

人外周血淋巴细胞暴露于化学致癌物后 DNA 切除修复测定方法研究

洪长福 虞曼青 王守仁 俞淑清 俞永旦

(浙江人民卫生实验院)

人类癌症据估计有 80% 以上是由环境化学物质引起的。因此对大量的化学物质进行致癌性筛选试验,成为肿瘤预防的必要手段之一。实验表明, DNA 切除修复的测定可用作检测化学物质的致癌性。

过去,研究者曾用体外培养的人外周血淋巴细胞^[1-4]、人成纤维细胞^[5]、Hela 细胞^[6]、大鼠肝原代细胞^[7,8]等,成功地显示了由致癌性化合物诱导的非程序 DNA 合成(又称 DNA 切除修复)。他们分别采用放射自显影法和液体闪烁计数法作定量测定。特别是液体闪烁计数法,既简便、又灵敏,更适用于致癌性化学物质筛选。

人类外周血淋巴细胞常用于检测致癌化合物的研究,但很多人采用分离的淋巴细胞培养方法,手续繁琐,用血量大。本文报道我们用人全血培养淋巴细胞和选择性水解 DNA 技术,并以液体闪烁计数法测定 DNA 切除修复中的 ^3H -TdR 掺入。

材 料 和 方 法

一、淋巴细胞培养

取肝素抗凝的新鲜人外周血。全血加入 RPMI 1640 培养液中,其中含小牛血清 10%,青、链霉素各 100u/ml, PHA 30 μg /ml,用 5.6% NaHCO_3 调 pH 至 7.3—7.4, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱里培养 72 小时。全血白细胞计数在 1×10^6 W. B. C./ml。

二、用受试化合物处理淋巴细胞

全血淋巴细胞培养 72 小时后,加适量羟基脲使最终浓度为 10mM,以便抑制 DNA 半保

留复制。1 小时后,小心振荡各瓶,分别添加各种受试化合物储备液(溶于二甲基亚砜或其它溶剂)。最终浓度分别为 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7}M 。留一瓶仅加溶剂作对照。

三、DNA 修复测定

将 ^3H -TdR 加入上述各瓶,使最终浓度为 1 μCi /ml。培养 6 小时后,将每瓶样品分成三份,分别移入离心管。2000rpm 离心 10 分钟,小心倾去上清液。细胞团粒上加 3% CH_3COOH 4ml,打匀后,放置 5 分钟以破坏红细胞。2000rpm 离心 10 分钟。用 10ml 1mM EDTA 生理盐水洗涤培养瓶,再转入各离心管中。2000rpm 离心 10 分钟,小心倾去上清液。剧烈振荡细胞团粒,同时添加 1ml 6M NaSCN 溶液。室温下静置 16 小时以达到细胞完全胞溶。然后,添加载体 DNA 溶液 (0.1mg/ml) 1ml 及 30% 冰-冷 TCA 溶液 1ml,在剧烈振荡下大分子被沉淀。4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 分钟后,2000rpm 离心 10 分钟。细胞团粒用 0.5N PCA 洗一次,无水酒精洗一次,沉淀在 1ml 0.5N PCA 中,80 $^{\circ}\text{C}$ 下选择性地水解 60 分钟,再 2000rpm 离心 10 分钟。取上清液,定量地加入 10ml 甲苯闪烁液中,在 FJ-353 液体闪烁仪中测定。测定条件 HV1130 伏,甄别阈上 0.5V,下 5.0V,放大倍数 1/4。

从细胞培养的三个以上重复样品中,计算每组 dpm 的平均值,标准差和标准误。实验结果是计算各个化学物质诱导的最大非程序 DNA 合成(以下简称 UDS-)增加值。与对照组比较,进行显著性测验。

结 果

一、温度对选择性水解 DNA 的影响

淋巴细胞暴露于致癌化合物中后,可用 ^3H -TdR 的掺入代表诱导的 DNA 切除修复。Brouns 和 Michalopoulos 等报道,酸性沉淀物的放射性有很多被结合到非 DNA 结构中(主要是蛋白质)。而真正掺入 DNA 中的放射性较少。由于 ^3H -TdR 的非特异的结合,因而造成 DNA

切除修复增加的“假象”。

用 DNA 选择性水解技术,可以除去这一假象。当酸沉淀物最后用 0.5N PCA 80℃ 下水解,因它专一水解核酸,因此除去了非 DNA 结构物质放射性,所得即是 DNA 切除修复结果。

我们用甲基甲烷磺酸酯和 2,7-氨基苄处理全血淋巴细胞,以 0.5N PCA 水解,比较不同的选择性水解温度。在我们实验条件下,以

表 1 选择性水解 DNA 与温度关系

	水 解 温 度			
	70℃	80℃	90℃	100℃
甲基甲烷磺酸酯 (10^{-3}M)	4523*	6727	8177	11155
对 照	3536	4686	5718	8905
增加 UDS(%**)	27.89	43.55	43.00	25.27
2,7 氨基苄 (10^{-3}M)	236	759	650	864
对 照	191	464	741	850
增加 UDS(%)	23.81	63.73	—	1.6

* 表内除写明单位外皆为 dpm/ 10^6 白细胞

** 以对照为 100 最大增加值

80℃ 最好(见表 1)。

二、外周血淋巴细胞 DNA 修复合成与 PHA 的关系

本实验用 PHA 刺激人淋巴细胞,72 小时后加入各种浓度的化合物,诱导 DNA 切除修复合成,阳性致癌物与对照组的浓度反应曲线表明,两者有明显差异。而不加 PHA 的人淋巴细胞,因没有 DNA 合成,因而亦没有 DNA

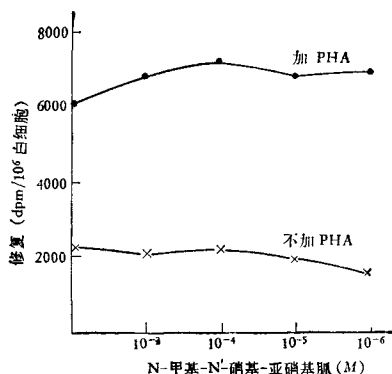


图 2 PHA 与 DNA 修复合成关系 (MNNG)

的切除修复合成。如图 1, 2。

三、DNA 切除修复合成-时间关系

培养 72 小时后用 10M 羟基脲抑制 DNA 半保留复制,1 小时后,加入 $22\mu\text{g}/\text{ml}$ 甲基甲烷磺酸酯处理淋巴细胞,同时加入 ^3H -TdR,继续培养,分别于不同时间取出样品,测定 DNA 修复值,其时间曲线见图 3。

由图 3 可知随着诱导时间增加, DNA 切

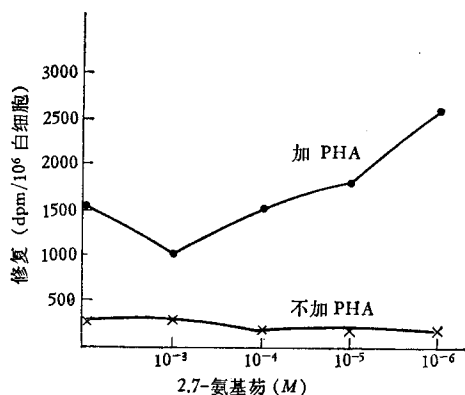


图 1 PHA 与 DNA 修复合成关系 (2,7-氨基苄)

表 2 人淋巴细胞悬液里经各种化学物质诱导的切除修复

	对照 (0.05% 溶剂) (dpm/10 ⁶ 个白细胞)	最大 DNA 修复值 (dpm/10 ⁶ 个白细胞)	浓度 (M)	P	诱导 UDS	致癌性/ 致突变性
2,7-氨基蒽	2405±317*	4382±577	10 ⁻⁵	<0.05	+	+
甲基甲烷磺酸酯	2277±189	3955±323	10 ⁻⁵	<0.02	+	+
偏重亚硫酸钠	1045±124	1180±152	10 ⁻⁵	/	-	-
杀螟松	2453±41	2512±112	10 ⁻⁴	/	-	-
N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍	1770±106	3509±124	10 ⁻⁵	<0.001	+	+
抗矽-14	1890±98	2214±367	10 ⁻⁵	/	-	-
联苯胺	2373±430	2336±393	10 ⁻⁶	/	-	+
叠氮钠	2100±6	1837±309	10 ⁻³	/	-	-

* 平均值±标准误

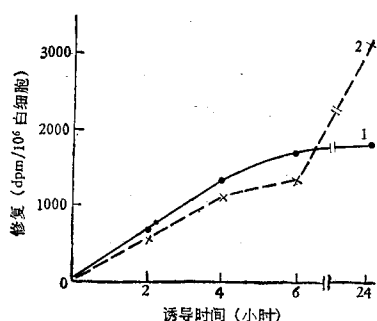


图 3 甲基甲烷磺酸酯等处理细胞修复合成时间曲线

1: 甲基甲烷磺酸酯 (10⁻⁴M) 2: 2,7-氨基蒽 (10⁻³M)

除修复合成值增大。但 DNA 修复速率在 4 小时即接近最大值,以后略有增加。我们选择诱导时间为 6 小时。

四、致癌化合物诱导 DNA 切除修复的测定

从我们对已知的致癌物 (2,7-氨基蒽, 甲基甲烷磺酸酯、N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍等)

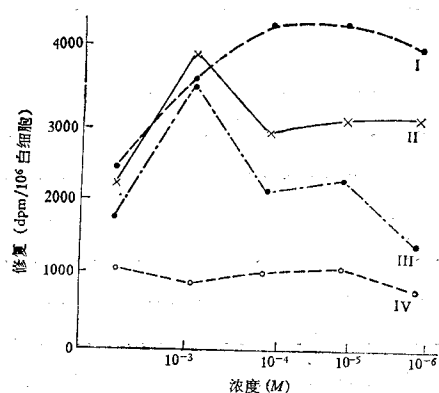


图 4 各种化合物不同浓度时 ³H-TdR 渗入的结果

I: 2,7-氨基蒽 II: 甲基甲烷磺酸酯 III: N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍 IV: 偏重亚硫酸钠

测定结果看,各种化合物诱导 DNA 修复能力不同。它们的剂量-效应曲线 (图 4),其浓度范围高低相差 1000 倍以上。一些致癌物,前致癌物和某些未知化合物 UDS 最大增加值见表 2。

不同个体(献血员)同一化合物诱导的最大 DNA 修复值是不同的 (见表 3)。不同的个体对化学物质敏感性不同,及各个体细胞背景结合不同,而有差异,但不影响结果。这与 Lake^[5]报道的结果相似。

表 3 不同献血员淋巴细胞经同一化学物质诱导的 DNA 切除修复

献血员	化合物	诱导最大 DNA 修复 (dpm/10 ⁶ 个白细胞)
A	2, 7-氨基蒽 (10 ⁻³ M)	3464±472 (2064±34)*
B		4382±577 (2405±317)
C		2673±178 (1504±257)
D		1800±77 (1446±0)
E	甲基甲烷磺酸酯 (10 ⁻³ M)	2463±286 (1045±124)
F		9931±633 (5118±857)
G		3955±323 (2277±189)
H		7333±357 (4869±360)

* 对照 (0.05%) 二甲亚砜平均值±标准误

讨 论

诱发 DNA 切除修复的试验,用作预测化学物质致癌性/诱变性,筛选化学致癌物是一个很有前途的方法。最近美国食品安全协会科学委员会已建议把诱导“DNA 切除修复试验”作为体外诱变试验的步骤之一。

目前认为致癌物质的作用靶子,主要是细胞 (下转第 6 页)

是用复制中间体的假说难以解释的。

四、环形 DNA 分子寡聚物研究的展望

从以上事实可以看到人们对环形 DNA 分子寡聚物的研究已经大大深入了。这些方面的研究使我们对 DNA 重组、复制及 DNA 可能的拓扑异构情况, DNA 拓扑异构酶的催化特性及可能的生物学作用有了更多的了解。由于细菌质粒、病毒及线粒体 DNA 这些环形 DNA 分子的分子量较小, 对基因组的结构和功能又了解得比较清楚, 因而为我们的研究提供了极方便的条件。这类 DNA 分子的遗传重组研究将为整个遗传重组的分子机制及生化过程提供一个理想的研究模型。对环形 DNA 分子的各种拓扑异构形态的研究及 DNA 拓扑异构酶的研究必将深化对 DNA 复制、基因的调控, 染色体的形态及其活动的调节以及遗传重组的过程的认识。连环寡聚物和多聚物的研究已成为了解这些问题的一把钥匙。环形 DNA 分子寡聚物的研究所产生的知识将丰富基因工程理论基础并指导它的实践, 给整个分子生物学的研究以重大影响。

参 考 文 献

- [1] Hudson, B. et al.: *Nature*, **216**, 647, 1967.
- [2] Clayton, D. A. et al.: *Nature*, **216**, 652, 1967.
- [3] Roth, T. F. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **58**, 650, 1967.
- [4] Hoeijmakers, J. H. J. et al.: *Plasmid*, **4**, 97, 1980.

- [5] Baldi, M. I. et al.: *Cell*, **20**, 461, 1980.
- [6] Goebel, W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **61**, 1406, 1968.
- [7] Rush, M. G. et al.: *J. Bio. Chem.*, **243**, 4821, 1968.
- [8] Margit, M. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **60**, 3739, 1973.
- [9] Jaenisch, R. et al.: *J. Mol. Biol.*, **73**, 199, 1973.
- [10] Helinski, D. R. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **40**, 899, 1971.
- [11] Kasamatsu, H. et al.: *Ann. Rev. Biochem.*, **43**, 695, 1974.
- [12] Helinski, D. R. et al.: *Ann. Rev. Microbiology*, **27**, 450, 1973.
- [13] Potter, H. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **74**, 4168, 1977.
- [14] Benbow, R. W. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **72**, 235, 1975.
- [15] DasGupta, C. et al.: *Cell*, **25**, 507, 1981.
- [16] Hudik-Plevnik, T. et al.: *Mol. Gen. Genet.*, **178**, 131, 1980.
- [17] Wake, C. T. et al.: *Cell*, **21**, 141, 1980.
- [18] Cassuto, E. et al.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 2962, 1980.
- [19] Howard-Flanders, P.: *Scientific American*, **245**, No. 5, 56, 1981.
- [20] Cohen, S. et al.: *Nature*, **294**, 182, 1981.
- [21] Kolodner, R.: *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **77**, 4847, 1980.
- [22] Fishel, R. A. et al.: *Nature*, **294**, 182, 1981.
- [23] 黄熙泰等《第四次中国生物化学学术会议论文摘要汇编》, 1981年85页.
- [24] Wang, J. C. et al.: in *Molecular Genetics Part III* (Edited by Taylor, J. H.), Academic Press, 1979, p. 65.
- [25] Cozzarelli, N. R.: *Cell*, **22**, No2 part 2, 327, 1980.
- [26] Cozzarelli, N. R.: *Science*, **20**, 953, 1980.
- [27] Gellert, M.: *Ann. Rev. Biochem.*, **50**, 879, 1981.
- [28] Tse, Y. C. et al.: *Cell*, **22**, 269, 1980.
- [29] Hsieh, T. et al.: *Cell*, **21**, 115, 1980.
- [30] Sundin, O. et al.: *Cell*, **21**, 103, 1980.

[本文于1982年6月25日收到]

(上接第 49 页)

胞内遗传的基础物质 DNA。我们用羟基脲抑制正常的有丝分裂的半保留复制合成, 测定内切酶切除 DNA 损伤片段后, 用未损伤链作模板再合成相应 DNA 片段, 此过程称为修复制或切除修复。可用同位素标记核苷酸 (^3H -TdR) 再掺入到细胞核的 DNA 上, 以便观察 DNA 片段修复制。

培养哺乳动物细胞的致突变短期试验, 在潜在致癌试验的组合里是必不可少的。采用新鲜的人全血淋巴细胞, 有以下优点: ①在评价

化学物质对人类危害性时, 可减少因种族差异而导致推论的错误。②新鲜的人全血淋巴细胞富有可诱导药物代谢的酶, 有利于需要代谢活化的一些前致癌物的检测。③直接采用新鲜的人全血, 比国外用分离淋巴细胞方法简便。

我们用上述方法测试致癌化合物 2, 7-氨基芴、甲基甲烷磺酸酯及 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍等呈阳性结果, 而对非致癌物偏重亚硫酸钠、叠氮钠等, 则为阴性结果。同时检测未知化合物杀螟松、抗矽-14 等为阴性, 与 Ames 等

(下转第 73 页)

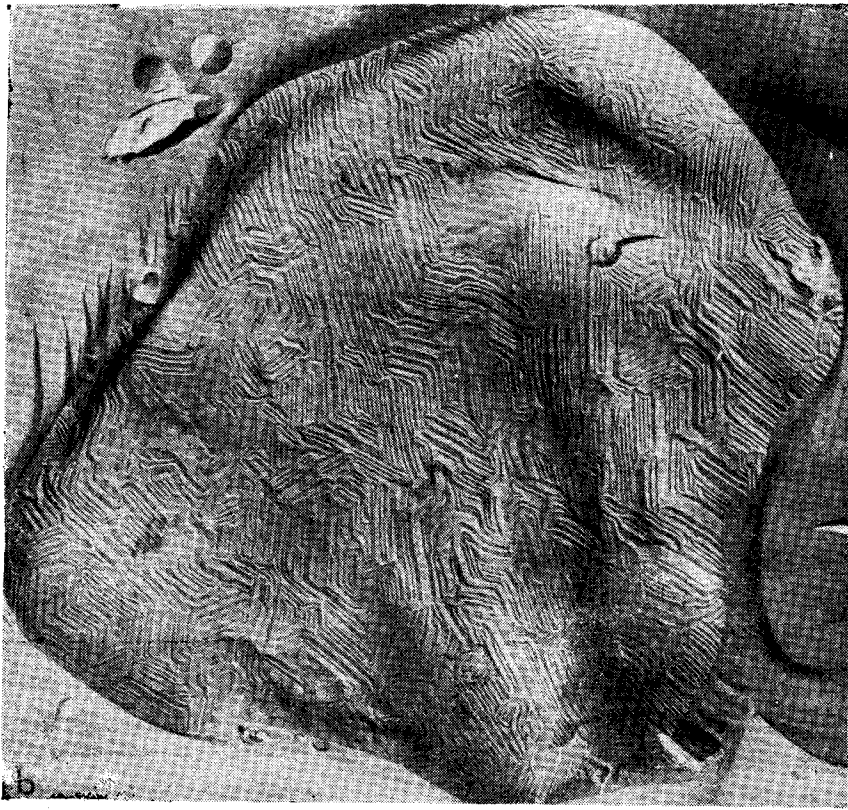


图 3b 用液体快速混合器制备的 DPPC 脂质体的冰冻断裂电镜照片

实验条件同 3a, DPPC 脂质体直径约为 6 微米 ($\times 20,000$)

裂电镜研究,也可经过凝胶过滤法进一步分离大小均一的脂质体供生物膜研究用。

参 考 文 献

- [1] 黄芬等:《科学通报》,1982 年,第 5 期,305 页。
[2] Bangham, A. D. et al., *Methods in Membrane Biology* (Korn E. D. ed), Vol. 1, 1—68, 1974.

- [3] Bartzri, S., et al: *J. Cell. Biol.*, 66, 621, 1975.
[4] Deamer, D. W., et al.: *Biophys. J.*, 16, AIII, 1976.
[5] Papahadjopoulos, D., et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 394, 483, 1975.
[6] Kim, S. et al.: *Biochim. Biophys. Acta*, 646, 1, 1981.

[本文于 1982 年 9 月 9 日收到]

(上接第 6 页)

的试验的结果一致。可见,本法方法简易,特别适合作常规试验,可用于化学物质致癌性的筛选。

参 考 文 献

- [1] Monica, H. et al.: *Mutat. Res.*, 65, 133, 1979.
[2] Lieberman, M. W. et al.: *Cancer Res.*, 31, 1297, 1971.
[3] Scudiero, D. et al.: *Cancer Res.*, 36, 1397, 1976.

- [4] Lake, R. S. et al.: *Cancer Res.*, 38, 2091, 1978.
[5] Lake, R. S. et al.: *Mutat. Res.*, 74, 357, 1980.
[6] Martiu, C. H. et al.: *Cancer Res.*, 38, 2621, 1978.
[7] Brouns, R. E. et al.: *Mutat. Res.*, 64, 425, 1979.
[8] Michalopoulos, G. et al.: *Cancer Res.*, 38, 1866, 1978.
[9] 余应年:《国外医学》(卫生学分册),第 8 卷,第 2 期,第 65 页。
[10] Scientific Commifftee Food Safety Conncil: *Food Cosmet Toxicol. Suppl.*, 2 (16) 4, 1978.

[本文于 1982 年 4 月 21 日收到]