DOI：10.19789/j.1004-9398.2022.02.009
文献引用：赵昕，陈宣齐，张燕翔，等．微核检测在辣条食用安全性评估中的应用[J]．首都师范大学学报（自然科学版），2022，43（2）：56-60.
ZHAO X，CHEN X Q，ZHANG Y X，et al. Micronucleus test technique in the food safety testing of spicy strip[J]. Journal of Capital Normal University（Natural Science Edition），2022，43（2）：56-60.

微核检测在辣条食用安全性评估中的应用*

赵　昕[1]，陈宣齐[2]，张燕翔[3]，李雅轩[1**]

（1. 首都师范大学生命科学学院，北京　100048；2. 北京市第十中学，北京　100072；
3. 首都师范大学初等教育学院，北京　100048）

摘要：为了研究辣条的食品安全性，利用微核检测技术，分析不同稀释倍数的辣条提取液对蚕豆根尖的遗传毒理作用．实验分为：空白组、对照组和实验1～5组（按稀释倍数由高到低排序），分别给予等体积的H_2O、5 mg/L环磷酰胺和稀释200～0倍的辣条提取液处理蚕豆根尖，并取根尖细胞进行观察，对不同组数据进行统计学分析．结果表明：与空白组相比，实验1～5组均可诱导微核产生，具有一定遗传毒性；实验2、3和4组的微核数显著增加（t=1.96、2.49和3.42，P<0.05），实验1和5组的微核数增加但结果差异无统计学意义（P>0.05）．与对照组相比，实验1和2组遗传毒性具有显著差异（t=−2.34和−2.07，P<0.05），实验3、4和5组遗传毒性与对照组相当且差异无统计学意义（P>0.05）．在实验浓度范围内，辣条提取液诱导产生的微核数随溶液稀释倍数的降低而增加，并呈现剂量效应．

关键词：微核；辣条；遗传毒性；安全评价
中图分类号：X171；X835

Micronucleus test technique in the food safety testing of spicy strip*

ZHAO Xin[1]，CHEN Xuanqi[2]，ZHANG Yanxiang[3]，LI Yaxuan[1**]

（1. College of Life Sciences，Capital Normal University，Beijing　100048；2. Beijing NO.10 Middle School，Beijing　100072；3. Elementary Education College，Capital Normal University，Beijing　100048）

Abstract：In order to study the food safety of spicy strip，the micronucleus detection technology was used to test the genotoxicity of different concentrations of spicy strip extraction. In this study we set the blank group，positive control group and experimental group 1 to 5（ordered by dilution ratio from high to low）. Root tips of *Vicia faba* were treated with deionized water，5 mg/L cyclophosphamide and different dilution ratio（200 to 0 times）spicy strip extraction，then root-tip cells were observed under the microscope. The result showed that compared with the blank group，the extracts of experimental group 1 to 5 could induce micronucleus generation and had certain genetic toxicity. The number of micronuclei of experimental group 2，3 and 4 were significantly increased（t=1.96，2.49，3.42，P<0.05）. The number of micronuclei of experimental group 1 and 5 were increased，but the difference was not significant（P>0.05）. Compared with the positive control group，there were significant difference in experimental group 1 and 2（t=−2.34，−2.07，P<0.05），while the experimental group 3，4 and 5 had the similar

收稿日期：2021-02-01
* 2021首都师范大学教学改革项目
** 通信作者：liyaxuan@cnu. edu. cn

genotoxicity with the positive control group and no statistical significance was observed (P>0.05). In the range of experimental concentration, the number of micronuclei increased with the decrease of dilution ratio of spicy strip extraction, and showed does effect.

Keywords: micronucleus; spicy strip; genotoxicity; safety assessment

CLC: X171; X835

0　引　言

微核(micronucleus, MCN)是细胞在分裂间期表现出的一种畸变类型,是环境因素的作用下,引起真核生物细胞的染色体断裂或整条染色体移动异常,导致细胞分裂后期没有进入子核中而产生的独立于主核之外的微小核结构[1].微核在细胞分裂间期的形状多与主核形状类似,大小约为主核大小的1/10~1/3,靠近主核,其染色性质与主核相类似.一般情况下,微核自发发生率很低,故可作为检测环境因素对遗传物质影响效果的指标,即通过微核检测研究环境因素的安全性,建立微核检测技术[1-3].目前,微核检测已成为毒理性检测与评定的常规方法[4-7].

微核试验(micronucleus test, MNT)以动物的骨髓细胞或外周血淋巴细胞、蚕豆等为研究对象,探究环境因素的毒理作用,且随着生物技术的发展,其应用范畴已从体内检测拓展到体外检测[8-10].王映雪[11]、仪慧兰和孟紫强[12]分别以蚕豆(*Vicia faba*)根尖进行微核检测,表明植物微核检测方法与动物学检测方法具有高度一致性,且具有材料易得、培养条件简单和实验周期短等优势;张丽霞等[5]比较了单细胞凝胶电泳实验和蚕豆根尖微核检测技术,证明二者研究结果一致,且由于蚕豆根尖微核检测技术在实验上的便捷性,该技术已成为对待测因素进行遗传毒理性分析的常用方法;刘增禹和蔡文国[6]利用微核检测技术,表明某品牌方便面调料对蚕豆根尖细胞存在遗传毒理性;李艺等[13]利用微核检测技术,表明杏鲍菇(*Pleurotus eryugii*)提取液有效降低了微核出现的比率;李雅轩等[14]在对有机硒粉的研究中,证实适当浓度的有机硒粉对$NaNO_2$所导致的染色体损伤具有拮抗作用,可以有效降低染色体损伤,并且具有剂量效应.以上研究结果表明,微核检测方法是对食品安全性进行评估的有效方法.

辣条是一种以谷物或豆类为主要原料的常见小零食,目前没有统一的制作标准,其制作中会添加甜味剂、增味剂、乳化剂和防腐剂等食品添加剂,有些辣条甚至含有20余种食品添加剂.由于辣条的购买成本低和经销商的花式营销手段,使得其深受青少年们的喜爱[15-19].虽然国家有相关规定限制各类食品添加剂的使用量[20-21],但是当多种食品添加剂叠加使用时,其食品安全性还需要进一步确认.目前尚没有类似研究的报告,本文以蚕豆根尖为研究对象,通过微核检测分析辣条的食用安全性,以进一步丰富以蚕豆为实验材料的遗传毒理分析研究,希望为辣条的食品安全性评价提供实验数据.

1　实验材料与方法

1.1　实验材料

无水乙醇、冰醋酸和苯酚购自北京化工有限责任公司,均为分析纯;环磷酰胺购自MACKLIN/麦克林试剂公司;品红购自北京Leagene/雷根生物技术有限公司.实验所用H_2O为去离子水.

1.2　辣条提取液的制备

选择某品牌辣条为分析对象.使用食品粉碎器粉碎辣条,取20 g加100.00 mLH_2O,24 ℃浸泡2 h,滤纸过滤,将滤液定容至100 mL,命名为原提取液,4 ℃冰箱中保存.

分别取原提取液0.25、2.50、12.50和25.00 mL,加H_2O分别稀释至50.00 mL,得到稀释倍数分别为200、20、4和2倍的溶液,进行后续研究.

1.3　蚕豆根尖处理

选取美农汇种子公司生产的临蚕9号种子(青皮蚕豆)为实验测试用种子,要求籽粒均匀饱满、形态大小相似.培养步骤:(1)将种子浸泡于H_2O中24 h;(2)将膨胀后的种子转移至铺有双层湿纱布和有少量H_2O的白瓷盘中,24 ℃下继续培养催根,每隔12 h换1次H_2O;(3)待种子的初生根长度达到2 cm左右时,选取42粒种子,随机分为7组,分别为空白组、对照组和实验1~5组(按稀释倍数由高到低排序),每组6粒种子;(4)分别加入50.00 mL的H_2O、5 mg/L环磷酰胺[22-23]和不同稀释倍数(200、20、4、2和0倍)的辣条提取液,24 ℃培养蚕豆根尖6 h;(5)用H_2O清洗种子和根尖3次,置于垫有双层湿纱布的培养皿内,以H_2O缓苗培养24 h;(6)取2 cm根尖置

于卡诺固定液中,固定24 h;(7)取固定后的根尖放于70%乙醇溶液中,4 ℃冰箱中冷藏,待测.每组实验重复3次.

1.4　微核分析

使用济南腾览仪器有限公司生产的Leica DM 500型显微镜观察统计处理后根尖中的微核数.以常规方法进行制片[24],每个蚕豆根尖观察1 000个细胞进行计数,每组观察2个根尖,每组实验重复3次,共计观察6 000个细胞.统计每个根尖具有微核的细胞数(n),计算微核率(P)和微核指数(I_M),对应计算公式为:

$$P=\frac{n}{1000}\times 1000‰, \tag{1}$$

$$I_M=\frac{P_{实}}{P_{空}}, \tag{2}$$

式中:$P_{实}$和$P_{空}$分别为实验1~5组(或对照组)与空白组的P;I_M也称为污染指数(pollution index,PI),当$0<I_M<1.50$为基本无遗传毒性,$1.50\leqslant I_M<2.00$为具有轻度遗传毒性,$2.00\leqslant I_M<3.50$为中度遗传毒性,$I_M\geqslant 3.50$为重度遗传毒性,$I_M>1.50$就判定为存在致突变作用[9-10].

1.5　统计学处理

数据以$\bar{x}\pm s$表示.利用SPSS19.0软件进行统计学分析.根据微核指数判断测试提取液的遗传毒性,使用t检验进行组间微核数据对比分析.利用最小二乘法构建稀释度的倒数与微核数的回归方程,对回归系数进行显著性检验.$P<0.05$为差异有统计学意义.

2　结　果

2.1　蚕豆根尖细胞微观结构

所有组蚕豆根尖细胞的微观结构如图1所示.空白组,根尖细胞近似为正方体,细胞核为圆形或椭圆形,形状均匀一致;对照组,根尖细胞中可见明显的细胞核变形,产生突出,出现三角形或局部锐化现象;实验1~5组,根尖细胞中均有微核出现,细胞核形态可见大量明显变形,与对照组细胞核表现相类似,其中实验5组宏观可见根尖表面颜色发暗,微观细胞核变形更为显著,其根尖细胞受损伤严重.

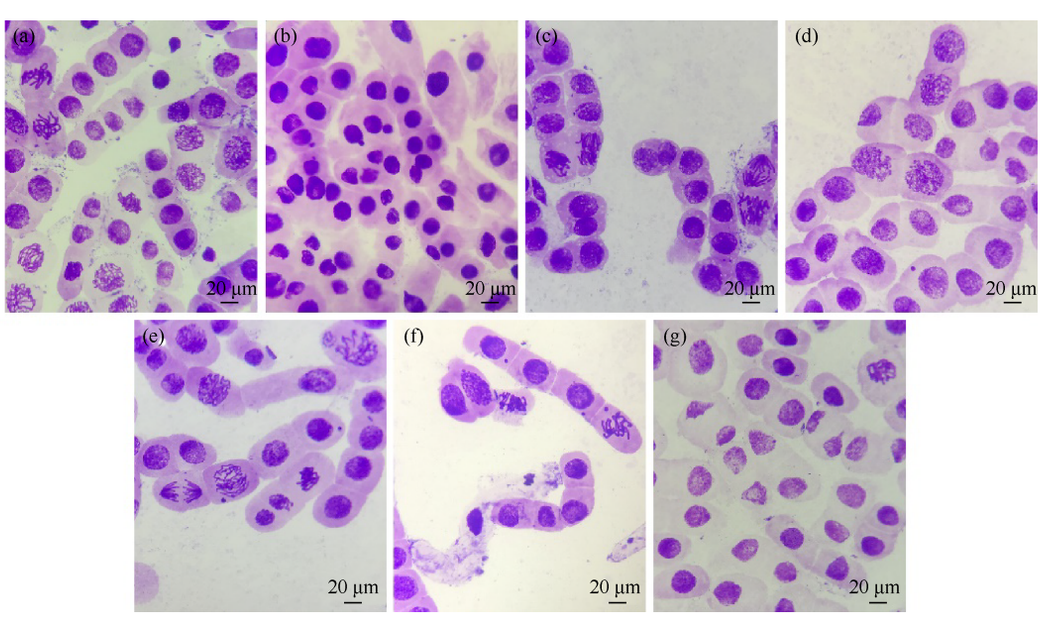


图1　不同组蚕豆根尖细胞的微核结构

(a)空白组;(b)对照组;(c)实验1组;(d)实验2组;(e)实验3组;(f)实验4组;(g)实验5组

2.2　微核数据

不同组处理后蚕豆根尖细胞微核统计结果如表1所示.空白组、对照组和实验1~5组的微核数分别为9、39和14~30个,微核千分率分别为1.50‰±1.22‰、6.50‰±3.89‰和2.33‰±1.97‰~5.00‰±2.19‰,I_M分别为1.00、4.33和1.55~3.33.与空白组相比,实验1和5组的微核率有所增加,但结果差异无统计学意义($P>0.05$);实验2~4组的微核率显著增加(t=1.96、2.49和3.42,$P<0.05$);与对照组相比,实验1和2组微核率显著减少(t=−2.34和−2.07,$P<0.05$),实验3~5组的微核率降低,但结果差异无统计学意义($P>0.05$).

表1　不同组处理后蚕豆根尖细胞微核统计结果

组名	微核数	微核率/‰	微核指数
空白组	9	1.50±1.22	1.00
对照组	39	6.50±3.89	4.33
实验1组	14	2.33±1.97[a]	1.55
实验2组	18	3.00±1.41[ab]	2.00
实验3组	26	4.33±2.50[b]	2.89
实验4组	30	5.00±2.19[b]	3.33
实验5组	19	3.17±4.92	2.11

注:[a]与对照组相比,t=−2.34和−2.07,P<0.05;[b]与空白组相比,t=1.96、2.49和3.42,P<0.05.

2.3　相关性分析

对在本实验中显示适于进行微核检测的实验1~4组进行相关性分析.利用最小二乘法构建的回归方程为y=31.11x+15.74,r=0.962;对回归系数的显著性检验可知,微核数在提取液稀释倍数范围内的线性回归显著(P<0.05).可知,在研究处理液浓度范围内,微核数随着处理液浓度的升高而增加.

3　讨　论

微核数据显示,辣条提取液处理根尖后,可见微核数明显升高,说明其对染色体有损伤作用,使得细胞中微核数增加.实验1组因稀释度高,其未造成与空白组的显著差异,说明稀释200倍的提取液不具明显遗传毒性;实验2~4组与空白组处理效果形成显著差异,说明稀释20~2倍的辣条提取液已具有明显的遗传毒性,但其食用安全性有待于进一步研究确定;实验5组的微核率比实验4组有所降低,致畸作用未见显著大于实验4组,且与空白组亦不具有显著差异.

分析实验5组数据,这是因为微核的形成,依赖于细胞周期的正常发生,文中缓苗处理,也是期待受到环境诱导而发生损伤的染色体,在下一个细胞周期中的间期不能进入到子核中,形成的染色体断片或落后染色体成为独立于子核以外的微核,以此反映实验因素的遗传毒性.数据统计时,实验5组的微核总数比空白组有显著增大,但是分布极不平均,6个根尖细胞中出现的微核数分别为0、0、10、0、9和0个(共19个);而实验4组的6个根尖细胞中出现的微核数分别为8、4、4、2、7和5个(共30个).结合根尖表型及其细胞表现特点,推测实验5组由于细胞受损或细胞分裂受到抑制,导致微核数降低,甚至为0,其出现微核的细胞来自于2个根尖,其余4个根尖的细胞中未测出微核.进一步观测这4个根尖的细胞分裂水平,亦发现处于分裂期的细胞数显著减少,表现为细胞分裂受到抑制,所以未能观察到微核出现.结合细胞学观察,判断实验5组的根尖细胞是由于细胞分裂受到抑制,影响了微核形成的过程,说明其影响作用更为显著,只是不适于利用微核检测的方法判断其遗传毒性,这从另一面说明高浓度提取液对染色体的影响非常严重.此研究结果与前人的工作相印证,所以微核试验分析需要确定待测因素的适用浓度范围[25-26],选择适当的浓度具有重要意义.如果处理液过浓,可以通过增加稀释度,得到数据后再进行数据校正,也可得到正确的结论.

与对照组相比,实验组的微核数和微核千分率均有所减少,且实验1和2组微核数及微核千分率显著减少,说明实验1和2组辣条提取液未达到5 mg/L环磷酰胺的遗传毒性水平;实验3~5组的微核率降低,但结果无显著性差异,说明实验组3~5提取液的遗传毒性与5 mg/L环磷酰胺相当,由此进一步确认了此稀释度范围内的辣条浸提液对染色体有明显损伤作用,与对照组具有相同的遗传毒性.

微核指数结果表明,不同稀释度的辣条提取液均有一定遗传毒性(I_M>1.50).其中稀释200倍的提取液具有轻度遗传毒性,I_M=1.55;其余提取液均具有中度遗传毒性,I_M为2.00~3.33.在实验2~4组稀释度的范围内,随着稀释度的降低(浓度增大)微核数在增多,相关分析结果显示,微核数与浓度的简单相关系数高且线性回归显著,说明在此研究稀释度范围内,辣条提取液的浓度与诱导所产生的微核数呈正相关关系.

辣条包装上的成分表显示,在其生产中使用了多种食品添加剂,包括了谷氨酸钠、单硬脂酸甘油酯、丙三醇、环已基氨基硫酸铵、乳酸钠、三氯蔗糖、特丁基对苯二酚、纽甜和食用香精香料等,成分过于复杂.结合本研究,有理由推测多种食品添加剂的使用,无论是剂量或种类的叠加作用都会对食品安全性产生不利的影响.

2019年12月10日,我国市场监管总局发布《关于加强调味面制品质量安全监管的公告》[20-21]显示,各地市场监管部门对“辣条”类食品统一按照“方便食品(调味面制品)”生产许可类别进行管理,提出了更加严格的制作要求和检测标准,凡与此不一致的,应当于2020年1月31日前调整到位.参照方便食品

管理意味着,能添加的防腐剂仅为“乳酸链球菌素”,将大大减少添加剂的种类.而随着其性质的明确,辣条在添加剂使用、产品保质期等方面将面临更高的要求,这也意味着辣条行业生产将会更加规范化.

4　结束语

本研究利用微核检测技术,以原提取液及不同稀释倍数的辣条提取液处理蚕豆根尖细胞,表明实验稀释度范围内的辣条提取液均可诱导微核产生,具有一定遗传毒性,并呈现剂量效应.辣条提取液越浓,对染色体具有明显损伤作用.本研究是依据前人的工作,以蚕豆根尖细胞为实验材料进行了研究分析.在今后的工作中,可以模式动物作为研究对象进行更深入研究,对辣条提取液中具体成分进行具体毒理性分析,从而对确立辣条生产中的食品安全性指标提供参考依据.

参 考 文 献

[1] 周俊,陈桥,沈丽娟.蚕豆根尖微核致突变性试验标准修订背景研究[J].环境监测管理与技术,2018,30(3):8-11.

[2] 陈思,鲁克庆,马兴铭.微核试验方法及应用研究进展[J].中国比较医学杂志,2016,26(2):83-86.

[3] 胡晓菊,刘燕,李杰,等.微核检测技术的应用:中学生物学课外活动的好题材[J].生物学通报,2005,40(9):54-55.

[4] 李雅轩,胡英考,蔡民华,等.应用微核技术对北京三海水域污染状况的研究[J].生态学杂志,2005,24(9):1106-1109.

[5] 张丽霞,张明,治洪,等.两种遗传毒性检测方法在饮水安全监测的应用对比[J].环境与健康杂志,2018,35(8):707-710.

[6] 刘增禹,蔡文国.方便面调料对蚕豆根尖的遗传毒性[J].食品科技,2009,34(4):252-253+258.

[7] 周小露,陈崇俊,冉莉莎,等.复合茯砖袋泡茶的配方优化及安全性评价[J].现代食品科技,2020,36(4):210-219.

[8] 金波,陈光荣.遗传毒理与环境检测[M].武汉:华中师范大学出版社,1998:204-236.

[9] 曹佳,林真,余争平.微核试验原理、方法及其在人群监测和毒性评价中的应用[M].北京:军事医学科学出版社,2000:3-5.

[10] 张弘,张晶莹,隋自洁,等.富硒纳豆安全性试验研究[J].中国卫生工程学,2020,19(6):898-900.

[11] 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.

[12] 仪慧兰,孟紫强.SO_2对蚕豆根尖细胞微核的诱导作用[J].生态学报,2003,23(2):292-296.

[13] 李艺,张燕青,李鑫,等.杏鲍菇提取液对蚕豆根尖细胞微核形成的影响[J].安徽农业科学,2013,41(13):5646-5647.

[14] 李雅轩,赵昕,胡英考,等.有机硒粉对亚硝酸钠引起蚕豆根尖微核的拮抗作用研究[J].安徽农业科学,2012,40(24):11934-11935.

[15] 刘少伟,阮赞林.疯狂的“辣条”:有关“辣条”的食品安全隐患[J].质量与标准化,2015(5):35-36.

[16] 刘煜侠,陈皓.辣条中食品添加剂的使用现状[J].食品安全导刊,2020(33):125-126.

[17] 肖娴,孙丽,许韶君.宁波市初中生饮食习惯影响因素分析[J].中国学校卫生,2015,36(3):429-431.

[18] 陈皓,刘煜侠,许国忠,等.浅谈辣条标准发展和市场现状[J].食品安全导刊,2020(18):4-5.

[19] 斯淑婷,韦斌财,李丰恒,等.广西中小学生辣条食用及认知现况[J].中国学校卫生,2017,38(10):1553-1554.

[20] 食品生产安全监督管理司.关于加强调味面制品质量安全监督的公告[EB/OL].(2019-12-10)[2020-12-11].http://gkml.samr.gov.cn/nsjg/spscs/201912/t20191210_309145.html.

[21] 周玉瑾.食品添加剂与食品安全概述[J].现代食品,2021(1):155-156+160.

[22] 李培宁,江漪,陈秀娟,等.致畸试验中3种常用阳性对照物的效果比较[J].癌变·畸变·突变,2017,29(3):235-240.

[23] 秦永燕,赵青松,刘晨,等.潞党参对环磷酰胺诱导蚕豆根尖的抗突变作用[J].河南农业科学,2020,49(7):53-57.

[24] 李雅轩,赵昕.遗传学综合实验[M].北京:科学出版社,2010.

[25] 钱晓薇.重铬酸钾对蚕豆根尖细胞致畸效应的研究[J].遗传,2004,26(3):337-342.

[26] 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.

(责任编辑:王　媛)