

高剂量硒诱发姐妹染色单体交换及染色体畸变

陈贤均 赵红刚

咸宁医学院 生物学教研室及病理学教研室 湖北咸宁 437100

摘要 为阐明正常人体外周血淋巴细胞培养物中加硒的遗传毒性剂量及其毒性特征,用不同剂量的亚硒酸钠处理培养中的淋巴细胞 72h,观察其姐妹染色单体交换(SCE)及染色体畸变率的变化。结果显示在培养体系中添加 0.05 - 0.25mg/L 剂量的亚硒酸钠不增加 SCE 频率($P > 0.5 - 0.2$)和染色体畸变率($P > 0.5$),添加 0.75 - 1.50 mg/L 剂量的亚硒酸钠显著增加 SCE 频率($P < 0.01$)及染色体畸变率($P < 0.01 - 0.001$),表现出遗传毒性。较高剂量的亚硒酸钠(0.75 - 1.50 mg/L)还可导致染色体形态不良和着丝粒早裂。

关键词 亚硒酸钠;姐妹染色单体交换;染色体畸变

HIGH DOSE Selenite INDUCED SCE AND CHROMOSOME ABERRATION IN HUMAN LYMPHOCYTES

Chen Xianjun, Zhao Honggang

Biology Department and Pathology Department, Xianning Medical College, Hubei 437100

Abstract For the purpose of elucidating the genotoxic dose and genotoxicity characteristics of selenium, healthy human peripheral blood lymphocytes(PBL) *in vitro* were treated for 72h by supplementing with different doses of sodium selenite, then the changes of the frequencies of sister-chromatid exchanges(SCE) and chromosome

组织和胰腺良性病变均未见 K-ras 基因点突变⁽⁶⁾。但以往的研究从未区分胰腺癌的病理类型,特别是对占胰腺癌 10 - 20%的腺泡细胞癌的 K-ras 基因突变率一无所知,而深入了解这方面情况无疑会进一步认识腺泡细胞癌分子生物学特性。

本实验发现,在对照组大鼠胰腺组织中未见 K-ras 基因第 12 位密码子的突变,而给予 Azaserine 的大鼠胰腺组织 K-ras 基因突变率为 42.1%。由于我们所诱发的仅仅是胰腺腺泡细胞癌的癌前病变,因而说明 K-ras 基因点突变在胰腺腺泡细胞癌发生过程中属早期事件。Azaserine 导致部分胰腺腺泡细胞 K-ras 基因点突变,突变的 K-ras 基因不能自行灭活,造成 DNA 无控制地复制,其所编码的蛋白产物 p21 蛋白过度表达,破坏细胞的正常平衡,作用累积,同时由于其它癌基因突变、抑癌基因失活等变化,造成细胞的正常生长、增殖、分化调控失常,细胞异常增殖,最终引起细胞癌变。在由腺泡细胞不典型增生发展为

腺瘤并最终转变为腺泡细胞癌的过程中,不同时期出现的组织学变化均与细胞内不同的基因突变相关,而 K-ras 基因点突变在此过程中是决定性因素之一。

参考文献

- 1 Wingo PA, Tong T, Bolden S. Cancer Statistics. *CA Cancer J Clin*, 1995;45(1):8
- 2 Ellen BG. Epidemiology and risk factors for pancreatic cancer. *Surg Clin Nor Am*, 1995;75(5):819
- 3 徐峰. 外分泌胰腺癌动物模型. 国外医学外科学分册, 1995;22(4):208
- 4 王衡文, 程立, 主编. 实验肿瘤学基础. 北京:人民卫生出版社, 1992:131
- 5 Chang KW, Laconi S, Mangold KA, et al. Multiple genetic alterations in hamster pancreatic ductal adenocarcinomas. *Cancer Res*, 1995;55:2560
- 6 戴存才, 刘训良, 杜竟辉, 等. PCR-SSCP 快速检测胰腺癌 K-ras 基因点突变. 中华病理学杂志, 1996;25(5):296

(1998-01-17 收稿;1998-06-16 修回)

aberrations were observed. The results showed that when the culture of PBL was supplemented with sodium selenite at 0.05mg/L and 0.25mg/L, the frequencies of SCE and chromosome aberrations were not significantly increased ($P > 0.5$ and $P > 0.3$ respectively), when at 0.75mg/L and 1.50mg/L, the frequencies of SCE and chromosome aberration were increased obviously ($P < 0.01$ and $P < 0.001$ respectively). High doses of sodium selenite could cause chromosome deform and centromere segregate prematurely. It is suggested that high dose selenium possesses mutagenic effect and might possess many other cytotoxic effects.

Key words sodium selenite, sister-chromatid exchange; chromosome aberration

硒作为人体必需微量元素,近几十年来备受关注。研究确证,硒作为多种酶的组成元素或活性中心参与酶的催化反应及部分辅酶和蛋白质合成等多种代谢过程,并具有增强机体免疫力,拮抗多种致癌、致突变化合物和有毒重金属元素的毒性以及延缓衰老等多种复杂的生物学功能^(1,2);同时,过量硒又有毒副作用,摄入过量时会引起中毒甚至诱发突变^(3,4)。硒的良性生物效应的大量研究与报道导致诸如富硒酵母、富硒茶、富硒麦芽等多种富硒食品和制剂的研制与开发;许多人对硒的生物学效应存在片面认识,在膳食中盲目添加了严重超过营养水平或推荐剂量的硒。由于硒的生物效应的复杂性,人们使用硒的日益广泛性及对硒的良性生物学效应认识的片面性,我们对硒的毒性应予以足够的重视,并有必要进行深入研究。本文报道亚硒酸钠诱发 SCE 和染色体畸变的研究结果。

材料与方法

1 主要试剂 肝素, RPMI 1640 培养基(美国 GIBCO 公司),小牛血清(浙江三利生物制品厂), PHA(广州医药工业研究所), BrdU(美国 Fluka 公司),秋水仙素(Serva 公司)亚硒酸钠(AR 沈阳市试剂二厂)。

2 血样与分组 人体外周血淋巴细胞取自本地区中心血站健康献血者,共取 6 份,男女各半,肝素抗凝。实验设阴性对照组和 4 个亚硒酸钠组(依据文献^(5,6)及预实验结果,其剂量确定为 0.05mg/L, 0.25mg/L, 0.75mg/L, 1.50mg/L 培养液)共 5 个组。

3 细胞培养与制片 血样用 RPMI 1640 培养液(含小牛血清 10%,青霉素、链霉素各 10 万 TUL)作微量全血培养。每份血样每组接种 1 瓶。细胞接种后即加入亚硒酸钠,接种培养 24h 后加入 BrdU(终浓度 10mg/L),制片前 2.5h 加入秋水仙素(终浓度 0.04mg/L),接种培养 72h 后收集细胞常规制备染色体标本片。标本片在室温下过夜后 75℃ 烤片 2.5h,紫外线照射,姬姆萨染色制备 SCE 标本片。

4 姐妹染色单体交换(SCE)和染色体畸变计数

4.1 SCE 计数 根据观察细胞中 SCE 频率的均一性不同,每例观察 50 或 60 个染色体长度适中、分散良好、姐妹染色单体色差明显的分裂相,统计其 SCE 数。染色单体在着丝粒区交叉但连续者视为交叉,交叉而不连续者视为交换。染色体两臂交换的次数按常规计数,SCE 频率以平均每个细胞的 SCE 数($\bar{x} \pm s$)表示。

4.2 染色体畸变及畸变细胞计数 每例观察 40 个以上染色体长度适中、分散良好的分裂相(包括掺入和未掺入 BrdU 者),统计染色单体裂隙和断裂、染色体裂隙和断裂、无着丝粒断片、双着丝粒染色体、染色体环及四射体等结构畸变的数目;畸变细胞指具有染色体结构、数目及形态异常的细胞。染色体畸变频率以每 100 个细胞的畸变数表示,畸变细胞率以百分率表示。

5 统计学处理 统计结果以($\bar{x} \pm s$),组间比较用 t 检验。

结果与讨论

1 不同剂量亚硒酸钠对淋巴细胞 SCE 频率的影响

不同剂量的亚硒酸钠对人体淋巴细胞的 SCE 频率的影响见表 1 及图 1。表 1 显示,在淋巴细胞培养物中添加 0.75mg/L 和 1.50mg/L 亚硒酸钠显著提高 SCE 频率,与对照组比较有极显著的差异。在 1.50mg/L 剂量组 SCE 频率最高者为 17/细胞。相关分析表明,亚硒酸钠剂量与 SCE 频率之间存在高度剂量-反应关系($r = 0.9540$, $P < 0.005$),表明过量亚硒酸钠有诱发 SCE 的毒性效应。本文硒对 SCE 的诱发作用不如周树锋等报道的强烈,在他们的研究中 0.01 - 0.1mg/L 亚硒酸钠诱的 SCE 频率是为自发 SCE 频率的 1 - 3 倍⁽⁵⁾。进一步比较亚硒酸钠各相邻剂量组间 SCE 频率显示,只有 0.25mg/L 与 0.75mg/L 组间具有极显著的差异,其他相邻组间差异无显著性(表 1)。

表1 不同剂量 Na₂SeO₃ 对人体外周血淋巴细胞 SCE 频率的影响(处理 72h)

组别	剂量 (mg/L)	例数	观察细胞数	计数 SCE 数	SCE/细胞 ($\bar{x} \pm s$)	t 检验 P 值	
						与 NC 组比较	相邻 Se 组间比较
N. C	0.00	6	300	1 841	6.41 ±0.42		
Na ₂ SeO ₃	0.05	6	300	1 786	5.95 ±0.52	>0.5	
	0.25	5	300	1 766	5.89 ±0.39	>0.2	>0.5
	0.75	6	300	2 102	7.01 ±0.29	<0.01	<0.001
	1.50	4	240	1 791	7.46 ±0.69	<0.01	>0.10

注:1. N. C 为阴性对照组;

Na₂SeO₃ 0.25mg/L 组 1 瓶、1.50mg/L 组 2 瓶无分裂相。

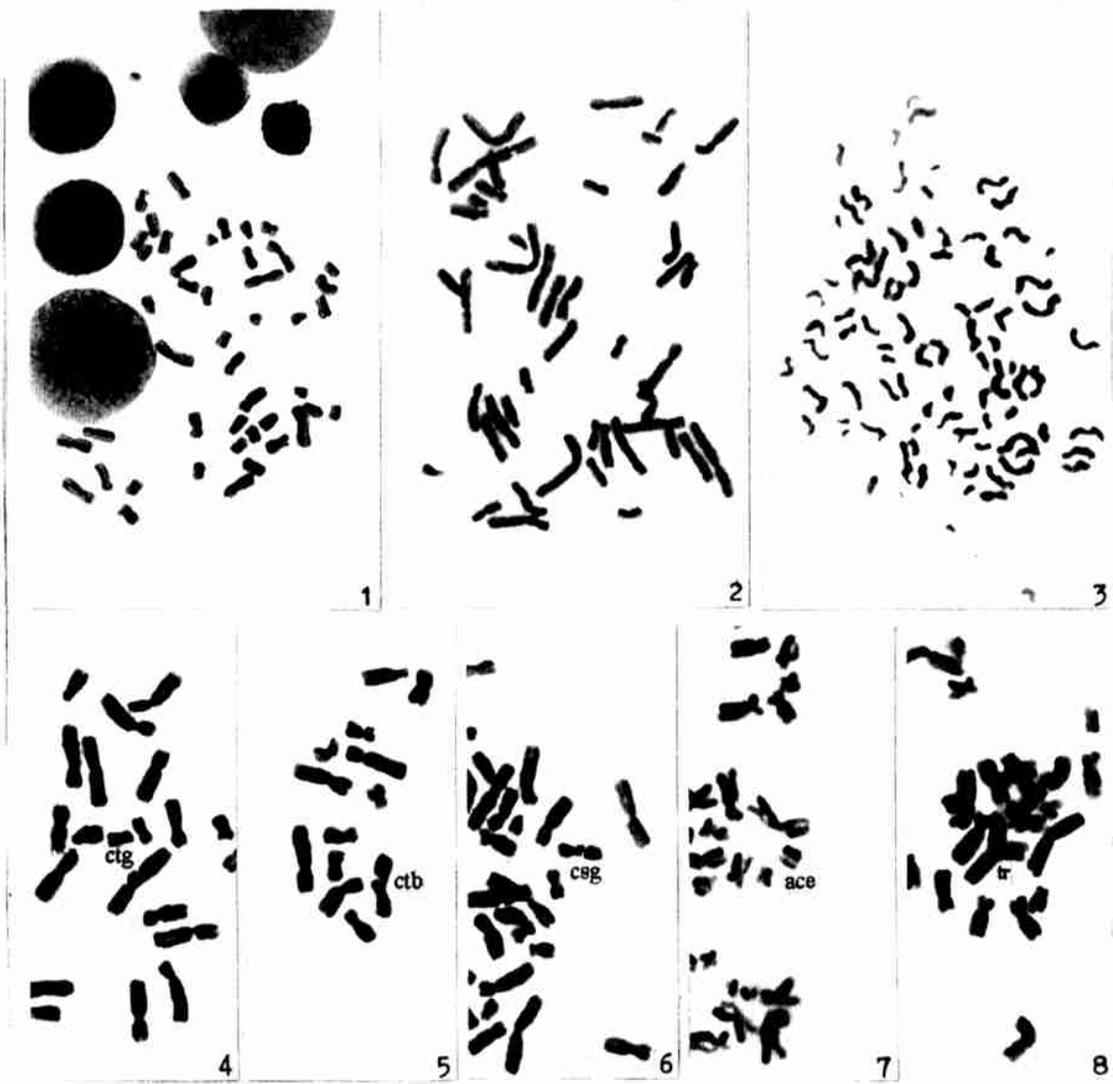


图1 亚硒酸钠对人体淋巴细胞 SCE 和染色体畸变的影响

1. 有 6 次交换的分裂相(0.25mg/L 亚硒酸钠组), 2. 有 11 次交换的分相(1.50mg/L 亚硒酸钠组), 3. 着丝粒早裂并形态不良(1.50mg/L 亚硒酸钠组), 4~8 几种结构畸变 ctg:染色单体裂隙,ctb:染色单体断裂,csg:染色体裂隙,ace 无着丝粒断片, tr:三射体(详见正文)

2 不同剂量亚硒酸钠对染色体畸变的影响

不同剂量的亚硒酸钠对染色体畸变的影响见表

2 及图 1 中, 3, 4 - 8。统计结果显示, 在正常淋巴细胞培养物中添加 0.75mg/L 和 1.50mg/L 亚硒酸钠

可显著提高染色体畸变频率和畸变细胞率,亚硒酸钠与染色体畸变率和细胞畸变率间存在高度的剂量-反应关系(前者 $r=0.9509$,后者 $r=0.9976$,二者 $P<0.0005$),表明高硒能诱发染色体畸变。低剂量亚硒酸钠组染色体畸变率与阴性对照组的自发畸变率无显著差异,二者主要畸变类型有染色(单)体和染色单体断裂。高剂量亚硒酸钠组畸变较为严重和复杂,

畸变类型除前述几种类型外,还存在微体、双微体,双着丝粒染色体及四射体等复杂多样的畸变类型(图 1,4-8)。比较亚硒酸钠各相邻剂量组染色体畸变率,只有 0.25mg/L 和 0.75mg/L 剂量组间有显著差异,其他剂量组间差异无显著性。与其对 SCE 频率影响的相应结果一致。

表 2 不同剂量 Na_2SeO_3 对人体外周血淋巴细胞染色体畸变的作用(处理 72h)

组别	剂量 (mg/L)	观察 细胞数	结构畸变数					结构 畸变率	<i>t</i> 检验 <i>P</i> 值		数目及形态畸变细胞数				畸变 细胞 率(%)	<i>t</i> 检验 <i>P</i> 值				
			ctg	ctb	csg	csb	ace		r	tr	与 N. C 组比较		Se 组 间比较	数目畸变		着丝粒 早裂	形态 不良	与 N. C 组比较	Se 组 间比较	
											2n-1	2n+1		2n-1						2n+1
N. C	0.00	288	1	1	1			1.04				1				1.39				
Na_2SeO_3	0.05	353	2	1	1			1.13	>0.5			1				1.42	>0.5			
									>0.5									>0.1		
	0.25	308	1	2	1			1.30	>0.5			1	2	2		2.92	>0.1			
										<0.05									>0.1	
	0.75	264	1	3	1	2	3	1	1	4.55	<0.01		2	2	2	2	6.82	<0.05		
											>0.2								<0.02	
	1.50	230	2	2	1	3	5			5.65	<0.001		3	4	7	6	14.35	<0.001		

注:染色体结构畸变率为平均每 100 个细胞的畸变数。

高剂量亚硒酸钠组中还观察到另一值得注意的现象,即染色体不良形态变化,表现为首丝粒早裂,染色单体间距离增大及染色体呈波浪状弯曲,失去形态典型性(图 1,3)。分析认为此不良形态变化并非由制片过程中的随机因素所致。染色体的这些不良形态变化提示着丝粒及染色体螺旋结构可能发生了异常改变。

染色体数目畸变的类型主要是 $2n \pm 1$ 条染色体的超二倍体和亚二倍体,数目畸变表明染色体的着丝粒或/和着丝点结构受到破坏或正常功能受到干扰。

通过亚硒酸钠组与阴性对照组间以及亚硒酸钠各相邻剂量组间 SCE 频率及染色体畸变率比较分析,均显示出在正常人体淋巴细胞培养体系中添加亚硒酸钠,在 0.25mg/L 与 0.75mg/L 之间存在一毒性临界剂量,低于该临界剂量(如 0.25mg/L)不表现遗传毒作用,高于该临界剂量(如 0.75mg/L)则显示遗传毒性,诱发 SCE 和染色体畸变。

本文 1.50mg/L 剂量亚硒酸钠对染色体的致畸

作用,与顺铂的致畸作用⁽⁷⁾相比并不强烈,若在培养物中添加 2.0mg/L 剂量亚硒酸钠,则培养不易成功。这提示硒除有诱变效应外还有其他细胞毒作用。

参考文献

- 胡国刚,刘绣,刘军. 亚硒酸钠和硒蛋氨酸对砷诱导人外周血淋巴细胞遗传毒性保护比较. 中华预防医学杂志,1996;30(1):26
- 候建军. 硒的生物功能. 生物学通报,1997;32(5):16
- 赵红刚,陈贤均,胡虹. 实验性小鼠硒中毒病理学基础探讨. 微量元素与健康研究,1994;专辑:3
- Shamberger RJ. The genotoxicity of selenium. *Mutat Res*, 1985; 154:29
- 周树锋,区宝祥. 亚硒酸钠对人和哺乳动物细胞、细菌的诱变作用研究及其致癌性的初步评估. 微量元素与健康研究,1994;11(2):4
- 艾军,梁素源. 硒对体外培养的恶性转化细胞(BHLB4)生物效应的影响. 癌变·畸变·突变,1995;7(6):346
- 陈贤均,赵红刚. 顺铂对小鼠骨髓遗传毒性的研究. 癌变·畸变·突变,1996;8(6):362

(1998-06-28 收稿;1998-09-30 修回)