

甲醛致 V79细胞 DNA蛋白质交联作用及其修复

江中发¹, 胡建国², 李宁¹, 张玲¹, 袁春¹, 张本延^{1*}

(1 武汉科技大学医学院, 湖北 武汉 430065 2 杭州经济开发区白杨街道社区卫生服务中心, 浙江 杭州 310018)

摘要: 目的 探讨甲醛诱导 DNA蛋白质交联作用及其修复效应。方法 采用培养 V79细胞株作为实验材料, 以不同浓度的液态甲醛 (0.50 100 200 400 800 1600 $\mu\text{mol/L}$) 对细胞染毒 1 h后检测 DPC率, 并根据实验结果选取 200 $\mu\text{mol/L}$ 对培养细胞株进行修复实验 (修复 0 6 12 18 24 h)。采用 KCl-SDS沉淀法检测 DPC率。结果 较高浓度的液态甲醛 ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) 可以产生明显的 DPC效应 ($P < 0.05$); 由 200 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的液态甲醛诱导 V79细胞产生明显的 DPC ($P < 0.05$), 经过修复可以恢复到空白对照水平 ($P > 0.05$)。结论 较高浓度的甲醛可以明显诱导 DPC形成, 甲醛所致的 DNA蛋白质交联可以得到修复。

关键词: 甲醛; V79细胞; DNA蛋白质交联; 修复

中图分类号: R994.6 O622.4 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2009)06-0413-03

Effect of formaldehyde on DNA-Protein crosslink and its repair in V79 cell line

JIANG Zhong-fa, HU Jian-guo, LIN Ling, ZHANG Ling, YUAN Chun, ZHANG Ben-yan*

(1 Department of Preventive Medicine Medical College Wuhan University of Science and Technology Wuhan 430065 China 2 Baiyang Community Medical Center Hangzhou Economic Developing Area Hangzhou 310018 China)

Abstract: Objective To explore the effect of formaldehyde (FA) on DNA-protein crosslink (DPC) and its repair. Methods V79 cell line from Chinese hamster was used in the study. The cells were cultured with different concentrations of FA solutions (0.50 100 200 400 800 1600 $\mu\text{mol/L}$) for 1 h. DPC rate in V79 cell line was detected by KCl-SDS assay. The repair of DPC in 200 $\mu\text{mol/L}$ FA solution was examined at 0 6 12 18 and 24 h respectively after exposure. Results The DPC in cells exposed to higher concentrations of FA solution ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$), while the DPC induced by 200 $\mu\text{mol/L}$ of FA solution could be repaired after 18 h and restored to control level after 24 h. Conclusions The results suggested that higher concentration of FA might induce DNA-protein crosslink, however this kind of DPC could be well repaired.

Key words: Formaldehyde; V79 cell line; DNA-Protein crosslink; Repair

挥发性有机物广泛存在于人们的生活和生产环境中, 并可对人体的多个系统产生危害。因此人们在享受生活的同时往往忽视了其带来的不利于健康的影响。其中甲醛以其毒性大、污染水平高、污染时间长等特点成为我国室内主要空气污染物之一, 被人们广泛关注。有研究认为, 甲醛可以诱导各组织器官的氧化损伤、DNA链断裂 (DNA strand breakage DSB)、DNA-DNA交联 (DNA-DNA crosslinks DDC)、DNA-蛋白质交联 (DNA-Protein crosslinks DPC) 等^[1,2], 其中 DPC在致癌性和致突变性中起着至关重要的作用。WHO指出甲醛所引起的 DPC效应能造成生物分子遗传损伤, DPC可以作为机体潜在突变的分子标志物, 甲醛与 DPC的剂量-效应关系已被用于甲醛致癌性的危险度评价。笔者以培养 V79细胞 (中国仓

鼠肺细胞) 作为实验材料, 采用 KCl-SDS沉淀法检测 DPC系数, 对不同浓度甲醛所致 DNA损伤及其剂量-效应关系进行探讨。

1 材料与方法

1.1 主要仪器与试剂

PF5301型荧光分光光度计 (岛津公司), MCO-15 AC型二氧化碳培养箱 (SANYO), ZHJH-1214 C型操作净化台 (上海智诚公司), CKX31型倒置显微镜 (Olympus), 10%的甲醛溶液 (Sigma), 十二烷基硫酸钠 (SDS Sigma), 蛋白酶 K (Amresco), Hoechst 33258荧光染料 (Sigma), 小牛胸腺 DNA (Sigma), 三羟基氨基甲烷盐酸盐 (Tris-HCl Amresco), 乙二胺四乙酸 (EDTA Amresco), RPMI1640细胞培养液 (Gibco), 胎牛血清 (杭州四季青), 青链霉素 (双抗, Gibco), 胰酶 (Gibco), 其他试剂均为国产分析纯。

1.2 实验材料及细胞培养

本研究采用培养 V79细胞株作为实验材料。细胞

收稿日期: 2009-05-18 修回日期: 2009-09-21

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2006BAI19B05-2)

作者简介: 江中发 (1972-), 男, 硕士, 主要从事环境与健康危险评价研究。

* 通讯作者, E-mail: zbyan1000@163.com

株购自中国科学院上海细胞库。细胞培养于含 15% 的胎牛血清、100 U 双抗的 RPMI1640 培养液中, 于 37 °C、CO₂ 含量为 5% 的 CO₂ 培养箱中, 每 2~3 天传代一次。在细胞生长至对数生长期时进行实验。台盼蓝排斥试验检测细胞活力, 细胞存活率达 90%。

1.3 实验方法

1.3.1 DPC 实验方法 将 V79 细胞悬液接种于 24 孔培养板, 分别用 10% 的甲醛溶液和 RPMI1640 细胞培养液配制成不同终浓度的甲醛溶液 (0、50、100、200、400、800、1 600 μmol/L), 于 37 °C、CO₂ 含量为 5% 的 CO₂ 培养箱中染毒 1 h。每个浓度组 5 孔。染毒结束后取出离心, 用 PBS 清洗后进行检测。

1.3.2 DPC 修复实验方法 将 V79 细胞悬液接种于 24 孔培养板, 分别用 10% 的甲醛溶液和 RPMI1640 细胞培养液配制成终浓度为 200 μmol/L 的甲醛溶液于 37 °C、CO₂ 含量为 5% 的 CO₂ 培养箱中染毒 1 h。染毒结束后离心弃上清, PBS 清洗后用 RPMI1640 细胞培养液重悬, 于培养箱中孵育 0、6、12、18 和 24 h。设 1 个未染毒对照组, 每组 5 孔。检测各组 DPC 系数, 观察 DPC 的修复效应。

1.3.3 DNA 标准曲线的制作 用 0.5 ml 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, 加入 0.5 ml 新鲜配制的终浓度为 400 ng/ml 荧光染料 Hoechst 3258 使荧光染料的终浓度为 200 ng/ml, 置于暗处 30 min。用荧光分光光度计在 350 nm 发射光和 450 nm 激发光下测得各浓度的荧光值, 制备标准曲线, 所得回归方程为: $y = 0.0834x + 21.714$ $r^2 = 0.9975$ 见图 1。

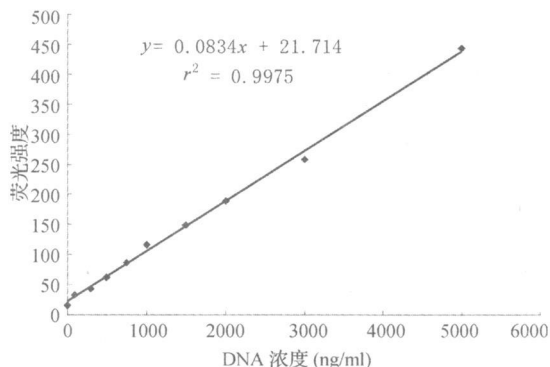


图 1 DNA 浓度标准曲线

1.3.4 DPC 系数的检测 采用改良的 KCl-SDS 沉淀法进行检测。SDS 可以与 DPC 以及其他蛋白结合, 不与游离 DNA 结合, 再加入 KCl 可使 DPC 和蛋白质沉淀下来, 而游离 DNA 则留在上清液中, 移除上清

液后, 再向沉淀中加入蛋白酶 K 除去蛋白质, 使 DPC 中的结合 DNA 游离出来, 用荧光法测定结合 DNA 荧光值 (A) 以及上清液中游离 DNA 荧光值 (B), 计算 DPC 系数 (η) = $A/(A+B)$ 。

细胞悬液用 SDS 溶液轻微振荡裂解, 65 °C 恒温水浴。从水浴中加入的 Tris-HCl-KCl 溶液吹匀。在冰上冷冻 5 min 后于 4 °C 以 10 000 r/min 离心 5 min, 收集上清至离心管中。沉淀用清洗缓冲液重悬, 65 °C 水浴, 冰上冷冻 5 min 后离心, 收集上清至同一只离心管中, 再重复此步一次。染色前将离心管中的上清液取 1 ml 备用 (含游离 DNA)。沉淀中加入 1 ml 终浓度为 0.2 mg/ml 的蛋白酶 K, 50 °C 水浴消化 3 h。在冰上冷冻 5 min 后于 4 °C 以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液于另一只离心管中 (含结合 DNA)。在样品中分别加入 1 ml 新鲜配制的终浓度为 400 ng/ml 荧光染料置于暗处染色 30 min 后测定其荧光值计算 DPC 系数。

1.4 统计学方法

本实验测得的数据采用 Origin 5.0 统计软件分析, 进行 t 检验并作图。以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 液态甲醛致 V79 细胞 DPC 效应

图 2 可见, 200 μmol/L 及以上较高浓度组诱导 V79 细胞产生的 DNA 蛋白质交联率均高于对照组 ($P < 0.05$), 50 μmol/L 和 100 μmol/L 等较低浓度组 DNA 蛋白质交联率与对照组相比虽有升高趋势, 但差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。这说明液态甲醛在较高浓度水平 (≥ 200 μmol/L) 时 V79 细胞 DNA 可以与蛋白质分子发生明显的交联性损伤。

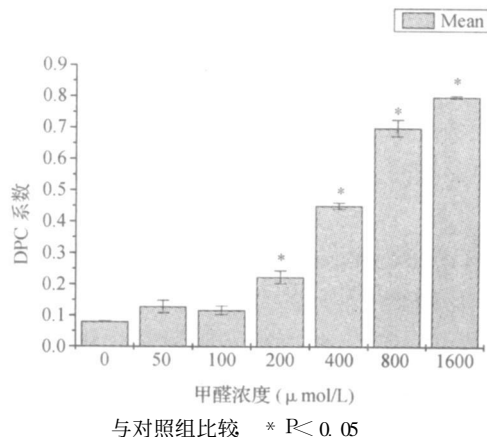
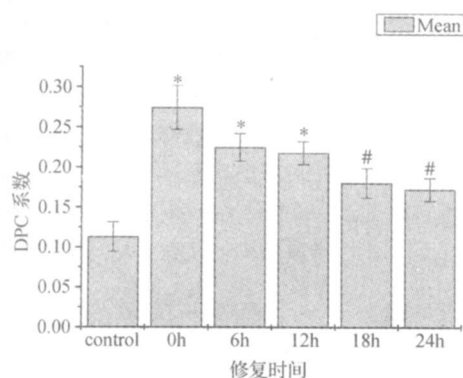


图 2 液态甲醛致 V79 细胞 DPC 效应

2.2 液态甲醛致 V79 细胞 DPC 的修复效应

图 3 显示, 细胞经过 200 μmol/L 的液态甲醛染毒后, 0 h 修复组 DNA 蛋白质交联率高于对照组 (P

<0.05), 这说明 $200 \mu\text{mol/L}$ 的液态甲醛可以诱导 V79 细胞产生 DNA 蛋白质交联。液态甲醛诱导 V79 细胞产生的 DPC 经过 6 h 和 12 h 修复后, DNA 蛋白质交联率与 0 h 组相比虽有下降趋势 ($P>0.05$); 经过 18 h 和 24 h 修复后 DNA 蛋白质交联低于 0 h 组 ($P<0.05$), 但与空白对照组相比差异无统计学意义 ($P>0.05$), 这说明此时的 DPC 已经得到修复。



与对照组比较, * $P<0.05$ 与 0 h 组比较, # $P<0.05$

图 3 液态甲醛致 V79 细胞 DPC 修复效应

3 讨论

WHO 已于 2004 年将甲醛确定为 I 类致癌物。其发表的报告称, 高浓度的甲醛能导致耳、鼻、喉癌, 也可能导致白血病^[3]。张美荣等^[4] 研究认为甲醛可以影响 V79 细胞 DNA 和 RNA 合成。在正常细胞中存在一定量的 DPC, 这是 DNA 与核蛋白的正常联系或其代谢的结果, 对维持细胞的正常活动具有重要作用, 当有外来物理、化学因素作用时, 则可诱导出过量的 DPC。DPC 仅可发生在单链 DNA 上, 这表明这种交联只能发生在 DNA 复制和转录期间, 因此, DPC 的形成必将对 DNA 的构像和功能 (复制与转录) 产生严重的影响, 并在其复制过程中容易造成某些重要基因 (如抑癌基因) 的丢失, 导致肿瘤或某些严重疾病的发生。可见 DPC 过度增加是一种病理现象, 是 DNA 分子的一种严重的遗传损伤^[5], 会导致染色体断裂、缺失, 以及基因突变和细胞的死亡^[6,7]。甲醛诱导 DPC 形成的实验结果表明, 甲醛在低浓度 ($\leq 100 \mu\text{mol/L}$) 时不能明显诱导 DPC 效应, 而较高浓度 ($\geq 200 \mu\text{mol/L}$) 则可以明显诱导 DPC 形成。这说明甲醛对 V79 细胞具有 DNA 损伤作用, 其损伤程度随甲醛浓度的增加而增加, 具有剂量效应关系。通过 DPC 修复实验可知甲醛导致细胞的 DPC 效应在一定时间内是可以得到修复的, 这与国内外相关研究的结论一致^[8~12]。Speit 等^[13] 采用彗

星试验通过对姐妹染色体互换的诱导和微核之间的关系实验对 V79 细胞的研究也证实, 甲醛可以诱导 DNA 蛋白质交联。Shaham 等^[14] 研究认为 DPC 也许是致癌过程中主要的早期损伤之一, 认为 DPC 可作为甲醛生物监测的标志物。本研究结果提示甲醛可引起 DNA 与蛋白质发生交联, 甲醛所致 DPC 可作为引起机体损伤的一种有效的生物标志物。

参考文献

- [1] Conaway CC, Whysner J, Verna LK, et al. Formaldehyde mechanistic data and risk assessment: endogenous protection from DNA adduct formation [J]. *Pharmacol Ther* 1996; 71: 29-55.
- [2] Lu K, Boysen G, Gao L, et al. Formaldehyde induced histone modifications in vitro [J]. *Chem Res Toxicol* 2008; 21 (8): 1586-1593.
- [3] WHO. International agency for research on cancer classifies formaldehyde as carcinogenic to humans [R]. Geneva: WHO, 2004.
- [4] 张美荣, 周建华, 时锡金. 甲醛对 V79 细胞 DNA、RNA 合成影响的体外实验研究 [J]. *苏州大学学报 (医学版)* 2004; 24 (4): 463-468.
- [5] Victoria V, Anatoly Z. Analysis of DNA-protein crosslinking activity of formaldehyde in vitro [J]. *Mutation Research* 1999; 424: 97-106.
- [6] Renee LB, Eric JJ, Jeffrey JR. A piezoelectric method for monitoring formaldehyde induced crosslink formation between polylysine and poly-deoxyguanosine [J]. *Talanta* 2000; 51: 159-171.
- [7] Qiuqin G, Zhikovich A. Loss of DNA-protein crosslink from formaldehyde-exposed cells occurs through spontaneous hydrolysis and an active repair process linked to proteasome function [J]. *Carcinogenesis* 2000; 21: 1573-1580.
- [8] Riddick JR, Nishimura A, Tano K, et al. Cells deficient in the FANCD/BRCA pathway are hypersensitive to plasma levels of formaldehyde [J]. *Cancer Res* 2007; 67: 11117-11122.
- [9] Nakano T, Morishita S, Terao H, et al. Repair mechanism of DNA-protein crosslink damage in *Escherichia coli* [J]. *Nucleic Acids Symp Ser* 2007; 51: 213-214.
- [10] Yingshuai Liu, Chang ML, J, Zhisong Li, 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] Gan Y, Xu Q, Peng G, et al. A comparison between the effects on DNA-protein crosslinks of *Saccharomyces* and *E. coli* induced by formaldehyde [J]. *Acta Microbiologica Sinica* 2007; 47: 164-167.
- [12] Speit G, Schütz P, Meik Q. Induction and repair of formaldehyde-induced DNA-protein crosslinks in repair deficient human cell lines [J]. *Mutagenesis* 2000; 15: 85-90.
- [13] Speit G, Schütz P, Hölzel J, et al. Characterization of the genotoxic potential of formaldehyde in V79 cells [J]. *Mutagenesis* 2007; 22 (6): 387-394.
- [14] Shaham J, Bernstein Y, Metzger A, et al. DNA-protein crosslinks: a biomarker of exposure to formaldehyde in vitro and in vivo studies [J]. *Carcinogenesis* 1996; 17: 121-125.