文章编号: 1001-0580(2008)03-0337-03　中图分类号: R994.6　文献标志码: A　【论　著】

五氯酚钠致突变性研究*

宋瑞霞[1], 阮鸿洁[1], 刘征涛[2]

摘　要: 目的　研究五氯酚钠的致突变性, 为五氯酚钠的毒性机制研究提供依据。方法　应用 Ames 试验、小鼠淋巴瘤细胞试验和体外染色体畸变试验研究五氯酚钠的致突变性。结果　五氯酚钠对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 4 株菌株无论直接作用或代谢活化后作用, 均未呈现致突变性; 随染毒浓度增大, L5178Y 细胞 tk 位点的突变频率有升高的趋势, 其中 150 μg/ml 剂量组的突变率与对照组比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 无论是否加入代谢活化剂, 受试物均引起染色体畸变率的明显增加。结论　五氯酚钠能诱发中国仓鼠卵巢(CHO)细胞染色体畸变, 是非基因致突变物或弱基因致突变物。

关键词: 五氯酚钠; 致突变性; Ames 试验; 小鼠淋巴细胞试验; 体外染色体畸变试验

Study on mutagencity of sodium pentachlorophenol

SONG Rui-xia, RUAN Hong-jie, LIU Zheng-tao. Institute for Environmental Hygiene and Health Related Products Safety, China Center for Disease Control and Prevention (Beijing 100021, China)

Abstract: **Objective**　To investigate the mutagenesis of sodium pentachlotophenol in vitro. **Methods**　The mutagenesis of sodium pentachlorophenol was detected by using Ames test, Mouse Lymphoma Cell Assay (MLA) and chromosome aberration test at different doses. **Results**　Sodium pentachlorophenol did not induce the reverse mutagenesis of *Salmonella typhimurium* TA97、TA98、TA100 and TA102 strain directly or after addition of S_9; High dosage sodium pentachlorophenol could increased the mutation frequency of TK gene significantly compared with control group. Sodium pentachlorophenol can induce a significantly increased chromosome aberration rate both with and without adding S_9 mix. **Conclusion**　Sodium pentachlorophenol can induce chromosome aberration of CHO cell, and is a non-genetic or weak-genetic mutagen.

Key words: sodium pentachlorophenol; mutagenicity; Ames test; mouse lymphoma cell assay (MLA); *in vitro* chromosome aberration

五氯酚钠作为一种高效、低廉的广谱杀虫剂、防腐剂、除草剂曾长期在世界范围内使用。尽管目前欧洲一些发达国家已停止或限制使用五氯酚钠, 但在一些发展中国家五氯酚钠仍被作为重要的农药而使用。其对人类健康的影响引起了普遍的关注[1-3]。有关五氯酚钠的致突变性研究各种观点不一[4,5]。本文应用 Ames 试验、小鼠淋巴瘤细胞试验和体外染色体畸变试验研究五氯酚钠的致突变性。

1　材料与方法

1.1　试验材料

1.1.1　试验细胞株　小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y (北京市疾病预防控制中心惠赠)。培养基用含 10% 马血清和双抗的 RPMI 1640 培养液, 集落培养使用含 20% 马血清和双抗的 RPMI 1640 培养液。在 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度下常规悬浮培养。中国仓鼠卵巢细胞(CHO) (中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心)。

1.1.2　菌株　组氨酸缺陷型鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100 和 TA102 菌株(美国加利福尼亚大学 Ames 试验室)。

1.1.3　试剂　RPMI 1640 培养基、胰酶、谷氨酰胺(美国 Gilco 公司); 次黄嘌呤、甘氨酸、胸腺嘧啶核苷、三氟胸苷、丝裂霉素(美国 Sigma 公司)。使用经多氯联苯(PCBs)诱导的大鼠肝匀浆并加相应的辅助因子配制成的混合物作为体外代谢活化剂(S9 mix)。

1.1.4　受试物五氯酚钠(天津大沽化工厂); 其中多氯代二苯并二　英(PCDDs)和多氯代二苯并呋喃(PCDFs)的含量分别为 15.76×10^{-6} g/g 和 2.26×10^{-6} g/g。

1.2　Ames 试验

按 Maron 和 Ames 等平板掺入法[6]。采用经鉴定生物学特性均符合要求的鼠伤寒沙门菌组氨酸缺陷型 TA97、TA98、TA100 和 TA102 4 株试验菌株, 用多氯联苯(PCB)诱导的大鼠肝匀浆 S9 作为体外代谢活化系统。根据毒性测定结果, 试验样品设 500, 1 000, 2 000, 5 000 μg/皿 4 个剂量组, 同时设溶剂对照组和阳性对照组。每个剂量设 3 个平行平皿, 重复试验 2 次。如果样品的回变菌落数达溶剂对照的 2 倍以上, 并呈剂量-回变反应关系者, 则定为阳性。

1.3　小鼠淋巴瘤细胞试验

1.3.1　清除系统中的自发回变　用含 3.0 μg/ml 胸腺嘧啶、5.0 μg/ml 次黄嘌呤、0.1 μg/ml 氨甲蝶呤及 7.5 μg/ml 甘氨酸 RPMI 1640 培养液处理 L5178Y 细胞 1 d, 转移至不含氨甲蝶呤的上述培养液中继续培养 2 d, 以去除自发回变。

1.3.2　受试物染毒处理细胞　取生长良好的细胞, 调整细胞密度为 5×10^5/ml, 受试物设 50, 100, 150 μg/ml 3 个剂量, 按 1% 加入受试物, 低速振荡培养 3 h。离心, 弃上清液, 用 RPMU 1640 培养液洗涤细胞 2 次, 重新悬浮细胞于含 10% 马血清的 RPMI 1640 培养液中, 并调整细胞密度为 2×10^5/ml。

1.3.3　第 0 d 的平板接种效率(PE_0)测定　取适量处理过的细胞悬液, 梯度稀释至 8 个/ml, 接种 96 孔板中, 每个剂量用 1 块平板, 置于 5% CO_2、37℃、饱和湿度下培养 12~14 d, 记数每块平板有集落生长的孔数。

1.3.4　实变基因表达　按步骤 1.3.2 所得细胞悬液表达培养 2 d, 每天记数细胞数并保持密度在 10^6/ml 下, 计算相对悬浮生长率。

1.3.5　第 2 d 平板接种效率(PE_2)测定　2 d 表达培养结束后, 取适量细胞悬液, 按 1.3.3 方法进行梯度稀释, 并接种 96

* 基金项目: 国家自然科学基金重点项目(40332023)
作者单位: 1. 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所环境毒理室, 北京 100021; 2. 中国环境科学研究院
作者简介: 宋瑞霞(1969-), 女, 山东人, 副研究员, 本科, 研究方向: 环境毒理学。

孔板中,每个剂量做 1 块平板,培养 12~ 14 d,记数每块平板有集落生长的孔数。

1.3.6 三氟胸苷(TFT)抗性突变频率(MF)测定 2 d 表达培养结束后,取适量细胞悬液,调整细胞密度为 1×10^4/ml,加入 TFT,终浓度为 3 μg/ml,接种 96 孔板,每孔 2 000 个细胞,每个剂量做 2 块平板,阴性对照接种 4 块平板,置于 5% CO_2、37 ℃、饱和湿度下培养 12~ 14 d,记数每块平板有集落生长的孔数。

1.3.7 计算平板接种效率和突变频率 平板接种效率(PE) = − ln(空孔数/总孔数)/每孔细胞数;平板 TFT 抗性突变频率= − ln(空孔数/总孔数)/每孔细胞数/ PE_2。

1.3.8 结果判定 受试物组的突变频率达到自发突变频率的 2 倍以上,并呈剂量− 反应效应,则可判定为阳性。仅在某剂量组出现突变频率显著高于阴性对照但无剂量− 反应关系,则为可疑阳性。

1.4 体外染色体畸变试验[7] 试验在加和不加代谢活化系统条件下进行。根据预试验结果,受试物组的终浓度设定为 40,80 和 160 μg/ml(− S_9),及 80,160 和 240 μg/ml,(+ S_9)。非代谢活化组阳性对照为丝裂霉素 C,剂量为 0.85 μg/ml。代谢活化组阳性对照为环磷酰胺,剂量为 10 μg/ml。常规对细胞染毒,收获细胞,低渗处理,制片、阅片。结果评价:下列 2 种情况下可判定受试物在本试验系统中具有致突变性:(1)受试物引起染色体结构畸变数的增加差异有统计学意义,并与剂量增加相关。(2)受试物在任何一个剂量下,差异有统计学意义,并有可重复性的阳性反应。

1.5 统计分析 采用 SPSS 10.0 软件进行 χ^2 检验。

2 结 果

2.1 五氯酚钠 Ames 实验结果(表 1) 由表 1 可见,五氯酚钠对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TA100、TA102 菌株无论直接作用和代谢活化后作用,均未呈现致突变性。

表 1 五氯酚钠对鼠伤寒沙门菌回变结果* ($\bar{x}\pm s$)

组别 (μg/皿)		TA97		TA98		TA100		TA102	
		− S_9	+ S_9	− S_9	+ S_9	− S_9	+ S_9	− S_9	+ S_9
五氯酚钠	500	125±23	148±14	38±12	36±1	139±3	137±6	330±20	272±23
	1000	120±8	135±13	41±2	36±3	128±11	123±3	317±9	261±13
	2000	160±8	143±6	34±5	35±4	123±13	146±7	305±8	265±15
	5000	158±19	127±6	36±4	29±3	145±8	128±7	307±30	305±22
自发回变		143±6	136±6	32±4	34±2	135±9	136±12	281±13	278±10
溶剂对照(丙酮)		139±25	146±21	37±3	36±3	126±10	129±10	308±14	318±18
阳性物对照									
叠氮钠	2.5					1 255±99			
2− 氨基芴	10.0		1 984±190		2 003±171		1 381±139		
9− 芴酮	0.2	1 937±156		4 431±993					
丝裂霉素 C	4.0							2 949±130	
1,8− 二羟蒽醌	50.0								1 025±24

注:* 表中数值均为 3 个平皿 $\bar{x}\pm s$。

2.2 五氯酚钠诱导 TK 基因突变的试验结果(表 2) 该实验系统溶剂对照的 PE0、PE2 和 MF 分别为 70.65%,77.01%,112.3×10^{-6},阳性对照的 MF 与溶剂对照差异有统计学意义($P<0.05$),表明本试验系统可靠。结果表明,在测试浓度下,随染毒浓度增大,L5178Y 细胞 tk 位点的突变频率有升高的趋势,其中 150 μg/ml 剂量组的突变率与对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 2 五氯酚钠诱发 TK 基因突变频率(MF)

组别(μg/ml)		PE_0	PE_2	MF($\times 10^{-6}$)
溶剂对照	0	70.65	77.01	112.3
五氯酚钠	50	74.82	64.87	93.8
	100	101.24	64.87	135.7
	150	44.64	63.06	250.4[a]
丝裂霉素 C	0.2	43.32	57.92	391.4[a]

注:与对照组比较,a $P<0.05$。

2.3 体外染色体畸变试验(表 3) 结果显示,无论是否加入代谢活化系统,五氯酚钠均有细胞毒性,引起染色体畸变率明显增加,与阴性对照组比较,差异有统计学意义($P<0.05$)。

表 3 五氯酚钠对 CHO 细胞染色体畸变试验结果

组别(μg/ml)		细胞数		畸变细胞数		畸变率(%)	
		+ S_9	− S_9	+ S_9	− S_9	+ S_9	− S_9
阴性对照		200	200	1	1	0.5	0.5
	40	−	200	−	5	−	2.5
	80	200	200	5	10	2.5	5.0[a]
	160	200	200	16	23	8.0[b]	11.5[b]
	240	200		41		20.5[b]	
丝裂霉素 C	0.8	100	100	29	43	29.0[b]	43.0[b]

注:与对照组比较,a $P<0.05$,b $P<0.01$。

3 讨 论

我国从 20 世纪 60 年代早期开始,曾在血吸虫病流行区域大量使用五氯酚钠,用于杀灭血吸虫的中间宿主一钉螺。随着科学的进步,五氯酚钠对环境的污染和对人体健康的危害日益受到了重视。目前对五氯酚钠的致突变型报道相对较少,尚无一致结论。对大鼠的研究发现,五氯酚钠被细胞色素

中国公共卫生 CPH

P450 酶代谢为亲电的活性产物后,会很快与邻近的蛋白或非蛋白巯基共价结合,但试验没观察到五氯酚钠及其代谢产物与 DNA 或血红蛋白结合的现象[8]。对小鼠有轻微的致突变效应,对人的淋巴细胞进行的五氯酚钠暴露培养发现了轻微的致突变性[9]。本研究发现,五氯酚钠对鼠伤寒沙门菌 TA97、TA98、TM100、TA102 试验菌株无论直接作用和代谢活化后作用,均未呈现致突变性;TK 基因突变试验结果显示,五氯酚钠染毒小鼠淋巴瘤细胞 L5178Y 后,高剂量组 TK 位点基因突变频率明显升高,与对照组比较差异有统计学意义。体外染色体畸变结果显示,无论是否加入代谢活化系统,五氯酚钠均有明显细胞毒性,并能引起染色体畸变率的明显增加,且随着受试物剂量的增加,染色体畸变率呈明显增加的趋势。出现上述结果的原因可能是因为 Ames 试验仅能检测小的基因突变,而小鼠淋巴瘤细胞试验是以小鼠淋巴瘤 L5178YTK+/- 细胞中胸苷激酶基因突变频率为指标的基因突变试验,不仅能检测小的基因突变、染色体小的缺失,还能检测大的染色体畸变,而以往研究亦证明五氯酚钠对染色体有损伤作用。本研究结果提示,五氯酚钠能诱发体外细胞染色体畸变,是非基因致突变或弱基因致突变物。

参考文献

〔1〕 冯亚平. 五氯酚对环境污染及居民健康影响的研究[J]. 四川环境, 1995, 14(1): 34-38.

〔2〕 郑星泉, 冯亚平, 江夕夫, 等. 血吸虫流行地区五氯酚的环境污染人体接触量及健康影响的研究[J]. 卫生研究, 1997, 26(1): 24-29.

〔3〕 Gerhard I, Frick A, Monga B, et al. Pentachlorophenol exposure in women with gynecological and endocrine dysfunction[J]. Environ Res, 1999, 80: 383-398.

〔4〕 Pavlica M, Klobucar GIV, Moja N, et al. Detection of DNA damage in haemocytes of zebra mussel using comet assay[J]. Mutat Res, 2001, 490: 209-214.

〔5〕 方征, 刘征涛, 李响, 等. 五氯酚钠与二恶英对人外周血淋巴细胞的影响[J]. 环境科学研究, 2006, 19(2): 20-22.

〔6〕 Maron DM, Ames BN. Revised methods for the Salmonella mutagenicity test[J]. Mutat Res, 1983, 113: 173-215.

〔7〕 中华人民共和国卫生部. 化妆品卫生规范[S]. 2002: 114-117.

〔8〕 Jeong Yo-chan, Yoon Byoung-Su, Lee Yong-soon, et al. Covalent interactions of reactive pentachlorophenol metabolites with cellular macromolecules[J]. Korean J Toxicol, 1997, 13(3): 257-263.

〔9〕 Draft Report, Atlanta G A. Toxicological profile for pentachlorophenol[R]. U.S. Agency for Toxic Substance and Disease Registry, 1992: 75-79.

收稿日期: 2007-06-23　(宋艳萍编校)

文章编号: 1001-0580(2008)03-0339-02　中图分类号: X 53　文献标志码: A

【论　著】

市郊公路边土壤中有机污染物分布特征*

刘晓艳, 李俊刚, 戴春雷, 冯进来, 闻婧

摘　要: 目的　研究交通排放对公路边公共土壤环境的影响,探讨其中有机污染物的分布特征及其防治对策。方法　利用热解分析方法对公路边土壤样品中的有机污染物含量进行检测分析。结果　公路边土壤中含有链烷烃、芳香烃、杂环及苯酚类等各种有机污染物。高速公路出入口处以及路况较差的路段,路边土壤中有机污染物含量高;细粒土壤中更易于富集有机污染物;有机污染物组分含量按以下顺序依次递减:链烷烃> 芳香烃> 杂环与酚类化合物;具有"三致"作用的多环芳烃较单环芳烃更易于被公路边土壤所富集。结论　公路边土壤中具有高环境毒性与生物毒性的有机污染物,特别是多环芳烃的危害性不容忽视,应加强预防和治理。

关键词: 市郊; 公路边; 土壤; 有机污染物

Distribution characteristics of organic pollutants in roadside soil at suburb

LIU Xiao-yan, LI Jun-gang, DAI Chun-lei, et al. Departimen of Geochemistry, Earth Science College, Daqing Petrolem Institute (Daqing 163318, China)

Abstract: **Objective**　To study the effects of vehicle emission on roadside soil at suburb, and to explore the distribution characteristics and precautionary measure of organic pollutants in roadside soils. **Methods**　Amount and composition characteristics of organic pollutants in the soil samples at roadside were detected and analyzed by pyrolysis method with Geofina Hydrocarbon Meter (GHM) made in Norway. **Results**　There were various organic pollutants, such as paraffins, aromatics, heterocyclic compounds and phenols, in the roadside soils. Organic pollutants were easily enriched in the roadside soils at the entrance and poor section of highway. The amount of organic pollutants was more in the tiny particle soil than coarse one. The content of the organic contaminants descends in turns: paraffins> aromatic hydrocarbons> heterocyclic compounds and phenols. The polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) were easier enriched than monocyclic aromatic hydrocarbons in the roadside soils. **Conclusion**　The containination and toxicity of organic pollutants in the roadside soils, especially PAHs, to the nature environment and human health can't be neglected. Comprehensive management of environmental pollution should be strengthened.

Key words: suburb; roadside soil; organic pollutant

* 基金项目: 黑龙江省自然科学基金(B0210); 黑龙江省科技计划项目(GZ05A601); 黑龙江省教育厅科技基金(10541005)

作者单位: 大庆石油学院地球科学学院地球化学系, 黑龙江大庆 163318

作者简介: 刘晓艳(1962-), 女, 山东商河人, 教授, 博士生导师, 博士, 主要从事环境科学研究工作。

中国公共卫生 CPH