

10.0g/kg、5.0g/kg、2.5g/kg,精子畸形率分别为 20.4%、22.2%、18.6%,阴性对照组(蒸馏水)精子畸形率为 23.6%。阳性对照组(CP 40mg/kg)精子畸形率为 102.0%。经统计学处理微核率、精子畸形率试验组与阴性对照组比较,差异无显著性。结论:本研究发现加拿大洋参含片属无毒物,Ames 试验、小鼠骨髓细胞微核试验和小鼠精子畸形试验均得到阴性结果,说明加拿大洋参含片在该组筛检试验中无诱变性,将为其作为保健食品的开发利用提供一个依据。

1-3 梦泰宁(褪黑素)毒性研究

王庭欣 马晓彤 蒋东升 赵文 秦淑贞 张俊刚 (河北省卫生防疫站 保定 071000)

褪黑素是以松果体为主要成分的保健食品,具有改善小鼠睡眠的作用。由于国内市场上销售的褪黑素均为化学合成品,合成路线不同,其毒性有可能有差别。为此我们对石家庄开发区四联生物工程有限公司生产的褪黑素进行了毒性研究。按《食品安全性毒理学评价程序》的方法对褪黑素的急性毒性、致突变性及喂养试验进行了鉴定,结果表明大小鼠 LD₅₀均大于 10g/kg bw;小鼠骨髓细胞微核试验对照组(蒸馏水)与三个剂量组(1.25g/kg bw、2.5g/kg bw、5.0g/kg bw)微核率分别为 2.3%、1.5%、1.4%、0.9%。小鼠精子畸形试验对照组(蒸馏水)与三个剂量组(1.25g/kg bw、2.5g/kg bw、5.0g/kg bw)微核率分别为 15.6%、13.2%、19.4%、16.6%。Ames 试验采用平板掺入法,每个剂量做三个平皿并重复一次,褪黑素剂量为 1.0mg/皿、2.5mg/皿、5.0mg/皿,同时设空白对照及阳性对照(2-AF₁,2,4,7-TNFone),结果褪黑素各不同剂量组在加 S₉ 和不加 S₉ 条件下的回变菌落数均未超过空白对照回变菌落的 2 倍。阳性对照回变菌落数达阳性标准。喂养试验褪黑素剂量为 5.0g/kg、2.5g/kg、1.25g/kg 大鼠经 30 天喂养生长发育良好,血液及生化指标均在正常范围内,各试验组与对照组比较无显著性差异,病理学检查结果心、肝、脾、肺、肾、胃、肠均基本正常。由此可见,褪黑素大小鼠 LD₅₀>10mg/kg 属实际无毒物,致突变试验及 30 天喂养试验均为阴性。

1-4 短期接触钒对人体细胞免疫遗传和增殖的影响

张家华¹ 王宇文² (1四川省攀枝花市卫生防疫站 2四川省攀枝花市卫生学校 攀枝花 617067)

目的:探讨短期接触钒及其化合物对作业工人细胞免疫、遗传和增殖的影响。方法:用细胞学组合检测法测定 14 例五氧化二钒和三氧化二钒作业 1~2.5 年的工人的外周血淋巴细胞转化率(LTR)、姊妹染色单体互换(SCE)、微核率(MNR)、有丝分裂指数(MI)、细胞周期比率(CCR)和增殖率指数(PRI)。结果:LTR 作业组(73.93%)与对照组(74.43%)比较无显著性差异($P>0.05$),作业工人男性(73.84%)与女性(74.00%)比较亦无显著性差异($P>0.05$);SCE 作业组(5.09/细胞)与对照组(4.44/细胞)比较无显著性差异($P>0.05$),男作业工人(5.24/细胞)与女作业工人(4.82/细胞)比较无显著性差异($P>0.05$);MNR 作业组(1.14%)与对照组(1.57%)比较无显著性差异($P>0.05$),男作业工人(1.22%)与女作业工人(1.00%)比较无显著性差异($P>0.05$);MI 作业组(9.31%)比对照组(6.95%)显著增高($P<0.005$),女作业工人(11.24%)与男作业工人(8.23%)比较有高度显著性差异($P<0.005$);CCR(M₁、M₂、M₃)和 PRI:作业组分别为 8.89%、18.32%、72.79%和 2.64,对照组分别为 11.32%、26.89%、61.79%和 2.10,男作业工人分别为 8.78%、19.72%、71.50%和 2.62,女作业工人分别为 9.10%、15.80%、75.10%和 2.66,M₃ 及 PRI 作业组显著高于对照组($P<0.005$),女作业工人显著高于男作业工人($P<0.05$)。结论:短期接触钒及其化合物对作业工人细胞免疫和细胞遗传学指标无明显影响,细胞有丝分裂指数、细胞周期比率和细胞增殖率指数显著增高,女性明显高于男性,值得进一步深入研究。

(向参加部份工作的肖太菊、陈嫣同志致谢!)

1-5 哺乳类细胞参与 MNNG 诱导的非定标性突变发生基因的分离和功能研究

胡文蔚 余应年 陈星若 宋 韬 谢海洋 (浙江大学医学院 病理生理教研室 杭州 310006)

目的:遗传不稳定是存在于人类遗传性疾病及肿瘤中的一种重要现象,也可由环境致癌理化因子诱发,但其发生的具

本项目受国家自然科学基金(编号:39470779,39830210)和浙江省自然科学基金(编号:394191)资助。

体机制尚不清楚。本实验室已证实了烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)可以诱发出 vero 细胞的遗传不稳定状态,表现为延迟发生的非损伤部位 DNA 突变率增加(非定标突变),且突变谱明显不同于由 MNNG 直接攻击引起的定标性突变。转录抑制剂放线菌素 D 可抑制这种突变的形成,提示它的发生依存于基因表达的改变。本研究目的是分离筛选参与以非定标性突变为特征的遗传不稳定发生的相关基因。方法:利用反义核酸技术,对本实验室用差异显示方法分离得到的 EST 片段进行功能分析。首先改建了两个真核表达载体的抗性,利用抗性选择使之进入细胞后不会干乱利用穿梭质粒 pZ189 进行非定标性突变率检测的实验系统。利用此载体构建含反向插入片段的真核细胞表达重组体并转染细胞,以获得反义 RNA 阻断其相应基因的表达,再检测非定标性突变率的变化。结果:筛选得到两个 EST 片段(片段 9,片段 10),它们相关基因的表达被阻断后,非定标突变率均发生了显著的改变。9 号片段相关基因的表达阻断后,非定标性突变率显著增高,vero 细胞组、含空载体的 vero-pM-amp-细胞组及含正反向插入片段的表达质粒的细胞 vero-pM-amp-9,自发突变率均较接近,分别为 1.6×10^{-4} ; 4.9×10^{-4} ; 4.7×10^{-4} 及 4.0×10^{-4} ,而 MNNG 处理后突变率均显著增高,分别为 23.6×10^{-4} ; 36.1×10^{-4} ; 25.0×10^{-4} 及 67.0×10^{-4} ,与自发突变率相比 $P < 0.01$,而其中 vero-pM-amp-9-细胞系在 MNNG 处理后 pZ189 复制的突变率较其它各组的非定标性突变率进一步增高, $P < 0.05$,在含反向插入片段的表达质粒的细胞 vero-pM-amp-10-中,10 号片段的相关基因表达阻断后,非定标性突变率下降至自发突变水平。vero 细胞组、含空载体的 vero-pM-amp-细胞组及 vero-pM-amp-10-细胞组,自发突变率较接近,分别为 17.2×10^{-4} ; 4.6×10^{-4} 及 5.2×10^{-4} ,在 MNNG 处理后,突变率分别为 17.2×10^{-4} ; 16.1×10^{-4} 及 2.5×10^{-4} ,vero-pM-amp-10 细胞组的非定标突变率与其它组比较 $P < 0.01$ 。结论:反义核酸技术筛选到两个分离片段的相关基因与哺乳类细胞非定标性突变发生有关,其中 9 号片段的相关基因可能参与维持细胞遗传稳定性,抑制非定标性突变的发生,而 10 号片段的相关基因则可参与引起烷化剂处理后细胞非定标性突变的产生。

1-6 MNNG 诱导的哺乳类细胞信号转导通路的改变

鲁 靖 余应年 谢海洋 (浙江大学医学院病理生理教研室 杭州 310031)

目的:本实验室曾用烷化剂 N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG)在非洲绿猴肾 vero 细胞上诱导出非定标性突变。进一步的研究提示细胞信号转导通路在非定标性突变的发生中扮演了重要角色。所以本实验的目的是研究与非定标性突变发生有关的细胞信号转导通路的改变。方法:本研究中,vero 细胞在 $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ MNNG 处理 2.5h 后在不同的时间点制备全细胞抽提液,然后利用一种偶联抗体(Anti-Phosphotyrosine Peroxidase)进行 Western 印迹分析来观察细胞蛋白质酪氨酸磷酸化的变化。为了评估 MNNG 处理 vero 细胞引起的胞内 JNK/SAPK 通路激活情况,我们用 Western 印迹法和固相激酶活性测定法分别检测 JNK1 的磷酸化程度和 JNKs 的激酶活性。在这部分实验中,vero 细胞在 MNNG 或 1mg L^{-1} 放线菌素酮(CHM)处理后在不同的时间点制备全细胞抽提液,Western 印迹法用抗 JNK1 兔多克隆 IgG 和羊抗兔 IgG-HRP 分别作为一抗和二抗。在固相激酶活性测定实验中,细胞抽提液在 [^{32}P ATP 存在下与 GST-cJun(79)-agarose 混合孵育,标记的磷酸化 GST-cJun 经 SDS-PAGE 分离后进行放射自显影。结果:在磷酸化酪氨酸 Western 印迹分析中发现 MNNG 处理 vero 细胞后再经 0h 和 12h,细胞内 45kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化程度增强。在 MNNG 处理 vero 细胞后再经 6h,有 62kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化程度增强。 1mg L^{-1} CHM 处理 vero 细胞 12h 也可引起胞内 45kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化程度增强。在 JNK1 磷酸化程度和 JNKs 激酶活性测定中发现 $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ MNNG 处理 vero 细胞 2.5h 和 1mg L^{-1} CHM 处理 vero 细胞 1h 都可引起细胞抽提液中磷酸化 JNK1 的比例增高,同时,通过测定 JNKs 的底物 cJun 的磷酸化水平,发现这两种处理也都可使 JNKs 的激酶活性大大增强(分别为对照的 6.7 倍和 3.0 倍)。结论:本研究发现 $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ MNNG 处理 vero 细胞可引起胞内 45kDa 的 62kDa 蛋白质酪氨酸磷酸化改变,提示 MNNG 可诱导哺乳类细胞内应激信号转导通路激活。另外, $0.2 \mu\text{mol L}^{-1}$ MNNG 处理 vero 细胞 2.5h 和 1mg L^{-1} CHM 处理 vero 细胞 1h 都可引起全细胞抽提液中磷酸化 JNK1 的比例增高和 JNKs 的激酶活性成倍增强。证明用于诱导 vero 细胞产生非定标性突变的实验条件可以引起 vero 细胞内信号转导通路发生改变,并且至少可以激活 vero 细胞内 JNK/SAPK 通路。