

文章编号: 1001-098X(2002)03-0124-03

·综述·

加速器质谱技术在DNA加合物检测中的应用

游冬青, 陈 杞

摘要: 大部分化学致癌物进入体内, 或经代谢活化后, 可与生物大分子——蛋白质或核酸形成共价相连的加合物, DNA加合物的形成是化学致癌过程中一个早期、可检测到的关键步骤。加速器质谱技术 (accelerator mass spectrometry, AMS) 的DNA加合物检测, 是目前最灵敏的检测方法, 提供了人们研究低剂量效应的直接有力的手段。

关键词: 加速器质谱技术; DNA加合物; 化学致癌物

中图分类号: TL817.4 **文献标识码:** A

Application of accelerator mass spectrometry in studies of DNA adducts

YOU Dong-qing, CHEN Qi

(Department of Radiation & Nuclear Medicine of Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: Most chemical carcinogens, after intake, or after metabolic activation, can form covalent modifications of DNA (DNA adducts). DNA adducts formation induced by carcinogenic chemicals reflects exposure and is directly related to tumor formation. DNA adduct is a valid indicator of early key stage of carcinogenesis. Accelerator mass spectrometry (AMS) is a relatively new nuclear technique, has been developed for the detection of DNA adduct with great detection sensitivity. This powerful application allows studying molecular effects at the low-dose carcinogen exposure.

Key words: accelerator mass spectrometer; DNA adduct; chemical carcinogens

大部分的化学致癌物进入体内, 或经代谢活化后, 生成的亲电子基团可与生物大分子——蛋白质或核酸形成共价相连的加合物 (adduct)。越来越多的证据已经表明, 机体暴露于化学致癌物所导致的DNA结构的损伤, 主要由化学致癌物——DNA加合物所引发的, 而DNA的损伤是肿瘤发生的直接原因。加速器质谱技术 (accelerator mass spectrometry, AMS) 为一新兴的核技术, 可应用于DNA加合物检测, 是目前最灵敏的检测手段。

1 DNA加合物研究简介

在多阶段的致癌连续事件中, DNA加合物的形

成是化学致癌过程中一个早期、可检测到的关键步骤。检测接触致癌物不同时间的DNA加合物, 反映了组织特异的加合物形成与清除速率, 并且与致癌物代谢活化、DNA修复、加合物的稳定性等因子密切相关。主要研究范畴包括:

(1) 实验动物模型中的DNA加合物剂量测定。其目的是通过测量致癌物与DNA的加合程度来评价致癌物的接触剂量和致癌危险性。所建立的实验动物模型通常是将实验动物暴露于多种剂量水平的化学致癌物1~2个月, 以确保足够的时间形成稳定水平的加合物。研究表明: ①DNA加合物的形成在极低剂量水平仍呈线性反应; ②加合物的形成通常可致肿瘤的发生, 但却不是肿瘤发生的惟一条件, 在某些实验动物模型中发生了肿瘤, 但没有DNA加合物的形成, 这是通过非DNA加合物形成途径致癌的。Otteneder M等^[1]进行了27种化学致癌的DNA加合物与肿瘤形成的相关性研究, 得到的结论是大鼠及小鼠肝脏中53~5543DNA加合物/ 10^8 核苷

收稿日期: 2002-01-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (19875077)

作者简介: ①游冬青 (1968-), 女, 福建福州人, 第二军医大学放射医学教研室 (上海, 200433) 副教授, 硕士生导师, 主要从事实验核医学与放射生物学研究。

②陈杞 (1932-), 男, 河南开封人, 第二军医大学放射医学教研室教授, 博士生导师, 主要从事实验核医学和放射毒理学研究。

酸的加合物水平与50%的肿瘤事件发生率相关;同样的研究表明,每增加200~500 DNA加合物/ 10^8 核苷酸,实验动物模型中肝肿瘤的发生率上升5%。

(2)人群DNA加合物的生物监测及在肿瘤分子流行病学中应用。传统的毒物监测方法在研究人群暴露和危险度评价时得到的仅为近似接触量,DNA加合物研究不仅可提供个体的“有效接触量”,还能提供许多化学物质结构与毒性之间关系及毒物代谢动力学之间的信息,是一项重要的生物监测指标。人体致癌物——DNA加合物的生物监测可用于阐明DNA加合物的形成与肿瘤危险度之间的关系,在肿瘤分子流行病学研究上具有良好的应用前景。在合理的流行病学研究设计前提下,Ross R K等^[2]报道了饮食中AFB1暴露人群中AFB1(aflatoxin B1)-DNA加合物与肝癌的相关性,Tang D L^[3]等报道了吸烟人群中多环芳烃类化合物(PAH)-DNA加合物与肺癌的关系。

(3)DNA加合物的研究发展趋势。①开展DNA加合物形成的生物学效应研究,试图在DNA加合物含量与生物学效应之间建立某种内在的联系^[4]。我们目前正致力于该类研究,将所建立的DNA加合物的AMS测量体系应用于细胞水平上的生物学效应研究,寻找DNA加合物形成与肿瘤发生的细胞传导通路的改变之间的关系;②检测方法向常规化和标准化发展,不断提高检测灵敏度,开发其实际应用价值。例如,Wendy AS等^[5]在1999年建立了无细胞体系中DNA加合物的检测方法,可用于确定化学防护剂的有效性。

2 DNA加合物的AMS检测方法

目前,DNA加合物的检测方法主要有:免疫法、荧光法、质谱法、 ^{32}P 后标记法、AMS等。在生物医学领域中,应用最广的是 ^{32}P 后标记技术,其检测的灵敏度可达1个加合物/ $10^8 \sim 10^{10}$ 个核苷酸,而AMS的检测的灵敏度为1个加合物/ $10^{11} \sim 10^{12}$ 个核苷酸,是目前检测灵敏度最高的方法^[6]。AMS的检测优势就在于研究机体在极低剂量暴露水平下或环境剂量水平下外源化学毒物对机体的作用。在缺少高灵敏的检测手段前提下,对低剂量水平的作用效应的认识,主要是通过高剂量实验水平的结果外推而得到的,由于在剂量-效应关系中存在着剂量域的影响,这种外推并不能客观反映低剂量水平的效应。

AMS的问世,提供了人们研究低剂量效应的直接有力的手段。

加速器质谱技术是加速器技术的一个新的应用。常规的质谱技术是利用静电场和磁场,使质量不同的离子束由于其荷质比的不同而分开的一种技术。利用这种技术可以测量原子质量、同位素丰度,鉴别化合物和混合物,进行成分分析等,具有分析对象范围广泛、分辨本领高和分析速度快等优点,但在测量长寿命同位素时(如 ^{14}C)会遇到大量的相同分子和同量异位素的干扰(如 ^{14}N 等),使其无法被识别。在20世纪70年代中期问世的加速器质谱技术,是一种加速器、质谱和探测鉴别技术相结合的产物,可克服上述常规质谱仪的不足。

加速器质谱主要包括五大部分:离子源、离子加速系统、离子束偏转与聚焦系统、消除干扰粒子系统和粒子探测系统。加速器质谱可采用回旋加速器,又可采用串列加速器,但目前世界上绝大多数实验室采用串列加速器。一般采用负离子源,不会产生氮(^{14}N)负离子,以消除 ^{14}C 的同量异位素的干扰,最终采用粒子鉴别技术和探测器对所测核素进行测量。与传统的核衰变计数相比,加速器质谱具有明显的高灵敏度、所需的样品量很少等优点。

早在1978年的第一次AMS国际会议上,Rochester大学的Reilson J和Waterhouse C就探讨了AMS应用于生物医学领域中进行示踪研究的可行性,但其突破性的研究直到1988~1990年才由美国LLNL实验室的Felton J S^[7]和Turteltaub K W^[8]获得成功,他们建立了AMS制样和测量体系,研究了烤制食品中致癌物MeIQx[2-氨基-3,8-二甲基喹唑(4,5-并)喹啉]在小鼠体内代谢与DNA的加合情况。其建立的方法体系沿用至今,所采用的标记化合物是 ^{14}C 标记化合物,以尾静脉注射、腹腔注射、灌胃或局部皮肤应用等方式引入机体中,代谢后分离纯化提取不同的组份。AMS测量所需的离子源为石墨碳,所有的生物样品必须转化为石墨才能上机测量,Vogel J S等^[9]建立的制样装置成功地应用于生物样品的石墨转化,其转化过程主要包括两个化学过程:生物大分子物质在CuO作用下氧化成 CO_2 , CO_2 在Co、Zn、 TiH_2 的作用下还原成C。在整个真空转化装置中, CO_2 必须与 N_2 、 H_2O 等其他杂气分离。制样过程防止交叉污染十分重要。测量结果引进一个特殊的单位:现代碳(MC),一个现代碳定义为每

克碳中有 5.9×10^{10} 个 ^{14}C 原子，或每克碳 6.11pCi ($1\text{Ci}=37\text{GBq}$)，相当于1950年自然界中 ^{14}C 的丰度。根据不同的组织标本中含碳量的不同，可以由 ^{14}C 与 ^{12}C 的比值计算出加合物的数目。

3 AMS在DNA加合物中的应用现状及前景

随着AMS在其他生物医学领域的应用日益增加，AMS的研究出现了一个分支——Bio-AMS，专指用加速器质谱进行生物医学研究。其中引人注目的工作就是对DNA加合物的研究。自从加合物的AMS检测方法建立以来，已研究了多种化合物在动物体内与DNA的加合代谢，如化学致癌物MeIQx、TCDD(2, 3, 7, 8-四氯二苯并-p-二恶英)、PhIP[2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑(4, 5-并)吡啶]、尼古丁[3-(1-甲基-2-吡咯烷基)-吡啶]、NNK[4-(甲基亚硝胺基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮]等。这些研究使得人们对这些化合物的基因毒性的认识提高到一个新的水平。无疑，AMS已成为生物医学领域的新技术。由于其研究方法的复杂性，AMS的推广应用具有局限性，表现在生物医学界了解AMS仍很少，而Bio-AMS的研究往往需要多学科间的交叉研究；AMS仪器的稀有也是其发展的不利因素，世界上总共有三十多台加速器质谱仪，虽已有三分之一开展生物医学研究，仍无法满足生物医学研究大样本测量的需要。

参考文献:

- [1] Otteneider M and Lutz WK. Correlation of DNA adduct levels with tumor incidence: carcinogenic potency of DNA adducts[J]. *Mutat Res*, 1999, 424: 237-247.
- [2] Ross RK, Yuan JM, Yu MC, et al. Urinary aflatoxin biomarkers and risk of hepatocellular carcinoma[J]. *Lancet*, 1992, 339: 943-946.
- [3] Tang DL, Rundle A, Warburton D, et al. Associations between both genetic and environmental biomarkers and lung cancer: evidence of a greater risk of lung cancer in women smokers[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19: 1949-1953.
- [4] Stacey LT, Stephen PE, Kevin KC, et al. Benzo[a]pyrene and TCDD-induced alteration in tyrosine phosphorylation and insulin-like growth factor signaling pathways in the MCF-10A human mammary epithelial cell line[J]. *Carcinogenesis*, 1998, 19:1291-1297.
- [5] Wendy AS, Ramesh CG. Determining efficacy of cancer chemopreventive agents using a cell-free system concomitant with DNA adductions[J]. *Mutat Res*, 1999, 4: 143-152.
- [6] Turteltaub KW, Felton JS, Gledhill BL, et al. Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: Relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 5288-5292.
- [7] Felton JS, Turteltaub KW, Vogel JS, et al. Accelerator mass spectrometry in biomedical science: Applications in low exposure biomedical and environmental dosimetry[J]. *Nucl Instr Meth Phys Res*, 1990, B52: 517-523.
- [8] Turteltaub KW, Felton JS, Gledhill BL, et al. Accelerator mass spectrometry in biomedical dosimetry: Relationship between low-level exposure and covalent binding of heterocyclic amine carcinogens to DNA[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 5288-5292.
- [9] Vogel JS. Rapid production of graphite without contamination for biomedical AMS[J]. *Radiocarbon*, 1992, 34: 344-350.

·书讯·

《实用临床核医学》(修订版)2002年6月出版

本书由马寄晓、刘秀杰编著，国内外40余名专家结合自身临床实践并参考了国外最新进展撰写而成，内容包括：正电子断层显像(PET)与双探头符合线路SPECT在心血管系统、神经系统及肿瘤上的应用；放射免疫及受体显像在肿瘤治疗上的应用及前景；核素治疗在内分泌、肿瘤及心血管系统方面的应用等。邮购价195元。

另有《实用核医学图谱》，邮购价70元；《辐射危害与评价》，邮购价112元。

邮购地址：北京55信箱清平书店 金莉收；邮编：100053。电话：83154081。户名：北京清平书店有限公司 帐号：0981106810001；开户行：招商银行展览路支行。