

大鼠胃粘膜上皮微核试验

周宗灿 傅娟玲 凌宝银¹ 刘春光 郭原健² 王 越

北京医科大学卫生毒理学教研室 北京 100083 ¹江苏省卫生防疫站毒理科 ²山西省卫生防疫站毒理科

摘要 为筛选遗传毒胃致癌物,我们以N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)为模型诱变剂,发展大鼠胃粘膜微核试验。Wistar大鼠经口给以MNNG灌胃2次,间隔24h,末次染毒后24h处死。取腺胃,以1%链霉菌蛋白酶E于37℃消化30~45min,离心消化液收集胃粘膜细胞,制片,Giemsa染色。胃粘膜细胞收率为每鼠 4.0×10^6 细胞。在涂片上,胃粘膜细胞可分为3组:表面上皮细胞、泌酸细胞、腺颈细胞和酶原细胞。研究结果表明:MNNG可引起大鼠胃粘膜细胞微核率增加,并有剂量一效应关系。

关键词 体内微核试验;大鼠;胃粘膜细胞;N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍

AN IN VIVO MICRONUCLEUS ASSAY IN THE RAT GASTRIC MUCOSAL CELLS

Zhou Zongcan, Fu Juanling, Ling Baoyin, Liu Chunguang, Guo Yuanjian
Department of Toxicology, Beijing Medical University Beijing 100083

Abstract Gastric carcinoma is one of the common cancer in human. We developed the micronucleus assay of gastric mucosal cells (GMC) in rat in order to screen the genotoxic stomach-carcinogens N-Methyl -N'-nitro-N-nitrosoguanidine(MNNG) was given twice to wistar rats by oral gavage with 24 h interval. The rats were killed at 24 h after the last treatment. The glandular stomach was filled up with the enzyme solution(1.0 % pronase E)and digested for 30-45 min in 37℃. The GMC were collected by centrifuge, smeared and stained with Giemsa. The yields of GMC was approximately 4×10^6 cells per rat. The GMC in smears were divided into three groups: the surface epithelial cells (34%), parietal cells(22%), mucous neck cells and chief cells(43%). The frequencies of micronucleated GMC were 0.40, 1.60, 2.20 and 6.60‰ respectively at the dose of MNNG 0, 25, 50 and 100 mg/kg. At the double dose of MNNG 50 mg/kg and 24, 48 and 72 h sample time, the micronucleus frequencies of GMC were 2.60, 2.80 and 0.60‰ respectively. the results indicated that MNNG induce a dose-dependant increase of micronucleus frequencies of GMC.

Key words micronucleus assay *in vivo*; gastric mucosal cells; rat; N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine

胃癌是人体最常见的恶性肿瘤之一。据国内恶性肿瘤尸检统计,胃癌占消化道恶性肿瘤第1位,肿瘤第3位。胃癌的病因不明,推测可能与环境、饮食及遗传等因素有关⁽¹⁾。目前,以胃粘膜细胞为靶细胞的体内遗传毒理学试验仅见大鼠胃粘膜细胞UDS试验⁽²⁾。为筛选胃遗传毒致癌物及胃抗致癌物,我们以N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(MNNG)为模型诱变剂,发展了大鼠胃粘膜微核试验,发现MNNG可引起大鼠胃粘膜细胞微核率增加,并呈剂量一效应关系。现将大鼠胃粘膜试验的方法学和初步结果简要报告如下:

材料和方法

1. 动物 健康 Wistar 大鼠, 雄性, 体重180~200g, 由北京医科大学实验动物部提供。

2. 试剂 链霉蛋白酶 E 购自 Merch 公司, MNNG 购自 Aldrich 公司, 其余试剂均为国产分析纯。

3. 染毒 大鼠于染毒前12h至染毒后4h禁食。MNNG溶于少量乙醇中, 染毒前临时用蒸馏水稀释。大鼠灌胃2次, 间隔24h, 于末次灌胃后24h采样。对照组仅以溶剂同法灌胃。在剂量一效应和时间一反应关系研究中, 所用的MNNG剂量和采样时间详见结果和讨论。

4. 取胃 大鼠断头处死, 于食道下部及十二指肠末端剪断取出胃。在胃皮区切开

一小口, 翻转胃体, 洗净胃内容物, 再将胃翻转回复原状。结扎胃皮区小口和胃食道端。从胃的十二指肠端插入塑料管, 再用无钙镁Hank's液冲洗2-3次。

5. 消化 消化液为1.0%链霉蛋白酶E溶于无钙镁Hank's液。由胃十二指肠端注入消化液, 每胃2~2.5ml。结扎胃十二指肠端, 将胃置于37℃生理盐水中, 消化30~45min。

6. 制片及观察 消化结束后, 取出胃内消化液, 再以无钙镁Hank's液冲洗3次。合并消化液和冲洗液, 500r/min离心5min, 弃去上清液。沉淀物加小牛血清50μl, 混匀后常规推片。涂片干燥后甲醇固定, 以1:30 Giemsa 染液(pH6.8)染色15min。于油镜下观察胃粘膜细胞及微核。

结果和讨论

1. 链霉蛋白酶E浓度对胃粘膜细胞产率的影响以0.5%和1.0%链霉蛋白酶E消化液进行大鼠胃粘膜消化, 产率分别为每鼠 1.58×10^6 和 4.01×10^6 细胞。因此, 采用1.0%链霉蛋白酶E消化液进行以下实验。

2. 胃粘膜细胞形态学鉴别和微核判别标准胃粘膜细胞经消化后成为游离的单个细胞, 失去其极性。根据Giemsa和PAS染色, 可将胃粘膜细胞分为表层上皮细胞、泌酸细胞、腺颈细胞和酶原细胞4种, 此4种细胞的形态学特征见表1⁽³⁻⁵⁾。Giemsa染色难以区分腺颈细胞和酶原细胞, 而后者在胃粘膜细

表 1 涂片上胃粘膜细胞形态学比较

细胞	比例	直径均值(μm)	形态	细胞质	细胞核
表层上皮细胞	21%	12.4	柱状或圆、卵圆形	浅蓝半透明、PAS阳性	圆形或卵圆形位于基底
泌酸细胞	30%	22.7	较大、卵圆形	粉红色、有时可见小颗粒	圆形
腺颈细胞	47%	15.5	柱状椭圆或三角形	紫少、浅蓝、稍透明、PAS弱阳性	圆形或卵圆形染色较深, 可位于一侧
酶原细胞 (主细胞)	1%	15.3	同腺颈细胞	胞浆染色深, 可见未染色的酶原颗粒, PAS染色颗粒呈嗜硷性	同腺颈细胞

胞中占比例甚小,故在 Giemsa 染色的涂片中将酶原细胞计入腺颈细胞中,5只大鼠胃粘膜细胞涂片的细胞分型发现,表层上皮细胞占34.2%,泌酸细胞占22.4%,腺颈细胞(包括酶原细胞)占43.4%,与文献报告⁽⁵⁾的结果相似。此外,在 MNNG 的作用下,胃粘膜细胞可见炎症变性。

微核判断标准:微核应位于胃粘膜细胞的胞浆内,与主核分离;典型的微核呈圆形或椭圆形,直径为主核的 1/3~1/20,边缘光滑、整齐;着色与主核相近,折光率与主核一致。

3. MNNG 诱发大鼠胃粘膜细胞微核形成以直接诱变剂 MNNG 作模型化合物,我们进行了 MNNG 诱发大鼠胃粘膜细胞微核形成的初步研究。

取 Wistar 雄性大鼠,分别以 MNNG 剂量 0.25、50 和 100mg/kg 灌胃 2 次,间隔 24h,末次灌胃后 24h 采样。每组 5 只大鼠,每鼠计数 2000 个胃粘膜细胞。各组胃粘膜细胞微核率分别为 0.40、1.60、2.20 和 6.60% (表 2)。绝大多数有微核的胃粘膜细胞是表

表 2 经 MNNG 作用的大鼠胃粘膜上皮微核试验结果

MNNG 剂量和染毒次数	采样时间 (h)	粘膜细胞微核率 (%)	表层上皮细胞微核率 (%)
溶剂对照	24	0.40 ± 0.55	0.80 ± 0.84
25mg/kg × 2	24	1.60 ± 0.55	2.60 ± 0.89*
50mg/kg × 2	24	2.20 ± 1.10*	4.80 ± 1.92**
100mg/kg × 2	24	6.60 ± 2.70***	13.60 ± 2.70***
50mg/kg × 2	24	2.60 ± 1.14**	5.00 ± 1.73***
50mg/kg × 2	48	2.80 ± 0.84**	5.60 ± 1.14***
50mg/kg × 2	72	0.60 ± 0.55	1.20 ± 0.84

与溶剂对照比较, *P<0.05, **P<0.01,

***P<0.005; 每组 5 只大鼠

层上皮细胞(占 88%),其原因可能是表层上皮细胞易于接触受试物,而其它细胞均位于胃底腺,胃底腺分泌物可阻碍受试物与这些细胞接触。因此,计数表层上皮细胞的微核

率可能更具价值。每鼠计数 2000 个表层上皮细胞,其微核率分别是 0.80、2.60、4.80 和 13.6%。MNNG 诱发胃粘膜细胞和表层上皮细胞微核率增加均有剂量反应关系,经 Cochrane Armitage 趋势试验⁽⁶⁾差异具有显著性(P<0.01)。当以 MNNG 50mg/kg 灌胃 2 次,于末次灌胃后 24、48 和 72h 分别采样时,胃粘膜细胞微核率分别为 2.20、2.80 和 0.60%,而表层上皮细胞微核率分别是 4.80、5.60、5.60 和 1.20% (表 2)。可见 MNNG 2 次灌胃后胃粘膜细胞微核率于 24~48h 达峰值,24 和 48h 采样的微核率差别无显著性(P>0.05)。上述结果表明:大鼠胃粘膜细胞作为 MNNG 靶细胞可诱发微核。已知 MNNG 为大鼠胃致癌物⁽⁷⁾,但其在小鼠骨髓多染红细胞微核试验中未获确切结论⁽⁸⁾。故发展大鼠胃粘膜上皮微核试验对预测胃致癌物和筛选胃抗致癌物可能具有一定的价值。

参考文献

1. 张汝献等.我国胃癌病因综合考察报告.中华医学杂志 1982; 62(4): 203.
2. Burlinson B. An in vivo unscheduled DNA synthesis assay in the rat gastric mucosa: preliminary development. Carcinogenesis 1989; 10: 1425.
3. 杨安峰等.大鼠的解剖和组织.科学出版社.北京.1985: 70-720
4. 王有祺主编.组织学.人民卫生出版社.北京.1965: 204-207.
5. Kurokawa Y, et al. Separation of gastric mucosal cells of rat with proteolytic enzymes, pronase and trypson, with special reference to the collection, morphology and viability of the generative cells. Tohoku J Exp Med 1975; 116: 241.
6. Margolin BH, et al. Evaluation of Short-term Tests for Carcinogens. Report of the IPCS's Collaborative Study on in vivo Assay. Cambridge Univ Press, Cambridge. 1988: 129-142.

(下转第 25 页)

值的。

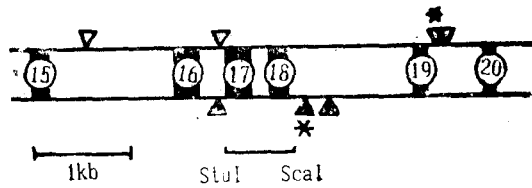


图 2 Hind III和Bcl I在17、18 外显子附近多态性位点及p114、12探针所在位置。

黑实框且数字标注处为外显子，空白框处为内含子。
 △, HindIII位点; ▲, BclI位点; *, 多态性位点。图的下方为探针所在位置。

用于血友病 A 多态性研究的探针有 2 种: 1 种是与 VIII 因子基因紧密连锁的 DNA 片段(如 DX13, St14), 1 种是 VIII 因子基因内的 cDNA 或基因组 DNA。国内沈岩、曾溢滔等用 DX13、St14 对基因外 RFLP 位点进行了研究^(8,9)。基因外 RFLP 分析的缺点是可能发生该位点与 VIII 因子基因间的重组, 产生假阳性或假阴性结果, 从而造成误诊。本文所研究的位点是基因内的 RFLP, 故它可以克服上述缺点。在 VIII 因子 cDNA 克隆后, 更多的研究是集中于寻找基因内 RFLP 位点, 当然在基因内 RFLP 位点信息不够时, 可以用基因外 RFLP 提供补充信息, 协同分析。

目前作者正在对血友病 A 家系进行 Hind III/p114、12 RFLP 的分析, 以期对携带者进行基因诊断。

参 考 文 献

1. Antonarakis S.E, et al. The molecular basis of hemophilia A in man. *TIG* 1938, 4(8): 233.
2. Gitschier J, et al. Genetic mapping and diagnosis of hemophilia A achieved through a BclI polymorphism in the factor VIII gene. *Nature* 1985; 314: 738.
3. Antonarakis S.E, et al. Hemophilia A: Detection of molecular defects and of carriers by DNA analysis. *N Engl J Med* 1985; 313: 842.
4. Wion K.L, et al. A new polymorphism in the factor VIII gene for prenatal diagnosis of hemophilia A. *Nucleic Acids Res* 1986; 14: 4535.
5. Ahrens P, et al. A new Hine III restriction fragment length polymorphism in the hemophilia A locus. *Hum Genet* 1987; 76: 127.
6. Youssoufian H, et al. Msp I polymorphism in the 3' flanking region of the human factor VIII gene. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 6312.
7. 沈岩, 等. 凝血因子 VIII 基因内 BclI 多态性研究及其在甲型血友病产前基因诊断中的应用. *中国医学科学院学报* 1987; 9(6): 402.
8. 沈岩, 等. 中国人 DX13/BglIIRFLPs 研究与甲型血友病基因连锁分析. *中国医学科学院学报* 1988; 10(6): 389.
9. 曾溢滔, 等. 中国人凝血因子 VIII 基因多态性和血友病 A 的产前诊断. *上海医学* 1989; 2: 373.

(上接第22页)

7. Sugimura T, et al. Tumour production in glandular stomach of rat by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine. *Nature* 1967; 216: 943.

8. Mavournin KH, et al. The *in vivo* micronucleus assay in mammalian bone marrow and peripheral blood. *Mutat Res* 1990; 239: 29.