细胞周期阻断法微核试验的建立与应用

冯继农 高 芑 卫生部食品卫生监督检验所 (100021)

摘要 建立中国仓鼠肺 (CHL) 细胞周期阻断微核试验, 并利用此方法对“富菇锗营养粉”的抗突变作用进行了初步探讨。结果显示, 细胞松弛素 B 可使 CHL 细胞形成双核, 从而在形态学上区分了已分裂和未分裂细胞, 丝裂霉素 C (MMC) 能明显诱导 CHL 细胞微核产生。剂量 $< 500\mu\text{g/ml}$ 的“富菇锗营养粉”可抑制 MMC 诱发的微核率增高 ($P < 0.05$)。此方法适用于检测食品的抗突变作用。

在众多的检测致癌物和致突变物的方法中, 微核试验以其简单、快速、可靠而被广泛应用。目前已发展了多种实验技术, 包括哺乳动物和人的外周血淋巴细胞微核、骨髓细胞微核及培养的细胞系细胞微核。1985年 Fenech 建立了人淋巴细胞周期阻断法微核试验^[1], 由于此法方便、可靠地在形态学上区分了已分裂和未分裂的淋巴细胞, 是微核研究的一项突破性进展。本研究建立了中国仓鼠肺 (CHL) 细胞周期阻断法微核试验, 并利用此方法对“富菇锗营养粉”抗突变作用进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 材料

CHL 材料细胞由中国预防医学科学院环监所提供。

细胞松弛素 B (cyt B), 丝裂霉素 C (MMC), MEM 培养基, 谷氨酰胺试剂均购自 Sigma 公司, 小牛血清为本室自制。

“富菇锗营养粉”由商业部谷物油脂化学研究所提供。

1.2 CHL 细胞用 MEM 补以 10% 小牛血清常规培养。每皿接种 6×10^5 细胞, 37°C 、5% CO_2 培养 24 小时后加入受试物及 cyt B, cyt

B 终浓度为 $3\mu\text{g/ml}$, 继续培养 24 小时, 弃去培养液, 消化细胞, 用 0.075N KCl 低渗 3 分钟, 甲醇:冰乙酸为 3:1 的固定液固定两次, 常规制片, 1:10 Giemsa 染色, 计数每 1000 个双核细胞中有微核的细胞数^[2, 3]。

微核的形态标准为, 微核染色与主核相同并与主核分离, 体积小于主核的五分之一, 排除其它细胞染色颗粒及核碎片。

$$\text{抑制率} = \frac{\text{阳性组微核率} - \text{实验组微核率}}{\text{阳性组微核率} - \text{阴性组微核率}} \times 100\%$$

2 结果

本试验阴性对照重复两次, 平均微核率为 7%; “富菇锗营养粉”本身的微核形成与阴性组无显著性差异; 试验一各组加 MMC $0.6\mu\text{g/ml}$, 试验二各组加 MMC $0.4\mu\text{g/ml}$ 。由表可见, MMC 可诱导 CHL 细胞微核产生; 两次试验均显示, 剂量 $> 500\mu\text{g/ml}$ 的“富菇锗营养粉”可明显抑制 MMC 诱导的 CHL 细胞微核产生, $P < 0.05$ 。

3 讨论

本试验系统中, MMC 作为阳性剂诱导 CHL 细胞产生微核, 其作用是稳定的, 且重复性好。根据我们多次试验的结果, cyt B 终

浓度为 3ug/ml 为宜,这与文献报道的是一致的^[4]。此浓度下双核细胞百分比达最高, cyt B 本身不增高 CHL 细胞的自发微核率。利用此试验研究“富菇锗营养粉”的抗突变作用,结果表明,该营养粉可以抑制 MMC 诱导的 CHL 细胞微核产生,并存在着剂量—反应关系,显示其具有一定的抗突变作用,值得进一步深入探讨。

“富菇锗营养粉”对 MMC 诱导的 CHL 细胞微核性能的影响

组别	剂量 (ug/ml)	微核率 (%)	抑制率 (%)
阳性	0	110	—
试 1	10	96	13.6
验 2	100	101	8.7
— 3	500	74*	35.0
4	1000	45*	63.1
阳性	0	77	—
试 1	100	76	1.4
验 2	500	55*	31.4
二 3	1000	31*	65.7
4	5000	13*	91.4

注: * 与阳性组相比, $P < 0.05$

由于微核只在分裂的细胞中才能产生,而传统的微核试验无法区分未分裂和已分裂细胞,所以其敏感性较低,本试验所建方法的特点是采用了非特异性细胞周期阻断剂—细胞松弛素 B,它的作用与秋水仙素相似,所不同的是细胞松弛素 B 只选择性破坏细胞骨

架,阻滞微丝组成的缢缩环的形成,使胞浆不分裂,但不影响核的分裂过程,结果使增殖的细胞形成双核及多核细胞,未分裂的细胞仍为单个核细胞,故可以明确、有效地区分已分裂和未分裂的细胞^[5]。试验中只计数处于分裂周期的双核细胞,计数 1000 个双核细胞相当于传统方法约 2000 个。

该方法的主要优点是简便、快速、判断终点明确,易于推广。不仅适用于检测环境中有害物质,也非常适用于检测食品的抗突变作用。

参 考 文 献

[1] Fenech M, et al. • Measurement of micronuclei in human lymphocyte. *Mutation Res.* 1985, 147:29—36.

[2] Wakata A, et al. • Measurement of micronuclei by cytokinesis—block method in cultured Chinese hamster cells: comparison with types and rates of chromosome aberrations. • *Mutation Res.* 1987;190:51—57.

[3] 冯继农 等 • EGCG 抑制苯并(a)芘诱导大鼠上皮细胞转化的研究 • 癌变、畸变、突变 1992,4(1):5—7。

[4] Krishna G, et al. • Use of the cytokinesis—block method for the analysis of micronuclei in V₇₉ Chinese hamster lung cells, results with mitomycin C and cyclophosphamid. • *Mutation Res.* 1989;212:63—69.

[5] Carter SB, et al. • Effects of cytochalasin on mammalian cells. • *Nature* 1976;213:261—264.

(上接 64 页)

潘丽梅	镉粒还原法快速测定奶粉中硝酸盐	4	(2)	57
熊习娅等	内江市食品卫生行政处罚文书中的问题分析与建议	4	(4)	27
魏润蕴等	猪组织中赭曲霉毒素 A 的薄层色谱测定方法	2	(2)	21
魏云早等	产气荚膜梭菌污染街头食品情况的调查报告	2	(4)	50
魏美华等	J+H 耶氏菌噬菌体在小肠结肠炎耶尔森氏菌检测中的应用	3	(3)	24
魏桂兰等	贵州主粮霉菌污染调查及其限量指标的探讨	4	(4)	14