

二甲基甲酰胺对 V79 细胞的毒性作用

孙佩君, 刘建烽, 冯三畏, 肖卫

摘要: [目的] 了解二甲基甲酰胺(DMF)对中国仓鼠肺成纤维细胞(V79细胞)的细胞毒性及DNA损伤作用。[方法] 以体外培养V79细胞为研究对象,采用四氮唑盐比色分析法(MTT法)和单细胞凝胶电泳技术(SCGE)分别检测5个浓度(0.5、2.0、8.0、32.0、128.0 mmol/L)DMF在3个时间段(6、12、24 h)染毒后对V79细胞的毒性作用和DNA损伤情况。[结果] 同一时间组V79细胞存活率随染毒浓度的增加而下降,与阴性对照组比较差异均有统计学意义($P<0.05$),存在明显的剂量-效应关系(6 h: $b=-0.002$, $P<0.05$; 12 h: $b=-0.003$, $P<0.05$; 24 h: $b=-0.003$, $P<0.05$)。各染毒浓度组的彗星拖尾率、尾长、Olive尾距、尾部DNA百分含量,与同一时间阴性对照组比较,差异均有统计学意义($P<0.05$)。[结论] 本实验条件下,DMF能够明显抑制V79细胞增殖,存在正向的剂量-效应关系,并能引起DNA损伤。

关键词: 二甲基甲酰胺; 中国仓鼠肺成纤维细胞; V79细胞; 四氮唑盐比色分析法; 细胞毒性; 单细胞凝胶电泳; DNA损伤

Toxic Effects of N, N-Dimethylformamide on V79 Cells *in Vitro* SUN Pei-jun, LIU Jian-feng, FENG San-wei, XIAO Wei (School of Public Health, Medical Department, Soochow University, Jiangsu 215123, China). Address correspondence to XIAO Wei, E-mail: hemingxy@yahoo.com · The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To investigate the cytotoxicity and DNA damage in Chinese hamster lung fibroblast cells (V79 cells) induced by N, N-dimethylformamide (DMF) *in vitro*. [Methods] Tetrazolium (MTT) assay and single cell gel electrophoresis were used to detect the cytotoxicity and DNA damage in V79 cells after exposure to 0.5, 2.0, 8.0, 32.0, and 128.0 mmol/L of DMF for 6 h, 12 h, and 24 h. [Results] DMF significantly reduced the viability of cultured V79 cells with the same exposure time periods ($P<0.05$) and in a dose-dependent manner (6 h, $b=-0.002$, $P<0.05$; 12 h, $b=-0.003$, $P<0.05$; 24 h, $b=-0.003$, $P<0.05$). There were significant differences in the comet tails rate, tail length, Olive tail moment, and tail DNA percentage between different exposure groups and the control group for the same exposure time periods ($P<0.05$). [Conclusion] Under current experimental condition, DMF can obviously inhibit the proliferation of V79 cells, showing a positive dose-dependent relationship, and can cause DNA damage.

Key Words: N,N-dimethylformamide; Chinese hamster lung fibroblast cells; V79 cells; tetrazolium assay; cytotoxicity; single cell gel electrophoresis; DNA damage

二甲基甲酰胺(N, N-dimethylformamide, DMF)是一种低毒类有机溶剂,作为一种重要的化工原料广泛应用于有机合成、染料、石油提炼、合成纤维、人造革、医药工业和其他行业^[1]。随着现代工业的发展,DMF的应用范围不断扩大,职业接触人员不断增加,接触DMF导致中毒的事件时有发生,给接触DMF作业人群带来健康安全隐患。世界卫生组织在1999年评定DMF致癌性为第三类:暂未确定遗传毒性的致癌物。DMF以呼吸道吸收为主要途径,肝脏是主要靶器官^[2];部分流行病学调查报道认为,DMF接触时间长短与肝功能损伤有关,且损伤程度有随着接触年限的增加而加重的趋势^[3];有资料表明,从事DMF作业时间越久,其心电图异常率越高,导致

慢性中毒和心脏损害的可能性越大^[4]。动物实验也有类似报道,并显示DMF可引起小鼠睾丸组织病理学改变,从而引起生殖功能的损伤^[5]。鉴于目前多是动物体内实验以及流行病学调查资料,对细胞毒性研究较少,故本实验以体外培养中国仓鼠肺成纤维细胞(V79细胞)为研究对象,采用四氮唑盐比色分析法(MTT法)和单细胞凝胶电泳技术(SCGE法),观察不同剂量DMF染毒对V79的细胞毒性及DNA损伤作用,为进一步全面而系统地认识DMF毒性,有效防止DMF引起的职业危害提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 主要仪器 CO₂培养箱(HF151UV型,陕西利康仪器公司);倒置显微镜(CK40型)、荧光显微镜(BX51型),日本Olympus公司;酶标分析仪(Power Wave XS型,美国Bio-Tek公司);电泳仪(DYY26C型,北京六一仪器厂);电泳槽(DYC

[作者简介] 孙佩君(1988—),女,硕士生;研究方向:职业医学;E-mail: sunpeijun123@163.com

[通信作者] 肖卫教授, E-mail: hemingxy@yahoo.com

[作者单位] 苏州大学医学部公共卫生学院,江苏 215123

34A 型,北京六一仪器厂)。

1.1.2 主要试剂 噻唑蓝[溴化-3-(4, 5-二甲基乙噻唑基)-2, 5-二苯基四氮唑, MTT]购于上海前尘生物科技有限公司; RPMI-1640 培养液(美国 Gibco 公司); 小牛血清(杭州四季青生物工程材料有限公司); DMF(国药集团, 纯度>99%); 二甲基亚砜(DMSO)为国产分析纯; Tris-Hcl、TritonX-100、正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖为美国 Amresco 公司产品, 进口分装; 溴化乙锭(EB, 美国 Sigma 公司); 十二烷基肌氨酸钠(美国 Sigma 公司); 乙二胺四乙酸钠盐(Na₂-EDTA, 国药集团)。

1.2 方法

1.2.1 MTT 法测定 V79 细胞存活率 取对数生长期的细胞经胰酶消化后用完全培养基重悬, 调整细胞密度为 1×10⁵ 个/mL, 接种于 3 块 96 孔培养板中, 每孔接种 100 μL 细胞悬液, 培养 24 h 后, 染毒组分别加入含 DMF 浓度为 0.5、2.0、8.0、32.0、128.0 mmol/L 的新鲜培养基 100 μL, 阴性对照组加入不含 DMF 的等量完全培养基。同时设立空白组对照调零, 空白对照组除不加细胞外其余条件与阴性对照组相同, 每组均设 5 个平行孔。置于培养箱中分别培养 6、12、24 h 后, 每孔加入 5 g/L 的 MTT 溶液 20 μL, 继续培养 4 h, 再加入 DMSO, 待蓝紫色结晶物充分溶解后, 在酶标仪上选择参考波长 630 nm, 初始波长 570 nm, 测定各孔光密度值(D)。按公式计算各组细胞存活率, 细胞存活率=[(D_{染毒组}-D_{空白组})/(D_{阴性组}-D_{空白组})]×100%。

1.2.2 SCGE 法检测 DNA 损伤 按照 SINGH 报道的方法^[6], 并参照本课题组建立的方法略作改进^[7]。染毒并制备细胞悬液: 取对数生长期细胞用 0.125% 胰酶消化后, 调整细胞悬液浓度, 以每孔 5×10⁵ 个细胞接种于 6 孔板中, 置培养箱中培养 24 h 后弃去旧培养液。实验共设 5 个浓度组、1 个阴性对照组和 1 个阳性对照组, DMF 染毒实验浓度与 MTT 法一致(0.5、2.0、8.0、32.0、128.0 mmol/L)。阴性对照和阳性对照组加不含 DMF 的新鲜培养基。置于培养箱在 3 个染毒时间(6、12、24 h)结束后收集各组细胞。阳性对照组在收集细胞前先在紫外灯下照射 10 min。弃掉培养液, 用冷的磷酸盐缓冲液洗 2 遍, 胰酶消化后调整各组细胞悬液浓度为 1×10⁶ 个/mL, 进行碱性 SCGE 实验。电泳结束后, EB 染色, 在 515~560 nm 波长激发光照射样本, 通过 590 nm 波长滤光片, 在荧光显微镜下每组随机拍摄约 200 个细胞, 计算拖尾率, 随机选择 30 个细胞用 CASP 软件对彗星图像进行分析。重复实验 3 次。

1.3 统计分析

采用 SPSS 18.0 统计软件对结果进行分析。细胞存活率比较采用方差分析, 尾长、尾部 DNA 百分含量及 Olive 尾矩比较采用方差分析, 染毒组间两两比较采用 SNK 检验, 拖尾率比较用卡方检验。检验水准 α=0.05。

2 结果

2.1 DMF 对 V79 细胞存活率的影响

经过 MTT 实验, 倒置显微镜下观察, 随着 DMF 染毒浓度的增加, 从 0.5 mmol/L 开始, V79 细胞的形态发生变化, 折光性减弱, 细胞质中颗粒物增多, 细胞逐渐圆缩甚至脱落, 单位面积细胞数明显减少。经方差分析, 同一时间组内, 各染

毒浓度组与阴性对照组比较, 细胞存活率差异具有统计学意义(P<0.05)。线性回归分析, 存在明显的剂量-效应关系(6h: b=-0.002, P<0.05; 12h: b=-0.003, P<0.05; 24h: b=-0.003, P<0.05)。同一染毒浓度组内, 不同染毒时间的 V79 细胞存活率不同(P<0.05), 见表 1。

表 1 不同浓度 DMF 在不同时间下作用于 V79 细胞的存活率(̄x±s)

DMF 浓度 (mmol/L)	细胞存活率(%)		
	6h	12h	24h
0.0	100.00	100.00	100.00
0.5	95.01±1.33 ^{*A}	88.60±1.93 ^{*B}	75.40±4.54 ^{*C}
2.0	86.26±2.60 ^{*A}	81.64±2.48 ^{*B}	67.14±3.58 ^{*C}
8.0	74.74±5.55 ^{*A}	73.96±5.42 ^{*A}	55.12±6.45 ^{*B}
32.0	81.71±3.39 ^{*A}	74.94±3.47 ^{*B}	60.80±6.47 ^{*C}
128.0	63.73±4.02 ^{*A}	51.36±5.25 ^{*B}	44.70±9.55 ^{*B}

[注]*: 与同一时间阴性对照组比较, P<0.05; 各浓度组内不同时间段两两比较, 字母不同, P<0.05。

2.2 DMF 致 DNA 的损伤作用

经过 SCGE 实验, 荧光显微镜下观察可见细胞核影像, 阴性对照组较少细胞出现拖尾, 且尾长很短, 荧光强度较低, 细胞核影像基本呈规则的圆形。而阳性对照组几乎全部拖尾, 彗星细胞头小而亮, 彗尾较长。经方差分析, 在同一时间组内, 尾长、Olive 尾矩、尾部 DNA 百分含量, 各染毒浓度组和阴性对照组比较, 差异均有统计学意义(P<0.05); 经卡方分析, 拖尾率差异有统计学意义(P<0.05), 见表 2。

表 2 不同浓度 DMF 对 V79 细胞的 DNA 损伤情况(̄x±s)

组别	DMF 浓度 (mmol/L)	尾部 DNA 百分含量 (%)	尾长	Olive 尾矩	拖尾率 (%)
6h	0.0	0.97±1.18	7.42±5.79	0.44±0.56	4.60
	0.5	2.56±2.38 [*]	14.23±11.64 [*]	1.25±1.37 [*]	13.85 [*]
	2.0	3.05±2.75 [*]	16.65±10.72 [*]	1.57±1.70 [*]	21.46 [*]
	8.0	3.87±2.43 [*]	19.89±11.50 [*]	1.79±1.31 [*]	30.11 [*]
	32.0	3.99±2.54 [*]	24.91±26.99 [*]	2.20±2.15 [*]	35.60 [*]
	128.0	5.39±4.38 [*]	25.48±16.56 [*]	2.77±2.68 [*]	41.57 [*]
12h	0.0	1.27±2.52	8.67±9.08	0.61±1.71	5.30
	0.5	2.60±2.44 [*]	16.09±15.73 [*]	1.34±1.67 [*]	16.90 [*]
	2.0	3.27±2.72 [*]	20.33±15.64 [*]	1.79±1.79 [*]	26.91 [*]
	8.0	3.76±3.98 [*]	21.06±15.16 [*]	2.15±2.59 [*]	32.30 [*]
	32.0	4.39±3.82 [*]	25.47±17.71 [*]	2.62±2.83 [*]	43.29 [*]
	128.0	5.81±5.16 [*]	35.74±30.90 [*]	3.80±4.43 [*]	45.17 [*]
24h	0.0	1.19±1.48	8.10±6.25	0.51±0.65	5.10
	0.5	3.94±4.14 [*]	20.71±19.08 [*]	2.03±2.70 [*]	17.58 [*]
	2.0	4.81±3.09 [*]	35.14±25.70 [*]	3.69±3.13 [*]	32.83 [*]
	8.0	5.33±3.99 [*]	42.68±43.40 [*]	3.81±3.83 [*]	39.87 [*]
	32.0	5.61±3.83 [*]	47.83±28.43 [*]	5.22±4.42 [*]	46.87 [*]
	128.0	9.55±4.94 [*]	52.77±44.04 [*]	6.26±4.21 [*]	53.94 [*]

[注]*: 与同一时间阴性对照组比较, P<0.05。

3 讨论

DMF 是一种低毒类有机溶剂, 在生产环境中常以蒸气形式扩散, 主要经呼吸道吸入, 液体污染体表可经完整皮肤进入

体内^[8]。参照动物实验以及房云等^[9]的研究,确定本次实验浓度为 0.5、2.0、8.0、32.0、128.0 mmol/L。本实验利用 MTT 实验探索设定的 5 个浓度下 DMF 对 V79 细胞的毒性作用,再利用 SCGE 法检测 DMF 对 DNA 的损伤作用,推测 DMF 可能在进入细胞后导致 DNA 单链断裂引起细胞死亡,从而进一步探讨 DMF 可能引起细胞损伤的机理。

MTT 实验结果显示:在不同的时间组,5 个浓度组与阴性对照组比较,差异均有统计学意义。线性回归分析结果表明,在各个时间段内,随着 DMF 染毒浓度增加,V79 细胞的存活率呈明显的下降趋势。此外,短时间内(6 h)接触低浓度的 DMF (0.5 mmol/L)对细胞已有毒性作用;而高浓度的 DMF 对细胞有明显的毒作用。根据 MTT 实验 24 h 时间段细胞存活率,推测 DMF 致 V79 细胞的半数致死量(LD₅₀)浓度在 128.0 mmol/L 左右,可在该浓度附近继续探讨其 LD₅₀。DMF 的体内代谢首先是甲基的羟基化,在细胞色素酶 P450 的氧化作用下生成 N-甲基-甲醇酰胺(HMMF),然后 HMMF 部分地脱羟甲基分解成甲基甲酰胺(NMF)和甲醛,NMF 还可羟基化然后再分解成甲酰胺。还有少部分 DMF 未转化仍以原形从尿中排出。有实验表明,NMF 毒性强于 DMF,HMMF 的毒性远低于 NMF。所以 DMF 的毒性可能是通过 NMF 来进一步表达的^[9]。本实验结果可以看出,随着 DMF 染毒浓度的上升,细胞存活率并没有呈绝对的直线下降,部分时间的存活率甚至出现反弹,进一步说明 DMF 可能不是直接产生毒作用,而是活化之后通过 NMF 产生毒作用^[10]。推测低浓度的 DMF 可能有诱导 P450 酶系合成的作用,使 NMF 浓度增加,而当浓度到达一定的浓度区间时诱导作用不明显,故该区间的毒作用并没有呈现出直线下降趋势。可在该范围内细化浓度做进一步研究,为后续的实验研究和相关行业评估 DMF 的毒性提供依据。

DNA 损伤形式有 DNA 链的断裂、嘧啶二聚体的形成、DNA 加合物、点突变和 DNA 交联等。SCGE 法是目前研究遗传毒物以对 DNA 损伤的一个非常有效的方法。它可以检测单个真核细胞 DNA 损伤,所需细胞少且灵敏度高。碱性的 SCGE 法可以检测 DNA 单链损伤,从 DNA 链断裂的角度探讨的 DNA 损伤情况^[11-12]。本实验结果显示,随着染毒浓度增加和时间的延长,细胞尾长、Olive 尾距、尾部 DNA 百分含量等指标均有明显的增加趋势,与阴性对照组比较均有统计学意义。本实验的最低浓度比杨锦蓉等^[13]的 1.56 mmol/L 更低,且在较小浓度 0.5 mmol/L 作用 6 h 的情况下,已经出现彗星细胞头部变小、亮度增加,彗尾变圆,荧光强度增加。而在高浓度 128.0 mmol/L 作用下,已出现细胞核破裂成不规则形状。在存活率比较高的情况下已能检测出比较明显的 DNA 损伤,表明细胞在发生明显生化改变之前,遗传物质已经受到损伤。DNA 损伤可以作为检测细胞早期受损的生物标志物之一。

本实验结果表明,DMF 可能是通过细胞 DNA 单链的断裂引起 DNA 损伤,从而引起细胞毒性,影响细胞存活率。本实验

仅探讨了单链断裂引起 DNA 损伤,同时还存在很多其他的 DNA 损伤途径,可在后续实验中采用其他方法作更进一步的讨论和研究。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] SOHN JH, HAN MJ, LEE MY, et al. Simultaneous determination of N-hydroxymethyl- N-methylformamide, N-methylformamide and N-acetyl-S-(N-methylcarbamoyl)cystein in urine samples from workers exposed to N, N-dimethylformamide by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. J Pharm Biomed Anal, 2005, 37(1): 165-170.
- [2] 李陆明,王明龙,孙晓楼,等. 二甲基甲酰胺作业工人肝肾损害和尿中甲基甲酰胺含量的关系 [J]. 中华劳动卫生职业病杂志, 2004, 22(4): 270-271.
- [3] 袁华平,田海林. 某企业二甲基甲酰胺接触人群肝功能损伤的流行病学分析 [J]. 职业与健康, 2012, 28(8): 936-937.
- [4] 范金荣,付爱玲,崔俊梅. 二甲基甲酰胺对作业工人心电图影响的分析 [J]. 职业卫生与应急救援, 2002, 20(3): 156.
- [5] 郑芸鹤,黄璐,侯旭剑,等. 二甲基甲酰胺对小鼠睾丸组织结构和睾丸酶的影响 [J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(9): 779-781.
- [6] SINGH NP. Microgels for estimation of DNA strand breaks, DNA protein crosslinks and apoptosis [J]. Mutat Res, 2000, 455(1/2): 111-127.
- [7] 姜旭,刘静容,肖卫. 硫酸铜对小鼠成纤维细胞毒性作用的研究 [J]. 环境与职业医学, 2011, 28(12): 757-759.
- [8] WANG SM, CHANG HY, TSAI JC, et al. Skin penetrating abilities and reservoir effects of neat DMF and DMF/water mixtures [J]. Sci Total Environ, 2009, 407(19): 5229-5234.
- [9] 房云,杨锦蓉,王菁. MTT 法观察 DMF 致人肝细胞增殖抑制作用 [J]. 浙江预防医学, 2006, 18(11): 1-2.
- [10] 张建新,童智敏. 二甲基甲酰胺的职业危害及防治 [J]. 上海预防医学杂志, 2006, 18(10): 529-530.
- [11] CREBELL R, CARTA P, ANDREOLI C, et al. Biomonitoring of primary aluminium industry workers: detection of micronuclei and repairable DNA lesions by alkaline SCGE [J]. Mutat Res, 2002, 516(1/2): 63-70.
- [12] ZHANG L, XU L, ZENG Q, et al. Comparison of DNA damage in human-derived hepatoma line(HepG2)exposed to the fifteen drinking water disinfection byproducts using the single cell gel electrophoresis assay [J]. Mutat Res, 2012, 741(1/2): 89-94.
- [13] 杨锦蓉,房云,王菁,等. VitC 对二甲基甲酰胺致人肝细胞 DNA 损伤的保护作用 [J]. 浙江预防医学, 2010, 22(12): 17-19, 23.

(收稿日期: 2012-08-28)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 郭薇薇; 校对: 王晓宇)