·论 著·

铅和汞诱发非整倍体效应的 CREST染色微核实验研究

冀琛[1]，虞琳[2]，王民生[3*]

（1. 东南大学公共卫生学院，江苏 南京 210009；2. 南京市白下区疾病预防控制中心，江苏 南京 210000；3. 江苏省疾病预防控制中心，江苏 南京 210028）

摘要：目的 比较低浓度醋酸铅（$PbAc_2$）和氯化汞（$HgCl_2$）在体外实验中对 V_{79}细胞非整倍体的诱发效应。方法 体外培养条件下，对低浓度 $PbAc_2$（0.01～20.0 μmol/L）和 $HgCl_2$（0.005～10.0 μmol/L）染毒 V_{79}细胞 18 h后诱导的微核进行形态学分析，计算微核细胞率和大微核细胞率；同时用 CREST染色计算微核着丝粒阳性率。结果 V_{79}细胞经 $PbAc_2$和 $HgCl_2$染毒后，各剂量组的微核率均明显增加，呈现剂量效应关系。$PbAc_2$在 0.03～20.0 μmol/L浓度范围内诱导 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别在 35.9%～52.0%和 0～8.8%，微核形状与 VCR组的微核形状相似。$HgCl_2$在 0.01～10.0 μmol/L浓度范围内诱导 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别在 21.4%～27.9%和 0～7.5%，微核形状以圆形为主，与 MMS组的微核形状相似。$PbAc_2$和 $HgCl_2$的微核着丝粒阳性率在各浓度组分别为 52.8%～67.6%和 47.4%～56.3%。结果 $PbAc_2$和 $HgCl_2$在低浓度下仍造成细胞染色体的损伤，$HgCl_2$具有一定的非整倍体毒性和染色体断裂效应，以非整倍体毒性为主；与 $HgCl_2$相比，$PbAc_2$的非整倍体毒性更占优势。

关键词：醋酸铅；氯化汞；微核实验；非整倍体效应；诱变剂

中图分类号：R994.6 文献标识码：A 文章编号：1002－221X(2009)04－0243－04

Study on the aneuploid effects of lead and mercury using micronucleus assay and CREST staining

JI Chen[1]，YU Lin[2]，WANG Min-sheng[3*]

(1. School of Public Health, Southeast University, Nanjing 210009, China; 2. Nanjing Baixia Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210000, China; 3. Jiangsu Center for Disease Prevention and Control, Nanjing 210028, China)

Abstract: Objective To evaluate the aneuploid effects induced by the low concentration of lead acetate ($PbAc_2$) and mercury chloride ($HgCl_2$) in vitro. Methods Micronucleus morphology analysis and micronucleated cell count were performed in V_{79} cell after treating with low concentration of $PbAc_2$ (0.01～20.0 μmol/L) and $HgCl_2$ (0.005～10.0 μmol/L) for 18 h. Positive rates of micronucleus kinomere were determined by CREST staining. Results Micronuclear rates in $PbAc_2$ and $HgCl_2$ treated V_{79} cell were obviously increased in dose-dependent way. Rates of macro- or multi-micronuclei induced by $PbAc_2$ and $HgCl_2$ were much higher than those induced by clastogen (methane methyl sulfonate). Morphological changes of micronuclei induced by $PbAc_2$ were similar to that induced by aneugen (Vincristine), while the changes of micronucleus by $HgCl_2$ were similar to that induced by clastogen. Positive rates of micronucleus kinomere induced by $PbAc_2$ and $HgCl_2$ were lower than those induced by aneugen, but higher than those induced by clastogen. Conclusions The chromosome damage in V_{79} cells could be induced by low concentrations of $PbAc_2$ and $HgCl_2$. Both aneuploid and clastogen effects could be seen in $HgCl_2$ treated cells, especially the aneuploid effects; compared to the effect of $HgCl_2$, the aneuploid effects induced by $PbAc_2$ seem much greater.

Key words: Lead acetate; Mercuric chloride; Micronucleus assay; Aneuploid effect; Clastogen

醋酸铅（$PbAc_2$）是一种诱变剂[1]，它能引起大鼠和小鼠淋巴细胞微核率的增加和 DNA断裂以及肝、肾、脑等脏器的氧化损伤[3～11]。在体外可抑制 DNA修复，动物实验显示醋酸铅可致啮齿类动物肾癌、脑癌、肺癌，同其他致癌物联合作用的致癌性效应更强。细胞遗传学研究显示，铅暴露工人的染色体异常、姊妹染色单体交换增多，提示肺癌和胃癌的风险增加[2]。

氯化汞（$HgCl_2$）的遗传毒性现已有报道[1]，但大多数职业流行病学调查未发现其致癌性的强有力证据。动物实验发现 $HgCl_2$只有在高剂量或毒作用剂量时才产生致癌作用，而在较低的浓度下则具有明显的细胞遗传毒性作用，表现为影响细胞分裂过程中染色体的分配，以及引起染色体畸变、断裂和非整倍体的形成，但未能诱导点突变，有报道认为其作用的机制主要是氯化汞影响细胞微管蛋白的功能[4]。

收稿日期：2009－04－15

作者简介：冀琛（1983－），硕士研究生，研究方向：遗传毒理学。

*：通讯作者，硕士生导师，研究方向：遗传毒理学。E-mail: lxso287@yahoo.com.cn

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

本研究通过体外微核实验和 CREST染色观察低浓度 $PbAc_2$和 $HgCl_2$诱发 V_{79}细胞非整倍体效应，以区别 $PbAc_2$和 $HgCl_2$是染色体断裂剂还是非整倍体诱变剂。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 选用的中国仓鼠肺成纤维细胞 V_{79}细胞株具有稳定的染色体组型、较短的细胞繁殖周期和高效的克隆能力，是全球第三次微核试验工作组会议推荐的细胞株之一[5]。

1.1.2 受试物与主要试剂 $PbAc_2$（纯度大于 99.99%）、$HgCl_2$分析纯和抗着丝粒抗体购自 Sigma公司，甲基磺酸甲酯（MMS）、长春新碱（VCR）、Trypsin-EDTA等购自德国 Merck-Schuchardt公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞毒性实验 按 Borenfreund等报道的方法[6]通过中性红实验测定 $PbAc_2$和 $HgCl_2$对 V_{79}细胞的毒性，选择低于或接近产生细胞毒性的浓度范围作为体外微核实验的染毒浓度。

1.2.2 微核实验 设置 9个染毒剂量组，$HgCl_2$的剂量分别为 0.005、0.01、0.03、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0和 10.0 μmol/L，$PbAc_2$剂量分别为 0.02、0.03、0.05、0.1、0.5、1.0、5.0、10.0和 20.0 μmol/L。同时设置 50 μg/ml MMS为染色体断裂剂（clastogen）阳性对照和 5.0 nmol/L VCR为非整倍体诱变剂（aneugen）阳性对照组以及阴性对照组。

先将 3×10^5 V_{79}细胞接种到含 10% FCS的 DMEM培养基中，37℃ 5% CO_2条件下培养 48 h，然后分别加入不同浓度的 $PbAc_2$、$HgCl_2$、MMS和 VCR，37℃培养条件下暴露 18 h（相当于 1.5个细胞周期）。V_{79}细胞染毒后分别加入 0.25% Trypsin-0.02% EDTA消化液 2.5 ml，使其脱壁成为细胞悬液，然后加入 5 ml的培养液，200 g离心 10 min，再用 2 ml培养液稀释成细胞悬液，加 2 ml的 0.4% KCl低渗液，再次离心后，加甲醇/冰醋酸固定液，固定 2次，滴 2滴细胞悬液于干燥的冰玻片上，推片，晾干，用新鲜配置的吖啶橙染液染色 15 min。荧光显微镜下观察记录完整细胞的微核数及微核的大小，每组计数 4 000个完整细胞，同时按微核大小进行分类计数，计算微核率。

1.2.3 数据分析 本实验全部采用双盲方法进行数据记录，所有实验至少独立重复 2次，然后用 SPSS11.0软件包进行统计分析。

1.2.4 CREST染色[7] 将标本载玻片置于 −20℃甲醇中固定 20 min，取出载片在 −20℃丙酮中涮洗 2～3次，在 PBS液中清洗 2次，每次 5 min。将 20 μl CREST血清（1∶1 PBS稀释）滴加于细胞层上，加盖片 37℃孵育 60 min。在 PBS液中清洗 3次，每次 10 min。加 50 μl CY3羊抗人 IgG-Fc抗体（1∶50 PBS稀释）加盖片 37℃孵育 60 min。在 PBS液中清洗 3次，每次 10 min。载片浸入 PBS稀释的 50 μg/ml Hoechst33258液中染色 10 min。风干后荧光显微镜观察，数据记录与处理同微核实验。

2 结果

2.1 $PbAc_2$和 $HgCl_2$的细胞毒性作用

中性红实验测定 $PbAc_2$对 V_{79}细胞毒性作用结果表明，20.0 μmol/L $PbAc_2$作用 18 h对 V_{79}细胞增殖无明显影响；浓度为 50.0 μmol/L时，细胞数和细胞对中性红摄入减少，提示细胞毒性作用；100.0 μmol/L时，细胞增殖和细胞对中性红摄入完全受到抑制。

$HgCl_2$对 V_{79}细胞毒性作用较 $PbAc_2$大，10.0 μmol/L $HgCl_2$作用 18 h对 V_{79}细胞增殖无明显影响；浓度为 15.0 μmol/L时，即发生细胞数和中性红摄入减少，提示细胞毒性作用；25.0 μmol/L时即出现细胞对中性红摄入完全受到抑制；50.0 μmol/L时，细胞增殖完全受到抑制。

2.2 不同浓度 $PbAc_2$和 $HgCl_2$染毒的微核率（表 1）

表 1 不同浓度 $PbAc_2$和 $HgCl_2$诱导 V_{79}细胞的微核细胞率 ‰

组别	浓度（μmol/L）	微核细胞率（$\bar{x}\pm s$）
阴性对照	50 μl培养基	4.60±0.36
VCR	5.0 μmol/L	13.45±0.33**
MMS	50 μg/ml	14.08±0.57**
$HgCl_2$	0.005	5.00±0.80
	0.01	5.50±0.60*
	0.03	8.30±1.00**
	0.05	10.80±1.00**
	0.1	13.50±1.30**
	0.5	12.30±1.50**
	1.0	11.00±1.40**
	5.0	10.80±1.00**
	10.0	10.50±1.30**
	20.0	—
$PbAc_2$	0.01	4.20±0.21
	0.02	4.70±0.50
	0.03	7.80±0.25**
	0.05	9.90±0.80**
	0.1	11.80±0.80**
	0.5	14.30±0.50**
	1.0	12.20±0.60**
	5.0	11.80±0.45**
	10.0	10.48±0.69**
	20.0	8.40±0.60**

注：每组计数 4 000个完整细胞。与阴性对照组比较，* $P<0.05$，** $P<0.01$

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

由表 1可知，两组阳性对照和阴性对照间差别均有统计学意义（$P<0.01$）。$HgCl_2$和 $PbAc_2$各剂量组的微核细胞率均明显增加，呈现剂量效应关系。$PbAc_2$和 $HgCl_2$引起微核率开始升高的浓度分别为 0.03 μmol/L和 0.01 μmol/L，微核率达最大值的 $PbAc_2$和 $HgCl_2$染毒浓度分别为 0.5 μmol/L和 0.1 μmol/L。在以后的浓度范围内微核率逐渐下降，两者的趋势基本一致，但随着染毒浓度的增高，$HgCl_2$比 $PbAc_2$细胞毒性作用大的特性逐渐显现，在 20 μmol/L细胞增殖受到一定影响。

2.3　$PbAc_2$和 $HgCl_2$诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率

非整倍体诱变剂 VCR诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核（≥1/3细胞直径）和多微核发生率分别为 30.2%～33.3%和 5.6%～7.0%，染色体断裂剂 MMS诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别为 5.3%～6.2%和 12.3%～13.2%，两类诱变剂诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率差别有统计学意义（$P<0.01$）。$PbAc_2$在 0.03～20.0 μmol/L浓度范围内诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别为 35.9%～52.0%和 0～8.8%，微核形状与 VCR组的微核形状相似。$HgCl_2$在 0.01～10.0 μmol/L浓度范围内诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别为 21.4%～27.9%和 0～7.5%，微核形状以圆形为主，与 MMS组的微核形状相似。见表 2。

表 2　$HgCl_2$和 $PbAc_2$诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率

组别	浓度（μmol/L）	分类			总微核细胞数	大 MN/总 MN	多 MN/总 MN
		MN（<1/3）	大 MN（1/3～1/2）	多 MN			
阴性对照	50 μl medium	21	0	0	21	0	0
MMS	25 μg/ml	31	2	5	38	0.053	0.132
	50 μg/ml	53	4	8	65	0.062	0.123
VCR	5 nmol/L	33	18	3	54	0.333	0.056
	10 nmol/L	54	26	6	86	0.302	0.070
$HgCl_2$	0.01	16	6	0	22	0.273	0
	0.03	22	6	0	28	0.214	0
	0.05	30	9	1	40	0.225	0.025
	0.1	31	11	1	43	0.256	0.023
	0.5	38	13	1	52	0.250	0.019
	1.0	30	12	1	43	0.279	0.023
	5.0	28	9	2	39	0.231	0.051
	10.0	28	9	3	40	0.225	0.075
$PbAc_2$	0.03	17	12	2	31	0.387	0.065
	0.05	25	14	0	39	0.359	0
	0.1	22	20	3	45	0.444	0.067
	0.5	26	24	4	54	0.444	0.074
	1.0	25	22	3	50	0.440	0.060
	5.0	22	26	2	50	0.520	0.040
	10.0	17	14	3	34	0.412	0.088
	20.0	16	13	1	30	0.433	0.033

2.4　抗着丝粒抗体间接免疫荧光染色检测结果

从表 3可见，非整倍体诱变剂 VCR诱导的 V_{79}细胞微核中有 73.2%为着丝粒信号阳性，显示出明显的非整倍体毒性，而染色体断裂剂 MMS诱导的 V_{79}细胞微核中仅有 16.7%为着丝粒信号阳性，提示其微核主要由染色体断片组成。$PbAc_2$和 $HgCl_2$的微核着丝粒阳性率在各浓度组分别为 52.8%～67.6%和 47.4%～56.3%。提示 $HgCl_2$具有一定的非整倍体毒性和染色体断裂效应，以非整倍体毒性占优势，与 $HgCl_2$相比，$PbAc_2$的非整倍体毒性更占优势。

表 3　$PbAc_2$和 $HgCl_2$诱导的 V_{79}细胞微核的 CREST染色检测结果

组别	浓度（μmol/L）	计数细胞数（个）	微核细胞数（个）	阳性微核细胞数（个）	微核着丝粒阳性率（%）
MMS	50 μg/ml	4 000	60	10	16.7
VCR	5 nmol/L	4 000	56	41	73.2
$HgCl_2$	0.01	4 000	20	11	55.0
	0.03	4 000	24	13	54.2
	0.05	4 000	38	18	47.4
	0.1	4 000	48	27	56.3
	0.5	4 000	47	26	55.3
	1.0	4 000	45	23	51.1
	5.0	4 000	37	20	54.1
	10.0	4 000	38	20	52.6
$PbAc_2$	0.02	4 000	19	11	57.9
	0.03	4 000	25	16	64.0
	0.05	4 000	32	18	56.3
	0.1	4 000	39	23	59.0
	0.5	4 000	53	28	52.8
	1.0	4 000	49	26	53.1
	5.0	4 000	46	27	58.7
	10.0	4 000	34	23	67.6
	20.0	4 000	30	18	60.0

3　讨论

CREST染色法结合微核技术在体外培养的细胞中能有效地鉴别化合物的非整倍体毒性。有着丝粒的微核是在非整倍体诱变剂（aneugen）作用下整条染色体丢失而产生的，非整倍体诱变剂能引起细胞纺锤体功能紊乱和结构损害，使染色体在有丝分裂后期不能进入子代核内，从而滞留在胞浆形成微核，这种类型的微核内能检测到着丝点，而染色体断裂剂（clastogen）能使染色体臂区断裂形成断片，此类微核中一般检测不到染色体着丝点。近年来研究表明，非整

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

倍体与癌变关系密切，在 75%以上的肿瘤细胞中可检出非整倍体。所以，区别外源性化学物的非整倍体毒性效应和染色体断裂毒性效应具有重要的现实意义，理论上整条染色体形成的微核比染色体断片形成的微核要大。当使用某种化合物诱发微核形成后，确定这些微核主要是由染色体断片还是滞留染色体组成，重要区别在于微核内是否有着丝粒存在，因而，通过简单实用的形态学指标分析大致可以区分非整倍体诱变剂和染色体断裂剂[8]。欧洲经济技术合作与发展组织（OECD）已将是否出现着丝粒蛋白质或着丝粒 DNA作为哺乳动作微核实验的一个检测终点明确写入化学物试验指南[9]。

本研究在微核实验的基础上，采用微核大小形态和 CREST染色技术对 $HgCl_2$和 $PbAc_2$的非整倍体毒性进行比较研究。实验结果表明，$PbAc_2$和 $HgCl_2$体外染毒 V_{79}细胞，各浓度组的微核率均明显增加，呈现剂量 效应关系，而且微核在低染毒浓度时就会增加。微核形态大小结果表明，非整倍体诱变剂 VCR和染色体断裂剂 MMS诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率差异有统计学意义（$P<0.01$）。$HgCl_2$在 0.01～10.0 μmol/L浓度范围内诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别为 21.4%～27.9%和 0～7.5%，微核形状以圆形为主，与 MMS组的微核形状相似。$PbAc_2$在 0.03～20.0 μmol/L浓度范围内诱导的 V_{79}细胞微核形态类别的发生率中，大微核和多微核发生率分别为 35.9%～52.0%和 0～8.8%，微核形状与 VCR组的微核形状相似，明显高于染色体断裂剂 MMS诱导的大微核发生率。分析 CREST结果表明，典型的非整倍体诱变剂 VCR诱导的微核约 73.2%为着丝粒信号阳性，显示其很强的非整倍体毒性；而典型的染色体断裂剂 MMS诱导的 V_{79}细胞微核中仅有 16.7%为着丝粒信号阳性，表明其诱发形成的微核大部分由染色体断片组成，具明显的染色体断裂效应。$HgCl_2$的微核着丝粒阳性率在各浓度组为 47.4%～56.3%，显示出一定的非整倍体毒性。$PbAc_2$的微核着丝粒阳性率在各浓度组为 52.8%～67.6%。结果说明 $HgCl_2$具有一定的非整倍体毒性和染色体断裂效应，而 $PbAc_2$更趋向于非整倍体诱变剂效应。Thei等[4]利用 CREST免疫微核技术分析汞盐和铅盐诱导的 V_{79}细胞微核实验、联合微管组装实验和驱动蛋白爬行实验，证明汞盐和铅盐可以与细胞骨架蛋白相互作用，从而影响细胞的纺锤丝装置活动，形成非整倍体，造成含着丝粒微核增加，这种与蛋白质的作用有剂量 反应关系，且有阈浓度存在[9]，这对完善遗传致癌物的分类有重要意义。

CREST染色微核分析具有简便、经济、易操作、实用性强等特点，可大大提高传统的微核实验检测能力，但微核的着丝粒分析只能检测染色体丢失造成的非整倍体，对染色体不分离引起的非整倍体则无法检测（如在微核形态似整条染色体丢失造成的而 CREST染色微核实验又为阴性时），这时可用荧光原位杂交（FISH）方法进行确认，FISH法种属特异性强，标本制备简单，可靠性更好，但因价格昂贵，不宜作为化学物非整倍体毒性的筛查方法。所以，在对化学物遗传毒性分析时可将两种方法结合，取长补短，才能使化学物的非整倍体毒性作用检测更为全面。

参考文献：

[1] Cavas T. In vivo genotoxicity of mercury chloride and lead acetate: Micronucleus test on acridine orange stained fish cells[J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(1): 352-358.

[2] Steenland K, Boffetta P. Lead and cancer in humans: where are we now?[J]. Mutat Res, 2005, 589(2): 103-110.

[3] Celik A, Ogenler O, Gümelekoglu U. The evaluation of micronucleus frequency by acridine orange fluorescent staining in peripheral blood of rats treated with lead acetate[J]. Mutagenesis, 2005, 20(6): 411-415.

[4] Theiri R, Bonacker D, Stoiber T, et al. Interaction of metal salts with cytoskeletal motor protein systems[J]. Toxicol Letters, 2003, 140-141: 75-81.

[5] Micheline Kirsch-Volders. Report from the in vitro micronucleus assay working group[J]. Mutation Research, 2003, 540: 153-163.

[6] Borenfreund E, Babich H, Martin-Alguacil N. Comparisons of two in vitro cytotoxicity assay the neutral red (NR) and tetrazolium MTT test[J]. Toxicol in Vitro, 1988, 2: 1-6.

[7] 胡斌，曹佳，程舸，等. 荧光原位杂交和 CREST染色对甲基丙烯酸环氧丙酯的非整倍体诱发效应的研究[J]. 癌变·畸变·突变，1998, 10(2): 65-68.

[8] Yamamoto K I, Kikuchi Y. A comparison of diameters of micronuclei induced by clastogens and by spindle poisons[J]. Mutat Res, 1980, 71: 127-131.

[9] OECD Guideline for the Testing of Chemicals: Mammalian Erythrocyte Micronucleus Test, 474. Adopted: 21st July 1997.

[10] Bonacker D, Stoiber T, Wang M S, et al. Genotoxicity of inorganic mercury salts based on disturbed microtubule function[J]. Arch Toxicol, 2004, 78: 575-583.

[11] 连灵君，吴晨，徐进，等. 铅染毒导致小鼠 DNA损伤与氧化损伤[J]. 环境科学学报，2006, 26(1): 137-141.

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