

取代苯对人体细胞的定量结构—遗传毒性研究

肖乾芬¹,戴玄吏²,王晓栋¹,王连生^{1*} (1.南京大学环境学院,污染控制与资源化研究国家重点实验室,江苏 南京 210093; 2.江苏省常州市环境监测中心站,江苏 常州 210003)

摘要: 通过微核实验,测定了 36 种取代苯类化合物对人体外周血淋巴细胞的遗传毒性;并构建了遗传毒性与分子结构参数之间的 QSAR 模型.结果表明,有 34 种化合物显著地导致了微核的产生,具有明显的遗传毒性;遗传毒性的大小与分子结构描述符辛醇-水分配系数(MlogP)、 x 轴主惯性矩(Principal_x)、 γ 极性率[Polar(γ)]等存在良好的结构-活性相关关系,所建模型的相关系数 $R^2=0.718$,具有较高的预测能力,可用来预测取代苯类化合物的遗传毒性.

关键词: 微核实验; 取代苯; 遗传毒性; QSAR; 人体外周血淋巴细胞

中图分类号: X503.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2005)01-0018-05

Studies on quantitative structure-genotoxicity of substituted benzenes on the human lymphocyte. XIAO Qian-fen¹, DAI Xuan-li², WANG Xiao-dong¹, WANG Lian-sheng¹ (1.State key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2.Changzhou Environmental Monitoring Center of Jiangsu Province, Changzhou 210003, China). *China Environmental Science*, 2005,25(1): 18~22

Abstract: The genotoxicity of 36 kinds of substituted benzenes compounds on the human peripheral blood lymphocyte was determined through micronucleus assay experiment, and the QSAR model of genotoxicity and molecular structure parameter was established. 34 kinds of the compounds resulted markedly in production of micronucleus, possessing obvious genotoxicity, there existed good structure-activity correlation between genotoxicity gravity and molecular structure descriptors, such as MlogP, Principal_x, Polar(γ) and so on. The relation factor of the established model $R^2=0.718$, possessing higher forecast ability, and could be forecasting the genotoxicity of substituted benzene compounds.

Key words: micronucleus assay; substituted benzene; genotoxicity; QSAR; human peripheral lymphocyte

取代苯类化合物作为溶剂、添加剂、致冷剂以及农业杀虫剂等,广泛应用于工农业生产中.在其生产及使用过程中,会以不同方式进入环境,造成污染,从而威胁着人体的健康^[1,2].这类化合物在毒理学研究中往往只停留在动物水平,而在健康风险评价中,采用基于动物的毒理学效应数据对人体健康效应的外推,还存在着很大的不确定性.人体外周血液淋巴细胞微核试验可直接测试环境污染物对人体血液淋巴细胞遗传物质的损伤,并以此评价污染物对人体细胞的遗传毒性效应,具有简便、经济、快速和灵敏度较高等特点^[3,4].应用定量结构-活性相关(QSAR)的方法,可以根据已知化合物的毒性来预测未知化合物的毒性^[5].本研究旨在利用人体外周血淋巴细胞微核实验,测定取代苯类化合物对人体血液淋巴细

胞的微核率,从而评价其对人体的遗传毒性,并构建基于分子结构的 QSAR 模型,以对取代苯类化合物的遗传毒性进行预测评价.

1 材料与方法

1.1 实验材料

36 个取代苯类化合物由南京大学化学系提供(表 1),所有测试化合物均为分析纯,未经进一步提纯.RPMI 1640 培养液(美国 GIBCO 公司);植物血凝素(PHA);秋水仙素;小牛血清;肝素溶液;

收稿日期: 2004-06-11

基金项目: 国家“973”项目(2003CB415002); 欧盟国际合作项目(ICA4-CT-2001-10039);国家自然科学基金资助项目(20177008);国家“863”项目(2001AA640601-4)

* 责任作者, 教授, wangxd@nju.edu.cn

双抗等.血样采自南京红十字献血中心健康男性青年(18~25 周岁).

1.2 微核测试方法

每分样品中加入 RPMI 1640 培养液 4mL,小牛血清 1mL,植物血凝素 0.2mL,人体外周血 0.5mL,双抗 0.05mL,混合均匀后置于 25mL 细胞培养瓶中,37℃ 恒温培养.48h 后加入一定浓度的受试化合物,每个化合物设 4 个浓度,每个浓度设 2 份平行样,同时作 2 次蒸馏水阴性对照和丝裂霉素阳性对照.培养至 70h 时加入两滴 50μL/mL 秋水仙素以获得中期相细胞;继续培养至 72h 时,完成培养,收集细胞并采用 Giemsa(吉氏)染色方法制片^[6].

镜检读数,每份样品中计数分散良好的中期相细胞 1000 个,计算微核细胞率(MNF).

$MNF = \text{发生染色体畸变的细胞数} / \text{被观察的中期相细胞数} \times 100\%$.

1.3 分子结构参数的计算

首先应用 ChemDraw Ultra 6.0 构建化合物的结构,采用 Chem3D Ultra 6.0 中的 MM2 方法进行分子结构能量优化.采用 MOPAC 6.0(PM3 算法)计算分子结构参数.采用如下关键词控制参数的计算和结果输出: POLAR ENPART BONDS.共计算了包括 x 轴主惯性矩(Principal_x)、 γ 极化率[Polar(γ)], E_{LUMO} 、 E_{HOMO} 等参数.同时还利用 dragon 软件计算了辛醇-水分配系数(MlogP).

1.4 数据处理及统计分析

根据实验得出的微核率,构建化合物剂量与微核率的关系式,再根据各关系式计算微核率为 15% 时化合物的浓度 C_{MN15} .为了表征不同化合物对细胞核的损害能力,计算各化合物诱发 15% 微核率时的摩尔浓度的负对数作为遗传毒性的指标,即微核指数 MNI:

$$MNI = -\log(C_{MN15} \times 10^{-3} / MW) \quad (1)$$

式中:MW 为各化合物的质量分数.

MNI 值越大,化合物的遗传毒性越大.

数据分析使用统计分析软件 SPSS 10.0^[7]完成.在 95% 置信区间,应用计算所得化合物分子结

构参数对 MNI 进行线性回归分析;构建方程的质量由相关系数平方(R^2)、标准误差(SE)、F 检验值和显著性水平 P 来度量.

2 结果与讨论

2.1 化合物的毒性数据及计量效应关系

测定了 36 种取代苯类化合物在不同浓度下诱发人体外周血淋巴细胞的遗传毒性.其 MNF 列于表 1,MNI 及其构建模型所用参数列于表 2.实验中阴性对照为 4%,阳性对照为 40%.从表 1 可以看出,其中有 34 种化合物的 MNF 值明显高于阴性对照,表明了这 34 种化合物都具有遗传毒性.将所加化合物浓度(C)与 MNF 值进行关系式拟合表明,这 34 种化合物的剂量与 MNF 值之间存在的对数关系, R^2 全都在 0.9 以上,即随着化合物浓度的增加,MNF 值呈对数关系增加.

2.2 QSAR 分析

将具有遗传毒性的 34 种化合物的 MNI 值对计算得到的分子结构参数进行回归分析,得到 MNI 与 3 种分子结构参数具有良好的回归效果,其回归方程如下:

$$MNI = 7.5 \times 10^{-2} MlogP + 1.9 \times 10^{-5} Polar(\gamma) - 1.9 Principal_x + 3.1 \quad (2)$$

方程 2 中 3 个参数间自相关性见表 3,相关矩阵显示 MlogP、Polar(γ)、Principal_x 之间没有显著的相关性.模型中实验值与预测值的拟合相关系数 $R^2=0.72$,标准偏差 $SE=0.12$,F 检验值= 25.5,可见以上模型具有显著的预测能力,其实验值与预测值、残差及残差占实验值的百分数都列于表 2,可以看出残差百分数从 0.119% 到 6.422%,实验值与预测值相差很小,可用来预测取代苯类化合物的遗传毒性.

在上述模型中,MlogP、Polar(γ)、的系数都为正,表明辛醇-水分配系数、 γ 极化率都会对化合物的遗传毒性具有增强作用;而 Principal_x 的系数为负,表明 x 轴主惯性矩对化合物的遗传毒性有减弱作用.

表 1 36 种取代苯诱发人体外周血淋巴细胞的微核率

Table 1 Micronucleus frequency of 36 substituted benzenes in experimentation

化合物	浓度(mg/L)	微核率(%)	化合物	浓度(mg/L)	微核率(%)	化合物	浓度(mg/L)	微核率(%)
4-硝基酚	31.5	11.5	4-溴苯酚	50.0	7.5	1-溴-2,4 二硝基苯	20.0	5.5
	63.0	14.0		100.0	15.0		40.0	7.5
	126.0	18.5		200.0	18.0		80.0	14.0
	252.0	26.0		400.0	24.5		160.0	22.5
2,4-二硝基酚	29.8	5.0	邻甲酚	31.0	5.5	3,4-二氯胺	26.8	8.5
	59.5	12.5		62.0	9.5		53.5	12.5
	119.0	17.0		124.0	12.5		107.0	16.5
	238.0	28.5		248.0	22.0		214.0	23.0
3-硝基酚	25.8	4.5	对氯酚	38.0	3.5	2-硝基酚	29.5	5.5
	51.5	8.5		76.0	7.5		59.0	8.0
	103.0	17.0		152.0	14.5		118.0	13.0
	206.0	22.0		304.0	21.5		236.0	20.0
4-硝基胺	30.3	10.0	2-氯 5-硝基胺	28.0	11.5	1,3-二硝基苯	36.0	7.5
	60.5	12.5		56.0	13.5		72.0	11.5
	121.0	18.0		112.0	20.5		144.0	16.0
	242.0	21.5		224.0	25.0		288.0	20.5
4-硝基苯甲醛	33.1	8.5	2-氨基酚	27.0	8.5	4-硝基甲苯	30.0	11.5
	66.1	13.5		54.0	14.0		60.0	14.0
	132.3	17.0		108.0	18.5		120.0	16.5
	264.5	22.0		216.0	22.0		240.0	21.5
对苯二酚	27.5	3.5	邻苯二酚	26.3	7.5	4-硝基氯苯	26.5	12.5
	55.0	7.0		52.5	10.5		53.0	15.0
	110.0	12.5		105.0	18.5		106.0	17.5
	220.0	22.0		210.0	25.0		212.0	21.0
4-硝基苯乙酸	28.0	6.0	3-氨基酚	26.5	5.5	2-氯-4-硝基胺	20.25	10.5
	56.0	13.5		53.0	10.5		40.5	14.5
	112.0	17.0		106.0	13.0		81.0	18.5
	224.0	23.5		212.0	21.5		162.0	22.0
1,4-二硝基苯	56.0	9.5	胺	51.8	7.5	1,2-二硝基苯	25.5	9.5
	112.0	11.5		103.5	13.5		51.0	15.0
	224.0	16.5		207.0	21.5		102.0	18.0
	448.0	23.0		414.0	25.0		204.0	22.5
硝基苯	39.9	6.0	双酚 E	30.5	12.5	双酚 A	25.5	9.5
	79.8	12.5		61.0	14.5		51.0	13.0
	159.5	17.5		122.0	19.0		102.0	17.5
	319.0	22.5		244.0	23.5		204.0	20.0
对甲苯酚	48.5	12.0	2-氯苯甲酰胺	30.3	13.0	4-甲氧基酚	45.75	8.0
	97.0	15.5		60.5	15.5		91.5	13.0
	194.0	18.5		121.0	19.0		183.0	16.5
	388.0	27.5		242.0	23.5		366.0	21.0
4-氯-2-硝基胺	22.7	10.0	2-氨基-4-氯酚	31.8	8.5	3-羟基苯甲醛	20.7	6.5
	45.4	13.5		63.6	11.0		41.4	10.5
	90.8	16.0		127.1	15.5		82.8	13.0
	181.6	20.0		254.2	20.0		165.6	19.5
4-特丁基酚	23.4	8.5	甲苯	162.5	4.0	1,2-二甲苯	153.6	3.0
	46.7	11.5		81.4	3.0		76.8	3.0
	93.3	16.5		40.7	4.0		38.4	2.0
	186.6	20.5		20.3	2.0		19.2	1.0

表 2 34 种取代苯的遗传毒性及分子结构参数

Table 2 Genotoxicity and molecular descriptors of 34 substituted benzenes

序号	化合物	C _{MN15} (mg/L)	质量分数	微核指数				x 轴主 惯性矩	γ 极化率	辛醇-水分 配系数
				实验值	计算值	残差	残差/实验值(%)			
1	4-硝基酚	62.099	139.12	3.350	3.170	0.181	5.698	0.133	11006.870	1.26
2	2,4-二硝基酚	78.561	184.12	3.370	3.376	-0.006	0.179	0.051	13693.430	1.22
3	3-硝基酚	91.441	139.12	3.182	3.178	0.004	0.119	0.091	7326.979	1.26
4	4-硝基胺	78.497	138.14	3.245	3.313	-0.067	2.037	0.132	18415.030	1.26
5	4-硝基苯甲醛	89.926	151.13	3.225	3.231	-0.006	0.184	0.123	12391.900	1.48
6	对二苯酚	119.106	110.12	2.966	2.901	0.064	2.221	0.189	4181.718	0.89
7	4-硝基苯乙酸	79.194	181.16	3.359	3.339	0.020	0.609	0.076	12764.090	1.61
8	1,4-二硝基苯	155.389	168.12	3.034	3.242	-0.208	6.422	0.104	10163.450	1.71
9	硝基苯	118.326	123.12	3.017	3.107	-0.089	2.880	0.134	5813.270	1.80
10	对甲苯	85.522	108.15	3.102	3.004	0.097	3.244	0.184	5199.368	1.86
11	4-溴苯酚	120.456	173.01	3.157	3.000	0.157	5.233	0.189	3804.122	2.30
12	邻甲酚	124.012	108.15	2.941	3.141	-0.201	6.391	0.106	4528.647	1.86
13	对氯酚	155.041	128.56	2.919	3.059	-0.140	4.582	0.189	7512.621	2.13
14	2-氯-5-硝基胺	53.994	172.58	3.505	3.400	0.105	3.092	0.080	15259.680	1.88
15	2-氨基酚	68.037	109.14	3.205	3.139	0.067	2.119	0.108	8331.141	0.89
16	邻苯二酚	71.159	110.12	3.190	3.056	0.134	4.379	0.109	4184.099	0.89
17	3-氨基酚	103.841	109.14	3.022	3.007	0.015	0.496	0.123	3017.623	0.89
18	胺	118.113	93.14	2.897	2.916	-0.019	0.654	0.185	2157.633	1.51
19	1-溴-2,4 二硝基苯	77.624	247.01	3.503	3.461	0.042	1.210	0.036	11629.670	2.50
20	双酚 E	55.616	214.28	3.586	3.501	0.084	2.412	0.032	11135.030	3.05
21	2-氯苯甲酰胺	49.642	155.59	3.496	3.329	0.167	5.010	0.051	8810.083	1.85
22	3,4-二氯胺	74.332	162.02	3.338	3.382	-0.044	1.294	0.062	9191.179	2.73
23	2-硝基酚	135.160	139.12	3.013	3.195	-0.183	5.724	0.078	6899.023	1.26
24	1,3-二硝基苯	121.814	168.12	3.140	3.309	-0.169	5.113	0.065	9743.021	1.71
25	4-硝基甲苯	70.405	137.15	3.290	3.243	0.047	1.448	0.131	11164.380	2.15
26	4-硝基氯苯	51.707	157.56	3.484	3.416	0.068	1.980	0.134	19434.050	2.42
27	2-氯-4-硝基胺	44.715	172.58	3.587	3.532	0.054	1.542	0.061	20287.620	1.88
28	1,2-二硝基苯	58.681	168.12	3.457	3.315	0.142	4.293	0.040	7488.345	1.71
29	双酚 A	72.123	228.31	3.500	3.580	-0.080	2.222	0.029	13925.920	3.31
30	4-甲氧基酚	137.563	124.15	2.955	3.023	-0.067	2.221	0.159	6092.932	1.25
31	4-氯-2-硝基胺	65.937	172.58	3.418	3.382	0.036	1.063	0.056	11911.200	1.88
32	2-氨基-4-氯酚	112.227	143.58	3.107	3.311	-0.204	6.156	0.099	14012.510	1.51
33	3-羟基苯甲醛	90.766	122.13	3.129	3.136	-0.007	0.228	0.124	8938.548	1.11
34	4-特丁基酚	74.899	150.24	3.302	3.296	0.006	0.188	0.085	6732.523	2.81

表 3 方程 2 中参数的相关关系

Table 3 The correlation of parameter in equation 2

参数	MlogP	Principal _x	Polar(γ)
MlogP	1.000		
Principal _x	-3.57	1.000	
Polar(γ)	0.254	-0.426	1.000

通常,取代化合物产生遗传毒性包括 3 步,第 1 步,取代化合物穿过靶细胞,到达靶位;第 2 步,

化合物的取代基最终转化为诱导有机体突变的物质;第 3 步,直接作用,发生诱变反应^[8].在本模型中包括了辛醇-水分配系数、x 轴主惯性矩、γ 极化率这 3 个参数,被认为与化合物的遗传毒性有着相关关系.MlogP 是描述化合物疏水性的,与化合物穿过靶细胞有关,即化合物的 MlogP 值越大越容易穿过靶细胞,对生物的遗传毒性越大,与模型中对遗传毒性的增强作用是一致的. Polar(γ)

则是描述化合物分子的电性的,与这些化合物对人体的遗传毒性成正相关; $Principal_x$ 是描述分子的空间结构的,与分子体积有一定的相关性,从模型看它与化合物的遗传毒性成负相关.从表1可见,没有遗传毒性的化合物甲苯和1,2-二甲苯都没有硝基、羟基或胺基等取代基团.这可能是因为第二步中,化合物没有取代基可以转化为诱导突变的物质,导致这两个化合物没有表现出遗传毒性.以前的研究表明硝基、亚硝基和胺基取代芳烃一般最终都会表现出遗传毒性^[9].本实验结果与以前的研究结果相符合.

3 结论

3.1 36种取代苯类化合物中,具有硝基、羟基和胺基的取代苯类化合物都表现出很强的遗传毒性,而烷基取代苯类化合物未表现出遗传毒性.

3.2 以 $MlogP$ 、 $Principal_x$ 、 $Polar(\gamma)$ 为参数研究了这一类化合物的毒性机理. $MlogP$ 和 $Polar(\gamma)$ 增强遗传毒性, $Principal_x$ 减弱遗传毒性.

3.3 基于以上3种参数的分析,所建立的定量QSAR预测模型,可以用于取代苯类化合物的遗传毒性的预测.

参考文献:

- [1] Li Hongli, Wang Haifang, Sun Hongfang, *et al.* Binding of nitrobenzene to hepatic DNA and hemoglobin at low doses in mice [J]. *Toxicology Letters*, 2003,139(1):25-32.
- [2] Khadikar P V, Mather K C, Singh S, *et al.* Study on quantitative structure-toxicity relationships for benzene derivatives acting by narcosis [J]. *Bioorganic and Medicinal Chemistry*, 2002,10(6):1761-1766.
- [3] 薛开先,马国建,吴建中,等.微核形成与细胞周期关系的初步研究 [J]. *癌变·畸变·突变*, 1990,2(3):4-7.
- [4] 印木泉.遗传毒理学 [M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [5] 王连生,韩朔滕.有机物定量-结构活性相关 [M]. 北京:中国环境科学出版社, 1993.
- [6] 吕晓华,张立实.体外微核试验中吖啶橙荧光染色与Giemsa染色的比较 [J]. *现代预防医药*, 1998,25(4):293-294.
- [7] 黄 海,罗友丰,陈志英,等.SPSS 10.0 for Windows统计分析 [M]. 北京:人民邮电出版社, 2001.
- [8] 马建国,薛开先.一种快速简便的完整淋巴细胞微核制片法 [J]. *细胞生物学杂志*, 1989,11(3):143.
- [9] Huang Qingguo, Wang Liansheng, Han Shuokui. The genotoxicity of substituted nitrobenzenes and the quantitative structure-activity relationship studies [J]. *Chemosphere*, 1995,30(5):915-920.

作者简介:肖乾芬(1979-),女,四川内江人,南京大学环境学院在读硕士研究生,主要研究方向为有机污染化学.发表论文1篇.