

Effect of Cadmium Chloride on the Unscheduled DNA Synthesis in Whole Blood Cells of Human

氯化镉 对人全血细胞 程序外 DNA 合成的影响

YU Ping, TANG Ling-fang
(Laboratory of Toxicology, Center for Disease Control and Prevention of Jiangsu Province, Nanjing 210009, China)

俞 萍/唐玲芳
(江苏省疾病预防控制中心毒理室,
江苏 南京 210009)

【摘要】背景与目的:进一步明确镉对人类细胞 DNA 的损伤效应以及对损伤修复的干扰作用。材料与方法:利用简化人全血细胞检测法研究了 CdCl₂ 诱导人全血细胞(主要是淋巴细胞和单核细胞参与反应)程序外 DNA 合成 (unscheduled DNA synthesis, UDS) 的能力及其对该细胞经 N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍(MNNG)或紫外线(UV)处理后 DNA 修复合成的影响。结果:0.1~10 μmol/L 的 CdCl₂ 单独作用,细胞 DNA 修复合成前体物 ³H-TdR 的掺入量与镉浓度呈高度正相关的剂量-效应关系,其中 10 μmol/L 剂量组与对照组相比差异有显著性;CdCl₂ 在对人全血细胞 UDS 无明显诱导的剂量水平下即可使 MNNG 作用后 DNA 的修复合成受抑;与之相反,1 μmol/L CdCl₂ 与 UV 共同作用对人全血细胞 UDS 的诱导存在明显的协同作用。结论:较高浓度的镉对 DNA 具有损伤作用;而在较低浓度下,镉干扰 DNA 修复过程的作用较明显。上述直接和间接的遗传毒作用可能是镉致癌的机制之一。

【关键词】氯化镉;程序外 DNA 合成

中图分类号:R994

文献标识码:A

文章编号:1004-616X(2005)01-0041-04

【ABSTRACT】BACKGROUND & AIM: To make further understanding in the action of Cd to inhibit the repair of DNA lesions in human cells. MATERIAL AND METHODS: The simplified method of unscheduled DNA synthesis(UDS) test with human whole blood cells(lymphocytes and monocytes were the main cell types involved in the test) was adopted to investigate the effect of CdCl₂ on the repair processes of DNA damage induced by N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine (MNNG)and ultraviolet(UV).RESULTS: Treatment of human blood cells with Cd caused a dose-dependent increase in the amounts of ³H-TdR incorporated in DNA through UDS, but the cpm value was significantly elevated only at 10 μmol/L Cd dose as compared with the negative control, which indicated apparent DNA damage induced by Cd .MNNG- induced UDS was weakened to some extent by Cd dose from 0.1 to 10 μmol/L, the remarkable inhibition was observed at Cd concentration of 1 μmol/L, while treatment with Cd of this concentration alone did not induce positive UDS. In contrast to MNNG, UV-induced UDS was strongly enhanced by 1 μmol/L CdCl₂. The analysis of variance showed an evident synergistic interaction between this dose of Cd and UV. CONCLUSION: Cd itself can induce DNA damage at relatively high dose, while the lower Cd dose may interfere with DNA repair process and these direct and indirect genotoxic mechanisms may be involved in the carcinogenicity of Cd compounds.

【KEY WORDS】 cadmium chloride; unscheduled DNA synthesis(UDS)

镉(cadmium, Cd)是重要的工业毒物 and 环境污染物, 且是肯定的人类致癌物。镉的致癌机制十分复杂, 资料

显示, 镉本身的遗传毒性较弱, 在达到较高剂量水平时可引起 DNA 链断裂、DNA 链内/链间交联、DNA- 蛋白交

收稿日期: 2004-03-01; 修订日期: 2004-04-26

作者简介: 俞 萍(1973-), 女, 江苏省苏州市人, 主管医师, 硕士, 主要从事卫生毒理学研究。Tel: 025-83759444, E-mail: fishyup@sina.com

联、姊妹染色单体交换、染色体畸变等损害。然而大量证据显示,虽然低浓度镉无明显的遗传毒性,但它却能明显促进紫外线、B(a)p、MMS 等因素对细菌和哺乳动物细胞的基因突变、DNA 损伤和细胞毒性等作用^[1],镉的这一效应可能与 DNA 修复过程的抑制有关^[2,3]。镉对 DNA 损伤修复的抑制意味着镉尽管本身的遗传毒性有限,但它可通过更广泛的途径促进各种有害因子对人类健康的危害,尤其是在致癌、致畸、致突变方面的间接作用更不容忽视。本文利用人全血细胞程序外 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, UDS) 试验初步研究了镉对人类细胞的这一作用。

1 材料与与方法

1.1 试剂 氯化镉(CdCl₂·2.5H₂O,分析纯,天津化学试剂批发部提供); RPMI1640 细胞培养液(Gibco 公司产品); 羟基脲(hydroxyurea, HU, Sigma 公司产品); N-甲基-N'-硝基-亚硝基胍(N-methyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, MNNG, Fluka 产品); 氚-胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR, 中国科学院原子能研究所产品,放射性比活度 60 Ci/mmol,放射性浓度为 1 mCi/ml); 2,5-二苯基恶唑(2,5-Diphenyloxazole, PPO, 闪烁纯)和对次苯基苯恶唑(2,2'-p-Phenylene-bis[5-phenyloxazole], POPOP, 闪烁纯),为上海试剂一厂产品; 闪烁液(0.4% PPO-0.04% POPOP-二甲苯溶液); 乙二胺四乙酸二钠(EDTA-Na₂·2H₂O)、三氯醋酸(TCA)、二甲苯、无水乙醇等试剂均为国产,分析纯; 实验用水为双蒸水。

1.2 仪器 日本产 YAMATO IP-31 型 CO₂ 细胞培养箱; 江阴产巨光牌 15 W 石英紫外杀菌灯; 绍兴产 DYQ-01 型多头细胞样品收集器; 上海产 RQ-305 型红外线快速干燥器; 瑞典产 LKB-1219 RACKBETA 液体闪烁计数仪。

1.3 人全血 取无毒物接触史的健康供血者。

1.4 实验方法 参照蔡永庭等和沈芳兰等^[4,5]的方法略加改进。肝素抗凝静脉血与 RPMI1640 培养液按 5:2 比例混合,内含 HU(终浓度 10 mmol/L 反应体系),混匀后分装塑料试管,0.35 ml/管,共 48 管,分为 12 组。按实验设计要求(表 1)加入受试物贮备液或接受

紫外线照射 5 min(254 nm,强度 0.5 W/m²),然后加入 50 μCi/ml ³H-TdR 50 μl/管,最后以 RPMI1640 培养液补足反应体系体积至 0.5 ml。将试管摇匀后置 37 °C 含 5% CO₂ 的细胞培养箱中孵育 4.5 h,其间振摇试管数次。培养结束后每组取一管进行存活白细胞计数,另 3 管加入冰冷的生理盐水 2 ml/管以终止掺入反应。用多头细胞收集仪转移细胞至湿润的 49 型玻璃纤维滤纸上,以 5 ml 0.02% EDTA-Na₂ 溶液(pH 7.4 无钙镁的 PBS 配制)荡洗试管一次,洗液移至滤纸上,用 25 ml 生理盐水冲洗,10 ml 5% 三氯醋酸固定,10 ml 95% 乙醇脱色。取下滤纸,用红外线干燥器烘干后平置于闪烁杯底,细胞面向上,加入 5 ml 闪烁液,旋紧瓶盖,室温下静置过夜,次日于液闪计数仪上测定各管 cpm 值。

1.5 统计处理 根据存活白细胞数求得各组平均 cpm/10⁶cells 值,该值反映细胞 UDS 水平,经平方根变换后用 SAS 软件进行统计分析。对氯化镉单独作用时的数据以单因素方差分析和 Dunnett's t 检验以做组间比较;对于氯化镉与 MNNG 或 UV 共同作用时的数据,分别将各剂量水平 CdCl₂ 作为第一因素,以 MNNG 或 UV 作为第二因素,用 2×2 析因分析法检验各剂量水平 CdCl₂ 与 MNNG 或 UV 各自作用和交互作用的显著性。

2 结果

2.1 氯化镉、MNNG、UV 对白细胞存活数的影响

人全血加入不同剂量的 CdCl₂、MNNG 或经 UV 照射后,白细胞存活数均有不同程度下降,UV 照射和剂量为 10 μmol/L 的 CdCl₂ 对白细胞存活数的影响尤为明显。接受 UV 照射后再接触 10 μmol/L CdCl₂,白细胞存活数仅为单独接受紫外线照射组的 75%(表 1)。

2.2 氯化镉、MNNG 和 UV 对人全血细胞程序外 DNA 合成的影响

2.2.1 氯化镉诱导人全血细胞 UDS 的作用

CdCl₂ 单独作用可促进人全血细胞 ³H-TdR 的掺入, cpm/10⁶ cells 值随镉浓度增加而升高, cpm/10⁶ cells 值经平方根变换后与镉剂量对数进行直线相关分析得相关系数 r = 0.998(P < 0.01),呈正相关关系;Dunnett's t 检验 10 μmol/L CdCl₂ 组 cpm/10⁶cells 值与对照组差异有

表 1 氯化镉、MNNG、UV 对白细胞存活数的影响

Table 1 Effect of CdCl₂, MNNG, UV on survival of the leucocyte (× 10⁶ cells/tube)

CdCl ₂ μmol·L ⁻¹	MNNG(-) & UV(-)		MNNG(+)		UV(+)	
	survival	Rate(× 10 ⁻²) [△]	survival	Rate(× 10 ⁻²) [△]	survival	Rate(× 10 ⁻²) [△]
0	1.283	100.0	1.083	84.4	1.000	77.9
0.1	1.075	83.8	1.058	82.5	0.983	76.6
1.0	1.033	80.5	1.000	77.9	0.917	71.4
10.0	1.017	79.2	0.967	75.3	0.750	58.4

Compared with control group, △, relative survival rate.

显著性(表 2),提示其已对 DNA 造成了明显损伤。

2.2.2 氯化镉对 MNNG 诱导的人全血细胞 UDS 的影响

CdCl₂对 MNNG 诱导的 UDS 存在一定抑制作用,两者联合作用时 cpm/10⁶cells 的增加量小于分别单独作用时 cpm/10⁶cells 增加量之和。对各水平 CdCl₂与 MNNG 的交互作用分别进行 2×2 析因分析发现,0.1 μmol/L CdCl₂与 MNNG 共同作用时 MNNG 对 UDS 的诱导作用具有显著性 (P<0.05),镉对 UDS 的诱导和两者的交互作用均不显著;1 μmol/L CdCl₂与 MNNG 共同

作用,细胞 UDS 明显减弱, MNNG 和镉的作用均不显著,而交互作用明显 (P<0.05);10 μmol/L CdCl₂对 UDS 有明显的诱导作用,虽然该剂量水平的 CdCl₂与 MNNG 共存时交互作用无统计学意义,但 MNNG 的作用也不显著,说明 MNNG 对 UDS 的诱导仍受到一定程度的抑制,提示镉在较低浓度时主要表现为抑制 DNA 修复合成的间接遗传毒性(表 2)。

2.2.3 氯化镉对紫外线诱导的人全血细胞 UDS 的影响

低浓度 CdCl₂ (0.1 μmol/L) 对 UV 诱导的

表 2 氯化镉、MNNG和UV对人全血细胞程序外DNA合成的影响

Table 2 Effects of CdCl₂,MNNG ,UV on UDS of Human Whole Blood Cells(³H-TdR incorporated, cpm/10⁶ cells, $\bar{x} \pm s$)

CdCl ₂ μmol·L	MNNG(-) & UV(-)		MNNG(+)		UV(+)	
	UDS	UDS	R [△]	UDS	R [△]	
0	136.1 ± 44.5	232.6 ± 57.6	1.71	242.1 ± 17.0	1.79	
0.1	194.4 ± 78.3	261.7 ± 47.7	1.34 [#]	312.6 ± 51.0	1.61 ^{# #}	
1.0	265.2 ± 74.0	221.5 ± 37.7	0.84 ^{&}	690.2 ± 23.4	2.60 ^{* * * * # & &}	
10.0	334.8 ± 103.8 [*]	385.2 ± 104.7	1.15 ^{* *}	359.9 ± 80.5	1.08 ^{* *}	

△, R = cpm/10⁶cells of MNNG(+) or UV(+)/cpm/10⁶cells of MNNG(-) & UV(-). n = 3, ANOVA & Dunnett's t test, *, P < 0.05 vs. the control group. 2×2 factorial analysis, ** , the effect of CdCl₂ is significant at P < 0.01 level; # / # # , the effect of MNNG or UV is significant at P < 0.05 / P < 0.01 level; & / & & , the interaction is significant at P < 0.05 / P < 0.01 level.

UDS 无明显影响;当浓度达到 1 μmol/L 时细胞 UDS 显著增强, CdCl₂ 和 UV 存在明显的协同作用(交互作用 P < 0.01);经紫外线照射后再接触 10 μmol/L CdCl₂, 细胞存活率显著下降(表 1),析因分析发现,此时 UV 和 CdCl₂ 的交互作用无统计学意义,但 UV 在诱导 UDS 中的作用已不显著,说明其受到了一定抑制(表 2)。

酶、AP 内切酶、DNA 糖基酶、所有的 DNA 聚合酶、DNA 连接酶等均为带有锌指结构的酶,有的还含有丰富的组氨酸、半胱氨酸残基^[9],因此极有可能受到镉的作用而失活^[10-12]。有研究发现锌、EDTA 和某些富含巯基的化合物可不同程度地拮抗镉对真核生物 DNA 聚合酶 β 或 DNA 连接过程的抑制作用^[7,12]。一些研究结果还显示,镉对氧化损伤修复有关的大肠杆菌 Fpg 蛋白、MutT 蛋白和人类 MTH1 蛋白等 DNA 修复酶也有抑制作用^[8]。对于最主要的修复方式——切除修复, Nocentini 认为镉主要抑制了损伤切除后 DNA 新链的合成和连接过程;某些学者认为镉引发的 DNA 断裂、染色体结构畸变、SCE 等是由于它抑制 DNA 修复中切口连接的后果,上述结论支持了这一观点。

有关学者对镉抑制烷化剂所致 DNA 损伤修复的认识较为一致,而对镉与各种射线共同作用的看法存在某些差异。本实验观察到,10 μmol/L 镉与 UV 共同作用时 UV 对 UDS 的诱导才受到一些抑制,但此时细胞存活仅为对照组的 58.4 %;而 1 μmol/L 镉可使 UV 诱发的 UDS 强度增加近两倍,说明在对人全血细胞 UDS 的诱导方面,镉与 UV 主要表现为协同作用。UV 和烷化剂所引发的 DNA 损伤修复对镉的反应的差别可能是因为两者所造成损伤的类型、占主导地位的修复方式和有关的酶有所不同^[3]。

除了镉与酶的直接作用,镉通过某些间接途径如钙调素系统下调 DNA 修复的可能也不能够完全排除。

DNA 修复功能失常可增加细胞基因突变和恶性转

3 讨 论

程序外 DNA 合成 (UDS) 是指与 DNA 修复有关的 DNA 合成过程,它不同于细胞在 S 期进行的 DNA 半保留复制,该过程的加强是 DNA 损伤的表现之一。

DNA 损伤是细胞癌变的关键步骤,损伤修复的失败可使机体产生肿瘤。低浓度镉仅有很弱遗传毒性,却能明显增强其它理化因子的遗传毒性^[6]。实验发现镉单独作用对 UDS 的诱导随剂量升高逐渐增强,UDS 强度与镉浓度之间呈极显著的正相关关系;在含 0.1、1、10 μmol/L CdCl₂ 培养液中加入 MNNG 后,细胞存活率未见明显下降,而 UDS 强度低于两者单独作用之和,在低于明显损伤 DNA 的镉水平(CdCl₂ 1 μmol/L),其交互作用最为显著,提示镉的辅助致突变性 (comutagenicity)^[2] 等遗传毒性增强作用可能是因为 DNA 损伤修复受阻所致。Dally 等^[7] 的研究也显示,镉显著抑制 DNA 修复的阈剂量低于自身引起 DNA 明显损伤的阈剂量。

镉抑制 DNA 修复的确切机制尚未完全明了,目前多认为与修复酶的失活有关,已有发现,许多 DNA 修复相关的酶可被镉抑制^[7,8],由于这些酶类,如修复内切



化的机率。因此,镉本身存在的弱遗传毒性加上它引起的 DNA 修复系统功能改变可能是镉致癌机制的一个重要方面。

参考文献:

[1] Hartmann A, Speit G. Effect of arsenic and cadmium on the persistence of mutagen-induced DNA lesions in human cells [J]. *Environ Mol Mutagen*, 1996, 27: 98 - 104.

[2] Hartwig A. Role of DNA repair inhibition in lead- and cadmium-induced genotoxicity: a review [J]. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(3): 45 - 50.

[3] Fatur T, Lah TT, Filipic M. Cadmium inhibits repair of UV-, methylmethane-sulfonate and N-methyl-N-nitrosourea-induced DNA damage in Chinese hamster ovary cells [J]. *Mutat Res*, 2003, 529(1-2): 109 - 116.

[4] 蔡永庭, 邹介智, 瞿永华. 简化人全血细胞 DNA 非程序合成检测化学致癌物研究 [J]. *肿瘤*, 1988, 8(2): 77 - 79.

[5] 沈芳兰, 张秀珍, 李珏声, 等. 牛磺酸对小鼠抗氧化和 DNA 修复能力的作用 [J]. *营养学报*, 1996, 18(3): 258 - 261.

[6] Pruski AM, Dixon DR. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L. [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 57(3): 127 - 37.

[7] Dally H, Hartwig A. Induction and repair inhibition of oxidative DNA damage by nickel(II) and cadmium(II) in mammalian cells [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(5): 1 021 - 1 026.

[8] Porter DW, Yakushiji H, Nakabeppu Y, et al. Sensitivity of *Escherichia coli*(MutT) and human(MTH1) 8-oxo-dGTPases to in vitro inhibition by the carcinogenic metals, nickel(II), copper(II), cobalt(II), and cadmium(II) [J]. *Carcinogenesis*, 1997, 18(9): 1 785 - 1 791.

[9] Coleman JE. Zinc proteins: enzymes, storage proteins, transcription factors, and replication proteins [J]. *Ann Rev Biochem*, 1992, 61: 897 - 946.

[10] Hartwig A, Asmuss M, Ehleben I, et al. Interference by toxic metal ions with DNA repair processes and cell cycle control: molecular mechanisms [J]. *Environ Health Perspect*, 2002, 110(5): 797 - 799.

[11] Hartwig A. Zinc finger proteins as potential targets for toxic metal ions: differential effects on structure and function [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2001, 3(4): 625 - 634.

[12] Asmuss M, Mullenders LH, Eker A, et al. Differential effects of toxic metal compounds on the activities of Fpg and XPA, two zinc finger proteins involved in DNA repair [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(11): 2 097 - 2 104.

(上接第 40 页)

采集树脂并调制成蜂胶后,用来加固巢、填补蜂巢缝隙与空间、涂抹巢房,还用蜂胶密封已被蛰死而不能清除出巢外的敌害,防止其腐烂。可见蜂胶是一种天然抗菌防腐物质。

国内外大量研究已经从世界各地蜂胶中鉴定出 300 多种化合物,多种微量元素和维生素^[2],对其中的某些化合物单项研究证明,蜂胶中的多种物质具有抗突变抗癌作用^[1,5-7],根据蜂胶具有的多种生物活性组分的特点,本文用 Ames 试验测定了蜂胶的诱变和抗诱变作用,结果显示,蜂胶无致突变作用,能抑制多种诱变剂诱发的不同类型的基因突变,且无论是否经肝微粒体酶活化,对阳性物诱发的突变均有拮抗作用,所以可初步认为,蜂胶具有广谱的抗诱变作用。

由于蜂胶抗突变作用的化学成分非常复杂,如酚类、香豆素、黄酮类、萜类、维生素 A、E、植物固醇及微量元素等,蜂胶抑制基因突变的作用机制也应是一个多方面作用的综合过程。如蜂胶具有很好的抗氧化作用,可以清除氧自由基。其含有的锌可以掺入 DNA 聚合酶的合成,促进 DNA 损伤的无误修复^[8];蜂胶中含有的香豆素、黄酮及酚类可以提高酶系统的活性,促进致癌剂灭活^[5],特别是生物黄酮素,可能通过阻止异源物质的酶

来诱变中间体,或者抑制癌细胞增殖信号,更重要的是某些抗癌活性可能是直接阻断接受体或接受体信号^[5],蜂胶抗突变机制有待进一步深入研究,以便充分开发这种天然抗诱变物质的临床应用价值。

参考文献:

[1] 卢志强,娄红祥. 植物活性成分与癌症的化学预防 [J]. *中草药*, 2002, 33(6): 563 - 565.

[2] 郭伽,周立东. 蜂胶的化学成分研究进展 [J]. *中国养蜂*, 2000, 51(2): 17 - 18.

[3] 韩连堂,王志萍,李佩贤,等. 蜂胶对环磷酰胺等四种诱变剂诱发突变的抑制作用 [J]. *中国公共卫生*, 2001, 17(5): 406 - 407.

[4] 周宗灿,傅娟龄,王莹,等. 57 种中草药甲醇提取物体外抗突变作用的筛选 [J]. *卫生毒理学杂志*, 1989, 3(4): 212 - 214.

[5] 蔡蕾. 食物中非营养成分的生物学效应研究进展 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1995, 22(5): 277 - 281.

[6] 徐厚铨. 环境致突变物和致癌物的抑制剂及其应用 [J]. *国外医学肿瘤学分册*, 1989, 16(1): 26 - 29.

[7] 刘向前. 细胞程序死亡和生物黄酮素 [J]. *中草药*, 2002, 33(2): 190.

[8] 周士新. 超氧化物歧化酶及其金属辅基与恶性肿瘤的关系 [J]. *国外医学卫生学分册*, 1995, 22(4): 228 - 231.