

阿托品对中国仓鼠 V₇₉ 细胞有丝分裂过程的影响

和智君 汪 旭

云南师范大学生命科学系 昆明 650092

摘要 本研究以毒蕈碱型乙酰胆碱受体抑制剂阿托品在离体情况下作用于中国仓鼠 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,探讨了阿托品对哺乳动物离体细胞正常有丝分裂过程的影响。结果发现,阿托品使 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、双核细胞的频率显著提高,提示阿托品可能通过 M 型胆碱受体阻断过程而对哺乳动物有丝分裂真实性产生影响。胆碱受体的功能异常可能为非整倍体发生的诱因之一。

关键词 中国仓鼠 V₇₉ 细胞;阿托品;有丝分裂;非整倍体

STUDY OF MITOTIC EFFECTS OF ATROPINE IN V₇₉ CHINESE HAMSTER CELLS

He Zhijun, Wang Xu

Department of Life Sciences, Yunnan Normal University, Kunming 650092

Abstract V₇₉ Chinese hamster cells were treated *in vitro* by atropine sulfate, which is an antagonist to cholinergic receptors and inhibitor of muscarinic receptor. The alteration of late telophase-early G₁ configuration induced by atropine were determined by analyzing present or lack of a cytokinesis furrow in late telophase and very early G₁ cells. The abnormal cytokinesis were investigated for the frequency of binuclear cells in interphase cells. The tested chemical disturbed mitotic coordination and induced significantly high frequency of binuclear cells. The result indicated that atropine is able to inhibit mammal mitosis by blocking the function of cholinergic receptor. The malfunction of cholinergic receptors may be a mechanism of aneuploid induction.

Key words V₇₉ Chinese hamster cell; atropine; mitosis; aneuploidy

中国仓鼠 V₇₉ 细胞可产生大量的乙酰胆碱 (Acetylcholine)。已有研究指出,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发生。双核细胞在继后的细胞分裂中易于导致异常纺锤体功能,质裂的抑制,因此构成了细胞染色体异常分离的风险。

阿托品 (Atropine) 是一类毒蕈碱 (muscarine) 型乙酰胆碱受体抑制剂,即 M 受体阻断剂⁽²⁾,对乙酰胆碱和其他拟胆碱药物的毒蕈碱样作用有拮抗效应。其具有解除平滑肌痉挛,抑制腺体分泌,扩大瞳孔,兴奋呼吸中枢的作用。在临床上用于治疗胃肠道、肾、

胆绞痛,抗休克和有机磷中毒等病症⁽³⁾。本文在离体情况下用阿托品处理具有乙酰胆碱合成能力的 V₇₉ 细胞,通过分析 V₇₉ 细胞晚末期和早 G₁ 期细胞核和细胞质构型、双核细胞频率,探索乙酰胆碱及其受体在哺乳动物细胞有丝分裂过程中的作用。

细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB) 是真菌的一种代谢产物,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 作为阳性对照物。

材料与amp;方法

1 受试物:硫酸阿托品购自 Sigma 公司,用前以无菌双蒸水溶解,受试剂量分别为 5.8μg/ml 和 2.9μg/ml,分别设溶剂对照和阳性对照。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,受试剂量分别为 3μg/ml、1.5μg/ml,10% DMSO 为相应溶剂对照。

2 方法:

2.1 细胞培养: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、100μg/ml 双抗、pH6.9 的 MEM 培养液 37℃ 培养。实验前 24h 在 25ml 培养瓶接种 10⁶ 细胞进行单细胞培养。

2.2 细胞染毒:将培养细胞中培养液移弃,用 37℃ 预热的 Hank's 平衡盐溶液 (pH6.9, 37℃) 荡洗细胞 2

次,然后加入 4ml Hank's 平衡盐溶液并按剂量加入受试药物,37℃ 处理 2h。

2.3 制片:将处理后的细胞以 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。

2.4 镜检

2.4.1 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(图 1a-c)和正常(图 1d-f)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。

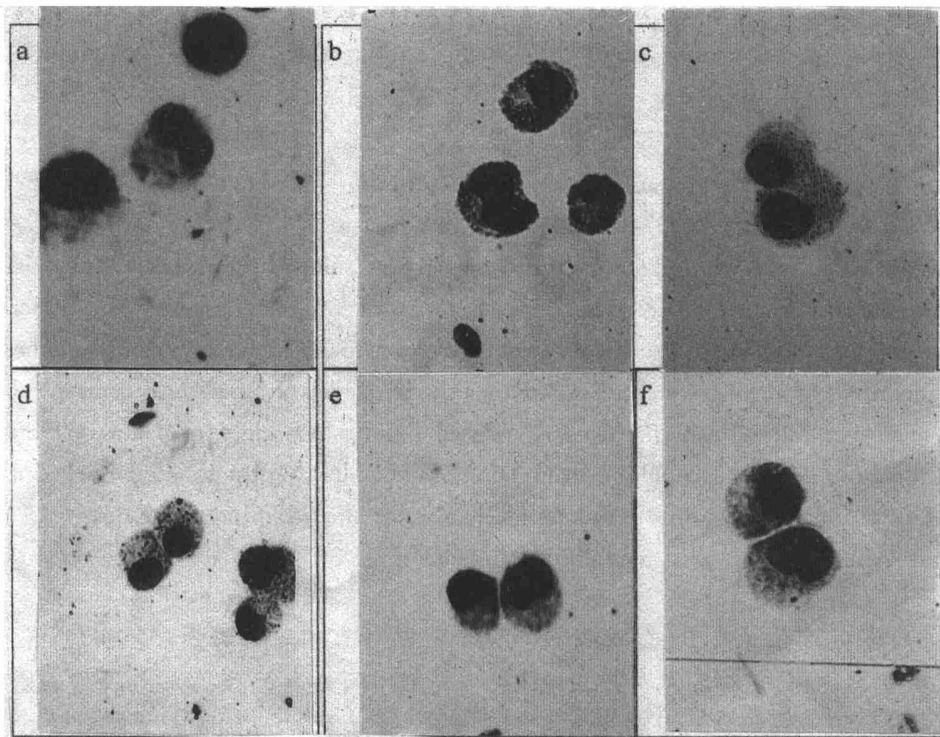


图 1 a-c:异常构型细胞。a:细胞无质裂缢但具有已分裂的晚末期细胞核;b:细胞无质裂缢但二极具有去凝聚的 G₁ 期样细胞核;c:细胞具质裂缢和二极去凝聚的 G₁ 期样细胞核;b-f:正常构型细胞。d:正常末期细胞:e:具有末期样染色质、已质裂的早 G₁ 细胞:f:具有早期样染色质、已质裂的早 G₁ 细胞。

2.4.2 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。

3 统计分析:实验数据以 χ^2 校正测验进行统计学分析。

Table 1 The alteration of telophase/ G₁ configuration in V79 treated with chemicals (treatment interval : 2h; No. of scored cells per group :100)

Chemical	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Categories of configuration							
		Abnormal(a - c)			Normal(d - e)				
		a	b	c	d	e	f		
C B	3	47	27	17	91 **	3	4	2	9
	1.5	16.	13	13	42 *	11	22	25	58
	10 %DMSO	3	6	19	28	22	16	34	72
Atropine	5.8	10	10	18	38 **	24	38	10	62
sulfate	2.9	6	5	26	37 **	33	25	5	63
	0	2	2	12	16	41	27	16	84

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

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

Chemical	Dose ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	No. of scored interphase	Binuclear (%)
C B	3	1 000	6.6 **
	1.5	1 000	5.3 **
	10 %DMSO	1 000	1.6
Atropine	5.8	1 000	1.6 *
sulfate	2.9	1 000	2.2 *
	0	1 000	0.6

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

如表 1 所示,在 $3\mu\text{g}/\text{ml}$ 的剂量时,细胞松弛素 B 能极显著地诱发 V₇₉ 细胞中异常构型即 a - c 类细胞产生 ($P < 0.001$); 在 $1.5\mu\text{g}/\text{ml}$, 该化合物也具有同样效应 ($P < 0.05$)。阿托品在高剂量 ($5.8\mu\text{g}/\text{ml}$) 时, 所诱发的异常构型细胞显著高于溶剂对照 ($P < 0.001$), 在低剂量 ($2.9\mu\text{g}/\text{ml}$) 时, 异常构型细胞也显著增加 ($P < 0.05$)。由表 2 得知细胞松弛素 B 在受试剂量范围内, 使 V₇₉ 间期细胞中的双核细胞频率显著提高 ($P < 0.001$); 阿托品在受试剂量范围内, 也表现了显著的诱发 V₇₉ 双核细胞的能力 ($P < 0.05$), 但

弱于细胞松弛素 B。

讨 论

据报道, 乙酰胆碱及其受体参与了细胞质裂的调控⁽¹⁾。鉴于细胞质裂的异常尤其质裂的抑制, 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异常纺锤体功能。因此质裂的抑制, 构成了细胞染色体异常分离的一种诱发因素。乙酰胆碱及其受体功能的正常发挥, 是否是保证细胞有丝分裂尤其染色体正常分离的机制之一? 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? 这一问题是本研究的核心。

阿托品是一类 M - 胆碱受体阻断药物, 其是乙酰胆碱及其他胆碱类化合物受体的拮抗剂, 在临床上主要有解除平滑肌痉挛, 抑制腺体分泌, 扩大瞳孔, 兴奋呼吸中枢等功效。本研究通过该化合物对 M 受体的阻断作用及其所引起的各种异常有丝分裂效应, 初探了乙酰胆碱及其受体在 V₇₉ 细胞正常分裂中的作用。研究发现, 阿托品处理能够合成乙酰胆碱的 V₇₉ 细胞后, 细胞出现质裂抑制的一系列典型特征, 即末期细胞无质裂结、早 G₁ 期仅出现质裂结而未完成质裂等细胞构型改变、双核细胞频率提高。证明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积极的作用。结果同时提示该途径是体细胞非整倍体产生的可能机制之一。

参考文献

- 1 Onfelt A, SoderpalnrBerndes C, Wiberg K. Antagonistes to cholinergic receptors increase the frequency of binuclear in V₇₉ Chinese hamster cells. A mechanism for induction of aneuploidy. *Mutat Res*, 1992;281:267
- 2 张德成. 动力细胞受体学基础. 北京: 中国农业出版社, 1996:74 - 84
- 3 周永自, 王世祥. 新编药物手册. 第二版. 北京: 金盾出版社, 1992:140 - 142
- 4 翟中和. 细胞生物学. 北京: 高等教育出版社, 1996:243 - 244
(1998 - 10 - 12 收稿; 1999 - 03 - 01 修回)