

二甲基呋喃酮的雄性小鼠生殖细胞中的遗传毒性效应

田庆伟 李袭丽 沈 军 王永明

天津医学院卫生系

二甲基呋喃酮化学名称 4-羟 2, 5-二甲基-3(2H)呋喃酮[4-Hydroxy-2, 5-dimethyl-3(2H)furanone]、简称 HDMF。本品为目前国外公认安全的食品添加剂(安全号为 FEMA: 3174, COF: 536⁽¹⁾), 已广泛应用于食品、饮料、烟草、化妆品和医药等工业, 我国早有进口。继1988年邢邦华等⁽²⁾首次报道 HDMF 有致突变活性后, 姚小曼等⁽³⁾(1990)报告了HDMF小鼠胎肝血微核为阳性结果。李袭丽等⁽⁴⁾1991年发现HDMF对SOS显色试验、枯草杆菌重组试验及标准品系OK果蝇致畸初筛均为阳性结果, 并有明显剂量反应关系。鉴于有关HDMF对生殖细胞影响报道较少, 本文以雄性小鼠生殖细胞微核和SCE形成探讨了HDMF对生殖细胞的潜在致突变作用。

材料和方法

1. 受试物 HDMF 系天津市化学试剂研究所提供的瑞士Firmenich公司产品。

2. 实验动物 封闭群昆明种雄性小鼠, 体重22-28g, 由本教研室动物房提供。

3. 方法

3.1 小鼠精原细胞姊妹染色单体互换(SCE)实验

15只小鼠随机分为五组, 每组各3只。高、中、低三个剂量组分别按800、400、200mg/kg(分别相当于LD₅₀的1/2、1/4和1/8)径口灌胃给予受试物。阳性对照组经腹腔注射给予40mg/kg环磷酰胺, 阴性对照径口给予等容量蒸馏水。染色单体IUdR标记、染毒时间、睾丸组织处理、制片及差别染色

等基本参照吕群⁽⁵⁾等方法(略去胶原酶预处理步骤)进行。油镜下观察每只动物25个第二周期中期分裂相。计数标准为, 凡在染色体端部出现的交换记为一次SCE, 在染色体中间出现的交换记为两次SCE。计算出每个细胞中平均SCE频率, 以Dunnetts t检验⁽⁶⁾进行统计学处理。

3.2 小鼠早期精细胞微核试验 实验小鼠随机分为五组, 每组各4只。各实验组给药剂量与方式同精原细胞SCE, 阳性对照组腹腔注射环磷酰胺80mg/kg, 阴性对照组给予蒸馏水制片按Tates法⁽⁷⁾经简化、修改⁽⁸⁾的方法进行, 即于染毒14天以颈椎脱臼法处死小鼠, 取一侧睾丸, 在10ml睾丸分离培养液中去被膜、剪碎, 于31-33℃水浴中加入骨胶原酶(Collagenase type I, Sigme)5mg, 15min后加透明质酸酶(Hyaluronidase, 上海生物化学制药厂生产)5mg, 7-8min后以一层擦镜纸过滤于离心管, 1000rpm离心5min, 推片法制片, 固定、Giemsa染色、镜检。油镜下计数每只动物1000个圆形核的早期精细胞, 记录微核细胞数并计算微核率。各实验组结果与对照组比较, 经平方根转换后进行Dunnetts t检验。

结果

1. 精原细胞SCE

小鼠精原细胞SCE实验结果如表1所示。HDMF高、中、低三个剂量组与阴性对照组相比, 差别均有显著性, 且存在剂量反应关系, 高剂量组(800mg/kg) SCE频率已超过基线的2倍, 呈现阳性结果。

表 1 HDMF 小鼠体内精原细胞SCE结果

剂 量 (mg/kg)	动物数	观察细胞		SCE/ce11 (M ± SE)
		总数	SCE 总数	
阴性对照	3	75	85	1.13 ± 0.12
200	3	72	139	1.85 ± 0.14*
400	3	75	180	2.40 ± 0.29**
800	3	75	298	3.97 ± 0.33**
阳性对照	3	75	851	11.35 ± 0.48

• 与阴性对照组相比较P<0.05

•• 与阴性对照组相比较P<0.01

2. 早期精细胞微核试验

结果如表2所示。HDMF 各剂量组与阴性对照相比较，差别均有统计学显著意义 (P<0.05, P<0.001)，剂量效应关系不明显，但800mg/kg组微核率与对照组比较P<0.001。

表 2 HDMF 小鼠早期精细胞微核试验结果

剂 量 (mg/kg)	检查细胞数	微核细胞数	微核率(%)
0	4000	2	0.50 ± 0.58
200	4000	7	1.75 ± 0.91*
400	4000	6	1.50 ± 0.83*
800	4000	11	2.75 ± 1.25**
阳性对照	4000	21	5.25 ± 1.37

• P<0.05

•• P<0.001

讨论

目前，环境中有害物质的生物检测较多地利用了SCE检测体系。其中以离体的体细胞测试者为多，活体测试较少，尤其是活体生殖细胞的测试更少。而从个体水平的遗传学效应来说，对子代产生直接影响的是生殖细胞，并非体细胞。所以各种有害物质对生殖细胞的作用以及为子代的影响更应引起人们的关注。活体生殖细胞测试可以作为这一目的的可靠指标。Allen等⁽⁹⁾于1976年首先建立了活体精原细胞姊妹染色单体差别染色法，1981年吕群等⁽⁵⁾将方法简化改进。本文在以上基础上略加改进，所观测的SCE基线

频率及阳性对照物SCE频率与国内外报道⁽¹⁰⁾基本一致。

目前国内多数实验室检测环境理化因子对哺乳动物雄性生殖细胞染色体损伤多采用初级精母细胞中期相染色体畸变分析的方法，此法费时费力，易发生误差。本文采用的早期精细胞微核检测是一种理想的简易检测雄性生殖细胞染色体损伤的方法，可广泛用来检测依赖于S期的化学物的染色体损伤效应⁽¹¹⁾。

HDMF于1965年首次从菠萝中发现并分离出单体，1973年美国人工合成该品后一直作为公认安全的食品添加剂而广泛应用。本文以两项雄性小鼠活体生殖细胞检测指标所观察到的阳性结果，进一步验证了邢邦华等人的结论，并突出表明了HDMF对哺乳动物雄性生殖细胞的遗传毒性效应，应引起有关部门的足够重视。

参考文献

1. Bruce KB, Flavor and Fragrance Materials USA; Allured Publishing Corporation, 1985; 118
2. 邢邦华, 等. 二甲基呋喃酮致突变活性的研究. 中华预防医学杂志, 1988; 22(2): 85
3. 姚小曼, 等. 孕鼠骨髓和胎鼠肝血嗜多染红细胞中微核检出率的比较. 癌变畸变突变. 1990; 2(1): 33-34
4. 李袭丽等. 二甲基呋喃酮是否“公认安全”? (待发表) 1991;
5. 吕群等. 小鼠活体精原细胞姊妹染色单体互换测定. 科学通报. 1981; 21: 1327-1329
6. 郭祖超主编. 医用数理统计方法. 第3版. 北京. 人民卫生出版社. 1988; 266-269
7. Tates AD, et al. A micronucleus method for detection of meiotic micronuclei in male germ cells of mammals. Mut Res 1983; 121: 131
8. 徐惟安等. 丝裂霉素 C 对小鼠早期精细胞的微核效应. 浙江医科大学学报. 1989; 18(3): 118-119
9. Allen JW & LattS A. Analysis of sister (下转第31页)

体畸变和姐妹染色单体交换率明显升高。尿砷、尿铅超标人员的外周血淋巴细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换率明显高于对照人群,并有随砷、铅在体内累积量增加而有升高趋势,这就进一步表明:砷、铅污染是导致人类染色体损伤的因素之一⁽⁶⁾范来富等⁽⁷⁾的七种金属致突变性的实验结果表明:当以不同浓度的氯化镍、氯化镉、硫酸镉、醋酸铅、硫酸锌、氯化汞、硫酸锰经腹腔注入小白鼠、观察到骨髓细胞的微核率和染色体畸变率增高,含Ag-NOR的染色体数目减少,并有剂量反应关系,这些金属的诱变活性依次为镉、汞、镍、锌、铅,因此认为上述金属是具有诱变作用的物质。彭沈一等⁽⁸⁾对砷、铅的联合致突变作用研究表明:在微核和枯草杆菌重组修复实验两种测试系统中,铅和砷都有明显的协同作用。铅可引起果蝇的基因突变,小鼠骨髓细胞的染色体断裂,数目异常,猕猴染色体断裂,同时也观察到引起人类染色体畸变等。⁽⁹⁾砷和其盐类可使培养的人淋巴细胞和成纤维细胞、小鼠、中国地鼠卵巢细胞的染色体畸变和姐妹染色单体交换率增高⁽¹⁰⁻¹⁴⁾因此广西大厂(马路、长坡、巴里),湖南香花岭(香¹、香²、香³)矿粉中所含有的砷、铅、镉、锡、铁、锌等元素是导致实验大鼠骨髓和肺巨噬细胞染色体损伤的重要因素之一。当然与个旧云锡的矿粉相比其诱变活性对较低。

参考文献

1. 刘爱华,贺维顺,等。五种云锡矿粉和四种金属化合物诱发大鼠骨髓和肺巨噬细胞的微核率。中国的遗传学研究 1986; P226。
2. 刘爱华,等。个旧锡矿工作人群外周淋巴细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换率的观察。中国的遗传学研究 1986; P382。
3. 贺维顺、刘爱华,等。云锡矿粉诱发大鼠骨髓细胞染色体畸变的研究。动物学研究1988; 9: (8)。
4. 赵桂芬,孙来华,等。云锡矿尘及氡子体暴露诱发大鼠肺癌的实验研究。辐射防护1987; 6: (3)。
5. 林圣州,等。金属致癌问题的研究近况。国外医学肿瘤学分册 1982; (5): 224。
6. 刘爱华,等。职业性接触铅、砷工人外周淋巴细胞染色体畸变和姐妹染色单体交换率的变化。动物学研究 1990; 11: (3)
7. 范来富,等。七种金属致突变性的实验研究。全国遗传学术会议交流资料 1984
8. 彭沈一,等。砷与铅的联合致突变作用。全国遗传学术会议交流资料 1984
9. Poma K, et al. Cytogenetic analysis of bone marrow cells and spermatogonia of meal mice after in vivo treatment with arsenic. Experimentia 1981; (37)
10. Paton GR, et al. Chromosomal damage in human cell cultures induced by metal salts. Mut. Res. 1972; 16: 332-336.
11. Burgdorf W, et al. Elevated sister chromatid exchange rates in lymphocytes of subjects treated with arsenic. Hum. Genet. 1977; 36: 69-72.
12. WU Nan-wen, et al. Baseline and sodium arsenite induced sister chromatid exchanges in cultured lymphocytes from patients with blackfoot disease and health persons. Hum. Genet. 1981; 59: 201-203.
13. Katsuhiko N, et al. Comparative studies of Chromosomal aberration induced by trivalent and pentavalent arsenic. Mut. Res. 1981; 88: 73-80.
14. Te-chang Lee et al. Sodium arsenic enhances the cytotoxicity clastogenicity and 6-thioguanine-resistant mutagenicity of ultraviolet light in Chinese hamster ovary cell. Mut. Res 1985; 148: 83-89.
10. 张忠恕,王仁礼。观察体内精原细胞SCE的新方法。生殖与避孕。1982; 2(1); 52-53
11. Lähdesmäki J, Meiotic micronuclei induced by adriamycin in male rats. Mut Res 1983; 119: 79-82

(上接第33页)

chromatid exchange formation in vivo in mouse spermatogonia as a new test system for environmental mutagens. Nature 1976; 260: 449