普遍性，可能是淋巴样细胞的一种趋同进化(convergent evolution)现象。至于蚯蚓的ANAE阳性细胞是否是原始型的T样细胞，尚待研究确定。

参 考 文 献

[1] Mueller, J. et al., 1975, Eur. J. Immunol., 5:270-274.
[2] Horwitz, D. A. et al., 1977, Clin. Exp. Immunol., 30:289-298.
[3] Kulenkampff, J. et al., 1977, Brit. J. Hematol., 36:231.
[4] Ferrari, F. A. et al., 1980, Clin. Exp. Immunol., 41:358-362.
[5] Garavini, C., 1981, Experientia, 37:516-517.
[6] Lake, B. D., 1971, J. Clin. Pathol., 74:617-620.
[7] Li, C. Y. et al., 1973, J. Histochem. Cytochem, 21:1-12.
[8] Radzun, H. J. et al., 1980, Blood, 55:891-897.
[9] Leino, A. et al., 1977, Developmental Immunobiology, Elseveir, North Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 147-p. 154.
[10] Roch, P. et al., 1977, Developmental Immunobiology, Elseveir. North Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 41-p. 49.

敌枯双、敌枯唑对体外培养细胞SCE的影响及其机制

傅中滇 徐维光 王瑞淑 彭恕生

（四川医学院卫生系）

自从BUdR/Giemsa技术用于检查SCE以来，已经用SCE分析法测试了许多化学物质的诱变性和致癌性，大多数促使SCE频率升高的化学物质都是诱变性致癌剂。因此，在遗传毒理学中已把SCE分析法作为诱变剂致癌剂的一种快速敏感的短期筛选方法。但是，也发现有些能使体外培养细胞SCE频率升高的化学物质，尚无证据认为是诱变剂，如维生素C、A等[1]。本文报道了敌枯双、敌枯唑促使体外培养的中国地鼠卵巢成纤维细胞(CHO-K1) SCE频率升高，而且受到尼克酰胺和NAD^+的拮抗，与以前报道的，在人淋巴细胞中的结果对比[9]，提出敌枯双、敌枯唑的作用点可能在DNA以外的部位，它们的诱变性和致癌性值得进一步研究。

材 料 和 方 法

全部采用RPMI 1640培养基，加15—20%小牛血清，卡那霉素100单位/毫升，pH调到7.2—7.4。本实验中采用的CHO-K1细胞株是次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶(HGPRT)遗传缺陷型。在瓶底面积为10平方厘米的培养瓶中，接种约3×10^5个细胞，培养液总量为3毫升。用胶塞塞紧后，放置在普通恒温培养箱中，在37℃生长24小时，然后加入受试物和BUdR（最终浓度为10 μM），再在完全黑暗的温箱中继续培养26小时。结束培养前2小时，加入秋水仙素（最终浓度为0.2微克/毫升）。敌枯双和敌枯唑在临用前用二甲基亚砜(DMSO)溶解，配制成各种浓度的准备液，使之加入培养液后能获得所需要的最终浓度，每份标本加受试物溶液15μl，对照组只加15 μl DMSO，因此DMSO在培养液中的浓度均为0.5%(V/V)。尼克酰胺和NAD^+用生理盐水配制，每份标本也加15 μl。细胞收集和制片按常规进行，并照Korenberg建议的方法作色差染色[2]。SCE计数采用盲片法，统计学处理全部用双侧t检验。

结 果

一、敌枯双、敌枯唑对CHO-K1细胞SCE的作用

如表1所示，在所选的有效剂量组中，这

本文承复旦大学遗传研究所项维教授、上海第一医学院顾学箕教授提供宝贵意见，特此致谢。

表 1 敌枯双、敌枯唑对 CHO-K1 细胞 SCE 的影响

化合物	剂量 μM	细胞数	SCEs/每个细胞范围	SCE 总数	SCEs/每个细胞均数±标准差	t 检验（与对照组比较）
敌枯双	0	50	4-14	428	8.52±2.26	
	0.02	25	7-24	343	13.72±4.13	P<0.001
	0.2	25	8-20	388	15.52±3.69	P<0.001
	2.0	25	13-38	562	22.48±6.79	P<0.001
	20.0	0				
敌枯唑	0	50	4-12	386	7.72±2.24	
	10.0	25	7-21	262	10.48±3.68	P<0.001
	100.0	25	7-30	360	14.40±5.38	P<0.001
	500.0	25	8-32	415	16.60±5.68	P<0.001
	1000.0	0				

表 2 敌枯双、敌枯唑对人淋巴细胞 SCE 的影响

化合物	剂量 μM	细胞数	SCEs/每个细胞范围	SCE 总数	SCEs/每个细胞均数±标准差	t 检验（与对照组比较）
DMSO		50	2-11	155	5.10±2.24	
敌枯双	0.009	25	4-19	204	8.16±2.90	P<0.001
	0.045	25	5-17	204	8.16±2.91	P<0.001
	0.45	25	6-14	224	8.96±1.88	P<0.001
	0.9	25	6-16	254	10.16±2.62	P<0.001
	4.5	25	6-20	334	13.36±3.77	P<0.001
	50.0	0				
枯敌唑	10.0	25	2-11	186	7.44±2.89	P<0.001
	100.0	25	2-13	192	7.68±2.78	P<0.001
	1000.0	0				

两种化合物都使 SCE 频率显著增加：统计学上的显著性都在 P<0.001 水平；最高有效剂量组的 SCE 频率为对照组的二倍以上；这种 SCE 频率变化有明显的剂量-反应关系。按 Latt 等人提出的标准，体外培养的 CHO-K1 细胞中，这两种化合物促使 SCE 频率升高的作用为强阳性[1]。当敌枯双的剂量进一步提高到 20μM，敌枯唑达到 1000μM 时，第二分裂中期相细胞极少，呈现明显的细胞毒性，故未能记录 SCE 数。

二、敌枯双、敌枯唑对人外周血淋巴细胞 SCE 的作用

表 2 显示敌枯双在 HL 细胞中也能促使 SCE 频率显著增加，属强阳性。敌枯唑在最高剂量组出现明显的细胞毒性，因此只得到两个剂量组的 SCE 数。与对照组相比，这两个剂量组的 SCE 频率在统计学上的差异也非常明显（P<0.001），但均未超过对照组的两倍，其剂量-效应关系也难确定，因此列为弱阳性。与 CHO-KI 细胞相比，无论敌枯双还是敌枯唑，促使 SCE 频率升高的作用，显然要弱得多。

三、尼克酰胺或 NAD⁺ 对敌枯双增加 SCE 的拮抗作用

选用使 SCE 频率增加显著，而又未明显抑制 CHO-K1细胞增殖的敌枯双剂量（2.0μM），观察同时加入不同剂量尼克酰胺或 NAD^+ 时，对敌枯双增加 SCE 频率的影响。从表 3 可见，在所选的剂量中，尼克酰胺和 NAD^+ 都使敌枯双对 SCE 的影响明显减弱，显示了对敌枯双的拮抗作用。并且这种拮抗作用在等克分子时最明显，与溶剂对照组相比已无明显差异（P>0.05），为进一步观察尼克酰胺及 NAD^+ 对敌

表 3 不同剂量的尼克酰胺或 NAD⁺ 对敌枯双增加 SCE 频率的拮抗作用（CHO-KI 细胞）

敌枯双 μM	加尼克酰胺 剂量 μM	加尼克酰胺 SCEs/每个细胞 均数±标准差	加尼克酰胺 t 检验（与对照组比）	加 NAD⁺ 剂量 μM	加 NAD⁺ SCEs/每个细胞 均数±标准差	加 NAD⁺ t 检验（与对照组比）
2	0	22.48±6.79		0	22.48±6.79	
2	0.2	15.28±4.38	$P<0.01$	0.2	12.52±4.41	$P<0.01$
2	0.4	12.44±3.98	$P<0.01$	0.4	9.64±3.44	$P<0.01$
2	2.0	8.28±1.97	$P<0.01$	2.0	9.24±2.45	$P<0.01$
2	4.0	8.92±1.85	$P<0.01$	4.0	9.08±2.04	$P<0.01$

表 4 等克分子尼克酰胺对敌枯双增加 SCE 频率的拮抗作用（CHO-KI 细胞）

敌枯双 μM	用尼克酰胺 剂量 μM	用尼克酰胺 SCEs/每个细胞 均数±标准差	用尼克酰胺 t 检验（与对照组比）	不用尼克酰胺 SCEs/每个细胞 均数±标准差	t 检验（同剂量组比较）
0	0	8.52±2.26			
0.02	0.02	10.24±3.34	$P<0.02$	13.72±4.13	$P<0.01$
0.2	0.2	失败		15.52±3.69	
2.0	2.0	9.04±2.57	$P>0.05$	22.48±6.79	$P<0.01$
20.0	20.0	9.84±3.51	$P>0.05$	0	

表 5 等克分子 NAD⁺对敌枯双增加 SCE 频率的拮抗作用（CHO-KI 细胞）

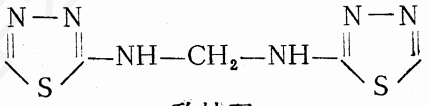
敌枯双 μM	加 NAD⁺ 剂量 μM	加 NAD⁺ SCEs/每个细胞 均数±标准差	加 NAD⁺ t 检验（与对照组比）	不加 NAD⁺ SCEs/每个细胞 均数±标准差	t 检验（同剂量组比较）
0	0	8.52±2.26			
0.02	0.02	9.76±2.40	$P<0.05$	13.72±4.13	$P<0.01$
0.2	0.2	9.00±3.88	$P>0.05$	15.52±3.69	$P<0.01$
2.0	2.0	9.44±1.98	$P>0.05$	22.48±6.79	$P<0.01$

枯双 NAD⁺ 的拮抗作用是完全的。为进一步证实这种拮抗作用，我们又将敌枯双按表 1 的剂量分组，但加入与之剂量相同的尼克酰胺或 NAD⁺，观察 SCE 频率的变化，结果如表 4,5。各个剂量组中，加入尼克酰胺或 NAD⁺ 后，敌枯双促使 SCE 频率升高的作用都明显降低（$P<0.01$）。若与溶剂对照组比较，多数剂量组中，SCE 频率已无明显差异（$P>0.05$）。

由此可见无论在 HL 细胞还是在 CHO-K1 细胞系统中，促使 SCE 频率升高的作用，敌枯双比敌枯唑强（表 1、2）。

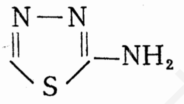
讨　　论

氨基噻二唑化合物在橡胶工业、医药和农药等方面都有广泛的用途。本文讨论的敌枯双、敌枯唑，曾作为抗白血病药物应用（主要用于实验动物），后来又发现对水稻白叶枯病（Xanthomonas Oryzae Dowson，病原为水稻白叶枯病菌）防治有显著效果。目前，某些国家和地区仍在使用。这两种氨基噻二唑化合物的化学结构式如下：



敌枯双

2,2'-(methylenediimino)bis-1,3,4-thiadiazole



敌枯唑

2-amino-1,3,4-thiadiazole

它们对哺乳动物细胞 DNA，RNA 和蛋白质合成的抑制作用，对妊娠动物的致畸效应，以及尼克酰胺对其毒性的拮抗作用，已作过许多详细研究，证实其主要作用点是抑制 IMP→XMP，这是因为敌枯双抑制了次黄嘌呤单核苷酸(IMP 脱氢酶)所致[3]：

$$\mathrm{IMP}\xrightarrow{\text{IMP 脱氢酶}}\mathrm{XMP}\rightarrow\mathrm{GMP}\rightarrow\mathrm{dGMP}$$

我们在 CHO-K1 和 HL 细胞中，证实敌枯双、敌枯唑也能诱发 SCE 频率升高，而且这种效应也同样受到尼克酰胺拮抗。因此，我们推测，敌枯双等引起 SCE 频率增加，可能也与它们抑制 IMP 脱氢酶活性有关。而且在CHO-K1细胞中，SCE频率升高比 HL 细胞中更为显著，这种差异如果说与 CHO-K1细胞缺乏HGPRT有关，则进一步说明了敌枯双、敌枯唑对 IMP 酶的抑制，是引起 SCE 频率升高的原因。在淋巴细胞中，前述合成 GMP 的途径被敌枯双等阻断后，可以经 HGPRT 催化的补救途径合成一些 GMP，作部分补偿：

$$\text{鸟嘌呤}\xrightarrow[\text{PRPP}\ \frown\ \text{PP}]{\text{HGPRT}}\mathrm{GMP}$$

缺陷型的 CHO-K1 细胞，不能经此途径合成 GMP，因此 SCE 频率升高就更明显。这种推论还有待于进一步用实验证实。

施立明等曾报道敌枯双诱发赤麂成纤维细胞 SCE 频率升高，但尚未见其它有关文献报道诱变性和致癌性研究[4]。已经证实，SCE 分析法作为一种诱变性致癌剂的测试方法，是相当简便和敏感的。但对于 SCE 试验阳性的化合物，似不宜一概肯定为诱变性致癌剂。虽然 Latt 等认为，SCE 分析法几乎没有什么假阳性，但很难说 vitA、C 等诱发 SCE 频率升高，就表示它们是诱变性致癌剂。目前已发现一些 DNA 合成抑制剂引起 SCE 频率升高，但并不都能诱发基因突变，有的在细胞转化或喂养动物试验中并不支持有致癌性，如氨甲喋呤和羟基脲素[5,6]。Nalarajan 发现 ADP-核糖聚合酶抑制剂能使 SCE 频率升高十倍，却未能诱发 CHO 细胞基因突变 (HGP-RT⁻)，认为 SCE 分析法是有假阳性的[7]。除了 SCE 频率升高以外，敌枯双在叙利亚金黄地鼠胚胎细胞转化试验和喂养动物致癌试验中，结果都是阴性[8]。因此，敌枯双是否能诱发哺乳动物细胞基因突变，还值得进一步研究，而从目前的资料来看，不能认为是一种致癌剂。但它们确实可以使体外培养细胞 SCE 频率升高，可能的原因之一，是这种化合物或其代谢产物并未直接损害 DNA 分子，只是在 DNA 分子以外的部位，例如抑制 IMP 脱氢酶，对 DNA 复制程序发生某种影响所致。

小　　结

敌枯双、敌枯唑能促使体外培养 CHO-K1 和 HL 细胞 SCE 频率升高，但受到尼克酰胺和 NAD^+ 的拮抗，因而推其对 SCE 的作用是抑制了 IMP 脱氢酶所致。它们的诱变性和致癌性仍有待于进一步研究。

参 考 文 献

[1] Latt, S. A. et al., 1981, *Mutation Research*, 87(1):17-62.
[2] Korenberg, J. R. et al., 1974, *Chromosoma*, 48:355-360.
[3] Tsukamoto, K. 1979, *Cancer Research*, 35:2631-2636.
[4] 施立明等,1980,动物学研究,1(3):197-302。
[5] Ishii Y et al., 1980, *Mutation Research*, 79(1):19-32.
[6] Banerjee, A. and W. F. Benedict., 1979, *Cancer Research*, 39(3):797-9.
[7] Nalarajan, A. T. et al., 1981, *Mutation Research*, 84(1):125-132.
[8] 四川省科委，敌枯双毒性研究资料汇编(内部资料)。
[9] 付中滇等，1982，四川医学院学报，13(2):131-135。

实验材料来源：CHO-K1 细胞株由复旦大学遗传研究所提供；RPMI1640 培养基为西德产品；BUdR 为瑞士产品，其它试剂均为国内产品。敌枯双、敌枯唑系由四川省化学工业研究所合成提纯的同批产品。