

昆明山海棠根部水抽提物对体外微管蛋白聚合的影响*

宋忠魁 梁子卿 汪旭**
(云南师范大学生命科学系 昆明 650092)

纺锤体在细胞分裂过程中的活动状态取决于纺锤丝微管组装与解聚之间的动态平衡。这种动态平衡对于染色体在细胞分裂时的正常分离具有极为重要的作用。微管蛋白正常的解聚和聚合作用是保证这一平衡的关键。微管蛋白聚合的抑制可导致有丝分裂阻滞进而诱发非整倍体,微管的超稳现象同样可以诱发非整倍体。

昆明山海棠(*Tripterygium Hypoglaucaum* (Level) Hutch, THH)是云南地方中草药,卫矛科雷公藤属,其主要成分为生物碱、萜类、内酯及皂甙,被广泛应用于治疗许多自身免疫性疾病,如类风湿性关节炎,系统性红斑狼疮等^[1]。用药后导致可逆性女性闭经和男性精虫减少^[2]。近年来,我们的系列工作表明,THH对哺乳动物体细胞和生殖细胞均具有较强的非整倍体诱发特性和其他基因毒性^[3-7],但其作用机制却一直未得以阐明。作为一种临床用药,对其遗传安全性以及其作用机制进行评价和探讨是一项十分重要的工作。为此,本研究通过药物作用下纯化猪脑微管蛋白的聚合/解聚动态的变化,探讨了THH诱发哺乳动物非整倍体的机制。

材料和方法

1. 微管蛋白的分离纯化

参照 Robley C^[8]提取微管蛋白的方法进行微管蛋白的分离纯化。

选体重为 145kg 左右的屠宰场家猪,常规宰杀后立即开颅取脑,除去脑膜,剪碎,每 100g 猪脑加入 75ml PM-4M 缓冲液,匀浆,6500g 离心 15min,取上清液于 96000g 离心 75min,收集上清液,以上工作均在 4℃ 进行。

在上述粗提物中,加入 GTP 使其终浓度为 1mmol/L,34℃ 水浴中温育 48min 使微管蛋白聚合;随

即于 27℃、96000g 离心 75min,弃上清液,在 4℃ PM 缓冲液中解聚 35min;4℃、96000g 超速离心 60min,收集微管蛋白(上清液);加入 PM-8M 缓冲液和 GTP 温育聚合,重复上一轮离心和解聚等纯化步骤,纯化的微管蛋白于液氮中储存备用。

2. 受试化合物

2.1 昆明山海棠(THH)根部水抽提物的制备

昆明山海棠购自昆明市医药公司。将根部粉碎物 100g,以 1000ml 双蒸水浸泡 1h,煮沸 3 次,每次 30min,滤渣,浓缩为 50ml(实际抽干得率为 4.8%)。-20℃ 保存备用。

2.2 秋水仙素(colchicine, COL)购自 Sigma 公司,用前以 PM-4M 缓冲液配制。

3. 缓冲液

缓冲液 PM(pH6.9):100mmol/L PIPES-NaOH, 2mmol/L EGTA, 1mmol/L MgSO₄, 2mmol/L dithioerythritol(DTE);缓冲液 PM-4M(pH6.9):除含 4mol/L 甘油外,其余同 PM 缓冲液;缓冲液 PM-8M(pH6.9):除甘油浓度为 8M 外,其余同 PM 缓冲液。

4. 微管蛋白含量的测定

按 Bradford 法测定蛋白溶液在 595nm 的光吸收值,所得微管蛋白的含量为 3.34-3.75mg/ml。

5. 微管蛋白鉴定

以 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳对样品进行分析鉴定。分离胶浓度 12% (pH8.8),浓缩胶浓度 7.5% (pH6.7),电压 25V。0.05% 考马斯亮蓝 R250 染色、照相、扫描。结果见图 1。

6. 微管蛋白聚合和解聚动态平衡反应

在冰浴的比色杯中加入 PM-4M 600μl、GTP (50mmol/L)30μl、微管蛋白溶液 1400μl 混合均匀,迅速

本文 2000 年 2 月 17 日收到,5 月 22 日接受。

* 国家自然科学基金(39660033)、云南省科委国际合作计划(98C013)资助。

** 通讯作者。

*** 本研究的许多工作承蒙中科院昆明动物研究所陆源高级工程师的大力协助,在此表示衷心地感谢!

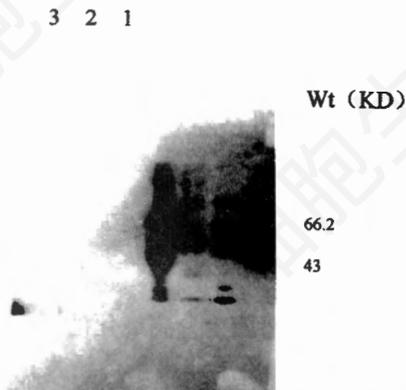


图1 猪脑中提纯的微管蛋白 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

1. 标准蛋白分子量标记,其中牛血清蛋白和兔肌动蛋白分子量分别为 66.2 和 43KD;2. 提纯的微管蛋白(52KD);3. 牛血清白蛋白和卵清蛋白混合样品。

放入岛津 UV-120-02 分光光度计的可控温样品池中, 37℃ 平衡 1min, 在 350nm 处测定微管蛋白多聚时的吸光值连续变化, 直至吸光值稳定为止; 随后在 2min 之内, 使样品池温度降至 4℃, 记录微管解聚时的吸光值变化。

7. 受试化合物对微管蛋白多聚的影响

在本节第 6 条所提及的反应系统中, 参考受试物在哺乳动物离体细胞发生作用的最低有效剂量^[11,12], 分别加入不同浓度的受试化合物 THH 和阳性对照物 COL, 记录 37℃ 时吸光值的连续变化。

结 果

1. 聚合/解聚反应平衡体系散点图

图 2 表现了微管蛋白聚合/解聚反应平衡体系的动态变化; 在 37℃ 条件下聚合(0 - 40min)和 4℃ 解聚合(40 - 60min); 该图平台区反映了在聚合条件下聚合/解聚合之间的动态平衡。

2. COL 对微管蛋白聚合反应的影响

参照文献 11 提供的 COL 对微管蛋白多聚的抑制浓度, 在本测试系统设定三个测试浓度: 0.0025mmol/L、0.0050mmol/L、0.0075mmol/L, 同时设溶剂对照。本实验中, COL 在 37℃ 时对微管蛋白聚合存在明显的抑制效应, 这与

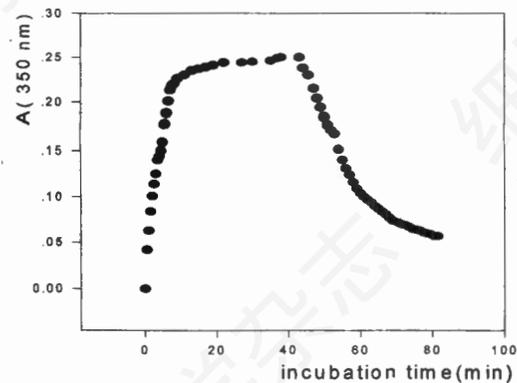


图2 微管蛋白在 37℃ (0 - 40min) 时的聚合与在 4℃ (40 - 60min) 时的解聚曲线, 平台区为聚合反应的平衡状态

COL 能结合于微管蛋白端部从而抑制管蛋白聚合作用的机制相符合。

3. THH 对微管蛋白多聚反应的影响

参照本实验室以往用 THH 所做的哺乳动物离体试验, 将其测试浓度设在 0.96 - 1.92 mg/ml 之间。图 3 提示了 THH 在 37℃ 时对微管蛋白的抑制呈明显的剂量——效应关系。

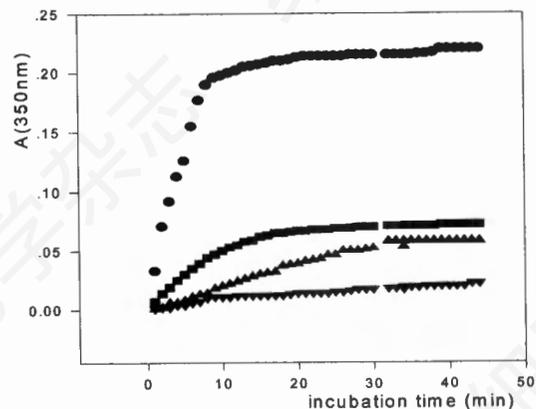


图3 THH 抑制微管蛋白多聚效应

●: 溶剂对照; ■: 0.96mg/ml; ▲: 1.44mg/ml; ▼: 1.92mg/ml。

讨 论

非整倍体诱发剂(aneugen)是一类通过引发细胞非整倍体(aneuploidy)产生, 导致体细胞癌变、自发流产和遗传病的遗传毒性因素。不

同的非整倍体诱发剂作用模式各自相异,它们的作用靶标通常不是染色体和 DNA,而是各种有丝分裂器(诸如中心粒、着丝点、纺锤体微管、着丝粒和细胞膜)、并与细胞膜胆碱能受体和多肽受体功能、第二信使的水平^[9,10]以及构成纺锤体微管的微管蛋白聚合状态密切相关。因此,探索各种不同类型非整倍体诱发剂作用机制,是对这一类遗传毒性物质进行有效监控、提高人类生存环境质量、减少人类遗传负荷的重要途径。

微管蛋白(tubulin)是构成微管的主要成分,包括 α 和 β 两种类型,两类分子联结在一起形成的二聚体(dimers)螺旋盘绕装配成微管的壁。微管和微管结合蛋白又进一步构成纺锤体。纺锤体作为有丝分裂装置,在维持染色体的平衡、运动、分配中起着重要的作用,纺锤体的结构、功能异常可诱发非整倍体。

我们的工作已发现,THH在哺乳动物体细胞和生殖细胞均具有较强的非整倍体诱发特性^[3-7],同时能显著诱发 V79 细胞的异常质裂,明显提高双核细胞频率^[12]。探讨 THH 诱发细胞非整倍体的机制因此而成为研究的焦点问题,本实验通过 THH 对微管蛋白体外聚合的影响研究提出其引起非整倍体的可能机制和途径。

图 1 展示了我们所使用的猪脑微管蛋白聚合/解聚系统的工作状况。在 37℃ 时,微管蛋白多聚并可达到一个聚合/解聚动态平衡状态,4℃ 时,微管迅速解聚。在该系统中加入不同浓度的阳性对照物 COL,发现在所有剂量组均迅速、显著地阻碍了微管蛋白的聚合,证实了该实验系统的可靠性和灵敏度。图 3 表明 THH 在该实验系统中对微管蛋白聚合表现显著的抑制作用,并呈明显的剂量——效应关系。研究证明了 THH 可抑制哺乳动物微管蛋白的体外聚合,提示 THH 中含有能够通过抑制微管蛋白

聚合进而影响纺锤体正常功能并诱发非整倍体的成分。鉴于我们的工作不断地发现 THH 的遗传毒性和不同的作用机制,对该药物进行深入的遗传毒性评价及其机制研究是很有必要的,对有关遗传终端指标需要活体实验的进一步证实。

摘 要

本研究利用猪脑中分离纯化的微管蛋白聚合和解聚反应,分析了非整倍体诱发剂昆明山海棠根部水抽提物(THH)对微管蛋白聚合状态的影响,从该角度探讨了 THH 诱发哺乳动物非整倍体的机制。秋水仙素(COL)为本研究的阳性对照物。结果发现:THH 能显著抑制体外微管蛋白的聚合,该抑制效应呈明显的剂量——效应关系。研究结果与我们以往关于 THH 为非整倍体诱发剂的实验证据相吻合并进一步提示 THH 可以抑制微管蛋白聚合作为诱发非整倍体的途径之一。

关键词: 昆明山海棠 微管蛋白多聚 非整倍体

参 考 文 献

- [1] 舒尚义,1978,中草药通讯,12:27-29.
- [2] 舒尚义,1983,云南中医杂志,4(6):43-44.
- [3] Wang Xu, et al., 1993, *Mutagenesis* 8(5):395-398.
- [4] 汪旭等,1995,遗传,17(5):21-23.
- [5] 汪旭等,1993,遗传,15(6):13-16.
- [6] 汪旭等,1993,遗传,15(3):16-19.
- [7] 汪旭等,1994,癌变 畸变 突变,6(4):1-5.
- [8] Robley C, et al., 1982, *Methods in enzymology*, Vol 85:376-381.
- [9] Onfelt A, et al., 1992, *Mutat Res*, 281:267-270.
- [10] Onfelt A, et al., 1992, *Mutat Res*, 270:97-102.
- [11] Buunner M, et al., 1991, *Mutagenesis*, 6(1):65-69.
- [12] 汪旭等,1998,云南师范大学学报,18(4):1-5.

A STUDY ON TUBULIN POLYMERIZATION IN VITRO AFFECTED BY *TRIPTERYGIUM HYPOGLAUCUM* (LEVEL) HUTCH

SONG Zhong Kui LIANG Zi Qing WANG Xu

(Department of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092)

ABSTRACT

The experiment employed tubulin from porcine brain to study the aneuploidy induction mechanism of the root extract of *Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch (THH) by analyzing the polymerization of tubulin. Colchicine was positive control of the experiment. The experiment found that THH can inhibit the polymerization significantly and showed a dose-effect relationship. The results was identical as our research before: THH is a aneugen in mammal. We concluded that one of a pathway of aneuploidy induction by THH was tubulin polymerization inhibiting.

Key words: *Tripterygium hypoglaucum* (Level) Hutch Tubulin polymerization Aneuploidy

实验技术

一种从琼脂糖凝胶上回收 DNA 的高效、快捷、经济的方法

姜勇 刘杰 陈伟明

(第一军医大学病理生理教研室和全军休克微循环重点实验室 广州 510515)

如何从琼脂糖凝胶上分离和提取 DNA 是分子生物学常见的一个问题。多年来已提出过多种从凝胶中回收 DNA 的方法,但没有一种方法尽如人意^[1]。近年来,二氧化硅基质(silica matrix),又称为玻璃奶(glass milk)的方法被广泛使用^[2],国外多家生物技术公司都推出相应的试剂盒,使琼脂糖凝胶 DNA 的提取,更加方便快捷,但这种试剂盒很昂贵,目前尚不适合在国内实验室推广。

这里我们报告一种制作简单、造价便宜并且十分有效的从琼脂糖凝胶上分离和提取 DNA 的方法。依据 Marziliazo 等人提出的方案^[3],我们设计了一种套式 DNA 回收装置用于琼脂糖凝胶的 DNA 回收,这种装置由四部分组成:一个 1.0ml 的蓝色吸头、一个 0.5ml PCR 管、一个 1.5ml EP 管和聚脂纤维填充物(polyester fiberfill, Poly-fil Supreme, Fairfield

Processing Corp., Danbury, CT, USA)。用其他多种普通纤维织物代替上述聚脂纤维也都具有类似的效果^[4]。其具体结构形式如图 1 所示。

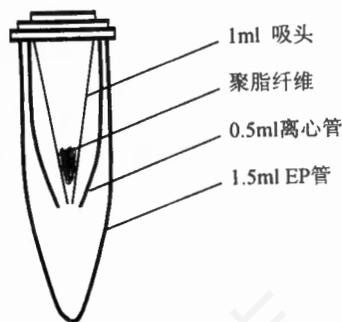


图 1 套式琼脂糖凝胶 DNA 回收装置的结构示意图

这种套式琼脂糖凝胶 DNA 回收装置的装配过程比较简单,如图 2 所示:首先将 0.5ml

本文 1999 年 1 月 26 日收到,6 月 28 日接受。