

氟碳代血液的诱变性

钟宝珍 唐琪妮 周永贵* 忻佩君 丁训诚

(上海市劳动卫生职业病研究所毒理研究室, 上海 200003)

提要 从基因水平、细胞水平进行PFE的遗传毒理学评价。体外基因突变系采用鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株, 在微粒体酶S9活化测试系统中, 直接加入20% PFE溶液, 在0.1—0.6 ml剂量范围未见直接抑菌作用, 不诱发基因突变。对输注不同剂量PFE的兔和猴, 进行间期淋巴细胞微核; 培养淋巴细胞姐妹染色单体互换; 骨髓中期分裂相染色体畸变等几种细胞水平诱变指标检测结果表明均无诱变作用。在骨髓中PFE浓度为4 mg/g及血液中浓度为0.4 mg/ml时, 亦不诱发染色体畸变, PFE为一非诱变剂。

关键词 氟碳乳剂; Ames试验; 微核试验; 姐妹染色单体互换; 染色体畸变

中国科学院上海有机化学研究所合成全氟碳乳剂(perfluorocarbon emulsion, PFE)经一系列药理、毒理研究后证明在动物临床模拟实验应用中, 安全有效。1980年始中山医院

1981年12月23日收稿 1982年7月12日修回

* 本所肿瘤研究室

首次应用于临床报道 PFE 对 10 人主要脏器功能均无影响⁽¹⁾，进一步阐明 PFE 的远期细胞效应已属必要。本文采用微生物基因突变及哺乳动物染色体畸变等几种诱变性检测指标，对该化合物进行遗传毒理学评价。

材 料 和 方 法

PFE 由中国科学院有机化学研究所提供。批号 800806 和 810507。成年大耳白兔，体重 $3.0 \pm (SD) 0.5 \text{ kg}$ ♂ ♀ 兼用。恒河猴 (*Macaca mulatta*) 10—12 岁。体重 $6.0 \pm 1.0 \text{ kg}$, 3 ♀ 1 ♂。

观察指标及方法

1. 微生物基因突变试验 Ames 试验⁽²⁾ 鼠伤寒沙门氏菌组氨酸缺陷型菌株 TA 98 (以检测引起移码突变); TA 100 (以检测诱发碱基置换突变)，加或不加大鼠肝微粒体酶系 S 9 活化，直接加入 20% PFE 液，每皿 0.1, 0.3, 0.6 ml，观察计数回复突变菌落数，同时作需 S 9 代谢活化的阳性诱变剂环磷酰胺 (cyclophosphamide, CP), 4-乙酰氨基苄 (4-acetylaminofluorene, 4-AAF) 及直接诱变剂 4-硝基喹啉 (4-nitroquinoline, 4-NQ) 测定及自发回复突变对照培养，比较菌落数。

2. 外周淋巴细胞微核测定⁽³⁾

3. 骨髓细胞中期分裂相染色体畸变测定 按照 3 mg/kg 剂量秋水仙素 ip，2 h 后剖杀取股骨骨髓于 37℃ 预温生理盐水中，充分吹打，弃残渣，200 × g 离心 10 min 沉淀细胞，0.05 M KCl 低渗于 37℃ 水浴中放置 20 min，离心，甲醇:冰醋酸 3:1 固定 2—3 次，放冰箱过夜，次日冰片制片、干燥、1:10 吉氏:磷酸缓冲液 (1/10 M, pH 7.4) 染色，空气干燥、镜检 50 个分裂相，记录数目及结构畸变率。

4. 培养淋巴细胞姐妹染色单体互换测定 (SCE)⁽⁴⁾

5. 血液，骨髓中 PFE 含量测定 毛细管色谱法，分离条件，SE-30，SCOT 柱，长 27 m，内径 0.3 mm，n/m 1000，检测器 FID，柱温 80℃，尾吹 N₂，分流比 50:1。

低剂量亚急性输注试验 家兔 ♂ 5 ♀ 7，随机分成实验组，6 兔 ip PFE 4 ml/kg/d × 5 d (最大耐受量)。对照组 6 兔 iv 生理盐水，于 PFE 在网内系统滞留浓度最高的第 6 d 处死，观察骨髓细胞中期分裂相染色体畸变；间期淋巴细胞微核；培养淋巴细胞 SCE 等改变。

大剂量亚急性输注试验 家兔 ♂ 6 ♀ 3，随机分成实验组 4 兔 iv PFE 20 ml/kg/d × 7 d (相当 2 倍总血量)。对照组 5 兔 iv 生理盐水，第 8 d 处死观察淋巴细胞微核及 SCE。

猴急性大剂量输注试验 猴 4 只 (3 ♀ 1 ♂) 以 5 ml/min 速度 iv 60 ml/kg，相当于目前临床试用的最高剂量，比较药前及药后 3 d 和 7 d 淋巴细胞微核；SCE 及培养淋巴细胞染色体畸变的影响。

结 果

微生物基因突变 TA 98 和 TA 100 是由一个抗药转移因子置于 TA 1535, TA 1538 而成的二个新菌株，对检出致变性和致癌性更为有效，常用于测试化合物的诱变作用，体外直接加入 20% PFE 液 0.6 ml 时，未见抑菌作用。二种菌株无论加或不加 S 9 活化处理的不同剂量组，均未见回变菌落数增加，与阳性致变剂 4-NQ, CP, 4-AAF 及空白皿比较，结果阴性，见表 1 最高剂量组经多次实验，未见抑菌作用，表 1 中所示 TA 98 自发回变数较高于测试组，可能与琼脂厚度有关。

生物样品中 PFE 含量 家兔 5 d 内总输注量达 50 ml 后，第 6 d 血中浓度为 0.4 mg/ml 骨髓中为 4 mg/g，与肝、脾、肾、肺含量比较，血中浓度最低，迅速由 24 h 最高峰下降，肝、脾含量较高，骨髓仅次于脾脏。

外周淋巴细胞微核率变化 家兔低剂量及大剂量输注及猴一次大剂量输注后 5—7 d，未见 PFE 对染色体的损伤作用，实验前后无明显改变 (表 2)。

骨髓中期分裂相染色体畸变检测 兔低剂量输药组和对照组骨髓细胞染色体分析，除偶见半体裂隙畸变外，无其他结构畸变检得，染

Table 1. *Salmonella*/microsome tests on PFE using strains TA 98 and TA 100

| Chemical treatment | Dose/plate | Revertant colonies on a plate ($\bar{x} \pm SD$) | | | |
|-----------------------|------------|--|--------------|------------|------------|
| | | TA 98 | | TA 100 | |
| | | +S 9 | -S 9 | +S 9 | -S 9 |
| 20% PFE emulsion | 0.1 ml | 18 ± 6* | 25 ± 1* | 205 ± 78* | 178 ± 15* |
| | 0.3 ml | 20 ± 4* | 26 ± 6* | 244 ± 35* | 140 ± 21* |
| | 0.6 ml | 24 ± 11* | 30 ± 4* | 264 ± 20* | 200 ± 10* |
| Cyclophosphamide | 1.0 mg | | | 512 ± 121* | |
| 4-Acetylaminofluorene | 0.2 mg | 530 ± 121*** | | | |
| 4-Nitroquinoline | 0.2 mg | | 1000 ± 10*** | | 900 ± 10** |
| Spontaneous | | 45 ± 6 | 20 ± 5 | 226 ± 7 | 205 ± 19 |

* $P > 0.05$, ** $P < 0.05$, *** $P < 0.01$

Table 2. Micronuclei tests in the lymphocytes of rabbits and monkeys infused with PFE. A total of 1000 cells from each animal was studied

| Animals | Infusion dose | Micronucleated cells % ($\bar{x} \pm SD$) | |
|-----------|------------------|--|----------------|
| | | Before infusion | After infusion |
| 6 Rabbits | 4 ml/kg/d × 5 d | 0.2 ± 0.4 | 0.2 ± 0.4* |
| 4 Rabbits | 20 ml/kg/d × 7 d | 0.4 ± 0.5 | 0.5 ± 0.5* |
| 4 Monkeys | 60 ml/kg | 0.8 ± 1.0 | 0.5 ± 0.6* |

* $P > 0.05$

色半体裂隙在正常动物亦可出现。一般不超过5%，本实验结果<1%，属正常。染色体数目在实验及对照组均出现12—14%的非正倍体染色体，正常二倍体细胞数在86—87%范围，组间无差异。(表3)猴输药后的不同阶段，外周血培养淋巴细胞中期分裂相无论是数目或结构畸变均未见增加。(表4)。该实验组中，猴一次输注PFE按血容量7%计算，相当为全血量的1/2，根据药物代谢研究结果，一周后骨髓中PFE的滞留量仍在高水平，因此PFE对血液细胞的增殖、分裂不显示明显的作用。

SCE测定 三项实验结果表明，用药前后交换数未见显著增加($P > 0.05$)，PFE不诱发DNA损伤。见表5与图1。

讨 论

诱变作用的分子生物学基础是遗传物质载体——染色体基因的DNA分子上某些碱基的缺失、替换或排列顺序的改变，由此引起核酸

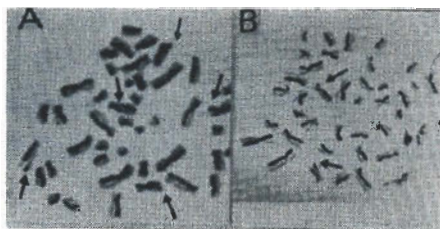


Fig 1. Sister chromatid exchanges (arrows) in 2 cells from the cultured lymphocytes of a rabbit treated with PFE 4 ml/kg/d × 5 d (A) and a monkey treated with PFE at 60 ml/kg (B).

Table 3. Chromosome studies of bone marrow cells from rabbits with or without infusion of PFE, 6 rabbits/group. A total of 50 cells was examined in each rabbit, $\bar{x} \pm SD$

| Dose | Chromosome number (%) | | Chromatid gap |
|-----------------|-----------------------|------------------------|---------------|
| | Diploid (2n = 44) | Aneuploid (2n ≠ 44) | (%) |
| Control | 87.7 ± 4.9 | 12.3 ± 5.2 | 0.3 ± 0.8 |
| 4 ml/kg/d × 5 d | 86.3 ± 7.2* | 13.7 ± 7.2* | 0.6 ± 1.0* |

* P > 0.05

Table 4. Chromosome studies of cultured lymphocytes from monkeys before and after infusion of PFE at 60 ml/kg. A total of 50 cells was examined in each monkey

| Monkeys | | Chromatid gap (%) | | |
|------------|-----|--------------------|-----------------------|-----|
| Wt (kg) | Sex | Before infusion | After infusion 3 d | 7 d |
| 7.0 | ♀ | 0 | 6 | 4 |
| 6.5 | ♀ | 4 | 0 | 4 |
| 6.0 | ♀ | 4 | 2 | 2 |
| 5.0 | ♂ | 4 | 4 | 0 |

Table 5. Sister chromatid exchanges (SCE) per cell in rabbits (R) and monkeys (M) before and after infusion of PFE, 20 cells were studied per animal.

| Dose of PFE | No. of animal | SCE/cell ± SD | | |
|-------------------|------------------|--------------------|-----------------------|------------|
| | | Before infusion | After infusion 3 d | 7 d |
| 4 ml/kg/d × 5 d | 6 R | 3.5 ± 0.9 | | 3.8 ± 1.2* |
| 20 ml/kg/d × 7 d | 4 R | 4.0 ± 1.1 | | 3.7 ± 1.4* |
| 60 ml/kg | 4 M | 2.3 ± 0.3 | 2.6 ± 0.9* | 3.6 ± 1.1* |

* P > 0.05

相应部位损伤而改变了代谢过程和遗传性状。药物是突变的外因之一，能否引起 DNA 大分子物质的损伤，取决于化学物质的代谢活性。已知一些诱变剂通过代谢活化后生成带阳电荷的亲电化合物与 DNA 呈共价结合而造成损伤。

PFE 的理化特性业已阐明，在常温下与强酸、强碱、强氧化剂作用均不起化学反应，呈现良好化学稳定性。经生物体毒性测试，具有类似麦芽糖、葡萄糖的毒性，被认为是近似

无毒化学物质。作为异物颗粒，致使机体网状内皮系统的吞噬功能出现一过性抑制，但能迅速恢复。对肝脏的一些重要代谢机能，肝细胞线粒体功能、肝细胞结构，均无损害⁽⁶⁾。经临床初步应用，未见不良反应。

无论从基因水平或细胞水平的几项诱变性检测结果均显示 PFE 无诱变作用。与日本报道^(6,7)一致，体外 S9 活化及经体代谢后，骨髓最高含量达 4 mg/g 时，未见对细胞生长的直接抑制作用。不具有直接干扰或参与 DNA

复制、蛋白质代谢或细胞增殖、分裂过程的影响,不表现有代谢活性而仅对 O₂ 和 CO₂ 的专一性运载作用。

致谢 本文承 Dr. Chester C. Huang (Department of Experimental Biology, Roswell Park Memorial Institute, Buffalo, NY 14263, USA) 审阅。

参 考 文 献

1 熊汝成、章仁安、陈惠方、黄维垣、骆昌平、曹文娟. 中华外科杂志 1981年4月; 19(4):213

- 2 Ames BN, McCann J, Yamasaki E. *Mutat Res* 1975 Dec; 31(6):374
- 3 唐琪妮、钟宝珍. 上海医学 1979年8月; 2(8):77
- 4 钟宝珍、唐琪妮、刘春芳. 同上 1980年6月; 3(6):35
- 5 Riess JG, Blanc NL. *Angew Chem [Engl]* 1978 Sep; 17(9):621
- 6 Naito R, Yokoyama K. Technical Information Ser. №. 5. Osaka: The Green Cross Corp, 1978 June; 161
- 7 光野孝雄、大柳治正. 医学のあゆみ 1978年4月; 105(5):553

Acta Pharmacologica Sinica 1983 Mar; 4(1):35-39

MUTAGENECITY OF FLUOROCARBON BLOOD SUBSTITUTE

ZHONG Bao-zhen, TANG Qi-ni, ZHOU Yong-gui, XIN Pei-jun, DING Xun-cheng
(Department of Toxicology, Shanghai Institute of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, Shanghai 200003)

ABSTRACT Assessment of genotoxicity on perfluorocarbon emulsion (PFE) was carried out at both gene and cellular levels. Histidine-requiring mutants of *Salmonella typhimurium* TA 98 and TA 100 strains with or without S9 mix activation were used for point mutation tests.

Neither increasing of revertants nor inhibition of bacterial growth was seen when 20% of PFE 0.1-0.6 ml were directly added to the plates.

Rabbits and monkeys were used for study on cytogenetic effects of PFE. Peripheral lymphocytes were sampled before and after infusion of PFE for micronuclei tests and sister chromatid exchanges (SCE). Bone marrow cells were used for chromosome aberration studies. Rabbits

infused with PFE 4 ml/kg/d × 5 d and at 20 ml/kg/d × 7 d or monkey at 60 ml/kg showed that the frequencies of micronuclei cells or the number of SCE/cell were not increased. The rate of chromosome aberration in the treated animals were not increased either. The dose used for monkeys in the study (60 ml/kg) was equivalent to the maximal dose used in the clinics. In the rabbits, after infusion of PFE 4 ml/kg/d × 5 d, we found PFE 4 mg/g bone marrow and 0.4 mg/ml blood. These results indicated that PFE caused no genotoxic effects even at the high dose 60 ml/kg.

KEY WORDS fluorocarbon emulsions; Ames test; micronuclei test; sister chromatid exchange; chromosome aberrations