·论著 ·

甲醛致大鼠离体骨髓细胞 DNA蛋白质交联的研究

黄思佳　王昆　郑宇铎　杨光涛　吴凯　杨旭*

【摘要】目的　检测经不同浓度甲醛染毒后所致大鼠骨髓细胞的 DNA - 蛋白质交联程度。方法　采用 KCl-SDS沉淀法检测液态甲醛所致 DNA 蛋白质交联 (DPC)效应。结果　低浓度的甲醛 (10 μmol/L和 50 μmol/L)能引起 DNA - 蛋白质的交联;较高浓度的甲醛 (250 μmol/L和 1 250 μmol/L)可以产生明显的 DNA蛋白质交联作用 ($P < 0.01$)。结论　甲醛可造成骨髓细胞 DNA蛋白质交联,而 DPC可以对细胞产生严重的遗传毒性,这可能是甲醛导致白血病的分子机制之一。

【关键词】甲醛; 骨髓细胞; DNA蛋白质交联; 白血病

【中图分类号】R135. 1+4　【文献标识码】A　【文章编号】1006-2483 (2008) 01-0009-03

DNA-protein crosslinks of rat bone marrow cells induced by formaldehyde in vitro

HUANG Si-jia, WANG Kun, ZHENG Yu-duo, YANG Guang-tao, WU Kai, YANG Xu. *Laboratory of Environmental Sciences, Huazhong Normal University* 430079, *China*

Corresponding author: YANG Xu, Email: yangxu@mail ccnu. edu. cn

【**Abstract**】 **Objective** To explore the DNA-protein crosslinks of marrow cells of rat after formaldehyde exposure. **Methods** KCl-SDS assay was used to access the effect of the DNA -protein crosslinks by the liquid formaldehyde. **Results** Low strength formaldehyde (10μmol/L and 50μmol/L) can cause DNA-protein crosslink; the higher strength formaldehyde (250μmol/L and 1250μmol/L) can cause obviously crosslinks ($P < 0.01$). **Conclusion** Formaldehyde may induce DNA-protein crosslink, and it can cause severe genotoxicity on cells, thus, it might be one of the molecule mechanisms of leukemia caused by formaldehyde.

【**Key words**】 Formaldehyde; Bone marrow cells; DNA-protein crosslinks(DPC); Leukemia

甲醛是一种常见的室内装修型化学空气污染物,以其来源广、污染水平高、污染持续时间长、毒性大等特点受到人们的广泛关注。许多研究证实,甲醛具有遗传毒性和致突变性,可以导致 DNA链断裂 (DSB)、DNA - DNA交联 (DDC)以及 DNA - 蛋白质交联 (DPC)[1]。其中,DPC在致癌和致突变中具有至关重要的地位[2,3]。甲醛所致 DPC主要是由组蛋白上的赖氨酸残基和 DNA上的鸟嘌呤共价结合而成,其主要形式可表示为: histone-NH-CH_2-NH-DNA。由于甲醛仅能与 DNA单链发生作用形成 DPC,因此,DPC只可能在转录或复制的过程中形成,说明这种 DPC的存在可以阻滞 DNA的正常转录和复制,会导致染色体断裂、缺失,以及基因突变和细胞的死亡。因此,WHO指出 DPC可以作为机体潜在突变的分子标志物。由于 DPC是癌变的重要诱因之一,甲醛与 DPC的量效关系已被用于甲醛致癌性的危险度评价。

甲醛现已被世界卫生组织列入确定的人类致癌物,已被肯定可以导致鼻咽癌[4],并被怀疑可以引起儿童白血病[5]。流行病学研究的结果表明,甲醛可导致白血病,但诱导人罹患白血病产生的机制尚不清楚。为了进一步研究甲醛引发白血病的可能机制,实验针对白血病发源的骨髓细胞进行研究,采用 KCl-SDS沉淀法检测甲醛致大鼠骨髓细胞 DPC效应。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　材料　自湖北省预防医学科学院动物实验中心购得纯系 Wistar雄性大鼠,体重 180～200 g。

1.1.2　试剂　10%甲醛溶液 (SIGMA公司),十二烷基硫酸钠 (Merk公司),蛋白酶 K(Merk公司), Hoechst33258荧光染料 (SIGMA公司),小牛胸腺 DNA(SIGMA公司), PBS(pH 7.5), 0.4%苔盼蓝溶液,其它试剂均为分析纯。

基金项目:国家自然基金面上项目 (No. 30570799)

作者单位: 430079　武汉,华中师范大学生命科学学院

第一作者简介:黄思佳 (1983 -),女,华中师范大学生命科学学院分子生物学专业硕士研究生

* 通讯作者:杨旭, yangxu@mail ccnu. edu. cn

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

1.1.3　仪器　三用电热恒温水箱 (北京市长源实验仪器厂),低温冷冻离心机 (Eppendorf),荧光分光光度计 (F-4500,日本日立)。

1.2　实验方法

1.2.1　骨髓细胞悬液制备及染毒处理　颈椎脱臼处死大鼠,用 37℃ PBS冲出股骨腔中骨髓细胞,以 800 r/min离心 5 min收集细胞,去掉上清液,用 0.5 ml PBS(pH 7.5)重悬浮细胞并调整细胞密度 (10^5个 /ml～10^6个 /ml),苔盼蓝排斥法检测细胞活力。细胞吹打均匀后,向每个 1.5 ml的离心管中各加入 0.5 ml骨髓悬浮细胞,然后加入液态甲醛使得其终浓度分别为 0、10、50、250、1 250 μmol/L,对照组加入 PBS缓冲液,每组 5个平行样,在 37℃的水浴中孵育 60 min。

1.2.2　用于 DPC检测的 KCl-SDS沉淀法[2,6-8]。

1.2.2.1　KCl-SDS沉淀法的原理　SDS可以和 DPC以及其他的蛋白结合,在向样品中加入 KCl溶液时可使 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,并用荧光法测定此 DNA的含量以及原液中 DNA的含量,计算交联 DNA和总 DNA的比值 (交联 DNA/(交联 DNA +自由 DNA))进而得出 DNA和蛋白质的交联程度。

1.2.2.2　细胞的裂解　在制备好的骨髓细胞悬液中分别加入 2%的 SDS溶液 0.5 ml并轻微振荡,然后将混合液 65℃水浴加热 10 min,裂解细胞。

1.2.2.3　游离 DNA的分离　从水浴中取出裂解好的细胞,加入 1.0 mol/L的 KCl (溶于 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5) 100 μl,将混合液 6次穿过 1 ml的聚丙烯枪头,从而使 DNA长度统一 (因 DNA片段的长度可影响该方法的准确性)。由于游离的蛋白质及 DNA蛋白质交联物可以和 SDS结合而沉淀下来,而游离的 DNA留在悬液中。在冰上冷冻样品 5 min后,可以形成 SDS-K +沉淀 (包括蛋白质和 DPC),然后 10 000 r/min 4℃离心 5 min收集沉淀,并将上清液转入另一离心管 (5 ml)中。再加入 1ml的清洗缓冲液 (0.1 mol/L KCl, 0.1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH7.5)重悬浮沉淀, 65℃水浴加热 10 min,冰上骤冷 5 min,如前述离心,如此清洗 3次,每次都将上清液转入上述离心管中。

1.2.2.4　DPC中结合 DNA的分离　最终的沉淀重悬浮于 0.5ml的清洗缓冲液中,然后加入 0.5 ml的蛋白酶 K(0.4 mg/ml,溶于清洗缓冲液中), 50℃消化 3 h,从水浴中取出,冰上骤冷 5 min, 12 000 r/min 4℃离心 10 min,收集上清液 (其中包括 DPC中的 DNA)。

1.2.2.5　DPC系数的计算　先制作 DNA浓度的标准曲线:用清洗缓冲液配制终浓度分别为 0、100、300、500、750、1 000、1 500、2 000、3 000、5 000 ng/ml的小牛胸腺 DNA标准液,紧接着加入 1 ml新鲜配制的 400 ng/ml的荧光染料 Hoechst 33258,使终浓度为 200 ng/ml,置于暗处 30 min,用 F-4500型荧光分光光度仪在 350 nm激发光和 450 nm发射光下测得各浓度的荧光值,制备标准曲线,所制备的标准曲线 (图 1)所示,回归方程为: y = 2.442 3 + 0.002 8 x, r = 0.998 8。将染色后的样品用 F-4500型荧光分光光度计测定其荧光值,根据标准曲线来定量交联 DNA和自由 DNA,再计算 DPC系数:

$$\text{DPC系数}(\eta) = \frac{\text{交联 DNA}}{\text{交联 DNA} + \text{自由 DNA}} \times 100\%$$

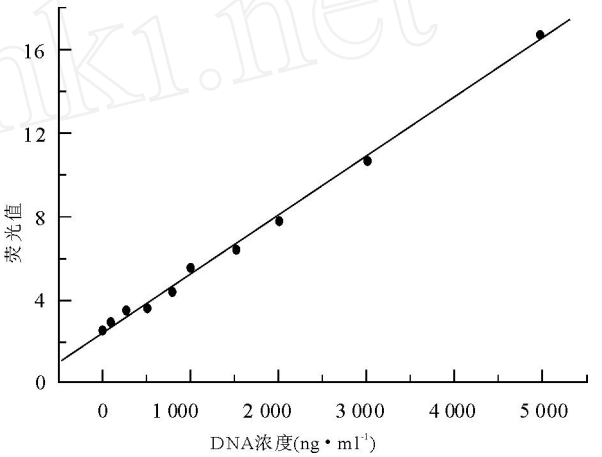

图 1　DNA浓度的标准曲线

1.2.3　实验数据的统计分析　实验测得的各项数据用 Origin6.1统计软件分析并进行 t检验并绘图,检测染毒组与对照组之间的差异显著性。

2　结果

甲醛致大鼠骨髓细胞 DPC效应:不同浓度的甲醛染毒后,用 KCl∑SDS沉淀法检测各浓度甲醛诱导生成 DPC。实验结果显示: 10 μmol/L和 50 μmol/L甲醛染毒处理后,大鼠骨髓细胞的 DPC系数与对照组相比有显著差异 ($0.01 < P < 0.05$),但是,当甲醛浓度升高到 250 μmol/L和 1 250 μmol/L时,DPC系数上升更为显著,且 DPC含量与对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$) (图 2)。该结果说明甲醛在低浓度时,就能够引起 DPC的生成;在较高浓度时,甲醛能够显著地诱导 DPC的生成。

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

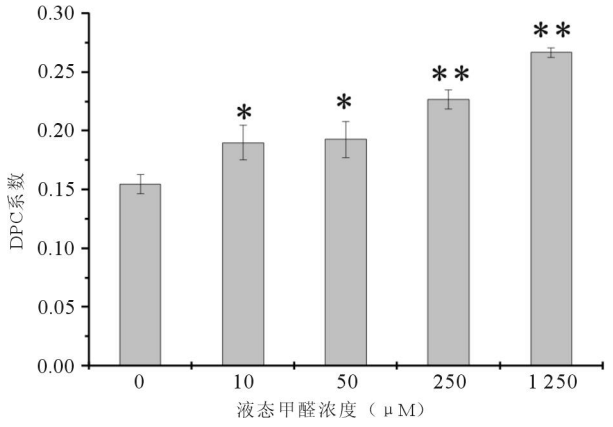

图 2　不同浓度甲醛致大鼠骨髓细胞 DPC系数 (%)

3　讨论

3.1　DPC的生物学特征和意义

DNA加合物可作为接触性生物标志物,反映对外源化合物进入生物体的真实接触浓度,也可作为效应标志物,反映外源化合物导致的靶器官效应剂量,因此用其进行环境生物监测和评估具有重要意义[6]。DPC是一种 DNA加合物,它的形成表明 DNA发生了损伤,DNA加合物不仅可以导致基因突变,激活癌基因和灭活抑癌基因,还可能影响到肿瘤调控因子的表达[10],而且所导致的突变不易修复[11]。DPC是一种重要的生物大分子损伤标志[12],被认为是甲醛致癌作用的"关键事件 (key event)"。

3.2　KCl-SDS沉淀法的特点

测定 DNA加合物的方法很多,例如 32P-后标记法、免疫学方法、碱洗脱法、序列测定法[6]等,KCl-SDS沉淀法与这些检测方法相比具有灵敏度高,操作简便等特点,因此在国际上得到广泛使用。

3.3　甲醛与白血病的关系

近年来白血病患者的数目急剧增加,尤其是儿童白血病患者的增加更为显著[13]。很多学者怀疑室内装修污染是重要的危险因素之一。在我国室内装修的污染中,甲醛是最主要的污染源。甲醛与白血病的关系应引起高度关注,这是一个重要的环境医学问题。实验室的研究证明,它能引起骨髓细胞 DNA蛋白质交联。而 DPC可以对细胞产生严重的遗传毒性,这可能是甲醛导致白血病的分子机制之一。

应用离体的大鼠骨髓细胞作为实验材料进行的研究只是一种初步的研究,但该实验仍然表明了甲醛致骨髓细胞致癌突变的可能性[1],更深入的研究需要以活体动物为实验材料进行。在今后的实验中,还需要扩大对其他生物标志物的研究,以求得到更为明确的分子机理。

【参考文献】

[1] WHO. Concise International Chemical Assessment Document 40: Formaldehyde [R]. World Health Organization, Geneva, 2002, 12 - 6.

[2] Conaway CC, Whysner J, Verma LK. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation [J]. Pharmacol Ther, 1996, 71: 29 - 55.

[3] Bunde RL, Jarvi E J, Rosentreter JJ. A piezoelectric method for monitoring formaldehyde induced crosslink formation between polylysine and poly-deoxyguanosine [J]. Talanta, 2000, 51: 159 - 171.

[4] Casanova M, Morgan KT, Gross EA, et al. DNA - protein crosslinks and cell replication at specific sites in the nose of F344 rats exposed subchronically to formaldehyde [J]. Fundam Appl Toxicol, 1994, 23: 525 - 536.

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

[6] Merk O, Speit G. Detection of crosslinks with the comet assay in relationship to genotoxicity and cytotoxicity [J]. Environ Mol Mutagen, 1999, 33(2): 167 - 172.

[7] Merk O, Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis [J]. Environ Mol Mutagen, 1998, 32(3): 260 - 268.

[8] Casanova M, Deyo DF, Heck HD. Covalent binding of inhaled formaldehyde to DNA in the nasal mucosa of Fischer 344 rats: analysis of formaldehyde and DNA by high-performance liquid chromatography and provisional pharmacokinetic interpretation [J]. Fundam Appl Toxicol, 1989, 12 (3): 397 - 417.

[9] 夏世钧,吴中亮. 分子毒理学基础 [M]. 武汉:湖北科学技术出版社, 2001. 105.

[10] Yingshuai Liu, Chang M Li, Zhisong Lu, et al. Studies on formation and repair of formaldehyde-damaged DNA by detection of DNA-protein crosslinks and DNA breaks [J]. Frontiers in Bioscience, 2006, 11: 991 - 997.

[11] 彭光银,赵玮,鲁志松,等. 甲醛所致 DNA蛋白质交联修复的研究 [J]. 生态毒理学报, 2006, 1(2): 144 - 149.

[12] 任泽舫,庄志雄,林寿悟,等. DNA蛋白质交联物作为接触铬工人生物标志物的研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1996, 14(1): 7 - 9.

[13] 杨友,颜崇淮,沈晓明. 儿童白血病发病的基因环境相互作用研究进展 [J]. 国际儿科学杂志, Int J Pediatr, 2007, 34(2): 117 - 120.

(收稿日期: 2007-10-30)
(本文编辑:万美)

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net