

醋酸棉酚对小鼠精原细胞姊妹染色半体互换的诱发效应

王仁礼 王民明* 吕群** 郑慧珍 姚玉龙* 蒋秀蓉 张忠恕 潘成新*

(上海市计划生育科学研究所, 上海 200032; *上海医药工业研究院, 上海 200040; **复旦大学遗传学研究所, 上海 201903)

提要 给醋酸棉酚 2 和 8 mg/kg/d 剂量组的小鼠, 平均每个精原细胞的 SCE 频率均为 1.4 ± 1.0 , 与对照组 ($1.4 \pm 1.2/\text{cell}$) 差异不显著。醋酸棉酚 20 mg/kg/d 剂量组平均每个细胞 SCE 频率为 1.8 ± 1.2 , 与对照组差异很显著。提示不可忽视高剂量棉酚能引起精原细胞 SCE 频率的增高。

关键词 棉酚; 精原细胞; 姊妹染色半体互换; 丝裂霉素 C

棉酚作为男性节育药, 具有可靠的抗生育作用。有人认为其作用环节在生精上皮, 干扰睾丸内精子发生⁽¹⁻³⁾, 其机制可能是通过干扰大鼠初级精母细胞 DNA 合成作用, 导致精子细胞 DNA 含量的紊乱和减低⁽⁴⁾。本实验旨在探讨棉酚对生殖细胞染色体 DNA 有否损伤, 通过观察 3 种剂量棉酚诱发姊妹染色体互换 (SCE) 的效应, 以阐明棉酚是否有致突变性。

材 料 和 方 法

ICR 6-8 周♂小鼠, 体重 $23 \pm (\text{SD}) 1.8 \text{ g}$, 随机分对照组, 棉酚 2, 8, 20 mg/kg/d 三个剂量组(相当于临床剂量的 5, 20, 50 倍) 和丝

裂霉素 C 组。醋酸棉酚(无锡轻工业学院提供) 用 1% 甲基纤维素配制成混悬液, 按三个棉酚剂量分别 ig 9 d⁽⁵⁾。对照组小鼠 ig 1% 甲基纤维素 9 d。停药后 d 1 小鼠 ip 吸附有 BrdU 活性炭悬浮液 (BrdU 10 mg/活性炭 100 mg/ml) 0.5 ml。阳性对照组在第 26 h 注射丝裂霉素 C 0.5 mg/kg。第 48 h ip 秋水仙素 4 mg/kg, 第 54 h 处死小鼠。

取出睾丸, 剥去白膜, 充分剪碎悬浮于无 Ca^{++} 和 Mg^{++} 的 Dulbecco's 缓冲液中, 离心收集组织碎片, 用 0.1% 胰旦白酶 37°C 处理 10 min。加几滴未灭活的小牛血清使胰旦白酶失活, 离心收集细胞, 缓冲液再冲洗一次后 75 mM 氯化钾低渗处理 10 min, 经甲醇:冰醋酸 (3:1) 固定, 空气干燥制成标本^(6,7)。

标本置 37°C 老化 2-7 d 后, 平放在 60°C 水浴锅盖面上, 在玻片上覆盖 $2 \times \text{SSC}$ 溶液(即 0.3 M NaCl, 0.03M 枸橼酸钠)。在标本上方 6 cm 用紫外灯照 45 min。蒸馏水冲洗后用 5% Giemsa 溶液 (pH 6.8 磷酸缓冲液稀释) 染色 7-10 min。

选择细胞轮廓完整, 染色体数 $2n = 40$, 色差鲜明的中期分裂相分析计数。染色半体端部

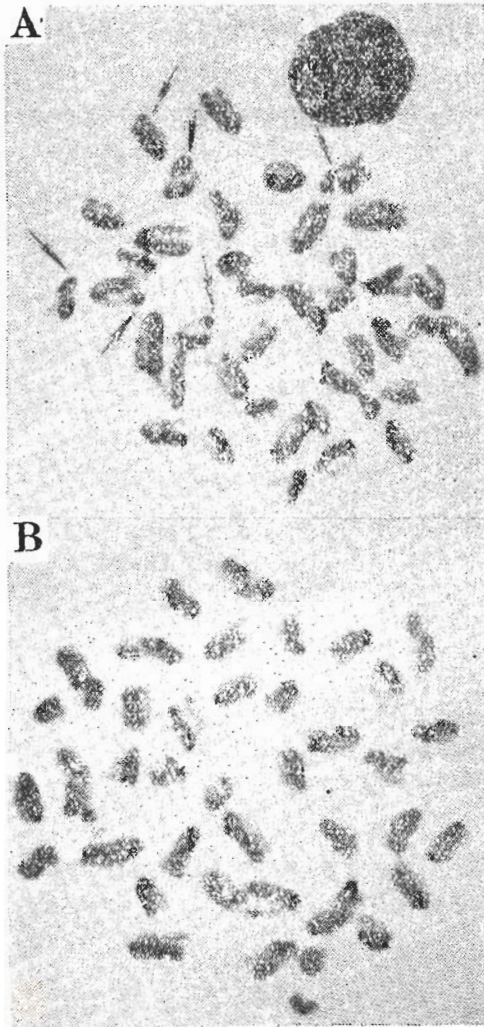


Fig 1. SCE (arrows) of spermatogonial cells in mice ig gossypol acetate 20 mg/kg daily for 9 d (A) and ip mitomycin C 0.5 mg/kg (B).

及着丝粒部互换计作 1 次 SCE, 染色单体中间互换计作 2 次 SCE。每一受试小鼠观察细胞约 25 个。

结果与讨论

图 1 示 ig 棉酚和 ip 丝裂霉素 C 的小鼠精原细胞 SCE。小鼠精原细胞 SCE 的结果列于表 1。对照组每个细胞 SCE 数为 1.4 ± 1.2 ; 丝裂霉素 C 组 SCE 为 4.9 ± 2.0 , 与对照组差异极其显著。棉酚低和中剂量组每个细胞 SCE 数都为 1.4 ± 1.0 , 与对照组差异不显著。棉酚高剂量组每个细胞 SCE 为 1.8 ± 1.2 , 和对照组差异很显著。结果表明棉酚 2 和 8 mg/kg/d 不诱发小鼠精原细胞 SCE 的频率增加, 与小鼠骨髓细胞 SCE 试验⁽⁸⁾ 基本一致。棉酚 20 mg/kg/d 使小鼠精原细胞 SCE 的频率明显增高。这与棉酚诱发♂大鼠的显性致死突变试验结果⁽⁹⁾ 可相互印证。♂大鼠 ig 20 mg/kg/d \times 30 d, 停药 37-50 d 时交配, 受孕♀鼠的胚胎显性致死率 (10.86%) 明显高于对照组, 但随停药时间延长, 显性致死率下降, 到 2 个月时受孕♀鼠的胚胎显性致死率 (4.45%) 给药组和对照组间差别不显著。根据大鼠的精子发生全过程 48-53 d, 推算此时交配的精子起源于 48-53 d 前的精原细胞, 其时正是棉酚给药时期, 睾丸中棉酚含量达到饱和处于动态平衡状态之中⁽¹⁰⁾。这说明棉酚诱发显性致死的机理很可能是通过诱发大鼠精原细胞的突变造成胚胎死

Tab 1. Frequencies of SCE in spermatogonial cells of the mice. BrdU was injected ip in charcoal-adsorbed formulation.

Intragastric gavage	Mice	Metaphases studied	Sister chromatid exchange (SCE)			
			Total	Mean \pm SD	Range	P
CMC	13	305	437	1.4 ± 1.2	0-6	
Gossypol acetate						
2 mg/kg/d	13	307	436	1.4 ± 1.0	0-6	>0.05
8 mg/kg/d	12	280	399	1.4 ± 1.0	0-5	>0.05
20 mg/kg/d	13	299	550	1.8 ± 1.2	0-6	<0.01
Mitomycin C 0.5 mg/kg	9	225	1121	4.9 ± 2.0	0-12	<0.01

亡。尽管在有的研究中未发现棉酚诱发大鼠精原细胞染色体畸变率增加⁽¹¹⁾，但由于与染色体畸变相比，SCE 是一个更敏感地反映诱变性的指标，是反映 DNA 初级损伤的指标，从本实验反映 DNA 损伤的 SCE 增加，进一步说明棉酚诱发精原细胞突变的本质，很可能是对精原细胞 DNA 的损伤。

有人认为棉酚对初级精母细胞的 DNA 合成有干扰作用，并认为可能是不育的环节之一⁽⁴⁾。推测棉酚对具有 DNA 合成能力的生精细胞 DNA 可能均具有干扰合成和/或损伤的作用。由于生精细胞的类型和对棉酚作用的反应不同，在生育上造成的影响可能有所不同，精母细胞 DNA 合成的减少可能与不育有关，而精原细胞的 DNA 损伤则与精细胞的显性致死突变有关。本实验高剂量棉酚可以诱发小鼠体内精原细胞 SCE 增高的结果与国内报道的类似实验相同⁽¹²⁾。这表明棉酚在小剂量应用作为节育药物还是较安全的，但是对于长期接触大剂量棉酚的药厂工人不应忽视适当的劳动防护措施。

世界卫生组织 1971 年的“药物诱变性的检测和评价的原则和问题”一文指出：“在一个品种中的阳性发现应看作对人有潜在的诱变活力

的指征”。又指出：“难于确定由于突变产生的损害的绝对量，但能通过各种方法减少损害，如已知有诱变作用的药物用于任何一种性别的情况下，在治疗期中和治疗后几个月中采用避孕方法是必要的”⁽¹³⁾。由于人的生精全过程是 64 天，为了避免由于服药期间棉酚对精原细胞 DNA 损伤产生的突变对后代可能造成的影响，建议服药者在停药至少二个月以后再生育是恰当的。

参 考 文 献

- 1 Hoffer AP. *Arch Androl* 1982; 8 : 223
- 2 Bozek SA, Jensen DR, Tone JN. *Cell Tissue Res* 1981; 219 : 659
- 3 戴荣禧、庞诗宜. *实验生物学报* 1978; 11 : 1
- 4 周文郁、薛社普. *生殖与避孕* 1981; 1 : 26
- 5 男用节育药全国协作组. *中华医学杂志* 1978; 58 : 455
- 6 Kanda N, Kato H. *Exp Cell Res* 1979; 118 : 431
- 7 张忠恕、王仁礼. *生殖与避孕* 1982; 2 : 53
- 8 张忠恕、王民明、吕群, 等. 同上 1981; 2 : 42
- 9 张忠恕、潘咸新、王民明、姚玉龙. *医药工业* 1979; 84 : 20
- 10 柯一保、林心楷、林秀媛等. *实验生物学报* 1979; 12 : 69
- 11 张忠恕、潘咸新、王民明, 等. *生殖与避孕* 1981; 1 : 33
- 12 周洁民、吕群、江绍慧, 等. 同上 1982; 3 : 49
- 13 WHO *Tech Rep Ser* 1971; (42) : 16

Acta Pharmacologica Sinica 1984 Dec; 5 (4) : 264-267

EFFECT OF GOSSYPOL ACETIC ACID ON INDUCTION OF SISTER CHROMATID EXCHANGE OF SPERMATOGONIAL CELL IN MICE

WANG Ren-li, WANG Min-ming*, LU Qun**, ZHENG Hui-zhen, YAO Yu-long*, JIANG Xiu-rong, ZHANG Zhong-shu, PAN Xian-xin*

(Shanghai Inst Planned Parenthood Research, Shanghai 200032; *Shanghai Inst Pharmaceutical Industry, Shanghai 200040; **Inst Genetics, Fudan University, Shanghai 210903)

ABSTRACT After intragastric gavage of gossypol acetic acid 2, 8, 20 mg/kg/d × 9 d respectively, the mice were injected ip BrdU-activated charcoal suspension. After 54 h, the mice were killed and spermatogonial cells were

sampled for SCE analysis. The SCE frequencies of gossypol acetic acid 2, 8 mg/kg/d groups were the same 1.4 ± 1.0 /cell. Having compared these with that of the control group (1.4 ± 1.2 /cell), there was no significant difference. The SCE

frequency of gossypol acetic acid 20 mg/kg/d group was $1.8 \pm 1.2/\text{cell}$, and the difference between this group and control group was significant. Although gossypol acetate at lower dose did not damage the genetic material, it

should not be neglected that the higher dosage might enhance SCEs of spermatogonial cell.

KEY WORDS gossypol; spermatogonia; sister chromatid exchange; mitomycin C

* * *

* * *