DNA修复合成的放射自显影显示法与致癌性化合物的检测

病理学教研组　余应年　丁　辰　王鸿秀　陈星若

面对引入人类社会的化学物质越来越多这一现实，人们急需建立一系列有关的毒性（包括致癌性）检测系统来确定各种化学物质的生产和使用范围，以保护人类免受其害。在致癌性检查方面，虽实验动物诱癌试验仍不失为一个较为可信的方法，但由于它耗时长、费用大，很难满足大量化学物质的检测需要，因而非常必要找寻一些体外快速检测系统。从已有的资料来看，在与体内诱癌试验的结果符合率较高的各种快速体外检测法[1,2]中，除培养细胞的体外转化试验外，以各种生物材料（细菌、真菌、昆虫、哺乳类细胞等）为实验对象的诱变试验和对DNA损伤及其修复的检测试验等，都是以化学致癌物可以通过它对DNA的攻击而导致细胞癌变这一理论(体细胞突变说)为依据的。虽然最近已有人设计了一种使阻遏了的基因经化学致癌物作用后转为表达的新的检测途径[3]，但由于后者还没有经受大量化合物检查的考核；同时对细胞癌变的最终分子生物学机理尚未阐明，因此，目前还难以判断这种根据外遗传学说（epigenetic theory）所设计出来的新途径，是否会比以突变学说为基础的检测系统更有前途。鉴于目前较常用的体外短期致癌性检查都有“假阳性”和“假阴性”存在，因此采用一个以上的测试系统，可能对结果可信度的提高有所俾益。为此，我组在建立了以鼠伤寒沙门氏菌的回变试验（Ames试验）[4]后，又开始建立以哺乳类细胞之DNA修复合成为指标的测试法，今将后者的原理、方法和价值作一简介。

一、DNA修复合成试验用作化学致癌性检测的原理

已知除一些烷化剂和亚硝酰胺类物质外，大部份化学致癌物都属“前致癌物”。进入体内后，需经微粒体酶系活化为在化学上很活泼而又极为短寿的“近似致癌物”。后者除可转变为非致癌性代谢物外，亦可转变为对细胞分子靶有作用的“终致癌物”。后者大多为带正电荷之亲电分子（表1）[5]，它可与生物大分子物质——DNA、RNA和蛋白——中电子密度高的亲核结构（表2）[6]发生作用。DNA经终致癌物作用后，可发生多种类型的损伤（表3）[7]。

表1　几种化学致癌物的代谢活化

前致癌物	终致癌物
1.多环芳烃	湾区及/或角环的环氧化物
2.芳香酰胺、芳香胺及偶氮染料	N-羟化和酯化
3.亚硝胺	α－羟化：烷化剂
4.黄曲霉素	2,3－环氧化物
5.吡咯啉定生物碱	脱氢：烷化剂
6.黄樟素	1′－羟基黄樟素环氧化物
7.氨基甲酸乙酯	N－羟化：烷化剂
8.四氯化碳	烷基化类：(自由基或碳镓离子)

细胞具有一系列酶性DNA修复机制，可使损伤了的DNA分子重建为连续的双链结构。在哺乳类细胞中，主要的修复机制为[7～10]：

1.切除修复：若损伤处于不在进行复制

表2 生物大分子中的化学致癌物的分子靶（体内）

靶结构	分子部位
>S	甲硫氨酸
-SH	半胱氨酸
>N	组氨酸(N-1、N-3) 鸟嘌呤(N-3、N-7、N^2)
>NH	腺嘌呤(N-1、N-3、N-7) 胞嘧啶(N-3)
>CH	酪氨酸(C-3) 鸟嘌呤(C-8)
>C-OH	酪氨酸(O^4) 鸟嘌呤(O^6)
-P-OH	DNA

表3 致癌物诱发之DNA损伤的类型

损伤类型	代表性致癌物
1.碱基损伤	
环丁烷嘧啶二聚体	紫外线
烷化(如O烷化鸟嘌呤、3-烷化腺嘌呤)	β-内内酯、烷基亚硝胺、烷基亚硝酰胺、硫酸二甲酯
与致癌物共价结合	苯(a)芘、N-乙酰氨基芴、黄曲霉素
去嘌呤作用	烷化剂
2.链断裂	X线
3.交联	
链间交联	硫芥、丝裂霉素C
DNA-蛋白交联	紫外线、环己亚硝脲
4.嵌入	溴化乙锭

的DNA链中或远离DNA复制叉，可由此机制修复。首先发生损伤区寡核苷酸的切除，然后发生被切除之核苷酸顺序的再合成（修复复制或修复合成）。这包括以下几个步骤：DNA损伤区的识别、DNA链在损伤区附近由单链内切酶切开、损伤区及其邻近的若干核苷酸由外切酶切下、以对侧健全DNA链为模板由DNA聚合酶再合成已降解了的DNA片段、最后由连接酶将它与原来的DNA链连接而恢复DNA的完整性。在这种修复过程中所插入的新合成的DNA片段可以只有十余个核苷酸（短顺序，如由r—射线、N—甲基—N'—硝基—N—亚硝胍等所诱起），也可涉及百余个核苷酸（长顺序，如由紫外线、4—硝基喹啉—1—氧化物、乙酰氨基芴等所引起）。这种在细胞周期S期DNA半保留复制以外的DNA合成，构成了主要的额外DNA合成（unscheduled DNA synthesis）。已知这种修复机制的缺陷可能同一些遗传性疾病（如着色性干皮病、Fanconi氏综合征、毛细血管扩张性共济失调等）的好发肿瘤的倾向有关。

2.复制后修复：若损伤在DNA复制开始前未能修复或损伤发生于接近复制叉的区域中，由于亲链中之DNA损伤区不能在半保留复制时作为模板，从而在新生之子链中形成空隙（gap）。空隙的长度在原核细胞可以长到千余个核苷酸。这种空隙在真核细胞可能通过链延长过程（在原核细胞可能通过DNA链的重组作用）而得以弥合。因此，复制后修复不是针对原发的DNA损伤，而是针对在复制过程中在子链中所形成的继发损伤。很多人认为复制后修复与切除修复的无误性（error—free）不同，易发生修复差错（error—prone）。抑制复制后修复降低了化学诱癌的发生率的报告[11]似可符合这种观点。

因此，人们可以通过检查在与化学物质接触后的细胞是否发生DNA修复，判断这种化学物质是否具有损伤DNA的能力，从而推测这种化学物质是否具有潜在的致癌作用。

二、DNA损伤切除修复的检测法

真核细胞DNA损伤的切除修复可用多种方法显示。常用的有[12,13]：

损伤碱基的检出：细胞与化学物质接触后，提取其DNA，经水解后作色层分析以检出DNA中是否有异常碱基的存在；或将细胞经低渗处理（或提取其DNA）后，用适当的内切酶（由原核细胞制取）处理，若DNA链中有内切酶—敏感部位即损伤碱基（嘧啶二聚体、烷化碱基等）存在，则DNA将被切开而发生单链分子量的变化。

在与化学物质接触后不同时刻进行这些检查，可以了解切除修复的进程。

2.链断裂的检查：终致癌物与DNA相互作用后，可能诱发DNA的单链断裂(表3)，在切除修复过程中，在损伤区切开和切除时，可产生一过性单链断裂。因此，测量DNA单链分子量及单链断裂数的变化可以反映DNA损伤及其修复过程。这可用碱性蔗糖梯度超速沉降法测定之。将与化学物质接触过的培养细胞或动物组织制成单细胞悬液，并加于碱性蔗糖梯度顶层之碱性裂解层上，使DNA链间之氢链破坏而形成单链。断裂的DNA单链其沉降系数低于完整的DNA单链。此外，链断裂尚可由在碱性缓冲液中链分离速度及碱性洗脱法（alkaline elution）检出。

3.DAN修复合成时新碱基掺入的检测：DNA修复合成（额外DNA合成）可以通过同位素标记之碱基(常用^{3}H—胸嘧啶核苷）或密度标记之碱基（溴尿嘧啶核苷）掺入细胞核DNA而得到显示。在用这种手段显示DNA修复合成时主要关键在于如何鉴别掺入水平很高的半保留复制合成与掺入水平较低的修复合成。这可由下述方法识别之：

（一）密度标记碱基及等密度梯度(isopycnic gradient)分析：溴尿嘧啶核苷在DNA半保留复制时替代胸嘧啶而大量掺入新生之DNA链中，将使其密度增加(增至1.751克/毫升)；而在修复合成中，由于只有少量掺入，因而对整个DNA之密度几无影响（1.700克/毫升）。因此，可用浮力密度氯化铯梯度(Bouyant density cesium chloride gradient）分析予以鉴别。将^{3}H标记之溴尿嘧啶核苷(或将非同位素标记之溴尿嘧啶核苷与同位素标记之胸嘧啶核苷混和)加于培养细胞之培基中，若在正常密度之DNA组分中检出有标记物的存在，即表明有修复合成的发生。

（二）细胞之DNA半保留复制可为羟基脲及/或缺乏精氨酸之培基所抑制，但并不影响DNA的修复合成。细胞在这样条件下与化学物质接触后，若发生新碱基掺入的增加，显然就是额外DNA合成的反映。常用放射自显影术或液体闪烁计数法显示^{3}H—胸嘧啶核苷的掺入情况。此外，也可利用溴尿嘧啶光解作用分析法显示DNA修复合成时的新碱基的掺入。掺入了溴尿嘧啶核苷之DNA链，对波长为313毫微米之紫外线照射不稳定而发生断裂。培养细胞用羟基脲抑制其DNA半保留复制，在有溴尿嘧啶核苷存在之培基中与化学物质接触后，若其DNA对313毫微米波长之光照敏感而发生链断裂，显然就反映有溴尿嘧啶核苷的掺入，即有修复合成的发生。

根据我们实验室的条件，选用放射自显影技术来显示DNA的修复合成。所用的实验顺序如下：

（1）将用作实验材料之单层生长的培养细胞用胰蛋白酶溶液(0.25%）或EDTA溶液(0.02%)制成单细胞悬液。细胞悬于含有20%小牛血清后Eagle MEM培基中，浓度为0.5～1×10^{5}个/毫升左右。

（2）将上述细胞悬液接种于置有小盖片（18×6平方毫米）之培养瓶中，37°C培养1～3天，使细胞在盖片上生长至适当密度。

（3）将生长于盖片上之细胞在不含精氨酸之培基（补以5%透析小牛血清）中继续培养2～3天后或直接置于含有5～10毫克分子羟基脲之培基中孵育2小时。

（4）将上述长有细胞之盖片置于含有不同浓度之受试物质、5～10毫克分子羟基脲及^{3}H－胸嘧啶核苷（5～10微居里/毫升）之培基中，37°C孵育5小时。以已知致癌性化合物为对照。

（5）用Hanks液充分洗涤盖片后，用1%枸橼酸钠溶液处理10分钟。随后用乙醇－冰乙酸（3：1）固定（4°C）。空气干燥。

（6）用少量中性树胶，将盖片粘固于

载玻片上，长有细胞的那面向上。45°C烘焙24小时。继以2%地衣红染色液染色。

（7）在暗室中用1：1稀释之融化核-4感光乳胶涂布于其表面，在有一定湿度之小室（29°C）中待其干固。4°C下曝光10天。D-170显影液和F-5酸性坚膜定影液显影定影。脱水透明后，用盖片封固。

（8）镜检 计数一定数量细胞核中呈黑色点状之银粒数。比较接触受试药物的银粒数/核之均值与空白对照有无差异。

三、DNA修复合成的放射自显影显示法对检测化学物质致癌性的价值

我们用直接致癌物N-甲基-N'-硝基-N-亚硝胍（MNNG）按上述顺序作了试验。结果表明，不论用HeLa细胞或二代大鼠胚胎细胞，在只含有^{3}H-胸嘧啶核苷之培基中孵育5小时，有相当数量的细胞有显著的^{3}H-胸嘧啶核苷掺入，显示S期的DNA半保留复制；当有5毫克分子羟基脲存在时，这种掺入明显降低，反映DNA半保留复制为羟基脲所抑制；而在5毫克分子羟基脲存在的条件下，适当浓度（如10^{-3}～10^{-6}克分子）之MNNG使相当普遍之细胞核显现掺入，其程度较半保留复制时的掺入程度低得多，是DNA修复合成的显现（见图）。

Stich等用这个方法以人纤维母细胞的早期传代细胞为实验材料检查了大量化学物诱发DNA修复合成的能力[14～17]。在29种“近似致癌物”或“终致癌物”中，除经活化之黄色粟疫病毒素（luteoskyrin）与皱曲霉素（Regulosin）外，其余的全为阳性。而这两种假阴性之致癌物在鼠伤寒沙门氏菌/微粒体系统中也不能显示有诱变作用。这可能反映如本文引言中所论述的那样，致癌过程并不是DNA损伤或突变的结果。当然，就DNA修复合成试验来说，也可能它们并不诱发可被修复的DNA损伤；30种“前致癌物”中，在只有纤维母细胞本身的活化系统存在时，在适当条件下，4-硝基喹啉-1-氧化物及其致癌性衍生物（16种）以及黄曲霉素B_1、杂曲霉素等也能诱发DNA修复合成反应。对29种非致癌性化合物（包括一些嵌入性诱发剂）没有一种诱发出细胞的DNA修复合成反应。这个对将近90种化学物质诱发DNA修复合成能力与其致癌性的对比研究结果表明，放射自显影DNA修复合成试验可以用作化学物质致癌性的筛选。Lieberman等[18]选用人外围淋巴细胞为材料，有它的优越性，因为在一般情况下，它是一种不增殖的细胞，DNA半保留复制的硷基掺入水平很低。

如何提高对“前致癌物”的检出水平，是化学物质致癌性检测的一个重要课题。对DNA修复合成试验系统来说，可以采取以下两种措施：

1.在测试系统中加入肝微粒体酶系统以提高活化“前致癌物”的能力[19]。Ahmed等[20]用这个系统检查了13种农药诱发DNA修复合成的能力，发现氯丹、七氯、环氧七氯、艾氏剂、狄氏剂、西维因、双快、二，四-滴、乐果、克菌丹等10种为阳性。其中七氯、环氧七氯和乐果必须在活化后才能诱发DNA修复合成反应，而氯丹反为微粒体酶系统灭活。其他如林丹、鱼豚酮和DDT三种农药不论有无肝微粒体酶系统的存在皆无诱发DNA修复合成的作用。

2.直接用富有药物代谢酶系统之肝细胞为实验材料。Williams[21]用培养24小时之原代大鼠肝细胞，以放射自显影技术显示，在分别需经不同代谢活化途径（环氧化、N-脱烃、C-羟化、N-羟化及N-氧酯化）活化之五类化合物（霉菌毒素、多环芳烃、亚硝胺、芳香胺及偶氮染料）的九种“前致癌物”中，除苯蒽外全可在此系统中诱发DNA修复合成反应。最近Milchalopoules等[22]用液体闪烁计数测定法证明利用新鲜分离之肝细胞（分离后6小时内）比短期培养之肝细胞更为理想。因为新鲜分离之肝细胞的细胞色素P450及P448仍维持体内水平，而经24小时及6天培养的

肝细胞中，它们分别只有体内水平之25%及15%。可能，使用经肝微粒体酶诱导剂诱导后之肝细胞会更加提高检测的灵敏度。

用DNA修复合成为指标，体内和体外试验相结合，还可能显示出其它短期致癌性检查所不能显示的重要问题，即致癌物的器官亲和性或肿瘤诱发的可能部位。将受试化合物引入动物体内，将各个脏器之小块组织培养于含有羟基脲及^{3}H－胸嘧啶核苷之培基中，再用放射自显影技术检查在哪一个脏器的哪一类细胞中有DNA修复合成发生，可推测该化合物诱发肿瘤的部位和细胞来源。Stich[23]用这个方法对4－硝基喹啉－1－氧化物及二甲亚硝胺作了检查，结果与体内诱癌试验所得结论完全符合。（图见插页19）

参 考 文 献

1. Stoltz D R, et al: Toxic Appl Pharmacol 29:157, 1974.
2. Bridge B S: Nature 261: 195, 1976.
3. Lovine A, et al: Mutat Res 50: 29, 1978.
4. 金中初　秦文清　陈星若：浙江医科大学学报 7:29, 1978.
5. Marquardt H：国外医学参考资料，卫生学分册 5：288, 1978.
6. Miller E C: Cancer Res 48: 1479, 1978.
7. Cleaver J E, et al: In "Screening Test in Chemical Carcinogenesis", Montesano R et al, ed, IARC Scientific Publication No. 12, IARC, Lyon, P639, 1976.
8. Trosko J E, Chu H Y: Adv Cancer Res 21:391, 1975.
9. Van Lancker J L: Curr Top Pathol 64:65, 1977.
10. Grossman L, et al: Ann Rev Biochem 44: 19, 1975.
11. 黑木登志夫：细胞の癌化　细胞生物学，卷7 细胞の分化（编集：堀川正克），理工学社，东京，321面，1977.
12. Cleaver J E: Methods Cancer Res 11: 122, 1975.
13. Cleaver J E: In "Handbook of Mutagenicity Test Procedures", Kilbey B J et al, ed, Eselvier Sci Publ Co, Amsterdan, P. 19, 1977.
14. Stich H F: Proc 10th Canad Cancer Res Conf P 83, 1974.
15. Stich H F et al: Canad J Genetics & Cytol 17: 471, 1975.
16. San R H C, et al: Int J Cancer 16: 284, 1975.
17. Stich H F, et al: In "Screening Test in Chemical Carinogenesis", Montesano R et al, ed, IARC Scientific Publication No. 12, IARC, Lyon, P617, 1976.
18. Lieberman M W, et al: Cancer Res 31: 1297, 1971.
19. Stich H F, elt a: Int J Cancer 16: 266, 1975.
20. Ahmed F E, et al: Mutat Res 42: 161, 1977.
21. Williams G M: Cancer Res 37: 1845, 1977.
22. Michalopoules G, et al: Cancer Res 38: 866, 1978.
23. Stich H F, et al: Proc Soc Expt Biol Med 145: 1339, 1974.

（上接第185页）

讨　论

在病毒的提纯方法中，近来已有用聚乙二醇（PEG）沉淀法的报道[4,5]，在e抗原的检测中亦有用13%浓度的PEG作为被检血清的浓缩方法[6]。但是在HBsAg的检测中，用PEG来浓缩被检血清还尚未见有报道。作者为了提高对流电泳的敏感度，试用了PEG浓缩HBsAg的被检血清，发现20%浓度的PEG（分子量4,000）能有效地浓缩被检血清中的HBsAg。具体操作简便省时，认为有推广价值。

关于1%琼脂内加入3%聚乙二醇（分子量4,000）和3%右旋糖酐可提高对流电泳的敏感度，我们从e抗原的检测中得到启示而试用于HBsAg的检测，亦得到满意结果。其机理是否因加入此二药物后可促进抗原抗体复合物的形成和沉淀，从而提高了对流电泳的敏感度。

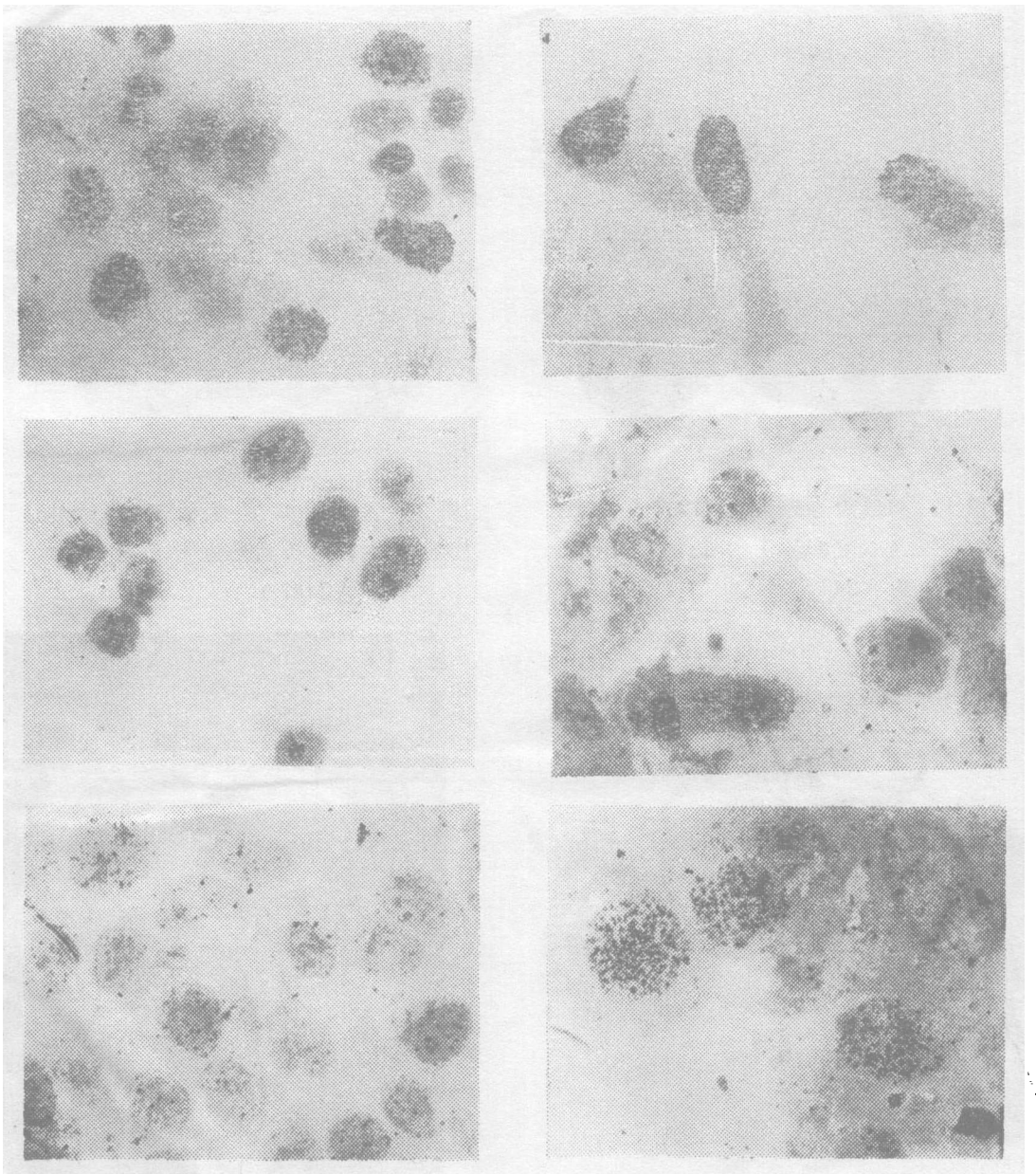
在判断结果时，于试验琼脂板上，抗原孔和抗体孔之间滴数滴20%磺基水杨酸甲醇溶液，能使沉淀线显色，又可增加敏感度2倍，操作方法和观察结果均比以往单宁酸浸泡法为佳。

参 考 文 献

1. 水谷昭夫：临床免疫血清检查．临床病理（临时增刊）特集第28号65页，1976.
2. 浙江医科大学附属第一医院等：对流免疫电泳技术快速准确诊断原发性肝癌的研究．浙江科技简报．2:28, 1972.
3. 浙江医科大学附属第一医院、浙江省望江山医院：肝炎相关抗原检查的初步观察．浙江科技简报12:19, 1972.
4. 国立预防卫生研究所学友会编：ウイルス实验学总论．改订二版，380页，丸善株式会社，日本，1974.
5. Schuurs A H W M, et al: Hepatitis B Surface antigen and human Serum Proteins. Am J Med Sci 270: 173, 1975.
6. 大河内一雄：HBe抗原、抗体の检出、测定、疫学．日本临床35(5): 160, 1975.

DNA修复合成的放射自显影显示法与致癌性化合物的检测

（正文见188页）



Hela细胞（左排）及大鼠胚胎细胞二代培养（右排）^{3}H胸嘧啶核苷标记5小时的放射自显影图。上：对照培养，显示重标记的DHA半保留复制。中：培基中加入5 mM羟基脲，DNA半保留复制被抑制。下：在羟基脲（5 mM）存在下，经10^{-3}M MNNG处理，显示轻标记之DHA修复合成