

限量饮食对致癌物活化代谢及 DNA 断裂的影响

陈雯¹ 张桥¹ 吴中亮² 周明武³

(1 中山医科大学卫生毒理学教研室; 广州, 510089 2 广州医学院
化学致癌研究所; 广州, 510182 3 美国国家毒理研究中心)

摘要 目的: 研究限量饮食(DR)对小鼠肝代谢活化致癌物以及致癌物导致的 DNA 链断裂程度的影响。方法: 用³²P-后标记和高效液相色谱法测定致癌物-DNA 主要加合物生成量; 用随机寡核苷酸引物合成法(ROPS)测定 DNA 链断裂程度; 用体外代谢酶活性测定法检测有关代谢酶的活性。结果: ①限量饮食减少小鼠肝中黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)-和 2-乙基氨基芴(2-AAF)-DNA 加合物(AF-C⁸-dG)的生成, 同时也减少致癌物导致的 DNA 链断裂; 限量饮食增加苯并[a]芘(BaP)-DNA 加合物(BaP-N²-dG)和 6-硝基苯甲萘(6-NC)-DNA 总加合物的生成, 也增加致癌物导致的 DNA 链断裂。②在小鼠肝中, 致癌物-DNA 加合物的生成量与致癌物导致的 DNA 链断裂程度密切相关; ③限量饮食诱导某些与致癌物代谢有关的酶。结论: 限量饮食特异地改变小鼠肝代谢酶的活性继而影响致癌物的代谢活化, 这种作用在致癌过程的起始阶段可能起着重要的作用。

关键词 膳食; 代谢/酶学; 肿瘤标记物; DNA 损伤

中图分类号 R 730.231

DIETARY RESTRICTION MODULATED CARCINOGEN METABOLIC ACTIVATION AND THE CARCINOGEN-INDUCED DNA STRAND BREAKS

Chen Wen Zhang Qiao Wu Zhongliang Zhou Mingwu

(Department of Health Toxicology, Sun Yat-sen University of Medical Sciences Guangzhou, 510089)

Abstract Objective: To study the effect of dietary restriction on the metabolic activation of carcinogens and carcinogen-induced DNA strand breaks in B6C3F₁ mouse livers. **Methods:** ³²P-postlabelling and HPLC techniques were applied to detect the formation of major carcinogen-DNA adducts. Random oligonucleotide-primed synthesis was used to measure the extent of DNA strand breaks. The enzyme activity was measured by the *in vitro* metabolic experiment. **Results:** To be showed that DR significantly inhibited aflatoxin B₁ (AFB₁)-DNA major adduct and 2-acetylaminofluorene (2-AAF)-DNA major adduct (AF-C⁸-dG) formation as well as carcinogen-induced strand breaks. DR enhanced the formation of hepatic benzo[a]pyrene (BaP)-DNA adduct (BaP-N²-dG) and total 6-nitrochrysene (6-NC)-DNA adducts as well as BaP-, 6-NC-induced DNA strand breaks. The formation of the carcinogen-DNA adduct in mouse liver was correlated with the carcinogen-induced DNA strand breaks. DR also induced the activity of several metabolizing enzymes. **Conclusion:** The effect of DR on the carcinogen activation is dependent upon the DR-modulated carcinogen metabolizing enzyme activities. It may play an important role in the initiation stage of carcinogenesis.

Subject headings diet; metabolism/enzymology; tumor markers; DNA damage

限量饮食(dietary restriction, DR)可延长实验动物的寿命, 对肿瘤的自然发生和发展有抑制作用^[1], 对化学致癌也有抑制作用^[2]。但产生这些作用的机理还未明确, 以往的研究多注重于 DR 对癌症发生的促进阶段和发展阶段的影响。但是, 许多致癌物需经代谢活化才有致癌作用, DR 可以改变

许多代谢酶的活性^[3], 它对致癌过程的起始阶段的影响又是怎样的呢? 为了探讨这个问题, 本实验选取黄曲霉毒素 B₁(AFB₁)、苯并[a]芘(BaP)、6-硝基苯甲萘(6-NC)和 2-乙基氨基芴(2-AAF)作为间接致癌物的代表。采用高效液相色谱(HPLC)和³²P-后标记的薄层色谱分析法, 用这几种致癌物的主要

DNA 加合物的生成量及有关的代谢酶活性的改变作为致癌物代谢活化的指标, 研究 DR 对不同致癌物代谢活化的影响。另外, 还测定了 DR 对致癌物导致的 DNA 断裂的影响, 以探讨其与致癌物-DNA 加合物生成的关系。

1 材料和方法

1.1 试剂

$^3\text{H-AFB}_1$ (7.7 MBq/mol), BaP, 小牛胸腺 DNA, T4 多聚核苷酸激酶 (T4 polynucleotide kinase, PNK) 购自美国 Sigma 公司; $[\gamma\text{-}^{32}\text{P}]\text{ATP}$ (3.4 MBq/mol) 购自美国 ICN Biomedicals。标准品来源: BaP 主要的 DNA 加合物 BP- N^2 -dG, 2-AAF 主要的 DNA 加合物 AF- C^8 -dG 以及 6-NC 加合物标准品分别由美国国家毒理研究中心符必成博士、Beland FA 博士以及 Delclos KB 博士赠给; AFB₁ 主要 DNA 加合物由本实验室合成, 并经过质谱分析及核磁共振分析鉴定^[4]。

1.2 动物的饲养和染毒

雄性 B6C3F₁ 小鼠由美国国家毒理研究中心繁殖供应并以标准的 NIH-31 饲料喂养。小鼠从生后第 16 周起, 所有动物分成两组, 一组为随意饮食 (ad libitum, AL), 另一组则给予 AL 组饲料消耗量的 60%, 但补充足够的维生素和矿物质是为限量组 (DR 组)。小鼠在限量饮食 5 周后开始染毒, 所有的动物都是腹腔注射给药, 每个剂量组 5 只动物。染毒剂量分别为 $^3\text{H-AFB}_1$ (5、10、20 mg/kg, 7.2×10^6 MBq/mol); BaP (5、10、20 mg/kg); 2-AAF (5、10、20 mg/kg); 6-NC (2、5、10 mg/kg), $\varphi = 75\%$ 二甲基亚砜 (DMSO) 作为溶剂。在各时间点, 用干冰产生的 CO₂ 使动物发生晕厥, 迅速解剖动物, 脏器称量后置 -70 °C 冰箱保存。

1.3 加合物的定量分析

$^3\text{H-AFB}_1$ -DNA 加合物的定量分析采用高效液相色谱法 (HPLC) 分离法^[4]; BaP-, 6-NC-和 2-AAF-DNA 加合物的定量分析用 ^{32}P -后标记的薄层色谱分析法^[5~7]。AFB₁-DNA 加合物的量和单位表示为 $b [n (^3\text{H-AFB}_1\text{-adducts) } \cdot m^{-1} (\text{DNA})] / (\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1})$; BaP-, 2-AAF-和 6-NC-DNA 加合物的水平用相对加合物标记值^[8] (relative adduct labeling, 量符为 Y_{RAL}) 来表示。可按如下公式计算: $Y_{\text{RAL}} = [\text{加合}$

物计数率 (min^{-1}) / 正常核苷酸的计数率 (min^{-1}) \times 稀释因子], 本实验中稀释因子为 10^{-9} , 即 $Y_{\text{RAL}} \times 10^{-9}$ 。

1.4 DNA 链断裂测定

采用随机引物寡核苷酸合成法 (random oligonucleotid-primed synthesis, ROPS)^[9], DNA 链断裂程度的量和单位表示为 $b [n (^{32}\text{P-dCTP incorporation) } \cdot m^{-1} (\text{DNA})] / (\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1})$ 。

1.5 酶学测定

谷胱甘肽硫转移酶 (GST), 芳烃羟化酶 (AHH), 7-乙氧基-9-羟基异喹啉去乙基酶 (EROD), 7-五氧基-9-羟基异喹啉去乙基酶 (PROD), 1-硝基苊还原酶 (1-NR) 的测定参照文献 [4, 5] 的方法。

1.6 数据统计

每只动物数据测定重复 3 次, 每一剂量组 5 只动物测定数据平均值的均值表示为平均值 \pm 标准误差 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$), 统计学分析采用 SPSS 7.0 For Windows 软件包中的 t 检验。

2 结果

2.1 限量饮食对致癌物-DNA 加合物生成及 DNA 链断裂的影响

表 1 是动物经 AFB₁, BaP 和 6-NC 染毒 24 h 后, 2-AAF 染毒 72 h 后 DNA 加合物生成量的数据结果, 其它剂量组的结果略。可见限量饮食减少小鼠肝中 AFB₁-DNA 加合物的生成, 减少 2-AAF-DNA 加合物 (AF- C^8 -dG) 的生成, 同时也降低致癌物导致的 DNA 链断裂程度; 另外, 限量饮食增加 BaP-DNA 加合物 (BP- N^2 -dG) 和 6-NC-DNA 总加合物的生成, 也增加致癌物导致的 DNA 链断裂程度。表 1 中的相关系数是致癌物在不同染毒剂量下加合物的生成和 DNA 链断裂的关系, 显示在两组小鼠中两者高度相关。

2.2 限量饮食对几种代谢酶活性的改变作用

从表 2 中可见限量饮食对表中所列的几种酶: 谷胱甘肽硫转移酶、芳烃羟化酶、7-乙氧基-9-羟基异喹啉去乙基酶、7-五氧基-9-羟基异喹啉去乙基酶、1-硝基苊还原酶, 都有不同程度的诱导作用, 所有的数据都是小鼠肝微粒体酶及肝胞浆提取液的体外代谢实验结果。

表1 限量饮食对致癌物-DNA加合物生成及DNA链断裂的影响

Table 1 The effect of dietary restriction on the formation of carcinogen-DNA adducts and DNA strand breaks ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

	Carcinogen-DNA adducts		DNA strand breaks ¹⁾		Correlation coefficient	
	AL-mouse	DR-mouse	AL-mouse	DR-mouse	AL-mouse	DR-mouse
AFB ₁ (5 mg/kg) ²⁾	5.50±0.12	3.82±0.23 ⁴⁾	108±25	39±11 ⁵⁾	0.95 ⁵⁾	0.90 ⁴⁾
BaP(20 mg/kg) ³⁾						
(BP- N ² -dG)	0.40±0.05	0.66±0.03 ⁴⁾	155±33	355±87 ⁵⁾	0.94 ⁵⁾	0.88 ⁴⁾
2-AAF(10 mg/kg) ³⁾						
(AF- C ⁸ -dG)	6.55±1.05	3.77±0.07 ⁴⁾	245±45	127±33 ⁵⁾	0.98 ⁵⁾	0.85 ⁴⁾
6-NC(2 mg/kg) ³⁾	3.88±0.34	8.45±2.20 ⁵⁾	75±15	127±20 ⁴⁾	0.97 ⁵⁾	0.83 ⁴⁾

1) DNA strand breaks was expressed as $b [n (^{32}\text{P-dCTP incorporation}) \cdot m^{-1}(\text{DNA})] / (\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1})$; 2) AFB₁ adduct was expressed as $b [n (^3\text{H-AFB}_1\text{-adducts}) \cdot m^{-1}(\text{DNA})] / (\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1})$; 3) BaP, 2-AAF and 6-NC adducts were expressed as $Y_{\text{RAI}} \times 10^{-9}$, compared to AL group; 4) $P < 0.05$; 5) $P < 0.001$

表2 限量饮食对代谢酶活性(λ_B)的影响作用Table 2 The effect of DR on the activity of metabolic enzymes ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

$\lambda_B / [\lambda_B]$	AL-mouse	DR-mouse	Change(%)
Glutathione S-transferase(GST)			+ ³⁾
[$\text{fmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	2.02±0.18	6.95±0.54 ²⁾	244
Aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)			+28
[$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	102.3±9.3	130.0±3.6 ¹⁾	
7-Ethoxy-resorufin O-deethylase (EROD)			+43
[$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	143.3±5.4	204.3±17.9 ¹⁾	
7-Pentoxeresorufin O-dealkylase (PROD)			+59
[$\text{pmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	2.9±0.1	4.6±0.4 ¹⁾	
1-Nitropyrene reductase(1-NR)			+
[$\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$]	2.1±0.2	4.4±0.3 ²⁾	110

Compared to AL group; 1) $P < 0.05$; 2) $P < 0.001$; 3) + means the percentage of increase

3 讨论

3.1 限量饮食(DR)减少肿瘤的自然发生率和致癌物诱导的肿瘤发生率

许多动物实验证明 DR 有降低肿瘤发生的作用, 包括 AFB₁ 诱导的大鼠肝肿瘤, BaP 诱导的小鼠皮肤肿瘤等。这可能与 DR 改变药物代谢酶的催化活性, 进而改变药物在体内的转化、利用和排出^[10]有关。本研究发现 DR 特异地改变致癌物的代谢活化, 即对不同的致癌物产生不同的作用。DR 减少 AFB₁-DNA 加合物和 2-AAF 主要 DNA 加合物 (AF- C⁸-dG) 的生成, 但增加 BaP 主要 DNA 加合物 (BP- N²-dG) 和 6-NC-DNA 总加合物的生成。

3.2 DR 影响致癌物-DNA 加合物生成的可能

代谢酶的特异性调节作用。DR 诱导肝谷胱甘肽硫转移酶, 故能较快地清除 AFB₁ 的终致癌物 AFB₁-8, 9-环氧化物, 这也许是 AFB₁-DNA 加合物生成减少的原因; 而 DR 增加 BaP-DNA 加合物的生成, 可能是由于 DR 诱导了 CYP1A1 酶(EROD) 和芳烃羟化酶(AHH)活性的缘故, 这两种酶是活化代谢 BaP 的主要酶类; DR 能诱导 1-硝基芘还原酶、N-乙酰转移酶(N-AT)和 UDP 葡萄糖醛酸脂酰转移酶(UDP-GT)活性^[11], 前两者对 2-AAF 有活化作用, 而后者则加快 2-AAF 代谢物的排泄, DR 使 AF- C⁸-dG 的生成减少也许是这几种酶代谢调节作用的总和。6-NC 的代谢活化主要是形成羟基-6-氨基萘, 这其中需要依赖细胞色素 P450

CYP2B 的 PROD 酶、硝基还原酶以及依赖 CYP2E1 的 4-硝基酚水解酶的催化, 本实验室的结果及文献报道都证明 DR 诱导上述几种酶的活性, 这也许是 6-NC-DNA 加合物在 DR 组中生成增加的缘故。

3.3 DNA 损伤、DNA 加合物与肿瘤发生的关系

本实验证明致癌物诱导的 DNA 链断裂程度, 即 DNA 损伤程度与 DNA 加合物的生成量成正相关。说明 DNA 加合物是一个较好的反映 DNA 损伤作用的生物指标。但从本实验的所有结果来分析, DR 影响某些致癌物 DNA 加合物生成的作用与其降低肿瘤发生率的终效应并不相符。这可能是由于 DR 调节代谢酶以及修复酶活性的特异性所引起的, 另外, 肿瘤发生是多因素参与的多阶段过程, DR 对致癌过程 3 个阶段作用的总和决定其对肿瘤发生影响的总效应。它对致癌过程的后 2 个阶段的作用效应, 如降低细胞增殖率; 减少 DNA 甲基化; 增加细胞凋亡; 降低癌基因的表达等方面, 在 DR 抗肿瘤过程中可能也起着很重要的作用。这些方面的进一步研究将有助于阐明 DR 减少肿瘤发生的机制。

参 考 文 献

- 1 Weindruch R, Walford R L. Dietary restriction in mice beginning at one year of age; effect on life span and spontaneous cancer incidence. *Science* 1982, 215: 1415
- 2 Pollard M, Luckert P. Tumorigenesis effects of direct and indirect-acting chemical carcinogenesis in rats on a restricted diet. *J Natl Cancer Inst*, 1985, 74: 1347
- 3 Leakey J E A, Bazare J R, Harmon R J, *et al*. Effects of long term caloric restriction on hepatic drug metabolizing enzymes in the Fischer 344 rat. In: Fishbein L ed. "Biological effects of dietary restriction". New York;

Springer-Verlag, 1991, 213

- 4 Chen W, Nichols J, Zhou Y G, *et al*. Effect of dietary restriction on glutathione S-transferase activity specific toward aflatoxin B1-8,9-epoxide. *Toxicol Lett*, 1995, 78: 235
- 5 Rogan E G, Devanesan P D, Ramakrishna N V S, *et al*. Identification and quantitation of benzo[a] pyrene-DNA adducts formed in mouse skin. *Chem Res Toxicol*, 1993, 6: 356
- 6 Delclos K B, Miller D W, Lya J O, *et al*. Identification of 8-modified deoxyinosine and N2- and C8-modified deoxyguanosine as major products of the *in vitro* reaction of N-hydroxy-6-aminochrysene with DNA and the formation of these adducts in isolated rat hepatocytes treated with 6-nitrochrysene and 6-aminochrysene. *Carcinogenesis* 1987, 8: 1703
- 7 Mullaart E, Boerrigter M E T I, Lohman P H M, *et al*. Age-related induction and disappearance of carcinogen-DNA-adducts in livers of rats. *Chem Biol Interactions* 1989, 69: 373
- 8 Randerath K, Randerath E R, Agrawal H P, *et al*. Postlabeling methods for carcinogen-DNA adduct analysis. *Environ Health Perspectives*, 1985, 62: 57
- 9 Basnakian A G, James S J. A rapid and sensitive assay for the detection of DNA fragmentation during early phases of apoptosis. *Nucleic Acids Res* 1994, 22: 2714
- 10 Chou M W, Chen W, Mikhailova M V, *et al*. Dietary restriction modulated carcinogen-DNA adduct formation and the carcinogen-induced DNA strand breaks. *Toxicol Lett*, 1997, 92: 21
- 11 Chou M W, Kong J, Chung K T, *et al*. Effect of caloric restriction on the metabolic activation of xenobiotics. *Mut Res* 1993, 295: 223

(1997-09-03 收稿 1998-07-18 修回)

。 题 录 。

- 黄 迪, 张锦明, 梁小曼. The finding of patients suffering from nasopharyngeal carcinoma who contacted with hexamethylphosphoramide for a long term. *Chin J Cancer Reserch*, 1995, 7(4): 285
- 朱振宇, 黄 迪, 马润泉. EB病毒基因片段扩增在鼻咽癌诊断中的应用. *中华肿瘤杂志*, 1995, 17 增刊: 27
- 陈尚武, 黄 迪. EB病毒胸苷激酶基因定向克隆. *生物技术*, 1997, 7(1): 9
- 黄 迪, 陈海峰, 成吕玲, 等. Sero-epidemiological studies of Epstein-Barr virus infection by testing antibodies against EBV specific DNase (EDAb) as a methos for early detection of nasopharyngeal carcinoma. *Chin J Cancer Reserch*, 1997, 9(3): 195
- 黄 迪, 黄必军, 吴秋良, 等. 石蜡包埋组织中 EB病毒基因片段检测. *生物化学与生物物理学报*, 1998, 30(4): 412
- 黄 迪, 黄必军, 吴秋良, 等. 鼻咽癌癌前及其高危人群鼻咽上皮组织 EB病毒 DNA 酶基因检测. *中华肿瘤杂志*, 1998, 20(4): 251