·综述 ·

8羟基脱氧鸟苷在污染物遗传毒性研究中的应用分析

武阳　常青　杨旭 *

【中图分类号】R994. 6　【文献标识码】B　【文章编号】1006-2483 (2009) 01-0057-03

遗传毒性是环境毒理学研究的一项重要内容。遗传毒性可以由多种环境因素,经过多种生物学机制引起。外源性氧化性环境污染物进入体内所致的生物大分子的氧化损伤,是遗传毒性最为常见的生物学机制之一。主要表现为生物大分子 (如 DNA、蛋白质、脂类等)氧化损伤,以及随之发生的结构和功能改变,并最终导致基因突变、细胞癌变及生成肿瘤等现象[1]。8羟基脱氧鸟苷 (8-hydroxy-2′-deoxyguanosine, 8-OHdG)是活性氧自由基 (如羟自由基、单线态氧等)攻击 DNA分子中的鸟嘌呤第 8位碳原子而产生的一种氧化性加合物,它是活性氧基团引起的 DNA氧化损伤修饰产物之一。它可以进一步导致碱基错配,基因突变,进而改变基因表达产物的结构和功能。8-OHdG可以通过高灵敏度、高选择性的检测手段来测定,目前已成为 DNA氧化损伤及遗传毒性研究中最常采用的生物标志物之一。

1　8-OHdG在遗传毒性研究中的作用

1. 1　8-OHdG的生成、修复和危害

DNA的氧化损伤可导致衰老、肿瘤及相关疾病。许多致突剂和致癌剂也会造成氧化损伤,由于 DNA在细胞复制过程中起着重要的信息传递作用,因此它的氧化损伤也引起了人们的重视[2]。自由基一直被认为是引起 DNA损伤的主要因素之一。羟自由基和超氧阴离子能直接与 DNA分子反应,导致 DNA链断裂、碱基修饰和 DNA蛋白交联等氧化性 DNA损伤,其中最主要的致突变性损伤反应是鸟嘌呤上 C-8与 -OH结合,产生 8-OHdG。8-OHdG可被机体特异性 DNA修复酶剪切清除并经肾脏随尿排泄,其含量反映机体氧化损伤程度,既是个体接触标志物,又是效应标志物[3]。它一旦逃避了机体自身修复,就可能成为致突变、致畸、致癌的启动因子。因为它是一种内源性诱变剂,具有突变倾向 (G: C - T: A颠换,见图 1),通常认为它是活性氧引起突变和癌症的一个可能原因[4]。文献[5]报道,基因组中高含量的 8-OHdG可导致 DNA修复能力丧失和修复时密码错译。Floyd等[6]研究发现目标组织中 8-OHdG的量的改变可引起某些癌基因的异常表达。

1. 2　8-OHdG的代谢特性和实用意义

8-OHdG在体内稳定存在,为代谢终产物,且只能通过 DNA氧化损伤途径形成,并可通过分析其在细胞核 DNA及线粒体 DNA中的含量来反映体内 DNA氧化损伤,体液中 8-OHdG水平不受饮食等因素影响,不是细胞更新结果,是目前国际上公认的一种新型评价 DNA氧化损伤和氧化应激状态敏感的生物标志物[7]。因此测定机体 8-OHdG含量对评估体内氧化损伤和修复程度,氧化应激与 DNA损伤相互关系,研究退行性疾病、衰老机制、癌发生机制、环境毒物、慢性炎症性疾病与氧化应激的关系等均有重要的意义,也可以用来评价抗氧化剂治疗 DNA氧化损伤的效果。目前,国内外主要检测各种组织 DNA、血液和尿液中的 8-OHdG,用来阐明某些疾病的发病机制和探索新治疗方法,并取得了很好的进展[8]。

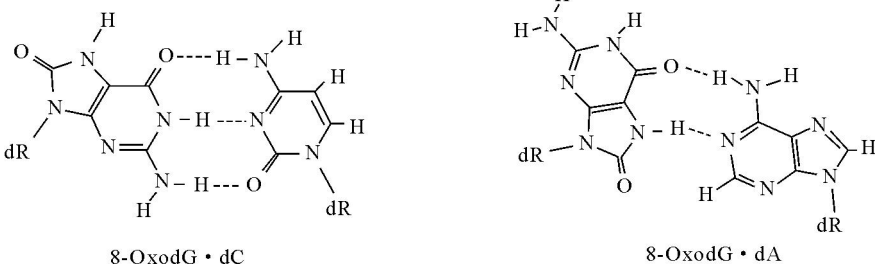

图 1　8-OHdG导致点突变的机制

甲醛是一种常见的遗传毒物,它的遗传毒性可能存在 4类分子机理[9]: ①细胞分裂期染色体断裂和姐妹染色单体交换。②甲醛作为酶类抑制剂,对 DNA分子的间接氧化损伤。例如甲醛可以抑制超氧化物歧化酶 (SOD),使细胞内氧自由基的清除不力,在组织中的含量增高,间接导致 DNA分子的氧化损伤,引起 DNA碱基突变。③对 p53基因的作用,有研

基金项目: 国家科技部卫生部科技支撑计划项目 (2006BAI19B05)和 (2006BAJ02A10)

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:武阳 (1983 -),男,分子生物学研究生
*通讯作者:杨旭: yangxu@mail ccnu edu cn

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

究表明 p53基因突变和突变型 p53蛋白的形成也与甲醛的遗传毒性有关，因为突变的形成导致了 p53蛋白抑癌功能丧失。④甲醛作为强氧化剂对 DNA分子的直接氧化，形成 8-羟基脱氧鸟苷，直接引起 DNA碱基突变。

8-OHdG为鸟嘌呤氧化的产物，在 8号位置上多接了一个羟基。一般而言，G在碱基配对时会和 C以三个氢键接在一起，但 8-OHdG因接了一个羟基而变得可以跟 A之间以两个氢键接在一起，这种错误配对如果未在 DNA复制前修补而就进行复制，就会造成子细胞 G: C到 T: A的点突变。

1.3 应用 8-OHdG研究污染物遗传毒性举例

潘洪志等[10]利用 $CdCl_2$使大鼠造成镉中毒，检测大鼠血清和肝脏中抗氧化酶活力，并测定肝细胞 DNA中 8-OHdG含量，结果发现与空白对照组相比，染毒组大鼠血清和肝匀浆的超氧化物歧化酶活性、谷胱甘肽过氧化物酶活力下降，丙二醛含量升高，肝脏内 8-OHdG含量明显升高，在统计学上有显著性差异（$P < 0.01$）。

袭著革等[11]对烹调油烟雾染毒的小牛胸腺 DNA及 Wistar大鼠气管灌注染毒的肺组织 DNA中 8-OHdG进行定量检测，发现烹调油烟雾的各组分，包括油烟冷凝物、残留油、油烟颗粒物、油烟挥发性有机物均能诱导 DNA氧化产生 8-OHdG，产生量的顺序为残留油 >冷凝物 >油烟颗粒物 >油烟挥发性有机物，表明烹调油烟雾具有明确的遗传毒性，可诱导核酸氧化产生加合物 8-OHdG，其机制可能是烹调油混合污染物中存在痕量金属离子如 Fe^{2+}、Cu^{2+}等，介导 Fenton反应生成羟自由基，直接进攻 DNA造成氧化损伤。

何天稀[12]等采用 HPLC-UV与反相 C-8柱，以 50 mmol/L的 KH2P04（pH5.5）- 10%的甲醇作为洗脱液，同步快速检测了 21位健康人与 90位胃癌病人胃粘膜活检组织中的脱氧鸟苷和 8羟基脱氧鸟苷的量，检测发现病人胃粘膜活检组织中的 8-OHdG含量远远高于健康人。

袭著革等[13]研究了环境污染物甲醛对 DNA分子的损伤效应，发现在体外模拟条件下甲醛单独染毒 DNA后 8-OHdG生成量比空白值略高，说明在体外对 DNA只造成弱的氧化损伤，但在铁离子介导下，DNA中 8-OHdG水平显著升高，大于甲醛和 Fe^{2+}单独作用之和。动物实验结果表明甲醛诱导大鼠肺组织 DNA生成 8-OHdG，且呈现随剂量增加而增高的趋势，说明甲醛有较强的遗传毒性，提示了甲醛潜在致癌效应的一条可能途径。但袭著革等[14]同期对乙醛诱导 DNA氧化损伤研究结果显示，乙醛在大鼠体内诱导产生的 8-OHdG与空白相比未见显著性差异，认为体内代谢条件下乙醛对核酸毒性效应是通过其它途径实现的。

2 8羟基脱氧鸟苷的检测方法

8-OHdG的检测方法很多，目前较常用的有 ^{32}P后标记检测法，高效液相色谱-电化学检测器分析法（HPLC-ECD），气质联用分析法（GC-MS），高效毛细管电泳法（HPCE），免疫组化法（Immunohistochemistry, IHC），酶联免疫吸附法（ELISA）。

2.1 ^{32}P后标记检测法

^{32}P后标记技术由 Randerath和 Gupta等人于 1981～1982年首先建立，其操作过程包括：DNA的水解、标记、层析分离、放射自显影。具有灵敏度高（最小检测限可达 1个 8-OHdG/106核苷）、样品用量少、应用范围广等优点。潘洪志等[15]应用此法测定正常小鼠各组织中 8-OHdG的含量，发现肝中水平最高，肾中水平最低。但该法的特异性有待提高，且 ^{32}P为放射性元素，易造成环境污染，还会对实验人员本身造成放射性损害。

2.2 高效液相色谱-电化学检测器分析法

HPLC-ECD法是将 DNA酶水解样品用 HPLC分离后用 ECD测定，是 1988年由 Floyd等[6]提出的，是一种定量测定 8-OHdG的有效方法。HPLC-ECD在检测 8-OHdG中得到了广泛的使用，具有较高的灵敏度，其最低检测限大约为 20 fmol/μmol核苷，需样品量小，是非损伤性的，快速而且选择性好，对组织细胞 DNA及尿中 8-OHdG均可检测，是目前应用广泛、较为成熟的方法。逄兵[16]等应用此技术对 52名男性不育患者精子 DNA中 8-OHdG进行测定，结果提示精子 DNA中 8-OHdG与精液质量存在一定相关性，表明精液量下降与精子 DNA损伤存在一定联系。缺点是存在 DNA的不完全酶解，可导致检测值比真实值偏高。

2.3 气质联用分析法

GC-MS即将气相色谱仪与质谱仪联合使用的一种检测方法，可为 DNA损伤中的氧化产物的鉴定提供灵敏而明确的结果。特别是利用选择性离子扫描方式进行定量分析，可以满足尿样中低浓度 8-OHdG含量测定。梅素容[17]等利用此法测定尿中 8-OHdG含量，发现癌症病人尿中 8-OHdG排放水平明显高于正常人。然而由于质谱仪价格昂贵，该方法在一般实验室还难以应用。同时 DNA碱基必须首先进行衍生化反应，且这一过程容易导致副产物的形成，从而导致假阳性结果。

2.4 高效毛细管电泳法

HPCE法利用 8-OHdG与其它脱氧鸟苷在电场中泳动方向和速率的不同而进行分离，应用保留时间进行定性，通过外标法进行定量。张霞[18]等用此法测定 II型糖尿病患者尿中 8-OHdG含量，得出“8-OHdG与糖尿病肾病（DN）程度呈正相关”的结论。该法进样量小、分离效率高、保留时间短，比 HPLC分离更为迅速，使用紫外检测器灵敏度较低，改用电化学检测器后灵敏度大大提高。该法目前应用也较广泛，

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

但同样存在 DNA的不完全酶解缺陷,而且易受样品中其他共洗脱物质的干扰,实验重现性差。

2.5 免疫组化法

IHC技术利用抗原与抗体特异性结合的原理,通过化学反应使标记抗体的显色剂显色来确定组织细胞内抗原(多肽和蛋白质),对其进行定位、定性及定量研究。王迎春[19]等用此法检测 8-OHdG在大鼠肾脏和肾上腺中的表达,结果表明关木通可引起肾上腺皮质增生和肾损害,肾上腺损害早于肾损害。该法存在抗体交叉反应。同时该方法试剂昂贵,实验操作步骤复杂,技术水平要求较高。

2.6 酶联免疫吸附法

ELISA检测法应用单克隆抗体技术,具有很高的灵敏度和很好的重现性。是目前国内外生物学实验室广泛使用的一种方法。市面上有相应的试剂盒出售。此法不用对 DNA分解处理,不需要较昂贵的仪器,特异性强,测定时间短,样品预处理程序简单,是一种在基层单位很有应用前景的检测方法。2001年郑全美等[20]、2002年孙贵范等[21]均利用 8-OHdG特异性单克隆抗体试剂盒,结合酶标仪对正常人尿样中 8-OHdG进行定量测定,发现该数值在不同性别间存在显著差异,女性正常值显著大于男性。

3 结论

我们的生活环境有许多物理、化学因子,如电离辐射、化学致突变剂等,可在人和动物体内产生大量活性氧自由基,进而引起 8-OHdG的生成,从而导致多种与 DNA氧化损伤有关的退行性疾病和癌症的发生,因此测定 8-OHdG的表达水平对了解 DNA氧化损伤及遗传毒性在疾病的发生和发展过程中的作用具有重要意义。

对上述 6种 8-OHdG的检测方法的综述可以发现,酶联免疫吸附法具有很高的灵敏度、特异性和很好的重现性,且操作简单,条件要求并不复杂,可以考虑为基层实验室进行相关研究的首选技术。

【参考文献】

[1] 潘洪志,李蓉. DNA氧化损伤标志物 8羟基脱氧鸟苷及其检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4): 404 - 405.

[2] 孙咏梅,戴树桂. DNA加合物 8羟基脱氧鸟苷特性研究[J]. 上海环境科学, 2001, 20(9): 409 - 412

[3] William WA, Boris O, Carsten H. Assessing DNA damage and health risk using biomarkers[J]. Mut Res, 2002, 509: 153 - 163

[4] Wu LL, Chiou CC, Chang PY, et al. Urinary 8-OHdG: a marker of oxidative stress to DNA and a risk factor for cancer, atherosclerosis and diabetics[J]. Clin Chim Acta, 2004, 339(6): 1 - 9.

[5] Kuchino Y, Mori F, Kasai H et al. Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its repair[J]. Carcinogenesis, 1986, 7: 1849 - 1851

[6] Floyd R A, West M S. Hydroxyl free radical mediated formation of 8-hydroxyguanine in isolated DNA[J]. Arch. Biochim. Biophys, 1988, 262: 266 - 272

[7] Kasai H. Analysis of a form of oxidative DNA damage, 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, as a marker of Cellular oxidative stress during carcinogenesis[J]. Mut Res, 1997, 387; 147 - 163

[8] 汪莉君,邵华. 8羟基脱氧鸟苷检测方法研究进展[J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(10): 1915 - 1916

[9] 周砚青,王昆,杨光涛,等. 甲醛致大鼠脑细胞 DNA损伤初步研究[J]. 公共卫生与预防医学, 2006, 17(6): 5 - 7

[10] 潘洪志,万丽葵,常东,等. 大鼠 DNA氧化损伤及抗氧化酶活力变化与慢性镉中毒[J]. 中国临床恢复, 2005, 9(15): 108 - 109

[11] 袭著革,李官贤,孙咏梅,等. 烹调油烟雾诱导核酸氧化损伤及其标志物 8羟基脱氧鸟苷的形成机制[J]. 环境与健康杂志, 2003, 20(5): 259 - 262

[12] 何天稀,王立光,周丹,等. HPLC-UV检测病人胃粘膜活检组织中 8羟基脱氧鸟苷[J]. 分析试验室, 2007, 26(11): 67 - 69

[13] 袭著革,晁福寰,杨丹凤,等. 甲醛致核酸损伤作用的实验研究[J]. 环境科学学报, 2004, 24(4): 719 - 722

[14] 袭著革,晁福寰,杨丹凤,等. 乙醛对脱氧核糖核酸分子的损伤作用[J]. 环境科学, 2004, 25(3): 102 - 105

[15] 潘洪志,常东,那立欣,等. 32 P后标记法检测 DNA中 8羟基脱氧鸟苷的含量[J]. 中国卫生检验杂志, 2004, 4(1): 19 - 20

[16] 逄兵,蒋学之. 男性不育患者精子 DNA中 8羟基脱氧鸟苷水平及与精液参数的相关性[J]. 中国男科学杂志, 2001, 15(3): 157 - 159

[17] 梅素容,王鹏,吴采樱,等. GC/MS法测定尿中的 8羟基脱氧鸟苷[J]. 华中科技大学学报, 2006, 34(5): 118 - 120

[18] 张霞,苏本利,王赞锋,等. 尿 8羟基脱氧鸟苷水平与糖尿病肾病的相关性[J]. 中国糖尿病杂志, 2006, 14(1): 41 - 42

[19] 王迎春,李海山,仲来福. 关木通对大鼠肾上腺的毒效应及其可能机制[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2006, 20(4): 344 - 348

[20] 郑全美,郭绍春,何景宏,等. ELISA方法测定尿 8羟基脱氧鸟苷(8-0HdG)含量及其临床意义[J]. 中国卫生检验杂志, 2001, 12(2): 145 - 146

[21] 孙贵范,刘珊,李冰,等. 正常成人尿中 8羟基脱氧鸟苷水平的观察[J]. 中国公共卫生, 2002, 18(1): 23 - 24

(收稿日期: 2008-12-11)

(本文编辑:宋晓东)

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net