

参考文献

- [1] FAO/WHO. Evaluation of allergenicity of genetically modified foods[R]. Rome: FAO, 2001.
- [2] Dearman R J, Kimber I. A mouse model for food allergy using intraperitoneal sensitization[J]. *Methods*, 2007, 41(1): 91-98.
- [3] Akiyama H, Teshima R, Sakushima J I, et al. Examination of oral sensitization with ovalbumin in Brown Norway rats and three strains of mice[J]. *Immunol Lett*, 2001, 78(1): 1-5.
- [4] Ladies G S, Holsapple M P, Astwood J D, et al. Workshop overview: approaches to the assessment of the allergenic potential of food from genetically modified crops[J]. *Toxicol Sci*, 2003, 73(1): 8-16.
- [5] 朱立平, 陈学清. 免疫学常用实验方法[M]. 北京: 人民军医出版社, 2000: 352-356.
- [6] Knippels L M, Penninks A H, Smit J J, et al. Immune-mediated effects upon oral challenge of ovalbumin-sensitized Brown Norway rats; further characterization of a rat food allergy model[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1999, 156(3): 161-169.
- [7] Knippels L M, Penninks A H, Spanhaak S, et al. Oral sensitization to food proteins; a Brown Norway rat model[J]. *Clin Exp Allergy*, 1998, 28(3): 368-375.
- [8] 李中港, 秦慧迪, 汪怀山, 等. BN大鼠与Wistar大鼠I型过敏反应敏感性的比较[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2010, 24(1): 30-34.
- [9] 贾旭东, 李宁, 王伟, 等. 蛋白过敏性研究——BN大鼠动物模型[J]. *卫生研究*, 2004, 33(1): 63-65.
- [10] 向钱, 贾旭东, 王伟, 等. BN大鼠致敏动物模型研究[J]. *中国食品卫生杂志*, 2008, 20(5): 393-396.
- [11] Lewkowich I P, Rempel J D, HayGlass K T. In vivo IgE levels in exogenous antigen stimulated responses; measurement of total IgE as a valid, simple surrogate for Ag-specific IgE[J]. *J Immunol Methods*, 2004, 286(1/2): 123-132.
- [12] Gonzalez cmssi F, Hsueh W. Experimental model of ischemic bowel necrosis. The role of platelet-activating factor and endotoxin[J]. *Am J Pathol*, 1983, 112(1): 127-135.

论著

不同烷基醛类对脱细胞-核 DNA 影响的研究

李谦^{1,2}, 苏卿^{2,3}, 张文众², 贾旭东², 李宁², 张立实¹

(1. 四川大学华西公共卫生学院, 四川 成都 610041; 2. 国家食品安全风险评估中心 卫生部食品安全风险评估重点实验室, 北京 100021; 3. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715)

摘要:目的 研究甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、己醛、戊醛对脱细胞-核 DNA 的影响。方法 将甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、己醛、戊醛用缓冲液分别配制浓度为 10 mmol/L 的溶液作为受试物; 用羟自由基损伤的脱细胞-核 DNA 断片模型检测受试物与 DNA 交互作用的能力; 用未经羟自由基处理的脱细胞-核 DNA 模型检测受试物导致 DNA 断裂的程度。两种模型均为每组 6 个平行板, 处理时间均为 60 min, 用彗星实验检测 DNA 拖尾情况, 每张板用彗星分析软件(Comet A1.0)分析 50 个脱细胞-核 DNA, 组间差异用 SPSS 18.0 软件进行统计学分析。结果 经甲醛处理的脱细胞-核 DNA 断片模型无 DNA 片段泳出; 经乙醛处理的脱细胞-核 DNA 断片模型中 DNA 片段泳出量明显低于对照组; 其他醛类对脱细胞-核 DNA 断片模型的 DNA 断片泳出量与对照组比较差异无统计学意义; 所有醛类均未导致未经羟自由基处理的脱细胞-核 DNA 模型的 DNA 断裂。结论 甲醛和乙醛均可直接与脱细胞-核 DNA 断片形成加合物和/或产生 DNA-DNA 交联, 且形成加合物和/或 DNA-DNA 交联的能力随醛类烷基数量的增加而减弱。

关键词:脱细胞 DNA; 彗星试验; 醛类; DNA 加合物

中图分类号: R155; R99 文献标志码: A 文章编号: 1004-8456(2014)06-0524-04

DOI: 10.13590/j.cjfh.2014.06.002

Effect of different alkyl aldehydes on acellular-nuclear DNA

LI Qian, SU Qing, ZHANG Wen-zhong, JIA Xu-dong, LI Ning, ZHANG Li-shi

(West China School of Public Health Sichuan University, Sichuan Chengdu 610041, China)

Abstract: Objective To explore the impact of formaldehyde, acetaldehyde, propionaldehyde, butyraldehyde, hexanal, and pentanal on acellular-nuclear DNA. **Methods** Different alkyl aldehydes were respectively dissolved in buffer to final

收稿日期: 2014-09-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(81373009); “十二五”国家科技支撑重大计划项目(2012BAK01B04)

作者简介: 李谦 女 研究生 研究方向为食品毒理 E-mail: liqian19911991@163.com

通讯作者: 张文众 男 教授 研究方向为食品毒理 E-mail: zhangwz2002@sina.com

张立实 男 教授 研究方向为食品毒理 E-mail: shizhang_56@163.com

concentration of 10 mmol/L. Fragment acellular-nuclear DNA pretreated with the hydroxyl radical was used to detect the interaction capabilities of test substance and DNA, intact acellular-nuclear DNA was used to detect breakage effect of test substance. Six slides with acellular-nuclear DNA, in each group, were immersed in test substances for 60 min, and comet assay was used to measure the changes of the acellular DNA, and 50 acellular-nuclear DNAs were analyzed with Comet A1.0 software in each slide. SPSS 18.0 software was used to compare the difference among groups. **Results** No fragment of acellular-nuclear DNA treated with formaldehyde migrated to tail, and fragment migration of acellular-nuclear DNA treated with acetaldehyde was more than control. All aldehydes showed no breakage on intact acellular-nuclear DNA. **Conclusion** Formaldehyde and acetaldehyde could form adducts and/or cross-linked with fragment of acellular-nuclear DNA. The capacity of forming adducts and or cross-linked with fragment of acellular-nuclear DNA decreased with the alkyl number of aldehyde increasing.

Key words: Acellular DNA; comet assay; aldehydes; DNA adducts

室内空气污染是环境和健康科学研究的热点,造成空气污染的醛类化合物属于挥发性有机化合物,由于醛类化合物与人们的生产生活密切相关而受到研究者的广泛关注。甲醛、乙醛是环境中典型的醛类污染物,其来源广泛、毒效应多,且是潜在的致癌物。国际癌症研究中心已经将甲醛列于 2A 组致癌物,乙醛列于 2B 组致癌物^[1]。甲醛的致癌机制包括能够引起 DNA-蛋白质交联、DNA-DNA 交联和形成 DNA 加合物^[2-5]。乙醛-DNA 加合物的研究也已开展^[6-8]。一般认为甲醛的致癌机制是攻击 DNA 分子上的鸟苷 N2 位形成不稳定的希夫碱,然后由细胞内还原系统还原成稳定的 N2-乙基-3'-脱氧鸟苷加合物^[9]。有研究报道乙醛形成 DNA-蛋白质交联和蛋白质加合物^[10-12]。杨丽娟等^[13]研究表明甲醛可直接与脱细胞-核 DNA 断片模型中 DNA 片段形成加合物和/或 DNA-DNA 交联。本研究拟采用脱细胞-核 DNA 模型,研究不同醛类与 DNA 的直接作用形式以及不同醛类与 DNA 作用之间的差别进行初步探索。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器与试剂

NIKON 55i 荧光显微镜(中国尼康),低温高速离心机,甲醛(AR)、乙醛(AR)、丙醛(CP)、丁醛(CP)、戊醛(纯度为 98%)、己醛(纯度为 97%)均购自国药集团化学试剂北京有限公司,细胞培养基 1640 培养液(美国 Gibco),彗星实验高通量电泳平台、彗星实验高通量试剂盒和彗星图像智能分析软件(Comet A1.0)均购自北京博乐通生物科技有限公司。

1.2 方法

1.2.1 脱细胞-核 DNA 的制作和储存

参考文献[14]并进一步优化方法,选用未经处理、生长状态好的淋巴瘤细胞(YAC-1 细胞),用 1640 完全培养基调整细胞浓度为 10^4 个/ml,将细胞悬液 10 μ l 细胞加入 90 μ l 1% 低熔点琼脂糖,铺在已铺有 1% 的正常熔点琼脂糖的载玻片上,并立即盖上盖玻

片,置 4 $^{\circ}$ C 10 min 固化,移去盖玻片,将载玻片浸没于裂解液(25 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na_2EDTA , 10 mmol/L Tris, 1% 肌酐酸钠,用 NaOH 将溶液调至 pH = 10,用前加入 1% Triton X-100, 10% DMSO), 4 $^{\circ}$ C 下避光裂解 1.5 h,裂解液用前放入冰箱 4 $^{\circ}$ C 30 min,经裂解去除细胞的细胞膜与核膜,做成细胞核 DNA 板。该细胞核 DNA 板的包埋剂可维持细胞核 DNA 的完整性(完整性:即维持其圆球形不变, DNA 链无断裂),而且包埋剂具有分子筛作用,即小分子物质可直接与 DNA 相互作用,染毒结束后直接电泳即可检测 DNA 断裂情况。在碱性条件下, DNA 片段带负电荷,在电场中通过凝胶介质向正极移动, DNA 片段越小在电场中的泳动速度越快。

1.2.2 脱细胞-核 DNA 断片模型的制作

把脱细胞-核 DNA 置于 1 mmol/L 羟自由基(Fenton 反应,硫酸亚铁和双氧水反应体系)溶液 8 min,用缓冲液(2 mol/L Tris-HCl, pH = 7.2)洗涤 3 次,每次浸泡 5 min。

1.2.3 醛类染毒试验

参考文献[13]进行剂量设计,分别将甲醛、乙醛、丙醛、丁醛、戊醛、己醛用缓冲液配成浓度为 10 mmol/L 的溶液进行染毒,7 个试验组(缓冲液对照组、甲醛组、乙醛组、丙醛组、丁醛组、戊醛组、己醛组),每组 12 张载玻片,羟自由基处理过的脱细胞-核 DNA 板和未处理的脱细胞-核 DNA 板各 6 张,置于各试验组溶液中,4 $^{\circ}$ C 染毒 60 min 后进行电泳。

1.2.4 脱细胞-核 DNA 板的检测

采用彗星实验检测脱细胞-核 DNA 损伤情况,用 Comet A1.0 分析彗星长、尾长、OLIVE 尾距、尾 DNA 含量作为结果判断的参数,具体方法参照文献[15]。

1.3 统计学分析

结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用统计分析软件 SPSS 11.0 单因素方差分析法比较组间差异,方差齐时用最小显著性差法,方差不齐时用 Games-Howell 法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脱细胞-核 DNA 断片模型

由表1可知,用1 mmol/L 羟自由基处理后的脱细胞-核 DNA 与未处理的脱细胞-核 DNA 相比,以

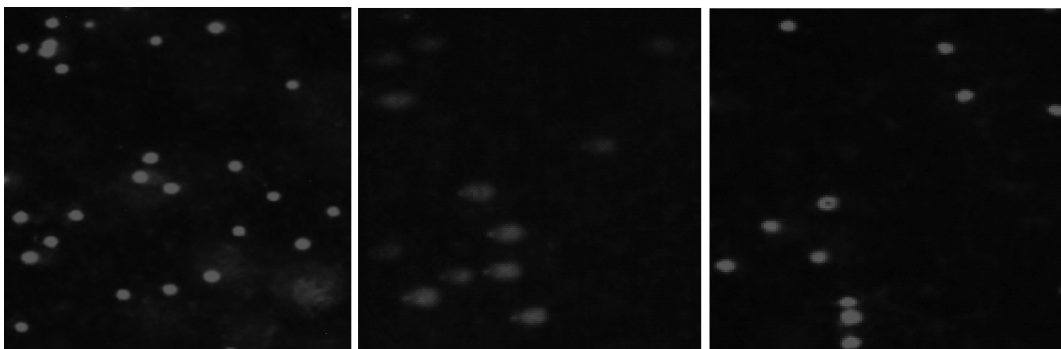
彗星长、尾长、OLIVE 尾距、尾 DNA 含量和尾/头(长)作为分析指标,羟基处理后脱细胞-核 DNA 损伤明显,荧光显微镜照片如图1所示。

表1 脱细胞-核 DNA 断片模型的构建($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 1 Model of Acellular-nuclear DNA fragments

组别	羟基剂量 /(mmol/L)	彗星长 / μm	尾长 / μm	Olive 尾距	尾 DNA 含量 /%
羟基处理未电泳	1	46.47 \pm 3.01	0.11 \pm 0.10	0.05 \pm 0.01	0.03 \pm 0.01
羟基处理并电泳	1	96.77 \pm 3.89*	85.63 \pm 1.07*	56.43 \pm 0.08*	91.90 \pm 3.85*
未处理组电泳	0	47.38 \pm 2.43	0.10 \pm 0.07	0.05 \pm 0.01	0.04 \pm 0.01

注: * 表示与未处理组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$



A. 经自由基处理未电泳

B. 自由基处理后电泳

C. 未经自由基处理电泳

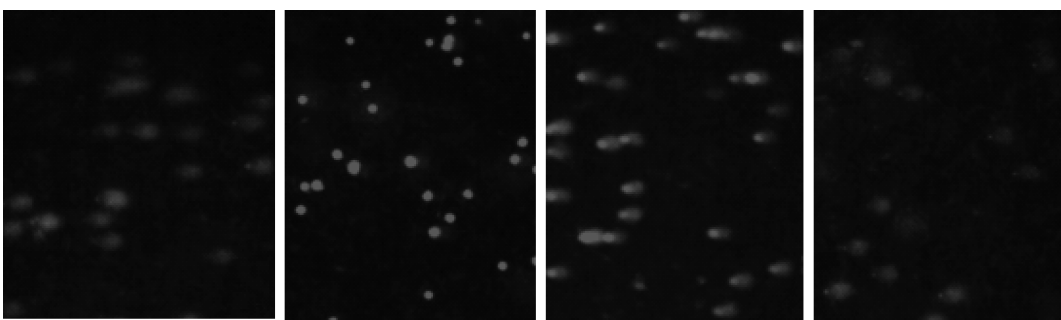
图1 脱细胞-核 DNA 损伤试验荧光显微镜图

Figure 1 Comet assay pictures of acellular-nuclear DNA fragment

2.2 醛类对 DNA 断片的影响

以彗星长、尾长、OLIVE 尾距、尾 DNA 含量作为分析指标,可见甲醛和乙醛处理后的断片脱细胞-核 DNA 的彗星实验尾部 DNA 与对照组相比明显减少,且经甲醛处理的断片脱细胞-核 DNA 的彗星实

验未见拖尾,经乙醛处理的断片脱细胞-核 DNA 彗星实验尾部 DNA 明显低于对照组。而丙醛、丁醛、戊醛和己醛暴露对 DNA 的损伤与对照组相比并未见明显差异,见图2、表2。



A. 自由基损伤

B. 甲醛组

C. 乙醛组

D. 其他醛类组

图2 醛类化合物暴露对脱细胞-核 DNA 影响试验荧光显微镜图

Figure 2 Comet assay pictures of acellular-nuclear DNA fragment after treatment with aldehyde compounds

表2 醛类对羟自由基处理后脱细胞-核 DNA 的影响($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Impact of aldehydes on acellular-nuclear DNA treated with hydroxyl radical

组别	剂量/(mmol/L)	彗星长/ μm	尾长/ μm	Olive 尾距	尾 DNA 含量/%
对照	0	96.40 \pm 4.26	82.0 \pm 7.44	58.71 \pm 5.82	92.21 \pm 1.40
甲醛	10	47.44 \pm 6.34*	0.00 \pm 0.00*	0.00 \pm 0.00*	0.00 \pm 0.00*
乙醛	10	50.27 \pm 1.39*	7.03 \pm 1.47*	2.77 \pm 0.98*	11.20 \pm 1.97*
丙醛	10	102.86 \pm 8.03	86.14 \pm 8.04	61.84 \pm 5.84	92.62 \pm 0.68
丁醛	10	85.33 \pm 3.06	67.33 \pm 4.96	48.28 \pm 3.92	92.30 \pm 0.74
戊醛	10	106.00 \pm 10.01	93.50 \pm 12.72	67.11 \pm 9.41	92.38 \pm 1.18
己醛	10	100.71 \pm 6.96	83.57 \pm 6.88	59.78 \pm 5.01	92.30 \pm 0.65

注: * 表示与对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$

2.3 醛类对完整脱细胞-核 DNA 的影响

用醛类对未经自由基处理的完整脱细胞-核 DNA 染毒,以彗星长、尾长、OLIVE 尾距、尾 DNA 含量作为分析指标,不同醛类对脱细胞-核 DNA 未观察到损伤。

3 讨论

研究显示^[13],甲醛导致 DNA 损伤的主要机制是其羟基亲电性和较小的空间位阻,以及可诱发自由基效应,活泼的醛基使得它们不经过代谢就能攻击亲核基团,如核酸和蛋白质等生物大分子物质。本研究表明,甲醛和乙醛均可与 DNA 断片形成加合物和/或交联物而使断片在电场中无法迁移。用彗星试验检测受试物对 DNA 断片的影响,试验发现甲醛和乙醛组分别表现为尾部无 DNA 和尾部 DNA 减少,其他醛类均无明显影响,这种结果提示醛类与 DNA 形成加合物的能力随着烷基数量增加,形成加合物的能力越来越弱。

试验证明^[16-18]甲醛对所有哺乳动物细胞均有损伤作用。Merk 等^[19]对甲醛的遗传毒性作了多次研究,但却未发现甲醛导致 DNA 断裂,但 Frenzilli 等^[20]报道,甲醛对 DNA 损伤表现为,低剂量时主要导致断裂,高剂量时主要导致交联,李睿等^[21]对甲醛研究结果与 Frenzilli 研究一致,且存在良好的剂量-效应关系。本研究表明不同烷基醛类浓度为 10 mmol/L 时对脱细胞 DNA 无致断裂作用,提示醛类可能需要经过影响生物系统的代谢产生自由基才能导致 DNA 断裂。

检测受试物与 DNA 形成加合物和/或交联的方法较多。如 P³²-后标记法、加速器质谱技术、色谱/质谱法、免疫法、荧光法等,但是上述方法也有诸多限制因素,如涉及到放射性核素的标记、对实验场地有特殊要求、操作复杂、仪器昂贵、检测成本高等。本研究采用羟自由基处理后的脱细胞 DNA 断片检测醛类形成加合物的能力具有操作简便、快速、灵敏、无需放射性标记、所需细胞数少、适用性广的特点。因此可用于筛选可以和 DNA 形成加合物和/或交联的化学物质。

由于本试验主要研究不同烷基醛类对细胞核 DNA 的影响,属于亚细胞水平;尚需进一步在整体细胞和动物水平研究不同剂量下的生物效应。

参考文献

[1] 方家龙,刘玉英.乙醛的毒性[J].国外医学卫生学分册,1996,23(2):101-104.
[2] Conaway C C, Whysner J, Verna L K, et al. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from

DNA adduct formation[J]. Pharmacol Ther,1996,71(1/2):29-55.
[3] Fennell T R. Development of methods for measuring biological markers of formaldehyde exposures[J]. Rep Eff Health Ins, 1994(67):1-26.
[4] Morris J B. Dosimetry, toxicity and carcinogenicity of inspired acetaldehyde in the rat[J]. Mutres,1997,380(1/2):113-124.
[5] Zimmerman B T, Crawford G D, Dahl R, et al. Mechanisms of acetaldehyde mediated growth inhibition: delayed cell cycle progression and induction of apoptosis[J]. Alcohol Clin Exp Res, 1995,19(2):434-440.
[6] Hemminki K, Suni R. Sites of reaction of glutaraldehyde and acetaldehyde with nucleosides[J]. Archives of Toxicology,1984, 55(33):186-190.
[7] Austin J, Dosanjh M K, Conrat H F. Further studies of the mixed acetals of nucleotides[J]. Biochimie,1993,75(7):511-515.
[8] Kuykendall J R, Matthew S. Bogdanffy. Formation and stability of acetaldehyde-induced crosslinks between poly-lysine and poly-deoxyguanosine[J]. Mut Res,1994,311(1):49-56.
[9] JIA L F, Vaca C E. Development of a 32P-postlabelling method of the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine 3'-monophosphate and DNA [J]. Carcinogenesis,1997,18(4):627-633.
[10] Ristow H, Seyfarth A, Lochman E R. Chromosomal damages by ethanol and acetaldehyde in *Saccharomyces cerevisiae* as studied pulsed field gel electrophoresis[J]. Mut Res,1995,326(2):165-170.
[11] Nicholls R, Jersey D, Worrall S. Modification of proteins and other biological molecules by acetaldehyde: adduct structure and functional significance[J]. Int J Biochemistry,1992,24(12):1899-1906.
[12] Castro G D, Delgado-de L A M, Castro J A. Liver nuclear ethanol metabolizing systems (NEMS) producing acetaldehyde and 1-hydroxyethyl free radicals[J]. Toxicology,1998,129(2/3):137-144.
[13] 杨丽娟,王越越,朱海燕. 甲醛对脱细胞 DNA 的影响[J]. 卫生研究. 2013,42(1):143-146.
[14] Kawaguchi S, Nakamura T, Honda G, et al. Detection of DNA single strand breaks induced by chemical mutagens using the acellular comet assay[J]. Genes and Environment. 2008,30(3):77-88.
[15] 张馨,李万湖,刘玉梅,等. 多层电泳槽在彗星试验中的应用[J]. 中国食品卫生杂志. 2011,23(2):141-143.
[16] 董红燕,刘君卓,陈冠英. 甲醛对豚鼠肺巨噬细胞 DNA 的损伤作用[J]. 环境与健康杂志,1998,15(1):253-256.
[17] Lovsehll H, Eiskjaer M, Arenhoh D. Formaldehyde cytotoxicity in three human cell types assessed in three different assays [J]. Toxicol in Vitro,2002,16(1):63-69.
[18] 刘延君,林哲询,李慧,等. 彗星电泳法和 K-SDS 法检测甲醛和 H₂O₂ 对人脐静脉内皮细胞 DNA 的损伤[J]. 癌变·畸变·突变,2005,17(4):8-11.
[19] Merk O, Speit G. Significance of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks for mutagenesis [J]. Environ Mol Mutagen, 1998,32(3):260-268.
[20] Frenzilli G, Bosco E, Barale R. Validation of single cell gel assay in human leukocytes with 18 reference compounds [J]. Mutat Res,2000,468(2):93-108.
[21] 李睿,鲁志松,乔琰,等. 甲醛对 DNA 损伤的彗星实验研究[J]. 实验生物学报,2004,37(4):262-268.