

应用蚕豆根尖及叶尖细胞微核技术检测 TNT 及车间空气的诱变性

戴敏 吴琼 周心一¹ 李斌 韩晓峰²

兵器工业卫生研究所 西安 710061 ¹西北工业大学 ²华山机械分厂

摘要 应用蚕豆根尖及叶尖细胞微核试验检测 TNT 的致突变效应及作业车间空气的诱变性。用不同剂量的 TNT 处理蚕豆根尖 3.5h 后,其细胞微核率与阴性对照组比较差别有高度显著性($P < 0.01$),并有剂量—效应关系。将蚕豆幼苗置 TNT 作业车间空气中暴露 6h 后,各测试点叶尖细胞微核率均高于清洁区对照组,经统计学处理差别有高度显著性($P < 0.01$),且叶尖细胞微核率随空气中 TNT 浓度的增高而增加。研究结果表明:TNT 明显诱导蚕豆根尖及叶尖细胞微核率的增加,显示其具有生物诱变作用。该检测方法灵敏、实验周期短、结果可靠、取材方便而经济,适用于对工业遗传毒物诱变性的快速检测及车间空气诱变性的监测。

关键词 蚕豆;微核试验;TNT;致突变性

DETECTING THE MUTAGENICITY OF TNT AND THE POLLUTED AIR IN TNT WORKSHOPS WITH MICRONUCLEUS ASSAY IN *VICIA FABA* ROOT AND LEAF TIPS

Dai Min, Wu Qiong, Zhou Xinyi¹, Li Bin, Han Xiaofeng²

Hygienic Institute of Ordnance Industry, Xi'an, 710061, ¹Northwestern Polytechnic Univ. ²Huashan Machinery Factory

Abstract The mutagenicity of TNT and the contaminated air in TNT workshops has been detected with the micronucleus (MN) test in *Vicia faba* root and leaf tip cells. After *Vicia faba* root tips were treated with different doses of TNT for 3.5h, the frequencies of MN were significantly raised from that of the negative control ($P < 0.01$), and the dose—effect relationship was clear. When *Vicia faba* seedlings were exposed to air in TNT workshops for 6h, the MN frequency in leaf tips of each monitoring group was higher than that of the clean control. Statistically, the differences were significant ($P < 0.01$), and the MN frequency was exposure dependent. It indicates that TNT is mutagenic.

Key words *Vicia faba*, micronucleus test, TNT, mutagenicity

蚕豆根尖微核技术用于水环境污染的监测等研究已有不少报道^(1,2),近年来逐渐应用于环境诱变剂的检测及致突变研究,该植物检测方法被认为是用作致突变性分析的一种

很好的测试系统。我们应用蚕豆根尖细胞微核试验对 TNT 的致突变性进行检测。同时还应用蚕豆叶尖细胞微核试验对 TNT 作业车间空气诱变性进行监测,以了解 TNT 对

生物染色体损伤的效应以及这两种植物检测方法在遗传毒物检测和车间环境空气诱变性监测中的适用性。

材料和方法

1. 豆种

采用华中师范大学国家定点培养实验用标准豆——松滋青皮豆。该豆是专门隔离栽培、无污染土地收获的纯品系、敏感豆种。本实验室该豆种的本底微核率 $<5\%$ 。

2. 受试物及主要试剂

TNT, 纯度 $>99.0\%$, 某兵工厂提供; 环磷酰胺, 上海第 12 制药厂生产, 批号: 920406; 二甲基亚砜, AR, 西₃ 化学试剂厂; 卡诺氏 (Carnoy) 固定液、席夫氏 (Schiff) 试剂、 SO_2 洗涤液、5N HCl 等试剂均按我国环境监测技术规范配制。其余试剂均为国产分析纯。

3. 实验方法与步骤

3.1 蚕豆根尖及幼苗的培育 选择当年成熟饱满、大小均匀的豆种, 用蒸馏水浸泡 24~36h, 种子吸涨破胸后移至铺有湿棉花的带盖铝盒内置 25℃ 恒温培养箱中催芽, 此间每 4~6h 换等温水一次。当初生根长至 1.5~2cm 时, 选择生长一致、根毛发育良好的蚕豆进行根尖染毒处理; 进行叶尖微核实验时, 需将初生根 2cm 左右的豆种埋入经过冲洗及消毒的湿砂中进行培育, 大约 3~4d 后, 蚕豆幼苗长出 2~3 片真叶时即可用于现场空气中暴露染毒。

3.2 染毒方法及剂量 根尖染毒时, 先将 TNT 研成细末, 用少量二甲基亚砜溶解后, 再用蒸馏水稀释为 0.5, 5, 50, 100, 250, 500mg/L 6 个浓度组, 各组选 6~8 颗发育良好的豆种置平皿内浸泡根尖染毒 3.5h, 终止染毒后, 用蒸馏水反复冲洗并浸洗 2 次, 然后置蒸馏水中修复 24h, 同时设溶剂 (DMSO) 对照组, 蒸馏水处理为阴性对照组, 阳性对照组为环磷酰胺 1.0mg/L; 叶尖细胞微核试验

时选择生长一致、长出 2~3 片真叶的蚕豆幼苗放置 TNT 作业车间各测试点空气中暴露 6h, 现场监测点按作业场所有害因素选点原则, 选择某厂 TNT 压药工房内 4 个测点, 同时对车间空气中 TNT 浓度进行测定, 方法按劳动卫生调查手册进行。幼苗终止染毒后用蒸馏水仔细冲洗后置蒸馏水中在清洁区修复 22h。路途对照组除不接触 TNT 作业车间空气外, 其它处理均与各测试组相同。

3.3 固定、染色、制片及镜检 截取修复后的蚕豆根尖和幼苗用卡诺氏固定液固定 24h, 取出根尖经 5N HCl 水解 25min (28℃), 蒸馏水浸洗后用席夫氏试剂避光染色过液, 除去染色液后用现配制的 SO_2 洗涤液浸洗幼根 2 次, 蒸馏水冲洗后常规压片镜检, 取固定后的幼苗剪取叶片经盐酸酒精 (各 1:1 混匀) 水解 2~5min, 蒸馏水浸洗后, 截取叶尖 1.0mm 捣碎于载玻片上, 滴 1 滴改良苯酚品红染液染色 3~5min 后, 常规压片镜检。微核识别及细胞计数: 选择染色适宜、细胞完整且分散均匀的部位, 在高倍镜下计数分生组织区域有分裂相部位的根尖或叶尖细胞。微核游离于细胞浆内、大小为主核的 1/3 或以下、染色与主核一致或稍浅、呈圆形、椭圆形或不规则形。在一个细胞中出现一个或一个以上微核时均按一个微核细胞计算。根尖微核试验每一剂量组观察 6 条根尖, 每条根尖计数 1000 个细胞; 叶尖微核试验每测试点观察 5 株幼苗, 每株幼苗取 2 片叶尖制片, 每片叶尖计数 1000 个细胞, 分别统计其微核细胞数计算微核千分率。按泊松分布进行差异显著性检验。

结果和讨论

本试验根尖细胞微核率阴性对照组与阳性对照组比较差别有高度显著性 ($P < 0.01$), 说明本试验体系可靠。溶剂对照组与阴性对照组比较差别无显著性 ($P > 0.05$), 说明该溶剂 (二甲基亚砜) 无明显诱导根尖细胞

微核率增加的作用。而 TNT 各剂量组根尖细胞微核率明显增加并高于阴性对照组,经统计学显著性检验差别有高度显著性($P < 0.01$),并在一定剂量范围内随着 TNT 剂量的增高微核率逐渐增加,有明显的剂量—效应关系(见表 1,图 1)。但当 TNT 剂量高达 100mg/L 时微核率开始逐渐下降,认为是由于过高浓度时,根尖细胞的有丝分裂受到抑制,受试物不能有效地作用于细胞染色体所致。

Table 1. MN in *Vicia faba* Root Tips Induced by TNT

Treatment	Dose (mg/L)	Mean MN freq. (%) ($\bar{x} \pm s$)
TNT	0.0*	2.83 ± 1.47 ^A
	0.5	7.67 ± 2.80*
	5.0	14.00 ± 3.29*
	50.0	19.50 ± 4.42*
	100.0	15.33 ± 3.72*
	200.0	14.83 ± 2.93*
	500.0	11.83 ± 1.94*
Distilled water		2.80 ± 0.84
Cyclophosphamide	1.0	18.50 ± 4.51*

* Solvent control. $\Delta P > 0.05$, * $P < 0.01$, compared with negative control.

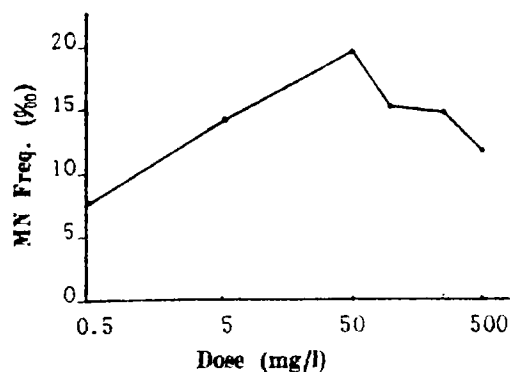


Fig. 1. Relationship of MN frequency in root tip and TNT.

叶尖细胞微核试验各测点微核率与路途对照组清洁区阴性对照组比较,均有明显升高,经显著性检验差别有高度显著性($P < 0.$

01),并且随着空气中 TNT 浓度的增高叶尖细胞微核率也相应地增加(见表 2,图 2),说明蚕豆幼苗在 TNT 作业环境空气中暴露染毒后,可引起叶尖细胞微核率的增加。以上结果表明:TNT 能引起蚕豆根尖及叶尖细胞微核率的增加,具有一定的生物诱变效应。

Table 2. MN Frequency in *Vicia faba* Leaf Tips at Every Monitoring Site at TNT Workshpos

Monitoring spot	Concentration (mg/L)	Mean MN freq. (%) ($\bar{x} \pm s$)
Compacting A	3.73	9.70 ± 2.63 *
Loading	1.07	8.00 ± 2.71*
Compacting B	0.51	7.10 ± 1.73*
Centre	0.22	5.00 ± 1.05*
Roasting	0.12	3.90 ± 1.74*
Way control	--	2.50 ± 0.81**
Clean area	--	2.40 ± 0.92

* $P < 0.01$, ** $P > 0.05$, compared with clean area.

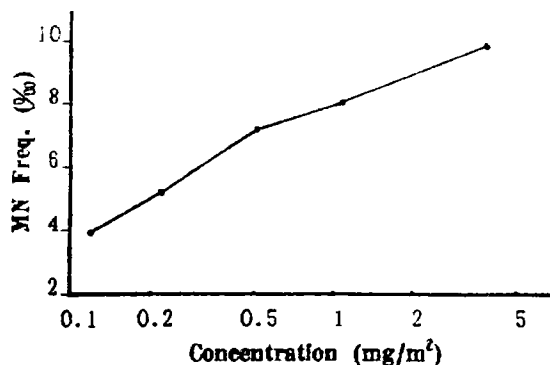


Fig. 2. Relationship of MN frequency in leaf tip and the concentration of TNT in air.

蚕豆细胞染色体大而数量少,细胞分生组织增殖周期较短,而且大部分时间是对诱变剂的敏感时期,诱变剂进入植物体后通过切断 DNA 分子或干扰 DNA 合成与修复造成间期染色体损伤、或引起纺锤丝断裂或其它畸变从而导致微核形成。蚕豆幼苗直接放置于 TNT 作业车间空气暴露进行染毒,各种形式的污染物均可通过植物的呼吸器官进

入体内,通过综合代谢作用引起体内细胞遗传学的微核效应。该植物监测方法是以生物体对环境多种因素的整体效应为指标,反映的是被监测环境中多种因素对机体作用的综合结果。也就是说它更能反映环境对人体健康影响的实际情况,是一种较为实际的新的监测手段。

TNT 是我国目前危害性较大的工业毒物之一,在生产和使用过程中,对作业工人身体健康危害极大。已有许多研究证明 TNT 在 Ames 试验,大、小鼠骨髓细胞微核试验及染色体畸变实验中,均显示明显的致突变作用^(3,4,5),而且还导致接触工人外周血淋巴细胞微核率及染色体畸变率增加^(6,7)。本室的 Ames 试验及 615 系小鼠骨髓细胞微核试验结果⁽⁸⁾与蚕豆根尖及叶尖微核试验检测结果一致均为阳性结果,说明 TNT 是一种遗传毒物,具有致突变作用;同时证明植物检测系统与动物及细菌实验一样能够反应出 TNT 的致突变效应,进一步证实蚕豆根尖及叶尖微核实验可以确切地反映出诱变剂对生物体内遗传物质的损伤效应。一般说来,植物比动物对环境中的诱变剂更为敏感,植物检测系

统尤其适合于现场监测,因为它反映整体的生物效应和更接近于实际情况,同时又具有结果可靠、方法灵敏、短期快速、技术简易、经济可行等优点,适用于对工业毒物和生产环境空气中诱变剂的快速监测。

参考文献

1. 陈光荣,等。利用蚕豆根尖的微核技术监测青山湖污染的研究。中国环境科学,1985;5(4):2。
2. Gustaviun FB and Rizzoni M. A mutagenicity analysis of water and sludge of the Tiber river, using the micronucleus test in *Vicia faba* root tip. *Mutat Res*, 1991; 252 (2):215。
3. 周炳亮,等。TNT 远期效应的初步研究。职业医学,1984;11(6):2。
4. 李高低,等。TNT 致突变作用实验研究。山西医学院学报,1985;4:29。
5. 杨荫森,等。三硝基甲苯对孕鼠和胎鼠体细胞的致突变效应。卫生毒理学杂志,1993;7(1):51。
6. 张儒林,等。三硝基甲苯诱发人体外周血淋巴细胞染色体畸变的初步观察。工业卫生与职业病,1984;10(3):160。
7. 张享山,等。TNT 作业工人外周血淋巴细胞微核分析。卫生毒理学杂志,1990;4(2):117。
8. 本室研究报告。TNT 及其代谢产物的毒理学研究。(待发表)。

发育异常机理研究的新前沿

摘要 本文综述了发育异常领域的一些重要问题,可能有利于理解基本发育过程,以及毒物对该过程干扰的机理。大约 70% 的人体发育异常是病因不明的,人们历来以为这些缺陷是由于在器官形成期接触化学或物理因素所致。现在已有令人信服的证据表明,在器官形成前的发育阶段接触某些因子也可直接损害所接触的早期孕体,从而导致胚胎异常。于是,着床前或着床后接触毒物可引起正常发育过程中协调连锁事件的基因控制的“越轨”(derailment)。如发育异常可因发育基因的协调表达紊乱所致,其中包括染色体印迹(genomic imprinting)、细胞系特化、细胞混合和识别、细胞间相互作用、细胞迁移、分化及分裂等,取决于接触的时间。由于我们缺乏化学物引起发育异常的分子和细胞学基础,目前只能利用一系列假设来评价和解释发育毒理学研究所得的资料。因此,研究正常和异常发育机理以及人和实验动物之间药代动力学—药效学的关系,是建立