DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.19.002
第25卷第19期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 19
1688 2003年10月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Oct. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)19-1688-04

纺锤体毒剂诱导小鼠淋巴瘤细胞 *tk* 基因突变的研究

袁 健,刘胜学,曹 佳 (第三军医大学军事预防医学院卫生毒理学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 研究纺锤体毒剂长春新碱和秋水仙碱对小鼠淋巴瘤L5178Y3.2.7c— $tk^{+/-}$ 细胞 *tk* 基因突变的影响。方法 使用长春新碱和秋水仙素对L5178Y细胞进行梯度染毒,再分别进行细胞毒性,细胞接种效率,相对存活率,相对悬浮生长率和突变频率测定。结果 随着长春新碱和秋水仙素剂量的增加,L5178Y细胞的相对存活率和悬浮生长率均明显下降。在长春新碱0.5~2.5 ng/ml,秋水仙素10~50 ng/ml范围内可以诱导细胞 *tk* 基因的突变率达到自发突变率的1~3倍。结论 长春新碱和秋水仙素对L5178Y细胞具有明显的细胞毒性,并可以诱导 *tk* 基因突变。

关键词:长春新碱;秋水仙素;纺锤体毒剂;*tk* 位点;致突变作用;L5178Y细胞
中图法分类号:R99;R394;R730.263 文献标识码:A

Spindle poisons induce *tk* gene mutation in mouse lymphoma cells

YUAN Jian, LIU Sheng-xue, CAO Jia (Department of Hygiene Toxicology, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of spindle poisons (Vincristine, VCR and Colchicine, COL) on the *tk* gene of mouse lymphoma cells. Methods L5178Y cells were treated with VCR and COL at different concentrations. Determination of cytotoxicity, cell inoculation efficiency, relative survival rate, relative suspension growth rate and mutation frequency was performed. Results The relative survival rate and suspension growth rate of L5178Y cells decreased significantly with the increasing doses of VCR and COL. The mutation frequency of *tk* gene induced by VCR (0.5~2.5 ng/ml) and COL(10~50 ng/ml) was 1~3 times higher than that of spontaneous mutation frequency of L5178Y cells. Conclusion VCR and COL have obvious cytotoxic and mutagenic effects on *tk* gene in L5178Y cells.

Key words: vincristine; colchicine; spindle poisons; *tk* gene; mutagenesis; L5178Y cell

非整倍体是哺乳动物细胞内发生的较为严重的遗传事件,通常会导致细胞内遗传物质的严重不平衡,进而引起肿瘤发生或细胞死亡。长春新碱(Vincristine, VCR)和秋水仙素(Colchicine, COL)是典型的纺锤体毒剂,它们均可抑制微管聚合,当细胞处于有丝分裂时纺锤丝微管受累可导致整条染色体丢失(非整倍体发生),从而诱导哺乳动物细胞发生基因突变。目前,已经证实某些纺锤体毒剂是致癌物。长春新碱和秋水仙碱已经分别用于临床治疗白血病和痛风,但是对其致基因突变作用的研究相对较少。我们使用目前国际上通用的突变试验方法,检测了小鼠淋巴瘤L5178Y3.2.7c— $tk^{+/-}$ 细胞经长春新碱和秋水仙素作用后细胞毒性和 *tk* 等位基因的突变频率。

1 材料与方法

1.1 实验用细胞株

本试验使用的小鼠淋巴瘤L5178Y3.2.7c— $tk^{+/-}$ 细胞,由日本国立医药品食品卫生研究所Honma博士惠赠。细胞呈淋巴母细胞样,悬浮生长,用含有10%马血清的RPMI1640培养基在37 ℃、5% CO_2 条件下常规培养,对数生长期细胞的倍增时间为13~16 h。

1.2 试剂

长春新碱(杭州民生制药厂)、秋水仙素(Serva公司)均过滤消毒,实验时配制成相应的浓度。

1.3 $tk^{-/-}$ 基因型细胞的清除

在突变实验开始之前,使对数增长期的L5178Y细胞在含有7.5 μg/ml甘氨酸、5.0 μg/ml次黄嘌呤、0.1 μg/ml氨基喋呤和3.0 μg/ml脱氧胸苷的完全培养基中生长1 d后,800 r/min离心5 min,重悬于只含有甘氨酸、次黄嘌呤和脱氧胸苷的完全培养基中,培养2 d后更换成正常的完全培养基再培养4~7 d,检查自发突变的频率符合PE(70%~130%)、MF(50× 10^{-6} ~200× 10^{-6})条件后备用。

1.4 剂量的设置

分别依据文献[1]直接进行两种纺锤体毒剂的实验,长春

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30100153);重庆市卫生局青年人才科研资助项目(CQ2000)
作者简介:袁 健(1968-),男,甘肃省兰州市人,硕士研究生,讲师,主要从事遗传毒理致突变检测方面的研究,发表论文8篇。电话:(023)68752295
通信作者:曹 佳,电话:(023)68752271;E-mail:caojia@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2003-05-13;修回日期:2003-06-27

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

新碱和秋水仙素的剂量分别为 0.5～2.5 ng/ml 和 10～50 ng/ml。乙基亚硝基脲(Ethylnitrosourea, ENU) 10 μg/ml 为阳性对照。双蒸馏水为阴性对照。

1.5　染毒和细胞毒性的测定

调整细胞密度为 5×10^5 个/ml, 分别按剂量设计的浓度加入受试物长春新碱和秋水仙素, 在 37 ℃、5% CO_2 条件培养 24 h, 800 r/min 离心 5 min, 弃去受试物。用 RPMI1640 培养基洗涤细胞 2 次, 重新悬浮细胞于培养基中调整细胞浓度为 2×10^5 个/ml, 继续培养。

同时取出一定量的细胞, 经过 2 个梯度的稀释, 使 96 孔培养板达到每孔 1.6 个细胞, 每个剂量接种 1 个培养板, 阴性对照接种 2 个培养板。在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养 14 d, 计数每块培养板中有克隆的孔数, 求算出细胞接种效率(Plating efficiency, PE0)和相对存活率(Relative survival, RS0)。

$$PE0=\frac{-\mathrm{Ln}(\text{空孔数}/\text{总孔数})}{\text{每孔细胞数}}\times100\%$$

$$RS0=\frac{PE0(\text{处理组})}{PE0(\text{阴性对照组})}\times100\%$$

1.6　突变表达与突变频率的测定

剩余的细胞在 37 ℃、5% CO_2 条件下继续培养 2 d, 这是该细胞株的最佳表达时间。在表达期间, 每天计数细胞浓度, 并据此计算出相对悬浮增长率(Relative suspension growth, RSG)与总相对增长率(Relative total growth, RTG)。细胞经受试物处理 2 d 后, 制备检测突变用平板和计算平板效率的平板。基因突变频率的检测用平板是在 3 μg/ml 三氟胸苷(TFT)的存在下, 以 2 000个/孔的数量接种细胞。培养 14 d 后计数含有克隆的孔数。分别计数大克隆(Large clone, LC)、小克隆(Small clone, SC)和两种都有(LC/SC)的孔数。

计算突变频率(Mutation frequency, MF)和小克隆突变的比率(SCR)。

$$DCG=\frac{\text{次日细胞浓度}}{\text{稀释后的细胞浓度}}$$

$$RSG=\frac{DCG\text{ 代表第 1 天}\times DCG\text{ 代表第 2 天(处理组)}}{DCG\text{ 代表第 1 天}\times DCG\text{ 代表第 2 天(阴性对照组)}}$$

$$MF=\frac{-\mathrm{Ln}(\text{空孔数}/\text{总孔数})/\text{每孔细胞数}}{PE2}$$

$$SCR=\frac{\text{含有 SC 的孔数}+\text{含有 LC/SC 的孔数}}{\text{含有 LC、SC、LC/SC 的孔数}}$$

1.7　统计学处理及结果判定

计数每块平板的总孔数及阳性和阴性集落孔数, 按照泊松分布计算平板接种效率和 10^6 细胞内的突变细胞数即突变频率, 用 SPSS 软件进行总体率与曲线拟合统计分析。受试物组的突变频率达到自发突变频率的 2 倍或以上, 并有剂量反应关系, 则可判定为阳性[1]。

2　结果

2.1　长春新碱和秋水仙碱的细胞毒性反应

VCR 和 COL 对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞的毒性作用见表 1、表 2。随着染毒剂量的增加, PE0、RS、RSG、RTG 均相应地下降。当 VCR 和 COL 的剂量分别增至 2.5 ng/ml 和 50 ng/ml 时, 上述指标已降至最低。RS 和 RSG 这两个细胞毒性指标与染毒剂量之间呈反向的剂量反应关系, 其中 RSG 比 RS0 显示了更为敏感的细胞毒性反应, 见图 1。

表 1　VCR 与 L5178Y 细胞毒性指标之间的关系

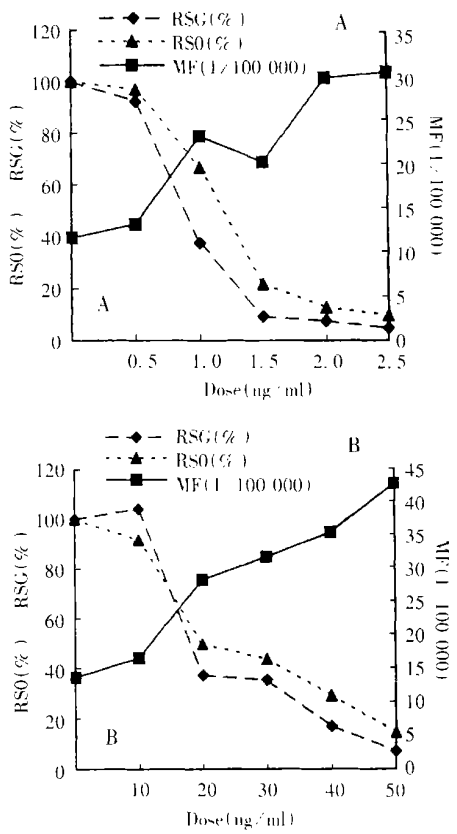
Tab 1　The relationship between cytotoxicity indexes (PE0, RS, and RTG) and the dose of VCR

Dose (ng/ml)	PE0(%)	RS0(%)	RSG(%)	RTG(%)
0	48.8	100.0	100.0	100.0
0.5	47.4	97.0	92.3	97.7
1.0	32.6	66.8	37.3	23.6
1.5	10.6	21.7	9.1	7.0
2.0	6.2	12.7	7.5	5.8
2.5	4.7	9.7	4.8	2.3
ENU(10 μg/ml)	24.7	50.6	51.6	36.6

表 2　COL 与 L5178Y 细胞毒性指标之间的关系

Tab 2　The relationship between cytotoxicity indexes (PE0, RS and RTG) and the dose of COL

Dose (ng/ml)	PE0(%)	RS0(%)	RSG(%)	RTG(%)
0	47.7	100.0	100.0	100.0
10	43.3	91.4	104.0	85.8
20	23.4	49.4	37.0	37.4
30	20.6	43.5	35.2	19.5
40	13.8	29.1	16.9	9.1
50	6.9	14.6	7.2	4.3
ENU(10 μg/ml)	40.1	84.6	76.1	55.9



A: VCR; B: COL

图 1　VCR 和 COL 24 h 处理后 L5178Y 细胞的细胞毒性反应与突变频率

Fig 1　Cytotoxicity represented by RS0, RSG and MF at the *tk* locus in L5178Y cells after treatment with VCR and COL for 24 h

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

2.2 VCR和COL的致突变作用

由表3、4可知，随着VCR和COL的剂量增加，*tk*基因的突变频率也随之增加。其诱发的突变频率是自发突变频率的1～3倍。由图1可以看出，两种物质所诱发的突变频率(MF)与其相应的RS0和RSG呈反向关系。在该实验中所观察到克隆类型，VCR和COL诱发小克隆和大克隆的比例没有显著的差异。

表3 VCR与L5178Y细胞*tk*基因的致突变性

Tab 3 Percentage of small colonies induced by VCR in L5178Y cells and *tk* gene mutation frequency(MF)

Dose(ng/ml)	PE2(%)	RS2(%)	MF(×10^{-5})	SC(%)
0	68.7	100.0	11.5	42.1
0.5	72.7	105.8	13.0	39.4
1.0	43.3	63.0	23.0	41.7
1.5	53.2	77.4	20.1	75.7
2.0	53.2	77.4	29.7	67.3
2.5	34.2	49.8	30.4	66.7
ENU(10 μg/ml)	48.8	71.0	32.4	36.5

表4 COL与L5178Y细胞*tk*基因的致突变性

Tab 4 Percentage of small colonies induced by COL in L5178Y cells and *tk* gene mutation frequency(MF)

Dose(ng/ml)	PE2(%)	RS2(%)	MF(×10^{-5})	SC(%)
0	90.7	100.0	13.6	56.0
10	74.8	82.5	16.5	50.0
20	47.4	52.7	28.2	57.8
30	50.2	55.3	31.6	58.7
40	48.8	53.8	35.3	63.3
50	34.8	38.4	42.7	65.9
ENU(10 μg/ml)	66.7	73.5	34.0	40.5

3 讨论

哺乳动物细胞的*tk*基因编码脱氧胸苷激酶(TK)，该酶催化脱氧胸苷变成脱氧胸苷酸，参与嘧啶核苷酸的补救合成。小鼠淋巴瘤L5178Y3.2.7c－$tk^{+/-}$细胞11号染色体上存在着杂合*tk*等位基因。由于只含有一个有活性的*tk*基因，因此可以检测出以耐药性为指标的进行性基因突变($tk^{+/-} \rightarrow tk^{-/-}$)，该方法的优点是不仅可以检测出点突变等小的基因突变，还可以检测染色体水平以及大的缺失等基因的变化。小鼠淋巴瘤实验所产生的大克隆(LC)和小克隆(SC)，主要是依据生长率的不同而形成，通常认为大的克隆仅含有小的*tk*基因内的改变，而小克隆包含有较大的染色体改变，以及*tk*基因以外的生长控制基因的较大的改变[2]。因此，如何利用小鼠淋巴瘤实验的检测突变谱广泛的优势，将其用于纺锤体毒剂致突变作用的检测，这正是本研究探讨的问题。它进一步丰富了纺锤体毒剂使用基因突变检测试验的数据。

不同的化合物产生非整倍体的机制不同，长春新碱可与微管蛋白结合，从而使微管蛋白形成晶体结构，导致产生非整倍体[3]。秋水仙素可以使细胞在减数分裂期的染色体交叉率下降，增加其减数分裂Ⅰ期相单价体的频率，从而形成非整倍体[4]。目前的研究认为，纺锤体毒剂如长春新碱和秋水仙碱是非DNA直接作用的致突变物，不发生对于DNA的直接损伤、插入或DNA加合物的形成。在很多的微生物和哺乳动物突变实验证实纺锤体毒剂没有致突变作用[5～7]。通过我们的实验结果表明，这两种化合物经24 h(通常为3 h)处理均诱导了*tk*基因的突变，随着长春新碱和秋水仙素的剂量增加，L5178Y细胞的突变率相应的增加。其诱发突变率是自发突变率的1～3倍。与长春碱(VBL)作用于L5178Y细胞的结果相比较，VCR的突变频率在0.5～2.5 ng/ml的范围内呈随剂量增加的趋势，而VBL在0.5 ng/ml以后呈平缓的水平趋势。这种差异可能是VCR与VBL在化学结构和性质上的不同，以及L5178Y细胞对于VCR和VBL形成的遗传损伤的修复能力是否存在差异所导致的，还需要进一步的研究。另一方面，相对于其他致突变剂，纺锤体毒剂在非常低的剂量既可诱导突变和明显的细胞毒性，可能与其致突变机制相关。由于纺锤体毒剂是以非DNA为靶的致突变物，在低剂量可以使分裂早期中心粒的运动受阻，于是导致初中心粒就可能成熟并组装纺锤体，从而导致非整倍体的形成。我们的结果表明纺锤体毒性可以通过L5178Y淋巴瘤细胞*tk*基因突变实验以及长期的受试物处理而检测所诱导的突变。而相关的研究表明小鼠淋巴瘤实验的长期(24 h)处理可以提高该实验检测突变的敏感性[8]。

Honma等[1]利用杂合性缺失和染色体图染技术，对纺锤体毒剂诱导的突变细胞进行了有意义的研究。结果表明突变所产生的全染色体缺失是由于有丝分裂不分离导致的，并结合这两项技术可以检测到多种突变类型，分别为基因内的突变、部分缺失、全染色体缺失、同源性重组、基因转换、非平衡性重组等。同时我室杨明杰等[9]的研究表明了纺锤体毒剂诱发的微核主要是由整条染色体组成，也证实了纺锤体毒剂诱导全染色体缺失的发生。本研究证实了小鼠淋巴瘤细胞*tk*基因突变试验方法可以有效地检测纺锤体毒剂。

参考文献：

[1] Honma M, Momose M, Sakamoto H, *et al*. Spindle poisons induce alleic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction[J]. Mutat Res, 2001, 493(6): 101－114.

[2] Blazak W F, Los F J, Rudd C J, *et al*. Chromosome analysis of small and large L5178Y mouse lymphoma cell colonies: comparison of trifluorothymi-

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

dine-resistant and unselected cell colonies from mutagen-treated and control cultures[J]. Mutat Res, 1987, 224(10): 197—208.
[3] Liang J C, Satya Prakash K L. Induction of aneuploidy by mitotic arrestants in mouse bone marrow[J]. Mutat Res, 1985, 155(1—2): 61—70.
[4] Puertas M J, De La Pena A, Cermeno M C, *et al*. C-banded chromosomes stained with methyl green-pyronin[J]. Stain Technol, 1983, 58(3): 111—112.
[5] Dickins M, Wright K, Philps M, *et al*. Toxicity and mutagenicity test of 4 anti-cancer durgs in Chinses hamster cells[J]. Mutat Res, 1985, 143(7): 149—154.
[6] Marcelo T, Maria L R, Gilberto S, *et al*. Comparative genotoxic effect of vincristine, vinblastine, and vinorelbine in somatic cells of Drosophila melanogaster[J]. Mutat Res, 2002, 519(8): 141—149.
[7] Adler I D, Schmid T E, Baumgartner A. Induction of aneuploidy in male mouse germ cells detected by the sperm-FISH assay: a review of the present data base[J]. Mutat Res, 2002, 504(7): 173—182.
[8] Honma M, Zhang L S, Sakamoto H, *et al*. The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay[J]. Mutagenesis, 1999, 14(1): 23—29.
[9] 杨明杰, 曹 佳. 秋水仙素和环磷酰胺诱发微核的多色荧光原位杂交研究[J]. 中华预防医学杂志, 2000, 34(2): 101—103.

(编辑 汪勤俭)

文章编号: 1000-5404(2003)19-1691-01

个案与短篇

前列腺素 E_1 静脉给药治疗产后出血 66 例临床观察

Clinical observation of the treatment of postpartum hemorrhage with intravenous infusion of prostaglandin E_1 in 66 cases

郑世菊[1], 周东玲[2], 江 露[1], 程 琼[1] (第三军医大学附属西南医院: [1] 妇产科, [2] 卫生经济科, 重庆 400038)

产后出血是产科严重的并发症之一, 是孕妇死亡的首要原因。其中宫缩乏力是产后出血的主要原因, 占 70%～75%。为预防产后出血, 临床常采用催产素和麦角新碱加强子宫收缩, 麦角新碱现已不生产, 无法使用, 但产妇对催产素敏感的个体差异大, 在未用勃乐斯(注射用前列腺素 E_1)之前, 有 12 例因对催产素不敏感而发生产后出血, 2002 年开始我院为预防产后出血, 剖宫产术后试用勃乐斯静脉滴注预防, 试用勃乐斯静脉滴注治疗阴道分娩中的产后出血, 结果 66 例全部有效, 疗效明显, 现报告如下。

1 资料与方法

1.1 临床资料

2001 年 7 月至 2001 年 12 月因无麦角新碱, 产后用催产素预防产后出血, 其中 12 例因对催产素不敏感发生产后出血, 最后用宫腔填塞纱条治疗; 2002 年 1 月至 2003 年 1 月共分娩 1 499例, 阴道分娩中有 66 例发生产后出血, 占 4.4%。其中出血 450～500 ml 24 例, 占 36.4%; < 1 000 ml 34 例, 占 51.5%; > 1 000 ml 8 例, 占 12.1%。66 例产后出血首先使用催产素 20 U 静脉推注, 发现子宫收缩差, 阴道流血继续增多时, 立即静脉滴注勃乐斯, 将单用催产素组和用勃乐斯组进行对照。

1.2 给药方法

勃乐斯(注射用前列腺素 E_1)系重庆药业制药有限责任公司生产, 为白色冻干粉末, 常用 100 μg。临床常用 500 ml 氯化钠或 6%右旋糖酐注射液、5%葡萄糖注射液溶解后静脉滴注, 滴注时间每瓶不少于 3 h, 用药后 1～3 min 出血明显减少。

1.3 疗效判定

显效: 5 min 内子宫变硬呈球形, 阴道流血明显减少; 无效: 子宫软, 轮廓不清, 阴道流血多。

1.4 统计学处理

采用 t 检验。

2 结果

2.1 两组疗效比较

勃乐斯组显效 66 例(100%); 单用催产素组无效 12 例(100%), 最后填塞宫腔纱条制止产后出血, 两组对比差异显著($P < 0.01$)。

2.2 引起子宫收缩乏力的因素

宫缩乏力性产后出血 50 例, 胎盘粘连 13 例, 妊娠合并妊高症 4 例, 双胎 2 例, 妊娠合并肝内胆汁淤积症 1 例, 急性胰腺炎 1 例, 巨大儿 5 例, 高原性心脏病 1 例, 院外分娩 3 例, 无痛分娩 6 例。本组 50 例宫缩乏力性产后出血, 除常规用催产素 20 U 静脉推注、按摩子宫, 立即将勃乐斯 100 μg 稀释于 6%右旋糖酐注射液或 0.9%氯化钠注射液静脉滴注, 开始速度可每分钟 30 滴, 2～3 min 后子宫变硬呈球形, 出血明显减少, 全部有效。

2.3 不良反应

常见为局部静脉发红、疼痛, 停药后消失, 治疗过程中无血压过低出现, 未见其它不良反应。

(下转 1694 页)

作者简介: 郑世菊(1971—), 女, 重庆市大足县人, 主管护师, 主要从事助产及母婴安全方面的研究, 发表论文 7 篇。电话: (023)68754412

收稿日期: 2003-03-24; 修回日期: 2003-07-27

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