

辐照中国白兰地酒对人体外周血姐妹染色单体交换率的影响

黄 权 光 史 纪 兰

(山东省医学科学研究所工业卫生研究室)

姐妹染色单体交换 (SCE) 是检查致癌物或突变物的一种方法, 此法灵敏、准确并且比较简便、快速。在突变和癌变研究方面, 某些作用于 DNA 的诱变剂或致癌剂可在极低的、不能或很少产生染色体畸变的浓度下诱发大量的 SCE。因此, 目前已把 SCE 列为测突变物——致癌物的常规指标之一。

国内外的研究表明, 利用 γ -线照射可提高酒质并加速其陈化^[8,9]。白兰地酒制作后需贮藏 2—3 年方可销售, 为缩短陈化时间, 提高酒质, 加速周转率, 扩大经济来源, 我们经多年的研究, 认为用 ^{60}Co - γ 线辐照 10 万伦 (剂量率 2 伦/分) 的白兰地酒, 味美、醇和、杂味少、不刺口辣喉。当年新酒经照射后比贮藏 2 年的酒还好, 经酒质分析, 照射与不照射的酒无明显差异。但经辐照的酒人食用后是否有害, 尤其能否产生致癌、致突变物质, 这是人们所关注的问题。迄今亦未见到这方面的报道。为此, 我们选用 SCE 做为检测辐照酒对体细胞的诱变性的一个指标。

材 料 与 方 法

一、取材与细胞培养 采健康人静脉血, 肝素抗凝, 每瓶培养液内含有 RPMI1640 培养基 4 毫升, 小牛血清 1 毫升、植物血球凝集素 (PHA) 500 微克 (广东省医药工业公司研究所), 肝素 0.1 毫升 (500 国际单位/毫升), pH 调至 7.2。接种全血 0.3 毫升。置 37℃ 温箱内避光培养 72 小时。培养至 24 小时, 加入 BudR (Sigma), 使最终浓度为 5 微克/毫升。同时加入受检物。培养终止前 5—6 小时加入秋水仙

素, 其最终浓度为 0.07 微克/毫升。

各受检物分组:

1. 空白对照 (不加受检物)
2. 辐照白兰地酒 0.005 毫升/毫升, 0.01 毫升/毫升, 0.02 毫升/毫升。
3. 未辐照白兰地酒 0.005 毫升/毫升, 0.01 毫升/毫升, 0.02 毫升/毫升。
4. 42% 酒精 0.005 毫升/毫升, 0.02 毫升/毫升。
5. 0.015% H_2O_2 0.02 毫升/毫升。
6. 丝裂霉素 C (阳性对照): 0.05 微克/毫升, 0.01 微克/毫升。

以上每个样本培养两瓶, 每瓶含 5 毫升培养液。

终止培养后, 按常规空气干燥法制片。

二、姐妹染色单体差别染色法 将室温保存 3—10 天的染色体标本依次浸入 0.14M 氯化钠, 0.004M 氯化钾和 0.01M 磷酸盐缓冲液 (pH7.0) 中各 5 分钟, 浸入用磷酸缓冲液配制的 1 微克/毫升的 33258-Hoechst 荧光染料中 15—20 分钟, 用上述 0.01M 磷酸盐缓冲液洗 2 次, 每次 5 分钟, 用 $2 \times \text{SSC}$ 溶液 (0.3M 氯化钠, 0.03M 枸橼酸钠, pH7.0) 加盖玻片封片, 将标本平放在恒温水浴箱的铝板上, 水浴事先预热, 铝板表面温度恒定在 50℃。同时, 用 2 支并列的 (220V) 20W 黑光灯照射标本 30—40 分钟, (不时地加入缓冲液, 以保持片子的润湿) 灯管距铝板约 2.5 厘米, 将标本放入双蒸水中, 使盖玻片与玻片脱离, 小心取出玻片, 再用双蒸水洗 5 分钟。用 2.5% Giemsa 染 10 分钟。冲洗待干。

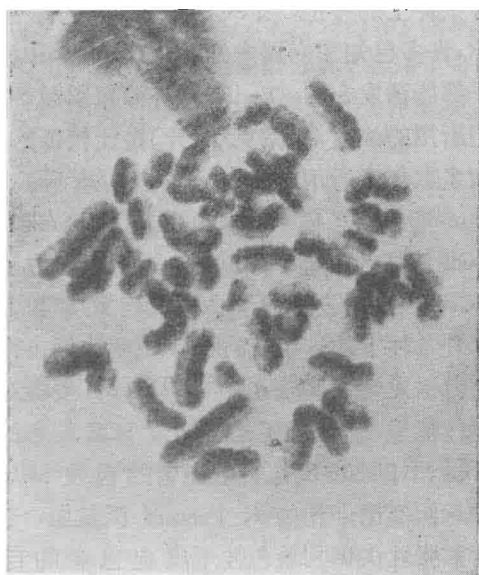


图 1 正常对照 SCE

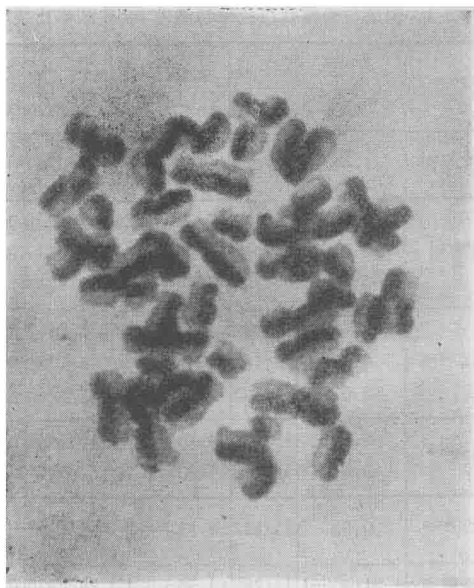


图 3 未辐照白兰地酒 (0.02ml/ml) 诱发的 SCE

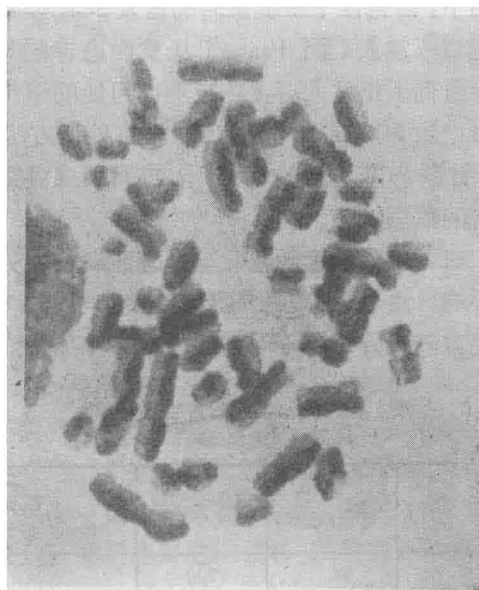


图 2 辐照白兰地酒 (0.02ml/ml) 诱发的 SCE

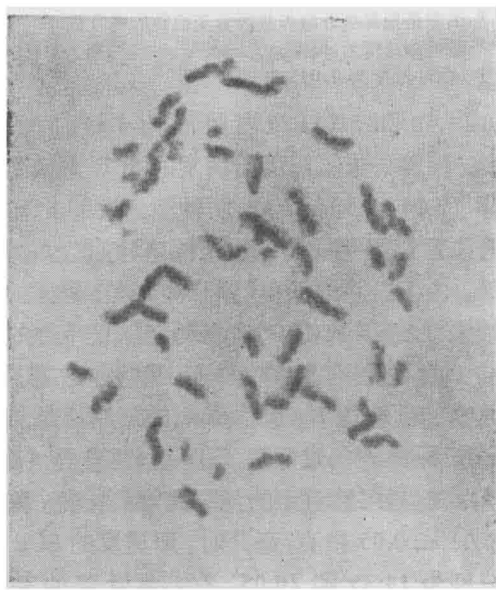


图 4 丝裂霉素 C (0.01µg/ml) 诱发的 SCE

三、SCE 的计数 选择细胞轮廓完整，染色体数目 $2n = 46$ ，复制两个细胞周期的细胞观察计数。凡在染色单体端部出现的互换，计为一个 SCE，在染色单体中间出现的互换，计为两个 SCE。SCE 计数在一般情况下都是十分明确的，只是十分接近着丝点区的交换有可能与着丝点处的染色体扭转相混淆，应注意鉴别。正常对照计数 50 个中期分裂相，受检物每份标本计数 20—50 个中期分裂相。

结果与讨论

一、辐照酒与未辐照酒诱发 SCE 频率比较 辐照酒与未辐照酒的三种实验浓度相当于乙醇在血中的浓度分别为 3.04%、6.21%、12.15% (克/100 毫升)。据报道^[10]：人体血中乙醇浓度达 400—500 毫克/100 毫升时即达到深度麻醉，可致死亡。就上述实验浓度诱发的 SCE 频率结果见表 1。从表 1 可见，辐照酒为

表 1 辐照与未辐照白兰地酒诱发 SCE 频率比较

受检物名称	浓度* (毫升/毫升)	细胞数 SCE 数	SCE/细胞 (M±s. e)	SCE/染色 体数	SCE/ 每条 染色体
正常对照	—	51/235	4.70±0.25	235/2289	0.102
辐照酒	0.005	20/104	5.20±0.30	104/920	0.113
	0.01	20/98	4.90±0.30	98/919	0.107
	0.02	20/108	5.40±0.54	108/920	0.117
未辐照酒	0.005	50/242	4.84±0.16	242/2300	0.105
	0.01	30/163	5.43±0.40	163/1380	0.118
	0.02	20/102	5.10±0.24	102/920	0.110
酒精**	0.005	30/138	4.60±0.31	138/1380	0.10
	0.02	35/182	5.20±0.21	182/1610	0.113
H ₂ O ₂ ***	0.02	43/193	4.83±0.26	193/1840	0.104
丝裂霉素 (阳性对照)	0.01μg/ml	20/287	14.35±0.17	287/920	0.312
	0.05μg/ml	20/401	20.05±0.12	401/920	0.436

* 浓度是指每毫升培养基所含受检物的毫升数。

** 酒精的浓度为 40%。

*** H₂O₂ 浓度为 0.015%。

5.20、4.90 和 5.40，未辐照酒为 4.84、5.43 和 5.10。辐照与未辐照酒所诱发的 SCE 无显著性差异 ($p > 0.05$)。同样，两种酒诱发的 SCE 频率与正常对照之间亦无显著性差异 ($p > 0.05$)。另外，由于白兰地酒含乙醇 42%，在辐照加工时加入 1.5‰ 的 H₂O₂。又为了验证单纯的酒精与 H₂O₂ 是否有致突变作用，我们亦选用了不同浓度的酒精与 H₂O₂ 对 SCE 的影响，结果诱发 SCE 频率均与对照组无显著性差异 ($p > 0.05$)。但与阳性对照的丝裂霉素 C 比较，浓度为 0.01 和 0.05 微克/毫升时，所诱发的 SCE 频率分别为 14.35 和 20.05，有非常显著的差异 ($p < 0.01$)。据报道^[7]：酒精在体外培养条件下，不导致 SCE 增加，用来作为阴性对照。我们的实验结果表明，辐照与未辐照白兰地酒、酒精和 H₂O₂ 仅就上述实验浓度条件下未发现致体细胞突变的物质。

二、自发 SCE 频率 我们得到的自发 SCE 为 4.70 ± 0.25 ，与 Slomon 和 Bobrow 的 5.1 相接近^[2]，稍高于邓承宗报道的 4.24 ± 2.05 ，低于吴旻、王秀琴的 5.74 ± 0.42 ^[2] 及多数作者的自 6.9—27.3 不等。结果不一的原因可能有(1)

培养条件上的差别，因 SCE 是一种十分敏感的指标，许多已知和尚属未知的物理、化学和生物因子都能诱发 SCE。BudR 本身即可引起 SCE，我们所用的浓度 (5 微克/毫升) 是比较低的，低于大多数作者所用的 10—20 微克/毫升，Dutrillaux 等使用了每毫升 200 微克的 BudR，得到 SCE 值亦为最高 (27.3)^[3]。近来又建立了体内 SCE 的检查技术，发现体内的自发 SCE 数不仅体外条件下的一半，进一步说明体外条件下存在着诱发 SCE 的某些因素^[4]。(2) 受检对象的遗传背景不一，亦可造成自发 SCE 频率的差别，例如 Bloom 氏综合症患者的自发 SCE 较正常对照高出十几倍^[5]，Fanconi 氏贫血，毛细血管扩张性失调和着色性干皮症患者的自发 SCE 与正常人无异^[6]，但在某些诱变剂和致癌剂作用下，着色性干皮症患者的自发 SCE 频率大大超过正常人，而 Fanconi 氏贫血患者的 SCE 却显著低于正常人。上述数例已可说明遗传背景对产生 SCE 的影响。(3) 标本处理方法不一，计数 SCE 的标准不统一，亦可造成各实验室之间数据的差别。

三、不同浓度酒辐照与未辐照对细胞分裂的影响 由表 2 可知，辐照与未辐照酒的三种浓度对细胞分裂有不同程度的抑制作用，细胞

表 2 辐照与未辐照白兰地酒的不同浓度对细胞分裂的影响

名 称	浓 度 (毫升/毫升)	观察细胞数 (个)	分裂指数 (分裂相/ 100 细胞)
辐 照 酒	0	200	9
	0.10	200	5
	0.02	200	3
	0.06	200	1.5
未辐照酒	0	200	6
	0.01	200	4
	0.02	200	2
	0.06	200	0

分裂随着酒的浓度的增加而显著减少。当每毫升培养基中含酒量增加至 0.06 毫升时，细胞受到严重抑制，甚至看不到分裂相，因此，我们在实验中酒量浓度的选择主要根据对细胞分裂的

影响而定,酒量太大,难以获得分裂相,酒量太小则不致于影响 SCE 频率。因此,选择了含酒 0.005—0.02 毫升/每毫升培养基作为本实验浓度。

本文的实验设计得到中国医科院肿瘤研究所的吴旻,王秀琴两位大夫的亲自指导,并提供本实验的必需药品。本文 SCE 照片蒙山东中医药研究所赵东坡和山东医科所李仁被两位大夫拍照,特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Solomon, E. et al.: *Mutation Res.*, **30**, 273, 1975.
[2] 吴旻、王秀琴:《实验生物学报》,1979 年,第 12 卷,第

1 期,第 31 页。

- [3] Dutrillaux, B. et al.: *Chromosoma*, **48**, 327, 1974.
[4] Latt, S. A. et al.: *Handbook of Mutagenicity test Procedures*, Elsevier/North-Holland Biomedical Press, 275, 1977.
[5] Chaganti, R. S. K., *Proc. Nat. Acad., Sci. (U.S.)*, **71**, 4508, 1974.
[6] Galloway, S. M. et al.: *Cell Genet.*, **15**, 17, 1975.
[7] Niehls, A. H. et al.: *Mut. Res. Sect. Genet. Toxicol. Testing*, **67**(2) 167, 1979.
[8] 单耀忠译:《国外食品科技》1980 年,第 7 期,第 44 页。
[9] 四川泸州曲酒厂:《全国辐射保藏食品专业座谈会资料汇编》原子能出版社 1979 年,第 140 页。
[10] 上海第一医学院《实用内科学》编写组编:《实用内科学》人民卫生出版社,1973 年,第 449 页。

[本文于 1981 年 2 月 12 日收到]

人类肝癌细胞的质膜额外损伤与辐射引起 DNA 断链的重接修补*

陈去恶 周启玲

(中国科学院生物物理研究所)

放射生物学正在形成一个重要的概念,即各种细胞对射线的杀伤及诱变(包括癌变)的耐受性不同,主要是因为细胞正确地修补自身受损伤 DNA 的能力不同。因此设法保护与提高细胞修补 DNA 的能力,将有利于防护辐射对机体细胞的杀伤并减低细胞癌变的机率;设法抑制或消除癌细胞修补 DNA 的能力,将增强射线及药物对癌细胞的杀伤,以便提高疗效。如果能找出一种在 DNA 修补过程中起重要作用的结构或成份,有选择地加以保护或破坏,就有可能达到上述两种目的。

1971 年 Myers^[1] 报道,用 X 射线照射大肠杆菌 B/r,如果有辐射敏化剂碘乙酰胺或碘化钾存在,杆菌的质膜受到额外损伤,其修补 DNA 链断裂的能力几乎完全丧失;无敏化剂存在的对照组则能修补到接近于照前水平。表明此杆菌的 DNA 修补作用与质膜的机能有关。迄今还没有见到有关哺乳类细胞类似的实验报道。鉴于哺乳类细胞质膜在细胞的一系列生命

活动中起重要作用,因而探讨它与细胞 DNA 修补是否有关是很有意义的问题。

本研究的目的是探讨:1. 有辐射敏化剂碘化钾存在时照射人类细胞,质膜是否会受到额外损伤(辐射损伤以外,由敏化剂引起的损伤);2. 质膜受到额外损伤后,其修补辐射打断的 DNA 主链的能力是否会被消除或受抑制。

材 料 与 方 法

样品用 ^{60}Co γ 射线在室温 (25—27°C) 下照射,剂量率为 1,250rad/分。

1. 检测 KI 存在下照射人类细胞,质膜是否会受到额外损伤 正常成年男性外周红细胞,放在含有不同浓度 KI 的生理盐水中受 γ 射线照射,然后检查冷贮期间含 KI 组及对照组血红蛋白的漏出量;如含 KI 组血红蛋白漏出量增

* 《英汉原子能词典》(原子能出版社 1978 年北京第一版)第 723 页涉及“repair”的翻译有两处,可译为“修补”、“修复”等,这里取其前者。