

草鱼体内肾细胞姐妹染色单体分化 及交换的初步研究*

魏彦章 陆仁后

(中国科学院水生生物研究所, 武汉)

提 要

本文确立了一个以草鱼体内肾细胞姐妹染色单体交换频率为指标的检测环境诱变或致癌物质的短期试验系统。采用硫堇-UV-Giemsa 染色法, 分析了草鱼体内肾细胞的 SCD-2(注射 BrdU 后第二个细胞周期的中期分裂相的 SCD) 频率和 SCE 频率。用 500 微克/克体重 BrdU 体内标记 5 天, 草鱼肾细胞 SCD-2 频率为 $8.58 \pm 0.22\%$; SCE 频率为 3.05 ± 2.523 SCE_s/细胞。以丝裂霉素 C(Mitomycin C, MMC) 作为阳性对照, 分析了化合物亚硝基胍(N-methyl-N¹-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG) 和农药叶蝉散(Mipc) 诱发 SCE 的能力。这项工作在评价水质污染方面将起一定的作用。

姐妹染色单体交换 (sister chromatid exchange, SCE) 分析技术是七十年代迅速发展起来并被人们广泛接受的一种筛选化学诱变或致癌物质的短期试验方法。随着人们对环境污染特别是水质污染日趋严重这一问题的关注, 以鱼类细胞 SCE 频率变化为指标来检测水质的污染状况, 无疑将是一种有力的手段。已有人试图以鱼类肾细胞(体外培养)、淋巴细胞 SCE 为指标来做这方面的工作^[2,3,6]。但是上述方法都需要进行体外培养, 而且反映的只是离体细胞的情况, 不能完全取代体内 SCE 分析。另外这种方法要求条件也较高, 在野外不易进行。Kligerman 等首先将体内 SCE 分析技术应用到鱼类^[7]。Mohanty 等对 *Channa punctatus* 体内鳃细胞和肾细胞做了 SCE 分析^[9]。作者选用我国的主要经济鱼类草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 为实验鱼, 以其体内肾细胞 SCE 频率为指标, 做了一些这方面的工作, 旨在探求建立一个以鱼类作为检测和评价水质污染的体内试验系统。

材 料 和 方 法

材料鱼取自本所养鱼场, 为 10—50 克重的草鱼鱼种。取材后室内饲养至少三周。BrdU (5-Bromodeoxyuridine) 的体内标记和待测物处理参照 Kligerman 等的方法进行^[7,8]。将材料鱼称重后, 腹腔注射 10 微克/克体重植物血球凝集素 (PHA), 间隔 2 小时, 腹腔注射 500 微克/克体重 BrdU 生理盐水溶液。小桶饲养, 每桶 2 尾, 水温保持在

* 本文承蒙白国栋副研究员, 蒋一珪副研究员指导, 谨致谢忱。

1985 年 11 月 18 日收到。

18—20℃之间。注射 PHA 后 24 小时，分别腹腔注射不同浓度的待测物 (MMC, MNNG 和叶蝉散，均用生理盐水配制成溶液或悬浮液后注射)，对照组只注射相应量的生理盐水。继续饲养 4 天。收获细胞前 1.5 小时腹腔注射 1.8—2 微克/克体重秋水仙素溶液。杀鱼前 10 分钟断尾放血。届时，取出肾组织，按常规方法制成染色体标本。姐妹染色单体分化染色采用李康等建立的硫堇-UV-Giemsa 法进行^[3]。将分化染色后的标本用高倍镜检查，选择分散良好，染色体数目完整的中期分裂相，油镜下统计 SCD-2 频率和 SCE 频率。单交换记数一个 SCE，双交换记数 2 个 SCE，余此类推。

结 果

1. SCD-2 频率

500 微克/克体重 BrdU 体内标记 5 天，草鱼肾细胞 SCD-2 频率平均为 8.58%。加入诱变剂 MMC，浓度为 8×10^{-7} 和 8×10^{-6} 克/克体重时，对其 SCD-2 频率无显著影响 (表 1)。

表 1 草鱼体内肾细胞 SCD-2 频率

Tab. 1 SCD-2 rate of grass carp renal cells *in vivo*

MMC 浓度 克/克 Concentration g/g(W/W)	总细胞数 Total No. of cells	SCD-2			P
		细胞数 No. of cells	%	$\bar{X} \pm SD\%$	
对照 Control	251	21	8.37	8.58 ± 0.22	—
	222	19	8.56		
	261	23	8.81		
8×10^{-7}	271	20	7.38	7.38 ± 0.275	$> 0.5^*$
	253	18	7.11		
	209	16	7.66		
8×10^{-6}	196	16	8.16	8.66 ± 1.095	$> 0.5^*$
	242	24	9.92		
	177	14	7.91		

* 与对照比较 In comparison with the control.

2. SCE 频率

经过三次重复实验，将所得结果随机取样，每实验组任选 20 个显示姐妹染色单体分化的中期分裂相，统计分析 (表 2)。

由表 2 可以看出，草鱼体内肾细胞的 SCE 频率是 3.05 ± 2.523 SCE/细胞。这一频率是未加待测物的 SCE 频率，称为基线频率。从表中还可以看到，化合物 MMC 和 MNNG 随其施用剂量的增加，均能诱发草鱼体内肾细胞 SCE 频率极显著地增加 ($P < 0.001$)；而氨基甲酸酯农药叶蝉散在我们施用的浓度未能诱发草鱼体内肾细胞 SCE 频率的显著增加。(图版 I: 1—3)

表 2 基线及药物诱发草鱼体内肾细胞 SCE 频率

Tab 2 The baseline SCE frequency and induced SCE frequency in grass carp renal cells *in vivo*

待测物 Compounds	浓度 克/克 Concentration g/g(w/w)	细胞数 No. of cells	SCE _s /细胞 SCE _s /cell		P
			范围 Range	$\bar{x} \pm SD$	
对照 Control	0	20	0—12	3.05±2.523	—
MMC	8×10^{-7}	20	4—13	7.85±2.852	<0.001
	8×10^{-6}	20	13—29	19.7±4.244	<0.001
MNNG	10^{-7}	20	2—11	6.3±2.386	<0.001
	10^{-6}	20	11—17	13.35±2.434	<0.001
MIPC	1.6×10^{-6}	20	1—6	2.95±1.395	$>0.5^*$
	1.6×10^{-5}	20	1—7	4.1±1.553	$>0.5^*$

* 与对照比较 In comparison with the control。

讨 论

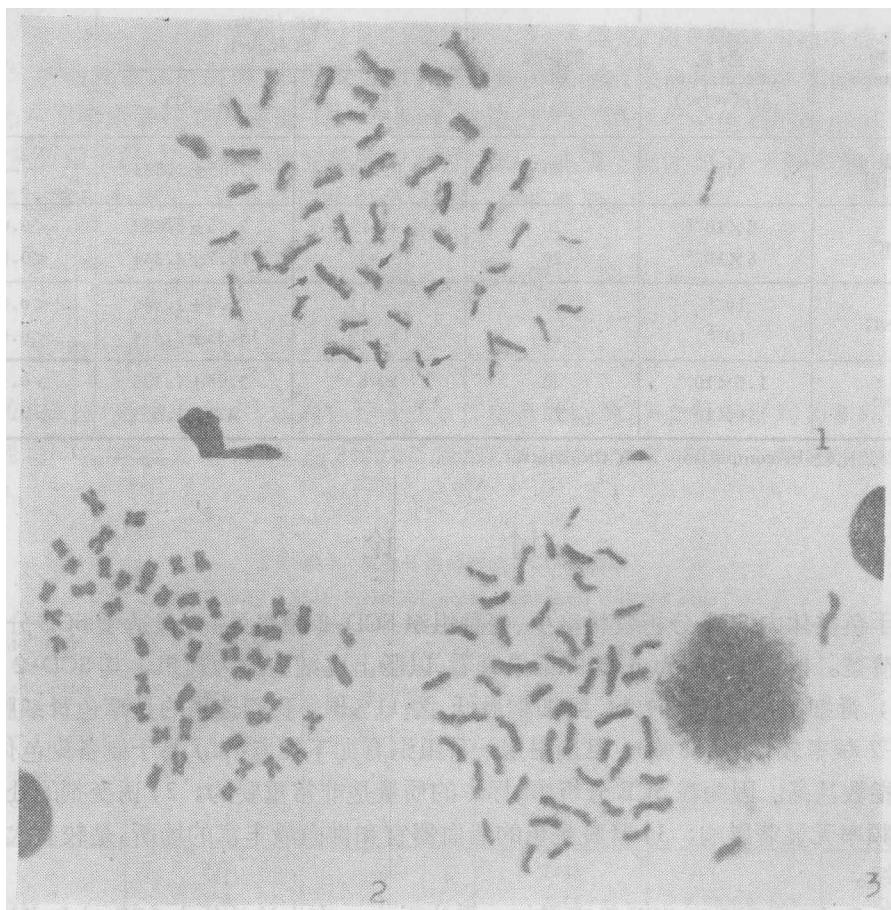
由于鱼类体内 SCE 分析资料极少,何种组织 SCD-2 频率最高,最适于 SCE 分析,目前还不清楚。根据 Kligerman 等的结果来看,以肠上皮细胞最为理想,其 SCD-2 频率高达 23%;肾细胞次之,为 14%;鳃细胞最低,为 11%^[8]。我们选用的是草鱼肾细胞,虽然其 SCD-2 频率较低(8.58%),但选用这一种组织有如下优点:1)易于制备染色体标本,且分裂指数甚高。因为在 SCE 分析中,标本的质量是非常重要的;2)诱变剂的处理对其 SCD-2 频率无显著影响;3)肾脏是鱼的造血器官和供血最丰富的场所,是较有代表性的体内组织。

关于 BrdU 能否诱发 SCE 频率增加,看法不一。有人认为体内 SCE 对 BrdU 浓度的增加不敏感^[10,11],一般体内试验掺入的 BrdU 剂量不足以引起 SCE 频率的明显增加^[4]。Kligerman 等分析泥荫鱼 (*Umbra limi*) 肠上皮细胞,肾细胞和鳃细胞 SCE 时所用的 BrdU 剂量是 500 微克/克体重,其 SCE 频率在 2.0—4.5 SCE_s/细胞之间^[8],他们对这一频率是自发还是 BrdU 所诱发未加讨论。但 Mohanty 等在分析 *Channa punctatus* 鳃和肾细胞 SCE 时发现,高浓度的 BrdU 能使两种组织细胞 SCE 频率显著增加^[9]。关于这一问题,最近有人提出了一个剂量阈值概念,认为在哺乳动物中,无论是体内还是体外,在自发 SCE 值波动范围内其 BrdU 剂量有一个阈值,超过这一阈值,SCE 才明显增加^[12]。这一概念是否适应于鱼类,及在鱼类体内 BrdU 剂量阈值是多少尚待进一步研究。我们的结果表明,草鱼体内肾细胞 SCE 频率为 3.05±2.523 SCE_s/细胞,与草鱼体外培养细胞(GCCF-2)的自发 SCE 频率(2.85±1.098 SCE_s/细胞)相比较无显著差异^[1]。但这一频率是自发还是诱发,还需研究。我们暂把它称做基线(baseline)SCE 频率,以便与药物诱发之 SCE 频率比较。

实验结果还表明,草鱼可以作为一个敏感的诱发 SCE 物质的指示系统。因为文献表

1) 魏彦章、陆仁后,四种化合物诱发草鱼细胞 GCCF-2 姐妹染色单体交换(SCE)的研究。(待发表)。

明,不论在体外还是在体内,诱变剂 MMC 都能诱发 SCE^[4]。在我们的实验中,剂量为 8×10^{-7} 克/克体重的 MMC 即诱发草鱼体内肾细胞 SCE 频率较对照有极显著的增加 ($P <$)。



1 草鱼肾细胞 SCD-2 (3 个 SCE), 箭头示 SCE; 2 草鱼肾细胞中期染色体;
3 8×10^{-7} 克/克体重 MMC 诱发草鱼肾细胞之 SCE (10 个 SCE)

1 SCD-2 of grass carp renal cell with arrows indicating SCEs (3 SCEs)

2 Metaphase chromosomes of grass carp renal cell

3 SCEs of grass carp renal cell induced by $8 \times 10^{-7} g/g$ MMC (10 SCEs)

0.001), 说明草鱼体内肾细胞对 SCE 这一指标是非常敏感的。同样,化合物 MNNG 也能诱发草鱼肾细胞 SCE 频率极显著地增加,这正是我们所预期的。因为文献已表明 MNNG 是一种强的诱变或致癌剂^[1]。SCE 分析是细胞遗传毒理学检测的重要手段之一,但用鱼类体内细胞做这方面的工作还未见报道。我们对叶蝉散做了鱼体内 SCE 分析,剂量为 1.6×10^{-6} 和 1.6×10^{-5} 克/克体重的叶蝉散均未能诱发草鱼体内肾细胞 SCE 频率明显增加。分析可能有以下三种原因: 1) 叶蝉散对草鱼的毒性较低; 2) 草鱼体内代谢系统对叶蝉散具有一定的解毒作用; 3) 叶蝉散对草鱼体内肾细胞 DNA 损伤较小。

综上所述,草鱼体内肾细胞对 SCE 这一指标很敏感。因此,可以应用这种方法来检测不同水体的污染情况。首先从不同水体或取草鱼或将同一批草鱼饲养在不同的待测水样中,一定时间之后,分析肾细胞 SCE 频率并进行比较分析,从而对不同水体污染程度的评

价提供一个较为客观的参数。这一方法的另一个优点是操作简便，在野外也可进行。

参 考 文 献

- [1] 陈祖辉、张湘桥等编译，1982。环境致变物，致癌物生物学短期试验。9—430。人民卫生出版社。
- [2] 刘凌云，1984。黄鳝的姐妹染色单体分化染色(SCD)、互换(SCE)及点状染色体(SD)。北京师范大学学报，(3): 85—89。
- [3] 李康等，1983。用改良的姐妹染色单体分化染色法对白鲢肾细胞增殖动力学和化学药品诱发姐妹染色单体交换频率的初步研究。细胞生物学杂志，5(3): 26—29。
- [4] 杨德清、张文郁，1984。体内姐妹染色单体互换分析。动物学研究，5(1)增刊: 38—51。
- [5] 单祥年等，1984。仓鼠体内注射 BrdU 的细胞遗传学效应。动物学研究，5(1)增刊: 93—94。
- [6] 秦世真、薛京伦。1984。姐妹染色单体互换——国际姐妹染色单体互换讨论会。国外医学 遗传学分册。(3): 116—121。
- [7] Kligerman, A. D., and S. E. Bloom, 1976. Sister chromatid differentiation and exchanges in adult mudminnows (*Umbrat limi*) after *in vivo* exposure to 5-bromodeoxyuridine. *Chromosoma (Berl.)*, **56**: 101—109.
- [8] Kligerman, A. D. 1979. Induction of sister chromatid exchange in the central mudminnows following *in vivo* exposure to mutagenic agents. *Mut. Res.*, **64**: 205—217.
- [9] Mohanty, L., and R. Prased, 1982. Sister chromatid exchanges in a live fish (*Channa punctatus*). *Nucleus (Calcutta)*, **25**(3): 161—164.
- [10] Sutou, S., 1981. Spontaneous sister-chromatid exchanges in Chinese hamster cells *in vivo* and *in vitro*. *Mut. Res.*, **82**: 331—341.
- [11] Wolf, S., 1977. Sister Chromatid Exchange. *Am. Rev. Genet.*, **11**: 183—201.

PRELIMINARY STUDIES ON FREQUENCIES OF SISTER CHROMATID DIFFERENTIAL (SCD) AND EXCHANGES (SCE) IN RENAL CELLS OF GRASS CARP (*CTENOPHARYGODON IDELLUS*) *IN VIVO*

Wei Yanzhang and Lu Renhou

(Institute of Hydrobiology, Academia Sinica, Wuhan)

Abstract

Using the frequency of sister chromatid exchanges (SCE) as an indicator, we have developed an *in vivo* system for assessing environmental mutagenic agents and water pollutants which act upon fish. The sister chromatid differential (SCD) and SCE were demonstrated by thio-nine-UV-Giemsa procedures 5 days after the fish having been injected with 500 µg/g of BrdU (5-bromodeoxyuridine). The frequencies of SCD and SCE in renal cells of grass carp were found to be $8.58 \pm 0.22\%$ and 3.05 ± 2.523 per metaphase, respectively. By using Mitomycin C (MMC) as a positive control, the abilities of MNNG and Mipc to induce SCE were analyzed. This system is considered to be a useful tool for water pollution monitoring.

Key words SCD, SCE, BrdU, renal cell of grass carp