

用彗星实验和微核实验检测地面水污染的遗传毒性效应

齐宝宁¹, 唐国慧^{1*}, 李劲松², 易建华¹, 郭剑锋¹, 苗江丽¹

(1. 西安交通大学医学院劳动卫生与环境卫生教研室, 陕西 西安 710061; 2. 西安市卫生监督所, 陕西 西安 710054)

摘要: 目的 探索应用彗星实验(单细胞凝胶电泳技术, SCGE)测定鲤鱼红细胞 DNA 损伤以评价地面水污染遗传毒性效应的可行性。方法 应用单细胞凝胶电泳和微核实验对污染指数(PI)不同的5种河流中采集的鲤鱼的红细胞 DNA 损伤和微核率进行测定。结果 5种地面水水源中的鲤鱼红细胞 DNA 损伤情况不全相同, 与阴性对照组比较差异有显著性($P < 0.05$), 与污染严重程度呈正相关, 趋势与微核实验一致。结论 SCGE 测定鲤鱼红细胞 DNA 损伤, 可以检测地面水的污染状况。

关键词: 单细胞凝胶电泳(彗星实验); DNA 损伤; 微核实验; 红细胞

中图分类号: R123.2 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)03-0163-03

Detecting of genotoxic effect for surface-water pollution with comet test and micronucleus test

QI Bao-ning¹, TANG Guo-hui^{1*}, LI Jin-song², YI Jian-hua¹, GUO Jian-feng¹, MIAO Jiang-li¹

(1. Department of Occupational and Environmental Health, Medical School, Xi'an Jiao-tong University, Xi'an 710061, China; 2. Xi'an Municipal Institute of Health Inspection, Xi'an 710054, China)

Abstract Objective To explore the feasibility of assessing the genotoxic effect for surface-water pollution using carp erythrocytes with comet test. **Method** Measure the incidences of DNA damage and micronucleus in erythrocytes of cyprinoids which were respectively taken from five rivers with different pollution index (PI) by single cell gel electrophoresis (SCGE, or comet test) and micronucleus test. **Result** Comet test showed that all the carp RBCs had DNA damage that significantly differed from the controls ($P < 0.05$), there was obvious positive correlation between severity and pollution level, and quite consistent trend showed in micronucleus test. **Conclusion** The results suggested that detecting the DNA damage of carp RBCs with comet test might reflect the pollution level of surface-water.

Key words: Single cell gel electrophoresis (SCGE, comet test); DNA damage; Micronucleus test; Red blood cell (erythrocyte)

随着工农业的迅速发展, 地面水正在受到日益严重的污染。已有大量研究阐述了有关进入地面水的污染物大多数是存在致突变性的有机污染物^[1]。国内外学者已从不同角度对此进行了实验研究和现场调查, 如选用 Ames 实验、微核实验和姐妹染色单体交换实验等手段^[2-3]。然而这些已完善的短期遗传毒性实验都有其局限性。我们直接应用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术测定水源污染的遗传毒性效应。

该方法于1996年 Raj pandrangi 等人选用大头鱼经环磷酸胺染毒进行的时间-剂量关系的研究证明了 SCGE 的高度敏感和结果的可重复性。这种技术可应用于所有真核细胞, 不需要有丝分裂活性, 与染色体的大小和数目无关^[4-5]。

本文采用 SCGE 法, 对5个主要河流的鲤鱼血细胞 DNA 损伤进行了测定, 目的是为建立地面水污染遗传毒性效应的生物检测方法积累资料。

1 材料与方法

1.1 样品采集

选用400g左右的鲤鱼, 分别采自5条污染程度不等的河流。参考市环保局连续3年的监测测定结果, 将河流按照污染指数(PI)从大到小的顺序依次编号为河流A(PI=43.46%)、

B(PI=32.67%)、C(PI=22.17%)、D(PI=16.08%)、E(PI=10.30%)。其中河流A污染最严重, 河流E基本无污染。每个采样点各采集10条。

1.2 实验方法

1.2.1 鱼红细胞微核实验 将现场所采之鱼立即送回实验室, 断尾取外周血, 常规涂片, 吉姆萨染色。每尾鱼计数1000个清晰、完整染色的有核红细胞, 计算微核率。

1.2.2 鱼红细胞 SCGE 实验 将文献[6]的方法稍作修改, 用作微核实验的鱼同时进行心脏穿刺取血10 μ l进行实验。直接将10 μ l血与80 μ l 0.65%低熔点胶混合制成细胞混悬液, 迅速倾在玻片上制成凝胶玻片, 凝固后放入新配制的细胞裂解液(2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 10% DMSO, 10%肌酐酸钠)中, 在pH 10.0、避光、室温条件下裂解2 h。去除裂解液后应在pH 13的碱性缓冲液中先解旋15 min, 再进行电泳。电泳的电压为25 V, 电流为265~270 mA, 避光, 4 $^{\circ}$ C条件下电泳20 min。电泳后凝胶玻片用pH 7.5的缓冲液(0.4 mol/L Tris)中和, 之后在凝胶上加溴乙锭染色, 用荧光显微镜在400倍下观察。每组10尾鱼, 每尾鱼记数100个细胞。

1.2.3 环磷酸胺(CP)染毒鱼红细胞 SCGE 实验 为了观察鲤鱼对低水平CP的敏感性, 从污染指数最小的河流E中采集20条鲤鱼分成4组, 每5条一组, 第一组腹腔注射生理盐水, 其余3组分别注射10、20、40 mg/kg CP溶液, 48 h后以同样

收稿日期: 2005-06-22; 修回日期: 2005-09-13

作者简介: 齐宝宁(1980-), 男, 在读硕士, 研究方向: DNA 断裂的生物标记物。

*: 通讯作者。

方法实验, 期间以无氯自来水饲养^[12]。

1.2.4 观察指标 按文献[7]的方法根据细胞彗星荧光尾部与其可见头部的比例可将损伤程度分为五级, 无损伤(0)、轻度损伤(I)、中度损伤(II)、重度损伤(III)、完全损伤(IV), 计算细胞损伤率和损伤强度指数(Arbitrary unit)。

1.3 统计分析

结果采用 SPSS10.0 统计软件进行分析, 对 5 个采样点地面水水源鱼红细胞微核和 SCGE 测结果用行×列的 χ^2 检验。

2 结果

2.1 鲤鱼外周血红细胞微核率

各采样点鱼外周血红细胞微核率不全相同($\chi^2=76.6$, $P<0.001$), 各采样点鱼外周血红细胞的微核率与污染最轻的河流 E 比较, 河流 A、河流 C 差异有显著性(χ^2 分别为 41.2 和 6.2, P 均小于 0.05); 河流 B、河流 D 差异无显著性(χ^2 分别为 1.7 和 0.3, P 分别为 0.2 和 0.7)。见表 1。

表 1 不同采样点鱼红细胞微核率($\bar{x}\pm s$)和污染指数(PI)

采样点	微核细胞数(个)	微核率(‰)	PI(%)
A*	76	12.60±2.38	43.46
B	23	3.89±1.24	32.67
C*	32	5.33±1.61	22.17
D	18	3.00±0.94	16.08
E	15	2.50±0.47	10.30

与河流 E 组比较, * $P<0.05$

2.2 各采样点鱼红细胞 DNA 损伤测定结果

5 个采样点地面水源中的鱼红细胞 DNA 损伤程度不全相同($\chi^2=191.3$, $P<0.001$)。河流 A、B、C 和 D 4 个水源中鲤鱼的红细胞 DNA 损伤测定结果与河流 E 比较差异均有显著性($\chi_A^2=155.0$, $P<0.001$; $\chi_C^2=39.3$, $P<0.001$; $\chi_B^2=22.0$, $P<0.001$; $\chi_D^2=27.6$, $P<0.001$)。见表 2。

表 2 各采样点鱼红细胞 DNA 损伤不同级别的细胞数和损伤强度指数

采样点	细胞损伤分级					损伤强度指数
	0	I	II	III	IV	
A*	327	130	65	56	22	516
B*	461	74	35	24	6	240
C*	440	93	43	17	7	258
D*	453	81	36	25	5	248
E	522	36	24	15	3	135

损伤强度指数=Ⅰ度损伤×1+Ⅱ度损伤×2+Ⅲ度损伤×3+Ⅳ度损伤×4; 与河流 E 比较, * $P<0.01$

2.3 环磷酰胺(CP)染毒鲤鱼后 SCGE 测定结果

低、中、高剂量组的环磷酰胺与阴性对照组比较差异均有显著性(χ^2 值分别为 150.1、235.4、162.6, P 值均小于 0.001), 并显示出明显的剂量-反应关系($r=0.542$, $P<0.0001$), 显示了本实验方法的可信性与敏感性。见表 3。

表 3 CP 不同剂量下 DNA 损伤不同级别的细胞数

剂量 (mg/kg)	细胞损伤分级				
	0	I	II	III	IV
0	63	106	26	4	1
10*	9	41	96	45	9
20*	0	20	79	82	19
40*	4	47	62	57	30

与 0 mg/kg 剂量组比较, * $P<0.001$

2.4 DNA 断裂测定结果与微核实验结果的相关性

不同来源鲤鱼外周血细胞 DNA 损伤强度指数与微核率有显著的相关性($r=0.915$, $P=0.029$)

3 讨论

微核的形成与染色体损伤有关, 近年来国内已有许多研究应用小鼠骨髓多染红细胞微核实验及人外周血淋巴细胞微核实验研究水源污染的遗传毒性效应^[8]。同时有直接应用鱼外周血红细胞微核测定来进行水源的遗传毒性研究^[9]。对于进入机体的有害物质, 鱼比人和温血动物敏感, 当其生存的水环境存在致突变性污染物时, 可引起鱼外周血细胞内的 DNA 或染色体损伤。鱼造血系统的损伤可使鱼造血干细胞部分有丝分裂异常, 可能使受损细胞染色体断片残留在胞浆中成为微核, 这种带有微核的有核红细胞随着血液到达外周, 可以迅速可靠地反映染色体的损伤情况^[9,10]。

SCGE 是检测 DNA 损伤快速、简便、敏感、经济并在细胞分裂间期就能检测的方法。该方法不受染色体的大小和数目的影响。国外学者研究表明, SCGE 法在检测水源污染的遗传毒性效应上比微核实验更具敏感性^[11]。Pandurangi 等^[12]应用大头鱼和鲤鱼红细胞 SCGE 来检测五大湖的水体遗传毒性效应, 结果表明该方法极其敏感且大头鱼和鲤鱼可作为检测水体遗传毒性效应的“岗哨生物”。

通常用孵卵所的鱼作为阴性对照, 然而 Preliminary 的数据显示野生鱼的损伤本底水平与孵卵所的十分相似。事实上, 一些从较轻污染地区得到的鱼红细胞 DNA 损伤结果接近孵卵所的结果, 因此本研究选用河流 E 里的鱼作为阴性对照组。

本研究中 5 个地面水中鲤鱼的 DNA 断裂情况不全相同, 均有彗星细胞出现, 损伤程度也不相同, 由此可以看出地面水在一定程度上能使其生存的鲤鱼红细胞 DNA 损伤, SCGE 的测定结果能初步反映地面水污染的遗传毒性效应。

4 个污染源和阴性对照组的鲤鱼外周血的微核率与 DNA 损伤强度指数之间存在着显著的相关性($r=0.915$, $P=0.029$)。说明 SCGE 和微核实验均可在一定程度上反映水源的污染状况。然而, 结果显示 SCGE 法在反映水源污染的遗传毒性效应方面比微核测定更敏感。

参考文献:

[1] Gagne F, Blaise C, Bemingham N. Lethal and sublethal effects of marine sediment extracts on rainbow trout hepatocytes [J]. Toxicology Letters, 1996, 87: 85-93.
[2] Vaknin D, Kelley MS. The structure of D-erythro-C18 ceramide at the air-water interface [J]. Biophys J, 2000, 79 (5): 2616-2623.
[3] Schwartz DE, Mancinelli RL. Biomarkers and the search for extinct life on

- Mars [J]. Adv Space Res. 1989, 9 (6): 155-158.
- [4] Lu WQ, Chen XN, Yue F, et al. Studies on the in vivo and in vitro mutagenicity and the lipid peroxidation of chlorinated surface (drinking) water in rats and metabolically competent human cells [J]. Mutat Res. 2002 15 513 (1-2): 151-157.
- [5] Marsteinstredet U, Wiger R, Brunborg G, et al. Apoptosis in HL-60 cells induced by 3-chloro-4-(dichloromethyl)-5-hydroxy-2[5H]-furanone (MX) [J]. Chem Biol Interact. 1997, 106 (2): 89-107.
- [6] Bombail V, Aw D, Gordon E, et al. Application of the comet and micronucleus assays to butterfish (Pholisgunnellus) erythrocytes from the firth of forth, scotland [J]. Chemosphere. 2001, 44 (33): 383-392.
- [7] Mouron SA, Golijow CD, Dubut FN. DNA damage by cadmium and arsenic salts assessed by the single cell gel electrophoresis assay [J]. Mutat Res. 2001, 498 (1-2): 47-55.
- [8] Park JH, Lee BJ, Lee SK, et al. Genotoxicity of drinking water from three Korean cities [J]. Mutat Res. 2000, 466 (2): 173-178.
- [9] Aylon F, Garcia-Vazquez E. Micronuclei and other nuclear lesions as genotoxicity indicators in rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. Ecotoxicol Environ Saf. 2001, 49 (3): 221-225.
- [10] Rodel PM, Terra NR, Erdtmann B. Evaluation of basal micronucleus frequency and hexavalent chromium effects in fish erythrocytes [J]. Environ Toxicol Chem. 2001, 20 (6): 1320-1324.
- [11] Saleha Banu B, Danadevi K, et al. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay [J]. Food Chem Toxicol. 2001, 39 (4): 361-366.
- [12] Pandrangi R, Petras M, Ralph S, et al. Alkaline single cell gel (comet) assay and genotoxicity monitoring using bullheads and carp [J]. Environ Mol Mutagen. 1995, 26 (4): 345-356.

1,2,4-三氯苯对小鼠心脏、肝脏和肾脏抗氧化系统的影响

刘军¹, 王路², 金焕荣³, 范来富⁴

(1. 沈阳市卫生监督所, 辽宁 沈阳 110014; 2. 沈阳市疾病预防控制中心, 辽宁 沈阳 110031; 3. 沈阳医学院, 辽宁 沈阳 110034; 4. 中国医科大学公共卫生学院, 辽宁 沈阳 110001)

摘要: 目的 探讨 1,2,4-三氯苯 (1,2,4-TCB) 对小鼠心脏、肝脏和肾脏抗氧化系统的影响。方法 经皮下注射染毒, 分为 1 382.2、2 764.4、4 146.6 mg/kg 低、中、高 3 个剂量, 测定心、肝、肾脏中超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px)、总巯基 (T-SH)、非蛋白巯基 (NP-SH)、蛋白巯基 (P-SH) 及脂质过氧化物 (LPO) 的含量。结果 心脏检测示低剂量组 NP-SH 含量显著高于对照组; 肝脏检测示中、高剂量组 LPO 含量显著增高, GSH-Px 活力和 NP-SH 含量显著低于对照组, 高剂量组 SOD 活力增高, 与对照组相比差异有显著性; 肾脏检测示 3 个剂量组 GSH-Px 活力有所降低, 与对照组相比差异有显著性, 低剂量组 NP-SH 含量显著低于对照组。结论 1,2,4-TCB 可使小鼠心、肝和肾脏脂质过氧化作用增强, 并相应地引起抗氧化酶活力和抗氧化物质含量的变化。

关键词: 1,2,4-三氯苯; 脂质过氧化物; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽过氧化物酶; 巯基; 小鼠

中图分类号: O625.21 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2006)03-0165-03

Effects of 1,2,4-trichlorobenzene on anti-oxidation system of heart, liver and kidney in mice

LIU Jun¹, WANG Lu², JIN Huan-rong³, FAN Lai-fu⁴

(1. Shenyang Municipal Institute of Public Health Inspection, Shenyang 110014, China; 2. Shenyang Center for Disease Control and Prevention, Shenyang 110031, China; 3. Shenyang Medical College, Shenyang 110034, China; 4. School of Public Health, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract Objective To explore the effects of 1,2,4-TCB on anti-oxidation system of heart, liver and kidney in mice. **Method** The mice were divided into three experimental groups and given 1 382.2 mg/kg, 2 764.4 mg/kg and 4 146.6 mg/kg of 1,2,4-TCB respectively by subcutaneous injection, then measure the activities of SOD, GSH-Px and the levels of T-SH, NP-SH, P-SH and LPO in heart, liver and kidney. **Result** The heart measurement showed that the NP-SH level in low dosage group was higher than that of control group; the liver measurement showed that LPO level in high and middle dosage groups were obviously increased, the GSH-Px activity and the NP-SH level were decreased, the SOD activity in high dosage group was risen compared with control group; while the kidney measurement showed that the GSH-Px activity in all the three experiment groups were decreased and there was some lower of the NP-SH level seen only in low dosage group. **Conclusion** 1,2,4-TCB could enhanced the lipid peroxidation in heart, liver and kidney of mice and thereby induced the change of the anti-oxidase activity and anti-oxidant content.

Key words: 1,2,4-trichlorobenzene (1,2,4-TCB); Lipid peroxides (LPO); Superoxide dismutase (SOD); Glutathione peroxidase (GSH-Px); Sulfhydryl group; Mice

收稿日期: 2005-11-03; 修回日期: 2005-12-30

作者简介: 刘军 (1968-), 女, 副主任医师, 现从事卫生监督工作。

国内外学者对 1,2,4-三氯苯 (1,2,4-TCB) 的毒性研究表明, 1,2,4-TCB 主要经消化道吸收, 也可经口和皮肤吸收, 吸