

基因重组人碱性成纤维细胞生长因子的遗传毒性研究

马明福¹, 李新生,¹ 蔡敏¹, 李练兵¹, 曾维三¹, 廖明阳², 王治乔²

(1. 重庆市计划生育科学研究所, 重庆 400020; 2. 军事医学科学院毒物药物研究所, 北京 100850)

摘要: 用 Ames 试验、CHL 细胞染色体畸变试验、小鼠骨髓 PCE 微核试验和小鼠致畸试验对基因重组人碱性成纤维细胞生长因子(rh-bFGF)进行研究。结果显示, rh-bFGF(0.1 ~ 500 μ g/皿)对 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株在 \pm S9mix 条件下无致突变作用。各剂量组的微核细胞率与溶剂组比较, $P > 0.05$ 。4 个剂量组 CHL 细胞染色体畸变率均 $< 5\%$ 。在妊娠母鼠 6 ~ 15d PO 给药, 各剂量组活胎率 90.2% ~ 95.9%, 与溶剂组 95% 比较, $P > 0.05$ 。对胎鼠外观、骨骼和内脏无致畸作用。但 0.03264mg/kg b.w 吸收胎与溶剂组比较, $P < 0.01$, 显示一定的胚胎毒性。

关键词: rh-bFGF; 突变; 畸变; 遗传毒性

中图分类号: Q784

文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2000)01-0015-18

Studied on Genotoxicity of Recombinant Human Basic Fibroblast Growth Factor

MA Ming-fu¹, LI Xin-sheng¹, CAI Min¹, LI Lian-bing¹, ZENG Wei-san¹, LIAO Ming-yang², WANG Zhi-qiao²

(1. Chongqing Family Planning Scientific Research Institute, Chongqing 400020; 2. Institute, Research of Pharmacology and Toxicology, Academy of Medical Sciences, Beijing 100850, China)

Abstract: The genotoxicity of recombinant human basic fibroblast growth factor(rh-bFGF) was studied by Ames test, Chromosome aberration assay of mammalian cell (CHL) in vitro, mouse marrow micronucleus assay and teratogenesis assay. The results showed that rh-bFGF at the dose level of(0.1 ~ 500 μ g/plate) did not induce positive mutations in TA97, TA98, TA100, TA102 with or without S9mix of Ames test. It was control within the range ($< 5\%$) of chromosome aberration rates from rh-bFGF with 4 doses groups with or without S9min. The frequency of mouse micronucleus rate had no increase. It was divided into each groups of rh-bFGF received(p.o) dosages the 6th to 15 day of gestation mouse respectively in the teratology test. The frequency of live fetuses of each dose was between 90.2 ~ 95.9%, there were no significant difference as compared with 95% of solution control group. It did not cause deformity of the fetus appearances, bone and internal organs. But there were significant differences from solution control in rh-bFGF group of absorfoetus at 0.03264mg/kg($P < 0.01$). The results showed certainly dembyotoxicity.

Key words: rh-bFGF; Mutation; Teratogenesis genotoxicity

基因重组人碱性成纤维细胞生长因子(recombinant human basic Fibroblast Growth Factor, rh-bFGF)是一种促进神经、血管、肌肉皮肤等修复的生长因子,是重组 DNA 技术构建的多功能生物活性物质,具有良好的临床疗效^[1]。为了确保人体用药的安全性,更好地应用于临床,了解是否具有潜在的遗传危害,对 rh-bFGF 进行了致突变与致畸作用的研究。

1 材料和方法

1.1 受试药物

rh-bFGF 为白色粉末,纯度 93.71%,批号 96031,易溶于水,由广州微观生物工程公司和暨南大学生物工程研究所提供。

1.2 Ames 试验

TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株由美国 Ames

教授提供,采用标准平皿掺入法^[2]在 ± S9mix 条件下试验。rh-bFGF 配成 0.1 ~ 500 μg/皿 6 个剂量浓度,另设空白、辅料、溶剂、S9mix 和阳性对照组,各剂量组均做 3 皿,重复试验 2 次。37℃ 培养 48h,计数回变菌落数,结果判断按标准执行。

1.3 哺乳动物细胞染色体畸变试验

用中国仓鼠成纤维细胞 (CHL, 华西医科大学公共卫生学院提供),按 Ishidate^[3]方法,先测定半数抑制浓度 (IC₅₀),其 IC₅₀ 值为 53.0 μg/ml。根据 IC₅₀ 值,设 rh-bFGF 剂量为 53.0、26.5、13.25、6.625 μg/ml。以空白、辅料、溶剂、阳性 (- S9mix MMC 0.2 μg/ml, + S9mix CP 60 μg/ml) 作对照。在 ± S9mix 条件下进行试验 (+ S9mix 时药物作用 6h 后换 DMEM 一次),每组

观察 100 个中期细胞,记录出现的各类染色体畸变,计算畸变率 (%)。

1.4 小鼠骨髓细胞微核试验

用 NIH 雄性小鼠 72 只,由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号 24301042,体重 22.5 ± 1.5g,随机分组,每组 6 只。预试验 rh-bFGF 最高剂量为 0.034 mg/kg (由于未测得 LD₅₀,此值为人临床拟用量 200 倍),一次肌肉注射给药,在给药后 12、24、36、48、72h 取材,制片,观察不同时间点微核细胞率^[4]。实验设 rh-bFGF 0.084、0.0085、0.00213、0.00053 mg/kg b.w (相当于临床拟用量的 3.118 至 200 倍)。同时以空白、辅料、溶剂、阳性 (CP 100 mg/kg) 作对照,肌肉注射,给药后 24h 处死动物,制片,染色,以双盲法

表 1 rh-bFGF 的 Ames 试验结果 (X̄ ± SD) *

剂量 (μg/ml)	TA97		TA98		TA100		TA102	
	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉	- S ₉	+ S ₉
500	145.56 ± 8.04	145.11 ± 9.06	47.33 ± 6.57	52.00 ± 6.67	182.88 ± 10.00	209.00 ± 16.63	254.33 ± 18.90	255.00 ± 17.54
250	146.77 ± 12.01	163.00 ± 9.30	50.55 ± 4.03	51.56 ± 5.72	17.67 ± 24.64	198.55 ± 13.90	260.00 ± 12.68	257.00 ± 17.04
100	149.33 ± 15.42	141.22 ± 9.41	47.44 ± 5.72	47.00 ± 7.46	168.67 ± 7.51	186.00 ± 6.68	247.00 ± 15.45	247.88 ± 10.82
10	136.44 ± 10.22	143.77 ± 5.47	47.11 ± 4.70	52.11 ± 6.97	173.33 ± 15.79	212.00 ± 13.07	257.33 ± 11.11	251.44 ± 23.60
1	144.00 ± 12.50	142.87 ± 7.41	41.00 ± 5.45	43.38 ± 3.76	172.89 ± 18.08	205.11 ± 26.69	233.78 ± 9.13	261.00 ± 10.78
0.1	146.67 ± 9.13	149.88 ± 5.79	43.11 ± 5.46	47.00 ± 7.40	174.33 ± 16.36	202.77 ± 24.77	248.67 ± 14.48	260.88 ± 12.63
0	147.11 ± 11.49	141.67 ± 9.44	40.22 ± 2.63	41.88 ± 5.41	176.0 ± 14.40	187.44 ± 22.55	247.88 ± 10.76	250.77 ± 12.78
溶剂对照	135.44 ± 12.78	153.22 ± 13.59	41.78 ± 7.13	44.11 ± 6.25	165.29 ± 12.59	165.33 ± 9.51	247.55 ± 14.31	251.11 ± 11.99
辅料对照	142.44 ± 9.81	143.44 ± 18.54	43.22 ± 7.69	40.33 ± 4.66	178.67 ± 8.37	169.22 ± 20.35	240.33 ± 14.33	245.77 ± 28.41
S 对照	-	142.67 ± 10.97	-	46.78 ± 5.91	-	195.33 ± 24.23	-	260.25 ± 11.60
阳性对照	MMS 0.5 μl	2-AF 10 μl	Dan 10 μl	2-AF 10 μl	MMS 1 μl	2-AF 10 μl	MMS 1 μl	1.8-Dan 60 μl
	1262.56 ± 285.97	1051.55 ± 324.72	824.78 ± 71.17	786.22 ± 53.14	1249.11 ± 140.17	1349.11 ± 96.91	1279.00 ± 168.15	891.77 ± 197.03

* N = 9 (每一剂量 ± S, 各 9 皿)

表 2 rh-bFGF 的 CHL 细胞染色体畸变试验结果

受试物	剂量 (μg/ml)	- S ₉ (24h)				+ S ₉ (48h)				- S ₉ (24h)				+ S ₉ (48h)			
		细胞 个	%	类型	判定	细胞 个	%	类型	判定	细胞 个	%	类型	判定	细胞 个	%	类型	判定
rh-bFGF	6.625	100	3	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	-	-	-	100	-	-	-
rh-bFGF	13.25	100	1	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	-	-	-	100	1	n.ab	-
rh-bFGF	26.50	100	4	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	2	n.ab del	-	100	-	-	-
rh-bFGF	53.00	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
辅料对照	1131.55	100	2	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	1	b	-
溶剂对照	0.02 **	100	-	-	-	100	3	n.ab	-	100	-	-	-	100	-	-	-
空白对照	0	100	-	-	-	100	1	n.ab	-	100	-	-	-	100	1	del	-
阳性对照																	
MMC	0.20	100	27	***	++	100	44	***	++								
CP	60.00									100	44	***	++	100	51	***	++

* 数目畸变; ** ml/ml; *** 主要畸变类型为 b, f, r, qr, tr, del, pva。

计数,每只观察 1000 个 PCE 及正常红细胞(NCE)。

1.5 小鼠致畸试验

用昆明种性成熟小鼠,雄性体重 $40.1 \pm 3.1\text{g}$,雌性为 $34.5 \pm 3.2\text{g}$,动物由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号 24301041。随机取获阴栓的雌性小鼠,每组 > 25 只。rh-bFGF 0.03264、0.00408 和 0.00051mg/kg b.w(相当于临床拟用量 3 至 192 倍)剂量组,于孕鼠 6~15d,每天肌肉注射一次,连续 10d。同时设空白‘辅料’溶剂和阳性(孕鼠 d9~11d 肌注 CP10mg/kg b.w)对照。于妊娠第 18 天颈椎脱臼处死动物,测量胎鼠的身长和尾长,称体重,记录胎鼠的活胎、死胎、吸收胎及着床数,检查各胎鼠外观、内脏和骨骼畸形,上述参数进行统计处理^[5,6]。

2 结果和讨论

2.1 Ames 试验

rh-bFGF 各剂量组显示,在 \pm S9mix 条件下 4 个菌株的回变菌落数均未超过阴性对照 2 倍,表明在 0.1~500 μg /皿时对菌株无致突变性,结果见表 1。

2.2 染色体畸变试验

在 \pm S9mix 条件下, rh-bFGF 各剂量组染色体畸变率均在正常范围(<5%)。表明各剂量组均无诱发 CHL 细胞染色体畸变作用,结果见表 2。

2.3 小鼠骨髓细胞微核试验

最高剂量组 5 个时间点的微核细胞率无差异,故本试验采用 24h 取材。各剂量组均未见小鼠骨髓 PCE 微核细胞率增加,即无诱发微核细胞的作用,其结果见表 3。

2.4 小鼠致畸试验

2.4.1 rh-bFGF 对孕鼠体重的影响

各剂量组妊娠期母鼠体重和净增重与溶剂对照组比较,(各剂量组的母鼠净增重为 2.66~2.96 \pm 2.49~4.74g,溶剂对照为 3.71 \pm 2.52g)无显著差异, $P > 0.05$ 。

表 3 rh-bFGF 不同剂量的微核率($\bar{X} \pm SD$)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{kg}$)	PCE (个)	MN (个)	MNF (%)	PCE	
					PCE + NCE	(%)
rh-bFGF	0.53	6000	17	2.83 \pm 0.75	77.09	
rh-bFGF	2.13	6000	13	2.17 \pm 0.98	76.20	
rh-bFGF	8.50	6000	14	2.33 \pm 0.82	79.31	
rh-bFGF	34.00	6000	23	3.83 \pm 0.75	74.34	
辅料对照	690.00	6000	13	2.17 \pm 0.75	77.26	
溶剂对照	10.00*	6000	15	2.50 \pm 0.55	79.47	
空白对照	0	6000	21	3.50 \pm 0.55	72.03	
阳性对照	100.00**	6000	362	60.33 \pm 20.11	79.27	

* ml/kg; ** mg/kg。

2.4.2 rh-bFGF 对小鼠胎鼠发育的影响

各剂量组对小鼠受孕率(平均着床数)窝平均活胎数活胎率无影响。0.0324mg/kg b.w 吸收胎与溶剂组比较,有显著性差异。各剂量组未明显外观畸形,而阳性组外观畸形率为 97.8%,主要表现为开眼(足外翻)卷尾和短尾等,结果见表 4。

2.4.3 rh-bFGF 对胎鼠生长发育的影响

各剂量组的胎鼠体重(身长)尾长与对照组比较,无明显差异, $P > 0.05$,表明对体重(身长)尾长的生长发育无影响。而阳性组环磷酸胺与溶剂对照组比较差异明显($P < 0.01$)。

2.4.4 rh-bFGF 对胎鼠骨骼系统的影响

各剂量组均有胸骨发育不全,缺肋或多肋等异常现象。但与溶剂组比较,无显著差异, $P > 0.05$ 。阳性对照的骨骼畸形率为 91.4%(见表 5)。

2.4.5 rh-bFGF 对胎鼠内脏系统的影响

徒手切片检查各剂量组胎鼠内脏系统未见明显畸形,仅见一只胎鼠发生腭裂。阳性组畸形率为 87.3%,主要表现为腭裂、肾缺失等。

本研究分别反应细菌基因突变、染色体畸变和胚胎畸形,从体外和体内,真核细胞和原核细胞,母

表 4 rh-bFGF 对小鼠生殖功能的影响

组别	剂量 (mg/kg)	受精 鼠 (只)	孕鼠 (只)	受孕 率 (%)	检测 窝数	着床 总数	平均着 床数 ($\bar{X} \pm SD$)	活胎		吸收胎		死胎		外观畸形			
								窝 数	窝均数 ($\bar{X} \pm SD$)	胎鼠 (只)	率 (%)	窝 数	率 (%)	窝 数	率 (%)	窝 数	率 (%)
rh-bFGF	0.03264	35	25	71.4	25	256	10.2 \pm 2.8	25	9.2 \pm 3.2	231	90.2	12	8.2	4	1.6	0	0.0
rh-bFGF	0.00408	33	27	81.8	27	293	10.9 \pm 3.3	27	10.0 \pm 3.0	269	91.8	9	4.4	7	3.8	0	0.0
rh-bFGF	0.00051	33	26	78.8	26	251	9.7 \pm 2.8	26	9.2 \pm 3.7	239	95.2	5	4.4	1	0.4	0	0.0
辅料对照	0.06645	33	29	87.9	29	288	9.9 \pm 3.1	29	9.6 \pm 3.0	279	96.9	5	2.1	2	1.0	0	0.0
溶剂对照	10.00*	33	28	84.9	28	290	10.4 \pm 2.5	28	9.9 \pm 2.5	278	95.9	6	2.1	4	2.0	0	0.0
环磷酸胺	10.00	31	25	80.7	25	250	10.0 \pm 3.6	19	7.4 \pm 4.3	140	56.0	18	36.8	9	7.2 \pm 3.3	19	97.8

* ml/kg b.w; ** 与溶剂对照组比较, $P < 0.05$; *** 与溶剂对照组比较, $P < 0.01$ 。

表 5 rh-bFGF 对胎鼠骨骼系统的影响

组别	剂量 (mg/kg)	胎鼠 (只)	上枕骨骨化程度					胸骨发 育不全	肋骨 畸形	畸形 胎鼠
			0级	I 级	II 级	III 级	IV 级			
rh-bFGF	0.03264	114	10.9 (95.6)	4 (3.5)	1 (0.9)	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (9.6)	4 (3.5)	15 (13.2)
rh-bFGF	0.00408	135	130 (96.3)	5 (3.7)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	13 (9.6)	1 (0.7)	14 (10.4)
rh-bFGF	0.00051	123	121 (98.4)	2 (1.6)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	10 (8.1)	3 (2.4)	13 (10.6)
辅料对照	0.06645	142	137 (96.5)	5 (3.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	7 (4.9)	3 (2.1)	9 (6.3)
溶剂对照	10.00 [*]	136	134 (98.5)	2 (1.5)	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	8 (5.9)	3 (2.2)	10 (7.4)
环磷酰胺	10.00	81	43 ^{**} (53.1)	15 ^{**} (18.5)	42 (44.8)	10 (12.3)	1 (1.2)	39 ^{**} (48.1)	54 ^{**} (67.7)	74 ^{**} (91.4)

* mg/kg b.w; ** 与溶剂对照组比较 $P < 0.01$ 。

体和胚胎诸方面评价了 rh-bFGF 的致突变和致畸性。其结果表明, rh-bFGF 各剂量组对 Ames 试验菌株、CHL 细胞染色体、小鼠骨髓嗜多染红细胞均无致突变作用。在致畸试验中, 人临床拟用量 24 倍以内未见明显生殖毒性与致畸作用, 但在 192 倍时呈现一定胚胎毒性。

参 考 文 献:

[1] 丁焕文, 等. 碱性成纤维细胞生长因子研究进展 [J]. 细胞生

物学杂志, 1996; 18(1): 14.

- [2] Maron DM, Ames EN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test [J]. Mutat Res, 1983; 113(4): 173.
- [3] Ishidate M. The date book of Chromosomal aberrtion tests in Vitro on 587 Chemical substane using a chinese hamster fibroblast Line (CHL cell) [M]. Tokey: The Realize Inc 1983; 1.
- [4] 人民共和国卫生部药政局编. 临床前研究指导原则汇编 [药理学、药理学、毒理学] 生殖毒性试验 [S]. 北京: ,1993, 216.
- [5] Wilson JG. Handbook of teratology [M]. New York: Plenum press 1978; 191