DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.19.001
第26卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 19
2004年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2004

文章编号:1000-5404(2004)19-1701-03

论著

硫芥诱导小鼠染色体畸变和微核形成作用的研究

李奇慧[1],朱明学[2],张黎明[2],董兆君[1] ([1]第三军医大学预防医学院军事毒理学教研室,重庆 400038;[2]第二军医大学海医系防化教研室,上海 200433)

提 要:目的 研究硫芥对中国仓鼠肺成纤维细胞(chinese hamster fibroblast cell line, CHL)染色体的诱变作用及对小鼠骨髓微核率的影响。方法 培养CHL细胞(±S9),以不同浓度硫芥处理24 h后常规方法制备染色体,观察畸变类型并计算畸变率。KM小白鼠皮下注射硫芥染毒,24 h后处死动物,取双侧股骨,行骨髓涂片和姬姆萨染色,计数含微核嗜多染红细胞(polychromatic erythrocyte, PCE)数。结果 硫芥处理的CHL细胞染色体畸变率显著增加,出现裂隙、断裂、缺失、多倍体等多种类型畸变,并呈量效依赖趋势。S9不影响硫芥诱导的CHL细胞染色体畸变形式和畸变率。与对照组比较,注射硫芥小鼠骨髓PCE微核率显著增加($P<0.01$),硫芥剂量越大,微核形成率越高。结论 硫芥能直接诱发细胞染色体损伤。

关键词:硫芥;CHL细胞;染色体;微核
中图法分类号:R329.24;R394.3;R827.174 文献标识码:A

Chromosomal aberration and micronucleus formation induced by sulfur mustard

LI Qi-hui[1], ZHU Ming-xue[2], ZHANG Li-ming[2], DONG Zhao-jun[1] ([1]Department of Military Toxicology, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of Chemical Defense, College of Navy Medicine, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of sulfur mustard on chromosomal aberration in Chinese hamster fibroblast cell line (CHL cells) and the micronucleus (MN) frequency in the bone marrow cells of mice. **Methods** CHL cells (with and without S9) treated with different concentrations of sulfur mustard for 24 h were harvested for the preparation of chromosome. Subsequently, the frequency and the type of chromosomal aberration were examined. The KM mice were sacrificed at 24 h after subcutaneous injection of sulfur mustard. The number of micronuclei-containing polychromatic erythrocytes (PCEs) was counted by means of bone marrow smear and Giemsa staining. **Results** Sulfur mustard might increase the chromosomal aberration frequency of CHL cell in a dose-dependent manner. S9 had no effects on the classificaiton and the frequency of chromosomal aberration. The types of chromosomal aberration included gap, break, deletion, polyploid, and so on. Compared with that in the control group, the MN ratio in every group increased significantly ($P<0.01$). The MN frequency was associated with the concentration of sulfur mustard in a dose-dependent manner. **Conclusion** Sulfur mustard can directly induce chromosome damage.

Key words: mustard gas; Chinese hamster fibroblast cell line; chromosomal aberration; micronucleus

硫芥是重要的化学战剂之一,也是使用较多的药物,可用于某些过度增生性疾病的治疗[1]。硫芥是双功能烃化剂,中毒后可对DNA产生强烈损伤[2]。除了细胞毒作用外,硫芥可能尚具有遗传毒作用[3]。本研究以中国仓鼠肺成纤维细胞(chinese hamster fibroblast cell line, CHL)和小白鼠骨髓嗜多染红细胞为实验材料,研究硫芥对细胞染色体的损伤作用,为阐明硫芥的遗传毒理学机制提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验用毒剂 硫芥由军事医学科学院六所提供,纯度为97.5%,用1,3-丙二醇溶解为母液。

1.1.2 细胞株 中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL)由上海细胞所提供。

1.1.3 实验动物 选择健康KM小白鼠65只,体质量20~24 g,雌雄各半,由第三军医大学实验动物中心提供。

1.1.4 主要试剂 1640培养液为Hyclone公司产品,小牛血清为兰州民海生物工程有限公司产品,阳性诱变剂丝裂霉素

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划指定性课题(01L054)
Supported by the Key Research Project of the "Tenth Five-year Plan" of PLA (01L054)
作者简介:李奇慧(1976-),女,黑龙江省肇东市人,硕士,主治医师,主要从事遗传毒理学方面的研究。电话:(023)68752356
通信作者:董兆君,电话:(023)68752285
收稿日期:2003-10-31;修回日期:2004-06-05

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

C(Mitomycin-C, MMC)为日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司产品, 环磷酰胺(cyclophosphamide, CP)为上海华联制药有限公司产品。秋水仙素、6-磷酸葡萄糖、氧化型辅酶Ⅱ均为 Sigma 公司产品, 其它为国产 AR 级试剂。

1.1.5 肝微粒体酶活化系统(S9)制备 采用苯巴比妥钠和β-奈黄酮联合诱导方法制备。操作过程需注意无菌和局部冷环境。

1.2 方法

按照文献[4]方法进行, 并加以改进。

1.2.1 哺乳动物细胞染色体畸变实验 选用 CHL 细胞。根据文献[5]设 0.01、0.02、0.03、0.04、0.05 μg/ml 5 个硫芥染毒剂量组, 同时设空白对照、溶剂对照及阳性对照(－S9: MMC 0.25 μg/ml, ＋S9: CP 20 μg/ml)。实验在±S9 条件下进行。－S9 时于染毒后 24 h 收获细胞, 制备染色体。＋S9 时染毒同时加 S9(0.1 ml/ml), 作用 6 h 后洗涤细胞 3～5 次, 加入新培养液, 培养 24 h 收获细胞。收获细胞前 4 h 均加秋水仙素 0.2 μg/ml, 胰酶消化, 制片。每组观察 100 个中期细胞, 记录出现的各类染色体畸变类型, 计算畸变率。判定标准为染色体畸变率< 5%为阴性(－),> 5%为可疑(±),> 10%为阳性(＋),> 20%为阳性(＋＋),> 50%为阳性(＋＋＋)。

1.2.2 小鼠骨髓微核实验 小鼠自由摄食摄水, 按实验动物检疫要求检疫观察 1 周, 剔除不合格动物。65 只小鼠随机分组, 每组 5 只。小鼠皮下注射硫芥 LD_{50}为 26 mg/kg[6], 故预实验以 1/2 LD_{50}即 13 mg/kg 皮下注射染毒, 分别于染毒后 12、24、36、48、72 h 取材、制片, 观察 5 个时间点的微核细胞率。实验组以 13、1.3、0.13、0.013 mg/kg 4 个剂量给药, 分别相当于 1/2、1/20、1/200、1/2 000 LD_{50}。同时设空白对照(生理盐水)、溶剂对照(1,3-丙二醇)、阳性对照(CP 60 mg/kg)。在预实验 5 个时间点取材的基础上, 确定在染毒 24 h 后处死小鼠, 见表 1。取两侧股骨骨髓, 涂片, 甲醇固定, Giemsa 染色, 双盲法油镜下每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞(PCE)的微核细胞数, 计算微核率, 以‰表示。同时计数正染红细胞(NCE)数。

表 1 硫芥染毒(13 mg/kg)后不同采样时间小鼠骨髓微核率(n= 5)

Tab 1 MN frequency induced by sulfur mustard (13 mg/kg) at different sampling time (n= 5)

Time (h)	Cell number		MNF(‰, $\bar{x}\pm s$)	PCE/(PCE+NCE) (%)
	PCE	MN		
0	5 000	19	3.8±0.8	71.2
12	5 000	57	11.4±2.3**	80.9
24	5 000	139	27.8±3.6**	75.8
36	5 000	113	22.6±1.8**	77.5
48	5 000	110	22.0±2.5**	76.3
72	5 000	108	21.6±2.7**	82.1

F= 65.55, P= 0.00; **: P< 0.01, *vs* 0 h

1.3 统计学处理

计量资料数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS10.0 统计软件包行方差分析。

2 结果

2.1 CHL 染色体畸变实验

硫芥各剂量组的染色体畸变分析结果显示, 无论有无肝微粒体酶活化系统的存在, 硫芥在 0.01～0.05 μg/ml 范围内即对 CHL 细胞有致畸作用, 畸变率分别为 18%、21%、27%、40%、51%(－S9)和 19%、26%、27%、32%、41%(＋S9), 染色体畸变率与硫芥的浓度呈剂量反应关系。畸变发生的类型复杂, 涉及染色体畸变(包括染色单体型、染色体型畸变)和染色体组畸变。生理盐水和溶剂对照组的染色体畸变率均< 5%。MMC 和 CP 的畸变率分别为 31%和 25%。结果表明, 硫芥可明显诱发 CHL 细胞染色体损伤, 是 CHL 细胞的直接诱变剂。

2.2 微核实验

微核实验结果见表 1、2。由表 1 可以看出, 硫芥中毒后 12 h 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率即显著升高, 24 h 达到高峰, 随后在 36～72 h 一直保持在一个高平台水平。由表 2 可以看出, 各剂量组硫芥小鼠骨髓多染红细胞微核率均高于空白对照组, 相差显著(P= 0.00), 但各剂量组间相差不显著。

表 2 不同浓度硫芥染毒小鼠骨髓微核率(n= 5)

Tab 2 MN frequency induced by sulfur mustard at various concentrations (n= 5)

Group	Concentration (mg/kg)	Cell number		MNF(‰, $\bar{x}\pm s$)	PCE/(PCE+NCE) (%)
		PCE	MN		
NS		5 000	19	3.8±0.8	71.2
Solvent control	0.02 ml/ml	5 000	31	6.2±1.9	76.6
CP	60	5 000	238	47.6±7.8**	79.6
Sulfur mustard	0.013	5000	84	16.8±2.2**	70.3
	0.13	5 000	111	22.2±5.1**	76.5
	1.3	5 000	119	23.8±3.7**	66.7
	13	5 000	109	21.8±5.1**	75.8

F= 53.87, P= 0.00; **: P< 0.01, *vs* NS

3 讨论

近代战争, 特别是中东和海湾战争的实践证明, 化学武器是一种具有战略威慑和战术实践的双重价值的武器, 尽管国际上禁止化学武器公约已经生效, 但是世界上仍然存在着化学武器威胁。硫芥作为一种重要的化学战剂, 由于其理化性质稳定, 毒性强, 穿透性强, 作用隐蔽, 持久性大等特点, 目前仍是外军装备的重要毒剂之一, 也是外军医学防护研究的重要对象[7]。现已从细胞和分子水平的中毒机制及其防治研究取得明显进展。硫芥也是应用较多的药物, 曾在动物实验中以局部注射的方式来治疗肿瘤, 而烷化剂可引起化疗病例的严重合并症－二次肿瘤的发生[8]。研究表明硫芥可致精子发生异常[9], 呼吸系统肿瘤发病率增加[3], 提示该化合物具有遗传毒性的远期危害, 其作用机制尚

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

不十分明了。

本研究结果表明, 硫芥在 0.01～0.05 μg/ml 即可明显诱发 CHL 细胞染色体损伤, 畸变发生的类型复杂, 涉及染色体畸变(包括染色单体型、染色体型畸变)和染色体组畸变。DNA 对硫芥极为敏感, 是其作用的靶分子之一[10], 硫芥对染色体的致畸作用可能是由于其使 DNA 链内、链间或 DNA 与蛋白质之间发生交联(cross linkage), 诱发 DNA 双链断裂, 发生在 DNA 复制之后或 G_2 期则可在中期相出现染色单体型畸变, 而在 G_0 和 G_1 期作用, 就会经 S 期的复制而出现染色体型畸变。染色单体型畸变在经过一个细胞周期后又会转变为染色体型畸变。关于硫芥诱发染色体组畸变的作用机制还不十分清楚, 可能是纺缍体结构或功能受损, 细胞质分裂障碍等, 但其发生频率则远小于染色体结构改变[4,5]。此外本实验结果还显示, 不论加或不加 S9 混合液, 硫芥均同样引起 CHL 细胞染色体损伤。表明硫芥可直接作用于细胞, 不需要肝微粒体混合功能氧化酶体系的代谢转化, 是 CHL 细胞染色体的直接断裂剂和细胞毒性因子。

微核试验(micronucleus test, MNT)是检测外来化合物对染色体损伤作用的重要试验。微核(micronucleus)与染色体损伤有关, 有丝分裂时, 因断裂剂引起的染色体断片或无着丝点环, 以及因非整倍体诱变剂所致纺缍体损伤而致个别行动滞后的染色体都将不能进入子核, 从而留在细胞质中成为微核。微核可出现于多种细胞, 由于在有核细胞中难与正常核的分叶及核突出物区分, 故而观察嗜多染红细胞。微核试验能够检测断裂剂和部分非整倍体诱变剂。由于其技术简便、观察快速、计数准确而得到广泛应用。小鼠骨髓嗜多染红细胞 MNT 是目前应用最为广泛的 MNT, 许多国家和国际组织都将其规定为评价农药、新药、食品添加剂等化合物毒理安全性的必做试验之一, 现已成为一种能获得大量客观数据的化学物质遗传毒性评价体系[11]。本实验结果显示, 以 1/2 000 LD_{50} (0.013 mg/kg)的低剂量硫芥皮下注射染毒即可引起小鼠骨髓 PCE 微核率显著增加, 与空白对照相比差异显著($P<0.01$), 且随染毒剂量增加, 微核率随之升高。而溶剂对照组与阴性对照组相比差异不显著。说明硫芥对小鼠骨髓细胞具有明显的诱变作用, 且随染毒剂量增加, 染色体损伤越严重。

综合 CHL 染色体畸变实验和小鼠骨髓细胞微核实验结果说明硫芥能直接诱发染色体损伤, 作用强烈而复杂。其详细机制尚待深入研究。

参考文献:

[1] 魏相德. 芥子气中毒机制的研究进展[J]. 国外医学军事医学分册, 1992, 9(1): 7－12.

[2] Lakshmana Rao P V, Vijayaraghavan R, Bhaskar A S. Sulphfur mustard induced DNA damage in mice after dermal and inhalation exposure[J]. Toxicology, 1999, 139(1－2): 39－51.

[3] Dacre J C, Goldman M. Toxicology and pharmacology of the chemical warfare agent sulfur mustard[J]. Pharmacol Rev, 1996, 48(2): 289－326.

[4] 黄幸纾, 陈星若. 环境化学物致突变、致畸、致癌试验方法[M]. 杭州: 浙江科学技术出版社, 1985. 219－234.

[5] Roberts J J, Friedlos F, Scott D, *et al*. The unique sensitivity of Walker rat tumour cells to difunctional agents is associated with a failure to recover from inhibition of DNA synthesis and increased chromosome damage[J]. Mutat Res, 1986, 166(2): 169－181.

[6] 欧阳子倩, 王廷治. 防化医学[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1985. 262－290.

[7] 罗成基, 欧阳子倩. 核、化学武器损伤防治学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1994. 138－140.

[8] 袁素波. 肿瘤化疗药物的致癌性及致癌机制[J]. 癌变·畸变·突变, 1998, 10(6): 386－391.

[9] Safarinejad M R. Testicular effect of mustard gas[J]. Urology, 2001, 58(1): 90－94.

[10] 杨清武, 董兆君, 魏相德, 等. 硫芥对大鼠淋巴细胞毒性作用的研究[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(1): 27－30.

[11] 曹　佳, 林　真, 余争平. 微核实验－原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 1－11.

(编辑　栾　嘉)

血压计量单位恢复 mmHg 表示法

根据国家质量技术监督局和卫生部联合发出的质技监局量函[1998]《关于血压计量单位使用规定的补充通知》的精神, 血压计量单位恢复使用毫米汞柱(mmHg), 但首次使用时应注明 mmHg 与千帕[斯卡](kPa)的换算系数。

本刊编辑部

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net