

文章编号:1004 - 616X(2002)01 - 0027 - 03

论著 ·

抗癌药物金克(Jinke)对小鼠骨髓、脾脏细胞微核形成的效应

叶亚新

(苏州铁道师范学院生物系,江苏 苏州 215009)

【摘要】目的:检测抗癌药物金克(Jinke)的诱变活性,评价其可能的潜在危害。方法:以小鼠脾脏和骨髓 PCE 细胞为观察对象,采用微核试验法,分别检测各处理组的微核细胞率(MNCF)。结果:金克对小鼠骨髓和脾脏 PCE 细胞均有明显的微核效应,其 MNCF 同阴性对照相比有极其显著的差异。金克诱发小鼠脾脏和骨髓 PCE 细胞的微核剂量效应、时间效应基本一致。结论:金克具有较强的诱变活性,有必要对其毒性进行多角度的研究。在小鼠微核试验中,骨髓和脾脏可以相互替换,这为评价被检测物的毒理效应提供了方便。

液引起的精原细胞 DNA 迁移长度显著比 PBS 烟液 8 倍稀释液长,表明香烟烟雾脂溶性物质对男性生殖细胞 DNA 损伤作用更强。

吸烟是否引起男性生殖细胞染色体畸变是目前十分关注的研究课题。张海珠等用人精子/金黄地鼠卵融合试验对 23 例吸烟者精子染色体进行的分析,结果显示吸烟者精子染色体结构和数目畸变率均明显高于对照组¹²。本次研究虽然未能检出香烟烟雾水溶物引起的小鼠睾丸初级精母细胞染色体结构畸变率增加,但发现各剂量组性染色体单价体和常染色体单价体均显著高于阴性对照组,并有明显的剂量-效应关系。这表明香烟烟雾中可能含有非整倍体诱变剂,并且这些非整倍体诱变剂可能与吸烟者精子性染色体和 1 号常染色体非整倍体畸变率增高有关^{13,14}。男性生殖细胞染色体畸变,尤其性染色体和常染色体非整倍体畸变是不育、自然流产、死胎死产、胎儿先天性畸形、智力发育障碍以及人类其他某些先天性疾病的主要原因之一,因此应引起足够重视。

参考文献:

- 1 全国吸烟情况调查组. 全国吸烟情况抽样调查结果 J. 中华医学杂志, 1987, 67(4): 229 ~ 232.
- 2 Merino G, Lira SC and Martinez-Chepue J. Effects of cigarette smoking on semen characteristics of a population in Mexico J. Arch Androl, 1998, 41(1): 11 ~ 15.
- 3 Vine MF, Tse CK, Hu P, et al. Cigarette smoking and semen quality J. Fertil Steril 1996; 65(4): 835 ~ 842.
- 4 Zavos PM, Correa JR, Antypas S, et al. Effects of seminal plasma from cigarette smokers on sperm viability and longevity J. Fertil Steril, 1998, 69(3): 425 ~ 429.
- 5 J Zavos PM, Correa JR, Karagounis CS, et al. An electron microscope study of the axonemal ultrastructure in human spermatozoa from male smokers and nonsmokers J. Fertil Steril, 1998, 69(3): 430 ~ 434.
- 6 孟庆余. 吸烟对男性不育症影响的流行病学调查分析 J. 中华流行病学杂志, 1995, 16(5): 284.
- 7 Tomarin R, Ballarin C, Nardini B, et al. Influence of smoking habit on the frequency of micronuclei in human lymphocytes by the cytokinesis block method J. Mutagenesis, 1991, 6(2): 123 ~ 126.
- 8 Chia SE, Xu B, Ong CN, et al. Effect of cadmium and cigarette smoking on human semen quality J. Int J Fertil, 1994, 39(5): 292 ~ 298.
- 9 Zenz MT, Bielecki R, Reed TE. Detection of benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in sperm of men exposed cigarette smoke J. Fertil Steril, 1999, 72(2): 330 ~ 335.
- 10 Shen HM, Chia SE, Ni ZY, et al. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking J. Reprod Toxicol, 1997, 11(5): 675 ~ 680.
- 11 张遵真, 衡正昌, 赵蓉, 等. 香烟烟雾对雄性小鼠生殖细胞 DNA 损伤的研究 J. 癌变 畸变 突变, 1999, 11(6): 319.
- 12 张海珠, 黄艳仪, 廖宝平, 等. 吸烟对人精子染色体畸变率的影响 J. 中国优生与遗传杂志, 1997, 5(2): 1 ~ 3.
- 13 Rubes J, Lowe X, Moore D, et al. Smoking cigarettes is associated with increased sperm disomy in teenage men J. Fertil Steril, 1998, 70(4): 715 ~ 723.
- 14 Harkonen K, Vitaann T, Larsen SB, et al. A neuploidy in sperm and exposure to fungicides and lifestyle factors. A European concerted action on occupational hazards to male reproductive capability J. Environ Mol Mutagen, 1999, 34(1): 39 ~ 46.

【关键词】微核试验;金克;脾脏;骨髓

中图分类号:R979.1

文献标识码:A

EFFECT OF ANTICANCER DRUG JINKE ON MICRONUCLEUS FORMATION IN MOUSE SPLEEN AND BONE MARROW PCE CELLS

YE Ya-xin

(Department of Biology, Suzhou Railway Teachers College, Suzhou 215009, China)

Abstract : Purpose : To investigate the mutagenic effects of anticancer drug Jinke. **Methods :** micronucleus test in mice and bone marrow PCE cells were used respectively to determine micronucleol cell frequencies (MNCF). **Results :** The MNCF of Jinke-treated groups were much significantly higher than that of control group, and to some extent, were dose-responsive. **Conclusion :** Jinke has strong mutagenic effect, and the result of micronucleus test on spleen PCE cells is closely similar to that on bone marrow cells.

Key words : micronucleus test; Jinke; spleen; bone marrow

微核试验是 70 年代初期建立的一种利用哺乳动物骨髓细胞染色体改变来测定致突变作用的实验方法¹。由于小鼠骨髓多染性红细胞 (PCE) 微核试验法具有简便快速等优点,已广泛应用于电离辐射、环境致突变剂等的研究,是筛选化学致突变剂的常用方法之一²。

抗癌新药金克 (Jinke) 是数十家科研单位经 20 余年的努力研制而成的植物抗癌药物,为黄棕色或棕色颗粒,有气腥味、味甜、微苦;以荷 S-180 瘤株小鼠观察了其药效,证明该药对小鼠实体和腹水型瘤株有一定的抑制作用。临床应用对消化系统的恶性肿瘤有明显疗效,尤其对中、晚期各类肝癌具有明显的抑制肿瘤生长作用,但治疗的同时也发现有恶心、呕吐等不良反应。对此我们利用小鼠骨髓细胞、脾脏细胞微核试验对金克的遗传毒理效应进行测定,为评价其对遗传物质的可能潜在危害提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 试剂 金克粉剂 (启东盖天力制药有限公司生产) 用蒸馏水配成 3 个浓度:100 mg/ml、200 mg/ml、300 mg/ml。

1.2 动物 8~12 周龄昆明种小白鼠,雌雄各半,由苏州大学医学院动物中心提供,合格证编号:苏动(质)97018、苏动(环)97020、苏动(环)97040。

实验动物随机分成 10 组,每组 5 只。实验组按

注射剂量分成 3 大组,每组再按取样时间分成 3 组;对照组只注射蒸馏水。

1.3 处理方法 参照文献 2,3,5,实验组动物腹腔注射药物,经 2 d、4 d、6 d 之后颈椎脱臼处死。先取出脾脏剪成小块,放在培养皿中的输血滤网上,以注射器内芯轻轻挤压以使细胞通过滤网而悬于 3 ml 无菌小牛血清内;尽快剥离小鼠双侧股骨,切断股骨两端,用无菌小牛血清冲出骨髓细胞于离心管中。脾脏细胞和骨髓细胞悬液均经 800 r/min,离心 5 min,弃上清;各组细胞悬液均涂片 5 张,晾干,甲醇固定 20 min;自然干燥后,用 Gemsa 染液室温下染色 25~30 min;冲洗风干后观察。

1.4 观察及统计

在每一标本的染色片上,选择轮廓清晰、边缘光滑、均匀分布的 PCE 细胞,计数含有微核的细胞数,求出微核细胞率 (MNCF)。PCE 细胞灰蓝色,微核为紫红色,处于细胞质中。微核的形态多数是单个圆形、边缘光滑整齐,偶有肾形、环形、马蹄形、椭圆形的微核出现;嗜色性与有核细胞的胞核相同;微核大小约占细胞 1/20~1/4。实验结果采用 *t* 检验法,比较分析给药组和对照组以及脾脏和骨髓细胞的 MNCF。

2 结果与分析

2.1 金克对小鼠脾脏细胞、骨髓细胞微核率的影响 (表 1)

表 1. 抗癌药物金克对小鼠脾脏、骨髓细胞的微核生成效应

Table 1. Micronucleus effect of Jinke on mice spleen and bone marrow PCE cells

Concentration (mg/ml)	Days of observation	No. Of cells scored	Spleen PCE cells		Bone marrow PCE cells		P value
			MNCF ($\bar{x} \pm s$)	t value	MNCF ($\bar{x} \pm s$)	t value	
100	2	15 000	13.27 \pm 3.35	3.59	12.47 \pm 3.76	3.75	> 0.05
	4	15 000	28.50 \pm 6.30	12.59	29.13 \pm 3.29	11.70	
	6	15 000	33.00 \pm 4.06	14.92	28.80 \pm 6.72	6.75	
200	2	15 000	17.80 \pm 4.59	6.82	17.13 \pm 4.65	6.20	> 0.05
	4	15 000	30.10 \pm 5.08	15.15	28.27 \pm 6.87	10.57	
	6	15 000	48.00 \pm 4.85	23.07	49.00 \pm 4.30	24.30	
300	2	15 000	32.20 \pm 5.67	23.21	31.36 \pm 7.20	10.35	> 0.05
	4	15 000	34.30 \pm 3.87	16.5	32.53 \pm 3.36	21.44	
	6	15 000	52.80 \pm 3.03	21.49	40.33 \pm 1.53	33.81	
Control		15 000	9.45 \pm 2.93		7.87 \pm 2.57		

从表 1 中可以看出,不同浓度的金克对小鼠脾脏细胞、骨髓细胞 MNCF 有明显影响。与对照组相比, MNCF 明显上升,经 t 检验,差异极显著 (P < 0.01)。而各剂量组脾脏和骨髓 PCE 细胞的 MNCF 值均很接近 (P > 0.05)。

2.2 金克诱变小鼠脾脏细胞微核的剂量效应关系及时间效应关系

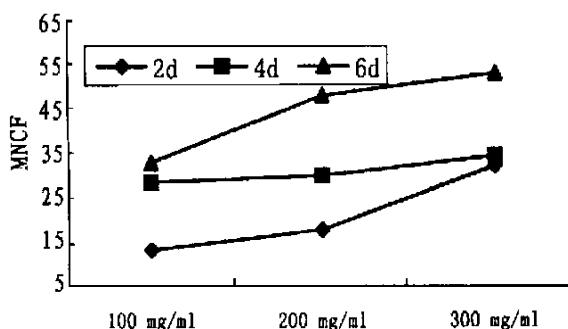


图 1. 抗癌药物金克对小鼠脾脏细胞微核的剂量效应

Figure 1. Dose response of Jinke on micronucleus test of mouse spleen PCE cells

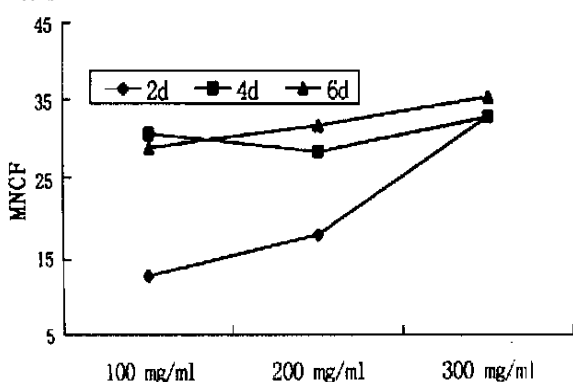


图 2. 抗癌药物金克对小鼠骨髓细胞微核的剂量效应

Figure 2. Dose response of Jinke on micronucleus test of mouse bone marrow PCE cells

由表 1、图 1 和图 2 可看出,随着金克浓度的增加, MNCF 呈现上升的趋势,反映出一定的剂量效应

关系;相同浓度下,不同的处理时间导致的微核效应也有所不同,随处理时间的延长也呈现一定上升趋势。

3 讨论

金克作为一种抗癌新药,其对肝癌的抑制效应在其他实验中得到印证,但从我们所进行的实验结果看,其对小鼠脾脏、骨髓 PCE 细胞具有较强的致突变效应,根据国际诱变剂、致癌剂防护委员会 (ICPEMC) 对遗传毒物所下的定义:任何一项致突变性试验,不论其遗传终点如何,只要得出阳性结果,即可认为该受试物属于致突变物⁴。由此表明,金克对小鼠有较强的致突变效应。以往的生物试验和医学试验表明,小鼠实验得出的研究成果一般也适用人类。所以,可以推测,金克对人类细胞染色体可能具有较强的诱变作用,这应引起我们高度重视,有必要从多种角度对其进行安全性评估。

本实验结果显示,金克诱发脾脏,骨髓细胞的微核效应较为相似,据此论证了 Yasuhiro 的观点⁵:小鼠的脾脏可以作为骨髓的替代物,进行微核试验。

参考文献:

- Heddle J A. A rapid *in vivo* test for chromosomal damage J. *Mutat. Res.*, 1973, 18:187 ~ 190.
- 曹佳,林真(日本),余争平. 微核试验 M. 北京:军事医学科学出版社, 2000, 42 ~ 64.
- 殷学军,刘德祥,黄世友,等. 小鼠脾脏与骨髓细胞在微核试验染色体畸变分析中的应用 J. *遗传*, 1988, 10(6): 8 ~ 22.
- 王蕊芳,金志玉,孔祥生,等. 抚仙湖无机污染物化学背景值及动物体内致突变性评定 J. *动物学研究*, 1999, 20(2): 99 ~ 103.
- Yasuhiro S, Fumiyu H, Hiroko M, et al. The micronucleus test with mouse spleen cells J. *Mutat Res.*, 1983, 121: 53 ~ 57.