

不同预处理消毒饮用水中非挥发性有机提取物 对 HepG2 细胞的损伤作用

曹贤文¹, 杜海荣², 张荣³, 王欣梅², 杜宏², 汪亚洲², 吕斌^{2*}

摘要: [目的] 研究汉江水源水以及 3 种不同预处理方法(氯气、二氧化氯和臭氧)消毒水中的非挥发性有机提取物(non-volatility organic compounds, NOCs)对肝癌细胞(HepG2 细胞)的损伤作用。[方法] 设氯气($\text{Cl}_2 + \text{Cl}_2$)、二氧化氯($\text{ClO}_2 + \text{Cl}_2$)、臭氧($\text{O}_3 + \text{Cl}_2$)和水源水(raw water)4 个处理组以及一个阴性对照组(1% DMSO)和一个阳性对照组(Bap)。各实验组分别以 0.2、1、5、25、125 mL/mL 培养基的浓度对体外 HepG2 细胞进行染毒。以单细胞凝胶电泳(single cell gel electrophoresis, SCGE)、细胞松弛素 B 阻断核质分裂微核法(cytokinesis-block micronucleus)和 MTT 试验分别检测其对细胞 DNA 断裂损伤、染色体损伤和细胞存活率的影响。[结果] 彗星试验显示,3 种不同预处理方法消毒水中 NOCs 在 5、25、125 mL/mL 培养基均可明显导致 DNA 单、双链断裂,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。相同浓度各处理组间的差异也具有统计学意义($P < 0.05$)。碱性彗星试验显示致 DNA 损伤最明显的是二氧化氯组;中性彗星试验显示致 DNA 损伤最明显的为氯气组。微核试验显示,3 种不同预处理方法消毒水和水源水 NOCs 在 5、25、125 mL/mL 培养基均可致细胞微核的形成,与阴性对照组相比差异有统计学意义($P < 0.05$)。与同浓度的臭氧组相比,氯气组在 1 mL/mL 培养基的细胞微核率升高($P < 0.05$)。二氧化氯组在 1 mL/mL 和 5 mL/mL 培养基的细胞微核率均明显升高($P < 0.05$)。水源水组在 1 mL/mL 和 25 mL/mL 培养基时的细胞微核率显著低于同浓度的二氧化氯、氯气和臭氧组($P < 0.05$)。在 125 mL/mL 培养基则显著高于二氧化氯、氯气和臭氧组($P < 0.05$)。与对照组相比,3 种不同预处理方法消毒水和水源水 NOCs 对体外 HepG2 细胞存活率有随浓度的增加而降低的趋势,在 25、125 mL/mL 培养基差异均有统计学意义($P < 0.05$)。相关性研究表明,碱性 OTM 和中性 OTM 与微核率均呈正相关($r=0.697, P=0.001$; $r=0.575, P=0.012$)。细胞生存率与碱性 OTM 和微核率均呈负相关($r=-0.763, P=0.000$; $r=-0.635, P=0.005$)。[结论] 3 种不同预处理方法消毒水中 NOCs 均可以导致体外 HepG2 细胞 DNA 单链和双链断裂。氯气预处理消毒水中的 NOCs 主要导致 DNA 双链的断裂,二氧化氯预处理消毒水中的 NOCs 主要导致 DNA 单链断裂。

关键词: DNA 损伤; 染色体损伤; 氯化消毒; 臭氧; HepG2 细胞

DNA Damage Caused by Non-volatile Organic Compounds Extracted from Surface Water Treated with Different Disinfection Methods

CAO Xian-wen¹, DU Hai-rong², ZHANG Rong³, WANG Xin-mei², DU Hong², WANG Ya-zhou², LÜ Bin^{2*} (1. Hu'nan Provincial Institute for Labor Hygiene and Occupational Diseases, Changsha, Hu'nan 410007, China; 2. MOE Key Lab of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan, Hubei 430030, China; 3. Department of Occupational and Environment Hygiene, School of Public Health, Hebei Medical University, Shijiazhuang, Hebei 050017, China). *Address correspondence to LÜ Bin; E-mail: lubin@mails.tjmu.edu.cn

Abstract: [Objective] To evaluate the *in vitro* toxicity of non-volatility organic compounds (NOCs) extracted from Hanjiang water disinfected by different sequential treatments. [Methods] Hanjiang water was disinfected using ozone, chlorine dioxide or chlorine as the primary disinfectant followed by chlorine as the secondary disinfectant. HepG2 cells were exposed to NOCs extracts of these different treated water samples corresponding to concentrations of 0.2, 1.0, 5.0, 25.0 and 125.0 mL/mL medium. DNA single-strand breaks, chromosome damage and cell survival rates induced by NOCs were investigated via single cell gel electrophoresis (SCGE), cytokinesis-blocked micronucleus (CBMN) test and MTT test respectively. [Results] Significant and dose-dependent increase of DNA damage induced by NOCs extracted from before and after chlorination, chlorine dioxide and ozone disinfected drinking water were found both in alkaline and neutral comet assay from the doses of 5.0 to 125.0 mL/mL medium

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(编号: 30671764 和 编号: 20477013)

[作者简介] 曹贤文(1981-),男,硕士;研究方向:环境卫生与职业卫生;E-mail: cxwcao@163.com

[*通信作者] 吕斌教授;E-mail: lubin@mails.tjmu.edu.cn

[作者单位] 1. 湖南省劳动卫生职业病防治所,湖南 长沙 410007; 2. 华中科技大学同济医学院公共卫生学院教育部环境与健康重点实验室,湖北 武汉 430030; 3. 河北医科大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学教研室,河北 石家庄 050017

($P < 0.05$), especially at high dosages(25.0 and 125.0 mL/mL medium)($P < 0.01$). NOCs extracted from water sample of chlorine dioxide group caused most serious DNA damage in alkaline comet assay and that of ozone group caused the lowest damage. Extraction from chlorination group caused DNA damage most serious in neutral comet assay. NOCs extracted from chlorination, chlorine dioxide and ozone disinfected drinking water caused significant and dose-dependent increase of MN frequencies from the doses of 5.0 to 125.0 mL/mL medium($P < 0.05$)in HepG2 cells; NOCs extracted from chlorination, chlorine dioxide and ozone disinfected drinking water caused a significant and dose-dependent decrease of cell viability from the doses of 25.0 to 125.0 mL/mL medium($P < 0.05$)in HepG2 cells; There were better correlations among cell survival rates, DNA damage(both alkaline and neutral Comet assay)and chromosome damage, either positive or negative. [Conclusion] According to Comet assay and Micronucleus assay, chlorination, chlorine dioxide and ozone could cause DNA breaks, both single-and double-strand, but chlorination caused DNA double-strand breaks most seriously and chlorine dioxide caused DNA single-strand breaks most seriously.

Key Words: DNA damage; chromosome damage; chlorinated disinfectant; ozone; HepG2 cells

大量研究表明,水源水中的有机物及污染物经水厂加氯消毒后,可形成致突变、致癌的氯化副产物^[1]。汉江是武汉市的主要供水水源,近年来研究表明以汉江为水源的氯化饮水有机提取物对哺乳动物细胞有 DNA 损伤作用^[2]; 水源水采用不同的预处理方法处理后,可形成不同的副产物,再用氯气消毒时则产生的毒性作用也就不一样^[3]。因此,为了得到一种更适合汉江水源水的消毒方法,本研究拟通过对不同预处理消毒饮用水中非挥发性有机提取物(non-volatility organic compounds, NOCs)对肝癌细胞(HepG2 细胞)活性的影响以及对 HepG2 细胞的遗传毒性作用的研究,寻找合适的氯化消毒预处理方法,为相关部门提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料

二甲基亚砷(DMSO),美国 Sigma 公司; 三羟甲基氨基甲烷(Tris base),上海生工生物工程有限公司; 乙二胺四乙酸二钠,广东汕头西陇化工厂; 十二烷基磺酸钠(SDS),浙江永嘉化学试剂厂; 胎牛血清、DMEM 培养基,美国 Gibco 公司; 噻唑蓝(MTT),美国 Sigma 公司; 荧光显微镜,日本 OLYMPUS 公司; 凝胶成像分析系统,法国 Vilber Louram 公司; 弱光仪,美国 EP 公司, LB9507 型; 吸附树脂,美国 Amberlite, XAD-2 型大孔树脂。无机盐、有机试剂等为分析纯或优级纯。HepG2 细胞株购自武汉大学典型培养物收藏中心。

1.2 水中 NOCs 的浓集

于 2004 年 12 月采集汉江有关水厂的水源水及不同预处理消毒水样(先以氯气、二氧化氯和臭氧预处理,最后以氯气消毒的消毒水)。水样以 1 mL/min 的流速通过预先净化的 XAD-2 树脂柱,吸附水中微量有机物,然后用 4 床体丙酮、4 床体二氯甲烷浸柱并洗脱所吸附的有机物,洗脱液通氮减压条件下经 K-D 浓缩器浓缩,再在 70 °C 烘箱中干燥制得有机物干品。试验前用二甲基亚砷(DMSO)溶解浓缩的有机提取物配成一定的浓度,以每培养皿中加入的试样 0.1 mL(相当于处理水样的体积)为浓度单位(L/皿或 L/0.1 mL)。

1.3 细胞培养

HepG2 细胞于含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养液、5%CO₂ 饱和湿度、37 °C 常规培养。调整细胞计数至 10⁵ 个/mL 接种于培养瓶,取指数生长期细胞进行实验。

1.4 实验分组及 HepG2 细胞染毒

先以氯气、二氧化氯和臭氧预处理,最后以氯气消毒的消毒水分别作为氯气(Cl₂+Cl₂)、二氧化氯(ClO₂+ Cl₂)、臭氧(O₃+Cl₂)和水源水(Raw water)四个处理组,另设一个阴性对照组(1% DMSO)和一个阳性对照组(25 μmol/L BaP)。HepG2 细胞培养后,弃去原培养基,加入以不含胎牛血清培养基稀释的 NOCs。根据相关文献以及本课题组的预实验结果,最后选择细胞染毒的浓度为 0.2、1、5、25、125 mL/mL 培养基内含不同浓度的 NOCs。

1.5 彗星试验^[4-5]

不同浓度 NOCs 处理 HepG2 细胞 24 h 后收获细胞,每个浓度设 3 个平行样,同时分别以 1% DMSO 和 25 μmol/L BaP 作为阴性对照和阳性对照。取细胞悬液与 0.5% 的低熔点琼脂糖混匀后浇注到用 1% 正常熔点琼脂糖预处理过的磨砂玻片上,细胞裂解后,碱性彗星实验的电泳条件为: 电泳液的条件为碱性电泳液恒压 25 V, 4 °C, pH=13, 300 mA 电泳 25 min; 中性彗星实验的电泳条件为: 中性电泳液恒压 25 V, 4 °C, pH=8.5, 240 mA 电泳 40 min。电泳完毕后用细胞中和液中和,EB 染色,荧光显微镜下观察,每片观察 100 个细胞核,用 CASP 彗星分析软件分析,以 Olive 尾距(olive tail moment, OTM)作为分析指标进行统计学分析,OTM= 尾部 DNA 含量 × 头部中心到尾部中心的距离。

1.6 微核试验

HepG2 细胞体外微核试验参照由 FENECH 建立的方法^[6]: 取对数生长期的细胞接种于 25 cm² 细胞培养瓶中,细胞数为 5 × 10⁵ 个/瓶,加入 5 mL DMEM 生长培养液,在 5%CO₂、饱和湿度条件下培养 24 h 后,加入受试物 50 μL,同时设阴性对照(1% DMSO)和阳性对照(25 μmol/L BaP)。染毒 24 h 后,除去旧培养液,用磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次,加入适量细胞松弛素 B,并使其终浓度达到 3 μg/mL,培养 24 h 后收获细胞。用 1% 的胰蛋白酶消化细胞 4 min,培养液终止反应,1000 × g 离心 8 min 后,用 5.6 g/L 的 KCl 溶液处理细胞,再次离心(离心条件和用时间同上)后加入固定液(乙酸和甲醇按 3 : 1 比例配制),再次重复固定 1 次,留沉淀物 0.5 mL 左右,轻轻打匀,将细胞悬液滴入预冷的玻片,并用 Giemsa 染液染色,晾干后用自来水冲洗,待片子风干后每个样本在显微镜下计数 1000 个双核细胞(binucleated cell, BNC)中的微核(micronulei, MN)数,计算微

核率。每个受试物独立的实验重复 3 次。

1.7 细胞活性检测(MTT 试验)

接种 HepG2 细胞于 96 孔培养板中,接种密度为 1×10^4 个,待细胞贴壁汇合后,进行细胞染毒。染毒结束后,弃去培养基,以 PBS 洗 2 次,加入新鲜的含 10% 小牛血清的 DMEM 培养基 200 μ L/孔,再加入 5 mg/mL MTT 20 μ L/孔,37 $^{\circ}$ C,5%CO₂ 继续培养 4 h,移去培养基,加 150 μ L DMSO/孔,震荡 15 min,充分溶解结晶物,用酶标仪在波长为 490 nm 处测定光密度(D)值。设 6 个平行样,计算平均值。细胞活性 = $(D_{\text{处理组}}/D_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

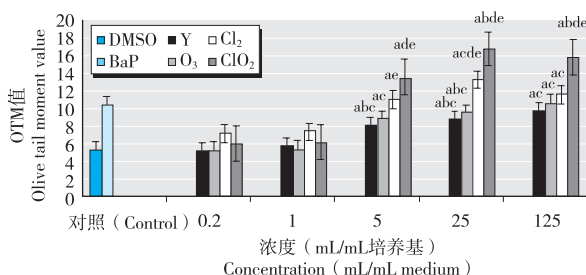
1.8 统计学分析

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 13.0 分析软件进行统计,组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett's *t* 检验,检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 对 HepG2 细胞的 DNA 损伤作用

如图 1 所示,在碱性彗星试验中,与阴性对照组相比,所有消毒水和水源水的 NOCs 都使 OTM 升高, $P < 0.01$,并随着浓度的增加而增加。与同浓度的水源水组相比,ClO₂+Cl₂ 组在 5、25、125 mL/mL 培养基的 OTM 均明显升高, $P < 0.01$; Cl₂+Cl₂ 组在 0.2、1、5、25 mL/mL 培养基均升高, $P < 0.01$ 。与同浓度的 O₃+Cl₂ 组相比,ClO₂+Cl₂ 组在 5、25、125 mL/mL 培养基均明显升高, $P < 0.01$; Cl₂+Cl₂ 组在 0.2、1、5、25 mL/mL 培养基均明显升高, $P < 0.01$ 。与同浓度的 Cl₂+Cl₂ 组相比,ClO₂+Cl₂ 组在 5、25、125 mL/mL 培养基均明显升高, $P < 0.01$ 。ClO₂+Cl₂ 组 NOCs 导致 OTM 升高最明显。

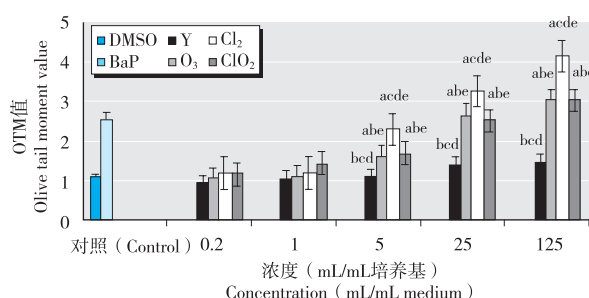


[注]: 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n = 3$); Y: 水源水; a: 与阴性对照组 (DMSO) 比较, $P < 0.01$; b: 与 Cl₂ 组比较, $P < 0.01$; c: 与 ClO₂ 组比较, $P < 0.01$; d: 与 O₃ 组比较, $P < 0.01$; e: 与水源水组比较, $P < 0.01$ 。[Y=raw water; Cl₂= Cl₂+Cl₂; ClO₂= ClO₂+Cl₂; O₃= O₃+Cl₂; DMSO=dimethyl sulfoxide; Values are the mean of three separate experiments and expressed as OTM value, data represent the mean value $\pm$ standard error ($n = 3$); a: Compared to DMSO, $P < 0.01$; b: Compared to Cl₂, $P < 0.01$; c: Compared to ClO₂, $P < 0.01$; d: Compared to O₃, $P < 0.01$; e: Compared to raw water, $P < 0.01$ 。]

图 1 不同消毒饮用水所致 HepG2 细胞 DNA 的损伤水平 (碱性彗星) Figure 1 DNA damage level (alkaline comet assay) in HepG2 cell treated by different disinfected water extracts

如图 2 所示,在中性彗星试验中,与阴性对照组相比,所有消毒水的 NOCs 所致 OTM 都明显升高, $P < 0.01$,并随着浓度的增加而增加。与同浓度的水源水组相比,Cl₂+Cl₂ 和 ClO₂+Cl₂ 组在 5、25、125 mL/mL 培养基的 OTM 均明显升高, $P < 0.01$; O₃+Cl₂ 组在 125 mL/mL 培养基明显升高, $P < 0.01$ 。与同浓度的

O₃+Cl₂ 组相比,Cl₂+Cl₂ 组在 5、25、125 mL/mL 培养基均明显升高, $P < 0.01$; ClO₂+Cl₂ 组在 125 mL/mL 培养基升高, $P < 0.01$ 。与同浓度的 ClO₂+Cl₂ 组相比,Cl₂+Cl₂ 组在 5、25、125 mL/mL 培养基均明显升高, $P < 0.01$ 。水源水组 OTM 明显低于其他 3 组, $P < 0.01$ 。Cl₂+Cl₂ 组 NOCs 导致 OTM 升高最明显。



[注]: 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n = 3$); Y: 水源水; a: 与阴性对照组 (DMSO) 比较, $P < 0.01$; b: 与 Cl₂ 组比较, $P < 0.01$; c: 与 ClO₂ 组比较, $P < 0.01$; d: 与 O₃ 组比较, $P < 0.01$; e: 与水源水组比较, $P < 0.01$ 。[Y=raw water; Cl₂= Cl₂+Cl₂; ClO₂= ClO₂+Cl₂; O₃= O₃+Cl₂; DMSO=dimethyl sulfoxide; Values are the mean of three separate experiments and expressed as OTM value, data represent the mean value $\pm$ standard error ($n = 3$); a: Compared to DMSO, $P < 0.01$; b: Compared to Cl₂, $P < 0.01$; c: Compared to ClO₂, $P < 0.01$; d: Compared to O₃, $P < 0.01$; e: Compared to raw water, $P < 0.01$ 。]

图 2 不同消毒饮用水所致 HepG2 DNA 的损伤水平 (中性彗星)

Figure 2 DNA damage level (neutral comet assay) in HepG2 treated by different disinfected water extracts

2.2 对 HepG2 细胞微核率的影响

如表 1 所示,与对照组相比,所有水样 NOCs 所致微核率都明显增加, $P < 0.05$ 。与同浓度的水源水组相比,Cl₂+Cl₂ 组在 1、25 mL/mL 培养基均明显增加, $P < 0.05$; ClO₂+Cl₂ 和 O₃+Cl₂ 组在 25 mL/mL 培养基明显增加, $P < 0.05$; Cl₂+Cl₂、ClO₂+Cl₂ 和 O₃+Cl₂ 组在 125 mL/mL 培养基均明显降低, $P < 0.01$ 。与同浓度的 O₃+Cl₂ 组相比,Cl₂+Cl₂ 组在 1 mL/mL 培养基明显增加, $P < 0.05$; ClO₂+Cl₂ 组在 1、5 mL/mL 培养基均明显增加, $P < 0.05$ 。同浓度 ClO₂+Cl₂ 和 Cl₂+Cl₂ 组差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

表 1 不同消毒饮用水所致 HepG2 染色体的损伤水平

Table 1 Chromosome damage level in HepG2 treated by different disinfected water extracts

组别 Group	浓度 (mL/mL 培养基) X Concentration, mL/mL medium)				
	0.2	1	5	25	125
DMSO	17.00 $\pm$ 0.33	17.00 $\pm$ 0.33	17.00 $\pm$ 0.33	17.00 $\pm$ 0.33	17.00 $\pm$ 0.33
Cl ₂	19.67 $\pm$ 0.67	21.00 $\pm$ 0.67 ^{ade}	25.00 $\pm$ 0.58 ^a	32.33 $\pm$ 1.45 ^{ae}	27.67 $\pm$ 0.33 ^{ae}
ClO ₂	19.00 $\pm$ 0.33	20.33 $\pm$ 0.88 ^{de}	26.33 $\pm$ 0.33 ^{cd}	33.67 $\pm$ 0.58 ^{ae}	28.00 $\pm$ 0.58 ^{ae}
O ₃	17.33 $\pm$ 0.58	17.33 $\pm$ 0.58 ^{bc}	23.33 $\pm$ 0.67 ^{bc}	30.33 $\pm$ 2.51 ^{ae}	26.33 $\pm$ 1.45 ^{ae}
Y	17.00 $\pm$ 0.33	17.00 $\pm$ 1.45 ^{bc}	24.67 $\pm$ 2.52 ^a	26.67 $\pm$ 1.45 ^{abcd}	31.33 $\pm$ 2.51 ^{abcd}

[注]: 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n = 3$); Y: 水源水; a: 与对照组 (DMSO) 比较, $P < 0.05$; b: 与 Cl₂ 组比较, $P < 0.05$; c: 与 ClO₂ 组比较, $P < 0.05$; d: 与 O₃ 组比较, $P < 0.05$; e: 与水源水组比较, $P < 0.01$ 。[Y=raw water; Cl₂= Cl₂+Cl₂; ClO₂= ClO₂+Cl₂; O₃= O₃+Cl₂; data represent the mean value $\pm$ standard error ($n = 3$); a: Compared to DMSO, $P < 0.05$; b: Compared to Cl₂, $P < 0.05$; c: Compared to ClO₂, $P < 0.05$; d: Compared to O₃, $P < 0.05$; e: Compared to raw water, $P < 0.01$ 。]

2.3 对 HepG2 细胞存活率的影响

如表 2 所示, MTT 试验显示水样中的 NOCs 对 HepG2 的细胞存活率都有剂量-反应关系。与对照组相比, 各种水样中的 NOCs 在 25、125 mL/mL 培养基时细胞存活率均显著降低, $P < 0.05$ 。与水源水组相比, $\text{ClO}_2 + \text{Cl}_2$ 和 $\text{Cl}_2 + \text{Cl}_2$ 组 NOCs 对 HepG2 细胞存活率在 125 mL/mL 培养基时明显降低, $P < 0.05$; 其他剂量组无明显变化, $P > 0.05$ 。与 $\text{O}_3 + \text{Cl}_2$ 组相比, $\text{ClO}_2 + \text{Cl}_2$ 和 $\text{Cl}_2 + \text{Cl}_2$ 组的 NOCs 对 HepG2 细胞存活率在 125 mL/mL 培养基时明显降低, $P < 0.05$, 其他剂量组无明显变化, $P > 0.05$ 。 $\text{Cl}_2 + \text{Cl}_2$ 和 $\text{ClO}_2 + \text{Cl}_2$ 组之间 HepG2 细胞存活率差异无统计学意义, $P > 0.05$ 。

表 2 不同消毒饮用水对 HepG2 细胞存活率的影响
Table 2 Effects of NOCs extracted from water disinfected by different disinfected water extracts on the survival of HepG2 cells

组别 Group	浓度 (mL/mL 培养基) X Concentration, mL/mL medium)				
	0.2	1	5	25	125
Cl_2	1.05 ± 0.01	1.03 ± 0.02	1.08 ± 0.06 ^a	0.87 ± 0.04 ^a	0.58 ± 0.04 ^{ade}
ClO_2	1.09 ± 0.02	1.06 ± 0.08	1.02 ± 0.04 ^a	0.95 ± 0.03	0.60 ± 0.01 ^{ade}
O_3	1.04 ± 0.02	1.01 ± 0.01	0.92 ± 0.05 ^{bce}	0.88 ± 0.04 ^a	0.72 ± 0.03 ^{abc}
Y	1.06 ± 0.02	1.03 ± 0.01	1.02 ± 0.01 ^d	0.94 ± 0.01	0.74 ± 0.01 ^{abc}

[注]: 所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示 ($n = 3$); Y: 水源水; ^a: 与对照组 (DMSO) 比较, $P < 0.05$; ^b: 与 Cl_2 组比较, $P < 0.05$; ^c: 与 ClO_2 组比较, $P < 0.05$; ^d: 与 O_3 组比较, $P < 0.05$; ^e: 与水源水组比较, $P < 0.01$ 。[Y=raw water; $\text{Cl}_2 = \text{Cl}_2 + \text{Cl}_2$; $\text{ClO}_2 = \text{ClO}_2 + \text{Cl}_2$; $\text{O}_3 = \text{O}_3 + \text{Cl}_2$; data represent the mean value $\pm$ standard error ($n = 3$); ^a: Compared to DMSO, $P < 0.05$; ^b: Compared to Cl_2 , $P < 0.05$; ^c: Compared to ClO_2 , $P < 0.05$; ^d: Compared to O_3 , $P < 0.05$; ^e: Compared to raw water, $P < 0.01$.]

2.4 DNA 损伤、微核率和细胞生存率之间的相关性分析

NOCs 在一定浓度范围内 (0.2~125 mL/mL 培养基), $\text{Cl}_2 + \text{Cl}_2$ 、 $\text{ClO}_2 + \text{Cl}_2$ 、 $\text{O}_3 + \text{Cl}_2$ 和 水源水 随着浓度的升高, DNA 断裂损伤、微核率呈增加的趋势。碱性 OTM 和中性 OTM 与微核率均呈正相关 ($r = 0.697$, $P = 0.001$; $r = 0.575$, $P = 0.012$), 碱性 OTM 和细胞生存率呈负相关 ($r = -0.763$, $P = 0.000$) 以及细胞生存率与微核率也有较强的负相关性 ($r = -0.635$, $P = 0.005$)。

3 讨论

本项目主要研究了 3 种不同预处理方法消毒水中非挥发性有机提取物对体外 HepG2 细胞的 DNA 断裂损伤、线粒体损伤以及细胞存活率的影响。

彗星试验可以分碱性和中性两种。碱性单细胞电泳技术逐渐成为检测单个细胞 DNA 单链断裂和碱性不稳定位点与不完全切除修复部位的单链断裂的一种快速、简便、敏感的技术^[7]; 中性彗星试验主要用于检测 DNA 双链的断裂。它们都已广泛用于环境化学物质的遗传毒性研究。研究表明, 氯化消毒饮用水的提取物在碱性条件下可以导致 DNA 断裂损伤^[2,8-9]。本研究发现, 3 种不同预处理消毒水的 NOCs 不仅可以导致体外 HepG2 细胞的 DNA 单链断裂而且可致 DNA 双链断裂, 并且存在剂量-反应关系, 但其损伤程度却不一样。在碱性彗星试验中二氧化氯预处理组导致 DNA 断裂损伤较强; 而在中性条件

下为氯气预处理组导致 DNA 断裂损伤最严重。结合这两种彗星试验, 本研究发现二氧化氯预处理消毒水中 NOCs 主要引起 DNA 单链断裂, 氯气预处理消毒水中的 NOCs 主要引起 DNA 双链断裂。臭氧组和二氧化氯组预处理消毒水中 NOCs 导致的 DNA 双链断裂的损伤程度均低于氯气组, 可能这两组在预处理的过程中氧化了一些有毒有害物质, 使其再用氯气消毒时产生的消毒副产物较少, 从而降低了消毒副产物的毒性, 故其毒性没有氯气组严重。有研究发现, 预臭氧化工艺对有机物的去除效果明显优于预氯化工艺, 预加臭氧能有效去除源水中大量的三卤甲烷氯前体物, 使滤后水在经氯化 (消毒) 时, 三卤甲烷的生成量甚微^[10]。本研究结果显示这 3 种不同预处理方法消毒水中 NOCs 均可以导致体外 HepG2 细胞 DNA 的双链断裂。由于 DNA 双链断裂是人类细胞中最严重的毒性和致突变性的 DNA 损伤之一, 一般在比较严重的损伤中才被检测到, 说明该 3 种预处理方法消毒水对 HepG2 细胞造成的损伤作用较为严重。本研究结果也提示来自汉江水源水的氯化消毒饮用水中的 NOCs 对人体已经具有相当大的危害, 应引起广泛的关注。

染色体异常, 是检测 DNA 损伤的另一种敏感的方法。微核试验是检测化学毒物对染色体损伤和干扰细胞有丝分裂的快速检测方法。一般认为微核是细胞内染色体断裂或纺锤丝受影响而在细胞有丝分裂后期滞留在细胞核外的遗传物质。所以, 微核试验能检测化学毒物或物理因素诱导产生的染色体完整性改变和染色体分离改变这两种遗传学终点。这种方法现在已经运用到各种类型的细胞, 人们用它来监测遗传毒性, 筛选有潜在遗传毒性的化学物质, 预测肿瘤的放射敏感性以及肿瘤患者个体之间对放射敏感的差异, 该方法已经成为广泛使用的遗传毒理学试验之一^[11-12]。本研究发现, 3 种不同预处理消毒水和水源水中的 NOCs 均可以导致微核的形成。虽然在低浓度时, 臭氧预处理消毒水中 NOCs 所导致的微核率较氯气组和二氧化氯组低, 但是在高浓度时却没有明显的差别。这可能与高浓度的臭氧产生的副产物溴酸盐有关^[13]。水源水中的 NOCs 导致微核率较为复杂, 在低浓度 (0.2、1 mL/mL 培养基) 时较其他 3 种低, 而在高浓度 (125 mL/mL 培养基) 时比其他 3 种 (0.2、1、5 mL/mL 培养基) 的明显高, 这和彗星结果不完全一致。产生这种结果可能是与水源水中含有相当数量的有机致突变污染物有关。有机致突变物成分极为复杂, 包含有毒蓝藻产生的微囊藻毒素 (microcystins, MC)、腐殖酸、三卤甲烷等均可引起 DNA 断裂^[14]。TINWELL^[15]在研究了 8 种化学物质的遗传毒性与微核形态和大小的关系后指出, 致非整倍体原 (aneugens) 可引起大型微核 (大于细胞直径 1/4), 一般断裂剂 (clastogens) 只能引起小微核。本次研究发现的微核以小微核多见, 提示汉江水源水有机污染物多具有染色体断裂剂作用, 其主要原因可能是该水源水中的 NOCs 导致的 DNA 损伤以纺锤体功能的受损为主。

DNA 损伤和染色体损伤都可以导致细胞死亡。消毒饮用水已经被证实可以减低细胞存活率。细胞存活率不仅受消毒方法的影响, 同时也受到季节变化的影响^[16]。在本研究中, 于 25、125 mL/mL 培养基浓度下所有水样的 NOCs 均可显著降低细胞的存活率。25 mL/mL 培养基浓度的臭氧组和氯气组, 以及 125 mL/mL 培养基浓度的所有水样均显著降低细胞存活率,

$P < 0.05$ 。与水源水组相比,二氧化氯组和氯气组的细胞存活率在 125 mL/mL 培养基浓度时显著降低, $P < 0.05$ 。相关性研究提示,所有水样的细胞存活率与 DNA 损伤(包括碱性和中性)和微核率有较强的相关性。DNA 损伤和染色体损伤可能是导致细胞存活率降低的主要原因。臭氧和二氧化氯预处理虽然可以降低氯化副产物,但并没有增加细胞存活率。

本研究结果表明 3 种不同预处理方法消毒水中 NOCs 均可以导致体外 HepG2 细胞的 DNA 单链和双链断裂。氯气预处理消毒水的 NOCs 引起 DNA 双链断裂最明显,二氧化氯预处理消毒水的 NOCs 引起 DNA 单链断裂的作用最强。根据以上结果可以推断氯气预处理消毒水中的 NOCs 主要导致 DNA 双链的断裂,二氧化氯预处理消毒水中的 NOCs 主要导致 DNA 单链断裂。

参考文献:

- [1] CHEH A M, SKOCHDOPOLE J, KOSKI P, et al. Nonvolatile mutagens in drinking water: production by chlorination and destruction by sulfite[J]. Science, 1980, 207(4426): 90-92.
- [2] 刘爱林, 吴建军, 鲁文清. 慧星试验检测武汉市氯化饮水有机提取物对 HepG2 DNA 的损伤[J]. 华中科技大学学报: 医学版, 2003, 32(2): 137-140.
- [3] RICHARDSON SD, PLEWA MJ, WAGNER ED, et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research[J]. Mutat Res, 2007, 636(1/2/3): 178-242.
- [4] SINGH NP, MCCOY MT, TICE RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cells Res, 1988, 175(1): 184-191.
- [5] KOPJAR N, ZELJEZIC D, VRDOLJAK AL, et al. Irinotecan toxicity to human blood cells in vitro: relationship between various biomarkers[J]. Basic Clin Pharmacol Toxicol, 2007, 100(6): 403-413.
- [6] FENECH M. The in vitro micronucleus technique[J]. Mutat Res, 2000, 455(1/2): 81-95.
- [7] VACA CE, FANG JL, SCHWEDA EK. Studies of the reaction of acetaldehyde with deoxynucleosides[J]. Chem Biol Interact, 1995, 98(1): 51-67.
- [8] LU WQ, CHEN D, WU XJ, et al. DNA damage caused by extracts of chlorinated drinking water in human derived liver cells(HepG2) [J]. Toxicology, 2004, 198(1/2/3): 351-357.
- [9] YUAN J, WU XJ, LU WQ, et al. Chlorinated River and lake water extract caused oxidative damage, DNA migration and cytotoxicity in human cells[J]. Int J Hyg Environ Health, 2005, 208(6): 481-488.
- [10] 张红专, 高乃云, 王海亮, 等. 给水预臭氧化与预氯化对比试验研究[J]. 给水排水, 2005, 31(4): 34-37.
- [11] 曹佳, 林真, 余争平. 微核实验—原理、方法学及其在人群监测和毒性评价中的应用[M]. 军事医学科学出版社, 2000.
- [12] NATARAJAN AT, DARROUDI F. Use of human hepatoma cells for in vitro metabolic activation of chemical mutagens/carcinogens[J]. Mutagenesis, 1991, 6(5): 399-403.
- [13] Von GUNTEN U. Ozonation of drinking water: Part II. Disinfection and by-product formation in presence of bromide, iodide or chlorine [J]. Water Res, 2003, 37(7): 1469-1487.
- [14] RAO PV, BHATTACHARYA R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induced DNA damage in mouse liver in vivo[J]. Toxicology, 1996, 114(1): 29-36.
- [15] TINWELL H, ASHBY J. Micronucleus morphology as a means to distinguish aneugens and clastogens in the mouse bone marrow micronucleus assay[J]. Mutagenesis, 1991, 6(3): 193-198.
- [16] MARABINI L, FRIGERIO S, CHIESARA E, et al. Toxicity evaluation of surface water treated with different disinfectants in HepG2 cells[J]. Water Res, 2006, 40(2): 267-272.

(收稿日期: 2009-04-13)

(编辑: 丁瑾瑜; 校对: 徐新春)

【告知栏】

哥白尼索引(IC)对本刊 2009 年的最新评价数据

波兰哥白尼索引(Index of Copernicus, IC)是由 Medical Science International 创办的收录医药学、生物学等信息的国际知名检索系统,是一个新的通向科学信息的世界性门户,其受众主要有:学术研究者、临床医生、相关政府机构等。该数据库网址为 <http://www.indexcopernicus.com>。

本刊自 2007 年开始被该数据库收录,于 2010 年 1 月该数据库发布了最新评价报告(Index Copernicus Journal Evaluation Report in year 2009),结果显示:2009 年本刊评价结果(IC Value)为 4.40,与 2007 年和 2008 年 IC Value(3.24 和 4.00)比较又有所提高。

衷心感谢广大国内外专家学者、作者及读者多年来给予本刊的长期关注和积极支持!

《环境与职业医学》编辑部