

室内 PM₁₀ 对 DNA 氧化性损伤及其与微量元素组成关系*

邵龙义¹ 赵厚银¹ T. P. Jones² 吕森林¹ L. Merolla³

1. 中国矿业大学(北京)煤炭资源教育部重点实验室及资源与地球科学系, 北京 100083;

2. School of Earth, Ocean and Planetary Sciences, Cardiff University, UK;

3. School of Biosciences, Cardiff University, UK

摘要 使用质粒 DNA 评价法(plasmid DNA assay)和电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)研究了北京市室内外 PM₁₀(可吸入颗粒物)的生物活性及与微量元素的关系。选择了4组样品分别代表吸烟室内(1), 非吸烟室内(2)和相应室外(1)进行质粒 DNA 评价研究。结果表明, 室内 PM₁₀ 对超螺旋 DNA 的氧化性损伤高于室外; 吸烟室内 PM₁₀ 的 TD50(引起 50% DNA 损伤所需的颗粒物剂量)低达 100 μg · mL⁻¹, 对 DNA 氧化性损伤最大, 说明吸烟室内 PM₁₀ 的生物活性最大。结合微量元素分析发现, 吸烟室内 PM₁₀ 的水溶性 Zn 与 TD50 负相关性较其他元素强, 说明水溶性 Zn 可能对 DNA 的氧化性损伤起重要作用。Fe 元素虽然被认为是最具生物活性的元素之一, 但是在所分析样品中 Fe 元素多是以不可溶状态存在, 因此对 DNA 损伤较弱。

关键词 质粒 DNA 评价 氧化性损伤 微量元素 室内空气 可吸入颗粒物(PM₁₀)

近年来, PM₁₀ 对人体的损伤效应引起了广泛的关注, 流行病学研究结果表明 PM₁₀ 浓度的增加与人们发病率及死亡率之间有显著的相关性^[1, 2]。关于颗粒物的肺损伤目前被广泛接受的观点是颗粒物表面的生物可利用的过渡金属离子会产生自由基, 这些自由基对关键细胞的氧化性损伤可能是颗粒物导致肺损伤的主要原因^[3-7]。Wilson 等^[8]通过有过渡金属和没有过渡金属两种情况下的炭黑和超细炭粒子的自由基及致炎作用的研究, 证明 PM₁₀ 中的过渡金属对肺具有氧化性损伤。McNeilly 等^[9]利用体外实验的方法证明水溶性过渡金属会导致炎症。Richards 等^[10]研究表明导致肺损伤的是可溶的而非不可溶的锌; Adamson 等^[11]利用活体实验研究发现, 造成老鼠肺损伤的是水溶性 Zn。王玉秋等^[12]研究发现 Fe 是典型介导氧自由基过程的过渡金属。

中国矿业大学(北京)环境与健康课题组的研究表明对 DNA 产生氧化性损伤的是颗粒物中的水溶性组分, 其中水溶性的 Zn 元素可能是对 DNA 氧化性损伤的主要过渡金属元素^[13]。本文利用质粒 DNA 评价法对居室室内 PM₁₀ 样品的生物活性进行研究, 并利用 ICP-MS 对 PM₁₀ 的微量元素进行研究, 最后判别出不同类型室内 PM₁₀ 的氧化性损伤能力以及可能导致这种损伤能力的过渡元素类型。

1 样品采集及室内实验

1.1 样品采样

2003年7月在北京市2户(吸烟, 非吸烟家庭)客厅各采样3d, 每天连续采样8h以上。采样点位于中国矿业大学附近, 由于条件限制, 所以只在白天居民正常的生活条件下进行采样。同步在室外采

2004-07-28 收稿, 2004-10-14 收修改稿

* 教育部科学技术研究重点项目(104028)、国家自然科学基金(批准号: 40275040)和英国皇家学会资助项目

E-mail: ShaoL@cumtb.edu.cn

1) 吕森林, 北京市大气 PM₁₀ 的矿物学特征及质粒 DNA 损伤研究, 中国矿业大学(北京校区)博士学位论文, 2003

集 PM_{10} 样品, 避免雨天. 采样仪空气流速为 30 L/min, 设置高度为 1.5 m 左右. 随时记录室内外温度、湿度及风速. 本次实验的采样头为 Negretti (UK) PM_{10} 切割器, 所用滤膜为直径 47 mm, 孔径 0.6 μm 聚碳酸酯滤膜 (Millipore, UK).

1.2 DNA 损伤实验及电感耦合等离子体质谱 (ICP-MS) 实验

质粒 DNA 评价法是一种研究颗粒物表面的自由基对超螺旋 DNA 产生氧化性损伤的体外方法^[13,14]. 基本原理是颗粒物表面携带的自由基对超螺旋 DNA 产生氧化性损伤, 最初的损伤是引起超螺旋 DNA 松弛; 进一步的损伤表现为使 DNA 线化. 这种损伤变化引起 DNA 在电泳仪中的电泳速度的变化, 进而将不同形态的 DNA 在琼脂糖凝胶中定量地分离出来, 从而评价颗粒物的生物活性

(图 1). 具体实验步骤参见文献[13], 首先将颗粒物从滤膜上分离出来后, 使用超纯水将样品稀释成 4 个不同的浓度级别, 分别与一定量的质粒 DNA (X174-RF DNA, Promega, London, UK) 进行混合并使其充分反应, 然后将混合溶液置入电泳槽凝胶中, 使用电泳仪在 30V 电压下通电 16 h, 将不同形态的 DNA 分离出来, 最后使用紫外凝胶成像系统 (Synoptics LTM, Cambridge, UK) 对凝胶成像, 并使用 Syngene Genetools 软件 (Synoptics Ltd.) 和光密度计对凝胶体中的超螺旋、松弛的及线化的等不同形态的 DNA 进行半定量分析, 其中松弛和线化的 DNA 占总 DNA 的比例即代表样品的氧化性损伤能力即 (生物活性), 其中一个重要的参数 TD50, 它代表造成 50% 的 DNA 损伤所需的样品的剂量 (toxic dose), TD50 值越小, 颗粒物生物活性越大.

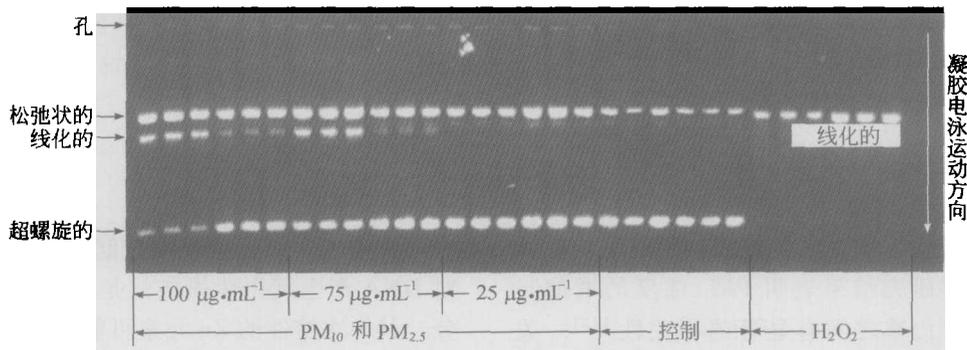


图 1 质粒 DNA 评价分析原理图

使用 ICP-MS 进行颗粒物中微量过渡金属元素进行分析. 本次利用微波消解法, 用纯硝酸溶解包括滤膜和颗粒物的全样品; 对水溶部分微量元素的测量, 将滤膜加入到 10 mL HPLC 级水中, 使用涡旋混合器震荡 16 h; 然后使用 0.2 μm 孔径的聚碳酸酯滤膜 (Millipore) 过滤, 即为水溶部分样品; 从制备好的溶液中取出 1 mL, 与 0.5 mL 的质量分数为 50×10^{-9} 铈标准液混合, 并加入 2% 硝酸至 5 mL; 使用 ICP-MS (Perkin Elmer Elan 5000) 进行化学成分分析.

2 结果与讨论

2.1 吸烟、非吸烟室内及室外 PM_{10} 对 DNA 的氧化性损伤

本次选择 4 个样品中, No. 1 为吸烟室内 PM_{10} , 其质量浓度为 $51.1 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$, No. 2 和 3 为两个非

吸烟室内 PM_{10} , 其质量浓度分别为 29.3 和 $91.2 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$, No. 4 为室外的 PM_{10} , 质量浓度为 $38.8 \mu\text{g} \cdot \text{m}^{-3}$. 4 组样品对超螺旋 DNA 损伤凝胶图如图 2 所示, 对其进行定量分析结果见图 3. 从图 3 可以看出, 吸烟的室内 PM_{10} 对 DNA 的损伤较非吸烟室内和室外 PM_{10} 的损伤大, TD50 为 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; 非吸烟室内 No. 2 样品在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的浓度下造成的损伤为 60%, 而在 $125 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 损伤为 17%, 所以其 TD50 在 $125-250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 之间, 而 No. 3 样品即使在浓度为 $500 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 对 DNA 的损伤才达 38%, 说明生物活性比较小; 室外 No. 4 样品在 $250 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时对 DNA 的损伤达 30%, TD50 为 $415 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. 从图 2 的损伤凝胶图也可以看出图 2(c) 的损伤凝胶图相对完整, 而图 2(a) 的 DNA 的破坏程度最大.

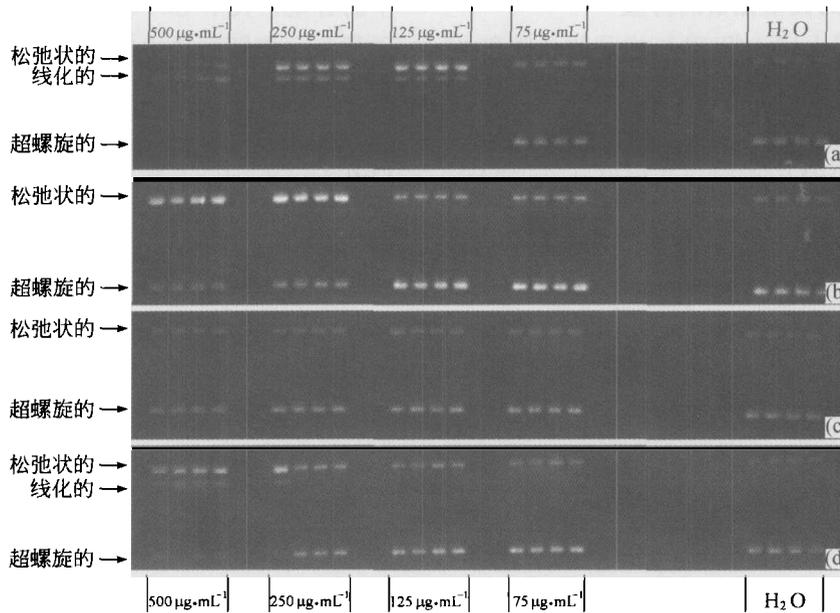


图 2 PM_{10} 对超螺旋 DNA 损伤凝胶图

(a) 吸烟室内 (No. 1); (b) 非吸烟室内 (No. 2); (c) 非吸烟室内 (No. 3); (d) 室外 (No. 4)

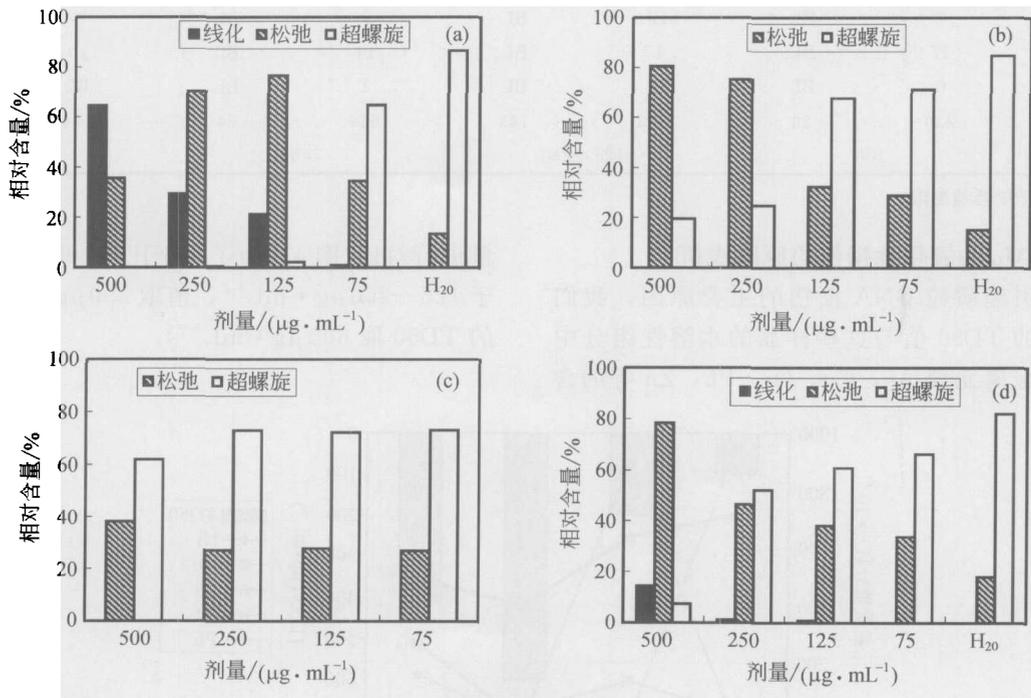


图 3 PM_{10} 对 DNA 的破坏量统计直方图, 其中线化和松弛的 DNA 的相对含量总和代表破坏量

(a) 吸烟室内 (No. 1); (b) 非吸烟室内 (No. 2); (c) 非吸烟室内 (No. 3); (d) 室外 (No. 4)

吸烟室内 PM_{10} 对超螺旋 DNA 的破坏率最大, 这可能与吸烟烟雾中有许多有机物及微量元素,

对 DNA 造成很大的损伤, 因此下面探讨造成 DNA 损伤的机理。

2.2 室内/外 PM₁₀ 的微量元素的含量

利用 ICP-MS 对上述 4 组 PM₁₀ 样品的全样和水溶样品的微量过渡金属元素组成进行测定, 其结果如表 1 所示. 从表 1 可以看出, Fe, Mo, Sn, Pt 等元素在全样中的含量明显高于在水溶部分中的含量, 说明这些元素在 PM₁₀ 中多是以难溶于水的状态存在的. 而 V, Ni, Mn, Co, Cu, Zn, As, Pb 在水溶组分中的含量则较为明显, 接近相应的全样

中的含量, 其中 Zn, As, Pb 尤为明显, 说明这些元素在大气颗粒物中有相当一部分是以水可溶状态存在.

对于水溶组分中的含量较高的 As, Cu, Ni, Pb, Zn 等 5 个元素, Zn 和 Ni 在吸烟室内 PM₁₀ (No. 1 样品) 中明显偏高, Cu 和 Pb 在其中一个非吸烟室内 PM₁₀ (No. 2 样品) 中偏高, 而 As 的规律不甚明显.

表 1 不同类型 PM₁₀ 中微量元素的质量分数/10⁻⁶ 及相应的 TD50 值^{a)}

元素	吸烟样品 No. 1		非吸烟样品 No. 2		非吸烟样品 No. 3		室外样品 No. 4	
	全样	水溶	全样	水溶	全样	水溶	全样	水溶
Mn	BL	BL	BL	BL	179	17	17	43
Fe	19878	BL	18380	BL	35587	BL	10643	92
Co	17	2	20	1	1116	1	8	1
Ni	27573	937	28133	BL	130645	BL	13479	158
Cu	BL	BL	4281	893	BL	BL	333	267
Zn	6942	714	5043	637	9749	404	3015	488
As	25	6	79	12	30	3	25	10
Mo	604	BL	931	BL	803	BL	374	BL
Sn	216	BL	418	9	82	1	90	1
Ce	7	BL	BL	BL	7	BL	3	BL
Pt	17	BL	17	BL	14	BL	10	BL
Hg	0	BL	BL	BL	1	BL	BL	BL
Pb	226	26	862	143	629	34	144	17
TD50/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	100		125—250		>500		415	

a) BL 为低于仪器检测限

2.3 导致 PM₁₀ 的氧化性损伤的原因浅析

为说明引起质粒 DNA 损伤的主要原因, 我们将 4 组样品的 TD50 值与这些样品的水溶性组分中的主要过渡金属元素 As, Cu, Ni, Pb, Zn 等的含

量进行对比(图 4)(为了便于比较, No. 2 的 TD50 介于 125—250 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, 值取 200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$; No. 3 的 TD50 取 600 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$).

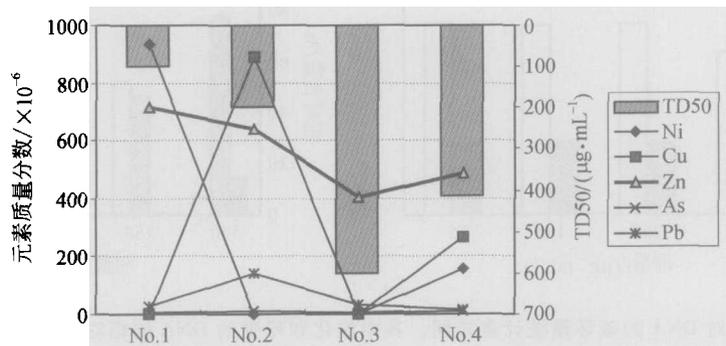


图 4 室内/外 PM₁₀ 的生物活性与水溶性元素的关系

No. 1——吸烟室内; No. 2——非吸烟室内; No. 3——非吸烟室内; No. 4——室外

从图4可以看出,虽然As, Cu, Ni, Pb在水溶组分中含量较高,但是它们与样品的TD50值并没有对应相关关系,说明这些元素可能不是造成质粒DNA损伤的主要元素.比较有意思的是Zn元素,从图4可看出水溶组分中Zn元素的含量与TD50值呈明显的负相关关系,即Zn含量越高,样品造成的DNA损伤越大.在4个样品中,Zn在No.3全样中含量虽然最高,但是该样品对质粒DNA的损伤却最小(TD50值最大),相反,Zn在吸烟室内No.1样品的全样中的含量不是很高,但是在该样品的水溶部分中的含量却是最高,因此吸烟室内No.1样品对DNA的损伤最大.

关于水溶性Zn的氧化性损伤能力,Richards等^[10]和Adamson等^[11]都对对老鼠肺损伤的活体实验中证实.关于香烟烟雾对肺及DNA的氧化性损伤作用,已有许多学者论述^[15-17].结合本文实验,可以认为水溶性的Zn可能是导致PM₁₀具有氧化性损伤的主要因素之一.

除Zn之外,Fe亦是一种具有较强氧化性损伤能力的过渡金属元素^[12],但是在本次分析样品中,Fe与颗粒物的氧化性损伤能力的关系不甚明显.从表1可以看出4个样品的全样部分Fe的含量都很高,而水溶部分几乎都为0,尤其是No.3样品,其全样中的Fe的质量分数为 35587×10^{-6} ,但是该样品对DNA的氧化性损伤最小,说明铁是以不可溶状态存在,因此不是造成DNA氧化性损伤的主导元素.

值得指出的是,吸烟造成的可吸入颗粒物的氧化性损伤力,除与过渡金属元素Zn有关外,还与烟草中的焦油含量关系密切,Landsberger等^[18]应用中子活化分析研究了室内吸烟产生的主要污染物微量元素Cd, Zn,同时Br, Cl, As和K也是吸烟的主要成分.吸烟的烟草烟雾(ETS)中含有4700多种化学物质,有较高浓度的焦油、苯、多环芳烃(PAHs)等,其中以焦油中含有的许多微量元素,对人体产生的危害最大^[19, 20].吸烟室内可吸入颗粒物中的焦油含量及有机质与颗粒物氧化性损伤能力的关系还有待进一步探讨.

3 结论

(1)室内与室外相比,室内PM₁₀对超螺旋

DNA的氧化性损伤略高于室外;在吸烟室内PM₁₀对DNA的破坏性最大,TD50可低达 $100 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$.

(2)PM₁₀中的水溶性Zn可能是引起PM₁₀对质粒DNA损伤的主要金属元素,在所分析的样品中,吸烟室内PM₁₀的水溶性Zn的含量最高,因而该样品对DNA破坏最大.

(3)Fe元素虽然在文献中被认为是最具生物活性的元素之一,但是在本文分析的北京市样品中Fe元素多是以不可溶状态存在,因此对DNA损伤较弱.

致谢 Roy Richards教授及Leona Greenwall

博士对本文实验工作进行了指导,何兴舟研究员对本文初稿提出了宝贵的修改意见,作者在此一并致以衷心感谢.

参 考 文 献

- 1 魏复盛,胡伟,吴国平,等.空气污染对儿童肺功能指标影响的初步分析.中国环境监测,2001,17(7):61-65
- 2 Schwartz J. What are people dying of on high air pollution days? Environmental Research, 1994, 64: 26-35
- 3 Donaldson K, Beswick P H, Gilmour P S. Free radical activity associated with the surface of the particles: A unifying factor in determining biological activity. Toxicology Letter, 1996, 88: 293-298
- 4 Costa D L, Dreher K L. Bioavailable transition metals in particulate matter mediate cardiopulmonary injury in healthy and compromised animal models. Environmental Health Perspectives, 1997, 105(Supp5): 1053-1060
- 5 Dreher K L, Jascot R H, Lehmann R, et al. Soluble transition metals mediate residual oil fly ash induced acute lung injury. J Toxicol Environ Health, 1997, 50: 285-305
- 6 Pritchard R J, Ghio A J, Lehman J R, et al. Oxidant generation and lung injury after particulate air pollutant exposure increase with the concentration of associated metals. Inhalation Toxicol, 1996, 8: 457-477
- 7 童永彭,倪新伯,张元勋,等.气溶胶自由基毒理学机制的研究.环境科学学报,2001,21(6):654-659
- 8 Wilson M R, Lightbody J H, Donaldson K, et al. Interactions between ultrafine particles and transition metals *in vivo* and *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2002, 184: 172-179
- 9 McNeilly J D, Heal M R, Beverland I J. Soluble transition metals cause the pro-inflammatory effects of welding fumes *in vitro*. Toxicology and Applied Pharmacology, 2004, 196: 95-107

- 10 Richards R J, Atkins J, Marrs T C, et al. The biochemical and pathological changes produced by the intratracheal instillation of certain components of zinc-hexachloroethane smoke. *Toxicology Letter*, 1989, 54: 79—88
- 11 Adamson I Y R, Frieditis H, Hedgecock C, et al. Zinc is the toxic factor in the lung response to an atmospheric particulate sample. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 166: 111—119
- 12 王玉秋, 张林, 戴树桂, 等. 可吸入颗粒物上铁介导的活性氧产生及其对肺损伤的影响. *环境科学进展*, 1998(增刊), 5: 118—123
- 13 时宗波, 邵龙义, Jones T P, 等. 城市大气可吸入颗粒物的质粒DNA的氧化性损伤. *科学通报*, 2004, 49(1): 673—678
- 14 Greenwell L L, Moreno T, Jones T P, et al. Particle-induced oxidative damage is ameliorated by pulmonary antioxidants. *Free Radical Biology & Medicine*, 2002, 32(9): 898—905
- 15 孙咏梅, 戴树桂, 裘著革. 香烟烟雾成分分析及其对DNA生物氧化能力研究. *环境与健康杂志*, 2001, 18(4): 203—207
- 16 Kamp D W, Greenberger M J, Sbalchierro J S, et al. Cigarette smoke augments asbestos-induced alveolar epithelial cell injury: Role of free radicals. *Free Radical Biology & Medicine*, 1998, 25(6): 728—739
- 17 Jung M, Davis W P, Taatjes D J, et al. Asbestos and cigarette smoke cause increased DNA strand breaks and necrosis in bronchiolar epithelial cells *in vivo*. *Free Radical Biology & Medicine*, 2000, 28(8): 1295—1299
- 18 Landsberger S, Wu D. The impact of heavy metals from environmental tobacco smoke on indoor air quality as determined by Compton suppression neutron activation analysis. *The Science of the Total Environment*, 1995, 173/174: 323—337
- 19 Evisken M P, Maistre C A, Newell G R. Health hazards of passive smoking. *Annual Review of Public Health*, 1988, 9(1): 47—70
- 20 Higgins M. Risk factors associated with chronic obstructive lung disease. *Ann N Y Acad Sci*, 1991, 624: 7—17

“2004年度拟南芥研究学术研讨会”在上海召开

2004年11月26—27日,“2004年度拟南芥研究学术研讨会”在上海召开,这是继2002年、2003年两次研讨会之后召开的针对拟南芥研究的第3次研讨会.与会的100多位代表来自国内从事拟南芥研究的各实验室,北京大学校长许智宏院士到会致辞,21位代表做了精彩的学术报告.

20世纪末,拟南芥的全部基因组序列公开(Nature, 2000, 408: 796—815),标志着多国合作的拟南芥基因组研究计划完成.测序工作完成后,以美国为代表的多国研究组提出了“2010计划”——到2010年确定拟南芥中所有基因的功能,即希望通过拟南芥这个模式植物全面认识高等植物的生物学特性.该计划从2001年度开始执行,这是自1990年开始资助的拟南芥基因组研究的一个继续,目前我国已作为合作国参与到这一计划中.由于该研究涉及功能基因的知识产权,将影响一个国家长远的经济发展和社会进步,许多国家对此项工作给予了充分的重视和足够的支持.

目前,我国有10多个实验室从事拟南芥方面的研究,方向包括形态建成、育性、抗逆、器官发育、植物激素和程序化死亡等,由于学术带头人大多为留学回国人员,工作基础和工作条件比较优越,该领域的研究在近几年取得了很大进展,主要实验室陆续在 *Plant Cell*, *Plant Physiology* 和 *Development* 等高水平杂志发表论文,标志着我国针对拟南芥开展的植物功能基因组的研究已逐步走向国际前沿.

(供稿:温明章)