

用 CBMN 法评价饮用水处理流程中 有机提取物的细胞毒性*

刘艳红 李素文

(北京师范大学生物系, 北京 100875)

王文华

(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

柴 文 金维荣

(北京市第九水厂, 北京 100085)

摘要 利用 CHO 细胞胞质分裂阻断微核(CBMN)法, 对某自来水厂 7 个处理工艺流程水中的有机提取物的细胞毒性进行了评价。在实验剂量范围内, 比较了各样品的含微核的双核细胞率(BNMN)、核分裂指数(NDI)和胞质分裂阻断增殖指数(CBPI)。实验表明, 源水加氯后比源水的细胞毒性增大; 经机加池和煤砂滤池处理后的水样毒性较大, 其中煤砂滤池水毒性最大, 机加池水次之; 经炭吸附后的水样比炭吸附前水样的毒性下降; 管网水的毒性较低。

关键词 CHO, 胞质分裂阻断微核, 双核细胞率, 饮用水处理工艺, 有机提取物, 细胞毒性

The Cytotoxicity Assessment of Organic Extracts from Drinking Water in Technological Process by Cytokinesis-block Micronucleus Assay

Liu Yanhong Li Suwen

(Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875)

Wang Wenhua

(Research Center for Eco-Environ. Sci., Chinese Academy of Sci., Beijing 100085)

Chai Wen Jing Weirong

(Ninth Water Factory of Beijing)

Abstract By means of the Cytokinesis-block micronucleus(CBMN) assay in CHO cell, the cytotoxicity of organic extracts from drinking water was evaluated. The parameters, including binucleated cells with MN (BNMN), nuclear division index (NDI) and cytokinesis block proliferation index (CBPI), were compared in the range of doses tested for the individual extracts. The results indicated that the chlorinated source water was more toxic than the source water. The water samples unfiltered by carbon were more toxic than the filtered ones. The sand filtration water was the most toxic, the flocculation water was less toxic than sand filtration water, and the water was the least toxic among seven samples.

Keywords cytokinesis block micronucleus assay, technological process of drinking water, organic extracts, cytotoxicity.

饮用水消毒处理特别是加氯消毒法(Chlorination), 因很好地控制了饮用水传染疾病而被全世界广泛运用^[1]。但在 70 年代, 人们发现饮用水消毒使用的氯与源水中存在的有机物质反应生成一系列消毒副产品, 其中有的副产品又被实验证实具致突变、致癌性, 因而, 饮用水处理的方法与效果成为各国科学家研究的重要

课题。
在 Fenech 等人^[2]创立的胞质分裂阻断微核(cytokinesis block micronucleus, CBMN)法

* 北京市自然科学基金资助项目(Project Supported by Natural Science Foundation of Beijing City) 编号: 8952005

刘艳红: 女, 29 岁, 硕士

收稿日期: 1997-09-15

的基础上,本实验室建立了中国仓鼠卵巢细胞(CHO)的CBMN法,测量了反映染色体损伤的含微核的双核细胞率(binucleated cells micronucleus, BNMN)^[2],反映细胞分裂状态的毒性指数(nuclear division index, NDI)^[3]和反映细胞周期延迟程度的毒性指数(cytokinesis block proliferation index, CBPI)^[4],以这些指标综合评价某自来水厂加氯处理各工艺流程水中有机提取物的细胞毒性和致突变性,以便进一步了解各处理工艺的处理效果与对水质的影响,为水厂改进工艺提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 饮水处理工序

源水经管道引入水厂后,经加氯消费去除藻类等微生物后,在机加池中进行混凝沉降,再先后经煤砂滤池、活性炭滤池的过滤和吸附,在进入供水管网前进行第二次加氯消毒。

1.2 水样的采集与处理

(1) 水中有机提取物的采集 取各阶段水200L,调pH值为2,(一次加氯和二次加氯水须先加 $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 去余氯后,调pH值为2),流速约为 $60\sim 100\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$,通过装有Amberlite XAD-2树脂的玻璃柱。

(2) 树脂的洗脱、浓缩 用3~5倍床体积的乙酸乙酯洗脱(流速 $3\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$),经无水 Na_2SO_4 脱水,在温度 $50\sim 60^\circ\text{C}$ 时减压蒸馏,将洗脱液浓缩至 $20\sim 30\text{ml}$ 。实验前将有机提取物在 $40\sim 50^\circ\text{C}$ 水浴下氮气吹干,在干燥皿内过夜至恒重,用一定量的二甲基亚砜(DMSO)溶解,4℃冰箱保存备用。

1.3 CHO细胞CB微核试验系统

实验分3组进行,每组都包含7个工序相应的各水样、阴性对照和阳性对照共9个样品,阴性对照为各相应水样组中的DMSO溶剂,阳性对照为丝裂霉素C(MMC)($1\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,日本Kyowa公司三蒸水配制)。第1组各工序水样浓度为 $30\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,第2组各水样浓度为 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,第3组各水样浓度为 $80\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 。

CHO细胞由本室提供。细胞培养在含10%胎牛血清的DMEM完全培养液中,置于5% CO_2 培养箱中在 37°C 条件下培养。细胞传代24h后同时加入CB($6\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$,Sigma公司)及9个样品其中之一,每组实验都同样操作,每个样品均设3个重复。再经 37°C 培养40h后,用0.02%的EDTA消化收获细胞,离心后去上清,缓慢加入 $0.075\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的KCl低渗溶液,立即加入等量新配制的固定液(甲醇冰醋酸为3:1),离心去上清,再次加入固定液,混匀静置20min后离心,每次离心10min($1000\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$),气干法滴片,Giemsa染色,高倍镜观察细胞并计数。

1.4 细胞计数和统计分析

高倍镜下计数1000个双核细胞中含1个微核的细胞数(1MN)、含2个微核的细胞数(2MN)和含3个及3个以上微核的细胞数(3MN),以求得总微核率($\text{MN}=(1\text{MN}+2\times 2\text{MN}+3\times 3\text{MN})\cdot/1000$);含微核的双核细胞率 $\text{BNMN}=(1\text{MN}+2\text{MN}+3\text{MN})\cdot/1000$ ^[2]。

高倍镜下计数500个细胞中含1个核的细胞数(M)、含2个核的细胞数(M)、含3个核的细胞数(M)及含4个核的细胞数(M),以求得双核细胞百分率, $\%\text{BN}=\text{M}/500$ ^[2]、核分裂指数 $\text{NDI}=(\text{M}+2\times\text{M}+3\times\text{M}+4\times\text{M})/500$ ^[3]、胞质分裂阻断增殖指数 $\text{CBPI}=[\text{M}+2\times\text{M}+3\times(\text{M}+\text{M})]/500$ ^[4]。

实验结果用 X^2 测验进行显著性分析。^[5]

2 结果

7个工序水样导致的MN、BNMN和 $\%\text{BN}$ 、NDI和CBPI综合在表1中。

2.1 7个工序水样中BNMN的比较

经 X^2 统计分析后表明:在实验剂量范围内,源水、管网水(用户水)的BNMN值在各剂量组与阴性对照值相比都没有显著性差异;加氯源水、机加池水的BNMN值与阴性对照值相比,在 $30\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 剂量组无显著性差异,在 $50\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 剂量组有显著性差异($P<0.05$),

表 1 7 个工序水样的 MN、BNMN、% BN、NDI 和 CBPI

剂量 g · mL ⁻¹	处理	1000 个双核细胞中根据						500 个细胞中根据细胞						
		微核数的细胞分布				BNMN	MN	核数的细胞分布				% BN	NDI	CBPI
		0	1	2	3			1	2	3	4			
30	阴性对照	982	17	1	0	18	19	348	144	6	2	28.8	1.324	1.320
	源水	983	16	0	1	17	19	354	135	8	3	27.0	1.320	1.314
30	加氯源水	981	16	2	1	19	23	350	139	8	3	27.8	1.328	1.322
30	机加池水	977	22	0	1	23	25	354	134	10	2	26.8	1.320	1.316
30	煤砂滤池水	974	23	2	1	26 ¹⁾	30	358	130	10	2	26.0	1.312	1.308
30	炭滤池水	977	21	1	1	23	26	347	138	9	6	27.6	1.348	1.336
30	二次加氯水	982	16	2	0	18	20	350	137	9	4	27.4	1.334	1.326
30	管网水	983	16	0	1	17	19	351	133	11	5	26.6	1.340	1.330
1	阳性对照	890	98	10	2	110 ¹⁾	124	375	115	8	2	23.0	1.274	1.270
50	阴性对照	967	27	4	2	33	41	325	149	21	5	29.8	1.412	1.402
	源水	967	25	6	2	33	43	334	140	16	10	28.0	1.404	1.384
50	加氯源水	952	42	4	2	48 ¹⁾	56	323	157	13	7	31.4	1.408	1.394
50	机加池水	949	41	7	3	51 ¹⁾	64	335	139	21	5	27.8	1.392	1.382
50	煤砂滤池水	946	47	6	1	54 ²⁾	62	336	141	19	4	28.2	1.374	1.374
50	炭滤池水	958	35	6	1	42	50	319	155	21	5	31.0	1.424	1.414
50	二次加氯水	965	31	4	0	35	39	330	142	23	5	28.4	1.406	1.396
50	管网水	967	30	3	0	33	36	326	146	22	6	29.2	1.416	1.404
1	阳性对照	881	100	15	4	119 ³⁾	142	376	110	11	3	22.0	1.282	1.276
80	阴性对照	966	28	6	0	34	40	317	159	14	10	31.8	1.434	1.414
	源水	959	36	4	1	41	47	324	156	13	7	31.2	1.406	1.392
80	加氯源水	950	44	5	1	50 ²⁾	57	325	149	15	11	29.8	1.424	1.402
80	机加池水	941	53	5	1	59 ²⁾	66	325	154	16	5	30.8	1.402	1.392
80	煤砂滤池水	933	60	6	1	67 ²⁾	75	330	148	19	3	29.6	1.390	1.384
80	炭滤池水	940	55	5	0	60 ²⁾	65	312	163	18	7	32.6	1.440	1.426
80	二次加氯水	950	46	3	1	50 ²⁾	55	317	167	10	6	33.4	1.410	1.398
80	管网水	959	37	4	0	41	45	317	160	18	5	32.0	1.422	1.412
1	阳性对照	895	90	8	7	105 ³⁾	127	368	120	5	7	24.0	1.302	1.288

1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$ $P < 0.001$

在 $80\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 剂量组则差异非常显著 ($P < 0.01$); 煤砂滤池水的 BNMN 值与阴性对照值相比, 在 $30\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 剂量组已出现显著性差异, 在 $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $80\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 剂量组差异非常显著; 炭滤池水、二次加氯水(出厂水)的 BNMN 值与阴性对照值相比, 在 $30\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 、 $50\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 剂量组无显著性差异, 在 $80\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 剂量组差异则非常显著.

2.2 7 个工序水样中 3 个细胞学毒性指数 %BN、NDI、CBPI 的比较

图 1、图 2 分别表示 7 个水样的 NDI、CBPI 指数值与阴性对照值相减后的相对值随剂量变化之间的比较. 纵座标上的 0 值代表阴性对照值. 各水样的 NDI 和 CBPI 指数值随浓度增加

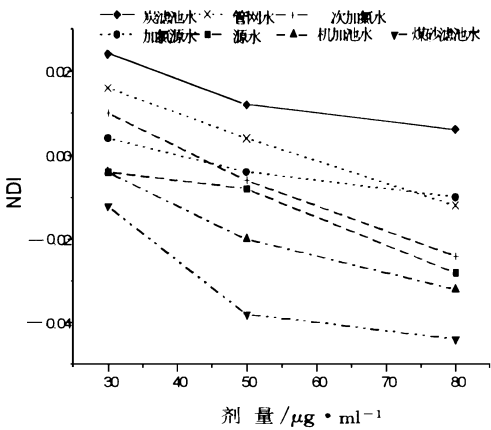


图 1 NDI 值随剂量相对变化的比较

而降低, 指数值从高到低排列的顺序为: 炭滤池水、管网水(用户水)、二次加氯水(出厂水)、加

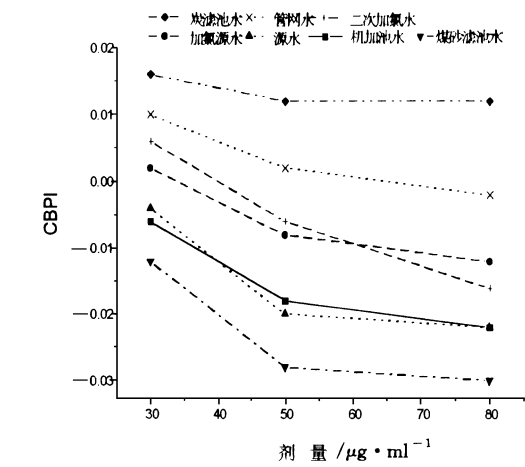


图2 CBPI 值随剂量相对变化的比较
氯源水、源水、机加池水、煤砂滤池水。

3 讨论

经过对某水厂 7 个饮用水处理工序的研究,实验结果表明:源水加氯后,产生了显著的微核效应,且随浓度增加而增强,表明加氯源水比源水对细胞毒性增强,但其 NDI、CBPI 指数值比源水却有所增高,这可能是由于源水加氯后有机物的种类和含量增加(化学分析的结果另文发表)而造成的一种综合性的细胞效应。煤砂滤池过滤后的水产生了最显著的微核效应,它的 NDI、CBPI 指数值最低,表明该水对染色体损伤最大,抑制了细胞的增殖活性,对细胞毒性最大。经机加池混凝过滤后的水对细胞的毒性仅次于煤砂滤池水位于第二,表明这 2 道工序产生了比加氯源水更致细胞毒性的物质。

经活性炭吸附以后的水、二次加氯后的出厂水及管网水(用户水)的 NDI、CBPI 指数值都高于源水、机加池水和煤砂滤池水,表明细胞的增殖活性增强,并且只在 $80\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ 剂量时炭滤池水和二次加氯水(出厂水)才产生显著性微核效应,表明活性炭吸附工序是有成效的,去除了很多致毒的物质。

在实验剂量范围内未检出源水和管网水(用户水)的微核显著性,NDI、CBPI 数据说明

源水比管网水(用户水)对细胞增殖抑制强一些;管网水(用户水)的水质比较好。

需要加以说明的是,文中所得数据是体外培养细胞(不是生物成体)在具体实验条件下(一定剂量范围内)所得到的;同时,虽然 CB 本身并不诱导微核和染色体断裂^[2],但 CB 与被检测物协同作用于细胞,也可能对实验结果产生一定影响,这是本实验的局限之处。考虑到饮用水的水质直接关系到人们的健康,所以在对某市饮水处理工艺流程的研究中还采用了许多其它生物实验,比如 Ames、发光菌实验(另文发表),再对比化学分析的结果,将能对饮水处理各工艺对水质的影响做出更为全面的评价。

致谢 本工作得到中科院生物物理所齐翔林先生,北京师范大学张鸿卿先生、何琪扬老师、周卫东老师的帮助,谨表谢意。

参 考 文 献

- 1 Glaze W H. Drinking Water and Health in the year 2000. AWWA Research Foundation Workshop Report, 1993
- 2 Fenech M and Morley A A. Measurement of micronuclei in lymphocytes. *Mutat. Res.*, 1985, **147**: 29- 36
- 3 Eastmond D A and Tucker J D. Identification of aneuploidy-inducing agents using cytokinesis blocked human lymphocytes and an antikinetochore antibody. *Environ. Mol. Mutagen*, 1989, **13**: 34- 43
- 4 S  r  lles J et al.. Induction of micronuclei by five pyrethroid insecticides in whole-blood and isolated human lymphocyte cultures. *Mutat. Res.*, 1995, **341**: 169- 184
- 5 科恩·G A 等著,周明强等译. 数学手册. 北京: 工人出版社, 1987: 579
- 6 Fenech M and Morley A A. Cytokinesis-block micronucleus method in human lymphocytes: effect of in vivo ageing and low dose X-irradiation. *Mutat. Res.*, 1986, **161**: 193- 198
- 7 Van Hummelen P and Kirsch-Volders M. Analysis of eight known or suspected aneugens by the in vitro human lymphocyte micronucleus test. *Mutagenesis*, 1992, **7**: 447- 455
- 8 S  r  lles J et al.. The effect of cytochalasin-B concentration on the frequency of micronuclei induced by four standard mutagens. *Mutagenesis*, 1994, **9**(4): 347- 353