DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.04.017
第24卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 4
416 2002年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)04-0418-02

胸腺肽降低环磷酰胺诱导的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的初步研究

杨录军,田荣福,周利军,黄 建,曹 佳 (第三军医大学预防医学系分子毒理学实验室,重庆 400038)

提 要:目的 探讨胸腺肽对遗传损伤的作用。方法 以每天25.0 mg/kg(高剂量组)、12.5 mg/kg(低剂量组)的胸腺肽连续10 d小鼠腹腔注射给药,实验另设以生理盐水10 ml/kg代替胸腺肽的阴性对照组;于第9、10两天以40 mg/kg剂量腹腔注射染色体断裂剂环磷酰胺,环磷酰胺末次注射后6 h处死小鼠,检测小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率。结果 胸腺肽能显著降低环磷酰胺诱导的微核率,与阴性对照组相比 P 均小于0.01,高低两个胸腺肽剂量组及阴性对照组的微核率分别为(12.50±3.88)‰、(14.75±3.42)‰、(22.58±4.98)‰。结论 胸腺肽具有拮抗或修复环磷酰胺诱导的遗传损伤作用。

关键词:胸腺肽;微核;突变;环磷酰胺
中图法分类号:R392.11;R596;R977.1 文献标识码:A

Thymosin decreases the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes of bone marrow in mice induced by cyclophosphamide

YANG Lu-jun, TIAN Rong-fu, ZHOU Li-jun, HUANG Jian, CAO Jia (Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of thymosin on the genetic damage since it has been wildly used in clinic. Methods Thymosin at 25.0 mg/kg (high dose group) or 12.5 mg/kg (low dose group) was injected intraperitoneally to mice for 10 d in order to stimulate the immune system. Cyclophosphamide which induces micronuclei was given in same way on the 9th and 10th day. The micronucleated polychromatic erythrocytes of bone marrow were observed and measured. Results Thymosin significantly decreased the frequencies of the micronucleated polychromatic erythrocytes induced by cyclophosphamide ($P<0.01$ vs negative control group). The frequencies of the high dose group, low dose group and negative control group were (12.50±3.88)‰, (14.75±3.42)‰, (22.58±4.98)‰, respectively. Conclusion Thymosin can antagonize or/and repair the genetic damage induced by cyclophosphamide.

Key words: thymosin; micronucleus; mutation; cyclophosphamide

胸腺肽(Thymosin)作为一种细胞免疫调节剂,具有重建和增强机体细胞免疫功能的作用,在临床上的应用日益广泛,主要用于治疗细胞免疫缺陷症、自身免疫性疾病、肿瘤、爱滋病等,效果良好[1,2]。由于其中的多种疾病与遗传损伤密切相关,因此胸腺肽有可能通过恢复机体的免疫机能来拮抗或修复遗传物质的损伤。研究这方面的作用机制,不仅可以对临床应用提供理论基础,而且开发胸腺肽新的应用领域。小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验是国际标准的突变检测试验[4],本实验采用该方法对胸腺肽拮抗或修复诱变剂环磷酰胺的遗传损伤的作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂及仪器

昆明种小鼠,体重18~24 g,由第三军医大学实验动物中心提供。

胸腺肽注射液,重庆三新制药厂产品,规格为5 mg/2 ml;环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP),上海华联制药有限公司产品;无菌生理盐水(NS),重庆西南药业有限公司产品。

高级生物显微镜,BX60型,日本OLYMPUS公司产品。

作者简介:杨录军(1967—),男,河南省辉县市人,硕士,实验师,主要从事遗传毒理和分子毒理学研究,共发表论文10篇。电话:(023)68752295

收稿日期:2001-01-15;修回日期:2001-12-10

1.2 方法

1.2.1 实验动物的剂量分组与处理 微核试验的每个剂量组一般为6~12只动物,各组雌雄各半。为避免统计学分析漏检低剂量组的拮抗效果(即微核降低的幅度相对较小),故相对增加了低剂量组和阴性对照组的样本量。小鼠随机分为4组:高剂量组(25.0 mg/kg)、低剂量组(12.5 mg/kg)、阴性对照组和空白对照组,动物数分别为6、12、12、6只。

实验参考临床上应用胸腺肽的剂量和用药时间点[3],方法参考欧洲经济合作组织化学物质毒性实验指南中提供的方案[4]。胸腺肽试验组以每天25.0 mg/kg、12.5 mg/kg的胸腺肽连续10 d腹腔注射,阴性对照组以10 ml/kg(与25.0 mg/kg剂量组的胸腺肽注射液等体积)的无菌生理盐水(NS)代替。3组均于第9、10两天以40 mg/kg剂量腹腔注射环磷酰胺,末次环磷酰胺注射后6 h处死小鼠。空白对照组不给予任何处理因素,与其它3组同时处死小鼠。取小鼠胸骨骨髓细胞按常规方法制片,10%Giemsa染色,每只小鼠计数1000个嗜多染红细胞(PCE),计算其微核细胞千分率(‰)。

1.2.2 统计学处理 所获结果采用Poisson分布U检验进行统计分析。

2 结果

各组的微核率结果,见表1,图1。经统计学分析,两个胸腺肽剂量组的微核率显著低于阴性对照组;25.0 mg/kg剂量组的微核率有与比12.5 mg/kg剂量组降低的趋势,但二者间无统计学显著差别。空白对照组的微核率属于正常的小鼠微核率本底值为(1.83±1.17)‰,符合文献[4]结果。

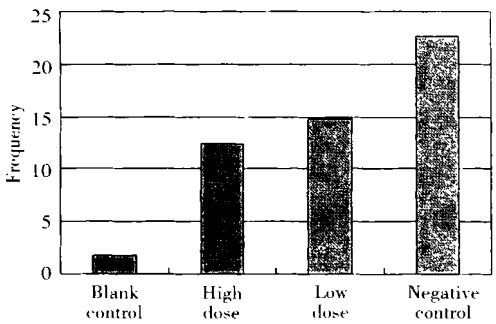
?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　胸腺肽对环磷酰胺诱导的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率的影响(‰)

Tab 1　Effect of thymosin on the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes of bone marrow in the mice induced by cyclophosphamide(‰)

Groups	n	Thymosin		Cyclophosphamide		Individual micronuclei	Frequencies of micronuclei (‰, $\bar{x}\pm s$)
		Dose(mg/kg)	Times	Dose(mg/kg)	Times		
High dose	6	25.0	10	40	2	17, 9, 15, 7, 12, 15	12.50±3.88 *
Low dose	12	12.5	10	40	2	13, 17, 19, 12, 19, 16 18, 10, 11, 10, 17, 15	14.75±3.41 *
Negative control	12	NS	10	40	2	32, 27, 26, 25, 21, 25 17, 24, 25, 19, 14, 19	22.58±4.98
Blank control	6	——	——	——	——	1, 2, 2, 3, 3, 0	1.83±1.17

*: $P<0.01$ *vs* negative control



High dose: 25.0mg/ml thymosin + CP; Low dose: 12.5mg/ml thymosin + CP Negative control: NS + CP

图 1　胸腺肽降低环磷酰胺诱导的小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率(‰)

Fig 1　Thymosin decreases the frequencies of micronucleated polychromatic erythrocytes of bone marrow in mice induced by cyclophosphamide(‰)

3　讨论

随着医学科学的发展, 传染病已初步得到控制。但是, 由于环境污染、非传染病性疾病特别是恶性肿瘤的死亡率在逐年上升。目前认为, 约 80%的肿瘤是由环境因素引起的。尽管发生机制目前沿不完全清楚, 但是"诱变剂→基因突变→癌变"这一学说可解释多种肿瘤的发生, 并被多数学者所公认[5]。因此, 灭活诱变原或防止基因突变是预防肿瘤的关键。人类接触的诱变原主要来自环境污染。一般来说, 要人体完全脱离接触环境中的诱变原较困难。因此, 对进入体内的诱变原进行灭活或防止其引起基因突变, 是较为经济而有效的防止肿瘤的手段。

自 Goldstein 等在 1966 首先从小牛胸腺组织中提取了一种具有生物活性的物质并命名为胸腺素(亦称胸腺肽)以来, 已有大量的研究者对其进行了分离、提纯和临床研究, 并已证明胸腺肽在细胞免疫动员、促进 T 细胞成熟和分化、促进成熟的 T 细胞、NK 细胞分泌 IL-2、干扰素等细胞因子等方面都起着重要作用[1~3]。

胸腺肽在国内外的临床应用日益广泛[2], 主要包括: 各种胸腺不发育症和其它细胞免疫缺陷症如爱滋病, 自身免疫性疾病包括红斑狼疮综合症和慢性活动性肝炎, 恶性肿瘤如慢性淋巴细胞性白血病, 放射伤害和衰老等方面, 具有较好的疗效。1990 年前苏联还用胸腺肽治疗切尔诺贝利核事故病人。由于其中多种类型的疾病如恶性肿瘤、肝炎、放射伤害等均与遗传损害密切相关, 因此胸腺肽对这些疾病的良好疗效有可能也通过拮抗或修复遗传损伤途径。

环磷酰胺是一种间接诱变原, 需经体内活化才能发挥作用, 其在肝细胞色素 P450 单加氧酶的催化下, 可形成 4-OH-CP, 其酮式并构体 aldophosphamide 可进一步产生代谢物 PM 和 AC, 其中 AC 主要与蛋白质作用, 而 PM 具有烷化活性, 主要与 DNA 作用, 造成 DNA 断裂, 可导致微核率增加[6]。

本实验中, 在给予染色体断裂剂环磷酰胺前, 共持续 10 d 给予小鼠注射胸腺肽, 以刺激小鼠 T 细胞成熟和提高整个机体的免疫应答功能, 实验结果表明, 经胸腺肽刺激后小鼠能明显降低环磷酰胺诱导的小鼠微核发生率, 证明胸腺肽可能通过某种机制能起到降低染色体损伤的作用。

根据化合物对诱变原的抑制作用, 可分为细胞内抑制和细胞外抑制两种途径, 每种途径中都包含一系列的分子生化反应, 前者主要是直接保护 DNA 分子免受诱变原的打击或加速其排出; 后者则主要是防止对基因有毒害作用的化合物的形成或直接对其灭活。文献[7]报道胸腺肽可降低过氧化脂质的含量、提高 SOD 值、增加细胞的抗氧化能力和清除自由基的水平。自由基可造成基因突变, 与微核形成有一定的相关性[8], 因而胸腺肽有可能通过这些方面保护遗传物质及降低微核率。另外, 胸腺肽还能够调节细胞中 cAMP 和 cGMP 浓度[1], 推测是否可能通过这些第二信使的浓度变化而改变对某些化合物(如环磷酰胺)的反应和敏感能力, 还需进一步实验和论证。对于上述有意义的结果, 我们正在选择其它遗传毒理试验予以进一步研究。

参考文献:

[1] 顾长海. 临床细胞免疫学[M]. 重庆: 重庆出版社, 1990. 339—341.
[2] Goldstein A L. Clinical application of thymosin alpha-1[J]. Cancer Invest, 1994, 12(5): 545—547.
[3] 吴镇凤, 王铁君, 迟景新, 等. 大剂量胸腺肽对肿瘤放疗病人 T 细胞亚群的影响[J]. 中华免疫学杂志, 1998, 14(6): 438—440.
[4] 曹　佳, 林　真, 余争平. 微核试验—原理、方法及其在人群检测和毒评价中的应用[M]. 北京: 军事医学科学出版社, 2000. 264—272.
[5] 夏世钧, 吴中亮. 分子毒理学基础[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2001. 133—136.
[6] Delmanto R D, de Lima P L, Sugui M M, *et al*. Antimutagenic effect of Agaricus blazei Murill mushroom on the genotoxicity induced by cyclophosphamide[J]. Mutat Res, 2001, 496(1—2): 15—21.
[7] 杨金波, 王　勤, 胡晓愚. 胸腺肽的合成及抗衰老作用研究[J]. 微生物学免疫学进展, 1994, 22(3): 29—31.
[8] 陈少华. 超氧自由基与遗传损伤[J]. 癌变·畸变·突变, 1995, 7(3): 157—159.

(编辑　薛国文)

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