

· 论 著 ·

L-02 肝细胞对氢醌所致 DNA 损伤 耐受实验模型的初步建立

胡恭华^{1,3}, 庄志雄^{2*}, 杨淋清², 纪卫东³, 沙焱³, 杨建平³

(1. 赣南医学院预防医学教研室, 江西 赣州 341000; 2. 深圳市疾病预防控制中心, 广东 深圳 518020; 3. 中山大学公共卫生学院预防医学系, 广东 广州 510080)

摘要: 目的 确定氢醌 (hydroquinone, HQ) 对 L-02 肝细胞的染毒剂量和染毒时间, 从而为进一步的 DNA 损伤耐受机制研究提供科学依据。方法 采用噻唑蓝 (MTT) 比色法测定不同浓度 (0、5、10、20、40、80、160 和 320 $\mu\text{mol/L}$) 的 HQ 于不同时间 (6、12、24 和 48 h) 作用之后 L-02 肝细胞的相对存活率。结果 在相同的作用时间 (6、12 或 24 h) 条件下, 在 0~320 $\mu\text{mol/L}$ 范围内, 随着 HQ 浓度的增加, 各剂量组 L-02 肝细胞的存活率以剂量依赖性方式逐渐减少; 其中 160 和 320 $\mu\text{mol/L}$ 组 L-02 肝细胞的存活率与对照组相比较有明显地减少 ($P < 0.01$); 而在 48 h 时间组内, HQ 染毒剂量达到 80 $\mu\text{mol/L}$ 就可引起 L-02 肝细胞存活率的明显降低 ($P < 0.01$)。在相同浓度 (5、10、20 和 40 $\mu\text{mol/L}$) 的 HQ 作用下, 随着 HQ 作用时间的延长, 各剂量组细胞的存活率之间差异没有统计学意义 ($P > 0.05$); 当 HQ 染毒时间达到 48 h 时, 80、160 和 320 $\mu\text{mol/L}$ 的 HQ 染毒组 L-02 肝细胞的存活率与 6 h 对照组比较有明显地减少 ($P < 0.01$)。结论 可以将 80 $\mu\text{mol/L}$ 的 HQ 染毒 24 h 作为 L-02 肝细胞耐受 DNA 损伤的最大剂量和最长时间的界限。

关键词: 氢醌; L-02 肝细胞; 噻唑蓝比色法

中图分类号: R994.6; O625.46 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2007)01-0006-03

Establishment of experimental model for DNA damage tolerance induced by HQ in L-02 hepatic cells

HU Gong-hua^{1,3}, ZHUANG Zhi-xiong^{2*}, YANG Lin-qing², JI Wei-dong³, SHA Yan³, YAN Jian-ping³

(1. Department of Preventive Medicine, Gannan Medical College, Ganzhou 341000, China; 2. Shenzhen Municipal Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen 518020, China; 3. Department of Preventive Medicine, School of Public Health, SUN YAT-SEN University, Guangzhou 510080, China)

Abstract Objective To establish action-dose and time of HQ on L-02 hepatic cells then to provide a scientific basis for the further studies on the mechanism of DNA damage tolerance. **Method** MTT assay was conducted to detect the effect of HQ with various concentrations (0, 5, 10, 20, 40, 80, 160 and 320 $\mu\text{mol/L}$) on survival rate of L-02 hepatic cells at different exposure time. **Result** The HQ concentrations in the range of 0~320 $\mu\text{mol/L}$, at same exposure time (6, 12, or 24 h), the viabilities of L-02 hepatic cells were gradually decreased in a dose-dependent manner; the higher exposure groups (160 $\mu\text{mol/L}$ and 320 $\mu\text{mol/L}$) were significantly reduced compared to the control group (0 $\mu\text{mol/L}$, $P < 0.01$); while the 48 h exposure to HQ ($< 80 \mu\text{mol/L}$) could induce significant decrease of viability of L-02 hepatic cells ($P < 0.01$), and at same exposure level to HQ (0, 5, 10, 20, or 40 $\mu\text{mol/L}$), there was no difference in survival level of L-02 hepatic cells ($P > 0.05$). When the exposure time reached 48 h, the viability of L-02 hepatic cells whether 80, 160 or 320 $\mu\text{mol/L}$, were all less than that of the control (6 h, $P < 0.01$). **Conclusion** It could be concluded that L-02 hepatic cells treated by HQ with 80 $\mu\text{mol/L}$ for 24 h might be the maximal limit of dose and time of L-02 hepatic cells to tolerate DNA damage induced by HQ.

Key words: Hydroquinone (HQ); L-02 hepatic cell; MTT

氢醌 (hydroquinone, HQ), 又名对苯二酚, 是一种白色晶状固体, 溶于水, 易溶于乙醇和乙醚。主要用于黑白显影剂、偶氮染料、橡胶防老剂、稳定剂、抗氧化剂、皮肤化妆品及皮肤科治疗色素沉着症的外

用制剂等, 同时还是许多致癌物在体内关键的中间代谢产物^[1]。HQ 可经呼吸道、消化道和皮肤吸收。动物实验表明, HQ 对肝、肾、造血系统和中枢神经系统等均可造成损害。从分子水平上看, HQ 可引起人血液系统细胞内 DNA 的损伤^[2], 如产生 DNA 加合物、双链断裂等。而有些未被修复的 DNA 损伤则会阻碍细胞内正常的 DNA 复制, 从而会最终导致细胞的明显死亡。最近的研究表明, 细胞内有种称为 DNA 损伤耐受的机制可以耐受 DNA 损伤的存在, 使

收稿日期: 2006-08-03; 修回日期: 2006-09-16

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973) 项目 (2002CB512903, 2002CB512904)

作者简介: 胡恭华 (1972-), 男, 讲师, 硕士, 主要从事生化和分子毒理学研究。

*. 通讯作者, 教授, 博士生导师。

得DNA合成得以顺利进行下去^[3]。目前,有关于L-02肝细胞对HQ所致DNA损伤耐受的研究未见报道。为此,本文以体外培养的L-02肝细胞为研究对象,以HQ为受试物,采用MTT法测定HQ对L-02肝细胞存活率的影响,旨在为DNA损伤耐受机制研究中HQ对L-02肝细胞的染毒剂量和染毒时间的确定提供科学的依据。

1 材料和方法

1.1 试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 RPMI-1640培养基(美国GIBCO公司),胰蛋白酶(美国AMRESCO公司),胎牛血清(杭州四季青),青霉素和链霉素(美国Sigma公司),二羟乙基呱嗪乙烷磺酸钠(HEPES,美国Sigma公司),噻唑蓝(MTT,美国Sigma公司),二甲基甲酰胺(DMF,Genview分装),十二烷基磺酸钠(SDS,美国Sigma公司)。其它试剂均为国产分析纯。

1.1.2 主要仪器 HFsafe-1200型生物安全柜(上海力申科学仪器公司),HF212 uv型CO₂恒温培养箱(上海力申科学仪器公司),XDS-1B型倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂),TDL-5-A型低速离心机(上海安亭科学仪器厂),BP1211S型电子天平(德国赛多利斯有限公司),Milli-Q Biocel型超纯水系统装置(法国MILLIORE公司),HVE-50高压灭菌器(日本HIRAYAMA公司),SUT-6120热空气消毒箱(德国Heraeus公司),MM-I型微量振荡器(上海精科实业有限公司),Powerwavex型酶标仪(美国BIO-TEK公司)。

1.1.3 细胞及受试物 L-02肝细胞(购自中国科学院上海细胞生物学研究所),HQ(美国Sigma公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 培养基采用含10%胎牛血清的RPMI-1640,并加入青霉素(100×10³ U/L)和链霉素(100 mg/L)。将L-02肝细胞用37℃、体积分数为5%的CO₂细胞培养箱培养。每3 d传代一次,细胞消化用0.25%胰蛋白酶。取对数生长期细胞进行实验。

1.2.2 大剂量范围HQ染毒之后L-02肝细胞存活率的检测 采用MTT法(详见1.2.3)。首先进行了大剂量范围的染毒,终浓度分别为0、0.1、1、10、100、1000 μmol/L和10、100 mmol/L,染毒时间为24 h;然后根据结果来确定小范围的染毒剂量。

1.2.3 小剂量范围HQ染毒之后L-02肝细胞存活率的检测 采用MTT法。将处于对数生长期的L-02肝细胞用0.25%胰酶消化,之后用吸管吹打使之成单细胞悬液并调整细胞浓度为10⁴个/L,接种于96孔培养板上,置37℃、5%的CO₂培养箱中培养,待细

胞达80%融合时,弃原培养液,加入200 μl含不同浓度HQ的培养液并使其终浓度分别为0、5、10、20、40、80、160和320 μmol/L,另设培养液对照组(即调零孔),每种浓度设9个平行孔;分别于6、12、24和48 h之后弃去旧培养液,每孔加入100 μl新鲜培养液及20 μl的MTT液(5 g/L)。2 h后,倾去培养液,每孔加入150 μl的细胞裂解缓冲液(50%DMF+20%SDS, pH4.6),室温下于微量振荡器上振荡10 min,使所形成的紫色结晶充分溶解。然后用酶标仪(Bio-Tek)测定各孔的吸光度值(参考波长为630 nm,实验波长为570 nm)。按下式计算存活率:细胞存活率(%)=处理组吸光度均值/对照组吸光度均值。

1.2.4 统计学分析 MTT实验所获得的吸光度值及细胞存活率均以均值±标准差表示。实验数据使用SPSS 11.0统计软件进行ANOVA方差分析。

2 结果

2.1 大剂量范围内HQ对L-02肝细胞存活率的影响

用MTT法分别观察了不同剂量HQ在不同时间对L-02肝细胞的毒性作用。如表1所示,在0~100 mmol/L的范围内,L-02肝细胞的相对存活率具有随着HQ剂量的增加而降低的趋势。在浓度低于1000 μmol/L的HQ作用下,各染毒组L-02肝细胞的相对存活率(依次为98.21%、97.96%、97.01%、96.90%)与正常对照组即0 μmol/L剂量组(相对存活率为100%)之间的差别无统计学意义($P>0.05$);当染毒剂量超过1000 μmol/L时,HQ能够使L-02肝细胞的存活率明显减少($P<0.01$,与对照组相比),分别降至72.48%、59.33%和50.79%。由此可初步确定HQ的小剂量范围染毒界限。

表1 不同浓度HQ染毒24 h对L-02肝细胞相对存活率的影响($\bar{x}\pm s$)

HQ浓度(μmol/L)	n	相对存活率(%)
0	9	100.00±4.82
0.1	9	98.21±6.79
1	9	97.96±6.31
10	9	97.01±5.68
100	9	96.90±4.93
1000	9	72.48±4.30*
10000	9	59.33±3.86*
100000	9	50.79±3.17*

与对照组比较, * $P<0.01$ (ANOVA分析)

2.2 小剂量范围内HQ对L-02肝细胞存活率的影响

如表2所示,在相同的作用时间(6、12或24 h)条件下,各剂量组(浓度分别为5、10、20、40、80

$\mu\text{mol/L}$ 的 HQ 作用于 L-02 肝细胞之后, 随着 HQ 浓度的增加, 各剂量组细胞的存活率之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 并且上述各剂量 HQ 染毒组的细胞存活率与对照组 (即 $0 \mu\text{mol/L}$ 组) 之间的差异也没有统计学意义 ($P > 0.05$); 当染毒剂量超过 $160 \mu\text{mol/L}$ 时, 各时间组内染毒组 L-02 细胞的存活率与对照组相比较有明显地减少 ($P < 0.01$); 而在 48 h 时间组内, HQ 染毒剂量达到 $80 \mu\text{mol/L}$ 就可引起 L-02 肝细胞存活率的明显降低 ($P < 0.01$)。在相同浓度 (5、10、20 或 $40 \mu\text{mol/L}$) 的 HQ 作用下, 随着 HQ 作用时间的延长, 各剂量组细胞的存活率之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 当 HQ 染毒时间达到 48 h 时, 80、160 和 $320 \mu\text{mol/L}$ 的 HQ 染毒组 L-02 肝细胞的存活率与 6 h 对照组比较有明显地减少 ($P < 0.01$)。

表 2 不同浓度 HQ 于不同作用时间对 L-02 肝细胞存活率的影响 ($n=9$, %, $\bar{x} \pm s$)

HQ 浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	6 h	12 h	24 h	48 h
0	100.00 ± 1.98	100.00 ± 2.88	100.00 ± 3.71	100.00 ± 3.06
5	99.91 ± 4.06	99.92 ± 3.46	99.65 ± 4.48	97.79 ± 6.58
10	99.14 ± 5.05	99.10 ± 4.64	99.41 ± 6.54	97.07 ± 3.59
20	98.76 ± 3.86	98.34 ± 6.10	96.85 ± 3.22	94.82 ± 2.30
40	98.43 ± 4.67	97.97 ± 2.15	95.39 ± 3.07	94.15 ± 2.16
80	96.26 ± 7.26	95.51 ± 3.18	94.02 ± 6.09	69.80 ± 3.66*#
160	84.08 ± 4.89*	82.95 ± 4.87*	79.20 ± 7.94*	63.43 ± 2.73*#
320	81.51 ± 3.71*	78.33 ± 6.98*	72.00 ± 2.74*	56.69 ± 3.26*#

同一染毒时间各剂量实验组与正常对照组比较, * $P < 0.01$; 同一染毒剂量各时间 (12、24 和 48 h) 组与 6 h 时间组比较, # $P < 0.01$

3 讨论

大量的体外研究表明, HQ 可导致动物及人体细胞内 DNA 的异常改变, 如引起 DNA 链断裂^[4,5]、DNA-蛋白质交联^[6], 以及产生 DNA 加合物^[7~10]。而这些 DNA 损伤可以导致 DNA 复制的异常, 从而引起细胞的明显死亡。幸运的是, 细胞内有种称为 DNA 损伤耐受的机制可以容忍 DNA 损伤的存在, 使之得以适应不断变化的环境。目前, DNA 损伤耐受机制的探讨已成为毒理学研究的热点。为此, 本文以细胞存活率为观察终点, 着重就 L-02 肝细胞对 HQ 的剂量-反应和时间-反应关系进行研究, 旨在建立 DNA 损伤耐受研究的体外实验模型。

本实验主要采用 MTT 比色法^[11] 测定 HQ 对 L-02 肝细胞存活率的影响。结果显示, 在一定的剂量范围内, HQ 对 L-02 肝细胞相对存活率的影响存在着一定的剂量依赖性和时间依赖性。在 24 h 的染毒时间范围内, 低剂量组 (5~ $80 \mu\text{mol/L}$) 浓度范围内的 HQ 作用于 L-02 肝细胞后, 细胞存活率与正常对照组的

细胞存活率之间差异无统计学意义, 但基本上具有随剂量和时间的增加而增加的趋势。当染毒剂量超过 $160 \mu\text{mol/L}$ 时, HQ 就会对 L-02 肝细胞产生明显的毒性作用而对细胞存活率和细胞形态产生影响。而当染毒时间达到 48 h 时, $80 \mu\text{mol/L}$ 的 HQ 就可引起 L-02 肝细胞存活率的明显降低。因此, 可以将 $80 \mu\text{mol/L}$ 的 HQ 染毒 24 h 作为 L-02 肝细胞耐受 DNA 损伤的最大剂量和最长时间的界限, 从而为下一步 DNA 损伤耐受机制研究中的染毒剂量和染毒时间的确定奠定了相应的理论基础。

参考文献:

- [1] Decaprio AP. The toxicology of hydroquinone relevance to occupational and environmental exposure [J]. Crit Rev Toxicol, 1999, 29 (3): 283-330.
- [2] Fabiani R, DE Bartolomeo A, Rosignoli P, et al. Influence of culture conditions on the DNA-damaging effect of benzene and its metabolites in human peripheral blood mononuclear cells [J]. Environ Mol Mutagen, 2004, 37 (1): 1-6.
- [3] Kunz B A, Straffon A F, Vonarx E J. DNA damage-induced mutation; tolerance via translesion synthesis [J]. Mutat Res, 2000, 451 (1-2): 169-185.
- [4] 江高峰, 庄志雄, 刘起展, 等. 氢醌对人胚肺成纤维细胞中 DNA 及细胞核的影响 [J]. 中华预防医学杂志, 2003, 37(3): 183-185.
- [5] Lindsey RH Jr, Bender R P, Osheroff N. Effects of benzene metabolites on DNA cleavage mediated by human topoisomerase II alpha; 1, 4-hydroquinone is a topoisomerase II poison [J]. Chem Res Toxicol, 2005, 18 (4): 761-770.
- [6] Bironaite D, Siegel D, Moran J L, et al. Stimulation of endothelial IL-8 (Ei-8) production and apoptosis by phenolic metabolites of benzene in HL-60 cells and human bone marrow endothelial cells [J]. Chem Biol Interact, 2004, 149 (2-3), 177-188.
- [7] 常平, 戴宇飞, 李桂兰. 苯及其代谢产物在小鼠骨髓中形成 DNA 加合物的实验研究 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 1999, 17 (4): 196-199.
- [8] 孟紫强. 应用 ^{32}P -后标记技术对苯醌和氢醌处理人血淋巴细胞形成 DNA 加合物的研究 [J]. 中国环境科学, 1997, 17 (3): 272-275.
- [9] Gaskell M, McLuckie K I, Farmer P B. Comparison of the mutagenic activity of the benzene metabolites hydroquinone and parabenzoquinone in the supF forward mutation assay; a role for minor DNA adducts formed from hydroquinone in benzene mutagenicity [J]. Mutat Res, 2004, 554 (1-2): 387-398.
- [10] Gaskell M, McLuckie K I, Farmer P B. Comparison of the repair of DNA damage induced by the benzene metabolites hydroquinone and p-benzoquinone; a role for hydroquinone in benzene genotoxicity [J]. Carcinogenesis, 2005, 26 (3): 673-680.
- [11] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival; application to proliferation and cytotoxicity assays [J]. J Immunol Methods, 1983, 65 (1): 55-63.