

对几种原代细胞彗星实验敏感性的探讨

张青碧¹, 衡正昌²

(1. 泸州医学院预防医学教研室, 四川 泸州 646000; 2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 筛选一种动物原代敏感细胞用于彗星实验, 以便更广泛地监测环境样品的遗传毒性。方法 用重铬酸钾($K_2Cr_2O_7$)和过氧化氢(H_2O_2)作为受试物, 对小鼠的肝、脾、肾细胞进行彗星实验, 观察 $K_2Cr_2O_7$ 和 H_2O_2 对这 3 种细胞造成的 DNA 损伤, 从而判断细胞的敏感性。结果 以 $K_2Cr_2O_7$ 染毒, 肝细胞的检测阈值(10 nmol/L)低于脾和肾(1 000 nmol/L)。以 H_2O_2 染毒, 在相同浓度下肝细胞迁移长度最大。结论 肝细胞在彗星实验中的敏感性最高、自身活化能力强, 且取材方便、耗时短、费用低, 可以作为一种敏感细胞应用于彗星实验, 对环境样品进行遗传毒性监测。

关键词: 原代细胞; 敏感性; 彗星实验; DNA 损伤

中图分类号: R99; Q2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2003)05-0274-03

The studies on selection for sensitive primary cells used in the comet assay

ZHANG Qing-bi¹, HENG Zheng-chang²

(1. Department of Preventive Medicine, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. Huaxi School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** In order to select sensitive primary cells to be used in the comet assay to detect genotoxicity for environmental samples. **Method** Mice were exposed to varied concentrations of potassium dichromate ($K_2Cr_2O_7$) and hydrogen peroxide (H_2O_2) and their cells were isolated from the liver, spleen and kidney to detect the effects of DNA damage using comet assay to find sensitive ones.

Result Threshold for detection of DNA damage in the liver cells (10 nmol/L) was less than that in the spleen and kidney cells (1 000 nmol/L), as exposed to $K_2Cr_2O_7$. The longest migration length of DNA was found in the liver cells as exposed to the same concentration of H_2O_2 . **Conclusion** The liver cells had the highest sensitivity and auto-activation in the comet assay, with features of convenience, quickness and low-cost, and can be selected as target cells in the comet assay to detect genotoxicity for environmental samples.

Key words: Primary cell; Sensitiveness; Comet assay; DNA damage

环境中的某些化学、物理因素会直接或间接造成生物体 DNA 链的断裂^[1,2], 虽然 DNA 单链断裂可保持 DNA 的连续性, 但双链断裂, 则会造成 DNA 片断移位、易位、丢失等, 从而引起遗传性的损伤并影响遗传行为^[3]。检测 DNA 链的断裂是测定 DNA 损伤程度并判定样品遗传毒性的有效技术。彗星实验 (comet assay) 又称单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE), 是检测单个细胞 DNA 链断裂的新技术, 该方法具有灵敏、简便、快速及样品用量少、不需放射性等优点, 在 20 世纪 90 年代发展十分迅速, 应用极其广泛^[4-6]。然而该技术目前仍然处于进一步发展和完善阶段, 有许多问题尚待解决^[7]。本研究采用彗星实验对小鼠的几种原代细胞的敏感性进行比较。目的在于筛选出一种敏感性高、取材方便、制备简单、成本低、耗时短的细胞, 为彗星实验的广泛应用特别是对环境样品的遗传毒性监测提供依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

1.1.1 重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$)、过氧化氢 (H_2O_2), 分析纯, 纯度大于 98%, 成都化学试剂厂生产。

1.1.2 裂解液 100 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠 (Na_2EDTA), 1% 的肌氨酸钠, 10 mmol/L 三(羟)甲基氨基甲烷 (Tris), 2.5 mol/L 氯化钠 ($NaCl$), 依次加热溶解后, 用氢氧化钠 ($NaOH$) 调节 pH=10, 置 4 °C 冰箱保存。临用前加入 10% 二甲亚砜 (DMSO), 1% TritonX-100。

1.1.3 解旋和电泳液 1 mmol Na_2EDTA , 300 mmol $NaOH$, 依次加热溶解, 加蒸馏水至 1 000 ml, pH=13。

1.2 实验动物

昆明种雄性小鼠, 7~8 周龄, 体重约 25 g, 由华西医科大学实验动物中心提供, 常规饲养 1 周, 健康者供实验用。

1.3 组织细胞的分离

选取体内有代表性的重要脏器肝、脾、肾作实验器官。股动脉放血处死小鼠, 取出小块肝、全部脾、两侧肾放在滤纸上除去被膜及血后放小烧杯内, 加入少量预冷的 PBS 液清洗, 用眼科剪略剪碎, 低速匀浆

收稿日期: 2003-03-31; 修回日期: 2003-05-14

作者简介: 张青碧 (1968-), 女, 讲师, 硕士, 研究方向: 环境遗传毒理。

5 s, 用 110 目的不锈钢筛网过滤, 收集细胞悬液, 用 PBS 液稀释, 调细胞密度至 $10^7 \sim 10^8$ 个/ml, 置 4 °C 冰箱保存备用, 并以台盼蓝染色观察细胞存活率。

1.4 受试物和细胞染毒

采用过氧化氢 (H_2O_2) 和重铬酸钾 ($K_2Cr_2O_7$) 作为化学诱变剂, 临用前用双蒸水配制, 按照悬浮染毒方法进行操作^[8]。取上述制备好的细胞悬液按每管 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞分装于 5 ml 刻度离心管, 再加 PBS 液至刻度。在不同的离心管中分别加入 50 μ l 不同浓度的受试物, 同时用 PBS 液作阴性对照。 $K_2Cr_2O_7$ 处理组于 37 °C 孵箱染毒 1.5 h, H_2O_2 处理组于 37 °C 孵箱染毒 0.5 h。染毒期间用滴管不定时地混匀细胞, 染毒完毕于 1 500 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 加 100 μ l PBS 液重悬细胞用于彗星实验。以台盼蓝排斥法观察染毒后的细胞存活率, 观察受试物对细胞的毒性。

1.5 彗星实验

1.5.1 制片 第一层胶制备: 取 45 °C 0.7% 的正常熔点琼脂糖 (NMPA) 110 μ l 浇注到预冷的磨砂载玻片上, 迅速加盖玻片, 使胶均匀铺开 4 °C 固化 10 min。第二层胶制备: 取下盖玻片, 将细胞悬液以 1:7 的体积比与 37 °C 低熔点琼脂糖 (LMPA) 混合, 取 75 μ l 加到第一层胶上, 盖上盖玻片, 再置 4 °C 固化 10 min。

1.5.2 裂解 取下盖玻片后, 将载玻片浸于新鲜配制的冰冷裂解液中, 避光低温裂解 1 h。

1.5.3 解旋 从裂解液中取出载玻片, 用蒸馏水将其充分清洗后, 置于水平电泳槽中。将新鲜配制的电泳液缓慢倒入电泳槽中, 液面高于载玻片 2.5 mm 左右, 低温避光解旋 30 min。

1.5.4 电泳 将电压调至 22 V, 调整电泳液液面的高度, 使电流保持 200 mA, 低温下避光电泳 30 min。

1.5.5 漂洗与染色 电泳结束后, 取出载玻片, 用蒸馏水漂洗 3 次, 保存于潮湿的片盒中。观察时滴加

25 μ l 20 μ g/ml 的溴化乙啶, 盖上盖玻片即可。

1.5.6 结果观察 在 510 nm 波长的荧光下放大 200 倍观察结果, 用目镜测微尺测量拖尾细胞的头长和全长, 全长扣除头长后即为 DNA 迁移长度。实验以平均细胞拖尾长度和拖尾率为检测指标, 每张玻片随机计数 50 个细胞, 计算细胞的拖尾率和平均尾长。

1.6 统计方法

采用 SPSS 软件进行方差分析和 χ^2 检验

2 结果

经多次独立重复实验, 结论一致。按方法 1.3 分离的细胞经台盼蓝染色观察细胞存活率均在 95% 以上, 染毒完毕, 细胞存活率大于 80%, 因此细胞的拖尾系氧化损伤所致。 $K_2Cr_2O_7$ 对肝、脾、肾 3 种细胞均有 DNA 损伤作用, 并呈现剂量-反应关系。肝细胞的检测阈限为 10 nmol/L, 而脾和肾均为 1 000 nmol/L。在相同浓度下肝细胞 DNA 迁移长度和拖尾率均高于脾和肾细胞。 H_2O_2 染毒时, 肝细胞的检测阈限为 1 nmol/L, 而脾和肾均为 10 nmol/L。在相同浓度时肾细胞的拖尾率虽高于脾细胞和肝细胞, 但因为肾细胞的自然拖尾率很高容易影响观察结果, 且 DNA 平均迁移长度低于肝细胞 (表 1)。两种受试物测定结果表明, 肝细胞在彗星实验中的敏感性明显高于脾和肾细胞。

3 讨论

彗星实验是以 DNA 损伤为检测终点, 理论上可应用于各种真核细胞, 包括细胞株、植物细胞和动物细胞, 但各类细胞各有优缺点。细胞株可以通过细胞培养获得, 但其具有培养技术相对复杂、实验周期较长、费用较高、易导致假阳性等不足^[9]。植物细胞取材方便, 可满足现场监测条件, 但目前的实验结果都存在阴性拖尾过长、剂量-反应关系尚不理想、实验条件不完善等缺点^[10]。在彗星实验的研究中, 国内外最常用的受试细胞为细胞株, 对动物细胞敏感性的

表 1 两种受试物的彗星实验结果

受试物	浓度 (nmol/L)	细胞拖尾率 (%)			DNA 迁移长度 ($\bar{x} \pm s, \mu$ m)		
		肝细胞	脾细胞	肾细胞	肝细胞	脾细胞	肾细胞
PBS 组	—	11.2	13.1	10.8	14.3 ± 2.3	15.2 ± 3.9	12.5 ± 6.9
$K_2Cr_2O_7$ 组	1	20.0	12.3	18.2	16.4 ± 7.8	16.5 ± 3.7	13.5 ± 4.6
	10	44.5*	16.1	23.5	48.5 ± 3.8* Δ	23.2 ± 4.9	27.9 ± 6.4
	100	86.2*	42.8*	46.3*	72.6 ± 6.3* Δ	56.2 ± 6.3*	54.2 ± 6.8*
	1 000	100.0*	44.3*	89.3*	114.2 ± 13.7* Δ	60.4 ± 8.9*	61.2 ± 8.7*
H_2O_2 组	0.1	14.0	17.2	33.5	11.8 ± 5.2	13.7 ± 4.6	14.5 ± 3.5
	1	34.5*	18.4	44.9	68.9 ± 6.7* Δ	19.7 ± 4.9	24.9 ± 6.3
	10	74.3*	35.2*	82.7*	75.4 ± 8.6* Δ	39.8 ± 3.9*	44.9 ± 6.3*
	100	86.2*	44.3*	89.3*	86.5 ± 7.5* Δ	49.6 ± 5.9*	56.3 ± 3.1*

* 与阴性对照 (PBS) 比较, 差异有显著性, $P < 0.01$; Δ 在相同浓度下肝细胞与脾、肾细胞比较, DNA 迁移长度有差异, $P < 0.01$ 。

研究在国外偶见报道,在国内尚未见报道。因此本研究采用小鼠肝、脾、肾细胞为靶细胞,观察 3 种细胞在彗星实验中的敏感性。结果显示,3 种细胞均有一定的敏感性,但肝细胞的敏感性更高,其原因可能为:(1)肝细胞中含有多种酶系统,对间接致突变剂有一定的活化能力,从而更易检出阳性结果;(2)肝细胞的碱不稳定性点多,DNA 更易发生断裂;(3)任何外来物质的代谢作用首先发生在肝,肝具有一定的自身代谢活化能力,在离体后仍然能维持几天的时间。将小鼠肝原代细胞应用于彗星实验具有敏感性高、取材方便、细胞制备简单、不需体外活化、费用低、实验周期短等优点,对环境样品的遗传毒性监测具有极其重要的意义,其应用前景十分广泛,值得进一步探讨。

参考文献:

[1] Hann A. Assessment of DNA damage in filamentous fungi by single cell gel electrophoresis comet assay [J]. Environ Toxicol Chem, 1999, 18: 1421-1424.
 [2] Olga K. Plants experiencing chronic internal exposure to ionizing radiation exhibit high frequency of homologous recombination than acutely irradiated

plants [J]. Mutat Res. 2000 449: 47-56.
 [3] Steven R. Caged amphibian tadpoles and in situ genotoxicity monitoring of aquatic environments with the alkaline single cell gel electrophoresis. Mutat Res [J]. 1998, 413: 235-250.
 [4] Rojas E, Valverde M, Herrera LA, et al. Genotoxicity of vanadium pentoxide evaluate by the single cell gel electrophoresis assay in human lymphocytes [J]. Mutat Res. 1996 356: 77-84.
 [5] Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: A comprehensive review [J]. Mutat Res. 1995, 339: 37-42.
 [6] Mckelvey Martin VL, Green MHL, Schmezer P, et al. The single cell gel electrophoresis assay: European review [J]. Mutat Res. 1993, 288: 47-63.
 [7] Olive PL, Ramath JP, Durand R. Heterogeneity in radiation-induced DNA damage and repair in tumor and normal cells measured using the comet assay [J]. Radiation Res. 1990, 122: 86-94.
 [8] 张遵真, 衡正昌. 改良的彗星试验与标准方法的对比研究 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14 (3): 180-182.
 [9] Singh NP, Tice RR, Stephens RE, et al. A microgel electrophoresis technique for the direct tests cultured on microscope slides [J]. Mutat Res. 1995, 252: 289-296.
 [10] Tomas G. Induction of somatic DNA damage as measured by single cell gel electrophoresis and point mutation in leaves of tobacco plants [J]. Mutat Res. 1998, 401: 143-152.

· 病例报告 ·

利福平致乳腺发育 2 例报告

Mammae masculina by Rifampin—Two cases report

朱 岩¹, 闫美凤², 樊克林¹, 史青燕¹, 金小平¹

(1. 北京市朝阳区结核病防治所, 北京 100025; 2. 北京市滨河医院, 北京 100054)

【例 1】男, 56 岁。1999 年 4 月 5 日诊为矽肺合并结核, 并开始抗结核治疗。方案: 异烟肼(H)400 mg、利福平(R)450 mg、乙胺丁醇(E)750 mg、吡嗪酰胺(Z)1 250 mg, 每日 1 次口服。1 个月后复查胸片示左上病灶有所吸收, 但自觉双侧乳房胀痛, 增大, 饮食无异常。既往无药物过敏史, 无类似发病史。查体: T 37 ℃, P 76 次/分, R 19 次/分, BP 120/80 mmHg (16/10.7 kPa); 意识清楚, 精神尚好, 全身浅表淋巴结无肿大; 心、肺、腹无异常。双侧乳房增大, 乳晕颜色加深, 并可触及 2.0 cm×2.5 cm 结节, 表面无红肿, 轻度压痛。血常规、肝功、肾功均正常, 停用异烟肼, 继续用其他 3 种药(R、Z、E)治疗, 1 个月后乳房胀痛无缓解; 停用利福平, 改用 H、Z、E 治疗半个月后乳房胀痛明显减轻, 3 个月后胀痛、结节消失, 乳晕颜色恢复正常。后又加用利福平 450 mg, 每日 1 次口服, 20 d 后又觉乳房胀痛, 遂停用, 胀痛又逐渐消失, 继续用 H、E、Z 完成抗结核治疗, 随访半年未复发。

【例 2】男, 38 岁。于 2000 年 3 月 4 日诊为结核性胸膜炎, 并行抗结核治疗。方案: H 300 mg、R 450 mg、E 750 mg、

Z 1500 mg, 每日 1 次口服。1 个月后复查胸片示胸水明显吸收, 但出现双侧乳房胀痛, 未在意, 2 个月后疼痛加剧。既往无药物过敏史, 无类似发病史。查体: T 36 ℃, P 76 次/分, BP 115/75 mmHg (15.3/10 kPa), 意识清楚, 语言流利, 全身浅表淋巴结未触及肿大。双侧乳房增大, 并可触及 3 cm×3.5 cm 结节, 表面无红肿, 压痛不明显, 无其他阳性体征。实验室检查肝功、肾功均正常。停用利福平, 继用 H、E、Z 治疗 5 个月后, 乳房胀痛及结节消失; 再服利福平 1 个月又觉乳房胀痛, 遂停用, 继续用其他抗结核药完成疗程, 随访半年未复发。

讨论 此 2 例患者均于服用利福平一段时间后出现乳房胀痛、结节, 停用后逐渐消失, 再次使用又出现上述症状, 提示与服用利福平有关。其机制可能与利福平影响肝脏对雌激素的灭活, 致雌激素在体内蓄积有关。一般而言, 利福平的毒性较低, 服用者易于耐受, 常见不良反应有肝脏毒性、消化道反应、变态反应、免疫抑制, 偶有白细胞减少, 凝血酶原时间缩短, 头痛、眩晕、视力障碍等。男性乳房发育常见于使用雌激素或睾丸功能不全、肾上腺皮质激素分泌过多、衰老及肝硬化等, 而在结核病服用利福平过程中出现乳腺发育尚不多见。