

用 SCGE 分析甲氨蝶呤对小鼠体内多个组织器官 DNA 损伤作用

Detection of DNA Damage Induced by Methotrexate in Multiple Mouse Organs Using SCGE Assay

杨建一/彭 芸/李 莉/杜圣家/
单联喆/张新旺/王文娟
(山西医科大学基础医学院,
山西 太原 030001)

YANG Jian-yi, PENG Yun, LI Li, DU Sheng-jia,
SHAN Lian-zhe, ZHANG Xin-wang, WANG Wen-juan
(School of Basic Medical Science, Shanxi
Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi, China)

【摘要】背景与目的: 为进一步了解甲氨蝶呤(Methotrexate, MTX)的作用机制, 探测其对不同组织器官作用的敏感性。 材料与方法: 用单细胞凝胶电泳技术(Single cell gel electrophoresis assay, SCGE)检测小鼠腹腔注射 MTX 染毒 1、3、6、12、24 h 后对肝、脾、骨髓、胸腺、肾、睾丸、胃和外周血淋巴细胞的 DNA 损伤作用及其与 MTX 剂量间的关系。结果: 腹腔注射 1.25 ~ 5 mg/kg MTX 可诱发小鼠脾细胞、骨髓细胞、胸腺细胞和外周血淋巴细胞的 DNA 单链断裂; 核 DNA 损伤程度与用药剂量呈正相关。 结论: MTX 可致小鼠体内多脏器细胞的 DNA 单链断裂, 不同脏器细胞对 MTX 的易感性不同, 脾、骨髓、胸腺、外周血淋巴细胞可考虑为 MTX 的遗传毒性靶细胞。

【关键词】甲氨蝶呤; 单细胞凝胶电泳; DNA 损伤; 靶器官

中图分类号: Q319.3

文献标识码: A

文章编号: 1004 - 616X(2005)05 - 0298 - 04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: In order to understand the mechanism of methotrexate (MTX) further and to investigate the genotoxic target organs. MATERIAL AND METHODS: DNA damage and the correlation with dosage treated with MTX were studied by using the alkaline single cell gel electrophoresis assay(SCGE) . Liver, spleen, bone marrow, thymus, kidney, testicle, stomach and peripheral lymphocytes of mice were isolated at 1、3、6、12、24 h after MTX intraperitoneal injection. RESULTS: Significant increase in DNA migration and comet frequency in the spleen, thymus, bone marrow and peripheral lymphocytes were induced after intraperitoneal treatment of MTX at a dose of 1.25 ~ 5 mg/kg. The migration of nuclear DNA and comet frequency of spleen, thymus, bone marrow and peripheral lymphocytes in the dose-response study showed a dose-dependent increase. CONCLUSION: The results indicate that DNA SSBs could be induced by MTX in some cells of mice. There are difference in sensitivity of various organs in the mice and cells of spleen, thymus, bone marrow and peripheral lymphocytes may be the important target cells of MTX.

【KEY WORDS】 methatrexate; single cell gel electrophoresis; DNA damage; target organ

单细胞凝胶电泳技术 (Single cell gel electrophoresis assay, SCGE), 又称彗星实验 (Comet assay) 是一种在单细胞水平检测有核细胞 DNA 断裂的新技术^[1]。作为一种快速、简便、灵敏的检测 DNA 损伤的方法, 无须控制有丝分裂的时期即可观察物质的遗传毒性作用^[2], 实验结果能较准确反映某种化合物是否能造成体细胞的 DNA 断裂损伤以及损伤的修复情况。SCGE 敏感性高,

样本需要量少, 凡能制成单细胞悬液的真核细胞都能用此法进行 DNA 损伤的研究。体内染毒后用 SCGE 技术可以分析不同组织、器官、细胞的 DNA 损伤和修复情况, 以推测具有遗传毒性的化学物质及其代谢产物的作用靶器官, 或者不同物质作用的器官特异性比较^[3]。

最早 SCGE 用来检测环境致突变物 (电离辐射, 铬、镍、砷、汞等化合物, 杀虫剂, 木尘, 石棉等) 对人体造成

收稿日期: 2004 - 06 - 09; 修订日期: 2004 - 08 - 28

作者简介: 杨建一(1953 -), 女, 山西省人, 教授, 硕士, 主要从事医学遗传学和遗传毒理学研究。Tel: 86 - 351 - 4962143, E - mail: jianyiyang@163.com

的危害,成为职业和环境生物检测的重要方法之一。近几年来,在评价放疗、化疗药物和一些麻醉药的遗传毒性时,SCGE 技术也做出了突出贡献。临床治疗过程中采用 SCGE 分析可获得不同作用时间所造成的不同 DNA 损伤水平的及时信息,为监测用药和副作用防治提供了有效手段^[4]。

甲氨蝶呤(methotrexate, MTX)的化学结构与叶酸相似,是一种抗叶酸药,它对二氢叶酸还原酶有强大而持久的抑制作用,阻止脱氧胸苷酸和嘌呤核苷的合成,影响 DNA 的合成,并干扰 RNA 和蛋白质合成^[5]。利用这一机制在临床上 MTX 主要用于一些恶性肿瘤的治疗,大剂量用于治疗急性白血病和绒癌,MTX 选择性作用于增殖期细胞,对体液免疫有较强的抑制作用,抑制细胞增生和细胞对炎症介质的反应,用来治疗类风湿性关节炎、肌炎、银屑病。MTX 不良反应较多,可致口腔及胃肠道黏膜损伤、骨髓抑制,孕妇可致畸胎、死胎,大剂量长期用药可致肝、肾损害,所以此药虽然疗效显著,但用药的安全性令人担忧。选择恰当的适应症,并注意临床监测,及时、恰当地给予叶酸制剂等保护措施是应用 MTX 的关键^[6]。

近年来在国内将彗星实验应用于临床用药监测中,多为体外试验研究^[7],系统检测体内多个器官 DNA 损伤与修复的研究报道较少。我们以小鼠为实验对象,选择了肝、脾、骨髓、胸腺、胃、肾、睾丸和外周血淋巴细胞等八个组织的细胞进行 SCGE 分析。了解 MTX 用药的时效和量效反应关系,为应用 MTX 治疗过程中的临床监测和副作用防治提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 动物及材料

健康 BALB/C 品系雄性小鼠,7~8 周龄,体重 25~30 g,引自中国预防医学科学院实验动物研究所。

主要药品与试剂:正常熔点琼脂糖(normal melting point agarose, NMPA): PROMEGA 分装;低熔点琼脂糖(Low melting point agarose, LMPA): PROMEGA 分装;溴化乙啶(Ethidium Bromide, EB): SIGMA 公司分装;肌氨酸钠: SIGMA 公司分装;TritonX-100: SIGMA 公司分装;人淋巴细胞分离液($\rho = 1.077$, pH = 6.5~7.5): 上海试剂二厂。

1.2 MTX 的时效关系实验

1.2.1 动物分组

将小鼠随机分为 0 h(阴性对照)、染毒 1、3、6、12、24 h 等 6 组。

MTX 主要作用于细胞分裂的 S 期,这一时期持续

约 8 h。为了检测药物作用的最大 DNA 损伤及一次给药后 DNA 损伤的修复情况,故分别在给药后 1、3、6、12、24 h 取样^[8]。

1.2.2 染毒

用生理盐水将 MTX 配成 0.25 mg/ml 的浓度,按 5 mg/kg 的单一剂量经腹腔注射给药^[9]。

1.2.3 器官或组织的选择与分离

选择原则:①致突变物的常见靶器官;② MTX 治疗中有毒性反应的器官;③ MTX 的代谢器官。据此选定肝、脾、骨髓、胸腺、外周血淋巴细胞、肾、睾丸、胃作为受检器官。

1.2.4 单细胞悬液制备

分别分离和制备外周血淋巴细胞,肝、脾、肾、胸腺、睾丸、胃黏膜的单细胞悬液^[10]和骨髓单细胞悬液。

1.2.5 单细胞凝胶电泳

按文献[7,11]的方法进行。

1.2.6 结果观察

荧光显微镜使用 260 nm 波长的紫外光作为激发光,放大倍数为 200 倍,每张玻片随机选取 30 个细胞观察,计算拖尾细胞数,用目镜测微尺测量每个观察细胞的头长、全长,得到彗星尾长。

1.3 MTX 的量效关系实验

1.3.1 动物分组 小鼠被随机分为阴性对照组,低、中、高剂量组。

1.3.2 染毒 阴性对照组:生理盐水 20 ml/kg,腹腔注射。MTX 低、中、高剂量分别以 1.25 mg/kg (0.625 mg/ml), 2.5 mg/kg (0.125 mg/ml), 5 mg/kg (0.25 mg/ml) 剂量腹腔注射,以时效实验中得出的最佳采样时间(染毒后 12 h)处理动物。

1.3.3 分离制备单细胞悬液 同 1.2.4。

1.3.4 单细胞凝胶电泳 同 1.2.5。

1.4 统计学处理 用 SPSS10.0 统计软件进行数据分析。细胞 DNA 迁移距离(尾长)和彗星频率做方差齐性和正态性检验后,用方差分析或秩和检验($\alpha = 0.05$),进行各组间的显著性检验。对量效关系实验做相关性分析。

2 结果

2.1 SCGE 图像

在荧光显微镜下观察:DNA 被 EB 染成桔红色,没有发生 DNA 断裂的细胞只有 1 个圆形的荧光头部;发生 DNA 断裂的细胞则表现为断片向阳极方向迁移,形成一个像彗星样的拖尾。

2.2 动物染毒后的中毒表现



处理后各时间、剂量组动物无死亡, 均未见中毒表现, 解剖检查未观察到 MTX 所造成的组织、器官的异常改变。

2.3 时效实验结果

以 5 mg/kg 的 MTX 剂量给小鼠腹腔注射染毒后, 不同时间各实验组脏器细胞彗星实验的彗星频率和平

均尾长见表 1 和表 2。各时间点与对照组进行统计分析后发现: 脾、骨髓、外周血淋巴细胞和胸腺细胞的平均尾长和彗星频率均有显著增加 ($P < 0.01$), 说明腹腔注射 MTX 后可引起这些器官细胞的 DNA 断裂, 细胞平均拖尾长度以胸腺细胞最大。染毒后 12 h, 核 DNA 平均迁移距离和彗星细胞频率达到最高值, 24 h 后略有降低, 但

表 1 腹腔注射 MTX 后不同取样时间小鼠脏器细胞的彗星频率

Table 1 Comet frequency in various cells of mice at different sampling time after treatment with 5 mg/kg MTX

Sampling time (h)	n	Comet frequency ($\times 10^{-2}$, $\bar{x} \pm s$)							
		Liver	Spleen	Bone marrow	Peripheral lymphocytes	Thymus	Kidney	Testis	Stomach
0	6	5.38 ± 2.10	7.38 ± 1.64	5.72 ± 2.09	3.27 ± 7.43	16.45 ± 3.88	7.48 ± 3.30	2.61 ± 2.22	7.12 ± 2.67
1	6	6.11 ± 2.51	14.45 ± 3.44	9.45 ± 4.91	5.22 ± 2.51	28.89 ± 5.02**	6.67 ± 3.65	2.22 ± 1.72	7.22 ± 2.51
3	6	6.11 ± 2.51	18.89 ± 9.58*	12.78 ± 3.28*	8.11 ± 4.56*	36.67 ± 6.99**	6.67 ± 2.98	2.78 ± 5.10	8.33 ± 3.49
6	6	7.22 ± 3.90	22.22 ± 5.44**	36.67 ± 9.66**	11.67 ± 3.50**	43.33 ± 14.91**	8.89 ± 4.04	3.33 ± 2.11	8.89 ± 2.72
12	8	9.58 ± 5.48	37.92 ± 18.16**	27.50 ± 7.29**	12.08 ± 6.41**	85.00 ± 12.60**	8.75 ± 3.53	3.75 ± 2.14	8.33 ± 3.09
24	6	11.11 ± 3.44	32.22 ± 14.96**	20.00 ± 9.43**	10.56 ± 3.90**	71.67 ± 18.71**	7.78 ± 2.72	2.67 ± 2.79	8.67 ± 5.06

Compared with the control(0 hour), * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

表 2 腹腔注射 MTX 后不同取样时间小鼠脏器细胞核 DNA 迁移距离

Table 2 Migration of nuclear DNA in various cells of mice at different sampling time after treatment with 5 mg/kg MTX

Sampling time (h)	n	Migration of nuclear DNA (μm , $\bar{x} \pm s$)							
		Liver	Spleen	Bone marrow	Peripheral lymphocytes	Thymus	Kidney	Testis	Stomach
0	6	0.87 ± 0.21	2.22 ± 0.55	2.04 ± 0.57	0.88 ± 0.20	2.43 ± 1.52	1.48 ± 0.66	0.51 ± 0.33	2.01 ± 0.69
1	6	0.93 ± 1.27	3.51 ± 0.78	3.93 ± 1.05	1.28 ± 0.74	4.66 ± 0.87**	1.61 ± 0.92	0.43 ± 0.38	2.07 ± 0.55
3	6	0.96 ± 0.35	4.44 ± 2.11**	4.73 ± 1.43**	1.68 ± 0.61**	6.26 ± 0.85**	1.94 ± 0.79	0.55 ± 0.44	2.22 ± 0.35
6	6	1.15 ± 0.31	5.20 ± 1.21**	9.75 ± 0.81**	2.56 ± 0.52**	14.52 ± 5.62**	2.03 ± 0.63	0.60 ± 0.37	2.34 ± 0.30
12	8	1.2 ± 20.94	10.81 ± 4.76**	5.69 ± 2.21**	2.76 ± 1.24**	26.81 ± 5.81**	1.81 ± 0.74	0.89 ± 0.71	2.30 ± 0.29
24	6	1.35 ± 0.65	9.59 ± 4.53**	4.93 ± 3.43**	2.37 ± 1.12**	19.83 ± 9.26**	1.70 ± 0.74	0.76 ± 0.81	2.83 ± 1.03

Compared with the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; the control was dealt with 20 ml/kg physiological saline.

表 3 不同剂量 MTX 腹腔注射后小鼠脏器细胞的彗星频率

Table 3 Comet frequency in various cells of mice treated with different dose of MTX

Dose $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	Comet frequency ($\times 10^{-2}$, $\bar{x} \pm s$)				
		Liver	Spleen	Bone marrow	Peripheral lymphocytes	Thymus
0.00	8	6.25 ± 2.78	10.00 ± 5.04	8.75 ± 3.96	4.58 ± 1.73	26.25 ± 6.77
1.25	8	6.25 ± 2.13	17.92 ± 2.48	18.33 ± 4.71**	10.42 ± 5.18*	31.67 ± 6.17
2.50	8	6.66 ± 2.52	24.58 ± 3.54**	24.17 ± 5.27**	11.25 ± 7.33*	67.92 ± 16.52**
5.00	8	9.58 ± 5.48	37.92 ± 18.16**	27.50 ± 7.29**	12.08 ± 6.41**	85.00 ± 12.60**

Compared with the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; the control was dealt with 20 ml/kg physiological saline.

表 4 不同剂量 MTX 腹腔注射后小鼠脏器细胞核 DNA 迁移距离

Table 4 Migration of nuclear DNA in various cells of mice treated with different dose MTX

Dose $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	n	Comet frequency (μm , $\bar{x} \pm s$)				
		Liver	Spleen	Bone marrow	Peripheral lymphocytes	Thymus
0.00	8	0.90 ± 0.46	2.01 ± 0.76	1.65 ± 0.72	0.84 ± 0.33	5.79 ± 2.11
1.25	8	0.94 ± 0.40	2.88 ± 0.98	4.15 ± 1.20**	1.98 ± 0.88*	7.31 ± 1.50
2.50	8	1.18 ± 0.64	5.97 ± 0.96**	5.54 ± 2.02**	2.20 ± 1.78*	15.94 ± 2.61*
5.00	8	1.22 ± 0.94	10.81 ± 4.76**	5.69 ± 2.21**	2.76 ± 1.24**	26.81 ± 5.81**

Compared with the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; the control was dealt with 20 ml/kg physiological saline.

与对照组比差异仍有统计学意义 ($P < 0.01$)。骨髓细胞在染毒后 6 h 核 DNA 平均迁移距离和彗星细胞频率达到最高值, 12、24 h 各值逐渐降低, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。肝、肾、睾丸、胃等脏器细胞的两项指标在各观察时间与对照组 (0 h) 比较差异均无

统计学意义。

2.4 量效实验结果

给小鼠腹腔注射不同剂量 MTX 后 12 h, 各实验组脏器细胞彗星实验的彗星频率和平均尾长见表 3、4。3 个剂量组小鼠骨髓细胞、外周血淋巴细胞的核 DNA 平

均迁移距离与彗星频率均显著高于对照组 ($P < 0.05$), 在 2.5 和 5 mg/kg 剂量组胸腺细胞、脾细胞的彗星频率和平均尾长与对照组相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。脾、外周血淋巴细胞、骨髓、胸腺细胞的上述两项指标与 MTX 呈剂量 - 反应关系。肝细胞与对照组间差异无统计学意义。肾、睾丸、胃等器官因在时效实验中 5 mg/kg 剂量的 MTX 染毒没有引起核 DNA 平均迁移距离和彗星细胞频率的增加, 故未进行量效实验。

3 讨 论

实验结果表明 MTX 能诱发细胞 DNA 的单链断裂, 这与国外文献报道的体外实验结果一致^[12]。Shakin 等^[13]用 MTX 长期给药后诱发微核试验的结果也证实 MTX 对 DNA 有损伤作用, 但我们研究的 MTX 是经腹腔注射给药的体内实验, MTX 受试浓度更接近临床常规应用的药物浓度^[14]。给药 1 h 后胸腺细胞就诱发了明显的 DNA 损伤, 给药 3 h 后脾细胞、骨髓细胞、外周血淋巴细胞也诱发了 DNA 损伤的彗星图像, 6 h 时骨髓细胞损伤达到高峰, 外周血淋巴细胞、胸腺细胞、脾细胞于 12 h 达到高峰, 这些结果表明 MTX 诱发外周血淋巴细胞、骨髓细胞及体内免疫系统的脾细胞、胸腺细胞的 DNA 损伤, 从而影响这些细胞的生理或病理功能, 达到临床用药的目的。临床上用来治疗急性白血病和自身免疫性疾病。MTX 的这种损伤作用不仅作用于用药的目的细胞, 也作用于其他正常细胞, 因而带来如骨髓抑制等诸多不良反应。

小鼠体内各种脏器细胞对 MTX 的易感性不同。MTX 选择性作用于快速增殖和更新的细胞, MTX 及其活性产物能以较高浓度聚集在脾、骨髓、胸腺等器官, 或者这些器官对 MTX 具有较强的活化能力, 它们可能是 MTX 作用于小鼠的遗传毒性靶器官。随采样时间后移, DNA 链断裂水平下降, 但与阴性对照组相比差异仍有统计学意义, 说明随着 MTX 在体内的代谢, 损伤 DNA 在所用剂量范围内有修复的趋势, 但最终的自身修复结果应做长期染毒实验加以证实。量效反应关系实验显示脾、骨髓、外周血、胸腺 4 种靶细胞的核 DNA 损伤程度呈剂量依赖关系, 骨髓在低浓度剂量组即有显著的 DNA 损伤, 推测骨髓细胞的敏感性最强, 较低剂量的 MTX 就能造成明显的骨髓抑制。

参考文献:

[1] Singh NP, Mccoy MT, Tice RR, *et al.* A simple technique

for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175(1): 184 - 191.

[2] Fairbairn DW, Olive PL, O' Neill KL. The comet assay: a comprehensive review[J]. *Mutat Res*, 1995, 339: 37 - 59.

[3] Tsuda S, Matsusaka N, Madarame H, *et al.* The alkaline single cell electrophoresis assay with eight mouse organs: results with 22 mono-functional alkylating agents (including 9 dialkyl N-nitrosamines) and 10 DNA crosslinkers[J]. *Mutat Res*, 2000, 467(1): 83 - 98.

[4] Kassie F, Parzefall W, Knasmuller S. Single cell gel electrophoresis assay: a new technique for human biomonitoring studies[J]. *Mutat Res*, 2000, 463(1): 13 - 31.

[5] Seitz M. Molecular and cellular effects of methotrexate. [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 1999, 11(3): 226 - 232.

[6] Bagarry-Liegey D, Nicoara A, Daffaced F, *et al.* Individual does adjustment of high-dose methotrexate in clinical practice [J]. *Revue de Med Interne*, 1996, 17(8): 689 - 698.

[7] 张遵真, 衡正昌. 用单细胞凝胶电泳技术检测铬和砷化合物的 DNA 损伤作用 [J]. 中华预防医学杂志, 1997, 31(6): 365 - 367.

[8] Prise KM, Gaal JC, Pearson CK, *et al.* Increased protein ADP ribosylation in Hela cells exposed to the anti-cancer drug methotrexate[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1986, 887 (1): 13 - 22.

[9] 施新猷. 医用实验动物学 [M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1989. 417.

[10] 衡正昌, 李爱武, 张遵真. 二氯乙烷对小鼠 DNA 损伤的器官特异性及时效关系研究 [J]. 卫生研究, 2001, 30(4): 193 - 195.

[11] 杨建一, 李莉, 彭芸. 低剂量甲氨蝶呤对 DNA 的损伤及甲酰四氢叶酸对其保护作用 [J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(1): 24 - 26

[12] Kasamatsu T, Kohda K, Kawazoe Y. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay [J]. *Mutat Res*, 1996, 369(1-2): 1 - 6.

[13] Shahin AA, Ismail MM, Saleh AM, *et al.* Protective effect of folic acid on low-dose methotrexate genotoxicity [J]. *Z Rheumatol*, 2001, 60(2): 63 - 68.

[15] 江明性. 新编实用药理学 [M]. 第 1 版. 北京: 科学出版社, 2000. 191.

