

中图分类号: R99 文献标识码: A 文章编号: 1002-3127(2007)02-0120-03

· 实验研究 ·

沙尘与非沙尘细颗粒物总颗粒物及其有机、无机提取物的致突变性

陈威, 郭新彪

(北京大学医学部劳动卫生与环境卫生学系, 北京 100083)

关键词: 沙尘暴; 细颗粒物; Ames 试验; 致突变性

近半个世纪以来, 沙尘暴发生强度和次数在我国呈明显上升趋势^[1]。沙尘暴对健康的影响在很大程度上取决于其中的细颗粒物(PM_{2.5})^[2]。大量流行病学研究表明大气 PM_{2.5} 的长期暴露可导致人群肺癌患病率和死亡率增加^[3,4]。而沙尘与正常天气大气颗粒物的来源不同, 导致两者在无机、有机组分的构成比不同^[5], 可能导致沙尘 PM_{2.5} 的致突变性与正常天气大气 PM_{2.5} 不同。实验室研究发现: 大气颗粒物的有机提取物有致突变性^[6-16], 且颗粒物粒径愈小其有机提取物的致突变作用愈强^[12-13]。国内外已有的文献报道对颗粒物致突变性的研究都是使用颗粒物的有机提取物进行, 而有关颗粒物本身及其无机提取物致突变性的研究未见报道。为此, 本研究利用鼠伤寒沙门氏菌/哺乳动物肝微粒体酶实验(简称 Ames 试验), 选用 TA 98 和 TA100 菌株, 分别在体外代谢活化系统 S9 存在或不存在的条件下, 比较了沙尘与非沙尘总颗粒物及其有机提取物和无机提取物的致突变性。

1 材料与方法

1.1 颗粒物的采集 沙尘和非沙尘细颗粒物采集自包头市某城区, 采样点周围人口密集, 树木较少, 附近无工业企业, 采样头距离地面约 10 m。样品的采集时间为 2004 年春季 3~5 月, 当沙尘发生时进行沙尘 PM_{2.5} 采集, 无沙尘时进行非沙尘 PM_{2.5} 的采集。采样流量为 1 m³/min, 每张膜的采样时间约为 24 h, QM-A 型石英纤维滤膜(20.3 cm×25.4 cm)为美国 Whatman 公司产品, 采样前在马弗炉中在 450℃下烘烤 4 h, 以除去吸附在膜上的有机物, 然后恒温干燥 24 h, 称重, 采样后在同样条件下平衡 24 h, 称重, -20℃避光保存。

1.2 颗粒物的提取

1.2.1 总颗粒物的制备: 将膜分为 3 等份。取其中一

份加入 90 ml 的高纯水, 水浴超声提取 20 min(水温保持在 20℃以下)。提取液冷冻干燥 24 h, 称重。用消毒磷酸盐缓冲液(PBS)配制成贮备液, 经 Co 放射源照射灭菌, -20℃避光保存。

1.2.2 有机提取物制备: 另一份膜加入 30 ml 二氯甲烷水浴超声 20 min, 超声 3 次。提取液过滤后氮气吹干, 称重。二甲亚砜(DMSO)配成贮备液, -20℃避光保存。

1.2.3 无机提取物制备: 第 3 份膜加入 90 ml 的高纯水, 水浴超声提取 20 min(水温保持在 20℃以下)。0.45 μm 水系过滤头过滤后冷冻干燥 24 h, 称重。用消毒 PBS 缓冲液配成贮备液, -20℃避光保存。

1.2.4 有机和无机提取物在总颗粒物中的比例: 按照颗粒物提取后称重得到的质量及各部分提取物的提取率, 计算得出沙尘有机与无机提取物在总颗粒物中的质量比分别为 4.97% 和 51.02%, 非沙尘有机与无机提取物在总颗粒物中的质量比分别为 19.28% 和 29.64%。

1.3 Ames 试验 TA 98 和 T 100 菌株购于中国医学科学院肿瘤研究所, 实验前测试菌株经遗传性状鉴定合格。采用平板掺入法^[17], 加和不加 S9 混合液条件下分别测试。沙尘、非沙尘总颗粒物实验剂量设为 125、250、500 和 1 000 μg/皿, 沙尘、非沙尘有机提取物根据提取率分别设为 6.25、12.5、25、50 μg/皿和 25、50、100、200 μg/皿, 沙尘、非沙尘无机提取物同样根据提取率分别设为 62.5、125、250、500 μg/皿。同时设阴性对照和阳性对照组。阳性对照物加 S9 选用 2-氨基芴(2AF, 10 μg), 不加 S9, TA 98 为 4-硝基喹啉(4NQO, 0.5 μg), TA100 叠氮钠(NaN₃, 1 μg), 阴性对照物为 PBS 缓冲液(总颗粒物、无机提取物)或 DMSO(有机提取物, 20 μg/皿)。每个剂量组接种 3 个平皿, 以上实验重复一次, 取均值。实验结果以 MR(突变率)表示, MR 值 = 待测样所诱发的菌落回变数/自发回变菌落数, MR 值 ≥ 2 并有剂量-反应关系和重现性的为致突变阳性。

1.4 统计学方法 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, SPSS 10.0 软件

基金项目: 国家自然科学基金重点项目资助(30230310)

作者简介: 陈威, 在读硕士研究生, 研究方向: 分子环境医学。

通讯作者: 郭新彪, 教授, 博士生导师, 研究方向: 环境毒理学。

进行 ANOVA 分析。

2 结果

本研究所选取的有机提取物与无机提取物的实验浓度为相同总颗粒物浓度当量转换得到的剂量。因此,可对沙尘和非沙尘 2 种天气的有机和无机提取物的致突变性进行比较。

2.1 相同总颗粒物浓度下,沙尘与非沙尘 PM_{2.5}总颗粒物的致突变性比较(表 1) TA 98、TA 100 2 种菌种在加与不加活化系统 S9 的条件下,沙尘、非沙尘 PM_{2.5}总颗粒物各染毒剂量组的平均回复菌落数均低于平均自发回复菌落数 2 倍,即 MR < 2。沙尘、非沙尘 PM_{2.5}总颗粒物无致突变性,且二者之间差异无统计学意义。

表 1 沙尘与非沙尘 PM_{2.5}总颗粒物的致突变性($\bar{x} \pm s$)

颗粒物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	回复突变数			
		TA ₉₈		TA ₁₀₀	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
自发回变		38 ± 2.5	31 ± 3.1	157 ± 12.1	162 ± 3.8
沙尘	125	40 ± 2.0	31 ± 2.6	149 ± 5.5	155 ± 4.6
	250	35 ± 6.1	34 ± 2.5	149 ± 8.1	134 ± 9.0
	500	34 ± 4.5	34 ± 5.0	155 ± 7.0	151 ± 3.1
	1 000	38 ± 3.2	28 ± 4.0	158 ± 4.0	138 ± 7.5
非沙尘	125	39 ± 4.2	32 ± 2.5	142 ± 7.7	162 ± 7.8
	250	35 ± 6.0	30 ± 2.5	155 ± 5.5	148 ± 4.0
	500	36 ± 7.4	30 ± 5.0	145 ± 12.6	133 ± 11.1
	1 000	35 ± 3.6	31 ± 4.7	143 ± 4.6	168 ± 5.5
磷酸缓冲液	36 ± 3.1	30 ± 1.5	147 ± 17.6	161 ± 11.2	
2-氨基苄			297 ± 11.8	829 ± 19	
四硝基喹啉	316 ± 14.4				
叠氮钠			669 ± 17.5		

2.2 相同总颗粒物浓度下,沙尘与非沙尘 PM_{2.5}有机提取物的致突变性比较(表 2) TA 98、TA 100 2 种菌种在加与不加活化系统 S9 的条件下,从相同质量沙尘、非沙尘 PM_{2.5}总颗粒物获得的有机提取物各剂量组的平均回复菌落数均低于平均自发回复菌落数 2 倍,即 MR < 2。因此,沙尘、非沙尘 PM_{2.5}有机提取物无致突变性,且两者之间差异无统计学意义。

2.3 相同总颗粒物浓度下,沙尘与非沙尘 PM_{2.5}无机提取物的致突变性比较(表 3) TA 98、TA 100 2 种菌种在加与不加活化系统 S9 的条件下,沙尘、非沙尘 PM_{2.5}无机提取物各剂量组的平均回复菌落数均低于

平均自发回复菌落数 2 倍,即 MR < 2。因此,沙尘、非沙尘 PM_{2.5}无机提取物无致突变性,且两者之间差异无统计学意义。

表 2 沙尘与非沙尘 PM_{2.5}有机提取物的致突变性($\bar{x} \pm s$)

颗粒物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	回复突变数			
		TA 98		TA 100	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
自发回变		33 ± 5.6	32 ± 2.2	124 ± 6.6	123 ± 5.4
沙尘	6.25	29 ± 3.1	34 ± 2.9	126 ± 5.4	127 ± 3.6
	12.5	39 ± 12.7	35 ± 2.0	122 ± 6.5	127 ± 3.9
	25	34 ± 7.4	35 ± 4.7	120 ± 3.9	124 ± 5.6
	50	37 ± 7.1	37 ± 3.1	124 ± 7.3	126 ± 4.3
非沙尘	25	38 ± 8.9	36 ± 5.1	119 ± 6.8	121 ± 4.2
	50	35 ± 4.7	34 ± 5.5	121 ± 3.9	124 ± 5.6
	100	30 ± 4.3	33 ± 3.6	126 ± 6.9	125 ± 4.8
	200	41 ± 7.3	32 ± 1.6	135 ± 6.7	128 ± 5.8
二甲基甲砒		31 ± 3.5	32 ± 1.6	122 ± 5.5	125 ± 7.5
2-氨基苄			400 ± 12.0		769 ± 19.5
四硝基喹啉	369 ± 13.0				
叠氮钠				850 ± 18.0	

表 3 沙尘与非沙尘 PM_{2.5}无机提取物的致突变性($\bar{x} \pm s$)

颗粒物	剂量 ($\mu\text{g}/\text{皿}$)	回复突变数			
		TA 98		TA 100	
		- S9	+ S9	- S9	+ S9
自发回变		30 ± 3.0	31 ± 3.1	124 ± 5.5	149 ± 5.7
沙尘	62.5	29 ± 2.7	30 ± 4.0	125 ± 6.1	151 ± 7.4
	125	28 ± 3.4	29 ± 3.0	125 ± 4.5	141 ± 9.3
	250	31 ± 4.5	30 ± 2.9	127 ± 8.2	148 ± 12.2
	500	32 ± 3.3	29 ± 4.1	127 ± 8.1	142 ± 8.1
非沙尘	37.5	31 ± 2.1	30 ± 2.4	125 ± 5.6	146 ± 9.0
	75	31 ± 2.9	32 ± 3.6	123 ± 7.8	142 ± 11.8
	150	30 ± 1.8	32 ± 4.5	126 ± 5.2	150 ± 14.8
	300	32 ± 2.1	27 ± 3.4	120 ± 4.0	144 ± 8.5
磷酸缓冲液	30 ± 1.6	29 ± 3.1	120 ± 2.8	146 ± 12.2	
2-氨基苄			440 ± 8.7		851 ± 19.7
四硝基喹啉	286 ± 12.0				
叠氮钠				747 ± 12.7	

3 讨论

在 Ames 实验中,TA 98 菌株是检测移码型致突变物,而 TA 100 菌株是检测碱基对置换型致突变物,S9

代谢活化系统的存在使说明致突变物是否需要代谢活化。在此研究中,沙尘、非沙尘 $PM_{2.5}$ 的总颗粒物、有机提取物和无机提取物均无致突变性,非移码型和碱基对置换型突变物。

本研究受试物的剂量选择,根据相同总颗粒物质量浓度以及沙尘、非沙尘中有机、无机提取物质量百分比,进行计算,得到相同总颗粒物浓度的总颗粒物、有机提取物和无机提取物的受试物浓度。本研究选取的总颗粒物浓度范围为 125, 250, 500 和 1 000 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$, 远高于以往细胞毒性实验^[18-20]中引起细胞存活率低于 80% 的染毒剂量(约 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$),但未对本实验的菌株产生毒性作用,因此该剂量组的选择具有实际研究意义,在总颗粒物高浓度组 1 000 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ 时已经发生明显的细胞毒性,故进行 Ames 实验的浓度选择应低于引起细胞毒性的浓度,即本次实验所选取的浓度。而沙尘、非沙尘的有机、无机提取物在总颗粒物中所占的质量百分比比较低(沙尘有机与无机提取物在总颗粒物中的质量比分别约为 5% 和 50%,非沙尘有机与无机提取物在总颗粒物中的质量比分别为 20% 和 30%),因此本实验中有有机提取物的实验浓度较以往国内外相关研究所选取的浓度低。总颗粒物高浓度组 1 000 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ 所对应的沙尘、非沙尘有机提取物实际浓度分别为 50 和 200 $\mu\text{g}/0.1\text{ ml}$ 。而以往大量实验^[6-16]所选取的有机提取物浓度远高于本实验所确定的浓度,虽得出阳性结果,但其实际意义较弱,在其所选取的有机提取物浓度所对应的总颗粒物浓度下早已发生细胞死亡等细胞毒性结果。本研究依据有机和无机提取物占总颗粒物的质量比来选择有机和无机成分的染毒剂量。因此,与以往的研究相比,实验结果更能客观地比较在不引起细胞毒性的浓度下,颗粒物不同组分的致突变活性。

参考文献:

- [1] 周自江. 近 45 年中国扬沙和沙尘暴天气. 第四纪研究, 2001, 21: 9-17.
- [2] 李君, 范雪云, 佟俊旺, 等. 沙尘暴特性及对人体健康影响. 中国煤炭工业医学杂志, 2004, 7: 897-898.
- [3] Schwartz J, Norris G, Larson T, et al. Episodes of high coarse particle concentrations are not associated with increased mortality. Environ Health Perspect, 1999, 107: 339-342.
- [4] Dockery DE, Pope AC, Xu X, et al. An association between air pollution and mortality in six US cites. N Engl J Med, 1993, 329: 1753-1759.
- [5] 孙业乐, 庄国顺, 袁蕙, 等. 2002 年北京特大沙尘暴的理化特性及其组分来源分析. 科学通报, 2004, 49: 340-346.
- [6] 赵贤四, 朱惠刚, 蒋松辉, 等. 上海市大气悬浮颗粒物有机提取物的致突变性研究. 癌变·畸变·突变, 1996, 8: 684-691.
- [7] 丁国武, 王晓云. 兰州地区大气悬浮颗粒物有机提取物的致突变性研究. 环境与健康杂志, 1999, 16: 96-97.
- [8] 于燕, 张振军, 张敬华. 西安市大气悬浮颗粒物污染现状及其有机提取物致突变性的研究. 癌变·畸变·突变, 2003, 15: 43-45.
- [9] 李桂英, 唐小玲, 毕新慧, 等. 广州市不同粒径大气颗粒物有机提取物的致突变性. 环境科学学报, 2005, 25: 319-323.
- [10] 齐秀云, 李华文, 张毅. 山东省四城市大气总悬浮颗粒物的致突变性研究. 癌变·畸变·突变, 1995, 7: 259.
- [11] 齐秀云, 于青. 室内燃煤燃气空气颗粒物致突变性研究. 卫生研究, 1995, 24: 218-220.
- [12] 杨文敏, 吴炳耀, 马亚萍, 等. 大气颗粒提取物的致突变性. 中国公共卫生学报, 1994, 13: 19-121.
- [13] Kawanaka Y, Matsumoto E, Sakamoto K, et al. Size distributions of mutagenic compounds and mutagenicity in atmospheric particulate matter collected with a low-pressure cascade impactor. Atmos Env, 2004, 38: 2125-2132.
- [14] Mukherji S, Swain AK, Venkataraman C. Comparative mutagenicity assessment of aerosols in emission from biofuel combustion. Atmos Env, 2002, 36: 5627-5635.
- [15] Jerzy Z, Piotr J, Jerzy K. Seasonal variability of the mutagenicity of airborne particles in the town center. J Aero Sci, 2001, 32: 409-423.
- [16] Zhao HW, Barger MW, Ma JKH, et al. Effects of exposure to diesel exhaust particles (DEP) on pulmonary metabolic activation of mutagenic agents. Mutat Res, 2004, 564: 103-113.
- [17] 中华人民共和国卫生部. 中华人民共和国国家标准. 食品安全性毒理学评价程序和方法. GB 15193-94. 1995.
- [18] 耿红, 孟紫强, 张全喜. 沙尘暴细颗粒物对大鼠肺泡巨嗜细胞钙水平和脂质过氧化的影响. 环境科学学报, 2005, 25: 845-850.
- [19] 魏爱丽, 孟紫强. 沙尘暴细颗粒物对人外周血淋巴细胞遗传损伤效应. 环境与健康杂志, 2006, 23: 291-293.
- [20] 王菲菲, 郑灿军, 郭新彪. 沙尘与非沙尘 $PM_{2.5}$ 对人肺成纤维细胞存活率及细胞间通讯的影响. 卫生研究, 2006, 35: 26-30.

(收稿日期: 2006-10-10)