二氯化汞对人外周血淋巴细胞的遗传毒性及硒的防护作用

孟紫强　张连珍
（山西大学环境科学系）

环境中的汞对人体健康有潜在危害性．它可与 DNA 中的不同组分相互作用，引起 DNA 链断裂和诱发染色体畸变．近来研究表明，硒对汞的毒作用具有防护效应，这对于估价汞的健康损害作用似是一个重要的修饰因子．但是，有关硒对汞化合物引起的 DNA 损伤的保护效应的文献报道甚少，其防护机制亦未完全阐明．本文采用对检出致 DNA 损伤因子较为灵敏的姊妹染色单体交换（SCE）实验技术[1,2]，通过对体外培养的人外周血淋巴细胞 SCE 的观察分析，研究了 Na_2SeO_3 对 $HgCl_2$ 引起的染色体 DNA 损伤的防护效应．

一、材料和方法

外周血淋巴细胞培养按文献[3]方法进行，常规气干法制片，一周内将标本作姊妹染色单体差别染色．其主要过程如下：取健康成人静脉血，将 0.2ml 全血加入 5ml RPMI 1640 培养液（含 20% 小牛血清，PHA 和肝素适量，青霉素 100 单位/ml，链霉素 100μg/ml）中，在 37 ± 0.5℃ 培养 24 小时以后加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷（最终浓度为 4μg/L），在黑暗中继续培养 48 小时．固定前 3 小时加入秋水仙素（最终浓度为 2×10^{-7}mol/L）．离心收集细胞，以 0.075mol/L KCl 低渗 15 分钟，用固定液（甲醇：乙酸为 3:1，V/V）固定 3 次．再用常规气干法制片．将此标本平放于（细胞面向上）平皿内，加入 2 × SSC 液（1SSC：0.015 mol/L 柠檬酸钠，0.15 mol/L NaCl）浸没覆于标本上面的擦镜纸，在 56℃ 下用 30W 紫外灯照射 30 分钟（标本与灯管距离为 10cm），然后用自来水冲片，气干，用 5% Giemsa 染液染色 15 分钟，冲洗、干燥，于光学显微镜下按照文献 [4] 观察分析第 1 次、第 2 次、第 3 次及以上的分裂细胞．每个处理分析 100 个中期细胞以测定各次分裂细胞所占的百分率．

将 $HgCl_2$ 或 Na_2SeO_3 溶于无血清的 RPMI 1640 培养液中均制成 3×10^{-4}mol/L 浓度，再按不同处理将其加入培养液至所需浓度．细胞在培养期间均接受所试化合物的处理．

SCE 分析：仅对第 2 周期中期细胞进行，凡染色体臂端部具有染色单体交换者，计为一个 SCE；臂中部一个节段交换者，计为 2 个 SCE；着丝粒区具染色单体交换者因难以与制片时单体的扭转现象相鉴别，故不予统计．每点分析 100 个中期细胞，同时观察分析 2000 个细胞以测定有丝分裂指数．所获数据均进行统计学 t 检验．

二、结果及分析

1. $HgCl_2$ 对 SCE 的诱导

对不同浓度 $HgCl_2$ 处理的人外周血淋巴细胞培养物进行分析，结果表明，$HgCl_2$ 可使细胞分裂指数下降，且引起细胞 SCE 显著增高，在一定浓度范围内（1×10^{-7}—1×10^{-5}mol/L）细胞 SCE 随浓度的增加而增高，显示一定的剂量-效应关系（表 1）．

表 1　$HgCl_2$ 对人外周血淋巴细胞 SCE 的诱发和分裂指数的影响

浓度 (mol/L)	细胞分裂指数	SCE/细胞 ($\bar{X}\pm SE$)	SCE 增长率(%)
0	3.17	2.84±0.34	0
1×10^{-7}	2.35	4.08±0.37*	43.66
3×10^{-7}	2.71	4.15±0.38*	46.13
1×10^{-6}	2.01	4.59±0.39**	61.62
3×10^{-6}	1.88	4.61±0.39**	62.32
1×10^{-5}	1.51	5.68±0.44***	100.00

注：与对照组比* $P<0.05$，** $P<0.01$，*** $P<0.001$.

表 2　Na_2SeO_3 对人外周血淋巴细胞 SCE 的诱发

浓度 (mol/L)	细胞分裂指数	SCE/细胞 ($\bar{X}\pm SE$)	SCE 增长率(%)
0	3.0	4.53±0.44	0
3×10^{-7}	2.1	4.89±0.40	7.95
1×10^{-6}	1.7	5.72±0.45	26.27
3×10^{-6}	1.0	7.17±0.45***	58.28
1×10^{-5}	0	细胞未生长	无法检测
3×10^{-5}	0	细胞未生长	无法检测

注：与对照组比 *** $P<0.001$.

2. Na_2SeO_3 对 SCE 的诱发

表2表明，人血淋巴细胞经 Na_2SeO_3 处理后，在一定浓度范围内细胞分裂指数下降、SCE 增高，且 SCE 增高的程度显示有剂量依赖关系，表明过量的硒化合物对人体健康具有潜在危害性.

图 1 表明，虽然硒和汞均能引起细胞 SCE 增高，但在一定浓度范围内 (3×10^{-6} mol/L 以下)，硒对 SCE 的诱发作用远小于汞对 SCE 的诱发作用，意味着在一定浓度下汞比硒对人体健康具有更大的潜在危害性.

图 1 还表明，$HgCl_2$ 浓度在 1×10^{-5}mol/L 时，人血淋巴细胞分裂指数降至 1.51，细胞仍能分裂生长；而用同样浓度的 Na_2SeO_3 处理，细胞分裂指数降为 0，细胞的分裂生长完全停止，表明 Na_2SeO_3 对人血淋巴细胞作用的安全系数甚小.

3. $HgCl_2$ 对细胞周期动力学影响

图 2 指出，$HgCl_2$ 强烈抑制淋巴细胞在体外的分裂能力，使细胞周期推迟. $HgCl_2$ 不仅使细胞分裂指数下降(表 1)，而且随 $HgCl_2$ 浓度的增加分裂三次以上的细胞数大为减少，分裂一次的细胞数明显增加，并显示一定的剂量-效应关系(图 2).

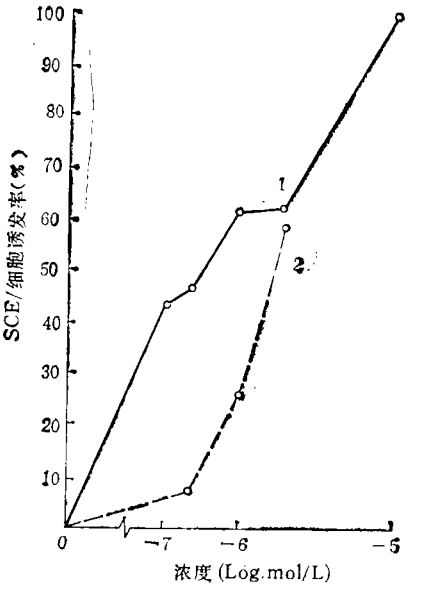

图 1　硒和汞对人外周血淋巴细胞 SCE 诱发率的比较

1. $HgCl_2$ 2. Na_2SeO_3 (1×10^{-5}mol/L 出现细胞毒效应) SCE/细胞诱发率＝[(实验组 SCE/细胞-对照组 SCE/细胞)/对照组 SCE/细胞]×100%

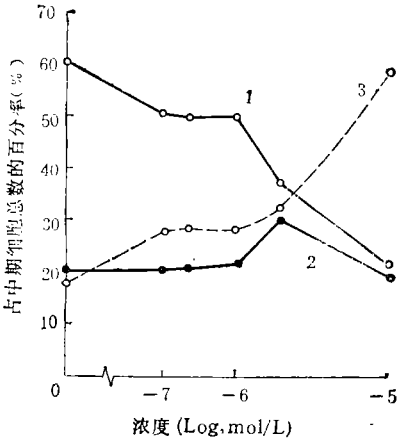

图 2　$HgCl_2$ 对人外周血淋巴细胞周期的效应

每组分析 100 个中期细胞. 1.第 1 次分裂细胞 2.第 2 次分裂细胞 3.第 3 次分裂细胞

表 3　硒对 $HgCl_2$ 诱发细胞 SCE 的防护效应

$HgCl_2$ 浓度 (mol/L)	Na_2SeO_3 浓度 (mol/L)	分子比 (Se:Hg)	SCE/细胞 ($\bar{X}\pm SE$)	SCE/细胞抑制率 (%)
0	0	—	4.53±0.41	—
1×10^{-5}	0	0	5.78±0.48	0
1×10^{-5}	3×10^{-7}	1:33	5.29±0.48	8.48
1×10^{-5}	1×10^{-6}	1:10	5.12±0.48	11.42
1×10^{-5}	3×10^{-6}	1:3	4.90±0.51	15.22
1×10^{-5}	1×10^{-5}	1:1	4.35±0.51*	24.74

* 与第二组相比 $P<0.05$.

表 4　硒对 $HgCl_2$ 推迟细胞周期的防护效应

Na_2SeO_3 浓度 (mol/L)	$HgCl_2$ 浓度 (mol/L)	分子比 (硒:汞)	细胞分裂指数	不同次分裂细胞占中期细胞的百分率(%)		
				第一次	第二次	第三次
0	0	—	3.0	29.81	23.56	51.92
0	1×10^{-5}	0	0.8	36.06	39.42	24.52
3×10^{-7}	1×10^{-5}	1:33	0.96	37.93	33.00	29.06
1×10^{-6}	1×10^{-5}	1:10	1.37	34.13	36.06	29.80
3×10^{-6}	1×10^{-5}	1:3	2.12	22.77	33.17	45.05
1×10^{-5}	1×10^{-5}	1:1	1.87	32.24	25.00	49.34

4. 硒对 $HgCl_2$ 诱发 SCE 的防护作用

为了研究硒化合物对 $HgCl_2$ 诱发淋巴细胞 SCE 的防护效应，细胞在 1×10^{-5}mol/L $HgCl_2$ 培养的同时，加入不同量的 Na_2SeO_3，结果表明（表 3），Na_2SeO_3 对 $HgCl_2$ 诱发 SCE 有防护作用，其防护作用的大小与 Na_2SeO_3 的浓度有关．当细胞接受 $HgCl_2$ 和 Na_2SeO_3 的浓度均为 1×10^{-5}mol/L 时，即二者的分子比为 1 时，硒的防护效果最佳，可以完全防止 $HgCl_2$ 对细胞 SCE 的诱发．

5. 硒对 $HgCl_2$ 推迟细胞周期的防护

$HgCl_2$ 对淋巴细胞周期动力学有强烈抑制作用(图 2)．淋巴细胞接受 1×10^{-5}mol/L $HgCl_2$ 的同时，加入不同量 Na_2SeO_3 的实验结果表明，硒化合物能防止 $HgCl_2$ 对细胞周期动力学的不利影响（表 4）．当硒/汞分子比为 1 时，在 72 小时培养期间，各次分裂的细胞数接近未接触 $HgCl_2$ 的对照组水平，表明这时硒化合物完全防止了 $HgCl_2$ 对细胞周期的推迟作用．

三、讨　论

本文实验结果指出，人外周血淋巴细胞在全血培养期间接受 $HgCl_2$ 处理后，细胞 SCE 显著增高，细胞周期推迟，表明 $HgCl_2$ 对细胞 DNA 有损伤作用．最近研究报道，Hg^{2+} 和 CH_3Hg^+ 主要通过碱基而与核酸组分相结合[5,6]．设想 DNA 与 Hg^{2+} 反应生成不易折叠的 DNA-Hg^{2+} 复合物，Hg^{2+} 还可使两条 DNA 结合在一起，导致 DNA 交联，阻碍了分裂细胞在 S 期 DNA 解旋过程的进行．这些均可影响 DNA 复制、抑制细胞分裂，使细胞分裂指数下降，细胞周期推迟，染色体畸变和染色单体交换（SCE）频率增高等．

本实验结果也表明，Na_2SeO_3 浓度较高时能引起淋巴细胞 SCE 增加．这可能是由于在本实验全血培养物中的红细胞含有大量谷胱甘肽，它可使 Na_2SeO_3 转化为可与 DNA

（下转第 49 页）

锅炉，普通设计的燃烧器平均 NO_x 排放在 300—500ppm（考虑过量空气系数为 1.06），而用复合前置燃烧装置燃用水煤浆时，可使锅炉的 NO_x 排放降低到小于 150ppm（考虑过量空气系数为 1.06），故作为一种新型的燃烧设备，复合前置燃烧室不失为一种理想的低污染燃烧器，已可用于工业性试验。

四、结　论

根据以上在复合前置燃烧试验装置中的试验研究及分析，可以得出几点初步结论：

1. 采用分段送风燃烧，保持较低的氧量水平，能降低炉内温度水平，有效地抑制 NO_x 生成及排放。

2. 水煤浆在复合前置燃烧室中的雾炬燃烧试验表明，水煤浆是一种很有前途的清洁代用液体燃料，而采用分段送风燃烧等方法的复合前置燃烧室则是一种理想的低污染燃烧设备。

3. 由测定沿水煤浆燃烧火炬的 NO_x 生成以及排放规律表明，最大 NO_x 浓度均出现在相应最高火炬温度左右附近，而降低火炬温度水平，则能有效地减少 NO_x 的排放。

致谢：本研究工作是在岑可法教授的直接领导下进行的，试验阶段曾得到浙江大学燃烧实验室曹英武、池作和、李绚天、葛林甫同志的大力协助，在此表示感谢。

参 考 文 献

[1] 岑可法等，提高水煤浆燃烧效率和燃烧强度的途径，第七届国际煤浆制备与利用会议论文集，1985，美国。
[2] 沈珞婵等，浙江大学学报，**21**(6)，103(1987).
[3] 岑可法等，燃料化学学报，**12**(2)，149(1984).
[4] 岑可法等，燃料化学学报，**12**(1)，33(1984).
[5] Pruce, L., *Power*, **125**(1), 33(1981).
[6] Felke Bergsma, *Ind. Eng., Chem. Process*, Des, Dev., **24**(1), 1985.

（收稿日期：1988 年 3 月 7 日）

（上接第 9 页）

作用的活性形式，即活性突变剂谷胱甘肽-Se^-，导致 DNA 损伤，SCE 增高。

实验结果还表明，硒化合物对 $HgCl_2$ 诱发细胞 SCE 和推迟细胞周期的作用有防护效应。虽然 3×10^{-6}mol/L 的 Na_2SeO_3 或 1×10^{-5}mol/L 的 $HgCl_2$ 单独处理淋巴细胞，均可显著提高细胞 SCE 频率，但是如以二者的上述浓度同时处理淋巴细胞时，却可使细胞 SCE 下降至未受汞或硒处理的对照细胞的 SCE 水平。更为有趣的是，1×10^{-5} mol/L 的 Na_2SeO_3 可使细胞生长停止，显示细胞毒作用，1×10^{-5}mol/L $HgCl_2$ 可使细胞周期推迟、SCE 显著增高。但如二者均以上述浓度同时处理细胞时，淋巴细胞可继续生长，且细胞 SCE 频率和细胞周期均接近未作任何处理的对照组。这既消除了该浓度下 Na_2SeO_3 的细胞毒作用，又消除了 $HgCl_2$ 诱发细胞 SCE 和推迟细胞周期的作用。这意味着，这两种化合物相互间具有拮抗作用，其拮抗机制可能是在于汞和硒形成了高分子复合物，从而降低了各自的细胞毒性所致[7,8]。在含有 Na_2SeO_3 和 $HgCl_2$ 的体外全血培养物中有谷胱甘肽硒和汞分子比为 1:1:1 的复合物形成[9]。在这种复合物中汞和硒都失去了它们能使染色体 DNA 损伤的活性。由于红细胞中含谷胱甘肽的浓度较高，本实验全血培养物中含大量红细胞，故本实验结果支持下述观点：即谷胱甘肽-Se-Hg 复合物的形成可能是 $HgCl_2$ 和硒化合物相互拮抗的关键步骤。

参　考　文　献

[1] Stetka, D. G. et al., *Mutat. Res.*, **41**, **343** (1976).
[2] Carrano, A. V. et al., *Nature* (London), 271, 551 (1978).
[3] Crossen, P. E. and W. F. Morgan, *Exp. Cell Res.*,

（下转第 56 页）

表 8 SO_3^{2-} 干扰下的 BOD_5 测定值及回收率*

SO_3^{2-} 含量 (mg/L)	0	1.0	2.0	3.0	5.0
"标准方法" BOD_5					
测定值 (mg/L)	3.73	4.37	4.11	4.42	4.13
回收率(%)	100	117	110	118	111
$HgCl_2$ 碘量法 BOD_5					
测定值 (mg/L)	5.2	4.9	5.3	5.2	5.1
回收率(%)	100	94	102	100	98
盐酸碘量法 BOD_5					
测定值 (mg/L)	5.7	5.5	5.3	5.5	5.7
回收率(%)	100	96	93	96	100

* 3 次测定均值.

法"的 BOD_5 回收率显著偏高，而一次法则排除了化学氧化耗氧的干扰.

八、试 验 步 骤

1. 用少量稀释废水样冲洗两个有编号的培养瓶，以虹吸法用稀释水将两瓶装满，直至溢出少许，用吸管在其中一瓶深部处加入浓度为 10mg/ml 的 $HgCl_2$ 溶液 0.2ml (或浓盐酸 1.2ml). 如果瓶壁有气泡，要轻击瓶壁使之逸出. 小心地盖紧瓶塞，勿使瓶内存有气泡，瓶口水封.

2. 另取两个有编号的培养瓶，用接种稀释水(或稀释水)如 1 中操作，作为空白.

3. 培养同"标准方法"

4. 五日后取出培养瓶，测定溶解氧

(1) $HgCl_2$ 碘量法的溶解氧浓度测定

同"标准方法"

(2) 盐酸碘量法的溶解氧浓度测定

五日后取出培养瓶，倒尽封口水，打开瓶塞后，加入 $MnSO_4$ 溶液 1ml，碱性碘化钾溶液 2ml，以下同"标准方法".

5. 计算

以加细菌失活剂的废水培养液和空白的溶解氧测定值代替"标准方法"中当日的废水培养液和空白的溶解氧测定值进行计算，其它同"标准方法".

九、结 论

BOD_5 一次测定法排除了化学氧化耗氧的干扰，使得在还原性物质存在下，准确测定生化需氧量成为可能.

与"标准方法"相比，一次测定法操作简便，试剂误差小.

BOD_5 一次测定法具有较高的准确度和精密度.

参 考 文 献

[1] 宋仁元等译，水和废水标准检验法，444—449 页，中国建筑工业出版社，北京，1985 年.
[2] 邓元镇等，生物膜法处理污水，78 页，中国建筑工业出版社，北京，1986 年.
[3] 邢建等译，废水生物处理过程设计，27 页，中国建筑工业出版社，北京，1984 年.
[4] 沈同等，生物化学，241 页，高等教育出版社，北京，1980 年.

(收稿日期: 1988 年 2 月 8 日)

(上接第49页)

104, 453 (1977).
[4] Giulotto, E. et al., *Mutat. Res*, **70**, 343 (1980).
[5] Mansy, S. and R. S. Tobias, *J. Am. Chem. Soc.*, **96**, 6874 (1974).
[6] Mansy, S. and R. S. Tobias, *Inorg. Chem.*, **14**, 287 (1975).
[7] Burk, R. F. et al, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, **145**, 782 (1974).
[8] Hill, C. H., *Fed. Proc.*, **34**, 2096 (1975).
[9] Naganuma, A. et al., *Res. Commun. Chem. Pathol Pharmacol.*, **20**, 139 (1978).

(收稿日期: 1987 年 2 月 3 日)

Abstracts

HUANJING KEXUE Vol. 10 No. 2, 1989
Chinese Journal of Environmental Science

Research on Transport and Transformation of Contaminants in the Unsaturated Vadose Water Zone

Nie Yongfeng, Liu Zhaochang and Li Yadong (Dept. of Environmental Engineering, Tsinghua University, Beijing)

The potential impact of contaminants on groundwater through transporting in unsaturated vadose zone was studied in this paper. By means of theoretical analysis, the methematical functions of convection, dispersion and adsorption-desorption processes of pollutants were touched. The main attention was paid to the permeability of tilling layer, plough pan and lower aeration zone. The plough pan was refered to the controlling layer of water permeation in terms of the measurement results of samples. The soil-water characteristic curves of three typical soils (fine silt, silt and very fine sand) were made out. The parameters for unsaturated hydraulic conductivity of loam was obtained through curve fitting. Compared with that of foreign scholars. The results were considered practicable. Furthermore, the transport and transformation of pollutants presented by tritium (tritiated water) were researched in an unsaturated column. (See pp. 2—6).

Cytogenetic Toxicity of Mercuric Chloride on Human Lymphocytes and Preventive Effect of Selenite

Meng Ziqiang and Zhang Lianzhen (Dept. of Environmental Sciences, Shanxi University, Taiyuan)

The protective effects of sodium selenite (Na_2SeO_3) against the cytogenetic toxicity of mercuric chloride ($HgCl_2$) were investigated on human whole-blood cultures in relation to induction of sister-chromatid exchanges (SCE) and delay of cell cycle. Mercuric chloride caused a dose-dependent increase in SCE and delay of cell cycle. It strongly affected the ability of human lymphocytes to divide in vitro, the number of cells dividing 3 times within 72 hours in culture was strongly decreased. Sodium selenite also induced SCE, but had only a smaller effects at the low concentration (3×10^{-6} mol/L) than mercuric chloride. SCE frequency increased significantly in culture only containing mercuric chloride of 1×10^{-5}mol/L and cell toxicity appeared in culture only at the concentration of sodium selenite of 1×10^{-5}mol/L. Beyond the limits, cell growth stopped. However, when selenite (3×10^{-7}—1×10^{-5} mol/L) was added simultaneously to cell cultures containing mercuric chloride (1×10^{-5} mol/L), induction of SCE was prevented and the cell cycle was delayed. There existed a clear doserelated manner. When selenite and mercuric chloride were simultaneously added at a molar ratio of Na_2SeO_3: $HgCl_2$ = 1:1, cells in treated cultures showed no increase in the SCE frequency and no delay in cell cycle time. These results indicate that selenite and mercury mutually antagonize the ability to cause DNA damage leading to the formation of SCE and the delay of cell cycle. (See pp. 7—9)

A Preliminary Study on the Characteristics of Bioparticles in Anaerobic Attached Film Expanded Bed (AAFEB) Reactor

Xu Xianyang, Zheng Ping, Feng Xiaoshan (Environmental Science Department, Zhejing Agricultural University, Hangshou)

The characteristics of bioparticles in AAFEB reactor with continuous steady state operation has been studied in this paper. The biological mechanism for high efficiency operating performances of AAFEB reactor with steady state from these respects as follow: sludge retention time (SRT), microbial compositions (methanogens) in biofilm, change and distribution features of acid producing activity, methane producing activity and coenzyme F_{420} contents of bioparticle, which obtained from various sampling spots of AAFEB reactor during operation. Meanwhile, it is also showed that substrate transfer resistance exists in bioparticles or biofilm, and becomes of significance at low substrate concentration and in thick biofilm. (See pp. 10—15)

A Study on Photosynthetic Bacteria (PSB) Contact-Oxydation Process

Shi Jialiang and Xu Yatong (Department of Environmental Science, East China Normal University, Shanghai); *Sun Zhendi* (Tong Xing Hosiery Manufactory, Shanghai)

Treating bean-food wastewater by using PSB contact-oxydation process has been made in order to purify high concentration organic wastewater under the conditions of limited space. Upflow contact oxidation reactor with two stages has been adopted. Under the following conditions: influence COD_{Cr} reaches 10500mg/L(BOD_5 6000mg/L), container A volume load 10.48kg $COD_{Cr}/M^3\cdot$day (6kg $BOD_5/M^3\cdot$day), container A effluent-COD_{Cr} reaches 835mg/L(BOD_5 148mg/L), percentage of COD_{Cr} removal 92%(BOD_5 removal percentage 97.5%). Under the conditions: container A + B volume load reaches 5.24kg $COD_{Cr}/M^3\cdot$day (3kg $BOD_5/M^3\cdot$day), effluent container A + B reaches 395mg/L(BOD_5, 38.7mg/L), percentage of COD_{Cr} removal 96.2%(BOD_5 removal percentage 99.4%).

The quantity of PSB measured and the ratio of PSB/heterotrophic bacteria in container A, which bears high load, is larger than that in container B. This illustrates