

## · 实验研究 ·

抗癌中药白毛藤对CHO细胞G<sub>2</sub>-PC染色体畸变的观察

南通医学院生物学教研室 曹济远 谭湘陵

**提要** 本文应用细胞融合及PCC技术研究抗癌中药白毛藤对CHO细胞各时相中PC染色体受损伤的效应。结果发现药物浓度在0.5—1.0克/毫升,处理45分钟后(37℃),G<sub>2</sub>-PC染色体有较明显的损伤作用,表现为有各种染色体畸变,如裂隙、断裂、交换、双着丝点等。提示该药物能明显阻断G<sub>2</sub>期细胞,在高剂量组1.0克/毫升时,尚可见到有少量的G<sub>1</sub>-PC染色体有裂隙、断裂的损伤。在三种剂量组中,发现该药对M期细胞无明显的直接作用。并对药物剂量与各期细胞的作用作进一步的探讨。

**关键词:** 白毛藤、细胞融合、PCC技术、PC染色体畸变。

抗癌中药白毛藤 *Solanum lyratum* Thunb 属茄科植物,全草可供药用。临床主治消化系统肿瘤有较好的疗效。据日本学者佐藤昭彦等报道<sup>[1]</sup>,在筛选800种抗癌中草药中,实验用细胞培养法,结果发现白毛藤对正常细胞无损伤,而对癌细胞有抑制作用。近年我国学者杨佩满等<sup>[2]</sup>,在研究国产抗癌药争光霉素时,已应用细胞融合,染色体提前凝集(Premature Chromosome Condensation简称PCC)的技术,以确定药物对PC染色体损伤的作用及药物杀伤细胞的具体周期时相,并可作连续观察损伤的修复或发展过程,从而可指导临床合理用药。本文在研究抗癌中药时就应用了PCC技术,以观察中药白毛藤对CHO细胞各时相中PC染色体受损伤的效应。

### 材料和方法

**细胞培养:** CHO细胞,用Eagle's培养液加10%小牛血清,在细胞瓶中培养3—4天后,使细胞进入对数生长期后备用。

**M期同步细胞的制备:** 当CHO细胞进入对数生长期后,加入秋水仙胺(0.05微克/毫升)8—9小时后,用震荡法收集M期细

胞,以备与间期细胞或M期细胞融合之用。

**药物提取:** 取生药白毛藤100克干重。流水洗净,加水煎沸30分钟后冷却,过滤加2倍量95%乙醇沉淀过夜,回收乙醇过滤,使药物浓缩为浓度10克/毫升生药备用。

**药物处理:** 每次实验取一并对数生长期的CHO细胞,用0.25%胰酶消化,用不加小牛血清的Eagle's培养液洗脱,制成细胞混悬液,等量分装成4个离心管中,每管约5毫升,分别加入药物处理,使加入药物后浓度分别为:0.25克/毫升;0.5克/毫升;1.0/毫升。第4管不加药物处理,作为空白对照组。药物作用时间为在37℃水浴中孵育45分钟,后离心(1000转/分,8分钟),去上清液,收集细胞,以备细胞融合之用。

**细胞融合:** 本实验方法参照Hanks<sup>[3]</sup>及叶秀珍<sup>[4]</sup>等报道略加修改,用50%PEG(国产,分子量1000),在溶化灭菌后加入等体积RPMI1640培养液,使成50%PEG(pH 7.4—7.6)作为融合剂。主要步骤如下。将上述药物处理组及空白对照组的CHO细胞与M期同步化CHO细胞融合,按1:1或1:2比例混合,用无血清的Eagle's培养液洗2次,离心去上清液,加入50%PEG 1毫

升，在37℃水浴下，缓慢沿管壁滴入混合细胞中，时间为1分钟，边滴边震荡，静置1分钟，加入无血清培养液洗二次，离心去上清液，加入有血清培养液，在37℃下温育45分钟，收集细胞。

**PCC标本制备：**收集悬浮细胞，离心去上清液，加入0.075M的KCl，在37℃下低渗处理20分钟，离心去上清液，加入甲醇、冰醋酸(3:1)的固定液，固定二次，每次15分钟，用洁净冰载玻片滴片，吹干，用Giemsa染色，制片观察PC染色体畸变的形态，计数，及显微摄影放大等。

表1 白毛藤对CHO细胞G<sub>2</sub>-PCC的作用

剂量 克/毫升)	G <sub>2</sub> -PCC 计数 (个)	染色体畸变/细胞			
		裂隙	断裂	交换	双着丝点
0.25	100	1.42	1.96	0.22	0.13
0.50	100	2.56	2.16	0.41	0.28
1.0	100	4.92	4.26	0.78	0.61
0	100	0.07	0.03	0	0

## 结 果

显微观察结果见表1。发现药物处理45分钟后，在三种不同剂量组中G<sub>2</sub>-PC染色体均有较明显的直接损伤作用。表现为G<sub>2</sub>-PC染色体的畸变，有裂隙、断裂、交换、双着丝点等图象，见图1、2、3。其损伤程度和药物剂量呈线性依赖关系。在0.5克/毫升、及1.0克/毫升剂量组中，可引起G<sub>2</sub>期细胞阻断，这主要机制是由于药物引起G<sub>2</sub>-PC染色体畸变所致。在高剂量组中，尚观察到有少量G<sub>1</sub>-PC染色体畸变，有裂隙和断裂的损伤。说明该剂量对G<sub>1</sub>期细胞亦可有少量的阻断作用。

药物对M期细胞的直接影响：应用秋水仙胺使CHO细胞阻断在M期，然后用震荡方法，分离出M期细胞，按上述方法用三种不同剂量进行药物处理45分钟(37℃)，第4

管作为空白对照，进行细胞融合及PCC标本制备，显微观察结果发现白毛藤对M期细胞染色体无损伤作用。提示该剂量对M期CHO细胞不起直接损伤作用。

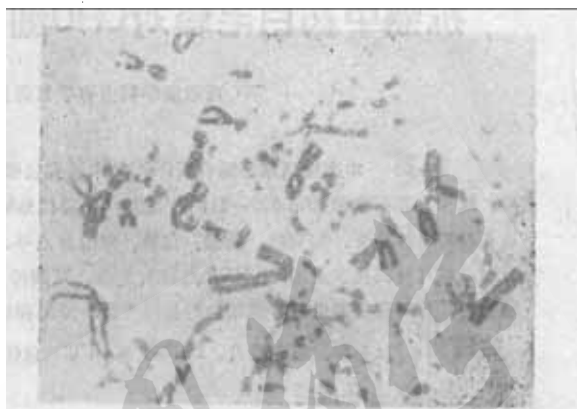


图1 G<sub>2</sub>-PC染色体，示裂隙、断裂剂量：0.5克/毫升×1520。

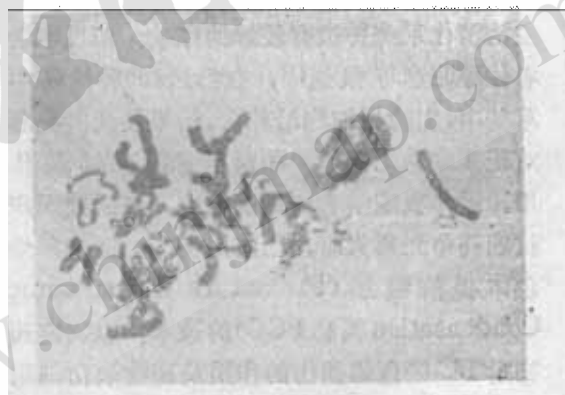


图2 G<sub>2</sub>-PC染色体，示交换、双着丝点。剂量：0.5克/毫升。×1520。



图3 G<sub>2</sub>-PC染色体，示裂隙，双着丝点，剂量：1.0克/毫升 交换×1520。

## 讨 论

PCC 是分裂期细胞与间期细胞融合后,使间期核染色质提前在间期内凝集成染色体的现象,这种提前凝集的染色体称 PC 染色体。使用 PCC 技术与中期细胞染色体技术相比,在测定染色体损伤的效应上有其独特的敏感性。因它能在损伤后 1 小时内从 PCC 图象中即可观察到。据 Schmiady H. 等报告<sup>[1]</sup>, PC 染色体的包装程度比相应中期染色体要低,通常可以看到更多的染色体畸变,成为一种较灵敏的技术指标。即使简单的损伤,如断裂和裂隙也可追踪观察到;而对复杂的畸变如交换,也能看到而不被修复。因此应用 PCC 技术能显示出其他方法所看不到的药物损伤效应。可确定药物杀伤细胞的具体周期时相,并可连续观察损伤的修复或发展的过程。

本研究应用 PCC 技术,发现白毛藤对 CHO 细胞  $G_2$ -PC 染色体有较明显的直接损伤作用,其机制为出现各种 PC 染色体的畸变。其损伤程度与药物剂量呈正相关性,对 M 期细胞无直接损伤作用。这一结果与 Hittelman 等报告<sup>[6]</sup>,博来霉素对 CHO 细胞  $G_2$ -PC 染色体损伤作用的结果较相似,但在除去药物作用后,继续在 37°C 孵育 4 小时,则损伤率可较明显降低,因此他们认为博来霉素致  $G_2$ -PC 染色体的损伤到达 M 期后相当一部份可以修复。但我们在本实验中并没有看

到这一修复的现象。

根据日本大阪中医研究所所长佐藤昭彦等的报告<sup>[1]</sup>,对 800 种中草药的体外实验中,选用对抗癌剂具有耐药性的人宫颈癌 JTC-26 细胞株和正常人纤维母细胞作对比,比较生存细胞数及测定细胞增殖抑制率。结果发现 10 种中草药对癌细胞有不同程度抑制作用,和所谓“双刃剑”作用(既能抑制癌细胞,也损害正常细胞)的抗癌剂不同,它们是不影响或较少影响正常细胞。特别是其中三种中药:仙鹤草,对癌细胞抑制率为 100%;对正常细胞无影响而能促进其增殖。白毛藤对癌细胞的抑制率为 100%,对正常细胞无任何影响。败酱根,对癌细胞抑制率为 98.2%,对正常细胞则促进增殖 100%。我们也做了上述三种药物的提取,按 PCC 技术方法只发现白毛藤一种是有效的,能产生 PC 染色体畸变,而对仙鹤草及败酱根,实验重复数次都无效。不起染色体畸变的作用。这可能是条件方法不同而结果各异,也可能是因药物产地不同而效果各异。

致谢:本室张弘、侯祥同志协助显微摄影谨致谢意。

## 参 考 文 献

- [1] 佐藤昭彦等, 汉方研究, 1979, 2:51.
- [2] 杨佩满等, 中华医学会全国肿瘤基础理论专题论文选编, 1982, p.192.
- [3] Hanks SK et al: Exp. Cell Res. 1982, 138:215.
- [4] 叶秀珍等, 实验生物学报, 1980, 13:205.
- [5] Schmiady, H. et al: Exp. Cell Res. 1981, 134:461.
- [6] Hittelman, WN. et al: Cancer Res. 1974, 34:3433.

## The damage effect of Chinese herb medicine Baimaoteng (Solanum lyratum) on $G_2$ -PC Chromosome in CHO cells

Cao Jiyuan Tan Xianling  
(Department of Biology, Natong Medical College)

### Abstract

The phenomenon of premature chromosome condensation, which involves the fusion of mitotic with interphase cells, was applied to the study of Solanum lyratum inducing chromosome damage in CHO cells. These results are striking in which much chromosome damage was observed in  $G_2$ -PCC (0.5—1.0 g/ml for 4.5 min at 37°C), and PCC were scored for aberrations: gaps, breaks, exchanges, and double centromere. In 1.0 g/ml dosage a little of chromosome damage was observed in  $G_1$ -PCC, but in all dosage treatment had no effect on the progression of cells in M phase.

KEY WORDS: Prematurely Condensed Chromosomes. CHO cell, Cell fusion, Chromosome aberrations.