DOI:10.16016/j.1000-5404.1994.04.001
第16卷第4期 第三军医大学学报 Vol,16,No.4
1994年8月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Aug.1994

1,3—丁二烯多次吸入染毒后小鼠红细胞微核率的流式仪检测的研究*

论著

曹 佳 U.Kliesch** M.Nüsse** I.D.Adler** (第三军医大学预防医学系分子毒理室) 630038

提 要 在本研究中使用作者新近建立的流式仪小鼠红细胞微核自动检测技术和微核常规检测技术,测定了小鼠连续吸入1,3—丁二烯气体5d后(50,200,500和1 300 mg/L)骨髓和外周血红细胞的微核率变化情况,结果表明1,3—丁二烯能明显诱导小鼠红细胞微核率升高,其剂量反应为非线性增加,但曲线斜率随剂量增加而趋于平缓,由此证明1,3—丁二烯具有肯定的遗传毒性。同时小鼠外周血嗜多染红细胞率随剂量增大而下降,还说明该化合物具有细胞毒性。

关键词 1,3—丁二烯/中毒;小鼠;微核;流式细胞仪
中图法分类号 R13

1,3—丁二烯是一种广泛用于各种化合物合成及合成橡胶生产的工业气体。已有研究表明,大、小鼠长期吸入1,3—丁二烯后可致癌[1],大量遗传毒理试验也证实其具有肯定的遗传毒性[2]。

最近,欧共体对1,3—丁二烯进行了协作研究,以便对其致癌、致突变性作出更明确的结论。在此研究计划内,我们对小鼠进行5 d吸入染毒,用作者新近建立的流式仪红细胞微核(Micronuclei,简称MN)自动检测技术[3]测定了小鼠骨髓和外周血红细胞MN发生率,得到了1,3—丁二烯遗传毒性的新证据。现报道如下:

1 材料与方法

1.1 动物与分组

使用(102/E_2×C_3H/E_1)F_1代杂交小鼠,雌雄各半,体重25~28 g,每组随机分入小鼠10只。

1.2 动物染毒

采用动态式动物染毒柜染毒。将1,3—丁二烯气体通过配气装置,按所需浓度输入,使用流式计和电脑监测与控制1,3—丁二烯的浓度,以维持其恒定。剂量分组为50,200,500和1 300 mg/L,小鼠每天持续吸入染毒6 h,共染毒5 d。

1.3 血及骨髓标本采集

用抗凝毛细玻管从小鼠眶下静脉丛采血30~50 μl/鼠,动物在染毒前采血作为自身空白对照,染毒5 d后再次采血并处死动物,骨髓采自股骨,按常规方法制片。

1.4 MN的流式细胞仪检测和分选

基本方法见作者先前报道[3],简述如下:血液或骨髓细胞用35%的percoll液离心以去除血小板及微小杂质。

细胞固定液使用含30 μg/ml SDS的1%戊二醛液,4℃过夜,次日吸去固定液并用PBS液洗涤细胞1次。

染液为100 ml PBS中含500 μl DNA特异染料——赫斯特(Hoechst 33342简称HO)和50 μl RNA特异染料——噻唑橙(Thiazole orange简称TO)。每试管中加入2 ml,37℃避光染色45 min。

使用FACS⁻双激光流式细胞仪对MN进行检测和分选验证。在流式仪检测的HO和TO荧光二维点阵图上(图1)X轴方向为TO荧光,成熟红细胞(Nomochromatic erythrocytes,简称NCE)和嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocytes,简称PCE)两个细胞群因胞浆中RNA含量不一而得以分开;在Y轴方向为HO荧光,NCE和PCE中如果含有MN,因其组成为DNA,故会造成HO荧光增强。这样,含MN的NCE(简称MNCE)和含MN的PCE(简称MPCE)会向上位移形成独立的两个细胞群。通过建立计算窗口,每个样本检测50 000个细胞,即可准确地计算MNCE和MPCE发生率。

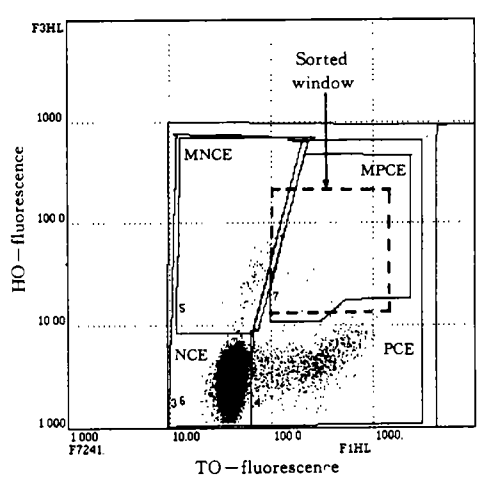


图1 小鼠外周血及含微核红细胞HO-TO荧光流式仪检测二维点阵图

Fig 1 HO-TO fluorescent dot plots of mouse peripheral blood and micronucleated erythrocytes measured by flow cytometry

* 欧共体资助项目(编号CT91—0144)
** 德国环境与健康研究中心 D—85758

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

利用流式细胞仪分选功能，建立“电子分选窗口”(见图1虚线框)，对认定为MNCE和MPCE的细胞分选在载玻片上，荧光显微镜下检查红细胞所含MN的比例。

1.5 MN的显微镜检测

为了验证流式仪机检结果是否正确。外周血采样后取5 μl血样作吖啶橙盖玻片活细胞染色，方法如Hayashi所述[4]。每只小鼠计数1 000个Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ型网织红细胞的MN发生率。骨髓细胞用10% Giemsa染色，荧光镜下读片。

2 结果

2.1 小鼠外周血和骨髓MPCE发生率(见图2)

镜检小鼠骨髓，机检和镜检外周血，其MPCE率均随剂量增加而升高。骨髓和外周血最低剂量50 mg/L时就比各自对照显著增加($P<0.01$，Mann-Whitney test)，剂量反应曲线的斜率随剂量增加而趋于平缓。MPCE率在500至1 300 mg/L处仅有少量升高(骨髓镜检约为17%，骨髓和外周血镜检和机检MPCE之间无显著差异。

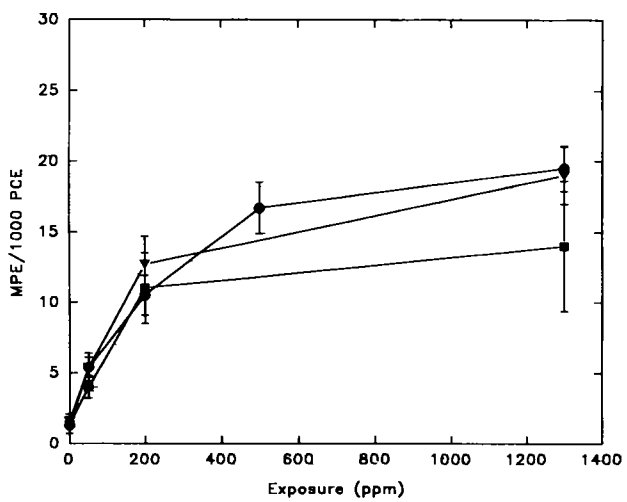


图2 小鼠外周血和骨髓MPCE发生率
(圆形—骨髓，镜检；三角形—外周血，机检；正方形—外周血，镜检)

Fig 2 The frequencies of MPCE in mouse peripheral blood and bone marrow
(Circles—bone marrow, microscopy; Triangles—peripheral blood, flow cytometry; Squares—peripheral blood, microscopy)

2.2 小鼠MNCE和PCE发生率(见图3)

机检小鼠外周血MNCE率也随剂量而升高，但仅当剂量达200 mg/L时比对照显著增加($P<0.05$，Mann-Whitney test)。当剂量增加至200 mg/L时还导致小鼠外周血PCE率开始下降。至1 300 mg/L时PCE已比空白对照降低一半以上。

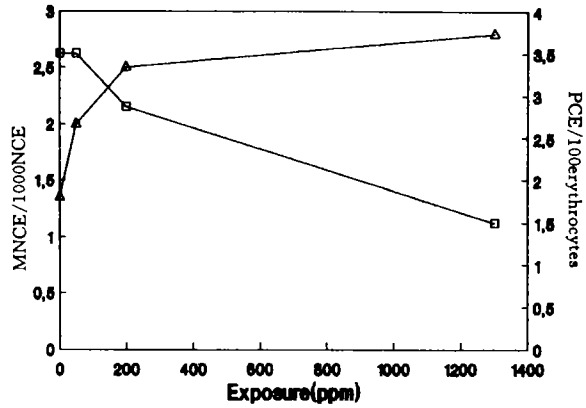


图3 小鼠外周血MNCE和PCE发生率
(三角形—MNCE，机检；正方形—PCE，机检)

Fig 3 The frequencies of MNCE and PCE in mouse peripheral blood
(Triangles—MNCE, flow cytometry; Squares—PCE, flow cytometry)

3 讨论

MN是独立于细胞核而存在于胞浆中的核小体，主要由染色体断片和丢失的整条染色体形成。通过计数各种生物细胞(人，大、小鼠，鱼，植物等)中MN发生率的微核试验(Micronucleus Test，简称MNT)，近年来已广泛用于各种化合物，物理因子，生物因素及环境污染物的遗传毒性的检测[5]。近10多年来，仅我国发表的有关MN文献就逾500篇。

随着MNT的广泛应用，MN的人工镜检方法已远不能满足实际工作的需要。发展MN的自动化检测已成为MNT向前发展的关键[6]。最近，Grawe和作者本人先后建立了一种流式仪小鼠外周血MN自动检测技术[3,7]。检测速度至少比人工检测提高了40倍以上，样本量增大25～50倍以上。这种大样本和高速度的检测，可以大大提高弱诱度剂和弱致癌剂的检出率。

1,3—丁二烯作为一个工业毒物，其遗传毒性早在80年代初就引起了人们的注意。80年代中期，美国将其列入国家级毒理研究项目，进行了系统研究[2]。在6.25，62.5，至625 mg/L各剂量每天吸入6 h，其染毒10 d后，小鼠骨髓细胞姊妹染色体互换(SCE)从6.25 mg/L即开始显著增加。骨髓MPCE从62.5 mg/L开始显著增加。而在长达13周的慢性染毒后，检出诱导

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

MNCE的最低有效剂量是6.25 mg/L。本实验用大样本机检法证实最低有效剂量是50 mg/L，这与大多数文献报道一致。美国最近将工作场所工人的暴露阈值限定在10 mg/L[8]，对此可以再尝试用大样本流式仪MN自动检测技术予以证实。

本实验5天多次吸入1,3－丁二烯后，机检和镜检的小鼠骨髓和外周血MPCE率均升高，其剂量反应曲线为非线性增加并在500与1 300 mg/L间趋于平缓(图2)，该平台的出现似乎不能完全用1,3－丁二烯在体内代谢饱和来解释。有研究显示1,3－丁二烯在体内代谢后会产生一种致癌性和致突变性较强的中间产物1,2－环氧丁烯－3，其与小鼠血红蛋白缬氨酸形成加合物的剂量反应曲线，与1,3－丁二烯染毒后血中1,2－环氧丁烯－3形成的剂量反应曲线非常相似，两者均随1,3－丁二烯浓度增加而趋于平缓。但其在500 mg/L和1 300 mg/L剂量处增辐仍较MN发生率的增幅要低些[9]。因此，可能的机制是，不仅1,2－环氧丁烯－3，而且还有1,3－丁二烯代谢的其它中间产物，都参与了诱导MN形成的过程。1,3－丁二烯诱导MN率升高和其它文献报道的诱导染色体畸变率升高，SCE增加等事实，都证明1,3－丁二烯具有肯定的致突变性。

我们用流式仪还同时检测了外周血MNCE发生率，一般来说，急性染毒不会导致小鼠外周血MNCE升高[5]。但若慢性长期染毒，其MNCE则可以稳定地积累[10]。我们的检测结果证实了这一点。这说明小鼠外周血MNCE作为反映慢性染毒后染色体损伤的一个指标，同样具有很高的灵敏度。

小鼠外周血中PCE百分率(正常为5%以下)，反映了骨髓中新生细胞的增殖程度[5]，是反映化合物细胞毒性的简单而有效的指标。本实验证实当1,3－丁二烯浓度增加至200 mg/L时，即可造成PCE发生率下降，说明高浓度1,3－丁二烯在具有遗传毒性的同时还具有较高的细胞毒性，这与国外报道的用PCE发生率，分裂指数等评价1,3－丁二烯的细胞毒性结果接近[2]。

总之，本实验用大样本和全自动化的流式仪机检，再次证实了工业常用气体1,3－丁二烯具有明显的遗传毒性和细胞毒性。综合美国已公布的6.25 mg/L 13周吸入染毒后即可引起MNCE显著增加的事实，考虑把人的暴露阈值限定在10 mg/L以下是很有必要的。

参考文献

1 Huff JE, Melnick RL, Solleveld HA, et al. Multiple organ carcinogenicity of 1,3-butadiene in BGC3F1 mice after 60 weeks of inhalation exposure. Science,1985,227:548～549

2 Shelby MD. Results of NTP-sponsored mouse cytogenetic studies on 1,3-butadiene, isoprene and chlorprene. Environ Health Perspect,1990,86(1):71～73

3 Cao J, Beisker W, Nüsse M, et al. Flow cytometirc detection of micronuclei induced by chemicals in poly- and normochromatic eryhrocytes of mouse peripheral blood. Mutagensis,1993,8(6):533～541

4 Hayashi M, Morita T, Kodama T, et al. The micronucleus assay with mouse peripheral blood reticulocytes using acridine orangecoated slides. Mutat Res,1990,245(2):245～249

5 Mavournin K, Blakey DH, Cimino MC, et al. The in vivo microucleus assay in mamalian bone marrow and peripheral blood. A report of the U.S. Environmental Proction Agency Gene-Tox program. Mutat Res,1990,239(1):29～80

6 曹　佳.微核自动化检测的研究进展和意义.卫生毒理学杂志,1993,7(3):183～186

7 Grawe J, Zetterberg G, Amneus H. Effects of extends low-dose-rate exposure to 137Cs detected by flow-cytometric enumeration of micronucleated erythrocytes in mouse peripheral blood. Int J Radiat Biol,1993,63(3):339～347

8 ACGIH. Threshold limit values and biological exposure indices. American Conference of Govermerntal Industral Hygienists. Technicl Informational Office. Cincinati, Ohio, 1993,13

9 Johanson G, Filser JG. A physiologically based phamacokinetic model for butdiene and its metabolite butadiene monoxide in rat and mouse and its significance for risk extrapolation. Arch Toxiol,1993,67(1):151～163

10 曹　佳.外周血红细胞微核试验研究近况.卫生毒理学杂志,1990,4(2):112～114

(收稿:1994-04-04;修回:1994-07-09)

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

An investigation of the incidence of micronucleated erythrocytes after multiple inhalations of butadiene with flow cytometry in mice

Cao Jia, U. Kliesch, M. Nüsse, I. D. Adler (Molecular Toxicology Lab, Department of Toxicology, Third Military Medical College, Chongqing, 630038)

Abstract The incidence of micronucleated polychromatic erythrocytes (MPCE) and normochromatic erythrocytes (MNCE) in the bone marrow and peripheral blood induced by multiple inhalations of 1,3-butadiene was observed in mice with a new automatic flow cytometric technique designed by the authoors themselves and the conventional flow cytometry. 1,3-butadiene of 0, 50, 200, 500 and 1 300 ppm was inhalated by the mice repeatedly for 5 days.

It was found that the incidence of MPCE and MNCE was significantly increased in both the bone marrow and peripheral blood after butadiene inhalation and the dosage-effect relation was non-linear. The slope of the curve was flattened when the exposure concentration of 1,3-butadiene was increased.

These findings suggest that 1,3-butadiene possesses definite genetic toxicity and it also exerts cytotoxicity red cells since there was a decrease of MPCE in number in the peripheral blood when the dosage of 1,3-butadiene was increased.

Key words 1,3-butadiene; toxicosis; mice; micronuclei; flow cytometry

论文摘要

放射损伤、烧伤和放烧复合伤早期心肌能量代谢和形态结构的变化及其机理研究*

Effects of radiation, burn and combined radiation-burn injuries on energy metabolism and morphology of myocardium and its mechanism

熊 业 程天民 陈宗荣 (第三军医大学预防医学系复合伤研究室) 630038

放烧复合伤是核爆炸与平时核事故所发生的主要伤类之一。放烧复合伤早期心肌固有收缩力下降的机理尚待探讨。少数文献指出，鉴于烧伤后心肌细胞内高能磷酸化合物含量下降，能量代谢障碍可能是伤后心肌功能下降的重要原因。本实验以单一伤与复合伤相对比检测能量代谢功能变化并与形态病变相联系，观察伤后变化与进行实验治疗(补液或使用钙通道阻滞剂)相引证，以心肌能量代谢的主要细胞器——线粒体为重点，并侧重从钙代谢方面探讨能量代谢变化的机理，以期为阐明放烧复合伤心肌损害及其机理提供实验依据。

用健康雄性 Wistar 大鼠，体重170～250 g。放射损伤的动物接受^{60}Co γ线全身一次照射，照射距离1.5 m，照射剂量6 Gy；烧伤的动物背部剪毛，乙醚麻醉下用5 kW 溴钨灯照射造成三度烧伤；放烧复合伤动物选照射后烧伤。补液量为45 ml/kg 生理盐水，烧伤后立即和12 h 分二次腹腔注射；每次为总量的1/2。钙通道阻滞剂用量为：4 mg/kg 维拉帕米，腹腔注射。

本实验的主要结果和结论如下：(1)放烧复合伤早期血压下降并致休克的发生中，烧伤是主要因素，放射损伤使血压下降更早、更重、持续更长。(2)6 Gy 全身照射、10%～30%三度烧伤与放烧复合伤时心肌线粒体呼吸功能和肌球蛋白 AATP 酶活力显著下降，复合伤时下降更显著。这说明伤后心肌细胞能量的产生和 利用均发生障碍。(3)三伤组心肌组织病变主要要表现为不同程度的退变，不同伤类无显著差异。心肌超微结构主要是肌膜下水肿，肌原纤维模糊，闰盘扩张、解离，线粒体局部空泡化、嵴稀疏、指纹样变，内皮细胞水肿和间质水肿。照射后线粒体肿胀较明显，这在线粒体图像定量分析中得到证实；而烧伤与复合伤时出现了闰盘扩张、解离等病变。(4)补液抗休克显著改善了烧伤和放烧复合伤时心肌细胞能量的产生和利用，保护线粒体结构或减轻损害。(5)放烧复合伤心肌线粒体游离钙含量升高，钙释放加速。补液或维拉帕米减少伤后线粒体钙含量和保护线粒体呼吸功能。提示伤后心肌线粒体呼吸功能损害与钙含量升高有关。(6)外源性钙离子对正常心肌线粒体呼吸功能有双重作用：低浓度钙刺激呼吸；高浓度钙抑制呼吸，维拉帕米有一定的保护作用。外源性钙离子对放烧复合伤心肌线粒体呼吸功能为单向作用：低浓度无作用；高浓度抑制。

由此可见，伤后缺血缺氧可以导致细胞内钙含量升高，钙含量升高是导致线粒体功能损害的重要原因。

关键词 灼伤；辐射损伤；休克；线粒体；钙；心肌；大鼠

中图法分类号 R644，R818

* 全军"八五"攻关题分题，国家自然科学基金资助

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