

研究工作

化学诱变物诱发小鼠脾脏细胞和大麦根端分生组织细胞姐妹染色单体交换的比较研究

曹雪松 张自立

(南开大学生物学系)

姐妹染色单体交换(SCE)作为一种灵敏的方法被广泛用于检测诱变物及DNA的损伤。现已利用多种动物和植物材料研究了SCE,已有一些研究者比较研究了动物与植物两类诱变检测系统的异同。Kihlman和Andersson提醒人们注意植物根尖细胞的代谢与哺乳动物不同,用植物作材料检测环境诱变物可能对人类是一种“遗传冒险”(Genetic risk)^[1]。但近年的研究表明植物细胞抽提物同样能把对动物具有潜在诱变能力的诱变剂前体激活成为诱变剂^[2-5]。

迄今为止,有限的植物与动物SCE比较研究大多是在离体系统中进行的,为了进一步探讨诱变物在动物和植物体内诱发SCE的异同,我们研究了几种常用化学试剂在小鼠和大麦细胞中诱发SCE的活力。

材 料 和 方 法

一、小鼠体内脾脏细胞 SCE

小鼠选用昆明种,6—9周龄,体重20—25克左右。

将吸附有BrdU的活性炭悬浮液(每毫升生理盐水含10毫克BrdU和100毫克活性炭)0.75毫升经腹腔注射入小鼠体内,1小时后腹腔注射诱变剂,9小时后第二次注射BrdU 0.75毫升,杀鼠前2小时腹腔注射秋水仙素(4 mg/kg体重),小鼠处死后取脾脏,用匀浆器将脾脏捣碎后,除去组织碎片,在离心管中离心7分钟(2000转/分),去上清液,沉淀细胞在37℃下低渗液中(0.075 mol/L KCl)处理20分钟,细胞在固定液中(甲醇:冰乙酸=3:1)固定两次,每次15分钟,滴片,空气干燥24小时,载片在 $2\times$ SSC溶液中70℃水浴上紫外线照射30分钟,5%Giemsa染色10分钟。

二、大麦根尖细胞 SCE

所用大麦品种为孟克尔号,自来水浸种5—6小时,在放有浸湿滤纸的培养皿中培养,温度为 $25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ 。选择生长旺盛的种子,当根长为0.5—1 cm时,在BrdU($5\times 10^{-4}\text{M}$)溶液中黑暗培养12小时,吸去BrdU溶液并冲洗,在放有诱变剂的水溶液中黑暗条件下培养12小时($25^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$),除去诱变剂溶液,将种子浸入冰水中(4℃)处理48小时,将根端分生组织切下,固定液固定3小时,蒸馏水浸泡1小时,2.5%纤维素酶和2.5%果胶酶 25°C 下酶解5小时,将根尖捣碎后,加1 ml固定液,滴片。分染处理及染色同小鼠脾脏细胞。

结 果

一、小鼠脾脏细胞和大麦细胞 SCE 的比较及其相关性

我们共测试了8种化合物对小鼠脾脏及大麦SCE的影响,其中有4种重金属(三氧化铬、硫酸铜、升汞、乙酸铅)、两种有机试剂(苯、苯酚)、一种农药(久效磷)、一种强诱变剂(丝裂霉素C)(表1)。结果表明,上述4类化合物都能诱发小鼠脾脏细胞及大麦细胞SCE的增加,其中升汞、三氧化铬、乙酸铅、苯酚、苯、丝裂霉素C(MMC)6种诱变剂12个浓度能诱发小鼠脾脏细胞SCE明显高于对照组($P<0.01$),三氧化铬(0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$)和久效磷(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)两种诱变剂各一个浓度的处理与对照相比SCE增加较为显著($P<0.05$)。重金属中升汞的诱导活性较高,而硫酸铜在0.1—1 $\mu\text{g}/\text{ml}$

本课题由国家自然科学基金资助。

表 1 诱变剂对小鼠脾脏和大麦细胞 SCE 的影响

化合物	剂量 (ug/ml)	小鼠脾脏细胞 SCEs±S.D./cell	大麦细胞 SCEs±S.D./cell
对照		5.73±2.35	10.04±3.37
乙酸铅	1	5.73±1.72	10.97±2.90
	5	5.87±1.43	15.04±3.20**
	10	8.88±2.45**	18.12±5.19**
硫酸铜	0.1	5.58±1.87	10.43±2.79
	0.5	5.53±1.62	12.75±2.13**
	1	5.90±2.73	13.72±2.72**
升汞	0.1	7.96±2.02**	19.52±3.34**
	0.5	8.03±2.11**	21.31±5.23**
	1	9.92±2.22**	24.83±6.33**
三氧化铬	0.1	6.09±1.68	21.54±6.72**
	0.5	7.32±2.06*	21.39±5.91**
	1	8.41±3.09**	21.41±4.58**
苯酚	5	6.02±1.69	14.62±3.22**
	10	8.20±1.94**	17.32±5.18**
	50	8.93±2.06**	18.23±6.17**
苯	100	5.63±1.87	18.04±4.21**
	500	8.01±2.56**	18.12±4.05**
	1000	8.28±2.96**	18.07±4.10**
久效磷	0.1	5.84±1.49	18.73±7.27**
	1	5.87±1.36	18.77±5.37**
	10	7.41±2.29*	20.05±3.95**
丝裂霉素 C	1	10.33±2.06**	35.79±4.93**
	5	13.78±2.10**	43.74±5.52**
	25	16.01±2.43**	抑制分裂

* 表示处理与对照相比差异较显著 $P < 0.05$ 。

** 表示处理与对照相比差异极显著 $P < 0.01$ 。

的范围内不具有诱导活性, 乙酸铅在 1—5 ug/ml 的范围内也不具有诱导活性。有机试剂中苯酚比苯具有较强的诱导活性, 农药久效磷对小鼠脾脏的 SCE 影响在 0.1—10 ug/ml 的范围内不是太显著。

相同浓度的诱变剂对大麦细胞的 SCE/细胞的影响大多比较剧烈, 除了乙酸铅 (1 ug/ml) 和硫酸铜 (0.1 ug/ml) 两种诱变剂在较低浓度

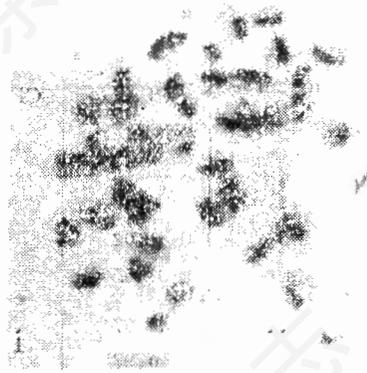


图 1. 小鼠脾脏细胞 SCE

下不具有诱导活性外, 所有诱变剂均能极显著地诱发大麦细胞 SCE 的增加。同种诱变剂诱发大麦细胞 SCE 的增加幅度较小鼠脾脏细胞大, 并且在大麦细胞中诱发 SCE 明显增加所需的化合物浓度较低。对于强诱变剂 MMC, 当浓度为 25 ug/ml 时, 较强烈地抑制大麦根端分生组织细胞的分裂。虽然诱变剂在大麦细胞中诱发 SCE 所需浓度较低, 但在大麦细胞和小鼠脾脏中诱发 SCE 的相关系数是 $\gamma = 0.86$ ($P < 0.01$), 即两者之间的相关性极为显著 (表 3), 也就是说对于所检测的化合物在小鼠脾脏细胞和大麦细胞中诱发 SCE 的效应是相同的。

二、小鼠脾脏细胞和大麦细胞的 SCE/pgDNA、SCE 比率和 SCE/pgDNA 增加及其相关性

我们把诱变剂诱导后的 SCE 频率的平均值除以对照组 SCE 平均值所得的值称为 SCE 比率, 把 SCE 值除以细胞 DNA 含量所得值称为每皮克 DNA 的 SCE, 记为 SCE/pgDNA, 把经诱变剂诱导后的 SCE 平均值减去对照组 SCE 平均值再除以细胞 DNA 含量称为每微微克 DNA 的 SCE 增加, 记为 SCE/pgDNA 增加。在小鼠脾脏细胞和大麦细胞的上述三项数值如表 2 所示。其中 SCE/pgDNA 反映单位 DNA 中产生 SCE 的频率, SCE 比率与 SCE/pgDNA 增加反映了诱变剂诱导 SCE 的能力。

各种诱变剂诱发大麦细胞 SCE 比率均比

表 2 小鼠脾脏细胞和大麦细胞的 SCE 比率 SCE/pgDNA 和 SCE/pgDNA 增加

化合物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	小鼠脾脏细胞			大麦细胞		
		SCE 比率	SCE/pgDNA	SCE/pgDNA 增加	SCE 比率	SCE/pgDNA	SCE/pgDNA 增加
对照			0.88			0.50	
乙酸铅	1	1.00	0.88	0.00	1.10	0.55	0.05
	5	1.02	0.90	0.02	1.50	0.75	0.25
	10	1.55	1.37	0.48	1.80	0.91	0.41
硫酸铜	0.1	0.97	0.86	-0.02	1.04	0.52	0.02
	0.5	0.97	0.85	-0.03	1.27	0.64	0.13
	1	1.03	0.91	0.03	1.37	0.59	0.18
升汞	0.1	1.37	1.22	0.34	1.94	0.98	0.47
	0.5	1.40	1.24	0.35	2.13	1.07	0.57
	1	1.73	1.53	0.64	2.47	1.24	0.74
三氧化铬	0.1	1.06	0.94	0.06	2.15	1.08	0.58
	0.5	1.28	1.13	0.24	2.14	1.07	0.57
	1	1.47	1.29	0.41	2.13	1.07	0.57
苯酚	5	1.05	0.93	0.04	1.46	0.73	0.23
	10	1.43	1.26	0.38	1.73	0.87	0.36
	50	1.56	1.37	0.49	1.82	0.91	0.41
苯	100	0.98	0.87	-0.02	1.80	0.90	0.40
	500	1.40	1.23	0.35	1.81	0.91	0.41
	1000	1.45	1.27	0.39	1.80	0.90	0.40
久效磷	0.1	1.02	0.90	0.02	1.87	0.94	0.43
	1	1.02	0.90	0.02	1.87	0.94	0.44
	10	1.29	1.14	0.26	2.00	1.00	0.50
丝裂霉素 C	1	1.80	1.59	0.71	3.58	1.79	1.29
	5	2.40	2.12	1.24	4.36	2.19	1.69
	25	2.79	2.46	1.58	抑制分裂		



图 2. 大麦根端细胞 SCE

小鼠脾脏细胞 SCE 比率高。两者的 SCE/pgDNA 相比较,基本上是小鼠脾脏细胞的值大于大麦细胞的值。除了乙酸铅(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、苯酚(10 $\mu\text{g}/\text{ml}$)、(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$)外,其他诱变剂诱发大麦的 SCE/pgDNA 增加均大于小鼠的值。小鼠和大麦之间的 SCE 比率、SCE/pgDNA 增加和 SCE/pgDNA 三项数值经统计处理后的相关性及其显著性检验如表 3 所示,结果表明它们之间的相关性极为显著。

讨 论

我们测试了8种化合物诱发小鼠脾脏及大麦细胞 SCE 的能力并进行了比较,总的来看,这些化合物在小鼠脾脏细胞和大麦细胞中诱发 SCE 的结果具有较高的一致性(相关性极为显著)。有人认为植物体内的多功能氧化酶系统与动物的不同^[6,7]。在体外系统中,从蚕豆根尖提取的 S_{10} 系统与大鼠肝 S_0 系统在激活原致突变剂为突变剂方面也显示了不同的特性^[4]。但迄今尚未见有把哺乳动物体内 SCE 与植物 SCE 进行比较的报道。我们的实验结果表明,虽然有可能某种诱变剂在植物和动物中的代谢途径有某些不同,但就大麦细胞和小鼠脾脏细胞而言,诱变剂最终诱发 SCE 的能力是相当一致的。在我们所检测的4类化合物中,绝大部分在小鼠脾脏和大麦细胞中都能诱发 SCE 增加,两者的区别是:在大麦细胞中诱发 SCE 明显增加所需试剂浓度较低,而在小鼠脾脏中所需浓度较高,说明可能植物细胞 SCE 比动物体内 SCE 具有较高的敏感性。绝大部分大麦细胞的 SCE 比率和 SCE/pgDNA 增加两项数值大于小鼠脾脏细胞,进一步说明利用大麦细胞 SCE 检测诱变剂比小鼠脾脏细胞 SCE 敏感。造成动物与植物 SCE 方法敏感性差异的原因可能在于诱变剂在动物与植物体内具有不同的代谢和解毒途径。动物体内具有专司代谢解毒的器官(肝脏)和排泄系统,诱变剂在体内经代谢和排泄作用后其浓度很快降低。Bauknecht 等证明 BrdU 在动物体内1小时后,其在血液中的浓度只有原有浓度的20%^[8]。已有实验证明动物体内的许多药物在损伤 DNA 前都经过了新陈代谢作用^[9,10]。因此,动物体内最终影响染色单体交换的诱变剂不能维持在有效的浓度范围内。用大麦细胞做 SCE 实验是将大麦的初生根浸在诱变剂溶液中,诱变剂进入根部后虽然经过一系列代谢过程^[2,4],但初生根的排毒系统发育不全,排毒能力有限,诱变剂有可能在根部细胞中累积。

表3 小鼠脾脏和大麦 SCE 有关数据的相关性及显著性

	相关系数(r)	P*
SCE/cell	0.86	<0.01
SCE 比率	0.77	<0.01
SCE/pgDNA	0.87	<0.01
SCE/pgDNA 增加	0.86	<0.01

* $P < 0.01$ 表明相关程度极为显著。

小鼠脾脏细胞的 SCE/pgDNA 的值大于大麦细胞的值。也就是说在小鼠脾脏细胞中的单位 DNA 中发生 SCE 的频率大于在大麦细胞中的频率。由于小鼠脾脏细胞 DNA 含量较低(6.5 pg DNA/细胞),大麦细胞 DNA 含量较高(20 pgDNA/细胞),这提示我们大麦细胞有更多的未发生 SCE 的 DNA 片断。SCE 的发生被认为是沿 DNA 链产生的随机事件^[11,12]。其发生频率与 DNA 含量成比例^[13]。所以我们推测大麦细胞 DNA 链具有更大的潜在增加 SCE 的能力,其 SCE 的增加幅度可以更大,这从大麦细胞的 SCE/pgDNA 增加值大于小鼠脾脏细胞的值得以证明。

鉴于利用植物材料 SCE 技术检测诱变剂具有方法简便、快速、经济等特点,张自立等提出期望利用植物 SCE 分析技术作为检测环境诱变因素的新手段^[14]。我们的实验表明利用大麦细胞的 SCE 技术检测诱变剂的结论可能与利用哺乳动物的 SCE 系统所得出的结论具有较大的一致性,当然这个结论是否适用于其他物种的植物和动物还有待更多的实验证据。

摘 要

诱变剂诱发 SCE 的增加在大麦细胞中比在小鼠脾脏细胞中所需浓度较低,说明植物 SCE 比动物体内 SCE 敏感。所检测的诱变剂大多均能在小鼠脾脏细胞和大麦细胞中诱发 SCE 的增加,两者之间的 SCE/细胞、SCE/pgDNA、SCE 比率、SCE/pgDNA 增加等项数值均显示极显著相关性,表明所检测的几种诱

变剂在小鼠脾脏细胞和大麦细胞中最终诱发 SCE 的效应是一致的。

参 考 文 献

- [1] Kihlman, B. A. et al., 1982, *Sister Chromatid Exchange*, ed. by Wolff, S., pp. 243—256. Wiley, New York.
- [2] Plewa, W. J. et al., 1982, *Chemical Mutagens, Principles And Methods For Their Detection*, ed. by Hollaende, A. et al., pp. 401—420. Plenum New York.
- [3] Takehisa, S., 1982, *Sister Chromatid Exchange*, ed. by Wolff, S. pp. 87—147. Wiley, New York.
- [4] Takehisa, S. and N. Kanaya., 1983, *Mutation Res.*, 124:145—151.
- [5] Takehisa, S, et al., 1988, *Mutat. Res.*, 197:195—205.
- [6] Scott, B. R. et al., 1978, *Mutat. Res.*, 49:203—212.
- [7] Dohn, D. R. et al., 1981, *Drug & Metab. Rev.*, 12:119—157.
- [8] Bauknecht, Th. et al., 1977, *Hum. Genet.*, 35:209—307.
- [9] Miller, J. A., 1970, *Cancer Res.*, 30: 559—579.
- [10] Ames, B. N. et al., 1975, *Mutat. Res.*, 115:177—213.
- [11] Wolff, S. and P. Perry., 1974, *Chromosoma.*, 43:341—353.
- [12] Schvartzman, T. B. and F. Cortes., 1977, *Chromosoma.*, 62:119—133.
- [13] Kihlman, P. A. and E. Kronborg., 1975, *Chromosoma.*, 51:1—10.
- [14] 张自立、董广元, 1982, *遗传学报*, 9(5): 357—362.

自然杀伤细胞和甲状腺细胞膜上的神经节苷脂的研究

陈哲生 李林立* 郑思华 卢辉章** 孙明杰 曹忠正

(首都医学院微生物学免疫学教研室)

自然杀伤细胞(Natural killer cell, NK)是一类非特异性杀伤肿瘤细胞的杀伤细胞,而且在体内分布较广、裸鼠体内也有NK细胞的存在,并有较广的抗瘤谱,尤其对淋巴瘤和白血病的瘤细胞杀伤能力最强。NK细胞杀伤靶细胞首先必须与靶细胞接触,然后融合释放穿孔素(perforin),发挥杀伤作用^[1]。

Adams等1956年发现甲状腺机能亢进病入血清中存在一种自身抗体,称长效促甲状腺素(long acting thyroid stimulator, LATS),后人又相继发现其他刺激抗体,现统称为甲状腺刺激抗体(Thyroid stimulating antibody, TsAb)。TsAb与甲状腺细胞膜上的受体相结合,发挥刺激作用^[2]。

神经节苷脂(ganglioside)是许多动物细胞膜上成份之一,是含有不同唾液酸的酸性糖脂,具有不同的生物学功能。神经节苷脂是近年来引人注目的课题。

本文报道霍乱肠毒素对NK细胞和甲状腺细胞膜上神经节苷脂影响的研究结果。

材 料 和 方 法

一、NK效应细胞

1. 动物 CBA 纯系小鼠, 年龄 8 周龄。
2. 瘤细胞株 小鼠 Moloney 淋巴瘤株(YAC-1), 红细胞系的白血病细胞株(K 562) (材料均来自瑞典, 卡诺林斯卡医学院免疫系), 两株瘤细胞培养在 RPMI 1640 培养基内(内含 10% 胎牛血清和青、链霉素)。
3. 霍乱肠毒素 B 亚单位(sigma 公司)。
4. 自然杀伤细胞活性的测定 人和小鼠淋巴细胞的分离^[3]。靶细胞的同位素标记^[3]。50 μ l 的 ⁵¹C, 标记的靶细胞与 100 μ l 的效应细胞, 按比例混合(人的效应细胞数: 靶细胞数 = 2: 1;

* 北京职工医院。

** 北京宣武医院。