

# 用综合检测法评价醋酸棉酚对人淋巴细胞的遗传学效应 —体内体外实验

崔应琦 张树成

(国家计划生育委员会科学技术研究所, 北京)

**摘要** 本文应用综合检测法——染色体畸变(CA)分析、微核(MCN)测定、姐妹染色单体交换(SCE)频率和细胞分裂指数(MI)、对PHA刺激反应、中期分裂相(M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub>)比率、细胞周期分析的细胞动力学等多项试验指标,对醋酸棉酚长期服用者和停药者53例的体内实验和相当于人服用棉酚血清中浓度1、5、7.5、10倍的体外实验,进行遗传学效应的综合评价。结果显示,临床使用醋酸棉酚从遗传学角度来看是安全的。

**关键词** 棉酚 微核 细胞动力学

为了探讨棉酚在遗传学方面的远期安全性,国内外学者已进行了一些研究。但绝大多数为动物实验<sup>[1,2]</sup>或人外周血的体外试验<sup>[3,4]</sup>及少数体内试验<sup>[5]</sup>,且结论有争论。其主要原因是仅采用1个或2个实验指标检测,不能较全面的反映其遗传学效应。为此本文采用综合检测法——CA分析,MCN测定,SCE频率及MI、对PHA刺激反应、M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub>比率和细胞周期分析的细胞动力学等多项试验指标,对棉酚服用者和停药者53例和5例4种不同浓度棉酚的体内体外实验,进行遗传学效应的综合研究。

## 1. 材料和方法

### 1.1 分组

1.1.1 体内实验:实验组:53例年龄在29-53岁(平均 $37.6 \pm 0.7$ 岁)的健康男性,每人每日口服醋酸棉酚20mg,连服50-75d,改为每周40-50mg的维持量,总服药时间平均 $159.5 \pm 19.0$ 周即3年(40-477周),总服药剂量为平均 $8.1 \pm 0.9$ g(1-27.5g)。又根据服药情况分为服药组24例,停药组29例,平均停药时间为 $13.2 \pm 0.6$ 月(10-25月)。对照组选择未接触过射线、铅、苯等化学试剂及无病毒感染的正常健康男性48例,平均年龄为33.9岁(24-46岁)。

1.1.2 体外实验:棉酚溶于DMSO(二甲基亚砜),每例测试静脉血分别加入含最终浓度为4、20、30、40微克/毫升棉酚的199培养基中,对照组加入与实验组等量的DMSO。5例中有2例另外在培养基中加入丝裂霉素C30和50ng/ml做为阳性对照组。

### 1.2 淋巴细胞培养、染色、计数及统计

参照Moorhead<sup>[6]</sup>及Lats<sup>[7]</sup>培养方法,加以改进。染色用常规Giemsa及Perry<sup>[8]</sup>的FPG法进行。计数及计数标准按Evans<sup>[9]</sup>、Countryman<sup>[10]</sup>方法进行。所有观察数据,均用微机处理,进行t检验和方差分析。以 $\bar{X} \pm SE$ 表示。

## 2 结果

2.1 CA分析:分别用核型畸变率、染色体畸变率和畸变类型观察,并对第1细胞周期(M<sub>1</sub>)中期核型进行观察。

体内实验中服药组的核型畸变率和染色体畸变率均高于对照组和停药组,但3组间无显著性差异(均 $P > 0.05$ )。见表1。体外实验中亦显示棉酚组与对照组间,上述2个指标均无统计学意义( $P > 0.05$ )。

在经过1次细胞复制周期的中期分裂相,在体内实验中,核型畸变率和染色体畸变率在服药组、停药组和对照组之间均无显

表 1 染色体畸变分析

组 别	例数	观察细胞数	畸变核型数	核型畸变率 $\bar{X} \pm SE(\%)$	畸变染色体数	染色体畸变率 $\bar{X} \pm SE(\%)$	
体内实验	对照组	48	4800	39	$0.81 \pm 0.24$	49	$0.02 \pm 0.007$
	服药组	24	2400	29	$1.21 \pm 0.25$	31	$0.03 \pm 0.006$
	停药组	29	2900	27	$0.88 \pm 0.25$	27	$0.02 \pm 0.005$
体外实验	0	5	500	8	1.6	8	0.035
	棉酚	4	5	500	6	6	
	浓度	20	5	500	8	8	
	( $\mu\text{g/ml}$ )	30	5	500	5	5	0.025
		40	5	500	4	4	

著性差异(均  $P > 0.05$ )；在体外实验中，核型畸变率棉酚组(0.5%)和染色体畸变率(0.02%)均高于对照组(0.2%和0.004%)，但无统计学的显著性差异(均  $P > 0.05$ )。见表 2。

CA 损伤的类型分析，常规Giemsa染色和 FPG 染色的第1细胞周期的中期分裂相中显示：体内体外实验均以染色单体畸变为主要类型，各种畸变类型所占的百分率与相对应组的比较，均无显著性差异。见表 3。

表 2 第 1 细胞周期中染色体畸变分析

组 别	例数	观察细胞数	畸变核型数	核型畸变率 $\bar{X} \pm SE(\%)$	畸变染色体数	染色体畸变率 $\bar{X} \pm SE(\%)$	
体内实验	对照组	44	4400	47	$1.07 \pm 0.17$	50	$0.02 \pm 0.004$
	服药组	24	2400	24	$1.00 \pm 0.21$	24	$0.02 \pm 0.004$
	停药组	23	2500	28	$1.22 \pm 0.28$	29	$0.03 \pm 0.005$
体外实验	0	5	500	1	0.2	1	0.004
	棉酚浓度	4	5	500	3	9	
		20	5	500	1	3	
	( $\mu\text{g/ml}$ )	30	5	500	3	3	0.02
		40	5	500	3	8	

2.2 MCN 测定

体内实验：在普通法对照组、服药组和停药组分别观察69000、37000和40000个细胞，MCN细胞率分别为  $2.08 \pm 0.29\%$ 、 $3.29 \pm 0.52\%$ 和  $2.29 \pm 0.38\%$ ，经方差分析，服药组与对照组有统计学显著差异( $F = 5.6426, P < 0.025$ )，而其它各组间均无统计学显著差异(均  $P > 0.05$ )；在参入BUdR方法中，3组分别观察72000、45000

和35000个细胞，其MCN细胞率分别为  $3.38 \pm 0.23\%$ 、 $3.81 \pm 0.32\%$ 和  $2.75 \pm 0.35\%$ ，3组间均无显著差异( $P > 0.05$ )；两种方法的对照组(加BUdR与无BUdR组)间有非常显著差异( $F = 9.4938, P < 0.01$ )，而两种方法相应的服药组和对照组间，无显著差异( $P > 0.05$ )；分析表明，棉酚对BUdR间无交互协同作用( $F = 1.2750, P > 0.05$ )。

体外实验：每组均观察5000个细胞，棉

表 3 染色体畸变类型分析

组 别	常规Giemsa染色中期分裂相										第一细胞周期中期分裂相					
	染色单体 裂隙	染色单体 断裂	染色单体 裂隙	染色单体 断裂	三射体	四射体	断片	缺失	染色单体 裂隙	染色单体 断裂	染色单体 裂隙	染色单体 断裂	双着丝粒 染色体	双着丝粒 染色体	断片	
体内实验	25	2	6	6	5		5		31	3	4	4	6	6	6	
服药组	11	2	2	2	5	1	9		8	4	1	1	8	3	3	
停药组	13	3	2	1	1	1	3	2	18	2	3	4	1	1	1	
体外实验	6		1	1					1							
棉酚浓度 ( $\mu\text{g/ml}$ )	4		2	2					1				3	5		
	20	8											1	2		
	30	4							1					2		
	40	3		1					3							

酚浓度0, 4, 20, 30, 40  $\mu\text{g/ml}$  组分别有 14, 10, 13, 15, 16 个 MCN 细胞, 对照组和棉酚组 MCN 细胞率分别为 2.8% 和 2.7%, 两组间无显著差异 ( $P > 0.05$ )。在不同浓度棉酚组, 随棉酚剂量增加, MCN 发生稍有增加。在阳性对照丝裂霉素 C30 和 50  $\text{fg/ml}$  组中, MCN 细胞率明显增加, 为 36% 和 60%。

### 2.3 SCE 频率

体内实验: 在对照组、服药组和停药组, 平均每例分别观察 86.6、100 和 77.1 个中期分裂相, 其 SCE 总数分别为 31134、15640 和 17011, 均值分别为每细胞  $7.98 \pm 0.22$ 、 $7.45 \pm 0.11$  和  $7.73 \pm 0.39$ , 3 组间无统计学显著差异 (均  $P > 0.05$ )。

体外实验: 棉酚组共观察 1851 个中期分裂相, 有 14513 个染色单体交换, 平均 SCE 7.84/细胞; 对照组观察 500 个细胞, 有 3676 个交换, 平均 SCE 7.35/细胞; 在丝裂霉素 C30 和 50  $\text{ng/ml}$  2 组中, SCE 均值为 58.95 和 105.83/细胞, 与实验组和对照组有显著差异 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.02$ )。4 种不同浓度棉酚 (4、20、30、40), SCE 均值分别为  $7.42 \pm 1.57$ 、 $7.92 \pm 1.62$ 、 $8.04 \pm 1.56$ 、 $8.10 \pm 1.55$ , 随棉酚剂量增加而增加, 除棉酚 4  $\mu\text{g/ml}$  1 组外, 其它浓度与对照组间的差异均有统计学显著意义 ( $P < 0.01$ )。但即使在最大浓度 40  $\mu\text{g/ml}$  组中, SCE 值仍在正常范围内。

### 2.4 细胞动力学

#### 2.4.1 MI

体内实验: 对照组、服药组和停药组分别观察 140000、83000 和 76000 个细胞, MI 分别为  $3.45 \pm 0.22\%$ 、 $3.09 \pm 0.31\%$  和  $3.64 \pm 0.30\%$ , 3 组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

体外实验: 在棉酚浓度 0、4、20、30、40  $\mu\text{g/ml}$  组, 常规培养法其 MI 分别为 7.12%、6.08%、6.70%、5.54%、3.24%; 参入 BUdR 培养法其 MI 分别为 5.82%、

5.22%、4.72%、3.60%、2.84%；常规法培养组均高于相应的参入BUdR培养组；这2种培养组中，对照组的MI均约2倍于40 μg/ml棉酚组，且有统计学差异 ( $P < 0.001$ )。

#### 2.4.2 PHA 刺激反应

由受PHA刺激而增大的间期细胞核与无反应的间期细胞核的比率，来估计棉酚对PHA刺激反应的程度。在棉酚0, 4, 20, 30, 40 μg/ml浓度，其受PHA刺激的间期细胞分别为59.1%、53.7%、43.5%、40.1%、30.5%，显示随棉酚浓度增大而相应减少。

#### 2.4.3 M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub> 比率

体内实验：M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub> 比率的均值，在对照组分别为74.80 ± 2.07, 23.00 ± 1.79, 2.20 ± 0.42 (观察5500个核型)；服药组为78.91 ± 1.98, 19.71 ± 1.78, 1.38 ± 0.25 (观察4000个核型)；停药组为71.66 ± 2.96, 25.27 ± 2.09, 3.07 ± 1.08 (观察2400个核型)；3者之间均无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。

体外实验：各棉酚组M<sub>1</sub>比率均高于对照组，且随棉酚浓度增高而增多，M<sub>2</sub> M<sub>3</sub>比率相应减少。在4 μg/ml和20 μg/ml组中M<sub>1</sub> M<sub>2</sub>比率与对照组无统计学显著差异 ( $P > 0.05$ )，而在30 μg/ml和40 μg/ml组约2倍于对照组，有显著性差异 ( $P < 0.001$ )。见表4。

表4 体外实验 M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub> 比率

棉酚浓度	观察细胞数	M <sub>1</sub> (%)	M <sub>2</sub> (%)	M <sub>3</sub> (%)
0	291	37.1	44.7	18.2
4	261	43.7	44.1	12.2
20	236	47.9	43.2	8.9
30	180	56.7	36.1	7.2
40	142	63.4	30.9	5.7

2.4.4 不同培养时间下棉酚对M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub>的比率 在培养48 h，棉酚组与对照组均处于

M<sub>1</sub>期；培养72 h，则对照组58%细胞处于M<sub>2</sub>期，96小时多数细胞处于M<sub>3</sub>期或M<sub>3</sub>期以上。但棉酚组在培养96 h大多数细胞仍然为M<sub>1</sub>期而无M<sub>3</sub>期分裂相。表5。

表5 棉酚40 μg组不同培养时间下 M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub> 比率

培养时间(h)	M <sub>1</sub> (%)	M <sub>2</sub> (%)	M <sub>3</sub> (%)
48	100(100)	0(0)	0(0)
66	84(65)	16(44)	0(1)
72	83(27)	17(58)	0(15)
96	67(16)	33(85)	0(49)

( ) 内外对照组

### 3 讨论

人外周血淋巴细胞是测试物理和化学因子诱变剂的极为敏感的指标。在检测工作中除经典的染色体畸变分析外，SCE可检出绝大多数ng量的致突变物，是一种DNA水平上的检测染色体损伤的灵敏方法。简便快速而灵敏的MCN测定法可反映细胞周期中各时期染色体和DNA损伤及纺锤体装置受到的影响，但它仅能反映其质的关系，即不能显示损伤类型。细胞动力学是对细胞在基本生命活动中，DNA和蛋白质复制过程为主要表现的细胞周期的研究，认识细胞周期的规律性，用以检测各种因素对细胞周期各阶段的影响及研究细胞基本生理活动有着重要意义。因此，这些指标是在检测遗传物质损伤的不同程度上有其不同意义及不同优点与不足。所以利用多项检测指标进行综合评价对于较全面地反映有无致癌、致诱变作用有着重要作用。

本研究采用上述综合检测法，分析了醋酸棉酚长期服用者的体内实验和相当人服用棉酚血清中浓度的1、5、7.5、10倍的体外实验的遗传学效应。

体内实验表明，长期服用棉酚者的CA、SCE、MI和M<sub>1</sub> M<sub>2</sub> M<sub>3</sub>比较均无影响，细

胞动力学方面未受干扰。MCN 发生率在服药组高于对照组，临床上这些人均无自觉症状，体检及各项生化指标测定均无异常；停药组与对照组无显著差异，说明停药后 MCN 发生可恢复正常。结合体外实验，在相当于临床使用10倍剂量下，对CA、MCN、SCE 均无影响。因此临床使用棉酚从遗传学角度来看还是安全的。

体外实验结果显示，棉酚有明显减少 MI 和降低受 PHA 刺激的间期细胞反应的作用；随棉酚剂量的增加，细胞经过有些分裂所产生的子细胞中， $M_2$ 、 $M_3$  比率降低，而  $M_1$  相应增加。这些现象说明棉酚对细胞动力学产生一定的影响，减少或抑制细胞对 PHA 刺激的反应和反应迟缓。但在大剂量棉酚组，即使培养时间延长至 96 h， $M_2$ 、 $M_3$  细胞仍进行性地减少，绝大部分细胞处于  $M_1$  阶段，说明细胞对 PHA 刺激反应迟缓的可能性不大；相反，大部分细胞处于  $M_1$  和低的 MI，推论是只有少数细胞对 PHA 有反应，即棉酚有减弱或降低 PHA 的作用，可能影响了细胞动力学。棉酚的这种作用，可能同样作用于睾丸生精上皮，从而抑制了精子发生，因为棉酚有选择的蓄积于睾丸，生殖细胞的这种作用可能更明显。

在遗传学安全性检测工作中，由于各个指标有着不同的分子作用机制，对遗传物质的损伤代表着不同的水平和程度，用一、二项指标不能全面地反映其遗传学效应的可能性。因此，我们建议应用多项检测指标综合地进行研究，以求达到较完善的遗传安全性

的结论。同时认为利用参入 BUdR 的方法用以检测致诱变的可能性，特别是进行 MCN 测定是不恰当的。

### 参 考 文 献

1. 张忠恕，等。棉酚的遗传学研究 I。生殖与避孕。1981；1(1)：33。
2. 张忠恕，等。棉酚的遗传学研究 II。生殖与避孕。1981；1(2)：42。
3. 张忠恕，等。棉酚对人体淋巴细胞 SCE 的离体效应。生殖与避孕。1983；3(3)：61。
4. 蔡有余，等。棉酚对人体外周血淋巴细胞染色体畸变和 SCE 影响的研究。解剖学报。1981；12(3)：293。
5. 陈立男，等。长期服用棉酚对个体 SCE 率的影响。遗传。1983；5(3)：35。
6. Moorhead PS, et al. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. *Exp Cell Res* 1960; 20: 613.
7. Latt SA. Sister chromatid exchanges, induces of human chromosome damage and repair; detection by fluorescence and induction by mitomycin C. *proc Natl Acad Sci USA* 1974; 71: 3162.
8. Perry P, et al. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974; 251: 156.
9. Evans HJ, et al. Human peripheral blood lymphocytes for the analysis of chromosome aberrations in mutagen tests. *Mutat Res* 1975; 31: 135.
10. Countryman PI, et al. The production of micronuclei from chromosome aberrations in irradiated cultures of human lymphocytes. *Mutat Res* 1976; 41: 321.

(上接第67页)

初具规模，各项工作正走向正规，研究水平日益提高。在不断加强与国内和国际的交流和合作基础上，我们相信，中国环境诱变剂学

会一定会为我国“四化”建设贡献自己的力量，一定会对我国与全世界人类的健康及环境保护作出贡献。

meprobamate (10), sorbitor (11), urethane (12), methyl methanesulfonate (13), sodium fluoride(14), 5-bromodeoxyuridine(15). Normal test described by Margolin et al (1983) and Kastenbaum-Bowman test are used to examine data for statistical significance. The compounds which show significant difference at the 5% level between the treated and control frequencies of chromosome gain in treated ♂ include (1, 2, 5, 7, 9, 14), and (4) in treated females. The compounds which show significant difference at the 5% level of chromosome loss in treated males include (3, 4, 6, 7, 8, 9, 11, 12, 13, 14, 15), and (1, 5) in treated females. Of 15 compounds tested for non-disjunction and loss, only six (4, 5, 8, 9, 12, 13) have definitive carcinogenesis classifications (all positive). Five (4, 8, 9, 12, 13) of these were significant difference for loss, three (14, 5, 9) of these were significant difference for non-disjunction. Sensitivity is 83% and 50%, respectively.

## ON EVALUATION OF THE GENETOTOXIC EFFECT OF GOSSYPOL IN HUMAN LYMPHOCYTES WITH AN COMPREHENSIVE BATTERY OF BIOASSAYS: INTEGRATING THE IN VITRO AND IN VIVO TEST

Cui Yingqi, Zhang Shucheng

National Research Institute for Family planning, Beijing

In order to investigate whether Gossypol possesses any mutagenic effect on human lymphocyte chromosomes, the in vitro and in vivo studies were carried out based on the parameters of chromosome aberration, sister chromatid exchanges, micronucleus test, mitotic index and cell kinetics. Increasing of micronuclei counting in the gossypol taking group (within clinical dosage) was observed. But for other four parameters, there was no significant difference between the drug users, discontinued and the control groups. As the dosage raised 7.5-10 folds of that used for clinic purpose, gossypol did affect the cell kinetics, reducing mitotic index and alterate the ratio of second and third metaphases after BUDR incorporation.