

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0031 - 03

补充核酸内切酶 对 DNA 氧化损伤影响的研究

杜 卫²,刘四朝²,马爱国¹

(1. 青岛大学医学院医学营养学系,山东青岛 266021 2. 中国农业科学院研究生院,北京)

摘要:目的:核酸内切酶 在 DNA 损伤的切补修复体系中可能发挥着重要作用,是否有效地促进 DNA 损伤修复本文进行了探讨。方法:本研究采用“彗星”电泳技术分析 DNA 断裂损伤,利用人体淋巴细胞和 HeLa 细胞并用 100 μ molH₂O₂ 诱导 DNA 严重损伤,其损伤分别达到 198.5 和 320(专用单位, AU),然后再将两种细胞各分为两组;一组为对照组,另一组为实验组补充 25 μ l(1 μ g/ml)的核酸内切酶。在培养至 30min,60min,180min 和 240min 时观察 DNA 断裂损伤情况。结果:淋巴细胞 DNA 断裂损伤在对照组中经过 4h 培养后逐渐得到修复, DNA 损伤由初始时的 198.5 下降到 64.27(AU);补充核酸内切酶 的实验组尽管 DNA 断裂经过 4h 后也得到修复,但 DNA 断裂损伤率仍明显高于对照组(P 均 <0.05)。HeLa 细胞对 H₂O₂ 表现出较高的敏感性并有极强的自身修复能力,对照组 DNA 断裂损伤从初始时的 320 下降到 4h 后的 19(AU),自身修复率达到 94.1%,然而补充核酸内切酶 的 HeLa 细胞 DNA 断裂损伤率在 30min、60min、180min、240min 时均明显高于对照组($P < 0.05$)。结论:本结果提示核酸内切酶 在 DNA 损伤修复中增加了 DNA 的断裂损伤率。

关键词:核酸内切酶 ;彗星电泳;DNA 损伤;DNA 修复

中图分类号:Q523

文献标识码:A

THE EFFECT OF ENDONUCLEASE SUPPLEMENTATION ON THE DAMAGE OF DNA STRAND BREAKS

水质污染的指标。但多数鱼类的染色体形态小,数目多,给染色体畸变及 SCE 的分析造成困难。鱼类的外周血红细胞的核质比例较高,核质染色反差较大,易于对微核的观察¹,因此,有的学者认为鱼外周血红细胞实验可作为一个理想的检测手段²。然而,水中污染物诱发红细胞微核率的高低,一方面和染色体断裂剂或纺锤体毒剂的活性有关,另一方面还和细胞的分裂密切相关的^{5,6}。鱼类的外周血红细胞为终端分化细胞,已停止分裂或分裂指数很低必然会导致其灵敏度很差⁵。所以,利用鱼类外周血红细胞微核实验检测水质污染的可行性还有待于进一步研究。目前,有些学者倾向于用蝌蚪的红细胞微核实验作为一种检测指标,蝌蚪的细胞分裂较旺盛,对污染物较敏感,其红细胞微核实验灵敏度高于鱼类^{4,6}。

参考文献:

- 1 肖奇友,张尤恩,邱洪斌,等. 鱼外周血红细胞微核率与采血时间、染毒次数关系的实验研究 J. 癌变 畸变 突变,1992,4(1): 40 - 41.
- 2 楼允东,吴萍. 亚硝基胍对泥鳅红细胞微核及核异常的诱发 J. 中国环境科学,1996,16(4):275 - 278.
- 3 Hoofman RN and de Raat WK. Induction of nuclear anomalies(micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pinnata* by ethyl methanesulphonate J. *Mutat Res*, 1982,104:147 - 152.
- 4 贺维顺,王蕊芳. 污水和污水土地处理系统中各种水质对华西蟾蜍蝌蚪红细胞微核率的影响 J. 动物学研究,1992,13(3): 275 - 279.
- 5 陈军建,夏宜璋. 青蛙蝌蚪微核试验——一种水体诱变剂检测系统的建立 J. 水生生物学报,1993,17(4):298 - 308.
- 6 王蕊芳,贺维顺,吴世芳,等. 昆明水源水和自来水水质致突变性及化学背景值. 蝌蚪红细胞微核和 CHO 细胞染色体畸变及 SCE 试验 J. 动物学研究,1996,17(4):469 - 475.

收稿日期:1999 - 02 - 04;修订日期:1999 - 07 - 20

作者简介:杜卫,(1954 -)女,山东人,副教授,从事生物化学与分子生物学的教学与研究工作。

Abstract : Purpose and Methods : The aim of the study was observing the effect of endonuclease supplementation on the damage of DNA strand breaks, which were measured by comet assay (SCGE). **Results :** DNA strand break damage of lymphocytes and HeLa cells induced by $100\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ in controls reached 198.5 and 320 arbitrary units respectively. The rate of DNA strand breaks of lymphocytes was gradually decreased from the beginning to 4 hour culture in control group. At the end of 4 hour culture, there was a much lower rate of DNA repair in Endonuclease group with 33.4% than control group with 67.6% ($P < 0.05$). The same result was found in HeLa cells. The levels of DNA strand breaks was quickly decreased from 320 to 19 arbitrary units in control group within 4 hour culture, whereas the DNA strand breaks in supplementing group with Endonuclease was kept at a high level with 172.0 arbitrary units at 4 hour culture ($P < 0.05$). **Conclusion :** The study suggested that the supplementation of endonuclease could increase the levels of DNA strand breaks.

Key words : endonuclease ; SCGE; lymphocyte; DNA repair; DNA damage

放射诱导 DNA 损伤的氧自由基主要是羟自由基 $\cdot\text{OH}^1$ 所致。而 H_2O_2 造成的 DNA 损伤最终也是由 $\cdot\text{OH}$ 所致,然而这种损伤通常发生在 DNA 分子内部形成如 DNA 加合物、DNA 链断裂、碱基的交连等^{2,3}。采用彗星电泳技术只能检测到 DNA 的断裂损伤,而非断裂性损伤则不易观察到⁴。核酸内切酶 又称胸苷醇—DNA 糖苷酶 (thymineglycol - DNA glycosylase),它主要识别由环饱和、环裂解或环收缩引起的碱基残基的损伤,并水解其 N'-糖苷键。然而,核酸内切酶 是否能对已受损伤的 DNA 产生进一步影响本研究进行了探讨。

材料与方法

1 材料 细胞培养用的 RPMI-1640 试剂购自 Sigma 公司。小牛血清、胎牛血清和淋巴细胞分离液均由中国医学科学院血液学研究所提供,DAPI(4'-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride) 荧光剂购自 Boehringer Mannheim,核酸内切酶 购自 Sigma 公司。

2 细胞及培养 本实验选用 HeLa 细胞和新鲜采集的人外周血淋巴细胞。人体外周血淋巴细胞的收集是取指尖血 $30\mu\text{l}$ (约 1 滴) 与 1ml 含有 10% 小牛血清的 RPMI-1640 培养液混合,在冰上放置 30min 加入 $100\mu\text{l}$ 淋巴细胞分离液, 4°C 、 $200\times\text{g}$ 离心 3min,在培养液与分离液交界处吸取粉红色层液获取淋巴细胞。HeLa 细胞株单层培养在一次性 Nunc 培养皿上,在 RPMI-1640 培养液中加入 5% 的胎牛血清和 5% 的小牛血清, 37°C 、5% CO_2 培养箱内培养。

3 “彗星”电泳法 (SCGE) 是较敏感的 DNA 断裂损伤分析技术⁵。“彗星”图象分析是 SCGE 的重要步骤。用 DAPI 荧光染色的细胞核,在荧光显微镜下观察。一个典型“彗星”图像包括头部和尾部,根据可见荧光的尾部与其可见头部的大小、比率可将 DNA 损伤分为 0、1、2、3、4 逐级加重的 5 级。0 级无尾部,只是一个明亮的核形,表明无任何损伤;当 DNA 断裂损伤的程度由轻到重,则“彗星”尾部逐渐变长变大,头部逐渐变小且荧光强度逐渐变弱。实验分析时,每种处理至少观察 100 个细胞。用眼睛观察判断损伤分级需要通过计算机彗星图像分析加以确定⁶。本文中使用的专用单位 (Arbitrary units, AU) 是一种衡量 DNA 链断裂损伤程度的特有单位,是把不同分级加以换算得到 DNA 损伤的实际和总体水平。

4 DNA 损伤的处理 选择 H_2O_2 作为 DNA 的损伤剂。浓度为 2.0×10^5 的 HeLa 细胞隔夜培养,弃去培养液分别往培养皿内加入 $100\mu\text{mol}$ 、 $200\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 ,置冰上作用 5min 后弃去,用冷 PBS 液冲洗两次,用细胞刮子刮起贴壁的细胞,再加入 1ml PBS 液并充分吹打细胞团,然后离心, 4°C 、 $200\times\text{g}$ 、3min,弃上清后待制片。经分离获得的淋巴细胞悬液分别给予 $100\mu\text{mol}$ 、 $200\mu\text{mol}$ 的 H_2O_2 ,作用 5min 后离心,弃上清液后待制片。

5 核酸内切酶 的补充 用内切酶缓冲液 (40mmol HEPES - KOH, 0.1mol KCl, 0.5mmol EDTA, 0.2mg/ml 小牛血清蛋白 V, $\text{pH}8.0$ 配制核酸内切酶 (endonuclease) 其浓度为 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 。受损伤淋巴细胞和 HeLa 细胞的实验组各加入 $25\mu\text{l}$ ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 核酸内

切酶 溶液,对照组添加 25 μ l 内切酶缓冲液(不含核酸内切酶),同时放入 37 $^{\circ}$ C,5% CO $_2$ 培养箱内培养,并在 30min、60min、180min、240min 取出观察 DNA 断裂损伤。

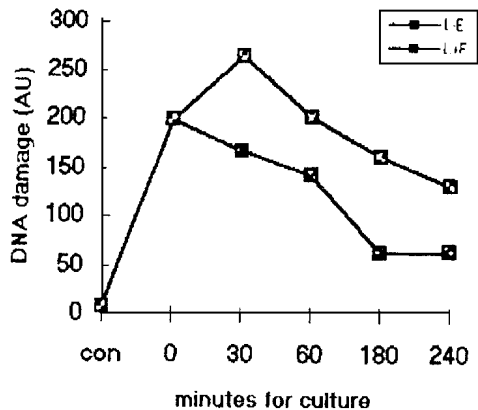


Figure 1 comparison of DNA repair between control and endonuclease supplementation group in lymphocytes

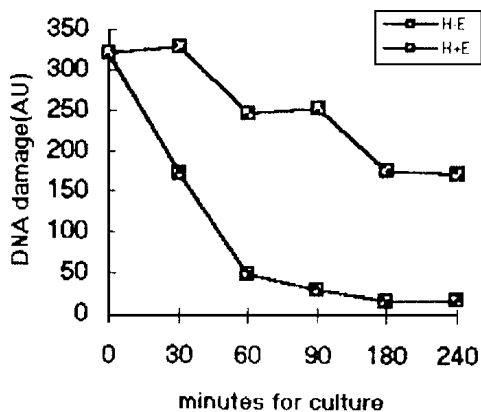


Figure 2 comparison of DNA repair between control and endonuclease supplementation group in HeLa cells

结果

1 核酸内切酶 补充对淋巴细胞 DNA 断裂损伤的影响

图 1 中显示的是核酸内切酶 对淋巴细胞 DNA 断裂损伤率的影响,两条曲线分别表示对照组(下部曲线)和添加核酸内切酶 的实验组(上部曲线)。在经过 240min 的培养后,对照组 DNA 的断裂损伤已从初始时的 198.5 (AU)⁷ 下降到 240 分钟时的 64.27;而实验组在加入 25 μ l (1 μ g/ml) 核酸内切酶 后,DNA 断裂损伤程度在开始时不但没有减轻反而加重,起初为 198.5(AU),而培养到 30min 却增加到 264,尽管在以后的 3 - 4h 的培养过程中 DNA 断裂损伤也逐渐下降,但仍明显高于对照组 (P 值均 < 0.05),到第 240min 时 DNA 断裂损伤仍为 132.12 (专

用单位)。

2 HeLa 细胞与淋巴细胞相比对 H $_2$ O $_2$ 损伤较为敏感,100 μ mol H $_2$ O $_2$ 可使 HeLa 细胞 DNA 损伤达到 320 专用单位(400 为全部损伤)。从图 2 可以看到,HeLa 细胞 DNA 断裂损伤的修复能力很强。在经过 240 分钟的培养后,其 DNA 断裂损伤已从初始时的 320 下降到 240min 的 19,修复率达到 94.1%,而实验组在加入 25 μ l (1 μ g/ml) 核酸内切酶 后,DNA 断裂损伤在培养到 30min 却增加到 328,尽管在第 60min、90min、120min、240min 的 4 个时段的 DNA 损伤也逐渐下降,但均明显高于对照组 ($P < 0.05$),到第 240min 时 DNA 断裂损伤仍为 172.0(专用单位)。

讨论

本文 H $_2$ O $_2$ 剂量的选择是在能使淋巴细胞的 DNA 损伤几乎达到最严重的程度,接近 50% 的细胞 DNA 损伤率,即使 H $_2$ O $_2$ 增大到 1000 μ mol 时,为前者的 10 倍,其 DNA 细胞损伤率也未达到 80%,而 H $_2$ O $_2$ 在 100 μ mol 剂量下 HeLa 细胞的 DNA 损伤率已接近 98%⁸。一些研究结果认为,具有活性增生的细胞每单位时间内的变异率比间期(G $_0$)细胞要高得多⁹。本研究中的 HeLa 细胞为传代培养过程中繁殖性很活跃的细胞,因此在同等剂量下和相同时间内观察 DNA 断裂损伤率 HeLa 细胞就比正常淋巴细胞 DNA 断裂损伤率要高得多。

氧自由基(ROS)可产生 30 多种不同的碱基加合物、氧化产物如胸苷醇和胞苷醇、DNA 链断裂、交连产物以及各种氨基酸、蛋白质、脂质修饰(氧化)产物的形成¹⁰。大多数 DNA 损伤的修复是通过碱基切除修复和核苷酸切除修复完成的¹¹。核酸内切酶 是已知的与 DNA 修复有关的数种糖苷酶中的一种,它可能参与了被氧化或损伤碱基及核苷酸的切除过程,从而使 DNA 链形成修复性断裂。所以,采用“彗星”电泳技术分析所看到的 DNA 的断裂损伤比初始时要高的原因和添加核酸内切酶 并经过数小时培养后 DNA 的断裂损伤率比空白对照组明显增加的原因可能就在于此。这提示 H $_2$ O $_2$ 所致的 DNA 损伤有相当数量可能为非直接断裂性损伤,核酸内切酶 增加了 DNA 的断裂损伤率。至于核酸内切酶 为什么没有通过加速切除而发挥促进 DNA 修复的作用及其机制有待于深入研究。

文章编号:1004 - 616X(2000)01 - 0034 - 03

叔丁基 - 4 羟基茴香醚致突变性研究

李毅民,胡燕平,李彦红

(中国药品生物制品检定所毒理室,北京 100050)

摘要:目的与方法:用 Ames 试验、CHL 细胞染色体畸变试验及微核试验对叔丁基 - 4 羟基茴香醚(BHA)进行了致突变性研究。结果:Ames 试验结果在 25 - 300 $\mu\text{g}/\text{皿}$ 剂量范围内加与不加 S9 mix 条件下,4 个菌株的回变菌落数均未有 2 倍以上的增加;微核试验显示在 171 - 683 $\text{mg}/\text{kg. bw}$ 剂量,小鼠骨髓嗜多染红细胞微核率与对照组比较无显著性差异;CHL 细胞染色体畸变试验结果显示在不加 S9 mix 条件下 10 - 60 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量范围内染色体畸变率 $< 5\%$,在加 S9 mix 条件下 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 剂量组畸变率为 7.5%,属可疑阳性,推测叔丁基 - 4 羟基茴香醚可能具有致突变性。结论:应对 BHA 在食品及食品油中应用的安全性给予重视。

关键词:叔丁基 - 4 羟基茴香醚;致突变性

中图分类号:Q319.31

文献标识码:A

MUTAGENICITY RESEARCH OF 3 - TERT - BUTYL - 4 - HYDROXYANISOLE

LI Yi - min, HU Yang - ping, LI Yan - hong

(Department of Toxicology, National Institute for the Control of Pharmaceutical and Biological Products, Beijing 100050, China)

Abstract: **Purpose and methods:** The mutagenicity of 3 - tert - butyl - 4 - hydroxyanisole (BHA) was examined by Ames test, CHL cell chromosome aberration test in vitro and micronucleus test. **Results:** The results

参考文献:

- Hutchinson F. Chemical changes induced in DNA by ionizing radiation J. *Prog Nucl Acid Res*, 1985, 32:115 - 154.
- Schraufstatter I, Hyslop PA, Jackson JH, et al. Oxidant-induced DNA damage of target cells J. *J Clin Invest*, 1988, 82:1040 - 1050.
- Marnett LA and Burcham PC. Endogenous DNA adducts: potential and paradox J. *Chem Res Toxicol*. 1993, 6: 6771 - 6785.
- Gedik CM, Ewen SWB and Collins AR. Single-cell gel electrophoresis applied to the analysis of UV - C damage and its repair in human cells J. *J Radiat Biol*, 1992, 63(3):313 - 320.
- 马爱国,韩秀霞,刘四朝,等. 两种 DNA 断裂损伤检测方法敏感性比较 J. *遗传*, 1997, 19(1):32 - 43.
- Collins AR, Dusinska M, Franklin M, et al. Comet assay in human biomonitoring studies: reliability, validation, and applications J. *Environ Mol Mutag*, 1997, 30: 139 - 146.
- 马爱国, Collins AR, Susan JD, et al. 抗氧化营养素对 DNA 损伤的保护作用 J. *青岛医学院学报*, 1996, 32(2):95 - 97.
- 马爱国, Collins AR, Susan JD, et al. 不同细胞 DNA 氧化损伤及自身修复能力的分析 J. *癌变·畸变·突变*, 1997, 9(3):138 - 142.
- Bridge BA. The role of DNA damage in stationary phase ('adaptive') mutation J. *Mutat Res*, 1998, 408:1 - 9.
- Peter M and Hakan W. Adduct formation, mutagenesis and nucleotide excision repair of DNA damage produced by reactive oxygen species and lipid peroxidation product J. *Mutat Res*, 1998, 410:271 - 290.
- Mitchelmore CL and Chipman J K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of the comet assay in environmental monitoring J. *Mutat Res*, 1998, 399: 135 - 147.

收稿日期:1999 - 08 - 03;修订日期:1999 - 11 - 23

作者简介:李毅民(1964 -),男,山东人,助理研究员,硕士,主要从事药品的致突变性研究。