

染色体畸变试验中 CHL 细胞系/剂量法则的应用¹⁾

黄念君

(卫生部药品生物制品检定所, 北京)

为了检测化学物质的遗传毒性和潜在致癌性, 所采用的方法应是简单、快速、经济、敏感和重复性强。传代的哺乳动物组织培养细胞, 特别是中国仓鼠肺细胞(简称 CHL 细胞)正具备着这些特点。Ishidate^[3]自 1977 年起成功地用 CHL 细胞系统作为一种非常有用的工具, 检测环境中的化学物质, 并发现不少新的诱变剂^[4-7]。我们用 CHL 系统观察化学物质所诱发的染色体畸变, 获满意结果。

材料与方 法

(一) 培养细胞 中国仓鼠肺细胞克隆亚系 CHL-1, 由日本东京国立卫生试验所诱变剂部赠送。该细胞系由东京肿瘤研究所的 T. Utakoji^[8]建株, 染色体的原始核型为 25, 核型稳定, 37°C 单层培养, 培养液为 EAGLE MEM (日本产) 及 10% 小牛血清, 每周传代 2 次, 传至 200 多代其核型仍基本保持不变。

(二) 化学药剂 柔毛霉素(Daunomycin), 意大利产; 丝裂霉素 C (Mitomycin C), 日本产; 甲基亚硝基胍(N-Methyl-N-Nitro-N-Nitrosoguanidine), 瑞士产。4-硝基喹啉(4-Nitro-Cinolin-N-Oxid), 瑞士产。以上化学物质均分析纯。聚乙烯醇(Polyvinyl Alcohol), 北京有机化工厂生产。

(三) 50% 细胞生长抑制试验 以 6×10^3 /ml 的 CHL-1 细胞培养 3 天后, 分别加入不同剂量的化学物质, 作用 48 小时后, 固定, 结晶紫着色, 检查着色细胞, 观察抑制 50% 细胞生长的剂量。对照用溶媒及未处理组。

(四) 染色体畸变试验 以 4×10^3 /ml 的

CHL-1 细胞培养 3 天后, 分别加入不同剂量的化学药剂, 加药后 24、48 小时收获细胞。按常规制备染色体, 对照采用溶媒及未处理组。

在油镜下, 每一剂量组计数 100 个中期细胞, 观察染色体畸变。畸变类型分 5 种: 染色单体型间隙(g), 染色单体型断裂(b), 染色单体型易位(t), 环状染色体(r), 碎片或粉碎化(f)。也计算多倍体(p)的发病率。染色单体内不着色的长度小于染色单体的宽度作为间隙。根据日本 NIHS 经验, 间隙不计入总的畸变率。

(五) 结果的判断 CHL-1 细胞的自发染色体畸变率通常小于 2—4%, 因此判断如下: 畸变率小于 4.9% 为阴性(-), 介于 5.0—9.9% 为可疑(±), 介于 10—19.9% 为弱阳性(+), 介于 20.0—49.9% 为阳性(++), 大于 50% 为强阳性(+++)。从 24 小时或 48 小时收获细胞的畸变率大于 10% 以上, 并有剂量反应关系时判断为阳性, 少许化学药剂若没有明确的剂量反应关系, 则测定该剂量的可重复性。

结 果

(一) 50% 细胞生长抑制试验 各种化学药剂抑制 50% 细胞生长的浓度是不同的(表 1)。其中致突变/致癌剂柔毛霉素、丝裂霉素 C、4-硝基喹啉和甲基亚硝基胍基本接近, 在 1—4 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 范围内, 而聚乙烯醇则高达 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。

Huang Nianjun: Application of CHL Cell Line and Dose-rule in Chromosomal Aberration Assay

1) 赵强同志参加部分实验, 特此致谢。

表 1 5 种化学药剂染色体畸变试验结果

| 化学 物质 | 50% 抑制 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 染色体畸变试验 | | | | |
|--------|---------------------------------------|---------------------------------------|--------|--------|--------|-----|
| | | 最大作用浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$) | 畸变率(%) | 时间(小时) | 类 型 | 判 断 |
| 柔毛霉素 | 1 | 1 | 81 | 48 | gbtrfp | +++ |
| 丝裂霉素 C | 1.25 | 1.25 | 98 | 24 | gbtfp | +++ |
| 4-硝基喹啉 | 2 | 1 | 39 | 24 | gbtp | ++ |
| 甲基亚硝基胍 | 4 | 4 | 96 | 24 | gbtrfp | +++ |
| 聚乙烯醇 | 500 | 500 | 1 | 24 | p | - |

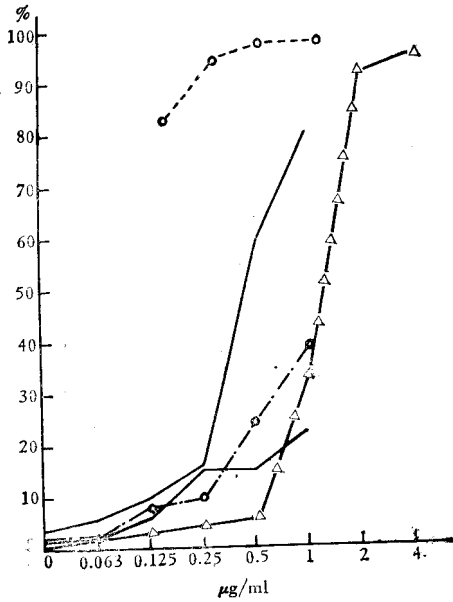


图 1 4 种化学药剂诱发的染色体畸变与剂量

—○— 柔毛霉素; ○---○ 丝裂霉素 C;
 ○—·—·—○ 4-硝基喹啉;
 △—△—△ 甲基亚硝基胍

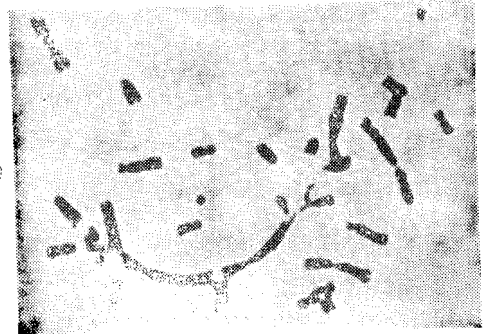


图 3 染色体单体易位和断裂
(Mitomycin C 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24h)



图 4 环状染色体
(Daunomycin 0.5 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 48h)

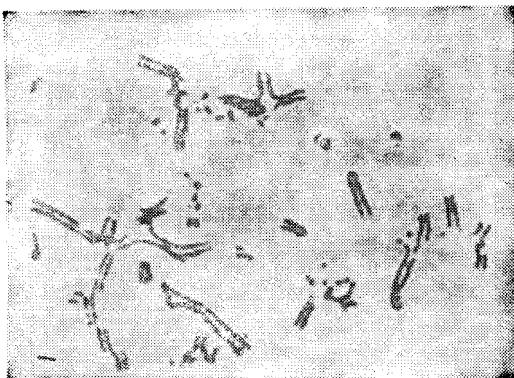


图 2 染色体单体断裂和易位
(MNGG 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24h)

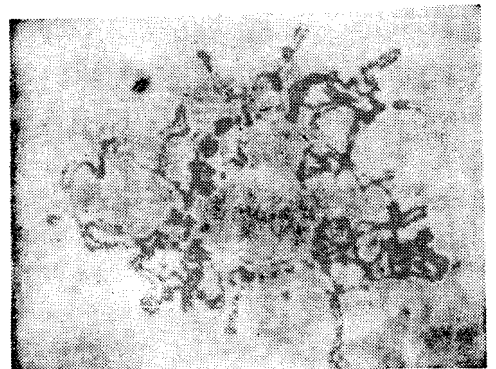


图 5 染色体粉碎化
(Mitomycin C 0.32 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 24h)

(二) 染色体畸变试验 表1显示5种化学药剂所诱发的染色体畸变率是不同的。丝裂霉素C、甲基亚硝基胍、柔毛霉素、4-硝基喹啉所诱发的染色体畸变率分别高达98%、96%、81%和39%，并有明显的剂量反应关系(表1,图1)。丝裂霉素C、甲基亚硝基胍、4-硝基喹啉所诱发的染色体畸变率的高峰在24小时,而柔毛霉素迟至48小时。聚乙烯醇所诱发的畸变率和对照组相仿,在正常范围内。

以上化学药剂所诱发的畸变类型主要有b、t、r、f、P(图2—5)。此外也有不同程度间隙。

讨 论

(一) 化学药剂对培养细胞的作用时间及所诱发的染色体畸变

由于各类化学药剂的稳定性和对细胞的作用方式不同,因此需要不同的作用时间。OECD^[1]规范中也要求24小时、48小时的不同取材法。Ishidate 累积的大量资料证实:不少致突变/致癌剂获得阳性结果的作用时间是48小时,而不是24小时。事实上柔毛霉素相当稳定,其生理盐水溶液在0℃或37℃经3星期而不失活,因此48小时的畸变率明显高于24小时。丝裂霉素C也较稳定,48小时作用更明显。因此在检测一种未知化学物质所诱发的染色体畸变时,需要不同的取材时间,一般24小时和48小时是必要的,以免导致假阴性结果。

化学物质主要诱发染色单体型和染色体型畸变^[2,9-10]。由于取材时间等影响,在实验条件下所观察到的主要是染色单体型畸变^[9-10]。本文所观察的化学药剂普遍诱发了染色单体断裂和易位,而且比例高,多倍体各组时有出现,但频度低。环状染色体及粉碎化一般少见。间隙的出现并无规律性变化,多数学者也不主张计入总的畸变率之内,本文亦未统计。

(二) 50% 细胞生长抑制试验的应用与剂量法则

在致突变试验中所采用的剂量极为重要,剂量过高时,毒性太大,实验无法进行。剂量过低时,容易导致假阴性。因此,如何确定待测化学物质恰当的最高剂量是实验成败的关键。目前,有的国际规范中已明确要求阐明设计最高剂量的理由^[1],也就是要可靠的指标,而不是随意设计。

在CHL系统中采用50%细胞生长抑制试验作为染色体畸变试验的预试验,以获得抑制50%细胞生长的剂量,并以这一剂量为基准,作为染色体畸变试验的最高剂量。本文所观察的丝裂霉素C等均用了这一剂量法则,并获得相当高的染色体畸变率。Ishidate 则报道了更多资料。因此,以50%细胞生长抑制剂量为基准,对多数化学物质是可取的。事实上有时因培养条件等影响,二者可相差1—2个剂量级,这也是允许的,因为通常需要采用3个以上测试浓度和必要的重复试验。

参 考 文 献

- [1] 大森義仁: 1981, OECD化学物质毒性试验,化学工业出版社, p. 579—609.
- [2] Adler, I. D. et al.: 1971. *Mutation Research*, 13: 263—273.
- [3] Ishidate, M., S. Odashima: 1977. *ibid.*, 48: 337—354.
- [4] Ishidate, M. et al.: 1978. *Bull. Natl. Inst. Hyg. Sci.*, 96: 55—61.
- [5] Ishidate, M. et al.: 1980. *Mutagens Toxicol.*, 12: 82—90.
- [6] Ishidate, M. et al.: 1981. *GANN, Monograph on Cancer Research*, 27: 95—108.
- [7] Ishidate, M. and K. Yoshikawa: 1980. *Arch. Toxicol., Suppl.*, 4: 41—44.
- [8] Koyama, H. et al.: 1970. *GANN*, 61: 161—167.
- [9] Legator, M. S. et al.: 1969. *Science*, 165: 1139—1140.
- [10] OECD Participants: 1982. *In ad Hoc Meeting on Mutagenicity*, in London, 22nd. March. p. 424—474.