

硅灰石和石棉诱发CHL细胞姊妹染色单体交换和染色体畸变

刘京跃 梁淑容

中国预防医学科学院劳动卫生与职业病研究所, 北京

硅灰石和石棉纤维均属天然矿物纤维, 由于矿物纤维的商业用途极为广泛, 接触矿物纤维的职业和非职业人群不断扩大, 因此, 有关矿物纤维致突变和致癌性的问题近年愈引起各国学者的关注。动物实验表明硅灰石具有致癌性⁽¹⁾, 体外可引起金仓鼠胚胎细胞(SHE)转化⁽²⁾。1987年, IARC(国际癌症研究所)将石棉列为肯定致癌物, 硅灰石列为潜在致癌物⁽³⁾。迄今对国产石棉致突变和致癌性的研究尚不充分, 而对国产硅灰石则尚未见报道。本文研究了国产硅灰石和石棉诱发中国仓鼠肺细胞SCE和CA的作用并探讨其可能的作用机制。

材料和方法

1. 矿物纤维制备 <1> 硅灰石(中国吉林梨树矿)纤维制备按研磨水选法⁽²⁾。石棉纤维制备: 将石棉(本所粉尘室)剪至长约1cm, 垂直置于冰冻切片机上, 连续切片, 切下之纤维60℃烘干备用。<2> 矿物纤维分散度测量⁽²⁾, [表1]。三种矿物纤维以温石棉最长, 硅灰石最短; 直径小于1.5μm均占90%以上, 其中以温石棉较为更细。<3> 矿物纤维扫描电镜样品制备: 矿物纤维用95%乙

表 1[a] 三种矿物纤维长度分散度(%)

	硅灰石	青石棉	温石棉
<5	58.0	38.5	11.0
~10	27.5	28.5	26.5
~15	10.0	16.5	39.5
~20	4.5	12.5	19.0
>20	—	4.0	4.0

表 1[b] 三种矿物纤维直径分散度(%)

	硅灰石	青石棉	温石棉
<1	64.5	78.5	91.5
~1.5	29.0	15.5	6.5
>1.5	6.5	6.0	2.0

醇稀释成悬液, 取1~2滴滴在表面含有95%乙醇的铜台上, 干燥24小时, 表面喷金, 扫描电镜观察[图1]。

2. 矿物纤维对CHL细胞的遗传毒性实验

CHL细胞(卫生部北京药品检定所)为25条染色体, 核型稳定。矿物纤维用PBS配成一定浓度的混悬液, 超声振荡分散。N-甲基-N'-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine; MNNG)溶于二甲基亚砜(Dimethyl Sulfoxide, DMSO)中, DMSO终浓度低于0.2%。实验共分6组: <1> 硅灰石(Wollastonite, Wol.) <2> 青石棉(Crocidolite, Cro.) <3> 温石棉(Chrysotile, Chr.) <4> MNNG(阳性对照) <5> 溶剂对照(DMSO、PBS) <6> 空白对照。实验重复两次以上, 每次同一实验均设2瓶以上平行样。

2.1 细胞毒性实验 将处于对数生长期的CHL细胞以 2×10^4 /ml种于60ml培养瓶中, 1640完全培养液, 37℃5%CO₂中培养48小时, 换以含不同浓度(1, 5, 10, 20, 50, 100μg/ml)三种矿物纤维的培养液继续培养48小时后, 胰酶消化, 计数活细胞和死亡细胞(台盼兰染色), 以细胞存活率表示矿物纤维对CHL细胞的毒性:

细胞存活率(%) =

$$\frac{\text{存活细胞数}}{\text{存活细胞数} + \text{死亡细胞数}} \times 100$$

2.2 SCE 实验 CHL 细胞培养方法同上, 弃去培养液, 换以含 6 $\mu\text{g/ml}$ BudR 的 1640 完全培养液, 同时分别加入不同浓度的 Wol.、Cro.、Chr. 和 MNNG, 37 $^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 中避光培养 48 小时, 收获细胞前 2 小时, 加入终浓度 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 的秋水仙素。常规收获细胞, 低渗、固定、制片, SCD AG 染色⁽⁴⁾, 每一处理组选择 25 个分散良好的中期分裂相细胞计数 SCE 频率, t 检验进行差异显著性检验。

2.3 CA 实验 CHL 细胞在含不同浓度 Wol.、Cro.、Chr. 及 MNNG 的 1640 完全培养液中培养 48 小时。收获细胞前 2 小时, 加入终浓度 0.4 $\mu\text{g/ml}$ 的秋水仙素。常规收获细胞, 低渗、固定、制片, Giemsa 染色。每一处理组选择 100 个分散良好的中期分裂相细胞进行 CA 分析。畸变类型分为以下几种: 染色体裂隙(g, 染色单体内的破损长度小于一个染色单体的宽度做为裂隙), 染色体断裂(b), 环形变(r), 多射体, 粉碎化(f)。分别计算出各处理组的细胞畸变率, 用 χ^2 检验进行差异显著性分析。

结果

1. 细胞毒性 三种矿物纤维对 CHL 细胞均有一定毒性作用, 且随其浓度的增高而加强。其中以 Chr. 的毒性最强, Cro. 其次, Wol. 较弱[图 1]。

相差显微镜下观察, 加硅灰石纤维后 2 小时, 即见有被 CHL 细胞吞噬, 开始在胞浆内不均匀分布, 10 小时后, 则大多分布于核周区域。此后, 见有不同程度的空泡、颗粒变性及细胞死亡, 高浓度时尤为明显。

2. SCE 和 CA 三种矿物纤维均能诱发 CHL 细胞的 SCE 和 CA 率的增加, 并呈剂量反应关系[表 2, 表 3], 畸变为多种类型。

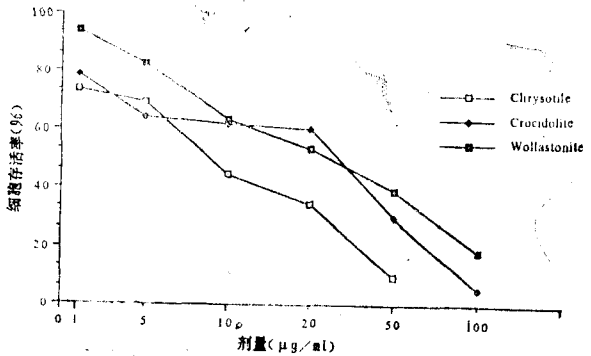


图 1. 三种矿物纤维对 CHL 细胞的毒性作用

表 2. 三种矿物纤维诱发 CHL 细胞姐妹染色单体交换

处理因素	剂量(μg/ml)	SCE/细胞(M ± SD)
硅灰石	5	6.2 ± 1.9*
	10	6.8 ± 2.1*
	20	7.9 ± 3.6**
青石棉	5	6.7 ± 2.5*
	10	7.4 ± 3.0**
	20	9.5 ± 3.6**
温石棉	5	7.6 ± 3.3**
	10	11.3 ± 3.8**
	20	14.6 ± 4.6**
空白	0	5.0 ± 2.2
DMSO	10(μl)	5.5 ± 2.3
PBS	50(μl)	4.6 ± 2.1
MNNG	2	交换密集

注: 与空白对照组比较: *p < 0.05 **p < 0.01

3. SCE 与 CA 的比较 在同样条件下, 硅灰石 5 $\mu\text{g/ml}$ 时, SCE 频率显著升高; 而浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$ 时, 才能引起 CA 有统计学意义的增加。

4. 三种矿物纤维诱发 CHL 细胞的 SCE 和 CA, 按作用强弱依次为: Chr. > Cro. > Wol.

讨论

表 3. 三种矿物纤维诱发CHL细胞染色体畸变

处理因素	剂量($\mu\text{g}/\text{ml}$)	畸变率(%)
硅灰石	5	9.0
	10	12.0*
	20	18.0**
	50	11.3*
青石棉	5	12.5*
	10	18.0**
	20	24.0**
	50	27.5**
温石棉	5	21.4**
	10	31.0**
	20	48.0**
	50	毒性
空白	0	3.0
DMSO	10(μl)	4.0
PBS	50(μl)	2.0
MNNG	2	89**

注：与空白对照组比较：* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$

本文研究结果显示国产硅灰石、青石棉和温石棉均能诱发CHL细胞SCE和CA率的显著增加，是较强的染色体断裂剂(Clastogen)^(5,6)。CA显示染色体受损的多种形式，能直接反映出环境诱变剂对哺乳动物细胞染色体DNA的损伤，结果可靠。业已证明，能引起CA的许多化学物质如镉、铬等可引起肿瘤⁽⁷⁾，并且CA与肿瘤恶性程度呈正相关，说明CA可能是大多数致癌作用的机理之一。已知石棉是肯定致癌物，本实验进一步提示了染色体损伤与癌变之间的联系，同时也提示硅灰石具有致癌的可能性。

SCE是检测致突变物较敏感的指标。文献报告，在不产生CA的浓度中，SCE已有增加⁽⁸⁾。本实验中， $5\mu\text{g}/\text{ml}$ 的硅灰石引起SCE与对照组相比就有显著差异($p < 0.05$)，而引起CA率升高的剂量却是 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ ($p < 0.05$)。这表明硅灰石诱发SCE的敏感性比CA高。但石棉诱发SCE和CA率并无差异。

SCE与CA两种遗传学效应多数呈一致

关系⁽⁹⁾，本实验，三种矿物纤维均同时诱发CHL细胞的SCE和CA，表现出较好的一致性。从诱发SCE和CA作用强度看， $\text{Chr.} > \text{Cro.} > \text{Wol.}$ ，这与文献报道相似^(5,6,10)。这除与本文实验所用三种矿物纤维的理化特性不同有关外，更可能与本文所选用的三种矿物纤维的长度与直径不同有关，与文献报道细长矿物纤维的致突变和致癌性强于短粗纤维一致⁽¹¹⁾。

一般认为，矿物纤维导致染色体损伤与纤维对染色体直接机械作用有关。Wang⁽¹²⁾在电镜下观察到石棉纤维缠绕、切割染色体，Hesterberg⁽¹⁰⁾报告在细胞进行有丝分裂时矿物纤维与染色体直接作用而导致分裂后期出现CA。本实验也观察到在分裂期，纤维进入细胞内与染色体直接作用。此外，也有人认为可能是矿物纤维产生了自由基/和染色体断裂因子等因素有关⁽¹¹⁾。我们的另一实验，还发现硅灰石能引起SHE细胞转化⁽²⁾。因此推测，矿物纤维导致染色体损伤很可能是细胞转化和癌变的重要步骤。(本文工作曾得到中国医学科学院肿瘤医院李中德教授的指导和帮助，特此致谢。)

参考文献

1. Stanton MF, et al. Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. JNCI 1981; 69: 965-975
2. 刘京跃, 等. 硅灰石对金仓鼠胚胎细胞转化作用的研究. 中国医学科学院学报, 1991
3. IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. 1987; Suppl. 7, p377
4. Nakagawara, et al. Differential staining of the sister chromatid-BrdU-AG method. J Clin Exp Med 1983; 124: 629-631
5. Sincock AM, et al. A comparison of the cytogenetic response to asbestos and glass fiber in Chinese hamster and human cell lines. Mut Res 1982; 101: 257-268

(下转第27页)

即已显示出明显改变。现在用MN检测焦炉车间3个工龄组,彼此间有显著差异,即工龄愈长变化愈大。而SCE变化更早,不到5年即已有显著变化,说明了SCE很敏感但分辨力不强,CA及SCE十年工龄组反而低于其它两个工龄组,这种现象厂能与焦炉车间十年以上工龄组近两年来已用维甲酸等多种防突变剂有关,可以推想由于阻断治疗的结果,使各种指标出现逆转,原来应表现更高的SCE因此而差距减少,CA及MN反而低于另两工龄组。据此可以考虑工种轮换问题,焦炉车间以不超过5年为好,或所有焦炉工皆接受阻断治疗,其它组以不超过10年轮换为好⁽¹⁾(我室1986年已发表资料)。

CA与MN之数据有很好的对应性,这两指标呈直线相关。因此可以考虑用简单、快速、敏感、重复性好的MN代替常规的CA,作为检测致突变物的初筛试验是较好的选择,而且MN的形成机制与CA并不完全一致,它本身有其独特性,它可用DO期淋巴细胞在诱变剂的作用下呈十几倍增加,以及核形态的多种变化皆值得深入研究。

本组Bap浓度系在各作业点所测得四季的平均值。各作业点浓度相差悬殊,高低间

将近百倍,它与MN、CA、SCE皆有良好的相关性,因此可肯定这3个都是很好的指标。如果从实际出发,首选MN是可取的。

本试验组脆性部位共有断点251个,有的工种含Fra可高达5.05%,是正常对照组的25倍,其中60%断点在A组染色体,其次22%是在C组占,这符合一般断点规律。能准确定位的13个位点中,38个(33.6%)属遗传性脆性部位3P14⁽⁴⁾。这并不算太高,例如肝炎患者3P14可高达45%⁽³⁾,小细胞肺癌患者3P14出现率可占个体的81—100%,因该厂焦炉炉顶工的肺癌是职业病,因此需对这一发现作更深入的调研。

参考文献

1. 刘永辑. 中华预防医学杂志1986; (3)179
2. 薛开先, 等. 遗传1982; (2): 3
3. 刘永辑, 等. 遗传与疾病1987; 4(1): 26
4. Bergerger R, et al. Cytogenet. cellgenetics 1985; (40): 490
5. De Braekeleer M, et al. Humangenet. 1985; 69(2): 112-116
6. Hecht F, et al. 国外医学遗传分册 1984; 7(6): 313
6. Palekar LD, et al. Metaphase and anaphase analysis of V79 cells exposed to erionite, UICC chrysotile and crocidolite. Carcinogenesis 1987; 8: 553-560
7. Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium. Mut Res 1981; 86: 115-135
8. Chen HH, et al. Induction of SCE and cell cycle delay in cultured mammalian cells treated with eight pesticides. Mut Res 1981; 88: 307-316
9. Gebhart E. SCE and structural CA in mutagenicity testing. Hum Genet 1981; 53: 235-254
10. Hesterberg TW, et al. Role of phagocytosis in Syrian hamster cell transformation and cytogenetic effects induced by asbestos and short and long glass fibers. Cancer Res 1986; 46: 5795-5802
11. Jaurand MC, et al. Particulate-state carcinogenesis: a survey of recent studies on the mechanisms of action of fibers. In Bignon J (ed.), Non-occupational exposure to mineral fibres. Lyon, IARC, 1989; pp54-68
12. Wang NS, et al. The interactions between asbestos fibers and metaphase chromosomes of rat pleural mesothelial cells in culture. Am J pathol 1987; 126: 343-349

(上接第53页)