

## 铂配位络合物诱发小鼠骨髓多染红细胞微核的形成

仲来福、张富勤、刘 军、夏元洵 (大连医学院卫生学教研室, 大连 116012)

**提要** 小鼠 ip 顺铂, PHM 和 SHP, 分别为 0.19, 5.63, 0.18 mg/kg 或以上, 可使骨髓中 PCE 微核率显著增高。剂量-效应曲线呈斜率不同的二或三相。ip 顺铂 18 h 内, 微核率未明显增高; 0.24 mg/kg 时, 微核率达到峰值的时间为给药后 24 h, 而 1.5 mg/kg 时, 则延迟至给药后 30 h。表明该药诱发的微核效应可能依赖 DNA 合成期, 并引起细胞分裂周期延迟。

**关键词** 顺铂; 丙二酸环己二胺铂; 硫酸环己二胺铂; 细胞微核; 药物剂量-效应关系

长期给小鼠 ip 顺铂 (cisplatin), 可使肺部

肿瘤发生率提高。用 cisplatin 治疗的癌症患者可继发急性骨髓性白血病<sup>(1)</sup>。Cisplatin 可诱发 CHO 细胞微核率增高<sup>(2)</sup>, 但未见诱发哺乳动物骨髓多染红细胞(PCE)微核形成的报道。迄今尚无有关第二代铂络合物丙二酸环己二胺铂(PHM)和硫酸环己二胺铂(SHP)细胞遗传学的报道。本文观察了 cisplatin, PHM 和 SHP 诱发小鼠骨髓 PCE 微核的效应, 并阐明剂量-效应关系和/或时间-效应关系。

### 材 料 和 方 法

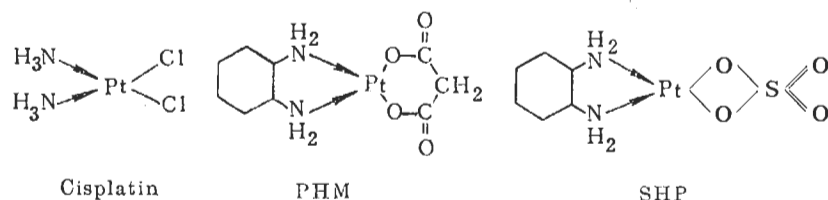


Fig 1. Structures of cisplatin, malonato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum and sulfato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum.

纯度均在96%以上。化学结构如图1。Cisplatin与SHP分别溶于生理盐水或无菌蒸馏水中。PHM用二甲基亚砜(DMSO, AR, 北京化工厂)溶解,以蒸馏水稀释,终浓度 $\leq 5\%$ 。

昆明种小鼠,♂,8-10 wk龄,体重 $28.3 \pm SD 2.8$  g,随机分组,每组4-5只。为观察三种化合物诱发微核的量-效关系,按Schmid推荐的方案,两次ip,间隔24 h,第二次ip后6 h处死<sup>(3)</sup>。对照组分别ip生理盐水,蒸馏水

或5% DMSO蒸馏水。每药设5或6个剂量组,最高剂量为 $LD_{50}$ 的1/8(cisplatin)或1/4(PHM和SHP),其他剂量则依次递减1/2。

Cisplatin诱发微核的时-效关系实验,用 $LD_{50}$ 的1/8和1/50一次ip,在72 h内于7个不同时间处死,并以给药后即刻处死组(0 h)为对照。

给药次数对cisplatin诱发微核的影响,用两组小鼠,0.6 mg/kg分别ip一或两次后

Tab 1. Frequency of polychromatic erythrocytes (PCEs) with micronuclei in mouse bone marrow after ip cisplatin, malonato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II), and sulfato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum (II). \* $p > 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.01$

Compound	Single ip dose		Mice	PCE examined	Reduction in PCE(%)	PCEs with micronuclei (%) $\bar{x} \pm SD$
	mg/kg	$\frac{1}{n} LD_{50}$				
Cisplatin	Saline		5	5000		$0.26 \pm 0.11$
	0.09	1/128	5	5000	<10	$0.46 \pm 0.21^*$
	0.19	1/64	4	4000	<10	$1.3 \pm 0.5^{***}$
	0.38	1/32	5	5000	<10	$1.9 \pm 0.6^{***}$
	0.75	1/16	5	5025	<10	$4.9 \pm 2^{***}$
	1.5	1/8	5	5086	<10	$7.6 \pm 2.5^{***}$
PHM	Water		4	4000		$0.25 \pm 0.06$
	5% DMSO		4	4000	<10	$0.58 \pm 0.13^{**}$
	5.6	1/64	4	4000	<10	$1.7 \pm 0.7^{***}$
	11.3	1/32	4	4000	<10	$1.9 \pm 0.4^{***}$
	22.5	1/16	4	4000	<10	$5.4 \pm 1.8^{***}$
	45	1/8	4	4000	>20	$8.7 \pm 0.6^{***}$
	90	1/4	4	4000	>10	$9.2 \pm 5^{***}$
SHP	Water		4	4000		$0.38 \pm 0.17$
	0.18	1/128	4	4000	>10	$1.0 \pm 0.4^{***}$
	0.35	1/64	4	4000	>10	$1.3 \pm 0.6^{***}$
	0.7	1/32	4	4000	>10	$4.0 \pm 0.5^{***}$
	1.4	1/16	4	4000	>20	$8.8 \pm 0.9^{***}$
	2.8	1/8	4	4000	>20	$11.1 \pm 0.3^{***}$
	5.6	1/4	4	4000	>40	$7.2 \pm 1.5^{***}$

$LD_{50}$ (mouse, ip) of cisplatin, PHM, and SHP were 13, 360, and 22.5 mg/kg, respectively

30 h 处死观察。

按常规制备骨髓涂片, 10%Giemsa 染色。每鼠计数 1000 个 PCE, 记录含微核的 PCE 细胞数, 以%表示。为估计药物对骨髓细胞增殖的影响, 计算  $PCE\% = PCE / (PCE + RBC) \times 100\%$  和有核细胞% = 有核细胞数 / (PCE + 有核细胞数)  $\times 100\%$ 。用标准表<sup>(4)</sup>确定两组数据间差异的显著性。

## 结 果

小鼠 ip. cisplatin 0.19 mg/kg 或以上各剂量组及 PHM 与 SHP 全部剂量组, 微核率均显著高于对照组(表 1)。三种药物引起微核率显著增高的最低剂量, cisplatin 和 PHM 为  $LD_{50}$  的 1/64, SHP 为  $LD_{50}$  的 1/128。Cisplatin, PHM 和 SHP 诱发的微核率与剂量呈线性关系, 相关系数 r 分别为 0.96, 0.96 和 0.84。这三条量-效曲线似呈二或三相模式(图 2)。曲线的第二相的斜率明显大于第一和/或第三相。构成第二相的剂量为诱发微核的敏感剂量。Cisplatin, PHM 和 SHP 的敏感剂量分别是 0.38-1.5, 11.3-45 和 0.35-2.81 mg/kg。ip PHM 高达 90 mg/kg 时, 微核率没有进一步增高; ip SHP 5.63 mg/kg, 其微核率反而低于 2.81 mg/kg 组。三种药物对有核细胞%均无明显影响, 但 ip PHM 45-90 mg/kg 或 SHP 1.4-

5.6 mg/kg 使 PCE% 明显减少, 以 SHP 更明显并呈剂量依赖关系, 表明它们不同程度地抑制了 PCE 生成或导致外周血重新进入骨髓。

Cisplatin 诱发微核的时-效关系见图 3。一次 ip 0.24 mg/kg(相当于  $LD_{50}$  的 1/5)后, 18 h 微核率显著增高, 24 h 达到峰值, 然后缓慢下降。ip 1.5 mg/kg(相当于  $LD_{50}$  的 1/8)时, 达到高峰的时间后延至给药后 30 h。

一次 ip cisplatin 0.6 mg/kg 后 30 h 采样, 其微核率为  $2.0 \pm 0.9\%$ ; 以相同剂量 ip 两次, 间隔 24 h, 第一次给药后 30 h 采样, 检出的微核率为  $2.2 \pm 0.4\%$ , 与前者没有显著差别。

## 讨 论

本文结果表明, cisplatin, PHM 和 SHP 是强遗传毒物。它们的量-效曲线第一相斜率明显小于第二相的原因可能是, 低剂量铂络合物在血浆中经转化并大部分与血浆蛋白结合后, 活性代谢物的量仅为给药量的极少部分; 并且这些活性代谢物到达靶部位(如骨髓)前已部分被消除。较高剂量即诱发微核的敏感剂量, 则使第二相的斜率明显增大。而给予更高剂量 PHM 或 SHP, 曲线变得低平甚至下降, 这可能与两药引起骨髓成红细胞成熟过程延迟有关。

成红细胞周期持续的时间为,  $G_1$  1.0 h,

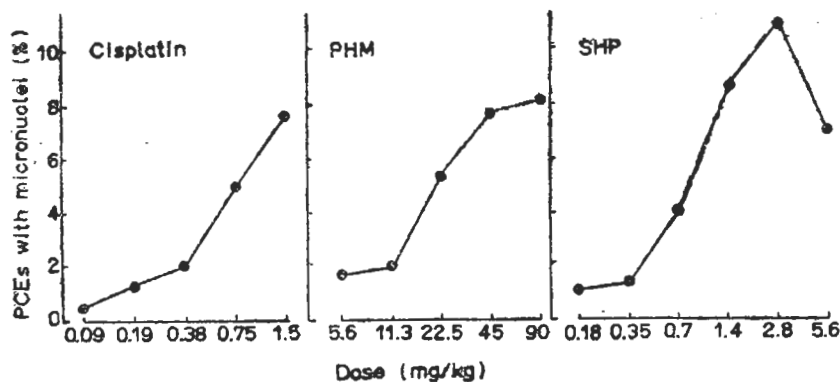


Fig 2 Dose-effect curves for 3 platinum compounds measured by *in vivo* mouse bone marrow PCE assay. 4 mice/point; 1000 PCE/mouse.

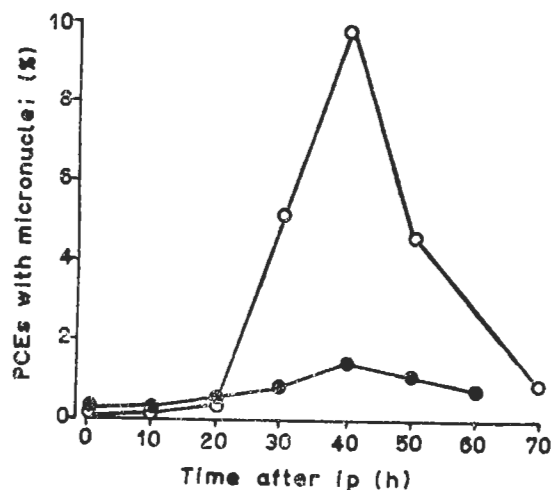


Fig 3. Frequency of micronuclei after ip cisplatin 1.5 and 0.24 mg/kg measured by *in vivo* mouse bone marrow PCE assay. 4 mice/point; 1000 PCE/mouse.

S 7.5 h 和 G<sub>2</sub> 1.5 h, 最后一次有丝分裂发生于正染性成红细胞排核从而转化为 PCE 之前约 6-8 h<sup>(6-7)</sup>。本文结果显示, 给予 cisplatin 后 18 h 前微核率未明显增高; 达到高峰的时间随剂量增大而后延, 表明顺式铂络合物对 DNA 模板的损害, 需经过 DNA 复制方使微核增多的效应表达出来, 并引起细胞分裂周期延迟。

迄今广泛采用 Schmid 推荐的方案。本文结果表明, 采样前 6 h 给 cisplatin 未能诱发微核率增高。因此, 用在体小鼠骨髓微核试验检测铂络合物的遗传毒性可于一次给药后 24 或 30 h 采样。

DMSO 用作诱变试验的溶剂, 可诱发大鼠骨髓染色体畸变与微核率增高<sup>(8)</sup>。我们给小鼠 ip DMSO 0.5 ml/kg, 结果也显示微核率显著高于蒸馏水对照组。

致谢 乔树民教授指导, 胡克震副教授指导统计处理, 张敏和马旋同志参加部分工作。

### 参 考 文 献

- 1 International Agency for Research on Cancer. Cisplatin. In: International agency for research on cancer, ed. *IARC Monographs on the carcinogenic risk of chemicals to human*. suppl 4. 1st ed. Lyon: IARC, 1982; 93-4
- 2 Bonatti S, Lohman PHM, Berends F. Induction of micronuclei in Chinese-hamster ovary cells treatment with Pt co-ordination compounds. *Mutat Res* 1983; 116 : 149
- 3 Schmid W. The micronucleus test for cytogenetic analysis. In: Hollaender A, ed. *Chemical mutagens: Principles and methods for their detection*. New York: Plenum, 1976; 4 : 31-53
- 4 Kastenbaum MA, Bowman KO. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. *Mutat Res* 1970; 9 : 527
- 5 Cole RJ, Taylor N, Cole J, Arlett CF. Shortterm tests for transplacentally active carcinogens: I. Micronucleus formation in fetal and maternal mouse erythroblasts. *Ibid* 1981; 80 : 141
- 6 Jenssen D, Ramel C. Factors affecting the induction of micronuclei at low doses of X-rays, MNS and dimethylnitrosamine in mouse erythroblasts. *Ibid* 1978; 58 : 51
- 7 Hart JW, Hartley-Asp B. Induction of micronuclei in the mouse revised timing of the final stage of erythropoiesis. *Ibid* 1983; 120 : 127
- 8 Čihák R, Srb V. Cytogenetic effects of quinoxaline-1,4-dioxide-type growth-promoting agents: I. Micronucleus test in rats. *Ibid* 1983; 116 : 129

## Micronucleus formation in mouse polychromatic erythrocyte induced by platinum coordination complexes

ZHONG Lai-fu, ZHANG Fu-qin, LIU Jun, XIA Yuan-xun

(Dept Hygiene, Dalian Medical College, Dalian 116012)

**ABSTRACT** The genotoxicities of cisplatin, malonato-1,2-diaminocyclohexane-platinum (II) (PHM), and sulfato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II) (SHP) were studied by bone marrow polychromatic erythrocyte (PCE) micronucleus assay of ♂ mice. An increase in the number of micronucleated PCEs was seen at and over the ip dose of cisplatin 0.19 mg/kg, PHM 5.6 mg/kg, and SHP 0.18 mg/kg. The dose-effect curves for these chemicals showed 2 or 3 phases with different slopes.

A significant increase of micronucleated PCEs did not occur until 18 h after cisplatin. For cisplatin, the maximum of micronucleated PCEs was dose-dependent; the frequency of micronuclei reached the

highest levels at 24 h after 0.24 mg/kg and at 30 h after 1.5 mg/kg. The results suggest that the expression of micronuclei induced by cisplatin may be dependent upon progression of cells through the DNA synthesis of the cell cycle, and the mitotic delay was induced. When genotoxicities of platinum coordination complexes were evaluated by the bone marrow PCE micronucleus assay, mice should be sampled at 24 or 30 h after a single ip.

**KEY WORDS** cisplatin, malonato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II); sulfato-1,2-diaminocyclohexaneplatinum(II); cell micronucleus; drug dose-response relationship