

文章编号: 1674-7054(2016)03-0348-05

薰衣草精油对蚕豆根尖遗传毒性的影响

赖柯华, 王佳宁, 冯青, 黄伟康, 范咏梅

(海南大学 环境与植物保护学院, 海口, 570228)

摘要: 利用蚕豆根尖细胞微核试验对薰衣草遗传毒性进行检测, 同时探究在不同含量薰衣草精油诱导下, 细胞微核率与脂质过氧化物之间的相关关系。结果表明: 质量浓度为 $1.000\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的薰衣草精油会抑制蚕豆根尖细胞的生长, 质量浓度 $0 \sim 0.200\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的薰衣草精油对细胞不会产生明显的遗传毒性, 且表现出不断上升的抗突变性和抗氧化性, 其诱导蚕豆根尖细胞的微核率和脂质过氧化呈正相关, 相关系数 $R^2 = 0.83$ 。当薰衣草精油的质量浓度超过 $0.200\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 蚕豆根尖细胞产生了明显的生物损伤, 细胞正常的生理代谢和应激反应受到影响。

关键词: 薰衣草精油; 蚕豆; 微核; 脂质过氧化物

中图分类号: TQ 654.2 文献标志码: A DOI: 10.15886/j.cnki.rds wxb.2016.03.012

薰衣草(*Lavandula angustifolia* Mill) 又称欧薄荷^[1], 其花穗可以提炼精油, 其主要成分为芳樟醇、乙酸芳樟酯等^[2-3], 具有镇静催眠、抗抑郁、抗氧化、驱虫等功效, 广泛应用于化妆品中, 在食品和医药方面也有较大的用途^[3-4]。近年来, 薰衣草精油的研究, 主要集中在化学成分、生物活性、生物作用等方面, 其对植物遗传毒性的研究尚少。主要是利用细胞生物学方法测定细胞的微核发生率(Micronucleus frequency MNF), 用于外源化合物致突变性的检测, 具有操作简单、准确、快速的优点^[5-7], 其中蚕豆根尖细胞微核试验是检测外源化合物对植物是否存在遗传毒性的重要指标^[8-10]。植株体内丙二醛(Malondialdehyde, MDA)是植株膜脂过氧化的产物, 其含量的高低反映了细胞膜脂过氧化水平。脂质过氧化强度和膜系统伤害程度^[11-15], 但是测蚕豆根尖细胞膜脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量的报道尚少^[8], 目前, 尚未见采用蚕豆根尖细胞微核试验研究精油遗传毒性的报道。笔者采用蚕豆根尖细胞微核试验研究薰衣草精油对蚕豆根类的遗传毒性, 并探究在不同浓度薰衣草精油的诱导下, 细胞微核率与脂质过氧化物之间的相关关系, 旨在为进一步研究薰衣草精油对蚕豆根类的遗传毒性机理提供借鉴。

1 材料与方法

1.1 材料 供试的青皮蚕豆(*Vicia faba* L.) 购于湖北松滋; 98% 薰衣草单方精油(广州市栋方日化有限公司)。

1.2 种子萌发 采用文献[10]的方法: 蚕豆在种子 $25\ ^\circ\text{C}$ 的温箱中 蒸馏水浸泡 24 h, 催芽 24 h 选种, 再催芽 36 h, 待种子大部分初生根长至 $1.00 \sim 2.50\ \text{cm}$ 时, 选取根尖长度大致相等的根尖幼苗作为实验材料。

1.3 处理设置 在 5 次预实验基础上, 确定正式试验中薰衣草精油浓度依次为 $0.001\ 6, 0.008\ 0, 0.040\ 0, 0.200\ 0, 1.000\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (公比 $r=5$)。用二甲基甲酰胺(DMF)作溶剂, Tween-80 作助剂, 用去离子水配制的溶液作为阴性处理。供试青皮蚕豆每 5 粒为 1 个处理组, 每组 3 次重复。以 $30\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的环磷酰胺

收稿日期: 2015-12-10

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2012BAK01B05); 海南省教育厅项目(HNJC2014-07)

作者简介: 赖柯华(1989-), 男, 海南大学环境与植物保护学院 2013 级硕士研究生, E-mail: 992650308@qq.com

通信作者: 范咏梅(1968-), 女, 研究员, 研究方向: 农药环境毒理与瓜菜病虫害防治, E-mail: yongmeifan@126.com

溶液为阳性对照,并测定其微核率与丙二醛含量。以去离子水为空白对照。

1.4 生长试验 选取发育良好,生长较一致的种子,吸干表面水分,用不同质量浓度的薰衣草精油溶液浸泡根尖,恒温处理24 h,分别于处理前、后测量其根长,恢复培养24 h。计算染毒24 h蚕豆根尖的生长量。

1.5 微核试验 将恢复培养24 h后的种子,吸干表面水分,切下1 cm长的幼嫩根尖,用卡诺氏固定液固定24 h,然后放入70%的乙醇中,置于4℃冰箱保存备用。固定后的根尖用蒸馏水浸洗2次,每次2~3 min,置于1 mol·L⁻¹的盐酸中,在60℃水浴锅中解离10 min,去离子水浸洗后,浸于水中。将充分软化的幼根放在滴有1滴蒸馏水的载玻片上,用解剖针截除根冠区,截留下约1 mm的根尖分生区,使细胞分散,在空气中晾干。用卡宝品红染液^[8]染色1.5 min,将载玻片置于70%的乙醇溶液中浸泡2 min,用镊子轻轻取出载玻片,用蒸馏水冲洗3次并晾干,完成制片,镜检。镜检微核标准为与主核分离、着色与主核相当或稍浅的圆形、椭圆形、不规则形小核。其大小于主核大小的1/3,并每个根尖观察3 000个细胞,记录染毒24 h后的微核细胞数,按下式计算微核率 MNF(%):

$$\text{微核率(MNF)} = \text{观察到微核细胞数} / \text{观察细胞总数} \times 1000。$$

用微核指数 MI 作为供试试剂是否致蚕豆根尖细胞产生突变的指标,它可直观反映蚕豆根尖细胞是否突变及突变程度^[10]。按下式计算微核指数:

$$\text{微核指数(MI)} = \text{处理组微核率} / \text{对照组微核率}。$$

1.6 脂质过氧化作用的检测 通过丙二醛(MDA)的含量($\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,FW)确定薰衣草精油对蚕豆根尖的脂质过氧化作用。根据文献[8]的方法,使用紫外分光光度计测定450、532、600 nm处上清液的吸光度,以2 mL的10%三氯乙酸(TCA)作参比液。

1.7 数据处理 使用SPSS17.0软件对各处理的结果进行F检验和MS等分析。

2 结果与分析

2.1 薰衣草精油对蚕豆根尖生长的影响 随着薰衣草精油处理浓度从0.001 6、0.008 0、0.040 0、0.200 0 mg·L⁻¹升高到1.000 0 mg·L⁻¹,蚕豆根尖的生长量呈下降趋势,分别为1.40、1.23、1.01、0.70和0.20 cm,空白对照的生长量为1.60 cm,阴性对照的生长量为1.59 cm(图1)。薰衣草精油处理24 h后的蚕豆,其根尖的生长量均小于空白对照,说明薰衣草精油对蚕豆根尖的生长具有一定的抑制作用。回归分析结果表明,随着薰衣草精油用量的升高,蚕豆根尖的生长量逐渐降低,呈负相关关系,相关系数 R^2 为0.95(图2)。

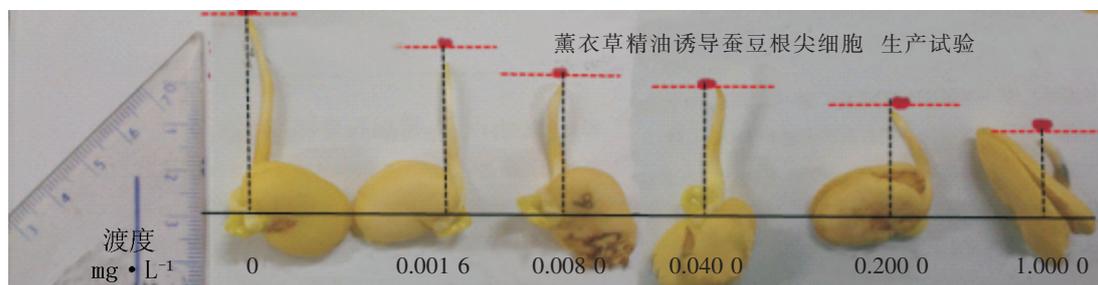


图1 薰衣草精油诱导蚕豆根尖生长试验

Fig.1 The growth test of *Vicia faba* root tip treated with lavender essential oil

2.2 薰衣草精油诱导蚕豆根尖微核结果 显微镜计数符合微核标准的微核细胞及正常细胞数(如图3箭头所示)。结果表明,薰衣草精油诱导蚕豆根尖细胞的微核率均低于阳性对照物环磷酰胺的微核率(21.2%)。在0~0.200 0 mg·L⁻¹范围内,随着精油处理质量浓度的升高,其诱导蚕豆根尖细胞产生的微核率逐渐降低,在0.200 0 mg·L⁻¹时达到最低(4.3%),且微核指数均<1,说明在此质量浓度范围内,薰衣草精油具有一定的抗突变性,且随着质量浓度的升高而增强;质量浓度范围在0.200 0~1.000 0 mg·L⁻¹时,随着质量浓度的升高,微核率也升高,在1.000 0 mg·L⁻¹达到12.6%,且微核指数>1.5,说明此质量浓度开始产生致突变作用。方差分析结果显示,0.001 6 mg·L⁻¹质量浓度处理组的蚕豆根尖细胞微核率与阴性

对照组差异显著 ($P \leq 0.05$) ,且 0.008 0 μ .040 0 μ .200 0 μ .1.000 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组的蚕豆根尖细胞微核率与阴性对照组差异达极显著水平 ($P \leq 0.01$) 。本实验以 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 环磷酰胺溶液作阳性对照 ,蚕豆染毒 24 h ,恢复培养 24 h 后 ,测得微核率为 21.2% 符合 OECD(欧洲经济合作组织) 的标准 ($\text{MNF} > 10\%$) [16] 。

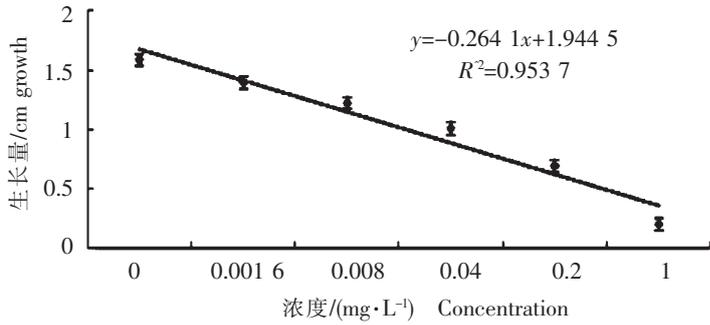


图 2 24 h 薰衣草精油对蚕豆根尖生长量的影响
Fig.2 The effects of lavender essential oil on the growth of *Vicia faba* root tip (24 h)

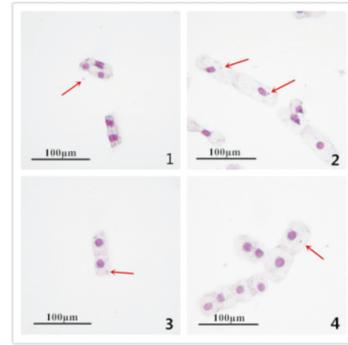


图 3 蚕豆根尖细胞产生的微核
1.游离细胞外的微核;2~4.细胞内的微核
Fig.3 Micronucleus of *Vicia faba* root tip cells
1. Micronucleus outside the cells;
2. Micronucleus inside the cells

表 1 薰衣草精油对蚕豆根尖细胞微核率的影响(24h)

Tab.1 The effects of lavender essential oil on the micronucleus frequency of *Vicia faba* root tip cells(24h)

用量/($\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) Concentration	微核率/%Micronucleus frequency	微核指数 Micronucleus index
阴性 Negative control	7.1	-
0.0016	5.9*	0.83
0.0080	5.3**	0.75
0.0400	5.4**	0.76
0.2000	4.3**	0.61
1.0000	12.6**	1.77

注: * 为 $P < 0.05$,** 为 $P < 0.01$

2.3 薰衣草精油诱导细胞膜脂质过氧化作用 从图 4 可知 ,蚕豆根尖细胞经薰衣草精油处理后 ,在 0 ~ 0.200 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 随着精油浓度的升高 ,脂质过氧化产物 MDA 的含量逐渐降低 ,并在 0.200 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最低 ,表明在此浓度范围 薰衣草精油具有一定的抗氧化性 ,且随着浓度的升高而增强; 在 0.200 0 ~ 1.000 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 随着浓度的升高 ,MDA 含量升高 ,在 1.000 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 达到 0.038 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$,超过了空白对照 (0.037 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 以及阴性对照 (0.036 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$) 。本实验以 30 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的环磷酰胺溶液作阳性对照 ,蚕豆染毒 24 h ,恢复培养 24 h 后 ,测得 MDA 含量为 2.133 $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}$ 。

2.4 细胞微核率与脂质过氧化相关关系分析 对 MNF 和 MDA 的相关关系进行散点回归分析 ,结果表明 ,在质量浓度为 0 ~ 0.200 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的薰衣草精油诱导下 ,蚕豆根尖细胞的微核率和脂质过氧化之间呈正相关关系(图 6) 相关系数 $R^2 = 0.83$,说明在此浓度区间薰衣草精油表现出了一定的抗突变性和抗氧化性 ,细胞微核的形成有赖于薰衣草精油诱变产生的氧化应激; 但在 0.200 0 ~ 1.000 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内 ,微核率与 MDA 含量都出现了增加的趋势 ,笔者初步认为 ,薰衣草精油的质量浓度高于 0.200 0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时 ,对蚕豆根尖细胞已经产生了明显的生物损伤 ,对细胞正常生理代谢和应激反应造成了破坏。

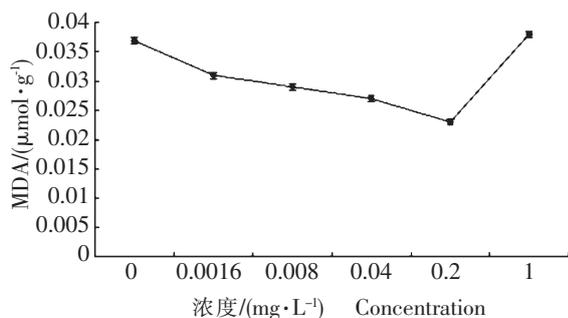


图4 薰衣草精油诱导下蚕豆根尖细胞MDA含量的变化
Fig.4 The effects of lavender essential oil on the MDA content of *Vicia faba* root tip cells

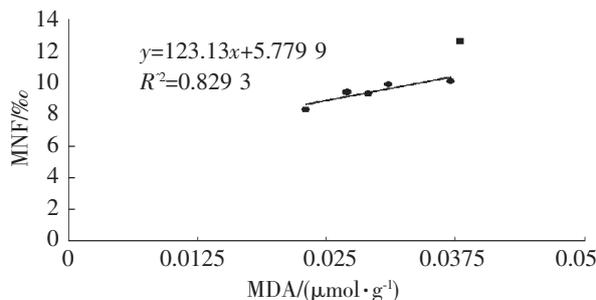


图5 薰衣草精油诱导下蚕豆根尖细胞的微核率和脂质过氧化相互关系的散点回归分析
Fig.5 The scattered plotting for regression analysis of correlation between the micronucleus frequency and the lipid oxidation of *Vicia faba* root tip cells induced by lavender essential oil

3 讨论

蚕豆微核检测方法不仅可用苯酚等化学物质的遗传毒性研究^[8],也可作为硒等重金属遗传毒性研究的方法^[17],共结果与Evandri^[18]等人曾用鼠伤寒沙门氏菌试验研究其遗传毒性研究结果相似。在植物衰老生理和抗性生理研究中,MDA含量是1个常用指标,通过测定MDA可了解膜脂氧化的程度,从而间接测定膜系统受损程度以及植物的抗逆性^[11-15]。许多学者把MDA的增加作为逆境条件下植株受害程度的指标,盐胁迫可使植物叶片膜脂过氧化作用加重,MDA含量明显增加^[19-21]。笔者用检测蚕豆根尖细胞经薰衣草精油处理细胞膜产生的脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量,可以初步揭示遗传毒性的机理,对今后的研究有一定的指导意义。

本实验的质量浓度基于多次预实验的基础,使发生氧化损伤的节点为 $0.2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处于实验浓度的中段,在小于该质量浓度时,薰衣草精油对细胞不会产生明显的遗传毒性,且表现出一定的抗突变性,说明薰衣草精油具有一定的抗突变活性,与赵鑫、刘婷等人的结果相似^[22];在本实验中,细胞微核率与脂质过氧化之间呈正相关关系,细胞微核的形成是由于薰衣草精油诱变产生的氧化应激,与张爱宁等人的结果相似^[8],但是当质量浓度大于 $0.2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,会产生一定程度的生理损伤,说明具有抗氧化作用的薰衣草精油在高浓度时会产生脂质过氧化反应,在该产品应用过程中应该严格控制其使用浓度。

本实验用OECD有关哺乳动物微核实验标准中推荐的阳性对照染色体断裂剂环磷酰胺作为阳性对照,该阳性对照实验结果与丁晓雯^[23]、王鹏^[24]等的研究报道相似,建议今后可将环磷酰胺作为蚕豆微核实验的阳性参比物质,以保障实验结果的稳定性和参考价值。薰衣草精油在 $0 \sim 0.2000 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量之间,具有一定的抗氧化性,却抑制蚕豆根尖生长,其机理有待深入探讨。

参考文献:

- [1] 程鹏,潘勤,许善初.薰衣草精油的生物活性[J].国外医药(植物药分册) 2008,23(1):7-10 41.
- [2] 张秋霞,江英,张志强.薰衣草精油的研究进展[J].香料香精化妆品 2006,23(6):21-24.
- [3] 王玉芹,孙亚军,施献儿.薰衣草精油的化学成分与药理活性[J].国外医药(植物药分册) 2004,19(1):5-8.
- [4] 张群,扎灵丽.薰衣草的研究和应用[J].时珍国医国药 2008,19(6):1312-1314.
- [5] 陈瑞娇,李均祥.蚕豆根尖微核试验在环境致突变物检测中的应用[J].韶关学院学报(自然科学版) 2006,27(9):87-91.
- [6] 肖健,王璐.有关蚕豆根尖微核试验的问题分析及改进策略[J].河北农业科学 2010,14(7):166-169.
- [7] 李爱玲,贾盼.蚕豆根尖微核检测技术的应用与发展[J].陕西农业科学 2014,60(5):66-68.
- [8] 张爱宁,严志刚,刘永军.用蚕豆根尖细胞分析苯酚的遗传毒性及机理[J].西安航空技术高等专科学校学报 2011,29(3):58-61.

- [9] 傅思颖, 杨民和. 染发剂对蚕豆根尖细胞遗传毒性效应的研究[J]. 山西师范大学学报(自然科学版) 2014 28(2): 89–93.
- [10] 李桂芳, 吴学进, 黄先忠, 等. 烟草浸提液对蚕豆根尖的遗传损伤[J]. 长春师范学院学报 2012 3(3): 81–83, 95.
- [11] Feller U. Proteolytic in relation to leaf senescence [A]//Dalling MT(ed) . Plant Proteolytic Enzymes(Vol.2) . Boca Raton , FL: CRC Press ,1986: 49–84.
- [12] Leopold A C. Senescence in plant development [J]. Science ,1961 ,34: 1727–1741.
- [13] Leopold A C. Aging , senescence and turnover in plants [J]. Bioscience ,1975 ,25: 659–712.
- [14] Leshem Y Y , Halevy A H , Frankel C. Processes and Control of Plant Senescence [M]. New York: EL Seviser Science Press ,1986.
- [15] 马丽清, 韩振海, 周二峰, 等. 盐胁迫对珠美海棠和山定子膜保护酶系统的影响[J]. 果树学报 2006 23(4): 495–499.
- [16] OECD. Test No. 487: in vitro mammalian cell micronucleus test [S]. Paris: OECD Publishing ,2014: 3–5.
- [17] 王安喜. 硒对镉胁迫下蚕豆根尖细胞遗传毒性的影响[D]. 成都: 四川师范大学 2008.
- [18] Evandri M G , Battinelli L , Daniele C , et al. The antimutagenic activity of *Lavandula angustifolia* (lavender) essential oil in the bacterial reverse mutation assay [J]. Food and Chemical Toxicology ,2005 ,43(9): 1381–1387.
- [19] 齐曼·尤努斯, 李秀霞, 李阳, 等. 盐胁迫对大果沙枣膜脂过氧化和保护酶活性的影响[J]. 干旱区研究 2005 22(4): 503–507.
- [20] 石明岩, 吕锡武. N_2O 的环境效应及其防逸技术的发展趋势[J]. 城市环境与城市生态 2002 15(5): 45–47.
- [21] 张永清, 苗果园. 高粱生育后期根系对渍水胁迫的生物学响应[J]. 山西农业大学学报. 2005 25(3): 193–195.
- [22] 刘婷, 庠文波, 王婷, 等. 水蒸气蒸馏和超临界萃取薰衣草精油抗氧化作用研究[J]. 时珍国医国药 2009 20(12): 3035–3037.
- [23] 丁晓雯, 李红, 王海燕. 环磷酰胺对蚕豆根尖细胞微核率的影响[J]. 食品科学 2010 31(1): 194–197.
- [24] 王鹏. 不同浓度的环磷酰胺对蚕豆根尖细胞微核率的影响[J]. 辽宁师专学报(自然科学版) 2006 8(1): 101–102.

Genotoxic Effect of Lavender Essential Oil on *Vicia faba* Root Tip Cells

LAI Kehua , WANG Jianing , FENG Qing , HUANG Weikang , FAN Yongmei
(College of Environment and Plant Protection , Hainan University , Haikou , Hainan 570228 , China)

Abstract: Essential oil of Lavender (*Lavandula angustifolia* Mill) was used to induce the growth of *Vicia faba* root tip cells to test its genotoxicity , and the correlation between the micronucleus frequency and lipid peroxidation of the root tip cells induced were investigated. The result indicated that lavender essential oil could inhibit the growth of *V. faba* root tip cells at the concentration of $1.000\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, but it had no obvious genetic toxicity at the concentration of $0 - 0.200\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, and showed increasing resistance to mutation and oxidation. Induced with the lavender essential oil at the concentrations of $0 - 0.200\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ the root tip cells showed positive correlation between their micronuclei frequency and their lipid peroxidation , and the correlation coefficient (R^2) was 0.83. When induced with the lavender essential oil at a concentration of higher than $0.200\ 0\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, *V. faba* root tip cells produced obvious biological damage , and their normal physiological metabolism and stress response were affected.

Keywords: lavender essential oil; broad beans; micronucleus; lipid peroxidation