

温室土壤有机提取物遗传毒性研究

刘建文, 高祥春, 邢杰, 任有勋, 闫绍妹, 邱玉刚, 翟庆峰

摘要: [目的] 检测温室土壤中有机提取物的遗传毒性作用。[方法] 以小鼠为实验动物, 共分 5 组: 阴性对照组(二甲亚砜)、阳性对照组(环磷酰胺)及土壤有机提取物低、中、高剂量组, 染毒剂量分别为 5、15 和 30 g 土壤干重/(kg 小鼠体重·d), 染毒方式为每日灌胃 1 次, 连续染毒 4 周。用胞质分裂阻滞微核细胞试验和彗星试验分别检测有机提取物所致小鼠外周血淋巴细胞的染色体损伤作用和外周血细胞的 DNA 损伤作用。[结果] 有机提取物剂量与微核率具有较明显的剂量-效应关系, 显著高于阴性对照组; 随着有机提取物作用剂量的增加, 彗星尾长、尾部 DNA 含量和 Olive 尾矩显著升高。[结论] 温室土壤中有有机提取物可以诱使小鼠发生染色体和 DNA 损伤。

关键词: 温室土壤; 有机污染物; 遗传毒性; 胞质分裂阻滞微核试验; 彗星试验

Genotoxicity of Extractable Organic Matter in Greenhouse Soil LIU Jian-wen, GAO Xiang-chun, XING Jie, REN You-xun, YAN Shao-mei, QIU Yu-gang, ZHAI Qing-feng (School of Public Health, Weifang Medical University, Weifang, Shandong 261053, China). Address correspondence to QIU Yu-gang, E-mail: qiuYG@wfmc.edu.cn; ZHAI Qing-feng, E-mail: zhaiqf@wfmc.edu.cn · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To study the genotoxicity of extractable organic matter (EOM) in vegetable greenhouse soil. [Methods] EOM obtained by soxhlet extraction from greenhouse soil were fed to 3 groups of mice via gavage at concentrations of 5, 15, and 30 g soil dry weight/kg body weight, once per day for 4 weeks. A negative control group was administered with dimethyl sulfoxide and a positive control group with cyclophosphamide. Chromosomal damage in peripheral blood lymphocytes and DNA injury in peripheral blood cells were detected by cytokinesis-block micronucleus (CBMN) assay and comet assay independently. [Results] There were significant differences in the micronucleus frequency between the EOM exposure groups and the negative control group, and the micronucleus frequency remarkably increased with EOM concentration. Compared with the negative control group, the tail length, tail DNA percent, and Olive tail moment increased in the middle and the high dose groups. [Conclusion] EOM extracted from greenhouse soil could induce chromosomal damage and DNA injury in mice.

Key Words: greenhouse soil; extractable organic matter; genotoxicity; cytokinesis-block micronucleus assay; comet assay

蔬菜生产基地通常位于市郊或城乡结合部, 由于工业三废大量排放、生活垃圾不合理堆放, 以及蔬菜生产中高毒高残留农药、化肥和地膜等农用化学品的广泛使用, 致使大量有机污染物于温室土壤中蓄积, 并可能通过植物根系的吸收, 在蔬菜等作物中富集, 进而通过食物链对人类健康造成潜在危害。为此, 本研究拟利用遗传毒理学方法对温室土壤中有有机污染物(extractable organic matter, EOM)的遗传毒性进行综合评价。

1 材料与方法

1.1 土壤样品的采集及有机物的提取

采用梅花形布点法采集蔬菜大棚(6 年棚龄, 种植西红柿)

[基金项目] 山东省医药卫生科技发展计划项目(编号: 2009QZ029)

[作者简介] 刘建文(1989—), 男, 本科生; 研究方向: 预防医学; E-mail: 871015191@qq.com

[通信作者] 邱玉刚副教授, E-mail: qiuYG@wfmc.edu.cn; 翟庆峰讲师, E-mail: zhaiqf@wfmc.edu.cn

[作者单位] 山东省潍坊医学院公共卫生学院, 山东 潍坊 261053

土壤样品, 弃杂物, 风干, 研磨, 过 50 目筛备用。称取过筛后土壤样品 50.0 g, 用索氏提取器提取有机物, 提取液为丙酮/石油醚混合液(体积比 1:1), 温度 80℃, 提取 8 h。提取液经旋转蒸发仪浓缩干燥后, 定容于 10 mL 二甲亚砜(DMSO)作为原液备用, 则原液相当于 5.0 g 土壤干重/mL DMSO。染毒时用植物油稀释到指定浓度。

1.2 动物分组、染毒

将 40 只清洁级昆明种系雄性小鼠(由潍坊医学院动物中心提供, 动物合格证号为 SCXK(鲁)20050015; 体重 15~20 g; 10 周龄)随机分为 5 组: 阴性对照组、阳性对照组和低、中、高剂量染毒组。阴性对照组用 DMSO 和植物油 6:4 混合液染毒; 阳性对照组腹腔注射环磷酰胺, 100 mg/体重 kg, 摘眼球取血前隔日染毒两次; 低、中、高剂量染毒组, 染毒液浓度分别为 0.5、1.5 和 3.0 g 土壤干重/mL DMSO, 染毒方式为每日灌胃 1 次, 染毒体积 10 mL/(kg 小鼠体重·d), 最终染毒剂量分别为 5.0、15.0 和 30.0 g 土壤干重/(kg 小鼠体重·d), 连续染毒 4 周。

1.3 胞质分裂阻滞法微核试验 (CBMN)

动物染毒结束后 24 h 内摘眼球取抗凝血 0.4 mL, 加入 5.0 mL 培养液 (80% RFMI 1640; 20% 胎牛血清; 250.0 mg/L 谷氨酰胺; 植物血凝素和肝素适量), 培养至 44 h 加入细胞松弛素 B, 72 h 收获细胞, 经低渗、固定处理后滴片, Giemsa 染色。采用盲法读片, 参照 FENECH^[1] 的判定标准, 计数 1 000 个双核细胞中的微核数, 500 个细胞中的核分裂指数 (nuclear division index, NDI)。NDI = (M₁ + 2M₂ + 3M₃ + 4M₄) / N, 其中 M₁ ~ M₄ 分别代表具有 1~4 个核的细胞数目, N 为计数的活细胞总数。

1.4 彗星试验

参照 OLIVE 等^[2] 方法, 于染毒第 27 天取 5 μ L 小鼠尾部全血与 200 μ L 37 $^{\circ}$ C 1% 低熔点琼脂糖相混合。然后迅速取 75 μ L 平铺至玻片上, 固化 20 min, 碱性裂解液中裂解 1 h, 电泳液中解旋 20 min, 电泳 30 min (25 V, 300 mA)。然后 Tris-HCl 缓冲液中和 3 次, 每次 5 min。溴化乙锭染色 20 min。24 h 内用荧光显微镜拍照, 用 COMET.1 软件 (北京博乐通生物科技有限公司) 分析测量。观察指标为尾长、Olive 尾矩和头尾光密度比。

1.5 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS 13.0 软件统计分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析。组间两两比较: 若方差齐时, 采用 SNK 检验; 若方差不齐时, 采用 Games-Howell 检验。采用 *t* 检验进行相关系数的统计推断来判定两变量之间的剂量效应关系。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 EOM 致小鼠外周血淋巴细胞的染色体损伤作用

由表 1 可见, EOM 中、高剂量组双核细胞率较阴性对照组明显降低 ($P<0.05$)。NDI 各剂量组间差异无统计学意义 ($F=1.44, P<0.05$)。双核细胞率和 NDI 同 EOM 剂量皆呈现明显的剂量效应关系 (双核细胞: $r=-0.97, P<0.05$; NDI: $r=-0.97, P<0.05$)。随 EOM 作用浓度的增加, 微核率随之增加, 具有较明显的剂量-效应关系 ($r=0.99, P<0.05$)。

表 1 土壤有机提取物致小鼠外周血淋巴细胞的染色体损伤作用 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	双核细胞 (%)	核分裂指数	微核率 (%)
阴性对照	80.13 $\pm$ 10.17	2.18 $\pm$ 0.34	2.88 $\pm$ 0.72
阳性对照	58.88 $\pm$ 7.76*	1.50 $\pm$ 0.38	5.25 $\pm$ 1.58*
EOM 低剂量	77.75 $\pm$ 8.46	1.88 $\pm$ 0.71	4.00 $\pm$ 1.25
EOM 中剂量	65.50 $\pm$ 8.57*	1.75 $\pm$ 0.66	5.75 $\pm$ 1.29*
EOM 高剂量	60.25 $\pm$ 9.50*	1.42 $\pm$ 0.23	7.63 $\pm$ 1.35*

[注]*: 与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 彗星试验结果

本部分用尾长、头尾光密度比和 Olive 尾矩表示 DNA 遗传损伤情况, 结果发现, 这 3 项指标 EOM 中、高剂量组明显高于低剂量组、阴性对照组和阳性对照组 ($P<0.05$), 并且这 3 项指标皆与 EOM 剂量之间存在显著正相关关系 (细胞尾长: $r=0.99, P<0.05$; 尾部 DNA: $r=0.95, P<0.05$; Olive 尾矩: $r=0.96, P<$

0.05)。这 3 项指标阳性对照组与阴性对照组间差异皆有统计学意义 ($P<0.05$)。

表 2 土壤有机提取物致小鼠外周血细胞的 DNA 损伤作用 ($n=8, \bar{x} \pm s$)

组别	尾长	尾部 DNA 含量 (%)	Olive 尾矩
阴性对照	4.20 $\pm$ 2.68	8.22 $\pm$ 3.33	0.30 $\pm$ 0.23
阳性对照	25.59 $\pm$ 10.16*	14.08 $\pm$ 8.40	4.96 $\pm$ 4.93*
EOM 低剂量	13.83 $\pm$ 8.92*	9.04 $\pm$ 5.68	2.24 $\pm$ 2.74*
EOM 中剂量	22.09 $\pm$ 10.30*	17.22 $\pm$ 7.93*	4.15 $\pm$ 3.29*
EOM 高剂量	37.78 $\pm$ 14.61*	19.86 $\pm$ 8.56*	5.47 $\pm$ 3.93*

[注]*: 与阴性对照组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

有研究发现, 农田土壤样品中除检出胺类、烷烃类外, 还检测出苯类、醇类、多环芳烃等有机毒物^[3]。实验动物体重增长情况反映动物中毒后综合整体变化。本课题组前期研究结果^[4]表明, EOM 对小鼠的生长发育具有一定的影响, 但其剂量-效应关系并不明显。

目前, 胞质分裂阻滞法微核试验 (CBMN) 已经发展成为研究基因组不稳定性及细胞毒性的综合手段^[1]。微核通常被认为是染色体断裂和丢失的标志。高红霞等^[5]应用传统微核试验对污灌土壤中有机污染物的遗传毒性检测发现土壤有机提取物可以诱导小鼠骨髓细胞微核率的增加。本研究表明, EOM 处理组小鼠外周血微核数显著高于阴性、阳性对照组; EOM 染毒后, 双核细胞率和 NDI 皆有降低的趋势并呈剂量-效应关系。

彗星试验不仅能揭示细胞内存在的损伤类型, 而且能定量分析细胞中 DNA 单、双链缺口损伤的程度^[2]。刘仲苓^[6]研究发现, 无公害蔬菜生产基地高剂量组彗星拖尾率显著高于阴性对照组, 证明两个基地冬、夏两季土壤中均含有可引起小鼠外周血细胞 DNA 损伤的有机物, 本研究结果与之一致。由以上两个实验^[2, 6]表明, EOM 具有一定的致 DNA 损伤能力, 亦可引起染色体损伤和具有抑制细胞分裂的细胞毒性。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

[1] THOMAS P, FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay[J]. Methods Mol Biol, 2011, 682: 217-234.

[2] OLIVE P L, BANÁTH J P. The comet assay: a method to measure DNA damage in individual cells[J]. Nat Protoc, 2006, 1(1): 23-29.

[3] 刘英莉, 高红霞, 阎红, 等. 某地不同灌溉用水土壤中有有机污染物的成分分析[J]. 现代预防医学, 2010, 37(18): 3428-3430.

[4] 翟庆峰, 刘春兰, 邢杰, 等. 温室土壤有机提取物靶器官毒性研究[J]. 环境卫生学杂志, 2012, 2(1): 1-4.

[5] 高红霞, 闫红, 高铁利, 等. 污灌土壤中有机污染物遗传毒性检测[J]. 中国公共卫生, 2008, 24(10): 1250-1251.

[6] 刘仲苓. 无公害蔬菜生产基地土壤及蔬菜产品有机污染物的遗传毒性研究[D]. 天津: 天津医科大学, 2004.

(收稿日期: 2012-03-12)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 张晶; 校对: 葛宏妍)