

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0008 - 04

α-筒箭毒碱对 V79 细胞和小鼠骨髓细胞有丝分裂的影响

和智君,汪旭

(云南师范大学生命科学系,云南昆明 650092)

摘要:目的:探讨烟碱型乙酰胆碱受体阻断剂 α-筒箭毒碱对 V₇₉细胞和小鼠骨髓细胞有丝分裂的影响。方法:在离体情况下以受试物处理中国仓鼠 V₇₉细胞,通过分析 V₇₉细胞晚末期和早 G₁期细胞核与细胞质构型、双核细胞频率,探讨受试物对细胞质分裂的影响;研究同时探讨了活体情况下,该化合物对小鼠骨髓细胞的 C-有丝分裂(C—M)效应,分析其对哺乳动物体细胞有丝分裂的影响。结果:α-筒箭毒碱能使 V₇₉细胞的晚末期—早 G₁期细胞核和细胞质分裂构型发生显著变化($P < 0.001$)、双核细胞的频率显著提高($P < 0.001$)。在小鼠骨髓细胞 C—M 效应分析中,该化合物除在低剂量组导致较明显的 C—有丝分裂细胞增加外($P < 0.05$),其他未见异常。结论:研究提示受试物可通过 N 型胆碱受体阻断过程对哺乳动物细胞质分裂的真实性产生影响;同时,该化合物还具有影响染色体正常分离的潜在能力。对胆碱受体功能的研究将有助于探索非整倍体产生的各种机制。

关键词:中国仓鼠 V79 细胞;α-筒箭毒碱;有丝分裂;非整倍体

中图分类号:R99.4 **文献标识码:**A

大得多(见表 2)。

表 2 不同人群集团 hGSTP1 Ile105 和 Val105 等位基因频率比较

人群集团	地域居民集团	Ile105	Val105
中国人	上海	0.813	0.187
	北京	0.806	0.194
	台湾	0.823	0.177
高加索人	美国	0.675	0.325
	英国爱丁堡	0.72	0.28
	澳大利亚	0.66	0.34

中国人人群中 GSTP1 基因多态性的情况与同一基因家族另外两个基因 GSTT1 和 GSTM1 的情况有所不同,在那两个基因的情况下,中国人群中不同亚人群虽然对于高加索人群都表现共同的特征,但是内部(例如上海人群和新加坡华人群间)也存在一定程度,甚至是统计显著性差异¹。

(致谢 本工作受德国联邦教育、研究、科学、技术部(BMBF)和中国科学院以及上海市卫生局基金的资助,谨致谢意。)

参考文献:

- 1 Shen JH, Lin GF, Yuan WX, et al. Glutathione S-transferase T1 and M1 genotype polymorphisms in the normal population of Shanghai J. *Arch Toxicol*, 1998,72:456-458.
- 2 林国芳,谭靖伟,沈建华.上海正常人群中谷胱甘肽 S-转移酶基因 T1 纯合缺失 J. *癌变 畸变 突变*,1998,10:345-348.
- 3 马晴雯,沈建华.人谷胱甘肽 S-转移酶 P1 基因及其人群多态性 J. *卫生毒理学杂志*, (综述,印刷中).
- 4 Harris MJ, Coggan M, Langton L, et al. Polymorphism of the P1 class glutathione S-transferase in normal population and cancer patients J. *Pharmacogenetics*, 1998, 8:27-31.
- 5 Watson MA, Stewart RK, Smith GBJ, et al. Human glutathione S-transferase P1 polymorphisms: relationship to lung tissue enzyme activity and population frequency distribution J. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 275-280.
- 6 Harries LW, Stubbins MJ, Forman D, et al. Identification of genetic polymorphisms at the glutathione S-transferase P1 locus and association with susceptibility to bladder, testicular and prostate cancer J. *Carcinogenesis*, 1997,18:641-644.

收稿日期:1999-05-30;修订日期:1999-07-29

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39660033);云南省科委国际合作计划(98C013)

作者简介:和智君(1974-),男(纳西族),云南,硕士研究生,研究方向:遗传毒理学。

汪旭(1959-),女,云南,硕士生导师,教授,研究方向:遗传毒理学。

STUDY OF MITOTIC EFFECTS OF α -TUBOCURARINE IN V₇₉ CHINESE HAMSTER CELLS AND IN MOUSE BONE MARROW CELLS

HE Zhi-jun, WANG Xu

(Department of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092, China)

Abstract : Purpose : The mitotic effects of α -tubocurarine in V₇₉ cells and mouse bone marrow cells was investigated in this study. α -tubocurarine is a antagonist to cholinergic receptors and inhibitor of nicotinic receptor. **Methods :** V₇₉ Chinese hamster cells were treated *in vitro* by α -tubocurarine. The alteration of late telophase-early G₁ configuration induced by this chemical was determined by analyzing of presence or lack of a cleavage furrow in late telophase and very early G₁ cells, the abnormal cytokinesis was investigated for the frequencies of binuclear cells in interphase cells. Simultaneously, we investigated the C-M effects of α -tubocurarine in mouse bone marrow cells. **Results :** The tested chemical disturbed mitotic coordination and significantly induced high frequency of binuclear cells in V₇₉ cell line ($P < 0.001$). There is no other distinguished abnormality in mouse bone marrow cells but significant enhance of C-M cells at low dose group. **Conclusion :** The results indicated that α -tubocurarine is able to inhibit mammal mitosis by blocking the function of nicotinic receptor. The malfunction of cholinergic and nicotinic receptors may be a mechanism of aneuploid induction.

Key words : V₇₉ hamster cell; mitosis; aneuploidy

已有研究指出,中国仓鼠 V₇₉ 细胞可产生大量的乙酰胆碱(Acetylcholine),乙酰胆碱及其受体参与了细胞质分裂的调控¹。如果乙酰胆碱及其受体介导的信号对细胞质分裂是至关重要的,阻断这些受体将导致双核细胞的形成。产生的双核细胞在继后的细胞分裂中易于导致纺锤体功能异常,使质裂受抑制,因此构成了细胞染色体异常分离的风险。

α -筒箭毒碱(α -Tubocurarine TUB)是烟碱型乙酰胆碱受体抑制剂,即 N 受体抑制剂²,此化合物主要用于精神病电休克辅助治疗及内镜镜检查,骨折、肌肉痉挛的治疗³。

细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB) 是真菌代谢产物,能够切断微丝并结合在微丝末端从而抑制肌动蛋白聚合,破坏微丝三维结构⁴,最终抑制细胞质分裂。本实验以细胞松弛素 B 作为胞质分裂抑制的阳性对照物。

本实验还以小鼠骨髓细胞 C—M 效应研究,初步分析了 α -筒箭毒碱对哺乳动物染色体分离的影响,秋水仙素(colchicine, COL)为相应对照。研究旨在探讨胆碱受体功能对非整倍体形成的影响,探索非整倍体产生的各种机制。

材料与amp;方法

1 受试物: α -筒箭毒碱购自 Sigma 公司,用前以 Hank's 液溶解,在 V₇₉ 测试中受试剂量为 6.8 - 55 μ g/ml。阳性对照物细胞松弛素 B,购自 Sigma 公司,用前以无菌 10% DMSO 溶解,剂量分别为 1.5 - 3 μ /ml, 10% DMSO 为相应溶剂对照。在小鼠骨髓 C—M 效应分析中, α -筒箭毒碱剂量为 0.063-0.125mg/kg;秋水仙素(4mg/kg)为阳性对照,用前均以无菌双蒸水配制。

2 方法

2.1 V₇₉细胞培养和处理:V₇₉中国仓鼠成纤维细胞购自中国科学院上海细胞生物学研究所细胞库。细胞以含 20% 新生牛血清、100IU/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、pH6.9 的 MEM 培养液培养。受试物处理前 24h 在 25ml 培养瓶接种 10⁶ 细胞进行单细胞培养,继后将培养液移弃,用 37 $^{\circ}$ 预热的 Hank's 平衡盐溶液(pH6.9)荡洗细胞 2 次,然后加入 4ml Hank's 平衡盐溶液并按剂量要求加入受试药物,37 $^{\circ}$ 处理 2h;处理后的细胞以 0.125% 的胰酶消化脱壁,800r/min 离心 3min,弃上清液,3-1 无水乙醇—冰醋酸固定液固定 10min,800r/min 离心 3min,将单细胞悬液滴于冷冻载片上,室温干燥,4% Giemsa 染色 8min。

镜检及分析标准参考文献⁵。简述如下:末期—G₁ 期细胞核和细胞质构型分析:每一样本检测

100 个染色质进入晚末期—早 G₁ 细胞,并根据染色质浓缩程度及胞质分裂的协调情况将其分为异常和正常构型。晚末期细胞具有质裂缢、早 G₁ 期细胞胞质完全分裂视为正常构型。双核细胞的检测:每一样本分析 1000 个间期细胞中双核细胞的频率。实验数据以 ² 校正测验进行统计学分析。

2.2 小鼠处理和骨髓取样 实验动物为雄性昆明种小白鼠,购自中国科学院昆明动物研究所,8-10 周龄,体重 25-30g。每剂量组设 5 只动物,鉴于动物的遗传同源性,所有溶剂对照归并为 1 组。以受试物腹腔注射动物,处理 1h 后断颈处死,取骨髓细胞常规染色体制片,空气干燥,5% Giemsa 染色 3min。C—M 效应分析手段同文献⁶,主要以下列三项指标分析。

(1) 有丝分裂指数 (Mitotic Index, MI):每一动物计数 1000 个骨髓细胞有丝分裂千分率,MI 改变以 MI 因子 (F_{MI}) 表示。

$$FMI = \frac{\text{处理动物 MI 平均值}}{\text{对照动物 MI 平均值}}$$

(2) C—有丝分裂细胞分析:每一动物分析 100 个中期细胞,根据染色体浓缩程度和姊妹染色单体间夹角的大小将其划分为 A-E 共 5 类,C-E 类细胞染色体浓缩加剧,姊妹染色单体间夹角增大,视为 C—有丝分裂细胞。其频率改变表示为 C-E 因子 (F_{C-E})。

$$F_{C-E} = \frac{\text{处理动物 C-E 类细胞频率平均值}}{\text{对照动物 C-E 类细胞频率平均值}}$$

(3) 后期频率分析:每一动物分析 100 个分裂细胞中后期百分率,后期频率降低表示为:

$$\frac{\text{处理动物平均后期百分率}}{\text{对照动物平均后期百分率}} \times 100\%$$

结果

实验结果见图表。

如表 1 所示,在 3μg/ml 剂量组,细胞松弛素 B 能极显著地诱发 V₇₉ 细胞晚末期—早 G₁ 期细胞核和胞质分裂构型异常,即产生 a-e⁵ 类细胞 (P < 0.001); 在 1.5μg/ml,该化合物也具有同样效应 (P < 0.05)。α-筒箭毒碱在 27.5μg/ml 和 55μg/ml 两个剂量组均极显著地诱发 V₇₉ 细胞晚末期—早 G₁ 期细胞核和胞质分裂构型异常细胞产生 (P < 0.001)。由表 2 得知细胞松弛素 B 在测试剂量范围内,使 V₇₉ 间期细胞中的双核细胞频率显著提高 (P < 0.001); α-筒箭毒碱在 27.5μg/ml 和 55μg/ml 两个剂量均使 V₇₉ 间期细胞中的双核细胞频率显著提高 (P < 0.001),间期双核细胞的频率随着 α-筒箭毒碱的受试剂量的

增加而上升(图 1)。

Table 1 The alteration of telophase/ G₁ configuration in V79 cells treated with chemicals (treatment interval: 2h; number of scored cells per group: 100)

Chemical	Dose (μg/ml)	Categories of configuration							
		Abnormal (a - c)			Normal (d - e)				
		a	b	c	Sum.	d	e	f	Sum.
TUB	6.8	6	4	15	25	31	27	11	75
	13.6	10	3	4	17	28	24	31	83
	27.5	15	25	10	50**	28	8	16	50
	55	16	28	12	56**	23	8	13	44
Control	Hank's	1	3	16	20	29	37	14	80
CB	1.5	16	13	13	42	11	22	25	58
	3	47	27	17	91**	3	4	2	9
Control	10% DMSO	3	6	19	28	22	16	34	72

* P < 0.05, ** P < 0.001 (Yates² 校正测验)

Table 2 The result of cytokinesis examination in V79 Cells treated with chemicals

Chemical	Dose (μg/ml)	No. of scored interphase	Binuclear (%)
TUB	6.8	1 000	1.1
	13.6	1 000	1.5
	27.5	1 000	3.7**
	55	1 000	4.3**
Control	Hank's	1 000	0.8
CB	1.5	1 000	5.3**
	3	1 000	6.6**
Control	10% DMSO	1 000	0.6

* P < 0.05, ** P < 0.001 (Yates² 校正测验)

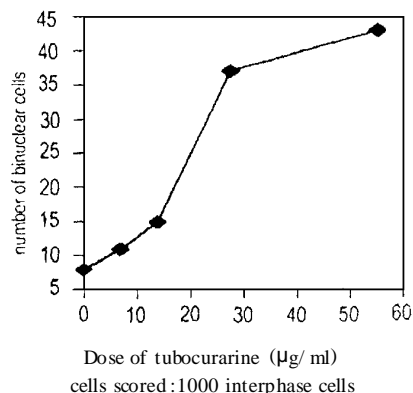


Figure 1 The frequency of binuclear cells after 2h treatment of tubocurarine in V₇₉ cells

表 3 总结了小鼠骨髓细胞 C—M 效应分析的结果。阳性对照秋水仙素能显著提高小鼠骨髓细胞有丝分裂指数和 C—有丝分裂细胞频率,并使后期细胞频率显著降低 (P < 0.001); α-筒箭毒碱在受试

剂量范围内,降低剂量组出现较明显的 C——有丝分裂细胞增加外 ($P < 0.05$),其他未见异常。

讨 论

据报道,乙酰胆碱及其受体参与了细胞质裂的调控¹。细胞质裂的异常尤其质裂的抑制,又将导致双核细胞的产生,而双核细胞在继后的细胞分裂中易于导致纺锤体功能异常。因此质裂的抑制,构成了细

胞染色体异常分离的一种诱导因素。乙酰胆碱及其受体功能正常与否,是否是保证细胞有丝分裂尤其是染色体正常分离的机制之一呢?也就是说,乙酰胆碱及其受体功能的异常是否会导致双核细胞产生进而诱发非整倍体?此外,乙酰胆碱及其受体功能的异常是否引起染色体的分离异常而直接导致非整倍体产生?这些问题是本研究设计的初衷(中)。

Table 3 C-M effects in mouse bone marrow cells treated with TUB

Chemical	Dose (mg/kg)	MI (% \pm S \bar{x})	F _{MI}	Freq. of C-E cell (% \pm S \bar{x})	F _{C-E}	Freq. of anaphase (% \pm S \bar{x})	Percentage reduced (%)
COL	4	4.1 \pm 0.	3.4***	78.2 \pm 2.4	5.5***	0.8 \pm 0.2	91**
TUB	0.063	0.9 \pm 0.5	0.8	8.6 \pm 2.8	0.6*	8.8 \pm 2.4	3
	0.125	1.0 \pm 0.2	0.8	10.4 \pm 3.8	0.7	13.0 \pm 1.3	0
Control	0	1.2 \pm 0.2		14.2 \pm 3.4		9.1 \pm 1.6	

* $P < 0.05$, ** $P < 0.001$ (t -test)

本研究通过 N 受体阻断剂筒箭毒碱作用于含有胆碱受体的 V79 细胞,细胞出现质裂抑制的一系列典型特征,即末期细胞无质裂、早 G₁ 期仅出现质裂而未完成质裂等细胞构型改变、双核细胞频率提高等现象。d 筒箭毒碱在小鼠骨髓细胞 C——M 效应研究中表现了明显的 C——有丝分裂效应,这些结果均提示了乙酰胆碱及其受体在维持正常质裂、保证有丝分裂的真实性上具有正面的作用,乙酰胆碱及其受体的功能异常可能构成了哺乳动物体细胞非整倍体产生的可能机制之一。

参考文献:

- 1 Onfelt A, Soderpalm - Berndes C, Wiberg K. Antagonistes to cholinergic receptors increase the frequency of binuclear V79 Chinese hamster cells. A mechanism for induction of aneuploidy J. *Mutat Res*, 1992, 281:267 - 270.
- 2 张德成. 动物细胞受体学基础 M. 北京:中国农业出版社,1996. 74-78.
- 3 周永自,王世祥. 新编药物手册 M. 第二版. 北京:金盾出版社, 1992. 17-18.
- 4 翟中和. 细胞生物学 M. 北京:高等教育出版社,1996. 243
- 5 和智君,汪旭. 阿托品对中国仓鼠 V79 细胞有丝分裂的影响 J. *癌变 畸变 突变*,1999,(11)3:125 - 127.
- 6 汪旭,Miller B, Kliesch U, et al. 三种有丝分裂抑制剂诱发小鼠骨髓细胞非整倍体的比较研究 J. *遗传学报*,1991,18(4):312 - 315.