DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.05.021
第25卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 5
2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

文章编号:1000-5404(2003)05-0423-04

论著

C市枯水期饮用水中有机污染物分析及对肝细胞DNA损伤的研究

邱志群,舒为群,田怀军 (第三军医大学预防医学系环境卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解城市饮用水环境中有机污染物状况及其对肝细胞的遗传毒性。方法 用气/质联用仪毛细管色谱柱分离分析技术(GC/MS)定性分析C市以嘉陵江和长江为水源的A、B、C、D、E 5个水厂枯水期的水源水与出厂水中有机提取物并用单细胞凝胶电泳实验检测了其对原代大鼠肝细胞DNA的损伤,观察比较DNA迁移长度与拖尾细胞百分率。结果 定性分析共检出有机物98种,其中水源水为60种,出厂水为58种,污染物主要包括:酯类、酮类、酚类、杂环和苯及其衍生物等。水源水样品中以长江为水源的C、D、E厂在250 ml时肝细胞DNA迁移长度和细胞拖尾百分率与对照相差显著($P<0.01$),以嘉陵江为水源的A、B厂在50 ml即可相差显著($P<0.01$)。而全部出厂水样品诱导的DNA损伤在50 ml均与对照相差显著($P<0.01$)。结论 C市主城区各水厂水源水与出厂水均已受到有机物的污染,嘉陵江的污染重于长江。且各水样的有机提取物在一定范围内均可诱导原代大鼠肝细胞DNA损伤,出厂水引起的DNA迁移长度大于水源水,提示氯化消毒可以使有机提取物的DNA损伤作用增强。

关键词:有机提取物;饮用水;单细胞凝胶电泳;原代大鼠肝细胞;DNA损伤
中图法分类号:R123.1;R575 文献标识码:A

An analysis of the organic extracts from source water and drinking water in city C and the effects on DNA damage in primary hepatocytes in rats

QIU Zhi-qun, SHU Wei-qun, TIAN Huai-jun (Department of Environmental Health, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of the polluted organic substances in urban water environment and genetoxicity of the organic pollutants in drinking water on DNA damage in primary cultured hepatocytes in rats. **Methods** Qualitative analysis of the organic extracts from source water and drinking water in five waterworks in city C with GC/MS was conducted and the effects of organic extracts on DNA damage in primary cultured hepatocytes in rats were tested with single cell gel electrophoresis assay. Comet length means and percentage of tail cell were observed. **Results** A total of 98 organic pollutants were detected in all samples including 60 in source water and 58 in drinking water. The pollutants were mainly esters, ketons, phenols, benzenes and the derivatives. Comet length means was found to be significantly higher ($P<0.01$) in source water from C, D, E waterworks at 250 ml/tube and A, B waterworks at 50 ml/tube compared to control sample. DNA damage induced by organic extracts from all drinking water samples was found at 50 ml/tube ($P<0.01$). **Conclusion** Source water and drinking water in city C are polluted by organic substances. Jialing river is polluted more seriously than Yangtze river. DNA damage induced by organic extracts from drinking water and source water in city C can be found and comet length means from drinking water is longer than that from source water, suggesting that chlorinated disinfection can enhance DNA damage induced by organic extracts.

Key words: organic extract; drinking water; single cell gel electrophoresis; primary rat hepatocyte; DNA damage

饮用水的有机物污染已经成为严重的环境问题,国内外学者对此做了大量的研究[1,2]。C市是我国一个特大城市,产业重型化问题突出,能源消费的结构化矛盾尖锐,环境污染比较严重。全市每年排放的废水达13.5亿吨,大部分未经处理而直接排放到江中,致使河流污染[3]。长江和嘉陵江作为C市主城区的饮用水水源,其有机污染物的定性分析尚未见报道。单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)是一种

基金项目:国家自然科学基金资助重点项目(59838300);国家教育部"98"春晖计划资助项目(1999-36);重庆市科技攻关资助项目(5772)
作者简介:邱志群(1971-),女,四川省自贡市人,硕士,实验师,主要从事饮水与健康方面的研究,发表论文6篇。电话:(023)68752293
通信作者:舒为群,电话:(023)68752294, E-mail:wqshu@mail.tmmu.com.cn
收稿日期:2002-06-06;修回日期:2002-09-12

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

快速、灵敏的在单细胞水平上检测 DNA 损伤的实验技术，目前已广泛应用于毒理学研究。本研究采用 GC/MS 检测 C 市 5 个水厂的水源水与出厂水中有机提取物种类并用SCGE 实验检测了对原代大鼠肝细胞 DNA 的损伤，为了解城市水环境有机物污染状况及其对人群健康的影响提供参考。

1 材料与方法

1.1 水样的采集与处理

水样于 2001 年 1 月(枯水期)在 5 个水厂同时采集(包括进厂水与出厂水)，各水厂位置如图 1 所示。采用固相萃取法，以 GDX-102 树脂(天津试剂二厂)作吸附树脂，树脂用前经重蒸甲醇、丙酮、二氯甲烷分别提取 8 h。过柱速度为 3 倍床体积/min，各厂水源水和出厂水均采集 500 L。依次用 3 倍体积的二氯甲烷和甲醇洗柱(流速 0.1 倍床体积/min)。洗脱液经氮气 35 ℃吹干。DMSO 定容至 100 L/ml 后用于实验。另取树脂，用洗脱液洗脱、氮气 35 ℃吹干 1 ml 浓集物相当于 100 L 原水样中有机物含量、DMSO 溶解，作为溶剂对照。

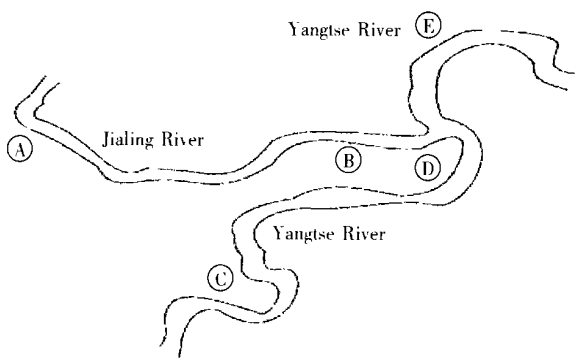


图 1 C 市主城区 5 个水厂分布示意图

Fig 1 The distribution of five waterworks in city C

1.2 分析

美国惠普 GC6890/MS5973 联用仪，色谱条件：进样口温度 250 ℃，不分流，压力 52.4 kPa，总流速 50.1 ml/min，隔垫吹扫 46.5 ml/min 2 min，节约气型 20 ml/min，进样体积 1 μl。柱温恒流型 50 ℃(1 min) $\xrightarrow{5\ ℃/min}$ 220 ℃(22 min)共运行 57 min，载气流速 1.0 ml/min。质谱：E1 源，70 eV；离子源温度 230 ℃，四极杆 150 ℃，自动调谐；溶剂延迟时间 3 min。载气：He (99.999%)，流速 1.0 ml/min。全扫描方式(SCAN)，扫描范围 20～550 amu，wiley 库检索。

1.3 原代大鼠肝细胞的制备

参照王宇明等[4]的方法并做改进。选用雄性 Wistar 大鼠，(每次为 1 只，实验重复 3 次)，体重(75±25) g，1%戊巴比妥钠腹腔麻醉，无菌开腹腔，肝素抗凝后取肝，用 37 ℃灌流液灌流，含 0.05% Ⅳ胶原酶的消化液消化分离肝细胞，4 层纱布滤去碎组织，500 r/min 离心 5 min，用 D-Hanks 如此离心洗涤 3 次后将细胞悬浮于 D-Hanks 液中至所需细胞浓度。所得细胞用 0.4%台盼蓝染色，存活率＞90%方可用于实验。

1.4 实验分组

取 10 ml 刻度离心管加入 4 ml D-Hanks 液，每管中分别加入 10 μl 不同浓度的水样有机提取物，使终浓度相当于每管 50 ml，250 ml，500 ml 原水样，各剂量设两个平行样，同时设试剂对照(10 μl DMSO)。将 1× 10^6 个/ml 肝细胞悬液 1 ml 分装至各管，混匀后置 37 ℃水浴染毒 1.5 h，染毒完毕，离心去上清液，再用 D-Hanks 液洗涤 2 次，最后将细胞制成一定浓度的悬液备 SCGE 实验用。

1.5 单细胞凝胶电泳实验

参照 Singh 等[5]的方法略加改进。取 0.8% 正常熔点琼脂糖(60 ℃) 110 μl 加于磨毛的载玻片上，用盖玻片压平胶面，4 ℃放置 5 min，然后将盖玻片轻轻移开制成底层胶。取 100 μl 细胞悬液与 300 μl 1%低熔点琼脂糖(37 ℃)混匀后吸取 75 μl 迅速铺于底层胶上，用盖玻片压平，4 ℃放置 5 min，轻轻移开盖玻片。将制成的玻片放入塑料盒中，倒入新鲜配制的裂解液(2.5 mol/L NaCl，100 mmol/L Na_2EDTA，10 mmol/L Tris，1% TritonX-100，10% DMSO，pH 10)，4 ℃裂解 2 h，取出玻片，水平放入电泳槽中，倒入预冷的电泳缓冲液，避光放置 20 min，在 25 V，185 mA 条件下电泳 30 min。将玻片取出用 0.4 mol/L tris(pH 7.5)中和 3 次。再用 5 μg/ml EB 暗处染色 10 min，在荧光显微镜下阅片，每张片随机测量 30 个拖尾细胞的尾长并计数 100 个细胞中的拖尾细胞数。

1.6 统计学处理

实验数据采用 χ^2 检验和 t 检验。

2 结果

2.1 有机污染物种类的鉴定

水源水与出厂水共检出有机物 98 种，其中水源水为 60 种，出厂水为 58 种，各厂有机物数量见图 2。污染物主要包括：酯类、酮类、酚类、杂环和苯及其衍生物等。有 7 种物质属于美国 EPA 和/或中国水环境优先控制污染物，他们是：1，1，1，2-四氯乙烷、2，4-二甲基酚、萘、蒽、萤蒽、邻苯二甲酸二乙酯和邻苯二甲酸二丁酯。不同样品其有机污染物组分差异较大。邻苯二甲酸二(2-甲基丙基)酯、邻苯二甲酸二丁酯在 10 个水样中检出率最高。1-氯-4-硝基-苯，1，1，3，3，3-五氯丙烷的检出率也较高。此外，在嘉陵江水域还检测出多种硫代磷酸酯。

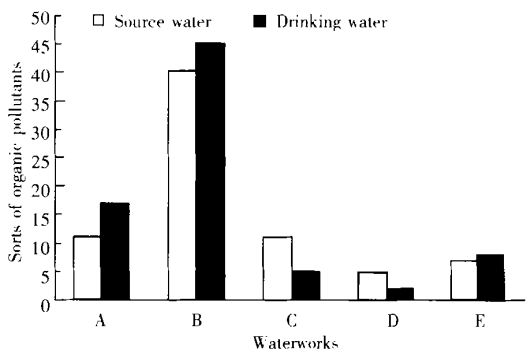


图 2 各水厂有机污染物种类的比较

Fig 2 Comparison of sorts of organic pollutants in five waterworks

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.2　对肝细胞 DNA 的损伤

表 1 显示, 所有水样的有机提取物均能在一定的浓度范围内引起大鼠肝细胞 DNA 损伤, 5 个水源水样品中 3 个样品诱导 DNA 损伤的最低浓度为 250 ml/管, 另 2 个在 50 ml/管即可检出, 而出厂水诱导 DNA 损伤在 50 ml/管浓度时均可检出。除 A 厂外其余 4 个水厂的出厂水中有机提取物引起的 DNA 迁移长度均高于水源水, 总的说来出厂水对 DNA 的损伤作用强于水源水。

表 1　C 市水源水及出厂水中有机提取物诱导的原代大鼠肝细胞 DNA 损伤($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　The effects of organic extracts from source water and drinking water in city C on DNA damage in primary rat hepatocyte ($\bar{x}\pm s$)

Sample		Concentration (ml/tube)	Comet length	Percentage of tail cell(%)
DMSO control		0	17.04±3.18	21
A waterworks	Source water	50	31.00±3.01 *	43 #
		250	53.88±8.32 *	82 #
		500	63.36±5.10 *	98 #
	Drinking water	50	21.96±2.44	26
		250	35.56±5.65 *	70 #
		500	46.60±5.68 *	89 #
B waterworks	Source water	50	25.92±6.31 *	33 #
		250	39.8 ±3.77 *	78 #
		500	57.72±5.29 *	90 #
	Drinking water	50	35.92±8.96 *	42 #
		250	57.28±8.25 *	61 #
		500	84.60±12.58 *	98 #
C waterworks	Source water	50	18.44±6.17	24
		250	19.44±3.38	28
		500	37.48±5.32 *	72 #
	Drinking water	50	23.48±1.73 *	52 #
		250	35.92±4.75 *	72 #
		500	43.36±6.58 *	89 #
D waterworks	Source water	50	18.16±6.13	24
		250	44.48±8.28 *	75 #
		500	57.16±5.08 *	97 #
	Drinking water	50	29.04±2.13 *	42 #
		250	57.96±6.03 *	88 #
		500	73.40±6.55 *	97 #
E waterworks	Source water	50	22.88±4.70	25
		250	38.20±7.60 *	78 #
		500	42.28±5.67 *	78 #
	Drinking water	50	36.84±4.66 *	35 #
		250	42.00±5.04 *	40 #
		500	72.44±7.18 *	88 #

*: $P<0.01$ *vs* DMSO control, *t* test;
#: $P<0.01$ *vs* DMSO control, χ^2 test

3　讨论

水环境中有机污染物种类繁多、含量低微, 在分析方法上要求高分离度和灵敏。气/质联用仪毛细管色谱柱分离分析技术(Gas chromatography/mass spectrometry, GC/MS)则是目前能满足这种要求的先进分析技术。其优点为对多组分分离效果好, 灵敏度高, 不必使用标准品对照, 通过计算机检索谱库直接给出定性结果。我们应用 GC/MS 对 C 市水源水与出厂水进行检测的结果显示 C 市主城区饮用水已经受到有机物的污染。出厂水与水源水的有机物种类数相差不大表明现有的水处理工艺对有机物的去除效果不明显。位于嘉陵江边的 A、B 厂检出的有机物明显多于位于长江边的 C、D、E 厂, B 厂位于嘉陵江最下游, 流入嘉陵江的生活污水、工业废水和农业废水最终途经该水域流入长江, 枯水期流量小, 水体自净能力较差, 加之该水厂靠近两江汇合处, 水文较复杂, 使得此处有机污染物的转归复杂化, 导致 B 厂污染严重。长江水流量大, 流速快, 自净能力强, 其水源污染程度较嘉陵江轻。

邻苯二甲酸酯是目前世界上生产量大, 应用面广的人工合成有机化合物之一, 该类化合物已成为一种全球性的环境有机污染物, 在大气、水环境、土壤中广泛存在。本次检出结果与已有的报道是一致的[6,7]。我们的分析显示, 出厂水中有机污染物种类增加的有: 酮类、酸类、烷烃和烯烃, 尤其是酮类增加最多(水源水中酮类物质为 11 种, 而出厂水中则出现了 20 种之多); 出厂水中有机污染物种类减少的有: 酯类、杂环类、苯及衍生物; 种类未发生变化的有: 邻苯二甲酸酯、多环芳烃。值得注意的是优先控制污染物除邻苯二甲酸二丁酯在水源水中检出外, 其余 3 种(邻苯二甲酸二乙酯、萘、蒽)在水源水中均未检出, 其来源有待探讨。

流行病学调查显示饮水污染与肿瘤(如: 肝癌)的发生具有特异性联系。水中有机提取物对细胞的遗传毒性一直是研究热点[8]。但以往多采用培养的细胞株作为研究介质(如 BALB/c 3T3、V79 细胞)[9,10]。新鲜分离的原代大鼠肝细胞保留了肝脏的绝大部分功能, 并含有广谱的混合功能氧化酶, 是理想的遗传毒性的靶细胞。本研究结果表明 B、C、D、E 水厂水源水和出厂水在一定的剂量范围内均可诱导原代大鼠肝细胞 DNA 损伤, 出厂水引起损伤的剂量低于水源水, 且在相同剂量下出厂水所致的 DNA 迁移长度大于水源水, 说明出厂水的 DNA 损伤作用大于水源水。可能由于氯化消毒过程使水中形成大量的有机卤化物, 从而使致突变性大大提高。这与以往的研究结果相一致[11]。A 厂水源水所致的 DNA 迁移长度大于出厂水可能是由于水源水致 DNA 损伤物质的本底值较高时混凝沉淀对它的去除作用更为明显, 因为 A 厂的水源水所致的 DNA 迁移长度在 5 个水厂中最高。C 厂进出厂水的 DNA 损伤作用最小可能是由于该水厂取水点位于上游, 受城区的污染较小所致。

研究结果表明 C 市的水源水与出厂水具有潜在的致突变活性。SCGE 实验是一种快速灵敏的检测

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

DNA完整性改变的实验，本研究用它来检测水中有机提取物所引起的DNA链断裂。Ames实验是用于检测DNA碱基序列改变。二者反映的是不同的遗传学终点。本室Ames实验结果显示大部分水样在一定范围内可呈现阳性致突变性，提示C市的有机提取物不仅能引起DNA链断裂，还可引起DNA碱基序列改变。这种含有多种遗传毒物的有机物混合体对人群健康的危害不容忽视。

C市是传统的工业大市，顺长江与嘉陵江的交汇处而建，主城区拥有六百万人口，长江及嘉陵江为其主要饮用水源，工业生产带来的水环境污染问题较为严重。有研究表明乙肝感染、饮水类型以及肝胆器官疾病史是该市原发性肝癌相关程度最大的危险因素，其相对危险度分别为15.579，8.774，4.557[12]。结合本次实验结果提示饮用水污染是C市的肝脏肿瘤高发的一个重要因素，水环境的治理与保护应引起高度重视。

参考文献：

[1] Gagne F, Blaise C, Bermingham N. Lethal and sublethal effects of marine sediment extract on rainbow trout hepatocytes[J]. Toxicology Letters, 1996, 87(2－3): 85－93.

[2] Dong Y. Polychlorinated organic compounds (PCOCs) in the Yangtse River water samples using SPE and GC/ECD[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2000, 64(3): 383－389.

[3] 李蜀庆. 重庆环境保护产业发展战略研究[J]. 重庆环境科学, 2000, 22(1): 28－30.

[4] 王宇明，陈国政，董家鸿，等. 分离肝细胞的一种体外灌流法[J]. 中华消化杂志，1994，14(3)：175－175.

[5] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al*. A simple technique for quantification of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1): 184－191.

[6] 叶常明. 环境中的邻苯二甲酸酯[J]. 环境科学进展，1993，1(2)：36－46.

[7] 吴平谷，韩关根，王惠华，等. 饮用水中邻苯二甲酸酯的调查[J]. 环境与健康杂志，1999，16(6)：338－339.

[8] Boorman G A. Drinking water disinfection byproducts: review and approach to toxicity evaluation[J]. Environ Health Perspect, 1999, 107(Suppl): 207－231.

[9] 吴　静，蒋明辉，陈　约，等. 水中有机提取物和蓝藻对BALB/C3T3细胞的毒性作用[J]. 中国公共卫生，2001，17(1)：1019－1021.

[10] 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，1999，16(1)：10－12.

[11] 江城梅，庄　颖，赵　红，等. 淮河水中非挥发性有机物的遗传毒性研究[J]. 癌变.畸变.突变，2000，12(3)：154－156.

[12] 孙安龙. 重庆市原发性肝癌的危险因素[J]. 中国肿瘤，2000，9(3)：123－124.

（编辑　郭建秀）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2003)05-0426-02

谷氨酸毒性对培养PC12细胞钙内流与游离钙的影响

Effects of glutmate intoxication on calcium influx and free calcium in PC12 cells

吴　南，冯　华，王宪荣　（第三军医大学附属西南医院神经外科，重庆 400038）

Ca^{2+}作为细胞内一种重要的第二信使，参与神经细胞的一系列活动，对神经细胞的代谢和功能产生广泛的影响，细胞内钙超载被称为细胞损伤的“最后共同通路”。谷氨酸是中枢神经系统内含量最多的兴奋性氨基酸，有神经兴奋毒性，它作用于NMDA受体，引起钙内流，在神经细胞的继发性损害中谷氨酸释放占重要地位[1,2]。PC12细胞是一种从鼠嗜铬细胞瘤分离的克隆细胞，因其在神经生长因子（Nerve growth factor, NGF）存在下，细胞形态、结构和功能皆类似于交感神经细胞，因而成为近年来神经科学工作者研究神经细胞递质合成、储存和释放、离子通道规律及受体的细胞模型[3]。本实验利用液闪计数法测定^{45}Ca内流，用激光共聚焦显微镜通过钙荧光探针Fluo-3测定游离钙变化，旨在探索谷毒酸毒性致神经细胞继发性损伤时钙离子的变化特点。

作者简介：吴　南（1971－），男，河南省新乡市人，硕士，主治医师，讲师，主要从事脑血管微创方面的研究。电话：(023)68754000-73071

收稿日期：2001-10-21；修回日期：2002-05-06

1　材料方法

1.1　细胞培养及处理

1.1.1　PC12细胞株（小鼠嗜铬细胞瘤，上海细胞生物研究所提供）。

1.1.2　细胞培养　　培养液为RPMI-1640，内含10%小牛血清、100 U/ml青、链毒素、2.5 S NGF（终浓度75 ng/ml），PC12细胞在37 ℃，5%CO_2混合气体的孵箱（温度95%）中培养。

1.1.3　分组　　对照组、谷氨酸毒性组。

1.1.4　时相点　　取谷氨酸毒性损伤后1、4、24 h。

1.1.5　谷氨酸毒性组药物浓度　　L-谷氨酸（终浓度0.75 mmol/L，购自北京制药二厂）[4]。

1.2　液闪计数法测^{45}Ca Bq值

以2.5×10^4个/ml细胞密度接种于24孔板内，给药前加入^{45}Ca 74 GBq/孔（Amsham公司，美国），不同时相点制样过程如下：

（下转433页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net