DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.04.001

微核的染色体组成模型与微核实测 DNA含量的比较研究*

论著

曹 佳 程天民** (第三军医大学预防医学系分子毒理学实验室)重庆, 630038

提 要 使用图象分析系统测定了丝裂霉素(MMC)、环磷酰胺(CP)、乙基磺酸甲酯(EMS)和γ-射线诱导小鼠骨髓红细胞微核(MN)的DNA含量,并与模拟的MN各种染色体损伤模型进行了比较,结果发现MMC、CP、EMS诱导MN的染色体组成模型,基本可看成是染色体随机断裂产生的单个断片形成或2个断片随机重接而形成的。而根据DNA探针FISH资料的进一步模拟,认为5 Gy γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞MN,可以由65%的单个断片(Single fragment, 1 Frag), 22%的2个Frag, 7%的3个Frag,以及6%的丢失染色体混合模型而得到较好模拟。

关键词 微核; DNA含量;染色体断裂;模型,遗传

中图法分类号 R329.24

细胞微核(Micronuclei, MN)一般认为来源于染色体损伤后形成的染色体断片,或纺锤体器受损伤后丢失的整条染色体[1]。但有关微核形成的许多细节迄今尚不清楚,如一个MN可以包含几个染色体断片(或染色体)?其组成是随机的还是有规律的[2]?很显然,进一步了解有关MN的染色体组成情况,对于搞清MN形成机理,合理使用微核试验均具有重要意义。本研究以小鼠骨髓红细胞MN为实验材料,研究了染色体随机断裂和重接的几种模型,并与几种化合物、γ-射线诱导MN的实测DNA含量进行了比较。

1 材料与方法

1.1 实验动物

昆明种小鼠(第三军医大学实验动物中心提供),每组4只,体重18~22 g,雌雄各半。

1.2 微核试验

用^{60}Co源γ-射线照射动物,剂量5 Gy,剂量率0.665 Gy/min。标准染色体断剂:丝裂霉素C(Mitomycine, MMC)、环磷酰胺(Cyclophosphamide, CP)、乙基磺酸甲酯(Ethylmethanesulphonate, EMS),其使用剂量分别为5 mg/kg、100 mg/kg、200 mg/kg。小鼠腹腔注射给药后24 h后处死,每只小鼠制作胸骨髓推片2张。甲醇固定。

1.3 红细胞MN的DNA含量测定

细胞涂片的Feulgen染色参见文献[3]。使用CMIAS007真彩色医学图象分析系统(本校病理学教研室)进行MN的DNA含量测定。MN在显微镜下由高分辨彩色摄象机摄入,采用手工分割图象方式,测出目标光密度积分值,每只小鼠测定45个MN,每只小鼠还随机选测了20个G_0期2倍体淋巴细胞核的光密度积分值。将其均值作为G_0期2倍体淋巴细胞核相对DNA含量的正常值。将每组每个MN所测光密度积分值除以该组2倍体淋巴细胞光密度积分平均值,即为每个MN的相对DNA含量。

1.4 染色体损伤模型的选择和建立

按照染色体的随机断裂和重接模型进行模拟[2]。即:每个染色体损伤机会均等,在每个染色体上各部位损伤机会又均等,损伤后形成的染色体断片重新结合在一起的机会也均等。

使用公布的小鼠中期染色体标准命名和DNA含量[4],小鼠全部为端着丝粒染色体(Telocentric chromosome),每个染色单体只有一个臂。假设每个染色体的臂粗细均匀,臂长为1,用CASIOfx-3600p型计算器产生0.000~0.999之间的随机数,分别用于随机选择所损伤的染色体编号和染色体上的断裂位点。断片的随机重接亦按随机选择的方法进行。对于单个染色体断片(Single fragment, 1 Frag),其断片大小规定为从断裂点到臂末端。每个染色体断片假设由两条染色单体组成;2个或3个断片随机重接则形成2 Fragsr或3 Frags。

2 结果

按完全随机化的要求,分别模拟了1个和2个Frags的DNA含量分布模型,但这些单一理论分布模型与MMC、CP、EMS诱导MN的实测DNA含量分布之间均存在明显不同(未公布资料)。因此仅用某一种单一损伤模型难以解释化合物诱导MN的形成模式。但若将染色体断片重接限制在2个Frags以内,并采用一种1 Frag和2 Frags随机混合分布的模型(即1 Frag和2 Frags概率各占约50%)时,则能较好地对MMC、CP、EMS MN的DNA实测值进行模拟(图1~3)。

* 全军"八五"青年科学基金资助项目

** 防原医学教研室 重庆, 630038

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

有关γ-射线诱导 MN的染色体组成的模拟,本研究参照已有的 Miller对小鼠 NIH3T3细胞 MN进行荧光原位杂交的结果[5],模拟了γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞 MN的各种染色体断片组成的分布模型。结果仍完全按随机化原则,调整其比例为65%的 1 Frag, 22%的 2 Frags, 7%的3个 Frags和6%的丢失染色体 (Loss chromosome, LC)时,所形成的染色体断片混合分布模型即可较好地与 5 Gy γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞 MN的实测 DNA分布吻合(图4)。

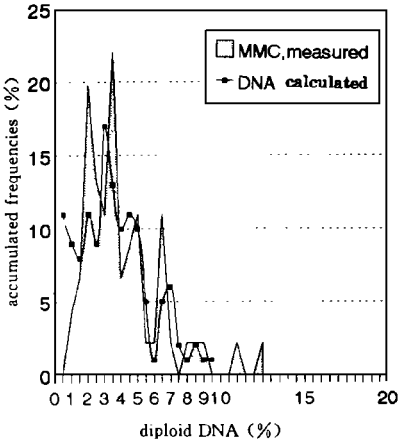


图1 丝裂霉素C诱导MN的DNA含量测定值与1个和2个染色体断片混合分布模型的比较

Fig 1 Comparison of the measured DNA distribution of MN induced by MMC and calculated distribution of mixture model of 1 Frag and 2 Frags

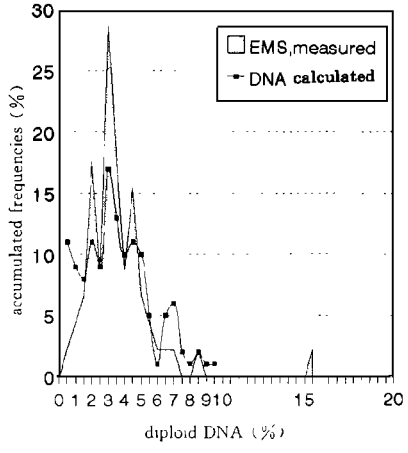


图3 乙基磺酸甲酯诱导MN的DNA含量测定值与1个和2个染色体断片混合分布模型的比较

Fig 3 Comparison of the measured DNA distribution of MN induced by EMS and calculated distribution of mixture model of 1 Frag and 2 Frags

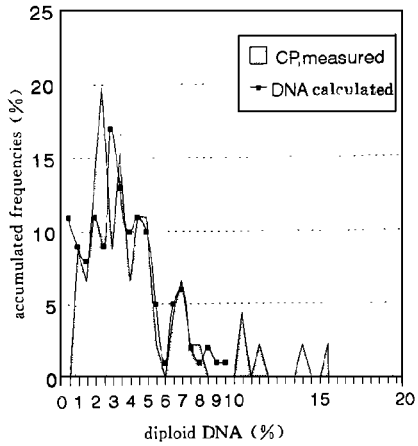


图2 环磷酰胺诱导MN的DNA含量测定值与1个和2个染色体断片混合分布模型的比较

Fig 2 Comparison of the measured DNA distribution of MN induced by CP and calculated distribution of mixture model of 1 Frag and 2 Frags

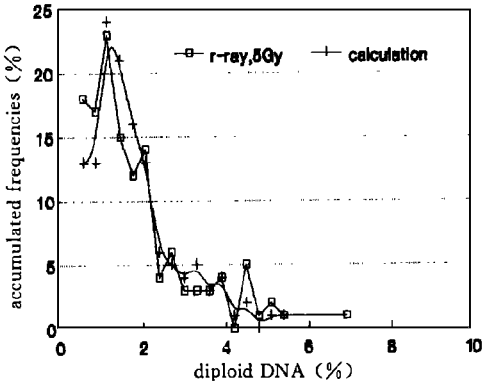


图4 5 Gy γ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞MN的DNA测定值与由不同比例断片混合分布模型的比较

Fig 4 Comparison of the measured DNA distribution of MN irradiated by 5 Gy γ-rays and calculated distribution of mixture model of differental porportional and kinds fragments

3 讨论

一般认为,MN主要有两个来源[1,6]:一种是染色体断裂剂诱导产生的染色体断片;另一种是非整倍体毒剂或纺锤毒剂造成纺锤器损害,诱导产生的整条染色体丢失。上述情况表明 MN的染色体组成与诱导化合物的性质关系较大。而 MN内的染色体(或断片)组成不同,其 DNA含量就必然会有所不同。因此,本研

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

究采用了 4种标准的染色体断裂剂作为诱变因素,以尽量排除由 1条或数条染色体形成的大 MN这样 MN的染色体组成就可基本限制在各种断片模型内考虑。

已有研究证实部分具有增殖分裂能力的细胞,如培养人淋巴细胞、各种细胞株等的 MN具有 DNA合成能力[2]。这必然会增加这部分 MN的 DNA含量。本研究为了排除这一因素,选择了不再分裂的红细胞作为研究细胞,其 MN已失去复制条件和能力。故可较好排除 MN的 DNA复制对模型模拟的影响,因此,本研究中 MN的染色体组成,基本可简化为 MN内含有几个染色体断片?以及断片组成是随机的还是具有某些规律?由于本研究中的 MN主要来源于染色体断片,因此这一问题又转化为诱变因素对染色体的损伤是随机性的,还是具有某些"热点"。有研究认为电离射线对染色体的损伤,多发生在异染色质部分,是一种非随机断裂[7]。但由于染色体上常、异染色质分布基本是交叉和均衡的。所以,采用随机断裂从统计分布上看,应是一种很好的近似,而且可以大大简化模型。至于不同化合物对染色体损伤的机理,情况较为复杂,本研究为了简化模型,也一并采用染色体随机断裂模型。

本研究将 MMC、CP、EMS的 MN组成限制在 1个 Frag和 2个 Frags随机混合的范围内,即断片的随机重接仅限于两个断片之间。由此建立的染色体随机断裂和重接模型,虽然并不特别准确,但却增加了模拟时的可操作性。模拟结果仍然可以较好地与 3种化合物 MN的 DNA实测值吻合。这说明染色体断裂剂诱导产生的 MN,基本是由染色体随机断裂产生的单个断片形成或由两个断片随机重接而形成。但该模型不能对约占 6.7%～ 27.7%大于 6%(2倍体 DNA含量)的大 MN作出合理的预测。估计这部分大 MN主要是由超出模型预测以外的 3个 Frags或部分丢失的整条染色体组成的。另外,理论模型中有 8.3%的断片小于 0.5% 2倍体 DNA含量,而实测 MN的 DNA含量时小于 0.5%的小 MN均未统计,故若将理论模型中这 8.3%的小断片标化去除,模型的模拟可能还要好一些。

Miller曾使用着丝粒和端粒 DNA探针[5],研究了 2～ 4 Gyγ-射线诱导小鼠 NIH3T3细胞 MN的染色体组成,即约 47% MN含 1个 Frag, 28% MN含 2个 Frags, 6% MN含 3个 Frags, 19% MN含 1个以上 LC。该研究较准确地提供了γ射线诱导 MN的染色体实际组成情况,因此也为本研究模拟提供了可供参考的染色体组成比例。由于研究靶细胞有所不同,在本研究中,当其比例调整为 65%的 1个 Frag, 22%的 2个 Frags, 7%的 3个 Frags和 6%的 LC时,所建立的混合分布模型即可与 5 Gyγ-射线诱导的小鼠骨髓红细胞 MN的 DNA实测值较好吻合。这不仅证明了γ-射线诱导的小鼠红细胞 MN也是以几种不同类型断片和丢失染色体混合形成,而且主要以单个染色体断片组成为主(65%),另外还说明我们的 MN形成理论模拟与 Miller的 FISH结果具有较好的一致性[5]。

(向为本研究图象分析提供帮助的校病理教研室卞修武副教授、刘友生副教授表示谢意。)

参考文献

1 Maki-paakkanen J, Hayashi M, Suzuki T *et al*. Analysis by fluorescence *in situ* hybridization with a mouse gamma satellite DNA probe of isolated micronuclei induced in mice by two clastogens and two spindle poinsons. Mutagenesis, 1995; 10(6): 513

2 Nusse M, Kramer J, Miller BM. Factors influencing the DNA content of radiation-induced micronuclei. Int J Radiat Biol, 1992; 62(5): 587

3 曹　佳,卓鉴波.微核实验中浮尔根染色法的应用.中华预防医学杂志, 1989; 23(3): 178

4 Committee on standardized genetic nomenclature for mice. Standard karyotype of the mouse. J Heredity, 1972; 63: 69

5 Miller BM, Werner T, Weier HU *et al*. Analysis of radiation-induced micronuclei by FISH simultaneously using telomeric and centromeric DNA probes. Radiat Res, 1992; 131(2): 177

6 Schriever-Schwemmer D, Adler ID. Differentiation of micronuclei in mouse bone marrow cells: a comparison between CREST staining and fluorescent *in situ* hybridization with centromeric and telomeric DNA probes. Mutagenesis, 1994; 9(4): 333

7 Michalik V. Model of DNA damage induced by radiations of various qualities. Int J Radiat Biol, 1992; 62(1): 9

(收稿: 1996-02-06;修回: 1996-07-11)

(编辑　仇玉福、冷怀明)

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

Comparison between measured and calculated DNA distribution of micronuclei in mice

Cao Jia, Cheng Tianmin (Laboratory of Molecular Toxicology, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract The DNA content of erythrocytic micronuclei (EMN) in bone marrow of mice induced with mitomycine (MMC), cyclophposphamide, ethyl methanesulphonate (EMS) and γ-rays were measured with image analysis system and compared with the calculated DNA distribution of chromosomal fragments of various simulated models. It was found that the chromosomal composition of MN induced with the 3 chemical mutogens consisted of single fragment or random recombination of two fragments after the random chromosomal breakage. Fluorescent *in situ* hybridization with DNA probes revealed that EMN in the bone marrow of mice induced with γ-rays could be simulated better by 65% MN containing 1 fragment, 22% MN containing 2 fragments, 7% MN containing 3 fragments and 6% containing lost chromosomes.

Key words micronucleus; DNA content; chromosomeal breakage; mice

科研简报

体外生物人工肝的构建及其对急性肝衰竭犬的支持作用*

Establishment of an extracorporeal bioartificial liver and its support effect in acute hepatic failure dogs

王英杰 王宇明 李梦东 聂青和 陈国致 黄艳萍 (第三军医大学附属西南医院传染病中心) 重庆, 630038

生物人工肝是近年来迅速发展起来的新一代人工肝,由于它以培养肝细胞为关键材料,兼具肝脏的生物合成和解毒代谢两大功能,从而为肝衰竭患者代偿肝脏功能、稳定内环境以及阻断恶性循环提供了可能,同时也为具有强大再生能力的肝细胞再生提供了条件和时间。故被誉为极有可能像肾透析曾给肾功能衰竭的治疗带来革命性变化一样,为急性肝衰竭的现代治疗提供最大的希望。

目前,体外生物人工肝支持系统(EBLSS)是生物人工肝研究的主要内容,构建理想的 EBLSS并对急性肝衰竭患者予以有效的人工肝支持是该领域的重大课题。本文采用我们以往建立的体外简易两步灌流法分离人肝细胞和肝非实质细胞,综合应用限制贴壁技术进行大量混合高密度、高活性培养(悬浮培养),使用由 225根多孔质(0.2μm)空心纤维组成的生物反应器和由血液透析仪改装的辅助循环装置,共同构成一种人肝细胞型 EBLSS。结果表明,所得肝细胞总产量超过 10^{10}个,在被覆贴壁抑制剂、定时旋转振荡和激素限定条件下,肝细胞与肝非实质细胞呈球形聚集体长期浮游生长,置 EBLSS反应器在正常犬体外循环 5 h后仍保持较高的贴壁能力和存活率,同时见实验犬血清蛋白水平增加。实验过程犬生命征平稳,无不良反应,EBLSS运行正常。

采用门腔静脉侧侧吻合加入肝动脉及门静脉断流法建立犬急性衰竭模型,用所建 EBLSS进行人工肝支持。结果显示,5只急性肝衰竭犬在平均使用约 10^{8}个肝细胞-肝非实质细胞的 EBLSS支持下,存活时间较无细胞循环对照组延长一倍,其肝性脑病发生较晚,脑水肿出现较慢,出血倾向及血压、心率下降亦迟缓。在 EBLSS循环前 5 h内,对照组血氨、乳酸升高迅速,LDH改变明显。上述初步研究结果表明,实验所建立的 EBLSS已发挥出培养肝细胞的生物合成与解毒代谢功能,能够部分代偿急性肝衰竭犬的肝脏功能。本研究为开展我国生物人工肝研究奠定了基础,并为肝衰竭的生物人工肝支持提供了实验依据,经进一步完善 EBLSS及方法后,有可能为发病率居世界首位的重型肝炎肝衰竭的治疗开辟新的途径。

关键词 生物人工肝;细胞培养;急性肝衰竭;人工肝支持
中图法分类号 R318.1
(收稿: 1996-07-30;修回: 1996-08-05)
(编辑 王 红、沈锡庚)

* 国家自然科学基金资助项目, No. 39370189

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