

应用胞质分裂阻滞法研究乙双吗啉对人淋巴细胞微核形成与增殖动力学的效应

吴建中 薛开先 马国建

(江苏省肿瘤防治研究所 南京 210009)

摘要 乙双吗啉为我国首先合成的抗癌药,长期服用可诱发白血病。为进一步研究其遗传毒性的机理,本研究应用胞质分裂阻滞法(CB法)研究了乙双吗啉对体外培养人淋巴细胞微核形成及细胞动力学的效应。实验结果表明,乙双吗啉在胞质分裂阻滞的双核细胞及未阻滞的单核细胞中,均诱发微核形成并呈剂量依赖性增加;同时乙双吗啉具有明显的细胞毒性,抑制细胞分裂,双核与多核细胞率呈现剂量依赖性下降,可见,乙双吗啉是一个诱变与细胞毒因子。同时本文还讨论了CB-MNT实用价值的问题。

关键词 乙双吗啉,胞质分裂阻滞,微核形成,细胞动力学,人淋巴细胞

Studies on Effects of Bimolane on Micronucleus Formation and Cytokinetics in Human Lymphocytes Cultured *in vitro* by Means of Cytokinesis-block

Wu Jianzhong Xue Kaixian Ma Guojian

(Jiangsu Institute of Cancer Research, Nanjing 210009)

乙双吗啉为我国研制的抗癌药,对多种实验肿瘤具有明显的抑制作用^(1,2),临床治疗银屑病效果较好⁽³⁾。但近年来不断有报告指出,长期服用乙双吗啉可诱发治疗相关性白血病,从而引起对该药致癌作用与遗传毒性的关注⁽⁴⁻⁶⁾。胞质分裂阻滞微核测试法(CB-MNT)可同时检测受试药物的遗传毒性和细胞毒性,但检测遗传毒性的敏感性是否优于常规MNT,目前尚存在着不同看法^(1,12-15),故在本研究中进一步用CB法观察乙双吗啉的遗传毒性和细胞周期动力学效应,同时与常规法检测乙双吗啉遗传毒性敏感性进行了比较分析。

1 材料和 方法

实验用静脉血采自3例健康供血员,其中男性为1人,女性为2人,年龄为22-30岁。每份新鲜血样按常规作微量全血培养⁽⁷⁾,于37℃培养38小时,同时加入终浓度为0(对照)、5、10、20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 乙双吗啉(南京第三制药厂,890718),以及5-6 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 松胞素B(Cyt-B, Sigma产品),继续培养68小时,按本室常规制备完整淋巴细胞微核片⁽⁸⁾,Giemsa染色(1:10, pH 6.8),油镜下每组观察1000个转化淋巴细胞,分别记录各种核数的细胞及其微核,为在同一水平上比较不同阻滞周期数细胞检测MNF的敏感性,在1000个单核细胞、500个双核细胞和250个4核细胞中计数微核率(MNF%)。平均MNF组间差异的比较,采用u检验;平均单核、双核和4核细胞率在对照和各实验组间差异的比较,采用Dunnett's检验;采用最小二乘法拟合剂量效应曲线^(9,10,12)。

2 实验结果

2.1 乙双吗啉对 CB-MNF 的影响

在人全血淋巴细胞培养物中, 同时加入 Cyt-B 和乙双吗啉后, 在不同阻滞周期数的淋巴细胞中可观察到微核形成。表 1 显示, 单核(未分裂)、双核(分裂 1 次)和 4 核(分裂 2 次)细胞的 MNF, 均呈剂量依赖性增加, 令 $\hat{Y} = \log \text{MNF}$, 则剂量效应关系可分别用下述方程描述:

$$\hat{Y}_{\text{单核}} = 0.460 + 0.049 X, r = 0.973, P < 0.01;$$

$$\hat{Y}_{\text{双核}} = 0.733 + 0.032 X, r = 0.963, P < 0.01;$$

$$\hat{Y}_{\text{4核}} = 1.321 + 0.024 X, r = 0.995, P < 0.01.$$

从表 1 可见, 随着细胞分裂阻滞周期数增加, 背景 MNF 呈上升趋势, 对照双核细胞 MNF 较对照单核细胞明显增加 ($0.05 < P < 0.10$), 对照 4 核细胞 MNF 较对照单核与双核细胞, 均有极显著的增加 ($P < 0.01$)。但单核、双核、4 核细胞的 MNF, 与乙双吗啉处理剂量关系曲线的回归系数(参见上述函数方程)呈下降趋势, 这似乎提示, 双核与 4 核细胞测试系统检测乙双吗啉遗传毒性的敏感性, 并不优于单核细胞测试系统。

表 1 乙双吗啉对胞质分裂阻滞人淋巴细胞 MNF 的影响

浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	不同阻滞周期细胞的 MNF(%)		
	0	1	2
0	3.44 ± 2.07	5.80 ± 3.94	22.00 ± 11.94
5	3.67 ± 1.86	8.44 ± 5.46	26.60 ± 9.96
10	10.38 ± 8.03	8.63 ± 6.16	34.80 ± 22.15
20	28.40 ± 19.51	25.83 ± 20.53	65.00 ± 22.65

表 2 乙双吗啉对人淋巴细胞周期动力学的影响

浓度($\mu\text{g}/\text{ml}$)	具有不同核数目的细胞率(%)				
	1	2	3-4	5-6	7-8
0	418.84 ± 31.61	431.00 ± 41.99	146.91 ± 24.12	2.83 ± 3.38	0.42
5	430.82 ± 35.73	428.91 ± 68.14	139.45 ± 61.01	0.82 ± 1.83	0.90
10	495.36 ± 116.88	376.36 ± 36.32	127.27 ± 82.42	0.10 ± 0.14	0
20	747.18 ± 179.29	202.36 ± 128.78	50.29 ± 54.21	0.03 ± 0.06	0

2.2 乙双吗啉的细胞周期动力学效应

从表 2 可见, 乙双吗啉诱发双核与多核细胞比率呈剂量依赖性下降, 以及单核细胞比率相应提高。和对照组相比, 当乙双吗啉剂量达 $20\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 多核细胞率非常显著下降 ($P < 0.01$), 单核细胞率非常显著地上升 ($P < 0.01$)。看来乙双吗啉具有明显的细胞毒性, 阻滞细胞周期的进展, 减少分裂细胞。

比较表 1、表 2 的结果, 乙双吗啉诱发微核显著增加 ($P < 0.01$) 的浓度为 $10\mu\text{g}/\text{ml}$, 而引起明显细胞分裂抑制的剂量为 $20\mu\text{g}/\text{ml}$, 可见微核指标检测乙双吗啉的毒性效应, 较细胞分裂抑制指标更为敏感。

3 讨论

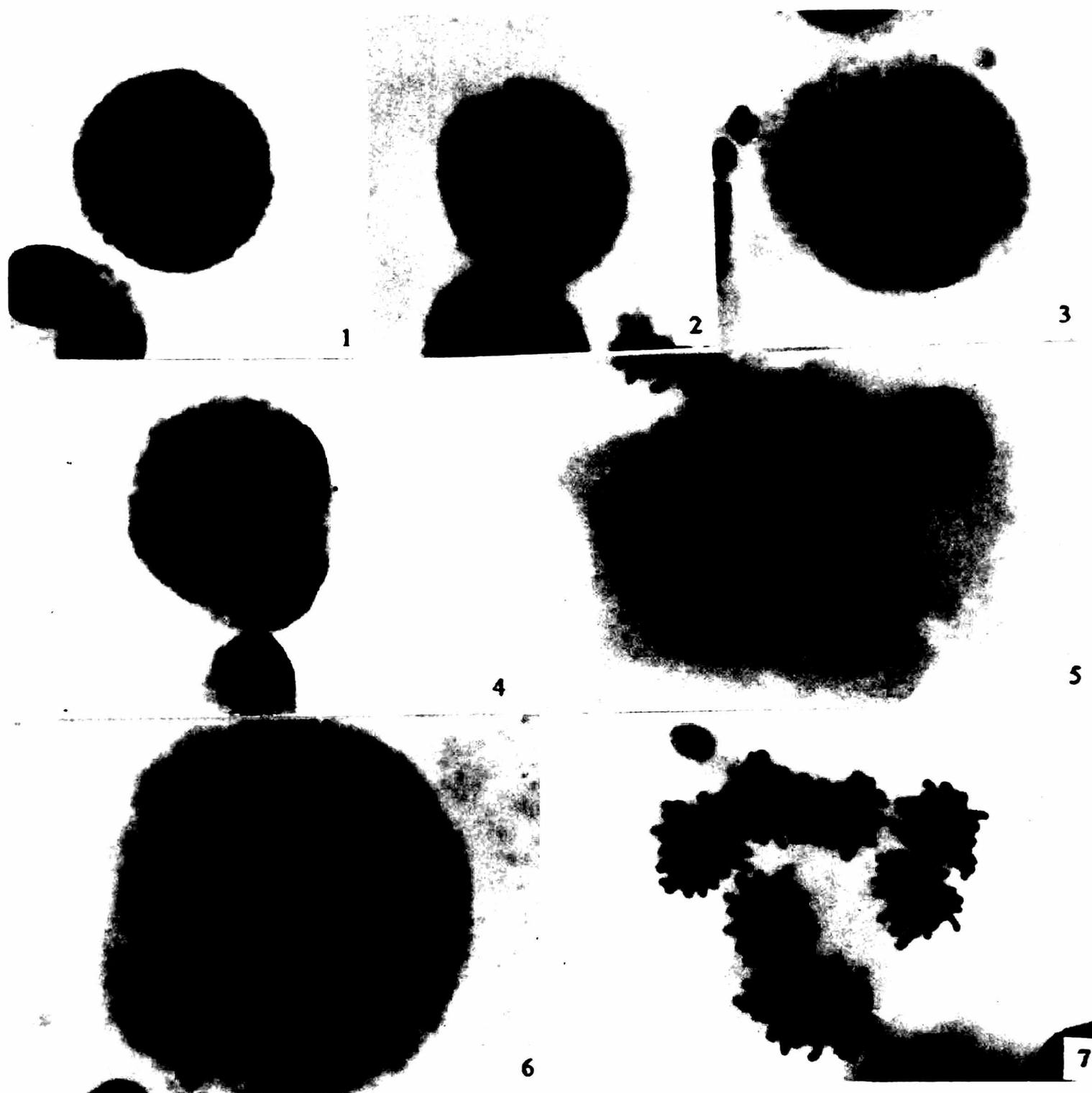
长期服用乙双吗啉可诱发治疗相关性白血病^[4], 在 5 例服用乙双吗啉后发生的急性早幼粒白血病患者骨髓细胞中, 均发现特异性染色体易位 $t(15; 17)(q22; q21)$, 其中 3 例还有额外的染色体异常^[11]。体外实验亦证明, 乙双吗啉可诱发人淋巴细胞各类染色体畸变与微核的形成^[6]。本实验应用 CB 法、在单核、双核与 4 核细胞测试系统中均进一步证实, 乙双吗啉具有明显的遗传毒性。

CB-MNF 是否较常规 MNF 更敏感, 文献中有不同报道。为保证 CB-MNF 与单核细胞 MNF 资料的可比性, 应计数 500 个双核细胞^[8, 9, 13]。目前文献中仅在正常人淋巴细胞背景 MNF 获得了一致的结果^[9, 13]; 但用 X-线诱发的 1000 个双核细胞的 MNF, 仅高于常规单核细胞 MNF 的 40-50%^[14]。我们用 CB 法与常规法比较检测了 MMC 诱发的微核, 发现 CB-MNF 低于常规法, 进一步研究发现, 双核细胞的微核明显大于单核细胞的微核, 这可能是微核间相互融合的结果, 导致了 MNF 的下降^[9]。同时本实验亦未能证实 CB 法检测乙双吗啉遗传毒性的敏感性优于常规法。然而用 CB 法测得的 γ -线与实验抗癌药 AZQ 诱发的 MNF 则高于常规法, 尤其在高剂量区^[8, 12]。这些实验结果的差异, 可能主要与处理因子不同有关。因此从方法学角度来看, 不能一般地认为 CB 法检测 MNF 的敏感性优于常规法, 但从实用角度考虑, 在 1000 个双核细胞中计数微核, 这样除可保证在同一周期中计数微核外, 还可使 CB-MNF 恒高于常规法, 提高实验的可复性和统计分析的可信性, 有其应用价值。

Cyt-B 阻滞胞质分裂, 在增殖细胞群体中产生不同核数的细胞。单核细胞尚未进行分裂, 双核细胞已分裂 1 次, 3 核或 4 核细胞为 1 个或 2 个子核已分裂有 2 次, 5-8 核细胞亦可类推不同数目的子核已分裂第 3 次。如用细胞毒因子处理细胞时, 则可能引起分裂延迟或抑制细胞分裂, 使多核细胞比率减少, 单核细胞比率增加^[12, 15]。由于细胞核计数较姐妹单体区别染色鉴别细胞分裂周期更为简便、易行^[15], 而且可同时作微核检测, 因此用胞质分裂阻滞法研究受试因子的遗传毒性和细胞动力学效应还是值得推广的。

参 考 文 献

- (1) 张翠沐等, 1980. 药学学报, 15(10): 577-583.
- (2) 于刚等, 1984. 药学学报, 19(7): 481-485.
- (3) 王慧英等, 1984. 临床皮肤科杂志, 13(1 增刊): 8.
- (4) 编者按, 1989. 中华血液学杂志, 10(1): 19.
- (5) 王永征等, 1989. 中华血液学杂志, 10(1): 19-21.
- (6) 薛开先等, 1991. 中华血液学杂志, 2(6): 321-322.
- (7) 薛开先等, 1986. 遗传学报, 13(5): 397-402.
- (8) 薛开先等, 1991. 遗传学报, 18(5): 401-406.
- (9) 薛开先等, 1991. 遗传学报, 18(1): 12-16.
- (10) 杨树勤主编, 1985. 医学统计学, 上海: 上海科学技术出版社, 111.
- (11) 卢大儒等, 1989. 江苏医药, 16(11): 597-598.
- (12) Erexson G L, *et al*, 1987. *Mutat. Res.*, 178(1): 117-222.
- (13) Fenech M, *et al*, 1986. *Mutat. Res.*, 161(2): 193-198.
- (14) Kormas C, *et al*, 1988. *Mutat. Res.*, 199: 31-35.
- (15) Krishna G, *et al*, 1989. *Mutat. Res.*, 222(1): 63-69.



1. 单核细胞; 2. 双核细胞, 并有一个微核; 3. 3核细胞, 并有一个微核; 4. 4核细胞, 并有一个微核; 5. 6核细胞, 并有一个微核; 6. 7核细胞, 并有一个微核; 7. 8核中期细胞.