· 综述 ·

甲醛所致DNA 断裂和DNA 交联的作用

彭光银　刘英帅　段丽菊　杨旭

【中图分类号】Q 7　【文献标识码】A　【文章编号】1006-2483(2005)02-0035-03

甲醛是一种具有遗传毒性和致突变性的物质, 可以导致DNA 链的断裂(DNA strand breakage, DSB)、DNA-DNA 的交联(DNA-DNA crosslink, DDC)以及DNA-蛋白质的交联(DNA-protein crosslink, DPC), 其中DPC 在致癌性和致突变性中具有至关重要的地位。就甲醛所致DNA 断裂、DNA-DNA 交联和DNA-蛋白质交联这三种效应的检测方法、量效关系、形成机理、修复机制予以介绍。

1　甲醛导致DNA 断裂作用

1.1　DNA 断裂的检测方法

DNA 断裂常用的检测方法有: 碱解旋法, 碱洗提法和单细胞凝胶电泳技术。(1) 碱解旋法: 碱解旋技术是依据在一定温度和PH 值下, DNA 双链的解旋发生在DNA 分子内单链断裂的部位这一性质而建立的, 经过一段时间的碱解旋后, 溶液中双链DNA 分子的量与反应前DNA 分子中单链断裂的数目成反比[1]; (2) 碱洗提法: 碱洗提技术是 Kohn 于 1976 年首先提出, 可用于检测DNA 分子单链或双链断裂。碱洗提法是把待测细胞放在滤膜上, 先用弱碱进行裂解, 通过滤膜除去大部分蛋白质和RNA, 而DNA 则原封不动的保存在膜上, 然后加入高PH 值的碱洗提液, DNA 完全裂解, DNA 单链随碱洗提液流过滤膜时DNA 膜上保存率(滤膜浸出液DNA 的含量/DNA 总量)与其长度存在依赖关系。此方法相对于碱解旋法来说使用更广泛, 但也有些不足之处, 如操作需特别细心且耗时较长[2]; (3) 单细胞凝胶电泳技术, 也称彗星试验, 即将细胞包埋在琼脂糖中, 铺于磨毛的载玻片上, 凝固后浸入冷溶解液中使细胞裂解, 在电泳液中解链后进行水平电泳, 洗涤后用DNA 结合荧光染料染色, 在荧光显微镜下观察玻片上细胞的荧光图象, 评价DNA 的损伤程度。本方法优点是: 简便, 快速, 灵敏度高, 所需细胞少; 本方法的缺点主要是不能直接区分DNA 断裂、DNA-DNA 交联和DNA-蛋白质交联这三种损伤效应[3]。

1.2　甲醛导致DNA 断裂

甲醛能否导致DNA 分子断裂, 学界一直没能达成共识。Oliver Merk 等对甲醛的遗传毒性作了多次研究, 但却没能发现甲醛具有断裂作用[4], 国内学者对此也进行过多项研究, 多数研究者也认为甲醛没有断裂作用; 但是唐国慧利用HL 60 人白血病细胞和杨丹凤利用大白鼠肝细胞分别进行研究, 却发现甲醛在 5 μmol/L 和 10 μmol/L 时都能引起DNA 链的断裂; 袭著革等利用甲醛对健康雌性昆明小鼠脾淋巴细胞进行染毒, 也发现低浓度的甲醛能够引起DNA 断裂; 本实验室经长期研究, 也发现分别经 5 μmol/L, 7.5 μmol/L 和 10 μmol/L 甲醛染毒, 人体口腔颊黏膜细胞DNA 也有断裂作用发生, 且甲醛导致DNA 断裂的峰值浓度位于 7.5 μmol/L 左右。

1.3　甲醛导致DNA 断裂可能机理

应用单细胞凝胶电泳技术对DNA 断裂进行研究, 发现加入自由基清除剂可以显著地抑制甲醛所致的DNA 断裂, 提示甲醛主要是通过活性氧自由基, 特别是羟自由基来介导DNA 断裂。甲醛可以通过以下三种途径产生活性氧自由基, 引起氧化压力的增加: (1) 甲醛可以损害生物或细胞内的抗氧化系统, 如引起超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶等抗氧化酶活性的降低, 以及抗氧化物质如还原型GSH 的耗竭等[5,6]; (2) 甲醛作为一种亲电子剂, 作为一种自由基及弱氧化剂, 进入机体或细胞后可发生类似 Fenton 反应的化学过程, 作用类似于过氧化氢, 产生羟自由基等强氧化剂, 进而导致氧化应激对生物大分子造成损伤[7]; (3) 甲醛进入细胞后可以打开线粒体上的线粒体渗透性转运通道, 降低线粒体膜电位, 抑制线粒体的呼吸作用, 产生更多的活性氧自由基(ROS), 使得细胞或机体内的氧化压力增加[6]。即甲醛可以通过多种途径破坏机体的氧化平衡状态, 使得机体内的ROS 水平增加, 进而对核苷酸进行攻击产生DNA 断裂[8]。

1.4　DNA 断裂的修复

DNA 断裂如果不能及时修复, 就会导致突变, 更关键的是, 它还会阻碍细胞分裂所必需的DNA 复制过程, 从而导致细胞死亡。在生物体长期进化过程中, 正常细胞形成了一套十分有效的DNA 修复系统, 从而可使受损伤的DNA 分子迅速恢复正常, 使细胞的遗传稳定性和正常功能得以保持而不致发生恶变。

1.4.1　DNA 分子单链断裂(SSBs)的修复较为容易和迅速, 一般采取切除修复。切除修复即将DNA 分子中受损伤部分切除掉, 并以完整的那一条为模板, 合成切除的部分, 然后使DNA 恢复正常结构。

1.4.2　DNA 双链断裂(DSBs)的修复主要通过重组修复进行。该修复主要依靠一种DNA 依赖的蛋白激酶(DNA-PK), DNA-PK 主要由两个蛋白质组成: 含有催化亚基的 P_{350}和与双链DNA 作用的Ku 自身抗原, 后者是一个分子量为 70/80

基金项目: 国家"十五"科技攻关课题(2001BA 704B 01)

作者单位: 430079　武汉, 华中师范大学生命科学学院环境科学实验室

第一作者简介: 彭光银(1975-), 男, 硕士研究生。研究方向: 分子生物学

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Ku(KD)的二聚体。具体修复机制是: 70/80 Ku 二聚体结合 DSBs 的断端, 然后由催化亚单位 P_{350} 作用, 使必需蛋白质磷酸化, 将断端重新接起来[6]。

2 甲醛导致DNA-DNA交联

从代谢生理的角度上看, DNA-DNA 的交联是甲醛正常代谢的一种方式, 因此, 正常的细胞中存在着微量的DNA-DNA 交联产物。当有外来物理, 化学因素如射线、烷化剂、甲醛以及一些金属化合物如镍等直接或间接的作用时, 则可诱导出过量的DNA-DNA 交联。这些DNA-DNA 交联必将对DNA 的构象和功能(复制与转录)产生严重的影响, 并在其复制过程中造成某些重要基因(如抑癌基因)的丢失, 从而对生物体造成严重的危害。由于DNA-DNA 交联对生物体的危害较大, 所以也引起了不少学者的重视。

2.1 DNA-DNA 交联的检测方法

DNA-DNA 交联常用的检测方法有: 碱洗提法, 单细胞凝胶电泳技术。

2.2 甲醛导致DNA-DNA 交联

许多研究都发现一定浓度的甲醛可以诱导DNA-DNA 的交联。Oliver Merk[10]和C. Clifford Conaway[11]等在不同的实验中都发现一定浓度的甲醛都可以导致DNA-DNA 交联; 袭著革等在使用不同浓度甲醛对人外周血淋巴细胞作用时, 也发现当甲醛浓度达到 0.3584 mmol/L 时可以引起DNA-DNA 的交联; 本实验室研究也发现甲醛在较低浓度(< 10 μmol/L)时可以导致人体口腔颊黏膜细胞DNA 链断裂, 但在较高浓度(> 15 μmol/L)时可以导致DNA-DNA 交联[3]。

2.3 甲醛导致DNA-DNA 交联的机理

国内外学者虽然针对甲醛导致DNA-DNA 交联进行了很多研究, 但确切机理还不是很清楚。甲醛所致的DNA-DNA 交联, 分为链内交联和链间交联, 主要发生在A、G、C 碱基自身或三者之间, 但不形成C-C 交联。其大致机理可能是: (1)甲醛主要通过活性氧自由基, 特别是羟自由基来介导DNA-DNA 的交联[12]。(2)甲醛是一种简单的小分子, 其毒性效应的一个重要方面是源于它的羰基亲电性和较小的空间位阻, 使其易于与核酸发生交联。在体内或体外甲醛先与核酸上的自由的氨基反应生成不稳定的羟甲基加合物, 然后再进一步与其他核酸反应形成稳定的交联物, 其主要形式是: DNA-NH-CH_2-NH-DNA[11]。

2.4 甲醛导致DNA-DNA 交联的修复

DNA-DNA 交联的修复可能是由几种修复系统共同完成, 主要的修复系统是切除修复和重组修复。重组修复的主要机制是: (1)受损伤的DNA 链复制时, 产生的子代DNA 在损伤的对应部位出现缺口。(2)另一条母链DNA 与有缺口的子链DNA 进行重组交换, 将母链DNA 上相应的片段填补子链缺口处, 而母链DNA 出现缺口。(3)以另一条子链DNA 为模板, 经DNA 聚合酶催化合成一新DNA 片段填补母链DNA 的缺口, 最后由DNA 连接酶连接, 完成修补[13]。

3 甲醛导致DNA-蛋白质交联

在正常细胞中存在着一定量的DNA-蛋白质交联, 这是DNA 与核蛋白的正常联系或其代谢的结果[14], 对维持细胞的正常活动具有重要作用, 当有外来物理、化学因素作用时, 则可诱导出过量的DPC。DPC 与其他DNA 损伤相比, 较难修复[10], 且DPC 仅可发生在单链DNA 上, 这表明这种交联只能发生在DNA 复制和转录期间, 因此DPC 的形成, 必将对DNA 的构象和功能(复制与转录)产生严重的影响[14], 并在其复制过程中容易造成某些重要基因(如抑癌基因)的丢失, 导致肿瘤或某些严重疾病的发生。可见DPC 过度增加是一种病理现象, 是DNA 分子的一种严重的遗传损伤。

3.1 DPC 的检测方法

DPC 常用的检测方法有: 碱洗提法、滤膜结合法、梯度离心法和 SDS-KCl 沉淀法, 近年来又发展了许多敏感和特异的方法如: 免疫印迹法、气相色谱-质谱联机法、氨基酸前标记法以及 ^{125}I-后标记法等。本实验室主要采用 SDS-KCl 沉淀法, 此方法操作简便, 结果合理, 其主要原理是: SDS 可以和DPC 以及其他的蛋白结合, 而不和自由的DNA 结合, 再向样品中加入 KCl 溶液可使DPC 和蛋白质沉淀下来, 而自由的DNA 留在上清液中。将上清液转移后, 再向沉淀中加入蛋白酶 K 除去蛋白质, 使DPC 中的DNA 游离出来, 并用荧光法测定DNA 的含量以及原液中DNA 的含量, 进而得出DNA 和蛋白质的交联程度[15]。

3.2 DPC 的生化特性

DPC 是一种稳定的共价化合物, 难以被一般的分离剂如碱性溶液、去污剂、强变性剂以及有机提取剂等分开。DPC 的生化特性有: (1)在正常细胞中存在着一定量的DPC, 这是DNA 与核蛋白的正常联系或代谢结果。当DNA 和蛋白质受到外来理化因素如: UV, γ-射线、烷化剂、甲醛以及一些金属化合物如镍和铬等直接和间接的作用, 则可诱导出超量的交联产物[16]。(2)和DNA 相联系的蛋白质。与DNA 交联的有正常联系的蛋白质, 如核小体质粒组蛋白等, 也有与DNA 无接触的蛋白质, 如白蛋白或溶菌酶等。紫外光可诱导小牛血清白蛋白、DNA 聚合酶、RNA 聚合酶、氨基酰 tRNA 合成酶以及核蛋白与核酸交联。(3)DPC 的DNA 序列: 通过核酸探针杂交技术, 可对DPC 的DNA 序列进行探讨。另外DPC 可在染色体结构松散的基因组区域优先形成, 而这些基因正是邻近于核基质结合位点并具有转录活性的序列[17]。

3.3 甲醛导致DPC 的形成

甲醛具有广泛的遗传毒性, 可以导致DNA-蛋白质交联, DNA-DNA 交联, DNA 链断裂, 染色体的畸变, 姐妹染色体的交换等, 其主要和直接的遗传毒性效应就是形成DPC[4]。1989 年 Casanove 等的实验表明, 用气态〔^{14}C〕-甲醛暴露 6 h, 以放射性"标记指数(labeling index, LI)"为指标, 检测 F344 大鼠鼻腔粘膜中DPC 的水平, 结果如下: 经 0.3 ppm 水平暴露, 即可检出DPC 的形成; 经 0.7, 2, 6, 10 ppm 水平暴露, DPC 形成的数值分别增长为 0.5, 4.2, 17, 24 LI。另外也发现, 在研究甲醛对人血淋巴细胞实验中, 当甲醛浓度在 0.005 mmol/L 和 0.025 mmol/L 时, DPC 的含量和对照组(加入蒸馏水)相比没有显著性的差异($P > 0.05$), 当甲醛浓度为 0.125 mmol/L 和 0.625 mmol/L 时, DPC 的含量

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

和对照组相比有极显著性的差异($P < 0.01$),结果反映:甲醛在低浓度时,DNA-蛋白质的交联现象不明显或者不引起DNA-蛋白质的交联现象;在高浓度时,甲醛能显著地诱导DPC的产生[15]。

3.4　甲醛导致DPC形成的机理

(1)甲醛是醛类化合物中最简单的小分子,其毒性效应的一个重要方面是源于它的羰基亲电性和较小的空间位阻,使其易于与核酸和蛋白质发生交联。在体内或体外甲醛先与蛋白质或核酸上的自由的氨基反应生成不稳定的羟甲基加合物,然后再进一步与核酸或蛋白质反应形成稳定的交联物。甲醛主要引起DNA和组蛋白的交联,该过程是甲醛先快速的和组蛋白反应,然后再和DNA环外的氨基结合形成DPC,主要涉及到组蛋白赖氨酸的ε-氨基和A/G碱基的环外氨基,其主要结构为:histone-NH-CH_2-NH-DNA[18,19]。(2)甲醛损害生物体抗氧化系统或作为抗氧化酶的抑制剂,间接导致DPC的增加。例如甲醛可以引起还原性GSH的耗竭,抑制谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶等抗氧化酶的活性,使羟自由基和氧自由基清除不力,导致DPC含量的增加[20]。

3.5　DPC的修复

与其他生物体存在的各种DNA损伤的修复机制相比,DPC的修复存在两个特点:(1)修复困难;(2)人类对DPC的修复机制知之甚少。初步研究结果表明,DPC的修复可能涉及"DPC的水解"和"短肽-DNA的修复"两个基本过程:(1)DPC水解的机制有:自发性水解(慢)和酶催化水解(快)。Quievryn G等认为蛋白酶复合体proteasome具有对DPC酶催化水解的功能,2000年他们采用proteasome的特异性抑制剂lactacystin(10 μM)作用DPC模型细胞,使DPC水解的速度降低3倍。(2)短肽-DNA修复机制:DPC水解之后,还有短肽或氨基酸残基继续与DNA相联,这时需要DPC修复酶来切除这些成份。例如,一种新近命名为TDP1的磷酸二酯酶就具有切除与DNA相联的酪氨酸残基或短肽的功能,这是目前唯一被报道的DPC修复酶,但是该酶仅能切除与DNA相联的酪氨酸残基或短肽。由于甲醛主要引起DNA和组蛋白交联而形成的DPC,所以我们要寻找的是能切除与DNA相联的赖氨酸残基或短肽的DPC修复酶,或称之为"赖氨酸DPC修复酶"[20]。

4　小结

因为甲醛在工业、建筑业及医学等多种行业广泛应用,特别是近10年来,随着我国经济的快速发展,人民生活水平的提高,室内装修已经成为新的时尚,但是由于不适当地使用了含有污染物的劣质建筑装饰材料,使目前我国城市室内空气污染,特别是室内甲醛污染更是十分严重,对广大人民群众的健康造成了很大的危害。遗传毒性是气态甲醛对人体健康最主要的危害之一,甲醛可以导致DNA断裂,DNA-DNA交联,这两类损伤可以被细胞内DNA损伤修复系统迅速修复,但是甲醛所导致的DNA-蛋白质交联则较难修复,交联的发生会对DNA的构象和功能(复制与转录)产生严重的影响,并在其复制过程中容易造成某些重要基因(如抑癌基因)的丢失,导致肿瘤或某些严重疾病的发生。因此研究甲醛对DNA的损伤对人体健康和遗传机制影响具有重要意义。

【参考文献】

[1] 王淑红,洪华生,郑微云,等. 可用于生物DNA损伤研究的几种方法及比较[J]. 集美大学学报,1999,4(4):72-79.

[2] 居学海,张琪,戴乾圆,等. 微孔滤膜碱洗脱法检测DNA损伤[J]. 北京工业大学学报,2000,(26)2:49-52.

[3] 鲁志松,严彦,乔琰,等. 气态甲醛对人体颊黏膜细胞遗传毒性的研究[J]. 中国环境科学,2003,23(6):566～569.

[4] Oliver Merk, Günter Speit. Significance of Formaldehyde-induced DNA-protein Crosslinks for Muta-genesis[J]. Environmental and Molecular Muta-genesis, 1998, 32(1): 260-268.

[5] 刘杰,刘宏亮,王光学,等. 气态甲醛对小鼠不同组织器官SOD的抑制作用[J]. 环境与健康杂志,2003,20(2):81-83.

[6] Teng S, Beard K, Pourahmad J. et al. The formaldehyde metabolic detoxification enzyme systems and molecular cytotoxic mechanism in isolated rat hepatocytes[J]. Chemico-Biological Interactions, 2001, 130-132: 285-296.

[7] 杨丹凤,袭著革,张华山,等. 甲醛吸入染毒致大鼠多组织器官氧化损伤效应研究[J]. 环境科学报,2004,24(1):174-176.

[8] 原亚萍,朴铁夫,许耀奎,等. DNA损伤、修复与突变的研究进展[J]. 吉林大学学报,1995,17(3):91-95.

[9] 李雨民. DNA损伤修复与细胞凋亡[J]. 国外医学:放射医学核医学分册,1999,23(3):12-115.

[10] Oliver Merk, Kristin Reiser, Günter Speit, et al. Analysis of chromate-induced DNA-protein crosslinks with the comet assay[J]. Mutation Research, 2000, 471: 71-80.

[11] C. Clifford Conaway, John Whysne, Lynne K Verna, et al. Formaldehyde Mechanistic Data and Risk Assessment: Endogenous Protection From DNA Adduct Formation[J]. Elsevier Science, 1996, 71(1/2): 29-55.

[12] Narendra Singh, Henry Lei. 60HZ magnetic field exposure induce DNA crosslinks in rat brain cells[J]. Mutation Research, 1998, 400(1): 313-320.

[13] 沈同,王镜岩,赵邦悌,等. 生物化学[M]. 第二版 下册 1991. 346-351.

[14] Victoria Voitkun, Anatoly Zhitkovich. Analysis of DNA-Protein crosslinking activity of malondialdehyde in vitro[J]. Mutation Research, 1999, 424: 97-106.

[15] 刘英帅,鲁志松,杨继文,等. 甲醛致人血淋巴细胞DNA-蛋白质交联作用的定量研究[J]. 湖北预防医学杂志,2004,15(4):4-7.

[16] Anatoly Zhitkovich, Max Costa. A simple, sensitive assay to detect DNA-protein crosslinks in intact cells and in vivo[J]. Carcinogenesis, 1992, 13(8): 1485-1489.

[17] 雷毅雄,庄志雄. 外来化学物与DNA-蛋白质交联物关系的研究进展[J]. 国外医学卫生学分册,1995,22(3):149-153.

[18] Renee L. Bunde, Eric J. Jarvi, Jeffrey J. Rosentreter, et al. A piezoelectric method for moni-toring formaldehyde induce crosslink formation between poly-lysine and poly-deoxyguanosine[J]. Talanta, 2000, 51: 159-171.

[19] George Quievryn, Anatoly Zhitkovich. Loss of DNA-Protein Crosslink from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteosome function[J]. Carcinogenesis, 2000, 21(8): 1573-1580.

[20] 杨旭,李睿,丁书茂,等. 室内气态甲醛的毒性作用及其生物标志物[C]. 首届室内环境安全与可持续发展国际论坛论文集,2003,96-103.

(收稿日期:2005-01-20)
(本文编辑:宋晓东)

© 1994-2007 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net