

氯霉素对大鼠胎肝细胞 DNA 修复合成的影响

王爱平¹、王肖鹏 (第二军医大学生物学教研室, 上海 200433, 中国)

Effect of chloramphenicol on DNA repair synthesis in fetal liver cells of rats

WANG Ai-Ping¹, WANG Xiao-Peng

(Department of Biology, The Second Military Medical College, Shanghai 200433, China)

ABSTRACT The inhibitory effect of chloramphenicol (CAP) on the DNA repair synthesis were studied on a primary cell culture of fetal liver tissue of rats. The fetuses were taken out with the umbilical cords and the placenta; then, the fetal livers were injected with a balanced salt solution and Type I collagenase through the umbilical vein. At the same time, the blood of the fetal livers were drained through the umbilical artery. The cells were detached at 10°C with a steel mesh. Chloramphenicol 1.6-403.8 mmol/L did not show significant increase in DNA repair synthesis. The unscheduled DNA synthesis(UDS) was active when the positive control 7,12-dimethylbenzanthracene(DMBA) was added alone to the culture in autoradiographic assay, but it was inactive when DMBA was added together with CAP. Therefore, it may be assumed that CAP has an inhibitory effect on the DNA repair synthesis.

KEY WORDS chloramphenicol; inbred strains rats; liver; DNA repair; cultured cells; autoradiography

摘要 本实验在国内首次建立了改良的胎鼠肝原代细胞培养物程序外 DNA 合成(UDS)检测致癌物的方法。用放射自显影检测结果表明,氯霉素在 403.8, 100.9,

25.2, 6.3 及 1.6 mmol/L 未引起 DNA 修复合成有意义的增加。当阳性对照物 DMBA 单独存在时具有 UDS 活性, 而 DMBA 与氯霉素同时存在时活性消失。这一结果提示氯霉素可能有抑制 DNA 修复的作用。

关键词 氯霉素; 近交系大鼠; 肝; 培养的细胞; 脱氧核糖核酸修复; 放射自显影术

治疗浓度的氯霉素就能引起 DNA 的损伤, 这在细菌和哺乳类细胞中都已证实⁽¹⁾。损伤后的 DNA 如果通过切除修复的方式修复, 可用程序外 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis, UDS) 试验检测。本实验用氯霉素处理 Wistar 胎鼠的肝细胞, 以了解氯霉素对 DNA 损伤同时的修复反应, 探讨氯霉素的毒性机理。

MATERIALS AND METHODS

氯霉素注射液, 杭州民生药厂生产; 7,12-二甲基苯并[α]蒽 (7, 12-dimethylbenz [α] anthracene, DMBA), Sigma 产品; I 型胶原酶, 上海医药工业研究院生产; Wistar 大鼠, ♀, 体重 258 ± SD 10 g, ♂, 266 ± 8 g, 复旦大学动物房提供。

给药方法 用不同浓度的氯霉素作细胞毒性预实验, 从 24 h 内无明显毒性到无存活细胞的剂量范围内选 403.8, 100.9, 25.2, 6.3 及 1.6 mmol/L 5 种剂量作 UDS 测定, 另设不处理和加等量 DMSO(二甲亚砜)的二个阴性对

Received 1988 Apr 25 Accepted 1989 Jun 2

¹ Now in Department of Biology, The Third Military Medical College, Chongqing 630038, China

照组。用 DMBA 1 mmol/L 为阳性对照。各组容量均为 25 μ l。为检测氯霉素与 DMBA 的相互作用,另设一联合给药组,在含 DMBA 1 mmol/L 的培养液中加入 0.03 g 氯霉素。

实验方法 雌雄大鼠 1:1 同笼,每晨做阴道涂片检查确定受孕日期。于孕 d 18 颈椎脱臼处死,取胎鼠肝细胞进行培养。用改良的 Williams 方法⁽²⁾进行 UDS 测定。消毒,剖腹连胎盘一起取出胎鼠,用 EDTA 0.5 mmol/L (溶于无 Ca^{2+} , 无 Mg^{2+} Hanks 液)经脐静脉对胎鼠全身灌注 2 min,同时经脐动脉放血。继之用含 I 型胶原酶 1667 nmol/s 的不完全 I 号培养液(I 号培养基,卫生部上海生物制品研究所出品,加入 L-谷氨酰胺 2 mmol/L,庆大霉素 125 IU/ml)灌注 5 min,剪断脐带,消毒,剖腹取出胎肝,置含胶原酶的不完全 I 号培养液中。用 80 和 180 目双层铜筛网分离肝细胞。10 $^{\circ}$ C 下 50 \times g 离心 4 min,除去胶原酶。这种经脐静脉灌注的胶原酶约 8/9 流经肝脏,同时冲走了肝内的各种血细胞,分离效果甚好。如果不经灌注直接取出胎肝置胶原酶中,用吸管反复吸打,分离效果也可,但混于其中的很多血细胞不易除去,影响肝细胞的附着和计数。离心后弃上清,加入适量完全 I 号培养液(I 号培养液中加入 10% 胎牛血清、L-谷氨酰胺 2 mmol/L、庆大霉素 125 IU/ml),制成细胞悬液。取少许悬液加入等量 0.4% 台盼兰染液,混匀,染色 2-3 min。计数细胞存活数。取 46 个直径 3 cm 的培养皿。各放二片 18 \times 6 mm² 小血盖片,灭菌后每皿加入 3 ml 完全 I 号培养液,并接种 0.5 \times 10⁶ 个细胞,置 5% CO₂ 温箱中使之附着,37 $^{\circ}$ C,湿度 95%,培养 1.5 h 后除去未附着细胞,重新加入 2.5 ml 完全 I 号培养液,37 $^{\circ}$ C 培养 2 h,取其中 10 皿做细胞毒性预备试验,另 36 皿继续培养 24 h 后做 UDS 检测。

细胞毒性预备试验、UDS 测定及放射自显影处理,按文献⁽²⁾方法进行。

用双盲法编号,在油镜下每一玻片随机选

读 50 个细胞,每组观察 3 个复本,共数 150 个细胞,计数一个细胞核中的核粒,减去本底数(计数核附近 3 个核大小的区域,取其平均数即为该细胞的本底数),即得净核粒数。

实验数据用方差分析处理。

RESULTS

细胞毒性存活测验结果显示,随着氯霉素浓度增加,细胞存活率逐步下降,培养 24 h 后比培养 2 h 时下降得更明显。(Fig 1)

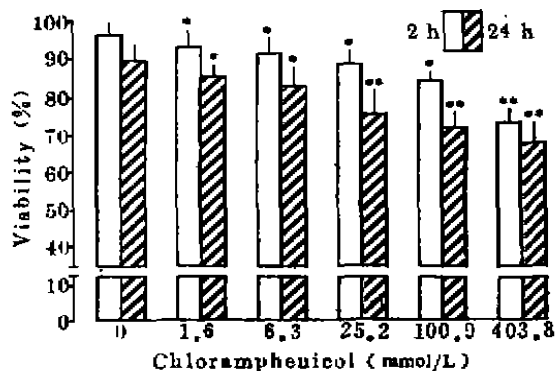


Fig 1. Chloramphenicol induced toxicity. Cultures of liver cells were used 2 or 24 h after initiation. $n = 1000$ cells/group, $\bar{x} \pm SD$. * $P > 0.05$, ** $P < 0.05$.

阳性对照组的净核粒数与文献上记载的结果⁽²⁾相近。阴性对照组的净核粒数在正常范围内,符合实验设计标准。氯霉素 3 个较高剂量组的净核粒数为 0。两个较低剂量组的净核率与阴性对照组无显著差异($P > 0.05$)。联合给药组的净核率等于零(Tab 1)。

DISCUSSION

实验结果表明培养所用的细胞对 UDS 是敏感的,适合于 UDS 的检测。经细胞活性测定,所用的氯霉素剂量在 3 个高剂量组已引起细胞毒性反应,在两个低剂量组细胞存活率与对照组无显著差异,说明采用的剂量适于 UDS 的测定。5 个剂量组的净核粒数与对照组无显著差异。其中 3 个高剂量组没有引发 UDS 形成。更有意义的是,当 DMBA 单独存在时,有

Tab 1. Effect of chloramphenicol (CAP) on unscheduled DNA synthesis (UDS) in liver primary cell cultures. No increase of average net grains per nucleus was seen by autoradiographic assay of UDS. $n = 150$ cells/group, $\bar{x} \pm SD$, * $P > 0.05$.

Drug	mmol/L	Grains/nucleus	% of cells with nuclear labeling >6 grains
Control	0	2.1±1.3	0
1% DMSO		1.9±2.2	0
CAP	1.6	0.8±0.4*	0
	6.3	1.0±0.2*	0
	25.2	0	0
	100.9	0	0
	403.8	0	0
DMBA	1	36.5±7.2	49
DMBA + CAP	1 + 403.8	0	0

DMBA = 7,12-dimethylbenz(α)anthracene

强烈的 UDS 活性, 而加入氯霉素后这种活性降至零. 这一结果提示, 氯霉素通过某种方式抑制 UDS 的产生.

氯霉素能使 DNA 的单链或双链断裂⁽¹⁾, 抑制哺乳类 DNA 合成⁽²⁾. 正常情况下 DNA 链损伤后, 在 S 期 DNA 合成抑制情况下也能刺激切除修复系统进行修复, 用放射自显影术检测 [³H]胸腺嘧啶核苷的参入应出现 UDS 活性. UDS 测试阴性提示氯霉素有抑制程序外 DNA 合成的作用, 使 DNA 切除修复过程不能进行. 这种抑制作用可能是氯霉素通过干扰靶细胞内线粒体和酶系统引起细胞严重代谢障碍, 使细胞正常活动不能进行所致⁽³⁾. 也可能是氯霉素

还原成亚硝基氯霉素后专一地抑制胸腺嘧啶核苷的参入使切除修复不能进行引起⁽²⁾. 氯霉素的硝基在啮齿类和人胎盘组织匀浆中及人肝脏提取物中能还原成亚硝基⁽⁵⁾. 许多肝脏致癌剂的致癌性能被氯霉素抑制⁽⁶⁾. 本实验中氯霉素对 DMBA 的 UDS 活性的影响从侧面证实了氯霉素的这种作用. 这可能与氯霉素影响了细胞蛋白质合成和能量代谢有关. 氯霉素影响 DNA 修复的程度与氯霉素浓度之间的关系有待研究.

感谢 本文承复旦大学刘祖洞教授审阅并指导.

REFERENCES

- 1 Skolimowski IM, Rowley DA, Knight RC, Edwards DI. Reduced Chloramphenicol-induced damage to DNA. *J Antimicrob Chemother* 1981; 7 : 593
- 2 Williams GM. Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat liver primary cell culture. *Cancer Res* 1977; 37 : 1845
- 3 Yunis AA, Harrington WJ. Patterns of inhibition by chloramphenicol of nucleic acid synthesis in human bone marrow and leukemic cells. *J Lab Clin Med* 1960; 56 : 831
- 4 Bartlett JG. Chloramphenicol. *Med Clin North Am* 1982; 66 : 91
- 5 Salem Z, Murray T, Yunis AA. The nitro reduction of chloramphenicol by human liver tissue. *J Lab Clin Med* 1981; 97 : 881
- 6 International Agency for Research on Cancer. *IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans*; vol 10. Lyon: WHO 1976; 85-98