

文章编号: 0529-6579 (1999) 05-0050-04

Ce(NO₃)₃ 对不同细胞 DNA 的损伤作用研究^{*}

杨维东¹, 罗 琛², 田雪梅¹, 雷衡毅¹, 杨燕生¹

(1. 中山大学化学与化学工程学院, 广州 510275; 2. 第一军医大学)

摘 要: 以体外培养 3T3 细胞和 lovo 细胞为研究对象, 运用单细胞凝胶电泳技术, 探讨了 Ce(NO₃)₃ 对这 2 种细胞 DNA 的损伤作用. 结果表明 Ce(NO₃)₃ 对 2 种细胞均有损伤作用: 低浓度 (1 mmol/L) 时, lovo 细胞的 DNA 损伤率要明显高于 3T3 细胞 DNA 的损伤率, 高浓度 (5 mmol/L) 时, 则 2 种细胞的损伤率几近相同, 提示较低浓度 Ce(NO₃)₃ 对正常细胞和癌细胞存在着不同的作用, 稀土对癌细胞具有选择性杀伤作用; Ce(NO₃)₃ 具有一定的遗传毒性.

关键词: 单细胞凝胶电泳; 稀土; DNA; 3T3 细胞; lovo 细胞

中图分类号: O 614 332; Q 28 **文献标识码:** A

稀土元素可导致大白鼠肝脏、肺脂质过氧化损伤^[1], 而脂质过氧化损伤可引起各种碱基损伤、DNA 链断裂和各种荧光产物产生^[2], 其终产物 MDA 可与 DNA 形成 DNA 加合物, 进一步引起突变和癌变^[3], 同时脂质过氧化过程中产生多种活性自由基, 活性自由基有致突变作用^[4], 稀土元素有可能通过这一途径对 DNA 造成损伤. 稀土元素, 特别是轻稀土元素具有抗癌作用^[5], 稀土元素杀死癌细胞的同时对正常细胞也有可能造成一定损伤. 本文以农用稀土最为常见的 Ce(NO₃)₃ 为研究对象, 3T3 细胞和 lovo 细胞为材料, 运用单细胞凝胶电泳技术探讨了稀土对上述 2 种细胞 DNA 的影响, 以期为进一步研究稀土元素的遗传毒理机制和抗癌机理提供参考.

1 材料与方法

1.1 材 料

(1) Ce(NO₃)₃ 溶液: 氧化铈 (CeO₂), $w \geq 99.95\%$, 购自广州珠江冶炼厂. 在浓盐酸和盐酸羟胺中溶解后, 加入过量草酸使其沉淀, 然后用蒸馏水洗涤沉淀. 将沉淀在浓硝酸中溶解后, 加热除去多余的硝酸, 用 EDTA 标准溶液进行铈浓度的标定, 灭菌后备用.

(2) 细胞株: 3T3 细胞和 lovo 细胞, 由第一军医大学细胞生物学实验室提供.

(3) 试剂: RPMI-1640 (GBICO), 低熔点琼脂糖 (Promega), 三羟甲基氨基甲烷 (Tris) (B. M.), 吐温 X-100 (Merck), 小牛血清 (杭州四季青生物工程研究所), 其它未标明试剂

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金 (29671034) 资助项目; 广东省自然科学基金 (960048) 资助项目

收稿日期: 1999-01-07 作者简介: 杨维东, 男, 1967 年生, 博士研究生.

剂均为国产 AR 纯。

(4) 仪器: 荧光显微镜 (OLYMPUS VANOX-3), DY-3D 型多功能电泳仪 (江苏兴化分析仪器厂), CO_2 培养箱 (Heraeus B 5060 EK- CO_2)。

1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 常规方法培养 3T3 细胞和 lovo 细胞, 将其传代至 6 孔培养板。用含血清的 RPMI-1640 培养液培养至对数期, 用无血清 1640 轻洗 2 次, 然后加入无血清 1640 培养液和受试物, 培养 8 h。

1.2.2 细胞悬液的制备 用冰冷的 PBS (磷酸缓冲液) 洗细胞 2 次, 再加入 0.75 mL PBS。轻柔刮下细胞, 用吸量器轻轻吹打制成细胞悬液, 再加 0.75 mL PBS, 小心混匀。

1.2.3 单细胞凝胶电泳 37 °C 下取 10 μL 细胞悬液与 75 μL ρ 为 0.65% 的低熔点琼脂糖混匀, 迅速铺于磨砂载玻片, 涂匀。4 °C 放置 10 min, 使其固化。然后将载玻片放入新配置的预冷的细胞裂解液 (2.5 mol/L NaCl, 100 mmol/L EDTA, 10 mmol/L Tris, ρ 1% 十二烷基肌氨酸钠, pH 10, 用前加入 ρ 为 1% Triton X-100) 中至少放置 1 h 或过夜, 取出玻片室温下晾干, 并列置于水平电泳槽中阳极端, 于高 pH 电泳缓冲液 (1 mol/L EDTA, 300 mmol/L NaOH) 放置 20 min, 使 DNA 解螺旋。室温下 25 V、100 mA 电泳 20 min。电泳后载片用 pH 7.5 的 0.4 mol/L Tris 浸洗 3 次, 每次 10 min。20 g/L EB 染色。

以上步骤均须在黄、红色灯光下或暗处进行, 以免对 DNA 造成额外损伤。EB 染色后立即在荧光显微镜下观察、照相。每实验组随机测量 25 个出现彗星的细胞。

2 结 果

2.1 单细胞凝胶电泳行为

如前所述, 单细胞凝胶电泳行为是将分散悬浮的单个细胞与低熔点琼脂糖液混合后在冰冻玻片上制成琼脂板, 细胞经过水解和碱化处理后, 在较高 pH 环境下进行电泳。电泳过程中, 当 DNA 有断裂损伤时, 细胞核中带有阴性电荷 DNA 片段, 就从核心向阳极方向伸展, 形成特征性彗星尾。DNA 受损伤越严重, 含断片越多, 在彗尾中出现 DNA 断片就越多, 尾中 DNA 百分含量和尾长就成了 DNA 断裂的重要定量参数。彗星的长度 (代表 DNA 迁移率) 与受试物引起的 DNA 断裂程度呈正相关, 测定 DNA 迁移距离可定量地反映 DNA 的损伤程度^[6]。实验结果显示, 电泳后对照组为一圆形荧光核心、无尾, 实验组则形成一荧光头部和较长的彗星状尾部, 如图 1 所示。这完全符合单细胞凝胶电泳的特征。



图 1 未受损细胞和损伤细胞单细胞凝胶电泳图

1 Photomicrograph of single cell gel electrophoresis in undamaged cell and damaged cell

a 未受损细胞; b 损伤细胞

2.2 彗星长度和 DNA 损伤

通过放大后测量彗星长度（放大倍数为 400），DNA 损伤率根据如下公式计算^[6]

DNA 损伤率（%）=
$$\frac{\text{实验组平均彗星长度}-\text{对照组平均彗星长度}}{\text{实验组平均彗星长度}} \times 100\%$$

表 1 列出 3T3 和 lovo 细胞单细胞凝胶电泳的彗星长度与 DNA 损伤率。

表 1 3T3 和 lovo 细胞单细胞凝胶电泳的彗星长度与 DNA 损伤率¹⁾
Tab 1 The length of migration and ratio of DNA damage in 3T3 and lovo cells

3T3				lovo			
$\frac{c(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3)}{(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})}$	彗星长度 mm	DNA 损伤率 %	<i>P</i>	$\frac{c(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3)}{(\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1})}$	彗星长度 mm	DNA 损伤率 %	<i>P</i>
0	8.5±1.68			0	14.0±2.08		
1	9.5±2.84	10.53	> 0.05	1	39.5±15.0	64.56	< 0.01
5	30.2±6.32	71.85	< 0.01	5	48.8±9.68	71.31	< 0.01

1) $n=25$, $\bar{x} \pm \text{SD}$; 彗星长度系放大 400 倍之数值

由表 1 可以看出, 当 $c(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3)$ 为 1 mmol/L 时, lovo 细胞单细胞凝胶电泳彗星长度明显高于对照组, 有极显著差异 ($P<0.01$); 3T3 细胞彗星长度与对照相比, 则极为相近, 两者比较并无显著性差异. 提示在该浓度下, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 对 lovo 细胞 DNA 具有明显的损伤断裂作用, 而对正常细胞 3T3 DNA 则不产生损伤作用. 当 $c(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3)$ 升高至 5 mmol/L 时, 3T3 细胞和 lovo 细胞彗星长度与对照相比, 均有极显著差异 ($P<0.01$), 表明在较高浓度时, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 不仅对癌细胞 lovo 造成断裂损伤, 对正常细胞 DNA 也会造成一定程度的损伤.

3 讨 论

近 10 年来, 稀土元素是否具有遗传毒性一直是人们研究的焦点. 用 10~300 mg/kg 的稀土硝酸盐灌大鼠胃进行传统致畸变实验, 均未发现大鼠胚胎内脏和外观畸形; 但也有报道稀土元素能够导致小鼠骨髓细胞染色体畸变^[7]. 研究表明, 当 $c(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3)$ 为 1 mmol/L 时, 3T3 细胞 DNA 没有明显的损伤, 但是当 $c(\text{Ce}(\text{NO}_3)_3)$ 升至 5 mmol/L 时, 对 3T3 细胞 DNA 表现出明显的损伤作用, 提示 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 尚具有一定的遗传毒性, 但这种毒性比较弱, 支持文 [7] 的结论. 由于稀土元素极难进入正常细胞, 因此推测稀土元素对遗传物质 DNA 的损伤极有可能与重金属元素一样, 是通过脂质过氧化作用造成的. 关于这一点, 正在做进一步的研究.

另一方面, 低浓度时 (1 mmol/L), lovo 细胞的 DNA 损伤率要明显高于 3T3 细胞 DNA 的损伤率, 提示较低浓度时 $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ 对正常细胞和癌细胞存在着不同的作用, 稀土对癌细胞可能具有选择性杀伤作用, 这种作用是否与癌细胞与正常细胞表面结构的差异造成稀土对癌细胞的高亲和性^[8]有关, 值得深入探讨.

参考文献:

- [1] SHIMADA H, NAGANO M, FUNAKOSHI T, et al. Pulmonary toxicity of systemic terbium chloride in mice [J]. J Toxicol Environ Health, 1996, 48: 81~92.
- [2] 刘晓麒, 曹恩华. 脂质过氧化损伤引起 DNA 损伤研究进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21 (3): 218~222.
- [3] LEURATTI C, SINGH R, LAGNEAU C, et al. Determination of malondialdehyde—induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay [J]. Carcinogenesis, 1998, 19 (11): 1919~1924.
- [4] CHENG K C, CAJILL D S, KASAI H, et al. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G—T and A—C substitutions [J]. J Biol Chem, 1992, 267: 166~171.
- [5] 纪云晶, 肖白, 王宗惠, 等. 轻稀土元素抑癌机理研究 [J]. 卫生毒理学杂志, 1996, 10 (4): 223~227.
- [6] 王芳, 张双全, 戴祝英. 抗菌肽 CM4 组分对 K562 癌细胞染色质 DNA 断裂作用的 SCGE 研究 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1998, 25 (1): 64~67.
- [7] JHA A M, SINGH A C. Clastogenicity of lanthanides: induction of chromosomal aberration in bone marrow cells of mice *in vivo* [J]. Mutat Res, 1995, 341: 193~197.
- [8] ZHUANG G, ZHOU Y, LU H, et al. Concentration of rare earth elements As and Th in human brain and brain tumors determined by neutron activation analysis [J]. Bio Trace Elem Res, 1996, 53 (1~3): 45~49.

DNA Damage of 3T3 and Lovo Induced by Cerous Nitrate

YANG Wei-dong^{}, LUO Chen, TIAN Xue-mei, LEI Heng-Yi, YANG Yan-Sheng*

Abstract: The effect of DNA damage in 3T3 and lovo cells induced by $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ was detected using single cell gel electrophoresis assay (SCG). The results showed that increase in DNA migration in lovo was induced by 1 mmol/L $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$, but little change happened in 3T3; however, when the concentration of $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ was up to 5 mmol/L, significant increase in DNA migration was observed both in 3T3 and lovo. It suggested that $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ have different effects on 3T3 and lovo, $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ have weak genetic toxicity.

Keywords: single cell gel electrophoresis; rare earth; DNA; 3T3; lovo

^{*} School of Chemistry and Chemical Engineering, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China