

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0042 - 03

油烟凝聚物和大蒜油对 V₇₉ 细胞中 p53、p21^{ras} 表达的影响

杜少陵,朱建华,姚应水

(皖南医学院,安徽芜湖 241001)

摘要:目的:为研究油烟凝聚物与肿瘤发生的潜在关系及大蒜油的防护作用。方法:用油烟凝聚物和大蒜油分别或同时处理 V₇₉ 细胞,利用免疫细胞化学方法检测 V₇₉ 细胞中 p53、p21^{ras} 蛋白的表达情况。结果:与对照组相比,油烟凝聚物处理组 p53、p21^{ras} 蛋白表达明显升高 ($P < 0.01$),且有剂量—效应关系;与对照组相比,50 μ l/ml 大蒜油处理组降低油烟凝聚物诱发 V₇₉ 细胞 p53、p21^{ras} 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:油烟凝聚物有诱变作用,大蒜油可防护油烟凝聚物的诱变作用。

关键词:油烟凝聚物;大蒜油;p53;p21^{ras};免疫细胞化学

中图分类号:R994.6;X503

文献标识码:A

THE EFFECTS OF HEATED COOKING OIL VAPORS AND ALLIUM SATIVUM OIL ON p53 AND p21^{ras} PROTEIN EXPRESSION IN V₇₉ CELLS

DU Shao-ling, ZHU Jian-hua, YAO Yin-shui

(Wannan Medical college, Wuhu 241001, China)

类、醛类、羧酸及杂环胺等 200 多种物质,其遗传毒性作用如染色体畸变、微核率和精子畸形率升高等远大于苯并芘。另有分析研究指出^{9,10},菜油和精炼油经高温产生的回收油中含有致突变和致癌作用的苯并芘、丙烯醛、1,3-丁二烯等有害物质。本实验所用的烹调色拉油烟冷凝物引致小鼠微核率和精子畸形率升高作用是否与上述有害物质的作用有联系,有待进一步验证。关于补充亚硒酸钠后显示具有拮抗色拉油烟冷凝物致小鼠微核率和精子畸形率升高作用的机制可能与其抗氧化作用有关。至于色拉油烟冷凝物对接触人群的健康危害有待深入研究。

参考文献:

- 1 Shen SB, Wang GX, Xiang LS, et al. Analyses and estimates of attributable risk factors for lung cancer in Nanjing, China J. *Lung Cancer*, 1996, 14 (Suppl 1): 107 - 109.
- 2 汪国雄,沈孝彬,沈其君,等. 肺癌配对病例对照研究中烹调油烟等致病因子多因素分析 J. *中华预防医学杂志*, 1992, 26(2):

89 - 91.

- 3 Qu YH, Xu GX, Zhou JZ, et al. Gneotoxicity of heated cooking oil vapors J. *Mutat Res*, 1992, 298: 105 - 107.
- 4 瞿永华,徐冠雄,高玉堂. 厨房小环境污染与肺癌 J. *癌变 畸变 突变*, 1993, 5(5): 59 - 61.
- 5 王献仁,秦珏慧. 烹调油烟对人体健康危害研究 J. *卫生研究*, 1994, 23(5): 274 - 276.
- 6 布鲁西克著. 吕群,强义国,江绍慧译. 遗传毒理学原理 M. 第一版. 上海:复旦大学出版社,1987. 244 ~ 247.
- 7 Li SG, Pan DH, Wang GX, et al. Analysis of polycyclic aromatic hydrocarbons in cooking oil fumes J. *Arch Environ Health*, 1994, 49(2): 119 - 122.
- 8 Chang S, Peterson J, Ho CT, et al. Chemical reactions involved in the deep-fat frying of food J. *J Am Oil Chem Sci*, 1987, 55(10): 718 - 720.
- 9 张瑞娟,于燕,曹晖. 菜油、精炼油及抽油机回收油中苯并芘的污染 J. *环境与健康杂志* (第四次全国环境卫生学术会议专辑), 1995, 213.
- 10 厉曙光,潘定华,汪国雄. 薄层扫描法测定食油及其加热产物中多环芳烃含量 J. *卫生研究*, 1991, 20(4): 44 - 46.

收稿日期:1999 - 04 - 04;修订日期:1999 - 07 - 04

作者简介:杜少陵(1965 -)男,安徽贵池人,讲师,学士,研究方向:抗癌药物与癌基因的相关性研究。

Abstract : Purpose : This paper studies the relationships between Heated Cooking Oil Vapors(HCOV) and Allium Sativum Oil(ASO) in mutagenesis. **Methods :** we detected p53 and p21^{ras} protein expression in the V₇₉ cells treated by HCOV and ASO with immunocytochemical techniques. **Results :** The results showed that the p53 and p21^{ras} protein expression was significantly increased in HCOV groups compared with the control group ($P < 0.01$), and a dose-dependent relationship was observed, while the ASO(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) could decreased the p53 and p21^{ras} protein expression in the V₇₉ cells treated by HCOV compared with the control group ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion :** The results indicated that the ASO could prevent from mutagenic activity of the HCOV.

Key words : heated cooking oil vapors; ailium sativum oil; p53; p21^{ras}; immunocytochemistry

烹调油烟是存在于居民住宅中常见的空气污染物,含多种多环芳烃(苯并芘、二苯并蒽等),可诱发突变的发生,具有潜在致癌性,与中国女性肺癌的发生有密切关系¹。

大蒜(*Allium sativum*)是百合科多年生草本植物鳞茎,有解毒消痛之功效。研究发现:大蒜油可防护苯并芘的诱变作用²,具抗肿瘤作用³。

我们采用油烟凝聚物和大蒜油处理 V₇₉细胞,利用免疫细胞化学方法检测 V₇₉细胞中 p53、p21^{ras}的表达情况,以评价油烟凝聚物与肿瘤发生的潜在关系及大蒜油的防护作用。

材料与amp;方法

1 油烟凝聚物样品的采集

市售菜油在空气洁净区,用电炉加热至 270 ~ 280 ,用粉尘采样仪收集油烟凝聚物于玻璃纤维滤膜上,凝聚物用丙酮浸出,挥干丙酮后,剩余物用二甲亚砜(DMSO)溶解成 1mg/ml 的待测样品,再用 DM-SO 逐步稀释成 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$,对照组用 DMSO 溶液。

2 大蒜油样品的配制

取大蒜油 1g、吐温 80 2g 和生理盐水 100ml 制成 1%大蒜油乳剂,用生理盐水和 2%吐温 80 溶液稀释成 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、50 $\mu\text{g}/\text{ml}$,对照组用生理盐水和 2%吐温 80 溶液。

3 油烟凝聚物和大蒜油非同时作用组

中国仓鼠胚胎肺成纤维细胞 V₇₉细胞株。最低基本培养(MEM)培养液,10%小牛血清,青霉素 100IU/ml,链霉素 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。培养 24h,加油烟凝聚物样品,72h,以后每 3d 换一次培养液,连续培养 10d。加大蒜油样品,72h。

4 油烟凝聚物和大蒜油同时作用组

细胞培养 24h,同时加油烟凝聚物、大蒜油样品,72h,以后每 3d 换一次培养液,连续培养 10d。

5 免疫细胞化学检测

将各试验组 V₇₉细胞消化、离心后,磷酸盐缓冲液(PBS)洗 3 次,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片厚度 4 μm 。常规脱蜡、脱水,PBS 洗 3 次,0.6% H₂O₂ 甲醇作用 10min,去内源性酶活力后,分别加鼠抗人 p53 单克隆抗体(1:40)、鼠抗人 p21 单克隆抗体(1:50),37 孵育 1h,加生物素化羊抗鼠 IgG,37 , 30min,再加链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶,37 , 20min,用 3,3-二氨基联苯胺(DAB)显色 5min 左右,苏木素衬染,脱水,透明封片。用 PBS 代替一抗作阴性对照,细胞中呈棕黄色为阳性。

6 统计方法

油镜下计数 10000 个细胞,统计 p53、p21^{ras}蛋白表达率(%),采用 ² 检验。

结果

Table 1 The effect of ASO and HCOV on p53 protein expression (%) in V₇₉ cells.

ASO ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	HCOV($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	1	5	10
0	0.05	0.58	1.06	1.78
25	0.06	0.46	0.91	1.65
50	0.05	0.27 **	0.68 **	1.41 *

note: HCOV: Heated Cooking Oil Vapore, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs the controlled groups. other table are similar to this table.

Table 2 The effect of ASO on p53 protein expression (%) in the V₇₉ cell mutagenised by HCOV

ASO ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	HCOV($\mu\text{g}/\text{ml}$)			
	0	1	5	10
0	0.05	0.69	1.27	2.01
25	0.06	0.56	1.18	1.87
50	0.05	0.36 **	0.86 **	1.58 **

Table 3 The effect of ASO and HCOV on p21^{ras} protein expression (%) in the V₇₉ cells.

ASO (μg/ml)	HCOV (μg/ml)			
	0	1	5	10
0	0.09	0.79	1.81	2.87
25	0.08	0.67	1.53	2.46
50	0.08	0.46 **	1.19 **	2.08 **

Table 4 The effect of ASO and on p21^{ras} protein expression (%) in the V₇₉ cell mutagenised by HCOV.

ASO (μg/ml)	HCOV (μg/ml)			
	0	1	5	10
0	0.09	0.88	2.11	3.49
25	0.08	0.72	1.96	3.07
50	0.08	0.56 **	1.44 **	2.45 **

表 1~4 中,大蒜油剂量一定条件下,油烟凝聚物处理组与对照组间及油烟凝聚物处理组之间,两两比较,均 $P < 0.01$ 。

从表 1~4 的结果可见,正常 V₇₉ 细胞中 p53、p21^{ras} 蛋白表达微弱,其表达率很低,而油烟凝聚物诱导 V₇₉ 细胞中 p53、p21^{ras} 蛋白表达率均明显增高 ($P < 0.01$),且呈剂量-效应关系。大蒜油对正常 V₇₉ 细胞 p53、p21^{ras} 蛋白表达没有影响 ($P > 0.05$),但在 50μg/ml 剂量下能明显拮抗油烟凝聚物对 V₇₉ 细胞 p53、p21^{ras} 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见表 1、3)。大蒜油 (50μg/ml) 还可抑制油烟凝聚物诱导 V₇₉ 细胞 p53、p21^{ras} 蛋白的表达 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$) (见表 2、4)。与大蒜油和油烟凝聚物非同时作用组相比,同时作用组 p53、p21^{ras} 蛋白表达降低,但两者之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。

讨论

正常细胞中含野生型 p53 基因及其 p53 蛋白,野生型 p53 基因能维持细胞的正常生长、抑制恶性增殖、诱导细胞凋亡,而突变的 p53 基因不具有诱导细胞生长停滞和凋亡的功能,反而具有促进细胞增殖和恶性转化的作用。野生型 p53 蛋白半衰期短,且极不稳定,难以检出,突变型 p53 蛋白产物则在细胞核内大量积聚,用常规免疫细胞化学方法检测出的大多为

突变型 p53 蛋白⁴。p21^{ras} 蛋白是 ras 基因家族 (H-ras、K-ras、N-ras) 的编码产物。许多人类肿瘤中都可检测到激活的 ras 基因,激活的方式主要为点突变,激活的 ras 基因表达增强,产生特异性转化蛋白, p21^{ras} 蛋白的过度表达可引起细胞转化,导致细胞癌变⁵。

本组实验结果显示油烟凝聚物可诱导 V₇₉ 细胞 p53、p21^{ras} 蛋白表达 ($P < 0.01$),且呈剂量效应关系。可能是因为油烟凝聚物中含有多种多环芳烃,可攻击 p53、p21^{ras} 基因,促使基因突变,导致 p53、p21^{ras} 蛋白表达水平的升高。有人报道^{6、7}: p53、p21^{ras} 蛋白在人肺癌细胞中呈高水平表达。这似乎可以说明油烟凝聚物诱发 V₇₉ 细胞的恶性转化与人类肿瘤的发生类似。李晓光等证实³: 大蒜油可上调胃癌细胞抑癌基因野生型 p53 和 p21/WAF1 的表达水平。我们发现大蒜油明显抑制突变型 p53 和 p21^{ras} 蛋白的表达。本组实验中,50μg/ml 大蒜油和油烟凝聚物同时作用时, V₇₉ 细胞中 p53、p21^{ras} 蛋白表达明显降低,表明大蒜油能够拮抗油烟凝聚物的诱变作用,推测可能主要是大蒜油阻断了多环芳烃的作用。用 50μg/ml 大蒜油处理油烟凝聚物诱变后的 V₇₉ 细胞, p53、p21^{ras} 蛋白表达亦明显降低,其作用机制是否主要为大蒜油促使突变的 p53 和 p21^{ras} 基因发生逆转,还有待于更进一步的研究。

参考文献:

- 1 Qu YH. Genotoxicity of Heated Cooking Oil Vapors J, *Mutat Res*, 1992, 298: 105 - 111.
- 2 赵景春, 刘秀兰. 大蒜提取液对苯并芘诱变小鼠遗传损伤的防护作用 J. *卫生毒理学杂志*, 1994, 8(3): 215.
- 3 李晓光, 谢锦玉, 李文梅等. 大蒜油对人胃癌细胞恶性增殖能力和细胞间通讯的影响 J. *中国科学(C 辑)*, 1998, 28(4): 367 - 370.
- 4 喻伦根. p⁵³ 蛋白功能的调节及意义 J. *国外医学肿瘤学分册*, 1995, 22(6): 323 - 326.
- 5 Taylor JA. Oncogene and their applications in epidemiologic studies J. *AM J Epidemiol*, 1989, 130: 6 - 13.
- 6 刘勇, 路名芝, 李启明. 肺癌中 MTS1/p16 和 p53 基因产物的表达与细胞增殖的关系 J. *临床与实验病理学杂志*, 1998, 14(2): 134 - 136.
- 7 Tanaka T, Slamon DJ, Battifora, et al. Expression of p21 ras oncoprotein in human cancers J, *Cancer Res*, 1986, 46: 1465 - 1470.