

纺锤体毒剂和断裂剂体外诱发 V79 细胞多核与微核效应的差异

刘云岗 吴中亮 陈家坤

广州医学院化学致癌研究所 广州 510182

摘要 采用长春新碱、秋水仙素(纺锤体毒剂)、丝裂霉素 C 和环磷酰胺(断裂剂)对 V79 细胞染毒,发现两类诱变剂在诱发多核与微核的敏感性和强度上存在显著差异。当剂量较高时,四种诱变剂都可诱发多核与微核,但纺锤体毒剂以诱发多核为主,多核细胞率与微核细胞率的比值为 2.0 - 3.5;而断裂剂以诱发微核为主,此比值倒置(0.08 - 0.28)。当剂量低至一定程度时,纺锤体毒剂只诱发多核(不诱发微核),而断裂剂则只诱发微核。还发现两类诱变剂间此比值的差异远大于微核面积或直径的差异。本研究结果提示在体外微核试验中同时计数微核细胞率和多核细胞率可能对鉴别纺锤体毒剂和断裂剂有意义。

关键词 纺锤体毒剂;断裂剂;多核;微核

DIFFERENTIAL EFFECTS OF ANEUGENS AND CLASTOGENS ON INCIDENCES OF MULTINUCL EATED CELLS AND OF MICRONUCLEATED CELLS IN CHINESE HAMSTER LUNG (V79) CELL LINE IN VITRO

Liu Yungang , Wu Zhongliang , and Chen Jiakun

Institute for Chemical Carcinogenesis , Guangzhou Medical College , Guangzhou 510182

Abstract Two aneugens: vinblastine (Vin) and colchicine(Col) ,and two clastogens: mitomycin C (MMC) and cyclophosphamide (CP) , were applied to Chinese hamster lung(V79) cells respectively in vitro for micronucleus test. The results showed that the increases of incidence of multinucleated cells (Imu) and that of micronucleated cells (Imi) in response to aneugens and clastogens were in different sensitivities. At relatively low concentrations, Vin and Col induced only Imu (but not Imi), while MMC induced only Imi; At higher concentrations, both Imu and Imi increased in a concentration dependent manner, however, Vin and Col induced multinuclei predominantly with the ratios of Imu to Imi 2.0 - 3.5, while MMC and CP induced micronuclei mainly, with Imu/ Imi of 0.08 - 0.28. This intensity of difference in Imu/ Imi was much greater than that in areas of micronuclei between aneugens and clastogens. The results indicate that in micronucleus test in vitro, observation of both Imu and Imi might be valuable for distinguishing aneugens from clastogens.

Key words Aneugen; Clastogen; Multinucleus; Micronucleus

微核试验最初用来检测染色体断裂,即断裂剂 (clastogens) 的作用⁽¹⁾;后来发现它还可检测染色体分离异常,即纺锤体毒剂 (spindle poisons) 的作用⁽²⁾。以微核试验为基础区分纺锤体毒剂和断裂剂的方法主要有:1,根据微核的面积或直径大小^(3,4);2,应用抗着丝粒抗体荧光染色技术可检测含有着丝粒的微核,后者代表整条染色体或染色单体的丢失⁽⁵⁾。后一方法较先进,但因需特殊设备和试剂,国内未广泛应用。最近我们观察到青石棉 (crocidolite) 对 V79 细胞诱发多核的作用明显强于诱发微核,表现在诱发多核的阈剂量低于诱发微核的,且多核细胞率 (incidence of multinucleated cells, Imu) 明显高于微核细胞率 (incidence of micronucleated cells, Imi) (2 - 4 倍),而丝裂霉素 C (mitomycin C, MMC) 诱发 Imu 仅为 Imi 的 1/24⁽⁶⁾。已知青石棉是一种以纺锤体毒性为主的诱变剂⁽⁷⁾,上述二者作用的差异能否代表其它纺锤体毒剂和断裂剂呢?为证实这一问题,本研究选用两种纺锤体毒剂[长春新碱 (vinblastine, Vin) 和秋水仙素 (colchicine, Col)]和两种断裂剂 MMC 和环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP),观察它们对 V79 细胞 Imu 和 Imi 的影响。

材料和方法

1 试剂和细胞培养

最低基本培养基 (minimum essential medium, MEM) 为 Gibco 实验室产品,MMC 为日本 Kyowa Hakko Kogyo 公司产品, Vin, Col, CP 均为 Sigma 公司产品。四种诱变剂均以三蒸水溶解。细胞培养液为含胎牛血清 10% 的 MEM,培养条件为 37 °C, 5% CO₂, 饱和湿度。

2 体外微核试验

V79 细胞按每瓶 3×10^5 密度接种至生长面积约 15cm² 的培养瓶内,培养 24h 后分别加入不同浓度诱变剂或等容量生理盐水,其中 CP 各浓度组在加入 CP 的同时加入 S₉ 混合物 (按 5% 容量加入)。S₉ 为 Aroclor 1254 诱导的

大鼠肝微粒体, S₉ 混合物的配制参照文献报道⁽⁸⁾。每组 2 瓶。染毒时间 6h, 更换新鲜培养液后继续培养 18h。细胞收集、微核制片及多核细胞和微核细胞的计数参照既往报道⁽⁶⁾。

3 微核直径的测量及面积计算

采用经过标算的目镜测微尺, 每组测量 100 个圆形微核的直径, 椭圆形微核不作测量。微核直径计为等级资料: 0μm - , 1μm - , 2μm - , 3μm - , 4μm - 。微核直径的中位数按第 50 百分位数计算, 相应的微核面积按 $3.14 \times (\text{直径中位数} \div 2)^2$ 计算。

4 统计处理

各组间 Imu 和 Imi 的比较采用 χ^2 检验; 微核直径分布的比较采用多个样本间两两比较的秩和检验。

结果

1 四种诱变剂对 V79 细胞 Imu 和 Imi 的影响

如表 1 所示, 四种诱变剂在不同程度上都可使 Imu 和 Imi 增高, 且都存在浓度 - 效应关系。但 Imu 和 Imi 的增高并不是同步或同强度的。断裂剂 (MMC 与 CP) 以诱发微核较敏感, 其阈浓度至少比诱发多核低 8 倍, 且 Imi 上升的幅度明显比 Imu 的大, Imu / Imi 倒置 (0.08 - 0.28); 而纺锤体毒剂 (Vin 与 Col) 则以诱发多核更敏感, 其阈浓度至少比诱发微核低 2 - 4 倍, 且 Imu 上升的幅度比 Imi 的大, Imu / Imi 比值为 2.0 - 3.5。两类诱变剂间 Imu / Imi 比值相差 10 - 30 倍。

2 四种诱变剂诱发微核的直径分布及其相应面积

如表 2 所示, Col 和 Vin 诱发的微核的直径分布均比 CP 组和 MMC 组大 ($P < 0.01$)。并且根据微核直径中位数算出的微核面积, Col 组和 Vin 组是 CP 组和 MMC 组的 1.6 - 2.5 倍。然而两类诱变剂间此差异程度明显小于 Imu / Imi 的差异。

Table 1 Effects of vinblastine, colchicine, mitomycin C, and cyclophosphamide on frequency of multinucleated or micronucleated cells in V79 cell line

Treatment/ concentration ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Frequency of multinucleated cells ‰ (A)	Frequency of micronucleate cells ‰ (B)	A/B
Negative control	3.0	4.5	0.67
Vinblastine			
0.025	11.5 * *	5.0	2.30
0.05	20.0 * *	9.0	2.22
0.1	39.5 * *	17.5 * *	2.26
0.2	50.0 * *	24.5 * *	2.04
0.4	68.0 * *	31.0 * *	2.19
Colchicine			
0.05	13.5 * *	5.5	2.45
0.1	25.5 * *	12.0 * *	2.13
0.2	50.0 * *	16.5 * *	3.03
0.4	105.0 * *	30.0 * *	3.50
Mitomycin C			
0.05	3.0	35.5 * *	0.08
0.1	5.0	54.5 * *	0.09
0.2	7.5 *	77.0 * *	0.10
0.4	10.0 * *	125.5 * *	0.08
Cyclophosphamide			
0 (S ₉)	2.5	4.0	0.63
1	3.5	12.5 * *	0.28
2	3.5	22.0 * *	0.16
4	5.5	29.0 * *	0.19
8	8.0 * *	40.5 * *	0.20
16	10.5 * *	61.5 * *	0.17

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, cyclophosphamide groups compared with S₉ group, other treatments compared with negative control.

讨论

MMC 和 CP 都是已知的断裂剂(其中 CP 需代谢活化),它们通过烷化作用而与 DNA 发生交联,从而导致 DNA 断裂。而 Vin 和 Col 都可抑制微管聚合,当细胞处于有丝分裂时纺锤丝微管受累可导致染色体丢失(非整倍体发生)。本研究结果表明 Vin 和 Col 诱发多核的敏感性和强度明显大于诱发微核,而 MMC 和 CP 诱发微核的敏感性和强度明显大于诱发多核。后者的作用容易理解,因为 MMC 和 CP 主要发挥断裂作用。然而为什么

Vin 和 Col 对 V79 细胞更易诱发多核?是否与它们导致微管功能障碍有关?已知胞质分裂(cytokinesis)主要依赖于微管和微丝系统的作用,当有丝分裂完成后纺锤丝微管即解散并重新形成细胞微管网络,后者参与胞质分裂⁽⁹⁾。如果细胞微管聚合障碍或发生更微妙的改变,胞质分裂就可能受阻,从而形成双核细胞。而两次不伴有胞质分裂的有丝分裂可导致四核细胞。所以 Imu 相对于 Imi 的优先升高可能是纺锤体毒剂对哺乳动物细胞的一个特征性作用。

Table 2 Distribution of micronuclei diameters in each mutagen treatment

Treatment	Distribution of MN diameter (%)					Median of MN diameter (μm)	^a MN area (μm ²)
	0 -	1μm -	2μm -	3μm -	4μm -		
cyclophosphamide	21	33	28	9	8	1.84	2.66
mitomycin C	25	17	33	18	5	2.23	3.90
vinblastine	15	12	37	25	11	2.85 * *	6.37
colchicine	5	20	27	34	14	2.93 * *	6.74

MN:micronucleus. Cyclophosphamide was at concentration of 16 ug/ml, and other treatments were at concentration of 0.4μg/ml, ^acalculated according to median radium. A total of 100 micronuclei were measured for diameter distribution in each treatment. *

* P < 0.01, compared with both MMC and CP group, by Nemenyi's rank sum test.

石棉[以纺锤体毒性为主的诱变剂⁽⁷⁾]对多种细胞诱发多核与微核的作用与本研究中华锤体毒剂的作用相似,从而为上述推论提供了一定支持。如青石棉对 V79 细胞⁽⁶⁾,青石棉和温石棉对人支气管上皮细胞⁽¹⁰⁾以及温石棉对叙利亚地鼠胚胎细胞⁽¹¹⁾,都是诱发多核的作用强于诱发微核。后一模型温石棉作用 24h 后诱发的双核细胞率为 Imi 的 7 - 8 倍,且在各剂量水平双核细胞率均与非整倍体细胞率相平行,提示双核细胞的发生与非整倍体形成之间有某种联系。对于 BALB/c - 3T3 细胞,青石棉作用下 Imu 增高的倍数为 Imi 增高倍数的 1 - 2 倍,而 MMC 作用下 Imu 的增高倍数仅为 Imi 增高倍数的 1/6⁽⁶⁾。BALB/c - 3T3 细胞对青石棉的上述反应不如其它细胞(如 V79 细胞)典型,可能与该细胞特有的生物学性质(如自发 Imi 高)有关。对于其它诱变剂和其它类型的细胞的试验仍需进行,以得出更具普遍意义的结论。

总之,体外微核试验中 Imu / Imi 比值及诱发多核与微核的敏感性分析作为鉴别纺锤体毒剂与断裂剂的指标,具有简便、灵敏的优点,尤其是不需要很精密昂贵的仪器和材料,所以具备很好的应用潜能。

致谢 本单位彭桂梅助理实验师为本研究提供主要的实验准备,深表谢意。

参考文献

- Heddel JA. A rapid in vivo test for chromosome damage. *Mutat Res*, 1973;18:191
- Vanpraes P, Vermeiren F, Sysmans M, et al. The micronucleus assay as a test for the detection of aneugenic activities. *Mutat Res*, 1990; 244:95
- Yamamoto KI, and Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons. *Mutat Res*, 1980; 71: 127
- Tinwell H and Ashby J. Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in mouse bone marrow micronucleus assay. *Mutagenesis*, 1991; 6:193
- 杜宝全,李寿祺,董奇男,等. 免疫荧光染色微核试验检测非整倍体诱变剂. *中国药理学与毒理学杂志*, 1995; 9: 146
- 刘云岗,刘玉清,周谷,等. 青石棉体外诱发细胞微核与多核. *中国药理学与毒理学杂志*, 1997; 11: 63
- Dopp E, Saedler J, Stopper H, et al. Mitotic disturbance and micronucleus induction in Syrian hamster embryo fibroblast cells caused by asbestos fibers. *Environ Health Perspect*, 1995; 103: 268
- 黄幸纾,陈星若主编. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法. 第一版. 杭州:浙江科学技术出版社, 1985:31 - 34
- Dustin P, Microtubules. Spring Verlag, Berlin, Heidelberg, Tokyo.
- Kodama Y, Boreiko CJ, and Maness SC. Cytotoxic and cytogenetic effects of asbestos on human bronchial epithelial cells in culture. *Carcinogenesis*, 1993;14:691
- Oshimura M, Hesterburg TW, Tsutsui T, et al. Corelation of asbestos induced cytogenetic effects with cell transformation of Syrian hamster embryo cells in culture. *Cancer Res*, 1984; 44: 5017