

·学科进展·

DNA 加合物研究及在环境毒理学中的应用

徐立红

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

[摘要] 致癌物在生物体内经解毒系统诱导与生物体内的 DNA 形成加合物, DNA 加合物综合反映了生物体对致癌物的暴露、吸收、分布、代谢以及机体对 DNA 的修复能力, 是致癌物有效作用的量度, 与致癌作用直接相关。目前较多用于 DNA 加合物测定的方法是³²P 后标记技术。DNA 加合物作为一项反映人群暴露于致癌物的指标在肿瘤分子流行病学研究中得到了较好的应用, 鱼与哺乳动物一样可活化致癌物形成 DNA 加合物, 由于解毒系统不完善及 DNA 修复能力差而对致癌物特别敏感, 因此鱼及其他水生动物的 DNA 加合物研究受到重视并且一直引人注目。因此, DNA 加合物作为指标用于环境毒理学研究应该大力发展和建立以鱼为模式动物的实验系统来筛选潜在致癌物和检测水环境中的致癌物。

[关键词] DNA 加合物, 肿瘤流行病学, 水毒理学, 致癌物监测, 潜在致癌物筛选

肿瘤是对人类健康威胁极大的一类疾病, 人类 90% 的肿瘤是由人工合成有机化学物引起的, 现在已有 200 万种有机物被合成并以每年新增 25 万种的速度不断增加, 而当今世界有机化学物与人们的日常生活关系越来越密切, 这就对人类发出了警告。肿瘤发生、形成的机理是最受关注的研究内容, 目前已经肯定了肿瘤形成的多步骤多阶段理论。从细胞癌变到肿瘤形成再到转移、浸润, 其间主要经过起始、促进、演进、转移几个阶段, 化学致癌物正是在肿瘤形成的起始阶段起着关键的作用。

目前研究已肯定, 化学致癌物进入到生物体内后, 作用于细胞内的 DNA, 对 DNA 的结构和稳定性产生影响, 导致链断裂、碱基被修饰等。若这些发生在 DNA 分子上的改变逃脱了生物体内的修复或被不正确的修复, 则将导致遗传信息的改变而诱发变异。因此化学物对 DNA 的修饰是化学物致癌过程的起始。研究表明, 许多化学物对 DNA 产生影响的方式是化学物在体内经代谢活化后与遗传物质 DNA 共价连接, 形成 DNA 加合物。任何可与 DNA 形成加合物的物质, 都可认为有致畸致癌的潜在危害。

1 DNA 加合物形成、测定及毒理学意义

化学物尤其是亲脂性化学物进入生物体内后经体内的多功能氧化酶系统活化, 产生中间代谢物, 有的被生物解毒系统第 2 阶段酶作用与体内小分子形成低毒易排出体外的物质, 而有些具有强亲电性的中间物与 DNA 的亲核中心发生反应, 与 DNA 形成稳定的加合物。最早关于 DNA 加合物的研究是 Brooks 和 Lawley 于 1964 年在《Nature》上关于 PAH 与 DNA 形成加合物的报道。DNA 加合物的形成及持久性取决于生物体暴露于化学物的浓度及时间、生物体对化学物的吸收、代谢以及生物体对 DNA 损伤的修复能力。因此, DNA 加合物是生物体暴露于致癌物的有效剂量及致癌物在体内产生的有效作用的综合表现。

加合物测定方法是加合物研究的关键内容, 这种测定的难处在于要在大量正常的碱基中测到含量极低的发生改变的碱基。用于测定 DNA 加合物的方法有免疫法, TLC 法, HPLC-荧光法, GC/SIM 等, 而适用性最广的是³²P 后标记法。

³²P 后标记法由 Randerath 及合作者于 1981 年首

国家自然科学基金资助项目, 批准号 39870157.

本文于 1999 年 3 月 3 日收到.

次报道。这种方法的原理是:当DNA分子中的碱基与外来化学物形成加合物后,其水解后的单核苷酸层析行为与正常的核苷酸不同,借此可将它们分离。基本步骤是,将生物体内靶组织中DNA分离纯化,用核酸酶将其水解为单核苷酸,用 γ - ^{32}P -ATP将单核苷酸标记为3,5-二磷酸核苷酸,通过二维多相层析将正常的单核苷酸与带加合基团的核苷酸分离并将各种带加合基团的单核苷酸分离,用放射性计数对加合物定量。该方法的优点是无需知道待研究物质的化学结构及组成,得到的是所有可与DNA结合的物质与DNA形成的加合物的总量,因此可检测由不同化学物与DNA结合成的加合物,同时适用于单一物质和混合物形成的加合物,具有广泛意义,可用于任何生物样品。该方法自建立后,又有不同改进,主要是富集DNA加合物的量以提高检测灵敏度。现在可检测到每 10^8 — 10^{10} 个核苷酸中一个碱基的加合物,且DNA用量仅 $1\mu\text{g}$ 即可。

在DNA加合物检测方法的研究上,一方面人们在努力探索新的技术,以提高方法灵敏度并能对特定加合物进行定性检测。随着仪器技术的发展,有一些新的检测方法可用于DNA加合物的测定,如用毛细管电泳技术,可对修饰的和未修饰的核苷酸进行分离,并且需要的样品量极少,DNA测序技术也可用于DNA加合物的检测。另一方面,当DNA加合物已被作为一项生物标志物较多接受和采用并已用于多学科领域的研究时,对已有的广泛采用方法的标准化也是目前人们希望解决的问题。

通过对加合物研究可以了解致癌物代谢方式及致癌作用的活性形式,从而对致癌机理有深入了解。用已知的致癌物进行室内实验是加合物研究中十分重要的内容。研究最早也最多的是典型的强致癌物苯并芘和黄曲霉素。许多测定方法的建立也是以这2种物质作为研究对象。对DNA加合物研究包括致癌物浓度与加合物生成量的关系,加合物量与致癌物致癌效应的关系,加合物形成与其他遗传学效应的关系,加合物在靶组织中的水平及加合物水平与肿瘤的关系等等。

DNA加合物作为一项反映致癌物与大分子之间作用的有意义的生物标志物在医学、毒理学、环境科学等相关领域的研究中得到了应用。

2 DNA加合物作为生物标志物用于肿瘤流行病学研究

在判断环境污染物对人类健康影响方面,毒理

学与流行病学研究所得到的信息是互相补充的,在大量的毒理学研究结论的基础上,DNA加合物作为一项反映人群暴露于致癌物的生物标志物在肿瘤分子流行病学研究中得到了较好的应用。虽然不是直接以人体靶组织作为样本,但其他外周组织的DNA加合物水平可以反映人群暴露情况,并且具有一定规律。将DNA加合物用于人群监测,例如对职业暴露、非职业暴露和吸烟人群DNA加合物的研究,目前已表明在人体可形成加合物的化学物包括PAH类,亚硝胺类,芳香胺类,杂环胺类,烷基类化疗剂,黄曲霉素等。这些物质来源于空气,水,食物,与人们的生活密切相关。

最早关于职业暴露引发癌症的例子是发现烟卤清扫工人极易患皮肤癌,由于烟尘中含有大量PAH。从事焦炉、铸造和沥青作业的工人白细胞中多环芳烃DNA加合物的含量与环境PAH浓度有非常明显的关系。环境暴露(非职业暴露)于致癌物可导致人群DNA加合物水平升高,研究发现当空气中PAH浓度呈季节性变化时,人群白细胞加合物水平也呈季节性变化^[1]。关于吸烟人群DNA加合物研究的结果亦是十分有意义的,几乎所有有关的研究都证实吸烟与体内DNA加合物的含量相关,至少戒烟5年以上DNA加合物水平才可降至非吸烟者的水平。吸烟会直接或间接增加DNA加合物水平,吸烟导致形成的加合物水平远远高于煤燃烧导致形成的DNA加合物水平^[2]。

DNA加合物在癌症研究尤其是肿瘤流行病学研究中起到了不可低估的作用,这种信息比调查数据和环境测量数据更客观、真实,在难以获得精确的测定数据,如由食物摄入的致癌物量的情况下更是如此,可以反映人群暴露于致癌物包括复合物的情况并由此判断致癌物对人的早期影响等。

DNA加合物研究也被用于临床,如用血细胞、外周血淋巴细胞,鼻粘膜、尿样作为样本,发现样品的DNA加合物水平与肿瘤存在一定的关系,或用 ^{32}P 后标记法检测铂-DNA加合物,改进含铂药物对肿瘤化疗的效果^[3]。

3 DNA加合物的水毒理学研究

早在1964年,动物流行病学研究就已经发现,污染地区的鱼肝组织可以形成病变,饲料中黄曲霉素可导致鱼肝脏肿瘤。现在对鱼的肿瘤病理学已了解得很清楚,鱼组织病变主要发生在肝、肾、胃、鳃,鱼的器官在结构上与哺乳动物不同,但鱼的肿瘤却

与哺乳动物的在组织学上很类似,许多对啮齿类和人类致癌的物质也可以引起鱼的不同器官的肿瘤。实际上,鱼体中也存在着与高等动物解毒系统类似的2阶段解毒系统,虽然复杂但不完善,相比之下,它们的第1阶段解毒系统酶活力高,可以活化致癌原,但第2阶段解毒系统酶活力低,中间代谢产物不易排出体外,这就决定了鱼可以活化致癌原,但代谢产物的排除较哺乳动物则不容易。研究还发现鱼中的DNA修复酶如O⁶-甲基鸟嘌呤-DNA甲基转移酶活力很低,不足以去除O⁶烷基化鸟嘌呤加合物,程序外DNA合成方法检测证明了鱼体DNA修复能力差。这些特点决定了鱼对致癌物特别敏感,对鱼的DNA加合物研究也因此引起注意并得以迅速发展,除了鱼,贝也是常用于进行DNA加合物研究的水生生物。

用水生生物进行DNA加合物研究的一个重要内容是与用哺乳动物进行研究得到的结果进行比较并将它们作为模式系统进一步研究致癌物作用机理。用典型的强致癌物研究在鱼体中形成加合物的情况,发现主要的苯并芘和黄曲毒素在鱼中产生的DNA加合物与在哺乳动物中的一样。在哺乳动物中,致癌物与DNA形成加合物与其致癌作用有较好的相关性,在鱼中也得到了证实。如用4种结构类似的黄曲毒素对硬头鲂进行食物暴露,结果表明4种黄曲毒素致癌作用的差异可从DNA加合物形成的量上表现出来^[4]。

用鱼作为实验系统可对致癌物作用机理进行深入研究,Hsu等人研究BaP诱导斑马鱼不同器官形成加合物的情况,结果表明,在鱼肠、肝、脑、精巢中,肠是最敏感的,尤其是在低PAH浓度下^[5]。实验室研究中用侧枝鳃暴露于含PAH的沉积物,结合肝脏DNA加合物分析及其他测定,证明致癌物引起的DNA损伤在鱼体中不易修复^[6]。在Harvey的室内研究中,将贝暴露于遗传毒性物质,研究加合物的形成、去除、持续性,结果表明,加合物形成与遗传毒性物质的吸收、活化有关,在停止暴露后56天,加合物仍然存在^[7,8]。

鱼对致癌物比哺乳动物更为敏感,致癌物对鱼的作用模式与哺乳动物的具有可比性,研究结果可以外推到哺乳动物,因而是理想的致癌物研究材料。与哺乳动物模式相比,用鱼作为实验系统还有一些优点,鱼的养殖成本低,因而容易获得统计学资料;鱼可以有多种致毒途径,可从不同途径研究作用机理;已知的真骨鱼有20 000多种,比用有限的哺乳

动物模式可提供更有说服意义的信息。这些使得鱼用于致癌物研究具有独到的优点。因此,用水生生物作为致癌物研究的模式系统得到重视,水毒理学研究不仅为致癌物作用机理研究提供了重要信息,也为将DNA加合物作为生物标志物用于环境监测打下了基础。

4 DNA加合物在环境监测中的应用

DNA是致癌物作用的靶分子,DNA加合物在化学物致癌起始过程中有重要作用,其水平与致癌能力相关,任何可与DNA形成加合物的化学物,即使在很低水平,都应该认为有致癌与致突变的可能性。所以,对环境中生物样品DNA加合物的检测可以判断环境中是否存在潜在致癌物。检测DNA加合物的方法则首选³²P后标记技术,它不仅灵敏度高而且可用于检测未知物或混合物与DNA的相互作用形成的加合物,尤为适合于环境监测。

水环境中含有大量有可能与DNA等遗传物质作用的天然的和合成的化合物,随着工业化的加速,这些物质将越来越多,这就需要有合适的方法对它们的潜在危害作出评价。虽然在毒理学研究中水生生物被大量用作研究材料,但更具有优势的是在水生态毒理学研究中,由于它们在水生态系统中的特殊地位,鱼或贝的DNA加合物检测可直接反映水环境中致癌物的存在,因此它们在研究和预测环境致癌物对水质和水生态系统的影响方面的作用是其他生物无法替代的,而对水产品中DNA加合物的测定,更可以了解致癌物在这些生物中的活化及代谢并判断它们作为食物可能对人体带来的影响。

水环境中水生生物可暴露来源于水、食物和沉积物的致癌物,通过特定生活习性生物,如底栖鱼体DNA加合物的研究,可以判断沉积物中污染物的性质。油泄漏常造成沿海水环境的污染,潮间带鱼的鱼体中DNA加合物水平明显高于未受到油污染地区鱼的,因此可以用作暴露于这类遗传毒性物质的指标^[9]。污染地区鱼体中DNA加合物及芳烃羟化酶活力等是鱼受到污染物的生物学损伤的早期生物标志物。常用于海洋生物监测的鱼体中DNA加合物的水平与沉积物中污染物水平相关,表明可以用来指示水生生物暴露于遗传毒物的情况^[10,11]。

贝类为固着生物,它的鳃、肝胰腺均可检测到DNA加合物,用于环境监测有其独到的优点,可较为明确地反映特定地区的水质状况。关于贝类DNA加合物的研究有很多,本实验室与香港城市大

学进行合作研究中就是充分利用贝的这一特点。将贝放置于香港海湾 PAH 污染程度不同地区,一个月后对贝进行 DNA 加合物分析和 PAH 分析,发现两者之间存在很好的相关性,PAH 含量高地区的贝类鳃中 DNA 加合物含量也高。

值得注意的是,蚯蚓作为生态毒理学研究材料,近 10—20 年里引起了重视。研究表明,暴露于土壤中 PAH 在 1—2 周后,可检测到蚯蚓体内形成的 DNA 加合物。这种生物在环境监测中也是十分有价值的^[12]。

5 用 DNA 加合物作为指标检测和筛选致癌物

如何评价有机化学物的潜在致癌作用,如何去发现环境中可能存在的化学致癌物,解决这些问题对于减少肿瘤对人类的危害是十分有意义的。DNA 加合物反映了化学致癌物与 DNA 的作用,与致癌物作用直接相关,因此可以用来评价和预测化学物的潜在致癌性。水生生物尤其是鱼由于对致癌物敏感,而且可以直接指示水环境中存在的致癌物,是一种理想的用来进行致癌物检测和筛选的模式系统,正因为如此,国外对鱼的 DNA 加合物研究受到越来越多的重视并且一直引人注目。

根据国内外研究现状及已有的研究基础,我们认为下列方面以后应开展更深入的研究:

(1)建立用鱼进行致癌物检测与筛选的模式系统。如前所述鱼由于对 DNA 损伤修复能力差,因而可较为灵敏地反映化学物与 DNA 形成加合物的能力,而鱼在水生态系统中的重要作用,更是特别适合用来检测水体中存在的潜在致癌物。

(2)对日常生活中常用的化学品的潜在致癌性进行研究。无论是国内还是国外,目前室内研究多是以已知的强致癌物为对象,而要将其发展为一种方法并能具有广阔的应用前景,应当对更多的与人类日常生活密切相关的而尚不知是否有致癌作用的化学物进行研究。

(3)对天然水体中鱼样的 DNA 加合物测定及相应水体的水和沉积物诱导鱼形成 DNA 加合物的能力的实验室研究。具有渔业价值和日常生活用途(饮用、游泳等)的水体与人类生活关系密切,如果含

有潜在致癌物,对人类健康影响极大,而对流行病学调查已显示癌症发病率高的水体更应该引起高度重视,对这样水体的水和沉积物中的有机物潜在致癌作用的判断,将为流行病学研究探讨高癌症发病根源提供更完整的资料。

参 考 文 献

- [1] Hemminki K. DNA adduct studies in occupational, environmental and medical settings. Biomarkers Conference, May 4—8, 1997, Charleston, SC, USA.
- [2] Chen C C, Lee H. Genotoxicity and DNA adduct formation of incense smoke condensates: Comparison with environmental tobacco smoke condensates. *Mutation Research*, 1996, **367**(3): 105—114.
- [3] Welters M J P, Maliepaard M, Jacobs-Bergmans et al. Improving ³²P-postlabelling assay for the quantification of the major platinum-DNA adducts. *Carcinogenesis*, 1997, **18**(9):1767—1774.
- [4] Bailey G S, Dashwood R, Loveland P M et al. Molecular dosimetry in fish: Quantitative target organ DNA adduction and hepatocarcinogenicity for four aflatoxins by two exposure routes in rainbow trout. *Mutation Research*, 1998, **399**(2):233—244.
- [5] Hsu T, Deng Fuh-Yeu. Studies on the susceptibility of various organs of zebrafish (*Brachydanio rerio*) to benzo(a)pyrene-induced DNA adduct formation. *Chemosphere*, 1996, **33**(10):1975—1980.
- [6] French B L, Reichert W L, Hom T et al. Accumulation and dose-response of hepatic DNA adducts in English sole (*Pleuronectes vetulus*) exposed to a gradient of contaminated sediments. *Aquatic Toxicol.*, 1996, **36**(1—2):1—16.
- [7] Harvey J S, Parry J M. The detection of genotoxin-induced DNA adducts in the common mussel *Mytilus edulis*. *Mutagenesis*, 1997, **12**(3): 153—158.
- [8] Harvey J S, Parry J M. The analysis of DNA adduct formation, removal and persistence in the common mussel *Mytilus edulis* exposed to 4-nitroquinoline 1-oxide. *Mutation Research*, 1998, **399**(1):31—42.
- [9] Lyons B P, Harvey J S, Parry M. An initial assessment of the genotoxic impact of the Sea Empress oil spill by the measurement of DNA adduct levels in the intertidal teleost *Lipophrys pholis*. *Mutat. Res. Genet. Toxicol. Environ. Mutag.* 1997, **390**(3):263—268.
- [10] Harvey J S, Lyons B P, Waldock M et al. The application of the ³²P-postlabelling to aquatic biomonitoring. *Mutation Research*, 1997, **378**(1—2): 77—88.
- [11] Myer M S, Johnson L L, Hom T et al. Toxicological hepatic lesions in subadult English sole (*Pleuronectes vetulus*) from Puget Sound, Washington, USA: Relationships with other biomarkers of contaminant exposure. *Marine Environmental Research*, 1998, **45**(1):47—67.
- [12] Walsh P, El-Adlouni C, Nadeau D et al. DNA adducts in earthworm exposed to a contaminated oil. *Soil Biology & Biochemistry*, 1997, **29**(3—4): 721—724.

THE STUDY OF DNA ADDUCTS AND ITS APPLICATION IN ENVIRONMENTAL TOXICOLOGY

Xu Lihong

(*Institute of Hydrobiology, CAS, Wuhan 430072*)

Abstract Many genotoxic carcinogens are metabolized to reactive intermediates, which covalently bind to DNA, called DNA adduct. The adducts represent an integration of exposure, absorption, distribution, metabolism, DNA repair, and thus provide a measure of biologically effective dose. The DNA adduct is believed to be involved in carcinogenesis. The major method used in DNA adduct research is ^{32}P -post labeling technique. As a biomarker for carcinogen exposure, DNA adduct has been applied to tumor molecular epidemiology. Fish have been shown to activate carcinogens to products that form DNA adducts which is the same one described in rodents systems. Furthermore fish is more sensitive to carcinogens due to incomplete detoxification system and limited capacity for DNA repair. Therefore studies of DNA adduct of fish as well as other aquatic animals have received great concern and are still a relative new area. For further consideration in environmental toxicology, more efforts should be focused on establishment of fish as model system in order to facilitate the application of DNA adducts in screening and environmental monitoring of carcinogens or precarcinogen.

Key words DNA adducts, tumor epidemiology, aquatic toxicology, carcinogen monitor, screening of potential carcinogen

·资料·信息·

“中国 21 世纪水问题研究”论坛在京举行

1999年5月17—19日,国家自然科学基金委员会“十五”优先资助领域“21世纪核心科学问题”系列论坛之二——“中国21世纪水问题研究”论坛在京举行。

全国人大常委会副委员长、国家自然科学基金委员会管理科学部主任成思危教授出席会议并讲话。他指出,由于水资源具有重要性和稀缺性的特点,因此开展“中国21世纪水问题研究”,对于21世纪中国的可持续发展具有重要的战略意义。他建议在“十五”期间,水问题研究要着重解决改善供应、提高效率、防止灾害和促进发展4方面的问题。他要求,根据研究成果提出的建议必须注意可行性,即做到:技术上可能、经济上合理、法律上允许、操作上可以执行、进度上可行、政治上可行。

来自中国科学院、清华大学等23个单位的38位专家学者参加了会议。与会专家围绕水循环与水

过程、节水与水资源高效利用、水环境污染与控制、水灾害与水资源管理4个主题进行了广泛而深入的研讨。

会议认为,我国人均水资源占有量严重不足,时空分布不均匀特点突出,水资源总体利用率不高,水旱灾害威胁远未解除,水质恶化趋势加剧,水问题将深刻影响21世纪我国第三步战略目标的实现,是国家可持续发展的重要制约因素之一。将水问题研究作为国家自然科学基金“十五”优先资助领域是十分必要的。会议初步提出了以下6个方面的关键科学问题:(1)流域尺度“自然-人工”二元水循环模式研究;(2)不同尺度水循环过程与水资源演化规律研究;(3)高农业节水效率的应用基础研究;(4)水旱灾害及其防灾减灾;(5)水环境污染与生态安全;(6)水资源管理模式。

(政策局 供稿)