

五种氯化有机物对 V₇₉ 细胞 DNA 损伤作用的研究

张遵真¹ 衡正昌¹ 李 南² 拉巴卓玛²

¹ 华西医科大学环境卫生教研室 ² 预防医学 94 级毕业生 成都 610041

摘要 本文采用近年来发展的单细胞凝胶电泳试验检测了二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳及一氯乙酸和三氯乙酸对 V₇₉ 细胞的 DNA 损伤作用。结果显示:五种受试物均可引起体外培养的 V₇₉ 细胞 DNA 损伤,但其作用强度差异很大。其顺序为四氯化碳 > 三氯甲烷 > 二氯甲烷 > 一氯乙酸 > 三氯乙酸。该结果还提示:五种氯化有机物对 V₇₉ 细胞的毒性及 DNA 损伤作用的大小顺序是一致的,氯化烷基类化合物的细胞毒性及 DNA 损伤作用均大于氯乙酸类,在氯化烷基类化合物中,其 DNA 损伤作用是随化合物中氯原子数目的增加而增强的。

关键词 氯化有机物;单细胞凝胶电泳;DNA 损伤;V₇₉ 细胞

STUDY ON THE DNA DAMAGE OF FIVE CHLORINATED ORGANIC COMPOUNDS IN V₇₉ CELLS

Zhang Zunzhen¹, Heng Zheng Chang¹, Li Nan², La Bazuoma²

¹ Department of Environmental Health, West China University of Medical Sciences, Chengdu 610041 ² Students of Preventive Medicine

Abstract In this paper, the DNA damage effects of carbon tetrachloride, trichloromethane, dichloromethane, chloroacetic acid and trichloroacetic acid were studied using the single cell gel electrophoresis technique (comet assay) in V₇₉ cells cultured in vitro. The results showed that all test substances, except trichloroacetic acid, exhibited a clear and reproducible linear dose-dependent increase in DNA migration. The DNA breakage capacity and the cytotoxicity of these chemicals have the same order: carbon tetrachloride > trichloromethane > dichloromethane > chloroacetic acid > trichloroacetic acid. The data also suggested that DNA breakage capacity and the cytotoxicity of the chemicals of chlorinated alkyl were stronger than that of the kind of chloroacetic acid. Among the chemicals of chlorinated alkyl, the DNA breakage capacity increased with increasing in the number of chlorine substitution.

Key words Chlorinated organic compound; Single cell gel electrophoresis; DNA damage; V₇₉ cell

二氯甲烷、三氯甲烷、四氯化碳及一氯乙酸和三氯乙酸都是具有广泛用途的化学试剂,同时又是饮水氯化消毒后的氯化副产物,人群接触机会多,潜在危害大,故国内外对它们的致癌、致畸和致突变作用已有不少研究^(1,2,3),然而,对于它们是否能引起细胞 DNA 链断裂未见报道。本文采用近年来发展的能够

敏感、快速检测单个哺乳动物细胞 DNA 链断裂作用的单细胞凝胶电泳 (SCGE) 实验⁽⁴⁾,对这五种化合物所致的 V₇₉ 细胞 DNA 损伤进行了研究,目的在于探讨氯化有机物“三致”作用的机理,丰富饮水氯化副产物的遗传毒性资料。

材料与方法

1 受试物 五种受试物的中英文名称,结构,来源及

纯度见表 1。

表 1 五种受试物的中英文名称、结构、来源及纯度

化合物	化合物英文名	分子式	纯度	来源
二氯甲烷	Dichloromethane	CH ₂ Cl ₂	> 99 %	西安化学试剂厂
三氯甲烷	Trichloromethane	CHCl ₃	> 99 %	重庆化学试剂厂
四氯化碳	Carbon tetrachloride	CCl ₄	> 99 %	成都化学试剂厂
一氯乙酸	Chloroacetic acid	CH ₂ ClCOOH	> 99.5 %	广东汕头新宁化工厂
三氯乙酸	Trichloroacetic acid	CCl ₃ COOH	> 99 %	上海试剂三厂

受试物于临用前配制。三氯乙酸和一氯乙酸用三蒸水溶解,二氯甲烷,三氯甲烷和四氯化碳均溶于分析纯二甲基亚砷(DMSO)。

2 细胞培养及染毒 中国地鼠肺成纤维 V₇₉ 细胞,以 DMEM 作为基本培养基,添加 10 % 的小牛血清,100IU 青霉素和 100μg 链霉素/100ml 成为完全培养液,按常规传代培养。正式实验前,测试受试物的细胞毒性。方法是:当细胞处于对数生长期时,分别加入 50μl 不同浓度的受试物,于染毒后不同时间根据细胞形态,颜色及脱落情况并与空白对照相比判断其细胞毒性;SCGE 实验时,选择无明显细胞毒性的浓度(细胞形态有变化,但无脱落)作为受试物的最高浓度,每一受试物设三个剂量,同时加入 1mmol/L 重铬酸钾的阳性对照和 50μl 二甲基亚砷的溶剂对照,暴露 2h 或者 3h 后,用 0.1 % 的胰酶消化收获细胞,离心后用 PBS 将细胞制成适当浓度的悬液,置冰浴备用。

3 单细胞凝胶电泳 单细胞凝胶电泳实验又叫彗星实验(Comet assay),其基本程序按本室常规方法操作⁽⁵⁾。主要步骤为: 制片:取 110μl 熔化的正常熔点琼脂糖(0.8 %)于毛玻片上,加盖玻片令其均匀展开,固化后加 75μl 约含 10⁴ 个细胞的低熔点琼脂糖凝胶(0.8 %),再加盖玻片待凝。 裂解:移开盖玻片,将载玻片浸于新配制的细胞裂解液(PH = 10),置 4 至少 1h。 解旋:转移玻片至盛有新鲜电泳缓冲液(PH = 13)的水平电泳槽,使液面高于凝胶表面约 2mm,避光浸泡 30min,使 DNA 解螺旋。 电泳:调电压为 23V,电流 200mA,室温下电泳 35min。 漂洗及染色:电泳完毕,取出载玻片,用蒸馏水漂洗 2 次,然后用 30μl 15mg/L 的溴化乙锭染色。 结果观察:荧光显微镜下(515 - 560nm 的激发波),每张片子观察 200 个细胞,计出拖尾细胞(彗星细胞)百分率,并用目镜测微尺随机测量 30 个拖尾细胞的头长和全长,全长扣除头长后即为 DNA 迁移长度,也称彗星尾长。

结果

1 受试物对 V₇₉ 细胞的细胞毒性 受试物中以四氯化碳的细胞毒性最大,5mmol/L 四氯化碳暴露 0.5h,细胞体积变小,变圆,并成棕色网状伴小片脱落;以一氯乙酸和三氯乙酸毒性最小,用 100mmol/L 的一氯乙酸和三氯乙酸处理 3h,细胞仅有轻微的毒性。五种受试物细胞毒性顺序为:四氯化碳 > 三氯甲烷 > 二氯甲烷 > 三氯乙酸和一氯乙酸。

2 荧光显微镜下细胞的形状 在荧光显微镜下,DNA 被溴化乙锭染成桔红色。正常细胞,染色体 DNA 呈圆团(图 1);具有 DNA 断裂的细胞,断片向阳极迁移,形成彗星样的拖尾(图 2,3)。

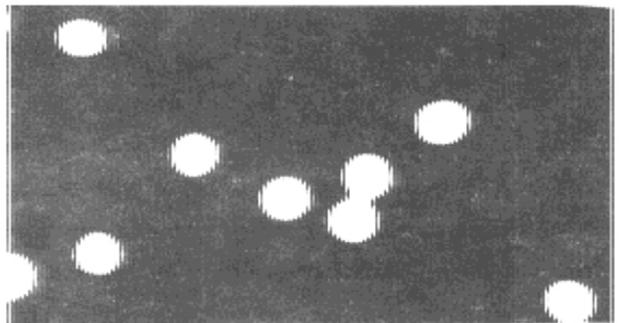


图 1 DMSO 组的细胞核形成圆团(×250)

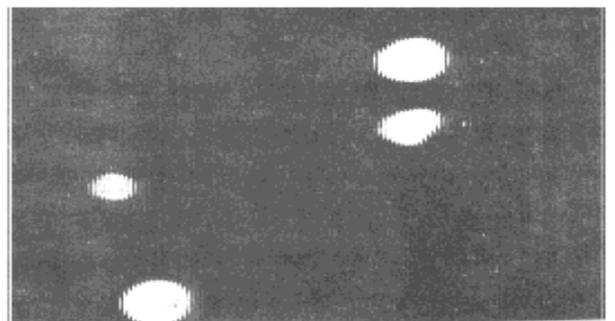


图 2 100mmol/L 一氯乙酸诱导的 V₇₉ 细胞 DNA 迁移(×250)

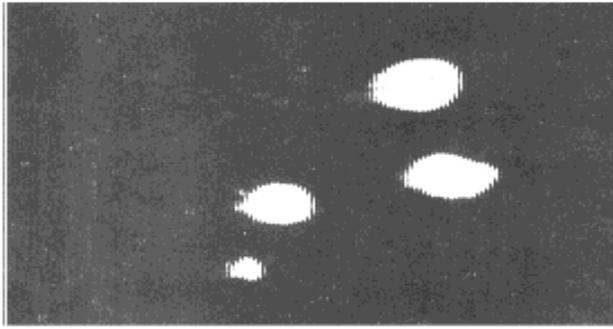


图3 1mmol/L 四氯化碳诱导的 V₇₉细胞 DNA 迁移 (×250)

3 受试物引起的 V₇₉细胞 DNA 迁移 结果见表 2。

本试验中,溶剂对照组有 10% 的细胞出现 DNA 迁移,但其迁移距离很小,而 1mmol/L 重铬酸钾组所有细胞都有迁移,其迁移距离约为 DMSO 组的 10 倍,证明该试验系统的可靠性。在同一条件下,五种受试物均可引起 V₇₉细胞 DNA 链断裂,且都呈现剂量反应关系。但其作用强弱相差甚大,与溶剂对照组相比,五种受试物引起 DNA 迁移有显著差异的最低浓度分别是:0.25mmol/L 四氯化碳,1.0mmol/L 三氯甲烷,5.0mmol/L 二氯甲烷,25mmol/L 一氯乙酸和 100mmol/L 三氯乙酸。三氯乙酸引起 V₇₉细胞的最大平均尾长为 30.2μm,其它四种受试物引起的最大平均尾长均大于 50μm。

表 2 五种氯化有机物的彗星实验结果

受试物	浓度 (mmol/L)	拖尾率 (%)	平均尾长 (μm, $\bar{x} \pm s$)
二氯甲烷	1.0	52 [*]	11.4 ± 5.0
	5.0	70 [*]	27.8 ± 5.6 [#]
	10.0	92 [*]	50.6 ± 7.2 [#]
三氯甲烷	1.0	72 [*]	23.6 ± 5.7 [#]
	5.0	88 [*]	52.7 ± 6.9 [#]
	10.0	99 [*]	78.6 ± 9.2 [#]
四氯化碳	0.25	80 [*]	38.6 ± 7.4 [#]
	0.5	100 [*]	78.3 ± 9.5 [#]
	1.0	100 [*]	94.5 ± 13.3 [#]
一氯乙酸	25.0	60 [*]	28.9 ± 4.9 [#]
	50.0	87 [*]	36.7 ± 5.1 [#]
	100.0	100 [*]	63.5 ± 8.0 [#]
三氯乙酸	50.0	7	9.8 ± 5.0
	70.0	11	12.8 ± 6.3
	100.0	30 [*]	30.2 ± 6.8 [#]
重铬酸钾	1.0	100 [*]	102.3 ± 13.9 [#]
DMSO	50μl	9	10.0 ± 4.8

* ² 检验与 DMSO 组比较, $P < 0.01$; # ^t 检验与 DMSO 组比较, $P < 0.01$

讨 论

有许多研究已经证实:常用的突变检测方法如 Ames 试验,微核试验等,对检测含氯化化合物的致突变性不敏感。Tafazoli 用彗星试验和微核试验研究了二氯乙烯,三氯乙烯,二氯丙烷,三氯丙烷和三氯乙烯的遗传毒性⁽⁶⁾,结论为:彗星试验比微核试验敏感,更适合于氯化有机物这类特殊物质的遗传毒性研究;

这些物质引起的 DNA 损伤与化合物所含氯的数目有关。本研究表明:五种氯化有机物在无明显细胞毒性的浓度下均可引起 V₇₉细胞不同程度的 DNA 损伤,进一步证明了单细胞凝胶电泳技术在检测含氯化化合物所致的 DNA 损伤是敏感可靠的。

从受试物浓度和所致的彗星细胞百分率及平均尾长可知:五种受试物引起的 DNA 损伤作用的大小顺序是:四氯化碳 > 三氯甲烷 > 二氯甲烷 > 一氯乙酸 > 三氯乙酸;这一顺序提示:第一,氯化烷基化合物引起的 DNA 损伤比氯乙酸类强。第二,在氯化烷基化合物中,随氯原子数目的增加其 DNA 损伤作用增强,这与 Tafazoli 结论相同⁽⁶⁾。

关于氯化有机物引起 DNA 链断裂的机制报道不多。Ashby⁽⁷⁾在研究化合物结构与致癌和致突变作用的关系时,将氯化烷基化合物归为无活性基团的化合物类,其结构中所含的氯原子是属于惰性卤(inert halogen),这类物质 50% 具有致癌性,而致突变性弱,其致癌机制可能与天然亲核性有关,使其易于扩散进入细胞核与 DNA 作用而致癌。此外,有人在研究四氯化碳肝毒作用机制时提出自由基学说,即四氯化碳在肝细胞内质网微粒体酶和细胞色素 P450 的催化下,引起脂质过氧化反应而形成自由基(CCL₃),该自由基可与核内 DNA 结合引起 DNA 损伤。那么,其它物质是否也具有同样的机制呢?有待进一步证实。一氯乙酸,二氯乙酸和三氯乙酸是主要的非挥发性氯化有机物,有研究表明,三氯乙酸具有致癌性,但似不具致突变性;也有人报道⁽⁸⁾三氯乙酸对大鼠肝脏不是启动剂,而是弱的肿瘤促进剂,因此认为三氯乙酸是一个弱的非基因性致癌物。本研究表明三氯乙酸对 V₇₉细胞的细胞毒性特小,在浓度高达 100mmol/L 染毒 3h,仅表现出较弱的细胞毒性,在此剂量下仅有 30% 的细胞出现 DNA 迁移,且迁移距离(30.2 ± 6.8μm)仅与 0.25mmol/L 的四氯化碳接近(38.6 ± 7.4μm),说明三氯乙酸仅有很弱的 DNA 损伤作用。当然美国国家毒理学计划,国际癌

差异显示法的建立及其在辐射致癌机理研究中的初步应用

杨梅英 叶常青 陈剑云 刘雷华 袁 雄

北京放射医学研究所 北京 100850

摘要 本研究目的建立差异显示技术,将其应用于辐诱发肺癌发生相关基因研究中。取 SHTF 细胞(SV40 永生化人胎气管成纤维细胞)和 SHTF 细胞(粒子照射后能在软琼脂上形成克隆的 SHTF 细胞)以及肺癌组织和同例正常肺组织为模板,将其 mRNA 进行 RTPCR 扩增,采用放射自显影法和硝酸银染色法显示扩增片段,并比较两者的显示效果。结果表明:在细胞和组织样品中均建立了差异显示法,但硝酸银染色的条带较放射自显影显示的清晰,再扩增后的显示率也较高,两者的复显率分别为 80%和 50%。结论:在细胞和组织样品中成功地建立了差异显示法,改进的条带显示法提高了复显率,为确定相关基因奠定了基础。

关键词 差异显示;放射自显影;硝酸银染色;辐射致癌

ESTABLISHMENT OF DIFFERENTIAL DISPLAY mRNA AND THE APPLICATION IN THE STUDY ON MECHANISM OF LUNG CANCER INDUCED BY IRRADIATION

Yang Meiyang, Ye Changqing, Liu Leihua

Institute of Radiation Medicine, Beijing 100850

症研究所等机构都指出:遗传毒与非遗传毒作用是不能截然分开的,许多非遗传毒致癌物同时也具有一定的遗传毒性,如酒精,石棉,三氯乙烯等是大家公认的非遗传毒物,事实上在某些条件下也可以引起活体人细胞的 SCE 和染色体断裂⁽⁹⁾,从这一观点出发,三氯乙酸在极高浓度下也可以直接与 DNA 作用,引起较弱的 DNA 损伤,具有一定的遗传毒性。

小结:

- 1 氯化烷基类化合物所引起的 V₇₉ 细胞 DNA 损伤作用强于氯乙酸类。
- 2 氯化烷基类所引起的 V₇₉ 细胞 DNA 链断裂随化合物中氯原子数目的增加而增强。
- 3 单细胞凝胶电泳技术用于检测氯化有机物所致的 DNA 损伤具有敏感,快速,简便等优点。

参考文献

1 Meier JR. Genotoxic activity of organic chemicals in drinking water. *Mutat Res*, 1989;196:211

- 2 胡长灯,詹卓玲,何尚浦. 三氯甲烷的致突性研究. 中国公共卫生学报,1991,10:39
- 3 唐萌,谈伟君,张文举,等. 用气态染毒法研究二氯甲烷的致突变性. 卫生毒理学杂志,1990;4:49
- 4 Fairbairn DW, Olive PL, O'Neill KL. The comet assay: A comprehensive review. *Mutat Res*, 1995;339:37
- 5 张遵真,衡正昌. 用单细胞凝胶电泳技术检测铬和砷化物的 DNA 损伤作用. 中国华预防医学杂志,1997;11:365
- 6 Tafazoli, Kirsch-Volders M. In vitro mutagenicity and genotoxicity study of 1,2-dichloroethylene, 1,1,2-trichloroethane, 1,3-dichloropropane, 1,2,3-trichloropropane and 1,1,3-trichloropropene, using the micronucleus test and the alkaline single cell gel electrophoresis technique in human lymphocytes. *Mutat Res*, 1996;371:185
- 7 Ashby J, Tennant RW. Definitive relationships among chemical structure: carcinogenicity and mutagenicity for 301 chemicals tested by U.S NTP. *Mutat Res*, 1991;257:229
- 8 Parnell MJ, Koller LD, Exon JA. Trichloroacetic acid effects on rat liver peroxisomes and enzyme-altered foci. *Environ Health Perspective*, 1986;69:73
- 9 Perera IP. Perspective on the risk assessment for nongenotoxic carcinogens and tumor promoters. *Environ Health perspective*, 1991; 94:231 (1998-06-08 收稿;1998-08-14 修回)

本课题为国家自然科学基金资助项目,资助号:39600043