

A - 23 端粒酶在消化道肿瘤组织中的表达

陈 雯¹ 张 桥¹ 寸凌云¹ 万德森²

(¹ 中山医科大学卫生毒理学教研室 广州 510089 ² 中山医科大学肿瘤医院腹外科)

端粒 (Telomere) 的长度与细胞的寿命密切相关, 正常细胞的端粒随分裂次数的增加而逐渐缩短, 最终导致细胞衰老死亡。端粒长度的维持需要端粒酶 (Telomerase) 的激活, 端粒酶是一核糖蛋白体复合物, 在人体正常情况下, 只在生长速度很快的胚胎细胞及骨髓造血细胞中可检测到此酶, 而在大多数分化了的体细胞中则检测不到。端粒酶的激活与肿瘤的发生及发展的关系的成为近年来肿瘤学研究的热点。本研究采用目前国际上普遍应用的端粒酶重复序列扩增法 (Telomeric Repeat Amplification Protocol, TRAP) 来检测原发性消化道肿瘤组织中端粒酶的活性。共检测了 40 例, 其中包括 9 例直肠癌、20 例大肠癌和 11 例胃癌以及它们相应的癌旁组织。结果发现在 40 例肿瘤组织中, 有 36 例端粒酶呈阳性 (90%), 而 39 例癌旁组织中则全部阴性。另外, 端粒酶的表达与肿瘤发生的部位、类型、恶性程度及肿瘤转移的关系未见有关联。结果提示端粒酶的激活也许是细胞永生化的所必需的, 端粒酶可能是一个很好的肿瘤标记物, 可运用于临床恶性肿瘤诊断和鉴别诊断, 并可能作为肿瘤治疗的靶标。

B1 致突变的基础及方法研究部分

B1 - 1 ⁶⁰Co - 射线和 B(a)P 处理的人外周血 T 淋巴细胞 HPRT 基因位点突变频率的检测和比较

徐洪兰 曹 毅 段志凯 吴启庆 (中国辐射防研究所 生命科学研究所 太原 030006)

应用 T 淋巴细胞克隆分析技术, 检测了经不同剂量的 ⁶⁰Co - 射线和苯并 (a) 芘 B(a)P 处理的人外周血 T 淋巴细胞 HPRT 基因位点的突变频率, 抗性突变体用 6 - 巯基鸟嘌呤 (6 - TG) 筛选。在诱导的突变频率相同的情况下, 初步比较了两种诱变剂的剂量范围、细胞毒性及诱变剂的致突性, 得出了本实验条件下 ⁶⁰Co - 射线和 B(a)P (+S9) 处理后的细胞存活率及突变频率的剂量效应曲线和数学表达式。当射线的剂量在 0.5 ~ 4Gy (剂量率 1.03Gy/min) 时, HPRT 位点的突变为 1.5 ~ 11.3 个突变体/10⁵ 个细胞, 当 B(a)P 的剂量在 0.5 ~ 8g/ml 时, 突变频率为 1.4 ~ 14.2 个突变体/10⁵ 个细胞。当诱导的突变频率为 1 ~ 14 个突变体/10⁵ 个细胞时, 剂量为 0.05 ~ 4.76Gy 的射线的效应基本上相当于浓度为 0.15 ~ 7.36μg/ml B(a)P 的效应。当细胞存活率为 37% 时, B(a)P 诱导的 HPRT 位点的突变频率 (13.93 × 10⁻⁵) 大于 ⁶⁰Co - 射线 (8.80 × 10⁻⁵) 的作用。

国际原子能机构和核工业科学基金资助项目

B1 - 2 亚硫酸氢钠诱发 CHO 细胞 gpt 基因突变的分子分析

孟紫强 (山西大学 生命科学系 环境生物毒理研究室 太原 030006)

本文采用标准的突变细胞克隆技术、PCR 及 DNA 序列分析方法研究了二氧化硫在体内的衍生物——亚硫酸氢钠对 CHO - AS52 细胞 gpt 基因的致突变作用。实验结果表明, 高浓度的亚硫酸氢钠能诱发该基因发生突变, 且其突变频率随该化学物浓度的增加而增高。PCR 分析指出, 在 CHO - AS52 细胞自发的、5mmol/L 和 10mmol/L 亚硫酸氢钠诱发的突变体中, gpt 基因完全缺失者所占比率分别为 36.0%、44.0% 及 65.0%。对 10mmol/L 亚硫酸氢钠诱发的非缺失型 gpt 基因突变的 PCR 序列分析表明, 在 5 个突变细胞克隆中, 有 1 个发生基因的碱置换型和移码型突变, 其余 4 个突变细胞克隆的 gpt 基因结构未发现改变,

其碱基的改变可能发生的基因启动子区。

B1 - 3 中国田鼠卵巢细胞 *gpt* 基因自发和亚砷酸钠诱发突变的分子分析

孟紫强¹ 谢武雄² (¹ 山西大学生命科学系环境生物毒理学研究室 太原 030006 ² 美国德州医科大学)

本文研究了亚砷酸钠对 CHO - AS52 细胞 *gpt* 基因的致突变作用。实验结果表明, 亚砷酸钠能诱发该基因发生突变, 且其突变频率随砷浓度的增加而增高。PCR 分析指出, 绝大多数亚砷酸钠诱发的 CHO - AS52 突变体的 *gpt* 基因完全缺失。在 CHO - AS52 细胞自发的、50 μ mol/L 和 100 μ mol/L 亚砷酸钠诱发的突变体中, *gpt* 基因完全缺失者所占比率分别为 36.00%、54.72% 及 66.67%。对亚砷酸钠诱发的非缺失型 *gpt* 基因突变的 PCR 产物直接进行 DNA 序列分析表明, 在 9 个突变细胞克隆中, 有 2 个发生移码突变, 其余 7 个突变细胞克隆的 *gpt* 基因结构未发现改变, 碱基的改变可能发生在基因启动子区。

B1 - 4 拟真核细胞 CHL 过氧化适应及其机理

薛丽君 金中初 (浙江医科大学病理生理学教研室 杭州 310031)

在中国仓鼠肺成纤维细胞 (CHL) 中, 观察 H₂O₂ 诱导的细胞活力 (MTT 法显示) 和 DNA 断裂 (以 DNA 解螺旋荧光分析法显示) 水平的过氧化适应反应。并在 DNA 适应模式上观察过氧化氢酶 (CAT) 和多聚 ADP 核糖聚合酶 (PARP) 的诱导情况, 及 PARP 的特异性抑制剂 3 - 氨基苯胺 (3 - AB) 对 DNA 断裂的阻断情况来断定该酶是否参与适应诱导作用。结果表明细胞活力水平在细胞存活情况下存在过氧化适应, 0.09 μ M 为本实验条件下最佳预处理浓度。同样, DNA 断裂水平也存在过氧化适应, 且预处理剂量与适应的诱导具有一定的剂量 - 效应关系, 而 50 μ M 为本实验条件下最佳预处理浓度。但两者诱导所需的预处理剂量不同, 攻击剂量也不同。低剂量 H₂O₂ (5 - 100 μ M) 预处理后 24hr, CAT 酶活性均比对照组高 ($P < 0.05$), 并与抑制 DNA 断裂的适应效应具的相关性 ($r = 0.95$, $P < 0.05$)。另外 2 及 3mM 3 - AB 可明显抑制 DNA 断裂水平适应性反应 ($P < 0.05$)。结果提示, 细胞整体活力水平的氧化适应在真核细胞可能有一定普遍性, 不仅存在致死性适应, 也存在非致死性适应; 细胞活力水平与 DNA 断裂水平适应模式的不同, 两者可能存在不同的诱导途径。过氧化氢酶诱导是产生 DNA 断裂水平过氧化适应反应的机制之一。PARP 在 H₂O₂ 的适应诱导中起一定修饰作用。

国家自然科学基金资助

B1 - 5 CHL 细胞 DNA 解螺旋荧光分析法实验参数的选择及其应用

薛丽君 金中初 (浙江医科大学病理生理学教研室 杭州 310031)

不同种属动物或不同脏器细胞的 DNA 解螺旋速度不同, 本研究确定在 CHL 田鼠中以 DNA 解螺旋荧光分析法 (FADU) 作为检测细胞断裂的方法时的较佳实验条件: 按 Birnboim 等的观点, 实验条件的选择标准有三个, 即 OD 值较大, OD_T/OD_B 比值在 2.0 - 2.5 范围内, 而空白对照组 OD 值不应低于 50%, 综合考虑时应在保持 OD 值较大的前提下兼顾 OD₀ 值和 OD_T/OD_B 比值。实验证明, 在 CHL 细胞, DNA 在解旋液 NaOH 浓度为 0.4N 时所得的 OD 值, OD₀ 值均优于 0.2N 时。但 OD_T/OD_B 比值后者优于前者, 在 15 解螺旋所得的 OD 值、OD₀ 值均优于 0 时, 但 OD_T/OD_B 比值后者优于前者。因此采用解旋液 NaOH 浓度 0.4N, 解旋温度以 0 30min, 15 60min 作为 FADU 在 CHL 上的实验条件。把该方法应用该条件下的 FADU 在 CHL 细胞中证明, H₂O₂ 与 DNA 断裂间存在剂量效应关系, 且一定浓度范围内 (5 ~

50 μ M) 的 H₂O₂ 诱导的氧化适应反应能明显抑制高浓度 H₂O₂ (5000 μ M) 所致的 DNA 断裂。

B1 - 6 MNNG引起猴肾 Vero 细胞基因表达改变及有关 cDNA 片段的克隆和初步鉴定

胡文蔚 余应年 张小山 董海涛

(浙江医科大学病理生理教研室及医学分子生物学实验室 杭州 310031)

本实验室曾利用穿梭质粒证明 MNNG 处理后可引起哺乳动物细胞非定标突变, 并有基因表达的改变参与作用。据此运用 DD - PCR 技术, 通过 24 对锚定及任意引物组合显示基因的差异表达, 并分离了 7 个表达有差异的片段。其中 3 个片段的相关基因属于对 MNNG 处理的初级反应基因 (其表达化不受蛋白合成抑制剂放线菌酮 CHM 的影响), 另 2 个属于次级反应基因 (其在 MNNG 诱导后的表达变化可被 CHM 抑制)。反向缝隙印迹杂交分析印证了 2 个片段在 DD - PCR 中发现的改变, 同时分析的本实验室分离的 25 个片段中, 8 个片段的变化被验证与 DD - PCR 中的改变一致。序列分析结果显示这些片段与许多基因有高同源性, 其中包括一些参与信息传导的基因。为应用反义阻断技术筛选参与发生非定标突变的相关 cDNA 片段, 改造了真核表达载体的抗性使之不干扰利用穿梭质粒对哺乳动物细胞非定标突变的检测, 并利用此载体构建了 3 个差异表达片段的反义表达质粒。进一步的研究工作正在进行中。

B1 - 7 hMLH1 反义 RNA 表达细胞的突变表型检测

钱瑛 余应年 张芸 陈星若 罗建红 (浙江医科大学病理生理学教研室 杭州 310031)

研究发现 30 % 的遗传性非息肉性结肠癌 (HNPCC) 的发病归因于错配修复基因 hMLH1 缺陷, 来源于 HNPCC 的 hMLH1 基因缺失的细胞系 hgprt 自发突变率升高, 且出现了 MNNG 耐受。本实验室利用逆转录 - 聚链式反应 (RT - PCR), 特异地扩增 HeLa 细胞中错配修复基因 hMLH1 cDNA 的最保守区域, 并将其克隆到 TA 载体, 从重组质粒两端进行序列分析, 证实为目的片段。然后将该目的片段反向克隆到哺乳动物表达载体 pREP9 的 BamH 和 Kpn 位点之间, 筛选后得 pREP9 - hMLH1 反义表达重组质粒。用磷酸钙 - DNA 共沉淀法将重组质粒 DNA 及载体 DNA 分别导入 HeLa 细胞, 经 G418 筛选, 扩大培养, 得 HeLa - hMLH1 和 HeLa - R9 细胞系。凝胶阻滞实验证实转染有 pREP9 - hMLH1 重组质粒的 HeLa - MLH1 细胞抽提物中 G·T 和 A·C 错配结合蛋白表达正常。该细胞系出现了 MNNG 耐受, 其 hgprt 位点自发突变率较 HeLa 和 HeLa - R9 细胞分别升高了 3.53 和 8.78 倍, 为进一步研究 hMLH1 基因的功能与 HNPCC 的关系提供了可能。

国家自然科学基金资助项目 39570303

B1 - 8 MNNG 诱发的遗传不稳定 vero 细胞中 DNA 体外复制保真度和错配修复功能的研究

冯朝晖 余应年 陈星若 (浙江医科大学病理生理教研室及分子生物学实验室 杭州 310031)

我们实验室证实, 化学致癌物 MNNG 可以诱发细胞延迟发生的, 以非定标性突变成成为特征的遗传不稳定状态。用 0.2 μ M MNNG 处理猴肾 vero 细胞 2.5h 并继续培养 24h 后, 将健全的穿梭质粒 pZ189 转染入细胞并在其中复制, 结果分离到该质粒中的 supF tRNA 基因的突变体, 突变率高出对照组 5 倍以上, 且突变谱明显不同于定标性突变。为了明确 MNNG 诱发细胞遗传不稳定的确切机制, 我们对上述 vero 细胞体外复制保真度进行了研究。利用在 vero 细胞抽提物中建立的 DNA 体外复制系统, 对质粒 pZ189 DNA 进行复制。发现在遗传不稳定 vero 细胞抽提物中复制后的 pZ189 质粒中 supF tRNA 基因突变率高出正常对照组 6~8 倍 (P < 0.05), 证实有 DNA 复制保真度的明显下降。我们同时对该细胞 DNA 错配修复功能进行了研究。利用凝胶阻滞技术和体外 DNA 错配修复技术, 发现上述细胞抽提物中存在 G·T 错配; 并且发现在该

细胞核抽提物中, G·T 错配能被有效, 特异地修复成 G·C, 和正常细胞比较, 未发现有上述错配修复功能的缺陷。以上结果高度提示, MNNG 诱发的遗传不稳定细胞中 DNA 复制系统功能缺陷可能为细胞 DNA 复制保真度下降和非靶向性突变率升高的重要原因。这种复制系统的缺陷可能为 MNNG 诱发细胞遗传不稳定的重要机制之一。对其机制的进一步研究正在进行之中。

B1 - 9 单细胞微凝胶电泳技术及其在人外周淋巴细胞 DNA 损伤研究中的应用

孟紫强¹ 张连珍² 池翠萍²

(¹ 山西大学生命科学系 环境生物毒理学研究室 太原 030006 ² 中国辐射防护研究院二所)

本文详细介绍了单细胞微凝胶电泳 (SCG) 技术的原理和操作过程, 并应用该技术研究了 γ 线照射、过氧化氢 (H₂O₂)、氯化镉 (CdCl₂) 对人血淋巴细胞 DNA 的损伤效应。结果表明, γ 线照射、H₂O₂ 和 Cd-Cl₂ 均能引起细胞 DNA 迁移长度增加, 且呈显著的剂量效应关系。对未处理对照细胞 DNA 迁移的原因及 SCG 实验操作过程中应注意的事项也进行了讨论。

B1 - 10 多色荧光原位杂交检测小鼠精子非整倍体

汪 旭 T Shimid, ID Adler

(¹ 云南师范大学生命科学系 昆明 650092 ² 德国环境及健康研究中心 GSF 哺乳动物遗传学研究所)

本试验以多色荧光原位杂交 (multi-color FISH) 技术评价了 2-(4'-噻唑) 苯丙咪唑 (TB) 在雄性小鼠生殖细胞形成过程中的非整倍体诱发效应。根据小鼠精子发育周期, 以口饲法处理动物 11 天 (细线期 - 粗线期, 剂量为 100 - 300mg/kg), 间隔 22 天后取小鼠精子涂片。联合应用 8 号、X 及 Y 染色体特异性 DNA 探针进行多色 FISH, 检测精子中出现的二倍体、双体、和缺体频率。结果发现: 在 200mg/kg 剂量组, 上述三类异常精子频率均显著高于溶剂对照 ($P < 0.01 - 0.05$)。其它二个剂量组的非整倍体精子频率与对照无显著差异, 但最高剂量组的二倍体精子数显著高于溶剂对照 ($P < 0.05$)。试验证明, TB 在哺乳动物生殖细胞发育具有显著的减数分裂抑制和染色体不分离诱发效应。多色 FISH 技术对于准确检测非整倍体诱发剂所诱发的特异染色体分离异常具有较高的应用价值。

国家自然科学基金、云南省科委国际合作基金及欧共体基金资助。

B1 - 11 L5178Y 细胞 TK 基因突变分析能检出多倍体/非等倍体诱导剂

张立实¹ 本间正充² 林 真² 祖父尼俊雄²

(¹ 华西医科大学公共卫生学院营养与食品卫生学教研室 成都 610041 ² 日本国立卫生研究所变异遗传部 东京 テ (日文) 158)

L5178Y 小鼠淋巴瘤细胞 TK 基因突变分析 (MLA) 不仅能检出基因突变诱导剂, 还能检出染色体畸变诱导剂, 但多倍体/非等倍体诱导剂在常规 MLA 实验程序 (即 2 - 4h 处理加 $\pm 12d$ 表达) 中常不能得到明显的阳性结果。在前一阶段的 L5178Y 细胞微核分析中已发现, 对多倍体/非等倍体诱导剂而言, 24 或 48h 连续处理诱导微核细胞的能力远较常规的 2 - 4h 处理为强。为阐明处理时间是否也是影响此类物质在 MLA 中反应性的关键因素, 选择了 4 种多倍体/非等倍体诱导剂 (秋水仙碱, 长春新碱, 己烯雌酚和氢醌) 以 3h 和 24h 两种处理作了 MLA 测试比较。在 3h 处理程序中, 秋水仙碱、长春新碱和己烯雌酚均未能诱导出明显的阳性反应, 而在 24h 处理程序中, 这三种化学物均使总突变频率和小集落突变频率增加, 剂量 - 反应关系明显的阳性结果。表明处理时间是影响 MLA 结果的主要因素。氢醌在两种处理程序中都得到明

显的阳性结果,其原因可能是该物质不仅是一种多倍体/非等倍体诱导剂,同时也是一种基因突变诱导剂。在本研究中,氢醌的 3h 处理能诱导更高的总突变频率,表明它有较强突变诱导活性。但另一方面,该化学特异的 24h 处理似乎能更有效地诱导小集落突变频率,这也表明处理时间可能是影响 MLA 检测多倍体/非等倍体诱导活性的能力的主要因素。采用长春新碱作了两次独立的实验。结果表明,两次实验所得各项指标有较好的重现性,证实 24h 处理程序所得结果的可靠性和重现性。

B1 - 12 荧光原位杂交检测早先受照者的染色体畸变

张泽云 金瑾珍 叶常青 刘秀林 程 昕 孙志贤 (北京放射医学研究所 100850)

以染色体特异性探针进行的荧光原位杂交,也称为染色体绘图 (Chromosome Painting),能灵敏和迅速地检测染色体易位等稳定性畸变。本文在中期染色体标本上显微分离 2 号染色体作为模板,以通用引物进行 PCR 扩增,生物素标记制备成 2 号染色体特异性探针。应用 2 号染色体特异性探针进行荧光原位杂交检测⁶⁰Co 射线 0~3 Gy 离体照射诱发人外周血淋巴细胞的易位畸变,呈现良好的剂量效应关系。并用 2 号染色体特异性探针对两起辐射事故病人的染色体畸变进行了研究,结果表明事故照射病人体内残留的染色体变主要是稳定性畸变,其中绝大部分是易位,倒位、插入、缺失、等臂染色体等其它畸变占很少。¹²⁹Ir 2.9 Gy 照射病人的照射后 1 年检测的易位畸变为 0.264,是照后 72h 双 + 环畸变率的 38.26%。⁶⁰Co 事故照射病人在照后第 6、7 年检测的易位畸变率统计学检验没有显著差异,易位畸变率约占照后立即检测双 + 环畸变率的 30~50%,并且易位畸变率与最初照射剂量相关良好。表明易位畸变在照后一年内显著下降,而一年以后,易位畸变率即保持相对稳定。

B1 - 13 射线诱导 AL 细胞 HGPRT 位点突变的实验研究

周红宁 王 琪 张军兰 阮健磊 李新兰 (卫生部工业卫生实验所 北京 100088)

电离辐射可诱导多种细胞的基因突变。AL 细胞是一种人鼠杂交细胞,含有一套完整的地鼠染色体及人的一条 11 号染色体。本实验观察不同剂量 射线照射后,AL 细胞 HGPRT 位点的突变情况。细胞吸收剂量分别为 0、1、2、4、6 Gy,剂量率为 1.8 Gy/min。细胞受照后,细胞存活率下降。1、2、4、6 Gy 照射后 AL 细胞的存活率率分别为对照的 76.4%、58.2%、25.4% 及 10.0%,HGPRT 位点的突变率分别为 1.2、2.6、5.6 及 3.7/105 存活细胞。另外,我们分离出单个 HGPRT 突变集落,使细胞生长到一定数量后,提取 DNA,经 PCR 扩增后,分析 HGPRT 基因 9 个外显子的变化,确定其突变类型,目前,该工作正在进行。AL 细胞对理化因素的致突作用非常敏感,特别是位于 11 号染色体上的 S₁ 位点,这为以后的致突及其抑制研究提供了一个良好的模型。

B1 - 14 肿瘤患者局部照射后细胞遗传学变化

龚曼丽 饶用请 赵紫兰 沈 磊 (北京医科大学放射医学基础教研室 北京 100083)

本文利用临床放疗病人的局部照射条件,对放疗病人第一次照射前和照射后 24 小时及离体血用相同剂量照射后,外周血淋巴细胞染色体畸变进行比较研究,以图了解局部照前与全照射效应关系。本文收集了 22 例恶性肿瘤患者,用美国产 Chinac-18 型,10MV 医用电子直线加速器产生的 X 射线,标距 1 米,进行局部照射,中心剂量为 200cGY,剂量率 300cGY/分,照射时间 0.18 分。患者照射前及第一次照射后 24 小时,抽取静脉血 2-4ml,肝素抗凝。同时用照前 2ml 血作离体 37 恒温照时,条件同上。培养开始加血的同时加秋水仙素,浓度为 7.2×10^{-8} M,培养 48 小时制片观察。结果表明: 肿瘤患者,局部受照及离体血受照后,所诱发的外周血淋巴细胞染色体各类型畸变均明显增高,皆高于照前对照组,经统计学处理,

差异非常显著 ($P < 0.001$), 而畸变细胞百分率也高于对照组, 为照前的 3.56 倍。局部照射后离体照射即使剂量相同, 其畸变产额相差也很大, 两组经统计学处理, 差异显著 ($P < 0.05$)。局部照射染色体畸变产额要比体外照射相同剂量少得多。对各部位受照面积作归一校正后, 发现胸部受照后, 诱发的染色体畸变率最高, 以下腹部 (包括盆腔) 受照后畸变率最低。对 22 例肿瘤病人做不同性别、年龄组染色体畸变率分析, 经统计学处理, 无差异。肿瘤病人与正常人染色体自发畸变率及两组人员离体血受照所得诱发的染色体畸变率比较无差异。

B1 - 15 11 种中成药⁶⁰钴 - 射线辐照前后遗传毒性的变化

林 飞¹ 高沛永² 郭巧生³ 宋谊平¹

(¹ 中国药品生物制品检定所 北京 100050 ² 军事医学科学院二所 ³ 江苏省药检所)

本文对消栓再造丸、牛黄清心丸、羚羊解毒丸、偏瘫复元丸、冠心苏合丸、小几至宝锭、鼻炎丸、六应丸、胃乃安、复方丹参片和小活络片等 11 种中成药经⁶⁰钴 - 射线辐照前和经 10 KGY 辐照后共 22 个受检样品进行了致突变试验——Ames 试验和微核试验, 比较辐照前、后遗传毒性的变化。Ames 试验采用 TA 系列四个菌株, 预培养法检测, 受检样品经进一步研磨, 过 200 目标准筛, 生理盐水稀释药粉 100mg/ml, 置 8 磅 20 分钟高压灭菌后使用, 预试验用菌株 TA100 判定药物毒性剂量。正式试验在 1 - 10000ug//皿 5 个浓度范围, 有或无代谢活化剂诱导下, 计数四变菌落数。结果显示, 辐照前后药品各剂量组均未出现毒性反应和回变菌落数的明显增加, 与阴性对照组的数值接近。微核试验采用 NIH 种雄性小鼠, 受检样品用蒸馏水制备最大混悬浓度, 以最大给药体积或 LD50 的 1/2 量一次灌胃给药。预试验在 12 - 72h 选择 6 个时间点, 寻找给药后最适采样时间。正式试验设 3 个剂量组, 在最适采样时间点处死动物, 常规方法骨髓制片。每只小鼠计数 1000 个嗜多染红细胞。结果表明, 辐照前后各药品各剂量组除个别药物高剂量组出现骨髓细胞抑制外, 其余多染红细胞与正染红细胞的比值基本正常; 各组微核细胞率均在 4% 以下, 统计学未见显著性差异。上述研究证实: 11 种中成药辐照前和辐照后未见遗传毒性的变化; 22 个受检样品在 Ames 试验和微核试验中均未诱发基因突变和染色体畸变; ⁶⁰钴 - 射线在 10 KGY 以下辐照剂量对中成药引起遗传毒性和潜在致癌性的可能较小。

B1 - 16 纺缍体毒剂和断裂剂体外诱发 V79 细胞多核与微核效应的差异

刘云岗 吴中亮 陈家 (广州医学院化学致癌研究所 广州 510182)

用中国仓鼠肺(V79)细胞对两种纺缍体毒剂(aneugen) [长春新碱(Vin)和秋水仙素(Col)]和两种断裂剂(clastogen) 丝裂霉素 C(MMC)和环磷酰胺(CP)]体外诱发核与多核的效应进行观察。结果显示:1. 微核细胞率(Imi)和多核细胞率(Imu)的增高在两类诱变剂具有不同的敏感性,当浓度降至一定水平,Vin和Col(0.05μg/ml)只诱发Imu增高,而对Imi无影响,MMC(0.1μg/ml)和CP(4μg/ml)则只诱发Imi增高,而对Imu无影响。2. 当上述诱变剂浓度相应高于以上水平,则对Imu和Imi都被诱发增高,且都呈浓度依赖性,但两类诱变剂在诱发Imu和Imi增高的幅度上的存在明显差异:Vin和Col以诱发核为主,Imu/Imi比值为2.0~3.5;而MMC和CP以诱发微核为主,Imu/Imi比值为0.08~0.28。两比值相距7~25倍。3. 对各组微核直径测量的结果显示,Col和Vin诱发的微核直径分布明显大于MMC和CP($p < 0.01$),提示在体外试验条件下微核直径对于区分两类诱变剂尚有一定意义;但微核直径中位数比值仅为1.2~1.6,相应的微核面积比也仅为1.6~2.5。因此,Imu/Imi比值的差异远大于微核直径或面积的差异,提示在体外微核试验中Imu/Imi比值及Imu与Imi增高的阈浓度差异可作为鉴别纺缍体毒剂与断裂剂的一种简便而有效的指标。

B1 - 17 一组标准诱变剂诱导 TK6 和 WTK1 细胞微核反应的比较

张立实¹ 吕晓华¹ 本间正充² 林 真² 王瑞淑¹ 祖父尼俊雄²

(¹ 华西医科大公共卫生学院营养与食品卫生教研室 成都 610041 ² 日本国立卫生研究所变异遗传部 东京 158)

哺乳类细胞体外微核分析已广泛用于评价化学物的诱变活性。L5178Y小鼠淋巴瘤细胞是用于 TK 基因突变分析的标准靶细胞系,亦已有一些将该细胞用于微核分析的报告。TK6 和 WTK1 细胞是两种新发展的用于 TK 基因突变分析的人类淋巴母细胞,二者来源于同一母细胞,其差别是 TK6 细胞为 p53 基因野生型,而 WTK1 细胞为 p53 基因突变型。在前一阶段已系统比较一组标准诱变剂诱导 L5178Y 和 TK6 细胞微核反 (Mutation Resaerch 347 105, 1995) 的基础上,进一步比较了 X 线、甲基磺酸甲酯、甲基磺酸乙酯、丝裂霉素 C、5-氟尿嘧啶和长春新碱等标准诱变剂诱导的 TK6 和 WTK1 细胞微核反应,以便为体外微核分析系统的靶细胞选择积累资料。X 线一次照射、甲基磺酸甲酯、甲基磺酸乙酯和丝裂霉素 C4h 处理后经 24、48、72h 表达培养,5-氟尿嘧啶和长春新碱 24、48h 处理后直接取样,按常规作微核片,AO (吖啶橙) 染色后在荧光显微镜下计数 1000 细胞每剂量组。结果表明,所有受试物均可诱导两种细胞微核率均不同程度地高于 WTK1 细胞微核率。这两种细胞对受试物诱导微核反应敏感性的差异可能与其 p53 基因的表达程度不同,WTK1 细胞对受试物的细胞毒性作用的耐受性较高等原因有关。二者作为体外微核分析系统靶细胞的适用性和优缺点还有待进一步研究。

B1 - 18 小鼠肝血嗜多染红细胞微核试验

周晓蓉 李百祥 邱向红 宋春华 (哈尔滨医科大学公共卫生学院毒理教研室 哈尔滨 150001)

由于骨髓对某些前致突变物活化能力有限,在肝脏内形成的短寿的终突变物难以在骨髓内达到引起染色体损伤的浓度,故对某需组织特异性活化的染色体损伤剂用骨髓微核试验就不敏感。而肝脏是化学物代谢转化的场所,易受化学物作用,如能用肝血微核试验检测需组织特异活化的致突变剂是很有意义的。我们用 11 种物质对小鼠骨髓及肝血多染红细胞 (PCE) 微核率作了平行观察。动物为体重 20~30g 昆明种小鼠,随机分组,每组雌雄各半,间隔 24h 染毒两次,常规制成骨髓片并剪破肝制成肝血涂片。小鼠骨髓及肝血微核率相关系数为 $r = 0.9129$ 有高度显著性,另对体重 10~15g、15~20g、20~25g、25~30g 小鼠肝血 PCE 观察,其检出率分别为 5.85%、5.11%、3.82%、2.40%。本试验结果表明,小鼠骨髓及肝 PCE 微核率之间存在密切相关性;小鼠随年龄减小,肝血 PCE 含量增加。故认为在某些特定条件下肝血微核试验有可能代替骨髓微核试验,用断乳鼠肝血 PCE 微核试验检测对不需在体内转化的致突变剂可能会更好。

B1 - 19 ⁶⁰Co 射线和 BPDE 对人体细胞软琼脂生长特性的影响

黄吉武 梁 静 林建成 (北京高等医专卫生系 北京 1013000)

细胞在体外获得软琼脂生长特性与其成瘤性呈密切相关,这可能代表着正常人体细胞向恶性细胞转化的多步骤中的一个必需步骤。本研究以 ⁶⁰Co 照射和 B (a) P 7, 8 - 二氢二醇 - 9, 10 - 环氧化物 (BPDE) 处理为诱发因素,观察其对成人纤维细胞株 MSU - 1.2 软琼脂生长的影响。辐射的剂量为 2.5 和 4.35 Gy, BPDE 剂量浓度为 0.25 和 0.42 μmol/L。细胞常规生长维持在改良的 McM 培养基中,顶层琼脂浓度 0.33%,含 2%胎牛血清。每实验组 20 平皿,每皿接种 5×10^4 个细胞,共培养 3wk,观察计数直径大于 120 μm 的软琼脂集落。结果细胞重种存活率:辐射处理为 54%和 11%,BPDE 为 36.5%和 18.7%;软琼脂集落民率:处理空白对照 0.7%;辐射处理为 1.1%和 15.5%;而 BPDE 2 个剂量均小于 0.7%,与对照比无显著差别;其亲代细胞 MSU - 1.1 作为细胞株阴性对照小于 0.01%,阳性细胞株 A2 - 10 为 18.0%。高剂量 ⁶⁰Co 诱发集落在经分离纯化并传代 10 代后,仍保持其软琼脂生稳定性。此研究表明辐射确可使该细胞株获得软琼脂生长特性,而 BPDE 在本实验中未发现其对实验细胞软琼脂生长诱发能力。此结果尚需进一

步实验证实。

B1 - 20 对鉴定和预测性细胞诱变剂的可靠性评价

傅娟玲¹ 袁定国² 周宗灿¹ (¹ 北京医科大学卫生毒理教研室 北京 100083 ² 武汉市卫生防疫站)

利用我们发展的化学品遗传毒性数据库(包括 58 种遗传毒理学实验及 4300 种化学品),评价了鉴定性细胞诱变剂的标准体内试验(显性致死试验 DL, 遗传易位试验 HT 和特殊座位试验 SL)及 11 种非标准体内短期试验的预测可靠性。结果发现, 53 种化学品在标准试验中有 1 项以上的阳性结果, 评为性细胞诱变剂。仅有 1 种化学品在 3 种标准试验均为阴性结果评为性细胞非诱变剂。余 93 种化学品仅在 1 或 2 种标准试验得到阴性结果, 因此, 不能肯定地判为性细胞非诱变剂。36 种性细胞诱变剂中有 31 种在非标准体内短期试验得到阳性结果(86%)。体内短期试验预测敏感性高低排序为: 小鼠点试验(11/11), 精子畸变试验(15/18), 骨髓微核/染色体畸变试验(23/30), 及睾丸染色体畸变试验(7/14), 但数据过少, 难以得出结论。目前的进展和方向是: 加强开展标准试验, 美国 NTP 对 31 种化学品进行了 1 个以上的标准试验。文献中已对丙烯酰胺和 1, 3-丁二烯进行了遗传风险评价。重视化学品对雌雄细胞特异性作用的研究。加强预测试验的研究和标准化。欧洲协作组发展了精细胞微核试验, 流式细胞仪测精子 DNA 含量和植入前胚胎细胞遗传学试验。应发展检测性细胞基因突变和原发 DNA 损伤的体内短期试验。分子生物学技术的发展和运用。

B2 环境因素的致突变监测与测试部分

B2 - 1 大气飘尘中有机提取物对细胞 DNA 合成的影响

田裘学 周伶芝(甘肃省环境保护研究所 兰州 730030)

本文介绍了用 UDS 和 DSI 方法, 分别利用混合的人体外周血和脐带血淋巴细胞, 对兰州市城区和农村 1.5、50、100、150 米四个不同高度采集的飘尘总有机提取物、多环芳烃、极性化合物对细胞 DNA 的损伤作用进行了研究。并同时作了 Ames 实验和色谱—质谱联营(GC/MS)定性分析。用 GC/MS 鉴定出了飘尘中有机物 112 种。城区以多环芳烃和极性化合物为主。多环芳烃的种类高度的变化较小, 极性化合物变化也不大。飘尘总有机提取物、多环芳烃和极性化合物, 经 Ames 实验证明, 在等浓度下, 均具有较强的致诱变作用。对 TA98 菌株的致诱变性强于对 TA100。但在 UDS 实验中, 上述三种有机物馏份终浓度在 0.01 ~ 100.00 μ g/ml 范围内, 未发现明显的剂量反应关系, 不诱导人淋巴细胞 UDS, 还抑制作用。DSI 实验也表明, 飘尘有机提取物对细胞 DNA 的合成有抑制作用, 去检测品后继续培养 DNA 的合成很快恢复。而已知 DNA 损伤剂 MMS 则表现了明显的损伤性抑制作用。飘尘有机提取物对细胞 DNA 合成作用总的效果类似于移码突变剂。

B2 - 2 兰州地区大气悬浮颗粒物对人体外周血淋巴细胞姐妹染色单体交换的影响

王晓云 丁国武(兰州医学院环境医学研究室 兰州 730000)

本文采用人体外周血淋巴细胞体外培养的方法, 对兰州市不同地区 5 个采样点大气总悬浮颗粒物(TSP)有机提取物进行了姐妹染色单体交换(SCE)试验。结果表明, 5 个样品对 SCE 率均有不同程度的影响, 并具有较好的剂量-反应关系。其中污染严重的铁路局和西固点 SCE 率增高尤为显著, 对照点榆中县乡村分析则增高微弱。