

用³²P后标记法检测固定组织(细胞)及石蜡包埋组织中DNA加成物*

王良君 余应年 陈星若

浙江医科大学病理生理学教研室和医学分子生物学实验室 杭州 310031

摘要 大鼠经腹腔注射不同剂量的B(a)P48h后,取出肝脏,分为两半分别在新鲜时及经福尔马林固定后,或在新鲜时及经石蜡包埋后,分别用³²P后标记法检测其DNA加成物,结果分别可分离到1个和5个加成物斑块,其相对加成物标记量(RAL)有很好的剂量-效应依赖性关系,经统计学处理后,相同剂量点上加成物的量均无显著性差异($P>0.05$)。不同浓度B(a)P处理后的FL细胞,再经福尔马林-磷酸盐缓冲液固定后,可分离到4个加成物斑块,其RAL有良好的剂量-效应依赖性关系。提示:固定组织(细胞)和石蜡包埋组织中RNA加成物的定性和定量均无明显的变化;³²P后标记法亦可适用于固定组织(细胞)和石蜡包埋组织中DNA加成物的检测。

关键词 ³²P后标记法; DNA加成物; 固定组织(细胞); 石蜡包埋组织

³²P-POSTLABELLING DETECTION OF DNA ADDUCTS IN FORMALIN FIXED AND PARAFFIN-EMBEDDED TISSUE SAMPLES

Wang Liangjun, Yu Yingnian, Chen Xingruo

Department of Pathophysiology and Laboratory of Medical Molecular Biology,
Zhejiang Medical University, Hangzhou 310031

Abstract In male SD rats, one i.p. administration of different dose of B(a)P were given. 48 hours later, then livers were removed, and each liver was divided into two halves. One was kept freshly, the other half was fixed with formalin, or in other group furthermore was embedded in paraffin. One or five adduct spots were found by ³²P-postlabeling assay, and the relative adduct labeling (RAL) had a good dose-response relationship, respectively. Similarly, four adduct spots were found in formalin-PBS fixed FL cells which had been treated with B(a)P, and the total RALs also had a clear-cut dose-response relationship. No significant difference can be found in both qualitative and quantitative ($P>0.05$) detection of DNA adducts between fresh tissues (cells) and formalin-fixed tissues (cells) or paraffin-embedded tissues. These results indicated that DNA adducts preserved well in tissues and cells after formalin fixation and paraffin embedding, and also

indicated that ^{32}P -postlabeling method was applicable to not only fresh tissues (cells), but also fixed and paraffin-embedded tissue samples.

Key Words ^{32}P -postlabeling assay; DNA adduct; Fixed tissue (cells); Paraffin-embedded tissue.

^{32}P 后标记法是检测致癌物—DNA 加成物最有效的方法之一, 近年来, 该技术发展极为迅速, 在新鲜组织中已成功地检出上百种致癌物所致的 DNA 加成物^(1,2), 并且将该技术广泛地应用于与 DNA 加成物检测有关的各领域中^(2,3,4), 特别是人类肿瘤分子流行病学的研究^(5,6)。为此, 样本的保存和来源是限制人们研究的“瓶颈”; 如果能以福尔马林固定后的组织或细胞及石蜡包埋后的组织提取 DNA, 然后进行研究, 将会给研究者提供更多的研究机会, 并可利用历史保存的样品对群体所经受环境遗传负荷进行回顾性的研究。

材料和方法

动物及样本处理 雄性 SD 大鼠(体重 $200 \pm 10\text{g}$, 购于本校动物实验中心)腹腔注射不同剂量的 B(a)P(mg/kg): 0, 0.04, 0.4, 2.0, 溶剂为二甲亚砜, 注射总体积为 $300\mu\text{l}$; 常规饲养 48h 后, 取出肝脏下叶, 一半在新鲜时提取 DNA, 另一半经 4% 福尔马林固定 72h 后, 于室温保存 1wk, 再提取 DNA。在另一组实验中将肝组织[B(a)P 0, 2.0mg/kg]用石蜡包埋后, 再提取 DNA。

细胞及样本处理 人羊膜上皮细胞 FL 由本实验室液氮保存, 经复苏、传代培养 (Eagle's MEM, 15% 小牛血清、100IU/ml 青霉素及各 $100\mu\text{g/ml}$ 链霉素和犬那霉素)至对数生长期, 加入不同浓度的 B(a)P(mol/L) 0, 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} , 溶剂为二甲亚砜, 各 $50\mu\text{l}$ 接触 24h 后, 收集细胞。再用 4% 福尔马林—PBS 溶液固定 12h, 室温保存 1wk, 提

取 DNA。

DNA 提取 新鲜肝组织的 DNA 提取方法见文献⁽⁷⁾; 固定组织(细胞)和石蜡包埋组织中 DNA 提取方法作如下修正: 细胞裂解液中 SDS 及链霉蛋白酶的浓度为 1.5% 及 2mg/ml , 裂解时间延长至 24h 时, 再增加链霉蛋白酶的浓度至 3mg/ml , 继续裂解 48h。

^{32}P 后标记法检测 DNA 加成物 该技术涉入有关的酶、化学试剂、PEI 纤维素膜等及其基本原理见文献⁽⁷⁾。

结果

1. 新鲜、固定及包埋组织中 DNA 加成物的分析 阴性对照大鼠肝组织, 在新鲜、经福尔马林固定和石蜡包埋后均未分离到加成物斑块, 见图 1-A(见封二)。而经 B(a)P 处理后大鼠的肝组织, 在新鲜时或经福尔马林固

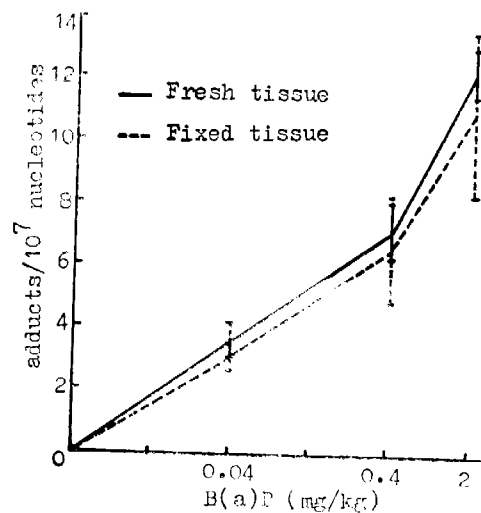


Fig. 2 The curves of dose-response of B(a)P-DNA adducts in fresh and fixed liver tissues.

*省自然科学基金资助项目

定后均可分离到1个加成物斑块,分别见图1-B、C;经定量分析后,均有明显的剂量-效应依赖性关系,见图2。

石蜡包埋及相对应新鲜肝组织均可分离到5个加成物斑块,见图1-D、E;定量分析后分别为 18.6 ± 6.4 , 20.4 ± 2.5 (加成物个数/ 10^7 个核苷酸)。经统计学处理后发现,固定或石蜡包埋肝组织与对应的新鲜组织相比较没有显著性差异($P > 0.05$)。

2. 固定细胞DNA加成物的分析 阴性对照FL细胞未分离到加成物斑块, B(a)P处理后的细胞则可分离到4个加成物斑块,分别见图3-A、B(见封二)。定量分析后发现有明显剂量效应依赖性关系,见图4。

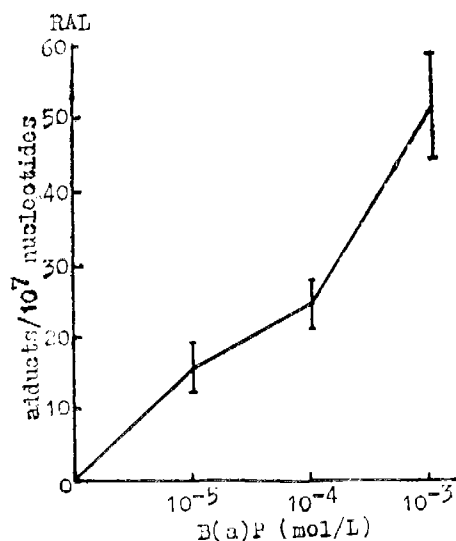


Fig. 4 The curves of dose-response of B(a) P-DNA adducts in fixed EL cells.

讨论

从福尔马林固定和石蜡包埋组织中提取已成功地进行一些分子生物学实验^(8,9)。本研究证明,在上述组织或细胞中均可用本技术检测到DNA加成物的存在,且加成物无论在定性还是定量上都与新鲜组织一样,没有发生明显的变化。这可归咎于活化后的致

癌物与DNA的碱基结合系通过共价键形成。如活化后的致癌物与核酸分子中尿嘧啶或胸嘧啶的N-3、O²及O⁴,胞嘧啶中的N-3、O²及O⁴,鸟嘌呤中的O⁶、N-7、N-3、N-1和N²,腺嘌呤中的N-1、N-7和N⁰,以及主链中的磷酸二酯键和核糖的O²等位结合形成共价键。一般来说,活化后的B(a)P可作用于嘌呤的N²、C-8,腺嘌呤的N⁶及胞嘧啶的N⁴等处。在化学键中,共价键是最稳定的化学键之一,在一般状态下不会发生键的断裂和残基脱落等现象。

Harrison等⁽¹⁰⁾,利用抗AFB1-DNA加成物抗体,对经福尔马林固定后的小鼠肝组织中AFB1-DNA加成物进行检测,发现与新鲜组织无明显的差别。用抗体检测加成物时,不必经DNA的酶性消化和后标记等步骤。研究表明,经福尔马林固定后的组织(细胞)、石蜡包埋的组织中提取的DNA及水解产物仍可作为有关酶的底物,不影响核酸酶P1、前列腺酸性磷酸酶、多聚核苷酸激酶的酶性反应。因此,³²P后标记技术不仅适合于新鲜组织(细胞),而且也适用于固定组织(细胞)或石蜡包埋后的组织中的DNA加成物的检测。

参考文献

1. Randerath K, Randerath E, Agrawal HP, et al. Postlabelling method for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ Health Perspect*, 1985, 62(1): 57.
2. 王良君, 余应年, 陈星若. 用³²P后标记法研究交链孢酚及菜油油烟凝聚物对FL细胞的DNA加成作用. *中国病理生理学杂志*, (在印刷中)
3. Dunn BP. Carcinogen adducts as an indicator for the public health risk of consuming carcinogen-exposed fish and shellfish. *Environ Health Perspect*, 1991, 90(1): 111.
4. Lehman TA, Kurian P, Milo GE. Metabolism of and DNA adduct formation by benzo (a) pyrene in human skin epithelial cells *in vitro* pretreated with cytochrome P450

