

• 实验研究 •

3,4-二咪唑基氧化咪唑对小鼠致突变性研究

Study on the mutagenicity of DNTF in mice

王玉玲, 杜文霞, 孙苑菡, 张延巍, 常志强, 邢亚飞

WANG Yu-ling, DU Wen-xia, SUN Yuan-han, ZHANG Yan-wei, CHANG Zhi-qiang, XING Ya-fei

(兵器工业集团第五二一研究所, 陕西 西安 710065)

摘要: 对新型高能量化合物 3,4-二咪唑基氧化咪唑 (DNTF) 的致突变性进行研究, 为进一步探讨 DNTF 对人体健康的影响和制订职业接触限值提供依据。对 DNTF 进行小鼠骨髓微核试验、染色体畸变、Ames 试验。结果表明, 小鼠骨髓细胞微核试验、染色体畸变、Ames 试验结果均为阴性。提示在本试验范围内 DNTF 无致突变作用。

关键词: 3,4-二咪唑基氧化咪唑; 小鼠骨髓微核试验; 染色体畸变; Ames 试验

中图分类号: R994.3 文献标识码: B

文章编号: 1002-221X(2011)06-445-03

3,4-二咪唑基氧化咪唑 (DNTF) 是一种新型高能量密度材料, 外观为白色固体。DNTF 的综合性能优于奥克托今 (HMX), 而接近于六硝基六氮杂异戊兹烷 (CL-20)^[1]。可用作低特征信号推进剂的氧化剂, 具有无卤素、无烟、安全性好的特点, 可以在炸药、推进剂及其他爆炸产品领域得到广泛应用^[2]。经检索, 国内外均无毒性研究的资料, 本研究旨在探讨 DNTF 的遗传毒性。

1 材料与方法

1.1 材料

受试物 DNTF 由中国兵器工业集团公司第二〇四研究所研制提供。实验动物均由西安交通大学医学院实验动物中心提供。秋水仙碱, 中国医药 (集团) 上海化学试剂公司分装; 注射用环磷酰胺, 上海华联制药有限公司生产, 批号 011115; 小牛血清, 长春生物制品有限公司生产; Ames 试验标准菌株 (TA97、TA98、TA100 和 TA102) 由河南省疾病预防控制中心引进, 其余试剂均为国产分析纯。

1.2 方法^[3]

1.2.1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验 选用体重 18~22 g 健康 ICR 小鼠 32 只, 雌雄各半, 随机分为 4 组, 每组 8 只, 染毒剂量为 2 000 mg/kg、1 000 mg/kg, 另设阴性对照组 (植物油), 阳性对照组 (CP, 环磷酰胺)。阴性对照组和染毒组连续经口灌胃 4 d, 灌胃量按 0.2 ml/10 g 体重计算, 第 5 天颈椎脱臼法处死动物。处死动物前 6 h, 阳性对照组用环磷酰胺 CP 30 mg/kg 腹腔注射 1 次。处死动物后, 取出股骨制片,

Giemsa 染色, 镜检及计数。每一动物检查 2 张涂片, 油镜下观察 1 000 多个染红细胞 (PCE) 出现的微核率 (%), 求出 PCE 与正染红细胞 (NCE) 的比值。

1.2.2 小鼠骨髓细胞染色体畸变试验 选用体重 18~22 g 健康 ICR 小鼠 40 只, 雌雄各半, 随机分为 5 组, 每组 8 只。染毒设 3 个剂量组, 分别为 500 mg/kg、158 mg/kg、50 mg/kg, 同时设阴性对照组 (植物油), 阳性对照组 (CP, 环磷酰胺)。染毒组与阴性对照组动物按 0.2 ml/10 g 经口灌胃, 连续 5 d; 阳性对照组 (CP, 30 mg/kg), 第 4 天皮下注射第一次, 24 h 后再注射 1 次, 最后一次给药后 6 h, 腹腔注射 0.04% 秋水仙碱 2 h 后处死动物。用颈椎脱臼法处死动物, 立即取其双侧股骨制片, 用新配制的 Giemsa 染色液染色, 先于低倍镜下寻找分散良好、染色体收缩适中的中期分裂相细胞, 再用油镜观察分析。

1.2.3 鼠伤寒沙门氏菌营养缺陷型回复突变试验 (Ames 试验) DNTF 设 200.00、40.00、8.00、1.60、0.32 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 5 个剂量组, 另设自然回变对照组、溶剂对照组 (DMSO) 和阳性对照组。用 Ames 试验标准菌株 TA97、TA98、TA100 和 TA102, 在加与不加 S-9 混合液条件下, 分别对 DNTF 做平板掺入法 Ames 试验。各菌株每剂量做 3 个平行皿, 每皿加菌加受试物各 0.1 ml, 整个试验重复 2 次。记录各皿回变菌落数, 如果受试物的回变菌落数是自发回变菌落数的 2 倍以上, 并且有剂量-反应关系者则定为阳性。

1.3 统计学处理

结果所得数据采用 *t* 检验、 χ^2 检验。

2 结果

2.1 小鼠骨髓嗜多染红细胞微核试验

与阴性对照相比, DNTF 染毒组诱发小鼠的微核率差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 表明在以上剂量的作用下, DNTF 对小鼠骨髓嗜多染红细胞无诱发微核作用。结果见表 1。

表 1 DNTF 对小鼠骨髓细胞嗜多染红细胞的微核效应

组别	动物数	观察 PCE 数	PCE/NCE ($\bar{x} \pm s$)	微核数	微核率 (% $\bar{x} \pm s$)
阴性对照组	8	8 000	0.98 \pm 0.02	20	2.53 \pm 1.23
染毒 2 000 mg/kg 组	8	8 000	0.97 \pm 0.02	18	2.25 \pm 1.34
染毒 1 000 mg/kg 组	8	8 000	0.98 \pm 0.05	21	2.63 \pm 1.26
阳性对照组	8	8 000	1.07 \pm 0.06	126	15.75 \pm 3.67 **

注: 与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

2.2 小鼠骨髓细胞染色体畸变试验

收稿日期: 2011-03-17; 修回日期: 2011-08-02

基金项目: 兵器“十一五”预研支撑项目 (编号 42001100202)

作者简介: 王玉玲 (1961—), 女, 主管技师, 主要从事卫生毒理研究工作。

DNTF 染毒组非二倍体出现率与阴性对照组比较, 差异无统计学意义, 说明 DNTF 对小鼠骨髓细胞无致染色体数目畸变作用。DNTF 3 个剂量组染色体细胞畸变率与阴性对照组比较, 差异无统计学意义, 即 DNTF 对小鼠骨髓细胞染色体无损害作用。结果见表 2、表 3。

表 2 小鼠骨髓细胞染色体数目畸变率

组别	动物数	观察 细胞数	二倍体		非二倍体	
			数目	%	数目	%
阴性对照组	8	800	780	97.5	20	2.5
染毒 50 mg/kg 组	8	800	776	97.0	24	3.0
染毒 158 mg/kg 组	8	800	779	97.4	21	2.6
染毒 500 mg/kg 组	8	800	780	97.5	20	2.5
阳性对照组	8	800	650	81.3	150	18.7**

注: 与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

2.3 Ames 试验

表 4 DNTF Ames 试验结果 ($\bar{x} \pm s$)

受试物与剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	第一次							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
自然回变	156 ± 17	147 ± 22	36 ± 4	38 ± 5	187 ± 17	154 ± 15	308 ± 14	293 ± 9
200.0	0	0	0	0	0	0	0	0
40.00	17 ± 6	146 ± 16	5 ± 5	17 ± 4	43 ± 17	145 ± 11	45 ± 11	187 ± 15
8.00	153 ± 41	152 ± 26	37 ± 10	37 ± 6	150 ± 16	163 ± 23	250 ± 34	252 ± 27
1.60	127 ± 37	147 ± 31	40 ± 4	38 ± 9	157 ± 12	188 ± 12	255 ± 6	305 ± 8
0.32	143 ± 15	173 ± 24	43 ± 6	35 ± 7	157 ± 33	144 ± 20	302 ± 23	267 ± 32
DMSO	171 ± 9	171 ± 14	41 ± 12	47 ± 4	182 ± 18	164 ± 22	300 ± 16	305 ± 25
阿的平 (10.0)	2 732 ± 134	—	—	—	—	—	—	—
2-氨基芴 (10.0)	—	1 486 ± 157	—	3 227 ± 239	—	2 233 ± 179	—	—
柔毛霉素 (6.0)	—	—	1 486 ± 157	—	—	—	—	—
叠氮钠 (1.5)	—	—	—	—	2 304 ± 193	—	—	—
丝裂霉素 C (2.5)	—	—	—	—	—	—	2 251 ± 188	—
顺铂 (25.0)	—	—	—	—	—	—	—	1 896 ± 177

试验显示 200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 组受试物完全抑菌, 4 000 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 组部分抑菌。其余每剂量组各菌株回变菌落数均未超过自然回变菌落数的 2 倍, 而阳性对照组超过自然回变菌落数的 2 倍, 即表明 DNTF 在 0.32 ~ 200 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量范围内未发现诱变作用。结果见表 4。

表 3 小鼠骨髓细胞畸变率及染色体畸变类型

组别	动物数	观察 细胞数	染色体畸变类型				细胞畸变率 (%)
			断片	缺失	互换	粉碎化	
阴性对照组	8	800	4	5	0	0	1.1
染毒 50 mg/kg 组	8	800	5	3	0	0	1.0
染毒 158 mg/kg 组	8	800	6	3	1	0	1.2
染毒 500 mg/kg 组	8	800	6	4	1	0	1.4
阳性对照组	8	800	68	12	18	36	16.8**

注: 与阴性对照组相比, ** $P < 0.01$ 。

第二次

受试物与剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	第二次							
	TA97		TA98		TA100		TA102	
	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9	-S9	+S9
自然回变	114 ± 24	176 ± 5	37 ± 4	42 ± 10	152 ± 8	102 ± 72	263 ± 23	240 ± 51
200.00	0	0	0	0	0	0	0	0
40.00	97 ± 9	147 ± 30	23 ± 5	32 ± 3	102 ± 5	153 ± 47	45 ± 9	242 ± 46
8.00	160 ± 35	173 ± 13	39 ± 4	31 ± 8	176 ± 14	139 ± 24	263 ± 19	308 ± 17
1.60	150 ± 33	139 ± 9	37 ± 8	39 ± 8	142 ± 41	165 ± 31	288 ± 18	285 ± 25
0.32	109 ± 22	116 ± 18	39 ± 8	41 ± 8	183 ± 16	177 ± 34	252 ± 14	289 ± 27
DMSO	121 ± 13	117 ± 26	36 ± 7	35 ± 8	138 ± 32	167 ± 35	255 ± 53	293 ± 31
阿的平 (10.0)	2 934 ± 196	—	—	—	—	—	—	—
2-氨基芴 (10.0)	—	1 649 ± 75	—	3 661 ± 333	—	2 398 ± 239	—	—
柔毛霉素 (6.0)	—	—	2 005 ± 234	—	—	—	—	—
叠氮钠 (1.5)	—	—	—	—	2 411 ± 133	—	—	—
丝裂霉素 C (2.5)	—	—	—	—	—	—	2 228 ± 208	—
顺铂 (25.0)	—	—	—	—	—	—	—	2 125 ± 169

3 讨论

染色体分析主要检出染色体的完整性受损, 其次也可发现染色体分离的改变。微核主要是无着丝点断片或环在细胞

分裂时不能定向移动, 因而遗失在细胞质中而产生, 也可能是纺锤丝功能或结构障碍, 而使整个染色体在细胞分裂末期被排入细胞质而产生^[3]。本研究染色体畸变分析与微核试验

结果基本一致,表明在所选剂量下,DNTF未改变小鼠染色体的完整性。而Ames试验所反映的遗传学终点是DNA碱基序列的改变,本次试验结果为阴性,表明在所选择的剂量水平下,DNTF不会引起DNA碱基序列的改变。表明DNTF为非遗传毒物,因此对接触人员不会产生突变性。由于DNTF是一种新型的高能量密度化合物,是否具有致癌性,有待进一步的人体试验和流行病学调查研究。

参考文献:

- [1] 郑伟,王江宁,韩芳,等. DNTF-CMDB推进剂的化学安定性[J]. 火炸药学报,2010,33(4):10-13.
- [2] 胡焕性,张志忠,赵凤起,等. 高能量密度材料3,4-二硝基咪唑基氧化咪唑性能及应用研究[J]. 兵工学报,2004,25(2):155-158.
- [3] 李寿祺. 卫生毒理学基本原理和方法[M]. 成都:四川科学技术出版社,1987:68,499-505.

豚鼠染毒三氯乙烯后淋巴细胞凋亡基因表达水平的改变

Change of expression level of lymphocytic apoptosis gene in GP after exposure to TCE

陈红锋,甘露,蔡日东,刘灵辉

CHEN Hong-feng, GAN Lu, CAI Ri-dong, LIU Ling-hui

(深圳市宝安区福永预防保健所,广东深圳 518103)

摘要:将18只豚鼠随机分为3组,采用豚鼠最大值试验法(GPMT),设立TCE实验组、阴性对照组、阳性对照组,用皮内注射的方式分别注射三氯乙烯(TCE)、橄榄油、2,4-二硝基氯苯(DNCB)。并收集豚鼠外周血和脾淋巴细胞,用Real-time荧光定量PCR检测凋亡基因表达水平。TCE实验组和阳性对照组动物出现明显皮肤损害。TCE实验组和阳性对照组脾淋巴细胞Bax、Bad、Bcl-2的mRNA表达水平比阴性对照组显著升高($P < 0.01$);但TCE实验组和阳性对照组外周血淋巴细胞Bax、Bad、Bcl-2的mRNA表达水平与阴性对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。提示三氯乙烯可诱导豚鼠产生明显的迟发型皮肤变态反应,致豚鼠脾淋巴细胞凋亡基因表达水平发生明显改变。

关键词:三氯乙烯;豚鼠;外周血;脾;淋巴细胞;凋亡基因

中图分类号:R994.3 文献标识码:B

文章编号:1002-221X(2011)06-0447-03

三氯乙烯药疹样皮炎的报道较多,但其毒性作用的具体机制目前尚不完全清楚。本实验拟通过观察三氯乙烯引起豚鼠明显皮肤改变,并检测脾和外周血淋巴细胞的凋亡基因表达,探讨三氯乙烯的免疫毒性机制,为预防控制三氯乙烯的职业危害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器设备

三氯乙烯购于美国Sigma公司,纯度大于99.5%;阳性对照组2,4-二硝基氯苯(DNCB)购于天津市光复精细化工研究所;橄榄油及福氏完全佐剂(FCA)(美国Sigma公司);淋巴细胞分离液EZ-Sep™(深圳达科为生物技术有限公司);

淋巴细胞总RNA提取试剂盒Trizol Reagent(美国Invitrogen公司);反转录及SYBR Green Q-PCR试剂盒DRR063A(大连宝生物公司)。凋亡基因Bax、Bad、Bcl-2的PCR引物由TaKaRa生物公司合成。MX4000型荧光定量PCR仪(美国Stratagene公司)。

1.2 实验动物及分组处理

取18只健康成年雌性豚鼠,体重250~280g,购自广东省医学实验动物中心,随机分为3组,每组6只,动物自由进食饮水。采用豚鼠最大值试验法(GPMT)^[6]。阴性对照组用橄榄油,阳性对照组用0.125% DNCB和福氏完全佐剂等量混合物,TCE实验组用5% TCE(TCE:橄榄油=5:95)。实验第1天各组动物皮内注射进行第一次致敏,第8天涂皮诱导,第15天涂皮激发。末次激发后24h,观察和记录受试区的皮肤反应情况,按下列标准对皮肤反应进行评分:红斑根据大小记0~4分,水肿根据严重程度记0~3分。

1.3 动物脾淋巴细胞分离

应用淋巴细胞分离液分离脾淋巴细胞,在平皿中加入4ml EZ-Sep™淋巴细胞分离液,将脾脏通过70 μm细胞过滤网研磨过滤到EZ-Sep™淋巴细胞分离液中,然后将含有脾脏淋巴细胞的分离液移入15ml离心管内,缓慢加入500 μl RPMI1640培养基,使液面分层明显。室温下水平离心机中3000 r/min离心30 min,吸出淋巴细胞层,再加入10ml 1640培养基,颠倒洗涤。然后室温下1800 r/min离心15 min收集细胞;倾倒入上清,用1ml 1×PBS重悬细胞,移入1.5ml离心管内,1200 r/min离心10 min,倾倒入上清后加入1ml Trizol, -80℃冰箱保存。

1.4 提取外周血淋巴细胞

取豚鼠抗凝外周血2~4ml,用RPMI 1640培养基稀释1倍;取3ml EZ-Sep™淋巴细胞分离液置于15ml离心管内,向该离心管内缓缓加入2~3ml稀释的抗凝外周血,使得淋巴细胞分离液与外周血之间有明显的分层。其余步骤同脾淋巴细胞提取。

1.5 实时荧光定量PCR测定mRNA表达水平

收稿日期:2011-08-15

基金项目:深圳市科技计划项目(项目编号:200602177)

作者简介:陈红锋(1953—),男,副主任医师,从事公共卫生和疾病预防控制工作。