

环氧乙烷的遗传毒性研究 XIII小鼠肝细胞 DNA 定量分析研究

王金茂¹ 张树人² 陆静芬² 钟 坤² 张 龄²

¹ 浙江医科大学 ² 上海职工医学院 200237

摘要 本研究应用 IBAS 显微数字图象分析系统,对不同剂量环氧乙烷(ethylene oxide, EtO)染毒小鼠的肝细胞核 DNA 含量进行测定的结果显示:染毒小鼠肝细胞核 DNA 的含量均较对照组增高。特别引起注意的是雄性染毒小鼠肝细胞核 DNA 的含量明显高于雌性,其中雄性染毒组与对照组、雄性染毒组与雌性染毒组之间,肝细胞核 DNA 含量的平均值比较,均有显著差异,经 K-S 检验结果 $P < 0.01$ 。据此可以提示:环氧乙烷不但可以引起实验小鼠肝细胞 DNA 的复制,诱发肝细胞抵近恶性变的倾向,而且雄性小鼠肝细胞对 EtO 的敏感性明显高于雌性。

关键词 环氧乙烷;肝细胞;DNA 定量分析

STUDY ON THE GENOTOXICITY OF ETHYLENE OXIDE XIII STUDY OF DNA QUANTITATIVE ANALYSIS IN THE MOUSE HEP- ATOCYTES

Wang Jinmao¹, Zhang Shuren², Lu Jingfen², Zhong Kun², Zhang Ling²

¹ Zhejiang Medical University, ² Shanghai medical College for Health Staff, Shanghai 200237

次分裂之间微核达到峰值,即培养 72h 左右。由于各实验室间培养条件不同以及受检个体差异等因素,峰值出现的时间也不同,影响结果的可靠性。CB 法是在转化的淋巴细胞在未完成第 1 次有丝分裂前,往培养体系里加 Cyt - B,使胞质分裂受抑而不影响胞核的分裂,涂片上所见的双核淋巴细胞(双核 CB 细胞)就是第 1 次有丝分裂细胞,此法进一步提高了微核测试法的灵敏度和可靠性,作者认为,对辐射损伤远后效应观察时,若以微核作为指标,最好采用 CB 法。

(致谢:物理剂量由黑龙江省卫生防疫站裴玉山教授等提供,牡丹江市职业病防治所杜玉银所长等对本工作给予大力支

持,在此一并致谢。)

参考文献

1. Almasy ZS, Krepinsky AB, Bianco A, et al. The present state and perspectives of micronucleus assay in radiation protection, A review. *Appl Radiat Isot*, 1987; 38(4):241
2. 白玉书,张秀霞,关树荣. ⁶⁰Co 线照射离体人血诱发的淋巴细胞微核与剂量的关系. *遗传*, 1982;4(3):7
3. Fenech M, Morley AA. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat Res*, 1985;147:29
4. 蒋本荣,张忠银. 人淋巴细胞浆分裂阻滞微核法的探讨. *军事医学科学院院刊*, 1990;14:132
5. 白玉书. 淋巴细胞微核估算受照剂量方法的标准化问题. *中华放射医学与防护杂志*, 1991;11(2):133
6. 白玉书,张秀霞,关树荣. 培养法与直接法外周血淋巴细胞微核率的比较研究. *遗传*, 1990;12(4):34

Abstract With the digital image analytic system, this study is to quantitate the DNA in hepatocytes nuclei of exposed mice with different doses of ethylene oxide. The results showed that the quantity of DNA in the hepatocytes nuclei of exposed groups is higher than that in the control group. It is worth noticing, the DNA quantity in male groups is obviously higher than that in the females. By comparing the male exposed groups with control group and the male exposed groups with female exposed groups, their DNA quantity in the nuclei of hepatocytes are both significant different. The K-S test $P < 0.01$. The data suggested that EtO not only caused the duplication of DNA in the experimental mice hepatocytes but also induced the tendency of approaching malignant changes in the hepatocytes. The hepatocytes in the male mice are more sensitive to EtO than those in the female.

Key words ethylene oxide; hepatocyte; quantitative analysis of DNA

环氧乙烷(ethylene oxide, EtO)被广泛应用于化学工业,并经常作为生活用品、医疗器材、食品及纺织品的消毒剂。EtO属烷化剂,不需经代谢活化就能与亲核大分子(DNA、RNA、蛋白质)直接发生反应。从国外关于EtO对微生物、植物、昆虫和哺乳动物的毒性研究报告⁽¹⁾和近年来我们的研究结果^(2,3)均证实了EtO是一种诱变剂、致癌剂。其诱变潜能是染色体异常及姐妹染色单体交换所能表达的,从而引起体细胞的突变和生殖细胞的遗传损伤。肝脏是机体进行生物转化的重要器官,也是癌症的好发器官。而EtO对肝细胞遗传物质的诱变,在国内外均未见报告,我们采用经典组织化学技术,使用显微数字图象分析仪,对不同浓度EtO染毒的实验小鼠肝细胞核的DNA含量进行测定,并与正常对照组小鼠肝细胞核的DNA含量对比,旨在探讨EtO对肝细胞的诱变作用。

材料和方法

1 材料

1.1 环氧乙烷,纯度为99%,由杭州电化厂提供。

1.2 静式染毒柜(1m³),由上海市劳动卫生职业病研究所提供。

1.3 实验动物,NIH种小鼠,购自上海生物制品研究所,体重16-18g。

2 方法

2.1 环氧乙烷浓度测定,气相色谱仪,氢焰检测器,色谱柱402担体(60-80目)⁽⁴⁾。

2.2 吸入染毒,小鼠36只(雌雄各半)随机分成二个染毒组和一个对照组。二染毒组的静式吸入EtO的浓度分别为54mg/m³和360mg/m³,每d吸入2h,每wk 6d,连续14wk。

2.3 处死小鼠后迅速取出肝脏,用手术刀切开后即将切面印于洁净的载玻片上,制成肝细胞印片,然后一次完成Feulgen染色。

2.4 应用德国Kontron公司生产的IBAS显微数字图象分析系统,测定肝细胞核DNA的含量,工作波长550nm,由复旦大学分析测试中心细胞分析室测试。测定方法为:待测标本置显微镜下定位后,由电视摄像系统将细胞图象输入计算机系统,同时显示于电视监视器上,在电视的监视下,对单个肝细胞核逐一计算其积分光密度(IOD)值,得出肝细胞核DNA的相对含量。对照组与二染毒组随机抽取雌雄各3例,每例至少测50个肝细胞,每组至少取200个肝细胞,以DNA相对含量为横坐标,细胞绝对数为纵坐标,绘制出DNA含量的直方图;同时算出各组雌、雄小鼠肝细胞核DNA含量的平均值进行比较。另测同一切片20个淋巴细胞,以其DNA含量均值为二倍体(倍体、C)标准。

结果

1 对照组雄性小鼠 3 例,测肝细胞 258 个, DNA 平均值 9.93 ± 7.83 ; 对照组雌性小鼠 3 例,测肝细胞 281 个, DNA 平均值 9.29 ± 6.59 ,二者之比,无显著差异, $P > 0.05$ 。

2 EtO 浓度为 $54\text{mg}/\text{m}^3$ 染毒组雄性小鼠 3 例,测肝细胞 345 个, DNA 含量平均值 11.13 ± 8.39 ; EtO 浓度为 $360\text{mg}/\text{m}^3$ 染毒组雄性小鼠 3 例,测肝细胞 223 个, DNA 含量平均值 13.25 ± 9.01 ,二染毒组与对照相比,均有显著差异, $P < 0.01$ 。

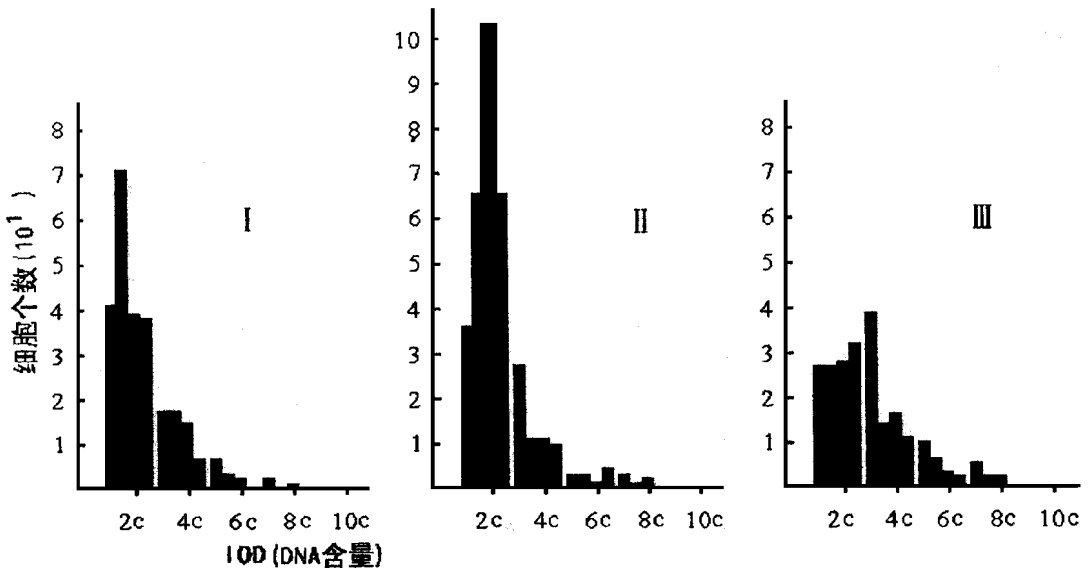
3 EtO 浓度为 $54\text{mg}/\text{m}^3$ 染毒组雌性小鼠 3 例,测肝细胞 401 个, DNA 含量平均值 9.72 ± 6.24 ; EtO 浓度为 $360\text{mg}/\text{m}^3$ 染毒组雌性小鼠 3 例,测肝细胞 205 个, DNA 含量平均值 10.05 ± 8.19 ,二染毒组与对照组均无显著差异, $P > 0.05$ 。

4 EtO 浓度为 $54\text{mg}/\text{m}^3$ 与 $360\text{mg}/\text{m}^3$ 的二染毒组,雌、雄小鼠肝细胞核 DNA 含量平均值之比,均有显著差异 $P < 0.01$ 。结果见表及附图 1、2。

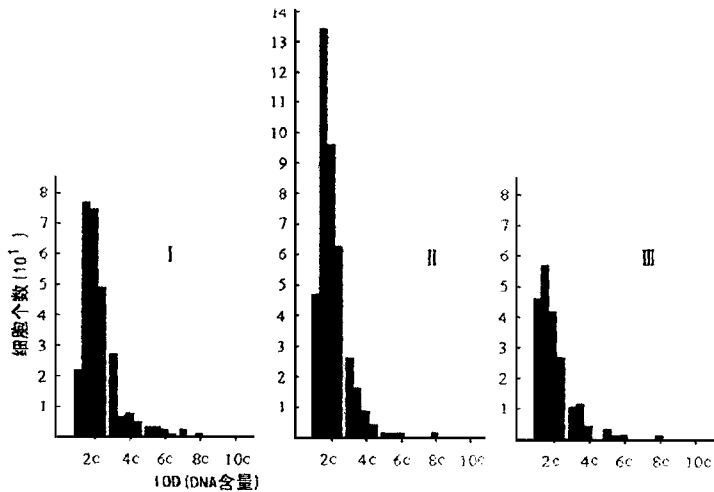
对照组与染毒组小鼠肝细胞 DNA 含量测定结果

EtO 浓度(mg/m^3)	性 别	细胞数	DNA 含量平均值($\bar{x} \pm s$)
0	♂	258	9.93 ± 7.83
0	♀	281	9.23 ± 6.59
54	♂	345	$11.13 \pm 8.39^*$
54	♀	401	9.72 ± 6.24
360	♂	223	$13.25 \pm 9.01^*$
360	♀	205	10.05 ± 8.19

* 与对照组比 $P < 0.01$ 。



附图 1 ♂对照组肝细胞() ♂ $54\text{mg}/\text{m}^3$ 染毒组肝细胞() ♂ $360\text{mg}/\text{m}^3$ 染毒组肝细胞() DNA 含量直方图



附图2 对照组肝细胞() 54mg/m³染毒组肝细胞() 360mg/m³染毒组肝细胞()DNA含量直方图

讨论

细胞核是细胞的中心,细胞形态和功能上的任何变化,必定是以细胞核中DNA的变化为先导。因而细胞中DNA量的变化,能直接反映细胞的增殖和染色体的变化^(5,6),许多学者的研究证实,肿瘤细胞的DNA含量和倍体的类型,可以作为恶性肿瘤早期诊断和分级的一个量化指标⁽⁷⁻¹⁰⁾。肝细胞不典型增生及肝癌细胞核DNA含量测定的研究以及其它许多学者的研究,都报告了处于癌前增殖状态的细胞DNA含量水平呈现为高出正常细胞,并抵近肿瘤细胞的倾向,即从正常细胞到异型增生细胞到癌细胞,细胞核中的DNA含量平均值呈递增变化^(11,12)。

本文对EtO染毒小鼠肝细胞DNA含量测定的研究显示:二种浓度EtO染毒组小鼠肝细胞核DNA的含量均高于正常对照组,且DNA含量随着EtO浓度的增高而递增,尤其在雄性小鼠显得更为突出,与对照组比较有显著的差异,提示EtO对实验小鼠肝细胞具诱变性、致癌性。而雄性小鼠肝细胞对EtO的敏感性明显高于雌性,二者比较亦有显著的差异,其原因与机理尚待进一步研究。(致谢:本工作得到复旦大学测试中心金承志、汪萍萍二位

先生及上海市卫生学校夏国兴、方芳、姚和翔三位先生的帮助,一并致谢。)

参考文献

1. Dellarco V, Generoso WM, Sega GA, et al. Review of the mutagenicity of ethylene oxide. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1990;16(2):85
2. 张龄, 钟坤, 陆静芬, 等. 环氧乙烷遗传毒性研究. 小鼠精子畸形试验. 癌变·畸变·突变, 1994;6(1):16
3. 陆静芬, 张龄, 夏国兴, 等. 环氧乙烷遗传毒性研究. 小鼠骨髓细胞染色体畸变亚急性性试验. 癌变·畸变·突变, 1995;7(2):101
4. 杭世平, 徐伯洪, 虞爱如, 等. 空气中有害物质测定法. 北京人民出版社, 1986:527-528
5. Barlogie B, Drewinko B, Schumann J, et al. Cellular DNA content as a marker of neoplasia in man. *Am J Med*, 1980;69:195
6. Ljungberg B, Stenling R, Roos G. DNA content in renal cell carcinoma with reference to tumor heterogeneity. *Cancer*, 1985;56:503
7. Barlogie B, Martin N, Raber MN, Schumann J, et al. Flow cytometry in clinical research. *Cancer Res*, 1983;43:3982
8. Ezake T, Kanematsu T, Okamura T, et al. DNA analysis of hepatocellular carcinoma and clinicopathologic implications. *Cancer*, 1988;61:106
9. 刘复生. 早期食道癌上皮的DNA分析. 中华肿瘤杂志, 1988;10:26
10. 李文彬, 刘萍, 王光明, 等. 肝癌细胞核DNA含量研究. 中华病理学杂志, 1991;20(3):227
11. 丛文铭, 吴孟超, 张秀忠. 肝细胞不典型增生DNA含量及其形态特征的定量研究. 癌变, 1988;7(3):177
12. 王仰坤, 董荣春, 黄明州. 胃粘膜腺体扩张和胃癌细胞核DNA含量的测定. 中华病理学杂志, 1993;22(6):356