

³²P 后标法分析二氯胺基酚—DNA 加合物

衡正昌 T. Ong

华西医科大学环境卫生教研室 成都 610041

Fig 2 示小鼠在染毒剂量为 5mg/kg BW 时,肝和肾对两种加合物的清除速率,从图中可见小鼠两组动物对两种加合物的清除速率无明显差异,肝的 AFB₁-FAP 的量比 AFB₁-N⁷-Gua 要高;而在肾中,先是以 AFB₁-N⁷-Gua 为高,但 24hr 后却以 AFB₁-FAP 为主。

讨 论

FR 可以改变药物代谢酶的催化活性⁽⁴⁾,进而改变药物在体内的转化、利用和排出。FR 对代谢酶活性的影响可通过测定某些特异性酶的活性及致癌物-DNA 加合物来研究。本实验选择两种对 AFB₁ 敏感度不同的动物, F344 大鼠和 B6C3F₁ 小鼠,研究 FR 对 AFB₁ 代谢活化的影响。结果说明:FR 减少体内大鼠和小鼠对 AFB₁ 的代谢活化,表现为 ADA 的生成减少。ADA 在各器官中的分布由多到少排列为肝 > 肾 > 肺,这与肝是 AFB₁ 的靶器官相符。大鼠对 AFB₁ 相对敏感,其肝加合物的量比对 AFB₁ 相对不敏感的小鼠高 7-9 倍,而且对两种 ADA 清除速率也比小鼠慢,这可能与小鼠谷胱甘肽-巯基-转移酶活性高有关。

ADA 的两种主要形式中, AFB₁-FAP 比 AFB₁-N⁷-Gua 要稳定⁽⁵⁾,而且不易得到修复⁽⁶⁾。虽然 AFB₁ 的诱癌作用与 ADA 两种形式的关系尚未明确,但有学者认为 AFB₁-

N⁷-Gua 似乎与肿瘤的关系更加密切⁽⁷⁾。我们的结果显示在大鼠肝中 AFB₁-N⁷-Gua 占主要,而在小鼠肝中, AFB₁-FAP 占主要,符合上述理论。

我们的结果表明:FR 影响大鼠和小鼠对 AFB₁ 的代谢活化,这种影响对不同的动物种属有相同性,也有差异性。ADA 的高低及分布与致癌作用密切相关,所以 ADA 水平可作为 AFB₁-N⁷-Gua 致突变和致癌研究的一个很有用的生物指标。

参考文献

1. Allaben WT, Chou MW, Pegram RA. Dietary restriction and toxicological endpoints: a historical perspective. In: *Biological Effects of Dietary Restriction* (Fishbein L. ed.). Berlin Heidelberg: Springer-Verlag, 1991:42-54.
2. Pollard M, Luckert P. Tumorigenesis effects of direct- and indirect-acting chemical carcinogenesis in rats on a restricted diet. *J Natl Cancer Inst*, 1985;74:1347.
3. Chen W, Nichols J, Zhou Y, et al. Effect of dietary restriction on glutathione S-transferase activity specific toward aflatoxin B₁-8,9-epoxide. *Toxicol Lett*, 1985;78:235.
4. Chou MW, Kong J, Chung KT, et al. Effect of caloric restriction on the metabolic activation of xenobiotics. *Mutat Res*, 1993a;295:223.
5. Eaton DL, Gallagher EP. Mechanisms of aflatoxin carcinogenesis. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 1994;34:135.
6. Martin CN, Garner RC. Aflatoxin B₁-oxide generated by chemical or enzymatic oxidation of aflatoxin B₁ causes guanine substitution in nucleic acids. *Nature*, 1977;267:863.
7. Hoseyni MS. Risk assessment for aflatoxin: III. Modelling the relative risk of hepatocellular carcinoma. *Risk Anal*, 1993;12:123.

摘要 本研究以核酸酶 P_1 和正丁醇增强的 ^{32}P 后标法分析了 2,4-二氯-6-氨基酚(DCAP)染毒的 V79 细胞 DNA 加合物。试验结果:在核酸酶 P_1 富集方式下,观察到 4 种 DCAP 诱发的 DNA 加合物,其含量分别为 38.7、71.5、85.7 和 22.4/10⁸ 单核苷酸;而正丁醇萃取法,未检出加合物。该结果表明:DCAP 具有与哺乳动物细胞 DNA 产生共价结合的能力,与 DNA 共价结合可能是 DCAP 产生遗传危害和致癌的基本途径。由于 DCAP 是致癌性农药(83-1 除草剂)在体内的主要代谢产物,DNA 加合物分析可能成为 83-1 除草剂暴露人群监测的重要生物标志。本文还对两种富集方法的敏感性进行了讨论,提出:化合物的极性可能是选用正丁醇富集法的主要依据。

关键词 ^{32}P 后标法;二氯氨基酚;DNA 加合物;富集法

DETECTION OF DICHLOROAMINOPHENOL - DNA ADDUCTS USING ^{32}P - POSTLABELLING ASSAY

Heng Zhengchang, T. Ong

Department of Environmental Health, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041

Abstract A detection of DNA adducts in V79 cells treated by 2,4-dichloro-6-aminophenol (DCAP) was carried out using ^{32}P -postlabelling assay with the nuclease P_1 and the butanol enhancement methods. Results showed that with the nuclease P_1 enhancement 4 DNA adducts induced by DCAP were observed and the amount of the DNA adducts were 38.7, 71.5, 85.7, and 22.4/10⁸ nucleotides respectively, and that with butanol enhancement no one was detected. The results indicated that DCAP was capable of forming covalent bonds to DNA in mammalian cells and the covalent binding to DNA might be an essential pathway by which DCAP resulted in genotoxic and carcinogenic effects. Because DCAP is a major metabolite of the 83-1 herbicide, an animal carcinogen, the DNA adduct analyses could be applied as a biomarker for biomonitoring of human exposure to the herbicide. The sensitivity of two enhancement methods has also been discussed and it was suggested that the polarity of chemicals was the most important factor for selecting the butanol enhancement method.

Key words ^{32}P -postlabelling assay; dichloroaminophenol; DNA adduct; detection enhancement

2,4-二氯-6-氨基酚(2,4-dichloro-6-aminophenol, DCAP)是一种国内开发的新除草剂(83-1 除草剂)在哺乳动物体内的主要代谢产物。小鼠致癌试验表明,83-1 除草剂为诱癌剂。作者最近的研究发现,DCAP 具有细胞遗传毒性,从而推测 83-1 除草剂的致癌作用与其代谢产物 DCAP 有关⁽¹⁾。为了进一步探明 DCAP 的遗传毒理作用,并为该除草剂致癌研究建立分子生物标志,本文以核酸酶 P_1 和正丁醇增强的 ^{32}P 后标法分析了 DCAP 染毒的 V79 细胞 DNA 加合物。

材料和方法

1 试验化合物和试剂

试验化合物 DCAP,由华西医科大学药学院合成和重蒸纯化,纯度 > 99%;2-氨基蒽(2-AA),阳性对照物(Sigma 公司);蛋白酶 K、RNA 酶 A、脾磷酸二酯酶(SPD)、微生物核酸酶(MN)、核酸酶 P_1 、 T_4 多核苷酸激酶(T_4)均购自 Sigma 公司;(γ - ^{32}P)ATP (10mCi/ml),由美国 ICN 生化试剂公司生产;聚乙烯亚胺纤维素(PEI)层析板,购自美国 Alltech 公司。

2 细胞培养和染毒

V79 细胞在补充 10% 小牛血清、1mM L-谷酰胺和 1% 双抗的 Eagle's 基础培养液中培养。待分种的细胞进入对数生长期并达到适当生长密度后,加入化合物溶液,使 DCAP 的终浓度分别为 100、200 和 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 2-AA 为 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$, 加 2-AA 的培养瓶中还应加入大鼠肝 S9 活化,阴性对照瓶加相同体积的溶剂,细胞染毒 3h。

3 DNA 提取和纯化

染毒后,以胰酶消化法收获细胞。按标准酚-乙醇提取法分离 DNA,并用 RNA 酶 A 进一步纯化处理。重新溶解 DNA 于纯水中,紫外分光光度计测定 DNA 含量。

4 DNA 加合物测定

4.1 DNA 消化 每一试样取 12.5 μg DNA,按 Gupta 描述的方法⁽²⁾以 MN 和 SPD 在 37 $^{\circ}\text{C}$ 消化 4h,使 DNA 消化成 3'-磷酸单核苷酸。反映混合物的总体积为 60 μl 。

4.2 加合物富集 经消化的 DNA,每试样取两份,每份 5 $\mu\text{g}/24\mu\text{l}$,分别以核酸酶 P₁ (简称 P₁)^(3,4) 和正丁醇法⁽²⁾ 富集加合物。对 P₁ 法, DNA 消化物在含 2.4 μl P₁ (5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$) 及 9.6 μl 反应缓冲液中作用 1h; 对正丁醇法, DNA 消化物首先与 15 μl 转移剂(氯化四丁基胺溶液)、15 μl 100mM 甲酸胺及 70 μl 双蒸水混合,然后以 200 μl 经水饱和的正丁醇萃取两次,再以 500 μl 经正丁醇饱和的双蒸水反萃取两次,弃去水相液。

4.3 ³²P 标记 经加合物增强处理的试样,在旋转真空干燥器中挥干,重新溶解于 7.5 μl 纯水,再加 7.5 μl 放射活性混合物(含 50 μCi ³²P-ATP、5 $^{\text{u}}$ T₄ 和标记缓冲液),在 37 $^{\circ}\text{C}$ 下反应 1h。

4.4 薄层分离 取标记反应混合物点样在 PEI 层析板上,以多向展开系统^(2,5) 分离 DNA 加合物。展开系统包括: 1) 以 1M NaH₂PO₄ 为展开液(D) 1,分离并去除反应剩余的 ³²P-ATP 和标记的正常单核苷酸;

2) D2 (2.5M 甲酸铵) 和 D3 (4M 甲酸锂和 7M 尿素液), 将 DNA 加合物在 x 轴方向展开; 3) 前 D4 (0.5M tris-HCl) 和 D4 (0.8M LiCl, 7M 尿素溶液), 将 DNA 加合物在 y 轴方向展开; 4) D5 (0.35M MgCl₂), 清洁背景。

4.5 单核苷酸总量测定 取 4 μl DNA 消化反应混合物的稀释液(含 4.16ng 单核苷酸)与 2 μl 放射活性混合物在 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60min, 再加 4 μl apyrase 和 bicin 液,继续反应 30min, 然后加 615 μl 反应终止液(15mM EDTA 和 10mM tris-HCl), 混匀。取上述混合液 5 μl 点样于 PEI 层析板上,以 40mM NH₄SO₄ 溶液展开。

4.6 DNA 加合物定量 经薄层层析分离的加合物,应用放射自显影技术在 -70 $^{\circ}\text{C}$ 下作用 23d, 显相于 Kodak XAR-5 胶片上。切下各加合物斑块,以液体闪烁计数器测定放射量,按下式计算加合物含量:

$$\text{加合物} / 10^8 \text{ 单核苷酸} = \frac{\text{加合物单核苷酸的放射量}}{\text{总单核苷酸的放射量}} \times 10^8$$

结 果

不同染毒处理的 V79 细胞 DNA,经消化、加合物富集、标记和薄层层析,其 PEI 板放射自显影显示(见图一): 溶剂对照,在两种富集方式下,均未显现任何 DNA 加合物斑块; 阳性对照,分别出现明显的 DNA 加合物斑 45 个; DCAP 浓度为 100 和 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时,结果与阴性对照相同(图略); DCAP 浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时, P₁ 方式下,有 4 个 DNA 加合物斑,而正丁醇萃取则无加合物斑出现。比较两种富集方式的放射自显影图,不难看出: 从背景的清洁度而言, P₁ 方式优于正丁醇; 就检测加合物的灵敏度而言,因待检的化合物而异。对 2-AA,似正丁醇萃取更加灵敏。而对 DCAP,仅 P₁ 方式可检出 DNA 加合物形成。

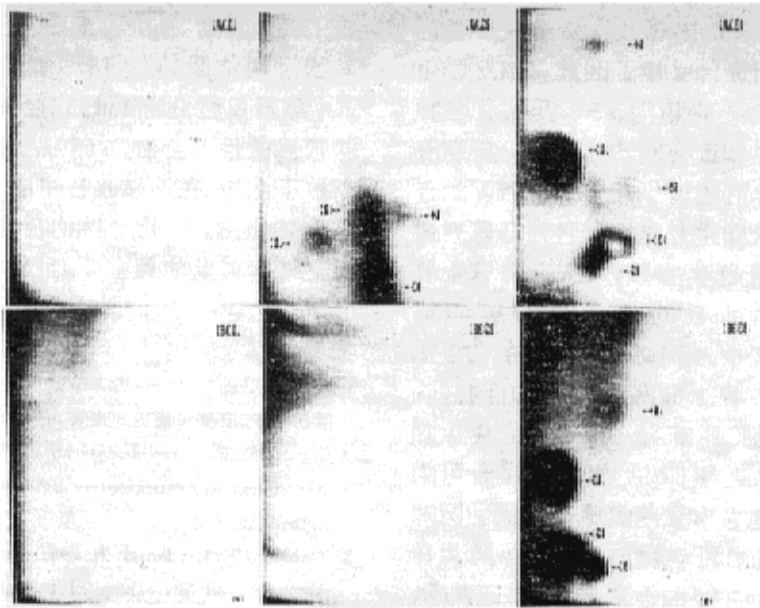


图1 以DCAP和2-AA染毒的V79细胞DNA加合物放射自显影图

(A) 核酸酶 P₁ 富集, (B) 正丁醇萃取; (1) 溶剂对照, (2) DCAP(300µg/ml), (3) 2-AA(30µg/ml)

表1 以DCAP和2-AA染毒的V79细胞DNA加合物含量

化合物	浓度 (µg/ml)	增强方式 ^a		加合物点 编号	加合物量/10 ⁸ 单核苷酸		
		P	B				
DCAP	300	+		1	38.7 *		
				2	71.5 **		
				3	85.7 **		
				4	22.4		
2-AA	30	+		1	101.5 **		
				2	19.3		
				3	18.2		
				4	8.2		
				5	4.7		
					+	1	93.9 **
					+	2	92.1 **
					+	3	29.4
	+	4	13.5				

^aP+ :代表核酸酶 P₁ 增强; B+ :代表正丁醇萃取

* > 本底 2 倍; ** > 本底 3 倍

对 PEI 板上的 DNA 加合物斑进行液闪测定, 结果见表 1。DCAP 染毒剂量为 300µg/ml 时, V79 细胞的四种 DNA 加合物含量分别为 38.7、71.5、85.7 和 22.4/10⁸ 单核苷酸。其中两种大于本底值的三倍, 一种大于本底值的两倍。30µg/ml 2-AA 染毒, 所形成的 DNA 加合物, 正丁醇萃取法有两

种大于本底值的三倍, 而 P₁ 富集法仅一种。两富集方式间, 除了第一种加合物的含量相当外, 其余三种加合物含量均以正丁醇萃取法较高。

讨 论

能与 DNA 共价结合形成加合物是许多

遗传毒性化合物和致癌物的重要特征⁽⁶⁾,某些类型 DNA 加合物的形成是致突变必要的前过程和肿瘤引发的关键。因此, DNA 加合物分析可以作为一种短期试验,测试化合物的潜在遗传危害和致癌性^(3,4),并在一定程度上阐明致癌的作用机理。近年来, DNA 加合物分析更重要的用途是作为一种内暴露剂量或有效暴露剂量的生物标志,应用于职业和环境暴露人群的致癌分子流行病学研究^(3,8,9)。本试验中,经 DCAP 染毒的 V79 细胞 DNA 在 PEI 板上分离出四种加合物,该结果表明:DCAP 具有与 DNA 产生共价结合的能力,DCAP 与 DNA 的共价结合可能是其产生遗传危害和致癌的重要方式。同时提示,DCAP 与哺乳动物细胞 DNA 的共价结合可能有四个主要结合位点。结果还表明, DNA 加合物分析有可能成为 83—1 除草剂暴露人群监测的生物标志。但是,本试验为体外试验,鉴于体内外试验间可能存在某些差异,在应用于人群研究之前,进行动物体内试验是必要的。

DNA 加合物测定包括免疫法、荧光法、³²P 后标法等多种方法。由于³²P 后标法具有灵敏度高、不必事先对致癌物标记、适用于已知和未知化合物的体内实验和人群流行病学研究等优点,而成为广泛采用的分析方法。为了进一步提高³²P 后标法的灵敏度,以满足研究环境低剂量暴露下加合物形成的需要,某些 DNA 加合物的富集措施已被应用于该试验系统。其中,以核酸酶 P₁ 和正丁醇萃取法效果最明显。对这两种富集方法的比较研究已有报道。研究指出,对芳香胺和硝基芳香族化合物形成的 DNA 加合物,正丁醇萃取一般比 P₁ 法更为有效^(5,9,10),这两种方法的富集能力还主要取决于加合物的化学性质。本研究同时以 P₁ 和正丁醇富集的³²P 后标法检测了 DCAP 和 2—AA 形成的加合物,结果如上所述,对于 2—AA,两富集方式间,除了第一种加合物的含量相当外,其

余三种加合物含量均以正丁醇萃取法较高,这与已报道的研究结果一致。而对于 DCAP, P₁ 法测出了四个加合物,正丁醇法则全然不能检出。其原因可能是,正丁醇萃取法只适用于 2—AA 等弱极性化合物的加合物,对 DCAP 这样较强极性化合物的 DNA 加合物可能主要存在于水相,在萃取过程中被丢失,因而没有富集能力。据此,化合物的极性可能为是否选择正丁醇富集法最主要的依据。

参考文献

1. 衡正昌, Ong T. 83-1 除草剂及其主要代谢产物的遗传毒性研究. 癌变 畸变 突变, 1997; 9(3): 154.
2. Gupta RC. Enhanced sensitivity of ³²P - postlabeling analysis of aromatic carcinogen - DNA adducts. *Cancer Res*, 1985; 5: 5656.
3. Reddy MV, Randerath K. Nuclease P₁ - mediated enhancement of sensitivity of ³²P - postlabeling test for structurally diverse DNA adducts. *Carcinogenesis*, 1986; 7: 1543.
4. Randerath KE, Randerath HP, Agrawal HP, et al. Postlabeling methods for carcinogen - DNA adduct analysis. *Environ Health Perspect*, 1985; 62: 57.
5. Gallagher JE, Jackson MA, George MK, et al. Differences in detection of DNA adducts in the ³²P - postlabeling assay after either 1 - butanol extraction or nuclease P₁ treatment. *Cancer Lett*, 1989; 45: 7.
6. Lutz WK. In vivo covalent binding of organic chemicals to DNA as a quantitative indicator in the process of chemical carcinogenesis. *Mutat Res*, 1979; 65: 289.
7. Perera F. Validation of DNA Adducts as Biological Markers of Carcinogen Exposure and Effects. In: Mendelsohn ML, et al. eds. *Biomarkers and Occupational Health*, Washington, D. C.: Joseph Henry, 1995: 105108.
8. Perera FP, Whyatt RM. Biomarkers and molecular epidemiology in mutation/ cancer research. *Mutat Res*, 1994; 313: 117.
9. Gupta RC. ³²P - Adduct assay: comparative recoveries of structurally diverse DNA adducts in the various enhancement procedures. *Carcinogenesis*, 1988; 9: 1687.
10. Whong WZ, Stewart JD, Ong T, et al. Induction of in vivo DNA adducts by 4 industrial by - products in the rat - lung - cell system. *Mutat Res*, 1994; 312: 165.