

农药敌灭灵诱发的染色体畸变 和姐妹染色单体交换的研究

贺维顺 刘爱华 陈松强 保海仙

(中国科学院昆明动物研究所细胞遗传研究室)

朱慧香 王桂清

(沈阳化工研究院)

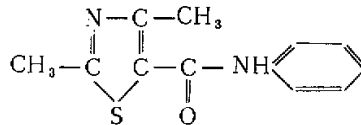
敌灭灵为农用杀菌剂。化学名称：2,4-二甲基-噻唑-5-甲酰替苯胺。1966年由美国 Unird1 公司合成。在我国由沈阳化工研究院试制成功。经有关部门药效研究证明敌灭灵杀菌剂对高粱黑穗病有特效。

敌灭灵的急性毒性试验已有报导(沈阳化工院农药六室 1979 March, R. W. 1977)。为了检查敌灭灵是否具有潜在性的致癌和遗传危害, 我们观察了敌灭灵对小鼠骨髓细胞和赤麂离体细胞的染色体, 赤麂细胞周期动力学变化, 以及姐妹染色单体交换的改变。

材 料 和 方 法

敌灭灵化学名称：2,4-二甲基-噻唑-5-甲酰替苯胺。

化学结构式：



待测样品由沈阳化工研究院农药六室提供。

实验小鼠雌雄两性, 体重18—22克。

整体实验共设敌灭灵1/5 LD₅₀ 组(871mg/kg体重), 1/15 LD₅₀ 组(290mg/kg体重),

* 本文承施立明同志修改, 特此致谢!

阳性对照组—敌枯双 $1/5LD_{50}$ 组(446mg/kg体重)及对照组共四组。每组设小鼠5只。敌灭灵及敌枯双均用二甲亚砜(DMSO)溶解,配成所需的浓度。每个剂量组及阳性对照组均两次口服给药,隔间24小时(对照组按同样处理时间每次口服0.2ml DMSO),于第二次给药后6小时腹腔注射4mg/kg秋水仙素溶液。两小时后杀死小鼠。按常规程序制备骨髓细胞染色体标本(贺维顺等,1978)。用磷酸盐缓冲液(pH 6.98)配制的Giemsa溶液染色。每只小鼠观察50个背景清晰,分散良好的中期相。每个组至少要观察250个中期相,统计出其中出现的畸变细胞数,以百分率表示之。

离体实验使用的细胞株为本实验室所建的雄性赤麂(*Muntiacus muntjak*)二倍体细胞株(KIZ-7901), $2n=7$ 。用60ml容积的小方瓶,内盛含有15%小牛血清的“199”培养液12ml,细胞接种后,在暗处红光灯下按 $8\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量加进5-溴去氧尿嘧啶核苷(BUdR), 37.5°C 避光培养,在细胞生长48小时加入待测的杀菌剂敌灭灵,使最终浓度为 0.2mM 或 2mM 。继续培养2小时,倾去含有敌灭灵杀菌剂的培养液,以 37.5°C 予温的Hanks或PBS溶液洗涤两次。换上含有同样浓度BUdR的新鲜培养液,继续培养22小时,从接种到细胞收获总共为72小时。

细胞收获前4小时加入秋水仙素溶液,使最终浓度为 $0.4-0.6\mu\text{g}/\text{ml}$ 。培养终止后,以0.25%胰蛋白酶(Difco 1:250)溶液消化,收集细胞,以予温至 37.5°C 的0.4%KCl溶液低渗处理13分钟,离心收集细胞,按常规空气干燥法制片。

姐妹染色单体分化(SCD)染色,把制好的染色体标本在 37.5°C 温箱中处理24小时,用经我们改进的Чебогарев等人的分化染色法染色(Чебогарев А. Н., Селезнева Т. Г., Длатонова В. И., 1978);标本在 10^{-5}M 的吡啶橙溶液中予染,在 0.07M 的 Na_2HPO_4 或 $2\times\text{ssc}$ 溶液中以30瓦紫外光灯管照射(贺维顺,刘爱华等,1980,施立明,贺维顺等,1980)照后用5%Ba(OH)₂饱和液在室温下处理,流水冲洗,以2%的Giemsa(pH6.98磷酸盐缓冲液稀释)染液染色20分钟。干燥,镜检。

在同一个标本上观察细胞周期动力学变化,姐妹染色单体交换和染色体畸变。根据姐妹染色单体分化图相和复制周期数,把中期相分为M-1, M-2和M-3。从每号染色体(Y₂是一个亚中着丝点的微小染色体,一般在计数SCE时勿略不计)分别记录它们的SCE(见图1)。杀菌剂敌灭灵诱发赤麂离体细胞染色体畸变类型有断裂,单断片,双断片,不对称单体互换,粉碎性断片等。

结 果

染色体畸变:

染色体畸变分析结果表明,不论是小鼠骨髓细胞染色体畸变率还是离体培养的赤麂成纤维细胞染色体畸变率都高于对照组。敌灭灵诱发小鼠骨髓细胞染色体畸变, $1/15LD_{50}$ 和 $1/5LD_{50}$ 组无甚差异(见表1)。小鼠口服 $0.2\text{ml}/\text{鼠}\times 2$ 二甲亚砜(DMSO)对照组骨髓细胞染色体畸变率为0.3%,口服敌灭灵 $1/15LD_{50}$ 组畸变率为2.4%, $1/5LD_{50}$ 组为2.0%,阳性对照 $1/5LD_{50}$ 敌枯双组染色体畸变率竟达到19.2%。(见表1)。敌灭灵两个给药组和对照组相比,其差异都达到统计学上的显著水平($P<0.01$)。

表1. 杀菌剂敌灭灵诱发小鼠骨髓细胞和赤鹿离体细胞染色体损伤的结果

细胞类型	药物浓度	观察 细胞数	畸变类型						畸变 细胞 数	畸变细胞率 (%)
			断裂	单 断片	双 断片	单体 互换	环	粉碎性 断片		
小鼠骨髓 细胞	DMSO对照组	350	1						1	0.3%
	1/15LD ₅₀ 组	250	1	3	1		1	1	6	*2.4%
	1/15LD ₅₀ 组	250	1	1	2				5	*2.0%
	1/5LD ₅₀ 敌枯双									19.2%
赤鹿 离体细胞	DMSO对照组	82		2					2	2.4%
	0.2mM	491	7	11	2	1			21	4.3%
	2mM	190	5	3	5			3	16	☆8.4%

* P < 0.01

在赤鹿离体细胞中, DMSO对照组为2.4%, 0.2mM敌灭灵组为4.5%, 2mM组为8.4% (见表1)。用0.05mM (10.7 μ g/ml) 敌枯双处理细胞4小时, 染色体畸变率达到14% (施立明, 贺维顺等, 1980)。染色体畸变类型: 在DMSO对照组中, 只观察到断裂和单断片, 0.2mM敌灭灵组除了断裂, 单断片, 双断片外还出现了不对称单体互换 (见图2), 而2mM组除有上述畸变类型外, 还多次出现粉碎性断片 (见图4)。

细胞周期动力学变化

根据姐妹染色单体分化 (SCD) 的图相和DNA复制的周期数, 把中期相分为, M-1, M-2和M-3。在对照组和实验组中三类型都有。不过M-3数量很少未统计。在M-1和M-2类型中, 给药组和对照组相比, 随着给药剂量的加大, M-2类型减少, M-1增加, 细胞分裂周期持续时间延长, 这表明可能DNA合成受阻, (见表2)。

表2. 在赤鹿离体细胞中敌灭灵处理后的细胞周期动力学变化

给药浓度	各期细胞百分数(%)			观察细胞 总数(个)
	M-1	M-2	M-3	
对照组	42.8	54.8	2.40	84
0.2mM	46.3	53.3	0.38	523
2mM	51.5	47.6	0.97	206

姐妹染色单体交换 (SCE)

在对照组, 0.2mM敌灭灵和2mM敌灭灵实验组, 每个细胞平均SCE率分别为6.89, 9.70和9.31。经统计学处理给药组和对照组相比, 相差非常显著 (P < 0.001) (见表3)。

表3. 敌灭灵杀菌剂诱发赤麂离体细胞的姐妹染色单体交换 (SCEs)

给药浓度	观察细胞数 (个)	SCE分布(占SCE总数%)				每个细胞平均SCE数	
		№ 1	№ 2	x	y ₁	范围	$\bar{x} \pm S.E.$
对照组	19	45.8	34.4	7.6	12.2	4—11	6.89 ± 0.51
0.2mM	138	48.0	26.0	14.3	11.7	2—24	* 9.70 ± 0.34
2 mM	19	49.7	23.7	14.1	12.4	5—15	* 9.31 ± 0.37

* $P < 0.001$

SCE的分布和染色体长度, DNA的相对含量有关。染色体越长, DNA含量就越高, 诱发的SCE分布也就越多。在X染色体中SCE的分布就不一定符合这个规律。X染色体的颈部为异染色质, 很少有SCE分布, 我们观察的结果和S. Ved Brat等人用咖啡因等诱发印度麂离体细胞SCE观察的结果一致 (Ved Brat, et al. 1979)。在本实验中0.2mM敌灭灵和2mM组每个细胞平均SCE率没有区别。

讨 论

评定一种化合物可能的诱变性, 方法之一是观察诱发的哺乳动物细胞中染色体畸变。一些工作表明, SCE比常规染色体畸变分析更灵敏。在实际应用上更有优越性。Порядкова[1976]认为SCE比染色体畸变分析灵敏100—200倍。Takehisa等(1977)也认为SCE是诱变—致癌测定的一种灵敏指示器。

我们采用不同的检测系统和不同的指标进行试验, 所得的数据, 相互印证, 结果可能更为可靠些。

在试验中, 我们使用二甲亚砜(DMSO)作溶剂, 实验结果和Majumder等用DMSO溶解狄氏剂诱发小鼠骨髓和WI—38人胚细胞株的染色体损伤一样, DMSO没有引起明显的染色体损伤(Majumder, S.K. et al 1976)。

在离体实验中, 除了观察染色体畸变外, 还观察细胞周期动力学变化和SCE, 这就需要使用5—溴去氧尿嘧啶核苷(BUdR)标记染色体。而BUdR本身就是一种弱诱变剂, 使用多大剂量既能对细胞培养物进行标记, 又不增加染色体畸变呢? Kata认为, 在低浓度的BUdR中, SCE率下降可能由于没有足够的胸腺嘧啶核苷被BUdR置换, 造成染色体染色不佳(Sheldon Wolff, et al. 1979)。Чеботарев等指出: 50和10 μ g/ml BUdR不会影响细胞周期的延续时间, 也没有引起染色体畸变率增加(Чеботарев А. Н., Селезнева Т. Г., 1979)。Еголина指出: 甚至在200 μ g/ml高浓度BUdR都没有引起染色体畸变额增加(Еголина Н. А., Захаров А. Ф., 1971)。我们使用8 μ g/ml BUdR, 既能对染色体标记又没有引起染色体畸变额增加。

我们对敌灭灵进行的实验结果表明: 无论在整体实验还是离体实验, 杀菌剂敌灭灵

都显示一定的诱变性, 但和杀菌剂敌枯双相比 (施立明, 贺维顺, 1980) 它的诱变活力则弱得多。

参 考 文 献

- 沈阳化工院农药六室敌灭灵急性毒实验记录 (1979, 待发表)
- 贺维顺等 1978 浮选剂丁黄酸烯丙酯, 丙睛酯及丁基黄药对小鼠骨髓细胞染色体的影响。有色金属 (选冶部分) (8) 24—26。
- 贺维顺、刘爱华等 1980 一种简易的姐妹染色单体分化方法—紫外线照射加Giemra染色 (UPG) 自然杂志 (8) 638。
- 施立明、贺维顺等 1980 赤麂离体细胞测定化合物诱变活动力的研究。动物学研究 I (3), 297—302。
- Majumder, S.K. et al. 1976 Dieldrin-induced chromosome damage in mouse bone-marrow and WI-38 human lung cells. The Journal, 67: 303-307. of Heredity March, R.W. 1977 Systemic fungicide 88.
- Sheldon Wolff. et al. 1979 Report of the workshop on The Utility of Sister-chromatid Exchange (Lake Yaman-a. Japan. July 16—17. 1978) Mutation Res. 64:53-56.
- Ved Brat. S. et al. 1979 Anthramycin-induced [sister-chromatid exchange and caffeine potentiation in the chromosomes of Indian muntjac. Mutation Res. 63:325-334.
- Еголина Н. А. Захаров А. Ф. 1971 Зависимость спирализации хромосот китайского хомячка от дозы и времени действия 5-бромдезоксигуанидина в митотическом цикле. Цитология 13 №10, 1218—1224.
- Чеботарев А. Н. Селезнева Т. Г. Платонова Б. И. 1978 Модифицированный метод дифференциальной окраски сесринских хроматид. Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. Том 2:242—243.
- Чеботарев А.Н. Селезнева Т. Г. 1979 Использование 5-бромдезоксигуанидина для определения продолжительности фаз клеточного цикла. Цитология и Генетика. Том 13 163—167.

Abstract

**A STUDY OF CHROMOSOMAL ABERRATIONS AND SISTER-
CHROMATID EXCHANGES INDUCED BY AGRICULTURAL
GERMICIDE DIMIELING**

He Wei-shun Liu Ai-hua
Chen Song-jiang Bao Hai-xian

(Department of Cytogenetics, Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

Zhu Hui-xiang Wang Gui-qing
(Shenyang Academy of Chemical Industry)

We used the chromosomal aberrations in the bone-marrow cells of mice and chromosomal aberrations, sister-chromatid exchanges (SCE), changes of cell-cycle kinetics in the culture cells of Red Muntjac in vitro as the index to study the mutagenicity of dimieling (2,4-dimethylthiazole-5-formylanilide). The experimental results show that the chromosomal aberration frequencies in the bone marrow cells of mice were: control group 0.3%, dimieling LD 50 1/15 doses (290mg/kg) group 2.4%, LD 50 1/5 doses (871mg/kg) group 2.0%, positive control, LD 50 1/5 doses (446mg/kg) dikushuang (N,N'-methylene-bis-(2-amino-1, 3, 4-thiadiazole) aberration frequency 19.2%. Chromosomal aberration frequencies in the culture cells of Red Muntjac were: dimethylsulfoxide (DMSO) control group 2.4%, 0.2mM (46.6 μ g/ml) dimieling group 4.6%, 2mM (466 μ g/ml) group 8.4%. The culture cells of Red Muntjac had been treated with 0.05mM (10.7 μ g/ml) dikushuang for four hours chromosomal aberration frequency reached 14%. SCE frequency has been increased after treatment with dimieling. The number of SCEs for DMSO control group was 6.89 ± 0.51 /cell, 0.2mM (46.6 μ g/ml) dimieling group was 9.70 ± 0.34 /cell, 2mM (466 μ g/ml) group was 9.31 ± 0.73 /cell, and yet SCE frequency induced by 0.05mM (10.7 μ g/ml) dikushuang was as high as 19.4 ± 0.92 /cell. Obviously, compared with dikushuang, dimieling is a weak chemical mutagen.

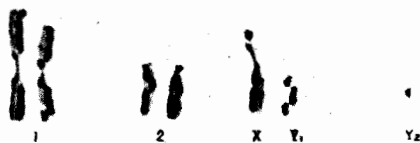


图1. 显示SCEs的赤麂 (*Muntiacus muntjak*) 核型

图2. 0.2mM (46.6 $\mu\text{g/ml}$) “敌灭灵”诱发赤麂离体细胞的单体断裂和单体互换
a. 单体断裂 b. 单体互换

图3. 0.2mM (46.6 $\mu\text{g/ml}$) “敌灭灵”诱发赤麂离体细胞出现的SCE

图4. 2mM (466 $\mu\text{g/ml}$) “敌灭灵”诱发赤麂离体细胞染色体粉碎性断裂

图5. 阳性对照—1/5LD50 (466 $\mu\text{g/kg}$) “敌枯双”诱发小鼠骨髓细胞染色单体断裂、单体互换及粉碎性断裂
a. 单体断裂和单体互换 b. 粉碎性断裂