

## • 基础实验研究论著 •

## DNA 氧化损伤对人外周血淋巴细胞微核率的影响\*

惠长野, 郭 妍, 高朝贤, 王佃鹏, 张 文, 杨新跃, 李智民<sup>△</sup>

(深圳市职业病防治院, 广东深圳 518001)

**摘 要:**目的 探讨  $H_2O_2$  诱导淋巴细胞氧化损伤对其微核率的影响。方法 采用 10、50、100、1 000  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  诱导静息期淋巴细胞 DNA 损伤; 体外培养淋巴细胞, 有丝分裂原刺激其进入细胞周期, 于培养不同时间点加入 1 000  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  诱导 DNA 损伤, 常规培养法检测微核率的变化。结果 各实验组微核率并无明显变化。结论  $H_2O_2$  可以诱导淋巴细胞 DNA 损伤, 但对微核的形成无影响, 可能与 DNA 损伤类型及快速修复有关。

**关键词:**淋巴细胞; DNA 氧化损伤; 微核

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2014.14.004

文献标识码:A

文章编号:1673-4130(2014)14-1823-02

## Effect of DNA oxidative damage on micronucleus frequency in peripheral blood lymphocytes\*

Hui Changye, Guo Yan, Gao Chaoxian, Wang Dianpeng, Zhang Wen, Yang Xinyue, Li Zhimin<sup>△</sup>

(Shenzhen Prevention and Treatment Center for Occupational Disease, Shenzhen, Guangdong 518001, China)

**Abstract:** Objective To study the effect of DNA damage induced by  $H_2O_2$  on the micronucleus frequency in lymphocytes. **Methods** Resting lymphocytes were treated with different levels of  $H_2O_2$  (10, 50, 100, 1 000  $\mu\text{mol/L}$ ). 1 000  $\mu\text{mol/L}$   $H_2O_2$  was added into mitogen-stimulated lymphocyte cultures at different time intervals. Then micronucleus rate was examined by the conventional culture method. **Results** There was no significant change of the micronucleus frequency in the experimental groups. **Conclusion**  $H_2O_2$  could induce lymphocyte DNA damage rapidly, but exerts no effect on the formation of micronuclei, which may be related to the type of DNA damage and rapid DNA repair.

**Key words:** lymphocyte; DNA oxidative damage; micronucleus

电离辐射和化学因素是职业性肿瘤最常见的致病因素, 其中大部分可疑致癌物已通过动物诱癌试验或体外试验证实具有损伤基因组 DNA、诱导染色体畸变及致突变的能力。淋巴细胞微核的形成与基因组 DNA 损伤有关, 职业致癌因素暴露引起作业人员微核率及染色体畸变率升高的报道很多<sup>[1]</sup>。

电离辐射可通过直接作用造成 DNA 链断裂, 还能使细胞质电离产生包括活性氧在内的多种自由基, 间接造成 DNA 氧化损伤。苯及其代谢产物具有明显的遗传毒性, 苯在体内代谢过程中可以产生多种自由基<sup>[2]</sup>。砷、铅、铬、镉等重金属的遗传毒性作用被证实与活性氧簇部分相关<sup>[3]</sup>。DNA 氧化损伤、基因突变与致癌的相关性已得到学者的公认。 $H_2O_2$  体外可直接诱导多种细胞 DNA 的氧化损伤, 不同来源细胞, 其 DNA 氧化损伤的敏感性自我修复能力不同, 彗星电泳可以快速检测 DNA 磷酸二酯键断裂情况<sup>[4]</sup>。淋巴细胞微核主要来自于分裂中期染色体折叠包装过程产生的无着丝粒断片, 相比单细胞电泳, 反映的是 DNA 损伤的远期效应, 本文拟初步探讨  $H_2O_2$  诱导淋巴细胞氧化损伤对其微核率的影响。

## 1 材料与方法

**1.1 仪器与试剂** PRMI 1640 培养基为 Corning 公司产品; 胎牛血清购自杭州四季青; 植物血凝素 PHA 购自广州达晖公司; 秋水仙素为 Sigma 公司产品; 低熔点琼脂糖为 Amresco 公司产品; GoldView 核酸染料购自上海生工公司; 其他试剂为国产分析纯。 $CO_2$  细胞培养箱(美国 SHELLAB 3517-2 型); 恒温水浴槽(上海精宏 DK600 型); 水平转子低速离心机(Thermo ST40); DYY-2C 电泳仪及 DYCP-31DM 电泳槽(北京六一); BX51 荧光显微镜(日本 OLYMPUS)。

**1.2 血细胞处理** 静脉血样采自 3 名健康成年男性(18~26 岁), 肝素钠抗凝, PBS 洗涤 3 次(1 200 r/min, 5 min), 去除血浆成分, 等体积 PBS 悬浮制成血细胞悬液( $10^6/\text{mL}$ ), 4℃保存备用。

**1.3  $H_2O_2$  诱导静息期淋巴细胞损伤** 500  $\mu\text{L}$  血细胞悬液加入终浓度为 0~1 000  $\mu\text{mol/L}$  的  $H_2O_2$ , 诱导基因组 DNA 损伤, 取 50  $\mu\text{L}$  进行单细胞凝胶电泳分析, 剩余细胞悬液按下述方法培养并分析微核率变化。

**1.4 单细胞凝胶电泳** 取 100  $\mu\text{L}$  0.5% 正常熔点琼脂糖滴加在磨毛的载玻片上, 盖玻片压平, 4℃固化制成底层胶; 移去盖玻片, 50  $\mu\text{L}$  待测细胞液与 50  $\mu\text{L}$  1.0% 低熔点琼脂糖混匀, 铺于底层胶上, 盖玻片压平后 4℃固化; 移去盖玻片, 置于 pH 10 碱性裂解液(2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L  $Na_2EDTA$ , 1% 肌氨酸钠, 10 mmol/L Tris-HCl, 1% TrionX-100, 10% DMSO) 于 4℃裂解 2 h; 滤纸吸尽裂解液, 置于 4℃碱性电泳液(1 mmol/L  $Na_2EDTA$ , 30 mmol/L NaOH, pH 10) 解旋 40 min, 20 V、200 mA 电泳 20 min; 中和后 GoldView 染色, 荧光显微镜下随机观察 50 个细胞, 计算拖尾细胞百分数。

**1.5 细胞培养及制片** 血细胞悬液接种于 4 mL 含 20% 胎牛血清、10  $\mu\text{g/mL}$  PHA 的 PRMI 1640 培养液中, 细胞培养及微核制片方法参考文献[5]。培养 72 h 后, 离心收获细胞, 0.075 mol/L KCl 于 37℃水浴低渗处理 2~3 min, 经清洗、固定并制片, 每片油镜下计数 1 000 个已转化的淋巴细胞, 并计算微核率。

**1.6  $H_2O_2$  诱导不同细胞周期淋巴细胞损伤** 微核的形成与细胞周期有关, 0.4 mL 全血接种于 4 mL 含 20% 胎牛血清、10  $\mu\text{g/mL}$  PHA 的 PRMI 1640 培养基中, 静息期淋巴细胞在有丝

\* 基金项目: 国家职业病临床重点专科建设项目(WY2011873); 深圳市重大职业病诊疗技术重点实验室建设项目(CXB201111250112A)。

作者简介: 惠长野, 男, 主管技师, 主要从事职业卫生研究。 <sup>△</sup> 通讯作者, E-mail: lizhimin567@sina.com。

分裂原 PHA 刺激下活化增殖,在培养进行至 0、12、24、36、48、60 h 时分别加入 1 000  $\mu\text{mol/L}$  的  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,继续培养至 72 h,并制片分析,考察  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导处于不同细胞周期淋巴细胞 DNA 损伤是否对微核形成产生影响。

2 结 果

2.1 静息期淋巴细胞氧化损伤对微核率的影响  $\text{H}_2\text{O}_2$  可以诱导静息期淋巴细胞 DNA 氧化损伤,并呈一定的量效关系,但微核率并没有随着 DNA 损伤程度的加大而上升。当  $\text{H}_2\text{O}_2$  剂量达到 1 000  $\mu\text{mol/L}$  时,彗星细胞率高达 77.6%,微核率与未处理组相比差异依旧无统计学意义( $P>0.05$ ),结果见图 1。

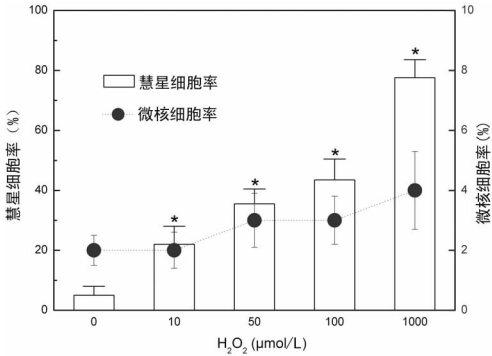


图 1 淋巴细胞经  $\text{H}_2\text{O}_2$  处理后 DNA 氧化损伤率及微核率

2.2 不同细胞周期淋巴细胞氧化损伤对微核率的影响 外周血淋巴细胞经 PHA 刺激后进入细胞周期,为考察处于不同细胞周期的淋巴细胞 DNA 氧化损伤对微核形成的影响,实验组分别在培养进行到 0、12、24、36、48、60 h 时加入 1 000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ ,和对照组相比,微核率并无显著变化(结果未列出)。此外,本组也考察了在培养过程中每隔 12 h 连续加入 10、50、100、1 000  $\mu\text{mol/L}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 。连续添加高浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (100、1 000  $\mu\text{mol/L}$ ) 造成淋巴细胞转化率下降,病死率上升,低浓度  $\text{H}_2\text{O}_2$  (10、50  $\mu\text{mol/L}$ ) 的连续添加并未显著影响细胞生长,但微核率也未出现明显变化。

3 讨 论

$\text{H}_2\text{O}_2$  是最常用的 DNA 化学诱裂剂,在不考虑酶解的情况下, $\text{H}_2\text{O}_2$  可以快速穿过细胞膜直达细胞核,从而造成 DNA 单链断裂及碱基的氧化损伤<sup>[4]</sup>。损伤严重的细胞易发生凋亡,而损伤轻微的细胞在修复失败或发生错误修复时可能导致基因突变,氧化应激等造成的 DNA 氧化损伤是肿瘤发生的重要致病机制。

外周血淋巴细胞属于非增殖细胞,PHA 刺激淋巴细胞活化增殖后,细胞代谢活跃,DNA 复制及修复相关蛋白表达增强,DNA 损伤修复能力得到提高<sup>[6]</sup>。Andreoli 等<sup>[7]</sup>研究表明和 PHA 刺激的淋巴细胞相比,静息期细胞对苯毒性代谢产物造成的 DNA 损伤更敏感。马爱国等<sup>[4]</sup>的研究发现静息期淋巴细胞 DNA 修复能力远低于其他高增殖率细胞株,但静息期淋巴细胞对  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导的 DNA 损伤敏感性较其他传代细胞株

要明显降低。这可能与不同细胞本身对  $\text{H}_2\text{O}_2$  氧化损伤的敏感性 & 胞质内过氧化物酶体系、还原物质的种类和量有关。

目前普遍接受的微核理论是,DNA 损伤导致细胞有丝分裂时染色体发生断裂,在细胞间期,丧失着丝粒的染色体片断滞留在主核外形成微小染色质块。生理因素、化学诱变剂、电离辐射、抗氧化因子缺乏等都与微核的形成有关<sup>[8]</sup>。微核率与染色体畸变率在 80% 化合物毒理学实验中证实具有良好的相关性,微核实验经济、快速、简便,已成为广泛使用的遗传毒理学实验之一<sup>[9]</sup>。本研究利用  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导静息期淋巴细胞 DNA 的氧化损伤,单细胞凝胶电泳可以快速直观地反映 DNA 链断裂情况,但在随后进行的常规微核实验中并未发现微核率的升高。同时本研究也考察了 PHA 刺激淋巴细胞活化进入细胞周期,不同时间点加入  $\text{H}_2\text{O}_2$  诱导 DNA 损伤,微核率也未升高。分析可能有两方面的原因:一方面有丝分裂原刺激淋巴细胞活化,DNA 合成及修复能力大大提高,损伤部位得到快速修复;另一方面,不同于电离辐射以造成 DNA 双链断裂这一严重的损伤形式为主,氧化剂主要导致 DNA 单链断裂,损伤正确修复率大大提高。此外,DNA 单链断裂对微核形成的贡献十分有限。

参考文献

[1] 曹佳.微核试验在中国的应用、发展与展望[J].遗传,2003,25(1):73-76.  
[2] 杨凤,周建华.苯致 DNA 损伤的研究进展[J].工业卫生与职业病,2009,35(1):54-58.  
[3] Hei TK, Liu SX, Waldren C. Mutagenicity of arsenic in mammalian cells: Role of reactive oxygen species [J]. PNAS, 1998, 95(14): 8103-8107.  
[4] 马爱国, Collins AR, Susan JD, 等. 不同细胞 DNA 氧化损伤及自身修复能力的分析[J]. 癌变·畸变·突变, 1997, 9(3): 138-142.  
[5] 惠长野, 刘征宇, 高朝贤, 等. 外源脱氧核苷酸对淋巴细胞 DNA 辐射损伤修复的影响[J]. 职业与健康, 2012, 28(10): 1211-1212.  
[6] 陈鸿书, 彭家和, 李蓉芬, 等. PHA 刺激对淋巴细胞修复 DNA 损伤的影响[J]. 生物化学杂志, 1985, 1(3): 39-47.  
[7] Andreoli C, Leopardi P, Crebelli R. Detection of DNA damage in human lymphocytes by alkaline single cell gel electrophoresis after exposure to benzene or benzene metabolites[J]. Mutat Res, 1997, 377(1): 95-104.  
[8] 杨明杰, 曹佳, 余争平. 微核实验的分子生物学研究进展[J]. 癌变·畸变·突变, 2000, 12(4): 237-241.  
[9] Miller B, Potter-Locher F, Seelbach A, et al. Evaluation of the in vitro micronucleus test as an alternative to the in vitro chromosomal aberration assay: position of the GUM working group on the in vitro micronucleus test[J]. Mutat Res, 1998, 410(1): 81-116.

(收稿日期:2014-02-06)

(上接第 1822 页)

[5] 陈华, 刘伟, 程洁, 等. 人类巨细胞病毒感染对血管平滑肌细胞脂代谢相关基因表达的影响[J]. 中南医学科学杂志, 2013, 41(1): 17-20.  
[6] 赵冬, 刘静. 中国心血管病: 负担持续上升, 预防任重道远[J]. 中华心血管病杂志, 2012, 40(3): 1-2.  
[7] 王瑛, 赵冬. 心血管疾病终生风险的研究现状[J]. 中华心血管病杂志, 2013, 41(6): 524-526.

[8] 李建军. 心血管病进展与 2011 回顾炎症与冠状动脉粥样硬化性疾病研究进展[J]. 心血管病学进展, 2013, 33(1): 10-13.  
[9] 李玲芳, 陈华, 郭国军. 人类巨细胞病毒感染对脐动脉血管平滑肌细胞胆固醇代谢的影响[J]. 第二军医大学学报, 2011, 32(2): 150-154.

(收稿日期:2014-02-01)