

典型醛类污染物与细胞 DNA 分子的结合作用

裘著革,戴树桂,孙咏梅(南开大学环境科学与工程学院,天津 300071)

摘要:为了研究甲醛、乙醛和丙烯醛等 3 种典型醛类污染物与细胞 DNA 的结合作用,探讨其遗传毒性效应和机制,采用体外测试系统,应用紫外光谱移动法和高效液相色谱法研究结合位点。结果表明,醛类污染物染毒细菌 DNA 紫外吸收峰位移不显著;但提取的细菌 DNA 与甲醛进行试管反应体系紫外位移显著;醛类污染物染毒真核细胞致 DNA 分子紫外吸收峰位移显著;乙醛与脱氧鸟苷酸的试管反应经 NaBH_4 还原后经 HPLC 分离检测,产物初步定性为 N2-乙基鸟苷加合物。说明 3 种醛类污染物能够与细胞 DNA 结合而体现遗传毒性,鸟苷的 N2 位可能是共价加合的位点。

关键词:典型醛类污染物;遗传毒性效应;DNA 加合物

中图分类号:R994.6 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2001)01-04-0019

The Bindings of Typical Aldehydes Pollutants with Cell DNA

Xi Zhuge, Dai Shugui, Sun Yongmei (College of Environmental Sciences and Engineering, Naikai University, Tianjin 300050, China)

Abstract: The bindings of 3 kinds of aldehyde pollutants, formaldehyde, acetaldehyde, acrolein, with both prokaryotic and eukaryotic DNA, and their genotoxic effect and mechanism were conducted by the shifts of maximum UV absorption peak to determine binding effects and by HPLC to determine binding sites in vitro model system. The shifts of maximum UV absorption peak of prokaryotic DNA contaminated by 3 kinds of aldehyde pollutants are not significant; but after the DNA extracted from prokaryotic bacteria reacting with formaldehyde in tube, the shifts of maximum UV absorption peak of DNA are significant; the shifts of maximum UV absorption peak of eukaryotic DNA contaminated by 3 kinds of aldehyde pollutants are significant also. The reaction of acetaldehyde with dG reduced by NaBH_4 was separated and detected by HPLC, the product was determined qualitatively as N2-ethyldeoxyguanosine adduct. The 3 kinds of aldehyde pollutants could bind with cellular DNA to express genotoxic effects; and the N2 site of deoxyguanosine is the possible covalent binding site.

Key words: typical aldehyde pollutants; genotoxic effects; DNA adducts

醛类化合物具有多方面的毒性效应,其遗传毒性效应倍受关注。目前开展的工作主要有甲醛能够引起 DNA-蛋白质交联^[1,2]和与 DNA 结合形成加合物^[3,4]。乙醛-DNA 加合物的研究也已开展^[5~11],一般认为其潜在致癌机制是进攻 DNA 分子上的鸟苷 N2 位形成不稳定的希夫碱,然后由细胞内还原系统还原成稳定的 N2-乙基-3'-脱氧鸟苷加合物^[9]。乙醛形成 DNA-蛋白质交联和蛋白质加合物有研究报道^[12~15]。丙烯醛也能够形成 DNA 加合物,经初步鉴定为 N2-丙基-脱氧鸟苷加合物^[16]。本文以 3 种化合物作为典型研究对象,应用紫外光

谱移动法和液相色谱法,通过原核与真核测试系统和试管反应,研究污染物与 DNA 分子的结合作用和结合位点,探讨其遗传毒性效应和潜在致癌性的分子机制,同时寻求简易的检测环境遗传毒物的方法。

1 材料与方法

1.1 实验材料

基金项目:国家教委博士点专项基金资助项目(BBA24A)

作者简介:裘著革(1966~),男,博士后,主要研究方向为污染生态化学及环境污染物生物学标志物,现在军事医学科学院攻读博士后。通讯地址:天津市和平区大理道 1 号,邮政编码:300050。

收稿日期:2000-04-26

(1) 试剂与药品 RPMI 1640(GIBCOBRL 公司) HANK' S 储存液:按文献[17]方法配制,临用前 1 份贮存液加 4 份高压灭菌的双蒸水比例配成 HBSS 应用液;溶血 Gey' s 明胶溶液:按文献[17]配制;新生小牛血清(天津血研所,用前 56 ℃30 min 灭活分装, - 20 ℃保存);胎盘蓝溶液:按文献[17]配制;DNA 提取试剂盒(军事医学科学院五所赠);大肠杆菌株 8099 株(军事医学科学院四所赠)。5'-dCMP, 5'-dTMP, 5'-dAMP, 5'-dGMP, 均为层析纯(上海伯奥生物试剂公司)。

(2) 实验动物 健康雌性昆明小鼠, 体重 25g, 按文献方法提取脾淋巴细胞。

(3) 仪器 液相色谱仪, 配 Bondapack C-18 反相色谱柱和紫外检测器(美国 Waters 公司); UV-7500 全扫描紫外可见分光光度计(扫描精度: ±0. 2nm, 香港天美公司)。

1. 2 实验方法

(1) 醛类化合物与 DNA 分子的结合(加合)作用 应用 DNA 的紫外光谱最大吸收峰移动法定性测定^[17]。实验过程为在原核(大肠杆菌) 和真核细胞(小鼠脾淋巴细胞) 系统中, 加入醛进行染毒, 用试剂盒将 DNA 抽取出来, 测其紫外吸收光谱, 观察位移情况, 如果发生位移则表明 DNA 分子结合了待测化学物。

(2) 醛类污染物与 DNA 分子结合位点研究 应用液相色谱研究: 色谱条件: 流动相: 甲酸胺(0. 2 mol/ L) / 甲醇(30 mmol/ L) 1: 20, 流速为 0. 7 ml/ min; 紫外检测波长为 254nm: ①4 种单核苷酸分别在 PB 缓冲盐溶液中, 37 ℃恒温下分别与乙醛进行反应一定时间(0. 10. 30. 60. 90 min, 4h. 5h) 进行色谱测定; ②4 种单核苷酸分别在 PB 缓冲盐溶液中, 37 ℃恒温下分别与乙醛进行反应 18h, 之后将其中一个反应管取出后加入 3 mg NaBH₄, 每隔 30 min 加入一次 3 mg NaBH₄, 连续加入 3 次, 最后加入 6 mg NaBH₄, 反应 30 min 后进样分析; ③乙醛和乙醇以不同比例与脱氧鸟苷酸进行加合反应, 进样分析。

2 实验结果

2. 1 醛类化合物对原核细胞 DNA 结合损伤作用

预实验结果表明甲醛和丙烯醛均具有抑菌作用, 而乙醛基本无抑菌作用。选择一个较低剂量的染毒细菌后, 提取细菌的 DNA, 观察染毒细菌 DNA 的紫外吸收峰变化情况, 见表 1。直接提取细菌 DNA, 然后以甲醛为例染毒观察 DNA 紫移情况见表 2。通过表 1 可以判断甲醛、乙醛、丙烯醛对细菌 DNA 损伤不明显或比较微弱。因此, 醛类污染物不易穿透原核细胞的细胞膜, 对原核生物造成遗传损伤。表 2 中 DNA 紫外吸收峰的位移要明显得多, 反映活体细胞与提取 DNA 的差异, 也提示醛类化合物具有遗传毒性效应。同时这种光谱移动法也可能成为一种筛选遗传毒性物质的简便方法。

表 1 染毒细菌提取的 DNA 紫外吸收峰的位移/ nm

Table 1 The shifts of maximum UV absorption peak of prokaryotic DNA

受试物	最大吸收峰	位移	Abs
空白对照	253	0	3. 000
甲醛	254	+ 1	3. 000
乙醛	254	+ 1	3. 000
丙烯醛	254	+ 1	2. 045

表 2 未染毒细菌提取的 DNA 与
甲醛作用后紫外吸收峰的位移/ nm

Table 2 The shifts of maximum UV absorption peak of prokaryotic DNA after reacted with formaldehyde

甲醛/ %	最大吸收峰	位移	Abs
对照	252	0	1. 958
3	254	+ 2	2. 045
5	258	+ 6	2. 154
10	258	+ 6	2. 154

2. 2 醛类化合物对真核细胞 DNA 的结合损伤作用

经一系列染毒实验确定在本实验条件甲醛浓度 < 0. 16 mmol/ L, 乙醛浓度 < 1. 0 mmol/ L, 丙烯醛浓度 < 0. 1 mmol/ L 时, 淋巴细胞的存活率 > 95 %。这一结果表明: 3 种醛类化合物均具有细胞毒作用, 但它们的毒作用程度在剂量上

存在差别,丙烯醛对细胞的致死剂量最小,其次是甲醛,乙醛对细胞的致死性弱于前 2 种化合物,表明丙烯醛的急性毒性要强于甲醛和乙醛.醛类污染物染毒小鼠脾淋巴细胞后,提取的 DNA 紫外吸收峰位移情况如表 3.通过紫外光谱移动的情况发现乙醛引起的 DNA 紫外光谱最大吸收波长的位移最大,其次是丙烯醛,甲醛移动距离最小,这一结果体现了与细胞毒性不同的规律,DNA 紫外吸收峰位移代表了遗传物质核酸与外源物质的结合程度,所以位移大小反映了醛类污染物与细胞 DNA 的结合能力的差异,其后果是遗传毒性效应的差异.

表 3 染毒细胞提取的 DNA 紫外吸收峰的位移/nm
Table 3 The shifts of maximum UV absorption peak of eukaryotic DNA

浓度 / $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$	甲醛		乙醛		丙烯醛	
	位移	Abs	位移	Abs	位移	Abs
0.00	0	1.920	0	1.866	0	1.866
0.01	0	1.920	4.0	1.000	1.0	1.000
0.02	1.0	1.000	5.0	1.000	1.0	1.000
0.04	4.0	1.522	6.0	1.619	4.0	1.795

2.3 醛类污染物与 DNA 分子结合位点

乙醛与 4 种单核苷酸反应体系经 HPLC 分离分析未获得新峰,表明乙醛难以与之加合,或加合物产量过低,或者加合物不稳定.在乙醛与 dG 的反应体系中通过加入温和还原剂 NaBH_4 ,获得了图 1 的色谱图,此反应体系中乙醛和 dG 的保留时间分别为 4.96 min 和 11.89 min,推断随 dG 之后而出的保留时间为 13.80 min 的峰为脱氧鸟苷酸加合物,因为 dG 与乙基鸟苷加合物分子量相近,难以分离完全.目前有关乙基鸟苷加合物的结构研究尚处于理论阶段,还未见合成的加合物标准品报道,所以未能用标准品确证,有待今后深入研究.乙醛与 dA、dC、dT 的反应体系均未获得明确结果.乙醛与脱氧鸟苷酸的加合反应历程的研究也未获得明确结果.这表明尽管理论上乙醛能够与 4 种单核苷酸形成亚胺形式的加合产物,但这类加合物是非常不稳定的,衰变较快,或者产量很少,在 HPLC 的检测限内难以检出.对于酗酒

者而言,体内乙醇在脱氢酶作用下代谢为乙醛,所以在体内还存在乙醇、乙醛同时存在这样的情况.为此探索乙醛和乙醇以不同比例与脱氧鸟苷酸的加合反应情况,结果仍未检测到加合物的峰,基本可排除醇醛缩合形成的缩醛与碱基结合的可能性.

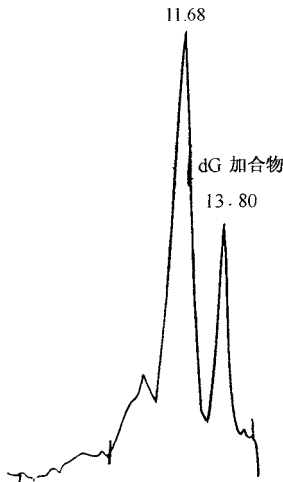


图 1 乙醛与 dG 反应经 NaBH_4 还原的 HPLC 色谱图
Fig.1 The reacting HPLC chromatogram of acetaldehyde with dG reduced by NaBH_4

3 讨论

(1) 所用紫外光谱移动法只能定性测定,但不失为一般经济而有效的测试手段.通过对原核生物细胞(大肠杆菌) DNA、真核细胞(小鼠脾淋巴细胞) DNA 的染毒测定,结果表明 3 种醛类化合物能够与 DNA 分子结合而具有遗传毒性.由于紫外光谱移动值不大,且相应的吸光度值的改变没有明显的规律性,也提示结合程度是有限的.应用小鼠脾淋巴细胞进行试验,效果要优于大肠杆菌.方法如能够与一些公认的检测遗传毒性的方法(如 Ames 试验)结果相一致,那么其所具有的简便、经济的特点将使之具有广阔的应用前景.

(2) 在确定 3 种醛类化合物具有遗传毒性,并能够与细胞 DNA 结合的基础上,通过乙醛与 4 种单核苷酸的各种反应,探讨醛类化合物与 DNA 碱基的结合位点.结果表明只有在还

原剂的参与下,乙醛与脱氧鸟苷酸可形成 N₂-乙基-脱氧鸟苷酸稳定加合物.因此推断其为乙醛暴露后体内形成的加合物的主要形式.当然在体内复杂环境中,即使从理论上推知可能发生的反应,包括在体外实验中检测到的反应,在体内也是很难实现的.Fang JL 利用 HPLC-³²P-后标记技术在酗酒者的外周血淋巴细胞中检测到了 N₂-乙基-脱氧鸟苷酸加合物.结合上述实验结果,可推断该加合物就是乙醇经脱氧酶作用代谢为乙醛,后者进攻 DNA 分子上鸟苷酸,形成不稳定的希夫碱(亚胺),然后在细胞内还原剂参与下,还原为稳定的 N₂-乙基-脱氧鸟苷酸加合物.甲醛和丙烯醛则可能分别形成相同位置的甲基化和丙基化加合物.

参考文献:

1 Conaway CC, Whysner J, Verna LK et al. Formaldehyde Mechanistic Data and Risk Assessment, Endogenous Protection from DNA Adduct Formation. *Pharmacol Ther*, 1996, **71**(1, 2): 29 ~ 55.

2 Fennell TR. Development of Methods for Measuring Biological Markers of Formaldehyde Exposure. *Res Rep Health Eff Ins*, 1994, **67**: 1 ~ 26.

3 Morris JB. Dosimetry, Toxicity and Carcinogenicity of Inspired Acetaldehyde in the Rat. *Mut Res.*, 1997, **380**: 113 ~ 124.

4 Zimmerman BT, Crawford GD, Dahl R et al. Mechanisms of Acetaldehyde Mediated Growth Inhibition: Delayed Cell Cycle Progression and Induction of Apoptosis. *Alcohol Clin Exp Res.*, 1995, **19**(2): 434 ~ 440.

5 Vaca CE, Fang JL, Schweda EKH. Studies of the reaction of Aa with deoxynucleosides. *Chemical Biological Interactions*, 1995, **98**: 51 ~ 67.

6 Hemminki K, Suni R. Sites of reaction of glutaraldehyde and acetaldehyde with nucleosides. *Arch Toxicol*, 1984, **55**: 186 ~ 190.

7 Austin J, Dosanjh MK, Conrat HF. Further studies of the mixed acetals of nucleosides. *Biochimie*, 1993, **75**: 511 ~ 515.

8 Conrat HF, Singer B. Nucleoside adducts are formed by cooperative reaction of acetaldehyde and alcohols: possible mechanism for the role of ethanol in carcinogenesis. *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1988, **85**: 3758 ~ 3761.

9 Jia LF, Vaca CE. Development of a ³²P-postlabeling method of the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3' monophosphate and DNA. *Carcinogenesis*, 1997, **18**(4): 627 ~ 633.

10 Costa M, Zhitkovich A, Haris M et al. DNA-protein crosslinks produced by various chemicals in cultured human lymphoma cells. *J Toxicol Environ Health*, 1997, **50**(5): 433 ~ 449.

11 Keykendall JR, Bogdanffy MS. Formation and stability of acetaldehyde-induced crosslinks between poly-lysine and poly-deoxyguanosine. *Mut Res.*, 1994, **311**(1): 49 ~ 56.

12 Ristow H, Seyfarth A, Lochmann ER. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in saccharomyces gel electrophoresis. *Mut Res.*, 1995, **326**: 165 ~ 170.

13 Nicholls, R, Jersey JD, Worrall S. Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance. *Int J Biochemistry*, 1998, **24**(12): 1899 ~ 1906.

14 Castro GD, Delgado de LAM, Castro JA et al. Liver nuclear ethanol metabolizing system (NEWS) producing acetaldehyde and 1-hydroxyethyl free radicals. *Toxicology*, 1998, **129**(2 ~ 3): 137 ~ 144.

15 Lee BP, Morton RF, Lee LY. Acute effects of acrolein on breathing role of vagal bronchopulmonary afferents. *American Physiological Society*, 1992, 1050 ~ 1055.

16 Nath RG, Ocando JE, Chung FL. Detection of 1, N₂-propanodeoxyguanosine adducts as potential endogenesis DNA lesions in rodent and human tissue. *Cancer Research*, 1996, **56**(2): 452 ~ 456.

17 方福德, 周吕, 丁湊等主编. 现代医学实验技巧全书《上册》. 北京: 北京医科大学与中国协和医科大学出版社, 1998. 1153 ~ 1160.

1999 年中国(自然科学)各学科影响因子居前 3 位的期刊¹⁾

综合类		生物		化学		工程	
1 中国科学	1.077	1 植物学报	0.809	1 分析化学	0.915	1 摩擦学报	1.054
2 中国科学 E	0.620	2 遗传学报	0.723	2 分析试验室	0.779	2 电力系统自动化	0.841
3 科学通报	0.526	3 植物生态学报	0.620	3 高等学校化学学报	0.641	3 计算机集成制造系统-CIMS	0.746
数学		医学		地学		环境	
1 生物数学学报	0.299	1 中华结核和呼吸杂志	1.268	1 矿床地质	1.487	1 环境科学	0.772
2 数学学报	0.270	2 中华传染病杂志	1.187	2 第四纪研究	1.195	2 遥感学报	0.699
3 应用数学学报	0.270	3 中华心血管病杂志	1.135	3 地质学报	0.848	3 生态学报	0.632
物理·力学		农学		信息与系统科学		大学学报	
1 物理学进展	0.784	1 中国农业科学	0.730	1 信息与控制	0.453	1 地球科学——中国地质大学学报	0.515
2 工程力学	0.658	2 园艺学报	0.602	2 控制与决策	0.426	2 第四军医大学学报	0.349
3 核聚变与等离子体物理	0.495	3 棉花学报	0.546	3 控制理论与应用	0.380	3 第二军医大学学报	0.335

1) 引自《科学时报》2000 年 12 月 15 日第 3 版