

Genetic Toxicity Induced by Microcystin-LR *in Vitro*

微囊藻毒素 Microcystin-LR 体 外遗传毒性

ZHAN Li¹, ZHANG Li-shi², WANG Li¹, ZHANG Hao²,
ZHU Ling¹, TAKAYOSHI Suzuki³, MASAMITSU Honma³,
WU De-sheng², *

詹 立¹/张立实²/王 莉¹/
张 浩²/朱 玲¹/铃木孝昌³/
本间正充³/吴德生², *

(1. National Chengdu Center for Safety Evaluation of Traditional Chinese Medicine, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China; 2. West China Public Health School, Sichuan University, Chengdu, 610041, Sichuan, China; 3. Division of Genetics and Mutagenesis, National Institute of Health Science, Tokyo 1588501, Japan)

(1. 四川大学华西医院国家成都中药安全性评价中心, 四川 成都 610041; 2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041; 3. 日本国立医药品食品卫生研究所遗传变异部, 日本东京 588501)

【摘要】 背景与目的: 应用人类淋巴瘤母细胞 TK6 研究微囊藻毒素 (Microcystin-LR, MCLR) 的体外遗传毒性。 材料与方法: MCLR 体外染毒 TK6 细胞 4 h 或 24 h 后检测细胞毒性、微核及 tk 位点突变频率。 结果: 4 h 染毒未引发明显细胞毒性, 24 h MCLR 染毒导致 TK6 细胞相对存活率下降, 细胞微核率及 TK 基因突变频率明显上升, 并有剂量 - 反应关系。 最高浓度组 (80 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 的细胞微核率及 TK 基因突变频率分别是对照组的 4.8 及 5.1 倍。MCLR 诱发 tk 位点两种不同表型的突变细胞集落, 即正常生长集落及缓慢生长集落, 并以后者为主。 结论: 24 h 染毒 MCLR 可以诱发 TK6 细胞微核及基因突变, 揭示 MCLR 可能是一种断裂剂。

【关键词】 微囊藻毒素; 微核; 突变; TK6 细胞

中图分类号: R1 文献标识码: A 文章编号: 1004 - 616X(2005)03 - 0171 - 04

【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM: Human lymphoblastoid cell line TK6 was used to investigate the *in vitro* genotoxicity of Microcystin-LR. MATERIAL AND METHODS: Cytotoxicity response, micronucleus(MN) and mutation frequency at tk locus induced by MCLR after 4 h or 24 h treatment were detected. RERULTS: Treatment with MCLR for 4 h did not induce a significant cytotoxic response at less than 80 $\mu\text{g}/\text{ml}$. Exposure to MCLR for 24h decreased relative survival(RS), induced both MN and TK mutation in a concentration-dependent manner. The maximum induction of MN and TK mutation were 4.8 and 5.1 times those of the control, respectively. Two distinct phenotypic colonies of TK mutants were generated, namely tk-NG and tk-SG mutant colonies but the latter dominated. CONCLUSION: MCLR was clastogenic in TK6 human lymphoblastoid cells.

【KEY WORDS】 Microcystin-LR; micronucleus; mutation; TK6 cell

蓝绿水藻引起的水污染已经成为一些国家和地区较为严重的公共卫生问题^[1]。微囊藻毒素(Microcystins)是由铜绿微囊藻属(*Microcystis aeruginosa*)、水华鱼腥藻属(*Anabaena flos-aquae*)、泡沫节球藻(*Nodularia spumigena*)、颤藻属(*Oscillatoria aeruginosa*)等产生的单环七肽肝毒素。在目前已知的 50 余种微囊藻毒素异构体中 Microcystin-LR(MCLR)最为常见。MCLR 引起的肝脏毒性已得到证实并有较多的报道^[2]。我们实验通过 MCLR 染

毒人类淋巴瘤母细胞 TK6, 应用微核试验及 TK 基因突变试验对其体外遗传毒性进行研究。

1 材料与方法

1.1 细胞株 人的类淋巴瘤母细胞 TK6 由日本国立医药品食品卫生研究所遗传变异部提供。用含 10 % 马血清, 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 丙酮酸钠, 100 U/ml 青霉素和 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 链霉素的 RPMI1640 培养液(RPMI10), 在

收稿日期: 2005 - 01 - 17; 修订日期: 2005 - 03 - 06

基金项目: 第 25 期笹川医学奖学金资助

作者简介: 詹 立(1970 -), 男, 湖北省人, 讲师, 博士, 从事毒理学研究。

* Correspondence to: WU De - sheng, Tel: 86 - 28 - 85501177, E - mail:

dswwcums@mail.sc.cninfo.net

37 °C, 5 % CO₂, 饱和湿度条件下做常规悬浮培养, 细胞密度维持在(1 × 10⁵ ~ 1 × 10⁶) cells/ml。在突变实验开始前, TK6 细胞在含有 CHAT (10 μmol/L 脱氧胞苷 deoxycytidine, 200 μmol/L 次黄嘌呤 hypoxanthine, 0.2 μmol/L 氨基蝶呤 aminopterin, 1.75 μmol/L 胸腺嘧啶核苷 thymidine) 的完全培养基中培养 2 d, 200 g 离心 5 min, RPMI10 洗涤, 重悬于只含有 CHT(没有氨基蝶呤 aminopterin) 的完全培养基再培养 2 d, 以清除自发突变 tk⁻、基因型 TK6 细胞, 在几天内用于突变试验。

1.2 细胞染色 MCLR(Wako Pure Chemical Co. Tokyo, Japan) 于 -20 °C 冰箱保存, 实验前溶于 PBS 缓冲液。共设 5 个剂量组(5、10、20、40、80 μg/ml)。4 h 处理组调整细胞密度达到 5 × 10⁵ cells/ml, 反应总体积 20 ml, 置于 37 °C 空气浴振荡器染毒; 24 h 处理组细胞密度为 2.5 × 10⁵ cells/ml, 反应总体积 50 ml, 置于 CO₂ 培养箱染毒。均以 PBS 为对照。染毒结束时 200 g 离心 5 min, 弃上清液并用 PRMI10 洗涤细胞两遍, 重新悬浮细胞于完全培养液中并调整细胞密度到 2 × 10⁵ cells/ml。

1.3 微核试验(Micronucleus test, MNT) 染毒后 48 h 收获细胞, 约 10⁶ 个细胞经 0.075 mol/L KCl 低渗处理, 冰醋酸-甲醇(1:3)固定液固定, 离心后用含 1 % 冰醋酸的甲醇制成悬液, 滴片, 风干。荧光显微镜(Olympus BX50, Japan)镜检之前, 丫啶橙(AO)染色。

每个样本制片两张, 以下三类细胞均作为微核细胞计数: ① 带有一个典型微核的细胞, ② 带有一个大微核(直径大于主核直径的 1/4)的细胞, ③ 带有多个微核(无论大小)的细胞。每张片子至少计数 500 个完整的单核细胞。计算每个样本 1 000 个细胞中微核细胞率。(‰, 以下简称微核率)

1.4 TK 基因突变试验

1.4.1 平板接种效率测定 取一定量处理过的 TK6 细胞, 用 RPMI10 梯度稀释至 8 cells/ml, 在 96 孔培养板内每孔加入 200 μL 培养液(1.6 cells/well), 37 °C, 5 % CO₂, 饱和湿度的培养箱内培养 12 d, 计数每块平板的集落形成数, 计算 0 d 平板接种效率(PE0)。余下细胞作突变表达培养 3 d, 每天计数细胞密度, 并维持细胞密度在 3 × 10⁵ cells/ml 左右。3 d 表达培养结束后, 同法测定 PE3。

1.4.2 tk 位点突变频率测定 3 d 表达培养结束后, 取适量细胞, 加入三氟胸苷(Trifluorothymidine, TFT), 使其终浓度为 3 μg/ml, 混匀, 在 96 孔平板内, 每孔分别加入 TK6 细胞 40 000 个。37 °C, 5 % CO₂, 饱和湿度条件下培养 12 d 后计数平板含正常生长集落

(Normal growth colony, NG) 的孔数, 每孔再添加适量 TFT 继续培养 10 d 计数缓慢生长集落(Slow growth colony, SG)的孔数。在第一次计数抗-TFT 的生长集落时, 直径大于培养板孔径 1/5 的细胞克隆均被计数为 NG。

1.5 结果计算和统计处理 细胞的平板效率 PE0 和 PE3 按 Poisson 分布计算。

$$PE = \frac{\ln(EW/TW)}{N}$$

EW: 不含集落的孔数
TW: 总孔数, 此处为 192
N: 每孔的平均细胞,
在此 N = 40 000

细胞毒性指标相对存活率(RS)以 % 表示

$$RSG(\%) = [PE0(\text{处理组})/PE0(\text{溶媒对照组})] \times 100$$

细胞毒性指标相对悬浮增长率(RSG)根据每天细胞增长(Daily Cell Growth, DCG) 计算

$$RSG(\%) = \frac{DCG1 \times DCG2 \times DCG3(\text{处理组})}{DCG1 \times DCG2 \times DCG3(\text{对照组})}$$

突变集落也呈 Poisson 分布, 考虑到细胞平板效率的因素, MF 表示如下, 用 Mutant 软件进行统计学分析^[3]。

$$MF = \frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE3}$$

EW: 不含集落的孔数
TW: 总孔数
N: 每孔的平均细胞,
在此 N = 1.6

2 结果

2.1 TK6 细胞对 MCLR 的细胞毒性反应 不同浓度的 MCLR(5、10、20、40、80 μg/ml) 分别染毒 TK6 细胞 4 h 及 24 h。图 1 显示细胞毒性反应结果。相对存活率(Relative survival, RS) 和相对悬浮增长率(Relative suspension growth, RSG) 都是细胞毒性指标, 后者反应染毒后 72 h 细胞相对生长状况。不同剂量组 MCLR 染毒 TK6 细胞 4 h 后未见细胞毒性, RS 及 RSG 均无显著性差异。24 h 处理后 RSG 随染毒剂量的增大而逐步下降, 并有明显的剂量效应关系, 但 RS 指标无显著变化。

2.2 微核实验结果 MCLR 染毒 TK6 细胞 24 h 诱发微核细胞率随着染毒浓度的增加而增高, 存在着明显的剂量反应关系, 见图 2。最高浓度组(80 μg/ml) 诱发微核率是对照组的 4.8 倍。

2.3 TK 基因突变试验结果 MCLR 染毒 TK6 细胞 24 h 后, 随作用剂量的增加 tk 位点突变频率明显升高, 与对照组相比具有显著性差异。最高浓度组(80 μg/ml) 诱发 TK 基因突变率是对照组的 5.1 倍。

突变集落呈现两种表现型, 即正常生长突变体(NG), 突变细胞倍增时间与野生型 TK6 细胞较为一致

(13~17 h); 缓慢生长突变体 (SG), 其细胞倍增时间 > 21 h. SG 突变体在 MCLR 诱发突变细胞中占较大比例 (图 3)。

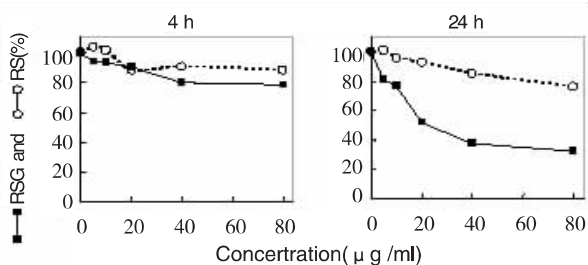


图 1 MCLR 染毒 TK6 细胞 4 h 及 24 h 细胞相对存活率及相对悬浮增长率

Figure 1 Cytotoxic response represented by RS and relative cell growth (RSG) of TK6 cells treated with MCLR for 4 and 24 h respectively

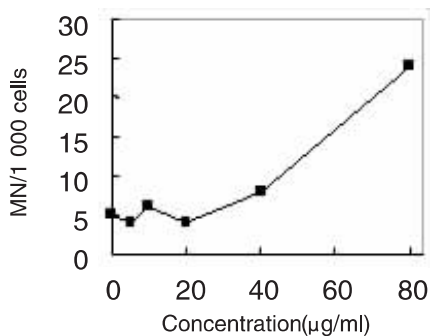


图 2 MCLR 染毒 TK6 细胞 24 h 后诱发微核细胞率
Figure 2 MN induction treated with MCLR for 24 h

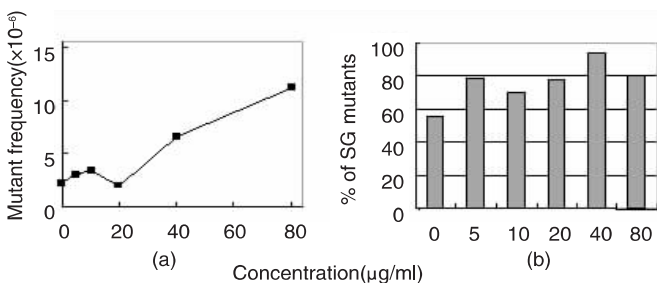


图 3 MCLR 染毒 24 h 后 TK 基因突变频率及缓慢生长突变体比例
Figure 3 Mutation frequency at TK gene, and percentage of slowly growing (SG) among TK-deficient mutants treated with MCLR for 24 h

3 讨论

MCLR 是微囊藻毒素中毒性最强的一种。腹腔注射 1~2 µg MCLR 就能导致小鼠死亡, 其代谢产物主要聚集于肝脏。目前对 MCLR 的肝脏毒性研究较多^[4,5], 但对其遗传毒性的报道相对较少, 尚无一致结论。不同学者应用蓝藻水华提取的微囊藻毒素进行 Ames 试验报道结果各异, Ding 等^[6] 的研究表明无论有无代谢活化作用 MCLR 的 Ames 试验结果均为阴性, Tsuji 等^[7] 也曾报道 MCLR 在 Ames 试验中不具遗传毒性。但另一方面, 有研究发现 MCLR 对哺乳类细胞有遗传毒性效果。Ding 等^[6] 在彗星试验中观察到 MCLR 对大鼠原代肝细胞 DNA 的

损伤, Rao 等^[8] 通过体内染毒小鼠发现 MCLR 可致肝细胞染色体损伤及 DNA 双链断裂。另有研究报道 MCLR 可导致染色体畸变及诱发哺乳类细胞基因突变^[9]。

我们研究再一次证实了 MCLR 的体外遗传毒性。MCLR 染毒可导致人类淋巴母细胞 TK6 微核形成并诱发 TK 基因突变。微核的产生来源于诱变剂诱发染色体结构异常的效应或对细胞分裂器的损伤 (诸如纺锤体毒剂和分裂阻断剂) 所致染色体数目的异常。以往研究证实, 微囊藻毒素的毒性机制在于其能强烈抑制丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶 (Protein phosphatases, PP) PP1 和 PP2A 的活性, 使体内蛋白质过磷酸化, 蛋白磷酸酶 PP2A 的失效可使染色体出现超浓缩, 多倍体等异常现象^[10]。

MCLR 处理 TK6 细胞时, 在最高浓度组 (80 µg/ml) 短期 4 h 染毒未见任何效果, 细胞毒性和遗传毒性的出现均是在染毒 24 h 之后。尽管体内染毒小鼠 MCLR 呈现较强毒性, 体外处理时, 尤其对于非肝脏细胞, 其呈现的细胞毒性相对较弱。原因之一可能是单环七肽的微囊藻毒素不容易进入细胞, 它需要特殊的转运系统^[11]。我们应用相对存活率 (RS) 和相对悬浮增长率 (RSG) 评估 MCLR 的细胞毒性, RS 反映暴露结束时平板接种效率, 而 RSG 则反映随后 3 d 细胞相对生长情况。较之 RS 指标, RSG 显示出更严重的细胞毒性反应, 提示 MCLR 有抑制细胞生长的作用。TK 基因突变试验中, 24 h 染毒对于检测某些断裂剂或纺锤体毒物较为必要, 因为这些物质的致突变性可能表现出对细胞生长周期的依赖性, 从而导致 4 h 处理结果为阴性^[12]。

我们实验中 MCLR 不仅造成 TK 基因突变频率升高, 并且诱发 SG 的比例随着作用剂量的增加而升高。该趋势与 MNT 结果较一致, 表明 24 h 染毒主要引起诸如较大缺失, 重组或重排的较大结构变化。对其致突变分子机制有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] Codd GA, Bell SG, Brooks P. Cyanobacterial toxins in water [J]. *Water Sci Technol*, 1989, 21: 1-13.
- [2] Carmichael WW, Azevedo SMF, An JS, et al. Human fatalities from cyanobacteria: chemical and biological evidence for Cyanotoxins [J]. *Environ Health Perspect*, 2001, 109(7): 663-667.
- [3] Honma M, Momose M, Sakamoto H, et al. Spindle poisons induce allelic loss in mouse lymphoma cells through mitotic non-disjunction [J]. *Mutat Res*, 2001, 493(1): 110-114.
- [4] Rao PVL, Bhattacharya R, Pant SC, et al. Toxicity evaluation of *in vitro* cultures of freshwater cyanobacterium *Microcystis aeruginosa*. Part 1. Hepatotoxic and histopathological effects in



rats[J]. *Biomed Environ Sci*, 1995,8: 254-264.

[5] Bhattacharya R, Rao PVL, Bhaskar ASB, *et al*. Liver slice culture for assessing hepatotoxicity of freshwater cyanobacteria [J]. *Hum Exp Toxicol*, 1996, 15: 105-110.

[6] Ding WX, Shen HM, Zhu HG, *et al*. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China[J]. *Mutat Res*, 1999, 442: 69-77.

[7] Tsuji K, Watanuki T, Kondo F, *et al*. Stability of microcystins from cyanobacteria. Part IV. Effect of chlorination on decomposition[J]. *Toxicon*, 1997, 35: 1 033-1 041.

[8] Rao PVL, Bhattacharya R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver *in vivo* [J]. *Toxicology*, 1996, 114: 29-36.

[9] Suzuki H, Watanabe MF, Wu Y, *et al*. Mutagenicity of microcystin-LR in human R5a cells[J]. *Int J Mol Med*, 1998, 2: 109-112.

[10] Mayer-Jaekel RE, Ohkura H, Gomes R, *et al*. The 55 kd regulatory subunit of Drosophila protein phosphatase 2A is required for anaphase[J]. *Cell*, 1993, 72: 621-633.

[11] Runnegar M, Berndt N, Kaplowitz N. Microcystin uptake and inhibition of protein phosphatases: effects of chemoprotectants and self-inhibition in relation to known hepatic transporters[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 134: 264-272.

[12] Honma M, Zhang LS, Sakamoto H, *et al*. The need for long-term treatment in the mouse lymphoma assay[J]. *Mutagenesis*, 1998, 14: 23-29.

在医学或物理化学领域,常见标准化量名称与废弃的量名称的对照列表

(引自《法定计量单位在医学上的应用(第三版)》)

标准化量名称及符号	废弃的量名称	说明
质量 m	重量	在科学技术中,重量表达的是力的概念,其单位为N;而质量的单位为kg,二者不可混淆。只在人民生活中贸易中,质量习惯称为重量,但国家标准不赞成这种习惯
体积质量,密度 ρ	比重	历史上“比重”有多种含义:当其单位为 kg/m^3 时,应称为体积质量;当其单位为1,即表示在相同条件下,某一物质的体积质量与另一参考物质的体积质量之比时,应称为相对体积质量
相对体积质量,相对密度 d		
质量热容,比热容 c	比热	定义为热容除以质量,单位为 $\text{J}/(\text{kg} \cdot \text{K})$
质量定压热容,比定压热容 c_p	定压比热容,恒压热容	定义为定压热容除以质量,单位为 $\text{J}/(\text{kg} \cdot \text{K})$ 。称为定压比热容违背“比字加在量的名称前用以指该量被质量除所得的商”这一规定
电流 I	电流强度	单位为A
相对原子质量 A_r	原子量	二量的单位为1 单位为kg,常用u
相对原子质量 M_r	分子量	
分子质量 m_n		
物质的量 n	摩尔数,克原子数,克分子数,克离子数,克当量	单位为mol。“摩尔数”是在量的单位名称“摩尔”后加上“数”字组成的量名称,这类做法是错误的。使用mol时必须指明基本单元
质量分数 ω	重量百分数,质量百分比浓度,浓度	单位为1,是某物质的质量与混合物的质量之比
体积分数 ϕ	体积百分比浓度,体积百分含量,浓度	单位为1,是某物质的体积与混合物的体积之比
质量浓度 ρ	浓度	单位为 kg/m^3 ,是某物质的质量除以混合物的体积
浓度,物质的量浓度 c	摩尔浓度,体积克分子浓度,当量浓度	单位为 mol/m^3 ,常用 mol/L ,是某物质的量除以混合物的体积
[放射性]活度 A	放射性强度,放射性	单位为Bq

本刊编辑部