

常用抗癌药物诱发人外周血淋巴细胞核损伤的观察

马国建 吴建中 薛开先

江苏省肿瘤防治研究所 南京 210009

摘要 本文用阿霉素、阿糖胞苷、氟尿嘧啶、氮芥及秋水仙素和长春新碱体外处理人外周血淋巴细胞,观察了这七种具诱变作用的抗癌药诱发的微核、核变形、核碎裂等核损伤变化。结果表明,七种抗癌药物均能引起多种核损伤指标的改变,并呈剂量依赖性增加,其中微核率、核异常率最明显。本实验结果并综合文献讨论后作者认为:应用核异常测试法评价化学诱变因子对人体的遗传毒性和潜在致癌性是可行的。

关键词: 核异常测试法; 人淋巴细胞; 抗癌药物; 诱变性

OBSERVATION OF THE NUCLEAR DAMAGES IN LYMPHOCYTES OF HUMAN PERIPHERAL BLOOD INDUCED BY SOME ANTI-TUMOR DRUGS

Ma Guojian, Wu Jianzhong, Xue Kaixian

Cancer Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210009

Abstract We studied the nuclear damages in lymphocytes of human blood induced in vitro by Adriamycin, Bleomycin-A₅, Cytosine arabinoside, 5-Fluorouracil, Colchicine, Vincristine and Mustine hydrochloridum. The results show that the seven mutagenic antitumor drugs can cause obvious change of the nuclear damage indices (frequency of micronucleus, frequency of nuclear abnormalities, frequency of karyorrhetic nucleus, and frequency of irregular nucleus etc.) and dose-dependent increase are exhibited. Among the indices, the MNF and NAF are significant remarkably. Combining previous studies the experiment results suggest, the nuclear abnormality test (NAT) should be available to evaluate the genetic toxicities and potential carcinogenicities to human exposed to chemical mutagenic factors.

Key words: nuclear abnormality; lymphocytes; anti-tumor drugs; mutagenicity

环境污染中有害因子的致癌致突变效应以及肿瘤治疗中化学药物诱发第二肿瘤风险⁽¹⁾已越来越受到人们的关注。因此寻找更为快速简便并较敏感性的短期测试法,用以评价有害因子对受染人群的遗传毒性和潜在

的致癌性,显得十分必要。用体外人外周血淋巴细胞核异常测试系统,是理化诱变因子 γ -线,乙双咪啉、噻替哌、丝裂霉素⁽²⁻⁵⁾进行遗传毒理学评价,我们取得了良好的结果。为进一步验证此方法的实用价值,本文

选常用抗癌药氮芥(HN₂)、阿霉素(ADM)、平阳霉素(BL-A₅)、氟尿嘧啶(5-Fu)、阿糖胞苷(Ara-C)、秋水仙素(COL)和长春新碱(VCR)作为化学诱变因子,体外处理人外周血淋巴细胞,观察所诱发的多种核损伤变化,并结合文献,探讨了人淋巴细胞核异常测试法检测化学诱变因子的可行性。

材料和方法

实验用外周血采自健康供血员,共3

例,男2人,女1人。年龄19-22岁。新鲜抗凝血用10ml培养小瓶分装,每瓶0.4ml,加入0.1ml用RPMI 1640无血清培养液配制的不同浓度待检药物(见附表1),同时设阴、阳性对照,阴性对照加0.1ml培养液,阳性对照为20μg/ml的乙双吗啉。各组血样,在37℃培养箱放置17-18小时,按本室末稍血淋巴细胞微核法制片⁽⁶⁾和阅片⁽⁷⁾。实验结果分析微核率(MNF),核变形率(INF)、核碎

常用抗癌药物对人淋巴细胞核损伤的影响

药物及剂量 (μg/ml)	MNF (%)	INF (%)	KNF (%)	NAF (%)
0	0.58±0.90	15.91±6.29	0.16±0.39	14.00±6.73
HN ₂				
0.5	2.41±1.08*	18.31±5.80***	0.33±0.49***	22.62±3.47*
1.0	7.41±1.31*	13.00±4.98***	1.58±1.16*	22.91±2.68*
2.0	8.25±6.25*	19.40±12.54**	2.75±1.60*	32.34±11.42*
Ara-C				
0.25	2.75±1.36*	18.00±6.95**	0.83±1.19**	21.33±7.14*
1.00	6.00±2.79*	7.90±13.45***	1.41±1.51*	29.56±7.53*
4.00	10.00±3.95*	12.90±3.68***	2.91±0.90*	29.18±3.21*
COL				
0.01	6.25±2.22*	12.43±3.53***	1.25±0.86*	20.08±4.96*
0.10	6.58±2.43*	19.61±3.98**	1.75±1.66*	28.00±4.63*
1.00	10.51±2.68*	18.78±5.89***	3.25±2.34*	32.61±4.31*
BL-A ₅				
1.0	3.25±1.48*	31.50±6.45*	0.83±0.93**	35.72±5.39*
5.0	5.75±2.34*	23.17±3.85*	1.51±1.08*	30.42±5.52*
25.0	8.66±5.43*	23.80±12.85*	1.16±1.47*	33.68±12.51*
ADM				
1.0	3.00±1.04*	23.43±4.03*	0.25±0.62***	26.71±4.16*
4.0	4.58±2.78*	16.58±4.68***	1.83±2.32*	22.92±5.69*
16.0	3.08±1.62*	18.91±3.50***	0.08±0.29***	22.13±4.27*
VCR				
0.02	3.45±1.13*	13.12±4.70***	1.54±1.29*	13.57±6.48***
0.20	4.00±2.04*	19.31±4.29**	1.13±1.16*	19.55±11.31*
2.00	5.25±2.34*	17.31±5.23***	1.48±1.08*	20.63±8.74*
5-Fu				
20.0	1.18±1.17***	19.23±8.11***	0.63±0.92***	24.27±6.11*
40.0	4.58±1.44*	23.68±14.43*	1.90±1.38*	31.93±11.59*
80.0	2.51±1.08*	32.67±11.03*	0.25±0.62***	37.00±6.63*

*P<0.01, **P<0.05, ***P<0.05.

裂率(KNF)和核异常率(NAF),核异常率为MNF+INF+KNF。本实验中核固缩率与核空泡率在各处理组中均呈无规律改变,未做进一步统计分析。

结果

经七种抗癌药物处理后,各个剂量处理组都出现了不同程度的核损伤改变,见附表1。

1. 抗癌药物诱发的MNF变化

经抗癌药物处理后,MNF改变最明显,和对照组相比,除5-Ft最低剂量20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ($P>0.05$),其余各组MNF都有显著性差异($P<0.01$)。其中 HN_2 、VCR、Ara-C、COL和BL- A_5 五种药物的MNF里剂量依赖性增量。ADM、5-Fu各自在中剂量(4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 和40 $\mu\text{g}/\text{ml}$)MNF达到最大值(4.58%和4.58%)随后呈下降趋势,MNF分别为3.08%及2.51%。

2. 抗癌药物对NAF的影响

药物处理组NAF有极显著性差异,VCR 0.02 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 组 $P>0.05$,其余各组 $P<0.01$; HN_2 、COL、VCR和5-Fu NAF随剂量增加,剂量一效应关系显著。ADM、BL- A_5 随剂量增加,NAF呈下降趋势。Ara-C在中剂量组NAF达到峰值,然后逐趋平稳,NAF分别为2.95%和2.51%。

3. 抗癌药物诱发的KNF和INF变化

本实验中,Ara-C、COL和 HN_2 的KNF $P<0.01$,并随剂量增加而增量。BL- A_5 、VCR较对照组有显著性差异($P<0.01$),但剂量一效应关系不明显。ADM和5-Fu分别在中剂量组KNF $P<0.01$,低、高剂量 $P>0.05$ 。在本实验中,INF改变不明显,BL- A_5 和5-Fu中高剂量组 $P<0.01$,并且5-Fu的INF变化呈剂量依赖性增加。其余各组INF改变不大, $P>0.05$,个别 $P<0.05$ 。

4. 抗癌药物引起的其它核损伤改变

在Ara-C、COL处理组观察到,随着剂量增加,大部分淋巴细胞质呈粉红色染色,

而且核内出现深染的染色质凝块。部分细胞并可见核被推出胞质外的现象。

讨论

近年来抗癌药剂的遗传毒性研究深受人们的重视。许多研究结果证实,抗癌药物作用于靶细胞DNA合成或基因表达的同时,必然累及正常细胞造成一定的遗传损伤,而且大多数抗癌药物可诱发染色体畸变并具有细胞毒性等,有些还具有很大的致癌潜能^(1,9,11,13)。本实验将常用的抗癌药物为一类化学诱变因子,进一步验证核异常测试法在不同类型诱变因子中检测其效应的可行性。结果表明,七种实验药物均能诱发大部分核损伤指标(MNF、NAF、INF、KNF等)的改变。一些指标呈剂量依赖性增加,其中MNF和NAF变化最明显,KNF和INF也有不同程度的增加,和以往我们在X-线、乙双吗啉等⁽²⁻⁵⁾研究中的结果基本一致。

本实验中,选用了抗菌素类药物BL- A_5 及ADM。BL- A_5 是一种具有电离辐射效应的DNA断裂剂,它可使DNA链中碱基发生置换,产生单点或大片断多位点缺失,并诱发人精子染色体畸变^(8,11)。ADM是一个直接诱变剂,可嵌入DNA链中,引起DNA单链断裂,并能直接或作为一个自由基间接阻止DNA修复⁽¹²⁾。对此两种药物检测中,各指标均有明显改变,其中BL- A_5 四项核损伤指标都呈显著性改变($P<0.01$ 、 0.05)。可见该检测方法是具有较高的敏感性。 HN_2 是烷化剂类抗癌药,它对人生殖系统有很强基因毒作用,可杀死精子、致畸并抑制骨髓,影响免疫功能等。从检测结果可见, HN_2 诱发的KNF改变大于INF的变化,这种现象同时也在Ara-C、COL等其它药物作用看到(见表1),而我们在x-线、苯等理化因子所观察到的核损伤指标与此不同。这种指标上存在的差异,表明细胞对不同诱变因子的各种核损伤指标敏感性有所差异。由此可见,对于不同类型的诱变因子,应选择不同

的指标配合进行评价,才能比较客观的反映遗传损伤的程度。

5-Fu、Ara-C为抗嘧啶类代谢药。在体内5-Fu可转化成毒性很大的5-氟尿嘧啶核苷酸,可广泛掺入RNA,对正常和癌组织无选择性杀伤作用。Ara-C具有很强的细胞毒性,可致染色单体和染色体型结构异常⁽¹³⁾, Ara-C在体内需经激酶激活磷酸化后才能显示活性⁽⁹⁾而在本实验中,直接用体外周血淋巴细胞测试系统,没有经体内的代谢激活处理或加代谢激活剂,检测出该药诱发MNF、NAF和KNF的显著增加($P < 0.01$),进一步间接证实了人体外周血红细胞具有一定的氧化作用,可激活间接致癌剂⁽¹⁰⁾。实验药物中,COL和VCR是生物碱类抗癌药。在Swiss鼠实验中,COL可诱发骨髓多染红细胞微核⁽¹⁴⁾,经VCR处理的人纤维细胞作整倍体增加⁽¹⁵⁾。两者都是典型的有丝分裂毒性剂,在本实验中,细胞没有经过有丝分裂过程,而是用COL直接处理体外未经PHA刺激培养的淋巴细胞。出现了细胞浆染色与核相似,呈粉红色。部分细胞核被推出胞质外现象。这提示:COL可能改变了核膜的通透性,使核内染色质流入到胞质,而改变了胞浆的染色。

本实验结果并分析综合作者以往研究^(2-5,18),人外周血淋巴细胞核异常测试法具有快速、简便,较为敏感,而对一些间接诱变剂无需添加S₀等代谢激活剂等特点,各种核异常指标的改变,反映不同层次的遗传毒理学损伤。它对化学诱变因子的检测是可行的。但能否成为常规的短期测试法,仍需应用各种理化因子进一步扩大验证。

参考文献

1. Kantaryian HM, et al. Therapy-related leukemia and myelody-splastic syndroms. *SeyminOncol* 1987; 14(4): 435.
2. 薛开先,等。人体外周血淋巴细胞核损伤指标的

- 比较研究. *遗传学报* 1990; 17(1): 70.
3. 薛开先,等。乙双吗啉诱发人淋巴细胞染色体畸变与微核形成的研究. *中华血液学杂志* 1991; 12(6): 321.
4. 薛开先,等。培养人淋巴细胞分裂阻滞与常规微核测试法的比较研究. *遗传学报* 1991; 18(5): 401.
5. 薛开先,等。噻替派诱人淋巴细胞染色体畸变与微核测试法的比较研究. *遗传与疾病* 1991; 8(3): 108.
6. 薛开先,等。人体末梢血微核测试方法的改进. *辐射防护* 1988; 8(2): 227.
7. Xue KX (薛开先), et al. Comparative studies on several indices of nuclear damage in human peripheral lymphocytes. *Envir Molec Mutag* 1989; 14 (Supp 15): 224.
8. 黄天华,等。平阳霉素诱发人精子染色体畸变——评价化学物质致断性的一种离体测试系统. *遗传* 1991; 13(6): 24.
9. 陈新谦,等。新编药理学.第12版北京:人民卫生出版社,1991:608.
10. Maki-Paakkanen J. Chromosome aberrations, micronuclei and sister-chromatid exchanges in blood lymphocytes after occupational exposure to low levels of styrene. *Mutat Res* 1987; 189: 399-406.
11. Povirk LF, and Austin MJF. Genotoxicity of bleomycin. *Mutat Res* 1991; 257: 127-144.
12. Chabnes BA, and Myers CE. Clinical pharmacology of cancer chemotherapy; in De Vita, et al. (eds) *Cancer principles and practice of oncology*. Philadelphia. Lippincott. 1985: 287-328.
13. Beaula KD, and Subramanyam S. Genotoxic evaluation of Ara-C by multiple parameters. *Mutat Res* 1991; 263: 185-196.
14. Ghaskadbi S, and Vaidya VG. Studies on modulation of effects of Colchicine by L-cysteine using bone marrow of Swiss mice. *Mutat Res* 1991; 260: 181.
15. Tsutsui T, et al. Aneuploidy induction in human fibroblasts; comparison with results in Syrian hamster fibroblasts *Mutat Res* 1991; 240: 241.
16. 薛开先,等。健康人及超量电子束照射病员淋巴细胞核异常的检测. *遗传* 1991; 13(1): 29.