

• 研究简报 •

稀土元素钬对蚕豆根尖细胞姊妹染色单体互换的影响

屈艾¹, 汪承润^{1,2}, 薄军¹, 张永¹, 高俊芳¹, 高宽场¹

(1. 徐州师范大学生物系, 江苏 徐州 221116; 2. 淮南师范学院化学生物系, 安徽 淮南 232001)

【摘要】背景与目的: 研究稀土元素钬对蚕豆根尖细胞姊妹染色单体互换的影响。材料与方法: 将蚕豆初生根浸入 10^{-4} mol/L 5-BrdU 溶液中, 23 °C 避光培养 18 h, 然后把实验组蚕豆转移到硝酸钬溶液中, 23 °C 避光培养 4 h, 对照组蚕豆转移到去离子水中 23 °C 避光培养 4 h。再把实验组、对照组蚕豆分别转移到 10^{-4} mol/L 5-BrdU 溶液中继续在 23 °C 避光条件下培养 17 h。切取根尖, 在 23 °C 避光条件下用 0.05 % 秋水仙素处理 3.5 h, 固定液固定 3.5 h, 盐酸水解, Schiff 试剂染色, 制片, 镜检, 统计 SCE 频率/细胞。结果: 各剂量组的硝酸钬溶液均能诱导蚕豆根尖细胞 SCE 频率显著上升, 并且细胞核异常现象明显。结论: 钬元素对蚕豆根尖具有一定的细胞毒性和遗传毒性。

【关键词】钬; 姊妹染色单体互换; 细胞毒性和遗传毒性

中图分类号: Q33; R994

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2004)03-0173-02

Effect of Rare-Earth Element Holmium on the Sister Chromatid Exchange(SCE) of Root TIP Cells of *Vicia Faba*

QU Ai¹, WANG Cheng-run^{1,2}, BO Jun¹, et al

(1. Department of Biology, XuZhou Normal University, Xuzhou 221116, China; 2. Department of Chemistry and Biology, HuaiNan Normal College, Huainan 232001, China)

【ABSTRACT】BACKGROUND & ATM: To evaluate the effect of rare-earth Holmium on the sister chromatid exchange (SCE) of root tip cells of *Vicia faba*. MATERIAL AND METHODS: The primary roots of *Vicia faba* were cultured for 18 hours in 10^{-4} mol/L 5-BrdU solution at 23 °C in the dark. In the disposal groups, roots were moved to nitrate of holmium solution and incubated for 4 hours at 23 °C in the dark; in the control group, roots were moved to distilled water and treated for 4 hours at 23 °C in the dark. The roots in the disposal groups and control group were transferred to 10^{-4} mol/L 5-BrdU solution respectively and cultured for 17 hours at 23 °C in the dark. The root tips of *vicia faba* were dissected and soaked in 0.05 % colchicines solution for 3.5 hours in the same condition as above, and treated in fix solution for 3.5 hours, hydrolyzed in HCl solution, stained in Schiff agent. Finally, the slides were prepared and examined under microscope, the frequency of SCE were analyzed by *t*-test. RESULTS: The results showed that, in all of the disposal groups, Holmium element significantly increased the frequency of SCE compared with the control group. Furthermore, Holmium element also induced anomalous nuclei. CONCLUSION: It suggests that Holmium element may have certain cytotoxicity and genotoxicity to root-tip cells of *vicia faba*.

【KEY WORDS】holmium; sister chromatid exchange; cytotoxicity and genotoxicity

姊妹染色单体互换 (sister chromatid exchange, SCE) 即一条染色体的两条姊妹染色单体之间发生了片段互换, 是染色体在 DNA 复制过程中产生的非正常交换现象。近年来因发现物理、化学等诱变剂能使

SCE 频率显著提高, 而且在检测遗传物质损伤的多种方法中, SCE 实验具有快速、灵敏等优点, 与 Ames 实验具有同样效果, 比微核实验灵敏几十到几百倍。因此, 这一方法被公认为检测诱变剂和致癌剂的最灵

敏的细胞遗传学方法之一^[1],其应用前景也引起人们的极大关注^[2,3]。稀土元素钬对蚕豆根尖细胞的 SCE 研究至今尚未见报道,为此,本文利用氧化钬为原料合成硝酸钬结晶,配制梯度硝酸钬溶液,检测钬离子对蚕豆根尖细胞 SCE 的影响。

1 材料与方 法

1.1 试验材料和试剂 蚕豆 (*Vicia faba*): 小青皮豆,徐州习见品种^[4]。氧化钬,高纯,上海化学试剂采购供应站分装厂; 5-溴脱氧尿嘧啶 (5-BrdU), Sigma 公司销售;秋水仙素,上海卫辉化学试剂厂生产。

1.2 溶液配制

1.2.1 硝酸钬溶液的制备 精确称取 128 mg 氧化钬,加微量稀 HNO₃,加热反应制备水合结晶^[5],配成 128 mg/L 贮备液,再稀释成梯度溶液 8.0、4.0、2.0、1.0、0.5 mg/L(以氧化钬的质量体积比)。

1.2.2 5-BrdU 溶液的配制 10⁻⁴ mol/L,去离子水配制。

1.3 实验分组 分成 5 个剂量组 (8.0、4.0、2.0、1.0、0.5 mg/L) 和一个阴性对照组(去离子水)。

1.4 试验方法

1.4.1 催芽和染毒 按常规浸种法催芽^[6],结合孔志明、邢万金试验方法^[7,8]进行染毒,略加改进。待蚕豆初生根长至 15~20 mm 时,浸入盛有 10⁻⁴ mol/L 的 5-BrdU 溶液的小烧杯中,在 23 °C 避光条件下悬浮培养 18 h。然后将对照组的蚕豆洗净后移入去离子水中继续避光培养 4 h,再将各剂量组蚕豆洗净后分别移入硝酸钬的梯度溶液中避光培养 4 h。最后对对照组、各剂量组蚕豆取出洗净后转移至 10⁻⁴ mol/L 5-BrdU 溶液中继续培养 17 h。

1.4.2 秋水仙素处理 洗净蚕豆,剪取根尖(长约 1.0 cm),浸入盛有 0.05% 秋水仙素的青霉素小瓶中,23 °C 避光处理 3.5~4 h。

1.4.3 固定 用新配制的卡诺氏固定液,在上述条件下固定根尖 3.5 h。

1.4.4 水解和染色 用 1 mol/L HCl,60 °C 下处理根尖 6~8 min,洗净根尖,用 Schiff 试剂避光染色至根尖呈深紫红色。

1.4.5 制片、镜检与统计 常规压片、镜检,每组蚕豆随机取 4 个根尖,每根尖观察 30 个分裂相。染色单体两端的交叉计为一次交换,中间的交叉记为两次交换,发生在着丝点部位的,经判明不是两条染色单体发生扭转,记为一次交换,SCE 频率以每细胞 SCE 数的平均值计算 $\bar{x} \pm s$ 。

2 结 果

本实验中发现,1、2 mg/L 剂量组蚕豆根尖生长基本正常,4 mg/L 剂量组根尖微黄变硬,生长减慢,而 8 mg/L 剂量组根尖变黑变硬,分裂相显著下降,以致于不足统计,表明达到一定浓度的钬离子具有明显的细胞毒性。硝酸钬的 5 个梯度溶液对蚕豆根尖细胞 SCE 的影响见表 1。随着剂量的递增,蚕豆根尖细胞 SCE 频率显著上升,而且呈现良好的剂量-效应关系($r = 0.982, P < 0.05$)。因此,钬离子对蚕豆根尖细胞遗传物质可造成一定的损伤。

表 1 硝酸钬对蚕豆根尖细胞的姊妹染色单体互换的影响
Table 1 Effect of nitrate holmium on the sister chromatid Exchange of *Vicia faba*

dosage mg · L ⁻¹	number of mitosis phase observed	SCE($\bar{x} \pm s, \times 10^{-2}$)
0.0	120	4.60 ± 0.55
0.5	120	6.03 ± 0.31*
1.0	120	7.62 ± 0.29**
2.0	120	9.13 ± 0.71***
4.0	120	10.06 ± 0.51***
8.0	-	-

Notation: significant difference of *t* test is represented with *, $P < 0.05$; terribly significant difference of *t* test is represented with **, $P < 0.01$; highly significant difference of *t* test is represented with ***, $P < 0.001$.

3 讨 论

3.1 微核千分率(FMN)、染色体畸变率(CAF)、和姊妹染色单体交换(SCE)3种检测方法敏感性比较 本实验室曾研究了硝酸钬对蚕豆根尖细胞 FMN 和 CAF 的影响,结果表明,1 mg/L 的硝酸钬溶液不能引起 FMN 显著上升,却能诱导 CAF 极显著增加($P < 0.01$),当剂量达到 2 mg/L 时才引起 FMN 显著性升高($P < 0.05$)。由此可见,CAF 比 FMN 检测方法灵敏。本实验中,1 mg/L 的硝酸钬溶液即能诱导 SCE 极显著性增加($P < 0.01$),不仅证明钬离子具有一定的遗传毒性,而且验证了 SCE 的灵敏性远远超过 FMN 检测技术。因此,SCE 和 CAF 这两种检测方法都比 FMN 灵敏,都是毒理遗传学的敏感指标。已有研究表明,不能诱发染色体断裂的受检物浓度的被测溶液仍可引起 SCE 频率增高^[10],说明 SCE 比 CAF 还要灵敏。因此,就灵敏性而言,其大小顺序为: SCE > CAF > FMN。

3.2 稀土元素钬的细胞毒性和遗传毒性 实验中发现,一定剂量的硝酸钬溶液可诱导蚕豆根尖生长减慢、变黄、变黑、变硬、细胞核异常,表明稀土元素钬具有一定的细胞毒性。硝酸钬溶液还诱导蚕豆根尖细胞 SCE 显著升高,表明稀土元素钬具有一定遗传毒性。有人曾证明七种农药对 SCE 的影响在人和

产物(chlorinated by-products, CBPs)。CBPs 主要由含氯消毒剂与水中有机物反应生成,能诱导哺乳动物产生肿瘤^[3]。在 Ames 试验中,含氯消毒剂消毒后饮用水对沙门氏菌 TA₁₀₀ 株致突变活性是 TA₉₈ 株的 2~8 倍。且加入大鼠肝微粒体酶时活性降低(-S₉)提示饮用水致突变是以直接碱基置换型为主^[4]。本次试验,并未发现强氯净消毒剂对小鼠骨髓嗜多染红细胞有致突变作用,这可能与含氯消毒剂产生致突变能力的强弱,与水中污染有机物程度(尤其腐植酸)和氯化时间等因素有关^[4];臭氧具有较好的消毒效果,特别是作为空气和水的消毒越来越被广泛应用。但有人报道用臭氧发生器作用 15 min,纯净水中含亚硝酸盐 0.119 1~0.152 0 mg/L,自来水中含亚硝酸盐 0.112 9~0.162 6 mg/L,说明消毒后亚硝酸盐含量严重超标^[5]。本试验未发现高浓度臭氧水对小鼠骨髓嗜

(上接 174 页)

植物细胞中是基本相同的,并进一步说明植物根尖细胞 SCE 与人外周血淋巴细胞 SCE 在检测诱变剂作用本质上的一致性^[8]。Vig BK^[10]也早已发现,植物和动物之间对环境致突变物所引起的染色体畸变等定性反应的一致性可达 99% 以上。因此,推测钽离子对哺乳动物外周血淋巴细胞 SCE 的影响也可能存在与蚕豆根尖 SCE 相似的效应,暗示钽元素对人类可能具有潜在的遗传毒性。

参考文献:

- [1] Perry P and Evans HJ. Cytological detection of mutagen-carcinogen exposure by sister chromatid exchange[J]. *Nature*, 1975, 258(13): 121-125.
- [2] Wanjin X, Zili Z. A comparison of SCE test in human lymphocytes and *Vicia faba*: a hopeful technique using plants to detect mutagens and carcinogens [J]. *Mutat Res*, 1990, 241: 109-113.
- [3] Zhang ZL, Yang J, Zhang Q, et al. Studies on the utilization of a plant SCE test in detecting potential mutagenic agents [J]. *Mutat Res*, 1991, 261: 69-73.

(上接 177 页)

用。本试验选择小鼠妊娠后第 4~16 d 给药,包括了小鼠胚胎的整个敏感期。结果表明,水提液对妊娠小鼠胚胎无致畸作用。在致畸活性和致畸部位上看,山萸肉水提液与阴性对照是基本一致的,因此认为液对脊椎动物胚胎无致畸作用。

综上所述,山萸肉水提液在本实验条件下对实验小鼠无急性毒性、蓄积毒性和胚胎毒性,为将其开发为新的保健食品资源提供了科学依据。

多染红细胞有致突变作用,今后应进一步探讨;戊二醛作为消毒和灭菌剂被广泛应用于医疗单位,其有较强的刺激性,同时也易引起变态反应,但未见报道有致突变作用;聚维酮碘溶液是一种无毒、无刺激的消毒剂,也未见报道有致突变作用,这与本次试验结果相一致。

参考文献:

- [1] 薛广波. 实用消毒学[M]. 北京:人民军医出版社,1986.
- [2] 卫生部. 消毒技术规范[S]. 2002. 126-143.
- [3] 林辉,刘建平. 氯消毒饮水的毒性及其流行病学研究进展[J]. 中国消毒学杂志,2000,17(2): 89-93.
- [4] 徐丹凤. 氯化饮水致突变性与腐植酸的关系[J]. 国外医学卫生学分册,1992,20(1): 20.
- [5] 魏兰芬,许激,林军明. 水中臭氧杀菌效果及产生亚硝酸盐量的检测[J]. 中国消毒学杂志,2002,19(1): 48-50.
- [4] 嵇庆,朱卫中,徐业义,等. 三种蚕豆品种在微核试验中的敏感性比较[J]. 徐州师范学院(自然科学版),1994,12(2): 50-52.
- [5] 张若桦. 稀土元素化学[M]. 天津:天津科学技术出版社,1987. 112.
- [6] Tempelaar, MJ, de Both MT, Versteegh JE. Measurement of SCE frequencies in plants: a simple Feulgen-staining procedures for *vicia faba* [J]. *Mutat Res*, 1982, 103(3-6): 321-326.
- [7] 孔志明,吴庆龙,夏恩中,等. 蚕豆 SCE 检测环境诱变剂的方法学研究[J]. 环境科学,1996,17(1): 47-49.
- [8] 邢万金,王宇一. 7 种农药对植物及人外周淋巴细胞 SCE 影响的比较观察[J]. 癌变·畸变·突变,2001,13(3): 172-174.
- [9] 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.
- [10] Vig BK. Somatic mosaicism in plants with special reference to somatic crossing over [J]. *Environ Health Prospect*, 1978, 27: 27-36.

参考文献:

- [1] 赵世萍,付桂香. 山萸萸化学成分和药理作用的研究进展[J]. 中草药,1997,28(3): 187-188.
- [2] 刘保林,朱彤妮,禹志领,等. 山萸萸醇提物对实验动物血糖、血脂、血小板聚集的影响[J]. 中国药科大学学报,1992,23(1): 19-21.
- [3] 黄钰铃,呼世斌,刘音. 萸萸果实提取物抑菌作用研究[J]. 食品工业科技,2002,23(10): 31-32.
- [4] GB15193.14-1994.《食品安全性毒理学评价程序》[S].