

# 彗星电泳法和 K-SDS 法检测 甲醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对人脐 静脉内皮细胞 DNA 的损伤

# DNA Damage of Human Umbilical Vein Endothelial Cells Caused by Formaldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> with Comet Assay and K-SDS Assay

刘延君/林哲绚/李 慧/罗文鸿\*

(汕头大学医学院中心实验室,  
广东 汕头 515041)

LIU Yan-jun, LIN Zhe-xuan, LI Hui, *et al*  
(The Center Laboratory, Shantou University  
Medical College, Shantou 515041, China)

**【摘要】**背景与目的: 研究甲醛、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 以及两者共同作用对人脐静脉内皮细胞 DNA 的损伤。材料与方法: ①应用彗星电泳法于荧光显微镜下观察人脐静脉内皮细胞经甲醛、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、甲醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不同浓度 (0、5、10、25、50、100 μmol/L) 作用 20 min 或 25 μmol/L 浓度作用不同时间 (0、10、20、30 min) 后的 DNA 损伤情况; ②用 K-SDS 法检测甲醛、甲醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不同浓度 (0、10、50、100、500、1 000、2 000 μmol/L) 或 50 μmol/L、100 μmol/L 浓度不同时间 (0、0.5、1、1.5、2、4 h) 引起的 DNA-蛋白质的交联效应。结果: ①彗星电泳结果: 内皮细胞与不同浓度甲醛孵育 20 min, 5、10、25 μmol/L 甲醛所致 DNA 损伤以断裂为主且与阴性对照有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 与等摩尔 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同孵育时, 5、10、25 μmol/L 浓度组均可使单独 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时的彗星尾距增加, 50、100 μmol/L 使单独 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用时的彗星尾距减小; 25 μmol/L 甲醛作用不同时间, 尾距随时间增加而增大 ( $P < 0.05$ )。②交联结果: 内皮细胞与不同浓度甲醛孵育 1.5 h 后, 引起 DNA-蛋白质交联 (DPC) 形成明显增高 ( $P < 0.05$ ); 与等摩尔 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 共同孵育时除 1 h 组 ( $P < 0.05$ ), 其余各组与阴性对照无统计学差异; 50 μmol/L 的甲醛作用不同时间, 2 h 组与阴性对照有统计意义 ( $P < 0.05$ ); 100 μmol/L 的甲醛、甲醛与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用不同时间, 各实验组与阴性对照无统计学意义。结论: ①在体外条件下, 低浓度甲醛 (< 25 μmol/L) 对 DNA 的损伤以断裂为主, 高浓度 (> 500 μmol/L) 以交联为主, 均呈剂量及时间依赖性; ②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 引起内皮细胞 DNA 断裂损伤, 呈剂量及时间依赖性。

**【关键词】**人脐静脉内皮细胞; 彗星电泳; K-SDS; DNA 损伤

中图分类号: R735.702; R742.5

文献标识码: A

文章编号: 1004-616X(2005)01-0008-04

**【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM:** To investigate DNA damage of human umbilical vein endothelial cells after treated with formaldehyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formaldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. **MATERIAL AND METHODS:** ①Comet assay was employed to assess DNA damage of human umbilical vein endothelial cells treated with either various concentrations (0, 5, 10, 25, 50, 100 μmol/L) of formaldehyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formaldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for 20 min or 25 μmol/L formaldehyde, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, formaldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for different time (0, 10, 20, 30 min) to quantify the DNA damage. ②K-SDS was employed to evaluate DNA-Protein cross-link (DPC) of endothelial cells treated with either various concentrations of formaldehyde, formaldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (0, 10, 50, 100, 500, 1 000, 2 000 μmol/L) for 1.5 h or 50 μmol/L and 100 mol/L formaldehyde, formaldehyde and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> for different time (0, 0.5, 1, 1.5, 2, 4 h) to quantify the DPC. **RESULTS:** DNA breakage caused by 5, 10, 25 μmol/L formaldehyde was significantly different from control, and might be increased by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Tail moment was time-dependent when treated with 25 μmol/L formaldehyde. The formation of DPC increased ( $P < 0.05$ ) after treated with various concentrations of formaldehyde for 1.5 h. **CONCLUSION:** ①Formaldehyde can cause DNA breakage (< 25 μmol/L) and DPC (> 500 μmol/L), both were concentration and time-dependent. ②H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> can cause DNA breakage, which was concentration and time-dependent.

收稿日期: 2004-09-28; 修订日期: 2004-11-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30271139), 广东省自然科学基金 (No. 022124), 2003 年度教育部“优秀青年教师资助计划”项目 (教人司 [2003] 355 号)

作者简介: 刘延君 (1979- ), 女, 山东省泰安市人, 硕士研究生, 主要从事生化毒理学研究。

\* 通讯作者: Tel: 0754-8900532, E-mail: whluo@stu.edu.cn

【KEY WORDS】human umbilical vein endothelial cells; comet assay; K-SDS; DNA-damage

甲醛是公认的环境致癌物,自从 Rapoporty 于 1946 年首次报道了甲醛具有致突变性<sup>[1]</sup>以来,人们对甲醛的致癌性、致突变性做了大量研究。至今,绝大多数研究都集中在外源性甲醛即环境污染物。近年来 Yu 等<sup>[2,3]</sup>提出内源性甲醛可能是启动内皮细胞损伤,导致动脉硬化的潜在危险因素之一。人体内血液、尿液及组织中存在的少量甲胺,可以通过氧化脱氨产生内源性甲醛和等摩尔的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub><sup>[3]</sup>。本实验以人脐静脉内皮细胞为研究对象,采用彗星电泳法和 K-SDS 法检测甲醛、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、等摩尔甲醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对血管内皮细胞 DNA 的损伤作用。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞** 人脐静脉内皮细胞株 (CRL-2480) 购自北京医科大学肿瘤研究所。

**1.2 试剂** Tris、Na<sub>2</sub>EDTA、十二烷基肌氨酸钠、TritonX-100、DMSO、蛋白酶 K 购自上海生物工程公司,正常熔点胶、低熔点胶、溴化乙啶、PMSF 购自 Sigma 公司;分析纯 NaCl、KCl、Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、异丙醇、丙三醇、甲醛购自广州试剂公司,牛血清白蛋白、SDS 购自吉泰科技有限公司, Hoechst33258 购自晶美生物工程有限公司, M199 培养基购自 Gibco 公司。

**1.3 仪器与设备** 水平板电泳 (Bio-Rad 公司)、CO<sub>2</sub> 培养箱 (Themoforma)、光学显微镜 (Olympus)、超净工作台 (江苏净化仪器厂)、离心机 (Eppendorf)、低温冰箱 (Sanyo)、高压消毒锅 (宁波镇海医疗器械设备厂)、精密 pH 计 (Beckman)、荧光显微镜 (Olympus)、RF-5000 荧光分光光度计 (Shimadzu)。

### 1.4 实验步骤

**1.4.1 细胞培养** 取生长状态良好,处于对数生长期的细胞,0.25%胰蛋白酶消化接种于 35 mm 培养皿(每 50 T 培养瓶细胞接种 5 皿),于 37 °C 培养箱培养 48 h 后染毒。

**1.4.2 彗星电泳** 参考 Singh 等<sup>[4]</sup>人的方法。细胞与含有不同浓度甲醛、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、及等摩尔甲醛与 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(0、10、25、50、100 μmol/L)的无血清培养基 2 ml 共同孵育 20 min,或者与 25 μmol/L 的甲醛及 25 μmol/L 甲醛和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 孵育不同时间(0、10、20、30 min),之后无血清培养基洗 3 遍,0.25%胰酶消化,收集细胞离心,加入 PBS 配成浓度为 (1~2) × 10<sup>6</sup> 的细胞悬液。取 35 μl 细胞悬液与等体积的 1%的低熔点胶混合作为第二层铺在载玻片上,第一层和第三层分别是 1%的正常熔点胶 85 μl 和 0.5%的低熔点胶 70 μl,4 °C 冰箱至凝,移去盖

玻片,于 4 °C 预冷裂解液(2.5 mol/L NaCl, 100 mol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 10 mmol/L Tris 缓冲液,1%十二烷基肌氨酸钠, pH 10, 用前加终浓度为 1% TritonX-100 和 10% DMSO)中裂解 2 h,电泳液(1 mmol/L Na<sub>2</sub>EDTA, 300 mmol/L NaOH)平衡 15 min,电泳 15 min(电压 1 V/cm),电泳完毕 0.4 mol/L Tris pH 7.5 中和液浸洗 3 次,每次 10 min。5 μg/ml EB 染色,每张玻片 40 μl,荧光显微镜 20 倍物镜下观察照相(激发波长 515~560 nm, 阻断波长 > 590 nm),每组随机抽取 20 个细胞测量尾距(尾部 DAN 占总 DNA 的百分比与尾长的乘积)。

**1.4.3 K-SDS 法检测 DNA-蛋白质交联率** 按照 Anatoly 等<sup>[5]</sup>的方法。量效:每皿加入 2 ml 含不同浓度甲醛(0、10、50、100、500、1 000、2 000 μmol/L)或甲醛与等摩尔浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的无血清培养基,孵育 1.5 h;时效:含 50、100 μmol/L 甲醛和甲醛与等摩尔浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 的无血清培养基加入后各孵育 0、0.5、1、1.5、2、4 h;每浓度点、时间点设 2 平行皿;收集细胞,配制 (1~2) × 10<sup>6</sup> 的细胞悬液,取 100 μl 于 1.5 ml Eppendorf 管,每管加入 0.5 ml 裂解液(2% SDS, 1 mol/L PMSF, 20 mmol/L Tris-HCl),漩涡振荡 5 s, -70 °C 冻存(可保存 1 个月),待测定时取出;取出冻存管回温,65 °C 水浴 10 min,每管加入 0.5 ml 0.2 mol/L KCl、20 mmol/L Tris-HCl 溶液,吹打 5 次,冰水冷却 5 min,4 °C 离心,3 000 g 离心 10 min,收集上清,沉淀加入 1 ml 0.1 mol/L KCl、20 mmol/L Tris-HCl 溶液,吹打 5 次,冰水冷却 5 min,4 °C 离心,3 000 g 离心 10 min,收集上清,此步骤重复 3 次,最后一次取上清后,沉淀加入 1 ml 蛋白酶 K,50 °C 孵育 3 h,取出后每管加入 10 μl 10 mg/ml 的 BSA,冰水冷却 5 min,4 °C 离心,4 500 g 离心 10 min,取上清于一 5 ml 离心管。同时将前 4 次收集上清混匀后各取 1 ml 于新 5 ml 离心管。各管加入 1 ml 200 μg/ml Hoeschst 33258,放置 20~30 min 后荧光分光光度计测定发射光强度(激发波长 365 nm,发射波长 460 nm),计算 DNA-蛋白质交联(DPC)率。

**1.4.4 统计学方法** 用彗星电泳分析软件 casp1.2.2 测量彗星尾距。用 SPSS10.0 软件,数据用方差分析、Dunnett 检验,实验结果以 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示。

## 2 结果

### 2.1 彗星电泳结果

**2.1.1 人脐静脉内皮细胞与不同浓度甲醛孵育 20 min 后,5、10、25 μmol/L 甲醛所致 DNA 损伤以断裂**



为主且与阴性对照相比有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。50、100  $\mu\text{mol/L}$  甲醛所致 DNA 损伤与阴性对照相比无统计学差异。与等摩尔  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同孵育时, 5、10、25  $\mu\text{mol/L}$  浓度组均比单独  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用时的彗星尾距增加, 50、100  $\mu\text{mol/L}$  比单独  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用时的彗星尾距减小(表 1)。

表 1 不同浓度甲醛、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、甲醛 +  $\text{H}_2\text{O}_2$ 对脐静脉内皮细胞彗星尾距的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The concentration-dependent effect of formaldehyde,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formaldehyde +  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the comet tail moment of HUVECs( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Concentration $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	Tail Moment		
		Formaldehyde	$\text{H}_2\text{O}_2$	Formaldehyde + $\text{H}_2\text{O}_2$
1	0	0.032 ± 0.018	0.032 ± 0.018	0.032 ± 0.018
2	5	0.272 ± 0.229*	4.83 ± 3.22*	5.74 ± 4.04*
3	10	0.328 ± 0.278*	7.57 ± 4.99*	9.02 ± 6.42*
4	25	0.343 ± 0.309*	16.54 ± 8.23*	19.16 ± 8.89*
5	50	0.035 ± 0.051	24.61 ± 12.33*	17.18 ± 5.78*
6	100	0.037 ± 0.076	32.88 ± 13.88*	23.36 ± 11.20*

Compared with control group, \*  $P < 0.05$ .

2.1.2 人脐静脉内皮细胞与 25  $\mu\text{mol/L}$  甲醛作用不同时间, 尾距随时间增加而增大与阴性对照均有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 其中 10、20 min 组之间无统计学差异, 30 min 组与其他两组均有统计学差异。与等摩尔  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同孵育时, 10、20 min 组尾距较  $\text{H}_2\text{O}_2$  单独作用时增加, 30 min 组反而减小(表 2)。

表 2 不同作用时间 25  $\mu\text{mol/L}$  的甲醛、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、甲醛 +  $\text{H}_2\text{O}_2$ 对脐静脉内皮细胞彗星尾距的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 The time-dependent effect of 25  $\mu\text{mol/L}$  formaldehyde,  $\text{H}_2\text{O}_2$ , formaldehyde +  $\text{H}_2\text{O}_2$  on the comet tail moment of HUVECs ( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Time (min)	Tail Moment		
		Formaldehyde	$\text{H}_2\text{O}_2$	Formaldehyde + $\text{H}_2\text{O}_2$
1	0	0.032 ± 0.018	0.032 ± 0.018	0.032 ± 0.018
2	10	0.372 ± 0.262*	10.86 ± 6.79*	13.08 ± 6.48*
3	20	0.394 ± 0.235*	19.09 ± 9.02*	20.81 ± 10.70*
4	30	0.584 ± 0.457*	27.26 ± 12.56*	17.93 ± 9.75*

Compared with control group, \*  $P < 0.05$ .

## 2.2 交联结果

2.2.1 人脐静脉内皮细胞与不同浓度甲醛孵育 1.5 h 后, 引起 DNA-蛋白质交联 (DPC) 形成明显增高 ( $P < 0.05$ ), 500  $\mu\text{mol/L}$  组交联率比 100  $\mu\text{mol/L}$  组交联率升高 ( $P < 0.05$ ); 1 000、2 000  $\mu\text{mol/L}$  组比各低剂量

表 3 不同浓度的甲醛、甲醛 +  $\text{H}_2\text{O}_2$ 作用 1.5 h 对脐静脉内皮细胞 DPC 交联率的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 3 DNA-Protein crosslinks in HUVECs exposed to formaldehyde, formaldehyde +  $\text{H}_2\text{O}_2$  with different concentrations for 1.5 h( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Concentration $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$	DPC ( $\times 10^{-2}$ )	
		Formaldehyde	Formaldehyde + $\text{H}_2\text{O}_2$
1	0	3.97 ± 4.71	3.97 ± 4.71
2	10	2.73 ± 1.07	5.99 ± 2.52
3	50	4.15 ± 2.71	5.34 ± 3.89
4	100	6.72 ± 2.08	6.98 ± 6.16
5	500	9.51 ± 1.55*	9.52 ± 5.11
6	1 000	18.09 ± 2.94*	5.36 ± 2.66
7	2 000	29.35 ± 3.63*	6.81 ± 4.74

Compared with control group, \*  $P < 0.05$ .

组交联率高, 且差别有统计意义 ( $P < 0.05$ ); 加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  后, 各浓度组的交联率与阴性对照相比无统计学意义(表 3)。

2.2.2 50  $\mu\text{mol/L}$  的甲醛作用不同时间, 只有 2 h 组与阴性对照相比有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); 等摩尔甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同作用不同时间除 1 h 浓度组 ( $P < 0.05$ ), 其余各浓度组与阴性对照相比无统计学差异(表 4)。

2.2.3 100  $\mu\text{mol/L}$  的甲醛作用不同时间, 各浓度组与阴性对照以及各个浓度组之间均无统计学意义(表 4)。

表 4 不同作用时间的甲醛、甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$ 对脐静脉内皮细胞 DPC 的影响( $\bar{x} \pm s$ )

Table 4 DNA-Protein crosslinks in HUVECs exposed to formaldehyde, formaldehyde +  $\text{H}_2\text{O}_2$  for different time( $\bar{x} \pm s$ )

Group	Time (h)	DPC ( $\times 10^{-2}$ )			
		50 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )		100 ( $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ )	
		Formaldehyde	Formaldehyde + $\text{H}_2\text{O}_2$	Formaldehyde	Formaldehyde + $\text{H}_2\text{O}_2$
1	0	4.07 ± 2.77	4.07 ± 2.77	4.07 ± 2.77	4.07 ± 2.77
2	0.5	3.96 ± 2.49	3.34 ± 2.24	5.79 ± 1.89	4.81 ± 2.28
3	1	6.24 ± 2.12	9.18 ± 2.03*	7.64 ± 8.45	6.11 ± 2.29
4	1.5	4.15 ± 2.71	5.34 ± 3.89	6.72 ± 2.08	6.98 ± 6.16
5	2	9.82 ± 2.23*	7.65 ± 3.38	5.86 ± 0.98	8.48 ± 2.64
6	4	6.32 ± 2.45	8.33 ± 3.61	5.39 ± 1.64	7.14 ± 2.43

Compared with control group, \*  $P < 0.05$ .

## 3 讨论

自 Swenberg 首先用动物实验表明甲醛具有致癌性以来<sup>[6]</sup>, 人们逐步认识到甲醛是人群多系统肿瘤发生的重要危险因素之一, 但有关内源性甲醛毒性作用的报道仍甚少。本实验室通过初步人群调查, 测定人体血浆内源性甲醛的浓度在 10~120  $\mu\text{mol/L}$  之间。内源性甲醛是体内甲胺通过氨基脲敏感氧化酶 (SSAO) 催化产生, 该反应同时产生等摩尔的  $\text{H}_2\text{O}_2$  及  $\text{NH}_3$ , 这 3 种物质都有细胞毒性, 其中甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  均可以导致 DNA 损伤。由于人血液中同时存在甲胺和 SSAO, 那么人体血管内皮细胞长期暴露于含有内源性甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  的血液中是否也会引起内皮细胞的遗传性损伤从而启动某些病理过程。本文以人脐静脉内皮细胞为对象, 通过彗星电泳法及 K-SDS 法检测 DNA 损伤, 直接反映甲醛、 $\text{H}_2\text{O}_2$ 、甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  对血管内皮细胞 DNA 的损伤情况。

既往研究发现, 甲醛既可以引起 DNA 断裂也可以引起 DNA 交联<sup>[7]</sup>。DNA 断裂是最常见 DNA 损伤之一, DNA 损伤剂诱发的 DNA 链断裂可因 DNA 中糖基损伤、碱基中的环发生饱和和所致的 N-糖苷键不稳定和无碱基部位形成(碱不稳定性损伤)、损伤切除修复过程的酶性

切开<sup>[8]</sup>和 DNA 损伤诱发的细胞凋亡而发生<sup>[9]</sup>。DPC 是环境理化因素对生物大分子物质的一种重要遗传损害。DPC 较难修复,它一旦形成,必将对 DNA 的构象与功能产生严重影响,而这种损伤在细胞周期中持续时间较长,当 DNA 复制时,易造成一些重要基因的丢失。DPC 可致 DNA 严重损害并可造成细胞死亡。甲醛可直接介导蛋白质的氨基酸残基上的功能基团与 DNA 分子中碱基共价结合,其所致 DPC 共价键介于赖氨酸的氨基与 DNA 碱基之间<sup>[10]</sup>。本实验应用彗星电泳法检测 DNA 的断裂损伤,采用改良 KCl-SDS 沉淀法检测交联性损伤。

彗星电泳实验结果表明:甲醛浓度在 25  $\mu\text{mol/L}$  以下时,甲醛对 DNA 的损伤以断裂为主,且有随浓度增加而加重的趋势,在此浓度范围内甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同作用于细胞有协同作用,较甲醛或者  $\text{H}_2\text{O}_2$  单独作用时的断裂加重;在 50~100  $\mu\text{mol/L}$  之间,甲醛对 DNA 的损伤与阴性对照相比无明显差异,可能是此浓度范围内甲醛对 DNA 的断裂作用与其所致的 DNA-蛋白质交联作用相当,彼此作用相互抵消。此浓度范围内,甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同作用于细胞,评价细胞断裂的指标尾距值反比单独  $\text{H}_2\text{O}_2$  作用时有所减少,提示在此浓度范围,甲醛交联作用大于断裂作用。25  $\mu\text{mol/L}$  的甲醛对 DNA 的断裂作用随时间增加而加重,甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同作用时,10、20 min 时间组对 DNA 的断裂较甲醛或者  $\text{H}_2\text{O}_2$  单独作用时有协同效应,但 30 min 断裂反比单独  $\text{H}_2\text{O}_2$  所致的断裂作用小,可能是 DNA 在此时间内有部分修复。

K-SDS 实验结果表明:甲醛浓度在 500~2 000  $\mu\text{mol/L}$  之间甲醛对 DNA 的损伤以交联为主,且呈剂量依赖性,在此浓度范围内甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  共同作用,较甲醛单独作用时的交联率降低,这可能是  $\text{H}_2\text{O}_2$  的断裂作用使内皮细胞 DNA 剪切、消耗,从而降低了可测得的交联率。从 50 和 100  $\mu\text{mol/L}$  时 K-SDS 法时效关系结果中可看出,随着作用时间延长,早期出现交联作用增强,而 1.5 h 后又有所下降,这可能是由于甲醛消耗及细胞修复的结果。甲醛与等摩尔  $\text{H}_2\text{O}_2$  协同作用结果有使测得的相应交联率降低的趋势,这与  $\text{H}_2\text{O}_2$  可引起明显的 DNA 断裂(如彗星电泳所见),而 DNA 断裂可能降低了 K-SDS 法可检测的交联率有关。

甲胺在体内是通过 SSAO 催化产生甲醛,该反应同时有等摩尔的  $\text{H}_2\text{O}_2$  产生 ( $\text{CH}_3\text{NH}_2 \rightarrow \text{HCHO} + \text{H}_2\text{O}_2 + \text{NH}_3$ ),甲醛和  $\text{H}_2\text{O}_2$  两种产物都可能损伤细胞。本实验通

过直接加入甲醛、甲胺和  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 直接了解其对内皮细胞的损伤作用,结果表明,甲醛可直接导致内皮细胞 DNA 交联,而  $\text{H}_2\text{O}_2$  可导致内皮细胞 DNA 的断裂,从而可能影响细胞功能甚至引起内皮细胞凋亡。甲醛与  $\text{H}_2\text{O}_2$  协同作用可能会导致更严重的一些重要基因表达异常,但在该两种检测方法中不能表现出来,仍需进一步地深入研究。

### 参考文献:

- [1] Rapoport JA. Carbonyl compounds and the chemical mechanism of mutation[J]. *Comp Rend Acad Sci (CRSS)*, 1946, 54: 65-67.
- [2] Yu PH, Deng YL. Endogenous formaldehyde as a potential factor of vulnerability of atherosclerosis involvement of semicarbazide-sensitive amine oxidase-mediated methylamine turnover[J]. *Atherosclerosis*, 1998, 40(2): 357-363.
- [3] Yu PH, Zuo DM. Formaldehyde produced endogenously via deamination of methylamine. A potential risk factor for initiation of endothelial injury [J]. *Atherosclerosis*, 1996, 120 (1-2): 189-197.
- [4] Singh NP, McCoy MT, Trice RR, et al. Schneider, A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175: 184-191.
- [5] Anatoly Z, Max C. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and *in vivo* [J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13(8): 1 485-1 489.
- [6] Swenberg JA, Kerns WD, Mitchell RI, et al. Induction of squamous cell carcinomas of the rat nasal cavity by inhalation exposure to formaldehyde vapor[J]. *Cancer Res*, 1980, 40(9): 3 398-3 402.
- [7] Grafton RC, Fornace AJ, Atrup H, et al. Formaldehyde damage to DNA and inhibition of DNA repair in human bronchial cells[J]. *Science*, 1983, 220(4593): 216-218.
- [8] Kasamatsu T, Kohda K, Kawazoe Y, et al. Comparison of chemically induced DNA breakage in cellular and subcellular systems using the comet assay[J]. *Mutat Res*, 1996, 369(1-2): 1-6.
- [9] 杨录军, Nuesse Michael, 敖琳, 等. 昆明山海棠碱诱导 Jurkat 淋巴瘤细胞核 DNA 链断裂和 DNA 片断化 [J]. 第三军医大学学报, 2003, 25(17): 1 515-1 517.
- [10] 雷毅雄, 庄志雄. 外来化学物与 DNA-蛋白质交联物关系的研究进展 [J]. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(3): 149-153.

