

· 论 著 ·

不同剂量环磷酰胺诱发 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的比较

冯媛瑜 魏莲 陈永忠 王立辉 陈骁熠*

摘要:目的 探讨环磷酰胺(CP)不同剂量、不同取材时间对 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的影响。方法 对小鼠一次性腹腔注射不同剂量的 CP(25、50、100mg/kg·BW)后,于不同时间(给药后 12、18、24、36、48、72h)取材股骨制作骨髓涂片,观察 CP 对 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的影响。结果 高、中、低 3 个剂量组的小鼠骨髓红细胞微核率与溶剂对照组相比较,其差异具有统计学意义($P<0.05$),且 3 个剂量组之间两两比较差异均有统计学意义($P<0.05$),并表现出明显的剂量-反应关系;不同取样时间对小鼠骨髓细胞微核率的影响具有统计学意义($P<0.05$)。本实验室条件下,给 NIH 小鼠一次性腹腔注射 CP 后 12~48h 股骨取材均可取得较高的微核率,其中以 24h 微核率最高。结论 CP 作为微核试验的阳性对照其剂量范围为 50~100mg/kg·BW,给药后 24h 取材最佳,给药 12~48h 股骨取材均可获得较高的微核率。

关键词: 环磷酰胺;小鼠;骨髓;微核

中图分类号:R-332 文献标识码:A 文章编号:1009-9727(2012)5-535-04

Comparison of erythrocyte micronuclei frequency in NIH mouse thigh-bone marrow induced by different doses of cyclophosphamide. FENG Yuan-yu, WEI Lian, CHEN Yong-zhong et al. (Guangzhou Medical University, Guangzhou 510182, Guangdong P. R. China Corresponding author: Chen Xiao-yi E-mail: wchenxyl@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To explore effect of different doses of cyclophosphamide (CP) and sampling time on erythrocyte micronucleus frequency in NIH mouse thigh-bone marrow. Methods Mice were injected intraperitoneally with different single dose of CP (25, 50, 100mg/kg·BW), then femoral marrow from mice were obtained at different time (after the administration of 12th, 18th, 24th, 36th, 48th, 72nd h) and marrow slides were made. Changes of erythrocyte micronuclei frequency that CP induced on NIH mouse thigh-bone marrow were observed. Results Compared to the control group, significant difference of erythrocytes micronucleus frequency was found in mice thigh-bone marrow among three groups (high dose group, middle dose group and low dose group) ($P<0.05$). It was showed that statistically significance existed ($P<0.05$) between any two of three dose groups, demonstrating a clear dose-response relationship. Also there was statistical significance ($P<0.05$) in erythrocyte micronucleus frequency in mice thigh-bone marrow obtained at different sampling time. 25, 50, 100mg/kg·BW cyclophosphamide might lead to increasing of erythrocyte micronuclei frequency in NIH mice thigh-bone marrow under our laboratory conditions, showing a dose-response relationship and a time-effect relationship in a certain range of dose. High micronucleus frequency was obtained when femoral bones from mice were taken 12~48h after injection of cyclophosphamide into mice. Maximum of micronucleus frequency was got 24h after injection. Conclusion It was optimal that when dose range of CP as a positive control was 50~100mg/kg·BW and especially 24h after administration and high micronucleus rate 12~48h after injection CP can be obtained.

Key words: Cyclophosphamide; Mouse; Marrow; Micronucleus

微核试验是化合物毒理学安全性评价的必做试验之一,广泛用于染色体损伤和干扰细胞有丝分裂的化学毒物的快速检测,研究受试物或其代谢产物到达靶组织的情况。它与体外试验的细菌诱变和细胞染色体畸变试验组合成为一较为科学合理而完整的评价系统。关于微核试验的阳性对照物 CP 已见报道,但是关于采用 NIH 小鼠的文献报道中,其取材时间点的选择仅在用药后 18~48h^[1],未能反应用药后其他时

间点微核率的变化趋势。故本实验以 CP 为诱变剂,采用不同剂量一次给药后以 12~72h 时间点取样,同时以骨髓红细胞为靶细胞,探讨给药剂量、取材时间对 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的影响,以期微核试验方法的标准化与优化提供依据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂 小牛血清(四季青,浙江天杭生物科技有限公司);环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公

基金项目:广东省科技攻关项目(No.83047)

作者单位:广州医学院,广东 广州 510182

作者简介:冯媛瑜(1980~),女,本科,助理实验师,主要从事实验动物学实验及教学工作。

* 通讯作者: Email:wchenxyl@yahoo.com.cn.

司),用生理盐水配制;显微镜(Nickon 公司),低速离心机(BECKMAN 公司),甲醇(分析纯) pH6.8 的磷酸盐缓冲液,1.9Giemsa 染色液,0.004%的柠檬酸液。

1.2 动物分组与处理 本研究选择 NIH 小鼠 240 只,由广州医学院实验动物中心提供,体重均为 20~25g,雌雄各半,称重,编号,随机分为 4 组:阴性对照组(0mg/kg·BW,也可称溶剂对照组)、低剂量组(25mg/kg·BW)、中剂量组(50mg/kg·BW)、高剂量组(100mg/kg·BW),每组 60 只,按 0.1ml/10g·BW 腹腔注射给药,溶剂对照组用生理盐水代替,随后再将每组动物随机分为 6 小组,每组 10 只,分别于给药结束后 12、18、24、36、48、72h 用颈椎脱臼法处死、取样。

1.3 取样方法与处理 本实验中均取股骨髓制作涂片。股骨取材时分离一侧股骨,剔除干净,剪断两端骨髓后,用 1ml 小牛血清冲洗骨髓腔至 1.5ml 离心管中,1 000r/min 离心 5min,弃上清液后摇匀推片。晾干后的骨髓片均用甲醇固定 15min,Giemsa 染色 21 min,然后冲洗、晾干、镜检。各剂量组的每只小鼠均使用股骨髓作涂片。同时根据涂片染色的深浅程度使用 0.004%的柠檬酸液(1%的贮存液用蒸馏水稀释 250 倍)处理数秒钟。然后用蒸馏水充分洗净柠檬酸液,风干后备用待观察。

1.4 观察计数 采用双盲法阅片,每张片子计数 1 000 个嗜多染红细胞(Polychromatic erythrocytes,PCE),记录含有微核的嗜多染红细胞数(Micronucleated polychromatic erythrocytes,MNPCE),计算微核率(%)。

阅片时先在低倍镜下进行观察,选择分布均匀,染色较好的区域,再在油镜下观察计数。多染红细胞(Polychromatic erythrocytes,PCE)呈灰蓝色,正染红细胞(Normochromatic erythrocytes,NCE)呈桔黄色。细胞中的微核多数呈圆形,边缘光滑整齐,嗜色性与核质一致,呈紫红色或蓝紫色。一个细胞内可出现一个或多个微核。出现多个微核的 PCE 按一个计算。同时计数 200 个细胞中 PCE 与 NCE 的比值判断 CP 的毒性以调整 CP 的染毒剂量。

1.5 统计方法 所有数据采用 SPSS 11.0 统计软件分析,以率及 $\bar{x} \pm s$ 进行统计描述。用二因素析因设计方差分析比较不同剂量组不同取样时间点的微核率差异及不同剂量与不同取样时间下小鼠骨髓细胞微核率的变化趋势。用 Pearson 相关分析比较不同剂量 CP 诱发 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的剂量-反应关系及注射 CP 后不同时间 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的时间-效应关系。以 $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 不同剂量 CP、不同取样时间对小鼠骨髓细胞微核率的影响 由表 1 可知,经二因素析因设计方差分析发现,不同剂量与不同取样时间二个因素对小鼠骨髓红细胞微核率的影响有交互作用($F=1\ 405.016$, $P < 0.05$),且它们各自的单独效应(对小鼠骨髓红细胞微核率的影响)均有统计学意义($P=0.000$)。

表 1 不同剂量、不同取样时间的小鼠骨髓细胞微核率比较(n=10)

Table 1 Comparison of erythrocyte micronucleus rate in NIH mouse thigh-bone marrow with different dosages of cyclophosphamide(CP) at different sampling time dosage

| 组别(Groups) | 剂量 Dose | 微核率(micronucleus rate % $\bar{x} \pm s$) | | | | | |
|------------------------|-------------|---|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| | | 12 h | 18h | 24 h | 36 h | 48 h | 72h |
| 溶剂对照组 Control group | 0mg/kg·BW | 1.00± 0.67 | 0.80± 0.79 | 1.60± 0.52 | 1.00± 0.67 | 1.00± 0.67 | 1.00± 0.67 |
| 低剂量组 Low dose group | 25mg/kg·BW | 1.80± 0.79 | 2.80± 0.79 | 3.40± 0.52 | 2.60± 0.52 | 1.80± 0.42 | 1.80± 0.79 |
| 中剂量组 Middle dose group | 50mg/kg·BW | 4.40± 0.52 | 21.40± 1.26 | 24.80± 0.79 | 22.00± 1.49 | 20.20± 1.23 | 2.80± 0.79 |
| 高剂量组 High dose group | 100mg/kg·BW | 13.80± 1.23 | 35.20± 1.81 | 77.80± 1.23 | 56.80± 1.23 | 47.40± 1.71 | 13.20± 1.23 |

2.2 不同剂量 CP 给药后不同时间取样小鼠骨髓红细胞微核率的变化趋势 经 SNK 多重比较,由表 2 结果可知,100mg/kg·BW 组及 50mg/kg·BW 组的微核率显著高于其他两剂量组。同时由表 3 结果可知,24h、36h、48h 及 18h 时间点的微核率显著高于其他时间点,其中 24h 取材时间点的骨髓微核率最高。

经 Pearson 相关分析发现,在本实验条件下,随着 CP 处理剂量的增加,小鼠骨髓红细胞微核率相应升

高,显示出良好的剂量-反应关系($r=0.734$, $P=0.000$),由图 1 亦可知,随着 CP 给药剂量的增加,NIH 小鼠骨髓红细胞微核率有增加的趋势。经相关分析发现,尽管时间与 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率之间时间效应关系不明显($r=-0.045$, $P=0.176$),但是结合专业知识及图 4 可知,随着取样时间的变化,小鼠骨髓细胞微核率也显现出逐渐升高、达到高峰、然后下降的一个变化过程,表现出一定的时间-效应关系。

表 2 不同剂量 CP 诱发 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的多重比较结果

Table 2 The results of multiple comparisons on erythrocyte micronuclei rate in NIH mouse's bone marrow induced by doses of cyclophosphamide

| 药物剂量(Drug dosage mg/kg·BW) | N | Subset 比较组 | | | |
|-------------------------------------|----|------------|---------|---------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| SNK 检验 Student- New 阴性对照组(Controls) | 60 | 1.0667 | | | |
| man- Keuls ^{a,b} 25 | 60 | 2.3667 | | | |
| 50 | 60 | | 15.9333 | | |
| 100 | 60 | | | 40.7000 | |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

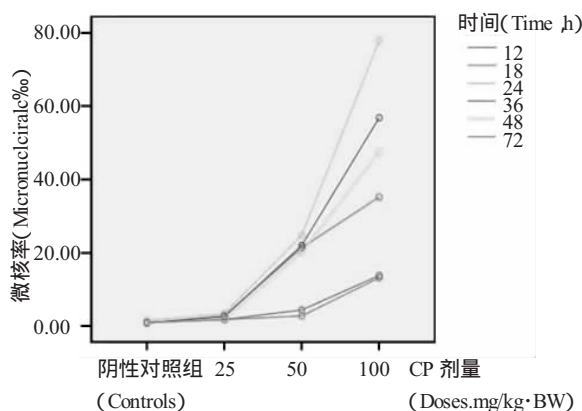
注：表中显示各相应比较组的均数 Means for groups in homogeneous subsets are displayed；基于 型平方总和 Based on Type III Sum of Squares；误差项是均数平方误差，为 1.015 The error term is Mean Square (Error)= 1.015 a 采用调和平均样本大小，为 60.000 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 60.000 b Alpha=0.05(b a =0.05)

表 3 CP 诱发 NIH 小鼠不同时间内骨髓红细胞微核率的多重比较结果

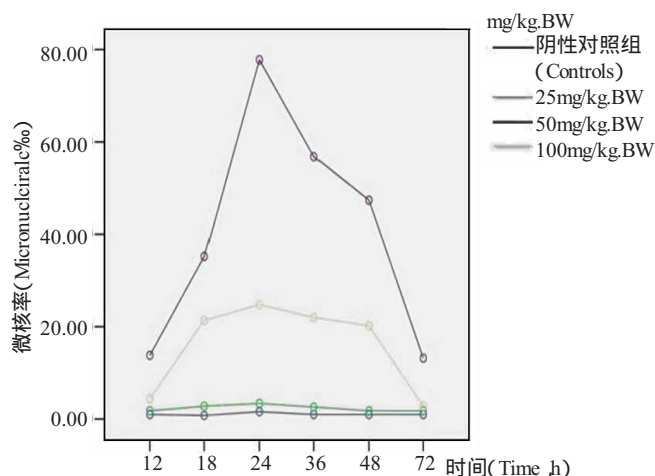
Table 3 The results of multiple comparisons on erythrocyte micronuclei rate in NIH mouse's bone marrow at different sampling time and induced by cyclophosphamide

| 时间(Time h) | N | 比较组 Subset | | | | | |
|------------------------------|----|------------|-------|-------|-------|-------|-------|
| | | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 |
| SNK 检验 72 | 40 | 4.7000 | | | | | |
| Student- New 12 | 40 | 5.2500 | | | | | |
| man- Keuls ^{a,b} 18 | 40 | 15.0500 | | | | | |
| 48 | 40 | 17.6000 | | | | | |
| 36 | 40 | 20.6000 | | | | | |
| 24 | 40 | 26.9000 | | | | | |
| Sig. | | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 | 1.000 |

注：表中显示各相应比较组的均数 Means for groups in homogeneous subsets are displayed；基于 型平方总和 Based on Type III Sum of Squares；误差项是均数平方误差，为 1.015 The error term is Mean Square (Error)= 1.015 a 采用调和平均样本大小，为 40.000 a Uses Harmonic Mean Sample Size = 40.000 b Alpha =0.05 (b a =0.05)

图 1 不同剂量 CP 诱发 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的变化
Fig 1 Changes of erythrocyte micronuclei rate in NIH mouse bone marrow and induced by doses of cyclophosphamide

3 讨论

图 2 不同取样时间下 CP 诱发 NIH 小鼠骨髓红细胞微核率的变化
Fig 2 Changes of erythrocyte micronuclei rate in NIH mouse bone marrow at different sampling time and induced by cyclophosphamide

本次实验中，我们根据文献推荐的 CP 剂量(25~100mg/kg)^[2]，同时结合本实验室的微核试验阳性剂量选取情况，采用 4 个剂量组，6 个取样时间，应用二因素析因设计方法来观察它们对小鼠骨髓微核率的影响。结果表明 CP 的剂量与用药后的取材时间对小鼠骨髓细胞微核率的影响均具有统计学意义，且具有剂量-反应及时间-效应关系。用药 CP 后的 24h 时间点微核率最高，此峰值的出现时间比余明泽等报道的峰值时间早 6 个小时^[3]，与肖凯等报道的峰值时间一致^[1]。有文献报道微核峰值具有时效性，其峰值不会很快升降，在其高峰前后 12h 采样均能高效的检出微核^[4]。我们也发现，取材 24h 峰值后至取材 48h 时间段内微核率有一定的下降，但其幅度小于 48h 之后微核率的下降幅度，至 72h 微核率最低。结果表明，给 NIH 小鼠一次性腹腔注射 CP 后 12~48h 股骨取材均可取得较高的微核率。本研究还发现，给药小鼠以 50~100mg/kg·BW 剂量条件下的微核率较高，且此剂量范围内随着剂量的增加微核率增加幅度明显。故本实验条件下，我们认为用 CP 作为诱导小鼠骨髓红细胞微核实验的阳性对照时，剂量范围可选择 50~100mg/kg·BW，在此剂量下，12~48h 时间段股骨取材均可获得较高的微核率，其中以 CP 给药后 24h 取材效果最佳。此结果为微核试验方法的优化与完善提供了一定的实验依据。

参考文献：

- [1] Xiao K, Li HX. Effects of cyclophosphamide dose and sampling time on mouse micronucleus frequency in bone marrow [J]. Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis 2005, 17(6): 367-369. (In Chinese) (肖凯, 李宏霞. 环磷酰胺剂量、取样时间对小鼠骨髓微核率的影响[J]. 癌变·突变·畸变 2005, 17(6): 367-369.)
- [2] Xia YW, Chen RZ, Huang ML. To study the (下转第 541 页)

2.4 叶下珠复方 号对 HSC-T6 细胞 I 型胶原蛋白表达的影响 采用 Western Blot 印记法检测。结果显示叶下珠复方 号高、中、低剂量组对 I 型胶原蛋白表达均具有明显的抑制作用,与对照组比较差异均有显著性意义($P<0.01$),见图 2。

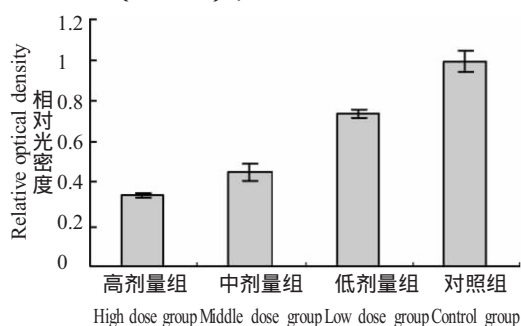


图 2 各组 I 型胶原蛋白表达

Fig 2 Expressipn of colla I mRNA in every treatment group of CPU

3 讨论

肝纤维化是指肝脏内弥漫性纤维结缔组织增生,是对炎症和坏死组织损伤的修复反应^[4],是多种病因导致的肝硬化必经的病理阶段。肝纤维化的发生是由于细胞外基质(ECM)在肝内过度沉积所致,尤其是胶原异常增生和沉积为特征^[5],其中心环节是 HSC 的活化和向成纤维细胞转化合成大量的细胞外基质。肝损伤时库普弗细胞等激活并分泌 TGF- β 1 等细胞因子,以旁分泌形式启动肝星状细胞活化,而活化的 HSC 可自分泌 TGF- β 1 以维持细胞活化的持续^[6]。TGF- β 1 在肝纤维化发生发展过程中具有活化 HSC、促进胶原基因表达和细胞外基质合成作用,是最强的促肝纤维化细胞因子之一^[2],而 I 型胶原是 ECM 的主要成分。

叶下珠复方 号临床上主要用于慢性肝炎、肝纤维化和肝癌的治疗,已证实叶下珠复方 号能显著抑制 HSC-T6 细胞增殖和细胞因子 TIMP-1mRNA 表达,从而减轻 TIMP-1 对基质金属蛋白酶的抑制作用,促进 ECM 的降解^[7]。

本实验研究显示:不同浓度的叶下珠复方 号体外能显著抑制 HSC-T6 增殖,具有明显的量效关系,对 HSC-T6 细胞 TGF- β 1 和 I 型胶原 mRNA 表达均具有明显的抑制作用,与对照组比较差异均有显著性意义($P<0.01$),并且可以显著抑制 I 型胶原蛋白表达,表明叶下珠复方 号可通过抑制 HSC-T6 增殖和 TGF- β 1 的表达,从而抑制 I 型胶原合成,起到抗肝纤维化作用。

参考文献:

- [1] Liu C, Liu P. The research progress of hepatic stellate cell in the process of hepatic fibrosis [J]. Chinese Journal of digestive diseases, 2000, 08(20): 258-260. (In Chinese)
- (刘成, 刘平. 肝纤维化过程中肝星状细胞的研究进展[J]. 中华消化杂志, 2000, 08(20): 258-260.)
- [2] Gressner AM, Weiskirchen R. The tightrope of therapeutic suppression of active transforming growth factor- β high enough to fall deeply[J]. J Hepatol, 2003, 39(5): 856-859.
- [3] Li CQ, Li G, Su JF, et al. Impact of compound phyllanthus urinaria (CPU) on the inhibition of the development of hepatic fibrosis in rats by two dimethyl nitrosamine induced [J]. Liaoning Journal of traditional Chinese Medicine, 2009, 36(8): 1413-1415. (In Chinese)
- (李常青, 李钢, 苏俊芳, 等. 叶下珠复方 号对二甲亚硝胺诱导大鼠肝纤维化形成的抑制作用 [J]. 辽宁中医杂志, 2009, 36(8): 1413-1415.)
- [4] Bissell DM, Roulot D, George J. Transforming growth factor β and the liver[J]. Hepatology, 2001, 34(5): 859-867.
- [5] Roulot D, Sevostir AM, Coste T, et al. Role of transforming growth factor β type II receptor in hepatic fibrosis: studies of human chronic hepatitis c and experimental fibrosis in rats [J]. Hepatology, 1999, 29(6): 1730-1738.
- [6] Safadi R, Friedman SL. Hepatic fibrosis-role of hepatic stellate cell activation[J]. Med Gen Med, 2002, 4(3): 27.
- [7] Shen Y, Li CQ, Liu N, et al. The affect of Phyllanthus compound II expression on the proliferation of HSC-T6 and TIMP-1mRNA [J]. China Tropical Medicine, 2008, 8(2): 204-205. (In Chinese)
- (盛杨, 李常青, 刘妮, 等. 叶下珠复方 II 号对 HSC-T6 增殖及 TIMP-1mRNA 表达的影响[J]. 中国热带医学, 2008, 8(2): 204-205.)

收稿日期 2012-03-15 编辑 符式刚

(上接第 537 页)

influential factors of inducing the micronucleus frequency of mouse bone marrow by cyclophosphamide with the orthogonal design [J]. Chinese Journal of Modern Applied Pharmacy, 2003, 20(2): 89-91. (In Chinese)

(夏义武, 程仁璋, 黄芒莉. 正交设计法研究环磷酰胺诱导小鼠骨髓细胞微核的影响因素 [J]. 中国现代应用药学杂志, 2003, 20(2): 89-91.)

- [3] Yu MZ, Liu YN, Jiang ZR, et al. Study on the influential factors of inducing the micronucleus frequency of mouse bone marrow by

cyclophosphamide [J]. Modern preventive medicine, 2007, 34(5): 935-936, 941. (In Chinese)

余明泽, 刘以农, 蒋中仁, 等. 环磷酰胺诱导小鼠骨髓细胞微核的影响因素的研究 [J]. 现代预防医学, 2007, 34(5): 935-936, 941.

- [4] Yin MO. Genetic Toxicology [M]. Beijing: Science Publishing, 2002: 410-415. (In Chinese)
- (印木泉. 遗传毒理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 410-415.)

收稿日期 2012-01-21 编辑 谢永慧