

黄芪多糖对甲醛染毒人 BMSCs 染色体损伤的保护作用

舍雅莉, 张秋菊, 李亚玲, 张立, 张国欣, 张磊, 刘永琦, 李长天*

(甘肃中医药大学 甘肃省高校重大疾病分子医学与中医药防治研究省级重点实验室,
敦煌医学与转化省部共建教育部重点实验室, 兰州 730000)

[摘要] **目的:** 研究黄芪多糖(APS)对甲醛染毒人骨髓间充质干细胞(BMSCs)微核形成、姐妹染色单体互换(SCE)频率升高的保护作用及潜在的机制。**方法:** 体外培养人 BMSCs, 随机分为空白组, 甲醛组, APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹ 组。用 120 μmol·L⁻¹ 甲醛染毒人 BMSCs, 染毒同时, APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹ 组分别加入 40, 100, 400 mg·L⁻¹ APS 共培养。利用倒置相差显微镜观察细胞形态, 微核实验检测微核形成情况, 姐妹染色单体互换实验检测 SCE 发生频率, 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)和蛋白免疫印迹法(Western blot)检测增殖细胞核抗原(PCNA), 着色性干皮病基因 B, D, F, G(XPB, XPD, XPF, XPG) mRNA 和蛋白表达情况。**结果:** 与空白组比较, 甲醛染毒人 BMSCs 细胞数量明显减少, 形态明显改变, APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹ 作用后, 细胞数量和形态均有所恢复。甲醛组微核形成及 SCE 发生频率较空白组显著升高($P < 0.01$), PCNA mRNA 和蛋白表达明显降低($P < 0.05$), XPB, XPD, XPF 和 XPG mRNA 和蛋白表达明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); 与甲醛组比较, APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹ 作用后, 微核形成及 SCE 发生频率显著降低($P < 0.01$), PCNA, XPB, XPD, XPF 和 XPG mRNA 和蛋白表达均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 APS 100 mg·L⁻¹ 组效果最为明显。**结论:** APS 可以保护甲醛染毒人 BMSCs 减少微核形成和 SCE 发生频率, 100 mg·L⁻¹ APS 保护作用最为明显, 其机制可能与上调核苷酸切除修复通路 PCNA, XPB, XPD, XPF 和 XPG 基因表达, 促进损伤修复有关。

[关键词] 黄芪多糖; 甲醛; 骨髓间充质干细胞; 微核; 姐妹染色单体互换

[中图分类号] R2-0; R22; R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2020)02-0066-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20192205

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20190807.1121.002.html>

[网络出版时间] 2019-08-07 15:46

Protective Effect of Astragalus Polysaccharide on Chromosome Damage in Human BMSCs Exposed to Formaldehyde

SHE Ya-li, ZHANG Qiu-ju, LI Ya-ling, ZHANG Li, ZHANG Guo-xin, ZHANG Lei,
LIU Yong-qi, LI Chang-tian*

(Provincial Key Laboratory for Molecular Medicine of Major Diseases and Traditional Chinese Medicine (TCM) Prevention and Treatment Research, Key Laboratory of Dunhuang Medicine and Transformation co-constructed by Gansu Provincial Government and Minister of Education, Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China)

[Abstract] **Objective:** To study the protective effect of astragalus polysaccharide (APS) on micronucleus and sister chromatid exchange (SCE) in human bone marrow mesenchymal stem cell (BMSCs) exposed to formaldehyde, in order to initially explore the potential mechanism. **Method:** BMSCs were cultured *in vitro*, cells were randomly divided into five groups: control group, formaldehyde group, and APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹ groups. BMSCs were infected with 120 μmol·L⁻¹ formaldehyde, meanwhile, APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹ groups were co-cultured with 40, 100, 400 mg·L⁻¹ APS. Cell morphology was observed by inverted phase contrast

[收稿日期] 20190505(022)

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81560667);甘肃省自然科学基金项目(1506RJZA045)

[第一作者] 舍雅莉, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: sheyali@sina.com

[通信作者] *李长天, 硕士, 教授, 硕士生导师, 从事中医药防治肿瘤研究, E-mail: 715357951@qq.com

microscope, micronucleus were detected by micronucleus test, SCE was detected by SCE test, and mRNA and protein expressions of proliferating cell nuclear antigen (PCNA), xeroderma pigmentosum B, D, F, G (XPB, XPD, XPF, XPG) were detected by quantitative real-time fluorescence polymerase chain reaction (Real-time PCR) and Western blot. **Result:** Compared with control group, cell counts decreased, and cell morphology of BMSCs in formaldehyde group significantly changed, they were all recovered gradually in 40, 100, 400 mg·L⁻¹ APS groups. Compared with control group, the micronucleus and SCE increased significantly ($P < 0.01$), PCNA mRNA and protein expressions down-regulated significantly ($P < 0.05$), while XPB, XPD, XPF, XPG mRNA and protein expressions up-regulated significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with formaldehyde group, BMSCs were treated with APS at 40, 100, 400 mg·L⁻¹, micronucleus and SCE decreased significantly ($P < 0.01$), and mRNA and protein expressions of PCNA, XPB, XPD, XPF and XPG up-regulated significantly ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Among them, the 100 mg·L⁻¹ APS group had the most obvious effect. **Conclusion:** APS can protect formaldehyde-induced BMSCs micronucleus and SCE, especially 100 mg·L⁻¹ APS has the most obvious effect. The mechanism may be associated with the up-regulation of expressions of PCNA, XPB, XPD, XPF and XPG in the nucleotide excision repair pathway (NER), which promoted the damage repair.

[**Key words**] astragalus polysaccharide; formaldehyde; bone marrow mesenchymal stem cell; micronucleus; sister chromatid exchange

人骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 是存在于骨髓当中、具有多向分化潜能的干细胞,能调节造血干细胞的增殖和分化,因此对于维持骨髓造血微环境的稳定具有重要意义^[1-2]。甲醛作为一种环境污染物对机体多种细胞具有毒性作用,有报道甲醛不但可以诱发人骨髓血祖细胞和小鼠骨髓中嗜多染红细胞的染色体损伤程度增加,也可诱发鼠 BMSCs 微核形成及姐妹染色单体互换 (SCE) 频率的升高^[3-5]。因此,甲醛通过对骨髓造血系统产生毒性损伤,从而影响骨髓的正常造血,可能导致白血病的发生。

黄芪具有补气升阳、益卫固表、利尿消肿、托毒生肌之功效,始载于《神农本草经》,谓其“主痈疽,久败疮,排脓,止痛,大风癰疾,五痔,鼠瘻”,列于上品,是常用补益药之一。我国临床常用于各类中晚期癌症患者的扶正固本方剂中,如当归补血汤、补中益气汤等,对提高患者近期、远期疗效都有益处。近年来,国内对其主要活性成分——黄芪多糖 (APS) 抗肿瘤作用的研究较为活跃^[6-7],但其在白血病方面,尤其对甲醛的毒性防护作用少有报道。本研究用 APS 多糖干预甲醛环境中的人 BMSCs,通过检测微核形成及姐妹染色单体互换频率来研究 APS 的保护作用,并试图从分子水平探讨 APS 的作用机制,为黄芪防护甲醛对机体的毒性作用提供实验依据。

1 材料

1.1 细胞株 人骨髓间充质干细胞 (BMSCs) 购自于美国 Cyagen Biosciences 公司,批号

HUXMA-01001。

1.2 药物与试剂 APS (北京索莱宝科技有限公司,批号 SA9790,质量分数 $\geq 98\%$); 甲醛 (美国 Sigma 公司,批号 47608,质量分数 37%); 人 BMSCs 完全培养基, ECL 超敏发光液 (美国 Cyagen Biosciences 公司,批号分别为 HUXMA-90011, HM30A-LB); 秋水仙素, Giemsa, Brdu (北京索莱宝科技有限公司,批号分别为 SC8400, G8220, B8010); 增殖细胞核抗原 (PCNA), 着色性干皮病基因 D, F, G (XPD, XPF, XPG), 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体, 山羊抗兔免疫球蛋白 (Ig) G (江苏睿瀛生物有限公司,批号分别为 RLM3031, RLN0325, RLT1615, RLT4915, RLM3029, RS0007); XPB (美国 CST 公司,批号 8746); Western 及 IP 细胞裂解液 (上海碧云天生物技术有限公司,批号 P0013); PVDF 膜 (美国 Millipore 公司,批号 IPVH00010); trizol 总 RNA 提取试剂盒, 第一链 cDNA Synthesis Kit, 2 倍 SYBR Green qPCR mix (德国 Qiagen 公司,批号分别为 74106, 205311, 330502)。

1.3 仪器 MCO-18AIC 型 CO₂ 细胞培养箱 (日本三洋电机公司); BX51 型倒置式基础型相差显微镜及成像系统 (日本奥林巴斯株式会社); CFX96™ 型实时荧光定量聚合酶链式反应 (Real-time PCR) 仪, Chemi DOC XRS + 型凝胶成像系统, Mini Protean Tetra Cell Mini Trans-blot cell 型蛋白核酸凝胶电泳转印系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及分组 人 BMSCs 专用完全培养基,置于 5% CO₂ 37 °C 饱和湿度的培养箱中培养。每 2~3 d 换 1 次液,待细胞达到 80%~90% 融合时,0.25% 胰酶消化传代,第 5 代细胞用于实验。实验分为空白组,甲醛组,APS 40,100,400 mg·L⁻¹ 组。空白组用 BMSCs 专用完全培养基,甲醛组用含终质量浓度为 120 μmol·L⁻¹ 甲醛的 BMSCs 专用完全培养基,APS 组用含终浓度为 40,100,400 mg·L⁻¹ APS 和 120 μmol·L⁻¹ 甲醛的 BMSCs 专用完全培养基,培养 24 h 后进行后续实验。APS 组给药质量浓度根据细胞增殖活性结果进行确定,40 mg·L⁻¹ APS 开始促进 BMSCs 增殖,400 mg·L⁻¹ APS 开始抑制细胞增殖。

2.2 微核实验 胰酶消化、收集细胞,KCl 溶液低渗 3 min,固定,滴片,Giemsa 染色。每张玻片随机观察细胞 1 000 个,细胞中含有的微核多数呈圆形,边缘光滑整齐,直径为主核的 1/16~1/3,无折光性,与主核不相连,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色,一个细胞内可以出现 1 个或多个微核。统计出现微核的细胞数目,微核细胞率(‰) = 具有微核的细胞总数/观察细胞总数 × 1 000‰。

2.3 姐妹染色单体互换实验(SCE) 细胞分组培养 24 h 后,加入终质量浓度为 10 mg·L⁻¹ BrdU 继续避光培养 48 h,秋水仙碱终止培养,胰酶消化、收集细胞。加入 KCl 溶液低渗 20 min,固定、滴片,紫外灯照射 30 min 后,Giemsa 染色。选择染色体分散和差别染色良好、数目为 46 条的中期分裂相进行拍照和观察计数,凡在染色体端部出现的交换计为 1 个 SCE,中部出现的交换计为 2 个 SCE,着丝粒处发生的交换在判明不是 2 个染色单体扭转者计为 1 个 SCE。各组计数 20 个中期分裂相,SCE 交换频率(次/中期分裂相) = SCE 总交换次数/中期分裂相数。

2.4 Real-time PCR 检测 PCNA,XPB,XPD,XPF 和 XPG mRNA 表达情况 细胞分组培养 24 h 后,根据 trizol 法提取细胞总 RNA,按照逆转录反应试剂盒说明书,合成 cDNA,按照 Real-time PCR 试剂盒说明书,检测 mRNA 表达水平。mRNA 引物序列为 GAPDH 上游 5'-ATGTTTACATGTTCCAATATG-3',下游 5'-ATTTTGGAGGGATCTCGCTC-3',产物长度 128 bp;PCNA 上游 5'-ATGTTTCGAGGCGCGCCT-3',下游 5'-ACCAAAGAGACGTGGGAC-3',产物长度 143 bp;XPB 上游 5'-ATGGGCAAAAGAGACCGAG-3',下游 5'-AACCGCTTCTGAGGGTC-3',产物长度

116 bp;XPD 上游 5'-ATGAAGCTCAACGTGGACG-3',下游 5'-ATCTCCAGGACTCCATGAC-3',产物长度 125 bp;XPF 上游 5'-TCCTTACCACCTTCTCCA-3',下游 5'-GAGGTGTTCAACTCCTTCT-3',产物长度 121 bp;XPG 上游 5'-CCTGGCTGTTGATATTAGC-3',下游 5'-TAAGAGTTTGCAGAGCCGA-3',产物长度 121 bp。根据公式:ΔC_t = C_t 均值 - 管家基因的 C_t 均值,ΔΔC_t = ΔC_t(药物组) - ΔC_t(空白组),计算得出各基因表达的 ΔC_t 和 ΔΔC_t 值。通过 2^{-ΔΔC_t} 计算实验组各 mRNA 的相对表达水平。

2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 PCNA,XPB,XPD,XPF 和 XPG 蛋白表达情况 细胞分组培养 24 h 后,加入裂解液 200 μL,细胞刮棒刮取、收集细胞。12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液,按 BCA 法测定蛋白浓度。按 1:3 的比例加入上样缓冲液,煮沸变性,-20 °C 冰箱备用。配置 SDS-PAGE 凝胶,电泳,PVDF 转膜后脱脂牛奶封闭 2 h,4 °C 孵育一抗(1:1 000)过夜,TBST 洗膜后室温孵育二抗(1:4 000)2 h,ECL 发光剂显影成像。用 Quantity One 图像分析软件分析各目的条带与相应 GAPDH 的灰度比值,表示各蛋白的相对表达水平。

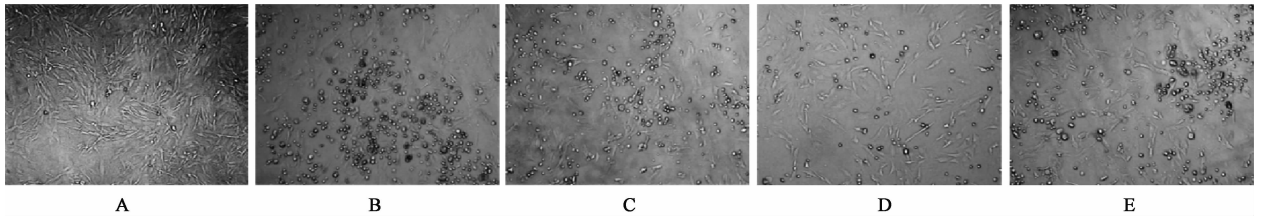
2.6 统计学方法 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析,多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析,以 P < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对甲醛染毒 BMSCs 细胞形态的影响 空白组 BMSCs 贴壁生长,呈长梭形或星形,大小较一致,排列紧密呈旋涡状。甲醛组细胞数量减少,部分细胞悬浮,体积缩小且大小不一,呈圆形,甚至表现为不规则形状。APS 40,100,400 mg·L⁻¹ 组,与甲醛组比较,细胞数量明显增加,少部分细胞悬浮,呈圆形,以 100 mg·L⁻¹ APS 组最为明显。见图 1。

3.2 对甲醛染毒 BMSCs 微核的影响 微核实验结果显示与空白组比较,甲醛作用 BMSCs 形成微核率显著升高(P < 0.01);与甲醛组比较,APS 40,100,400 mg·L⁻¹ 作用后,微核率显著降低(P < 0.01),以 APS 100 mg·L⁻¹ 作用最为明显。见图 2,表 1。

3.3 对甲醛染毒 BMSCs SCE 的影响 与空白组比较,甲醛导致 BMSCs 每个中期分裂相的 SCE 频率升高(P < 0.01)。与甲醛组比较,APS 40,100,400 mg·L⁻¹ 作用后,BMSCs 每个中期分裂相的 SCE 频率显著降低(P < 0.01)。其中 100 mg·L⁻¹ APS 作用组与空白组无明显差异。见图 3,表 1。



A. 空白组; B. 甲醛组; C. APS 40 mg·L⁻¹; D. APS 100 mg·L⁻¹; E. APS 400 mg·L⁻¹ (图 2~4 同)

图 1 APS 对甲醛染毒 BMSCs 细胞形态的影响(倒置显微镜, ×200)

Fig. 1 Effect of APS on morphology of formaldehyde-contaminated BMSCs(inverted microscope, ×200)

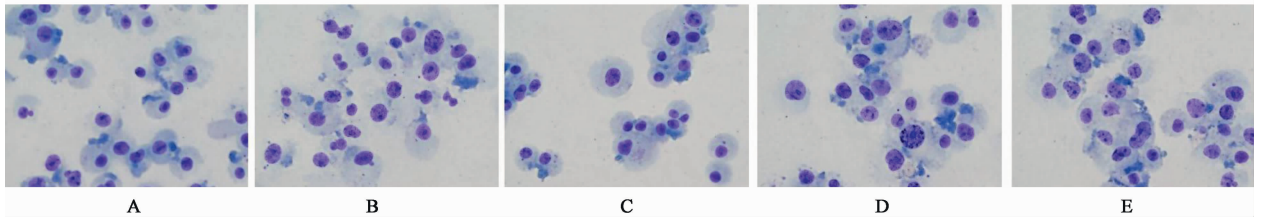


图 2 APS 对甲醛染毒 BMSCs 微核的影响(Giemsa, ×400)

Fig. 2 Effect of APS on micronucleus in formaldehyde-contaminated BMSCs(Giemsa, ×400)

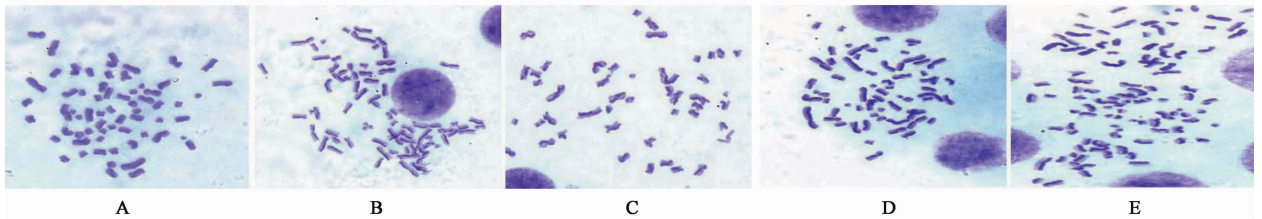


图 3 APS 对甲醛染毒 BMSCs SCE 的影响(Giemsa, ×1 000)

Fig. 3 Effect of APS on SCE in formaldehyde-contaminated BMSCs(Giemsa, ×1 000)

表 1 APS 对甲醛染毒 BMSCs SCE 和微核的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of APS on micronucleus and SCE in formaldehyde-contaminated BMSCs($\bar{x} \pm s$)

组别	质量浓度/ mg·L ⁻¹	微核率% (n=3)	SCE/mitosis (n=20)
空白	-	2.00 ± 0.63	0
甲醛	-	85.33 ± 4.93 ²⁾	13.42 ± 2.76 ²⁾
APS	40	47.50 ± 4.64 ⁴⁾	5.71 ± 1.98 ⁴⁾
	100	24.50 ± 3.62 ⁴⁾	2.14 ± 0.90 ⁴⁾
	400	32.67 ± 3.39 ⁴⁾	5.00 ± 1.83 ⁴⁾

注:与空白组比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与甲醛组比较³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2,3 同)。

3.4 对甲醛染毒 BMSCs PCNA, XPB, XPD, XPF 和 XPG mRNA 表达的影响 与空白组比较,甲醛作用时,PCNA mRNA 表达明显下调($P < 0.05$);与甲醛组比较,而在 APS 40,100,400 mg·L⁻¹作用后,表达显著上升($P < 0.01$);与空白组比较,XPB, XPD, XPF 和 XPG mRNA 在甲醛, APS 40, 100, 400 mg·L⁻¹作用后均较空白组明显升高($P < 0.05$,

$P < 0.01$),与甲醛组比较,PCNA, XPB, XPD, XPF 和 XPG mRNA 表达均在 APS 40,100,400 mg·L⁻¹作用时明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见表 2。

3.5 对甲醛染毒 BMSCs PCNA, XPB, XPD, XPF 和 XPG 蛋白表达的影响 与空白组比较,PCNA 蛋白在甲醛作用时表达明显下调($P < 0.01$),与甲醛组比较,在 APS 40,100,400 mg·L⁻¹作用后表达明显上升($P < 0.01$),其中 APS 100 mg·L⁻¹升高最为明显;与空白组比较,XPB, XPD, XPF 和 XPG 蛋白表达在甲醛, APS 40,100,400 mg·L⁻¹作用后均明显升高($P < 0.01$),以 APS 100 mg·L⁻¹升高最为明显,并且 APS 40,100,400 mg·L⁻¹组升高较甲醛组有明显差异($P < 0.05$, $P < 0.01$)。见图 4,表 3。

4 讨论

微核是染色体、染色单体的无着丝点断片或者由于细胞分裂时纺锤丝受损而丢失的整个染色体,在有丝分裂后期形成子细胞核时,不能包被在子核中而形成。SCE 是一条染色体中两条姐妹染色单体间的同源片段之间的互换。二者形成都与 DNA 的

表 2 APS 对甲醛染毒 BMSCs PCNA,XPB,XPB,XPB 和 XPG mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 Effect of APS on expression of PCNA,XPB,XPB,XPB and XPG mRNA in formaldehyde-contaminated BMSCs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	PCNA	XPB	XPB	XPB	XPB
甲醛	-	0.70 ± 0.08 ¹⁾	2.08 ± 0.24 ²⁾	1.37 ± 0.22 ¹⁾	1.53 ± 0.10 ¹⁾	1.36 ± 0.11 ¹⁾
APS	40	1.54 ± 0.12 ^{2,4)}	2.86 ± 0.16 ^{2,4)}	1.79 ± 0.06 ^{2,3)}	2.00 ± 0.16 ^{2,3)}	1.72 ± 0.12 ^{2,3)}
	100	1.97 ± 0.09 ^{2,4)}	3.28 ± 0.08 ^{2,4)}	2.30 ± 0.28 ^{2,4)}	2.09 ± 0.22 ^{2,3)}	1.99 ± 0.12 ^{2,4)}
	400	1.76 ± 0.13 ^{2,4)}	3.14 ± 0.19 ^{2,4)}	1.85 ± 0.30 ^{2,3)}	2.01 ± 0.19 ^{2,3)}	1.96 ± 0.17 ^{2,4)}

注:设空白组 mRNA 相对表达为 1.00。

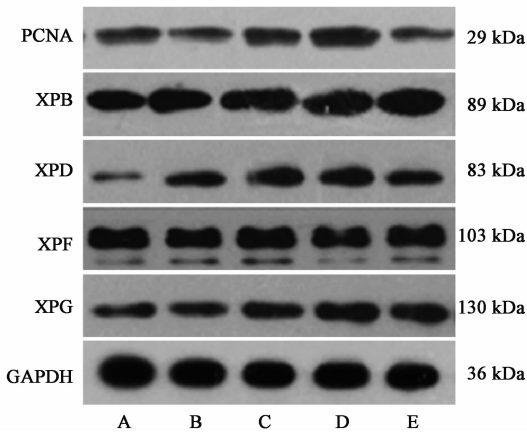


图 4 各组 BMSCs PCNA,XPB,XPB,XPB 和 XPG 蛋白表达电泳
Fig.4 Electrophoresis of PCNA,XPB,XPB,XPB and XPG protein expression in formaldehyde-contaminated BMSCs

稳定性有关,DNA 损伤增加或修复能力削弱均可增加微核形成和 SCE 发生的频率^[8-9]。前期研究证实,甲醛作为一种环境污染物,可以引起细胞微核形成,SCE 频率增高染色体损伤^[10],因此,本实验主要通过检测微核和 SCE 来研究 APS 对甲醛染毒人 BMSCs 染色体损伤的保护作用。实验发现,BMSCs 经 APS 干预后,微核形成和 SCE 频率均较甲醛组明显减轻,而且通过细胞形态观察,APS 组细胞形态较甲醛组明显改善。说明 APS 能够对甲醛环境中人 BMSCs 的染色体损伤起到保护作用。

机体细胞在受到外界因素作用时会导致 DNA 损伤,为保持基因组的稳定性,细胞会动员一系列完善而精确的修复机制来逆转这些损伤。核苷酸切除

表 3 APS 对甲醛染毒 BMSCs PCNA,XPB,XPB,XPB 和 XPG 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effect of APS on expression of PCNA,XPB,XPB,XPB and XPG protein in formaldehyde-contaminated BMSCs($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	质量浓度 /mg·L ⁻¹	PCNA/GAPDH	XPB/GAPDH	XPB/GAPDH	XPB/GAPDH	XPB/GAPDH
空白	-	0.34 ± 0.01	0.48 ± 0.01	0.31 ± 0.01	0.68 ± 0.01	0.45 ± 0.01
甲醛	-	0.24 ± 0.00 ²⁾	0.81 ± 0.01 ²⁾	0.51 ± 0.01 ²⁾	0.92 ± 0.02 ²⁾	0.52 ± 0.01 ²⁾
APS	40	0.39 ± 0.01 ^{2,4)}	0.95 ± 0.10 ^{2,4)}	0.89 ± 0.02 ^{2,4)}	0.97 ± 0.02 ^{2,4)}	0.62 ± 0.01 ^{2,4)}
	100	0.49 ± 0.01 ^{2,4)}	1.15 ± 0.02 ^{2,4)}	1.96 ± 0.02 ^{2,4)}	0.98 ± 0.01 ^{2,4)}	0.77 ± 0.01 ^{2,4)}
	400	0.40 ± 0.01 ^{2,4)}	1.09 ± 0.01 ^{2,4)}	1.04 ± 0.02 ^{2,4)}	0.76 ± 0.03 ^{2,4)}	0.56 ± 0.01 ^{2,3)}

修复(NER)通路是体内功能最广泛、参与修复 DNA 损伤类型最多的通路^[11]。NER 主要修复过程为①识别损伤 DNA;②转录修复因子(TFIIH)复合体被招募到损伤部位,TFIIH 的两个亚基 XPB(ERCC3)和 XPD(ERCC2)具有解旋酶活性,负责打开损伤的 DNA 螺旋结构;③核酸内切酶 XPF-ERCC1 复合体切除损伤 DNA 的 5'端,核酸内切酶 XPG 切除 3'端,去除包含损伤部位的 24~32 个核苷酸片段;④5'端切口产生后,增殖细胞核抗原 PCNA 被加载到损伤位点的 5'端^[12],招募 DNA 聚合酶 δ 和聚合酶 ε 合

成新的 DNA 片段,填充间隙,最后由 DNA 连接酶补平缺口^[13]。本研究发现,甲醛和 APS 组 XPB,XPB,XPB,XPB,XPB mRNA 和蛋白表达均较对照组明显升高,而且 APS 组较甲醛组升高更为明显,说明 XPB,XPB,XPB,XPB,XPB 既参与了甲醛导致人 BMSCs 染色体损伤的修复,也参与了 APS 促进染色体损伤的修复,这与 APS 明显减轻甲醛染毒人 BMSCs 微核形成和 SCE 频率这一结果相一致。说明 APS 对甲醛染毒人 BMSCs 染色体损伤的保护作用可能与上调 XPB,XPB,XPB,XPB,XPB mRNA 和蛋白表达有关。

PCNA 是 DNA 复制过程的必需因子,也在 NER 修复途径中能够与 DNA 聚合酶、连接酶等结合从而发挥重要修复作用^[13-15]。本研究中,PCNA mRNA 和蛋白在甲醛组表达明显降低,而在 APS 干预后表达明显升高,说明 PCNA 未参与甲醛引起染色体损伤的修复,可能参与了黄芪多糖的保护作用,促进了 DNA 的修复。另外,细胞内 DNA 复制与 DNA 修复是两个相辅相成的过程,DNA 复制的保真性依赖于 DNA 修复,而 DNA 修复过程也包含了 DNA 复制的众多因素^[16],因此,甲醛作用 BMSCs 细胞产生 DNA 损伤时,DNA 复制也会减弱,因而 PCNA mRNA 和蛋白表达减弱,而随着 APS 的作用,DNA 损伤逐渐修复,PCNA 表达逐渐增强。已有报道,可以通过检测 PCNA 的表达情况来反映细胞的损伤与修复的情况^[17]。

本研究还发现 APS 对甲醛染毒人 BMSCs 的染色体保护作用呈现出先增高后降低趋势,在 $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ APS 作用时,细胞微核形成和 SCE 频率逐渐降低,PCNA,XPB,XPD,XPF,XPG mRNA 和蛋白表达逐渐升高;然而在 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ APS 作用时,细胞微核形成和 SCE 频率较 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ APS 增多,PCNA,XPB,XPD,XPF,XPG mRNA 和蛋白表达较 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ APS 下降,但均较甲醛组比较,仍然有明显保护作用。提示 APS 质量浓度 $> 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,可能会对人 BMSCs 产生毒性影响,抑制 NER 修复,也说明 APS 虽然具有良好的促进 DNA 损伤修复的功能,但是具有一定的安全使用范围,其在体内所对应的安全剂量范围,还需进一步研究、明确。

综上所述,APS 对甲醛染毒人 BMSCs 染色体损伤具有保护作用,尤其以 APS $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 作用最为显著,可能与上调 NER 通路上的 PCNA,XPB,XPD,XPF,XPG mRNA 表达,促进 DNA 损伤修复有关。

[参考文献]

[1] Moore K A, Lemischka I R. Stem cells and their niches [J]. Science, 2006, 311(5769):1880-1885.
[2] Méndez-Ferrer S, Michurina T V, Ferraro F, et al. Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche [J]. Nature, 2010, 466(7308):829-834.
[3] LIANG X, ZHANG J, SONG W, et al. Formaldehyde exposure in indoor air from public places and its associated health risks in kunshan city, China [J].

Asia Pac J Public Health, 2018, 30(6):551-560.
[4] SHE Y L, LI Y, LIU Y Q, et al. Formaldehyde induces toxic effects and regulates the expression of damage response genes in BMSCs [J]. Acta Biochim Biophys Sin, 2013, 45(12):1011-1120.
[5] 刘星,李啸红,陈阳,等. 续断水提液对小鼠急性毒性和遗传毒性的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016, 22(5):160-165.
[6] 李钦,胡继宏,高博,等. 黄芪多糖在免疫调节方面的最新研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(2):199-206.
[7] 阎力君,洪涛,雒江菡,等. 黄芪多糖对结肠癌 SW620 细胞增殖及凋亡作用的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(22):97-101.
[8] Costa S, Coelho P, Costa C, et al. Genotoxic damage in pathology anatomy laboratory workers exposed to formaldehyde [J]. Toxicology, 2008, 252(1/3):40-48.
[9] ZHANG L, TANG X, Rothman N, et al. Occupational exposure to formaldehyde, hematotoxicity, and leukemia-specific chromosome changes in cultured myeloid progenitor cells [J]. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2010, 19(1):80-88.
[10] 舍雅莉,刘永琦,李屹,等. 甲醛对鼠 BMSCs 细胞系的遗传毒性影响[J]. 基础医学与临床, 2014, 34(4):454-458.
[11] Singh R K, Krishna M. DNA damage induced nucleotide excision repair in saccharomyces cerevisiae [J]. Mol Cell Biochem, 2006, 290(1/2):103-112.
[12] CHEN J, Bozza W, ZHUANG Z. Ubiquitination of PCNA and its essential role in eukaryotic translesion synthesis [J]. Cell Biochem Biophys, 2011, 60(1/2):47-60.
[13] Butkiewicz D, Drosik A, Suwinski R, et al. Influence of DNA repair gene polymorphisms on prognosis in inoperable non-small cell lung cancer patients treated with radiotherapy and platinum-based chemotherapy [J]. Int J Cancer, 2012, 131(5):1-9.
[14] 向生光,胡维新. 增殖细胞核抗原 PCNA 在 DNA 修复中的作用[J]. 生命的化学, 2009, 29(4):472-475.
[15] 刘珍财,赵海霞,马娜,等. 基于 PI3K/Akt 通路观察五子衍宗方对老龄大鼠精原干细胞增殖的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018, 24(23):119-125.
[16] Sharma S, Canman C E. REV1 and DNA polymerase zeta in DNA interstrand crosslink repair [J]. Environ Mol Mutagen, 2012, 53(9):725-740.
[17] Kelman Z. PCNA: structure, functions and interactions [J]. Oncogene, 1997, 14(6):629-640.

[责任编辑 周冰冰]