

参 考 文 献

- [1] Hampton MB, Orrenius S, 1998, *Biofactors*, **8**:1-5.
- [2] Hall AG, 1999, *Eur J Clin Invest*, **29**:238-245.
- [3] Schmid I, Uiffenbogaart CH, Keld B, et al., 1994, *J Immunol Methods*, **170**:145-157.
- [4] Smith JA, Weidemann MJ, 1993, *J Immunol Methods*, **162**:261-268.
- [5] Pollman MJ, Hall JL, Gibbons GH, 1999, *Circ Res*, **84**:113-121.
- [6] Suzuki K, Nakamura M, Hatanaka Y, et al., 1997, *J Biochem*, **122**:1260-1264.
- [7] Wang JH, Redmond HP, Watson RWG, et al., 1996, *Shock*, **6**:331-338.
- [8] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, Jing Y, 1999, *Blood*, **93**:268-277.
- [9] Garland JM, Sdergaard KL, Jolly J, 1997, *Br J Haematol*, **99**:756-765.
- [10] Hentze H, Kstle G, Volbracht C, et al., 1999, *Hepatology*, **30**:177-85.

PROTECTION OF GLUTATHIONE AGAINST ENDOTHELIAL APOPTOSIS INDUCED BY SODIUM ARSENITE

XIAO Nan LIU Ren TIAN Kun Lun DIAO You Fang WANG Zhi Wen

(Research Institute of Surgery, Daping Hospital, the Third Military Medical University Chong qing 400042)

ABSTRACT

In order to study the protective effect of glutathione(GSH)on endothelial apoptosis, the endothelial cells strain ECV-304 was cocultured in vitro with 40, 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ sodium arsenite(Ars)alone and with 50 $\mu\text{mol/L}$ GSH respectively. Twentyfour hours after culture, endothelial apoptosis, ICAM-1 expression and oxidative state were determined by flow cytometry. The results showed that Ars increased endothelial apoptosis with dose-dependent manner, upregulated ICAM-1 expression and suppressed the oxidative state. GSH decreased the endothelial apoptosis induced by 80 and 160 $\mu\text{mol/L}$ Ars by 30.2% and 52.1%, respectively, and down-regulated ICAM-1 expression. As for apoptosis and ICAM-1 expression at 40 $\mu\text{mol/L}$ Ars, GSH did not show significant effects. GSH could also preserve the oxidative state, which was more potent in that induced by 40 μM Ars. We concluded that GSH could protect the endothelial apoptosis induced by Ars, and this may associate with down-regulation of ICAM-1 expression.

Key words: Endothelial cells Apoptosis Glutathione

多色荧光原位杂交对昆明山海棠和丙烯酰胺 诱发微核染色体组成的研究

杨明杰 曹佳

(第三军医大学预防医学系分子毒理实验室 重庆 400038)

前期我室报道了使用小鼠次要卫星 DNA 探针荧光原位杂交和 CREST 染色对昆明山海棠和丙烯酰胺诱发微核的着丝粒组成比例的研究^[1,2],这两种方法虽然可以较好地了解微核(micronuclei)的组成情况,但却无法提供微核染色体断片组成的信息,为此,我们采用更为精确的着丝粒和端粒 DNA 探针多色荧光原位杂交(Multicolor fluorescent in situ hybridization, 多色 FISH)技术,深入研究了昆明山海棠和丙

烯酰胺诱发小鼠 NIH 3T3 细胞微核的着丝粒和端粒组成比例,以了解微核的染色体组成,进而了解这两种化合物的遗传毒性。

材 料 和 方 法

1. 受试化合物

昆明山海棠 [*Tripterygium hypoglaucum* (Level)]

本文 1999 年 1 月 28 日收到,6 月 29 日接受。

本课题由国家自然科学基金资助(基金编号 39400114)。

Hutch, THH]购自云南省医药公司,水抽提物按汪旭等^[3]的方法制备,所得抽提液浓度按2g生药/ml计,抽干得率为4.5%。丙烯酰胺(Acrylamide, AA),染色体断裂剂阳性对照毒剂丝裂霉素C(Mitomycin C, MMC),非整倍体阳性对照毒剂秋水仙素(Colchicine, COL),均购自Sigma公司。

2. 细胞培养及受试物处理

NIH 3T3小鼠成纤维细胞株按Miller^[4]方法培养,加受试物后继续培养22小时收获细胞。

3. 制片

中期相染色体制片按常规方法进行,微核检测制片,用-20℃预冷的固定液(甲醇:冰醋酸=8:1)于-20℃固定收获细胞,滴片后,用0.5μg/ml蛋白酶K处理10分钟,室温干燥后-20℃保存备用。

4. 探针制备

通过扩增含小鼠次要卫星DNA片段质粒pRP855(加拿大York大学Pearlmann教授惠赠),酶切,回收和纯化DNA目的片段,制备小鼠次要卫星DNA探针,并用随机引物法生物素标记。通过合成小鼠端粒重复序列(TTAGGG)₅和(CCTAA)₅,用I₂do^[5]的方法PCR扩增并延长端粒DNA序列,制备端粒DNA探针,并用随机引物法地高辛标记(标记试剂盒均购自宝灵曼公司)。

5. 多色FISH

按Schriever-schwemmer^[6]方法进行。FISH后着丝粒DNA探针用Cy3链霉抗生物蛋白(红色荧光, Sigma公司)检测,端粒DNA探针用FITC地高辛检测系统(黄色荧光,宝灵曼公司)进行2-3轮信号放大并检测,用0.5μg/ml Hoechst 33258配染(蓝色荧光, Sigma公司)。

6. 镜检和记录

各组杂交玻片均观察3000个细胞,计数含微核数,并记录微核的着丝粒和端粒杂交信号数目及组成。将微核按端粒和着丝粒信号有无分为C₀T₀、C₀T_n和

C_nT_n三型进行统计分析(C₀T₀表示微核无任何杂交信号,代表微核由不含端粒的染色体断片组成;C₀T_n表示微核只有端粒信号,代表微核由含端粒的染色体断片组成;C_nT_n表示微核既有端粒信号又有着丝粒信号,代表微核由整条染色体组成)。另外,进一步将C₀T_n和C_nT_n型微核按端粒和着丝粒信号数目归类细列如表1。

结 果

1. 探针特异性的检测

用NIH 3T3细胞染色体滴片,多色FISH后,观察5个染色体数为40的中期相染色体上着丝粒和端粒的杂交信号分布,验证探针特异性。结果除Y染色体外所有染色体着丝粒都可观察到两个并排的着丝粒DNA探针杂交信号。71.8%的染色体端粒部位可观察到端粒DNA探针杂交信号,各染色体上的端粒杂交信号数目不等,这一结果与Miller^[4]的结果类似。说明两种探针均具有较好的特异性。

2. 对微核的多色FISH结果

从表1可以看出,阳性对照和受试化合物诱导的微核率均显著高于溶剂对照微核率(P<0.01,χ²检验)。典型断裂剂MMC诱导的微核,78.6%无着丝粒信号,但59.8%含有端粒信号,说明MMC主要是诱导产生染色体断片,表现出较强的断裂剂效应。典型非整倍体毒剂COL诱导的微核,74.5%含有着丝粒信号,且很大部分含2个或2个以上着丝粒信号,说明COL主要诱导产生整条染色体丢失,表现出较强的非整倍体毒性。上述两个典型毒剂的

表1 各化合物诱导的微核率及不同杂交信号类型微核构成百分比

化合物	剂 量	微核数	千分率	CoTo	CoTn	端粒信号数			CnTn	着丝粒信号数		
						1-2	3-4	>4		1	2	>2
溶剂对照		29	9.7	20.7	34.5	24.1	6.9	3.4	44.8	31.0	13.8	0.0
COL	0.1μg/ml	165	55.0	6.1	19.4	10.9	6.1	2.4	74.5	31.5	34.5	8.5
MMC	0.1μg/ml	117	39.0	18.8	59.8	29.1	24.8	6.0	21.4	12.8	7.7	0.9
THH	5μl/ml	82	27.3	7.3	22.0	11.0	8.5	2.5	70.7	48.8	20.7	1.2
	10μl/ml	114	38.0	7.0	23.7	17.5	5.3	0.9	69.3	48.2	18.4	2.6
AA	20μl/ml	112	37.3	16.1	34.8	24.1	10.7	0.0	49.1	24.1	14.3	10.7
	100μg/ml	54	18.0	7.4	44.4	25.9	11.1	7.4	48.1	24.1	20.4	10.7
	200μg/ml	86	28.7	9.3	33.7	17.4	11.6	4.7	57.0	34.9	19.8	2.3
	400μg/ml	123	41.0	8.1	26.0	15.4	8.1	2.4	65.9	37.4	26.8	1.6

结果表明本研究的方法能较好地辨别微核的染色体组成,判断诱导微核的化合物是否有断裂剂毒性或非整倍体毒性。

THH 在 5、10 μ l/ml 两个剂量水平诱导的微核约 70% 含有着丝粒信号,其中部分含有 2 个或 2 个以上着丝粒信号,表明这两个剂量水平 THH 诱导的微核主要由整条染色体组成,此时表现出明显的非整倍体毒性效应。20 μ l/ml THH 诱导的微核率与 5、10 μ l/ml 相比反而下降,且无着丝粒信号微核所占百分比增加,说明剂量较高时,不仅 THH 的细胞毒作用抑制细胞分裂而使微核形成率下降,而且诱导的微核半数由染色体断片组成,即高剂时 THH 还有一定的断裂剂效应。

AA 诱导的微核率有非常显著的剂量反应关系($P < 0.01$, 线性相关分析,相关系数为 0.9929)。且随剂量增加,AA 诱导的含着丝粒信号微核所占百分比增大(从 48.1% 增至 65.9%)。提示 AA 既是一种断裂剂又具有非整倍体毒性,高剂量时非整倍体毒性表现更明显。

讨 论

用着丝粒和端粒 DNA 探针多色 FISH 进行微核分析,是近年来发展起来的新技术,通过检测微核中着丝粒和端粒的存在情况,判断微核的染色体组成,诱导微核形成的诱变因子的遗传毒性。与单纯依靠检测微核中的着丝粒的方法(如单纯着丝粒 DNA 探针 FISH 和 CREST 染色)相比,多色 FISH 可提供更多关于微核染色体组成的信息,因而更为精确可靠。

目前,检测小鼠着丝粒的 DNA 探针有小鼠主要卫星 DNA 探针[The mouse major (γ)satellite DNA probe]和次要卫星 DNA 探针(The mouse minor satellite DNA probe)两种,均可检测除 Y 染色体外的着丝粒。因次要卫星探针的互补配对区在着丝粒中心区,检测结果较主要卫星探针可靠,故有研究认为次要卫星探针更适于微核检测^[6]。本研究使用我室自备的次要卫星探针,验证结果证明具有较好的

特异性,且杂交信号明亮、清晰。检测小鼠端粒的 DNA 探针一般为(TTAGGG)六核苷酸串联重复序列。由于小鼠端粒 DNA 序列长度变化于 20-200kb 之间,所以用端粒探针进行 FISH 后,有较长序列的端粒杂交信号较为明亮,而较短序列的端粒杂交信号较弱甚至观察不到杂交信号。Miller^[4]等在同类研究中使用的端粒 DNA 探针一般只能检测出约 70% 的端粒。我们自备的端粒 DNA 探针可检测出 71.8% 的端粒。

THH 是一种云南特产中药,临床上主要用于治疗风湿性关节炎等自身免疫性疾病。汪旭等发现 THH 可能有非整倍体毒性^[3],我室前期研究^[1]也发现,该药能损伤着丝粒蛋白的结构和功能,它诱导的微核着丝粒信号阳性率高达 68.4%。本研究使用精确的多色 FISH,结果显示较低剂量 THH 诱导的微核中,70% 源于整条染色体,且约 20% 可能由两条或两条以上染色体组成。表明 THH 的确具有较强非整倍体毒性。而剂量较高时,THH 也可能具有潜在断裂剂毒性。可见 THH 既有非整倍体效应又有断裂剂效应,建议临床用药时要充分考虑其遗传毒性。

AA 是一种工业絮凝剂,广泛用于饮水净化和污水处理等行业,也是实验室常用电泳材料。早先报道认为 AA 仅是一种染色体断裂剂,近来研究发现 AA 也有非整倍体毒性。我室前期的研究发现,AA 诱导的微核着丝粒信号阳性率可达 71.6%,既可诱导小鼠骨髓细胞染色体结构畸变,又可诱导非整倍体形成,并且后者效应更明显^[2]。Schriever-schwemmer 等^[7]报道,AA 诱导的小鼠骨髓细胞微核次要卫星探针 FISH 信号阳性率为 29%,杂交信号阳性微核率是对照的三倍,表明 AA 既是一种断裂剂又有潜在非整倍体毒性。本研究多色 FISH 研究结果显示,AA 诱导的微核率有显著剂量反应关系,同时由整条染色体组成的微核所占百分比随剂量增加而增大(从 48.5% 增至 65.9%)。支持 AA 既有断裂剂毒性也有非整倍

体毒性,并且高剂量时非整倍体毒性表现更明显。

本研究条件下,由于Y染色体着丝粒和部分端粒不能被检测出,因而在准确判断组成微核的染色体或染色体断片数目等方面还存在局限。但与单纯检测着丝粒信号有无的方法(如单纯着丝粒探针 FISH 和 CREST 染色)相比,着丝粒和端粒 DNA 探针多色 FISH 提供的信息更全面,尤其在需要深入了解微核的染色体组成时,多色 FISH 无疑是一较好的方法。并且随探针、杂交方法和检测手段的改进,这一方法将会更加完善。

摘 要

采用着丝粒和端粒 DNA 探针多色荧光原位杂交,分析了昆明山海棠和丙烯酰胺诱导的

NIH 3T3 细胞微核的染色体组成。结果表明,昆明山海棠和丙烯酰胺诱导的由整条染色体组成的微核分别可达 70.7% 和 65.9%,提示昆明山海棠和丙烯酰胺均有较强的非整倍体毒性。

关键词: 多色荧光原位杂交 微核 昆明山海棠 丙烯酰胺 非整倍体毒剂

参 考 文 献

- [1] 曹佳等,1997,遗传,9(1):1-3.
- [2] 胡斌等,1997,细胞生物学杂志,19(2):83-86.
- [3] 汪旭等,1995,遗传,17(5):34-36.
- [4] Miller, B. M. et al., 1993, *Mutagenesis*, 8:35-41.
- [5] Ijdo, J. W. et al., 1991, *Nucleic Acids Reseach*, 19(17):478.
- [6] Schreiver-schwemmer, G., et al., 1994, *Mutagenesis*, 9(4):333-340.
- [7] Schreiver-schwemmer, G., et al., 1997, *Mutagenesis*, 12(4):201-207.

STUDY ON CHROMOSOMAL COMPOSITION OF MICRONUCLEI INDUCED BY *TRIPTERYGIUM HYPOGLAUCUM* (LEVEL) HUTCH AND ACRYLAMIDE WITH MULTICOLOR FLUORESCENCE IN SITU HYBRIDIZATION

YANG Ming Jie CAO Jia

(*Molecular Toxicology laboratory, Third Military Medical University, Chongqing 400038*)

ABSTRACT

Multicolor fluorescence in situ hybridization using simultaneously a combination of DNA probes for the centromerically mouse minor satellite DNA and the telomeric hexamer repeat (TTAGGG) was applied to analyze the composition of micronuclei (MN) in mouse NIH 3T3 fibroblasts induced by tripterygium hypoglaucum (level) hutch (THH) and acrylamide (AA). The results showed that 70.7% of THH-induced MN and 65.9% of AA-induced MN contained whole chromosomes, suggesting both THH and AA have aneugenic poison. Multicolor FISH with centromeric and telomeric DNA probes shows as an accurate technique for analysis of the chromosomal composition of MN.

Key words: Multicolor fluorescence in situ hybridization Micronuclei *Tripterygium hypoglaucum* (Level)
Hutch Acrylamide Aneugen

Project supported by National Natural Science Foundation of China (No. 39400114).