

# 丝裂霉素 C(MMC)\*<sup>①</sup> 诱发正常人淋巴细胞 姊妹染色单体互换(SCE)\*<sup>②</sup> 和染色体畸变

吴玉清 张雪艳

(中国医学科学院肿瘤研究所 细胞生物室)

丝裂霉素 C (简称 MMC) 是一种双功能的化学反应抗生素, 它选择性地作用于细胞 DNA, 使之解聚、降解, 并阻止增殖期细胞的 DNA 复制<sup>[1,2]</sup>。Lyer、Sasaki 和 Norman 等提出 MMC 的作用是烷化 DNA, 交连互补多核苷酸链<sup>[3,4]</sup>。Cohen 和 Shaw 首先观察到 MMC 引起的正常人淋巴细胞染色体断裂和交换, 其断裂点优先出现在 1, 9, 16 号染色体的次缢痕区, 通过重排(或体细胞配对)形成同源染色体的四极放射(Qr)\*<sup>③</sup> 图相。用荧光染色方法进一步证明, 第 1, 9, 16 号染色体的交换点位于 C 带区, 其余断裂点则在 R 带<sup>[5]</sup>。

以 SCE 作为指标, 检测正常人群和几种常染色体单基因隐性遗传综合征患者的体细胞, 在培养条件下, 对于包括 MMC 在内的某些外源性致突变或致癌物引起的 DNA 损伤, 及其对损伤的修复能力, 已成为细胞遗传学领域中广泛采用的最敏感、简便且定位准确的常规方法, 在短短的几年中, 国外已积累不少资料<sup>[6-11]</sup>。本实验室曾对林县食管癌高癌家族进行了遗传病因的研究, 获得高癌家族成员淋巴细胞的染色体畸变明显高于低癌家族<sup>[12]</sup>。并拟进一步以 SCE 作为指标, 观察具有染色体畸变的高癌家族成员的淋巴细胞“自发”和诱发的 SCE 频率。为此先就 MMC 对正常人淋巴细胞诱发的 SCE 和染色体畸变作如下报道。

## 材 料 和 方 法

### 一、细胞培养和制片

从 22 例正常人静脉采血 1—2 毫升, 作微

量血全血培养。每例培养 4—7 瓶, 每瓶含全血 0.2—0.25 毫升, 培养液 4 毫升(含 80% McCoy's 5A、20% 小牛血清 0.2 毫升自制 PHA、青霉素适量, pH 调至 6.8—7.0)。置 37℃ 恒温箱培养 24 小时后, 每瓶加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(BUDR), 使最终浓度为 5 微克/毫升, 避光继续培养 24 小时, 除一瓶留作对照组外, 其余各瓶分别加入不同浓度的注射用 MMC(日本制), 包括: 0.05、0.1、0.25、0.5、1.0、1.5 和 2.0 微克/毫升各一瓶。再培养至 72 小时。收获细胞前 3—4 小时加一滴秋水仙素, 使最终浓度为 0.02 微克/毫升。按空气干燥法制成染色体标本。

### 二、姊妹染色单体差别(SCD)\*<sup>④</sup> 染色法

按照 Korenberg 和 Freedlander 等<sup>[13]</sup> 建立的 EUaR-Giemsa 姊妹染色单体差别染色方法稍加改良, 即将室温保存 3 天至 1 个月的染色体标本或在 37℃ 恒温箱内干燥 2 小时的新鲜染色体标本, 置预热至 88℃—89℃ 的 1M NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 溶液中作用 5 分钟(片龄较长的标本可以酌情延长时间, 处理 10—20 分钟)。该溶液的 pH 用 NaOH 调至 8.02。从溶液中取出标本后立即在蒸馏水中漂洗两次, 然后用 Giemsa 染液染色 5—15 分钟。经自来水、蒸馏水依次冲洗后晾干。中性树脂胶封片。

### 三、SCE 计数和染色体畸变分析

先在低倍镜下找到分散好的中期相, 再用高倍镜初步辨认有无 SCD, 然后放至 100 倍物镜下计数每个中期细胞的染色体数目和 SCE 数。观察染色体畸变的标本不经 SCD 染

色, 直接用 Giemsa 染色后在 100 倍物镜下观察记录染色体畸变类型。

## 结 果

单加 BUdR 的对照组和加不同浓度 MMC 的实验组所得 SCE 频率和染色体畸变分析结

果详细总结于表 1。

### 一、SCE 频率

1. 对照组 计数 387 个中期细胞共 1934 个姊妹染色单体互换, 平均值为 5.02 SCEs/每个细胞、0.11 SCEs/每条染色体。(图版图 1)

表 1 MMC 诱发人淋巴细胞 SCE 及染色体畸变

组 别	BUdR剂量 微克/毫升	MMC剂量 微克/毫升	SCE 频率			染 色 体 畸 变		
			中期相数	SCE/每个细胞	SCE/ 每条染色体	中期相数	C.B./ 每个细胞	Qr%
对 照 组	5	—	387	5.02±0.16	0.11	—	—	—
实 验 组	5	0.05	20	8.5 ±0.65	0.19	4	—	—
	5	0.10	20	12.5 ±0.61	0.29	—	—	—
	5	0.25	23	15.5 ±1.87	0.36	20	1.3	30
	5	0.50	87	20.2 ±0.99	0.46	42	2.0	14.3
	5	1.00	38	27.3 ±1.99	0.61	48	2.08	23
	5	1.50	15	28.3 ±3.71	0.64	2	5.0	—
	5	2.00	14	34.7 ±4.98	0.78	7	10.3	14.3

C.B.为染色单体断裂

Qr.为四极放射图相。

2. 实验组 加不同浓度 MMC 的实验组共分析 221 个中期细胞, 其中 MMC 浓度为 0.05 微克/毫升时 SCE 的平均值为 8.5 SCEs/每个细胞、浓度为 0.25 微克/毫升时 SCE 频率增加至 15.5 SCEs/每个细胞、MMC 浓度增加至 2 微克/毫升时则 SCE 频率提高至平均 34.7 SCEs/每个细胞数, 个别细胞的 SCE 频率可高至 100 个以上。(图版图 2 和 3) 由此可见, SCE 频率随 MMC 的浓度增加而增加。

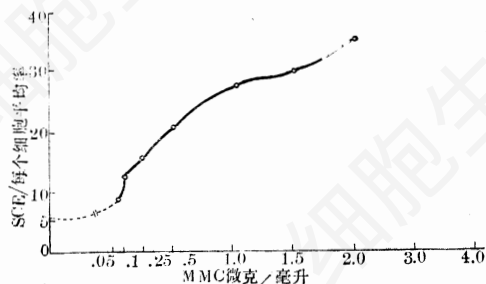


图 1 不同浓度 MMC 诱发人淋巴细胞的 SCE 频率

### 二、MMC 诱发的染色体畸变

1. 对照组 单加 BUdR 的对照组未查到明显的染色体畸变。

2. 实验组 从表 1 可以看出, MMC 诱发正常人淋巴细胞所致的染色体畸变主要为染色单体断裂(C.B.)\*<sup>⑤</sup>和四极放射(Qr)。(图版图 4) MMC 浓度在 0.1 微克/毫升以下时未查到明显的染色体畸变, 当 MMC 的浓度增加到 0.25 微克/毫升时开始出现染色单体断裂, MMC 浓度由 0.5 微克/毫升逐渐增加至 2.0 微克/毫升, 单体断裂畸变由 2C.B./每个细胞增加至 10.3C.B./每个细胞。可见染色体损伤亦随 MMC 浓度增加而增加。但是, 由染色单体断裂形成的四极放射图相则未能获得一致的正比例关系。

## 讨 论

Latt 利用 MMC 分子中乙稀亚酞和氮甲

酰脂两个活性基团具有与细胞的DNA发生交叉连接这一特点,结合SCE方法研究正常人淋巴细胞DNA损伤和修复能力,获得SCE频率有随MMC的浓度增加而增加的倾向。而染色体的畸变率却很低,表明低浓度MMC(0.003—0.1微克/毫升)引起的正常人淋巴细胞DNA损伤大部分是可以修复的<sup>[14]</sup>。本文结果基本上与Latt的结果是一致的。但是,Latt采用MMC的最低有效浓度在0.003微克/毫升时诱发的SCE频率为16.4SCEs/每个细胞,而诱发高频率SCE(88.2SCEs/每个细胞)时MMC浓度为0.1微克/毫升。我们使用的MMC浓度最低0.05微克/毫升,诱发的SCE平均值仅为8.5SCEs/每个细胞。当MMC浓度增加至0.25微克/毫升时所得SCE平均值15.5SCEs/每个细胞才能与Latt使用0.003微克/毫升时所得SCE平均值(16.4SCEs/每个细胞)相接近。有当MMC只浓度增高至2微克/毫升时少数细胞发生的SCE(100SCEs/每个细胞)才能与Latt使用的MMC浓度0.1微克/毫升时诱发的SCE平均值(88.2SCEs/每个细胞)相比拟。其原因之一,可能与使用的MMC厂牌不同和MMC对细胞作用时间长短有关,Latt采用Sigma厂牌的试剂MMC在培养开始时便加入,作用时间为72小时。我们采用日本制的临床注射用MMC于培养最后24小时加入,比Latt的实验可能少经历一个周期。若作用时间相同或许可使SCE频率加倍提高,但亦不能与之同样浓度相比。其二,受检人群“自发”SCE平均值的高低可能间接影响MMC的诱导水平。Latt从5例正常人淋巴细胞获得“自发”SCE的平均值为12SCEs/每个细胞<sup>[14]</sup>,Evans报道5例正常人体细胞“自发”SCE平均值为 $12.7 \pm 0.527$  SCEs/每个细胞<sup>[15]</sup>。Kato等根据各实验室使用BUdR浓度不同,计算方法不同,检查对象的年龄、性别、遗传背景和代谢类型不同等,提出人类SCE频率可以波动在5.1—27.3SCEs/每个细胞之间<sup>[16]</sup>。本文对照组为

22例正常人的“自发”SCE,平均值为5.02SCEs/每个细胞,乃属于低水平的,故可能间接影响到MMC的诱发水平。当然,SCE标本质量的优劣也是不可忽视的因素。

MMC诱发正常人体细胞染色体畸变类型主要为染色单体断裂和四极放射。1964年至1965年间Cohen和Shaw已先后获得一致结果。他们采用Sigma厂牌的试剂MMC作诱变剂,浓度为5微克/毫升时细胞全部杀死,浓度为1微克/毫升时分裂相显著降低,而染色体断裂和交换增多。同时获得60.2%同源染色体和29.7%非同源染色体的四极放射图相<sup>[12]</sup>。在本文中,当MMC浓度为0.5—1微克/毫升时分裂相亦显著减少,而染色单体断裂逐渐增高,由此形成的四极放射图亦以同源为主,占该畸变类型总数的61.1%。非同源的仅占22.2%。四极放射畸变都发生在第1,9,16号染色体的次缢痕区,故Cohen称之为MMC作用的靶区(target areas)<sup>[14]</sup>。至于MMC诱发的染色体畸变与SCE频率之间的比例,Latt使用低浓度MMC(0.1微克/毫升以下)在培养条件下诱发人淋巴细胞畸变,在126个中期细胞中获得1737次SCE,但仅有7个畸变,说明低浓度MMC产生的SCE比染色体畸变高200倍以上<sup>[17]</sup>。而本文对此结果表明,MMC浓度在0.1微克/毫升以下时未查出染色体畸变,开始出现1.3C.B./每个细胞时MMC浓度为0.25微克/毫升,而此时的SCE则为15.5SCEs/每个细胞,直至MMC浓度为2微克/毫升时染色体畸变为10.3C.B./每个细胞,SCEs则为34.7SCEs/每个细胞。可见染色体畸变和SCE之间仅相差3—20倍左右。亦可能与MMC浓度和作用时间长短直接相关。

关于化学突变剂诱发SCE的分子基础尚未完全弄清,双功能的(包括MMC和HN<sub>2</sub>等),单功能和三功能的烷化剂,对正常人体细胞诱发SCE的作用原理也不完全一致<sup>[4,16,18]</sup>。即使同样为双功能的烷化剂,对于不同遗传

背景的正常人群和几种常染色体单基因隐性遗传综合征患者诱发生成的 SCE 频率亦各不相同。MMC 浓度为  $10^{-9}$ — $10^{-7}$  克/毫升时使正常人体细胞的 SCE 可增加 10 倍以上。Bloom's 综合征患者的“自发”SCE 平均值本来比正常人高 10 倍左右(80.6 SCEs/每个细胞), 经用浓度为  $10^{-9}$ — $10^{-8}$  克/毫升 MMC 处理, SCE 频率又能提高一倍左右(128.8—139.3 SCEs/每个细胞)<sup>[5,19]</sup>。而染色体畸变仍保持在较低水平(0.350—0.825 SCEs/每个细胞)。着色性干皮病(XP)、Fanconi 氏贫血(FA)和毛细血管扩张性运动失调症(AT)等患者的“自发”SCE 频率基本正常<sup>[19]</sup>, 而 MMC 或其他化学突变剂对三者引起的染色体畸变率都很高, 但所致的 SCE 频率并不相同, 对(XP)细胞诱发之 SCE 频率极高; 对(FA)诱发的 SCE 比正常人低一半<sup>[20]</sup>; 而对(AT)细胞诱发产生的 SCE 频率则与正常人相同<sup>[21]</sup>。此看来, 烷化剂 MMC 对人体细胞由诱发生成的 SCE 频率与不同个体的遗传背景密切相关。因此, 利用 MMC 或其他致突变或致畸物作诱变剂比较研究易感肿瘤的高风险人群及高癌家族成员体细胞的“自发”和诱发 SCE 频率和染色体畸变或许是有裨益的。

### 小 结

本文报道一种双功能的烷化剂 MMC 对正常人淋巴细胞诱发生成的 SCE 和染色体畸变, 获得 SCE 频率和染色单体断裂与 MMC 浓度成正比例关系, 而四极放射畸变的出现率和 MMC 浓度似无明显的正相关。简短讨论了化学致突变或致畸剂诱发生成的 SCE 的频率可能与个体遗传背景有密切关系。

### 参 考 文 献

- [1] M. M. Cohen and M. W. Shaw, 1964. *J. Cell Biology*, 23: 386—395.  
 [2] M. W. Shaw and M. M. Cohen, 1956. *Genetics*, 51: 181—190.  
 [3] V. N. Lyster and W. Szybalski, 1963.

*Prod. Natl. Acad. Sci. USA*, 50: 355—362.

- [4] M. S. Sasaki and A. Norman, 1967. *Nature*, 244: 502—503.  
 [5] M. Morad et al, 1973. *Hereditas*, 74: 273—281.  
 [6] D. E. Comig, 1975. *Humangenetik*, 28 (3): 191—196.  
 [7] S. M. Galloway, 1977. *Mutation Res.*, 45: 343—349.  
 [8] J. R. Honeycombe, 1978. *Mutation Res.* 357: 5—49.  
 [9] E. M. Kuhn, 1978. *Chromosoma (Berl)* 66: 287—297.  
 [10] Y. Shiraishi and A. A. Sandberg, 1978. *Mutation Res.*, 49: 233—238.  
 [11] S. Wolff and B. Rodin, 1978. *Science*, 200 (4341): 543—545.  
 [12] 吴玉清、阮学珍, 1979. 遗传学报, 6: 234—241.  
 [13] J. Korenberg and E. Freedlender, 1974. *Chromosoma (Berl)*, 48: 355—360.  
 [14] S. A. Latt, 1974. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 71 (8): 3162—3166.  
 [15] H. J. Evans, 1977. What are sister chromatid exchange? in “Chromosomes Today”, vol. 6: 315. Edited by A. Dela Chapelle and M. Sorsa, Elsevier/Korth-Holland Biomedical Press Amsterdam, New York, Oxford.  
 [16] H. Kato, 1977. *International Review of Cytology*, 49: 55—97.  
 [17] S. A. Latt, 1975. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 72: 4006—4070.  
 [18] B. Beek and G. Obe, 1975. *Humangenetik*, 29: 127—134.  
 [19] S. Wolff, 1977. *Nature*, 265: 347—349.  
 [20] S. A. Latt, 1974. *Science*, 185: 74—76.  
 [21] P. Perry and H. J. Evans, 1975. *Nature (Lond)*, 258: 121—124.

\*① (MMC) 为 Mitomycin-c 的缩写。

\*② (SCE) 为 Sister Chromatid Exchange 的缩写。

\*③ (Qr) 为 Quadriradiation 的缩写。

\*④ (SCD) 为 Sister Chromatid Differential 的缩写。

\*⑤ (C. B.) 为 Chromatid Break 的缩写。

中国科学院生物物理所肿瘤组提供 BUdR, 在此表示感谢。