

乙醛对脱氧核糖核酸分子的损伤作用

裘著革, 晁福寰, 杨丹凤, 孙咏梅, 李官贤, 张华山, 张伟, 杨玉花, 刘焕亮

(军事医学科学院卫生学环境医学研究所, 天津 300050)

摘要:应用单细胞凝胶电泳技术和液相色谱-电化学检测法研究了典型环境污染物乙醛对脱氧核糖核酸(DNA)分子的损伤效应。结果表明:乙醛不仅可诱导人外周血淋巴细胞 DNA 发生链断裂,还可引起 DNA-DNA、DNA-蛋白质交联;乙醛与小牛胸腺 DNA 的体外作用较弱,但在铁离子介导下对 DNA 的氧化能力增强,可产生一定量的 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)加合物;动物实验表明,乙醛诱导大鼠肺组织 DNA 氧化损伤生成 8-OHdG,提示乙醛具有潜在遗传毒性,可能与引起 DNA 交联及氧化有关。

关键词:乙醛;核酸损伤;DNA 链断裂;DNA-DNA 交联;DNA-蛋白质交联;8-羟基脱氧鸟苷

中图分类号:X18,R994.6 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2004)03-0102-04

The Effects of DNA Damage Induced by Acetaldehyde

Xi Zhur ge, CHAO Fu-huan, YANG Dan-feng, SUN Yong-mei, LI Guan-xian, ZHANG Hua-shan, ZHANG Wei, YANG Yu-hua, LIU Huan-liang

(Institute of Health and Environmental Medicine, Academy of Military Medical Sciences, Tianjin 300050, China)

Abstract:The effects of DNA damage induced by the typical environmental pollutant acetaldehyde were studied with single cell gel electrophoresis(SCGE) and high performance liquid chromatography with electrochemical detection(HPLC-EC). The results showed that acetaldehyde not only could cause DNA strand breakage but also DNA-DNA, DNA-protein crosslinks of lymphocytes of human peripheral blood. The reaction of acetaldehyde with DNA in vitro was weak, but the oxidative ability was enhanced and the reaction could produce a number of 8-OHdG adducts mediated by the Fe^{2+} . The animal experiment shows that acetaldehyde can cause the oxidative DNA damage of rat lung tissues, which suggests that acetaldehyde have the potential genotoxicity and its chemical mechanism is relative to the crosslinks and oxidation with DNA.

Key words:acetaldehyde; DNA damage; DNA strand breakage; DNA-DNA crosslinks; DNA-protein crosslinks; 8-Hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)

乙醛是重要的化学工业原料,在生产和使用中常造成职业接触^[1].同时,由于吸烟及燃料燃烧等也使之成为一种普遍的室内空气污染物^[2],给人们的健康带来危害.乙醛还是乙醇在体内代谢的中间产物.其一般毒性主要表现为眼和上呼吸道刺激症状,但更主要的是其具有致畸性^[3~5]、致癌性^[6~8]和潜在的致癌性,被国际癌症研究中心(IARC)列为 2B 组,即动物实验证据充分而流行病学证据有限或流行病学证据有限但动物实验证据不足的可能致癌物^[9].本文应用单细胞凝胶电泳和液相色谱-电化学检测技术首次同时检测乙醛诱导人外周血淋巴细胞 DNA 的断裂、交联、DNA-蛋白质的交联,以及核酸氧化损伤标志物 8-OHdG,探讨乙醛对 DNA 造成的损伤作用等遗传毒性和损伤发生的化学机制.

1 材料与方法

1.1 试剂

小牛胸腺 DNA、核酸酶 P1、E. Coli 碱性磷酸酶、8-OHdG 标准品均购自于 SIGMA 公司;正常熔点琼脂糖(NMA),低熔点琼脂糖(LMA),溴化乙锭

(EB)购于 Promega 公司;甲醇为国产色谱纯,其他试剂均为国产分析纯.

1.2 仪器

可调式电泳仪(电流 50 ~ 500 mA,电压 220 ~ 1000 V,中国科学院上海生物研究所);显微摄影设备(Olympus 荧光显微镜,高分辨率(MTV-1881EX),黑白摄像头,JVC 录象机,录象带);图象分析系统(计算机 Pentium II 266 MHz);Aver Meri-a Tv capture card 灰度分析软件.高压液相色谱仪,配 464 电化学检测器, μ Bondapak C18 柱,4.6 mm $\times$ 300 mm,电化学检测器工作电极为玻璃碳电极,参比电极为饱和甘汞电极(美国 Waters 公司);紫外-可见全扫描分光光度计(中国香港天美公司);台式高速离心机(上海安亭公司).

1.3 方法

1.3.1 乙醛诱导人外周血淋巴细胞 DNA 损伤-链

收稿日期:2003-08-21;修订日期:2003-11-14

基金项目:国家科技部“十五”攻关项目(2001 BA704 B01);公益基金项目(2001 DIA1 001)

作者简介:裘著革(1966~),男,博士后,副研究员,主要研究方向为环境化学和化学毒理学.

断裂、交联及 DNA-蛋白质交联的检测^[10~13]

(1) 人外周血淋巴细胞的制备 用常规淋巴细胞分离法分离健康成人男性静脉血 3 mL, 最后获得浓度为 $10^6/\text{mL}$ 的淋巴细胞悬液。

(2) 细胞染毒 取淋巴细胞悬液 $250\mu\text{L}$, 加入不同量的乙醛, 以 RPMI 1640 调整总反应体积为 $500\mu\text{L}$, 乙醛的终浓度分别为 0、0.0166、0.0332、0.0664 和 0.1328 mmol/L。将反应管置于 37°C 恒温水浴锅孵育 30 min, 取出进行胎盘蓝染色, 计算细胞存活率大于 90%。

(3) 单细胞凝胶电泳 在磨砂载玻片上铺 0.75% 正常融点琼脂糖 $100\mu\text{L}$, 作为第 1 层; 第 2 层为 1% 低融点琼脂糖与等量的细胞悬液的混合液 $100\mu\text{L}$; 第 3 层为 0.5% 低融点琼脂糖 $100\mu\text{L}$ 。每一浓度制备 2 组凝胶, 其中第 1 组用于分析乙醛引起细胞的 DNA 断裂损伤, 第 2 组分析乙醛引起 DNA-蛋白质交联。将凝胶板放置于含有细胞裂解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na_2EDTA , 1% Triton, 1% Sodium Sarcosinate, 10% DMSO, 100 mmol/L Tris-HCl, pH = 10.0) 的大培养皿中, 进行细胞裂解, 裂解 2h。裂解后用冷去离子水冲洗, 以免凝胶脱落, 直至摸上去无滑腻感为止。将其中一组凝胶板放于电泳槽内 (内盛新鲜配制的电泳液, 1 mmol/L Na_2EDTA , 300 mmol/L NaOH, pH = 12), 先静置 20 min, 以实现 DNA 碱解旋, 之后电泳 20 min, 电流 300 mA。将凝胶板取出, 用 Tris-HCl (0.4 mol/L Tris-HCl, pH = 7.4) 中和至中性。取出胶板放无水乙醇中, 进行固定, 时间为 40 min。固定好的凝胶板放入湿润的瓷盘内, 置于冰箱, 保存待分析。另一组凝胶板先放入碱性电泳液中碱解旋 20 min, 再用 Tris-HCl 缓冲液中和至中性, 取出凝胶板, 在其上滴加 $50\mu\text{L}$

含蛋白酶 K 的细胞裂解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, 10% DMSO, 1g/L 蛋白酶 K), 置于 37°C 温箱中孵育 2h, 再置于碱性电泳液中电泳 20 min, 300 mA 电流强度, 之后用 Tris-HCl 缓冲液反复中和至中性, 再用无水乙醇固定, 以备分析 DNA-蛋白质交联。分析时, 首先将凝胶湿化, 再加入溴化乙锭 ($25\mu\text{g}/\text{mL}$) $50\mu\text{L}$, 染色 20 min, 最后用去离子水反复冲洗。上述过程均在 4°C 避光条件下进行。

为进一步确定 DNA-蛋白质交联的形成, 加入高浓度的蛋白酶 K 到凝胶上以去除与 DNA 交联着的蛋白质。通过与不加蛋白酶 K 的凝胶比较, 从而确定这种交联对 DNA 迁移率的影响。

(4) 显微摄影 将单细胞电泳的荧光图象用高分辨率的黑白 CCD 摄像头 (MTX-1881 EX) 拍摄, JVC 录像机录制, 显微镜物镜 $20\times$, 目镜 $3.3\times$, 激发波长 $530\sim 560\text{nm}$, 探测波长 $\geq 580\text{nm}$ 。

(5) 图象分析 用 AverMedia TV 捕捉卡将录像带上的细胞电泳图象输入计算机中, 800×600 真彩色 (24 位) 分辨率像素, 分别分析图象总灰度和尾部灰度, 计算出尾部灰度占总灰度的百分比。在 photoshop 5.0 剪贴板上用鼠标标定出细胞电泳的完整图象, 将背景填充为黑色, 然后用灰度分析软件分析其灰度, 以灰度值表示其中 DNA 总含量, 再用鼠标标记出细胞电泳图象的头部, 将其删除, 分析剩余部分的灰度, 用此灰度值表示尾部 DNA 含量, 以尾部灰度值/总灰度值代表泳出 DNA 的百分含量, 如图 1 所示。DNA 损伤程度表示为: DNA 损伤 (相对单位) = 染毒后细胞泳出 DNA 百分含量 - 未染毒细胞泳出 DNA 百分含量。

1.3.2 乙醛对 DNA 损伤形成 8-OHdG 的体外检测



图 1 彗星图象数据的定量处理

Fig.1 Quantitative analysis of comet image

在体外模拟条件下,浓度为 16.43 mg/ mL 乙醛与 100 μ g 小牛胸腺 DNA 37℃下温浴 10h;考虑金属离子的介导作用,以 1.0 mmol/ L Fe²⁺ 掺入反应,设立相应对照.DNA 沉淀、定量、酶解以及 8-OHdG 的分析检测参见文献^[14],其中,由于 8-OHdG 的含量较低,用 10⁵ 个 dG 中所含 8-OHdG 个数来表示.

1.3.3 动物实验

Wistar 大鼠 15 只,随机分为 3 组,每组 5 只,分别为空白对照,依据急性、慢性毒性实验和动物外推剂量设定低剂量组(0.05 mg/50 μ L),高剂量组(1.0 mg/50 μ L),经乌拉坦麻醉后,用乙醛气管灌注染毒,24h 后处死,提取肺组织 DNA,紫外定量后酶切,应用 HPLC-EC 分析形成的 8-羟基脱氧鸟苷^[15].

2 结果与讨论

2.1 乙醛引起的 DNA 断裂与交联损伤

不同浓度的乙醛与人外周血淋巴细胞作用后其彗星细胞尾部灰度与总灰度分析结果见表 1.当乙醛浓度为 0.0332 mmol/ L 时,彗星细胞尾部灰度与整个细胞总灰度比值最高,此时 DNA 断裂损伤最为严重,造成 DNA 片段泳出增加;此后,随乙醛浓度增加灰度比值减低,此时 DNA 发生交联,抑制 DNA 片段泳出,使彗星细胞尾部所占比例减少.当加入蛋白酶 K 后,随乙醛剂量增加灰度比值增加,具有剂量效应关系,该结果表明乙醛可引起人外周血淋巴细胞发生 DNA-蛋白质交联.

表 1 乙醛染毒后彗星细胞 DNA 泳出灰度比

Table 1 Grey scale ratio of the tail and whole comet cell after acetaldehyde cultured

乙醛浓度/ mmol·L ⁻¹	彗星细胞 DNA 泳出灰度比 ¹⁾ / %	
	不加蛋白酶 K	滴加蛋白酶 K
0	28.83 ± 2.44	30.54 ± 1.44
0.0166	45.29 ± 1.76 ²⁾	60.44 ± 1.42 ²⁾
0.0332	58.17 ± 1.93 ²⁾	69.16 ± 1.50 ²⁾
0.0664	36.78 ± 1.94 ²⁾	40.00 ± 1.19 ²⁾
0.1328	23.50 ± 1.49	36.60 ± 0.80

1) n = 20 2) 同甲醛浓度为 0 的对照组相比较, p < 0.05 .

不同浓度的乙醛对人外周血淋巴细胞 DNA 的损伤情况分别见表 2.可见,当乙醛浓度为 0.0332 mmol/ L 时,引起人外周血淋巴细胞 DNA 断裂损伤最大;加入蛋白酶 K 后,随乙醛剂量增加,引起 DNA-蛋白质交联损伤逐渐增大.

2.2 体外模拟条件下乙醛对 DNA 的氧化损伤

体外模拟条件下,乙醛与 DNA 作用后 DNA 中

8-OHdG 生成量的结果见表 3.实验表明,乙醛单独染毒 DNA 后 8-OHdG 生成量比空白值略高,说明在体外对 DNA 只造成弱的氧化损伤,但在 Fe²⁺ 介导下,使 DNA 中 8-OHdG 水平显著升高,大于乙醛和 Fe²⁺ 单独作用之和.

表 2 乙醛染毒后细胞损伤情况

Table 2 Grey scale ratio of the tail and whole comet cell, DNA damage after acetaldehyde cultured

乙醛浓度/ mmol·L ⁻¹	细胞 DNA 损伤率 ¹⁾ / %	
	不加蛋白酶 K	滴加蛋白酶 K
0	0	0
0.0166	16.46	16.73
0.0332	29.34	33.12
0.0664	7.95	37.49
0.1328	0	43.02

1) n = 20

表 3 乙醛单独及与 Fe²⁺ 联合与 DNA 作用引起 8-OHdG 的生成¹⁾

Table 3 The formation of 8-OHdG in DNA cultured with formaldehyde or acetaldehyde jointing Fe²⁺

实验组	8-OHdG 含量/ 个
DNA 空白对照组	41 ± 5
乙醛实验组	60 ± 10 ²⁾
Fe ²⁺ 实验组	102 ± 7 ²⁾
乙醛 + Fe ²⁺ 实验组	400 ± 52 ³⁾

1) n = 5 2) 同空白对照组比较, p < 0.05 3) 同其它 3 个实验组比较, p < 0.01 .

2.3 乙醛对大鼠肺组织氧化损伤及标志物 8-OHdG 的检测

乙醛染毒后,检测其诱导大鼠肺组织 DNA 氧化损伤形成 8-OHdG 结果分别为:空白对照组,(30 ± 6)个;低剂量组,(31 ± 5)个;高剂量组,(33 ± 10)个.实验表明,乙醛诱导的 8-OHdG 3 个实验组两两相比未见显著性差异(p > 0.05),前面实验结果表明乙醛具有较为明确的遗传毒性效应,但在体内诱导生成的 8-羟基脱氧鸟苷与空白相比未见差异,说明体内代谢条件下对核酸毒性效应是通过其它途径实现的.

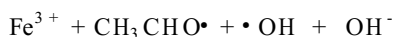
3 讨论

应用单细胞凝胶电泳技术,通过体外离体实验观察了典型污染物乙醛对人外周血淋巴细胞 DNA 的损伤作用.结果表明乙醛引起细胞 DNA 的损伤方式与浓度有一定关系,在低浓度时表现断裂,而在高浓度时则以交联作用为主,并且存在 DNA-DNA 交联和 DNA-蛋白质交联 2 种形式.乙醛是醛类化合物中结构简单的小分子,其毒性效应的一个重要

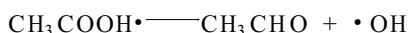
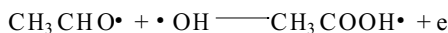
方面是源于它的羰基的亲电性和较小的空间位阻,使其易于与核酸及蛋白质发生交联-亲电加合反应。

同时乙醛还是广义上的自由基,本身及代谢过程中均能够产生自由基,进攻核酸产生断裂及形成 8-OHdG。检测鸟苷加合物实验研究表明,乙醛在体外对 DNA 只造成弱的氧化损伤,但在 Fe^{2+} 介导下,使 DNA 中 8-OHdG 水平显著升高,并且大于乙醛和 Fe^{2+} 单独作用之和。因此认为:作为一种自由基及弱的氧化剂,乙醛在试管反应中发生了类似 Fenton 反应的化学过程,作用类似于 H_2O_2 ,但介导 $\cdot\text{OH}$ 能力较之弱得多。其可能的反应历程如下。

引发阶段:



增长阶段:



终止阶段:



综上给出乙醛对核酸造成损伤的各种可能模式(图 2)。

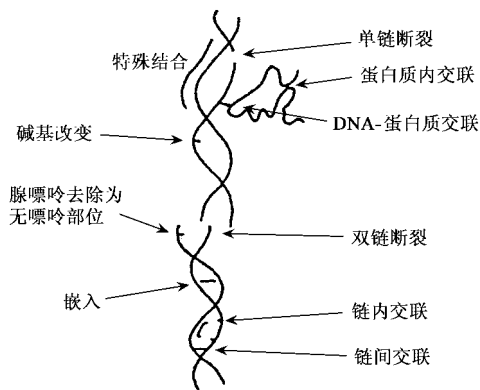


图 2 乙醛对 DNA 各种可能的损伤模式

Fig. 2 Different ways of DNA possible damage treated by acetaldehyde

参考文献:

- [1] 方家龙,刘玉英. 乙醛及其毒性[J]. 国外医学卫生学分册, 1996, 23(2): 101 ~ 104.
- [2] 裘著革,戴树桂,孙咏梅. 典型醛类污染物与细胞 DNA 分子的结合作用[J]. 环境科学, 2001, 22(1): 19 ~ 22.

- [3] Morris JB. Dosimetry, toxicity and carcinogenicity of inspired acetaldehyde in the rat. Mutation research[J], 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[J]. Alcohol-clin-express, 1995, 19(2): 434 ~ 440.
- [5] Ristow H, Seyfarth A, Lochmann ER. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in saccharomyces gel electrophoresis[J]. Mutation research, 1995, 326: 165 ~ 170.
- [6] Singh NP, Khan A. Acetaldehyde: genotoxicity and cytotoxicity in human lymphocyte[J]. Mutation research, 1995, 337(1): 9 ~ 17.
- [7] Matsuda T, Kawanishi M, Yagi T, et al. Specific tandem GG to TT base substitutions induced by acetaldehyde are due to introstrand crosslinks between adjacent guanine bases[J]. Nucleic acid research, 1998, 26(7): 1769 ~ 1774.
- [8] Vaca CE, Nilsson JA, Fang JL, et al. Formation of DNA adducts in humane buccal epithelia cells exposed to acetaldehyde and methylglyoxal in vitro[J]. Chemical-biological-interactions, 1998, 108(3): 197 ~ 208.
- [9] International agency for research on cancer: IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to Human[M]. IARC, Lyon, 1987.
- [10] Meehan WJ, Spencer JPE, Rannels DE, et al. Hydrogen peroxide induces oxidative DNA damage in rat type2 pulmonary epithelial cells[J]. Environmental and molecular mutagenesis, 1999, 33: 273 ~ 278.
- [11] Yang JL, Wang LC, Chang CY, et al. Single oxygen is the major species participating in the induction of DNA strand breakage and 8-hydroxydeoxyguanosine adduct by lead acetate[J]. Environmental and molecular mutagenesis, 1999, 33: 194 ~ 201.
- [12] Tice RR, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: guidelines for in vitro and in vivo genetic toxicology testing[J]. Environmental and molecular mutagenesis, 2000, 35: 206 ~ 221.
- [13] Merk O, Speit G. Detection of crosslink with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity[J]. Environmental and molecular mutagenesis, 1999, 33: 167 ~ 172.
- [14] 裘著革,晁福寰,孙咏梅,等. 高效液相色谱-电化学检测法测定脱氧核糖核酸分子氧化损伤标志物-8-羟基脱氧鸟苷[J]. 分析化学, 2001, 29(7): 765 ~ 767.
- [15] 裘著革,晁福寰,孙咏梅,等. 标准石英粉尘及青石棉直接诱导 8-羟基脱氧鸟苷加合物形成的研究[J]. 环境科学学报, 2001, 21(4): 481 ~ 485.