

5—溴脱氧尿嘧啶核苷标记法检测哺乳动物体细胞染色体异常分离的研究^①

汪 欣 合正基 刘素清

云南师范大学生命科学系 昆明 650092

摘要 通过分析5—溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)掺入后的第2周期细胞染色体,同步评估了受试化合物秋水仙素(colchicine, COL)及昆明山海棠水抽提物(*Tripterygium hypoglaucum* (Levl) Hutch, THH)在小鼠骨髓细胞中的有丝分裂阻滞、染色体异常分离及姐妹染色单体互换(sister chromatid exchange, SCE)诱发效应。COL及THH均具有不同程度的有丝分裂阻滞效应,且显著诱发非整倍体($2n=41\sim43$)及多倍体的产生。THH尚显著诱发小鼠骨髓细胞SCE。结果提示:THH具有与COL类似的哺乳动物体细胞非整倍体/多倍体诱发效应;此外,THH尚含有某些基因毒性成分。实验还证实,BrdU标记法检测哺乳动物体细胞染色体异常分离是可行的。

关键词 非整倍体,多倍体,有丝分裂阻滞,姐妹染色单体互换,秋水仙素,昆明山海棠

ANALYSIS OF CHROMOSOME MALSEGREGATION IN MAMMALIAN SOMATIC CELLS WITH BRDU LABELLING TECHNIQUE

Wang Xu, He Zhengji, Liu Suqing

Department of Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650092

Abstract The effects of mitotic block, chromosome malsegregation and sister chromatid exchange (SCE) induction were simultaneously investigated with Bromodeoxyuridine (BrdU) labeled mouse bone marrow cells at their second generation after a single i. p. treatment (COL) and *Tripterygium hypoglaucum* (Levl) Hutch (THH). Significant delay of cell cycle were found after animals were treated with both COL and THH. COL and THH also induced aneuploidy significantly ($2n=41\sim43$) and polyploidy in second mitosis. A significant increased SCE over the control frequency was observed after 5g/kg and 10g/kg of THH treatment. The result indicated that THH share the induction effects of aneuploidy and polyploidy as COL. Besides this, THH also possess genotoxicity. The approach to estimate *in vivo* mitotic malsegregation in mammalian somatic cells based Brdu incorporation is valid.

① 国家自然科学基金及云南省科委基金资助项目。

Key words aneuploidy; polyploidy; mitotic block; sister chromatid exchange; colchicine; *Tripterygium hypoglaucum* (levl) Hutch.

在人类群体的自发流产、先天畸形、某些癌症及遗传异常中,染色体异常分离所引起的非整倍体是常见的诱发因素之一⁽¹⁾。鉴于非整倍体诱发剂在细胞中的作用机制各自相异,在该领域中,已涌现出大量检测系统与手段。减少低渗时间后的中期细胞染色体计数曾一度作为简便的哺乳动物非整倍体诱发剂检测方式⁽²⁾。这种手段保证了染色体在整个制备过程中不溢出细胞膜,从而降低了人为染色体丢失的机率。但由于非整倍体往往发生于细胞克服受试物有丝分裂抑制作用后的细胞周期中⁽³⁾⁽⁴⁾,单纯的染色体计数法显然无力区分各个周期的细胞,为此,我们将 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BrdU)标记染色体 DNA 的方法引入非整倍体的检测:通过计数受试物处理后第 2 周期细胞染色体数,分析细胞在克服有丝分裂阻滞作用后染色体分离状况,同时了解在有丝分裂完全受阻而染色体依旧复制情况下多倍体的发生频率。

秋水仙素(COL)是典型的微管蛋白组装抑制剂,其诱发非整倍体的机制已清楚,本实验以 COL 为诱发染色体异常分离的阳性对照物。昆明山海棠(THH)系用于治疗多种免疫性疾病的云南地方中草药,其根部水抽提物在小鼠骨髓细胞中表现明显的有丝分裂抑制效应⁽⁵⁾,在以往的综合研究分析中,THH 亦表现一定程度的哺乳动物体细胞非整倍体诱发效应⁽⁶⁾。本实验拟采用 BrdU 标记染色体 DNA 的方法,分析受试物处理小鼠骨髓细胞后第 2 周期染色体分离状况,同时探讨 BrdU 标记法在该类检测工作中的可行性。

材料和方法

1 实验动物

实验用昆明种小白鼠购自云南大学饲养

场,6—8 周龄,体重 22—25g。

2 受试化合物

昆明山海棠根部生药购自昆明医药公司。100g 根部粉碎物于 1000ml 双蒸水中浸泡 0.5h,文火煎煮 3 次,每次 0.5h,滤渣浓缩至 50ml,浓度以 2g/ml 生药计,抽干得率为 4.8%。用前以无菌双蒸水稀释。

秋水仙素用前以无菌双蒸水配制。

3 BrdU 标记与染色体标本配制

3.1 BrdU 标记及药物处理:每一剂量组包括 2 只雄性动物及 1 只空白对照。BrdU 标记技术基本同文献⁽⁷⁾,标记前,每一动物腹腔注射 0.5mg 植物血球凝集素(PHA),24h 后,以 45℃4% 无菌琼脂溶解 BrdU,立即以 1mg/kg 的剂量注射于动物颈部皮下,1h 后,腹腔注射受试化合物或相应溶剂。COL 测试剂量为 1—2mg/kg,THH 为 2.5—10g/kg(以抽干得率为 120~480mg/kg)。受试最高剂量为 50% LD₅₀。

3.2 取样及标本制备

受试化合物处理动物后 23h,以 0.6mg/kg 的剂量腹腔注射秋水仙素以积累中期相,1h 后取股骨骨髓。染色体制备同通行方式,但低渗条件较温和,于 0.57%KCL 室温下进行 15min,随即预固定停止低渗。SCE 分化染色技术同文献⁽⁸⁾

4 镜检

4.1 有丝分裂阻滞效应分析:每一动物计数 100 个有丝分裂中期相,分析受试物处理后第 1 周期(M₁),第 2 周期(M₂)及第 3 周期(M₃)有丝分裂细胞所占百分数。

4.2 染色体异常分离效应分析:每一动物计数 100 个 M₂ 期细胞,记录非整倍体(2n=41~43)及多倍体(四倍体)发生率。为排除由于染色体制备所引起的人为染色体丢失,2n≤39 的细胞不列入统计分析。

4.3 SCE 分析:每一剂量组随机分析 20 个处于 M₂ 的整倍体细胞(2n=40)SCE 数。

结 果

1 有丝分裂阻滞效应分析

结果见表 1, COL 测试剂量分别为 1mg/kg 及 2mg/kg。以 COL 处理动物 2 个细胞周期后,仍分别有 69% 及 71.5% 的骨髓细胞处于 M₁,约系空白对照的 9 倍,表明 COL 具有强烈的有丝分裂阻滞效应。在 THH 的最低剂量组(2.5g/kg),有丝分裂进程与对照无显著差异,但在余下二个高剂量组(5g/kg, 10g/kg)中,M₁期细胞分别占 36.5% 及 38.5%,提示 THH 也具有一定程度的有丝分裂阻滞效应。

2 染色体异常分离效应分析

结果见表 2。COL 在所设二个剂量组中,均显著地诱发小鼠骨髓 M₂ 细胞非整倍体($P < 0.001 \sim 0.01$),同时级显著地诱发四倍体($P < 0.001$)。THH 仅在二个高剂量组导致非整倍体频率显著升高($P < 0.001$),而在所有剂量组导致非整倍体频率显著升高($P <$

0.001)。在所观察到的 M₃ 细胞中,未发现八倍体细胞。

3 SCE 诱发效应

结果见表 3, COL 未表现明显的 SCE 诱发效应,而 THH 的二个高剂量组中,SCE 频率较对照显著升高($P < 0.001$),提示 THH 含有某些基因毒性成分。

讨 论

各类损伤纺锤体,着丝粒等有丝分裂器的化学物理因素,都能导致这些细胞器或结构的功能障碍,从而引起细胞分裂进程的改变,致使非整倍体及多倍体的发生。有丝分裂的阻滞通常是染色体异常分离或不分离的预兆。当细胞克服这种抑制作用而进入下一细胞周期时,被破坏了的有丝分裂器如纺锤丝功能异常而导致染色体在子细胞中不均衡分配;当细胞无力克服抑制作用而染色体仍可复制时,则导致多倍体的产生^(9,10);由此可知,有丝分裂抑制效应可以作为预测化学物质对哺乳动物染色体分离的影响的指标。

Table 1. Mitotic inhibitory effects in mouse bone marrow

chemical	dose	animal number	observed cells	M1 %±sx	M2 %±sx	M3 %±sx
COL	0 mg/kg	3	300	7.7±4.3	69.0±1.2	23.3±3.2
	1.0	2	200	69.0±1.0	30.5±0.5	0.5±0.5
	2.0	2	200	71.5±2.5	27.5±2.5	1.0±0.0
THH	2.5 g/kg*	2	200	6.0±3.0	80.5±1.5	13.5±1.5
	5.0	2	200	36.5±2.5	56.5±4.5	7.0±2.0
	10.0	2	200	38.5±3.5	56.5±4.5	5.0±2.0

* The concentration was 2g/kg according to the original herb weight, but the extracted matter weight was 4.8%.

Table 2. Chromosome malsegregation effects induced by tested chemicals in mouse bone marrow

chemical	dose	animal number	(2n=42~43)		
			observed cells M ₂	n(%±s _x) aneuploidy	n(%±s _x) polyploidy
COL	0 mg/kg	3	300	3(1.0±0.06)	0
	1.0	2	200	10(5.0±0.10) **	9(4.5±0.05) ***
	2.0	2	200	14(7.0±0.00) **	8(4.0±0.10) ***
THH	g/kg ^a				
	2.5	2	200	5(2.5±0.05)	1(0.5±0.05) *
	5.0	2	200	8(4.0±0.00) **	7(3.5±0.05) ***
	10.0	2	200	7(3.5±0.05) *	7(3.5±0.05) ***

^a: The concentration was 2g/kg according to the orginal herb weight, but the extracted matter weight was 4.8%, * : P <0.05, ** P<0.01, *** P<0.001 (Yates χ^2 corrected test).

Table 3. SCE induction by tested chemicals in mouse bone marrow

chemical	dose	observed cells	(\bar{x} ±s _x) SCE/cell
COL	0 mg/kg	20	3.35±0.44
	1.0	20	3.45±0.34
	2.0	20	3.50±0.39
THH	g/kg ^a		
	2.5	20	4.90±0.78
	5.0	20	6.90±0.69 *
	10.0	20	7.90±0.97 *

^a: The concentration was 2g/kg according to the original herb weight, but the extracted matter weight was 4.8%, * : P <0.001 (t test).

COL 及 THH 均具有不同程度的有丝分裂抑制效应⁽⁵⁾: 提高有丝分裂指数、降低有丝分裂后期细胞频率, 从而具有诱发非整倍体/多倍体的潜能。

本实验中, COL 表现了极显著的有丝分裂阻滞作用, 并出现剂量效应: M₂ 细胞中非整倍体 (2n=41~43) 及四倍体频率均较对

照显著升高 (P<0.001~0.01)。笔者认为, COL 处理动物后, 一些受阻滞的细胞能够克服 COL 的抑制作用而进入下一轮细胞周期, 少数受损纺锤丝使得极个别染色体异常分离, 从而导致非整倍体发生; 而那些不能克服 COL 的有丝分裂阻滞作用, 却又能进行正常染色体复制的细胞则有可能形成四倍体。与

COL 相似,THH 也具有显著的非整倍体及多倍体诱发效应,暗示 THH 的水抽提物中含有与 COL 类似的有丝分裂抑制剂暨非整倍体诱发剂。

在基因毒性分析中,COL 在测试剂量范围内未表现明显的 SCE 诱发效应,这与我们过去的工作相符⁽⁶⁾;THH 在 2 个高剂量组使诱发 SCE 频率显著升高,并表现明显的剂量效应。已有的工作证明,THH 在体外条件下,同样具有诱发人外周血淋巴细胞 SCE 的作用⁽¹¹⁾,由此进一步证实了 THH 含有基因毒性成分。

我们的工作验证了 BrdU 标记法是同步评估受试物在哺乳动物体细胞内的有丝分裂阻滞、染色体不分离及 SCE 诱发效应的可靠手段。

参考文献

1. Hoffmann GR, Dellarco VL, Voytek PE. A review of the symposium on aneuploidy: etiology and mechanisms. 1986; 8:643.
2. Danford N. Measurement of levels of aneuploid in mammalian cells using a modified hypotonic treatment. Mutat Res, 1984; 139:127.
3. Banduhn N, Obe G. Mutagenicity of 2-benzimidazolecarbamate, diethylstilbestrol and estradiol: structure-chromosome aberrations, sister chromatid exchanges, C-mitoses, polyploidies and micronuclei. Mutat Res, 1989; 156:199.
4. Tucker RW, Brasett JC. Decreased numbers of spindle and cytoplasmic microtubules in hamster embryo cells treated with a carcinogen: diethylstilbestrol. Cancer Res, 1986; 46:2008.
5. 合正基,周汝敏,曹能等.有丝分裂抑制剂诱发小鼠骨髓细胞 C-有丝分裂效应研究.云南师范大学学报,1992; 12(3):89.
6. Wang X, Zhou RM, He ZJ. Aneuploidy induction by water extract from Tripterygium hypoglaucum (Levl) Hutch in mouse bone marrow cells. Mutagenesis, 1993; 8(5):395.
7. Qin S, Huang CC. A new method for sister chromatid exchange studies in vivo, a single injection of BrdU in melted agar. Mutat Res, 1984; 141:189.
8. 汪旭,薛京伦.3-氨基苯甲酰胺诱发中国仓鼠 Wg3-h 的 SCE.复旦学报,1990;29(1):109.
9. Manca A, Bassani B, Russo A, et al. Origin of aneuploidy in relation to disturbances of cell-cycle progression. I. Effects of vinblastine on mouse bone marrow cells. Mutat Res, 1990; 229:29.
10. Gustavino B, Bassani B, Pacchierotti F. Vinblastine-induced numerical chromosome changes and selection processes in mouse bone marrow cells. Mutat Res, 1991; 248:45.
11. 汪旭,周汝敏,严勇等.昆明山海棠遗传毒性评价. I. 致突变效应研究.遗传,1993,15(6):13-16.

癌变·畸变·突变 1994 年第 6 卷第 4 期

流式细胞术及染色体畸变分析在 X 射线职业照射者血细胞研究中的初步应用

周振英 林琳 戴亮 蔡逸云 张军妮 余世俊¹

江苏省肿瘤防治研究所 南京 210009 南京市职业病防治研究所¹

摘要 本文用流式细胞术对 56 例 X 射线工作者的外周血细胞做了 DNA 含量分析,并和染色体畸变结果进行了对比研究。结果表明,在 56 例 X 射线工作者中有 5 例出现 DNA 倍体异常细胞。流式细胞术分析的高二倍体验出者,在其染色体数目分析中,>2n 百分比与其呈一致性变化,X 射线工作者的>2c%(>超二倍体