

用 CBMN 法评价 4-氯酚与富里酸对 CHO 细胞的毒性效应*

李素文¹ 刘艳红¹ 王文华² 柴文³ 郁志勇²

(1 北京师范大学生物学系, 北京 100875 2 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085 3 北京市第九水厂, 北京 100085)

摘要 用 CHO 细胞和 CBMN 法对 4-CP(4-氯酚)及其 FA(富里酸)协同作用的细胞毒性效应进行了评价, 选用的细胞学毒性参数为总微核率(MN)、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)。结果表明: FA(0.66mg · L⁻¹)单独处理与阴性对照组比较不引起显著性差异; 4-CP 和 FA(0.66mg · L⁻¹)联合处理与 4-CP 各浓度分别处理相比有显著性的差异; 对于 BNMN 和 NDI, $P < 0.01$; 对于 MN 和 CBPI, $P < 0.05$, 协同作用使细胞毒性效应增强。在 2 种处理下, 4-CP 的剂量与细胞毒性效应之间都存在显著性相关, 当 4-CP 剂量大于 15mg · L⁻¹时, 除参数 MN 外, 其余各细胞毒性参数与阴性对照组相比都有显著或非常显著的差异。该工作提示: 由于氯酚类物质本身具有较强的细胞毒性效应以及与水体中 FA 协同作用后又能增强细胞毒性, 所以应严格控制氯酚类物质对水体的污染。

关键词 细胞毒性参数, 富里酸, 4-氯酚, 协同作用, 胞质分裂阻断微核法。

The Assessment of the Cytotoxicity Effects of 4-CP and FA on the CHO Cell by Cytokinesis Block Micronucleus Assay*

Li Suwen¹ Liu Yanhong¹ Wang Wenhua² Chai Wen³ Yu Zhiyong²

(1 Department of Biology, Beijing Normal University, Beijing 100875, China 2 State Key Laboratory of Environmental

Aquatic Chemistry, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

3 The Ninth Water Factory of Beijing, Beijing 100085, China)

Abstract By means of the cytokinesis block micronucleus(CBMN) assay for the CHO cell, the synergism effect of 4-CP and FA on the cytotoxicity parameters were evaluated. These cytotoxicity parameters include the frequencies of micronuclei (MN), the frequencies of micronucleated binucleated cells (BNMN), the nuclear division index (NDI), and the cytokinesis block proliferation index (CBPI). The results indicated that the cytotoxicity effects with FA (0.66mg · L⁻¹) alone is not statistically significantly different compared with negative control. The effects of combination of 4-CP at the doses of 5, 10, 15 and 20mg · L⁻¹ respectively and FA(0.66mg · L⁻¹) showed quite significant differences in MN, BNMN ($P < 0.01$), NDI ($P < 0.01$), MN ($P < 0.05$) and CBPI($P < 0.05$) compared with that of 4-CP at the corresponding four doses respectively. For both treatments (4-CP with FA and 4-CP alone), 4-CP at the doses more than 15mg · L⁻¹ showed a significant differences in MN, BNMN, NDI and CBPI compared with negative control. Also for both treatments the correlativity between the dose of 4-CP and MN, BNMN, NDI and CBPI respectively were statistically significant. This work indicated that it is necessary to control strictly the pollution of chlorophenol in aquatic system due to their synergism effects

* 国家自然科学基金资助项目: 29477283 和北京市自然科学基金资助项目: 8952005(Project Supported by National Natural Science Foundation of China and by Natural Science Foundation of Beijing)

李素文: 女, 56 岁, 副教授

收稿日期: 1998-04-10

on cytotoxicity.

Keywords cytotoxicity parameters, FA, 4-CP, synergism effect, cytokinesis block micronucleus (CBMN).

氯酚是一类常见的有机污染物. 它在自然界停留时间长, 易为生物有机体吸收且通过食物链富集, 对水生生物和哺乳动物表现出较强的毒性, 对人体健康亦有一定影响, 是 1978 年美国环保局 (EPA) 提出的水体中应予以优先考虑防治的 114 种有机化学污染物之一^[1-4]. 氯酚含有羟基官能团, 在环境中易与腐殖质类天然有机物结合^[5,6], 从而改变了它在环境中的形态和环境行为, 并将进一步影响其毒性表现. 有关腐殖质类的天然有机物存在时, 氯酚的环境毒性表现研究鲜有报道, 但这种研究对实际评价氯酚在环境中的毒性效应是十分必要的.

本工作采用 Fenech 和 Morley^[7] 创立的胞质分裂阻断微核 (Cytokinesis block micronucleus, CBMN) 法, 评价 4-氯酚 (4-chlorophenol, 4-CP) 和富里酸 (fulvic acid, FA) 对中国仓鼠卵巢细胞 (Chinese hamster ovary, CHO) 造成的染色体损伤情况, 用 Eastmond^[8] 引入的核分裂指数 (nuclear division index, NDI) 和 Súrralles^[9] 引入的胞质分裂阻断增殖指数 (cytokinesis block proliferation index, CBPI) 评价 4-CP 和 FA 对 CHO 细胞周期造成的细胞毒性效应.

1 材料和方法

1.1 细胞

CHO 细胞由北师大生物系细胞室提供. 细胞培养在含 10% 胎牛血清的 DMEM 完全培养液中, 置于 5% CO₂ 培养箱中在 37 条件下培养.

1.2 试剂

(1) FA 由白洋淀底泥提取, 提取方法见文献[10]. 本工作稍作修改, 将盐酸改为硫酸, 以避免向体系引入氯元素, 提取的 FA 的浓度为 220mg · L⁻¹, 实验时取 3μl, 即实验时浓度为 0.66mg · L⁻¹.

(2) 4-CP 化学纯, 4 冰箱保存, 使用前干燥皿干燥, 恒重后用生理盐水配制, 现配现用.

(3) 细胞松弛素 B (Cytochalasin B, CB) Sigma 公司产品, 用二甲基亚砜 (DMSO) 配制成母液, -20 冰箱贮存备用, 使用前用生理盐水稀释.

(4) 丝裂霉素 C (Mitomycin C, MMC) 日本 Kyowa 公司产品, 用生理盐水配制, 现配现用, 用于阳性对照试验.

1.3 CHO 细胞的 CBMN 试验系统

CHO 细胞传代 24h 后加入终浓度为 6mg · L⁻¹ 的 CB, 并同时加入以下各组试剂: 阳性对照组加入终浓度为 1mg · L⁻¹ 的 MMC; 阴性对照组加等量生理盐水; FA 单独处理组为终浓度 0.66mg · L⁻¹ 的 FA; 4-CP 单独处理组为终浓度分别是 5、10、15 和 20mg · L⁻¹ 的 4-CP; FA 和 4-CP 联合处理的 4 个组, 分别为 0.66mg · L⁻¹ FA 和 4-CP 单独处理各浓度的 4 种组合. 所有各组于 37 条件下培养 40h 后用 0.02% 的 EDTA 消化收获细胞, 离心后去上清, 缓慢加入 0.075mol · L⁻¹ 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), 离心后去上清, 再次加入固定液重新悬浮混匀后, 静置 20min 再次离心, 每次离心均为 1000r/min 时间为 10min, 离心后以沉淀的细胞滴片, Giemsa 染色, 高倍镜观察细胞并计数, 重复 3 次.

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 (MN) $MN = (1MN + 2 \times 2MN + 3 \times 3MN) / 1000$ ^[7]. 含微核的双核细胞率 (BNMN) $BNMN = (1MN + 2MN + 3MN) / 1000$ ^[7].

高倍镜下计数 500 个细胞中含 1 个核的细胞数(M_1)、含 2 个核的细胞数(M_2)、含 3 个核的细胞数(M_3)及含 4 个核的细胞数(M_4),以求得核分裂指数(NDI): $NDI = (M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times M_3 + 4 \times M_4) / 500^{[8]}$ 、胞质分裂阻断增殖指数(CBPI): $CBPI = [M_1 + 2 \times M_2 + 3 \times (M_3 + M_4)] / 500^{[9]}$.

对每个测量参数和 4-CP 间的效应剂量关系进行回归分析,再用 t 测验对相关系数进行显著性测验.用方差分析法对各处理组与对照组之间的细胞毒性效应进行比较,用成对数据平均数的比较法对 4-CP 与 FA 的协同作用进行评价^[11].

2 结果

用 CHO 细胞 CBMN 多参数测试系统^[12]对 4-CP 加或不加 FA 各浓度组的细胞学毒性效应的检测结果综合在表 1.

由表 1 可见,与阴性对照相比,1mg · L⁻¹浓度的 MMC 处理有显著性差异,而单独 FA (0.66mg · L⁻¹) 处理对于各参数均无显著性差异.4-CP 浓度低于 15mg · L⁻¹时,4-CP 加或不加 FA (0.66mg · L⁻¹) 的 2 种处理均无显著性差异;浓度在 15mg · L⁻¹时,除 MN 参数外,2 种处理的其余 3 项细胞毒性参数与阴性对照相比都存在显著性差异($P < 0.05$);20mg · L⁻¹浓

表 1 用 CBMN 法测量各处理组造成 CHO 细胞的细胞毒性效应

处理		参 数			
4-CP/mg · L ⁻¹	FA/mg · L ⁻¹	MN	BNMN	NDI	CBPI
0	3	34.33 ± 5.033	31.00 ± 3.000	1.631 ± 0.078	1.624 ± 0.073
5	0	38.67 ± 4.509	33.67 ± 3.512	1.631 ± 0.012	1.622 ± 0.103
5	3	49.33 ± 14.74	43.33 ± 9.504	1.603 ± 0.091	1.596 ± 0.085
10	0	46.67 ± 9.292	40.33 ± 6.807	1.581 ± 0.079	1.574 ± 0.079
10	3	51.33 ± 13.65	45.33 ± 9.713	1.555 ± 0.074	1.547 ± 0.073
15	0	51.00 ± 15.13	44.67 ± 10.26 ¹⁾	1.516 ± 0.082 ¹⁾	1.510 ± 0.080 ¹⁾
15	3	59.33 ± 11.02	51.67 ± 6.658 ¹⁾	1.494 ± 0.083 ¹⁾	1.491 ± 0.084 ¹⁾
20	0	59.67 ± 19.14 ¹⁾	51.67 ± 11.93 ²⁾	1.394 ± 0.073 ²⁾	1.391 ± 0.069 ²⁾
20	3	74.33 ± 20.74 ²⁾	61.67 ± 12.66 ²⁾	1.366 ± 0.068 ²⁾	1.363 ± 0.068 ²⁾
阴性对照		30.33 ± 3.512	27.33 ± 0.577	1.684 ± 0.088	1.675 ± 0.083
阳性对照		156.7 ± 17.24 ³⁾	114.7 ± 9.018 ³⁾	1.415 ± 0.048 ¹⁾	1.412 ± 0.048 ¹⁾

1) $P < 0.05$ 2) $P < 0.01$ 3) $P < 0.001$

度的 4-CP 加或不加 FA 的 2 种处理,除单用 4-CP 时 MN 有显著性差异外,其余各参数差异均非常显著($P < 0.01$).

在实验剂量范围内,4-CP 加或不加 FA 组,4-CP 的剂量都与 MN 和 BNMN 存在非常显著的线性正相关,与 NDI 和 CBPI 存在非常显著的线性负相关(见表 2)

表 3 为用成对数据平均数间的 t 测验法对 4-CP 加或不加 FA 的 2 种处理间细胞毒性效应的比较.

表 2 受试组的剂量与 CBMN 各参数间的回归分析

参数	处 理	
	4-CP	4-CP+ FA
MN	$r = 0.995$ $P < 0.001$	$r = 0.972$ $P < 0.01$
BNMN	$r = 0.998$ $P < 0.001$	$r = 0.977$ $P < 0.01$
NDI	$r = -0.980$ $P < 0.01$	$r = -0.960$ $P < 0.01$
CBPI	$r = -0.977$ $P < 0.01$	$r = -0.960$ $P < 0.01$

表 3 4-CP 加或不加 FA 对细胞毒性效应的比较				
检验	MN	BNMN	NDI	CBPI
<i>t</i>	4.295	5.662	5.709	2.923
<i>P</i>	< 0.05	< 0.01	< 0.01	< 0.05

由表 3 可见:4-CP 加或不加 FA 2 种处理间 4 个细胞毒性参数都存在显著性差异,对于细胞毒性参数 MN 和 CBPI, $P < 0.05$; 对于 BNMN 和 NDI, $P < 0.01$, 说明 4-CP 与 FA 的协同作用比用 4-CP 单独处理细胞毒性加强.

3 讨论

实验表明:在 4-CP 为 $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的剂量范围内,对于 4-CP 单独处理组和与 FA 联合处理组(FA 剂量为 $0.66\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$), MN 和 BNMN 值都与 4-CP 的剂量存在着显著性正相关,而 NDI 和 CBPI 值都与其存在显著性负相关.说明在 2 种处理情况下,随着 4-CP 浓度升高,染色体的断裂损伤加重,细胞核的分裂减慢,细胞周期被延迟.这一结果与 5-CP 对体外细胞遗传损伤呈现阳性的结果一致^[13]. 方差分析说明:在 4-CP 单独使用或 4-CP 与 FA 联合使用的 2 种处理中,当 4-CP 的浓度为 $15\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,除参数 MN 外,其余细胞毒性参数与阴性对照组相比都有显著性差异($P < 0.05$);当 4-CP 浓度达到 $20\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,除单独用 4-CP 处理对于参数 MN 有显著性差异外,其余各项细胞毒性参数都有非常显著性差异($P < 0.01$). 这些数据说明水体中如果含有高于 $15\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 4-CP,至少会对体外培养的 CHO 细胞有一定的细胞毒性.

虽然 $0.66\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的 FA 与阴性对照组相比细胞毒性效应没有显著性差异,但是用成对数据比较法对于相同的 4-CP 浓度,加 FA 与不加 FA 之间,细胞毒性效应有显著性差异,说明两者的协同作用使细胞毒性增强.

水体中普遍存在着天然腐殖质,氯酚类有机物又是水体中常见的污染物,已有的研究表明:天然腐殖质可与氯酚类有机污染物结合而

改变污染物在水环境中的存在形态^[5-6],但这种形态改变所引起的细胞毒性变化尚未见报道.本工作表明:腐殖质对氯酚细胞毒性的协同作用应引起重视.

参 考 文 献

1 欧洲共同体委员会,国际化学品安全署,国家环保局译. 国际化学品安全手册(第一卷). 北京:化学工业出版社, 1995. 160

2 Barron M G. Bioconcentration will water-borne organic chemicals, accumulate in aquatic animals. ES&T, 1990, **24**(11): 1612—1619

3 Kuhn R, Pattard M, Pemak K D et al. Results of the harmful effects of selected water pollutants to daphnia magna. Water Res., 1989, **23**(4): 495—503

4 廖宜勇,周玳,刘征涛. 取代芳烃对酵母菌毒性的定量结构-活性相关研究. 环境科学学报, 1996, **16**(3): 349—357

5 Nelson P O et al. Equilibrium adsorption of chlorophenols on granular activated carbon. Water Environ. Res., 1995, **67**(6): 892—899

6 Lassen P, Randall A et al. On the possible role of humic materials in the environmental organohalogen budget: The enzymatically mediated incorporation of 4-CP into humic acids, Dordrecht/Boston/London: Naturally Produced Organohalogen. in Anders Grimvall and Ed W B de Leer. Kluwer Academic Publishers, 1996. 183—191

7 Fenech M and Morley A. Identification of micronuclei in lymphocytes. Mutat. Res., 1985, **147**: 29—36

8 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

9 Srralles J, Xamena N, Creus A et al. Induction of micronuclei by five phrethroid insecticides in whole blood and isolated human lymphocyte cultures. Mutat. Res., 1995, **341**: 169—184

10 彭安,王文华. 水体腐植酸及其络合物. 环境科学学报, 1981, **1**(2): 126—133

11 杨纪珂,齐翔林. 现代生物统计. 安徽:教育出版社, 1985. 94—104

12 李素文,刘艳红等. CHO 细胞胞质分裂阻断微核技术的研究. 北京师范大学学报(自然科学版), 1997, **33**(4): 539—542

13 董华模主编. 化学物的毒性及其环境保护参数手册. 北京:人民卫生出版社, 1988. 365—371