

# 胆红素对正己烷致体外外周血淋巴细胞 DNA 损伤的拮抗作用

黎燕<sup>1</sup>, 邵昌松<sup>2</sup>, 杨青<sup>1</sup>, 王绵珍<sup>1</sup>, 沈惠麒<sup>3</sup>

(1. 四川大学华西公共卫生学院劳动卫生教研室, 四川 成都 610041; 2. 深圳市宝安区卫生防疫站, 广东 深圳 518101; 3. 北京大学公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系, 北京 100083)

**摘要:** 目的 研究胆红素 (bilirubin) 对正己烷 (*n*-hexane) 致 DNA 损伤的影响。方法 应用单细胞凝胶电泳 (SCGE) 技术和彗星图像分析系统, 检测不同浓度正己烷对外周血淋巴细胞 DNA 损伤, 同时观察  $10 \mu\text{mol/L}$  胆红素对正己烷所致的 DNA 损伤的保护作用。结果 尾长、尾/头 (长)、尾/头 (光强)、迁移率、尾 DNA%、Olive 尾矩等指标与正己烷浓度存在明显的剂量-效应关系, 发现胆红素能抑制正己烷的 DNA 断裂能力。结论 胆红素有抑制正己烷致 DNA 损伤的作用。

**关键词:** 正己烷; 单细胞凝胶电泳; DNA 损伤; 胆红素

中图分类号: O623.11; R394.6 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2004)03-0152-03

## Protective effect of bilirubin against the damage of *n*-hexane on DNA of peripheral lymphocytes

LI Yan<sup>1</sup>, TAI Chang-song<sup>2</sup>, YANG Qing<sup>1</sup>, WANG Mian-zhen<sup>1</sup>, SHEN Hui-qi<sup>3</sup>

(1. Department of Occupational Health, Huaxi School of Public Health, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Anti-epidemic and Health Station of Bao'an District, Shenzhen 518101, China; 3. Department of Occupational Health, Peking University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** **Objective** To study the effect of bilirubin on DNA damage due to *n*-hexane. **Method** Single cell gel electrophoresis assay was used to observe DNA damage due to *n*-hexane exposure at different doses and the protective effect of bilirubin. **Result** There was dose-response relationship between *n*-hexane exposure levels and the indexes including tail length, tail/head (length and intensity), migration rate, tail% DNA, and Olive tail moment etc., and bilirubin showed a protective effect against the damage on single strand DNA in peripheral lymphocytes. **Conclusion** *n*-Hexane could cause DNA damage in peripheral lymphocytes and the damage could be inhibited by bilirubin.

**Key words:** *n*-Hexane; Single cell gel electrophoresis; DNA damage; Bilirubin

文献表明正己烷具有膜脂质过氧化作用, 可导致膜扩张, 通透性增强, 细胞内酶外逸<sup>[1]</sup>。正己烷能否通过膜脂质过氧化作用或者其他方式损伤 DNA, 从而引发突变或者癌变, 目前尚无定论。胆红素是一种内源性抗氧化剂<sup>[2]</sup>。近年来, 国内外大量的研究表明, 胆红素可有效抑制各种活性氧的产生及脂质过氧化。为探讨正己烷的遗传毒性机制, 证明胆红素对其 DNA 损伤的拮抗作用以及促进受损 DNA 的修复, 为正己烷的中毒防治寻找可能的化学药物, 我们进行了本研究。

## 1 材料与方法

### 1.1 试剂

正己烷为分析纯试剂, 纯度为 99%; 胆红素为 Sigma 公司产品, 由北京大学环境与劳动卫生教研室沈惠麒教授惠赠。

### 1.2 淋巴细胞分离

血样 15 ml, 肝素抗凝, 加等体积的 PBS, 加 6 ml 淋巴细胞分离液, 1 500 r/min 离心 15 min, 吸取中间淋巴细胞层, 再加 PBS 10 ml 洗 2 次。最后用 PBS 定溶, 调整细胞密度为  $1 \times 10^9/\text{L}$ , 制成细胞悬液, 待用。

### 1.3 细胞染毒

分正己烷 100 mmol/L、20 mmol/L、10 mmol/L、2 mmol/L, 正己烷 100 mmol/L、20 mmol/L、10 mmol/L 分别加入终浓度为  $10 \mu\text{mol/L}$  的胆红素以及空白对照 (吐温 80 超声乳化液) 8 组。以上各组胆红素与正己烷同时加入受试细胞悬液中。正己烷受试液分别以吐温 80 为乳化剂超声乳化制成。37℃ 温箱静置染毒 1 h。

### 1.4 单细胞凝胶电泳

采用常规方法<sup>[3]</sup> (每个标本制备 2 个平行片, 18 mm×18 mm)。经铺胶、裂解、电泳、中和、染色后在 Olympus 荧光显微镜下, 选择 515~560 nm 波长激发光照射样本, 通过 590 nm 长通滤光片, 显微镜下

收稿日期: 2003-12-11; 修回日期: 2004-03-11

作者简介: 黎燕 (1977-), 女, 四川南充市人, 硕士, 研究方向: 环境职业卫生分子毒理学。

可见彗星细胞荧光像。同时，用 Nikon 荧光数码相机随机拍摄几个视野下的彗星图像，输入计算机。

### 1.5 统计分析

用 MI1.0 作逐个细胞分析，数据存为 Excel 格式，再将其转入 SPSS 10.0，作多因素方差分析。

## 2 结果

### 2.1 正己烷对人淋巴细胞 DNA 的损伤作用

在本实验条件下，正己烷各剂量组与空白对照组（即未加正己烷和未加胆红素）比较，尾长、尾/头（长）、尾/头（光强）、迁移率、尾 DNA%、Olive 尾矩等指标差异均有显著性 ( $P < 0.05$ )；未加胆红素的正己烷高浓度组与低浓度组两两比较，各测定指标差异有显著性 ( $P < 0.01$ )，见表 1。显微镜下可见随着正己烷剂量的增加，彗星尾长及尾部所占的面积越来越大，头部面积相对减小，荧光减弱，DNA 损伤逐渐加重（见图 1、图 2）。



图 1 100 mmol/L 正己烷组彗星图像

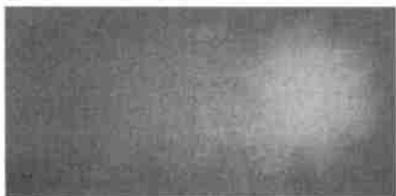


图 2 20 mmol/L 正己烷组彗星图像

### 2.2 胆红素对正己烷致 DNA 损伤的拮抗作用

正己烷+10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素与相同浓度的正己烷组比较各测定指标差异均有显著性 ( $P < 0.01$ )，见表 1。彗星图像比较：彗尾减短，彗星头部面积相对增大，荧光增强，DNA 损伤逐渐减弱（见图 3、图 4）。



图 3 100 mmol/L 正己烷+10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素组彗星图像



图 4 20 mmol/L 正己烷+10  $\mu\text{mol/L}$  胆红素组彗星图像

### 2.3 剂量-反应关系

未加胆红素各组分别以尾长、尾/头（长）、尾/头（光强）、迁移率、尾 DNA%、Olive 尾矩为纵坐标，正己烷浓度为横坐标作相关分析， $\beta$  值分别为 0.714, 0.369, 0.490, 0.690, 0.907, 0.777,  $P$  值均  $< 0.01$ 。说明以上指标与正己烷浓度之间存在剂量-反应关系。

表 1 正己烷致 DNA 损伤及胆红素的拮抗作用 ( $\bar{x} \pm s$ )

正己烷 (mmol/L)	胆红素 ( $\mu\text{mol/L}$ )	<i>n</i>	尾长 ( $\mu\text{m}$ )	尾/头 (长)	尾/头 (光强)	迁移率 (%)	尾 DNA %	Olive 尾矩
0	0	76	19.18±12.69	0.29±0.20	0.44±0.22	1.28±0.16	28.62±10.24	2.85±2.17
2	0	52	58.42±35.85 <sup>a</sup>	0.81±0.61 <sup>a</sup>	0.93±1.09 <sup>a</sup>	1.77±0.73 <sup>a</sup>	40.01±15.03 <sup>a</sup>	11.89±17.03 <sup>a</sup>
10	0	62	85.37±44.89 <sup>ab</sup>	1.09±0.63 <sup>ab</sup>	1.53±0.86 <sup>ab</sup>	1.94±0.59 <sup>ab</sup>	56.03±13.37 <sup>ab</sup>	21.62±15.68 <sup>ab</sup>
10	10	67	21.43±14.29 <sup>#</sup>	0.36±0.25 <sup>#</sup>	0.52±0.29 <sup>#</sup>	1.35±0.24 <sup>#</sup>	31.96±11.15 <sup>#</sup>	3.68±3.02 <sup>#</sup>
20	0	52	118.17±35.73 <sup>ab</sup>	1.50±0.53 <sup>ab</sup>	2.65±0.97 <sup>ab</sup>	2.31±0.42 <sup>ab</sup>	70.58±6.83 <sup>ab</sup>	37.60±14.36 <sup>ab</sup>
20	10	86	30.04±18.12 <sup>#</sup>	0.47±0.30 <sup>#</sup>	0.63±0.29 <sup>#</sup>	1.47±0.26 <sup>#</sup>	36.95±10.62 <sup>#</sup>	5.99±3.86 <sup>#</sup>
100	0	76	146.71±48.97 <sup>ab</sup>	3.38±1.74 <sup>ab</sup>	14.14±15.35 <sup>ab</sup>	3.68±1.42 <sup>ab</sup>	89.83±5.49 <sup>ab</sup>	54.12±21.29 <sup>ab</sup>
100	10	80	54.43±36.53 <sup>#</sup>	0.66±0.57 <sup>#</sup>	0.88±0.78 <sup>#</sup>	1.69±0.46 <sup>#</sup>	40.49±15.11 <sup>#</sup>	12.35±9.83 <sup>#</sup>

*n* 为观测细胞数；a：未加胆红素的正己烷各组与空白对照比较  $P < 0.05$ ；b：未加胆红素的正己烷各组高低浓度两两比较  $P < 0.01$ ；

#：与相同浓度未加胆红素的正己烷组比较  $P < 0.01$

## 3 讨论

正己烷的急性吸入可导致机体氧化还原系统的变化，机体抗氧化损伤的能力受到明显的影响，削弱了

机体清除自由基的能力，从而导致脂质过氧化损伤<sup>[4]</sup>。从本研究结果看，正己烷能够引发淋巴细胞的

(下转第 162 页)

别为0.011, 0.044, 0.008, 0.033); 对照组热应激后10 h, 给药组1 h、2 h 血浆MDA含量与各时相点比较差异无显著性。

### 2.5 动物整体情况

温热复创对照组热应激后4 h、10 h 两个时相点动物于出舱后120 min内各死亡1只; 给药组热应激后10 h时相点有1只于出舱后4 h内死亡。

### 3 讨论

近年来的研究表明, 热暴露后除了引起水盐代谢紊乱外, 还会引起体内脂质过氧化反应的加剧, 自由基产生增加<sup>[4,5]</sup>。因此, 减轻热暴露后体内的脂质过氧化反应对于防止体内重要脏器与组织的氧化损伤具有十分重要的意义。

MDA是脂质过氧化反应链式终止阶段产生的小分子产物, 其含量可以间接反映自由基的产生情况和机体组织细胞的脂质过氧化程度。SOD是机体中重要的抗氧化酶, 可以防止活性氧的损伤效应, 从而减轻在应激状态下的组织损伤。有研究表明, 在高温高湿环境下, 机体通过汗液蒸发散热而丢失大量体液, 使水、电解质代谢紊乱, 加之高温环境下体内氧运输障碍, 出现广泛的脂质过氧化反应, 造成机体SOD活性降低, MDA含量升高<sup>[6]</sup>。这与本实验对照组血浆SOD及MDA含量的变化相一致。应激时由于自由基大量产生, 使血管调节素作用减弱, 微血管通透性升高。加上机体正处于低血容量状态, 而迅速发生循环衰竭<sup>[7]</sup>。实验中动物出舱后120 min内死亡3只可能与此有关。

Vit E是一种脂溶性维生素, 可稳定细胞膜, 使细胞膜处于活动性高、通透性严密的状态, 保护细胞

膜上大量的不饱和脂肪酸不被氧化, 还可保护膜蛋白的活动结构<sup>[8]</sup>。本实验显示给药组动物给予含有维生素C、E等重要抗氧化剂的复合营养素, 能抑制大鼠外周脂质过氧化产物MDA的增加, 同时提高了SOD的活性。因此, 应激前给予复合营养素干预对机体可能有一定的保护作用。

早期采取的干预措施可以减轻和抑制机体的脂质过氧化反应, 减轻机体的损害。SOD与MDA含量的变化对于准确评估应激对机体影响的程度, 把握干预时机从而提高机体对应激的适应能力, 预防并发症的发生有重要意义。关于复合营养素的给药时机、剂量、浓度和给药途径等问题, 有待于进一步研究和探讨。

### 参考文献:

- [1] 吴伟康, 侯灿. 冷应激对老年小鼠体温、血糖浓度和血浆MDA水平的影响[J]. 老年医学杂志, 1991, 11(5): 302.
- [2] 张立颖, 李亚洁, 杨磊, 等. Wistar大鼠II度烫伤模型的建立[J]. 护理研究, 2003, 17(6): 624-625.
- [3] 罗炳德, 邹飞, 万为人, 等. 复方人参制剂对热应激大鼠的保护作用研究[J]. 中国工业医学杂志, 2001, 14(3): 136-138.
- [4] 罗海吉, 孙峻松, 邱仞之, 等. 高温对小鼠脂质过氧化作用的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1995, 13(2): 927.
- [5] 邱仞之, 万为人, 甄洪钧, 等. 热暴露时人体血浆丙二醛和中分子物质含量的初步观察[J]. 解放军预防医学杂志, 1993, 11(1): 708.
- [6] 李权超, 何英强, 谭终意, 等. 湿热应激对小鼠脂质过氧化反应的影响[J]. 解放军预防医学杂志, 1997, 15(5): 353-355.
- [7] Griffith OW, Stuehr DJ. Nitric oxide synthase: Properties and catalytic mechanism[J]. Annu Rev Physiol, 1995, 57: 707-736.
- [8] 陈仁麟. 现代临床营养学[M]. 北京: 人民军医出版社, 1999. 359-361.

(上接第153页)

DNA损伤, 且随着正己烷染毒剂量的增加, DNA损伤程度呈线性增加。因此, 可认为正己烷通过对细胞膜脂质过氧化损伤而引发DNA链的断裂。

近年来随着对血红素—一氧化碳—胆红素系统研究的不断深入, 人们已清楚地认识到胆红素不仅能抑制脂质过氧化, 终止自由基链式反应, 有效地清除自由基, 还可能与GSH的抗氧化作用具有协同作用<sup>[5]</sup>。本研究结果也表明, 10 μmol/L胆红素能够明显抑制正己烷引起的DNA断裂, 促进受损DNA的修复。提示胆红素可能通过清除正己烷产生的自由基而保护了DNA免受损伤。

综上所述, 正己烷可引起淋巴细胞的DNA断裂, 且

有明显的剂量-反应关系。10 μmol/L胆红素可明显抑制正己烷引起的DNA断裂, 促进受损DNA的修复。

### 参考文献:

- [1] Masotto S, Gabriele K. Effects of acute *n*-hexane and 2,5-hexane treatment on the striatal dopaminergic system in mice[J]. J Neural Transm Suppl, 1995(45): 281-285.
- [2] Stocken R. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance[J]. Science, 1987(235): 1043-1046.
- [3] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988(175): 184-191.
- [4] 沈齐英, 刘录. 正己烷致大鼠脂质过氧化损伤的研究[J]. 环境与健康杂志, 2001, 18(2): 86-88.
- [5] 朱守民. DNA损伤修复基因与遗传易感性[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(1): 50-52.