

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160614001

包小丹, 李天函, 郭梦龙, 等. 离子液体氯化 1-辛基-3-甲基咪唑对洋葱的遗传毒性作用[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(2): 102-107

Bao X D, Li T H, Guo M L, et al. Genotoxic effects of ionic liquid chloride 1-octyl-3-methylimidazolium on onions [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(2): 102-107 (in Chinese)

离子液体氯化 1-辛基-3-甲基咪唑对洋葱的遗传毒性作用

包小丹, 李天函, 郭梦龙, 杨威利, 李耀华, 王文锋, 井长勤*

新乡医学院生命科学技术学院, 新乡 453003

收稿日期: 2016-06-14 录用日期: 2016-08-28

摘要: 为探讨咪唑类离子液体氯化 1-辛基-3-甲基咪唑 ($[C_8mim][Cl]$) 对洋葱的遗传毒性, 用浓度分别为 2.5、5、10 和 20 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 $[C_8mim][Cl]$ 处理洋葱内表皮细胞和洋葱根尖 8 h, 用浓度为 10 $mmol \cdot L^{-1}$ 的 $[C_8mim][Cl]$ 处理洋葱内表皮细胞和洋葱根尖 4 h、8 h、12 h 和 24 h, 研究 $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱内表皮细胞核的影响和对洋葱根尖有丝分裂指数和染色体畸变的影响。结果显示, 与对照组相比, 随着 $[C_8mim][Cl]$ 处理浓度和时间的增加, 洋葱内表皮细胞核偏移率明显升高, 根尖细胞有丝分裂指数显著降低, 染色体畸变现象明显, 畸变率升高。研究表明, 当浓度达到 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$ 时, $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱具有遗传毒性。

关键词: $[C_8mim][Cl]$; 洋葱; 遗传毒性

文章编号: 1673-5897(2017)2-102-06 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Genotoxic Effects of Ionic Liquid Chloride 1-Octyl-3-methylimidazolium on Onions

Bao Xiaodan, Li Tianhan, Guo Menglong, Yang Weili, Li Yaohua, Wang Wenfeng, Jing Changqin*

College of Life Science and Technology, Xinxiang Medical University, Xinxiang 453003, China

Received 14 June 2016 accepted 28 August 2016

Abstract: The aim of this study was to explore the genotoxicity of imidazole ionic liquid chloride 1-octyl-3-methylimidazolium ($[C_8mim][Cl]$). Endothelial cells (EC) and root tip cells (RTC) of onion were treated with $[C_8mim][Cl]$ at the variable concentrations for 8 hours (2.5, 5, 10 and 20 $mmol \cdot L^{-1}$). Cells were also treated with $[C_8mim][Cl]$ at the concentration of 10 $mmol \cdot L^{-1}$ for different time period of 4, 8, 12 and 24 hours, respectively. The effect of $[C_8mim][Cl]$ on onion nucleus was observed, mitotic index was calculated and chromosome aberration of RTC were detected after the treatment of $[C_8mim][Cl]$. The results showed that $[C_8mim][Cl]$ exposure induced the location change of onion epidermal cell nucleus. In addition, $[C_8mim][Cl]$ caused the decrease of mitotic index of RTC and the increase of chromosome aberration ratio. These results demonstrated that the genotoxicity of $[C_8mim][Cl]$ on EC and RTC is in a dose- and time-dependent manner when the $[C_8mim][Cl]$ concentration reaches 2.5 $mmol \cdot L^{-1}$.

Keywords: $[C_8mim][Cl]$; onion; genotoxicity

基金项目: 河南省科技攻关项目(142102310045; 152102210126)

作者简介: 包小丹(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为植物生态毒理学, E-mail: 1057735318@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jingchangqin@126.com

离子液体(ionic liquids, ILs)具有许多优良的特性,如不挥发、高热稳定性、不易燃等^[1-2],被作为一类新型的环境友好型“绿色溶剂”,故它在化学合成、精细化学加工等领域得到广泛应用,并显示出了非常好的效果和应用前景^[3]。但是,离子液体在生产和使用过程中,可能会流失到环境中引起环境污染^[4],在生物体中进行富集且不易降解^[5],对生物体产生严重危害。因此有必要对离子液体的毒性进行评估,现在有很多学者研究了离子液体对某些动物、植物、微生物的影响^[6-8]。离子液体种类很多,对不同生物体的毒性差异比较大,需对其毒性做进一步研究,为全面评估离子液体的毒性提供更多依据。咪唑类离子液体是最常见、使用最广泛的一类离子液体,本实验选用氯化1-辛基-3-甲基咪唑($[C_8mim][Cl]$)为代表研究离子液体的毒性。洋葱廉价、易于在室内培养,是观察细胞核和有丝分裂的较佳材料。洋葱根尖实验是国际上常用的环境化学物质遗传毒性检测方法,具有灵敏、简便、快速的特点。因此,本实验研究了 $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱内皮细胞的影响、对洋葱根尖细胞分裂和洋葱染色体畸变的影响,通过研究 $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱的遗传毒性,探讨 $[C_8mim][Cl]$ 对生物体的毒性,为全面评估离子液体的毒性提供更多依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

红皮洋葱(*Allium cepa*),购自新乡市农贸市场; $[C_8mim][Cl]$,纯度为99.5%,购自湖北恒硕化工有限公司,用纯净水配成 $1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的母液。

1.2 预处理

挑选完整无损、大小均匀的新鲜洋葱5颗,撕掉外表皮,去除老根,在室温下于清水中培养数小时使其活化。

1.3 不同浓度的 $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱内表皮细胞核的作用

切取 1 cm^2 左右的内表皮若干,放入不同浓度(2.5 、 5 、 10 和 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $[C_8mim][Cl]$ 中处理8 h,对照组使用自来水。处理结束后用改良苯酚品红染液染色做常规制片,普通光学显微镜下观察洋葱内表皮细胞核形态和位置变化,每张片子选取5~10个视野,观察1 000个细胞,计算细胞核偏移率。细胞核偏移率等于细胞核边缘化细胞数量占细胞总数的百分比。

1.4 $[C_8mim][Cl]$ 不同处理时间对洋葱内表皮细胞核的作用

切取 1 cm^2 左右的洋葱内表皮若干,放入 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}[C_8mim][Cl]$ 中处理,在4 h、8 h、12 h和24 h时取样,用改良苯酚品红染液染色做常规制片、观察、照相,计算细胞核偏移率。

1.5 不同浓度的 $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱根尖细胞有丝分裂的影响

取正常生长的根长为2 cm的洋葱,移入不同浓度(2.5 、 5 、 10 和 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$) $[C_8mim][Cl]$ 中处理8 h,对照组使用自来水。处理结束后恢复正常培养24 h,剪取根尖,卡诺液固定24 h,保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、70%(体积分数)乙醇中。染色、压片,在显微镜下观察洋葱根尖细胞有丝分裂状况。分裂细胞包括前期、中期、后期、末期的所有细胞,统计1 000个左右细胞中的分裂细胞数,计算有丝分裂指数。有丝分裂指数=分裂细胞数/观察细胞数(%)^[9]。

1.6 $[C_8mim][Cl]$ 不同处理时间对洋葱根尖细胞有丝分裂的影响

取正常生长的根长为2 cm的洋葱,移入盛有 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}[C_8mim][Cl]$ 的小烧杯中,在处理4 h、8 h、12 h和24 h时取样,恢复正常培养24 h。剪取根尖,卡诺液固定24 h,保存于 $4\text{ }^\circ\text{C}$ 、70%(体积分数)乙醇中。染色、压片,在显微镜下观察洋葱根尖细胞有丝分裂状况,计算有丝分裂指数。

1.7 $[C_8mim][Cl]$ 处理后对染色体畸变的影响

计算根尖细胞有丝分裂指数后,观察染色体畸变情况;我们只统计中期、后期和末期的染色体畸变数,每处理组统计约300个分裂相,计算染色体畸变率。染色体畸变率=染色体畸变数/分析的染色体总数(%^[9])。

1.8 统计学分析

实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用Graph Pad Prism 6软件进行统计学分析,各组间比较用One-Way ANOVA,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 不同浓度的 $[C_8mim][Cl]$ 对洋葱内表皮细胞核的作用

未经 $[C_8mim][Cl]$ 处理的洋葱内表皮细胞核形态正常,着色较深,位于细胞中央,位置未发生偏移;经过 $[C_8mim][Cl]$ 处理8 h后,细胞核形态逐渐发生变异,并且随着浓度的增加,细胞核发生肿胀,着色变浅,核偏移现象严重。对照组细胞核偏移率为

6.5%、2.5、5、10 和 20 mmol·L⁻¹ [C₈mim][Cl]处理洋葱内表皮细胞 8 h 后,细胞核偏移率依次为 21.5%、25%、27% 和 35%,与对照组相比差异性显著 ($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 [C₈mim][Cl]不同处理时间对洋葱内表皮细胞核的作用

[C₈mim][Cl]处理时间对洋葱内表皮细胞核偏移的影响存在差异,随着[C₈mim][Cl]处理时间的延长,细胞核逐渐变大,着色变浅,核偏移现象加重。10

mmol·L⁻¹[C₈mim][Cl]处理 4 h、8 h、12 h 和 24 h 后细胞核偏移率依次为 19%、27%、32% 和 53%,各处理组相比差异性显著 ($P < 0.05$)(图 2)。

2.3 不同浓度的 [C₈mim][Cl] 对洋葱根尖细胞有丝分裂的影响

[C₈mim][Cl]造成了洋葱根尖细胞有丝分裂指数的降低,对照组根尖细胞有丝分裂指数为 16.4%,2.5、5、10 和 20 mmol·L⁻¹[C₈mim][Cl]处理洋葱根尖 8 h 后,有丝分裂指数依次为 15.1%、13.9%、10.9%

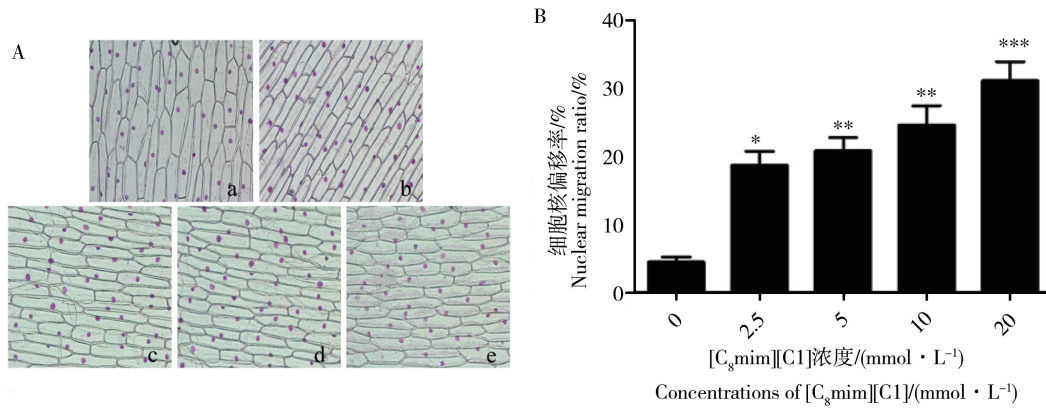


图 1 不同浓度 [C₈mim][Cl] 对洋葱内表皮细胞核偏移的影响

注:A 显微镜下的图像,其中 a,0 mmol·L⁻¹;b,2.5 mmol·L⁻¹;c,5 mmol·L⁻¹;d,10 mmol·L⁻¹;e,20 mmol·L⁻¹。

B 细胞核偏移的量化分析,与对照相比,* $P < 0.05$,* * $P < 0.01$,* * * $P < 0.001$,下同。

Fig. 1 Effects of [C₈mim][Cl] at different concentrations on nuclear morphological change of onion endothelial cells

Note: A. Onion endothelial cells imaged by microscope; a, 0 mmol·L⁻¹; b, 2.5 mmol·L⁻¹; c, 5 mmol·L⁻¹; d, 10 mmol·L⁻¹; e, 20 mmol·L⁻¹.

B. Quantitative analysis of nuclear morphological change of onion endothelial cells; asterisk denotes a response that is significantly different from the control (* $P < 0.05$, * * $P < 0.01$, * * * $P < 0.001$). The same below.

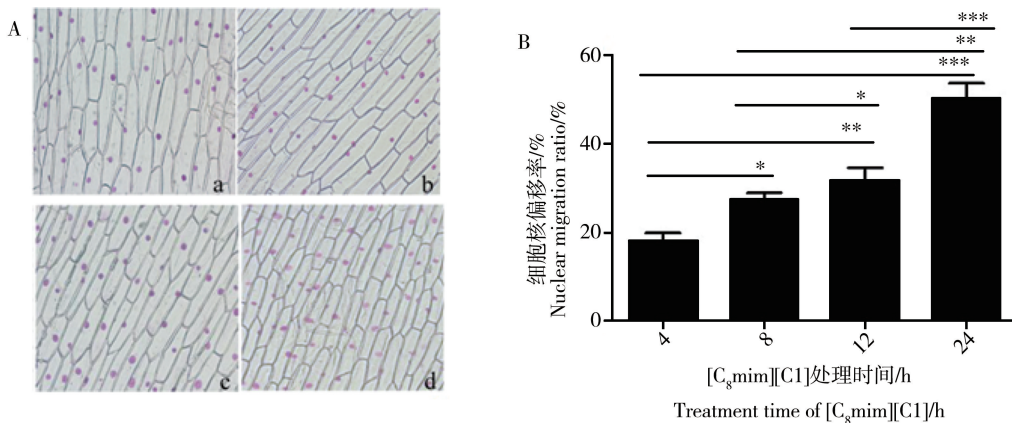


图 2 [C₈mim][Cl] 处理不同时间对洋葱内表皮细胞核偏移的影响

注:A 显微镜下的图像,其中 a,4 h;b,8 h;c,12 h;d,24 h。B 细胞核偏移的量化分析。

Fig. 2 Effects of [C₈mim][Cl] on nuclear morphological change of onion endothelial cells for different treatment time

Note: A. Onion endothelial cells imaged by microscope; a, 4 h; b, 8 h; c, 12 h; d, 24 h.

B. Quantitative analysis of nuclear morphological change of onion endothelial cells.

和4.6%,随浓度的增加,有丝分裂指数逐渐降低,与对照组相比,各浓度处理组有丝分裂指数均具有显著性差异($P<0.05$)(图3)。

2.4 [C₈mim][Cl]不同处理时间对洋葱根尖细胞有丝分裂的影响

[C₈mim][Cl]处理不同时间对洋葱根尖有丝分裂指数具有明显的影响,处理4 h、8 h、12 h和24 h后,有丝分裂指数依次为15.3%、12.6%、8.5%和4.1%,随着处理时间的增长,有丝分裂指数逐渐降低,与对照组相比,各时间处理组有丝分裂指数均有显著性差异($P<0.05$)(图4)。

2.5 [C₈mim][Cl]对洋葱根尖细胞有丝分裂过程中染色体畸变的影响

[C₈mim][Cl]处理洋葱根尖细胞后,造成了多种

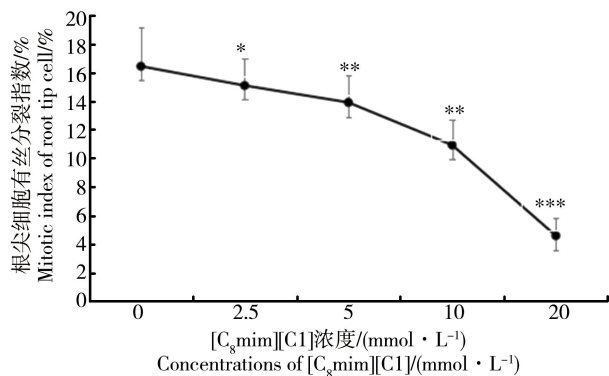


图3 不同浓度的[C₈mim][Cl]对洋葱根尖细胞有丝分裂指数的影响

Fig. 3 Effects of [C₈mim][Cl] at different concentrations on mitotic index of onion root tip cells

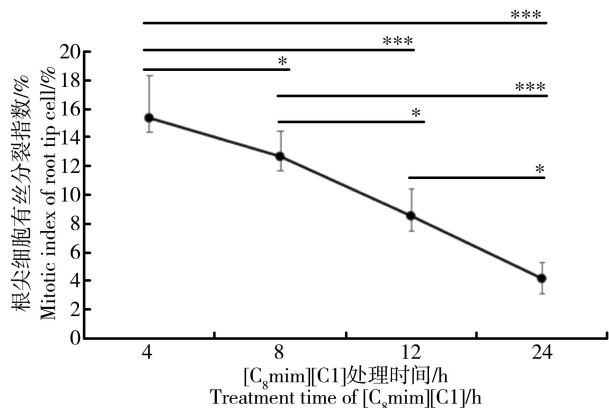


图4 [C₈mim][Cl]处理不同时间对洋葱根尖有丝分裂指数的影响

Fig. 4 Effects of [C₈mim][Cl] on mitotic index of onion root tip cells for different treatment time

染色体畸变现象的发生。洋葱根尖经过[C₈mim][Cl]处理后,均有不同类型的染色体畸变,如染色体粘连、染色体桥、断片、缺失、分配不均、染色体排列紊乱等,其中出现较为频繁的是染色体粘连及染色体桥(图5)。随[C₈mim][Cl]处理浓度及时间的增加,染色体畸变率总体呈升高趋势,但是当处理浓度在10~20 mmol · L⁻¹、处理时间在12~24 h范围时,染色体畸变率开始下降(图5)。

3 讨论 (Discussion)

细胞内环境的稳定性对细胞的物质代谢、能量转换和信息传递起着重要的作用。[C₈mim][Cl]既具有脂溶性,又具有水溶性,因此比较容易通过细胞膜进入细胞质,作用于细胞器,影响细胞内蛋白质、DNA或其他物质的代谢,引起细胞结构和功能的改变^[10]。本研究发现,[C₈mim][Cl]处理洋葱内表皮细胞后,可引起其细胞核形态和位置发生变异,说明[C₈mim][Cl]对洋葱内表皮细胞造成了毒害作用,并且这种毒害作用随着[C₈mim][Cl]的浓度和处理时间的增加而加重。细胞核是细胞内较大的细胞器,正常的细胞核能够存在于细胞的一定位置,是由于细胞骨架的支撑作用。细胞核位置偏移细胞的中心,可能是因为当细胞处于离子液体的环境中,离子液体能够进入到细胞内,直接或间接作用于细胞骨架组装或去组装的相关蛋白,引起了细胞骨架的改变,从而改变了细胞核的位置,当离子液体的浓度达到一定程度时,细胞骨架受损严重,细胞核缺少支撑作用,紧贴细胞膜分布。

研究表明环境中的有毒化学物质如铅和硒等能够降低植物的有丝分裂指数,其机理是通过阻碍与细胞有丝分裂相关的蛋白质合成,使细胞周期的运行受到抑制,最终导致有丝分裂指数降低。本实验结果表明,随着[C₈mim][Cl]处理浓度及时间的增加,洋葱根尖细胞有丝分裂指数呈降低趋势。[C₈mim][Cl]浓度越大,处理时间越长,其在植物体内的积累就越多,胞内分裂相关蛋白的合成受阻就越明显,有丝分裂指数越低。同时,[C₈mim][Cl]能够促进活性氧(ROS)、丙二醛(MDA)等的产生,抑制抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)等的活性,进而损害DNA,影响脂质及相关蛋白质的合成^[11-12],影响有丝分裂的正常进行,使得有丝分裂指数降低。

当生物体处于不良环境中时,会引起细胞染色体结构发生变异,形成染色体断片、粘连或造成染色

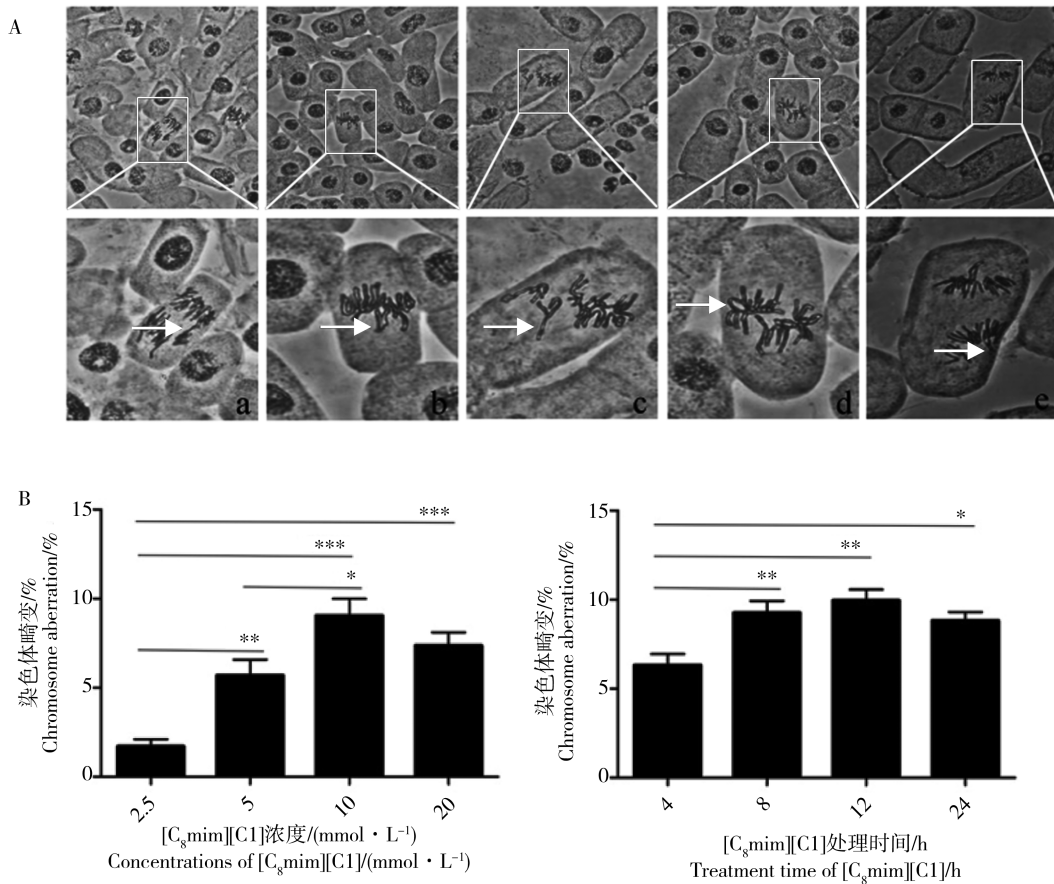


图5 [C₈mim][Cl]对洋葱根尖细胞染色体畸变的影响

注:A 显微镜下的图像,下图为上图的局部放大图,其中 a,染色体落后;b,染色体粘连;c,染色体排列紊乱、缺失;d,染色体桥;e,染色体断片(红色箭头所指)。B 洋葱根尖细胞染色体畸变量化分析。

Fig. 5 Effects of [C₈mim][Cl] on chromosome aberration of onion root tip cells

Note: A. Onion root tip cells imaged by microscope; arrow indicates a, chromosome lagging; b, chromosome adhesion; c, chromosome disorder and deletion; d, chromosome bridge; e, chromosome fragments. B. Quantitative analysis of chromosome aberration.

体排列紊乱、滞后的现象^[13]。研究表明离子液体对水稻、石莼、蚕豆等植物有毒性作用,抑制其生长,造成DNA损伤等^[14-17]。本实验中,[C₈mim][Cl]处理洋葱根尖细胞后,可以引起染色体桥、染色体粘连、缺失等畸变现象的发生。其发生的机制可能是通过以下3种途径,一是[C₈mim][Cl]进入细胞核内,将DNA作为靶点,直接损害遗传物质,当DNA的损伤程度超过DNA的修复能力时,则出现染色体畸变;二是损害与有丝分裂相关的分裂器如纺锤丝,干扰蛋白质合成或RNA的转录,不能形成与染色体运动有关的物质,间接引起有丝分裂异常,导致染色体畸变;三是通过干扰某些损伤的正常修复过程,阻止染色体在正常情况下的重建,而形成新的重排,出现

染色体桥、粘连、断片等现象。当[C₈mim][Cl]的浓度超过10 mmol·L⁻¹、处理时间超过12 h时,染色体畸变率开始下降,可能是因为当处理浓度及时间达到一定范围时,离子液体能够阻碍纺锤丝微管蛋白的聚合作用,致使细胞停留在分裂期。

总之,当浓度达到2.5 mmol·L⁻¹时,[C₈mim][Cl]对洋葱具有遗传毒性,主要表现为细胞核偏移、有丝分裂异常、染色体畸变等。

通讯作者简介:井长勤(1972-),男,理学博士,副教授,主要研究方向为细胞和分子毒理学,发表学术论文30余篇。

参考文献 (References):

- [1] Jing C, Mu L, Ren T, et al. Effect of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride on cell replication and membrane permeability of *Escherichia coli* DH5 α [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2014, 93(1): 60-63
- [2] Li X Y, Dong X Y, Bai X, et al. The embryonic and postembryonic developmental toxicity of imidazolium-based ionic liquids on *Physa acuta* [J]. Environmental Toxicology, 2014, 29(6): 697-704
- [3] Zhang S, Lefebvre H, Tessier M, et al. Influence of bronsted acid ionic liquid structure on hydroxyacid polyesterification [J]. Green Chemistry, 2011, 13(13): 2786-2793
- [4] Ventura S P M, Gonçalves A M M, Sintra T, et al. Designing ionic liquids: The chemical structure role in the toxicity [J]. Ecotoxicology, 2013, 22(1): 1-12
- [5] Coleman D, Gathergood N. Biodegradation studies of ionic liquids [J]. Chemical Society Reviews, 2010, 39(2): 600-637
- [6] Viboud S, Papaiconomou N, Cortesi A, et al. Correlating the structure and composition of ionic liquids with their toxicity on *Vibrio fischeri*: A systematic study [J]. Journal of Hazardous Materials, 2012, 15(215-216): 40-48
- [7] Dong M, Zhu L, Zhu S, et al. Toxic effects of 1-decyl-3-methylimidazolium bromide ionic liquid on the antioxidant enzyme system and DNA in zebrafish (*Danio rerio*) livers [J]. Chemosphere, 2013, 91(8): 1107-1112
- [8] Liu T, Zhu L, Xie H, et al. Effects of the ionic liquid 1-octyl-3-methylimidazolium hexafluorophosphate on the growth of wheat seedlings [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2014, 21(5): 3936-3945
- [9] 屈艾, 汪承润, 薄军. 稀土元素钬对蚕豆的细胞毒性和遗传毒性研究[J]. 遗传, 2004, 26(2): 195-201
Qu A, Wang C R, Bao J. Research on the cytotoxic and genotoxic effects of rare-earth element holmium to *Vicia faba* [J]. Hereditas, 2004, 26(2): 195-201 (in Chinese)
- [10] 井长勤, 陈红丽, 李效宇. 离子液体氯化1-辛基-3-甲基咪唑对 EMT6 细胞的毒性及其机理研究[J]. 环境科学学报, 2013, 33(6): 1809-1814
Jing C Q, Chen H L, Li X Y. Cytotoxicity and possible mechanism of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride on EMT6 cells [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2013, 33(6): 1809-1814 (in Chinese)
- [11] Gill S S, Tuteja N. Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2010, 48(12): 909-930
- [12] Lu L Y, Ou N, Lu Q B. Antioxidant induces DNA damage, cell death and mutagenicity in human lung and skin normal cells [J]. Scientific Reports, 2013, 3(11): 65-65
- [13] 易志刚, 傅巧姑. 应用蚕豆根尖微核技术研究3种重金属的遗传毒性[J]. 福建农林大学学报: 自然科学版, 2009, 38(4): 396-399
Yi Z G, Fu Q G. Utilization of micronucleus test technique in *Vicia faba* root tips to evaluate the genetic toxicity of three heavy metal ions [J]. Journal of Fujian Agriculture and Forestry University: Natural Science Edition, 2009, 38(4): 396-399 (in Chinese)
- [14] Kumar M, Reddy C R, Jha B, et al. The ameliorating effect of Acadian marine plant extract against ionic liquids-induced oxidative stress and DNA damage in marine macroalga *Ulva lactuca* [J]. Journal of Applied Phycology, 2013, 25(2): 369-378
- [15] Liu T, Zhu L S, Wang J H, et al. The genotoxic and cytotoxic effects of 1-butyl-3-methylimidazolium chloride in soil on *Vicia faba* seedlings [J]. Journal of Hazardous Materials, 2015, 285: 27-36
- [16] Kumar M, Trivedi N, Reddy C R, et al. Toxic effects of imidazolium ionic liquids on the green seaweed *Ulva lactuca*: Oxidative stress and DNA damage [J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24(11): 1882-1890
- [17] Liu H J, Zhang S X, Hu X N, et al. Phytotoxicity and oxidative stress effect of 1-octyl-3-methylimidazolium chloride ionic liquid on rice seedlings [J]. Environmental Pollution, 2013, 181: 242-249 ◆