

饮用塘水基因毒性和致癌性的实验研究*

The Experimental Study on Genotoxicity and Carcinogenesis of Drinking Pond Water

张丽生 张力图 黄少珍 郭建霞 覃国忠
Zhang Lisheng Zhang Litu Huang Shaozhen Guo Jianxia Qing Guozhong

(广西肿瘤研究所 南宁市滨湖路 6号 530021)

(Guangxi Cancer Institute, 6 Binhu Road, Nanning, Guangxi, 530021)

摘要 采用综合配套的实验研究方法,对广西某肝癌高发区饮用塘水的基因毒性和致癌性进行了系统研究。结果发现:饮用塘水对真核细胞有明显的诱变性,阳检率为 93.3%;从幼年年开始饮用塘水的儿童和成年男性居民,其周围淋巴细胞的遗传毒理学指标均有不同程度的损伤,显示塘水对人体细胞有遗传毒性作用;塘水浓缩物对人和大鼠原代肝细胞非程序 DNA 合成试验均呈阳性反应,且有剂量-效应关系;塘水浓缩物有明显诱发大鼠肝癌前病变的作用,并在长期诱变试验中显示出与黄曲霉毒素 B₁ 协同诱发大鼠肝癌的作用。研究结果揭示和论证了饮用塘水在肝癌病因学中的地位和作用。

关键词 饮用塘水 原发性肝癌 基因毒性 致癌性

Abstract The genotoxicity and carcinogenesis of drinking pond water in high incidence area of liver cancer in Guangxi was systematically studied using the systematic experimental methods. Drinking pond water had significant to eucells mutagenicity, and the positive rate was 93.3%. The cytogenotoxic index indicated in the cultured peripheral lymphocytes from children and adults who had been drinking the pond water since their childhood had damage in different degree, suggesting that the pond water had cytogenicity to human somatic cells. The unscheduled DNA synthesis response of the primary cultured human-hepatocyte or rat hepatocyte to the pond water concentrates were positive and had good dose-response relationship. The pond water concentrates play significant role in inducing pre-hepatocarcinous pathological change, and there was synergistic hepatocarcinogenicity between the pond water concentrates and AFB₁ in the long-term model of AFB₁-induced hepatocarcinogenesis in rats. These results revealed and evidenced the effect of pond water in pathogeny of liver cancer.

Key words drinking pond water, primary hepatocarcinoma, genotoxicity, carcinogenesis

在过去的 20 年间,大量的流行病学调查表明饮水类型与肝癌关系密切,其中,饮用塘水者肝癌最为高发^[1]。但是,囿于实验室研究尚未取得令人满意的进展,饮用塘水在肝癌病因学中的地位和作用仍是一个悬而未决的难题。

自 1988 年开始,我们采用一系列国际公认先进的生物学检测技术和实验动物模型,系统地研究了广西某肝癌高发区居民饮用塘水的基因毒性和致癌

性,取得了突破性进展,本文将综合报告有关方面的研究结果。

1 材料与amp;方法

1.1 饮用塘水诱变性评价

在广西某肝癌高发区 60 个居民点中,采集 83 份饮用水样,按饮水类型分为自来水、深井水、河溪水、塘边浅井水和塘水。

饮用水诱变性的测定采用美国紫露草微核试验 (Trad-MNT),以紫露草花粉母细胞的微核率 (MNF) 作为观察指标,受试水样 MNF 显著高于对

照蒸馏水者判为阳性^[2]。与此同时,在其中的4个水样点采集了35尾鲤鱼,按鱼周血红细胞微核试验(Fish-MNT)进行测定。将水样和鱼样的检测结果进行相关分析,以综合评价饮用水的诱变性。

1.2 饮用塘水对居民细胞遗传毒性损伤

在采集水样的居民点中,以抽样确定的129名30岁(±5岁)男性居民和213名10岁(±1岁)儿童为对象,依据过去10年间黄曲霉毒素B₁(AFB₁)摄入量和同期是否饮用塘水分为4组。A组:饮用非塘水+ AFB₁低摄入者;B组:饮用塘水+ AFB₁低摄入者;C组:饮用非塘水+ AFB₁高摄入者;D组:饮用塘水+ AFB₁高摄入者。

成年男性统一采用常规方法,检测周血淋巴细胞的染色体畸变(CA)、姐妹染色单体互换(SCE)和微核(MN)等三项指标;儿童则采用核异常测试法(NAT),观察指标为MNF和核碎裂率(KNF)。

1.3 塘水浓缩物对人和大鼠肝细胞基因毒性

塘水浓缩物的制备:塘水经52℃水浴蒸发至干,碾成粉末后用二甲亚砜(DMSO)配制成所需浓度。

人原代肝细胞非程序DNA合成试验(UDS试验):取肝癌手术切除的癌周正常组织,按常规方法制备成 $\times 10^6$ 细胞/mL的肝细胞悬液,苕盼兰试验细胞存活率为91%。实验分7组,每组4个平行样品,A组:DMSO空白对照;B组:AFB₁(0.01 μ g/mL)阳性对照;C、D、E、F、G为实验组,塘水浓缩物的剂量分别为0.05 mg/mL、0.10 mg/mL、0.25 mg/mL、0.50 mg/mL和1.00 mg/mL。实验结果采用液体闪烁计数器测定³H-TdR放射性掺入量cpm值。

鼠肝原代细胞UDS试验:选用雄性Wistar大鼠,按常规方法制备成每毫升 $\times 10^6$ 个细胞的肝细胞悬液。实验分6组,每组3个平行样品。A组:DMSO空白对照;B组:AFB₁(0.01 μ g/mL)阳性对照;C、D、E、F为实验组,塘水浓缩物的剂量分别为0.10 mg/mL、0.25 mg/mL、0.50 mg/mL和1.00 mg/mL。结果分析与人肝细胞UDS相同。

1.4 塘水致大鼠肝癌作用

受试塘水样用两种方法制备。①塘水浓缩物:制备方法同前。②塘水富集物:塘水中加入0.01%“去毒灵”吸附剂(广西田东化工厂生产,广西肿瘤研究所监制),搅拌10 min后静置过夜,翌日取沉淀经50℃恒温干燥,碾成粉末备用。

短期实验:6周龄近交系雄性Wistar大鼠72只,随机分6组。A:基础饲料组;B:去毒灵组;C:AFB₁组;D:塘水浓缩物组;E:塘水富集物组;F:

塘水浓缩物+ AFB₁组。诱癌作用的观察指标为r-谷氨酰转肽酶(r-GT)、三磷酸腺苷酶(ATPase)和葡萄糖-6-磷酸酶(G-6-Pase)等三种酶变灶。基本程序按广西肿瘤研究所建立的AFB₁致大鼠肝癌作用的短期实验模型^[3]。B、D、E组分别将0.2%的去毒灵、塘水浓缩物和塘水富集物加入饲料中的代替AFB₁,F组在C组的基础上加入塘水浓缩物,加入剂量和处理时间与D组相同。

长期实验:6周龄近交系雄性Wistar大鼠160只,随机分4组。A组:基础饲料;B组:腹腔注AFB₁,每周2次,每鼠50 μ g/次,连续30周;C组:饲0.2%塘水浓缩物至实验结束;D组:注AFB₁并饲0.2%塘水浓缩物,处理与B、C组相同。实验至18个月结束,自然死亡及处死的动物,进行病理形态学检查、r-GT酶变灶分析以及统计各组动物的肿瘤发生情况。

2 结果

2.1 饮用塘水的诱变性

在各类饮用水中,诱变性阳检率以塘水和塘边浅井水(实质为塘水)最高,分别达93.3%和83.3%,而9份深井水均为阴性(表1)。Trad-MNT和Fish-MNT两种水质原位检测系统的结果有高度相关($r = 0.984, P < 0.05$) (表2)。

表1 各种饮用水诱变性阳检率的比较

Table 1 The rates of positive response to the mutagenicity in various types of drinking water

饮水类型 Type	检测数 No. samples	阳性数 No. positive	阳性率 Rates of positive response(%)
自来水 Tap water	19	2	10.53
深井水 Deep well water	9	0	0
河溪水 River and stream water	19	3	15.79
塘边浅井水 Shallow well water by pond	6	5	83.33
塘水 Pond water	30	28	93.33
合计 Total	83	38	45.78

2.2 饮用塘水对居民细胞遗传毒性损伤

成年男性居民的检测结果如表3所示,饮用塘水(B组)和AFB₁高摄入者(C组)居民的MNF、SCE和CAF等三项指标均显著高于对照(A组)居民,而

既饮塘水 AFB₁ 摄入水平也高者 (D组), MNF/CAF 则显著高于 B C组。而儿童的检测结果与成年男性的基本相似 (表 4)。

表 2 两种测定方法的 MNF比较

Table 2 Comparision between Trad-MNF and Fish-MNF

采样地点 Place of sample	Trad-MNF ($\bar{x} \pm s$) (%)	Fish-MNF ($\bar{x} \pm s$) (%)
左江 Zuojiang River (A)	5.69±1.08	1.30±0.40
汪庄水库 Wangzhang reservoir (B)	6.84±1.13	1.47±0.29
S村水塘 S village pond (C)	9.33±0.85▲*	1.90±0.39▲*
L村水塘 L village pond (D)	10.48±1.50▲*	2.33±0.71▲*

▲表示与 A比, ★表示与 B比差别有显著意义。

The difference has statistical significance ▲ compared with A, ★ compared with B.

表 3 饮用塘水对成年男性居民 MNF SCE CAF的影响

Table 3 The effect of drinking pond water on MNF SCE CAF in the blood of adults

组别 Group	MNF ($\bar{x} \pm s$) (%)	SCE/细胞 ($\bar{x} \pm s$) SCE/cell	CAF ($\bar{x} \pm s$) (%)
A	1.63±1.45	7.5±1.7	7.70±2.40
B	2.79±1.17	10.16±3.06	10.24±2.06
C	3.57±1.47▲	10.33±3.81	10.95±2.94
D	4.31±1.76▲	10.86±3.43	13.0±3.56▲*

*表示与 A比, ▲表示与 B比, ※表示与 C组差别有显著意义。The difference has statistical significance * compared with B, ▲ compared with B, ※ compared with C.

表 4 饮用塘水对儿童 MNF KNF的影响

Table 4 The effect of drinking pond water on MNF and KNF in the blood of children

组别 Group	MNF (‰)		KNF (‰)	
	$\bar{x} \pm s$	> 1.0检出率 > 1.0 rate of response (%)	$\bar{x} \pm s$	> 1.0检出率 > 1.0 rates of response (%)
A	0.45±0.34	18.52	0.19±0.36	5.56
B	0.64±0.45	29.41	0.40±0.62	15.69
C	0.67±0.42	28.00	0.46±0.65	18.00
D	0.93±0.60▲*	56.90	0.59±0.43	34.48▲

*表示与 A比, ▲表示与 B比, ※表示与 C比差别有显著意义。The difference has statistical significance * compared with A, ▲ compared with B, ※ compared with C.

2.3 塘水对人和大鼠肝细胞基因毒性

塘水浓缩物的剂量在 0.10~0.50 mg/ml 时, 其人和大鼠肝细胞 cpm 值均显著高于空白对照, 并呈现剂量-效应关系; 而当剂量为 1.00 mg/ml 时; 则 cpm 值均有所下降; 除大鼠 E F组外, 其余各组的 cpm 值均显著低于 AFB₁ 处理组 (B组) (表 5)。

表 5 塘水浓缩物 UDS试验结果

Table 5 The experimental results of pond water concentrats to UDS

分组及处理 Group and ad- ministration	人肝细胞 cpm cpm of human- hepatocytes ($\bar{x} \pm s$)	大鼠肝细胞 cpm cpm of rat-hepato- cytes ($\bar{x} \pm s$)
A DMSO	1103.25±108.87	5019.00±361.32
B AFB ₁ (0.01 μg/ml) 塘水浓缩 物 AFB ₁ (0.01 μg/ml) pond wa- ter concentrats	3418.75±400.62	11176.33±1335.68
C 0.05 mg/ml	1244.00±55.95▲	
D 0.10 mg/ml	1422.25±67.13▲	7925.00±290.74▲
E 0.25 mg/ml	1771.25±83.44▲	9344.33±696.41
F 0.50 mg/ml	2163.25±101.43▲	11078.33±43.49
G 1.00 mg/ml	1985.00±71.73▲	8781.67±316.95▲

*表示与 A比, ▲表示与 B比差别有显著意义。

The difference has statistical significance * compared with A, ▲ compared with B.

2.4 塘水致大鼠肝癌作用

短期实验统计的肝组织切片中酶变灶 (r-GT ATPase和 G-6-Pase) 的发生情况见表 6 塘水浓缩物 (D组) 和塘水富集物 (E组) 酶变灶的数量均显著高于对照 (A组); C组 (AFB₁) 和 F组 (AFB₁+ 塘水浓缩物) 酶变灶的数量和大小在两组间无显著差异, 但均显著高于其他各组; 去毒灵 (B组) 与 A组相比, 各项指标均无显著差异。

在长期实验中, r-GT 酶变灶以 AFB₁+ 塘水浓缩物组 (D组) 发生最多、最大; 塘水浓缩物组 (C组) r-GT 也比空白对照 (A组) 多、大, 差异有显著意义 (表 7)。

表 6 各组动物肝组织切片中酶变灶发生情况

Table 6 Occurrence of enzymic change foci in the liver tissue of rats

组别 Group	动物数 No. rats	灶 /cm ² focus /cm ² ($\bar{x} \pm s$)	mm ² /灶 mm ² /focus ($\bar{x} \pm s$)	灶 /cm ³ focus /cm ³ ($\bar{x} \pm s$)	mm ³ /灶 mm ³ /focus ($\bar{x} \pm s$)
A	12	0.26 ± 0.30	0.08 ± 0.03	7.1 ± 9.41	0.03 ± 0.02
B	11	0.28 ± 0.38	0.06 ± 0.03	9.22 ± 13.81	0.03 ± 0.02
C	10	15.80 ± 8.65 [*]	0.32 ± 0.11 [*]	219.24 ± 111.37 [*]	0.24 ± 0.11 [*]
D	11	1.23 ± 0.59 ^{*△▲}	0.06 ± 0.02 ^{△▲}	40.16 ± 23.92 ^{*△▲}	0.02 ± 0.01 ^{△▲}
E	11	0.62 ± 0.62 ^{*△▲}	0.06 ± 0.02 ^{△▲}	25.53 ± 31.65 ^{*△▲}	0.02 ± 0.02 ^{△▲}
F	10	15.99 ± 4.48 [*]	0.25 ± 0.07 [*]	248.75 ± 75.64 [*]	0.17 ± 0.06 [*]

*表示与 A比, △表示与 C比, ▲表示与 F比差别有显著意义。

The difference has statistical significance * compared with A, △ compared with C, ▲ compared with F.

表 7 各组动物 r-GT酶变灶发生情况

Table 7 Occurrence of enzymic change foci in the groups of rat

组别 Group	动物数 No. rats	灶 /cm ² focus /cm ² ($\bar{x} \pm s$)	mm ² /灶 mm ² /focus ($\bar{x} \pm s$)	灶 /cm ³ focus /cm ³ ($\bar{x} \pm s$)	mm ³ /灶 mm ³ /focus ($\bar{x} \pm s$)
A	37	1.93 ± 2.63	0.06 ± 0.08	86.77 ± 132.67	0.0 ± 0.02
B	37	21.00 ± 13.90	0.19 ± 2.91	805.66 ± 629.21 [▲]	0.07 ± 0.24
C	40	6.07 ± 11.56 [▲]	0.23 ± 1.86	245.09 ± 513.92	2.87 ± 0.18
D	37	25.93 ± 17.26 [▲]	0.18 ± 1.27	923.66 ± 607.53 [▲]	0.12 ± 0.37

*表示与 A比, ▲表示与 B比差别有显著意义。

The difference has statistical significance * compared with A, ▲ compared with B

长期诱癌实验结果见表 8 空白和仅饲塘水浓缩物的两组动物均无肝癌发生; AFB₁ 塘水浓缩物组 (D组) 肝癌发生率为 42.1% (8/19), 仅注 AFB₁ 组 (B组) 肝癌发生率为 23.8% (5/21), 前者高于后者, 但差异无统计学意义。

表 8 各组大鼠肝癌发生情况

Table 8 Occurrence of liver cancer in groups of rat

组别 Group	动物数 [*] No. rats [*]	肝癌发生数 No. liver cancers	肝癌发生率 Incidence rates of liver cancer (%)
A	26	0	0
B	21	5	23.8
C	34	0	0
D	19	8	42.1

* 指出出现第一例肝癌时动物存活数 No. of alive rats when the first rat was observed to be with liver cancer

3 讨论

饮水污染对人类健康的潜在威胁历来是世界各国政府部门共同关心并给予高度重视的社会公共卫生问题。在本世纪前 50 年, 科学家们主要致力于研究饮水污染与传染病和地方病的关系。随着医学模式和疾病谱的变化, 癌症已成为当代严重威胁人类健康的大敌, 探讨饮水污染与肿瘤的病因学关系也就成为当前肿瘤研究工作的热点之一。

70 年代末期, 苏德隆教授在国际上最早提出了饮水污染与肝癌成因的理论^[4], 随后的 20 年, 有关方面的研究报道日隆, 并在流行病学调查中取得了诸多进展。据此, 一些研究者将饮水污染 (主要是塘水) 列为我国肝癌高发的危险因素之一^[1,5]。但与流行病学取得的研究结果相比, 实验室的研究一直未取得突破性进展, 尤其是有关饮用塘水的基因毒性和致癌性方面的研究尚鲜见报道。为此, 不少研究者认为, 饮水污染与肝癌的病因学关系仍需确证。

为了综合评价肝癌高发区居民饮用水的诱变性,本研究采用 Trad-MNT 和 Fish-MNT 两种水质原位检测系统,它们均属真核细胞测定系统 (Eukaryotic assay systems),在众多评价水体污染的方法中,由于其具有敏感、特异和更客观地反映水体污染的本质而受到特别的重视和青睐^[6,7]。在监测工业性水体污染的应用方面已有不少有价值的报道,但将这些方法应用于非工业性水体污染的研究报告不多,将两种方法联合应用则未见报道。对 83 份各类饮用水检测,首次发现,肝癌高发区饮用塘水诱变性的阳检率高达 93.3%,塘水可诱发紫露草花粉母细胞和鱼周血红细胞微核率显著升高, Trad-MNT 和 Fish-MNT 两种方法测定的结果有高度相关 ($r = 0.984, P < 0.05$),表明塘水中存在的诱变物质,对真核细胞具有潜在的遗传毒性。

结合流行病学调查开展饮用塘水对居民细胞遗传毒性损伤的研究是一项国内外尚未见报道的新课题。在以往的研究中,我们注意到,肝癌高发区的居民从幼年开始饮用塘水,通过误食受污染的玉米、花生等而摄入 AFB₁。为此,对在上述肝癌危险因素暴露了 10 年和 30 年的不同人群,进行了周血淋巴细胞遗传毒性损伤的分析,结果有三点新发现:① 饮用塘水的儿童和成年男性居民,其周血淋巴细胞的 MNF SCE CAF KNF 等指标均显著高于饮用非塘水者;② AFB₁ 高摄入者显示了与饮用塘水者相似的遗传毒理学效应;③ 饮用塘水同时摄入高水平 AFB₁ 的居民,其细胞遗传物质的损伤更趋严重,显示两因素间有协同作用。

UDS 试验是近年来倍受重视的基因毒性致癌物的筛选方法之一,其敏感性、特异性和可靠性已得到众多实验结果的支持,在已知的致癌物中,95% 在该试验中呈阳性^[8-10]。由于肝细胞中具有活化前致癌物所需的酶系统,同时考虑到人和动物在前致癌物活化环境和代谢路径可能存在的差异,本研究在评价饮用塘水的基因毒性时,选择了人和大鼠原代肝细胞 UDS 试验。结果发现,两套系统的检测结果基本一致,塘水浓缩物在 UDS 试验中均呈阳性反应,对人和大鼠肝细胞的 DNA 均有明显的损伤作用,且在一定的剂量范围内有良好的剂量-效应关系。表明饮用塘水中存在与肝癌相关的基因毒性致癌物。

在上述实验结果的基础上,为了进一步验证饮用塘水的致癌性,我们采用广西肿瘤研究所建立的 AFB₁ 致大鼠肝癌作用的动物模型^[3],进行了短期和

长期的动物诱癌实验。结果显示,无论是短期或长期实验,饮用塘水均有显著诱发大鼠肝癌前病变的作用,其 r-GT ATPase G-6-Pase 等癌前酶变灶的数量,大小显著高于对照。在长期诱发大鼠肝癌的实验中,AFB₁ 塘水浓缩物组大鼠肝癌发生率 (42.1%) 高于仅注 AFB₁ 组大鼠 (23.8%),这一结果与本项研究其他实验结果相吻合,提示塘水与 AFB₁ 有协同致肝癌的作用。但仅饲 0.2% 塘水浓缩物的大鼠无一例肝癌发生,其原因可能与塘水致癌性较弱,处理剂量过低有关。

综上所述,本文从分析流行病学、细胞遗传毒理学、分子生物学和肿瘤实验病理学的不同角度,发现并论证了广西某肝癌高发区居民饮用塘水存在的基因毒性和致癌性,揭示和阐明了饮用塘水在肝癌病因学中的地位和作用,这对于科学地制订肝癌综合预防战略将具有重要的意义。

参考文献

- 1 Yu SZ. Drinking water and primary liver cancer. In: Tang ZY (Ed). Primary Liver Cancer. Springer-Verlag Berlin, China Academic Publishers, 1989, 30.
- 2 张丽生,杨克政,侯家龙等.肝癌高发区水体污染的微核效应及其致癌危险性研究.癌症,1988,7(11):1.
- 3 陈志英,严瑞琪,覃国忠等.建立黄曲霉毒素 B₁ 致肝癌作用体内短期实验模型的进一步研究.广西医学院学报,1985,2(3):17.
- 4 苏德隆.饮水与肝癌.中华预防医学杂志,1980,14(2):65.
- 5 张丽生,韦金育,梁干旺等.扶绥县原发性肝癌主要危险因素的研究.肿瘤防治研究,1991,18(2):77.
- 6 Meier J R. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. Mutat Res 1988, 196: 211.
- 7 Ma T H, Harris M M, Anderson V A et al. Tradescanti-a-micronucleus (Trad-MCN) test on 140 health-related agents. Mutat Res 1984, 138: 157.
- 8 Williams G M. Detection of chemical carcinogens by unscheduled DNA synthesis in rat primary cell cultures. Cancer Res. 1977, 37: 37.
- 9 Williams G M, LASPIA M F, Dunkel V C. Reliability of the hepatocyte primary culture/DNA repair test in testing of code carcinogens and noncarcinogens. Mutat. Res., 1982, 97: 359.
- 10 Lonati G M, P H M Iohman, F Berends. The validity of the autoradiographic method for detecting DNA repair synthesis in rat hepatocyte in primary culture. Mutat. Res., 1983, 113: 145.

(责任编辑:蒋汉明 邓大玉)