

砷污染区黄牛和水牛姐妹染色单体 交换和细胞周期动力学的研究

王民楨 陈素珍 周桂琴 陈世军
(华南农业大学)

房为荣 林迈善 黄振光 曾呈林
(广东连南县畜牧水产局)

摘 要

本文以外周血淋巴细胞姐妹染色单体互换 (SCE) 频率和细胞周期动力学为指标, 以较长期 (4~13年) 生活在砷污染区的黄牛和水牛为对象, 对砷在动物体内慢性蓄积所诱发细胞遗传学效应进行了研究。其结果表明, 砷污染区黄牛和水牛 SCE 频率均显著高于对照组, 参照有关评价标准, 可判为弱阳性, 提示在当地污染水平下, 黄牛和水牛都诱发了一定程度的细胞遗传学效应。对细胞周期动力学的观察结果表明, 砷对黄牛和水牛没有明显的细胞毒性。本试验还报告了正常黄牛和水牛外周血液淋巴细胞 SCE 的自发频率以及培养72小时各期细胞的正常比率。

关键词 黄牛, 水牛, 砷污染, 姐妹染色单体互换, 细胞周期动力学

于动物活体或细胞体外培养液中加入5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-Bromodeoxyuridine, 简称 BrdU), 在 DNA 半保留复制过程中, BrdU 能掺入到合成的 DNA 链中, 取代胸腺嘧啶 (Thymidine), 经过两个复制周期后, 中期细胞染色体的两条姐妹染色单体中, 一条染色单体的 DNA 双链都含有 BrdU, 而另一条染色单体的 DNA 双链中只有一条含有 BrdU, 由于 BrdU 可使 DNA 分子相对解旋, 减低其对荧光素的亲和力, 故用荧光素染色后两条姐妹染色单体分别发出强弱不同的荧光, 可以清晰地看到其互换情况^[1]。Latt (1973)^[2]首次建立了 SCE 检测技术。Perry 和 Wolff (1974) 在此基础上建立了荧光素-吉姆萨染色法 (简称 FPG 法)^[3], 目前此法或其改良法为多数实验室所采用。国内外的研究资料表明, 环境化学物诱发的 SCE 频率增加与其致癌性及致突变性密切相关, 在遗传毒理学领域, SCE 作为反映 DNA 损伤及其修复力的敏感指标, 已广泛应用于对致突变物和致癌物的检测^[4,5]。

砷化合物是人畜最危险的毒物之一, 由于自然环境含砷过高或砷污染而引起人的地方性砷中毒在一些国家已被视为一种公害, 砷对人畜的危害还在于具有强烈的三致 (致突变、致癌、致畸) 作用, 但其机制迄今尚不甚清楚, 为此, 近年医学界在砷的遗传毒理学方面做了许多工作, 而兽医界在这方面的研究报道则甚少。1986~1989年我们曾对广东省连南县环境砷污染情况及其对黄牛和水牛的危害作了调查^[6], 本研究在此基础上以长期生活在砷污染区

- 本研究为国家自然科学基金资助项目。
- 本室研究生胡为民、詹勋参加了部分工作。
- 本文于1991年5月7日收到。

的黄牛和水牛为对象, 以外周血淋巴细胞 SCE 频率和细胞周期动力学为指标, 旨在探讨环境砷污染对于黄牛和水牛的细胞遗传学效应, 以评价砷污染对家畜健康的远期影响。

材 料 和 方 法

一、受检对象和分组 受检对象是长期生活在砷污染区的黄牛和水牛。根据对连南县环境砷污染的调查结果^[6], 分为轻污染区和中污染区两组, 另设对照组。共计检测黄牛32头,

表 1 受检动物和分组情况

Table 1 Animals examined and their experimental grouping

组 别 Groups	地 点 Sampling place	黄 牛 Cattle		水 牛 Buffaloes	
		检测头数 No. of animals	年龄(岁)平均(范围) Age (years) Mean (range)	检测头数 No. of animals	年龄(岁)平均(范围) Age(years) Mean(range)
对照区 Non-polluted area	新和 Xinhe	10	6.1(4~13)	10	8.6(4~12)
轻污染区 Slightly polluted area	香车 Xiangche	8	5.8(4~13)	16	6.9(4~10)
中污染区 Medium polluted area	老虎冲、鱼冲、 南坑塘 Laohuchong, Yuchong, Nankengtang	14	6.1(4~13)	22	6.8(4~12)

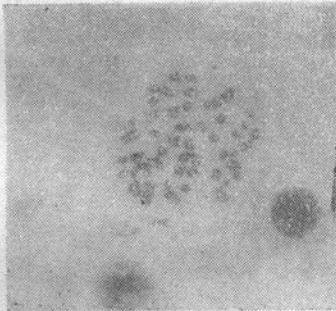


图 1 M₁期细胞。两条姐妹染色单体都染为深色(水牛染色体, 改良 FPG 染色)。

Fig.1 M₁ phase cell. Two sister chromatids stained deeply in color. (Buffaloes chromosome, modified FPG stain).



图 2 M₂期细胞。两条姐妹染色单体染为一深一浅, 箭头处表示染色单体交换(黄牛染色体, 改良 FPG 染色)。

Fig.2 M₂ phase cell. The one of sister chromatids is stained deeply and another lightly, arrows indicate the SCE. (Cattle chromosome, modified FPG stain).

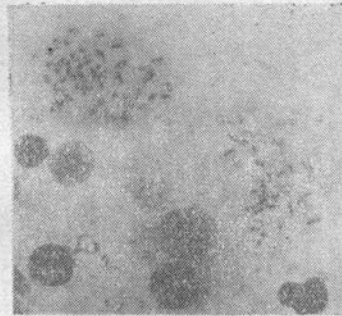


图 3 M₃期细胞(见 B)。部分染色体的两条染色单体都染为浅色(黄牛染色体, 改良 FPG 染色)。

Fig.3 M₃ phase cell (see B). Two sister chromatids of the some chromosome are stained lightl yin color. (cattle chromosome, modified FPG stain).

水牛48头,全为母畜,分组情况见表1。

二、SCE 测定方法

1. 采血:以严格无菌手续由颈静脉采血5毫升,预先用肝素湿润针头和注射器。
2. 淋巴细胞培养:每瓶培养液含 RPMI 1640 营养液(美国 GIBC 出品,正压过滤除菌)4毫升,小牛血清(56°C 灭活30分钟)1毫升,庆大霉素500单位,植物血凝素(PHA)1毫升,肝素100单位,调至 pH 7.2,以无菌操作于每瓶培养液中加入抗凝全血 0.3 毫升,于 38°C 避光培养24小时,加入 BrdU 液(最终浓度10微克/毫升),继续培养 48 小时,在终止培养前 3~4 小时加入秋水仙素50微克/毫升。
3. 制片:按常规收集细胞,以 0.075 M 氯化钾溶液于 38°C 处理 15 分钟,再用固定液(甲醇:冰醋酸为 3:1V/V)固定 3 次,每次15分钟。在预先冰冻的玻璃片上滴加上述悬液,吹气使细胞铺散,空气中干燥,室温中老化48小时以上然后染色。
4. 染色:采用改良 FPG 法^[7]。在标本片上加荧光染料双苯并咪唑(Hoechst 33258, Aldrich 公司出品,25微克/毫升)2~3滴,立即盖以另一较薄玻片,使染液布满两玻片间,用高压汞灯以3.5厘米距离照射7分钟,放入磷酸盐缓冲液中(pH 6.8)漂洗,常水冲净,晾干,用2.5%吉姆萨染液染色10分钟,水洗,空气中晾干待检。
5. SCE 计数:每份样品观察30个中期细胞,在油镜下计数染色单体互换频率,凡在染色单体端部出现的互换计为1个 SCE,在中部出现的互换计为2个 SCE,记录每中期细胞出现的 SCE 数。
6. 细胞周期动力学观察:由于细胞所经历的复制周期不同,在染色标本片中可观察到三期细胞。在一个细胞内,两条染色单体完全染为深蓝色为第1期(M₁)细胞;两条染色单体染为一深一浅即第2期(M₂)细胞;有1/4以上姐妹染色单体都染为浅蓝色即第3期(M₃)细胞。连续计数100个中期细胞,计算每期细胞的百分率。

结 果

一、测得黄牛(♀)自发 SCE 频率为 2.7 ± 0.33 ,水牛(♀)自发 SCE 频率为 3.51 ± 0.55 。

表2 砷污染区和对照区黄牛外周血淋巴细胞 SCE 频率测定结果
Table 2 The SCE frequency of cattle peripheral blood lymphocyte in arsenic-polluted and non-polluted districts

组 别 Groups	检测牛数 No. of animals	观察中期细胞数 No. of metaphase cells observed	SCE 数/每个中期细胞 SCE/cell		观察的染色体数 No. of chromosome observed	SCE 数/每条染色体 SCE/chromosome
			均数±标准差 Mean ± S. D.	范 围 Range		
对照区 Non-polluted area	10	302	2.7 ± 0.33	2.37~3.53	18120	0.044
轻污染区 Slightly polluted area	8	243	5.31 ± 0.49	4.63~6.13	14580	0.088
中污染区 Medium polluted area	14	422	5.46 ± 0.43	4.87~6.39	25320	0.092

二、砷污染区黄牛和水牛 SCE 频率均显著高于对照组 ($P < 0.001$), 表明在当地砷污染水平下, 长期生活在该地区的黄牛和水牛出现了有害的遗传学效应。

三、砷污染区黄牛和水牛细胞分裂周期动力学与对照组相比较, M_1 期百分比轻微增加, 但差异不显著, 表明试验区的砷污染水平并未对细胞生长过程产生阻抑效应, 砷对黄牛和水牛没有明显的细胞毒性。

讨 论

一、国内有关家畜 SCE 的研究报道尚少, 本试验的结果表明, 采用外周血淋巴细胞体

表3 砷污染区和对照区水牛外周血淋巴细胞SCE频率测定结果
Table 3 The SCE frequency of buffaloes peripheral blood lymphocyte in arsenic-polluted and non-polluted districts

组 别 Groups	检测牛数 No. of animals	观察中期细胞数 No. of metaphase cells observed	SCE 数/每个中期细胞 SCE/cell		观察的染色体数 No. of chromosome observed	SCE/每条染色体 SCE/chromosome
			均数±标准差 Mean±S.D.	范 围 Range		
对照区 Non-polluted area	10	298	3.51±0.55	2.47~4.20	14304	0.073
轻污染区 Slightly polluted area	16	462	6.68±0.54	5.58~7.63	23136	0.139
中污染区 Medium polluted area	22	661	6.91±0.59	5.37~7.77	31728	0.144

表4 砷污染区和对照区黄牛、水牛细胞周期动力学比较
Table 4 Comparison of cell cycle kinetics in cattle and buffaloes from arsenic-polluted and non-polluted districts

组 别 Groups	黄 牛 Cattle				水 牛 Buffaloes			
	检测头数 No. of animals	各期细胞百分数(%) Percentage of cell in phases			检测头数 No. of animals	各期细胞百分数(%) Percentage of cell in phases		
		M_1	M_2	M_3		M_1	M_2	M_3
对照区 Non-polluted area	10	26.7	70.5	2.8	10	34.6	63.6	1.8
轻污染区 Slightly polluted area	8	34.4	62.6	3.0	16	36.2	60.9	2.9
中污染区 Medium polluted area	14	29.2	67.9	2.9	22	37.6	60.0	2.4

外培养法和改良 FPG 染色法进行黄牛和水牛 SCE 的检测是可行的。在本试验条件下, 测得正常黄牛和水牛 SCE 自发频率以及培养72小时各期细胞的百分率, 为开展家畜遗传毒理学的研究提供了资料。

二、环境砷污染引起人类慢性砷中毒需要较大的积累量和长达数年甚至数十年的潜伏期, 并在其它因素共同存在的条件下发生致癌作用。家畜与人类生活在同一砷污染区, 无疑亦受到砷化合物的慢性侵害, 我们曾测得污染区牛毛含砷 (As_2O_3) 量极显著地高于对照区, 亦

证实了这一点^[6]。但这些牛都没有表现出任何临床症状,这就给兽医工作者提出了如何评价砷对家畜慢性侵害的远期效应问题。本试验在这方面做了一些有益的探讨。本试验测得较长期生活在砷污染区的黄牛和水牛的 SCE 频率显著高于正常牛,这与国内曾报道砷污染区居民和接触砷的工人的 SCE 频率显著高于对照组的结果^[8]是一致的。就 SCE 频率的绝对值而言,在 4 个试验组中,3 个组 SCE 频率均接近对照组的 2 倍,1 组(中污染组黄牛)略超过对照组的 2 倍,按照有人提出的判定标准^[9],此结果可判为阳性或弱阳性,提示试验组黄牛和水牛发生了致突变效应。可能由于家畜的寿命远较人类为短,体内砷的积蓄未能达到一定剂量,故终其一生未能表现出明显的临床症状和致癌效应。正因为这样, SCE 测定作为致突变性的快速检测方法,是评价砷化合物慢性蓄积诱发家畜遗传性损害的一种有用的辅助手段。

三、环境化学物对细胞周期动力学的影响,即该化学物的细胞毒作用,主要是抑制 DNA 的合成,对细胞生长周期起阻抑作用,这可以在 M_1 、 M_2 和 M_3 细胞百分比的变化中反映出来。因此,细胞周期动力学分析也是反映环境有害因素对机体影响的一种有用指标。本试验结果表明,砷污染区黄牛和水牛的细胞周期动力学与对照区比较,在统计学上没有明显差异,提示砷对黄牛和水牛没有明显的细胞毒性,这和前人所作砷对小鼠活体细胞周期动力学改变的研究结果(罗季儿等,1985)是一致的。

四、迄今国内外对于砷化合物诱发 SCE 的研究有着两种相反的结果,曾报道接受砷制剂治疗的病人、砷作业工人、砷污染区居民以及用砷处理体外培养的人淋巴细胞的 SCE 频率均显著高于对照组^[8,10],提示砷是一种致突变物。但也有一些研究报告认为 SCE 对于砷化合物不是一种敏感的检测方法^[11,12],可能其试验采用砷的剂量尚未达到诱发 SCE 增高的阈值,也可能砷对 DNA 损伤并非 SCE 所能反映的那一种类型,这些问题还有待探讨。

参 考 文 献

- [1] Wolff, S. Sister chromatid exchange. *Ann. Rev. Genet.* 1977, 11: 183~201.
- [2] Latt, S. A. Microfluorometric detection of DNA replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Natl. Acad. Sci (USA)*. 1973, 70: 3395~3399.
- [3] Perry, P. & Wolff, S. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* 1974, 251~158.
- [4] Carran, A. V. et al. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature*. 1978, 271: 551~553.
- [5] 联合国环境规划署等编: 砷的环境卫生标准(中译本). 人民卫生出版社(1981年出版).
- [6] 王民楨等. 环境砷污染对黄牛和水牛健康影响的调查. *中国兽医科技*, 1990, (4): 12~14.
- [7] 罗季儿等. 一种快速, 高效的姐妹染色单体区别染色法. 美国第十届环境诱变剂学会年会论文. 1988.
- [8] 苏德明等. 无机砷的细胞遗传效应研究. *遗传*, 1988, 10(3): 30~32.
- [9] 黄幸纾等. 环境化学物致突变, 致畸, 致癌试验方法. 浙江科学技术出版社. 1985.
- [10] Burgdorf, W. J. et al. Elevated SCE rate in lymphocytes of subjects treated with arsenic. *Hum. Genet.* 1977, 36(1)69~72.

- [11] Nordenson, I. et al. Chromosome aberrations in psoriatic patients treated with arsenic. *Hum. Genet.* 1979, 48(1)1~72.
- [12] Vig. B. K. et al. Chromosome studies in human subjects chronically exposed to arsenic in drinking water. *Am. J. Ind. Med.* 1984, 6(5) : 325~338.

**STUDIES ON SISTER CHROMATID EXCHANGE AND
CELL CYCLE KINETICS IN CATTLE AND BUFFALOES RAISED
IN ARSENIC-POLLUTED DISTRICTS**

Wang Minzhen, Chen Suzhen, Zhou Guiqin, Chen Shijun
(*South China Agricultural University*)

Fang Weirong, Lin Maishan, Huang Zhenguang, Zeng Chenglin
(*Liannan County Animal Husbandry and Aquatic
Bureau, Guangdong Province*)

Abstract

Using the frequency of sister chromatid exchange (SCE) of peripheral lymphocytes and cell cycle kinetics as indices, work was done to study the cytogenetic effect on cattle and buffaloes living for a long time in districts subjected to arsenic pollution induced by chronic accumulation of the element in the animal body. The results showed that the SCE frequencies of cattle and buffaloes in the polluted district were significantly higher than those of control animals in clean localities. These were assessed as weak positive reactions according to relevant standards, suggesting that cytogenetic effect to some degree could be induced both in cattle and buffaloes under the conditions of local pollution levels. According to the observed cell cycle kinetics, arsenic showed no obvious cytotoxicity to cattle and buffaloes. The spontaneous frequencies of SCE in peripheral lymphocytes of normal cattle and buffaloes and the normal ratio of cells in different stages at 72 hours of *in vitro* culture were also reported in this paper.

Key words Cattle, Buffaloes, Sister chromatid exchange, Cell cycle kinetics, Arsenic pollution