

荧光增白剂致中国仓鼠卵巢细胞微核形成与基因突变研究

缪文彬*, 蒋伟, 陈相

(上海出入境检验检疫局, 上海 200135)

摘要: **目的** 研究荧光增白剂诱导中国仓鼠卵巢细胞微核形成和基因突变的作用, 探讨荧光增白剂对体外哺乳动物细胞的遗传物质损伤机制。 **方法** 使用不同浓度的荧光增白剂 28 处理中国仓鼠卵巢细胞, 通过体外哺乳动物细胞基因突变实验和体外哺乳动物细胞微核实验检测细胞遗传物质的损伤程度。 **结果** 0.5556 mg/mL 组和 1.6667 mg/mL 组 *hprt* 基因突变频率和微核率与阴性对照组无显著性差异, 5.000 mg/mL 组 *hprt* 基因突变频率和微核率显著高于阴性对照组 ($P < 0.05$), 阳性对照组 *hprt* 基因突变频率和微核率显著高于阴性对照组 ($P < 0.01$)。 **结论** 荧光增白剂 28 可引起体外细胞的遗传物质损伤。

关键词: 荧光增白剂; 微核; 基因突变; 遗传物质损伤

Effect of fluorescent brightener on micronucleus and gene mutation of Chinese hamster ovary cells

MIAO Wen-Bin*, JIANG Wei, CHEN Xiang

(Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China)

ABSTRACT: Objective To study the effect of fluorescent brightener on micronucleus and gene mutation of Chinese hamster ovary cells (CHO), and to discuss the mechanism of genetic damage of mammalian cell *in vitro*. **Methods** The genetic damage of CHO cells treated with different concentrations of fluorescent brightener 28 was detected with the method of mammalian cell micronucleus test and mammalian cell gene mutation test *in vitro*. **Results** There was no significant difference of *hprt* gene mutation frequencies and micronucleus rates between negative control group and 0.5556 mg/mL and 1.6667 mg/mL fluorescent brightener 28 treated groups. The *hprt* gene mutation frequency and micronucleus rate of CHO cells with 5.000 mg/mL fluorescent brightener 28 were significant higher than that of negative control group ($P < 0.05$). The *hprt* gene mutation frequency and micronucleus rate of CHO cells in positive control group were significant higher than that of negative control group ($P < 0.01$). **Conclusion** Fluorescent brightener 28 may induce genetic damage in cultured mammalian cells.

KEY WORDS: fluorescent brightener; micronucleus; gene mutation; genetic damage

基金项目: 国家质检总局科技计划项目(2011IK042)

Fund: Supported by Science and Technology Project of General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine (2011IK042)

*通讯作者: 缪文彬, 工程师, 主要研究方向为危险化学品分类。E-mail: miuwb@shciq.gov.cn

*Corresponding author: MIAO Wen-Bin, Engineer, Shanghai Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Shanghai 200135, China. E-mail: miuwb@shciq.gov.cn

1 引言

荧光增白剂是一种荧光染料。由于其能激发入射光线产生荧光显著提高纸张的白度, 因此在造纸行业中被广泛地应用。欧盟与日本已禁止荧光增白剂用于纸类食品接触材料。研究报告发现荧光增白剂 220 未能导致体外中国仓鼠细胞(V79)发生染色体畸变, 同时体内小鼠骨髓细胞微核试验和中国仓鼠精原细胞染色体损伤试验均未发现微核率增加或发生染色体畸变^[1]。致癌性试验也未发现荧光增白剂有致癌效应^[2,3]。上海市疾病预防控制中心研究发现卫生纸中荧光增白剂 Ames 试验结果为阴性^[4]。但是, 国外研究发现荧光增白剂可能会影响细胞损伤相关基因的转录, 从而影响细胞发生凋亡的基因表达^[5]。

在我国荧光增白剂还广泛用于纸张等产品中, 在日常生活中, 人们接触到含荧光增白剂的产品较多, 同时由于荧光增白剂的不易分解性质, 其可能会在人体内蓄积, 会随着接触时间的增加, 人体体内荧光物质增加, 可能对人体产生更大的危害, 但目前荧光增白剂的致遗传损伤的研究较少^[6]。为探讨荧光增白剂对体外细胞的毒性作用, 采用体外哺乳动物细胞微核实验方法和哺乳动物细胞基因突变实验方法, 评价荧光增白剂对体外细胞遗传物质的损伤作用, 为荧光增白剂致遗传损伤机制的研究提供科学依据。

2 材料与方 法

2.1 材 料

荧光增白剂 28(Sigma 公司), 纯度 >99%, 准确称量 100 mg 荧光增白剂加二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)至 2 mL 制成 50 mg/mL 的储备液, 然后按照实验要求加 DMSO 进行相应稀释。用 DMSO 作为溶剂和阴性对照, 丝裂霉素 C(sigma 公司)作为体外微核实验阳性对照物, 称取 50 mg 的丝裂霉素 C, 加 DMSO 至 2 mL。7,12-二甲基苯丙萘作为细胞基因突变实验阳性对照物, 称量 25 mg 的 7,12-二甲基苯丙萘, 加 DMSO 稀释至 5 mL。

2.2 靶细胞

靶细胞为根据 OECD 测试方法 487 和 476 推荐的 CHO-k1, 中国仓鼠卵巢细胞株。染毒前一天, 将处于对数生长期, 生长状态良好的 CHO 细胞消化、计数。根据设定的供试品浓度组别数, 对照组别数,

及双份培养要求准备好相应数量的 100 mm 平皿, 每个平皿内加入完全培养液, 接种细胞, 至总体积为 10 mL。平皿放入 37 °C CO₂ 培养箱内培养 24 h。

2.3 四甲基偶氮噻唑蓝(MTT)实验^[7]

预试验将 CHO 细胞暴露于荧光增白剂 28, 加 MTT 培养 4 h, 加 DMSO 溶解细胞, 在酶标仪上测 OD₅₇₀ 并计算 IC₅₀, 荧光增白剂 28 在 5000 µg/mL 浓度下产生沉淀, 并产生约 60% 的细胞生长抑制率, 因此本实验条件下将最高浓度定为 5 mg/mL。

靶细胞培养贴壁后, 加入不同浓度的受试物, 使其终浓度分别为 5.000、1.6667、0.5556 mg/mL 的培养液, 同时设阴性对照组和不加细胞的空白对照组, 于作用结束前 4 h 加入 50 µL MTT, 弃去培养液, 每孔加 150 µL DMSO, 振荡 5 min, 充分混合以溶解细胞内紫色结晶物, 测定各孔吸光度值。计算细胞抑制率, 并计算细胞生长半数抑制浓度。

2.4 体外哺乳动物细胞微核实验

双份培养。设空白、溶剂对照组和阳性对照组。靶细胞培养 24 h 结束后进行染毒步骤, 吸去培养皿中的培养液。按设定浓度在每皿中分别加入 0.1 mL 荧光增白剂或对照物(100×)、加入基础培养液至总体积为 10 mL, 放入二氧化碳培养箱中培养 6 h。染毒结束后, 吸去含受试物的培养液, 用 5 mL 磷酸盐缓冲液轻轻洗 2 次, 加入 10 mL 完全培养液, 放入 CO₂ 培养箱, 继续培养 18 h 后收获细胞, 用胰蛋白酶溶液消化细胞, 待细胞脱落, 加入培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。离心(1500 r/min, 5 min), 弃去上清液后, 加入 0.075 mol/L 氯化钾溶液低渗处理 30 min。离心后, 再以甲醇/冰醋酸液固定 2 次。按常规滴片干燥, 用姬姆萨应用液染色 15 min 左右。每份滴片选 1000 个分散良好的细胞进行微核分析, 并记录含有微核的细胞数, 算出平均微核细胞率(%)^[8]。

2.5 体外哺乳动物细胞基因突变实验

靶细胞培养 24 h 结束后进行染毒步骤, 吸去培养皿中的培养液。按设定浓度在每皿中分别加入基础培养液, 0.1 mL 荧光增白剂或对照物(100×)及 2 mL 的 S9 混合液, 至总体积为 10 mL, 放入二氧化碳培养箱中培养 4 h。染毒结束后, 吸去含受试物的培养液, 用 5 mL 磷酸盐缓冲液轻轻洗 2 次, 加入 10 mL 完全培养液, 放入 CO₂ 培养箱, 继续培养 20 h 后收获

细胞,用胰蛋白酶溶液消化细胞,待细胞脱落,加入培养液并混匀以终止胰蛋白酶作用。将消化的细胞按每 100 mm 直径平皿接种 200 个,每组做 3 个平行,37 °C 培养 10 d,对细胞进行 Giemsa 染色,计数各平皿细胞克隆数和相对克隆形成率。在染毒后将每组细胞继续培养 9 d,确保突变有足够的时间表达 6-硫代鸟嘌呤(6-thioguanine, 6-TG)抗性。表达结束后,消化细胞,同时计数传代时细胞的总数,分两组接种,一组不加 6-TG,做 3 个平行,37 °C 培养 12 d,对细胞进行 Giemsa 染色,计数各平皿细胞克隆数和相对克隆形成率。另一组加 6-TG(终浓度为 10 μg/mL),做 3 个平行,培养 12 d 后 Giemsa 染色,计数平皿内突变克隆数,计算 *hprt* 基因突变频率^[9]。

2.6 统计分析

采用 Excel 建立数据库,SPSS 12.0(美国 SPSS 公司)进行数据分析。应用单因素方差分析染毒剂量对体外细胞微核率和体外细胞 *hprt* 基因突变频率的影响。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

3 结果与分析

3.1 荧光增白剂细胞毒性情况

细胞毒性试验结果显示荧光增白剂 28 有较弱的细胞毒性(相对活性均大于 70%),见表 1。

表 1 荧光增白剂细胞毒性($\bar{x} \pm SD$)

Table 1 Cytotoxicity of fluorescent brightener ($\bar{x} \pm SD$)

组别	浓度(mg/mL)	相对活性(%)
阴性对照组	0	100
0.5556 mg/mL 组	0.5556	119.0±1.0
1.6667 μg/mL 组	1.6667	82.4±9.0
5.000 μg/mL 组	5.000	71.8±12.0
阳性对照组		90.8±14.9

3.2 荧光增白剂致体外哺乳动物细胞微核数比较

阳性对照组体外细胞微核数显著高于阴性对照组($P<0.01$),表明该细胞模型建立成功。与阴性对照组相比,0.5556 mg/mL 组和 1.6667 mg/mL 组体外细胞微核率无显著性升高,5.000 mg/mL 组的体外细胞微核率显著高于阴性对照组($P<0.05$),见表 2。5.000 mg/mL 荧光增白剂 28 的微核率与阴性对照组存在显著性差异,表明荧光增白剂有一定的遗传物质损伤

作用。随着染毒剂量的升高,体外细胞微核率升高,存在一定的剂量-反应关系。

表 2 荧光增白剂致体外哺乳动物细胞微核数($\bar{x} \pm SD$)
Table 2 Effect of micronucleus induced by fluorescent brightener in CHO cells ($\bar{x} \pm SD$)

组别	浓度(mg/mL)	微核率(%)
阴性对照组	0	4.40±0.67
0.5556 mg/mL 组	0.5556	5.99±1.43
1.6667 mg/mL 组	1.6667	4.00±0.00
5.000 mg/mL 组	5.000	8.46±0.77*
阳性对照组		31.44±0.62**

注:与阴性对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

3.3 荧光增白剂致中国仓鼠卵巢细胞基因集落形成效率和突变频率

在有外源性活化代谢系统下,阳性对照组 *hprt* 基因突变频率显著高于阴性对照组($P<0.01$),见表 3,表明该细胞模型建立成功。0.5556 mg/mL 组、1.6667 mg/mL 组 *hprt* 基因突变频率与阴性对照组无显著性差异,5.000 mg/mL 组 *hprt* 基因突变频率显著高于阴性对照组($P<0.05$)。表明荧光增白剂 28 达到一定剂量后可能对 CHO 细胞 *hprt* 基因具有致突变性。

表 3 荧光增白剂致中国仓鼠卵巢细胞基因突变作用($\bar{x} \pm SD$)

Table 3 Effect of gene mutation induced by fluorescent brightener in CHO cells ($\bar{x} \pm SD$)

组别	集落形成效率(%)	基因突变频率($\times 10^{-5}$)	P^*
阴性对照	64.2±9.9	6.9±4.6	
0.5556 mg/mL 组	72.8±7.6	8.6±2.5	0.932
1.6667 mg/mL 组	46.2±31.8	13.2±7.6	0.116
5.000 mg/mL 组	75.0±12.9	14.7±4.0	0.039
阳性对照(5 μg/mL)	60.0±5.0	20.7±4.5	<0.001

注:* P 值为各染毒组的基因突变频率与阴性对照组比较。

4 讨论

微核的出现表明细胞的遗传物质发生损伤,可见于新的分裂的细胞中,可能是由于放射、有害化学物和基因组的随机突变导致。微核可能含有整个染色体或染色单体的一部分。微核的增加通常表明 DNA

损伤或突变的加重。在癌细胞或暴露于危险因素的细胞中会出现微核^[10]。体外哺乳动物细胞 *hprt* 基因突变试验利用受试物诱导细胞 *hprt* 基因发生突变, 其相应的酶的活性降低或失活, 从而导致 *hprt* 基因突变的细胞能够在 6-TG 的培养液中存活, 因此达到具有抗性的细胞的克隆和阳性筛选的目的, 用克隆形成率评价细胞毒性和克隆效率, 通过计算突变频率来反映受试物的致突变性^[11,12]。

微核是在细胞分裂时未能与其他染色体集中而遗留在胞质中的核外遗传物质, 从而导致染色体或染色单体的一部分存在于子细胞中。微核也可以作为细胞防御过程中产生, 如果细胞发现有异常的核外染色体, 细胞会尝试用细胞膜隔离, 并与其他正常的染色体分开。DNA 双链断裂也可产生微核, 形成一个单独的线性片段^[13,14]。

本研究结果表明, 5.000 mg/mL 荧光增白剂 28 的微核率与阴性对照组存在显著性差异, 具有遗传物质的损伤作用。0.5556 mg/mL 和 1.6667 mg/mL 剂量时均与对照组的微核率无显著性差异。荧光增白剂 28 在无外源性代谢活化系统条件下已可导致遗传物质损伤, 可损伤哺乳动物体细胞的染色体。

荧光增白剂 28 作用于 CHO 细胞后, 0.5556 mg/mL 组、1.6667 mg/mL 组 *hprt* 基因突变频率与阴性对照组无显著性差异, 但在 5.000 mg/mL 组 *hprt* 基因突变频率与阴性对照组存在显著性差异。有研究报告 *hprt* 基因突变的检出率明显高于染色体畸变, 因为 *hprt* 基因突变为不可逆的突变, 从而确保了该突变长期存在并在体内蓄积, 而染色体畸变由于其不稳定可能随着时间的延长而缺失^[15]。本研究组先前研究结果显示荧光增白剂 28 对中国仓鼠肺细胞无染色体畸变作用, 而本研究显示荧光增白剂 28 具有 *hprt* 基因突变作用, 也说明了可能存在此种机制。

本研究将为后续的荧光增白剂的致突变和致癌机制研究提供一定的依据。但本研究存在一定的局限性, 只研究了无外源性活化系统下荧光增白剂 28 对 CHO 细胞的遗传物质损伤作用, 未研究在有外源性活化系统下荧光增白剂 28 对 CHO 细胞的遗传物质损伤作用, 可能对于需要经过代谢活化发挥作用的化学物存在检测缺失。

参考文献

[1] 董仲生, 王振元, 董斯航. 荧光增白剂 220 的毒理学数据和其

使用安全性[J]. 造纸化学品, 2015, 27(2): 1-9.

Dong ZS, Wang ZY, Dong SH. Toxicological data and safety of fluorescent whitening agent 220 [J]. Paper Chem, 2015, 27(2): 1-9.

[2] 郭惠萍, 张美云, 刘亚恒. 荧光增白剂的毒性分析[J]. 湖南造纸, 2007, 4: 43-45.

Guo HP, Zhang MY, Liu YH. Analysis on the toxin of fluorescent whitening agents [J]. Hunan Papermaking, 2007, 4: 43-45.

[3] 董仲生. 从洗涤剂用荧光增白剂 CXT 的毒理学数据看其使用安全性[J]. 中国洗涤用品工业, 2012, 4: 22-34.

Dong ZS. The safety of the use of fluorescent whitening agent CXT in detergent according the toxicological data [J]. China Cleaning Ind, 2012, 4: 22-34.

[4] 仲伟鉴, 董妙珠, 肖萍, 等. 卫生纸中荧光增白剂的光毒、光敏和致突变性研究[J]. 上海预防医学, 1999, 11(11): 521-523.

Zhong WJ, Dong MZ, Xiao P, *et al.* Study on phototoxicity, photoallergy and mutagenicity of fluorescent whitening agents (FWAs) used in toilet paper [J]. Shanghai J Pre Med, 1999, 11(11): 521-523.

[5] Jung H, Seok SH, Han JH, *et al.* Effect of fluorescent whitening agent on the transcription of cell damage-related genes in zebrafish embryos [J]. J Appl Toxicol, 2012, 32(9): 654-661.

[6] 沈永嘉, 许煦. 荧光增白剂的毒性[J]. 化工科技市场, 2002, 25(8): 5-8.

Shen YJ, Xu X. Toxic properties of fluorescent whitening agents [J]. Chem Technol Market, 2002, 25(8): 5-8.

[7] 贾光, 刘世杰. 应用台盼兰拒染法与 MTT 法判断 Cr(VI)细胞毒性的比较[J]. 中国职业医学, 2000, 27(3): 49.

Jia G, Liu SJ. Application of trypan blue exclusion method and MTT method to determine Cr(VI) cell toxicity [J]. China Occupat Med, 2000, 27(3): 49.

[8] Organization for Economic Cooperation and Development. *In vitro* mammalian cell micronucleus test [R]. Paris: OECD, 1997.

[9] Organization for Economic Cooperation and Development. *In vitro* mammalian cell gene mutation test [R]. Paris: OECD, 1997.

[10] Iarmarcovai G, Ceppi M, Botta A, *et al.* Micronuclei frequency in peripheral blood lymphocytes of cancer patients: a meta-analysis [J]. Mutat Res-Rev Mutat, 2008, 659(3): 274-283.

[11] 周建华, 薛莲, 杜鹃, 等. 镉和氯化汞致体细胞 *hprt* 基因位点突变的作用和突变频率的研究[J]. 工业卫生与职业病, 2002, 28(3): 129-132.

Zhou JH, Xue L, Du J, *et al.* Study on the frequency of Cd and HgCl₂ induced *hprt* locus mutation and its dose-effect relationship [J]. Ind Health Occupat Dis, 2002, 28(3): 129-132.

[12] 薛莲, 周建华, 汪珂, 等. 氯化汞诱发人离体血细胞 *hprt* 基因位点突变频率的研究[J]. 工业卫生与职业病, 2001, 27(1):

- 23–25.
- Xue L, Zhou JH, Wang K, *et al.* Study on the frequency of HgCl₂ induced hprt locus mutation and its dose-effect relationship [J]. *Ind Health Occupat Dis*, 2001, 27(1): 23–25.
- [13] Terradas M, Martín M, Tusell L, *et al.* DNA lesions sequestered in micronuclei induce a local defective-damage response [J]. *DNA Repair*, 2009, 8(10): 1225–1234.
- [14] Chang P, Li Y, Li D. Micronuclei levels in peripheral blood lymphocytes as a potential biomarker for pancreatic cancer risk [J]. *Carcinogenesis*, 2011, 32(2): 210–215.
- [15] Muir P, Osborne Y, Morley AA, *et al.* Karyotypic abnormality of

the X chromosome is rare in mutant HPRT-lymphocyte clones [J]. *Mutation Research-fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 1988, 197(1): 157–160.

(责任编辑: 白洪健)

作者简介



缪文彬, 工程师, 主要研究方向为化学品风险评估。

E-mail: miuwb@shciq.gov.cn