

研究简报

微囊藻毒素 LR 对大鼠淋巴细胞 DNA 的损伤效应

陈加平 翁登坡 傅文字 徐立红

(浙江大学劳动卫生与环境健康研究所, 杭州 310031)

DAMAGE OF MICROCYSTIN LR ON RAT LYMPHOCYTES DNA

CHEN JiaPing, WENG DengPo, FU WenYu and XU LiHong

(Institute of Occupational and Environmental Health, Zhejiang University, Hangzhou 310031)

关键词: 微囊藻毒素; 大鼠; 彗星试验

Key words: Microcystins; Rat; Comet assay

中图分类号: X173 文献标识码: A 文章编号: 1009-3207(2004)-06-0677-02

微囊藻毒素是一类具生物活性的单环七肽^[1], 是蓝藻的一些属产生的次生代谢产物, 在发生水华的水体中这类毒素普遍存在。由于水华的普遍发生, 微囊藻毒素的存在已是一个令人瞩目的问题。流行病学调查发现人群原发性肝癌、大肠癌发病率与饮用水中的微囊藻毒素有关^[2]。微囊藻毒素 LR (MCLR) 是微囊藻毒素中最常见的一种, 由于它们的高急性毒性、强促癌活性以及与人患癌症发生的相关性使其受到全球的关注。DNA 是生物体内的遗传物质, 它的稳定对于生命体的正常繁殖与生长是至关重要的。然而环境中各种理化及生物因子, 如电离辐射、各种氧化剂、病菌等都可能引起 DNA 损伤。多年的研究表明, 至少人类的两大问题——癌症与衰老与 DNA 损伤密切相关。因此, DNA 的损伤及测定越来越引起人们的重视。测定 DNA 损伤的方法有很多^[3], 其中彗星试验 (comet assay), 又称单细胞凝胶电泳 (single cell gel electrophoresis, SCGE), 因其操作简便、快速、灵敏度高等特点而得到了广泛应用。为了探索不同浓度 MCLR 对染毒大鼠遗传毒性作用, 本文运用彗星试验测定了 MCLR 灌胃后大鼠淋巴细胞 DNA 的迁移长度, 这对阐明微囊藻毒素的毒作用机理将会有很重要的意义。

1 材料和方法

1.1 试剂 MCLR 由日本名城大学 Harada 教授赠送, 用生理盐水稀释。淋巴细胞分离试剂 Histopaque1077 购自美国 Sigma 公司。

1.2 主要仪器 荧光显微镜 (OLYMPUS BX51), 数码相机

(OLYMPUS DP50)。

1.3 实验动物及染毒 雄性 SD 大鼠 25 只, 体重 190—210g, 随机分为 5 组, 每组 5 只, 由浙江省实验动物中心提供。MCLR 以 10、100、1000 或 10000 $\mu\text{g/L}$, 按 $2\text{mL} \cdot (200\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 的容积给予灌胃, 连续 7d, 对照组给予等量生理盐水。最后一次灌胃 1h 后, 从股动脉采集血液放入事先加入肝素的试管中, 立即进行彗星试验。

1.4 彗星试验 照 Singh 的方法并加以改进^[4]。大鼠抗凝血 1mL 加 Histopaque1077 1mL, 离心分离淋巴细胞备用。首先加热玻片 (50°C), 铺上 100 μL 0.5% (w/v) 正常熔点琼脂糖 (NMP, 溶解于磷酸缓冲液 PBS, pH 7.4), 凝固后将 5 μL 细胞悬液和 75 μL 0.5% (w/v) 低熔点琼脂糖 (LMP) 的混合液铺在第一层凝胶上, 凝固后加 100 μL 0.5% LMP 于第二层凝胶上, 盖上盖玻片。待完全凝固后, 在暗光下, 将玻片浸入装有淋巴细胞消化液的科普林氏染缸 (pH 10) 4 $^{\circ}\text{C}$ 消化 1h, 然后将玻片放置于电泳槽水平板上, 并小心地用电泳液 (300mmol/L NaOH, 1mmol/L EDTA) 浸没, 开始电泳 (300mA, 25V, 30min)。电泳结束用中和电泳液 (0.4mol/L Tris, pH 7.5) 漂洗玻片两次后, 50 μL 溴化乙锭 (EB, 2 $\mu\text{g/mL}$) 染色。400 倍荧光显微镜下观察, 每个样品制片两张, 用数码相机随机拍摄 100 个细胞。Image Pro Plus 分析软件 (Media Cybernetics) 分析细胞的直径和尾长 (TL)。实验均在黄光下进行。

1.5 统计分析 实验结果以尾长平均值 \pm 标准差表示, 并用 SPSS10.0 统计软件做差异显著性分析。

收稿日期: 2004-02-06; 修改日期: 2004-05-20

基金项目: 教育部博士点基金 (20020335078), 863 项目 (2001AA641030) 资助

作者简介: 陈加平 (1973—), 男, 湖北仙桃人; 博士生; 主要从事环境毒理学工作

通讯作者: 徐立红 E-mail: xulihong@zju.edu.cn

2 结果

大鼠染毒后淋巴细胞彗星试验拍摄的图片见图 1 和图 2。比较图 1(对照组)和图 2(10000μg/L MCLR 暴露组),可以看到实验组淋巴细胞出现很明显的彗星样拖尾。对照组和 10、100、1000、10000μg/L MCLR 暴露组的细胞面积分别为 36.7 ± 1.9, 33.1 ± 3.3, 34.0 ± 3.4, 35.6 ± 4.7 和 37.8 ± 1.8μm², T 检验表明各组之间细胞面积无显著差异,通过测定细胞直径,计算出尾长(TL),结果如图 3 所示。统计分析结果表明,与对照组相比,各实验组尾长都显著增加,并且随着 MCLR 暴露浓度的升高,尾长也逐渐升高。

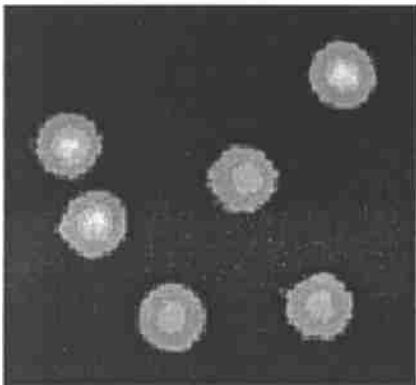


图 1 对照组大鼠淋巴细胞彗星试验(× 400)

Fig. 1 comet assay of control rat lymphocytes(× 400)

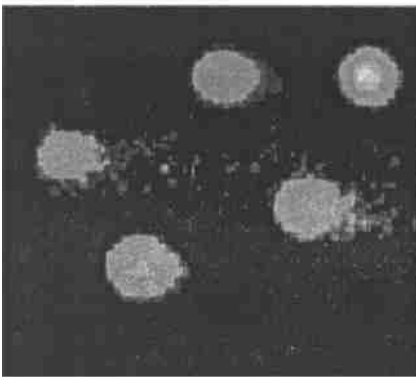


图 2 10000μg/L 微囊藻毒素 LR 暴露后大鼠淋巴细胞彗星实验(× 400)

Fig. 2 Photograph of comet assay of rat lymphocytes exposed to 10000μg/L microcystin LR(× 400)

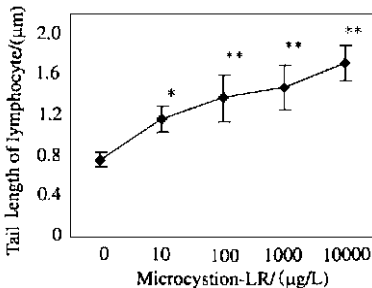


图 3 MCLR 暴露后大鼠淋巴细胞尾长(* P<0.05, ** P<0.01, n=5)

Fig. 3 Tail length of rat lymphocytes exposed to microcystin LR

3 讨论

彗星试验时,在细胞消化液的作用下,有核细胞的生物膜破坏,使细胞内的 DNA、蛋白质及其他成分进入凝胶,继而扩散到消化液中,只有核 DNA 仍附着在剩余的核骨架上而留在原位。如果细胞未受损伤,电泳中核 DNA 停留在核基质中,经荧光染色后呈现圆形的荧光团,无拖尾现象(图 1)。若细胞受到损伤,在碱性电泳液(pH>13)中,先是 DNA 双链解螺旋且碱变性为单链,单链断裂的碎片离开核 DNA 向阳极迁移,形成拖尾(图 2)。细胞核 DNA 受损伤越严重,产生的断链或碱变性断片就越多,片段也越小,电泳表现为尾长增加和尾部荧光增强。本实验结果表明经口摄入的 MCLR 进入血液后使淋巴细胞 DNA 受到损伤,并且浓度越高,损伤程度也越高。有关研究表明,腹腔注射 MCLR 可引起大鼠外周血淋巴细胞 DNA 迁移长度增加, MCLR 灌胃小鼠外周血淋巴细胞 DNA 迁移长度也显著大于对照组,这与本实验结果是一致的。Zegura 等使用细胞株 HepG2 也检测到了 MCLR 导致的 DNA 损伤,他们结合 Ding 等的实验结果认为 MCLR 通过诱导活性氧自由基的形成导致 DNA 损伤。已有不少试验^[6]相继证明 MCLR 能抑制蛋白磷酸酶 1 和 2A 的活性,是一种强烈的促肿瘤物。在本实验中大鼠受到损伤的 DNA 如果得不到修复,就容易在细胞增殖的过程中产生突变,这可能和微囊藻毒素的促肿瘤作用有关。

参考文献:

[1] Cammichael WW. The toxins of cyanobacteria[J]. *Sci. Am.*, 1994, **270**: 64—72

[2] Zhou L, Yu D, Yu H, *et al.* Drinking water types, microcystins and colorectal cancer[J]. *Chin. J. Prev. Med.*, 2000, **34**(4): 37—39 [周伦, 鱼达, 余海, 等. 饮用水源中的微囊藻毒素与大肠癌发病的关系. 中华预防医学杂志, 2000, **34**(4): 37—39]

[3] Xia L, Qiu GY. Recent progress of methodology in measuring DNA damages [J]. *Prog. Biochem. Biophys.*, 1997, **24**(1): 31—35 [夏璐, 丘冠英. DNA 链断裂检测技术的进展. 生物化学与生物物理进展, 1997, **24**(1): 31—35]

[4] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp. Cell Res.* 1988, **175**: 184—191

[5] Zhang Z Y, Yu S Z, Chen C W. Study on the effects of DNA and natural killer cell damage induced by microcystins L R [J]. *Chin. J. Prev. Med.*, 2001, **35**(2): 75—78 [张占英, 俞顺章, 陈传炜. 微囊藻毒素 LR 对 DNA 和自然杀伤细胞的损伤效应研究. 中华预防医学杂志, 2001, **35**(2): 75—78]

[6] Chen J P, Xu L H, Zhang Y Y. A study of inhibition of microcystins on protein phosphatase in fish tissue homogenate [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1998, **22**(1): 95—97 [陈加平, 徐立红, 张勇元. 微囊藻毒素对鱼组织匀浆液蛋白磷酸酶活性抑制作用的研究. 水生生物学报, 1998, **22**(1): 95—97]