

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

汪旭 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($2n=41-43$)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 ($2n=41\sim 43$) 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去南地方中草药,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(以抽干得率计为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<0.001~0.01), 同时显著地诱发四倍体(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 M₂ 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); 由此可悉, 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	3	300	7.7±4.3	69.0±1.2	23.3±3.2
	1.0 mg/kg	2	200	63.0±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	g/kg*					
	2.5	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	observed cells M2	(2n=42-43)	
				n(%±s \bar{x}) aneuploidy	n(%±s \bar{x}) polyploidy
	0	3	300	3(1.0±0.06)	0
COL	mg/kg				
	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 original 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 \bar{x}) SCE/cell
	0	20	3.35±0.44
COL	mg/kg		
	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

