

从 *HPRT* 和 *CD59* 基因的变化 研究石英 (MQZ) 的诱变效应*

吴李君^{1,2} 冯慧云 黑国庆¹ 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所 合肥 230031)

(¹哥伦比亚大学辐射研究中心 纽约 10032)

R135

R329.28

摘要 通过用 31, 62.5, 125 和 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MQZ 剂量处理人与中国仓鼠杂交 AL 细胞 24 h, 探讨石英对细胞生长、存活和突变效应。研究发现, 细胞对 MQZ 微粒的吞噬作用随着处理剂量的增加而增大, 吞噬的 MQZ 微粒多位于细胞质中。细胞的存活率与处理剂量成正比。基因突变率研究显示, MQZ 的致突变效应并不强, 对于 *HPRT* 基因位点, 其最高处理剂量 ($\rho = 500 \mu\text{g}/\text{mL}$) 的基因突变率略高于 4 Gy 的 γ 射线的突变频率; 而在 *CD59* 基因位点, MQZ 诱发的突变子数仅为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石棉 (chrysotile asbestos) 诱发突变子数的 1/5 ~ 1/6。此外, 在 *CD59* 基因位点, 其突变效应呈现出饱和效应, 并不随剂量的增加而增加。图 2 参 9

关键词 MQZ; AL 细胞; 基因突变 石英 诱变效应 危害 人体

CLC Q754 : P619.233

STUDIES ON THE MUTAGENICITY OF MQZ (QUARTZ) PARTICLES THROUGH THE ALTERATION OF *CD59* AND *HPRT* GEN LOCI

WU Lijun, FENG Huiyun, HEI Guoqing¹ & YU Zengliang

(*Institute of Plasma Physics, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China*)

(¹*Center for Radiological Research, Columbia University, New York 10032, USA*)

Abstract MQZ (Quartz) samples were examined for their cytotoxicity and mutagenicity in the human-hamster hybrid AL cells treated with grading doses of 31, 62.5, 125 or 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ of MQZ for 24 h. The results indicated MQZ-treated AL cells showed uptake of particles increased, and mostly, the particles were stored in the cytoplasm in the perinuclear location. The survival fractions showed a dose-dependent decrease with the increasing doses. Compared with the known mutagens, the mutagenicity of MQZ was not strong. For *HPRT* gene locus, the mutant frequency by the high cytotoxic dose of 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ was only a little higher than that of a 4 Gy γ rays, and for *CD59* gene locus, the mutant yield was insignificant compared to the yield by a 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ chrysotile asbestos fibers. In addition, the dose-response pattern of MQZ-induced mutation induction at *CD59* gene locus showed a plateau level. Fig 2, Ref 9

Keywords MQZ; AL cells; mutation

CLC Q754 : P619.233

石英是晶态硅中最常见的存在形式,也是地壳中含量第二的矿物质。流行病学研究发现,职业性地暴露于石英或其它类型的晶态硅粒可诱发肺的纤维化和硅化以及增加肺癌的可能性^[1-2]。由于石英也是普通人群中最常见的吸入肺部的矿物质^[3],因此了解石英的潜在的危害及其机理对于人类的健康防护非常重要。本研

收稿日期: 2000-06-05 接受日期: 2000-07-23

- 美国 NIH 项目资助 (ES05801)

* * 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: ljwl@mail.ipp.ac.cn

究从基因突变的角度,探讨了石英(MQZ)对细胞的影响。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

AL 细胞(美国哥伦比亚大学 Hei 博士惠赠)在含 8% 胎牛血清(FBS), 25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸庆大霉素, 2×10^{-4} mol/L 甘氨酸的 Ham F12 (GIBCO) 培养液中 37 $^{\circ}\text{C}$, 饱和湿度, 5% CO_2 条件下培养。进行试验前, 细胞被筛选以降低 *HPRT* 和 *CD59* 基因自发突变率^[6]。试验用 AL 细胞 *CD59* 基因自发突变率平均 22×10^{-5} , *HPRT* 基因自发突变率平均 1.2×10^{-5} 。

1.2 Min-U-Sil 5(MQZ) 样本

美国国家癌症研究所 Saffiotti 博士惠赠。Min-U-Sil 5 按实验需要的数量称出, 灭菌后悬浮在 F12 培养基中制备成最高处理剂量($\rho = 500 \mu\text{g}/\text{mL}$), 超声波处理 3-4 min 后, 逐步稀释成 250, 125, 62.5 和 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 等浓度。

1.3 细胞存活率与突变率测定

AL 细胞经不同剂量 MQZ 处理 24 h 后, 用 HBSS 缓冲液清洗 3 遍, 细胞经酶解取下, 进行存活率检测^[4]。*CD59* 基因和 *HPRT* 基因突变率试验参考文献^[4]。4 Gy γ 射线在 *HPRT* 基因位点和 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 石棉(chrysotile asbestos)在 *CD59* 基因位点诱导的突变率被分别作为阳性对照。

2 结果

2.1 MQZ 对细胞生长的影响

用 MQZ 处理细胞显示出细胞对石英微粒的吞噬作用, 且这种吞噬活性随着 MQZ 处理剂量的增大而增加。显微观察发现, 被吞噬的 MQZ 微粒大多数储存在细胞质中靠近细胞核周围的位置。此外, 我们的结果还显示, 细胞的生长受抑制的程度也与 MQZ 处理剂量成正比。

2.2 细胞存活率

图 1 显示不同剂量 MQZ 处理 AL 细胞 24 h 的存活率。当 ρ 为 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 细胞的致死率达 80.4%; 为 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 致死率为 68.1%, 类似于 4 Gy γ 射线的致死效率。在 125, 62.5 和 31 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时, 致死率分别为 56.1%, 37% 和 13.5%, 显示了细胞致死率与暴露剂量的正相关关系。

2.3 细胞突变率

图 2 显示不同剂量的 MQZ 处理 AL 细胞 24 h 在 *HPRT* 和 *CD59* 基因位点的突变频率。从图中我们可以看出, 低剂量的 MQZ 处理(31, 60.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 几乎不能诱导 AL 细胞的 *HPRT* 基因位点突变子的产生, 其突变率接近该基因的自发突变率(1.2×10^{-5})。其它处理剂量(125, 250, 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$), 突变率虽有所增加, 但仍不显著, 即便是 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 MQZ 诱发的突变率仅略高于 4 Gy γ 射线的诱变频率(3.9×10^{-5})。与此相类似, MQZ 对 *CD59* 基因位点的诱变率也显示了相同的趋势: 最大处理剂量的石英也仅相当于 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的石棉(chrysotile asbestos)处理 AL 细胞 24 h 诱导的突变频率(113.5×10^{-5})的 1/5 ~ 1/6, 说明石英是一个非常弱的诱变物。此外, *CD59* 基因位点的诱变研究还显示 MQZ 的诱变效应在处理剂量高于 62.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 后处于饱和状态, 诱导的突变子数不再随 MQZ 处理剂量的增加而增大, 这一发现与 Saffiotti 等用不同类型石英处理 BALB/3T3/A31-1-1 细胞均出现恶性转化率饱和和效应相一致^[5]。

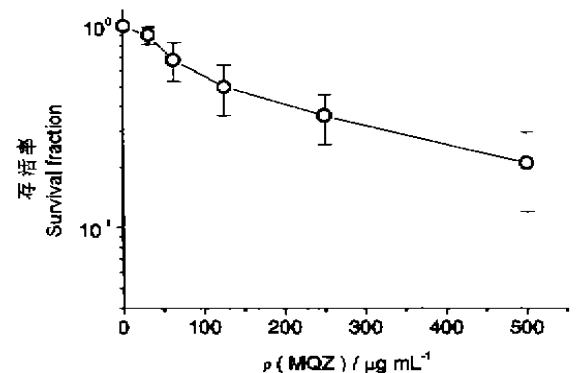


图 1 不同剂量 MQZ 处理 AL 细胞的存活率曲线
Fig.1 Doses response survival of AL cells treated with graded doses of MQZ

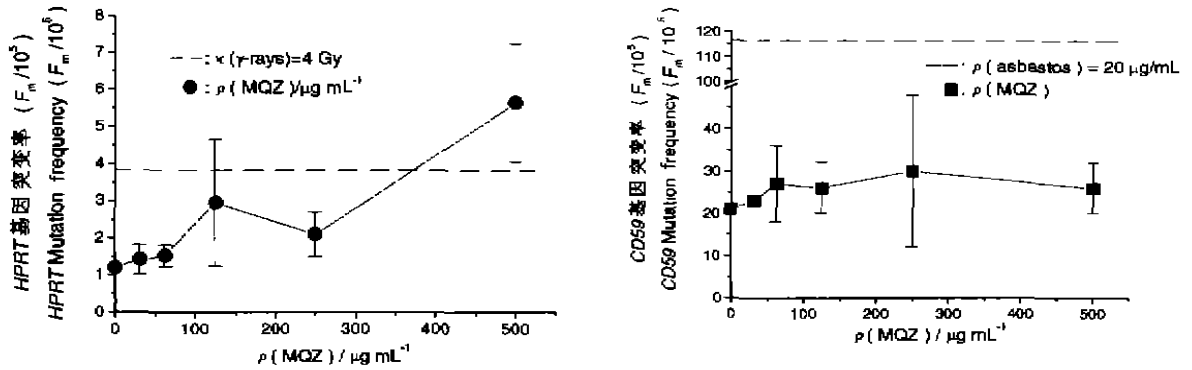


图2 不同剂量的MQZ处理AI细胞在HPRT和CD59基因位点的诱变率

Fig.2 Mutation frequency at HPRT and CD59 gene loci in AI cells treated with different doses of MQZ.

3 讨论

自然界中的石英有很多种存在形式, MQZ 是其中较为广泛的一种. 研究石英的致瘤性显示, 用石英处理 BALB/3T3/A31-1-1 和 SHE 细胞可引起这些细胞系的恶性转化, 将这些转化细胞接入小鼠, 在 1~5 wk 内可诱发小鼠长出肿瘤^[5-6]. 研究还显示石英处理可增加细胞中微核和双核的诱导频率^[7], 诱导自由基的产生^[8-9], 引发 DNA 的损伤^[9] 等. 本研究从突变的角度, 通过 MQZ 对 AI 细胞 HPRT 和 CD59 基因位点的变化探讨石英的致突变性, 以提供石英致肿瘤发生的分子机理. 我们的研究结果显示, 相对于石棉(chrysotile asbestos)或 γ 射线等诱变源, MQZ 的诱变效应相对较弱, 特别是在 CD59 基因位点, MQZ 诱导的突变子数仅是相同处理时间石棉(chrysotile asbestos, $\mu = 20 \mu\text{g/mL}$) 诱导突变子数的 1/5~1/6, 这与 Saffiotti 等的研究证明石英在 BALB/3T3/A31-1-1^[5] 和 SHE^[6] 细胞中的较强的恶性转化率不相一致. 我们分析这可能与石英处理细胞时间相关. 在 Saffiotti 等的研究中, 石英(MQZ)处理细胞的时间为 72 h^[5], 而在我们的研究中, 石英处理细胞时间仅为 24 h. 其次, 石英的对细胞的损伤可能存在着与其它诱变物的互作效应, 有研究显示 MQZ 与 Hematite 的共同作用可增加 MQZ 的细胞致死率, 而 Hematite 本身对细胞无任何杀伤性^[5]. 此外, MQZ 微粒的大小可能对其诱变效应也有重要的影响, Williams 等的发现(私人通信), $d \leq 0.5 \mu\text{m}$ 的石英微粒会偶尔地沉积在细胞核内. 这种微粒核沉积的数量是否会影响细胞的恶性转化率、突变率, 我们目前还不清楚.

参考文献

- 1 International agency for research on cancer, silica. In: "IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. Vol. 42; silica and some silicates." Lyon, France: International Agency for Research on Cancer, 1987. 39~143
- 2 Goldsmith DF. Silica exposure and pulmonary cancer. In: Samet JM ed "Epidemiology of lung cancer." New York: Marcel Dekker, 1994. 245~298
- 3 Chung A, Wright B, Stevens B. Exogenous mineral particles in the human bronchial mucosa and lung parenchyma. 1: Nonsmokers in the general population. *Exper Lung Res.* 1990, **16**:159~175
- 4 Zhu LX, Waldren CA, Vannais D, Hei TK. Cellular and molecular analysis of mutagenesis induced by charged particles of defined linear energy transfer. *Radiat Res.* 1996, **145**:251~259
- 5 Saffiotti U, Ahmed N. Neoplastic transformation by quartz in the BALB/3T3-A31-1-1 cell line and the effects of associated minerals. *Teratogenesis Carcinog and Mutagen.* 1995, **15**:339~356
- 6 Hesterberg TW, Barrett JC. Dependence of asbestos-and mineral dust-induced transformation of mammalian cells in culture on fiber dimension. *Cancer res.* 1984, **44**:2170~2180
- 7 Hesterberg TW, Ostmann M, Brody AR, Barrett JC. Asbestos and silica induce morphological transformation of mammalian cells in culture: A possible mechanism. In: Goldsmith DF, Winn DM, Shy CM ed "Silica, Silicosis, and Cancer." New York: Praeger, 1986. 177~190
- 8 Daniel LN, Mao Y, Saffiotti U. Oxidative DNA damage by crystalline silica. *Free Radic Biol Med.* 1993, **14**:463~472
- 9 Saffiotti U, Daniel LN, Mao Y, Shi X, Williams AO, Kaighn ME. Mechanisms of carcinogenesis by crystalline silica in relation to oxygen radicals. *Environ Health Perspect.* 1994, **102**(Suppl 10):165~171