

应用蚕豆根尖细胞微核监测技术对高层水箱水的致突变性研究

袁振华 刘 蒋罗章

杭州市卫生防疫站 杭州 310006

摘要 本研究应用蚕豆根尖细胞微核试验,对本市部分单位的高层水箱水的致突变性进行了检测。结果表明,被检五个单位中,东茂宾馆和之江饭店的高层水箱水的微核检出率分别为 34.8‰和 19.2‰,与自来水对照相比,具有统计学意义,揭示上述两处的 2 次供水均有不同程度受到诱变剂的污染。这项研究结果,为寻求防止二次供水污染的对策,减少肿瘤发病,提供了重要的科学依据。

表 3 小鼠精子畸形试验

组别	剂量 (M G/KG)	动物数 (只)	精子数	畸形精子数	畸形率(‰) $\bar{x} \pm s$	P 值 (与阴性对照比)
氯硝西潘	0.5	6	6000	1720	286.7 ± 38.1	< 0.01
	2	6	6000	1281	213.5 ± 14.6	< 0.01
	10	6	6000	1488	248.0 ± 17.1	< 0.01
蒸馏水		6	6000	135	22.5 ± 15.1	

讨 论

某些经典抗癫痫药物如苯妥英钠、丙戊酸钠、卡马西平可引起人体微核及染色体畸变率增加⁽³⁾,与氯硝西潘化学结构近似的安定可引起畸胎⁽¹⁾。而氯硝西潘作为一种新型抗癫痫安定型药物由于疗效优良开始广泛应用于临床,故了解该药物对人类遗传物质损伤及诱变性能应有必要,通过本文中各项试验结果表明氯硝西潘能诱发增加小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率、增加染色体畸变率和小鼠精子畸形率,提示在本文试验条件下该药物对机体可造成潜在的遗传危害和致突变性。本文试验了三种不同药物剂量(0.2, 2, 10mg/kg)进行灌胃,此灌胃剂量比患者服药剂量高 10—100 倍,但灌胃次数仅为 5—7 次,又比小鼠半数致死量(LD₅₀ > 15g/kg)⁽⁴⁾低 100 倍左右,所以选用剂量合理。虽然临床治疗中使用剂量较低,不会出现中毒副作用,但服药疗程长,据药物在体内代谢过程认识,

药物进入人体很快进入脑灰质并扩散到细胞组织中,还可通过胎盘屏障进入胚胎,胎儿由于分解药物酶系统不完善,极易使药物和代谢产物在体内积蓄,易引起胎儿畸形⁽⁵⁾,本试验只报道氯硝西潘诱发小鼠遗传物质变异情况,在临床使用该药物是否能引进胎儿发育异常和导致某些遗传病变需进一步研究。

参考文献

1. 王祖沂,裴印权,金有豫,等. 临床精神药理学. 第 1 版. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1990: 85—93.
2. 黄幸纾,陈星若. 环境化学物致突变畸变致癌变试验方法. 第 1 版. 杭州:浙江科学技术出版社,1985: 264—271.
3. 陈朝晖,赖伏英,李宁,等. 癫痫患者淋巴细胞微核率的测定. 癌变·畸变·突变,1995;7(5): 285.
4. 温玉麟. 药物与化学物质毒性数据. 天津:天津科学技术出版社,1989: 114.
5. 刘荣华,梁福佑. 抗癫痫药——苯妥英钠诱发小鼠骨髓细胞微核的研究. 癌变·畸变·突变,1994;6(3): 31.

关键词 蚕豆根尖细胞; 微核; 高层水箱水; 致突变性

近 20 年, 作为遗传毒物报警系统的生物测试方法发展迅速, 其中植物微核监测系统——蚕豆根尖微核技术已引起不少研究者的关注, 目前国内外已广泛应用于环境污染评价和致癌因子的探讨和研究⁽¹⁻⁷⁾。Degrassi⁽⁸⁾ (1982) 利用蚕豆根尖微核试验, 检测了 X-射线、丝裂霉素 C 等多种淡水污染诱变剂损伤的微核效应, 建立了诱变剂的检测系统。从 1983 年开始, 华中师范学院陈光荣等人利用蚕豆根尖微核技术检测了农药和诱变剂损伤⁽⁹⁾, 1984 年进一步研究筛选出了对农药更为敏感的蚕豆品种——松滋青皮豆⁽¹⁰⁾, 并为环境检测建立了一套较规范的检测方法, 并已被国家环保局、环境监测总站审定编入了《生物监测技术规范》一书⁽¹¹⁾。

随着城市高层建筑日益增加及工业的发展, 饮用高层水箱水的居民人口与日俱增, 因此二次供水污染问题已广为关注, 为了保护广大城市居民的健康, 我们采用了目前环境检测中较规范、灵敏、简易而经济的检测方法——蚕豆根尖细胞微核试验, 对市区部分单位的高层水箱水的致突变性进行了检测, 现将研究结果报告如下。

材料和方法

1. 采集水样

水样采自市区的浙纺大厦、东茂宾馆、宝善宾馆、之江饭店及市防疫站孝丰宿舍的顶层水箱水, 每件水样 25 升。

2 水样制备

参照天津邢邦华的方法⁽¹²⁾。所有水样均采用 XAD—8 非极性树脂浓缩法制备。取 XAD—8 树脂用丙酮洗涤数次, 然后用重蒸水洗净装柱 (Φ 2.5cm, h: 12cm)。使用前先通过 100ml 重蒸水。将经双层纱布过滤后的水样 25L 上柱, 流速调至 100ml/m in, 流毕出水弃去, 用 100ml 丙酮流速为 2ml/m in 洗脱吸附物, 56 减压浓缩成测试原液, 25ml 相

当于 25L 水样, 备用。用 1mg/ml 环磷酰胺作为阳性对照, 阴性对照为自来水。

3 测试方法⁽¹³⁾

3.1 用水样预处理蚕豆种子

实验用蚕豆种子由华中师大生物系提供的经筛选的敏感品种——松滋青皮豆, 在 25 生化培养箱内用自来水浸种 26h-30h, 催芽 24h-72h, 待初生根长至 2~3cm 时, 用被测液浸泡根部 4~6h 后, 用卡诺氏液进行固定处理 6h, 5NHCl 软化, 染色, 制片。

3.2 染色制片

按孚尔根 (Feulgen) 染色法, 常规压片。如不能及时制片, 材料可置于 4℃ 冰箱内保存。

3.3 微核观察与计数

在低倍镜下选择根尖分生组织区平铺均匀的细胞, 直接在高倍镜下观察计数微核。每件样品镜检三个不同的根尖, 每个根尖镜检 1000 个细胞, 统计微核千分率 (%)。

3.4 数据处理

实验结果用微核率的均值与阴性对照进行比较, 从差异的显著性判断受试物的诱变性。

结果和讨论

这次研究共检测了五个单位的高层水箱水, 其微核检出率见下表 1。

从表中结果可见, 其中东茂宾馆和之江饭店高层水箱水的微核检出率分别为 34.8‰和 19.02‰, 与自来水对照相比, 经 t 检验处理, 均具有显著性差异 ($P < 0.01$, $P < 0.05$), 同时阳性对照组 (1mg/ml 环磷酰胺) 获得阳性结果。本次实验研究结果证明, 上述两处的二次供水均有不同程度受到诱变剂的污染。

1992 年本站环卫科曾作过市区高层水箱水的监测, 据报告, 水箱水质浊度、余氯、细菌总数、大肠菌群四大指标合格率分别为

89.1%, 75%, 94.6% 和 98.6%, 前二项指标差异有高度显著性, 细菌总数差异亦有显著

性, 表明了水箱水这一环节存在污染的可能性⁽¹⁴⁾。

表1 市区部分单位高层水箱水的微核检出率(‰)

样品编号	样品来源	MCN (‰) 总数	$\bar{x} \pm s_x$	X 与 CK 差数
1	浙纺大厦	50.05(16.80, 11.91, 21.34)	16.68 ± 2.72	8.16
2	东茂宾馆	104.41(40.59, 37.92, 25.90)**	34.80 ± 4.52	26.28
3	宝善宾馆	37.67(14.85, 9.97, 12.85)	12.56 ± 1.42	4.04
4	之江饭店	57.05(22.57, 19.82, 14.66)*	19.02 ± 2.32	16.7
5	市防疫站宿舍	10.16(4.17, 2.00, 3.99)	3.37 ± 0.70	- 5.15
阴性对照	自来水(CK)	29.54(11.86, 13.71, 3.97)	8.52 ± 3.13	0
阳性对照	环磷酸胺 1mg/ml	132.56(28.74, 62.32, 41.50)**	44.19 ± 9.78	35.47

与阴性对照比较, 具有显著性差异 * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

自来水中的有机污染物据刘世良等人⁽¹⁵⁾ (1994) 分析报告, 大致有苯酚类、烷(烯)酸类、苯系物及三氯甲烷等, 其中不少对人体健康具有较强的危害作用⁽¹⁶⁾。

根据蚕豆根尖微核试验结果判断淡水的污染程度, 可应用陈光荣等⁽¹⁷⁾ (1986) 提出的“污染指数”这个概念作出评价, 初步提出: 污染指数在 0~ 1.5 区间为基本无污染, 1.5~ 2 区间为轻度污染, 2~ 3.5 区间为中度污染, 3.5 以上为重污染, 按上述判断标准, 本次测试结果可确认东茂宾馆水箱水为重污染(污染指数为 4.08), 之江饭店水箱水为中度污染(污染指数为 2.23), 浙纺大厦为轻度污染, 余者为基本无污染。

蚕豆根尖微核技术是一种以染色体损伤及纺锤丝毒性等为测试终点的植物微核监测方法, 目前多见于环境及水体污染的监测。据报道本项技术与动物实验方法之间对环境致突变物引起的染色体畸变等定性反应的相符率可达 99% 以上, 而且方法简单, 易操作, 灵敏度高, 特别适用于检测低剂量的弱诱变剂⁽¹⁾。本项技术无疑是环境遗传毒物的快速筛选方法之一。

参考文献

1. 魏玉丹, 甘卉芳. 生物学短期测试系统在污水致突变研究

中的应用. 国外医学卫生分册, 1990; 17(4): 215

2. 鲍宝珠, 徐友梅, 祝庆蕃等. 伊洛河巩县段河水、饮用井水及工业废水的致突变性研究. 首届环境毒理学术会议论文集, 1988: 167.

3. 张淑兰. 灌溉用污水的细胞遗传毒理学研究. 环境与健康, 1994; 11(5): 196

4. 阮萃才, 梁远, 刘锦玲. 蚕豆根尖微核技术监测环境污染物的诱变活性. 环境科学, 1992; 13(4): 56

5. 张小燕, 祝庆蕃, 杨斌等. 蚕豆根尖细胞微核试验检测交链孢醇单甲醚的诱变性. 第三届环境诱变剂学术论文集, 1987: 100

6. 梁远, 阮萃才, 刘锦玲. 真菌代谢提取物对蚕豆根尖细胞微核的诱导效应. 癌变·畸变·突变, 1991; (3): 43

7. 陈华, 孙昌盛. 应用蚕豆根尖微核技术检测肝癌高发区豆豉的诱变活性. 癌变·畸变·突变, 1995; 7(4): 253

8. Degraffi F, Rizzoni M. Micronucleus test in Vicia faba root tips to detect mutagen damage in fresh-water pollution. *Mutat Res*, 1982, 97: 19

9. 陈光荣, 金波. 蚕豆根尖微核技术检测农药和诱变剂损伤. 华中师院学报, 1983; (4): 69

10. 金波, 陈光荣. 蚕豆根尖微核试验敏感品种的筛选. 华中师院学报, 1984; (2): 2

11. 陈光荣, 金波. 蚕豆根尖细胞微核控制系统与环境遗传毒性检测策略的进展. 癌变·畸变·突变, 1995; 7(4): 253

12. 邢邦华, 支秀珍, 刘克明. 城市污水处理厂再生水自然净化中诱变活性变化的观察. 环境与健康, 1994; 11(5): 217

13. 陈光荣, 李明, 金波. 利用蚕豆根尖微核技术监测青山湖污染的研究. 中国环境科学, 1985; 5(4): 2

14. 李严正, 陈若琼. 杭州市水箱水质调查评价. 浙江预防医

端粒酶活性定量分析的方法学研究

陈铁河¹ 印木泉² 毕洁² 陈耀富² 朱炳钗¹

海军医学研究所 上海 200433 ² 第二军医大学卫生毒理教研室

摘要 本文报道一种端粒酶活性定量测定方法,并对反应体系和条件、分离、测定等多种可能影响测定结果的因素进行了初步探讨。结果表明本方法的批内和批间变异系数分别为15.6%和16.4%。放射性计数在700~7000的范围内与端粒酶活性呈现良好的线性关系。用本方法测定了部分肿瘤活检组织样品,其结果与文献值基本一致。

关键词 端粒酶;定量分析

STUDIES ON THE METHODOLOGY FOR QUANTITATIVE DETERMINATION OF TELOMERASE ACTIVITY

Chen Tiehe, Yin Muquan, Bi Jie, Chen Yaofu, Zhu Bingchai

Department of Health Toxicology, Second Military Medical University, Shanghai 200433

Abstract In this paper, an assay of quantitative determination of telomerase activity has been studied. And some factors such as reacting system and conditions, methods of isolation and fixation, and so on, which may influence the reproduction were also investigated. Results showed that the inter-batch and extra-batch variations were 15.6% and 16.4%, respectively. It revealed well linear relationship between telomerase activity and the value within 700~7000/m in determined by radioactive count. The telomerase activity of some specimens of cancer results from the procedures of this assay were accordant with literature.

Key words Telomerase; Quantitative assay

端粒酶活性的存在对于维持细胞的分裂增殖起着极其重要的作用。由于功能上的需要,生殖细胞含有较为丰富的端粒酶活性,但是在受精卵分化发育形成胚胎的过程中端粒酶基因被逐渐关闭,所以正常体细胞中测不

到端粒酶活性。可是当体细胞发生恶性转化后向肿瘤发展的过程中,端粒酶基因可被再次激活表达,因此绝大多数肿瘤组织表现较高的端粒酶活性。由于端粒酶分布和表达具有上述特点,所以目前端粒酶活性检测在临

学与疾病监测, 1992; 4(3): 28

15. 刘世良, 何尚浦, 张银华等. 某市自来水有机污染物健康危险初步评价. 环境与健康, 1994; 11(5): 202

16. 朱惠刚. 水中有机化学污染物对人体影响评价. 中国环

境科学, 1987; 7(4): 67.

17. 陈光荣, 金波, 李明. 污染指数在微核技术监测水质污染中的应用. 中国环境科学, 1986; 6(2): 60