

褐藻寡糖抗环磷酰胺诱导蚕豆根尖的细胞遗传毒性

卜宁 马莲菊* 江晓路¹ 王升厚

(沈阳师范大学化学与生命科学学院, 沈阳 110034; ¹ 中国海洋大学生命科学与技术学部, 青岛 266003)

摘要 采用蚕豆根尖细胞的微核试验和染色体畸变试验方法, 测定不同浓度的褐藻寡糖对环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)诱导的蚕豆根尖细胞的微核率、有丝分裂指数和染色体畸变率的影响。结果表明: 褐藻寡糖能有效抑制环磷酰胺诱导的蚕豆根尖细胞微核的产生, 即在一定浓度范围内, 微核率随褐藻寡糖处理浓度的降低而减少, 但低于一定浓度后反而呈上升趋势; 不同浓度的褐藻寡糖均可使蚕豆根尖细胞有丝分裂指数增大; 褐藻寡糖还能有效降低蚕豆根尖细胞染色体畸变率。因此, 褐藻寡糖对蚕豆根尖细胞具有明显的诱抗活性和调节细胞分裂生长的效应。

关键词 褐藻寡糖; 微核率; 有丝分裂指数; 染色体畸变率; 遗传毒理

寡糖(oligosaccharides)一般是由3~10个单糖(monosaccharide)分子通过糖苷键连接而成的化合物^[1], 广泛存在于生命体内。寡糖具有多种重要的生物活性, 如: 抗凝、抗病毒、增强免疫功能、抗肿瘤与抗炎等^[2,3]。寡糖是新一类生物诱抗剂, 具有可自然降解, 不污染环境, 无残留等优点^[4]。有关寡糖的研究与应用已成为结构化学、分子生物学、医学和食品学的新兴研究领域。褐藻寡糖(M-blocks、MG-blocks)是从褐藻胶中通过生物酶降解而成的海洋性寡糖。褐藻寡糖因其特殊的来源、结构和特点及与内源性寡糖的相似性而越来越受到关注^[2]。近年来的研究表明, 褐藻寡糖具有调节植物生长、诱导植物抗病能力的产生等生理活性^[5,6], 具有潜在的应用价值和广阔的开发前景。目前, 在海洋性寡糖的研究中, 有关壳寡糖已有不少研究报道^[7-9], 且在我国也有相关产品面世, 但至今尚未见褐藻寡糖对植物根尖细胞影响的报道, 为此我们进行了这方面的研究, 以探明褐藻寡糖对植物根尖细胞的诱抗活性, 为褐藻寡糖活性的研究开发与应用提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

蚕豆(*Vicia faba* L.)产于山东青岛, 为一年新种。环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)为上海华联制药有限公司生产, 用蒸馏水配制成4 μg/ml。褐藻寡糖(alginate-derived oligosaccharide, ADO)由中国海洋大学生命科学与技术学部提供, 用蒸馏水将其配制成10 g/L、5 g/L、2.5 g/L、1.25 g/L、0.625 g/L、0.3125

g/L、0.15625 g/L、0.078125 g/L共8个不同的浓度。

1.2 方法

1.2.1 幼苗培养 参照 Kanaya 等^[10]的方法, 选用饱满、大小均匀的蚕豆种子洗净于蒸馏水浸泡24 h, 待种子充分吸胀后, 放入铺有吸水纸的托盘中, 在23℃的恒温箱中催芽培养。其间每12 h换水1次。待根长至1 cm左右时用于毒性试验。

1.2.2 药物处理 选根长整齐一致的蚕豆幼苗随机分成18组, 即阴性对照组(蒸馏水组)、阳性对照组(CP)、不同浓度的ADO试验组(10 g/L、5 g/L、2.5 g/L、1.25 g/L、0.625 g/L、0.3125 g/L、0.15625 g/L、0.078125 g/L)、不同浓度的ADO+CP试验组[(10 g/L、5 g/L、2.5 g/L、1.25 g/L、0.625 g/L、0.3125 g/L、0.15625 g/L、0.078125 g/L ADO)+4 μg/ml CP], 每组在23℃下浸泡处理6 h, 用水洗净后恢复培养24 h。

1.2.3 根尖细胞制片 切取根尖, 用卡诺氏固定液(无水乙醇:冰醋酸=3:1)固定24 h, 置70%乙醇于4℃冰箱中保存。用Feulgen法染色, 常规制片。每组观察10个根尖, 每个根尖约1 000个细胞。

1.2.4 实验数据的统计分析 测定根尖细胞微核千分率(MCN‰)和抑制率(%)、有丝分裂指数以及染色体畸变百分率, 并对具有染色体畸变的细胞进行显微摄影。采用SPSS11.0数据处理系统进行方差分

收稿日期: 2006-11-01 接受日期: 2007-06-15

辽宁省自然科学基金资助项目(No.20052053)

* 通讯作者。Tel: 024-86593308, E-mail: malianju@tom.com

析。

$$\text{MCN } \% = \frac{\text{含有微核的细胞数}}{\text{观察细胞总数}} \times 1000$$

$$\text{抑制率 } \% = \frac{\text{对照组微核细胞数} - \text{试验组微核细胞数}}{\text{对照组微核细胞数}} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 ADO 对蚕豆根尖细胞遗传毒性的影响

2.1.1 不同浓度的 ADO 对蚕豆根尖细胞微核率的影响 由表1可见, 不同浓度 ADO 所处理的蚕豆根尖细胞微核率均明显低于阴性对照组 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$), ADO 对蚕豆根尖细胞微核的产生有显著的抑制作用, 抑制率均在 70% 以上; 在 10~0.625 g/L 浓度范围内, 微核率随 ADO 处理浓度降低而减小, 表现对处理浓度的正相关, 当浓度为 0.625 g/L 时, 微核率最低 (1.09 ± 1.33)%, 抑制率达 82.63%; 但随 ADO 浓度的进一步降低(即在 0.625~0.078125 g/L 浓度范围内)微核率反而增大, 微核率与处理浓度之间则表现为负相关, 抑制率呈下降趋势。

2.1.2 不同浓度的 ADO 对蚕豆根尖细胞有丝分裂指数的影响 蚕豆根尖经不同浓度的 ADO 处理后, 细胞的有丝分裂指数增加(表 1)。在浓度范围为 10~0.625 g/L ADO 处理中, 蚕豆根尖生长点细胞的有丝分裂指数随 ADO 浓度的降低而升高, 即 ADO 对蚕豆根尖细胞分裂的促进作用随 ADO 浓度降低而逐渐增强, 分裂指数与 ADO 浓度之间呈现负相关; 其中在 ADO 浓度为 1.25~0.3125 g/L 范围内, 蚕豆根尖细胞的有丝分裂指数与阴性对照组比较, 差异显著 ($P < 0.05$), 当浓度为 0.625 g/L 时, 分裂指数最高 (6.02 ± 2.25)%; 在浓度范围为 0.625~0.078125 g/L ADO 处理中, 有丝分裂指数随 ADO 浓度的降低而呈下降趋势, ADO 促进细胞分裂的作用会逐渐减弱。由此说明, 在一定浓度范围内, ADO 可以诱导蚕豆根尖细胞周期发生

明显的变化, 使细胞分裂间期缩短, 促进细胞进入分裂态, 从而导致根尖细胞有丝分裂指数上升。

2.1.3 不同浓度的 ADO 对蚕豆根尖细胞染色体畸变率的影响 由表1可见, ADO 有明显的降低蚕豆根尖细胞染色体畸变的作用。不同浓度 ADO 处理的蚕豆根尖细胞染色体畸变率均明显低于阴性对照组 ($P < 0.05$), 且在一定浓度范围(10~0.625 g/L)内, 染色体畸变率随 ADO 处理液浓度的降低而减小, 当 ADO 浓度为 0.625 g/L 时染色体畸变率最低 (3.35 ± 2.23)%, 此后随着 ADO 浓度的进一步降低(0.625~0.078125 g/L) 染色体畸变率反而升高。

2.2 ADO 对 CP 诱导蚕豆根尖细胞遗传毒性的影响

2.2.1 不同浓度的 ADO 对 CP 诱导蚕豆根尖细胞微核率的影响 实验发现, 不同浓度的 ADO 均能使 CP 诱发的蚕豆根尖细胞的微核率显著下降(表 2), 微核率与阳性对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$)。在 ADO 浓度为 10~0.625 g/L 范围内, 微核率随 ADO 处理浓度降低而减小, 当浓度为 0.625 g/L 时, 微核率最低 (3.66 ± 2.46)%, 抑制率最高达 87.14%; 而当浓度低于 0.625 g/L 后, 微核率则逐渐增大, 抑制率降低。由此可见, ADO 在一定浓度范围内能有效抑制 CP 所诱导的蚕豆细胞微核的形成, 对细胞内的遗传损伤具有较强的修复作用。

2.2.2 不同浓度的 ADO 对 CP 诱导蚕豆根尖细胞有丝分裂指数的影响 ADO 浓度的改变会影响 CP 诱导的蚕豆根尖细胞中有丝分裂指数(表 2)。在 10~0.078125 g/L 的 ADO 浓度范围内, 蚕豆根尖细胞中的有丝分裂指数呈先上升后下降的趋势。在浓度为 1.25 g/L 和 0.625 g/L 时, 其有丝分裂指数分别为 (8.47 ± 3.06)% 和 (8.65 ± 3.99)%, 明显高于阳性对照组 ($P < 0.05$)。

2.2.3 不同浓度的 ADO 对 CP 诱导蚕豆根尖细胞染

表 1 褐藻寡糖对蚕豆根尖细胞遗传毒性的影响

处理	浓度(g/L)	观察细胞数	微核率(%) $\bar{x} \pm s$	抑制率(%)	有丝分裂指数(%) $\bar{x} \pm s$	染色体畸变率(%) $\bar{x} \pm s$
阴性对照(H ₂ O)	0	10 352	6.28±3.95		2.91±1.98	10.60±9.68
ADO	10	11 134	1.69±1.23**	73.01	4.15±1.84	6.03±1.75*
	5	12 889	1.36±1.36**	78.34	4.29±2.93	5.20±2.43*
	2.5	10 226	1.28±1.43**	79.62	4.78±2.70	4.99±1.61*
	1.25	12 866	1.19±1.43**	81.05	5.33±1.63*	3.66±2.13*
	0.625	10 255	1.09±1.33**	82.63	6.02±2.25*	3.35±2.23*
	0.3125	10 969	1.17±1.45**	81.37	5.07±2.23*	4.04±1.47*
	0.15625	12 466	1.26±2.29**	79.93	3.67±2.05	4.92±1.03*
	0.078125	11 333	1.86±2.34*	70.38	3.09±2.85	5.79±2.55*

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

表2 褐藻寡糖对环磷酰胺诱导蚕豆根尖细胞遗传毒性的影响

处理	浓度		观察细胞数	微核率(%) $\bar{x} \pm s$	抑制率(%)	有丝分裂指数(%) $\bar{x} \pm s$	染色体畸变率(%) $\bar{x} \pm s$
	ADO (g/L)	CP (μ g/ml)					
阳性对照(CP)		4	10 277	28.46 $\pm$ 6.35		7.138 $\pm$ 2.97	13.49 $\pm$ 5.74
	10	4	10 283	13.13 $\pm$ 4.29**	53.87	5.70 $\pm$ 2.41	7.7 $\pm$ 2.31**
	5	4	10 376	9.39 $\pm$ 2.22**	67.01	6.69 $\pm$ 3.55	6.23 $\pm$ 2.9**
	2.5	4	10 217	5.60 $\pm$ 2.51**	80.32	7.04 $\pm$ 2.59	5.3 $\pm$ 2.38**
ADO+CP	1.25	4	10 184	4.41 $\pm$ 2.47**	84.5	8.47 $\pm$ 3.06*	5.06 $\pm$ 1.79**
	0.625	4	10 714	3.66 $\pm$ 2.46**	87.14	8.65 $\pm$ 3.99*	3.58 $\pm$ 2.57**
	0.3125	4	10 292	4.68 $\pm$ 1.46**	83.56	6.62 $\pm$ 2.69	4.16 $\pm$ 2.3**
	0.15625	4	10 153	5.42 $\pm$ 1.87**	80.96	5.17 $\pm$ 2.62	5.74 $\pm$ 2.32**
	0.078125	4	10 358	8.13 $\pm$ 2.51**	71.33	4.68 $\pm$ 2.68	6.99 $\pm$ 1.61**

与阳性对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

染色体畸变率的影响 ADO 对 CP 诱导的蚕豆根尖细胞的染色体畸变率的影响(表2)表明,各浓度的 ADO 均能使染色体畸变率显著下降。除 10 g/L 和 0.078125 g/L ADO 以外,其他各不同浓度(5~0.15625 g/L)ADO 的染色体畸变率与阳性对照组比较均差异极显著($P < 0.01$);染色体畸变率随 ADO 浓度的降低表现为先降低而后升高的态势,浓度为 0.625 g/L 时,染色体畸变率最低(3.58 $\pm$ 2.57)%。

2.3 蚕豆根尖细胞微核率、有丝分裂指数及染色体畸变率的关系

由图1、图2可清楚看到在 ADO 作用下,蚕豆根尖细胞以及由 CP 诱发的蚕豆根尖细胞微核率与有丝分裂指数和染色体畸变率之间的关系。在 10~0.625 g/L 浓度范围内,ADO 对蚕豆根尖细胞所受的遗传损伤的修复作用随着浓度的降低而逐渐增强,因此,微核率减少,染色体畸变率降低,但有丝分裂指数增加;在 0.625~0.078125 g/L 浓度范围内,随着 ADO 浓度的降低,对蚕豆根尖细胞所受的遗传损伤的修复作用却逐渐减弱,导致细胞微核率增加,染色体畸变

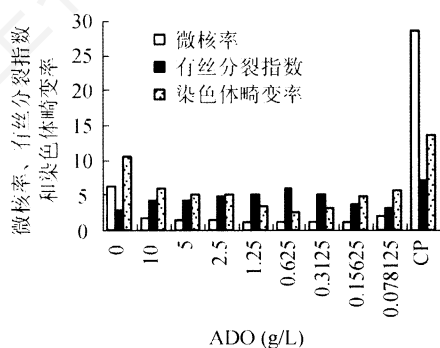


图1 ADO 作用下微核率与有丝分裂指数及染色体畸变率的关系

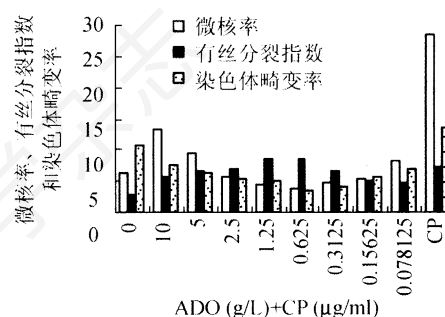


图2 ADO+CP 作用下微核率与有丝分裂指数及染色体畸变率的关系

率升高,而有丝分裂指数下降。微核率、染色体畸变率两者为正线性相关,而有丝分裂指数则表现出与两者的负线性相关。同时,在 0.625 g/L 浓度时 ADO 促分裂的能力也最强。

ADO 对 CP 诱导的蚕豆根尖细胞具有显著的诱抗作用,能有效抑制细胞中微核和染色体畸变的产生,其抑制作用在一定范围内随 ADO 浓度的降低而逐渐增强。ADO 的诱抗活性在 0.625 g/L 浓度时最强,微核率和染色体畸变率均最低。ADO 还能明显提高蚕豆根尖细胞有丝分裂指数,促进细胞分裂,从而具有促生长作用。ADO 是一种良好的诱抗活性物质,具有重要的开发潜力和应用价值。

参考文献 (References)

- [1] 郭忠武等. 化学进展, 1995, 7: 10
- [2] 张真庆等. 中国海洋药物杂志, 2003, (3): 51
- [3] Albersheim P et al. J Cell Biol, 1978, 78: 627
- [4] 邱 驰等. 中国生物防治, 2005, 21: 57
- [5] Akimoto C et al. Appl Microbiol Biotechnol, 1999, 52: 429
- [6] Iwasaki K et al. Biosic Biotechnol Biochem, 2000, 64: 1067

- [7] 马鹏鹏等。天然产物研究与开发, 2001, **13**: 82
[8] 郭红莲等。园艺学报, 2003, **30**: 577

- [9] 商文静等。西北农林科技大学学报(自然科学版), 2005, **33**: 73
[10] Kanaya N *et al.* *Mutat Res*, 1994, **310**: 231

Genetic Toxicity of Alginate-derived Oligosaccharide on *Vicia faba* Root Tip Cells

Ning Bu, Lian-Ju Ma*, Xiao-Lu Jiang¹, Sheng-Hou Wang

(College of Chemistry and Life Science, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China; ¹Division of Life Sciences and Technology, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract The effects of different concentrations of alginate-derived oligosaccharide (ADO) on *Vicia faba* root tip cells were studied. Micronucleus assay and chromosomal aberration assay were used to determine the mitotic index, the micronucleus rate and chromosomal aberration rate of *Vicia faba* root tip cells induced by cyclophosphamide (CP) under different concentrations of ADO. The result showed that ADO could effectively inhibit the micronucleus rate. During concentration of 10–0.625 g/L, the number of micronucleus of *Vicia faba* root tip cells were reduced with decrease concentration of ADO, but it was increased when concentration of ADO was lower than 0.625 g/L. The mitotic index was increased, while chromosomal aberration rate were lowed under all concentration of ADO. Turkey test showed all chromosomal aberration rate were significantly different from control ($P < 0.05$). So, ADO has an obvious effect on restraining chromosomal aberration and increasing division of cell of *Vicia faba* root tip.

Key words alginate-derived oligosaccharide; the micronucleus rate; mitotic index; the rate of chromosome aberration; genetic toxicity

Received: November 1, 2006 Accepted: June 15, 2007

This work was supported by the Natural Science Foundation of Liaoning Province (No.20052053)

*Corresponding author. Tel: 86-24-86593308, E-mail: malianju@tom.com