

文章编号:1004 - 616X(2001)02 - 0098 - 04

论著 ·

应用蚕豆根尖微核试验技术对二氧化氯消毒剂诱变性的研究

蒋辉权,倪晓平,寇宇

(杭州市疾病预防控制中心,浙江 杭州 310006)

摘要:目的与方法:采用蚕豆根尖微核试验技术对两种市售二氧化氯(ClO_2)的诱变性进行研究。结果:在 ClO_2 的稀释度为1:100时,杭州产 ClO_2 (A样)与余杭产 ClO_2 (B样)蚕豆根尖细胞微核率(MNF)分别为(17.91 ± 4.80)%和(17.57 ± 3.15)%。与作为阴性对照的自来水相比较,均有显著的统计学差异($P < 0.01$),并呈现较强的剂量-反应关系。结论:消毒剂 ClO_2 能诱发蚕豆根尖细胞微核率的增加,具有一定的诱变性。

关键词:蚕豆;微核试验;二氧化氯;诱变性

中图分类号:Q319;Q343 文献标识码:A

THE MUTAGENICITY STUDY OF CHLORINE DIOXIDE USING MICRONUCLEUS TEST IN VICIA FABA ROOT TIP CELLS

收稿日期:2000 - 08 - 28;修订日期:2000 - 11 - 16

作者简介:蒋辉权(1976 -),男,浙江东阳人,学士,主要从事消毒质量监测。

Wilms 瘤是儿科常见恶性肿瘤。有资料显示,瘤细胞中存在多种基因及其表达异常,但肿瘤的发生发展是否与 $p16$ 基因表达功能失调有关,研究报道较少。本文研究表明,wilms 瘤 $p16$ 基因表达阳性率为 30.8%,显著低于在正常肾组织对照中的阳性率 100%。这提示 Wilms 瘤中有 $p16$ 基因表达抑制, $p16$ 基因是否能正常表达同 Wilms 瘤的发生存在某种联系。进一步研究发现 $p16$ 基因表达在不同病理型 wilms 瘤中有所不同。在预后良好型中有部分表达,而在预后差型中检测不到 $p16$ 基因表达阳性。研究还发现随着肿瘤临床进程的加深, $p16$ 基因表达有不同程度的降低。在 I、II、III 临床期中, $p16$ 基因表达阳性率以 I 期最高,逐步递减,分别为 47.6% (10/21)、37.5% (3/8)、28.6% (2/7)、6.3% (1/16), $p16$ 基因低表达似是 wilms 瘤发生发展中的晚期事件。Wilms 瘤中 $p16$ 基因表达降低有可能是其基因异常造成的。光炜等研究发现,在 Wilms 瘤中虽然存在 $p16$ 基因纯合缺失现象,但缺失率较低(1/24),并且未检测到点突变⁵。这说明 $p16$ 基因表达异常可能具有除缺失和点突变以外的其他分子机制,详情有待于进一步研究。

由于 $p16$ 基因是人类发现的第一个最直接抑制肿瘤发生的固有成分,而且分子量小,因而有可能应用基因疗法,改造成替换肿瘤患者体内 $p16$ 基因,促进 $p16$ 蛋白的表达,加强对 CDK4 的竞争性结合,达到阻止癌细胞增殖的目的。因此对 $p16$ 基因的深入研究将为 Wilms 瘤的治疗提供一个新思路。

(感谢汕头大学医学院郭文丽同志给予的帮助)

参考文献:

- 1 Kamb A, Cruis NA, Weaver-Feldhaus J, et al. A cell cycle regulator potentially involved in genesis of many tumor types J. *Science*, 1994, 264(5 157): 436 ~ 440.
- 2 Beckwith JB, Palmer NF. Histopathology and prognosis of Wilms tumor: result from the first national Wilms tumor study J. *Cancer*, 1978, 41(5): 1 937 ~ 1 948.
- 3 D'Angio GJ, Breslow N, Beckwith JB, et al. Treatment of Wilms tumor results of the third national Wilms tumor study J. *Cancer*, 1989, 64(2): 349 ~ 360.
- 4 Yang R, Gombart AF, Serrano M, et al. Mutation effects on the P16^{INK4a} tumor suppressor protein J. *Cancer Res*, 1995, 55(12): 2 503 ~ 2 506.
- 5 光炜,王菁,杜伟书,等. Wilms 瘤中 $p16$ 基因缺失 1 例报告,中华医学遗传学杂志 J, 1997, 14 (1): 28 ~ 30.

JIANG Hui-quan , NI Xiao-ping , KOU Yu

(Center of Disease Prevention and Control in Hangzhou , Hangzhou 310006 , China)

Abstract : Purpose and Methods : The mutagenicity of two batches of chlorine dioxide(ClO₂) were studied using micronucleus test in *Vicia faba* root tip cells. **Results :** The frequencies of micronucleus of two kinds of ClO₂ were (17.91 ±4.80) ‰ and (17.5 ±3.12) ‰ respectively when the diluent multiple of ClO₂ was at 1:100. Comparing with the tap water group , the differences ($\frac{2}{A} = 30.57$, $\frac{2}{B} = 29.60$ $P < 0.01$) was statistically significant and the dose-effect relationship was clear. **Conclusion :** Chlorine dioxide has mutagenicity. We should pay attention to safety of its application in food and water.

Key words : *Vicia faba*; micronucleus test ; chlorine dioxide ; mutagenicity

蚕豆根尖微核试验技术自 1982 年建立以来¹ , 在环境污染监测和致突变性检测研究中已得到广泛应用。该方法被认为是用作致突变性分析的一种很好的测试系统,由于其方法较灵敏,特别适用于低剂量和弱诱变剂的检测。研究表明,农药、抗生素、除草剂、重金属、生物碱、辐射等均能引起蚕豆根尖细胞微核率(MNF)显著升高^{2,3} ,而有关二氧化氯(ClO₂)消毒剂诱变性的研究尚少见。本文采用蚕豆根尖细胞微核试验技术对 ClO₂ 的诱变性进行了检测,现将结果报告如下。

1 材料与方法

1.1 豆种 松滋青皮豆敏感品系由华中师范大学国家重点培养基地提供。

1.2 ClO₂ 杭州产(A 样),主剂亚氯酸钠由美国进口,配以片碱、甲醇等自行合成,采用国标碘量法测定(GB5750-85)其有效氯含量;余杭产(B 样),主剂氯酸钠系国产,配以甲醇、双氧水、片碱合成,同法测定其有效氯含量。

1.3 实验方法参照文献 4 进行。

1.3.1 蚕豆幼苗培养 豆种按常规浸种、催芽,置 28 培养箱内,待初生根长至 2~3 cm 时,选取根长

一致,根苗发育良好的幼苗备用。

1.3.2 染毒 将选出的蚕豆幼苗完全浸入 ClO₂ 系列浓度的消毒液中,置 28 培养箱内培养 4 h,然后置换入自来水恢复培养 24 h。

1.3.3 染色 取根 1 cm 用卡诺(Carnoy)氏液固定 24 h,5 mol/L HCl 28 水解 25 min,席夫(Schiff)氏试剂染色,常规压片,光镜下观察计数微核。每个受试浓度至少镜检 3 个不同的根尖,每个根尖计数 1 000 个细胞,分别计算受试物各浓度的微核细胞数和平均微核率。

1.4 对照 自来水作阴性对照,环磷酰胺(CP) 1 mg/ml 作阳性对照。环磷酰胺系江苏省连云港制药厂提供,批号:961113。

5 数据处理 采用²检验。

2 结果

杭州产 ClO₂ 原液有效氯含量为 3.834% ,其稀释倍数在 1:800~1:100 范围内时,MNF 随受试液浓度的增高而升高,呈明显的剂量-反应关系,(tr_(A) = 9.90, $P < 0.01$),且在 1:100 稀释时出现三微核现象。但稀释倍数为 1:50 时,MNF 反而有所下降。(表 1、图 1)

表 1. 二氧化氯(A 样)蚕豆根尖微核试验结果

Table 1. MNF in *Vicia faba* root tips treated with ClO₂(sample A)

Treatment	Diluent multiple	Dosage (mg/L)	MNCF (%)	MNF $\bar{x} \pm s$ (%)
ClO ₂	1:800	25	8.76	2.92 ±0.53
	1:400	50	18.66	6.22 ±0.81
	1:200	100	29.67	9.89 ±5.47
	1:100*	200	53.73	17.91 ±4.80
	1:50	400	47.38	15.79 ±1.15
Tap water			9.69	3.23 ±0.28
CP			72.93	24.31 ±0.87

Note: * Tri-micronuclei could be seen

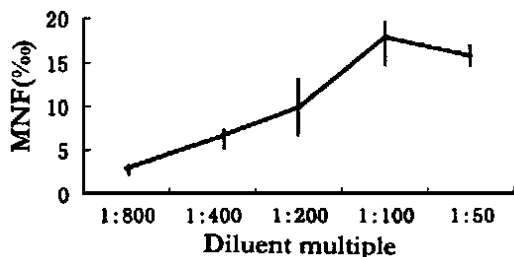


图1. MNF与二氧化氯(A样)稀释倍数的关系
Figure 1. Relationship between MNF and the Diluent multiple of ClO₂(sample A)

余杭产 ClO₂ 原液有效氯含量为 5.170%，其稀释倍数在 1:800 ~ 1:100 范围时，MCN 随受试液浓度的增高而升高，呈明显的剂量-反应关系 ($t_{r(B)} = 4.96, P < 0.05$)，在 1:400、1:200 稀释时，均出现双微核现象。稀释倍数为 1:50 时，MNF 也有所下降。(表 2、图 2,3)

表 2. 二氧化氯(B样)蚕豆根尖微核试验结果

Table 2. MNF in *Vicia faba* root tips treated with ClO₂(sample B)

Treatment	Diluent multiple	Dosage (mg/L)	MNCF (%)	MNF $\bar{x} \pm s$ (%)
ClO ₂	1:800	33.7	8.79	2.93 \pm 0.54
	1:400 [#]	67.4	37.74	12.58 \pm 6.47
	1:200 [#]	134.8	43.62	14.54 \pm 5.45
	1:100	269.6	52.71	17.57 \pm 3.15
	1:50	539.2	31.56	10.52 \pm 1.15
Tap water			9.69	3.23 \pm 0.28
CP			72.93	24.31 \pm 0.87

Note: # Bimicronuclei could be seen

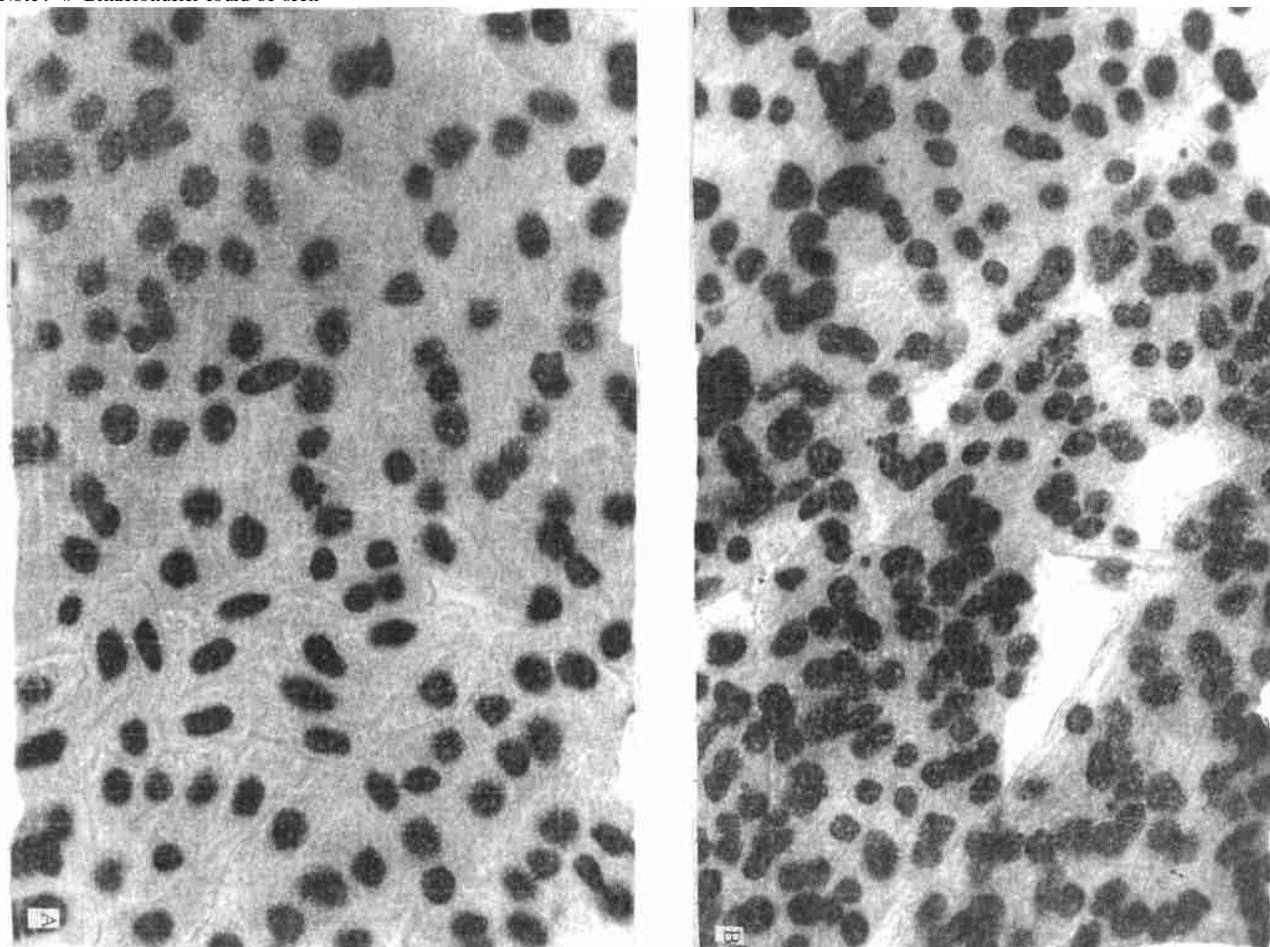


图 2. ClO₂ 对蚕豆根尖细胞微核的影响

Figure 2. Effect of ClO₂ on MNF in *Vicia faba* root tips

A: A cell with tri-micronuclei.

B: Many micronuclei can be seen.

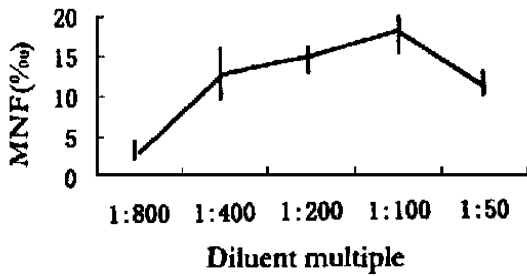


图3. MNF与二氧化氯(B样)稀释倍数的关系

Figure 3. Relationship between MNF and the diluent multiple (sample B)

阴性对照(自来水)系杭州市区自来水末梢管网水样,其MNf为(3.23 ± 0.28)‰,阳性对照环磷酰胺的MNf为(24.31 ± 0.87)‰。两种ClO₂在1:400~1:50稀释范围内MNf均明显高于自来水,而1:800稀释时,其MNf与自来水均无明显差异(P > 0.05)。

3 讨论

所测试的两种ClO₂消毒剂在1:100稀释时MNf均明显高于自来水(P < 0.001),并呈现较明显的剂量-反应关系;但当稀释倍数为1:50时,其MNf较1:100反而有所下降。这可能是与ClO₂浓度过高,蚕豆根尖细胞的有丝分裂受到抑制,受试物不能有效地作用于细胞染色体有关。该现象与戴敏⁶等报道相似。这提示诱变剂对染色体的损伤程度与其浓度呈现出一定的关系。诱变剂浓度越高,MNF越高;但超过某一阈值,高浓度的ClO₂反而使MNf下降。这一现象在实际应用中应引起重视。另外,两种ClO₂在1:100~1:200稀释时,分别出现双微核、三微核现象,这在普通的消毒剂检测中少见。提示ClO₂有较强的诱变作用。

本文实验与Ames试验结果⁶不一致,这可能是由于Ames试验与蚕豆根尖微核检测法对受试物的敏感性不同有关。

ClO₂在水体消毒后转化为氯酸盐和亚氯酸盐为主的稳定产物。有资料表明,较大量的二氧化氯进入人体会影响甲状腺,可抑制胎儿和婴儿小脑的重量、细胞数及其神经发育,而亚氯酸盐为血液中形成正铁血红蛋白的促成剂,能引起溶血性贫血和变性血红蛋白

白血症,高剂量二氧化氯可干扰动物肠道上皮细胞DNA的合成,低剂量可干扰动物睾丸和肝细胞DNA的合成⁷。目前,我国生活饮用水水质卫生标准中尚未对二氧化氯的最高允许浓度作出规定。最近,WHO认为ClO₂完全无致癌、致畸性,推荐其为安全消毒物质中的A₁级产品⁸。根据本文实验结果,建议有关部门应尽早制订相应标准,规定人体每日允许摄入量。同时,在食品、饮水行业中应慎用,使用中除严格掌握ClO₂浓度外,尤其要注意清除其残留成份。

蚕豆根尖细胞微核技术现已成为常用的一种遗传毒理学研究方法。据报道,本技术与动物试验结果的一致性极佳,孔志明等⁹报道,本方法比人外周血淋巴细胞微核方法稍敏感。本文建议,有关部门可将蚕豆根尖细胞微核技术列入《消毒技术规范》中的致突变试验项目中。

参考文献:

- 1 Ma TH. Vicia faba cytogenetic test for environmental Mutagen A report of U. S. Environmental protection Agency Gene-Tox Program J. *Mutat Res*, 1982; 99:25:292~302.
- 2 段昌群,王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨J. *植物学报*, 1995; 37(1): 14~16.
- 3 Marco AD, Desimone C, Testa RMA, et al. Importance of the type of soil for induction of Micronuclei and the growth of primary roots of Vicia faba treated with the herbicides atrazine, glyphosate and maleic hydrazide J. *Mutat Res*, 1992; 279: 9~13.
- 4 国家环境保护局. 环境监测技术规范. 第四册. 生物监测(水环境)部分S. 1986: 75~78.
- 5 戴敏,吴琼,周心一,等. 应用蚕豆根尖及叶尖细胞微核技术检测TNT及车间空气的诱变性J. *癌变·畸变·突变*, 1995; 7(1): 58~61.
- 6 Ames RG, Stratton JW. Effect of chlorine dioxide water disinfection on hematologic and serum parameters of renal dialysis patients J. *Arch Environ Health*, 1987; 42(5): 280~285.
- 7 Couri D, Abdel-Rahaman MS. Bull RJ. Toxicological effects of chlorine dioxide, chlorite and chlorate J. *Environ Health Perspect* 1982; 46: 16~23.
- 8 马小燕,刘秀英. 二氧化氯的应用研究进展J. *环境与健康杂志*, 1998; 15(2): 94~96.
- 9 孔志明,王永兴,臧宇,等. 硝基芳烃类化合物诱发外周血淋巴细胞和蚕豆根尖细胞微核的比较研究J. *癌变·畸变·突变*, 1997; 9(6): 358.