

石棉的细胞遗传学效应的探讨

杨文秀 张勇 金焕荣 赵肃 王凤芝 张迪

沈阳医学院预防医学系

摘要 本文报告了石棉引起矿工末梢血和小鼠骨髓细胞的细胞遗传学效应,实验结果表明,石棉浸出液可以引起小鼠骨髓细胞的染色体畸变,姐妹染色单体交换频率和微核率明显升高,同时亦能引起石棉工人末梢血淋巴细胞的微核率升高,并与工龄相关。说明石棉可以引起染色体畸变和DNA损伤。

关键词 石棉;硅酸盐;染色体畸变;微核;姐妹染色单体交换

石棉可诱发肺癌和间皮瘤,但致癌作用机理尚不清楚,1989年 Jackson 发现石棉与吸烟有协同作用,可引起DNA断裂和羟基(OH)增多^[1]。关于石棉对基因突变作用,报导甚少,且有出入。1980年 Light 等人提出石棉对细菌无致突变作用^[2]。1984年 Cleveland 发现石棉对大肠杆菌(CSH₆₀)有致突变作用^[3]。为探讨石棉对哺乳幼物体内染色体及DNA的损伤作用,本文应用小鼠骨髓细胞染色体畸变、微核、SCE和矿工末梢血淋巴细胞微核试验进行研究。

材料和方法

实验样品:石棉由朝阳新生石棉矿提供三级纯的温石棉,主要化学成份为SiO₂占36.44%、MgO34.7%、CaO8.81%、Fe₂O₃0.46%等。应用二甲基亚砷(DMSO)、正己烷(hexane)、二氯甲烷(methylenechloride)、甲苯(toluene)和乙腈(acetonitril)五种溶剂浸泡石棉,即石棉20g,加入EDMSO或正己烷200ml,放振荡器振荡2小时,37℃恒温箱24小时,离心取上清液、微温蒸发浓缩至5ml,浓度相当2g/ml。又因二氯甲烷、甲苯和乙腈毒性较强,微量可使小鼠死亡,故按上法浸出后,将三种上清液汇集在一起蒸干后,再加入5ml玉米油制成混悬液备用。

实验动物:昆明种小鼠和纯株系BALB/c

小鼠均由中国医大实验动物部提供。

矿工为朝阳新生石棉矿大集体和国家的工人,男女皆有、工龄1年以上。作业车间空气中石棉浓度(计重法和计数/法)均超过国家标准。(计数法按 OSHA 美国职业安全及健康协会5f/cc的标准)。

实验方法: SCE试验方法,参照king和复旦大学生物系的改良方法^[4,5]。采用SCE敏感的纯株系BALB/C雄性小鼠,体重19~25g,分为5组,每组2只,石棉的DMSO浸出液剂量为2,4,20g/kg,阳性对照为环磷酰胺(CP)10mg/kg,腹腔注射,每鼠皮下埋植15mgBUdR(5-Bromodeoxyuridine)琼脂胶囊、术后立即注射10%酵母溶液、每10g鼠重0.1ml,4小时,腹腔注射石棉浸出液,处死前2小时注射秋水仙素埋植24小时后,脱颈椎处死小鼠,取骨髓制片。每只动物计数25个第二周期分散良好的中期细胞,记录SCE数目,以每个细胞的SCE数表示。

染色体畸变,按照OECD规定的常规方法,采用昆明种,体重18~25g小鼠30只,雌雄各半,分为5组,石棉的DMSO浸液剂量为2、4、10g/kg,cp为50mg/kg,两次灌胃染毒,间隔24小时,第二次灌胃后6小时,脱颈椎处死小鼠,取骨髓制片。观察50个中期细胞数,记录畸变类型及畸变数,以细胞畸变率表示。

微核试验,按照 Schmid 方法^[6],采用昆明种雄性小鼠,体重 17~23g,随机分为 13组,每组 5 只,实验组为石棉的DMSO、正己烷浸液及玉米油混悬液,每组浸出液均采用 2, 4, 20g/kg 三个剂量,cp 为 100mg/kg,阴性对照为 DMSO、正己烷和玉米油。染毒方式同染色体畸变,每只动物观察 1000 个嗜多染红细胞、计数微核细胞数目、以千分率表示。

矿工末梢血淋巴细胞微核试验,取耳血

50~100 μ l,注入微量试管,加入 1/3~1/2 0.3% 甲基纤维素溶液,搅拌、放温箱沉淀 45 分,吸取白血球层,离心,沉淀物制片、计数 1000 个大淋巴细胞,其它同上。阴性对照组采用上海报导的正常人淋巴细胞微核率 (0.3%) 作为总体率^[7]。

结果

实验结果见表 1-表 5。

表 1 各组染色体畸变类型及频率

组别	剂量 (g/kg)	中期细胞 (I)	畸变类型								畸变频率		
			b	f	d	r	p	m	gr	dic	畸变次率 (I I)	I I / I (%)	范围
DMSO	0	300	2	1	0	0	0	0	0	0	3	1.0	0-2
CP	0.05	150	67	105	21	12	2	2	3	1	213	142.0*	21-63
石棉DMSO浸出液	2	300	5	7	0	1	0	0	0	0	13	4.3*	0-3
	4	300	3	14	0	0	0	0	0	0	17	5.7*	0-8
	10	300	8	8	6	0	0	0	0	0	22	7.3*	2-6

注 b: 断裂 f: 断片 d: 缺失 r: 环 p: 粉碎 m: 微小体 gr: 四射体 dic: 双着丝点 * P < 0.01

表 2 各组 SCE 互换频率

组别	剂量 (g/kg)	动物	中期细胞 (I)	SCE 频率	
				SCE 数 (I)	Y* \pm SD
DMSO	-	2	50	61	1.2 \pm 1.0
CP	0.01	2	50	805	16.1 \pm 6.9*
石棉DMSO	2	2	50	127	2.5 \pm 1.3*
浸出液	4	2	50	130	2.6 \pm 1.5*
	20	2	50	207	4.1 \pm 2.0*

* Y I / I * P < 0.01

表 3 各组小鼠骨髓细胞的微核率

组别	剂量 (g/kg)	PCE (I)	30h		48h	
			微核细胞数 (I)	I / I (%)	微核细胞数 (I)	I / I (%)
CP	0.1	5000	408	81.6*	237	47.4*
DMSO	0	5000	15	3.0	5	1.0
石棉DMSO	2	5000	18	3.6	21	4.2*
浸出液	4	5000	18	3.6	22	4.4*
	20	5000	21	4.2	27	5.4*
正己烷	0	5000	10	2.0	7	1.4
石棉正己烷	2	5000	13	2.6	15	3.0*
浸出液	4	5000	16	3.2	19	3.8*
	20	5000	11	2.2	29	5.8*
玉米油	0	5000	3	0.6	6	1.2
石棉玉米油	2	5000	4	0.8	16	3.2*
浸出液	4	5000	5	1.0	13	3.6*
	20	5000	12	2.4	22	4.4*

注 * P < 0.05

表4 不同车间矿工末梢血微核率

车间	工人数	计重法(几何均数)	计数法	微核(%)
		mg/M3	f/cc	
干燥炉	5	204.9	227.6	4.8±2.4
包装	33	85.4	148.1	3.6±1.9
轮碾	12	103.1	131.2	3.8±1.7
筛棉子	21	194.0	96.9	3.1±1.9

表5 不同工龄矿工末梢血微核率

工龄(年)	筛棉子车间			包装车间		
	工人	微核细胞数	微核率(%)	工人数	微核细胞数	微核率(%)
1—3	5	6	1.2	13	60	3.3
4—6	4	15	3.8	12	46	3.8
7以上	12	48	4.0	8	31	3.9

讨论

本文在染色体试验中,石棉的DMSO浸液在2, 4, 10g/kg 剂量时,畸变率明显增高,与对照组比较有显著性差异,并呈现剂量反应关系,畸变类型为断裂、断片、与Brown 报告的石棉可引起离体细胞的染色体畸变的结果是一致的^[3]。说明石棉纤维的细胞毒性作用可以引起染色体损伤。

在微核试验中,石棉的DMSO、正己烷浸液和石棉的玉米油混悬液在30小时,除后者 20g/kg 剂量外,其余各组微核率均无增高,在48小时各组微核率明显增高,与对照组比较有显著性差异,并有剂量反应关系。说明石棉的诱变作用高峰在48小时。各车间矿厂末梢血淋巴细胞微核率亦明显增高,并与工龄相关。证明石棉对染色体有损伤作用。关于石棉对矿工末梢血淋巴细胞微核率的影响,国外尚无报道,本文的报道补充了这方面的资料。

关于石棉对 SCE 的影响问题。Price-Jones 等报告石棉对离体动物细胞的 SCE 无明显影响^[9]。本文报道的体内试验结果说明

石棉能诱发动物细胞的SCE频率升高。肯定石棉对SCE的作用,有助于探讨石棉的遗传毒性作用机理。

参 考 文 献

1. Jackson JH, et al. Role of oxidants in DNA damage. Hydroxyl radical mediates the synergistic DNA damaging effects of asbestos and cigarette smoke. *J Clin Invest* Oct 1987; 80(4): 1090-5, Issn 0021-9738.
2. Light WG, et al. Surface charge and a molecular basis for asbestos toxicity. In: Brown RC, et al. eds. *The in vitro effects of mineral dusts*. London: Academic Press Inc 1980, 139-45.
3. Cleveland MC. Mutagenesis of *Escherichia coli* (CSH₅₀) by asbestos. *Proc Soc Exp Biol Med (USA)* 1984; 177/2343-346.
4. King MT, et al. 5-Bromodeoxyuridine table with improved depot effect for analysis in vivo of sister-chromatid exchanges in bone marrow and spermatogonial cells. *Mut Res* 1982; 97: 117.
5. 复旦大学生物系. 遗传学实验(18)姐妹染色单体色

(下转第28页)

表1 摄入呋喃丹的SD大鼠肿瘤发生情况

组别	动物数	肿 瘤 发 生 率					
		纤维肉瘤		乳腺腺瘤		其他肿瘤	
		例数	%	例数	%	例数	%
11.5ppm 呋喃丹	♂ 40	2	5.0			1	2.5
	♀ 40	2	5.0	2	5.0		
	合计 80	4	5.0	2	2.5	1	1.2
2.3ppm 呋喃丹	♂ 40	1	2.5			1	2.5
	♀ 40			3	7.5	2	5.0
	合计 80	1	1.2	3	3.7	3	3.7
对 照	♂ 40	2	5.0			1	2.5
	♀ 40	1	2.5	1	2.5		
	合计 80	3	3.7	1	1.2	1	1.2

三组之间任何肿瘤发生率均无统计学显著差异
(χ^2 法, $P > 0.10$)

其次是乳腺腺瘤(图2), 在三个组中共有6例。肿瘤成结节状, 最大的如鸡蛋大。镜下表现为分化较好的腺泡性乳腺腺瘤。

另外各组还有零星发生的肿瘤。其中包括2例胰岛细胞瘤(图3)小剂量组一例, 对照组一例。瘤细胞分化较好, 外有一层结缔组织包膜。小剂量组还有一例肺腺瘤(瘤细胞分化较好, 排列成乳头状, 并有结缔组织膜包裹, 图4和一例下颌骨软骨瘤(图5)。大剂量组有一例甲状腺腺瘤(图6), 瘤细胞分化良好, 是腺泡型的腺瘤。

讨论

本实验持续给予两性SD大鼠定量的呋

喃丹共一年半之久, 全部实验持续23个月, 动物的解剖和组织学检查也颇仔细。但检查结果证明大部份动物均受了猫猴虫幼虫的感染, 甚至在实验组和对照组中都有肝脏的纤维肉瘤发生和肝脏的病变。说明细胞所动物房的实验条件不够严格。这种动物用来做慢性实验是不合适的。

在此条件下, 未见任何实验组动物的肿瘤总发生率或个别肿瘤发生率明显超出对照组, 经统计学处理未见有显著差异。且各组动物肿瘤发生率均比较低。因此本实验未证实长期口服呋喃丹对雌及雄性SD大鼠有致癌作用。本实验结果和口服农药呋喃丹对ICR小鼠致癌性研究的结果一致^[5]。

上海市的自来水水质较差, 本实验对照组饮用的自来水未经任何处理, 根据市自来水公司内部资料得知上海地区自来水有较强的致突变性, 但未发现有致癌性。本实验也未发现饮用自来水的对照动物较高的肿瘤发生率。

参考文献

1. Dorouh HW, J Agr Food Chem 1968, 16 : 319.
2. Marshal TC, et al, J Agr Food Chem 1977, 25(5) : 1003.
3. Knaak JB, et al, J Agr Food Chem 1970, 18 (5) : 832.
4. Ivie GW, J Agr Food Chem 1968, 16 : 849.
5. 王达. 环境科学学报(待发表).

(上接第26)

差方法. 遗传. 1982; 4(3) : 37-53

6. Schmid W, et al. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A eds. Chemical Mutagens. New York, plenum Press 1976; 4(36) : 31-52.
7. 杨家宽, 等. 人外周血淋巴细胞微核正常值及其形态学观察. 核防护. 1980; 3 : 64-66.

8. Brown RC, et al. In vitro biological effect of glass fibre. J Environ Pathol Toxicol 1979, 2 : 1369-83.
9. Price-Jones MJ, et al. The genetic effects of crocidolite asbestos; comparison of chromosome abnormalities and chromatid exchanges. Mut Res 1980; 79 : 331-6.

aluminium salts in water coagulation, defluorination of drinking water, some aluminium containing drugs and additives must be with caution.

STUDIES ON CYTOGENETIC EFFECTS OF ASBESTOS

Yang Wenxiu et al

Dept. of Hygiene, Shenyang Medical College, Shenyang

This paper reports the results of studies on cytogenetic effects of asbestos on worker capillary lymphocyte and mouse bone marrow cells. The chromosome aberration, SCEs and micronucleus changes caused by asbestos were studied. Results showed that infusion of asbestos can cause chromosome aberration and elevate SCEs and micronucleus frequencies in mouse. The rise in micronucleated cells can be observed in worker at the same time. Micronucleus changes correlated with length of service of worker significantly.

(上接第57页)

- fication. *Science* 1987 ; 237 : 175.
29. Jeffreys AJ, Wilson V, Neumann R, et al. Amplification of human minisatellites by the polymerase chain reaction : towards DNA fingerprinting of single cells. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 10953.
 30. Saiki RK, Bugawan TL, Horn GT, et al. Analysis of enzymatically amplified β -globin and HLA-DQ α DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature* 1986 ; 324 : 163.
 31. Scharf SJ, Horn GT, Erlich HA. Direct cloning and sequence analysis of enzymatically amplified genomic sequences. *Science* 1986 ; 233 : 1076.
 32. Berchtold MW. A simple method for direct cloning and sequencing cDNA by the use of a single specific oligonucleotide and oligo(dT) in a polymerase chain reaction (PCR). *Nucleic Acids Res* 1989 ; 17 : 453.
 33. Winship P R. An improved method for directly sequencing PCR amplified material using dimethyl sulphoxide. *Nucleic Acids Res* 1989 ; 17 : 1266.
 34. Erohman MA, Dush MK, Martin GR. Rapid production of full-length cDNAs from rare transcripts : amplification using a single gene-specific oligonucleotide primer. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 8998.
 35. Higuchi R, et al. A general method of in vitro preparation and specific mutagenesis of DNA fragments : study of protein and DNA interaction. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 7351.
 36. Gyllensten UB, Erlich HA. Generation of single-stranded DNA by the polymerase chain reaction and its application to direct sequencing of the HLA-DQA locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 ; 85 : 7652.
 37. Lo Y-M, Patel P, Wainscoat JS, et al. Prenatal sex determination by DNA amplification from maternal peripheral blood. *Lancet* 1989 ; Dec 9 : 1353.
 38. Triglia T, Peterson MG, Kemp DJ. A procedure for in vitro amplification of DNA segments that lie outside the boundaries of known sequences. *Nucleic Acids Res* 1988 ; 16 : 8186.
 39. Lynch JR, Brown JM. The polymerase chain reaction : current and future clinical applications. *J Med Genet* 1990 ; 27 : 2.
 40. Kwok S, Higuchi R. Avoiding false positives with PCR. *Nature* 1989 ; 339 : 237.