

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20151126003

王五香, 高丹, 廖芬, 等. 蚕豆根尖微核技术的方法学新论[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3): 86-91

Wang W X, Gao D, Liao F, et al. New views on the methodology of micronucleus assay with *Vicia faba* root tip cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(3): 86-91 (in Chinese)

蚕豆根尖微核技术的方法学新论

王五香^{1,2}, 高丹¹, 廖芬¹, 周芙蓉¹, 封少龙^{1,*}

1. 南华大学公共卫生学院, 衡阳 421001

2. 南华大学图书馆, 衡阳 421001

收稿日期: 2015-11-26 录用日期: 2016-01-08

摘要: 虽然蚕豆根尖微核技术已是一个成熟规范的检测污染物遗传毒性的方法, 但其中仍涉及一些重要的方法学问题值得深入探讨和研究。本文在图示正确观测蚕豆根尖细胞内微核和染色体畸变, 如染色体断裂、丢失及染色体桥等的基础上, 提出应该对蚕豆根尖分裂相细胞及其染色体畸变进行观测, 以便更加准确、细致地反映污染物作用的剂量-效应关系和分子机制。同时还就该方法的其他重要问题提出了自己的观点, 供同行们深入探讨和研究, 使之不断完善, 更好地服务于环境监测和风险评估等领域。

关键词: 蚕豆; 微核; 染色体畸变; 形态学; 方法学

文章编号: 1673-5897(2016)3-086-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

New Views on the Methodology of Micronucleus Assay with *Vicia faba* Root Tip Cells

Wang Wuxiang^{1,2}, Gao Dan¹, Liao Fen¹, Zhou Furong¹, Feng Shaolong^{1,*}

1. The School of Public Health, University of South China, Hengyang 421001, China

2. The Library, University of South China, Hengyang 421001, China

Received 26 November 2015 accepted 8 January 2016

Abstract: Although the micronucleus assay with *Vicia faba* root tip cells is a canonical way to detect the genotoxicity of environmental pollutants, there are still some important issues that are worth in-depth discussion and investigation in its methodology. After illustrating how to correctly observe the micronucleus and chromosome aberrations, including chromosome fragment, chromosome loss and chromosome bridge, in the *Vicia faba* root tip cells we suggested that the dividing-phase cells and their chromosome aberrations should be taken account of in this assay, in order to more precisely and delicately determine the dose-effect relationship and potential molecular mechanisms than before. Other important issues about its methodology were also presented for our colleagues to discuss and explore deeply. The aim is to improve this assay to better serve the environmental monitoring and risk assessment.

Keywords: *Vicia faba*; micronucleus; chromosome aberration; morphology; methodology

基金项目: 湖南省教育厅重点项目(12A118); 南华大学归国学者启动基金(2012XQD44); 南华大学研究生教育教改项目(2014JG015)

作者简介: 王五香(1970-), 女, 中级职称, 研究方向为环境污染物的生态与健康影响机制, E-mail: wxwang_feng@126.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: slfeng71@usc.edu.cn

环境污染物的遗传毒性一直是人们最关心的问题^[1-2]。微核是环境污染物诱导细胞染色体结构和数目变异的结果,被广泛用作指示污染物遗传毒性的细胞生物标志物^[3-6]。

蚕豆根尖微核技术由于准确、快速、有明显的剂量-效应关系等特点,操作简便、适于大批量样品的检测等优点,特别是可以直接检测或监测实际环境样品的遗传毒性,样品不需要复杂的前处理,没有浓缩,直接反映了实际环境的本来情况,被广泛应用于辐射损伤、化学诱变、环境监测及风险评估等领域^[6-9]。许多国家和世界组织,如中国、美国、日本、欧盟成员国、联合国环境规划署及世界卫生组织等,都把它作为一种常规的环境污染检测指标^[9-11]。

虽然发展到现在,蚕豆根尖微核技术已是一个成熟规范的方法,但笔者根据10多年从事该技术的经验,觉得其中仍涉及一些问题值得深入探讨和研究。

1 染色体畸变与微核 (Chromosome aberration and micronucleus)

染色体畸变是指生物细胞染色体数目和结构的变异。由于环境遗传毒物作用所引起的细胞DNA或染色体损伤,如得到不及时正确的修复,在有丝或减数分裂过程中将形成染色体断裂片或双着丝点染色体。这些染色体断片由于缺少着丝点,在分裂过程中,得不到纺锤丝的牵引,不能运动到达两极的子核中去,留在细胞质中形成微核^[3]。通过这种方式形成的微核通常体积小(图1A)。而双着丝点的染色体

则在细胞分裂的后期和末期形成染色体桥,最终形成染色质桥连接两子细胞(图1D-G)。Fenech等^[12]认为染色体(质)桥是检测染色体重排的敏感指标。此外,环境污染物也可能干扰有丝分裂器的正常生理功能,影响部分染色体的正常分离到子细胞中去,使一个或几个染色体滞后(或称染色体丢失),不能进入两极的子细胞核,留在细胞质中,形成微核。通过这种方式形成的微核通常较大或形成几个微核(图1B、C)。

为使初学者建立染色体畸变与微核的直观认识,本文首先图示了中期、后期和末期染色体断裂和丢失,并联系了微核的形成(图2)。如图2, A、D和G分别示出了中期、后期和末期染色体断裂,其中的染色体断裂片经有丝分裂后,可形成如图1A所示的微核;B为两极各有一染色体丢失的中期相细胞,经有丝分裂后,可在两个子细胞中都形成微核(图2C);E和H分别为后期和末期染色体丢失,经有丝分裂后,可形成图1B、C或图2C、F样的微核。

虽然微核的形成是染色体畸变的结果,但现有蚕豆根尖微核试验的规范中,只要求观察计录处于细胞分裂间期的微核细胞,而忽视了分裂期细胞的遗传损伤,没有要求计录和统计上述的染色体畸变(图2),现有文献也未见报道。从剂量-效应关系上来看,现有的蚕豆根尖微核试验可能“减轻”了环境污染物的遗传毒性。因此,在蚕豆根尖微核试验中,是否计录和统计分析染色体畸变(如染色体断裂、染色体丢失和染色体桥等),以及这些数据所能反映出的污染物作用机理及剂量关系等,值得讨论和深入研究。

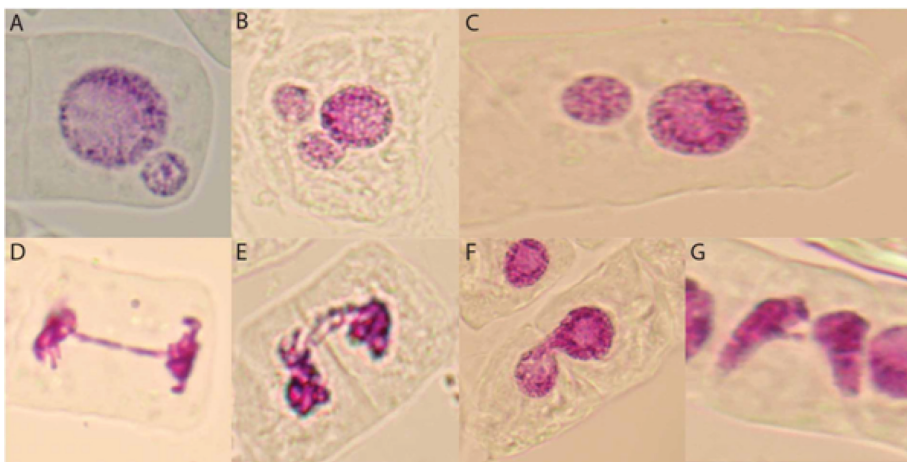


图1 蚕豆根尖微核与染色体桥

注:A. 小微核;B. 多微核;C. 大微核;D. 末期染色体桥;E. 前期染色体桥;F、G. 染色质桥。

Fig. 1 The micronucleus and chromosome bridge in *Vicia faba* root tip cells

Note: A. small micronucleus; B. multi-micronucleus; C. large micronucleus; D. telophase chromosome bridge;

E. prophase chromosome bridge; F, G. chromatin bridge.

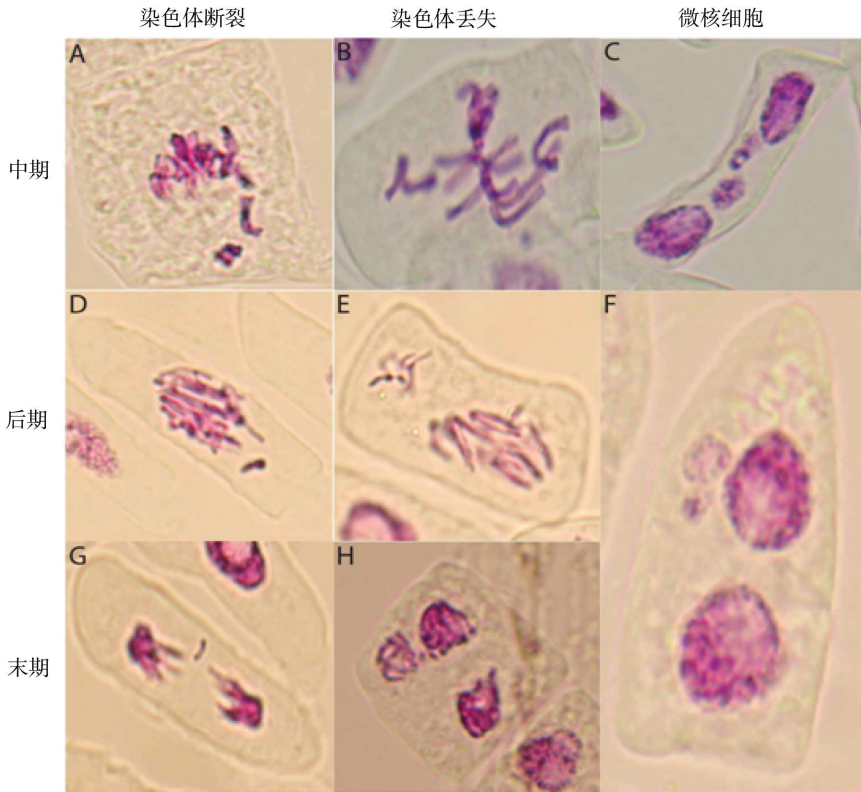


图 2 染色体断裂、丢失与微核形成

注:A. 中期染色体断裂;B. 中期染色体丢失;C. 两子细胞各含一微核;D. 后期染色体断裂;E. 后期染色体丢失; F. 含多个微核的细胞;G. 末期染色体断裂;H. 末期染色体丢失。

Fig. 2 The chromosome fragment, chromosome loss and formation of micronucleus

Note: A. metaphase chromosome fragment; B. metaphase chromosome loss; C. the daughter cells containing a micronucleus respectively; D. anaphase chromosome fragment; E. anaphase chromosome loss; F. multi-micronucleus in a cell; G. telophase chromatin fragment; H. telophase chromatin loss.

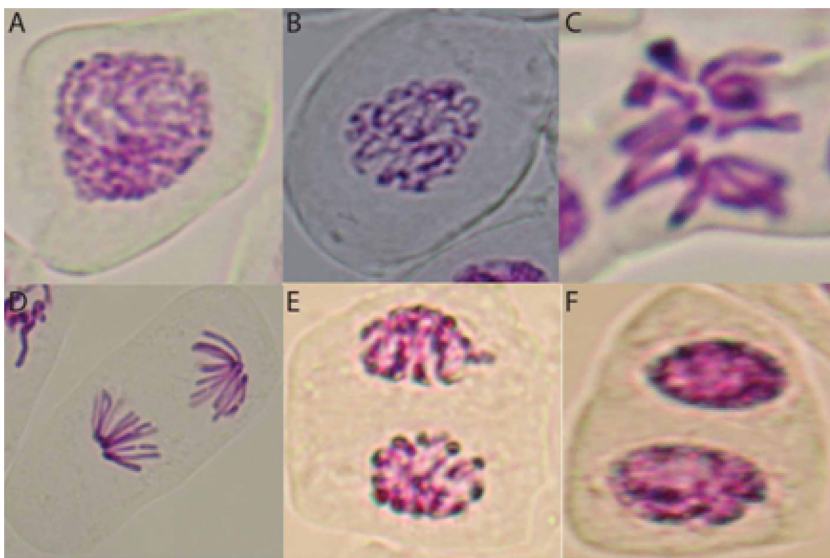


图 3 蚕豆根尖细胞有丝分裂特征

注:A. 前期;B. 前中期;C. 中期;D. 后期;E. 末期;F. 子细胞。

Fig. 3 The mitosis characteristics of *Vicia faba* root tip cells

Note: A. prophase; B. prometaphase; C. metaphase; D. anaphase; E. telophase; F. daughter cells.

2 细胞分裂与微核(Cell division and micronucleus)

细胞周期是指细胞一次分裂结束开始生长,到下一次分裂终止所经历的过程。细胞周期是生长与繁殖的周期,一个生物体通过细胞分裂,才能达到生长与繁殖的目的。因此,细胞分裂对生物的个体维持与种族绵延都有着十分重要的意义^[13]。生物对其细胞周期的调控是非常严密的,受多种效应-抑制因子的平衡调节,如: cyclins, cyclin-dependent kinase 及 cdk inhibitors: p27^{Kip1}, p21^{Waf1/Cip1}, p15^{INK4B}, p16^{INK4A}等^[14-16]。有多少个细胞进入下一次有丝分裂及细胞分裂所经历的时间等都是相对稳定的,不同种类和功能的细胞不同。在环境条件稳定的情况下,蚕豆根尖分生组织在各生理时期,分裂相细胞数及其各分裂期(前、中、后和末期,图3)细胞数的比率是在一个相对恒定的范围内。但在污染的胁迫下,细胞周期会发生改变^[7-9,17]。分裂相细胞数或各时期细胞频率的变化,从一定的侧面反映了污染物对细胞周期的影响。而且蚕豆根尖细胞的染色体或DNA受损伤之后,只有经过至少一次的有丝分裂才能形成微核,因此,进入有丝分裂的细胞数直接影响着微核率的高低。我们的研究表明,当污染物的浓度高,影响蚕豆根尖细胞分裂时,其微核率反而降低^[7-9]。而现有的蚕豆根尖微核技术的规范中没有要求记录有丝分裂相的细胞数,在现有的应用蚕豆根尖微核技术进行研究的文献中,也没有记录其试验中分裂相细胞数,或者只是定性描述。因此,在蚕豆根尖微核试验中,是否应该定量记录并统计分析分裂相各个时期细胞数,值得我们深入研究和探讨。

3 其他方法学问题(Other methodological issues)

3.1 微核的识别

特别重要的是微核的识别,这直接关系到数据的可靠性。微核是一种在细胞核(主核)以外,游离于细胞质中的小核,其中含有小块染色质断片或完整的染色体。在形态上:比主核小;染色质的密度、着色方式和折光等与主核相似;周围形态清晰可辨,表示核膜的存在;近圆形,与主核完全分离;与主核在同一个光学平面;与主核共处一个细胞质中^[9](如图1,2)。因此,微核的识别应从大小、着色深浅、有无染色质颗粒和折光率等几方面进行判断,但初学者凭文字的描述是难于进行判断的,要在熟练技术人员的指导下学习一段时间才能掌握。如图4,A是微核细胞,而B不是微核细胞。

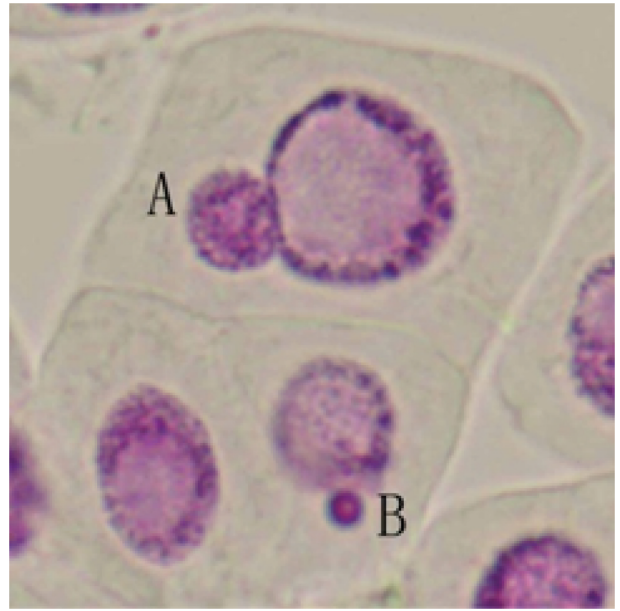


图4 微核的识别

注:A. 微核细胞;B. 假微核细胞。

Fig. 4 The identification of micronucleus

Note: A. a micronucleus-containing cell;

B. a fake-of-micronucleus-containing cell.

3.2 染毒剂量

染毒剂量要根据预试验的结果来定,预试验的目的不仅在于保证染毒的最高剂量不会使根尖细胞产生致死效应,也在于确定剂量-效应关系最敏感的受试物浓度范围。有试验证明,不同诱变机理的诱变剂在蚕豆根尖微核试验中诱发的微核率与浓度、时间等参数的曲线关系也不一样,既有S-型曲线,又有非S-型曲线^[2]。因此,预试验是相当必要的。

3.3 蚕豆品种、本底微核率与统计分析

选用对污染物敏感的蚕豆品种,是检出污染物遗传毒性的重要条件。华中师大生物系金波等^[17]从14个蚕豆品种中筛选出了敏感品种松滋青皮豆;农业部环保所从30个蚕豆品种筛选出了敏感品种上于田鸡青等。松滋青皮豆和上于田鸡青都是试验中值得选用的蚕豆品种。

本底微核率是试验成功的关键之一。有人提出在正常情况下,本底微核率不应高于千分之十^[18]。孔志明教授和笔者^[7-9]采用松滋青皮豆为材料(华中师大生命科学院金波提供),通过多年的研究发现,所有试验的微核本底都小于千分之五。本底以千分之十为上限是否合适,还有待于进一步的研究。本底太高,可能反映出试验条件、方法或试剂等需要重新检查,而微核判断的标准也应在考虑之列。

陈光荣等^[19]在利用蚕豆根尖微核技术监测水质污染时,引入化学监测中“污染指数”(Pollution Index, PI)的概念,用水质污染指数 = 样品实测 MN%₀ 平均值/对照组 MN%₀ 平均值的大小来划分水质污染的程度,并在实地监测中得出:PI 在 0~1.5 为基本没有污染;1.5~2.0 为轻度污染;2.0~3.5 为中度污染;3.5 以上为严重污染。用“污染指数”来表示水质污染程度,大大简化数据的统计处理,又可防止本底微核率的波动性带来的影响。

通过微核率的多少来反映环境中污染物的量,对于指示环境质量具有重要意义。但微核率的计算是:(含微核的细胞数÷观察细胞总数)×1 000,不论细胞中微核大小和个数的多少都作一个细胞计。一个细胞中含有多个微核或含有一个大微核(如图 1)所反映的作用于该细胞的污染物量与只引起细胞产生一个小微核的污染物量是否相同?有待进一步的研究。如前所述,引起细胞产生多个微核或大微核与只引起产生一个小微核的作用机理可能存在差异^[2]。有关细胞中含有多个微核或大微核是否应该与一个细胞中只含一个小微核分别统计和处理,在当前蚕豆根尖微核技术的规范中并没有对其加以说明或解释,有待进一步的讨论和研究。

4 结论与展望(Conclusion and perspective)

蚕豆根尖微核技术自建立,经过学者们的共同努力和国际社会的多方合作,到现在已经是一个成熟规范的检测污染物遗传毒性的方法。如前所述,笔者认为蚕豆根尖微核技术能告诉我们的不仅仅是微核细胞率,还应该包括染色体畸变数、细胞分裂周期变化等反映污染物不同作用机制方面的信息,是一个综合性的试验方法。因此,在方法学上还有许多问题值得人们深入思考和研究。特别是,如能与现代生命科学新理论与技术(如基因组学、功能基因组学及代谢组学等)相结合,它将在环境监测、风险评估和污染物的作用机制等方面发挥更大的作用。当然,这其中还需要青年工作者的投入和不懈努力。

通讯作者简介:封少龙(1971—),男,环境科学博士,教授,主要研究方向环境毒理学,发表学术论文 30 多篇。

参考文献(References):

[1] Araldi R P, de Melo T C, Mendes T B, et al. Using the comet and micronucleus assays for genotoxicity studies: A review [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2015, 72:

74-82

- [2] Guerard M, Baum M, Bitsch A, et al. Assessment of mechanisms driving non-linear dose-response relationships in genotoxicity testing [J]. *Mutation Research - Review*, 2015, 763: 181-201
- [3] Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus cytome assay [J]. *Nature Protocols*, 2007, 2(5): 1084-1104
- [4] Bolognesi C, Bonassi S, Knasmueller S, et al. Clinical application of micronucleus test in exfoliated buccal cells: A systematic review and metanalysis [J]. *Mutation Research - Review*, 2015, 766: 20-31
- [5] Xu X, Huang Z, Wang C, et al. Toxicological effects, mechanisms, and implied toxicity thresholds in the roots of *Vicia faba* L. seedlings grown in copper-contaminated soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(18): 13858-13869
- [6] Iqbal M. *Vicia faba* bioassay for environmental toxicity monitoring: A review [J]. *Chemosphere*, 2015, 144: 785-802
- [7] Feng S, Mai B, Wei G, et al. Genotoxicity of the sediments collected from Pearl River in China and their polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and heavy metals [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2012, 184(9): 5651-5661
- [8] Feng S, Cao Z, Yang Y, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons, heavy metals, and genotoxicity of the suburban soils from Guangzhou, China [J]. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2013, 33(5): 501-518
- [9] Feng S, Wang X, Wei G, et al. Leachates of municipal solid waste incineration bottom ash from Macao: Heavy metal concentrations and genotoxicity [J]. *Chemosphere*, 2007, 67(6): 1133-1137
- [10] Ma T H. The international program on plant bioassays and the report of the follow-up study after the hands-on workshop in China [J]. *Mutation Research*, 1999, 426(2): 103-106
- [11] EPA. Current Status of Bioassays in Genetic Toxicology (Gene-Tox) [M]. USEPA Publication, 1980: 1-69
- [12] Umegaki K, Fenech M. Cytokinesis-block micronucleus assay in WIL2-NS cells: A sensitive system to detect chromosomal damage induced by reactive oxygen species and activated human neutrophils [J]. *Mutagenesis*, 2000, 15(3): 261-269
- [13] 杨抚华. 医学细胞生物学(第 6 版)[M]. 北京: 科学出版社, 2010: 176-183
- [14] Kareta M S, Sage J, Wernig M. Crosstalk between stem cell and cell cycle machineries [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2015, 37: 68-74

- [15] Dalton S. Linking the cell cycle to cell fate decisions [J]. *Trends in Cell Biology*, 2015, 25(10): 592-600
- [16] Eichmann R, Schafer P. Growth versus immunity--A redirection of the cell cycle [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2015, 26: 106-112
- [17] 王映雪. 微核技术在环境监测中的应用概况[J]. *云南环境科学*, 2000, 19(4): 53-55
Wang Y X. Application of micronucleus technology on environmental monitoring [J]. *Yunnan Environmental Sciences*, 2000, 19(4): 53-55 (in Chinese)
- [18] 臧宇, 薛开先. 蚕豆根尖微核试验的应用与发展[J]. *癌变畸变突变*, 1999, 11(3): 158-160
Zang Y, Xue K. The application and development of micronucleus assay of *Vicia faba* [J]. *Carcinogenesis, Teratogenesis and Mutagenesis*, 1999, 11(3): 158-160 (in Chinese)
- [19] 胡振东. 蚕豆微核测定技术及应用[J]. *淮北煤师院学报:自然科学版*, 2000, 21(4): 65-69
Hu Z. The study and applicaion of micronucleus test technique in *Vicia faba* [J]. *Journal of Huaibei Coal Industry Normal College: Natural Sciences Edition*, 2000, 21(4): 65-69 (in Chinese) ◆