

1989;15~39。

3 高铭喧. 刑法学. 北京:法律出版社,1982;251~261。

4 姜明安. 行政法与行政诉讼. 中国卓越出版社, 1990;265~280。

5 张永伟. 论食品卫生监督中自由裁量权的行使. 中国食品卫生杂志 1989;1(3):1。

6 苏惠渔. 量刑与电脑. 中国社会科学 1990;(5): 19。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)对中国仓鼠肺纤维 CHL 细胞的遗传毒性

卫生部食品卫生监督检验所 李东华 孙 艺 罗雪云

摘要 观察存在于小麦赤霉病麦中的单端孢霉烯族毒素之一——脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)对中国仓鼠肺纤维(CHL)细胞的致染色体畸变,及对姐妹染色单体互换的作用。发现,经 0.05~0.4ug/ml 的 DON 处理,CHL 细胞姐妹染色单体互换率不增加($p>0.05$)。CHL 细胞与浓度为 0.1~0.6ug/ml 的 DON 接触 48h(加 Sq)与对照组比较,出现了染色体畸变率显著增加($p<0.05, p<0.01$),且有剂量—反应关系($r=0.994, p<0.005$),但不加 Sq 时, DON 无此活性。DON 对 50%CHL 细胞致死浓度为 0.1~1ug/ml。10ug/ml-DON 可使全部 CHL 细胞死亡。DON 可延长细胞的分裂周期,呈剂量—反应关系($r=0.991, p<0.01$),DON 经代谢活化后表现对哺乳类动物细胞致染色体畸变性,提示 DON 可能有潜在的致突变性。

脱氧雪腐镰刀菌烯醇(DON)是一种存在于赤霉病麦中的单端孢霉烯族毒素。它可引起人畜中毒,表现呕吐,腹泻等症状。由于 DON 在粮食中的检出率很高,它与我国广大的人群健康关系密切。国内外学者对 DON 的毒理进行了研究,在三致作用的研究中,由于方法不同,结果迥异。中国仓鼠 V79 细胞的突变试验,未能发现 DON 有诱变作用^[2],大鼠原代肝细胞,加入 1~100ug/ml 的 DON,仅见细胞毒性,程序外的 DNA 合成无明显增加。但在小鼠胚胎 BALB/3T3 细胞的体外转化试验中,DON 浓度为 0.2~1.6ug/ml 时,出现了细胞转化效应^[4],表明 DON 可能具有潜在的致癌性。本文报告了用国内外未曾报道过的中国仓鼠肺纤维(CHL)细胞作 DON 对细胞染色体的畸变分析及姐妹染色单体互换试验的结果,进一步观察 DON 对遗传物质的毒性作用。

1 材料和方法

1.1 材料

中国仓鼠肺纤维细胞(简称 CHL 细胞),由医科院肿瘤所细胞生物室提供。

MEM 液,15%小牛血清,NaHCO₃2g/l,青、链霉素各 1 万单位/ml。

DON,美国 Sigma 公司出品。

胰酶,同上。

台盼兰,上海化学试剂分装厂出品。

黄曲霉毒素(AFB₁),由北京市劳研所提供。

甲基硝基亚硝基胍(MNNG),由医科院肿瘤所细胞生物室提供。

大鼠肝 Sq,同上。

1.2 方法

1.2.1 DON 对 CHL 细胞的细胞毒性测定

将 CHL 细胞置 MEM 液中 37℃ 培养,

对数生长期分瓶接种于100ml培养瓶中,加培养液10ml,接种细胞量为 5×10^4 个/瓶,培养24h后,更换培养液,同时将培养液稀释过滤的DON以6个不同终浓度100、10、1、0.1、0.01、0.001ug/ml分别加入细胞中,继续培养48h后,将细胞用胰酶消化,适当稀释,0.5%台盼兰染色,镜下计数,计数细胞死亡率。

1.2.2 根据DON的细胞毒性,设计各组剂量,DON浓度分别为2、1、0.6、0.4、0.2、0.1ug/ml,以培养液作阴性对照,MNNG作阳性对照。

另取1、0.6、0.2、0.1、0.01、0ug/ml各组DON及AFB₁,同时加大鼠肝Sq0.2ml。

上列各剂量组的DON及阳性对照物,加于细胞培养瓶中,与细胞接触48h,常规收获细胞。细胞经低渗、固定、制片、染片,在低倍镜下选择染色体分散良好的中期分裂相,油镜下观察染色体,每组计数100个分裂相,计算染色体畸变率。

1.2.3 DON对CHL细胞姐妹染色

单体互换的作用

将细胞分瓶接种于培养瓶中,同时加入Budr(10ug/ml),24h后换液,加入不同剂量的DON,终浓度为1、0.4、0.2、0.1、0.05、0ug/ml,MNNG、Budr,毒物与细胞接触48h,常规收获细胞,制片,用pH为11,0.01M的磷酸缓冲液配制的Giemsa8%染液染色5min,油镜下观察SCE,每组计数50个,中期分裂相,同时另数50个第1,第3周期细胞的细胞周期时相。

1.3 统计

以平均每个细胞的染色体畸变数或平均每个细胞的姐妹染色单体交换数,作均数的双侧t检验。

2 结果与讨论

体外染色体畸变分析可了解受试动物对细胞的遗传毒性,实验中直接观察毒物对染色体的损伤,并根据染色体断裂数目判断染色体受损伤的严重程度,是目前评价环境诱变剂的一种手段。

表1 DON对CHL细胞的细胞毒性及对染色体的畸变作用

DON(ug/ml)	细胞死亡率(%)	染色体畸变数		染色体畸变率(%)	P值 ^a
		染色单体型	染色体型		
100	100				
10	100				
1	44.44				
0.1	46.81	6	3	9	>0.05
0.01	30.19	7	5	12	>0.05
0.001	15.19	7	4	11	>0.05
0	2.00	6	3	9	
1					
0.6					
0.4					
0.2		2	6	8	>0.05
0.1		4	9	13	>0.05
0		8	1	9	
MNNG		37	32	69	<0.01
DON+Sq					
1					
0.6		23	23	83	<0.005
0.2		20	8	28	<0.05
0.1		23	1	24	<0.02
0.01		9	3	12	>0.05
0		3	5	8	
AFB ₁		18	13	31	<0.002

注:a:各组均与0组比较;b:仅计数53个分裂相。

从表1可见,CHL 细胞在0.01~0.6ug/ml 的 DON 和大鼠肝 Sq 共同作用下,细胞染色体畸变率随 DON 剂量增加而升高,呈高度相关关系($r=0.994, p<0.005$),0.1、0.2、0.6ug/ml DON 的染色体畸变率分别为24%,28%,83%,与阴性对照组(畸变率8%)比较,差异有显著性, $p<0.05$ 及0.005。但未加 Sq 的 DON 各组对 CHL 细胞则未见明显的致染色体畸变作用($p>0.05$)。这个结果表明, DON 经肝 Sq 代谢活化后,对哺乳类动物染色体的遗传毒性增加,表明 DON 可能有潜在的致突变作用。王加生曾报道^[1], Ames 试验中,经肝 Sq 活化后, DON 的致突变性增加,与本文的结果相似。试验用 MNNG 和 AFB₁+Sq 处理的 CHL 细胞染色体畸变率均升高,差异为非常显著($p<0.01$)。

姐妹染色单体互换试验,是检验与 DNA 断裂和重接有关的化学物毒性。本实验中,0.

05~1ug/ml 的 DON 不增加 CHL 细胞的姐妹染色单体互换频率。经 MNNG 处理后, CHL 细胞的姐妹染色单体互换频率明显升高,达39.38%。见表2。

DON 的细胞毒性测定结果表明, DON 对 CHL 细胞的细胞毒性随 DON 的剂量增加而加大, DON 的50%细胞致死浓度为0.1ug/ml,当增至10ug/ml,可使全部 CHL 细胞死亡。本实验 DON 的细胞毒性的测定结果与国外报道的 DON 对中国仓鼠 V79 细胞,大鼠原代肝细胞的细胞毒性结果相近。DON 的细胞毒性可因 DON 对细胞内的 DNA,蛋白质合成代谢有显示著的抑制作用,及对膜的损伤作用有关^[5]。表2中,低剂量 DON 时,细胞多处于第3周期,而高剂量组则出现第1周期细胞增多,显示了 DON 明显延长细胞的分裂周期可能因 DON 有某种抑制细胞有丝分裂毒性。其机理仍待研究。

表2 DON 对 CHL 细胞 SCE 的作用

DON (ug/ml)	SCE 频率	总计数(每个剂量50个细胞)	
		第1周期分裂相数	第3周期分裂相数
1.0			
0.4	12.98	48	2
0.2	13.04	12	38
0.1	10.72	6	44
0.05	12.51	2	48
0	11.89	1	49
MNNG	39.38		

当 DON 的剂量较高时,CHL 细胞的分裂相明显减少,且出现染色体膨胀,染色后表现疏松,边缘不清晰,以至无法观察染色体畸变,及姐妹染色单体互换情况,这可能是 DON 对 CHL 细胞的细胞毒作用的表现之一。

致谢:本试验工作承中国医学科学院肿

瘤研究所细胞生物室李申德教授、许德新同志的大力协作,在此表示感谢。

参 考 文 献

- [1]. 王加生,等·赤霉病麦中毒研究 IV:赤霉病麦粗毒素的致畸与致突变研究·真菌学报 1986,5(1):58.
- [2]. Rogers CG, et al·Cytotoxicity and Absence of Mu-