

应用胞质分裂阻滞微核细胞组学方法评价三溴乙酸的遗传毒性

洪丽玲¹, 范宾¹, 黄永焯², 刘二刚², 王峰³, 田丽婷³

摘要: [目的] 应用胞质分裂阻滞微核细胞组学方法[cytokinesis-block micronucleus cytome(CBMN-cyt) assay]评价三溴乙酸的遗传毒性。[方法] 以小鼠淋巴瘤(L5178Y)细胞为受试细胞, 分为2组。一组暴露于终浓度分别为0(阴性对照)、7.81、15.62、31.25、62.50、125.00、175.00、250.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三溴乙酸溶液24h, 采用噻唑蓝比色法(MTT法)检测细胞毒性, 并计算半数致死浓度(median lethal dose, LC_{50}); 另一组暴露于终浓度分别为0(阴性对照)、31.25、62.50、125.00、175.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的三溴乙酸溶液24h, 并设阳性对照(终浓度为0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 丝裂霉素C), 采用CBMN-cyt试验检测遗传毒性。[结果] 与阴性对照组相比, 31.25、62.50、125.00、175.00、250.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三溴乙酸染毒组L5178Y细胞的存活率均较低, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 且随着三溴乙酸染毒浓度的升高, L5178Y细胞的存活率呈明显的下降趋势($P < 0.01$)。三溴乙酸对该细胞的 LC_{50} 为135.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。与阴性对照比较, 125.00、175.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 三溴乙酸染毒L5178Y细胞的微核率均升高, 各浓度三溴乙酸染毒L5178Y细胞的核质桥率也均升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$); 而各浓度三溴乙酸染毒L5178Y细胞的核芽率和核分裂指数(nucleus divided index, NDI)无显著改变。Pearson相关分析显示, 随着三溴乙酸染毒剂量的升高, L5178Y细胞的微核率、核质桥率、核芽率均呈明显的上升趋势($P < 0.01$)。[结论] 三溴乙酸的遗传毒性, 可能与染色体损伤、DNA错误修复、染色体重组或端粒末端融合损伤有关。

关键词: 三溴乙酸; 饮用水; 遗传毒性; 细胞毒性; 胞质分裂阻滞微核细胞组学

Evaluation on Genotoxicity of Tribromoacetic Acid by Cytokinesis-Block Micronucleus Cytome Assay
HONG Li-ling¹, FAN Bin¹, HUANG Yong-zhuo², LIU Er-gang², WANG Feng³, TIAN Li-ting³ (1. Toxicology Laboratory, Testing Center of Shanghai Research Institute of Chemical Industry, Shanghai 200062, China; 2. Shanghai Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 201203, China; 3. Amway (China) Research & Development Center, Shanghai 201203, China). Address correspondence to TIAN Li-ting, E-mail: brenda.tian@amway.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To test the genotoxicity of tribromoacetic acid by cytokinesis-block micronucleus cytome (CBMN-cyt) assay. [Methods] Mice L5178Y lymphoma cells were treated with tribromoacetic acid at 0 (negative control), 7.81, 15.62, 31.25, 62.50, 125.00, 175.00, and 250.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h. The cytotoxicity was tested by tetrazolium salt colorimetric assay, and the median lethal dose (LC_{50}) was calculated. The cells were treated with tribromoacetic acid at 0 (negative control), 31.25, 62.50, 125.00, and 175.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 24 h, and plus 0.1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ mitomycin C as a positive control, and the genotoxicity was tested by CBMN-cyt assay. [Results] Compared with the negative control group, the survival rate of L5178Y lymphoma cells in the 31.25, 62.50, 125.00, 175.00 and 250.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups decreased significantly ($P < 0.05$). From the dose-effect curve, a decreasing trend for the survival rate of L5178Y lymphoma cells was found with the increasing of dosage of tribromoacetic acid ($P < 0.01$). The LC_{50} of tribromoacetic acid was 135.70 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Compared with the negative control group, the frequency of micronucleus (MN) of L5178Y lymphoma cells in the 125.00 and 175.00 $\mu\text{g}/\text{mL}$ groups and the nucleoplasmic bridges (NPBs) in all treatment groups increased significantly ($P < 0.05$), but there were no differences in the frequency of nuclear buds (NBUDs) and the nuclear divided index between the treatment groups and the control group. The results of Pearson correlation test showed that along with the increasing of tribromoacetic acid treatment dosage increasing trends were found in the frequency of MN, NPBs, and NBUDs ($P < 0.01$). [Conclusion] The findings by the application of CBMN-cyt assay indicate that tribromoacetic acid could induce genotoxicity, mainly including chromosome damage, DNA error-prone repair, chromosome recombination or damage of telomere fusion.

Key Words: tribromoacetic acid; drinking water; genotoxicity; cytotoxicity; cytokinesis-block micronucleus cytome

[作者简介] 洪丽玲(1984—), 女, 硕士生, 助理工程师; 研究方向: 化学品危险性鉴定; E-mail: uj_hong@163.com

[通信作者] 田丽婷副教授, E-mail: brenda.tian@amway.com

[作者单位] 1. 上海化工研究院检测中心健康毒理实验室, 上海 200062; 2. 中国科学院上海药物研究所, 上海 201203; 3. 安利(中国)研发中心有限公司, 上海 201203

国内外对消毒所产生的氯代和溴代副产物的遗传毒性进行了一定的研究,而单独针对三溴乙酸的遗传毒性研究较少。现行的遗传毒性组合试验有其限制性,近年来在胞质分裂阻滞法微核试验基础上发展起来的胞质分裂阻滞法微核细胞组学(cytokinesis-block micronucleus cytome assay, CBMN-cyt)试验,由于可采用单一细胞在相同暴露条件下检测遗传毒性多个终点,可区别直接损伤剂和间接损伤剂,因而受到人们的关注。故本研究拟用较新的 CBMN-cyt 方法对三溴乙酸进行检测和评价,进一步探讨其遗传毒性作用特点和可能的机制。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

HERACELL 150i 自动温控二氧化碳(CO₂)细胞培养箱(美国 Thermo 公司),CKX31 型组织培养用显微镜、CX21 型光学显微镜(日本 Olympus 公司),Simplicity/SIMS000CN 超纯水器(美国 Millipore 公司),L80-2A 型离心机(上海跃进医疗器械有限公司),ELX800 型酶标仪(美国 BioTek 公司)。

三溴乙酸(纯度为 99%)、细胞松弛素 B、二甲基亚砜、噻唑蓝(MTT)均购自美国 Sigma 公司,丝裂霉素 C(mitomycin C, MMC, 瑞士罗氏有限公司),1640 培养基和马血清(美国 Hyclone 公司)。

三溴乙酸染毒溶液的配制:准确称取三溴乙酸,用 1640 培养基配制成相应浓度的三溴乙酸溶液。

1.2 细胞培养

将已进行核型鉴定的小鼠淋巴瘤(L5178Y)细胞(上海生命科学院细胞所)复苏后,用 1640 培养基在 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 3~4d。

1.3 MTT 法细胞毒性检测

根据预实验结果,取处于对数生长期的 L5178Y 细胞置于 96 孔板,调节细胞密度为 5×10^4 个/mL,每孔加 90 μ L 细胞悬液和 10 μ L 三溴乙酸,使三溴乙酸终浓度分别为 0(阴性对照)、7.81、15.62、31.25、62.50、125.00、175.00、250.00 μ g/mL 染毒 24h。每个浓度组设 6 个复孔。每孔加入 MTT 溶液(5 mg/mL) 20 μ L,置于培养箱继续孵育 4h。每孔加入 100 μ L 二甲基亚砜(DMSO),溶解后使用酶标仪于 490 nm 波长下测定各孔光密度 [$D_{(490\text{nm})}$] 值,并计算细胞存活率{细胞存活率(%)=[实验组 $D_{(490\text{nm})}$ 值/对照组 $D_{(490\text{nm})}$ 值] \times 100}。

以三溴乙酸浓度为横坐标,细胞存活率为纵坐标,拟合对数曲线并计算三溴乙酸对 L5178Y 细胞的半数致死浓度(median lethal dose, LC₅₀)。

1.4 CBMN-cyt 试验

取处于对数生长期的 L5178Y 细胞置于 6 孔板中,调节细胞密度为 4×10^5 /mL。每孔加入 4.5 mL 细胞悬液和 0.5 mL 三溴乙酸,使三溴乙酸终浓度分别为 0(阴性对照)、31.25、62.50、125.00、175.00 μ g/mL,并设阳性对照(终浓度为 0.1 μ g/mL 的 MMC),每组设 3 个重复;混匀后置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中培养 4h,然后每孔加入 50 μ L 细胞松弛素 B(终浓度为 4.5 μ g/mL),继续培养至 24h。收获细胞,以 800 r/min 离心(离心半径为 5 cm) 8 min,弃上清液,用 0.075 mol/L 氯化钾低

渗 3 min,加预冷的固定液甲醇-冰乙酸(体积比为 3:1)预固定,以 800 r/min 离心(离心半径为 5 cm) 8 min,弃上清液,用固定液固定 30 min,以 800 r/min 离心(离心半径为 5 cm) 8 min,弃上清液(留少许液体),混匀,滴片,晾干。然后用 10% Giemsa 染液染色 20 min,冲洗,晾干,阅片。每个剂量组观察 1000 个细胞,计数单核、双核、三核、四核及多核细胞数,按照以下公式计算核分裂指数[nucleus divided index, NDI, $NDI=(A+2 \times B+3 \times C+4 \times D)/N$]。式中:A 为单核细胞数,B 为双核细胞数,C 为三核细胞数,D 为四核细胞数,N 为细胞总数。此外,计数 1000 个双核细胞中出现微核(micronucleus)、核质桥率(nucleoplasmic bridges)及核芽(nuclear buds)的细胞数,并计算微核率、核质桥率及核芽率。

1.5 统计学方法

实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 进行表示。采用 SPSS 17.0 软件进行统计学分析。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析(one way ANOVA)。进一步进行组间两两比较时,若方差齐时,采用 SNK 检验(Student-Newman-Keuls 法);若方差不齐时,采用 Games-Howell 检验。采用 Pearson 相关分析对检测指标进行趋势分析。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 MTT 法细胞毒性检测

由表 1 可见,与阴性对照组相比,31.25 μ g/mL 及更高浓度三溴乙酸染毒组 L5178Y 细胞的存活率均较低,与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);且随着三溴乙酸染毒浓度的升高,L5178Y 细胞的存活率呈明显的下降趋势($P<0.01$)。通过拟合浓度-效应曲线计算,得到三溴乙酸对 L5178Y 细胞的 LC₅₀ 为 135.7 μ g/mL。

表 1 三溴乙酸染毒对 L5178Y 细胞活性的影响 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

浓度 (μ g/mL)	OD	存活率 (%)
0.00	0.67 \pm 0.14	100.00
7.81	0.64 \pm 0.06	95.29
15.62	0.65 \pm 0.10	96.72
31.25	0.53 \pm 0.06	74.00*
62.50	0.52 \pm 0.03	72.03*
125.00	0.45 \pm 0.05	60.39*
175.00	0.37 \pm 0.03	45.24*
250.00	0.18 \pm 0.04	9.24*

[注]*: 与对照组比较, $P<0.05$ 。

2.2 CBMN-cyt 试验

由表 2 可见,与阴性对照比较,125.00、175.00 μ g/mL 三溴乙酸染毒 L5178Y 细胞的微核率均升高,各浓度三溴乙酸染毒 L5178Y 细胞的核质桥率也均升高,与阴性对照组相比,差异有统计学意义($P<0.05$);而核芽率和 NDI 无明显改变。Pearson 相关分析显示,随着三溴乙酸染毒浓度的升高,L5178Y 细胞的微核率、核质桥率、核芽率均呈明显的上升趋势($P<0.01$),镜下观察如图 1 所示。

表 2 三溴乙酸染毒对 L5178Y 细胞微核率、核质桥率、核芽率及 NDI 的影响 ($n=3, \bar{x} \pm s$)

浓度 ($\mu\text{g/mL}$)	微核率 (%)	核质桥率 (%)	核芽率 (%)	核分裂指数
阴性对照组				
0.00	10.33 \pm 1.53	1.67 \pm 1.15	1.67 \pm 0.57	1.61 \pm 0.01
三溴乙酸组				
31.25	25.00 \pm 5.57	6.67 \pm 3.51*	3.00 \pm 2.65	1.57 \pm 0.08
62.50	26.67 \pm 6.43	5.00 \pm 1.00*	4.33 \pm 2.52	1.61 \pm 0.05
125.00	32.00 \pm 2.65*	7.33 \pm 0.58*	4.00 \pm 3.61	1.64 \pm 0.04
175.00	36.67 \pm 2.08*	7.67 \pm 1.53*	8.00 \pm 2.00	1.62 \pm 0.02
阳性对照组				
0.10	128.33 \pm 27.93*	9.33 \pm 1.15*	8.67 \pm 7.23*	1.36 \pm 0.06*

[注]*: 与阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

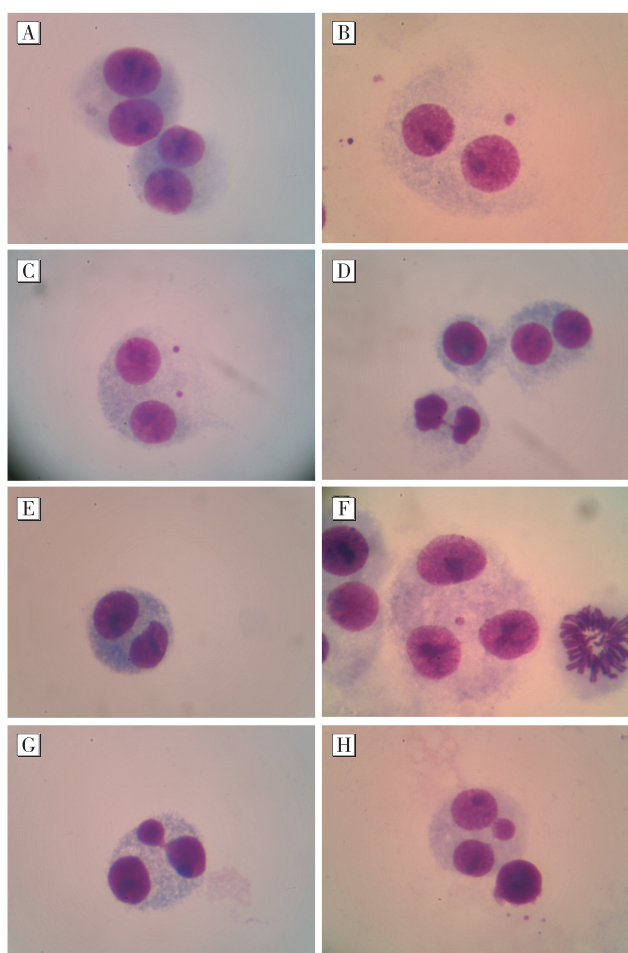


图 1 CBMN-cyt 试验中微核、核质桥和核芽图谱 (Giemsa 染色, $\times 1000$)

3 讨论

由微核试验发展而来的胞质分裂阻滞微核试验, 可有效去除因受试物或不良的细胞培养状态所致细胞分裂动力学改变而引起的假阴性结果, 因而与传统的微核试验相比, 具有更好的精确度^[1]。近年来, 胞质阻滞分裂微核试验已逐渐演变为一种综合性的实验, 可以用来检测染色体断裂、DNA 修复、染色

体丢失、不分离、坏死、凋亡和细胞生长抑制^[2]。其中, 微核可反映染色体损伤, 包括染色体断裂和非整倍体畸变, 用胞质分裂阻滞微核试验区分断裂剂和非整倍体诱变剂的效果等同于荧光原位杂交法 (fluorescence in situ hybridization, FISH)^[3]。这种试验现在也能够被用来检测核质桥 (一种检测 DNA 错误修复、染色体重组或端粒末端融合的生物标记); 也可检测核芽 [一种反映基因扩增和 (或) 基因量改变的生物标记]; 还可计算 NDI, 以反映核分裂活动情况。这种试验方法的最新进展之所以被称为“组学”, 是因为“组学”的概念提示在系统研究中, 可利用单一细胞在相同暴露条件下检测遗传毒性的多个终点, 比如可以对每一个细胞的有丝分裂状态 (单核、双核和多核)、染色体损伤或者不稳定状态 (微核、核质桥和核芽的出现及其频率) 进行检测。这种组学试验代表了胞质阻滞分裂微核试验的发展方向, 将有非常广泛的应用前景^[4]。

本研究所采用的小鼠淋巴瘤 (L5178Y) 细胞是目前国际上用于 tk 位点基因突变分析的标准靶细胞系, 可观察溴代副产物三溴乙酸对其细胞毒作用和遗传毒作用。哺乳类动物细胞体外微核分析已广泛用于评价化学物的诱变活性, 因为哺乳类动物细胞在结构、分化、代谢模式及 DNA 修复能力等方面与原核生物及低级真核细胞相比有很大差异, 前者更接近人类的情况, 故用其结果来评价遗传毒性更为可靠^[5]。

在本研究的胞质分裂阻滞微核试验中, L5178Y 细胞暴露于不同浓度三溴乙酸, 结果显示, 与阴性对照比较, 125.00、175.00 $\mu\text{g/mL}$ 三溴乙酸染毒 L5178Y 细胞的微核率均明显升高; 且随着三溴乙酸染毒剂量的升高, L5178Y 细胞的微核率呈明显的上升趋势 ($P < 0.01$)。表明一定浓度三溴乙酸暴露可引起受试细胞染色体损伤。

本试验结果还显示, 与阴性对照比较, 各浓度三溴乙酸染毒 L5178Y 细胞的核质桥率均明显升高; 且随着三溴乙酸染毒浓度的升高, L5178Y 细胞的核质桥率呈明显的上升趋势 ($P < 0.01$)。表明在本试验的浓度范围 (31.25~175.00 $\mu\text{g/mL}$) 内, 三溴乙酸染毒可对 L5178Y 细胞造成不同程度的 DNA 错误修复、染色体重组或端粒末端融合损伤。特别值得注意的是, 三溴乙酸诱导核质桥的浓度 (31.25 $\mu\text{g/mL}$) 远低于诱导微核的剂量 (125.00 $\mu\text{g/mL}$), 表明在未诱导微核率增高时已可导致 DNA 损伤或错误修复, 或染色体重组错误。如采用传统的微核试验就可能低估了其遗传毒性, 而且在本试验中最低浓度组就与对照组存在统计学差异, 表明诱导核质桥的剂量还可能进一步降低。遗憾的是本研究由于未区分 I 型和 II 型微核, 未能为区分可能的两类机制提供依据, 但为进一步的机制研究提供了有意义线索。

此外, 本试验结果显示, 与阴性对照比较, 各浓度三溴乙酸染毒 L5178Y 细胞的核芽率和 NDI 无明显改变。然而随着三溴乙酸染毒浓度的升高, L5178Y 细胞的核芽率呈明显的上升趋势 ($P < 0.01$), 提示对于三溴乙酸是否引起受试细胞基因扩增或基因量改变还应进行进一步的研究。

NDI 在一定程度上可反映细胞毒性, 175.00 g/mL 浓度组也显示有明显的细胞毒性。但 175.00 g/mL 浓度组 NDI 与对照组比较并无差异, 表明三溴乙酸可能对细胞分裂无明显影响, 其

细胞毒性可能主要通过对已分裂细胞的作用所致,这尚待以后进一步研究证实。

本研究结果初步提示,胞质分裂阻滞微核组学试验在评价三溴乙酸的遗传毒性上有明显的优势,值得进一步研究证实。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] FENECH M. The *in vitro* micronucleus technique [J]. *Mutat Res*, 2000, 455(1/2): 81-95.
- [2] FENECH M. Cytokinesis-block micronucleus assay evolves into a “cytome” assay of chromosomal instability, mitotic dysfunction and cell death [J]. *Mutat Res*, 2006, 600(1/2): 58-66.

[3] HASHIMOTO K, NAKAJIMA Y, MATSUMURA S, et al. An *in vitro* micronucleus assay with size-classified micronucleus counting to discriminate aneugens from clastogens [J]. *Toxicol in vitro*, 2010, 24(1): 208-216.

[4] GONZÁLEZ NV, NIKOLOFF N, SOLONESKI S, et al. A combination of the cytokinesis-block micronucleus cytome assay and centromeric identification for evaluation of the genotoxicity of dicamba [J]. *Toxicology Lett*, 2011, 207(3): 204-212.

[5] 吕晓华, 张立实, 王瑞淑. L5178Y 和 WTK1 细胞微核试验在抗诱变测试中的应用 [J]. *华西大学学报*, 1999, 30(3): 283-285.

(收稿日期: 2013-07-23)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 何蓉; 校对: 王晓宇)

【告知栏】

《预防医学论坛》杂志 2014 年征订通知

《预防医学论坛》杂志是由国家卫生部主管,中华预防医学会主办的系列刊物之一,国内外公开发行人,国家级医学科技期刊,国内统一刊号为 CN 37-1428/R, 国际连续出版物编号为 ISSN 1672-9153。本刊为中国生物医学核心期刊,中国生物医学文献数据库来源期刊,被《中国核心期刊(遴选)数据库》和中国知网《中国学术期刊》网络出版总库收录。本刊内容以反映和交流全国各地卫生防病、妇幼保健工作者的实践经验和科学研究成果为主,突出学术性和实用性相结合的特点。现设有论著、调查研究、实验研究、监测、综述、工作报告、资料研究、管理论坛、问题探讨、国外学术信息等栏目,重点报道国内预防医学科技的新成果、新理论、新技术、新方法和新经验。

本刊对省、部级以上基金资助项目、科研课题,优先刊用,费用优惠。订阅本刊者的学术论文,本刊优先刊用。订阅本刊 10 本以上者,本刊给予奖励。

《预防医学论坛》杂志为月刊,每月 10 日出版,国际标准大 16 开,80 页。每本定价 8 元,全年定价 96 元,邮发代号 24-169,也可直接向杂志社订阅,免收邮寄费。汇款请寄“山东省济南市经十路 16992 号(邮编:250014)《预防医学论坛》杂志社”收,并在附言栏内注明。联系人:刘兰珍;电话:(0531)82679773;传真:(0531)82679771; E-mail: yfyxlt@vip.163.com。

《预防医学论坛》杂志社

更正

发表于本刊 2013 年 30 卷第 11 期 880~883 页《水中微囊藻毒素的氧化水解产物 2-甲基-3-甲氧基-4-苯基丁酸的气相色谱-质谱检测研究》一文,做如下更正说明:(1)增加通信作者。卢大胜主管技师, E-mail: dslu@scdc.sh.cn。(2)883 页,“扩展不确定度和测量值分别为 0.24、1.03 $\mu\text{g/L}$, 对应的不确定度为 0.25 $\mu\text{g/L}$ ”、“在以往的文献中未见报到”2 句,分别应为“相对扩展不确定度和测量值分别为 0.24 ($k=2$)、1.03 $\mu\text{g/L}$, 对应的合成标准不确定度为 0.25 $\mu\text{g/L}$ ”、“在以往的文献中未见报道”。特此更正并致歉!