·实验研究·

扑灭津原药致突变性实验研究

Experimental study on the mutagenicity of propazine

李厚勇[1]，李丽[2]，王蓉[1]，徐明[1]，黄华[1]

LI Hou-yong[1], LI Li[2], WANG Rong[1], XU Ming[1], HUANG Hua[1]

（1. 山东省职业卫生与职业病防治研究院，山东 济南 250062；2. 威海市结核病防治所，山东 威海 264200）

摘要：扑灭津原药致突变实验结果显示，小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率及睾丸精母细胞染色体畸变率，染毒组与阴性对照组的差异均无统计学意义。Ames 实验中各剂量组的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍。表明在本实验条件下，未发现扑灭津原药有明显的致突变性。

关键词：扑灭津；毒性；致突变性；小鼠

中图分类号：R595.4；R99　　文献标识码：B

文章编号：1002－221X(2007)04－0251－02

扑灭津（propazine），化学名称 2-氯-4,6-二（异丙氨基）1,3,5-三嗪，是一种新型高效除草剂，已在 20 多个国家登记上市并大量推广使用。国内有关扑灭津的毒理学研究报道较少。为探讨其潜在的遗传危害，保护环境及人体健康，本实验室受某农药生产厂委托，对其进行了致突变性实验研究。

1 材料与方法

1.1 材料

昆明种小鼠，体重 25～30 g，实验动物许可证号：SCXK（鲁）2003-0004。菌种 TA97、TA98、TA100 和 TA102，经生物学鉴定符合实验要求。扑灭津原药（山东省某农药厂提供）纯度 96%，实验时用植物油配制。

1.2 方法

1.2.1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验 （1）剂量与分组：健康小鼠 50 只，雌雄各半，按体重随机分为 5 组，每组 10 只，其中 3 个为实验组，染毒剂量分别为 150、300、600 mg/kg，相当于经口 LD_{50}的 1/20、1/10 和 1/5。阴性对照组给等体积植物油灌胃，阳性对照组腹腔注射环磷酰胺（CP）40 mg/kg。（2）染毒与制片：实验小鼠每日经口染毒 1 次，连续 2 d，第 2 次染毒后 6 h 处死动物，取股骨骨髓制片，Giemsa 染色，油镜下每只动物镜检1 000个嗜多染红细胞，计算微核率。

1.2.2 小鼠睾丸初级精母细胞染色体畸变实验 （1）剂量与分组：健康雄性小鼠 25 只，按体重随机分为 5 组，每组 5 只。3 个实验组的染毒剂量分别为 300、600、1 500 mg/kg，相当于经口 LD_{50}的 1/10、1/5 和 1/2。阴性对照组经口给等体积植物油，阳性对照组腹腔注射丝裂霉素 2 mg/kg。（2）染毒与制片：实验小鼠每日经口染毒 1 次，连续 5 d，于第 1 次给药后 13 d 实验动物腹腔注射秋水仙素 4 mg/kg，6 h 后处死动物，取两侧睾丸，常规制片，Giemsa 染色，油镜下每只动物观察 100 个处于终变期-中期Ⅰ分裂相细胞，记录发生畸变的类型和数量。将断片和易位合并为染色体结构畸变进行统计处理。早熟分离（性染色体和常染色体单价体）则单独统计处理。

1.2.3 Ames 实验 （1）剂量与分组：根据 GB15670—1995《农药登记毒理学实验方法》，实验浓度为 40、200、1 000、5 000 μg/皿，每个剂量设 3 个平行样品，同时设自发回变和阳性对照。阳性对照组：敌克松（50 μg/皿）、叠氮钠（2.5 μg/皿）、丝裂霉素（MMC，4.0 μg/皿）、1,8-二羟基蒽醌（50 μg/皿）。（2）平板掺入法：采用经鉴定符合要求的 4 个标准突变型菌株（TA97、TA98、TA100 和 TA102），用多氯联苯（PCB）诱导的大鼠肝匀浆制备的 S9 混合液作为代谢活化系统。向熔化并保温 45℃的 0.2 ml 顶层培养基试管中依次加入实验样品 0.1 ml 增菌液和 0.5 ml S9 混合液（或不加 S9 混合液）混匀，迅速倾入底层培养基上，使其均匀分布，待上层培养基凝固后，将平板反转，37℃培养 48 h 后，计数每皿回变菌落数。

1.3 统计学分析

实验所得数据均采用 SPSS12.0 软件进行统计分析。

2 结果

2.1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核实验，扑灭津原药各染毒组微核率为 1.0‰～1.3‰，阴性对照组为 1.2‰，实验组与阴性对照组比较，差异无统计学意义（$P>0.05$）。而阳性对照组为 26.3‰，与阴性对照组比较，差异有统计学意义（$P<0.01$）。小鼠睾丸初级精母细胞染色体结构畸变率和早熟分离率与阴性对照组比较，差异无统计学意义，各剂量组间亦无剂量-反应关系，阴性与阳性对照组之间差异有统计学意义（$P<0.05$）。见表 1。

表 1 扑灭津原药对睾丸初级精母细胞染色体畸变的影响

组别	观察细胞数	结构畸变数	%	性染色体单价体数	%	常染色体单价体数	%
染毒 1 500mg/kg	500	1	0.20	16	3.20	4	0.80
染毒 600mg/kg	500	1	0.20	15	3.00	5	1.00
染毒 300mg/kg	500	0	0.00	17	3.40	6	1.20
阴性对照	500	1	0.20	20	4.00	4	0.80
阳性对照	500	21	4.20	35	7.00	8	1.60

注：阳性对照为丝裂霉素（2 mg/kg）。

2.2 Ames 实验中各剂量组的扑灭津原药的回变菌落数均未超过自发回变菌落数的 2 倍，亦未见剂量-反应关系。

收稿日期：2006－11－23；修回日期：2007－01－28

作者简介：李厚勇（1957—），男，研究员，主要从事卫生毒理工作。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

3 讨论

扑灭津原药3项致突变实验表明，该受试物对TA97、TA98、TA100和TA102菌株无论在有无代谢活化系统存在的条件下各剂量组回变菌落数均在正常范围内。采用欧洲经合组织（OECD）推荐的最新实验方法[1]，以两次给药的方式进行微核实验，可较好地反映外来化合物可能出现的染色体损伤效应，其结果亦为阴性。同样，扑灭津原药也未引起小鼠睾丸初级精母细胞染色体结构畸变率和早熟分离率的增加。上述实验覆盖了体内与体外两种实验方式、微生物与哺乳动物两种受试对象、基因与染色体两种水平、体细胞与生殖细胞两种不同的细胞，所有结果均提示扑灭津原药无致突变作用。国外Kligerman曾对扑灭津等3种除草剂进行细胞遗传学研究，结果也未见扑灭津有致突变作用[2]。

参考文献：

[1] 曹佳，林真，余争平，等. 微核实验——原理、方法及其在人群检测和毒性评价中的应用[M]. 北京：军事医学科学出版社，2000. 264-272.

[2] Kligerman A D, Doerr C L, Tennant A H, et al. Cytogenetic studies of three triazine herbicides [J]. Mutat Res, 2000, 471: 107-112.

雄黄对白血病HL-60细胞的生长抑制及其机制

Growth-inhibitory effect of arsenic sulphide on HL-60 cells and its mechanism

彭军，郑一瑾，吴银霞

PENG Jun, ZHENG Yi-jin, WU Yin-xia

（武汉科技大学附属医院四内科，湖北 武汉 430064）

摘要：以不同浓度（7.5～60 mmol/L）的雄黄（As_4S_4）作用于体外培养HL-60细胞12～48 h，MTT法检测细胞生长抑制率，流式细胞仪法观察细胞凋亡率，免疫组化法检测bcl-2，突变型p53蛋白表达，应用RT-PCR法检测HL-60细胞中突变p53 mRNA表达。结果不同浓度的雄黄作用不同时间后，可显著抑制HL-60细胞的生长，呈时间-剂量依赖性，并诱导细胞发生凋亡，凋亡率为30.18%～70.98%（$P<0.01$）。雄黄作用24 h后，下调突变型p53 mRNA的表达，且bcl-2、突变型p53蛋白表达逐渐降低，并呈浓度依赖性。这可能是其重要机制之一。

关键词：雄黄（As_4S_4）；白血病；HL-60细胞；基因；凋亡

中图分类号：O612.5；R733.7 文献标识码：B

文章编号：1002-221X(2007)04-0252-03

近年来国内学者发现雄黄（As_4S_4）具有抗肿瘤作用，尤其治疗恶性血液病效果显著[1～3]，已成为抗肿瘤研究的热点之一。研究表明，某些砷化合物能有效地治疗急性早幼粒细胞白血病，使肿瘤细胞株凋亡[4,5]。本研究旨在观察As_4S_4对人白血病细胞株HL-60细胞的增殖和凋亡及对bcl-2、突变*p*53基因表达的影响。

1 材料与方法

1.1 药物

高纯度雄黄As_4S_4购自Sigma公司，纯度>96%，溶解于RPMI-1640分装备用，一抗bcl-2和p53购自晶美公司。

1.2 细胞培养

人白血病细胞株HL-60细胞购自上海科学院细胞中心。在含有10%的胎牛血清、青霉素100 U/ml及链霉素100 U/ml的RPMI-1640培养基中37℃、体积分数为5%CO_2条件下培养。每周换液传代2次。

1.3 MTT比色法

采用MTT比色法检测不同浓度（7.5～60 mmol/L）As_4S_4分别作用于HL-60细胞0、12、24、36、48 h，另设未加药组作为对照。细胞的生长抑制率=（1－实验组平均*A*值/对照组平均*A*值）×100%。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡

收集不同浓度As_4S_4处理12～48 h后的HL-60细胞，以PBS缓冲液清洗后再将细胞沉淀充分混匀，用PBS缓冲液重悬，加入200 mg/L去DNA酶的RNA酶，流式细胞仪分析不同DNA含量的细胞分布。应用ModifitL TL1.00（MAC）分析系统进行数据处理，低于G_1期的细胞（亚G_1期）为凋亡细胞，其占细胞总数的比例为凋亡细胞比例。

1.5 RT-PCR检测突变p53mRNA表达

细胞总RNA抽提及RT-PCR步骤按Trizol（GBICO公司）试剂盒说明书进行，所提取的总RNA溶解后用紫外分光光度仪测RNA纯度和浓度（$A_{260}/A_{280}>1.8$）。在Genebank检索基因cDNA序列，自行设计PCR引物，由上海生物工程公司合成。p53引物序列（上游引物：5′-TCTGTGACTTGCACGTACTC-3′，下游引物：5′-CACGGATCTGAAGGGTGAAA-3′，扩增产物为349b。β-actin上游引物：5′-ACCACCATGTACCCAGGCAT-3′，下游引物：5′-CTCTCTTTGCACTCCCTGGGGG-3′，扩增产物150 bp。PCR扩增条件为95℃、5 min，72℃、1 min，94 ℃、1 min，5 ℃、1 min，72 ℃、7 min by 36循环。产物用1%的琼脂糖胶进行检测。用数码凝胶图像分析系统（Kodak EDAS290）作条带密度扫描，结果以目的条带与对应的β-actin密度值表示。

1.6 bcl-2、突变型p53蛋白水平检测

采用免疫组化法检测bcl-2、突变型p53蛋白的表达，用不同浓度的As_4S_4处理HL-60细胞24 h后丙酮固定，正常血清

收稿日期：2006-08-03；修回日期：2006-10-10

作者简介：彭军（1963—），女，硕士，副主任医师。

?1994-2017 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net