

· 实验研究 ·

硝基胍对小鼠 L5178Y 细胞 TK 基因的致突变作用

Mutagenic effect of nitroguanidine on TK gene in mouse L5178Y cells

赵彬, 刘志永, 高俊宏, 高永超

(兵器工业卫生研究所毒理技术研究中心, 陕西 西安 710065)

摘要: 通过体外哺乳动物细胞 TK 基因突变试验, 探讨硝基胍(NQ)的细胞致突变性。在无代谢活化(-S9)和有代谢活化(+S9)条件下, NQ 处理 L5178Y 细胞 3 h 后表达培养 2 d, 加入三氟胸苷(TFT), 接种于 96 孔板, 培养 12 d, 计算突变频率(MF)。结果显示, 以 1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g/ml}$ NQ 处理 L5178Y 细胞, 在 -S9 和 +S9 条件下, 各剂量组 MF 具有剂量相关性, 4 000 $\mu\text{g/ml}$ 剂量组的 MF 分别为 $(126.24 \pm 20.22) \times 10^{-6}$ 和 $(375.83 \pm 41.94) \times 10^{-6}$, 显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$)。提示 NQ 可能对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因具有致突变性。

关键词: 硝基胍 (NQ); TK 基因突变; 遗传毒性

中图分类号: R994.7 **文献标识码:** B

文章编号: 1002-221X(2024)01-0068-03

DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2024.01.021

硝基胍(NQ)为白色针状晶体, 属脂肪族硝胺类炸药, 作为推进剂和炸药装药组分, 比相同火药力的单、双基炸药具有较低的燃温, 故被称为“无焰冷火药”^[1], 是一种重要的爆炸化合物, 在炸药和火药制造中具有特殊用途^[2]。急性毒性试验显示, NQ 大鼠经口 LD₅₀ 8 066 mg/kg, 小鼠经口 LD₅₀ 10 044 mg/kg, 可导致实验动物出现胃肠道以及中枢神经系统刺激症状、血尿等中毒反应, 并对眼睛、皮肤、黏膜具有刺激作用; 长期染毒可产生蓄积毒性^[3]。本研究旨在为 NQ 的毒性安全性评价提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 NQ 由中国近代化学研究所提供。L5178Y TK⁺/--3.7.2C 小鼠淋巴瘤细胞(中国科学院典型培养物保藏委员会细胞库), RPMI 1640 培养基(Hyclone 公司), 马血清(GIBCO 公司), 胸腺嘧啶核苷、次黄嘌呤、氨甲蝶呤、甘氨酸、秋水仙碱、Giems(成都格雷西亚化学技术有限公司), 三氟胸苷

(TFT)、甲基甲烷磺酸乙酯(MMS)、环磷酰胺(CP, Sigma 公司); BT25S 型电子天平(赛多利斯科学仪器有限公司), 洁净工作台(西安富康空气净化设备工程有限公司), CO₂ 恒温培养箱(美国 SHELLAB 公司), 高压灭菌器(韩国大韩科学有限公司), 倒置显微镜(德国蔡司公司), 低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.2 方法 参照经济合作与发展组织(OECD)476^[4]中的相关要求, 剂量设计试验在与正式试验相同的条件下处理细胞后采用 CCK-8 方法测定细胞毒性范围。取清除自发突变、生长良好的细胞, 调整密度 5×10^5 个/ml, 按 1% 体积加入受试物(需代谢活化的情况下, 同时加入终浓度为 1% 的 S9 混合物), 37 °C 振摇处理 3 h, 以 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液, 用 PBS 洗涤细胞 2 遍, 重新悬浮细胞于完全培养基中, 并调整密度为 2×10^5 个/ml^[5]。取适量上述细胞悬液, 稀释至 8 个细胞/ml, 接种 96 孔板(每孔 0.2 ml), 每个剂量种 1 块平板, 培养 12 d, 计数每块平板有集落生长的孔数。取适量上述细胞悬液进行 2 d 表达培养, 每天计数细胞密度并保持密度 $< 10^6$ 个/ml。

表达培养结束后, 取适量细胞悬液稀释至 8 个细胞/ml, 接种 96 孔板(每孔加入 0.2 ml), 每个剂量种 1 块平板, 培养 12 d, 计数每块平板有集落生长的孔数。另取适量细胞悬液, 调整细胞密度为 1×10^4 个/ml, 加入 TFT, 混匀, 接种 96 孔板(每孔加入 0.2 ml), 每个剂量作 3 块平板, 培养 12 d, 计数有突变集落生长的孔数。

1.3 数据处理 平板效率(PE%) = $\frac{-\ln(EW/TW)}{1.6} \times 100\%$

式中: EW—无集落生长的孔数; TW—总孔数; 1.6—每孔接种细胞数。

相对存活率(RS%) = $\frac{PE_{处理}}{PE_{阴性对照}} \times 100\%$

突变频率(MF, $\times 10^{-6}$) = $\frac{-\ln(EW/TW)/N}{PE_2}$

式中: N—每孔接种细胞数(2 000 个); PE₂—第

基金项目: 国家“十三五”预研项目; 陕西省创新能力支撑计划(2023-CX-PT-05)

作者简介: 赵彬(1990—), 女, 硕士, 工程师, 研究方向: 毒理与生物效应。

通信作者: 高俊宏, 正高级高级工程师, E-mail: gaoping2285@126.com

2天的平板效率。

1.4 统计分析 采用 SPSS 23.0 软件对 MF 进行计算, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示。基因突变试验受试物的 MF ≥ 2 倍阴性对照, 可判定结果为阳性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受试物染毒剂量设定 选择 250~5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量组进行细胞毒性试验。在有代谢活化(+S9)和无代谢活化(-S9)系统条件下, 5 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量组受试物加入培养基后析出形成沉淀, 培养 3 h 后沉淀不溶解。其他各剂量细胞培养基内均未观察到受试物沉淀。细胞毒性以细胞相对存活率表示, 结果见表 1。

根据细胞毒性试验的结果, 受试物设定 1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 3 组剂量进行试验。

表 1 细胞相对存活率 [%]

受试物浓度 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	-S9	+S9
0 (DMSO)	100.0	100.0
250	95.2	98.2
500	94.5	96.5
1 000	74.3	82.2
2 000	63.7	59.6
3 000	53.3	55.6
4 000	47.5	46.3
5 000	0	0

2.2 NQ 对 L5178Y 细胞 TK 基因致突变性 在 -S9 情况下, 细胞相对存活率随染毒剂量的增加而减小, 说明 NQ 对 L5178Y 细胞具有一定毒性, 且呈现剂量-反应关系, 染毒剂量 4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时相对存活率 43.74%。阳性对照物 MMS 的 MF 为 $(296.77 \pm 8.84) \times 10^{-6}$, 为溶剂对照组的 5.41 倍。随着 NQ 染毒剂量的增加, MF 呈上升趋势, 具有剂量相关性, 在 4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时 MF 为 $(126.24 \pm 20.22) \times 10^{-6}$, 是溶剂对照组的 2.30 倍 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 NQ 对 L5178Y 细胞 TK 基因的致突变性 (-S9)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PE ₀ (%)	PE ₂ (%)	RS ₀ (%)	MF ($\times 10^{-6}$)
溶剂对照组	0.5% DMSO	98.04	216.61	100.00	54.90 \pm 7.17
阳性对照组 (MMS)	5	37.13	120.33	36.67	296.77 \pm 8.84 ^a
NQ	1 000	68.66	61.30	89.16	31.77 \pm 5.09
	2 000	40.77	84.09	52.94	51.76 \pm 6.76
	4 000	33.69	15.43	43.74	126.24 \pm 20.22 ^a

注: a, 与溶剂对照组相比, $P < 0.05$ 。PE₀—第 0 天平板效率; PE₂—第 2 天平板效率; RS₀—第 0 天细胞相对存活率。表 3 同。

在代谢活化系统中, L5178Y 细胞的 RS₀ 随着染毒剂量的增加而减小, 呈现剂量-反应关系, 染毒剂量

达到 4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时相对存活率为 39.09%。阳性对照 CP 的 MF 为 $(244.99 \pm 18.07) \times 10^{-6}$, 显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$)。随着 NQ 染毒剂量的增加, MF 呈上升趋势, 染毒剂量 4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时 MF 为 $(375.83 \pm 41.94) \times 10^{-6}$, 显著高于溶剂对照组 ($P < 0.05$), 具有剂量相关性。见表 3。

表 3 NQ 对 L5178Y 细胞 TK 基因的致突变性 (+S9)

组别	剂量 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	PE ₀ (%)	PE ₂ (%)	RS ₀ (%)	MF ($\times 10^{-6}$)
溶剂对照组	0.5% DMSO	104.62	163.65	100.00	73.00 \pm 13.44
阳性对照组 (CP)	50	47.36	89.30	42.29	244.99 \pm 18.07 ^a
NQ	1 000	92.08	86.64	93.92	70.33 \pm 13.58
	2 000	48.76	72.70	49.74	78.40 \pm 12.30
	4 000	38.32	7.61	39.09	375.83 \pm 41.94 ^a

3 讨论

遗传毒性试验检测方法众多, 根据检测的遗传终点可分为三类: 基因突变、染色体畸变和 DNA 原始损伤^[6]。本次实验采用的是检测灵敏度较高、检测谱较广且简便、易行的体外小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因突变试验^[7]。NQ 染毒剂量为 1 000、2 000、4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 在 4 000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量时 NQ 的 MF 为溶剂对照组的 2 倍以上, 且具有剂量-反应关系, 说明 NQ 可能对小鼠淋巴瘤 L5178Y 细胞 TK 基因具有致突变性。研究发现^[8], NQ 在 4 mg/ml 剂量下作用 24 h 可以诱导中国仓鼠肺细胞 (CHL) 发生染色体畸变。以基因突变、较大范围染色体损伤或重组形式出现的 DNA 损伤及其损伤的固定, 通常被认为是可遗传效应的基础, 为恶性肿瘤多阶段发展过程的重要因素。在遗传毒性试验中呈阳性的化合物为潜在的人类致癌剂和/或致突变剂^[9]。本研究进一步说明 NQ 可能具潜在的致突变性和致癌性。

NQ 是一种重要的爆炸化合物, 因其具有水溶性, 能随着生产加工的废液排放进入环境。接触 NQ 的科研、生产人员应加强防护, 避免职业危害, 同时应采取相应的环保措施, 减少 NQ 对环境的污染。

参考文献

- [1] 任特生. 硝胺及硝酸酯炸药化学与工艺学 [M]. 北京: 兵器工业出版社, 1994: 290.
- [2] 魏学涛, 赵颖, 李乃勤, 等. 新型硝基胍发射药研究 [J]. 火炸药学报, 2001 (4): 34-35.
- [3] 杜文霞, 刘亚杰, 吴琼, 等. 硝基胍的毒性研究 [J]. 工业卫生与职业病, 2003, 29 (3): 171-173.

(下转至第 105 页)

未见明显改善,需评估给药剂量及时间是否得当,必要时调整治疗方案。

2.3 中枢神经系统损伤护理 本文2例患者入院时呈昏迷状态,7例出现谵妄、烦躁不安,2例抽搐。烦躁不安患者急诊予地西洋10 mg镇静,同时予大量补液利尿等处理后症状渐缓解。需警惕患者出现惊厥、嗜睡甚至昏迷等中枢神经系统症状。

2.4 重要脏器功能损害的护理 2例患者尿蛋白(+),血 β -微球蛋白及尿素氮轻度升高,提示中毒性肾损伤,予积极补液利尿治疗,密切监测尿量及肾功能变化。3例患者血CK及CK-MB等升高提示中毒性心肌损害,给予营养心肌药物,并密切监测心率、心律、血压等生命体征。

2.5 口腔及消化道黏膜损伤护理 曼陀罗中毒患者口腔黏膜常极度干燥,可予口腔护理保持湿润;服用消毒漱口水或含片以减轻症状。服毒量大的患者因烦躁不安甚至抽搐等出现应激性溃疡,洗胃亦会出现消化道胃黏膜损伤。患者入院后予胃黏膜保护剂,减少消化道损伤。拔除胃管后患者可能会存在短暂的咽喉部不适、异物感,宜避免强咳分泌物引起黏膜破损;意识恢复后予温凉流质饮食。鼓励患者多喝水,同时给予利尿剂以加快毒物经尿液排出。

2.6 尿潴留处理 对伴有尿潴留的曼陀罗中毒患者,需要密切观察膀胱充盈情况,警惕中毒导致的精神神经症状掩盖尿潴留不适而出现的烦躁。本文3例患者入院时烦躁不安,外院予镇静治疗效果不佳,入院后床旁超声检查发现膀胱极度充盈,予紧急导尿后症状明显改善。对于意识恍惚、昏迷、尿失禁的患者,均行保留导尿。必要时遵医嘱记录尿量。留置导尿患者需要密切观察,必要时进行约束,防止意外拔除尿管,损伤尿道等不良事件发生。

2.7 心理护理 患者治疗早期多表现为烦躁、谵妄,患者及家属极易产生焦虑恐惧。医护人员需耐心进行心理安抚,树立患者积极治疗的信心。同时进行健康教育宣教,预防类似中毒事件的发生。

2.8 安全护理 部分患者入院时出现手足舞动、胡

言乱语、幻听幻视、谵妄等精神症状,当患者出现抽搐、痉挛时需防止舌咬伤;出现幻觉、谵妄、躁动时,宜正确使用约束带、床挡,防止坠床。密切观察呼吸肌麻痹及气道梗阻等呼吸困难情况;发现异常及时报告医生给予应急处理。

3 结果

9例患者中2例重症昏迷入院,气管插管后拟脑血管意外行颅脑造影检查,未发现异常,转入EICU,48~72 h意识转清,1周内拔除气管插管,其余患者均在72 h内症状消失,随访无后遗症发生。

4 讨论

曼陀罗毒性成分主要为莨菪类生物碱,可阻断M型胆碱能神经。本文9例患者入院时均出现颜面潮红、皮肤干燥,>50%患者出现谵妄、烦躁不安、视物模糊、幻听幻视、心动过速;部分患者出现CRP升高、蛋白尿及心肌酶谱检测异常等肾功能及心肌损害。

急性曼陀罗中毒抢救护理措施必须准确、及时、快速,彻底清除消化道内毒素,尽早予解毒剂及对症支持治疗。曼陀罗中毒以农村老年人多见,需做好高发人群的宣传教育,提高人们对曼陀罗中毒的认识,做到外用与内服药酒分开放置,减少中毒事件的发生。

参考文献

- [1] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典(2015)[M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 267.
- [2] 邓朝晖, 罗充, 刘彬, 等. 曼陀罗药用价值的开发和利用[J]. 现代生物医学进展, 2011, 11(7): 1394-1398.
- [3] 赵文艳, 魏惠, 景东华, 等. 以反应迟钝精神行为异常为首表现的曼陀罗中毒2例报告[J]. 中国实用神经疾病杂志, 2018, 21(6): 690-692.
- [4] 刘海光, 菅向东, 吴强, 等. 曼陀罗中毒二例[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2018, 36(5): 370-371.

(收稿日期: 2023-08-30; 修回日期: 2023-11-20)

(上接第69页)

- [4] OECD. OECD Guidelines for Test of Chemicals; 476 in vitro mammalian cell gene mutation test [S]. OECD, 2016.
- [5] 李存治, 刘志永, 赵彬, 等. 1,1'-二羟基-5,5'-联四唑二羧胺盐的遗传毒性研究[J]. 中国工业医学杂志, 2020, 33(6): 520-522.
- [6] 肖凯, 李宏霞. 遗传毒性试验方法应用现况与研究进展[J]. 现代预防医学, 2004, 31(4): 524-526.
- [7] Hozier J, Scalzi J, Sawyer J, et al. Localization of the mouse thymi-

dine kinase gene to the distal portion of chromosome [J]. Genomics, 1999(10): 827-830.

- [8] Sample BE, Arenal C, Reinke E. Wildlife toxicity assessments for chemicals of military concern. Chapter 7: Wildlife toxicity assessment for nitroguanidine [M]. Amsterdam: Elsevier, 2015: 147-159.
- [9] Celente G, Colares GS, Priscila da Silva Araújo, et al. Acute ecotoxicity and genotoxicity assessment of two wastewater treatment units [J]. Environ Sci Pollut Res Int, 2020, 27(10): 10520-10527.

(收稿日期: 2023-05-25; 修回日期: 2023-10-27)