

复合物的缘故。这种复合物与 DNA 分子相互作用,导致 DNA 结构的损伤。

亚硒酸钠对甲基汞诱发人淋巴细胞姊妹染色单体交换具有保护作用,其机理也不十分明瞭。Morimoto 认为甲基汞与亚硒酸钠在培养体系中形成 $(\text{CH}_3\text{Hg})_2\text{Se}$ 复合物,该复合物是拮抗甲基汞和亚硒酸钠诱变作用的关键。

参 考 文 献

[1] 李志超,环境科学,6(6),20(1985)。

- [2] Ohi, G. et al., *Environ. Res.*, **12**(1), 49(1976).
- [3] Verschaeve, L. et al., *Environ. Res.*, **12**(3), 306 (1976).
- [4] Popescu, H. J. et al., *Arch. Environ. Health.*, **34** (1), 461(1979).
- [5] Skerfving, S. et al., *Environ. Res.*, **7**(1), 83(1974).
- [6] Morimoto, K. et al., *Mut. Res.*, **102**(2), 183(1982).
- [7] Brubaker, P. E. et al., *Exp. Molec. Pathol.*, **18**, 263(1973).
- [8] Nakamuro, K. et al., *Mut. Res.*, **40**(2), 177(1976).
- [9] Whiting, R. E. et al., *Mut. Res.*, **78**(2), 159(1980).
- [10] Ray, J. H. et al., *Mut. Res.*, **54**(3), 343(1978).

碳酸铊的致突变性研究

张 冬 生

(中国预防医学科学院环境卫生与卫生工程研究所)

铊及其化合物是一种高毒、蓄积性毒物,由于铊污染和使用不当等已引起了人中毒和死亡事故。我国贵州省某地曾由于铊对环境的污染发生了近二百人的慢性中毒。火电厂和铅、锌等冶炼厂的排放,是环境中铊污染的最重要来源。近年来,人们发现铊的化合物能引起鸡胚畸形和哺乳动物细胞 DNA 单链断裂,因而对长期接触环境中低剂量铊对人体健康的危害和可能的致癌性已引起国内外有关部门的关注。

本文报道了用四种短测方法对碳酸铊的致突变性进行研究的结果。

一、材料和方法

1. 化学药品

碳酸铊 (Tl_2CO_3 , 分析纯),北京化工厂产品,易溶于水。丝裂霉素(MMC,注射剂),日本产品。甲基磺酸乙酯(EMS,化学纯),北京化工厂产品。

2. 枯草杆菌重组修复试验——孢子法

枯草杆菌 $\text{H}_3^+(\text{R}_c^+)$ 重组修复阳性菌和 $\text{M}_6^-(\text{R}_c^-)$ 重组修复阴性菌由沈阳劳动卫生职业病研究所王玉芝提供。按文献[1]方法进行。先制备 H_3^+ 和 M_6^- 芽孢混悬液(浓度均调整到 $5 \times 10^7/\text{ml}$),各取 0.1ml 分别加到 12 ml, 45℃ 营养琼脂(沈阳产品)中混匀后,倒入平皿。待固化后,将浸有 $20\mu\text{l}$ 不同浓度化学物的滤纸片(直径 8mm)置其上,37℃ 培养 20h,测量抑菌圈半径,结果按 Suter^[2] 的标准判断,即两种芽孢的抑制长度之差 $\geq 6\text{mm}$ 为++, < 6 和 $\geq 3\text{mm}$ 为+, < 3 和 $\geq 2\text{mm}$ 为±, $< 2\text{mm}$ 为一。

3. 中国地鼠卵巢细胞 (CHO) 姊妹染色单体交换 (SCE) 和染色体畸变 (CA) 试验

CHO 细胞由中国预防医科院环境卫生监测所秦钰慧提供。基本按文献[3]方法进行。将 1×10^6 细胞接种于含 10% 胎牛血清(天津产品)的最低基础培养液 (MEM) 中,培养 24h 后,换以含 5-溴脱氧尿苷 (BrdU,

终浓度为 $20 \mu\text{mol}$) 和 2.5% 胎牛血清的 MEM, 同时加入一定浓度的碳酸铈溶液, 在黑暗的环境下反应 24h. 去除受试物, 用 Hank's 液洗三次, 加入含 Brdu ($20 \mu\text{mol}$) 和 10% 胎牛血清的 MEM, 继续培养 9h, 收获细胞; 与收获细胞前 4h 加入秋水仙素(终浓度为 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$, 细胞按常规固定、制片、作染色体分析的标本可直接用 Giemsa 染液染色, 计算 100 个细胞的 CA 发生率. 检测 SCE 频率的标本经分化染色后, 计算 50 个细胞的 SCE, 求其平均值.

4. 中国地鼠肺成纤维细胞 (V_{79}) 次黄嘌呤鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 基因正向突变试验:

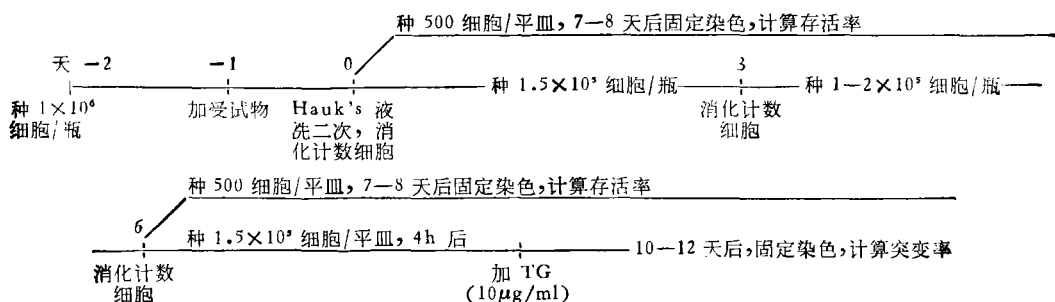


图 1 Ti_2CO_3 诱发 V_{79} 细胞 TG^+ 突变实验程序

二、实验结果

1. 不同浓度的 Ti_2CO_3 对两种芽孢的抑菌差值见表 1. 结果说明 Ti_2CO_3 对两菌的抑制效应不同. Ti_2CO_3 的这种诱变活性, 随着剂量增大而增加, 即对两菌的抑制效应的差别增大, 当剂量为 $200 \mu\text{g}/\text{片}$ 时, Ti_2CO_3 的诱变活性最大.

2. 将 Ti_2CO_3 诱发 CHO 细胞的 SCE 和 CA 的实验结果列于表 2—3. 结果表明, Ti_2CO_3 能诱发 CHO 细胞的 SCE 和 CA 增加, 并且均表现出一定的剂量反应关系. 当剂量为 $10 \mu\text{g}/\text{ml}$, SCE 明显增加 ($p < 0.05$); $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, SCE 的发生率最高, 为 9.06 SCE/细胞, 与对照样品比较, $p < 0.01$. 在同样条件下, 仅当剂量为 $20 \mu\text{g}/\text{ml}$ 时, 才能

V_{79} 细胞由中国医学科学院肿瘤研究所程书钧提供. 细胞常规培养于含 $20 \mu\text{mol}$ HEPES 缓冲液的 MEM 中, 补充 10% 胎牛血清 (GIBCO). 实验按文献 [4—5] 方法进行 (如图 1 所示). 化学物反应期间, 用 2.5% 胎牛血清的 MEM 培养细胞. 在表达时间 [指 Ti_2CO_3 反应后至加 6-硫代鸟嘌呤 (6-TG) 的时间差距] 为 6 天时, 每个剂量接种总数为 1.2×10^5 细胞 (1.5×10^5 细胞/平皿), 用于突变率测定, 同时接种 500 细胞/平皿, 计算细胞存活率. 突变率按实际存活细胞数计算. 实验中, 再接种细胞前细胞密度控制在 8×10^4 细胞/ cm^2 以下, 选择时细胞密度约为 5×10^3 细胞/ cm^2 .

表 1 Ti_2CO_3 的芽孢重组实验结果

化学物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{片}$)	抑菌圈半径 (mm) ¹⁾		差值	活性
		H_2O_2	M_2O_3		
蒸馏水	200	0	0	0	—
MMC (阳性对照)	0.02	1.1	7.9	6.8	++
	0.20	4.5	13.5	9.0	++
	1.00	11.7	19.1	7.4	++
Ti_2CO_3	25	1.4	2.9	1.5	—
	50	5.5	11.0	4.5	+
	100	12.8	17.1	4.3	+
	200	13.6	19.6	6.0	++
	300	14.6	19.0	4.4	+

1) 三次实验结果均值

引起 CA 具有统计学意义的明显增加. 随着

* 指培养瓶或平皿底面积

表 2 不同剂量的 Tl_2CO_3 诱发 CHO 细胞的 SCE 发生率

化学物	剂 量 ($\mu\text{g/ml}$)	SCE/细胞 (均数 $\pm$ 标准误)
蒸馏水	0	7.26 ± 2.72
Tl_2CO_3	5	7.83 ± 2.99
	10	$8.67 \pm 3.31^*$
	15	$8.51 \pm 3.12^*$
	20	$9.06 \pm 2.92^*$
	80 Δ	毒性
EMS	10	$13.88 \pm 4.01^*$

 Δ 为一次实验结果,余为三次实验结果均值* 经 t -检验,差异显著表 3 Tl_2CO_3 诱发 CHO 细胞 CA 剂量反应关系

化学物	剂 量 ($\mu\text{g/ml}$)	畸变率 (%)	P 值**
蒸馏水	0	8.0	
Tl_2CO_3	5	11.0	>0.05
	10	15.0	>0.05
	15	17.0	>0.05
	20	19.3	<0.05
	40*	21.0	<0.01
	80*	25.0	<0.01
EMS	10	20.7	<0.05

* 为一次实验结果,余为二次实验结果均值

** χ^2 检验表 4 不同剂量的 Tl_2CO_3 诱发 V_79 细胞的 TG^+ 突变率

化学物	剂 量 ($\mu\text{g/ml}$)	突变细胞数/ 10^6 存活细胞
蒸馏水	0	1.8
Tl_2CO_3	5	34.3*
	20	69.4*
	80	121.4*
EMS	60	415.8*

* 泊松分布检验方法, $p < 0.01$; 以上为二次实验结果均值

剂量的增加, CA 发生率有继续增高趋势。

3. Tl_2CO_3 诱发 V_79 细胞 HGPRT 基因正向突变的结果见表 4。从表中可以看出, Tl_2CO_3 能诱发 V_79 细胞 HGPRT 基因正向

突变,产生对 TG 有耐受性的 (TG^+) 突变体, Tl_2CO_3 的这种诱变效应呈现出较好的剂量反应关系。剂量为 $5 \mu\text{g/ml}$ 时,诱变率逐渐增大,最高达到 121.4 突变细胞/ 10^6 存活细胞。

三、讨论与小结

Bowen 指出^[6], 铊象其它金属一样污染潜力很大。铊是环境中有害的污染物。环境中铊主要以可溶性化合物如氧化亚铊和硫化亚铊等形式存在,因此,我们选用溶解性较高的 Tl_2CO_3 为代表来研究铊的致突变性,这与铊在环境中存在的特点是一致的;也是十分必要的

研究表明,金属化合物的致突变性和致癌性之间有正相关。现在多依据某种化学物的致突变性来判断是否具有潜在的致癌性。Brusick 指出^[7],引起遗传损伤的机制有多种,没有任何单一的试验系统能测定所有可能的机制。另外,由于可能出现“假阳性”或“假阴性”结果,因而单一试验中得到的致突变效应不足以说明某一化学物为遗传毒性物质。依据选用实验系统的基本原则,我们用上述四种方法对 Tl_2CO_3 的致突变性进行了研究。

枯草杆菌重组修复试验测定的是以细菌死亡或生长抑制表现出来的 DNA 损伤,从而提示受试物可能是一种致突变物;它是检测金属致突变物的最敏感方法之一。 Tl_2CO_3 对重组修复阳性菌(H_1^+)和重组修复阴性菌(M_1^-)的抑制效应有明显差异,并呈现出一定的剂量反应关系,说明 Tl_2CO_3 是一种 DNA 损伤剂,可能是一种致突变物。

SCE 和 CA 是致突变物作用的两种细胞遗传学后果。Koller 认为^[8],断裂是肿瘤细胞染色体最常见的一种异常。现已证明能引起 CA 的许多化学物如镉、铬等可引起肿瘤。因此,CA 这种损伤可能是大多数致癌作用的一种普遍机理。 Tl_2CO_3 能直接诱发

CHO 细胞 CA 率增高,并表现出一定的剂量反应关系,提示该物质有致癌的可能性。尽管 SCE 形成的分子机理和生物学后果尚不清楚,但由于 SCE 与 CA 之间关系密切,并与基因突变间似乎有相关。因而, SCE 的测定可以从另一方面反映化学物对遗传物质的部分作用。Ti₂CO₃ 能诱发 CHO 细胞 SCE 明显增高并呈现出剂量反应效应,说明 Ti₂CO₃ 对细胞中的 DNA 有损伤作用,它提示 Ti₂CO₃ 很可能是一种致突变致癌物^[9]。从我们的结果还可以看出, Ti₂CO₃ 诱发 CHO 细胞 SCE 的敏感性比 CA 高,两者之间表现出良好的一致性。

癌变的多数假设认为正常细胞的癌变需要经过突变的过程。现已证明,大多数致癌物是致突变物。在 V₇₉ 细胞突变试验系统中, Ti₂CO₃ 诱发的 V₇₉ 细胞 TG' 突变体明显高于对照组并表现出良好的剂量反应关系。这提示 Ti₂CO₃ 能使 HGPRT 基因发生突变,是一种直接致突变物。Bradley 等认为^[10], V₇₉ 细胞中 DNA 的基本成份和修复作用可以认为类似于人,因此,化学物在 V₇₉ 细胞中与 DNA 相互作用的致突过程,在人的细胞中也应是相似的,即从 V₇₉ 细胞得到的结果很可能适应于人体,对于长期接触环境中低剂量的铊引起人体肿瘤的可能性,值得重视。

我们的结果与其他作者的报道基本一致。Zasukhina 报道, Ti₂CO₃ 能诱发大鼠、小鼠成纤维细胞 DNA 单链断裂,大鼠显性致死试验结果阳性。铊的化合物还能引起鸡胚畸形。

已知金属阳离子能与蛋白质的配基和嘌呤碱基以及磷酸阴离子结合,很可能金属阳离子与碱基的结合使一种未知的核酸酶对碱基的去除或链的切断作用更敏感,结果在修

复过程中导致突变。实验资料提示铊在细胞核中的含量明显高于其它亚细胞成份(除胞浆外),铊对细胞内大分子的配基亲和力大。这说明铊能在核内达到较高浓度并能与 DNA 相互作用,但究竟铊是通过何种机制引起 DNA 损伤、SCE、CA 和基因突变尚待进一步研究。在我们的试验系统中, Ti₂CO₃ 均表现出一定的致突变性,因而提示 Ti₂CO₃ 可能是一种遗传毒性致癌物,这一结果在国内尚属首次报道,它可为制定铊在环境中的卫生标准提供科学依据。

致谢:本工作在中国预防医科院环境卫生监测所王子石和秦钰慧两位导师指导下完成,论文得到了两位导师的审阅;本工作还得到了中国医学科学院肿瘤研究所程书钧、沈阳市劳动卫生职业病研究所毒理室王玉芝等、中国预防医学科学院卫生统计研究室田风调和环监所郭润荣等各位老师的指导和帮助,在此一并致谢。

参 考 文 献

- [1] Hirano, K. et al., *Mutation Research*, **97**, 339 (1982).
- [2] Suter, W. et al., *Mutation Research*, **97**, 1(1982).
- [3] 秦钰慧等, 卫生研究, **13**(6), 14(1984).
- [4] Cheng, S. J. et al., *Carcinogenesis*, **1**, 685(1980).
- [5] Abbondandolo, A. et al., *Mutation Research*, **37**, 293(1976).
- [6] Bowen, H. J. M., *Trace Elements in Biochemistry*, Academic Press, London, 1966.
- [7] Brusick, D., *Principles and Methods of Toxicology*, p. 223, Edited by A. Wallace Hayes, Raven Press NY, 1982.
- [8] Koller, P. C., *The Role of Chromosomes in Cancer Biology*, p. 122, Springer Berlin Heidelberg, NY, 1972.
- [9] Latt, S. A. et al., *Mutation Research*, **87**, 17(1981).
- [10] Bradley, M. O. et al., *Mutation Research*, **87**, 81 (1981).