

## 基因重组人碱性成纤维细胞生长因子(rh-bFGF)致突变研究

马明福<sup>1</sup> 李练兵<sup>1</sup> 蔡敏<sup>1</sup> 李新生<sup>1</sup> 曾维三<sup>1</sup> 廖明阳<sup>2</sup> 王治乔<sup>2</sup>

<sup>1</sup>重庆市计划生育科学研究所 重庆 400020 <sup>2</sup>军事医学科学院毒物药物研究所 北京 100850

**摘要** 本文用 Ames 试验,体外染色体畸变试验和微核试验对 rh-bFGF 进行了致突变性研究。结果显示,rh-bFGF 的各剂量组对 TA<sub>97</sub>、TA<sub>98</sub>、TA<sub>100</sub>、TA<sub>102</sub>菌株在  $\pm S_{9mix}$ 条件下无致突变性;在  $\pm S_{9mix}$ 条件下的染色体畸变试验中,rh-bFGF 的 4 个剂量浓度对 CHL 细胞染色体无畸变作用;以 0.53mg/KG·bw、2.13mg/KG·bw、8.50mg/KG·bw、34.0mg/KG·bw 的 rh-bFGF 对小鼠骨髓多染红细胞无诱发微核增加作用。实验结果表明,rh-bFGF 无致突变作用。

**关键词** rh-bFGF; Ames 试验;染色体畸变;微核;突变

## STUDY ON MUTAGENICITY ON RECOMBINANT HUMAN BASIC FIBROBLAST GROWTH FACTOR

Ma Mingfu<sup>1</sup>, Li Lianbing<sup>1</sup>, Cai Min<sup>1</sup>, Li Xinsheng<sup>1</sup>, Zeng Weisan<sup>1</sup>, Liao Mingyang<sup>2</sup>, Wang Zhiqiao<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Chongqing Family Planning Scientific Research Institute, Chongqing 400020 <sup>2</sup>Institute of Pharmacology and Toxicology, Academy of Military Medical Sciences, Beijing 100850

退潮水样的诱变率均未超过 2。虽然 1 号样的 SOS 反应为阳性,它的化学污染综合评判的数值却是最小的(0.0236375)。5 号水样的综合评判的数值最大(0.038754),而其诱变性和 SOS 反应却都是阴性的。

如果将退潮水和涨潮水一起进行比较,则具有细菌遗传毒性的 6 号水样(涨潮水)与未达到阳性诱变标准的 5 号水样(退潮水)的综合评判结果的数值非常接近(0.038754 与 0.038232)。这是生物学试验与化学检测的不同之处。

本文的定量和定性分析结果表明:细菌遗传毒性试验与常规化学测试在揭示水体污染程度和性质方面作用是互为补充的。模糊综合评判法的应用可作为比较生物学试验和化学测试结果的一种方法。

(美国的 Ames 博士、法国 Philippe Quillardet 和 Maurice Hofnung 博士提供菌株;本系毕业生叶健儿、谭雪青、李胜兰、黄志勇、许德恒、陈志青参加部分实验工作,在此表示感谢)。

### 参考文献

- 1 朱惠刚. 水中有机化学污染物对人体影响评价. 中国环境科学, 1987;7(4):67
- 2 王文基,陆寿珍,王爱玲,等. 黄浦江水中化学污染物分析与生物毒

传毒性研究. i. b. i. d, 1990;10(6):434

- 3 许世琼,朱惠刚,杨铭鼎,等. 水质致突变性评价基准初控. 上海环境科学, 1989;8(7):9
- 4 冯霄,陆寿珍,陈中孚. SOS 显色法检测黄浦江不同江段水中有机污染物的遗传毒性. 复旦学报(自然科学版), 1990;29(12):198
- 5 Maron DM and Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983;113:173
- 6 Quillardet, Philippe and Marice Hofnung. The SOS Chromotest, a colorimetric bacter assay for genotoxins: Procedures. *Mutat Res*, 1985;147:65
- 7 罗承忠. 模糊集引论. 北京:北京师大出版社, 1989
- 8 朱惠刚,蒋颂辉. 水源水和自来水致突变性研究. 中国环境科学, 1984;4(4):71,60
- 9 王家玲,朱梁金,杨晓萍,等. 水中非挥发性有机物致突变性的研究. i. b. i. d. 1987;7(1):24
- 10 钱黎明,林伟华,王伟彤,等. 用 Ames 试验和 SOS 显色法研究水源水有机提取物的遗传毒性. 癌变 畸变 突变, 1994;6(1):25
- 11 韩发彬,等. 用 Ames 试验和 SOS 显色试验对污染河水及沿岸井水的遗传毒性. 中国环境科学, 1991;4(11):285
- 12 盛祖嘉. 微生物遗传学. 第二版. 北京:科学出版社, 1987:130
- 13 McMahon RE, et al. Assay of 855 chemicals in ten tester strains using a new modification of the Ames test for bacterial mutagens. *Cancer Res*, 1979;39(3):682

(1999 - 04 - 28 收稿;1999 - 05 - 05 接受)

**Abstract** This paper reported the research results of mutagenicity of rh-bFGF. The results showed that rh-bFGF at 5 doses of 0.1 - 500 $\mu$ g/plate did not induce positive mutation of strains TA<sub>97</sub>、TA<sub>98</sub>、TA<sub>100</sub> and TA<sub>102</sub> with or without S<sub>9</sub><sub>mix</sub> in the Ames Test. The rates of CHL Chromosome aberrations of rh-bFGF at 4 doses were negative range (< 5%). The rates of micronucleus assay of polychromatic erythrocytes in mice of rh-bFGF at doses of 0.53 $\mu$ g/ KG·bw, 2.13 $\mu$ g/ KG·bw, 85 $\mu$ g/ KG·bw, 34 $\mu$ g/ KG·bw would not be to induce increase of its micronuclei. It is proved that rh-bFGF would not be any mutagenicity in this experiment.

**Key Words** rh-bFGF; Ames test; Chromosome aberration; Micronucleus; Mutation

基因重组人碱性成纤维细胞生长因子(recombinant human basic Fibroblast Growth Factor, rh-bFGF)是广州微观生物工程公司、暨南大学生物工程研究所研制的基因工程药物,有促进受损神经、血管、肌肉、皮肤等的修复作用。为了确保用药的安全性,进一步了解 rh-bFGF 是否有潜在的危险性,对该药进行了致突变研究。

## 材料与方法

1 测试物 rh-bFGF 为白色粉末,易溶于水,纯度 93.71%,批号 960312,由广州微观生物工程公司、暨南大学生物工程研究所提供。

2 Ames 试验 TA<sub>97</sub>、TA<sub>98</sub>、TA<sub>100</sub>、TA<sub>102</sub>组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门氏菌由美国 Ames 实验室提供,采用标准平皿掺入法<sup>(1)</sup>在  $\pm$ S<sub>9</sub><sub>mix</sub> 条件下进行实验。rh-bFGF 剂量分别为 500 $\mu$ g/皿、250 $\mu$ g/皿、100 $\mu$ g/皿、10 $\mu$ g/皿、1 $\mu$ g/皿、0.1 $\mu$ g/皿,同时设空白对照、辅料对照、溶剂对照、S<sub>9</sub><sub>mix</sub>对照和阳性对照,每一剂量组均做 3 皿,重复实验 2 次。37 培养 48h 后记录回变菌落数,计算其均值及标准差( $\bar{x} \pm s$ ),判断 rh-bFGF 是否诱发回变菌落数增加。

3 哺乳动物细胞染色体畸变试验 实验选用中国仓鼠肺成纤维细胞(CHL),由华西医科大学公共卫生学院提供。根据 Matsuoka<sup>(2)</sup>和 Ishidate<sup>(3)</sup>方法先测定半数抑制浓度(IC<sub>50</sub>),结果为 53 $\mu$ g/ml,根据所测 IC<sub>50</sub>值,分别设 rh-bFGF 53 $\mu$ g/ml、26.5 $\mu$ g/ml、13.25 $\mu$ g/ml、6.625 $\mu$ g/ml 4 个剂量组,同时设空白对照、辅料对照、溶剂对照、阳性对照(-S<sub>9</sub><sub>mix</sub>, MMC 0.2 $\mu$ g/ml, +S<sub>9</sub><sub>mix</sub>, CP 60 $\mu$ g/ml)。实验在  $\pm$ S<sub>9</sub><sub>mix</sub> 条件下进行。直接法:加药后(-S<sub>9</sub><sub>mix</sub>)分别于 24h 和 48h 收获细胞,制备染色体。间接法:加药同时加 S<sub>9</sub><sub>mix</sub>(0.05ml/

ml),作用 6h 后换液 1 次,培养 24h 和 48h 收获细胞,收获细胞前 4h 加秋水仙素(0.4 $\mu$ g/ml),胰酶消化,制片,每组观察 100 个中期细胞,记录出现的各类染色体畸变类型,计算畸变率(%).判定标准为染色体畸变率 < 5% 为阴性(-),畸变率 > 5% 为可疑( $\pm$ ),畸变率 > 10% 为阳性(+),畸变率 > 20% 为阳性( $\#$ ),畸变率 > 50% 为阳性( $\#\#$ )。

4 小鼠骨髓细胞微核试验 选用 NIH 雄性小鼠 72 只(动物由重庆医科大学实验动物中心提供,合格证号 24301042),体重 22.5  $\pm$  1.5g,随机分组,每组 6 只。预试验设 rh-bFGF 34 $\mu$ g/ KG·bw 为最高剂量(由于未测得 LD<sub>50</sub>,采用人临床拟用量 200 倍),一次肌肉注射给药,于给药后 12h、24h、36h、48h、72h 取材,制片,观察 5 个时间点的微核细胞率<sup>(4)</sup>。实验将 rh-bFGF 分成 34 $\mu$ g/ KG·bw、8.5 $\mu$ g/ KG·bw、2.13 $\mu$ g/ KG·bw、0.53 $\mu$ g/ KG·bw,分别相当于临床拟用量 200 倍、50 倍、12.5 倍、3.118 倍。同时设空白对照、辅料对照、溶剂对照、阳性对照(CP 100mg/ KG),采用肌肉注射给药,在预试验 5 个时间点取材的基础上,确定实验在给药 24h 后处死动物,制片,Giemsa 染色,以双盲法每只动物计数 1 000 个嗜多染红细胞(PCE),同时镜检正染红细胞(NEC)数,以千分率表示。

## 结果与讨论

1 Ames 试验 rh-bFGF 各剂量组对鼠伤寒沙门氏菌 TA<sub>97</sub>、TA<sub>98</sub>、TA<sub>100</sub>、TA<sub>102</sub> 诱发的回变菌落数见表 1,结果显示,在  $\pm$ S<sub>9</sub><sub>mix</sub> 条件下对 4 个菌株诱发的回变菌落数均未超过对照 2 倍,为阴性结果。表明 rh-bFGF 在 0.1 - 500 $\mu$ g/皿时对沙门氏菌无致突变作用。

表 1 rh-bFGF 的 Ames 试验结果 ( $\bar{x} \pm s$ ) \*

剂 量 μg/ml	TA <sub>97</sub>		TA <sub>98</sub>		TA <sub>100</sub>		TA <sub>102</sub>	
	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>	- S <sub>9</sub>	+ S <sub>9</sub>
500	145.56 ±8.04	145.11 ±9.06	47.33 ±6.57	52.00 ±6.67	182.88 ±10.00	200.00 ±16.65	254.33 ±18.90	255.00 ±17.54
250	146.77 ±12.01	163.00 ±9.80	50.55 ±4.03	51.56 ±5.72	176.67 ±24.64	198.55 ±13.90	260.00 ±12.68	257.00 ±17.04
100	149.33 ±15.42	141.22 ±9.41	47.44 ±5.72	47.00 ±7.46	168.67 ±7.51	186.00 ±6.68	247.00 ±15.45	247.88 ±10.82
10	196.44 ±10.22	143.77 ±5.47	47.11 ±4.70	52.11 ±6.97	173.83 ±15.79	212.00 ±13.07	257.88 ±11.11	251.44 ±23.60
1	144.00 ±12.50	142.87 ±7.41	41.00 ±5.45	43.88 ±3.76	172.80 ±18.08	205.11 ±26.60	233.78 ±9.13	261.00 ±10.78
0.1	146.67 ±9.13	149.88 ±5.79	43.11 ±5.46	47.00 ±7.40	174.33 ±16.36	202.77 ±24.77	248.67 ±14.48	260.88 ±12.63
0	147.11 ±11.49	141.67 ±9.44	40.22 ±2.63	41.88 ±5.41	175.00 ±14.40	187.44 ±22.55	247.88 ±10.76	250.77 ±12.78
溶剂对照	135.44 ±12.78	153.22 ±13.59	41.78 ±7.13	44.11 ±6.25	166.29 ±12.59	165.93 ±9.51	247.55 ±14.31	251.11 ±11.99
辅料对照	142.44 ±9.81	140.44 ±18.54	43.22 ±7.60	40.33 ±4.66	178.67 ±8.87	160.22 ±20.56	240.89 ±14.33	245.77 ±28.41
S <sub>9</sub> mix 对照	-	142.67 ±10.97	-	46.78 ±5.91	-	195.36 ±24.23	-	260.24 ±11.60
阳性对照	MMS0.5μl	2-AF10μg	Dau10μg	2-AF10μg	MMS1μg	2-AF10μg	MMS1μl	L8-Dan60μg
	1262.56 ±285.97	1051.55 ±324.72	824.78 ±71.17	786.22 ±53.14	1249.11 ±140.17	1849.11 ±96.91	1279.00 ±168.15	891.7 ±197.03

\* N=9(每一剂量 ±S<sub>9</sub> 各 9 皿)

2 染色体畸变试验 rh-bFGF 各剂量组的染色体畸变分析见表 2,结果显示,在 ±S<sub>9</sub>mix 条件下,rh-bFGF 在 6.625 - 53μg/ml 4 个剂量浓度范围对 CHL 细胞染色

体畸变率无影响,染色体畸变率均在正常范围内。结果表明,rh-bFGF 无诱发 CHL 细胞染色体损伤的作用。

表 2 rh-bFGF 的 CHL 细胞染色体畸变试验结果

受试物	剂量 (μg/ml)	- S <sub>9</sub> (24hr)				- S <sub>9</sub> (48hr)				+ S <sub>9</sub> (24hr)				+ S <sub>9</sub> (48hr)			
		细胞 个	染色体畸变			细胞 个	染色体畸变			细胞 个	染色体畸变			细胞 个	染色体畸变		
			%	类型	判定		%	类型	判定		%	类型	判定		%	类型	判定
rh-bFGF	6.625	100	3	n.ab *	-	100	2	n.ab	-	100	-	-	-	100	-	-	-
rh-bFGF	13.25	100	1	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	-	-	-	100	1	n.ab	-
rh-bFGF	26.50	100	4	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	-	-	-
rh-bFGF	53.00	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
辅料对照	1131.55	100	2	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	2	n.ab	-	100	1	b	-
溶剂对照	0.02 **	100	-	-	-	100	3	-	-	100	-	-	-	100	-	-	-
空白对照	0	100	-	-	-	100	1	-	-	100	-	-	-	100	1	del	-
阳性对照																	
MMC	0.20	100	27	***	##	100	44	***	##								
CP	60.00									100	44	***	##	100	51	***	##

\* 数目畸变 \*\* ml/ml \*\*\* 主要畸变类型为 b,f,r,qr,tr,del,pvz

3 小鼠骨髓微核试验 rh-bFGF 34μg/KG·bw 在 12 - 72h 微核试验结果见表 3,各时间点的微核细胞率与空白对照比较,无显著差异, P > 0.05。其余各剂量组的实验结果见表 4,结果显示,rh-bFGF 随剂量的增加,均未见微核细胞率增加,表明 rh-bFGF 对小鼠骨髓 PCE 无诱发微核增加作用。

表 3 rh-bFGF 不同时间的微核率 ( $\bar{x} \pm s$ ) \*

时间 (hr)	PCE (个)	MN (个)	MNF (%)	$\frac{PCE}{PCE+NCE}$ (%)
0	6 000	21	3.50 ±0.55	72.03
12	6 000	19	3.17 ±1.17	71.36
24	6 000	23	3.83 ±0.75	74.34
36	6 000	19	3.17 ±0.75	76.15
48	6 000	18	3.00 ±0.63	74.56
72	6 000	18	3.00 ±2.19	77.79

\* 剂量 34μg/KG

## 用细胞转化实验检测 S 江有机污染致癌危险性

刘家仁<sup>1</sup> 庞永珣<sup>1</sup> 张尤恩<sup>1</sup> 范春<sup>1</sup> 王贤珍<sup>1</sup> 朱振岗<sup>1</sup> E.J. Love<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 哈尔滨医科大学公共卫生学院 哈尔滨 150001 <sup>2</sup> Department of Community Health Sciences, Faculty of Medicine, The University of Calgary, Canada

**摘要** 用 S 江冬夏两季的江水有机提取物分别做 NIH3T3 细胞转化试验。结果表明:江水有机提取物各剂量组均能诱发该细胞出现典型的细胞转化灶,其细胞转化率呈现剂量—反应关系。转化细胞的恶性表现是生长失去接触性抑制并能在软琼脂内生长。进一步提示了 S 江有机污染有潜在的致癌危险性。

**关键词** 有机污染;NIH3T3 细胞转化;致癌性

## EVALUATION ON CARCINOGENIC RISK FROM ORGANIC POLLUTION IN THE S RIVER BY CELL TRANSFORMATION

Liu Jiaren<sup>1</sup>, Pang Yongxun<sup>1</sup>, Zhang Youen<sup>1</sup>, Wang Xianzhen<sup>1</sup>, Fan Chun<sup>1</sup>, Zhu Zhengang<sup>1</sup>, E.J. Love<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Department of Environmental Health of Harbin Medical University, Harbin 150001, <sup>2</sup> Department of Community Health Sciences, Faculty of Medicine, The University of Calgary, Canada

表 4 rh-bFGF 不同时间的微核率( $\bar{x} \pm s$ )

组别	剂量 ( $\mu\text{g}/\text{kg}$ )	PCE (个)	MN (个)	MNF (%)	$\frac{\text{PCE}}{\text{PCE} + \text{NCE}}$ (%)
rh-bFGF	0.53	6 000	17	2.83 $\pm$ 0.75	77.90
rh-bFGF	2.13	6 000	13	2.17 $\pm$ 0.98	76.20
rh-bFGF	8.50	6 000	14	2.33 $\pm$ 0.82	79.31
rh-bFGF	34.00	6 000	23	3.83 $\pm$ 0.75	74.34
辅料对照	690.00	6 000	13	2.17 $\pm$ 0.75	77.26
溶剂对照	10.00 *	6 000	15	2.50 $\pm$ 0.55	79.47
空白对照	0	6 000	21	3.50 $\pm$ 0.55	72.03
阳性对照	100.00 * *	6 000	362	60.33 $\pm$ 20.11	97.27

\* ml/kg      \* \* mg/KG

本研究采用的 Ames 试验、染色体畸变试验、微核试验,分别从基因突变和染色体畸变、体外和体内试验、真核细胞和原核细胞等方面对 rh-bFGF 的致突变性进行了评价。在 Ames 试验中,得到 rh-bFGF 的最大溶解度为 5000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ,若再加大浓度测

溶解困难,因此,本试验的最高剂量为 500 $\mu\text{g}/\text{皿}$ ,未见诱发回变菌落数增加。结果表明,在本试验条件下所研究的 rh-bFGF 无诱发鼠伤寒沙门氏菌突变作用;对 CHL 细胞染色体无损伤作用;对小鼠骨髓 PCE 微核细胞率无增加作用,即 rh-bFGF 无致突变作用。

### 参考文献

- 1 Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test. *Mutat Res*, 1983;113(4):173
- 2 Matsuoka, Hayashi, Ishidate. Chromosomal aberration tests on 29 chemicals is combined with  $S_{9\text{mix}}$  in vitro. *Mutat Res*, 1979;66:277
- 3 Ishidate M. The date book of chromosomal aberration tests in vitro on 587 chemical substance using a Chinese hamster fibroblast line (CHL cell). Tokyo: The Realize Inc, 1983:1
- 4 中华人民共和国卫生部药政局编. 临床前研究指导原则汇编(药理学、毒理学、毒理学)致突变试验. 北京:211-216  
(1998-10-28 收稿;1999-03-01 修回)