文章编号：1006-3617(2010)11-0667-03 **中图分类号**：R114 **文献标志码**：A

【论著】

氯化钕对小鼠骨髓细胞的遗传毒作用

屈艾[1]，高宽场[1, 2]，闫晶晶[1]

摘要：［目的］ 探讨氯化钕对小鼠骨髓细胞遗传物质的影响。［方法］ 小鼠腹腔注射氯化钕染毒，采用微核测试技术和单细胞凝胶电泳技术检测小鼠骨髓红细胞微核率和彗星细胞 DNA 拖尾率。微核试验设置 20、40、80、160 mg/kg 4 个剂量组，彗星试验设置 20、40、80 mg/kg 3 个剂量组。［结果］ 在 20~160 mg/kg 剂量范围内，随着氯化钕剂量的增加小鼠骨髓细胞微核率（FMN）升高（$r_{FMN}=0.956$）；在 20~80 mg/kg 剂量范围内，彗星细胞 DNA 拖尾率（PTC）和尾长（TL）随着剂量的增加而增加，存在剂量 - 效应关系（$r_{PTC}=0.946$，$r_{TL}=0.997$）。［结论］ 氯化钕对小鼠骨髓细胞具有一定的遗传毒作用。

关键词：氯化钕；小鼠骨髓细胞；微核率；DNA 损伤

Genetic Toxicity of Neodymium Chloride on Marrow Cell of Mice *QU Ai*[1], *GAO Kuan-chang*[1, 2], *YAN Jing-jing*[1] (1. *Department of Environmental Toxicology, School of Biology Science, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu* 221116, *China*; 2. *Taicang Senior High School of Jiangsu Province, Taicang, Jiangsu* 215400, *China*)

Abstract：［Objective］ The toxic effect of neodymium chloride on genetic material of mouse bone marrow cells was explored. ［Methods］ Neodymium chloride was induced to mice via intraperitoneal injection, dose groups were 20, 40, 80, 160 mg/kg for micronucleus test and 20, 40, 80 mg/kg for comet assay. Regular micronucleus test technology and single-cell gel electrophoresis micronucleated erythrocytes were applied on mouse bone marrow samples. Micronucleus and comet tail of DNA cells were calculated. ［Results］ In micronucleus test, micronucleus rates of mouse bone marrow were highly correlated with the doses of neodymium chloride ($r_{FMN}=0.956$); the cell DNA comet tail ratio and tail length showed dose-response relationships with the doses of neodymium chloride ($r_{PTC}=0.946$, $r_{TL}=0.997$, respectively). ［Conclusion］ The study suggested that neodymium chloride may have a genetic toxic effect on marrow cell of mice.

Key Words: neodymium chloride; mouse bone marrow cells; micronucleus; DNA damage

随着稀土（rare earth，RE）在工业生产以及生活中的广泛应用，各种含有 RE 化合物的产品大量进入生态环境，并通过食物链进入人体，其对生态环境和人群健康的影响已经引起人们的广泛关注[1-3]。钕（Nd）属轻稀土元素，在农业、畜牧业、激光材料、磁性材料等的应用日渐广泛[2]，其安全性问题也日益受到人们关注[4-6]。微核试验是用来检测染色体异常的常规技术[7-8]，细胞微核一般由某种因素导致染色体损伤后形成的断片或纺锤丝受损后丢失的整条染色体而形成。单细胞凝胶电泳（SCGE）又称彗星试验（comet assay），是研究和测定单个细胞 DNA 链断裂的技术[9]，目前已应用于各种有核细胞经理化因子诱导的 DNA 损伤和修复的研究。

由于对氯化钕遗传毒作用的报道较少。钕在未表现出明显生物毒效应时，是否对模式动物小鼠的遗传物质造成损伤，是否具有潜在的危害性值得研究。本研究拟采用微核试验和单细胞凝胶电泳技术，研究氯化钕是否对小鼠骨髓细胞遗传物质造成损伤，以从染色体和 DNA 水平上阐释氯化钕的毒性效应。

[作者简介] 屈艾 （1950-），女，本科，教授；研究方向：环境毒理学和遗传毒理学；E-mail：quai@xznu.edu.cn

[作者单位] 1. 徐州师范大学生命科学学院环境毒理研究室，江苏 徐州 221116；2. 江苏省太仓高级中学，江苏 太仓 215400

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 昆明种纯系小鼠 60 只，雌雄各半，6~7 周龄［购于徐州医学院实验动物中心，动物合格证号：SCXK（苏）2005-0005］。实验开始时，各小鼠体重差异在平均体重的 18% 以内。按照实验动物饲养条件饲喂一周后用于染毒。

1.1.2 药品和仪器 氯化钕（$NdCl_3$），天津德兰精细化工厂；叠氮化钠（NaN_3），中国医药集团上海化学试剂公司；TritonX-100，美国 AMRESCO 公司；正常熔点琼脂糖（NMA）、低熔点琼脂糖（LMA）和溴化乙锭（EB），美国 SIGMA 公司；十二烷基肌氨酸钠，美国 AMRESCO 公司。

DYY-6C 型电泳仪，北京市六一仪器厂；LEICA DMRA2 型荧光显微镜，德国徕卡仪器有限公司；生化培养箱（LRH-250-II 型），广东省医疗器械厂；PHS-3C 型数字酸度计，杭州东星仪器设备厂。

1.2 试剂配制

精确称取 $NdCl_3$，以生理盐水定容，并稀释为 8、4、2 mg/mL 各梯度浓度；精确称取 NaN_3 以生理盐水定容至 2 mg/mL；上

述溶液均经高压蒸汽灭菌后备用。

1.3　实验分组

1.3.1　微核试验　根据预试验的结果确定 160 mg/kg 为高剂量组。设置 4 个 $NdCl_3$ 剂量组（20、40、80、160 mg/kg），同时设阴性对照组（生理盐水）和阳性对照组（NaN_3，20 mg/kg）。将小鼠随机分成 6 组，每组 10 只，雌雄各半。

1.3.2　单细胞凝胶电泳试验　设置 3 个 $NdCl_3$ 剂量组（20、40、80 mg/kg），阴性对照组、阳性对照组及小鼠分组均同“ 1.3.1 ”。

1.4　实验方法

1.4.1　染毒和取材　按照上述剂量根据每只小鼠体重分别计算氯化钕的染毒用量。采用 24 h 内间隔两次腹腔注射方法染毒，在第二次染毒 24 h 后采用颈椎脱臼处死小鼠，取股骨。

1.4.2　微核试验

1.4.2.1　微核的制作　参照文献［10］的实验方法进行。

1.4.2.2　微核的观察和统计　微核的判断标准参照曹佳等[8, 11]方法。制作好的微核片在观察前用 0.004% 的柠檬酸三钠溶液处理数秒，便于辨别骨髓嗜多染红细胞（PCE）和正染红细胞（NCE）。选择细胞分散、形态完整、染色良好、背景清晰的 PCE，在油镜下观察统计。实验中发现雌、雄小鼠的骨髓细胞微核率无明显差异可合并计算结果，故每只小鼠记数 1 000 个 PCE 细胞，记录微核数，各组微核率（FMN）平均值 =（观察到的微核数 / 观察细胞总数）×1000‰。

1.4.3　单细胞凝胶电泳试验

1.4.3.1　骨髓细胞悬液的制备　剪去小鼠股骨两端的骨节，用 0.5 mL Hank’S 液冲洗骨髓细胞两次，悬浮于磷酸盐缓冲液（PBS）中，制成细胞悬液，调整细胞密度为 1×10^6 个 /mL。苔盼蓝排斥法检测各组细胞存活率，要求细胞存活率在 90% 以上。

1.4.3.2　单细胞凝胶电泳试验　实验流程：受试小鼠骨髓细胞 → 铺细胞于微胶→裂解细胞→电泳→ EB 染色→ 镜检。方法参照有关文献[10, 12]，并略加改进。

铺胶板：铺第一层凝胶，即取 100 μL 50°C的 0.5% NMA 平铺于预热 40°C左右的磨砂载玻片上，迅速盖上洁净盖玻片，4°C冷凝 10 min 后揭去盖玻片；铺第二层凝胶，即于 37°C下将骨髓细胞 PBS 悬液与 0.5% LMA 按 1∶9 混匀，取 50 μL 混合液铺于第一层胶上，盖上盖玻片，4°C冷凝 10 min，揭去盖玻片；铺第三层凝胶，即在第二层凝胶上滴加预热 37°C的 0.5% LMA 75 μL，盖上盖玻片，4°C冷凝 10 min。每只小鼠制备 2 张胶板。细胞裂解：揭去盖玻片，将胶板水平浸入新配制的 4°C预冷的细胞裂解液［2.5 moL/L NaCl、100 mmoL/L 乙二胺四乙酸二钠（Na_2EDTA）、10 mmoL/L Tris-HCl、1%十二烷基肌氨酸钠，用前加入 1%TritonX-100，10%二甲基亚砜（DMSO）］中 2 h。以电泳缓冲液将 DNA 解旋：用 PBS 液将胶板冲洗 2~3 次，并列放置于水平电泳槽中，加预冷的电泳缓冲液（1 mmoL/L Na_2EDTA、300 mmoL/L NaOH，pH 13.0），覆过胶面约 0.25 cm，碱性条件下解旋 DNA 30 min。电泳：在电压 20 V，电流 200 mA，4 °C条件下电泳 30 min。中和与染色：取出胶板，置中和液（0.4 mmoL/L Tris-HCl，pH 7.5）中浸没 15 min，吸去中和液，以无水乙醇浸没 1 h，吸去无水乙醇，稍晾干；加 10 μL 20 μg/mL EB 溶液，染色 20 min，洗净染液晾干即可镜检。上述步骤均应在暗光下进行。

1.4.3.3　观察和统计　用 Leica DMRA2 型荧光显微镜放大 400 倍后观察和测量彗星细胞。每只小鼠随机观察 200 个彗星细胞，记录 DNA 拖尾细胞数，统计拖尾率（PTC）；每组随机选择 30 个细胞 DNA，拍照后直接运用该分析系统中的测标尺测量细胞 DNA 头长（HL）和全长并算出尾长（TL）。统计指标包括头长（类核直径）、尾长和拖尾率。拖尾率 =（拖尾细胞数 / 观察细胞总数）× 100%。

1.5　数据处理

采用 SPSS 11.5 软件进行分析，实验数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示，对实验数据用方差分析进行比较及作相关分析。

2　结果

2.1　氯化钕对小鼠骨髓红细胞微核率的影响

由表 1 可见，各剂量组的小鼠骨髓细胞微核率均高于阴性对照组，经统计学检验，20 mg/kg 剂量组与阴性对照组比较差异无统计学意义，其余各组与阴性对照组比较差异均有统计学意义（$P<0.01$）。

表 1　氯化钕对小鼠骨髓红细胞微核率的影响

Table 1　Frequency of micronuclei in bone-marrow red cells of mice treated by neodymium chloride

组别 Groups		PCE 细胞数 PCE Number of cell	微核率（‰） Frequency of micronuclei
阴性对照组（Negative control group）		10 027	2.593±0.514
$NdCl_3$（mg/kg）	20	10 033	3.089±0.733
	40	10 032	4.983±1.047**
	80	10 026	6.480±1.074**
	160	10 033	8.269±1.559**
阳性对照组（Positive control group）		10 030	7.278±1.155**

［注］与阴性对照组比较（Compared with negative control group），*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。

2.2　氯化钕对小鼠骨髓细胞 DNA 的影响

由表 2 可见，随着处理剂量的递增，骨髓彗星细胞 DNA 拖尾率逐渐增加，尾长也逐渐增加，而头长值则逐渐减小；各剂量组骨髓彗星细胞 DNA 的头长、尾长及拖尾率均大于阴性对照组，差异有统计学意义（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）。

表 2　氯化钕对小鼠骨髓细胞的 DNA 损伤

Table 2　DNA damage in marrow cells of mice treated by neodymium chloride

组别 Groups		头长（μm） Head length	尾长（μm） Tail length	拖尾率（%） Percentage of tailed cells
阴性对照组（Negative control group）		48.2±1.7	27.0±1.3	5.06
$NdCl_3$（mg/kg）	20	42.4±2.1*	45.3±3.6**	23.54**
	40	35.1±3.2**	52.5±4.3**	41.32**
	80	32.3±4.1**	72.4±5.3**	52.12**
阳性对照组（Positive control group）		33.1±3.4**	76.8±5.2**	54.63**

［注］与阴性对照组比较（Compared with negative control group），*：$P<0.05$；**：$P<0.01$。

2.3　染毒剂量与小鼠骨髓细胞 DNA 损伤及微核率的相关性

由表 3 可见，染毒剂量与彗星细胞 DNA 尾长（$r_{TL}=0.997$）、拖尾率（$r_{PTC}=0.946$）及微核率（$r_{FMN}=0.956$）均存在正相关关系，与头长呈负相关（$r_{HL}=-0.904$）；头长与尾长（$r_{TL}=-0.869$）、拖

尾率（r_{PTC} = -0.994）、微核率（r_{FMN} = -0.983）均呈负相关；尾长与微核率（r_{FMN} = 0.945）、拖尾率（r_{PTC} = 0.919）均呈正相关；拖尾率与微核率呈正相关（r_{FMN} = 0.997），均 P < 0.01。

表 3　氯化钕处理小鼠骨髓细胞微核试验的相关性结果

Table 3　Correlations in Micronucleus test on mice marrow cells treated by neodymium chloride

指标 Indices	头长 Head length	尾长 Tail length	拖尾率 Percentage of tailed cells	微核率 Frequency of micronuclei
剂量（Dosage）	- 0.904*	0.997*	0.946*	0.956*
头长（Head length）	—	- 0.869*	- 0.994*	- 0.983*
尾长（Tail length）	—	—	0.919*	0.945*
拖尾率（Percentage of tailed cells）	—	—	—	0.997*

［注］*：P < 0.01。

3　讨论

采用微核试验的前提是被检测物质不能严重阻碍实验生物的细胞分裂，否则不能正确反映被检测物质的 FMN 水平[13]。微核是染色体畸变在间期核中表现出来的一种异常（损伤）现象，以微核作为检测指标，可以说明染色体受损和畸变的情况。FMN 的高低与被检测物质的理化性质、处理剂量、处理时间及细胞有丝分裂的速度等因素有关。被检测物质剂量过高会导致实验生物中毒，细胞的正常分裂活动受到抑制；剂量过低会表现出较低的微核率水平，可能会获得假阴性的结果。 因此，选择适当的处理剂量和时间是实验的关键所在。本实验所设置的 4 个浓度梯度，是以氯化钕经腹腔注射的预实验结果结合文献［3］中使用的剂量（200 mg/kg）[3] 为依据，取其的 1/10、1/5、2/5、4/5 进行实验，从实验结果可见处理的剂量和时间符合毒理学原则。

已知微核的形成与染色体、纺锤丝的损伤有关。实验结果显示出在剂量为 40~160 mg/kg 的范围内，小鼠 PCE 的微核率明显高于阴性组，且随剂量的提高微核率也逐渐增加，具有明显的剂量 - 效应关系（r_{FMN} = 0.956，P < 0.01）。说明在一定的剂量范围内，钕离子可致骨髓细胞染色体和纺锤丝损伤形成微核，使微核率增加，对骨髓细胞的染色体具有损伤作用。

运用单细胞凝胶电泳技术，可检测出单个细胞中 DNA 链的断裂，进而反映 DNA 的损伤情况。由于 DNA 链的断裂可引起超螺旋的松散，电泳时 DNA 断链向阳极伸展，形成特征性的彗星尾状。体细胞中 DNA 量是一定的，若头部的量多（类核直径长），尾部的 DNA 量则少（尾长小）；反之亦然。从实验结果分析可知，在剂量为 20~80 mg/kg 的范围内，处理剂量越大，头长值越小，头部的 DNA 量越少，致使尾长值变大、拖尾率升高，尾部的断裂 DNA 量就越多，微核率也越高，说明 DNA 分子受损伤就越严重。剂量组细胞 DNA 的尾长、拖尾率及微核率均明显大于阴性对照组，并且随着剂量的增加，细胞 DNA 的尾长、拖尾率及微核率也增加，这均说明具有明显的剂量 - 效应关系（r_{TL} = 0.997、r_{PTC} = 0.946、r_{FMN} = 0.956）。结果表明，氯化钕确实可造成小鼠骨髓细胞 DNA 的直接断裂而导致遗传物质的损伤。

综上所述，在本实验条件下，一定剂量的氯化钕能使小鼠遗传物质在 DNA 和染色体水平上受到损伤，即产生遗传毒作用。但氯化钕引起 DNA 链的断裂是否与染色体的断裂有直接关系，以及氯化钕是否能起到纺锤体毒剂的作用还有待于进一步的研究。

参考文献：

［1］仇敬运，屈艾，胡文静，等 . 稀土元素钬的应用及毒理学研究进展［J］. 环境与职业医学，2008，25（2）：207-208.

［2］倪嘉瓒 . 稀土生物无机化学［M］. 北京：科学出版社，1995：290-298.

［3］王洋，聂刘旺，陈启龙 . 稀土元素的生物安全性探讨［J］. 生物学杂志，2004，21（2）：4-6.

［4］刘玉，陈祖义，王元兴 . 钕在小鼠体内的分布与蓄积及对孕酮分泌的影响［J］. 中国稀土学报，2001，19（5）：447-449.

［5］杨美玲 . 稀土钕的毒性实验研究［J］. 暨南大学学报，1990，11（3）：111-118.

［6］陈祖义，刘玉，程薇，等 . 稀土元素 ^{147}Pm、^{141}Ce、^{147}Nd 的环境毒理研究［J］. 生态与农村环境学报，2002，18（4）：52-55.

［7］MAKI-PAAKKANEN J，HAYASHI M，SUZUKI T，et al. Analysis by fluorescence in situ hybridization with a mouse gamma satellite DNA probe of isolated micronuclei induced in mice by two clastogens and two spindle poisons［J］. Mutagenesis，1995，10（6）：513-516.

［8］曹佳，林真（日本），余争平，等 . 微核试验 - 原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用［M］. 北京：军事医学科学出版社，2000.

［9］SINGH N P，MCCOY M T，TICE R R，et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in dividual cells［J］. Exp Cell Res，1988，175（1）：184-191.

［10］王心如 . 毒理学实验方法与技术［M］. 北京：人民卫生出版社，2003： 70-72.

［11］MATTER B E，GRAUWILER J. Micronuclei in mouse bone marrow cells：A simple in vivo model for the evaluation of drug-induced chromosomal aberrations［J］. Mutat Res，1974，23（2）：239-246.

［12］孟紫强，张连珍 . 应用 SCGE 技术研究细胞 DNA 损伤的原理与方法［J］. 中国生物化学与分子生物学报，1998，14（5）：604-609.

［13］周宗灿 . 毒理学基础［M］.2 版 . 北京：北京医科大学出版社，1999.

（**收稿日期**：2009-12-14）

（英文编审：金克峙；编辑：郭薇薇；校对：洪琪）