

用 Ames 试验和小鼠原代细胞彗星试验 检测 A 市生活饮用水遗传毒性

张青碧¹, 陈志群¹, 甘仲霖¹, 李 祥¹, 衡正昌²

(1. 泸州医学院公共卫生系环境与劳动卫生学教研室, 四川 泸州 646000; 2. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041)

摘要: 目的 用 Ames 试验和小鼠原代肝细胞彗星试验检测 A 市生活饮用水遗传毒性并比较两种方法的敏感性。方法 采用 Ames 试验和彗星试验分别对 A 市南郊水厂的水源水、出厂水、自来水的有机浓集物的诱变性进行检测。结果 出厂水和自来水的 Ames 试验于试样浓度为 3.0 L/皿时才表现为阳性结果, 而肝细胞的彗星试验在水样量为 0.1 L 时就出现明显的阳性结果 (与阴性对照比 $P < 0.01$), 后者的浓度比前者低 30 倍。水源水的 Ames 试验于试样浓度为 6.0 L/皿时仍表现为阴性结果, 而原代肝细胞的彗星试验在水样量为 0.5 L 时就出现明确的阳性结果。结论 Ames 试验只能检测出氯化消毒后饮用水的致突变阳性, 而彗星试验能同时检测出水源水和氯化消毒后饮用水的致突变性, 后者的敏感性远远高于前者。

关键词: Ames 试验; 饮用水; 肝原代细胞; 彗星试验; 遗传毒性

中图分类号: R123.1; R991 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)04-0224-03

Detection for genotoxicity of water samples in city A with Ames test and primary hepatic cell comet assay

ZHANG Qing-bi¹, CHEN Zhi-qun¹, GAN Zhong-lin¹, LI Xiang¹, HENG Zheng-chang²

(1. Department of Environmental Health, Luzhou Medical College, Luzhou 646000, China; 2. West China University of Medical Sciences, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

Abstract: **Objective** Genotoxicity of water samples from city A was detected with Ames test and primary hepatic cell comet assay and their sensitivities were compared. **Method** Organic substance was extracted from source water, chlorinated water and tap water, respectively, in city A and their mutagenicities were detected with Ames test and mouse primary hepatic cell comet assay. **Result** Positive Ames test was observed at concentration of 3 L/plate of chlorinated and tap water, but positive at concentration of 0.1 L/plate with primary hepatic cell comet assay ($P < 0.01$). Ames test was still negative at concentration of 6 L/plate of source water, but positive at 0.5 L/plate with primary hepatic cell comet assay. **Conclusion** Ames test could only detect genotoxicity of chlorinated water, which could be detected with primary hepatic cell comet assay for chlorinated and source water with a much higher sensitivity than the former.

Key words: Ames test; Drinking water; Primary liver cell; Comet assay; Genotoxicity

近年来, 由于各种环境污染物向水体的大量排放及自来水厂在消毒处理过程中给水质造成的影响, 导致水中的有机污染物的种类和数量也急剧增加。有文献报道, 自来水中有机浓集物具有强致突变性^[1-3], 对人类健康造成严重威胁。A 市地处沱江下游, 受到沱江上游城市工农业废水和生活污水的严重污染。为了解该市生活饮用水污染状况以及污染物的潜在危害性, 本研究采用 Ames 试验和小鼠肝原代细胞彗星试验, 对该市主要供水水厂南郊水厂水源水、出厂水和自来水的有机浓集物进行了致突变检测, 比较了两方法的敏感性并为改善水质、控制污染, 增进市民健康等提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 试剂

收稿日期: 2004-02-26; 修回日期: 2004-04-05

作者简介: 张青碧 (1969-), 女, 讲师, 硕士, 主要研究方向: 环境遗传毒理。

3-硝基 9-蒽酮 (TNO), FLUKA 公司生产; 叠氮化钠 (NaN₃), FLUKA 公司生产; 鼠伤寒沙门氏菌株 TA98 菌株和 TA100 菌株, 美国加州大学 Ames 实验室提供。细胞裂解液配方: 100 mmol/L 乙二醇四乙酸二钠 (Na₂EDTA), 1% 肌氨酸钠, 10 mmol/L 三 (羟) 甲基氨基甲烷 (Tris), 2.5 mol/L 氯化钠 (NaCl), 依次加热溶解后, 用氢氧化钠 (NaOH) 调节 pH=10, 置 4℃ 冰箱保存; 临用前加入 10% 二甲亚砜 (DMSO), 1% Triton X-100。碱性电泳缓冲液配方: 1mmol Na₂EDTA, 300 mmol NaOH, 依次加热溶解, 加蒸馏水至 1 000ml, pH=13。

1.2 实验动物

昆明种雄性小鼠, 7~8 周龄, 体重 (25±2) g, 四川大学华西医学中心实验动物中心提供。

1.3 方法

1.3.1 水样的采集和处理 长江是 A 市南郊水厂的

水源。取该厂的水源水、出厂水、末梢管网水(自来水)作为检测水样。采用固相萃取法^[4],以 XAD-2 型树脂为吸附树脂。水样采集于 50 L 搪瓷桶内,经数小时自然沉淀后,将水样通过 XAD-2 型树脂,以吸附其中的非极性有机致突变物。使用前将树脂用重蒸甲醇、丙酮、乙醚各提取 8 h。用精制过的 XAD-2 型树脂装柱过滤,过柱速度保持每分钟不超过过柱床容积的 3~5 倍,过柱水的总体积为 200 L。过柱毕,用重蒸乙醚进行洗脱。洗脱液收集于分液漏斗中,弃去水层后,转入 Snyder 浓缩器内。在 48℃ 水浴中挥干乙醚,残留物用二甲亚砜(DMSO)溶解,并定容至 2 ml(此液每毫升代表 100 L 水样中的有机浓集物)。另用重蒸水 100 ml 代替水样进行上述处理,作为试验的阴性对照。

1.3.2 Ames 试验 在无菌操作下,每个水样浓集物分别取 0.075、0.15、0.3、0.6 ml 于样品管中,然后加 DMSO 至样品稀释液体积为 1 ml,使样品稀释液的浓度依次为 7.5、15、30、60 ml/L。实验时往每个培养皿加入 0.1 ml 的样品稀释液,即相当于每皿的测试浓度分别为 0.75、1.5、3.0、6.0 ml/L。

按照标准平板掺入法进行操作^[5]。用 TA98 和 TA100 两种菌株,经鉴定合格后使用。试样分别设 4 个浓度,每个浓度做 3 个平行样,TA98 阳性对照用 2 μ g/ml 的 3-硝基-9-葱酮(TNO),TA100 阳性对照用 15 μ g/ml 的叠氮化钠(NaN_3),每皿加量 0.1 ml,重复试验 1 次。结果分析若测试皿平均回变菌落数大于或等于阴性对照的 2 倍,有剂量-反应关系和重现性,则判断为阳性结果。

1.3.3 小鼠原代肝细胞彗星试验 股动脉放血后颈椎脱臼处死小鼠,取出全部肝,放在滤纸上除去被膜及血迹后放小烧杯内,加入少量预冷的 PBS 液,用眼科剪剪碎后,经 110 目的不锈钢筛网过滤,收集细胞悬液。用 PBS 液调细胞浓度至 $10^7 \sim 10^8$ 个/ml,置冰浴待用。

按悬浮染毒方法进行染毒^[6]。取上述制备好的细胞悬液按每管 $10^5 \sim 10^6$ 个细胞分装于 5 ml 刻度离心管,再用 PBS 液将体积加至 5 ml。然后于每管中分别加入不同浓度的水样有机提取物,使终浓度相当于每管含 50、100、200、500 ml 原水样,各剂量设 2 个平行样,同时设试剂对照二甲亚砜(50 μ l DMSO)和阳性对照重铬酸钾(0.2 mmol/L $\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$)混匀后置 37℃ 孵箱染毒 1 h,染毒期间用滴管不时地混匀细胞,染毒完毕于 1 500 r/min 离心 5 min,弃掉上清液,再用 PBS 液洗 2 次,加 100 μ l PBS 液重悬细胞用于彗星试验。

按常规彗星试验方法^[7]检测 A 市南郊水厂水源

水、出厂水、自来水对小鼠原代肝细胞的 DNA 损伤作用。在 510 nm 波长的荧光下放大 200 倍观察结果,用目镜测微尺测量拖尾细胞的头长和全长,全长扣除头长后即为 DNA 迁移长度。实验以平均细胞拖尾长度和拖尾率为检测指标,每张载玻片随机计数 50 个细胞,计算细胞的拖尾率和平均尾长。

1.3.4 统计方法 采用 SPSS 软件,对细胞拖尾率进行 χ^2 检验,对拖尾细胞 DNA 迁移长度进行方差分析。

2 结果

2.1 Ames 试验结果

计数每个平皿的回变菌落数,求出 3 个平行平皿的均数和标准差,并计算两菌株的致突变率。致突变率(MR)=试验皿的平均回变菌落数/阴性对照皿平均回变菌落数。表 1 的 Ames 试验结果表明,水源水有机浓集物的试样浓度达 6.0 L/皿时,两菌株的致突变率仍小于 2,两菌株均为阴性反应。出厂水和自来水有机浓集物的试验浓度为 3.0 L/皿时,两菌株均为阳性反应。

表 1 A 市水源水、出厂水、自来水的 Ames 试验结果
(TA98、TA100)

受试物	浓度 (L/皿)	TA98		TA100	
		平均回变菌落数 (个/皿, $\bar{x} \pm s$)	致突变率 (MR)	平均回变菌落数 (个/皿, $\bar{x} \pm s$)	致突变率 (MR)
水源水	6.0	24.0 $\pm$ 4.9	1.0	160.0 $\pm$ 54.3	1.2
	3.0	17.0 $\pm$ 2.4	0.7	119.0 $\pm$ 24.8	0.9
	1.5	20.0 $\pm$ 5.2	0.8	123.0 $\pm$ 35.7	0.9
	0.75	14.0 $\pm$ 4.6	0.6	134.0 $\pm$ 44.4	1.0
自来水	6.0	97.0 $\pm$ 54.3 *	4.0 *	372.0 $\pm$ 79.1 *	2.8 *
	3.0	70.0 $\pm$ 21.8 *	2.9 *	273.0 $\pm$ 56.9 *	2.1 *
	1.5	44.0 $\pm$ 15.4	1.8	191.0 $\pm$ 54.3	1.4
	0.75	34.0 $\pm$ 7.2	1.4	124.0 $\pm$ 36.7	0.9
出厂水	6.0	102.0 $\pm$ 57.1 *	4.2 *	366.0 $\pm$ 79.1 *	2.8 *
	3.0	79.0 $\pm$ 20.9 *	3.2	289.0 $\pm$ 60.4 *	2.2 *
	1.5	41.0 $\pm$ 17.8	1.7	178.0 $\pm$ 54.5	1.3
	0.75	7.0 $\pm$ 6.4	1.5	137.0 $\pm$ 41.2	1.0
DMSO	—	24.5 $\pm$ 4.0	—	133.0 $\pm$ 44.6	—
TNO	—	2 450.0 $\pm$ 165.9	—	—	—
NaN_3	—	—	—	2 900.0 $\pm$ 135.9	—

* 与阴性对照相比,每皿回变菌落数增加一倍以上

2.2 小鼠肝细胞彗星试验结果

置荧光显微镜下观察,每张片随机观察 50 个细胞,计数拖尾细胞数,同时测量 50 个拖尾细胞的尾长,并计算拖尾率、平均尾长。肝细胞的试剂对照组有少量细胞出现较短的拖尾,其拖尾率为 12.0%,而阳性对照组全部细胞都发生拖尾,其平均迁移长度为(84.7 $\pm$ 7.9) μ m。出厂水和自来水水样量为 0.1~0.5 L 范围时,细胞拖尾率、拖尾细胞尾长和阴性对照比较差异有显著性($P < 0.01$),且出现明显的剂量-反应关系。水源水的细胞拖尾率和拖尾细胞尾长则在 0.5 L 剂量组与阴性对照组间差异有显著性($P < 0.01$)。见表 2。

表 2 A 市水源水、出厂水、自来水的
小鼠肝细胞彗星试验结果

试样	水样量 (L)	细胞拖尾率 (%)	DNA 迁移长度 (μm , $\bar{x} \pm s$)
水源水	0.5	57.0 *	49.5 $\pm$ 6.4 *
	0.25	25.2	11.4 $\pm$ 4.9
	0.1	13.2	6.2 $\pm$ 2.0
	0.05	12.1	5.4 $\pm$ 1.8
出厂水	0.5	100.0 *	89.9 $\pm$ 8.6 *
	0.25	82.2 *	72.3 $\pm$ 6.9 *
	0.1	54.2 *	41.5 $\pm$ 5.4 *
	0.05	23.1	5.5 $\pm$ 1.9
自来水	0.5	100.0 *	87.1 $\pm$ 7.9 *
	0.25	78.4 *	71.9 $\pm$ 7.5 *
	0.1	41.2 *	45.6 $\pm$ 6.9 *
	0.05	27.4	6.3 $\pm$ 1.4
DMSO	—	12.0	7.5 $\pm$ 2.4
K ₂ Cr ₂ O ₇	—	100.0	84.7 $\pm$ 7.9

* 和阴性对照比差异有显著性 ($P < 0.01$)

3 讨论

3.1 A 市饮用水的遗传毒性分析

沱江是目前四川省污染最重的一条河流^[8]。A 市地处沱江下游, 沱江汇入长江的交界处, 受到沱江中上游沿江城市的严重污染, 但对该地区饮用水致突变性的研究目前国内未见类似报道。

饮用水中致突变/致癌物含量低, 成分十分复杂, 若分门别类地逐一进行化学分析, 不仅技术上困难、工作量大, 而且难于反应总的有害作用。因此普遍采用检测水样有机浓集物的致突变性来评价可能的致癌危害。其致突变检测, 国内最常用的是 Ames 试验。本研究同时采用常规的 Ames 试验和小鼠肝原代细胞彗星试验对 A 市的水源水、出厂水及自来水的有机浓集物的致突变性进行检测, 结果显示, A 市南郊水厂的出厂水和自来水的有机浓集物在试验浓度为 3.0 L/皿 (相当于人的日饮水量) 时, Ames 试验的 T98 和 T100 两菌株均为阳性反应。表明长期饮用该自来水, 存在致突变/致癌的潜在危害。同时, Ames 试验仅在出厂水和自来水的有机浓集物中, 而并未在源水的有机浓集物中检测到致突变性, 可能是通过饮水氯化消毒产生的致突变性氯化消毒副产物所致^[9]。

3.2 肝细胞彗星试验检测饮用水的遗传毒性

比较表 1 和表 2 的结果可知, 在 A 市饮用水有机浓集物的致突变检测中, 出厂水和自来水的 Ames 试验于试样浓度为 3.0 L/皿时才表现为阳性结果, 而肝细胞的彗星试验在水样量为 0.1 L 时就出现明显的阳性结果 (与阴性对照比 $P < 0.01$), 后者的浓度比前者低 30 倍。水源水的 Ames 试验于试样浓度为 6.0 L/皿时仍表现为阴性结果, 而肝细胞的彗星试验在水样量为 0.5 L 时就出现明确的阳性结果。即 Ames 试验只能检

测出氯化消毒后饮用水的致突变阳性, 而彗星试验能同时检测出水源水和氯化消毒后饮用水的致突变性。由上可知, 肝细胞彗星试验应用于饮用水的遗传毒性检测, 除了方法更简便快速以外, 其优点还有灵敏度高, 假阴性结果减少, 水样浓集量少等。用 Ames 试验检测饮用水的致突变性一般需要浓集上百升水样, 样品的采集、运输、过柱等的工作量很大。而小鼠肝细胞彗星试验的检出阈值很低 (本研究中为 100 ml), 可使这一过程的操作发生根本性的变化。

3.3 肝细胞彗星试验灵敏度高的原因

与 Ames 试验比较, 肝细胞彗星试验检测饮用水遗传毒性灵敏度高的可能原因有: (1) 与回复突变不同, 彗星试验可反映 DNA 单链和双链断裂、DNA 不完全切除修复、碱不稳定位点等多种 DNA 损伤; (2) 彗星试验检测谱宽, 王涛等^[10]对 11 类致癌物检测结果显示, 彗星试验对 Ames 试验检测率低的金属类、氯化碳氢类物质十分敏感; (3) 原代肝细胞具有一定的活化作用。用 Ames 试验对一些间接致突变/致癌物的遗传毒性检测常需加 S9 活化系统; 通常细胞自身具有一定的活化能力, 一般原代细胞活化能力更强, 能更好地代表体内活化系统。衡正昌^[18]等研究认为短期试验常规应用的 S9 并不能完全模拟哺乳动物体内的代谢活化作用, 体内和体外的活化能力有时具有很大差异。因此, 用小鼠原代细胞彗星试验检测环境样品的遗传毒性, 若不需外加活化系统, 既可简化操作程序又可降低成本。

参考文献:

- [1] J M McElvey Martin, M H L Green, P Schmezer, et al. The single cell gel electrophoresis assay (comet assay): A European review [J]. Mutation Res. 1993, 288: 47-63.
- [2] D W. Fairbairn, P L Olive, K L O Neill. The comet assay: a comprehensive review [J]. Mutation Res. 1995, 339: 37-59.
- [3] 王涛, 衡正昌. 彗星试验研究现状及应用前景 [J]. 癌变·畸变·突变, 1999, 44 (4): 208-210.
- [4] 张遵真, 田怀军, 衡正昌, 等. 水中有机提取物对 V79 细胞 DNA 损伤的研究 [J]. 环境与健康杂志, 1999, 18 (1): 10-12.
- [5] 王心如. 卫生毒理学基础 [M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2003. 136-137.
- [6] 张遵真, 衡正昌, 王涛. 改良的彗星试验与标准方法的对比研究 [J]. 卫生毒理学杂志, 2000, 14 (3): 180-182.
- [7] 张青碧, 衡正昌. 对几种原代细胞彗星试验敏感性的探讨 [J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16 (5): 274-278.
- [8] 许毅, 许国凡, 罗长梅. 沱江内江段饮用水源的污染防治 [J]. 四川环境, 1998, 17 (2): 65-67.
- [9] 林辉, 刘建平. 饮水氯化消毒及其副产物的研究进展及展望 [J]. 中国公共卫生, 2001, 17 (11): 1042-1043.
- [10] 王涛, 衡正昌, 等. 彗星试验检测环境致癌物的敏感性评价 [J]. 卫生毒理学杂志, 2001, 15 (1): 58-60.