

## 赤麂 (*Muntiacus muntjak*) 离体细胞 测定化合物诱变活力的研究

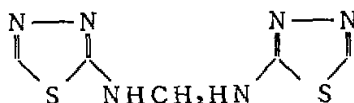
施立明 贺维顺 陈玉泽

(中国科学院昆明动物研究所)

研究环境化学物质(农药、药物、食品添加剂、工业毒物、化妆品、大气和水的污染物等等)对人类遗传的潜在危害以及这种危害的定量估价和对策即遗传毒理学工作,是当前环境科学的一项重要内容。其中,建立灵敏可靠的环境致癌—诱变剂检测系统又有特别重要的意义(施立明等,1979)。姐妹染色单体交换率(SCEs)测定,由于操作简单,观察客观又具有高度的灵敏性,是近年来颇受重视的一项新的检测指标(施立明,1979)。赤麂 (*Muntiacus muntjak*) 是迄今已知染色体数目最少的脊椎动物( $2n = \delta 7, \text{♀} = 6$ )其核型特点适合于遗传毒理学测定的需要。本工作以离体培养的赤麂二倍体细胞株为材料,结合姐妹染色单体交换这一新指标,旨在探讨这一新的检测系统对于研究化合物诱变活力的价值。

### 材料和方法

细胞株:我们实验室建立的雄性赤麂二倍体细胞株(KIZ-7901,  $2n = 7$ )。待测化合物:高效农用杀菌剂—敌枯双。化学名称为NN—甲撑—双(2—氨基—1、3、4—噻二唑),分子量=214,化学结构式:



按0.5%(W/V)浓度,在90°C水浴中加热2小时,使敌枯双溶解于蒸馏水中。

实验程序:

本文于1980年1月4日收到。

细胞培养采用60毫升容积的小方瓶,内盛含有10%小牛血清的“199”培养液12毫升。细胞接种后,按8微克/毫升剂量加5-溴去氧尿嘧啶核苷(BUdR),37°C避光培养48小时,当细胞开始进入生长对数期,加敌枯双,使最终浓度为0.05mM、0.1mM。继续培养2小时或4小时后,倾去含敌枯双的培养液。以预热至37°C的Hank's液洗涤(37°C培养5分钟),再弃去,重复两次。再换以含BUdR的新鲜培养液,继续避光培养24小时,使细胞从敌枯双处理所致的抑制中恢复生长,分裂。

秋水仙素低渗处理:细胞收获前4小时加秋水仙素,使最终浓度为0.4—0.6微克/毫升。培养终止后,以6毫升0.25%胰蛋白酶消化细胞,1000转/分离心10分钟。沉淀的细胞团以预热至37°C的0.4%KCl溶液低渗处理15分钟。然后离心收集细胞,以甲醇,冰醋酸(3:1)液固定15分钟。再离心收集细胞,更换一次固定液后,按常规空气干燥法制作染色体标本。

姐妹染色单体分化染色,制备好的染色体标本在37°C温度烤24小时,以我们实验室制定的紫外线加Giemsa染色(UPG)方法染色,在玻片(染色体标本)上滴加几滴 $2 \times \text{SSC}$ (等量的0.3M氯化钠和0.03M柠檬酸钠溶液相混合)液,盖一小张擦镜纸,将玻片放在一个培养皿中的玻棒上,培养皿底部铺有湿滤纸,内加 $2 \times \text{SSC}$ 溶液,溶液的高度不超过玻片,然后,又将培养皿放在45—48°C电热板上,在30瓦紫外灯下垂直照射30分钟,照射距离为3—6厘米。照射完毕以蒸馏水冲去擦镜纸,3%Giemsa(pH6.98磷酸盐缓冲液稀释)染色7—10分钟。干燥,镜检。

姐妹染色单体交换率的测定:选取细胞轮廓完整,染色体数目为 $2n=7$ ,姐妹染色单体分化清晰的细胞进行计数。每份标本至少观察40个中期分裂相。在染色单体末端出现的交换,计为一次SCE,在染色单体中间出现的交换,计为两次SCE,接近着丝点区域的交换计为一次SCE,但需要判定不是两条染色单体在着丝点部位发生的扭转(李昌本等,1979)。在计数时,雄性赤鹿№1染色体两条,№2染色体两条,X染色体一条, $Y_1$ 染色体一条, $Y_2$ 染色体一条,共七条, $Y_2$ 是一个亚中着丝点的微小染色体,其SCE忽略不计。

## 实验结果

敌枯双对赤鹿细胞的生长增殖有明显的抑制作用。这种抑制效应随剂量的增高和处理时间的延长而增强。经0.1mM敌枯双处理4小时,赤鹿细胞的生长受到严重的阻碍。分裂完全停止。在我们的实验条件下,不同剂量的敌枯双均能使赤鹿细胞的 $\text{SCE}_S$ 明显增高(表1,图板1)。和对照相比,这种差别在统计上有显著的意义。处理时间相同(2小时),高剂量的敌枯双诱发的 $\text{SCE}_S$ 高于低剂量组,在同一剂量(0.05mM)组内,处理4小时的 $\text{SCE}_S$ 值要比处理2小时的高。

从表2的资料还可以看出,看来,敌枯双对染色体的损伤是随机的,在同一细胞内不同的染色体之间,敌枯双诱发的 $\text{SCE}_S$ 比例无明显改变,换句话说,我们并没有观察到染色体受到敌枯双选择性地“攻击”的现象。很显然, $\text{SCE}_S$ 的分布和染色体的长度有关,如№1染色体最长, $\text{SCE}_S$ 也最多, $Y_2$ 是一个亚中着丝点的微小染色体,其 $\text{SCE}_S$

可以忽略。

表1 敌枯双诱发的赤麂细胞染色单体交换

浓度 (mM)	处理时间 (小时)	观察细胞数 (个)	每个细胞的SCE <sub>S</sub> 数	
			范围	$\bar{x} \pm S.E.$
对照	/	80	2—20	9.7 ± 0.9
0.05	2	40	8—31	15.9 ± 0.3**
	4	50	9—38	19.4 ± 0.9**
0.1	2	40	6—43	18.8 ± 1.0**
	4*	/	/	/

\* 细胞增殖严重抑制, 没有观察到分裂细胞

\*\*  $P < 0.01$

表2 SCE<sub>S</sub>在不同染色体间分布的差异

浓度 (mM)	处理时间 (小时)	观察细胞数 (个)	SCE的分布 (占每个细胞SCE的%)			
			N <sub>1</sub>	N <sub>2</sub>	X	Y <sub>1</sub>
对照	/	80	47.2	27.2	14.8	10.7
0.05	2	40	43.2	29.6	16.4	10.8
	4	50	48.8	27.0	13.3	10.9
0.1	2	40	49.3	25.1	16.2	9.4

表3 敌枯双诱发赤麂染色体结构畸变

浓度 (mM)	处理时间 (小时)	观察细胞数 (个)	畸变细胞 (%)	染色体型畸变			染色单体型畸变			总断裂数 (%)
				断裂	环	断裂数(%)	断裂	单体互换	断裂数(%)	
对照	/	200	2.5	4		2	2	1	2	4
0.05	2	100	5	3	1	5	2	1	4	9
0.05	4	100	14	2		2	10	5	20	22
0.1	4	115	11	5		4.3	10		8.7	13

## 讨 论

我们以往的初步结果表明, 敌枯双能诱发小鼠骨髓细胞染色体畸变。此外, 敌枯双还是一种明显的致畸胎剂(王云元等, 1978)。在我们这种以赤麂离体细胞姐妹染色单体交换率测定系统中, 敌枯双也呈阳性结果。并且在效应和剂量, 处理时间之间有着正相关。

在遗传毒理学测定工作中, 一般认为, 采用离体哺乳动物细胞比之整体动物有较多的优点(施立明, 1979; Hsu, 1979), (1) 可避免实验动物的饲养管理, 疾病防治等

麻烦,也节省待测化合物的使用量,因此比较经济。(2)细胞培养和处理的条件易于控制,结果相对地比较稳定,重复性比较好。(3)可以用同一材料进行染色体畸变和基因突变的比较研究。赤麂细胞的染色体数目少,又特别大,而且又有明显的个体性,不需分带等特殊染色即可清晰无误地一一加以区别。所以一些微细的染色体畸变,特别是稳定型畸变也可以精确鉴别。在本检测系统中,除了可以观察诱发的SCE<sub>B</sub>外,还可以同时观察染色体结构畸变和数量的改变。因此,在化合物诱变活力测定工作中,本检测系统有许多方法学上的优点,值得今后进一步试用。当然,离体哺乳动物细胞缺乏体内代谢激活或解毒机制。对于一些需要代谢活化的化合物测定的结果可能不一定符合活体内的真实情况,这就需要进一步研究,如何和一些活化体系如鼠肝微粒体酶相配合。另外,关于SCE<sub>B</sub>的生物学意义也还有深入研究的必要。

#### 参 考 文 献

- 施立明等, 1979 国外医学(内科学分册) 10, 461—466。  
 施立明, 1979, 遗传学报 3, 255—261。  
 王方元等, 1978 四川大学学报(自然科学)第2—3期合刊105—116  
 李昌本等, 1979 实验生物学报第12卷第二期131—139,  
 Hsu. T. C.: 1979 Mutation Res. 45, 233—247.

## Studies of Mutagenicity of Chemicals on Red Muntjac cells

Shi Li-ming He Wei-shun Chen Yu-ze

(Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica)

#### Abstract

A diploid cell strain (KIZ—7901) of red muntjac (*Muntiacus muntjak*) has been established in our laboratory. The diploid chromosome number of red muntjac ( $\hat{\delta} = 7, \hat{\text{♀}} = 6$ ) is the lowest among all vertebrates, so it is a good assay system for the testing of chemical mutagens.

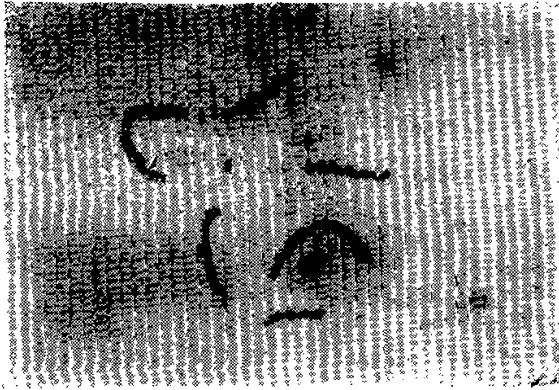
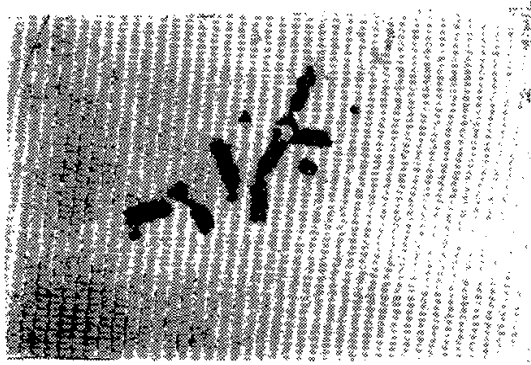
We use N, N—methylene—bis(2—amino—1, 3, 4—thiadiazole) as the chemical mutagen. The experimental results show that the greater the dosage of this chemical uses and the longer the duration of the treatment lasts, the greater the rates of the sister chromatid exchanges (SCE<sub>B</sub>) are, especially the frequencies of chromosome aberrations.

图版1 敌枯双诱发的赤鹿离体细胞的姐妹染色单体交换



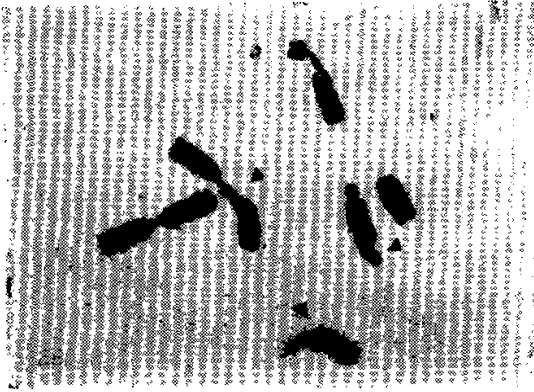
1.正常赤鹿细胞的SCE

2.敌枯双诱发的单体互换和SCE<sub>g</sub>的增高



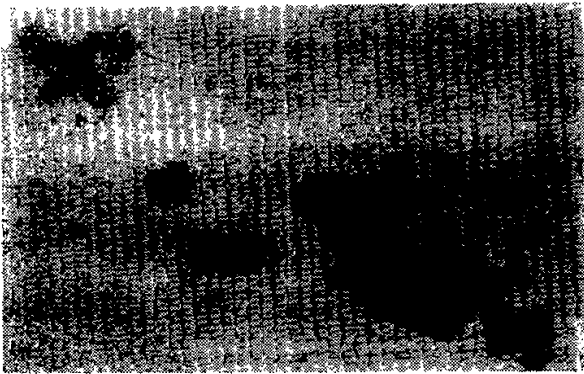
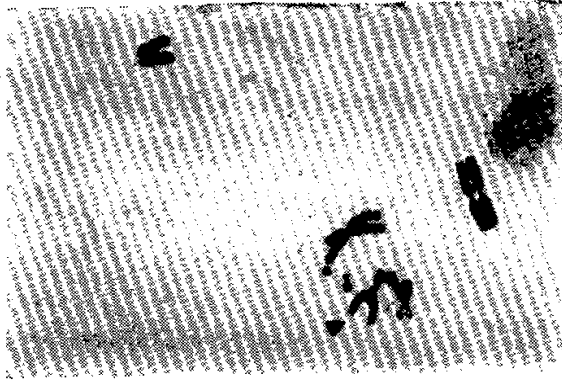
3.敌枯双诱发的SCE<sub>g</sub>

图版2 敌枯双诱发的赤鹿细胞的染色体畸变



1. 敌枯双诱发的单体断裂和断片

2. 敌枯双诱发的内复制, 单体互换和单体断片



3. 敌枯双诱发的环和单体互换