

致突变的致癌剂和非致癌剂在引发 DNA 股间交联上的显著差别¹⁾

居学海

(北京大学环境科学中心, 北京, 100871)

张 琪 戴乾圜²⁾

(北京工业大学化学与生物工程中心, 北京, 100022)

摘 要

借碱洗脱法证明: 具有致突变能力的致癌剂 1,2-二溴乙烷和胍在经过代谢活化后, 均剂量相关地引起 L₁₂₁₀ 细胞中 DNA 的股间交联。相反, 动物致癌试验表现阴性的致突变剂溴乙烷, 以及通过各种致癌动物试验均显示阴性的传统常用致突变剂羟胺, 在代谢活化以后的同样条件下均不能引起 L₁₂₁₀ 细胞中 DNA 的股间交联。这证明了双区理论的致癌机理观点, 即致癌剂必须是双官能烷化剂, 其同时引起互补碱对的交联将引起癌变。相反, 股内单一碱基的变异则可能引起致突变作用。并用 APCL/SIM (大气压化学电离/选择离子质谱) 证明: 1,2-二溴乙烷与 DNA 碱基对的模型反应, 与致突实验一致主要引起 G-C 对的交联和发生 G-C→A-T 突变。

关键词: 致癌机理, 双区理论, DNA 股间横向交联, 溴代烷烃, 胍, 羟胺, APCL/SIM 质谱。

根据非经验定量结构生理效应的理论研究, 戴乾圜提出了化学致癌机理的双区理论^[1-3]。双区理论认为, 致癌剂在体内都代谢形成双官能烷化剂, 在 DNA 互补碱对间所引起的交联将经历潜伏期而启动细胞的癌变。相反, 致突变作用只要求股内单一碱基的损伤, 即单官能烷化作用就可以诱发致突变作用, 但不能引起致癌作用。因此, 致癌性的致突变剂将引起 DNA 股间交联, 而非致癌性的致突变剂将不能引起 DNA 股间交联。碱洗脱法是判别股间交联的优越方法^[4], 作者用此法验证上述双区理论的观点。并用质谱法^[5,6]检测 1,2-二溴乙烷 (DBE) 与 DNA 四种碱基鸟嘌呤 (dG), 胞嘧啶 (dC), 腺嘌呤 (dA) 和胸腺嘧啶 (dT) 在生理条件下的反应产物。

1,2-二溴乙烷无论是口服、吸入或涂皮对大鼠或小鼠都具有强力的致癌潜力^[7], 但是溴乙烷根据现有的小鼠致癌试验则显示阴性。虽然两者均对 Ames 回复致突变试验显示阳性, 但两者的致癌潜力显著不同。按照双区理论, 致癌物质是双官能烷化剂, 应该引起 DNA 股间交联, 而非致癌物质溴乙烷即使在代谢后也不能产生足够的双官能烷化剂, 将不会检出 DNA 的股间交联。因此, 选择 1,2-二溴乙烷和溴乙烷分别作为检测 DNA 股间交联的阳性和阴性样品。

羟胺以各种施用方式和各种动物的试验, 证明是一种非致癌剂^[5]。不过, 在微生物

1) 国家自然科学基金资助项目 (批准号: 20042001)。2) 联系人, Email: qhdai@bjpu.edu.cn。

的研究中,羟胺是一种广泛的强力致突变剂.研究证明羟胺在生理条件下,主要与 DNA 中胞嘧啶互变异构的 4-位亚胺基交换,并生成 N^4 -羟基胞嘧啶. N^4 -羟基胞嘧啶将不再借三根氢键与鸟嘌呤配对,而是借两根氢键与鸟嘌呤配对,于是发生 C-G 生成 T-A 的变异^[6].虽然上述损伤足以在细菌中引起突变,但在哺乳动物细胞中强力的修复机制下,这种股间互相诱导性的损伤不能稳定存在而不足以引起癌变.

胍是一种具有显著致癌性能的致癌剂,但它在体外则是一种较羟胺为弱的致突变剂^[8],由于其碱性较羟胺为强,可能在生理条件下质子化的胍与 4-亚胺基的交换趋势将较相应羟胺的交换趋势为小,因而降低了 C-G→T-A 的变异^[9].Maxam 和 Gilbert 的经典 DNA 测序法中,是用胍来选择性地折断 DNA 链条^[10].即胍在中性条件下与 DNA 反应,这时将在嘧啶碱即 C 和 T 的 6-位上经 1,4-位加成而生成相应的 6-胍基取代的二氢嘧啶,于是胍基末端的 NH_2 将与 4-位亚胺基或羰基发生加成,并环化生成相应的羟基二氢吡唑基或氨基吡唑基的尿素衍生物.产物进一步分解形成吡唑和尿素脱氧核糖甙链条,若以六氢吡啶处理,则尿素及脱氧核糖均被分解除去而残留下两端的磷酸盐.这种方法使所有 T 和 C 处均选择性地发生断裂.倘若在 $1.5 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 的 NaCl 溶液中执行上述反应,则 T 上的加成反应将被抑制,而选择性地 C 上发生加成,这时将在所有的 C 处选择性地断裂.上述 1,4-位加成所产生的无碱位置,可能对于胍的致突变作用也有贡献.

由于正常细胞的修复能力,可能上述两种 NDA 的损伤都不能促使细胞产生癌变.按照双区理论,致癌剂胍应该通过某种方式在 DNA 股间引起交联,而非致癌剂羟胺则不能在 DNA 股间引起交联.这同样可以用碱洗脱法判明.

1 仪器与试剂

IPC-ISM762 型蠕动泵, ISMATEC 公司; RF510 荧光分光光度计, 日本岛津; 2300 型 CO_2 培养箱, Sheldon Manufacturing Inc., 美国; 色谱质谱联用仪, 日本岛津 QP8000.

L_{1210} 细胞, 中国医学科学院药物研究所; 培养基 RPMI640, Life Technologies Inc., 美国; 蛋白酶 K, Merck Germany; S_9 , 北京市职业病研究所; dA, dT, dG 和 dC 均为 99.5%, Sigma Chemical Co., USA; 甲醇, HPLC 级, Fisher Scientific USA; PEG 400 标准, 日本岛津; 其它试剂均为分析纯.

2. 细胞急性毒性试验

常规法培养 L_{1210} 细胞, 染料排斥法区分存活细胞与非存活或严重受损伤的细胞. 细胞存活率与 1,2-二溴乙烷和溴乙烷、胍、羟胺浓度的关系如图 1 所示.

从图 1 中可知, 1,2-二溴乙烷和溴乙烷、胍、羟胺的 LC_{50} 分别为 7.9, 6.3, 16.7 和 $3.7 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. 由此可见, 羟胺的毒性最大, 较 1,2-二溴乙烷和溴乙烷约高一倍. 两种溴乙烷的毒性彼此相近, 并都较胍高一倍. 在 DNA 交联实验时, 试剂浓度在 $0.2 \times LC_{50}$ 范围内. 显然, 半数致死浓度与对 DNA 的单官能损伤相关.

3 实验方法

细胞与药物作用后采用碱洗脱和荧光测定相结合检测 DNA 互补碱基对横向交联.

该法是由 Kohn 等发展起来的最初用于检测 DNA 单链断裂^[4], 后经斐淑等用改进的荧光检测法代替了 Kohn 的同位素标记法^[11]. 细胞经一定剂量的 Co^{60} γ -射线的照射后, 发生 DNA 单链的断裂, 断裂的片段经碱洗脱液在一定温度下作用一段时间后, 可经一定孔径的滤膜被洗脱. 但 DNA 一旦发生了横向交联, 则洗脱受阻, 交联的 DNA 片段滞留于滤膜上. 膜上 DNA 占全部洗脱过程中 DNA 总量的百分率反映出 DNA 交联性损伤的程度. DNA 膜上相对存留率 $R\%$ 为:

$$R\% = \frac{\text{滤膜浸出液荧光值}}{\text{滤液荧光值} + \text{滤膜浸出液荧光值}} \times 100$$

横向交联率 CLR% 为:

$$\text{CLR}\% = \frac{R_{\text{加药}} - R_{\text{空白}}}{R_{\text{空白}}} \times 100$$

式中, $R_{\text{加药}}$, $R_{\text{空白}}$ 分别为细胞加药和未经药物处理后 DNA 滤膜上的相对存留率. 具体操作见文献^[11, 12].

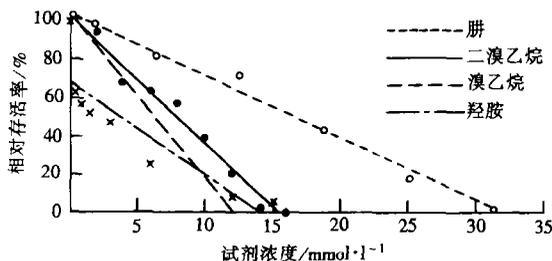


图 1 细胞存活率与试剂浓度的关系

Fig. 1 Relationship between cell survival ratio and reagent concentration

4 结果与讨论

1,2-二溴乙烷、溴乙烷、胍及羟胺与细胞作用后的 CLR% 列于表 1, 其相关图见图 2. 化合物及直线回归方程 $Y = aX + b$ 的 a , b , 以及相关系数 r , 标准偏差 S , F 值分别为: 1,2-二溴乙烷, 0.043, -7.2, 0.97, 3.09, 43.2; 胍, 0.193, 8.23, 0.97, 4.07, 47.7; 1,2-二溴乙烷加蛋白酶 K, 0.034, -4.2, 0.91, 4.38, 14.1; 胍加蛋白酶 K, 0.175, 5.29, 0.95, 4.94, 26.6.

表 1 四种致突变剂诱发的 DNA 股间交联率

Table 1 Cross-link ratio between DNA inter-strands induced by four mutagens

1,2-二溴乙烷			溴乙烷		胍			羟胺	
浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	CLR/%	CLR/% *	浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	CLR/%	浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	CLR/%	CLR/% *	浓度 ($\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$)	CLR/%
200	1.1	-0.3	120	-3.2	20	9.8	6.7	10	3.4
300	8.1	11.4	240	-0.2	50	16.6	11.5	20	-3.6
500	9.6	13.0	360	3.2	100	33.6	29.2	50	-3.5
600	19.2	12.3	480	4.2	150	36.9	33.7	80	-2.3
800	28.0	25.2	600	0.6	200	44.4	36.2	100	8.2

* 加蛋白酶 K.

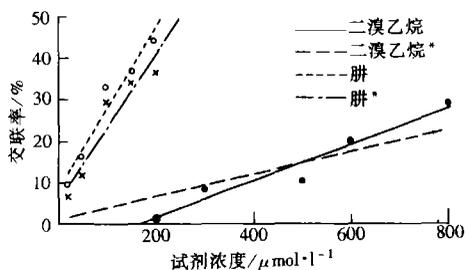


图 2 交联率与试剂浓度的关系 (* 加蛋白酶 K)

Fig. 2 Relationship between cross-link ratio and reagent concentration (* with proteinase K)

互补碱基对与 DBE 反应体系在不同浓度的 $\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 介质中及不同混合时间内所测得的质谱如表 2 所示。

表 2 互补碱基对与 DBE 反应体系在不同条件下的 APCI/SIM 质谱

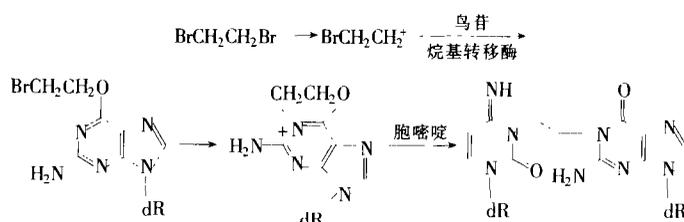
Table 2 APCI/SIM mass spectrometry of reaction system between complementary bases and DBE in various condition

反应体系	时间/h	$\text{NH}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}/\text{mmol} \cdot \text{l}^{-1}$	基峰强度	$\text{M} + \text{H}^+$				
dA/dT	96	0	2531	359.1(40.0)	358.1(38.7)	511.2(32.2)	520.2(33.0)	529.2(100)
	0.5	0	1086	349.0(38.1)	358.1(16.0)		520.2(34.2)	529.2(100)
dC/dG	96	0	2963	334.0(2.1)	374.4(1.9)	521.2(100)		
	96	1	3014	334.0(2.2)	481.2(10.8)	521.2(100)	561.2(13.3)	
	96	3	4815	334.0(2.6)	481.2(12.4)	521.2(100)	561.2(19.1)	
	0.5	0	2064	334.0(5.1)	481.2(100)	521.2(7.5)	561.2(9.3)	

注：括号中的数值是以基峰为 100 的相对丰度，碱对以等摩尔混合。

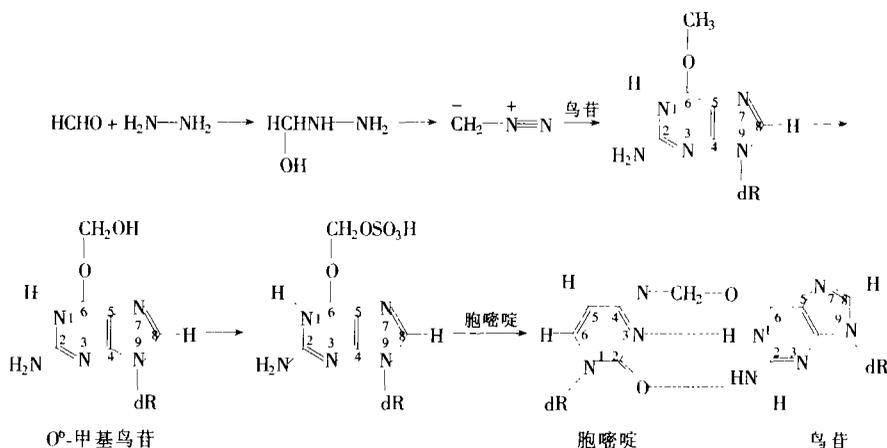
(1) 细胞毒性与 DNA 股内碱基的单官能损伤有一定的相关性，因此，羟胺毒性最高而胍最低。

(2) 从表 1 可知，当 1,2-二溴乙烷的浓度在 $200\text{--}800\mu\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 范围内，膜上荧光相对增长率 CLR% 作为交联度相对增长率的一种度量方式，随药物浓度的增加有明显的增加趋势，说明存在 DNA 交联性损伤。为了证明这种交联是 DNA-DNA 链间交联，在平行组样品中加入蛋白酶 K 除去 DNA 与组蛋白间的交联。由于 DNA-组蛋白间的交联与 DNA-DNA 链间的交联在滤膜上存留机制不同，DNA-DNA 交联是由于两条或多条 DNA 链交联形成大分子在通过滤膜时受阻而存留于滤膜上，而 DNA-组蛋白交联是由于蛋白质趋向于吸附滤膜而引起滤膜上存留，因而可以通过蛋白酶降解蛋白质来区分这两种交联。在加蛋白酶 K 后膜存留率随试剂浓度递增趋势基本不变，说明 1,2-二溴乙烷与 L_{1210} 细胞的 DNA 发生了横向交联。1,2-二溴乙烷两个烷化中心的距离约 0.28 nm ，可以推测这种横向交联只能在互补碱基对之间进行。而溴乙烷与 L_{1210} 细胞 DNA 作用后膜存留率不随药物浓度的增加而变化，表明溴乙烷与 DNA 之间没有发生类似反应。参照氯乙基亚硝基脲的反应，可以预言二溴乙烷与 DNA 交联的反应机理^[13,14]为：



(3) 具有致癌致突性的胍引起 DNA 膜上存留率随药物剂量的升高而明显增加, 且在 $20\text{--}200\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 的剂量范围内表现出良好的线性关系, 证明有交联性损伤存在. 加入蛋白酶 K 后, 交联度有所降低, 但降低幅度不大, 且仍有良好的线性关系, 说明存在 DNA 蛋白质交联, 但其量很少, 约占 CLR 总量的 $10\%\text{--}20\%$, 与若干甲基化试剂可引起 DNA-组蛋白间的交联产物的实验结果一致. 而羟胺在不同剂量时, 膜上存留率均接近空白对照组, 说明未引起 DNA 交联性损伤. 胍导致 DNA 交联性损伤, 证明双区理论关于其引起 DNA 股间交联的预言的正确性.

双区理论认为, 胍导致甲基鸟嘌呤的生成只是胍致癌过程的一部分, 不是其最终致癌形式, 更不是其致癌作用的关键步骤, 其关键步骤应是进一步活化后引起的 DNA 互补碱基对沟槽原子间的交联. 预言其机理如下: 类似于烷基代多环芳烃的 α 碳原子, 甲基鸟嘌呤中的甲基易被单氧酶氧化而生成醇. 在哺乳动物细胞中, 磺酰基转移酶、磷酸基转移酶及乙酰基转移酶等均很活跃, 使代谢产生的醇类转化成磺酸酯等酯类化合物, 作为活性酯的磺酸酯是很强的生物烷化剂, 易于与 DNA 等生物大分子发生烷化反应, 从而引起 DNA 双链间的交联:



互补碱基对中沟槽原子 (腺嘌呤的 O^6 位和胞嘧啶的 N^4 位) 上的反应可能比 DNA 沟槽以外的原子上的反应占优势. 单功能的突变剂羟胺没有引起膜存留率的变化, 因此, 与 DNA 不产生链间交联.

(4) APCI 离子化方法所检测的准分子离子即 $\text{M} + \text{H}^+$, 由表 2 可知, 混合反应 96h 的 dA/dT 体系中, 基峰为 529.2, 其对应的分子离子为 $\text{dA}(\text{CH}_2)_2\text{dA} + \text{H}^+$; 而 349.0, 358.1, 511.2 和 520.2 对应的分子离子分别为 $\text{dT}(\text{CH}_2)_2\text{Br} + \text{H}^+$, $\text{dA}(\text{CH}_2)_2\text{Br} + \text{H}^+$,

$dT(CH_2)_2dT + H^+$ 和 $dA(CH_2)_2dT + H^+$. 当样品混合 0.5h 后即作检测时, 其基峰强度由 2531 降低到 1086, 而 $dT-dT$ 间交联的 511.2 峰强则趋近于零. 显然, $dA-dA$, $dA-dT$ 和 $dT-dT$ 均可彼此形成氢键, 按组合论计算应为 50:100:50. 不过对称的氢键键合对可能更为稳定, 而 dA 具有最高的亲核性, 而 dT 的亲核能力最弱, 于是经历 96h 长时间达成平衡时, 总的结果使 $dA-dA$, $dA-dT$ 和 $dT-dT$ 交联的比率大约为 100:30:30. 但在 0.5h 短时间反应的情况下, 则亲核能力弱的 $dT-dT$ 交联产物则趋近于零.

在 $dG-dC$ 体系中, 反应时间为 96h 时, 基峰均为 521.2, 其对应的分子离子为 $dG(CH_2)_2dC + H^+$; 其余 334.0, 374.4, 481.2 和 561.2 所对应的分子离子分别为 $dC(CH_2)_2Br + H^+$; $dG(CH_2)_2Br + H^+$; $dC(CH_2)_2dC + H^+$; $dG(CH_2)_2dG + H^+$; 当样品混合 0.5h 后即作检测时, 基峰由 $dG(CH_2)_2dC + H^+$ 变成 $dC(CH_2)_2dC + H^+$, 并且强度由 96h 时的 2963 降低到 2064, 而 $dG(CH_2)_2dC + H^+$ 峰的强度降低更为显著, 表明在长时间混合以后, $dG-dC$ 之间依靠三条氢键而彼此缔合, 而 $dG-dG$ 与 $dC-dC$ 都只能形成两条氢键, 因此, 经历 96h 的长时间平衡将专一性地形成 $dG-dC$ 氢键键合对, 于是近乎 100% 地生成 $dG-dC$ 交联产物. 由于 dC 具有较高的亲核能力, 0.5h 的反应则形成 $dC-dC$ 交联产物成为主导趋势.

比较反应在不同浓度的氨水介质中的峰强可以看出, 随着体系 pH 值的提高, DNA 碱基在水溶液中的质子化倾向减弱有利于与二溴乙烷进行取代反应, 因而各种取代产物的浓度有所提高, 这导致峰强度随氨水浓度的升高而增加, 其中基峰强度由 2963 \rightarrow 3014 \rightarrow 4815 而不断增加. 除混合 0.5h 后的测定结果以外, 其余各个谱图的基峰均为 G-C 碱基对与 DBE 的反应产物, 表明上述 dG 和 dC 之间, 以氢键缔合配对专一性的重要作用. 因此, $dG(CH_2)_2dC$ 交联产物始终具有较 $dG(CH_2)_2dG$ 或 $dC(CH_2)_2dC$ 交联产物的更高浓度. 上述 DNA 碱基交联的模型实验表明, 互补碱基对之间的交联反应, 倘若在两个烷化中心接近 0.28—0.30nm 时, 则在互补碱基之间的交联将是反应的主导趋势.

(5) 实验结果证实了双区理论的预言. 双官能烷化剂二溴乙烷与 DNA 中 G-C 互补碱基对的共价交联, 破坏了其中的一个氢键, 残余的两对氢键键合原子, 或者与 dT 或者于 dA 配对, 导致 G:C \rightarrow A:T 突变, 这是二溴乙烷诱发的主要突变.

参 考 文 献

- [1] 戴乾圜, 化学致癌剂及其化学致癌机理的研究. 中国科学, 1979, 10:964—977
- [2] Dai Qianhuan, Di-Region Theory. New Discovery on Mechanism of Carcinogenesis. *Molecular Engineering*, 1998, 8: 61—89
- [3] 戴乾圜, 双区理论——致癌机理和致癌剂的非经验定量结构生理效应关系. 北京: 科学出版社, 2000
- [4] Kohn K W, DNA Filter Elution: a Window on DNA Damage in Mammalian Cells. *Bioassays*, 1996, 18:505—513
- [5] Guo Baochun, Mass Spectrometry in DNA Analysis. *Anal. Chem.*, 1999, 71 (12) :333R—337R
- [6] Melafferty F W, Fridriksson E K, Horn D M et al., *Biochemistry, Biomolecule Mass Spectrometry. Science*, 1999, 284 (5418) :1289—1290
- [7] International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the Carcinogenic Risks of Chemicals to Humans. Lyon, France, 1977, Vol. 15, p195
- [8] Zedek M S, Hydrazine Derivatives, Azo and Azoxy Compounds, and Methylazoxymethanol and Cycasin. In *Chemical Carcinogens*, Vol. II, Ed. Searle C E, Amer. Chem. Soc., Washington D C, 1984, p 915—944

- [9] (a) Sinden R R, DNA Structure and Function. San Diego: Academic Press, 1994, pp 38—46
(b) Singer B R, Grunberger D, Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens. New York, : Plenum Press, 1984, pp 50—53
- [10] Maxam A M, Gilbert W, Sequencing End-Labeled DNA with Base-Specific Chemical Cleavages. *Methods Enzymol.*, 1980, **65**:499—560
- [11] Pei Shu, Zhu Xujing, Xiang Mang et al. . The Cross-Linking Ability between DNA Double Strands as a New Method for the Identification of Carcinogens. In *Recent Advances of Chemistry and Molecular Biology in Cancer Research*. Ed, Dai Qianhuan, Margaret-Ann, Armour and Zheng Qingying. Beijing/Heideberg: Science Press/Springer-Verlag, 1993, 111—119
- [12] 戴乾圜, 张庆荣, 王丽慧等, 化学致癌作用是一种 DNA 股间交联的若干实验证明. 科学通报, 1999, **44** (24): 2624—2628; 英文版 2000, **45** (23) :2125—2129
- [13] Ali-Osman F, Quenching of DNA Cross-Link Precursors of Chloroethylnitrosoureas and Attenuation of DNA Interstrand Cross-Link by Glutathione. *Cancer Res.*, 1989, **49**:5258—5261
- [14] Tong W P, Kirk M C, Ludlum D B, Formation of the Cross-Link 1-[N³-deoxycytidyl] , 2-[N¹-deoxyguanosinyl]-ethane in DNA Treated with N,N'-Bis(2-chloroethyl)-N-nitrosourea. *Cancer Res.*, 1982, **42**:3102—3105

2001 年 3 月 3 日收到.

NOTABLE DIFFERENCE ON INDUCING DNA INTERSTRAND CROSS-LINK BETWEEN MUTAGENIC CARCINOGENS AND NON-CARCINOGENS

Ju Xuehai¹⁾ Zhang Qi²⁾ Dai Qianhuan^{1,2)}

1) Center of Environmental Sciences, Peking University, Beijing, 100871

2) Center for Chemistry and Bioengineering of Cancer, Beijing Polytechnic University, Beijing, 100022

ABSTRACT

By means of DNA filter elution method, it is evidenced that two carcinogens 1,2-dibromoethane with mutagenic potential and hydrazine with weak mutagenicity, can both induce the DNA interstrand cross-link with quantity dependence in L₁₂₁₀ culture. However in a identical condition, two non-carcinogens with analogous structures, ethylbromide and hydroxylamine with mutagenicity and potent mutagenicity respectively, both can't induce the corresponding cross-link. These results are consistent with the mechanism of the carcinogenesis of Dai's di-region theory that the carcinogen must be a bifunctional alkylating agent, the monofunctional damage of the base with single strand can only induce the mutagenesis but not carcinogenesis.

Keywords: mechanism of carcinogenesis, di-region theory, DNA interstrand cross-link, bromoalkane, hydrazine, hydroxylamine, APCI/SIM mass spectrometry.