



# 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对中国仓鼠肺细胞染色体畸变作用

高梅, 曹冲, 朱春花, 曲保恩

(山东省医药工业研究所, 山东省化学药物重点实验室, 山东 济南 250101)

**【摘要】** 目的 研究人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对中国仓鼠肺细胞 (CHL) 染色体畸变作用。方法 测定人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对 CHL 细胞的半数抑制浓度 (IC<sub>50</sub>), 根据 IC<sub>50</sub> 设立不同剂量组, 进行染色体畸变试验, 分别观察人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 接触 CHL 细胞 6 h、24 h 及加 S<sub>0</sub> 后 6 h 染色体的畸变情况, 根据标准进行结果判定。结果 染毒 6 h、24 h 及加 S<sub>0</sub> 后染毒 6 h 染色体畸变为阴性。结论 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 不能引起 CHL 细胞染色体产生畸变作用。

**【关键词】** 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>; 中国仓鼠肺细胞; 染色体畸变

**【中图分类号】** R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)08-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.008.004

## Effect of Ginsenoside Rb<sub>3</sub> on Chromosome Aberration in Chinese Hamster Lung Cells

GAO Mei, CAO Chong, ZHU Chun-Hua, QU Bao-En

(Shandong Institute of Pharmaceutical Industry, Shandong Provincial Key Laboratory of Chemical Drugs, Jinan 250101, China)

**【Abstract】 Objective** To explore the effect of ginsenoside Rb<sub>3</sub> on chromosome aberration in Chinese hamster lung (CHL) cells. **Methods** To determine the IC<sub>50</sub> of ginsenoside Rb<sub>3</sub> in CHL cells, and to establish the range of doses according to the IC<sub>50</sub> and induction of chromosome aberration. The results were judged according to the positive response standard. **Results** Negative response was found at 6 h and 24 h after the treatment with ginsenoside Rb<sub>3</sub> and at 6 h after the addition of S<sub>0</sub> mixture. **Conclusions** Under the conditions used in this study, ginsenoside Rb<sub>3</sub> does not induce chromosome aberration in CHL cells in vitro.

**【Key words】** Ginsenoside Rb<sub>3</sub>; Chinese hamster lung cells (CHL); Chromosome aberration

人参皂甙 Rb<sub>3</sub> (ginsenoside Rb<sub>3</sub>) 是人参二醇皂甙单体, 是人参皂甙发挥生物活性作用最重要的活性成分之一。研究表明, 人参皂甙 Rb<sub>3</sub> 具有清除氧自由基、保护中枢神经系统、保护心血管系统、拮抗钙离子、抗血小板聚集等作用<sup>[1-6]</sup>, 但对其毒理研究报道较少。染色体畸变试验是一种广泛应用的经典检测染色体损伤的技术, 在致突变物的作用下, 染色体或染色单体断裂, 可形成断片, 断端也可重

新连接或互换而表现出多种畸变类型。中国仓鼠肺细胞 (简称 CHL 细胞) 是药物遗传毒性研究技术指导原则中体外哺乳动物细胞染色体畸变试验常采用的细胞<sup>[7]</sup>。

本实验以 CHL 细胞为试验模型, 观察人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对细胞染色体畸变的影响, 评价 Rb<sub>3</sub> 体外细胞染色体的损伤情况, 预测其是否具有潜在的遗传毒性, 降低临床试验受试者和药品上市后使用人群的

用药风险。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 试剂: CHL 细胞购自中科院上海细胞库; 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对照品购自中国药品生物制品检定所, 分子量 1079, 批号 111686-200501; 胰酶购自 Solarbio 公司, 批号 20110516; RPMI 1640 购自赛默飞世尔生物化学制品(北京)有限公司, 批号 NXA0551; 新生牛血清购自杭州四季青公司, 批号 110110; 台盼蓝购自 Solarbio 公司, 批号 T8070; 注射用丝裂霉素购自浙江海正药业股份有限公司, 批号 100106; 环磷酸胺购自江苏恒瑞医药股份有限公司, 批号 11071821; 辅酶 II 购自上海源聚生物科技有限公司, 进口分装, 批号 100308; 6-磷酸葡萄糖购自 Sigma 公司, 批号 G7879; S<sub>9</sub> 活化系统制备: 取体重在 170 ~ 200 g 的健康 SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠, 腹腔注射 16 mg/mL 的苯巴比妥钠 2.5 mL/kg, 1 h 后, 腹腔注射给予浓度 20 mg/mL 的 β-萘黄酮-玉米油混悬液 2.5 mL/kg, 于第 5 天颈椎脱臼处死大鼠, 制备肝匀浆。匀浆以 9 000 r/min 离心 10 min, 取上清液(S<sub>9</sub>)分装, 液氮冷冻保存。临用时, 取 S<sub>9</sub> 进行 S<sub>9</sub> 混合液配制。S<sub>9</sub> 混合液组成: 0.5 mL S<sub>9</sub>, 3 mL 0.2 mol/L 磷酸盐缓冲液, 0.1 mL 1.65 mol/L 氯化钾溶液, 0.1 mL 0.4 mol/L 氯化镁溶液, 0.5 mL 0.05 mol/L 葡萄糖-6-磷酸钠盐溶液, 0.8 mL 0.025 mol/L 辅酶 II 溶液。其余试剂均为国产 AR。

1.1.2 仪器及器材: 倒置显微镜型号 BDS200, 重庆奥特光学仪器有限公司生产; 生物显微镜型号 SMART, 重庆奥特光学仪器有限公司生产; 二氧化碳细胞培养箱型号 BC-J160S, 上海博迅实业有限公司医疗设备厂生产; 台式低速离心机型号 TD5A-WS, 湘麓离心机仪器有限公司生产; 双人单面净化工作台型号 SW-CJ-2FD, 苏州净化设备有限公司生产; 24 孔细胞培养板, 美国 Corning 公司生产。

### 1.2 方法<sup>[8,9]</sup>

1.2.1 细胞培养: 由液氮中复苏冻存的 CHL 细胞, 培养液为 RPMI 1640 培养基, 使用前加入浓度为 100 单位/mL 的青霉素、链霉素抗生素, 10% 新生牛血清。细胞置 37℃、5% 的二氧化碳培养箱中培养。待细胞长满 70% ~ 80% 单层时, 用 0.25% 胰酶溶液进行消化、传代。取生长良好的细胞, 进行半数生长抑制浓度(IC<sub>50</sub>)测定和染色体畸变试验。

1.2.2 剂量设计: 通过细胞毒性试验计算细胞半数生长抑制浓度(IC<sub>50</sub>), 根据 IC<sub>50</sub> 设定染色体畸变试验剂量, 同时设阳性对照(直接诱变剂 MMC 及间接诱变剂 CP)和溶剂对照组。

1.2.3 半数生长抑制浓度(IC<sub>50</sub>)测定: 样品在无菌条件下配制, 用 CHL 细胞进行半数生长浓度测定, 选择浓度为 5、2.5、1.25、0.625、0.32 mg/mL 5 个浓度梯度剂量组测定 IC<sub>50</sub>。取对数生长期的细胞用 0.25% 胰酶消化处理, 制备成细胞悬液, 以 1640 完全培养液将细胞浓度调至 4 × 10<sup>5</sup> 个/mL, 吸取细胞悬液接种至 24 孔板中, 每孔 0.5 mL。24 h 后, 在无菌条件下配制不同浓度的药品(5、2.5、1.25、0.625、0.32 mg/mL), 每个浓度设 3 个平行孔, 并设空白对照孔。24 h 后将各孔培养液弃去, 用不完全培养液洗 1 遍后, 再加 300 μL 胰蛋白酶消化, 待各孔细胞脱落后加 700 μL 完全培养液终止消化并吹打混匀。吸取细胞悬液和台盼蓝稀释液各 50 μL 混匀, 染色 1 min, 血球计数板计数各组细胞数。以对照组的平均值为 100%, 计算加药组与对照组之间的比率。

1.2.4 统计学方法: 计算 3 孔的平均值和标准差, 试验数据采用( $\bar{x} \pm s$ )表示。用 DAS1.0 软件进行数据分析。

1.2.5 染色体畸变试验: 将贴壁生长良好的 CHL 细胞, 胰酶消化, 用培养液制成 4 × 10<sup>5</sup> 个/mL 细胞悬液, 分别接种到 75 mL 细胞培养瓶中, 8 mL/瓶, 在 37℃、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养。细胞密度达 80% ~ 90% 时, 加入 Rb<sub>3</sub> 溶液(根据 IC<sub>50</sub> 测定的结果, 3 个剂量组的终浓度分别为 3.35、1.68、0.84 mg/ml); 阳性对照组在不加 S<sub>9</sub> 混合液时, 加入 MMC 水溶液 0.2 mL, 其终浓度为 2 μg/mL; 加 S<sub>9</sub> 混合液时, 加入环磷酸胺水溶液 0.2 mL, 其终浓度为 120 μg/mL; 溶剂对照组为培养基。加 S<sub>9</sub> (0.4 mL) 混合液时, 细胞染毒 6 h 后, 倒掉加 S<sub>9</sub> 6 h 组和阳性组培养液, 用 PBS 洗涤细胞 2 ~ 3 次, 再加入完全培养液, 继续培养至 24 h, 收获细胞。不加 S<sub>9</sub> 混合液时, 染毒 6 h 和 24 h 后分别收获细胞。各组于终止培养前 4 h, 加入 16 μg/mL 秋水仙碱 0.2 mL, 终浓度为 0.4 μg/mL。按常规方法制作染色体标本并染色、镜检, 在相同试验条件下重复试验 1 次。试验各组选择分散较好的 200 个中期分裂相细胞, 计数每组的染色体畸变细胞。染色体畸变类型主要包括多倍体、断片、交换、环状染色体、微小体、内复制、染色体碎

裂、双着丝点染色体等,结果以百分率(%)表示。

1.2.6 结果判定标准:细胞畸变率 $\leq 5\%$ 为阴性(-);细胞畸变率 $\leq 10\%$ 为可疑( $\pm$ );细胞畸变率 $\leq 20\%$ 为阳性(+);细胞畸变率 $\leq 50\%$ 为阳性(++);细胞畸变率 $> 50\%$ 为阳性(+++),当试验结果为阳性时,各剂量组间细胞畸变率应有剂量-反应关系。如某一测试点细胞染色体畸变率呈现可重复性并有统计意义的增加,亦判断为阳性结果。

## 2 结果

### 2.1 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对 CHL 细胞的增殖抑制率及半数抑制浓度(表 1)

表 1 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对 CHL 细胞的增殖抑制率及半数抑制浓度

Tab. 1 The inhibitory effect on cell proliferation of the CHL cells by Rb<sub>3</sub> and its IC<sub>50</sub>

Rb <sub>3</sub> (mg/mL)	生存率 Survival	增殖抑制率 Inhibitionrate (%)	IC <sub>50</sub> (mg/mL)
5	30.67 ± 3.06*	72.29	3.35
2.5	79.33 ± 8.08*	28.31	
1.25	104.00 ± 6.00	6.02	
0.625	106.33 ± 2.52	3.92	
0.32	110.00 ± 8.00	0.60	
空白 Blank	110.67 ± 8.51	0	

\*  $P < 0.05$ , \*  $P < 0.01$ , compared with the negative control group.

### 2.2 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对 CHL 细胞染色体畸变率的影响

人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对 CHL 细胞染色体畸变作用的研究结果显示,Rb<sub>3</sub>高、中、低剂量组分别作用细胞 6 h 和 24 h,在加入 S<sub>0</sub>混合液和未加 S<sub>0</sub>混合液条件下所诱发的染色体畸变数均 $< 5\%$ ,其畸变率与阴性对照组相比差别均无显著性,且未呈现剂量-反应关系。而两次试验阳性对照组非代谢活化组的丝裂霉素 C 诱发产生的畸变率分别为 29% 和 27.5%;两次试验代谢活化组的环磷酰胺诱发产生的畸变率分别为 33% 和 28.5%,与阴性对照组相比差异具有显著性(表 2~4)。

## 3 讨论

CHL 染色体畸变试验是目前广泛应用的致突变试验方法之一,不但能判定染色体数目异常,尚能判定染色体结构变化,具有快速、灵敏的特点,其结果对于评价供试品的遗传毒性具有重要价值。目前,在试验研究中,中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL)是常用的细胞株之一,由于 CHL 细胞株的不同世代之间,在细胞周期时间和克隆形成率等参数上没有明显差异,便于控制实验条件,且不受动物体内营养及生理、免疫状态影响,因而能定量研究,

表 2 非代谢活化条件下染毒 6 h 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对 CHL 细胞染色体畸变率的影响

Tab. 2 Chromosome aberration test in CHL cells cultured with Rb<sub>3</sub> after treatment without S<sub>0</sub> for 6 hours

组别 Groups	剂量 Dosage	S <sub>0</sub>	作用时间 Treatment time (h)	细胞个数 Cell number	第 1 次 First time			第 2 次 Second time		
					畸变细胞/个 Aberrant cells	畸变率% Aberration rate	结果判定 Judgement	畸变细胞/个 Aberrant cells	畸变率% Aberration rate%	结果判定 Judgement
阴性对照组 Negative control		-	6	200	2	1.0	-	3	1.5	-
丝裂霉素 C Mitomycin C	2 μg/mL	-	6	200	58	29	++	55	27.5	++
人参皂苷 Rb <sub>3</sub>	0.84 mg/mL	-	6	200	1	0.5	-	2	1.0	-
	1.68 mg/mL	-	6	200	3	1.5	-	3	1.5	-
	3.35 mg/mL	-	6	200	2	1.0	-	3	1.5	-

表 3 非代谢活化条件下染毒 24 h 人参皂苷 Rb<sub>3</sub>对 CHL 细胞染色体畸变率的影响

Tab. 3 Chromosome aberration test in CHL cells cultured with Rb<sub>3</sub> after 24 h treatment without S<sub>0</sub>

组别 Groups	剂量 Dosage	S <sub>0</sub>	作用时间 Treatment- time (h)	细胞个数 Cell number	第 1 次 First time			第 2 次 Second time		
					畸变细胞/个 Aberrant cells	畸变率% Aberration rate	结果判定 Judgement	畸变细胞/个 Aberrant cells	畸变率% Aberration rate	结果判定 Judgement
阴性对照组 Negative control		-	24	200	2	1.0	-	1	0.5	-
丝裂霉素 C Mitomycin C	2 μg/mL	-	6	200	58	29	++	55	27.5	++
人参皂苷 Rb <sub>3</sub>	0.84 mg/mL	-	24	200	2	1.0	-	2	1.0	-
	1.68 mg/mL	-	24	200	3	1.5	-	3	1.5	-
	3.35 mg/mL	-	24	200	3	1.5	-	4	2.0	-

**表 4** 代谢活化条件下染毒 6 h 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对 CHL 细胞染色体畸变率的影响  
**Tab. 4** Chromosome aberration test in CHL cells cultured with Rb<sub>3</sub> after treatment with S<sub>9</sub> for 6 hours

组别 Groups	剂量 Dosage	S <sub>9</sub>	作用时间/h Treatment time	细胞个数 Cell number	第一次 First time			第二次 Second		
					畸变细胞/个 Aberrant cells	畸变率% Aberration rate	结果判定 Judgement	畸变细胞/个 Aberrant cells	畸变率% Aberration rate	结果判定 Judgement
阴性对照组替么 Negative control	/	+	6	200	2	1.0	-	3	0.5	-
环磷酰胺 Cyclophosphamide	120 μg/mL	+	6	200	66	33	++	57	28.5	++
	0.84 mg/mL	+	6	200	3	1.5	-	1	0.5	-
人参皂苷 Rb <sub>3</sub>	1.68 mg/mL	+	6	200	2	1.0	-	2	1.0	-
	3.35 mg/mL	+	6	200	3	1.5	-	3	1.5	-

重复性也好,且能传代保存,便于进行形态学和超微结构等观察,并进行细胞化学、生物化学等分析,被广泛用于染色体畸变试验的研究<sup>[10]</sup>。人参皂苷单体 Rb<sub>3</sub>具有广泛的药理活性,对它的研究主要集中在其对缺血性损伤的保护、线粒体损伤的保护作用及清除氧自由基、拮抗钙离子和抗血小板聚合可抗血栓形成等的功效方面<sup>[11]</sup>,但对其毒理研究报道甚少,尤其是遗传毒性的问题。因此,本试验以 CHL 细胞为研究对象对人参皂苷 Rb<sub>3</sub>遗传毒性进行了评价。

本实验中人参皂苷 Rb<sub>3</sub>共设 3 个试验浓度,分别为 3.35、1.68、0.84 mg/mL,并设溶剂对照和阳性对照,分别在 6 h 和 24 h 收获细胞,进行染色体畸变分析,未见 CHL 细胞染色体畸变率增高作用。而直接诱变剂 MMC 的染色体畸变率为 29% 和 27.5%,间接诱变剂 CP 在 S<sub>9</sub> 活化条件下染色体畸变细胞率为 33% 和 28.5%,呈明显的阳性反应,表明本试验系统可靠,因此,在本试验条件下,人参皂苷 Rb<sub>3</sub>在体外 CHL 细胞染色体畸变试验中结果为阴性,表明人参皂苷 Rb<sub>3</sub>在体外不能引起 CHL 细胞染色体畸变率增加。由于本实验属于体外实验,虽然应用了体外活化系统,但体外活化毕竟不同于整体动物体内,因此,人参皂苷单体 Rb<sub>3</sub>在体内对染色体的作用及其它毒性资料,如急性毒性、长期毒性等还需要进一步的动物体内试验研究。

**参考文献:**

[ 1 ] 江山,姜正林,曾因明. 九种人参皂甙单体抗脑缺血损伤作

用研究 [J]. 中药药理与临床, 2007, 23(2):19-21.  
 [ 2 ] Zhu JR, Tao YF, Lou S, et al. Protective effects of ginsenoside Rb(3) on oxygen and glucose deprivation-induced ischemic injury in PC12 cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2010, 31(3): 273-280.  
 [ 3 ] Wang T, Yu X, Qu S, et al. Effect of ginsenoside Rb<sub>3</sub> on myocardial injury and heart function impairment induced by isoproterenol in rats [J]. Eur J Pharmacol, 2010, 636(1-3): 121-125.  
 [ 4 ] 韩冬,于晓风,曲绍春,等. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对大鼠实验性心室重构的影响及其机制 [J]. 吉林大学学报(医学版), 2010, 36(6):1047-1051.  
 [ 5 ] 江炜炜,姜正林,柯开富. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 对缺血及正常神经元持续性钠电流的影响 [J]. 药学与临床研究, 2007, 15(6):444-448.  
 [ 6 ] 崔秀明,徐璐珊,王强. 人参皂苷 Rb<sub>3</sub> 的抗血小板和抗血栓作用 [J]. 中成药, 2008, (10):1526-1528.  
 [ 7 ] 药物遗传毒性研究技术指导原则[S]. 国家食品药品监督管理局药品审评中心,2007:26-28.  
 [ 8 ] 袁伯俊,廖明阳,李波. 药物毒理学试验方法与技术 [M]. 北京:化学工业出版社. 2007:268-269.  
 [ 9 ] 盛卸晃,刘妹,刘兆平. PT-141 染色体畸变试验[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 326-327.  
 [ 10 ] 刘丹卓,尤昭玲,赵新广. 通络丹对 CHL 细胞株染色体畸变影响的研究 [J]. 光明中医,2009, 24(11): 2090-2092.  
 [ 11 ] 卜其涛,刘文丛,郑毅男,等. 人参皂苷 R<sub>(b3)</sub> 的研究进展 [J]. 人参研究, 2011, (3):26-30.

[ 修回日期 ]2012-05-02