

## 用 $^{32}\text{P}$ 后标记法分析沥青和非沥青接触者外周血单个核细胞中 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** 本研究用  $^{32}\text{P}$  后标记法分别对铺柏油路工人、献血员、大学生外周血单个核细胞 DNA 加成物进行了分析, 结果发现他们分别可分离到 1-7、0-7、0-5 个加成物斑块, 其相对加成物标记量 (RAL, 加成物个数 /  $10^7$  个核苷酸) 分别为 1.34-4.24 ( $2.29 \pm 0.88$ )、0-0.93 ( $0.50 \pm 0.48$ )、0-0.32 ( $0.16 \pm 0.18$ ), 经统计学处理后, 铺柏油路工人组与后 2 组之间有非常显著性差异 ( $P < 0.01$ )。提示: 沥青环境中的暴露对人体有明显的细胞遗传毒效应, 对人体外周血单个核细胞 DNA 加成物分析可作为环境对人类遗传负荷评价的指标。

**关键词** DNA 加成物;  $^{32}\text{P}$  后标记法; 遗传负荷; 肿瘤分子流行病学

### $^{32}\text{P}$ -POSTLABELING ANALYSIS OF THE DNA ADDUCTS IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS FROM ASPHALT EXPOSURE AND NON-EXPOSURE POPULATION

Wang Liangjun Yu Yingnian Chen Xingruo

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

**Abstract** The DNA adducts were analysed in peripheral blood mononuclear cells from asphalt road constructors, blood donors, and college students by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay. 1 to 7, 0 to 7, 0 to 5 adduct spots were found respectively in the DNA isolated from their peripheral mononuclear cells; and the RAL (adducts /  $10^7$  nucleotides) ranged from 1.34 to 4.24 (average Relative Adduct Labeling (RAL)  $2.29 \pm 0.88$ ), 0 to 0.93 (average RAL,  $0.50 \pm 0.48$ ), and 0 to 0.32 (average RAL,  $0.16 \pm 0.18$ ) in the first, second and third group respectively. Adduct levels in the asphalt road constructors were significantly higher ( $P < 0.01$ ) than those in the blood donors and college students. This result suggested that exposure to asphalt have markedly genotoxic effects, and also suggested that analysis of the DNA adducts from peripheral blood mononuclear cells tissues serve as an evaluation parameter in analysis of human genetic burden laid by environmental factors.

**Key words** The DNA adduct;  $^{32}\text{P}$ -postlabeling assay; genetic burden; cancer molecular epidemiology

目前公认, 环境因素在人类肿瘤发生中起着重要作用, 研究表明, 遗传毒性致癌物直接或经代谢活化后与 DNA 结合形成加成物, DNA 加成物形成在化学致癌的启动期起着重要的作用, 因此, 直接利用人类组织检测 DNA 加成物, 对研究环境中致癌性化学物质的暴露与人类肿瘤发生关系有着重要意义。

过去, 主要利用物理化学的方法来监测环境中致癌物的暴露, 如检测空气、水、尿液及各种体液中致癌物<sup>(1)</sup>。近年来, 应用免疫学技术如 ELISA<sup>(2)</sup>、RIA<sup>(3)</sup>等检测人类组织中特异的 DNA 加成物获得成功。由于免疫学技术只能检测某一特定的 DNA 加成物, 不能适合环境中众多致癌物所形成的 DNA 加成物的分析, 且有免疫交叉反应<sup>(4)</sup>。用<sup>32</sup>P 后标记法检测人体组织中 DNA 加成物已有报道<sup>(5, 6, 7, 8)</sup>。本文将应用该技术对铺柏油路工人、献血员、大学生的外周血单个核细胞的 DNA 加成物进行分析, 以评价沥青环境中的暴露对人体细胞的遗传毒效应, 为人类肿瘤分子流行病学研究、环境对人类遗传负荷评价指标的研究提供重要的手段。

#### 材料和方法

接触沥青人群均来自杭州市道桥养护管理所的铺柏油路工人, 近期内均有沥青接触, 共 12 人, 男性 11 名, 女性 1 名; 年龄 34-53 岁 ( $45.6 \pm 5.6$  岁); 无吸烟史。

献血员来自本校附属一院, 共 10 名, 男性 9 名, 女性 1 名; 年龄 35-52 岁 ( $44.9 \pm 5.1$  岁); 均无沥青工种接触史和吸烟史。

大学生来自本校刚入学的新生, 共 10 名, 均为男性; 年龄 18-21 岁 ( $19.8 \pm 0.9$  岁); 均无沥青工种接触史和吸烟史。

<sup>32</sup>P 后标记法有关的酶、化学试剂、

PEI 纤维素膜等见文献<sup>(9)</sup>。

全血中单个核细胞的分离 取 5ml 静脉血, 经肝素抗凝后用磷酸盐缓冲液稀释成 15ml。取一支干燥试管, 内存 15ml 淋巴细胞分离液, 将稀释后的血液移入该试管中, 使界面保持清晰, 然后以  $2000r/min \times 15min$  离心, 小心吸出单个核细胞层, 再用适量的磷酸盐缓冲液洗涤两次, 离心沉淀, 收集细胞, 提取 DNA。

DNA 提取及 <sup>32</sup>P 后标记法检测 DNA 加成物技术的方法见文献<sup>(9)</sup>。

#### 结果

1. 沥青接触人群单个核细胞中 DNA 加成物的分析 12 例沥青接触者均可分离到 1-7 个加成物斑块, 以斑块在指纹图上的分布来看, 个体差异较大。在这些人群中, 共可分离到 16 种不同的斑块, 为了便于分析, 我们将这些斑块予以编号。图 1-A 示一男性 43 岁的个体中分离到 6 个加成物斑块。定量分析本组人群中的加成物总 RAL (加成物个数 /  $10^7$  个核苷酸) 为 1.34-4.42, 均值为  $2.29 \pm 0.88$ 。

2. 献血员单个核细胞中 DNA 加成物的分析 10 例个体中, 除 1 例未分离到加成物斑块外, 皆可分离到 1-7 个加成物斑块, 数目不等, 个体差异较大。图 1-B 示一男性 40 岁的个体中分离到 7 个加成物斑块。定量分析得到本组的总 RAL (加成物个数 /  $10^7$  个核苷酸) 为 0-1.53, 均值为  $0.50 \pm 0.48$ 。

3. 大学生单个核细胞中 DNA 加成物的分析 10 例大学生中, 除 2 例未分离到加成物斑块外, 其他均可分离到 1-5 个斑块, 个体差异较大。图 1-C 示一男性 20 岁的个体中分离到 5 个斑块。定量分析本组人群中加成物的总 RAL (加成物个数 /  $10^7$  个核苷酸) 为 0-0.32, 均值  $0.16 \pm 0.18$ 。

综合 3 组结果, 在定性分析中未见沥青接触后的特异性斑块出现。从定量结果上分析, 沥青接触组明显高于后 2 组, 有非常显著性差异( $P < 0.01$ )。图 2 示 3 组人群中加成物定量分析的散点图。

### 讨论

沥青是石油提炼后留下的废物, 含有许多化学物质, 其中有些具有致癌作用, 如多环芳烃类〔苯并(a)芘〕等。流行病学调查发现, 接触沥青的人群易患各种癌症, 如皮肤癌。有资料表明, 在沥青环境

中工作的人群, 每天可吸入苯并(a)芘  $30\mu\text{g}$  以上。本研究对铺柏油路工人外周血单个核细胞中 DNA 加成物进行了分析, 发现明显高于献血员和学生组, 直接显示了在沥青环境中的暴露对人体组织细胞具有明显的细胞遗传毒效应。该结果同对煤焦炉工人<sup>(6)</sup>、翻砂工人<sup>(10)</sup>、木工<sup>(8)</sup>、铝厂工人<sup>(7)</sup>淋巴细胞中 DNA 加成物的检测结果相一致, 在这些职业性接触中, 其淋巴细胞中加成物水平均高于对照组。也与 Randerath 等<sup>(5)</sup>研究了吸烟个体各组织如肺、气管、肾中 DNA 加成物形成的结果相一致, 在肺、气管等组织中加成物的含量与烟量呈正相关。由此可见, 对人体外周血单个核细胞中 DNA 加成物的分析, 可作为环境对人类遗传危害评价的 1 个指标;  $^{32}\text{P}$  后标记法不仅可直接用于人体组织(细胞)中 DNA 加成物的检测, 也可作为环境监测和人类肿瘤分子流行病学研究的工具。

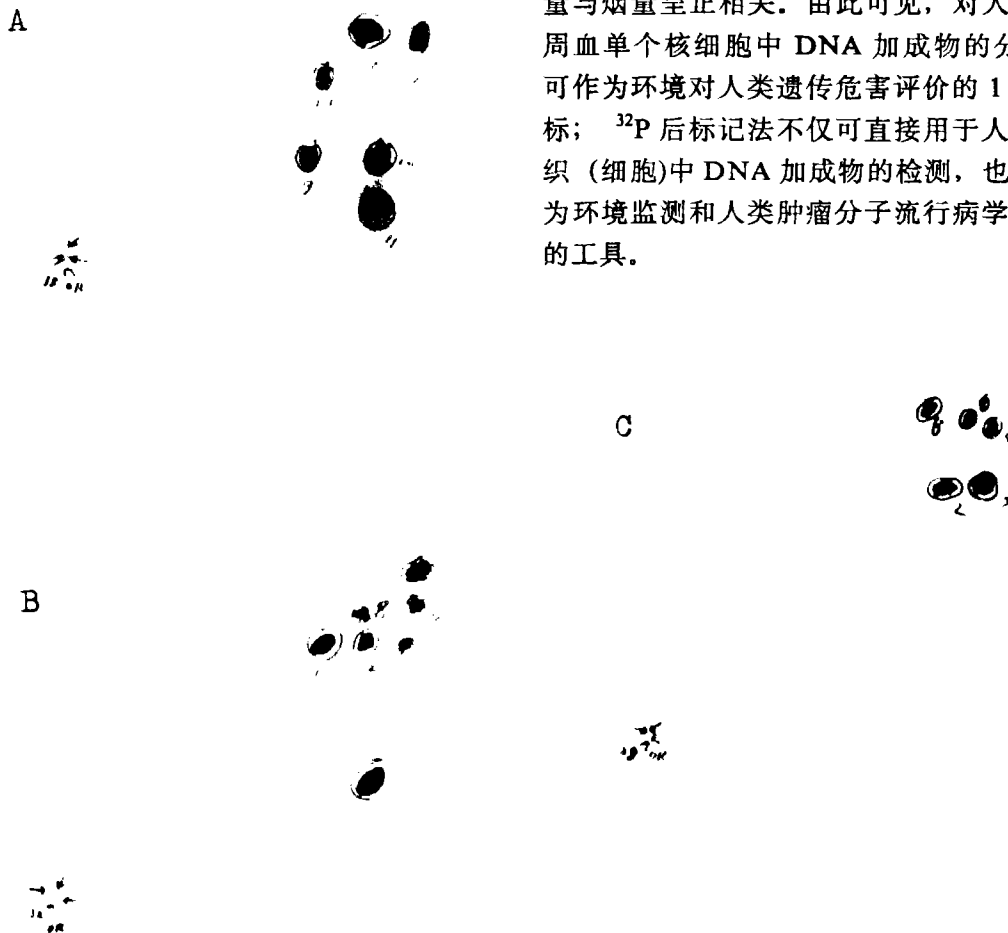


Fig 1 Two-dimensional PEI cellulose TLC.

A: Asphalt road constructor, B: Blood donor,  
C: College student.

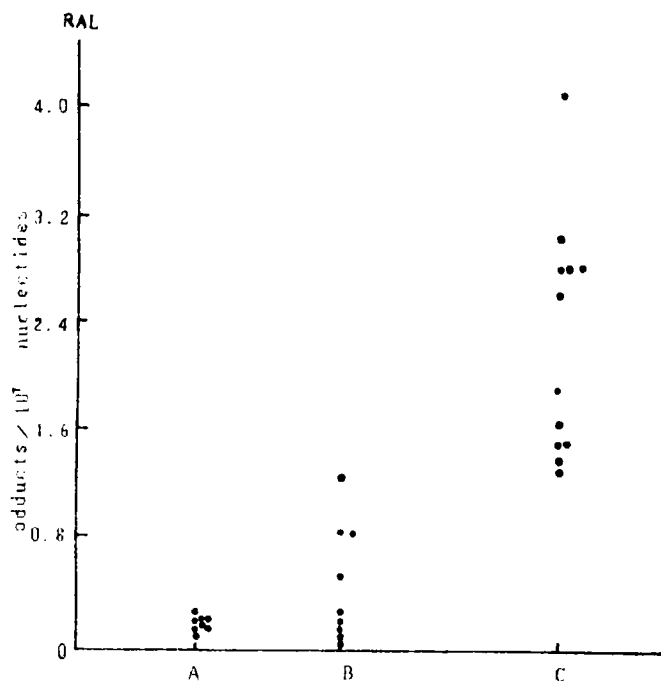


Fig 2 The scattergrams the of DNA adduct levels in peripheral blood mononuclear cells from college students, blood donors and asphalt road constructors. A: College students, B: Blood donors, C: Asphalt road constructors.

本研究还发现，献血员组外周血单个核细胞加成物水平高于学生组，这可能与接触环境不同有关外，还可能与所谓的 I 型复合物有关<sup>(11)</sup>，该复合物在鼠类组织 DNA 中发现认为可能是内源性代谢产物所形成的具有疏水性的大分子 DNA 加成物，常与年龄、性别、动物的种类、饮食及组织类型等因素有关。该加成物的形成与肿瘤发生的关系还有待于进一步明确；资料显示该加成物含量的异常增高或丢失与肿瘤发生有关。

#### 参考文献

1. Haugen A, Becher G, Benestad C, et al. Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons in the urine, benzo(a)pyrene diol epoxide-DNA adducts in lymphocytes DNA, and antibodies to the adduct in sera from coke oven worker exposed to measured amounts of polycyclic hydrocarbons in the work atmosphere. *Cancer Res*, 1986; 46(12):4178.
2. Perera FP, Hemminki K, Young TL, et al. Detection of polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts in white blood cells of foundry workers. *Cancer Res*, 1988; 48(8):2288.
3. Wild CP, Umbenhauer D, Chapot B, et al. Monitoring of individual human exposure to aflatoxins (AF) and N-nitrosamine (NNO) by immunoassay. *J Cell Biochem*, 1986; 30(2):171.
4. Weston AG Trivers G, Vahakangas K, et al. Detection of carcinogen-DNA adducts in human cells and antibodies to these adducts in human sera. *Prog Exp Tumor Res*, 1987; 31(1):76.
5. Randerath E, Miller RH, Mittal D, et al. Covalent DNA damage in tissues of cigarette smokers as determined by <sup>32</sup>P-postlabeling assay. *JNCI*, 1989; 81(5):341.
6. Randerath K. Monitoring carcinogen actions on DNA by <sup>32</sup>P-postlabeling. *Int. Symp. Priness Tabamatsu Cancer Res, Fund*. 1990; 21(2):317.
7. Scholet B, Phillips DH, Hewer A, et al. <sup>32</sup>P-postlabeling detection of aromatic DNA adduct in peripheral blood lymphocytes from aluminium production plant workers. *Mutat Res*, 1991;

260(1):89.

8. Herbert R, Marcus M, Wolff MS, et al. Detection of adducts of deoxyribonucleic acid in white blood cells of roofers by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling. Relationship of adduct levels to measures of exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons. *Scand. J. Work. Environ Health*, 1990; 16(2):135.
9. 王良君, 余应年, 陈星若. 建立一种只标记加成后碱基的  $^{32}\text{P}$  后标记检测 DNA 加成物技术. *癌变·畸变·突变* 1993; 5(4):30.
10. Phillips DH, Hemminki K, Hewer A, et al. Monitoring occupational exposure to carcinogens: Detection by  $^{32}\text{P}$ -postlabeling of aromatic DNA adducts in white blood cell DNA from foundry workers. *Mutat Res*, 1988; 204(3):531.
11. Randerath K, Li D, Randerath E, et al. Age-related DNA modifications (I-compounds): modulation by physiological and pathological processes. *Mutat Res*, 1990; 238(3):245.

癌变·畸变·突变 1994年第6卷第2期

## 抗着丝点抗体在鉴别微核起源上的应用\*

汪旭 刘素清\*\* 合正基 邱玉洁

云南师范大学生物系 昆明 650092

**摘要** 以抗着丝点抗体间接免疫荧光染色法(CREST染色法)分析了纺锤体毒剂秋水仙素、有丝分裂抑制剂对苯二酚及多功能烷化剂丝裂霉素C诱发小鼠骨髓细胞微核的起源。结果指出,3种受试物均显著诱发小鼠骨髓嗜多染红细胞微核发生。秋水仙素诱发微核中,71%含有着丝点,表现CREST阳性,提示这些微核由完整落后染色体形成。对苯二酚诱发微核中,19%为CREST阳性,与对照无显著差异,说明其遗传毒性主要体现为染色体诱裂效应。丝裂霉素C在所有受试物中微核诱发率居首,但CREST阳性率仅6%,显著低于对照,暗示该化合物具强烈的染色体诱裂效应,且诱裂部位可多集中在着丝粒处,使诱发微核内均无完整的着丝点功能结构,表现CREST阴性,CREST染色法能够为鉴别哺乳动物非整倍体诱发剂提供依据。

**关键词** 抗着丝点抗体;非整倍体诱发剂;落后染色体;无着丝粒片段;微核;骨髓细胞

## ANTI-KINETOCHORE ANTIBODY STAINING TO DISCRIMINATE BETWEEN TWO MICRONUCLEUS ORIGINS

Wang Xu, Liu Suqing, He Zhengji, Qiu Yujie

Department of Biology, Yunnan Normal University, Kunming 650092

**Abstract** Antikinetochore antibody staining (CREST staining) was applied to distinguish micronuclei in vivo induced by spindle poison colchicine (COL), mitotic arrestant

\* 国家自然科学基金及云南省科委基金资助 \*\* 并列第一作者