

• 论著 •

应用 ³²P 后标记法检测水中 非挥发性有机物的 DNA 加合物

唐 非, 谷康定, 运珞珈, 张水兵, 汪亚州
(华中科技大学同济医学院环境医学研究所, 湖北 武汉 430030)

【摘要】背景与目的: 研究自来水中非挥发性有机物 (Nonvolatile Organic Compounds, NOCs) 与生物样品 DNA 形成 DNA 加合物的水平, 尝试从分子水平来进一步验证水中 NOCs 的致突变作用及其机制。材料与amp;方法: 应用 XAD-2 树脂吸附浓缩水中有机物的技术, 结合 ³²P 后标记法, 对武汉东湖自来水中非挥发性有机物与体内外生物样品的 DNA 形成的 DNA 加合物进行了检测。结果: 自来水中的 NOCs 可直接与小牛胸腺 DNA 反应形成 DNA 加合物; 小鼠经口染毒 NOCs 后, 在其肝脏细胞可检出多个 NOCs 的 DNA 加合物。结论: 东湖自来水中的 NOCs 有直接损伤生物体内外 DNA、形成 DNA 加合物的作用。

【关键词】自来水; 有机物; DNA 加合物

中图分类号: R123 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2004)05-0260-03

Detection of DNA Adduct of Nonvolatile Organic Compounds in Tap Water by Using Nuclease P₁ Mediated ³²P-postlabeling Method

TANG Fei, GU Kang-ding, YUN Luo-jia, *et al*

(*Institute of Environmental Medicine, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China*).

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: The DNA adducts of the nonvolatile organic compounds (NOCs) in tap water were studied for further validating genotoxicity of NOCs and its mechanism at molecular level. MATERIAL AND METHODS: The sample of tap water derived from Donghu lake of Wuhan was collected and the nonvolatile organic compounds (NOCs) in water were concentrated on XAD-2 resin. The DNA adducts of such NOCs were examined by using ³²P-postlabeling method. RESULTS: Some NOCs-DNA adducts could be found in biological samples including calf thymus DNA reacted with NOCs and liver of male mice treated with NOCs. CONCLUSION: DNA could be damaged by the NOCs in tap water directly, and the DNA adducts of such NOCs were formed *in vitro* and *in vivo* test.

【KEY WORDS】 tap water; nonvolatile organic compounds; DNA adduct

自 70 年代 Rook 和 Bellar 等分别发现加氯消毒的自来水中含有三氯甲烷等消毒副产物, 特别是发现某些化合物具致突变、致癌作用以后^[1,2], 人们开始认识到饮用水中的有机物可能会对人体健康产生影响。大量研究发现自来水中存在多种有机污染物, 其中 90 % 为可溶性的非挥发性有机物 (Nonvolatile Organic Compounds, NOCs), 其种类繁多, 至今已分离并

鉴别千余种, 其中不乏致癌, 促癌和致突变物质, 多种短期生物学试验结果亦表明其具有遗传毒性^[3]。自 80 年代以来, 王家玲等针对武汉东湖水富营养化及其自来水中有机物污染的问题, 系统报道了其水源水及其自来水水中非挥发性有机浓集物具有致突变性的研究结果^[4]。

DNA 加合物是亲电性的化合物或其代谢产物与

收稿日期: 2004-03-17; 修订日期: 2004-05-20

基金项目: 国家“九五”重点科技攻关计划项目 (No. 96-911-07-02-02)

作者简介: 唐 非 (1960-), 男, 四川省广安人, 教授, 主要从事水污染检测、评价及防治的科研与教学工作。

Tel: 027-83657874, E-mail: feitang@mails.tjmu.edu.cn

DNA 共价相联形成的化合物, 是化学致癌物损伤 DNA 的主要形式之一, 它一旦逃避了自身修复就可能成为化学致癌、致畸、致突变的起始因子, 因此 DNA 加合物的形成被认为是致肿瘤过程的一个重要阶段。研究与检测外源化合物的 DNA 加合物, 对于探索外源化合物致癌机制、评价其遗传毒性作用的强度十分重要。本研究以东湖自来水为主要对象, 在对其 NOCs 的致突变性及化学组分进行检测、鉴定的研究结果^[5,6]基础上, 应用 ^{32}P 后标记法对此 NOCs 与体内生物样品 DNA 作用后, 形成的 DNA 加合物进行了检测, 尝试从分子水平来验证水中 NOCs 的致突变作用及其机制, 为确定其作为致癌潜在危险性的生物标识物提供进一步的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 吸附树脂 美国 Amberlite XAD-2 型大孔树脂。

1.1.2 实验动物 7 周龄昆明种小鼠, 体重 25 ~ 30 g, 购自同济医学院动物中心。

1.1.3 生化试剂 小牛胸腺 DNA, RNase A, RNase T1, 蛋白酶 K, 脾磷酸二酯酶, 核酸酶 P1, 氯化锂购自 SIGMA 公司; T4 多核苷酸激酶, 小球菌核酸酶, $\gamma^{32}\text{P}$ -ATP (> 5 000 mCi/mol) 购自 AMERSHAM - PHARMACIA 公司; PEI 纤维素薄层板, 购自 SIGMA - ALDRICH 公司; 腺苷三磷酸双磷酸酶, 购自 FLUKA 公司; 其余化学品均为分析纯或优级纯。

1.2 仪器

高速离心机, 紫外分光光度计, 液闪计数器等。

1.3 实验方法

1.3.1 采样 于 1999 年 12 月 (枯水期), 采集东湖自来水厂的出厂水水样。

1.3.2 水中非挥发性有机物 (NOCs) 的浓集 参照 Greenberg、王家玲等报道的方法^[7,8]进行。水样以 40 ml/min 的流速通过预先净化的 XAD-2 树脂柱, 吸附水中微量有机物, 然后用丙酮、二氯甲烷浸柱并洗脱所吸附的有机物, 洗脱液在通氮减压条件下经 K-D 浓缩器浓缩, 再在 70 °C 烘箱中干燥获得有机物干品。试验前用二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解配成一定的浓度梯度, 以试样 0.1 ml 中所含有机物量相当于处理水样的体积为单位 (10 L/ml)。

1.3.3 体外 DNA 加合物生物样品的制备 参照刘淑芬等报道的方法^[9]进行。在 0.5 mg 纯化过的小牛胸腺 DNA 样品中, 加入不同剂量的水样 NOCs 样品, 37 °C 下温浴 24 h, 反应产物用乙醚提取二次去掉了

量的有机反应物, 取水相用冷乙醇沉淀, 溶于 0.2 mmol/L Tris-HCL 缓冲液中, DNA 的准确浓度用紫外分光光度计测定 ($1.0 \text{ OD}_{260\text{nm}} = 50 \mu\text{g DNA/ml}$)。

1.3.4 体内 DNA 加合物生物样品的制备 7 周龄雄性昆明种健康小鼠, 实验室内适应性喂养一周。停食 12 h 后, 设 10、20、40 0.1 L/g (体重) 3 个 NOCs 剂量组, 每组 4 只动物, 分别经口灌胃染毒, 24 h 后断头处死, 采集肝脏组织样品, 迅速冷冻贮于液氮中。

1.3.5 小鼠肝脏细胞中 DNA 的提取与纯化 参照 Vijayaraj Reddy 等报道的方法^[10]进行。将肝脏组织细胞匀浆后, 加 RNaseA 和 RNaseT1, 37 °C 温浴 45 min 后, 再加入蛋白酶 K, 37 °C 再温浴 45 min, 然后再依次用饱和酚、酚/Sevay (1/1) 和 Sevag (CHCl₃/异戊醇: 24/1) 提取, 水相用 5 mol/L NaCl 和冷乙醇沉淀 DNA, 最后经纯化的 DNA 用紫外分光光度计测浓度, 用 0.2 mmol/L Tris-HCL 缓冲液将 DNA 稀释为 $2 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。

1.3.6 ^{32}P 后标记法测定 DNA 加合物含量 用核酸酶 P₁ 加强灵敏度的 ^{32}P 后标记法测 DNA 加合物的过程按文献^[11]进行, 即取 $4 \mu\text{g DNA}$ ($2 \mu\text{L DNA}$ 溶液) 样品, 经 DNA 酶解, TLC 薄层层析与放射自显影等步骤, 获得 DNA 样品的加合物放射自显影指纹图, 最后用液闪计数测出各加合物斑点 CPM 值, 据此按下式计算加合物的相对加合物标记值 (Relative Adduct Labeling, RAL)。

$$\text{相对 DNA 加合物水平 (RAL)} = \frac{\text{DNA 加合物的 CPM} - \text{本底 CPM}}{3420 \times \text{DNA } \mu\text{g 数} \times 3.75 \times 10^6}$$

2 结果

2.1 体外反应形成的 DNA 加合物

从放射性自显影图可见水中 NOCs 和小牛胸腺 DNA 反应能形成一种 DNA-NOCs 加合物 (显示有一个 DNA 加合物斑点), 小牛胸腺 DNA 和东湖自来水中非挥发性有机物 (NOCs) 生成的 DNA 加合物斑点 CPM 值及其 RAL 值见表 1。表 1 的计算结果表明在所设置的剂量范围内, 不同剂量的 NOCs 作用于 DNA 后所形成 DNA 加合物的定量值, 在扣除阴性对照 (DMSO) 的

表 1 NOCs 与小牛胸腺 DNA 反应形成的 DNA 加合物水平 (RAL 值)

Table 1 RAL of DNA adducts of calf thymus DNA reacted with NOCs in water

Treatment	Dose (10 L/ml DMSO)	CPM of background	CPM of spot	RAL ($\times 10^{-10}$)
DMSO ^a	0.1 ml	67	92	57
NOCs ^b	0.1	30	78	111
	0.2	19	94	173
	0.4	26	113	201
2-AF ^c	100 $\mu\text{g/ml}$ DMSO	73	138	150

^a Dimethyl sulfoxide (negative control), ^b Nonvolatile Organic Compounds (NOCs), ^c 2-Aminofluorene (positive control).

RAL值后,此种加合物的RAL值范围是 $5.4 \times 10^{-9} \sim 1.44 \times 10^{-8}$,即每 10^{10} 个正常核酸中有54~144个被形成加合物,由此而引起DNA的损伤,亦随NOCs剂量的增加而有所增强,这就可能是水中NOCs直接产生致突变作用的原因之一。

2.2 小鼠肝组织细胞中DNA加合物的形成

放射性自显影图表明水中的NOCs和DNA反应能形成DNA加合物,显示有多个DNA加合物斑点,肝脏组织细胞中形成的DNA加合物斑点CPM值总量及其相对标记率RAL值计算结果见表2。由表2结果表明东湖自来水中NOCs染毒处理小鼠后,其肝脏细胞中有DNA加合物形成,并且随着染毒剂量的增加,DNA加合物的种类(斑点数)也有所增加,与阴性对照(DMSO)所形成的斑点与位置相比有所不同,由此可初步认为这些DNA加合物是NOCs经体内代谢活化后,生成了一些新的化合物与DNA共价结合而形成的,但也不能排除是由NOCs中的一种或数种有机物直接与肝脏细胞DNA作用的结果。定量结果可看出在所设置的染毒剂量范围内,肝细胞中DNA加合物总量的RAL值范围是 $8.9 \times 10^{-9} \sim 2.39 \times 10^{-8}$,存在一定的剂量反应关系,反映出NOCs的染毒剂量与肝细胞DNA加合物形成种类、水平呈正相关。

表2 水中NOCs染毒小鼠后肝脏细胞中DNA加合物的水平(RAL值)
Table 2 RAL of DNA adducts in liver of mice treated with NOCs in water

Treatment	Dose (0.1 L/g)	Number of spot	CPM of background	CPM of total spot	RAL ($\times 10^{-10}$)
DMSO ^a	-	2	67	92	58
	10	2	49	74	56
NOCs ^b	20	4	70	136	147
	40	5	70	199	297
B[a]P ^c	0.25 mg/g	6	94	175	187

^a Dimethyl sulfoxide (negative control), ^b Nonvolatile Organic Compounds (NOCs), ^c Benzo[a]pyrene (positive control).

3 讨论

已有的研究表明,许多污染物引起的致癌作用是污染物在体内代谢活化后与DNA共价连接形成了DNA加合物,若这些DNA加合物未被修复,则将导致遗传信息的改变而诱发变异。因此,DNA加合物在化学致癌作用的起始过程中有重要作用,其水平与致癌能力相关,任何可与DNA形成加合物的污染物,即使在很低的水平,都应该认为对生物体有致癌与致突变的可能性,所以对DNA加合物的检测已成为评价污染物致癌性的重要手段之一^[11]。

从上述东湖自来水中非挥发性有机物(NOCs)在

体外及体内与DNA的反应的结果,可发现水中NOCs可直接与小牛胸腺DNA反应形成DNA加合物;小鼠经口染毒NOCs后,在其肝脏细胞可检出多个NOCs的DNA加合物,证明NOCs除了有直接损伤DNA、形成DNA加合物的作用外,还可经体内代谢活化后,生成了一些新的化合物与DNA形成DNA加合物,从分子水平进一步说明东湖自来水中NOCs对遗传物质DNA的损害,这也与以往对此NOCs的致突变作用的研究结果是一致的^[4, 5]。由于本研究只对所形成的DNA加合物总量进行了检测,至于这些DNA加合物是由NOCs中何种化合物所致,以及对加合物的结构鉴定、加合物含量与生物效应的相关性、用DNA加合物作为生物检测标志物等问题有待进一步的研究。

(致谢:本研究承蒙蔡宏道教授的关心与指导;有关DNA加合物的检测工作得到浙江大学劳动卫生与环境卫生研究所陈加平博士、徐立红教授的协助,在此表示感谢。)

参考文献:

- [1] Rook JJ. Formation of haloforms during chlorination of natural waters [J]. *Water Treatm Exam*, 1974, 3: 234-243.
- [2] Bellar TA, Lichtenberg JJ, Kronet RC. The occurrence of organohalides in chlorinated drinking waters [J]. *J AWWA*, 1974, 66: 703-706.
- [3] Meier JR. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water [J]. *Mutat Res*, 1988, 196: 211-245.
- [4] 王家玲,朱良金,杨晓萍,等.水中非挥发性有机物致突变性的研究[J].中国环境科学,1987,7(1):24-27.
- [5] 唐非,张水兵,谷康定,等.不同水文期水中非挥发性有机物致突变性的比较[J].同济医科大学学报,2001,30(6):538-540.
- [6] 唐非,张水兵,汪亚洲,等.东湖源水与自来水中致突变性物质比较[J].中国给水排水,2002,18(7):5-7.
- [7] Greenberg AE. Standard method for Examination of water and Wastewater [M]. 18th ed., Washington DC, American Public Health Association, Inc., 1992.
- [8] 王家玲,运珞珈,郑红俭,等.应用国产大孔树脂吸附水中有机质的研究[J].环境科学与技术,1983,(3):1-3.
- [9] 刘淑芬,蒋湘宁.³²P后标记法测DNA加合物[J].环境化学,1994,13(3):272-277.
- [10] Reddy MV, Randerathk K. ³²P-Analysis of DNA adducts in somatic and reproduction tissues of rat treated with the anticancer antibiotic, mitomycin C [J]. *Mutat Res*, 1987, 179:75-88.
- [11] 陈加平,徐立红,吴振斌,等.苯并[a]芘致毒的鱼的分子生态毒理学指标研究[J].中国环境科学,1999,19(5):417-420.