

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0076 - 03

燃煤砷污染对人体血细胞 DNA 合成、DNA 损伤及修复的影响

张爱华,杨光红,李 健,王 荣

(贵阳医学院卫生毒理教研室,贵州 贵阳 550004)

摘要:目的与方法:采用液体闪烁计数法及¹²⁵I后标记法检测燃煤型砷中毒人群血细胞 DNA 自发合成、DNA-蛋白质交联物(DPC)水平及非程序外 DNA 合成(UDS)反应,以探讨燃煤砷污染对人体 DNA 合成、DNA 损伤及修复的影响。结果:病区非病人及中毒病人的 DNA 合成明显降低,DPC 水平随病情加重而升高;而 UDS 反应则只在中毒病人体内增强,差异均有显著性。结论:燃煤砷可在早期致人体内 DPC 形成,引起严重的 DNA 损伤;亦能诱导中毒人群 UDS 反应增强,明显抑制 DNA 合成和修复,此可能为砷致皮肤癌敏感性增加的原因之一。

关键词:燃煤砷污染;DNA 合成;DNA 损伤及修复;液体闪烁计数法;¹²⁵I后标记法

中图分类号:X503.1 文献标识码:A

THE SITUATION OF DNA SYNTHESIS, DNA DAMAGE AND DNA REPAIR IN ARSENISM PATIENTS BLOOD CELLS CAUSED BY COAL - BURNING

ZHANG Ai - hua , YANG Guang - hong , LI Jian , WANG Rong

Department of Prevetive Medicine, Guiyang Medical College, Guiyang 550004, China

Abstract : Purpose and Methods : Using liquid scintillation count assay and ¹²⁵I postlabeling assay , DNA spontaneous synthesis、DNA-protein crosslinks (DPC) and unscheduled DNA synthesis(UDS) were detected to study DNA synthesis、repair function and DNA damage condition in human peripheral blood cells of arsenism caused by burning coal. **Results :** The DNA synthesis of non-patients and patients in local area obvious decreased , while DPC level increased with the development of poisoning , and UDS increased only in the patients , the difference were all significant. **Conclusion :** It suggested that arsenic containing in coal might induce DPC in early stage and severely hurt DNA ; and it might induce UDS , the DNA synthesis and repair ability were seriously restrained. It might be one of the reasons causing dermal cancer.

Key words : arsenic pollution ; DNA synthesis ; DNA damage and repair ; Liquid scintillation count assay ; ¹²⁵I postlabeling assay

砷可引起人体严重的遗传学损害¹。流行病学研究表明砷可致人类皮肤癌和肺癌,亦是其他内部器官癌的重要危险因素²。燃煤型砷中毒为一种严重危害人体健康的地方病,为居民开采和燃用含砷量高的煤以造成食物、室内空气污染所致,在我省造成严重危害和潜在威胁。病人表现为以皮肤损害为主并

累及多系统多脏器损害,肝硬化腹水及皮肤癌为其主要死因。本研究采用液体闪烁计数法及¹²⁵I后标记法检测燃煤型砷中毒人群血细胞 DNA 自发合成、DNA-蛋白质交联物(DPC)水平及非程序外 DNA 合成(UDS)反应,以探讨燃煤砷污染对人体 DNA 合成、DNA 损伤及修复的影响,同时筛选慢性砷中毒的

收稿日期:1999 - 08 - 03; 修订日期:1999 - 11 - 27

基金项目:国家自然科学基金(39660070)和省科委自然科学基金资助(D97 - 3)

作者简介:张爱华(1955 -),女(汉),安徽人,教授,硕士,研究方向遗传毒理。

早期、敏感、特异的遗传损伤标志物,并为探索砷致癌机理和保护砷致癌易感人群,以及发现不同类型、不同修复缺陷的个体或群体提供科学依据。

对象与方法

1 对象及材料

1.1 调查点:贵州省燃煤型砷中毒高发区—兴仁县交乐病区

1.2 研究对象:参考省地病办诊断并经临床复查确诊之患者,根据地方性砷中毒皮肤病诊断标准³分为轻、中、重度中毒三组。病区内经临床检查无明显异常者为病区非病人。选择距病区12km外无砷接触史、家族遗传史、吸烟史,半年内无射线接触史的村民为对照。

2 方法

2.1 DNA-蛋白质交联(DPC):¹²⁵I后标记法⁴。3-5ml抗凝静脉血常规WBC分离SDS-蛋白酶K消化、饱和酚-氯仿-异戊醇抽提DNA¹²⁵I标记(氯胺T氧化法)γ-计数(CPM)和DNA浓度测定(紫外分光光度法测定DNA浓度(μg/ml)=(A₂₆₀-A₃₃₀)×50×稀释倍数)DPC的检测(cpm/

μgDNA)。

2.2 DNA自发合成:根据孟紫强等方法⁵并改进。淋巴细胞分离RPMI1640培养液37℃1h,加入5μCi³H-TDR,37℃下30min终止培养后转移细胞至湿润的49型玻璃纤维滤纸上,真空抽吸下,50ml蒸馏水、10ml5%三氯乙酸、10ml95%乙醇洗涤液闪烁计数CPM(每分钟衰变数)。

2.3 非程序外DNA合成(UDS)实验⁶:采用法抗凝外周全血0.25ml加入等量RPMI1640培养液(内含³H-TDR10μCi/ml、HU10mmol/L)混匀置37℃水浴箱培养4h,其间多次摇荡终止培养余下操作步骤同DNA合成。

2.4 统计方法:PEMS统计软件包对DPC进行方差分析、q-检验、t-检验;对DNA合成及UDS进行t、t-检验。

结果

1 燃煤砷污染对接触人群血细胞DNA自发合成、DNA蛋白质交联及非程序DNA合成的影响(见表1)

表1 燃煤砷接触人群血细胞DNA自发合成、DPC水平和UDS反应

组别	DNA合成(cpm)		DPC(cpm/μgDNA)		UDS(cpm)	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
正常对照组	39	1152.56 ±709.76	40	942.8 ±181.3	33	514.76 ±159.70
病区非病人	12	253.58 ±112.58 **	11	1229.5 ±336.3 **	12	611.42 ±361.78
轻度中毒组	19	315.16 ±197.12 **	21	1610.8 ±476.5 **	21	686.76 ±386.70 *
中度中毒组	31	299.16 ±255.16 **	25	2130.2 ±775.6 ** ▼	29	744.03 ±507.54 *
重度中毒组	39	212.90 ±132.54 **	40	2736.9 ±1017.2 ** ▼▼	38	782.34 ±439.69 *

注:与对照组比较 * P<0.05, ** P<0.01;与病区非病人比较 P<0.01;

中、重度组与轻度组比较 ▼ P<0.05, ▼▼ P<0.01;中、重度组比较: P<0.05;

DNA合成与UDS的相关系数 R = -0.8101

2 吸烟对燃煤砷接触人群DNA合成、DNA损伤及修复的影响(见表2)

表2 吸烟对燃煤砷接触人群DNA自发合成、DPC水平及UDS反应的影响

组别	DNA合成(cpm)		DPC(cpm/μgDNA)		UDS(cpm)	
	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$	n	$\bar{x} \pm s$
吸烟组	25	266.84 ±259.04	34	2449.3 ±1018.9 *	26	627.58 ±483.53
非吸烟组	52	314.96 ±312.35	52	1836.3 ±799.2	52	694.58 ±400.68

注:两组比较 * P<0.05

讨论

DNA是细胞遗传物质的基础,也是遗传毒物作

用的靶分子。当遗传毒物损伤DNA,破坏其精确合成和高保真的修复能力时,细胞异常分化,机体处于

癌的易感状态。越来越多的事实说明癌产生与不同个体遗传背景有关,而遗传易感又与 DNA 的合成修复功能相关。本研究根据这一理论,采用 DNA 自发合成、DNA - 蛋白质交联(DPC)和 UDS 三指标,从 DNA 合成、损伤、修复三方面来评估燃煤型砷中毒患者的 DNA 功能状况。

DPC 是 DNA 与蛋白质形成的稳定共价化合物,一旦形成,难于修复,是一种严重的分子遗传损害⁽⁷⁾。它可引起严重的 DNA 损伤,交联后的 DNA 单链较难修复或易发生易错修复。经细胞分裂后, DNA 的损伤表达,可引起基因和染色体结构异常,甚至由于 DPC 的修复困难,在 DNA 复制过程中,可造成某些重要的基因丢失,如抑癌基因的丢失等而高度致突变,在致癌过程的启动和促进阶段均起重要作用。DPC 与其它的 DNA 损伤相比,在细胞内持续时间长,易于检测,因此可作为细胞 DNA 损伤的动态分子生物标记。本研究发现病区非病人及砷中毒患者 DPC 水平显著高于对照组;各中毒组 DPC 水平与病情呈正相关,差异均具显著性。结果提示:燃煤砷可在早期致人体内 DPC 形成,引起严重的遗传学损害;DPC 是其遗传损害的早期敏感指标,可反映 DNA 损伤程度。DPC 形成可能是燃煤型砷中毒人群遗传损害致突变 癌变的重要机理之一。¹²⁵I 后标记法是一种检测 DPC 的新方法,敏感、快速、简便⁸;白细胞是有核细胞、对毒物敏感且易获得,可较好反映体内 DNA 损伤情况,¹²⁵I 后标记法测定白细胞 DPC 可望作为燃煤型砷中毒人群遗传学损害的敏感动态监测指标。

业已证实,许多致癌物和致突变物可损害 DNA,抑制 DNA 合成, DNA 损伤后的修复能力在一定程度上反映对肿瘤的易感性。UDS 试验反映 DNA 损伤修复已作为遗传毒效应的监测指标被广泛应用,它是判别损害预后及损害作用敏感性程度的重要依据。根据 DNA 合成受损程度 非 S 期修复合成水平 DNA 合成量 ³H-TDR 掺入量来判断 DNA 修复能力。而细胞 DNA 的正常合成及损伤 DNA 的修复合成是维持遗传物质功能稳定性的基础,对于遗传信息的正确表达有着重要意义。目前研究认为:砷化合物对淋巴细胞 DNA 合成具有双相性,在极低浓度下明显刺激细胞 DNA 合成,在高浓度下显著抑制细胞 DNA 合成,均有明确的剂量效应关系,砷化合物对 DNA 合成刺激效应的机制尚不清楚,对 DNA 合成的抑制可能是由于砷与 DNA 聚合酶的巯基结合,抑制

了该酶合成 DNA 的活性;多数研究者认为砷对细胞 DNA 的损伤修复功能有抑制作用,砷化合物,尤其是三价砷化合物,能与有关 DNA 修复酶的巯基结合,使该酶活性降低,导致 DNA 修复作用的抑制⁵。我们的研究发现:中毒病人 UDS 反应增强,病区非病人及中毒病人的 DNA 合成则明显降低,两者呈负相关 $R = -0.8101$,差异均有显著性。提示燃煤砷污染可诱导中毒人群 UDS,抑制 DNA 合成和修复。

按照 WHO (1984) 关于吸烟调查方法标准化建议,每天吸烟 1 支以上,时间大于 1 年者为吸烟的分组原则⁹ 探讨吸烟对 DNA 合成、损伤和修复的影响。发现吸烟者 DPC 水平显著高于不吸烟者。现场调查该病区的烟的含砷量不高,且由于经济条件所限,病区村民吸烟人数少,吸烟量不多,提示吸烟可加重砷致 DNA 损伤;研究中还发现男性 DPC 水平显著高于女性,分别为 2474.6 ± 1036.6 和 1741.9 ± 679.2 cpm/ μ gDNA,分析其原因可能与男性吸烟者远远多于女性和男性多从事砷煤接触工作(如采煤、烧石灰等)有关,而不同性别在体内代谢、敏感性差异等方面原因有待进一步研究;从年龄分层发现:随着年龄增大,DPC 水平升高,表明燃煤砷接触年限越长, DNA 损伤越严重。吸烟、性别与年龄因素均未发现对 DNA 自发合成和 UDS 产生有意义的影响。

综上,燃煤砷污染可在早期严重损伤人体血细胞 DNA 及明显抑制 DNA 合成和修复,此可能为砷致皮肤癌敏感性增加的原因之一。重视砷中毒人群的遗传学检测,对高危人群进行动态观察,定能及时发现不少癌前病变,及时处理,能在一定程度上阻止和降低砷致皮肤癌或其他器官癌的发生率。

参考文献:

- 1 张波,孟紫强. 砷的致癌、致畸、致突变作用研究进展 J. 癌变·畸变·突变,1997,9(2):封二—封三.
- 2 Carlson - Lynch H, Beak BD and Boardman PD. Arsenic risk assessment J. *Environ Health Perspect*, 1994, 102(4): 354 - 356.
- 3 王连方. 地方性砷中毒工作标准探讨 J. 地方病通报,1994,9(1):46 - 49.
- 4 Zhi - xiong Zhuang and Maxcosta. Development of an ¹²⁵I - post-labeling assay as a simple, rapid and sensitive index of DNA - protein crosslinks J. *Environ Health Respectives*, 1994, 102(3): 301 - 304.
- 5 孟紫强,孟华千. 砷对人血淋巴细胞转化及 DNA 合成的效应 J. 中国环境科学,1994,14(2):134 - 137.
- 6 曾晓非,毛德寿,顾祖维,等. 非程序 DNA 合成试验检测某些金

文章编号:1004 - 616X(2000)02 - 0079 - 03

维生素 E 琥珀酸酯抑制人胃癌细胞生长作用的研究

刘柏合, 吴 坤

(哈尔滨医科大学公共卫生学院, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的与方法:本实验采用体外细胞培养的方法,研究了维生素 E 琥珀酸酯(VES)对人胃癌 SGC-7901 细胞生长和 DNA 合成的影响,并进行了细胞凋亡形态学观察。**结果:**VES(5 μ g/ml、10 μ g/ml 和 20 μ g/ml)对 SGC-7901 细胞生长和 DNA 合成有明显抑制作用,并呈现剂量-效应关系。同时,VES 也诱导 SGC-7901 细胞凋亡。**结论:**上述结果提示在离体条件下,VES 通过抑制细胞 DNA 合成及诱导细胞凋亡抑制 SGC-7901 细胞生长。

关键词:维生素 E 琥珀酸酯;人胃癌 SGC-7901 细胞; 3 H-TdR 掺入;细胞凋亡

中图分类号:R735.2 文献标识码:A

STUDY ON THE GROWTH INHIBITION OF VITAMIN E SUCCINATE IN HUMAN GASTRIC CANCER CELL

LIU Bai-he, WU Kun

(Public Health College of Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: Purpose and Methods: This paper observed the effects of Vitamin E Succinate (VES) on cell growth, DNA synthesis and the appearance of apoptotic morphological change in human gastric cancer SGC-7901 cell line in vitro. **Results:** The results showed that VES (5 μ g/ml, 10 μ g/ml and 20 μ g/ml) could obviously inhibit SGC-7901 cell growth and DNA synthesis in a dose-dependent manner, and induce apoptosis of SGC-7901 cell. **Conclusion:** These results indicate that the inhibition of VES on SGC-7901 cell growth was by the way of inhibiting cellular DNA synthesis and inducing apoptosis.

Key words: Vitamin E Succinate; human gastric cancer SGC-7901 cell; tritium thymidine incorporation; apoptosis

维生素 E 琥珀酸酯(Vitamin E Succinate, VES)是天然的维生素 E 衍生物,现已证明 VES 对乳腺癌、前列腺癌等多种肿瘤细胞的生长有抑制作用¹,尤其对上皮组织癌细胞作用显著²,并且对正常组织细胞生长无毒性及抑制作用³⁻⁵。同时研究也指出 VES 无维生素 E 所具有的抗氧化作用¹,并且是通过完整的结构来发挥抗肿瘤作用³。这些研究表明 VES 可作为一种有潜力的肿瘤化学预防和治疗剂,

- 属诱变性的研究 J. 工业卫生与职业病, 1990, 16(1): 27 - 30.
- 7 雷毅雄. 外来化学物与 DNA - 蛋白质交联关系的研究进展 J. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(3): 149 - 152.
- 8 Cota M. Preliminary report on a simple new assay of DNA - protein

- crosslinks as a biomotor of exposure by welders J. *J Toxicol Environ Health*, 1993, 40: 217 - 222.
- 9 郭志荣, 彭盛梅. 肺癌的遗传流行病学研究 J. 中华预防医学杂志, 1996, 30(3): 154 - 156.

收稿日期: 1999 - 04 - 29; 修订日期: 1999 - 10 - 03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870662)

作者简介: 刘柏合(1970 -), 男, 黑龙江省佳木斯市人, 在读博士, 从事食物中抗癌成分分子毒理学研究。