

## 基于质谱的DNA加合物组技术在药学领域应用的研究进展

闫明<sup>1, 2#</sup>, 叶倩<sup>1, 2#</sup>, 王雪<sup>2\*</sup>, 文海若<sup>2\*</sup>

1. 中国药科大学, 江苏 南京 211198

2. 中国食品药品检定研究院国家药物安全评价监测中心, 药物非临床安全性评价研究北京市重点实验室, 北京 100176

**摘要:** DNA加合物是评价DNA损伤最直接的分子证据, 随之产生一个专门研究DNA修饰识别和DNA加合物定量的新领域——DNA加合物组学。其中质谱(MS)分析法是常用的DNA加合物组学技术, 并且随着质谱分析仪的灵敏度和扫描速度的提高, 使得利用DNA加合物组学技术来筛查人类基因组中DNA损伤成为可能。其中, 基于质谱技术对马兜铃、巴豆醛等致癌物生成的DNA加合物的种类的检测应用十分广泛。主要就基于质谱的加合物组学检测技术及其在致癌物检测中的应用进行概述。

**关键词:** DNA加合物; 加合物组学; 质谱; 致癌物

中图分类号: R917 文献标志码: A 文章编号: 1674-6376(2021)04-0876-09

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2021.04.030

## Research progress in application of mass spectrometry-based DNA adduct technology in field of pharmacy

YAN Ming<sup>1, 2</sup>, YE Qian<sup>1, 2</sup>, WANG Xue<sup>2</sup>, WEN Hairuo<sup>2</sup>

1. China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China

2. National Center for Safety Evaluation of Drugs, National Institutes for Food and Drug Control, Key Laboratory of Beijing for Nonclinical Safety Evaluation Research of Drugs, Beijing 100176, China

**Abstract:** DNA adducts are the most direct molecular evidence for evaluating DNA damage, and a new field specializing in DNA modification recognition and DNA adduct quantification—DNA adductomics has emerged. Mass spectrometry (MS) is a commonly used DNA adductomics technology, and with the increase in the sensitivity and scanning speed of mass spectrometry, the use of DNA adductomics technology to screen DNA in the human genome Damage becomes possible. The detection of DNA adducts produced by carcinogens such as aristolochia and crotonaldehyde based on mass spectrometry is very widely used. This article mainly summarizes the adductomics detection technology based on mass spectrometry and its application in the detection of carcinogens.

**Key words:** DNA adduct; DNA adductomics; MS; carcinogens

环境及外源物质暴露于人体后在体内形成的亲电性化合物可破坏DNA结构并与其共价修饰形成加合物(adduct)。其中在肿瘤相关基因的关键位点形成的DNA加合物被认为是化合物致癌的起始步骤, 若加合物导致的DNA损伤未能被及时修复, 则可在细胞分裂过程中导致突变, 并破坏正常细胞的生长调节功能<sup>[1]</sup>。DNA加合物的形成为化学物

质在癌症发展中的作用机制提供了一种思路<sup>[2]</sup>。DNA加合物作为暴露生物标志物可以反映致癌物到达靶点的实际接触剂量, 定量分析特定的DNA加合物水平可以得到关于致癌物的生物有效剂量、遗传毒性风险及致癌机制等重要信息。某些与肿瘤形成存在明确关联的DNA加合物可作为生物标志物, 并成为分析物质暴露与毒性关联的重要依据<sup>[3]</sup>。

收稿日期: 2020-10-15

基金项目: 国家“重大新药创制”科技重大专项(2018ZX09201017-001); 中国食品药品检定研究院学科带头人培养基金资助项目(2019X4)

\*共同第一作者: 闫明, 男, 硕士研究生, 研究方向为遗传毒理学。Tel: 19825811211 E-mail: yanming0120@sina.com

叶倩, 女, 硕士研究生, 研究方向为遗传毒理学。Tel: 15871808114 E-mail: 1633487699@qq.com

\*通信作者: 王雪 E-mail: xue\_wang@nifdc.org.cn

文海若 E-mail: wenhairuo@nifdc.org.cn

然而目前许多遗传毒性化合物与肿瘤相关基因缺乏特征性的突变谱,很难证明特定加合物的形成与肿瘤之间的必然关联。因此,同时检测多种DNA加合物并对整体加合物水平进行评估,有助于充分识别某些危险化学品的暴露并采取相应措施。鉴于暴露于环境和饮食中的遗传毒性物质种类繁多,使用传统的技术来检测未知DNA加合物并不现实,这就促使研究人员开发更加灵敏、应用广泛且功能强大的DNA加合物组学检测方法同时筛查多种DNA损伤<sup>[4]</sup>。质谱(MS)分析技术的成熟运用和DNA加合物组学的不断发展可以加强研究人员对化学暴露在DNA损伤和疾病风险中的理解。本文旨在探讨MS技术的改进对于加合物组学发展的巨大作用,并且对基于MS的加合物检测技术在致癌物检测中的应用进行概述,以阐明该技术的发展对药学研究的重要意义。

## 1 DNA加合物及DNA加合物组学

化合物或体内产生的亲电物质通过烷基化、芳基化、双亲电交联、形成脂质过氧化反应中间体或自由基活化对DNA结构进行修饰并与DNA形成复合

物,即DNA加合物<sup>[5]</sup>。而DNA加合物组则是一类具有相同特征的DNA加合物的综合,在此基础上产生了一门专门研究DNA加合物组的学科即DNA加合物组学。

### 1.1 DNA加合物

DNA加合物的形成依赖于化学物质的结构、亲电性以及化合物与DNA结合的能力,因此化学物质通常会与DNA碱基的特定位置结合产生特定的DNA加合物,其中易形成DNA加合物的化学物质有烷化剂、醌类、醛类、*N*-亚硝基化合物、抗肿瘤药物等。研究表明鸟嘌呤与腺嘌呤的C8原子、碱基内/外环的N和O原子为常见的DNA结合位点(见图1),即DNA加合物形成位点<sup>[6]</sup>。胞嘧啶的C5甲基的氧化是DNA甲基化的重要生物标志物;鸟嘌呤C8原子氧化后产生的7,8-二氢-8-氧桥鸟嘌呤和2,6-二氨基-4-羟基-5-甲酰胺基嘧啶则是氧化应激以及遗传毒性损伤的生物标志物;自由基可氧化2-脱氧核糖C1和C4原子、胸腺嘧啶的C5-甲基以及嘧啶环的C5和C6原子;烟草中含有的致癌物4-(*N*-甲基-亚硝氨基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮的DNA加合物形成于磷酸基的骨架上<sup>[5]</sup>。

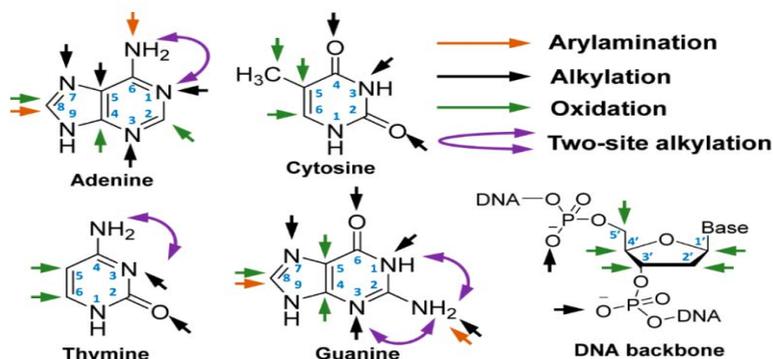


图1 DNA氧化损伤和加合物形成的反应位点

Fig. 1 Reaction sites for DNA oxidative damage and adduct formation

### 1.2 DNA加合物组学

研究DNA加合物主要有两种基本组学分析方法:一是靶向分析即自下而上(bottom-up)的分析方法,即通过扫描逐一检测出预期的加合物后构建样品的DNA加合物谱系,其常用的方法是基于MS对特定暴露或化学作用产生的有限数量的DNA修饰进行识别和定量。二是非靶向分析即自上而下(top-down)的分析方法,即基于DNA加合物分子结构的共同特征通过扫描筛选出具有推测指纹特征的化合物,然后逐一鉴定得到样品DNA加合物谱系。由于样品中DNA加合物较为复杂且不可预测,为更全面地测量DNA损伤,需要自

上而下的分析方法来同时筛选已知和未知暴露以及对暴露的生物反应(如内源性亲电体的形成)产生的多种DNA加合物。DNA加合物组学(DNA adductomics)的概念正是基于上述背景而提出的,其不仅针对一个加合物进行测定,而是根据整体的一个特征去筛选具有共同点的一类加合物从而构成一个完整的体系,旨在检出微量水平的DNA加合物的基础上与生物信息学结合,实现药物致癌性监管、肿瘤早期监测及抗肿瘤药物治疗预后评估。而实现这一目标的基础是DNA加合物检测技术的不断改进,其中最主要的是MS检测仪器的不断革新。

## 2 DNA加合物组学的检测方法

自20世纪起,国际上已建立多种DNA加合物分析技术<sup>[5]</sup>。但由于暴露后生物体内所产生的DNA加合物丰度极低,如何实现从大量的正常核苷酸中检测到含量极低的加合物(0.1~1个加合物/108个核苷酸)就成为一个技术挑战。20世纪80年代建立的免疫检测法和<sup>32</sup>P后标记分析法是最早应用于人类基因组检测并发现DNA损伤的技术。此外,液相色谱(liquid chromatography, LC)-吸收/荧光光谱法和LC-电化学检测也较为常用。然而,这些技术多为间接或非定量的方法,无法提供有关加合物结构的信息。

LC与电喷雾电离(electrospray ionization, ESI)耦合成为近年来一项突破性的技术,该方法能够同时检测多种DNA加合物<sup>[7]</sup>。电子冲击气相色谱法用于测定DNA加合物,特别是氧化的DNA碱基,而MS裂解谱可用于证实其加合物的结构,并且这种方法随着仪器灵敏度的提高,检测灵敏度可至1/1 010个核苷酸(nucleotides)。这种选择性高、特异性强、且能提供加合物结构信息的特点使得液相色谱-质谱法(LC-MS)有望取代<sup>32</sup>P后标记法成为DNA加合物筛选的首选方法。

## 3 应用加合物组学的MS仪及方法

近年来,新兴的加合物组学技术是LC-MS方法的延伸,可用于筛选已知或未知的DNA加合物,同时监测多种加合物与碱基突变之间的关联。随着MS方法和MS仪器的不断改进,衍生出了各种不同功能的质谱仪,并在检测加合物的应用上发挥了巨大作用。

### 3.1 MS仪

在加合物组学应用的MS仪主要有三重四极杆质谱仪(triple quadrupole mass spectrometry, QqQ-MS)和离子阱质谱仪(ion trap-MS)。

**3.1.1 QqQ-MS** QqQ-MS由3个对齐的四极组成,其中第1个四极(Q1)和第3个四极(Q3)进行离子选择,中间四极子(q)作为碰撞单元,实现波束型碰撞诱导解离(collision-induced dissociation, CID)碎片化。QqQ-MS有4种基本的串联扫描模式:选择性反应监测(selected reaction monitoring, SRM)、碎片离子扫描、前体离子扫描和中性缺失扫描(constant neutral loss, CNL)<sup>[8]</sup>。SRM模式下的QqQ-MS用于小分子的定向测量,包括DNA加合物。而中性缺失扫描(constant neutral loss, CNL)是一种经过修改的SRM模式。Wolf等<sup>[9]</sup>于1994年首次使用CNL筛选

*N*-乙酰氧基-*N*-乙酰基-2-氨基苄与小牛胸腺DNA结合形成的加合物。使用三重四极杆仪器和毛细管色谱的CNL方法检出3种存在于熟肉的致癌物2-氨基-1-甲基-6-苯基咪唑的DNA加合物<sup>[10]</sup>。QqQ-MS因其高灵敏度和高选择性而被广泛应用,具有动态范围宽、工作周期快、运行稳定性好等优点<sup>[11]</sup>。

**3.1.2 ion trap-MS** 离子阱是一种通过振荡电场“捕获”离子的装置,根据不同的结构,它可以将离子存储在三维空间中:称为四极离子阱(quadrupole ion trap, QIT),也可以存储在二维空间中:称为线性离子阱(linear ion trap, LIT)。与QIT相比,LIT具有更高的存储容量和捕获效率<sup>[12]</sup>。离子阱已被用于许多生物分析应用,包括药物代谢产物的表征<sup>[13]</sup>、寡核苷酸测序<sup>[14]</sup>和蛋白质修饰的鉴定<sup>[15]</sup>。Turesk实验室率先在LIT中筛选了不同种类基因毒物的多种DNA加合物<sup>[16]</sup>。LIT也用于检测抗癌药物acylfulvene和隐陡头菌素S(illudin S)在治疗结肠癌细胞系中诱导的DNA加合物<sup>[17]</sup>。

### 3.2 质谱方法

在加合物组学应用的MS方法主要有四极杆离子阱质谱(Q-trap MS)、四极杆飞行时间串联质谱(quadrupole-time of flight-mass spectrometry, Q-TOF-MS)和四极杆离子阱组合质谱和线性离子阱组合质谱(quadrupole and LIT-hybrid orbitrap MS)。

**3.2.1 Q-trap MS** Q-trap MS是一种混合的QqQ-MS方法,具有QqQ-MS的所有标准扫描功能和LIT代替Q3所带来的额外扫描功能。在Q-trap MS中,LIT可以用作标准Q或用作产生MS<sup>3</sup>光谱的附加破碎装置或存储来自碰撞细胞的碎片离子(q),以提高产物离子光谱的质量和被测碎片的质量准确性(the enhanced product ion scan, EPI)<sup>[18]</sup>。Feng等<sup>[19]</sup>实验室采用这种方法检测苯基缩水甘油醚和苯乙烯-7,8-氧化物处理的寡核苷酸的DNA加合物。有人将CNL与DDA-EPI结合,检测了甲基化剂甲基磺酸甲酯(MMS)及其氧化产物(d3-MMS)处理的DNA加合物<sup>[20]</sup>。

**3.2.2 Q-TOF-MS** TOF根据离子在电场中漂移通过无场区域到达探测器时的初始加速度获得的速度来分离离子<sup>[5]</sup>。TOF-MS可以看作是Q3被高分辨率TOF质谱分析仪所取代的QqQ-MS。与QqQ-MS, Q-trap-MS和IT-MS相比, Q-TOF-MS以 $1 \times 10^{-6}$ 精度测量离子,显著改善了对分析物的鉴定能力,可提供精确分子质量测定信息,为DNA加合物组学分析提供强大的平台。与QqQ相比, Q-TOF灵敏度

较低但具有更高的分辨率且能提供更为精确的碎片离子信息和更为全面的产物离子谱,适用于未知DNA加合物的初步筛查。Castro-Perez等<sup>[21]</sup>利用四极杆飞行时间质谱对CNL法进行改进后,可从人和大鼠肝微粒体中筛选多种药物的谷胱甘肽偶联物。

**3.2.3 Quadrupole and LIT-Hybrid Orbitrap MS 轨道阱(Orbitrap)**是一种静电离子阱,使用快速傅里叶变换来获取质谱<sup>[22]</sup>。一旦注入轨道中,离子沿着轨道的中心电极振荡,其频率通过傅里叶变换转换为质谱之前采集时域图像电流瞬变(瞬态长度)而测得。因此较长的瞬态长度提供了较高的分辨率,但降低了扫描速度。Turesky实验室使用该方法检测出烟草致癌物质4-ABP在人膀胱中的加合物和马兜铃酸在肾脏中的加合物<sup>[23]</sup>。

#### 4 基于质谱的DNA加合物技术在药学领域应用

成熟的MS分析技术测定DNA加合物获得致癌物相关的生物剂量信息和毒理信息再结合可靠的生物信息学技术可应用于分子流行病学的研究,更有助于研究者指认化学暴露、DNA损伤与疾病结果之间的联系。以下将举例阐释基于MS的DNA加合物技术在研究化合物暴露和致癌风险方面的应用。

##### 4.1 马兜铃酸加合物的检测

马兜铃酸(aristolochic acid)属于硝基菲羧酸,广泛存在于马兜铃属和细辛属植物中。2002年国际癌症研究中心(International Agency for Research on Cancer, IARC)将马兜铃酸列为I类致癌物。其中马兜铃酸I及马兜铃酸II为马兜铃酸中最主要的生物碱类成分,长期服用可引起马兜铃酸肾病(aristolochic acid nephropathy)、巴尔干地区特有肾病(Balkan Endemic nephropathy)及相关的泌尿系恶性肿瘤等。Lu等<sup>[24]</sup>研究发现马兜铃酸能够导致肝癌,其特征性A>T突变及加合基因于肿瘤发生发展密切相关,是导致亚洲肝癌发生的主要因素之一。马兜铃酸I与马兜铃酸II在人和哺乳动物体内经肝微粒体细胞色素P450(cytochromes P450, CYP) A1和A2等酶代谢形成马兜铃酸内酰胺(aristolactam)后与DNA碱基环外氨基结合形成马兜铃酸-DNA加合物<sup>[25]</sup>。马兜铃酸肾病和巴尔干地区特有肾病患者肾脏组织中检出的特征性马兜铃酸-DNA加合物[7-(deoxyadenosine-*N*<sup>6</sup>-yl)-aristolactam I, dA-AAI]为最常见且最持久的马兜铃酸I诱导产生的DNA-加合物,引起马兜铃酸的特征性A:T碱基置换型突变,可作为马兜铃酸人体暴露

的生物标志物,并且当检测对象不再暴露于马兜铃酸后7年仍可检出dA-AAI<sup>[26]</sup>。临床研究发现马兜铃酸-DNA加合物可以长期存留于人体内并诱发泌尿系统肿瘤,即便患者已预防性地切除双侧肾和输尿管后,仍可发生膀胱癌等泌尿系统肿瘤并诱导抑癌基因p53的特定位置点发生特异性A:T:T:A突变<sup>[27]</sup>。

因此准确而高效地检出马兜铃酸-DNA加合物对理解其毒性特征以及生物化学特征具有重要意义。季文萱等<sup>[28]</sup>对马兜铃酸-DNA加合物的检测方法进行优化,该课题组采用高效液相色谱-电喷雾离子阱串联质谱联用(HPLC-ESI/MS/MS)技术对合成的马兜铃酸-DNA加合物进行结构鉴定并采用混合物直接进样的电喷雾-多级质谱(ESI-MS<sup>n</sup>)与LC-MS<sup>n</sup>等方法进一步研究马兜铃酸-DNA加合物的质谱裂解特征,应用傅里叶变换离子回旋共振MS精确质量测定和同位素模式对合成的马兜铃酸-DNA加合物进行鉴定,从而揭示质谱技术可极大程度上丰富有关加合物的结构信息。

Jelakovic等<sup>[29]</sup>从67例因尿路上皮细胞癌(upper tract urothelial cancers, UTUCs)切除肾和输尿管患者的肾皮质和尿路上皮肿瘤组织中提取DNA用于检测马兜铃酸I-DNA加合物。这些患者均来自地方性肾病区域,研究同时收集来自非地方性肾病地区的10例上尿路癌患者样本为对照。检测时以<sup>32</sup>P后标记聚丙烯酰胺凝胶电泳法对马兜铃酸I-DNA加合物定量,并使用Velos线性四极杆离子阱质谱仪与毛细管1100系列液相色谱系统连接以分离DNA加合物进行测定,最终以芯片测序法鉴定肿瘤组织中p53基因突变类型。结果发现试验组中70%的样本存在马兜铃酸I-DNA加合物且94%的样本中的p53基因存在特异性A:T→T:A突变,而对照组中则未检出加合物和特异性突变,提示该突变为马兜铃酸高度特异性肿瘤生物标志性指标<sup>[26]</sup>。

##### 4.2 苯并[a]芘DNA加合物检测

苯并[a]芘(benzo[a]pyrene, BaP)是一种多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs),常见于煤焦油、烟草烟雾、烧烤食品、汽车尾气以及各种污染环境是一类重要的致癌物<sup>[30]</sup>。由于其普遍存在,且在实验动物和人体中具有致癌性,BaP作为PAHs致癌模型已被广泛研究<sup>[31]</sup>。BaP的代谢激活包括一系列步骤,包括初始氧化,随后水解和第二次氧化,得到最终致癌物质邻二醇环氧苯并(a)

蒽(trans-7,8-dihydroxy-anti-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo[a]pyrene, BPDE)<sup>[32]</sup>。BPDE与DNA链上的脱氧鸟苷共价结合,形成稳定BPDE-N2-dG加合物<sup>[33]</sup>。BPDE-DNA加合物作为一种重要的暴露生物标志物,对研究环境和职业PAHs暴露的致癌机制以及健康风险评价都具有重要意义。

Frederick等<sup>[34]</sup>建立了一种高效液相色谱结合电喷雾串联质谱(ES-MS/MS)的方法,用于检测和量化最终致癌性BP代谢物BPDE暴露后的主要DNA加合物。实验采用LC-MS-MS检测脐带血中BPDE-dG的量,所需DNA低至10 μg,内标低至10 pg,有效节约了样本,提高了检测的灵敏度。该方法的检测限为0.35 fmol/μg;日间精密度和日内精密度(RSD)分别为15%和10.5%;回收率为70%~95%;该法最低可以检测0.88 fmol/μg DNA中BPDE-dG加合物,经0.5、1.0 mg[7,8-<sup>3</sup>H]BaP腹腔注射的小鼠肝DNA的HPLC-ES-MS/MS分析得出的值与<sup>32</sup>P后标记法和免疫分析法测定的值相当<sup>[32]</sup>。

Feng等<sup>[35]</sup>建立了一种快速、灵敏地检测BPDE-dG加合物的稳定同位素稀释-超高效液相色谱串联三重四极杆质谱分析方法(UHPLC-MS/MS),与已有的方法相比,该法的分析速度和灵敏度均提高了10~20倍,并且4种异构体的检测限均小于0.7 fmol,该方法仅需30 μg DNA就可检测出人A549细胞暴露于1.0 μmol/L BaP或0.1 μmol/L(±)-anti-BPDE后的痕量加合物异构体。这些研究结果表明HPLC-ES-MS/MS方法具有高特异性、高灵敏度的特点,适用于评估暴露于BaP造成的DNA损伤,并且可以作为评价PAHs暴露的生物标志物用于人群分子流行病学或肿瘤预防研究。

### 4.3 巴豆醛DNA加合物检测

巴豆醛作为评价卷烟烟气危害性指数的7种化学成分之一已被列入Hoffmann名单和加拿大卫生部烟气有害成分名单,并且IARC将其列为3类致癌物<sup>[36-37]</sup>。巴豆醛是一种性质较活泼的 $\alpha,\beta$ -不饱和醛,具有2个亲电基团,可以与DNA中的脱氧鸟苷(deoxyguanosine, dG)发生反应生成DNA加合物S- $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -羟基-1, N<sup>2</sup>-丙桥-脱氧鸟苷(CdG-1)和R- $\alpha$ -甲基- $\gamma$ -羟基-1, N<sup>2</sup>-丙桥-脱氧鸟苷(CdG-2)<sup>[38-39]</sup>。CdG加合物可以抑制DNA的合成并导致错译,主要为G→T突变,且CdG-1的突变概率高于CdG-2<sup>[40-41]</sup>。而当DNA加合物不能被及时、正确地修复时,则可能会导致基因突变最终引发癌症等相关疾病。因此,准确检测出暴露于巴豆醛后人体产生的

DNA中的CdG加合物,对于评估巴豆醛对DNA损伤程度及可能的致癌风险及抗癌药的研发具有重要意义。Budiawan等<sup>[42]</sup>利用<sup>32</sup>P-后标记方法在喂食过巴豆醛的Fischer344小鼠体内检测出了CdG加合物而在对照组中未检出。Foiles等<sup>[43]</sup>利用酶联免疫方法结合CdG-1和CdG-2的单克隆抗体在巴豆醛暴露的骨髓瘤细胞中检测出了CdG加合物。

Rodgman等<sup>[36]</sup>利用LC-MS/MS方法检测分析了人体组织(肺、肝脏、血液)中CdG加合物的含量,发现肺组织中CdG的含量高于肝脏组织细胞,而在血液中未检出。由于<sup>32</sup>P-后标记技术前处理较繁琐、标记效率不确定以及酶联免疫技术中单克隆抗体较难获取的特点,限制了这两种检测技术的发展,而LC-MS/MS技术具有选择性好、灵敏度高且可使用同位素作为内标对加合物进行准确定量等优势,是目前检测DNA加合物较理想的技术。刘鲁娟等<sup>[44]</sup>建立了一种同时检测巴豆醛暴露后的DNA中CdG-1和CdG-2的HPLC-MS/MS法,DNA样品经巴豆醛暴露、酶解、纯化和浓缩复溶后进行HPLC-MS/MS分析,目标物CdG-1和CdG-2的加标回收率在83.3%~101.0%,检出限分别为0.006、0.005 ng/mL,证明了此方法简单快速、选择性好、灵敏度和准确度较高,适用于评估巴豆醛接触所致的DNA损伤。

### 4.4 乙醛DNA加合物检测

乙醛是一种具有遗传毒性的醛类化合物并且普遍存在于香烟烟气、汽车尾气和工业废气等环境污染物质中<sup>[45-46]</sup>。同时,通过乙醇代谢和脂质乙醇代谢和脂质过氧化等内源性途径也可以生成乙醛<sup>[47-48]</sup>。有研究表明1分子乙醛分子可与DNA中1分子dG反应形成N<sup>2</sup>-亚乙基-2'-脱氧鸟苷(N<sup>2</sup>-ethylene-2'-deoxyguanosine, EtdG),随后1分子EtdG与另1分子乙醛可以继续反应,形成具有(6S, 8S)和(6R, 8R)两种非对映体的1, N<sup>2</sup>-丙基-2'-脱氧鸟苷(1, N<sup>2</sup>-propyl-2'-deoxyguanosine, ProdG)<sup>[49]</sup>。ProdG可以通过引起G→T转变而导致DNA的编码错误,从而抑制DNA的合成<sup>[38]</sup>。因此,对ProdG加合物的检测在研究乙醛的诱变性和致癌性中具有重要作用。

Fang等<sup>[50]</sup>使用<sup>32</sup>P-后标记技术首次检测出体外乙醛暴露小牛胸腺DNA产生的乙醛-DNA加合物为N<sup>2</sup>-乙基-2'-脱氧鸟苷(N<sup>2</sup>-ethyl-2'-deoxyguanosine, ET-dG),该方法的灵敏度较高,但不能提供加合物的结构信息,且标记效率不确定,重现性差。李木

兰<sup>[51]</sup>利用紫外光谱移动法检测出乙醛暴露小牛胸腺DNA后256 nm处的吸收峰向长波方向移动,可初步判断乙醛能够加合到DNA中的亲核位点,但该方法灵敏度和专一性较低。刘鲁娟<sup>[52]</sup>基于LC-MS/MS技术,建立了一种同时检测DNA中EtidG和ProdG的方法,且该方法具有灵敏度高、分析时间短、特异性强等特点。

#### 4.5 MS在其他加合物测定中的应用

Singh等<sup>[53]</sup>利用液相色谱-串联质谱法(LC-MS/MS)检测出了饮酒之后人体白细胞中ET-dG的含量;Chen等<sup>[54]</sup>采用LC-MS/MS方法检测出吸烟者戒烟前后人体白细胞中ET-dG的含量存在显著差异。超高效液相色谱-电喷雾离子化串联三重四极杆质谱(UPLC-ESI-MS/MS)能够从108个碱基中检测到0.01~10个DNA加合物<sup>[55]</sup>。目前,LC-MS法不仅广泛应用于DNA加合物的分析,也用于对DNA表观遗传修饰的研究。与表现DNA损伤的DNA加合物不同,DNA表观遗传修饰是具有重要生理功能的DNA修饰形式,DNA表观遗传修饰可在不改变DNA一级结构的基础上,引起DNA构象、DNA稳定性以及DNA-蛋白质相互作用方式的改变,从而调控基因的表达<sup>[56-57]</sup>。其中,DNA甲基化是发现最早、研究最为深入的表观遗传修饰,在X染色体失活、胚胎发育、基因印记、基因沉默、基因表达与调控等生理过程中发挥极其重要的作用<sup>[58]</sup>。

5-甲基胞嘧啶(5-methylcytosine, 5mC)作为哺乳动物基因组DNA丰度最高的甲基化修饰,具有重要的生物学功能<sup>[59]</sup>。Wang等<sup>[60]</sup>建立了快速、高灵敏的UHPLC-MS/MS方法检测人类精子的5mC甲基化水平,当天与隔天的精确度维持在1.50%~5.70%。2013年,Yin等<sup>[61]</sup>利用UHPLC-MS/MS法研究发现,维生素C能够显著增强TET蛋白酶活性,进而加速5mC氧化和DNA主动去甲基化过程。这些研究结果表明基于MS的DNA加合物组技术可以应用于医药学的多个领域,并推动其发展进步。

#### 5 结语

DNA加合物是一类重要的肿瘤生物标志物,其检测在化合物毒性早期筛选、肿瘤发生的早期预测及肿瘤患者预后中具有重要应用价值,新兴的加合物组学技术也为检测致癌性化合物或环境污染暴露提供有效手段。MS在人类DNA加合物的鉴定中发挥了至关重要的作用,生物标志物数据加强了化学暴露与疾病风险之间的关联<sup>[62]</sup>。例如黄曲霉毒素B1和马兜铃酸I,其中化学暴露、靶组织中的

化学特异性DNA加合物,以及肿瘤相关基因中的突变谱,分别为这些化学物质在肝癌和上尿路上皮癌的发展中因果作用提供了一种机制上的理解。DNA加合物组学的目的是评估人体基因组中DNA损伤的总体情况,是一项较新的、正在发展的技术。

然而目前对于DNA加合物组的系统性研究较少,且难以归纳总结为条理清晰的研究结果供研究人员学习参考。这一问题的主要原因在于DNA加合物的检测和分析难度较大、且对仪器要求十分严格。但是随着LC-MS等检测技术不断发展,检测DNA加合物的技术和方法也会更加成熟,可获得更多致癌物相关的毒性和代谢机制信息,并以此建立化学物暴露与疾病之间的机制联系。当分析方法成熟,并且有强大的生物信息学工具可用来分析质谱数据时,DNA加合物组学可以应用于分子流行病学研究,以进一步理解化学暴露、DNA损伤和疾病结果之间的联系,并在新药研发靶点及系统毒理学领域做出重大贡献。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Loeb L A, Harris C C. Advances in chemical carcinogenesis: a historical review and prospective [J]. *Cancer Res*, 2008, 68(17):6863-6872.
- [2] Grollman A P. Aristolochic acid nephropathy: harbinger of a global iatrogenic disease [J]. *Environ Mol Mutag*, 2013, 54(1): 1-7.
- [3] Jarabek A M, Pottenger L H, Andrews L S, et al. Creating context for the use of DNA adduct data in cancer risk assessment: I. data organization [J]. *Crit Rev Toxicol*, 2009, 39(8): 659-678.
- [4] Matsuda T, Tao H, Goto M, et al. Lipid peroxidation-induced DNA adducts in human gastric mucosa [J]. *Carcinogenesis*, 2013, 34(1): 121-127.
- [5] Liu S, Wang Y. Mass Spectrometry for the assessment of the occurrence and biological consequences of DNA adducts [J]. *Chem Soc Rev*, 2015, 44(21): 7829-7854.
- [6] Guo J, Turesky R J. Emerging technologies in mass spectrometry-based DNA adductomics [J]. *High-Throughput*, 2019, 8(2): 13.
- [7] Tretyakova N, Goggin M, Sangaraju D, et al. Quantitation of DNA adducts by stable isotope dilution mass spectrometry [J]. *Chem Res Toxicol*, 2012, 25: 2007-2035.
- [8] Hoffmann E, Stroobant V. *Mass Spectrometry Principles and Applications* [M]. West Sussex, UK: John Wiley & Sons Ltd, 2007.

- [9] Wolf S M, Vouros P. Application of capillary liquid chromatography coupled with tandem mass spectrometric methods to the rapid screening of adducts formed by the reaction of *N*-acetoxy-*N*-acetyl-2-aminofluorene with calf thymus DNA [J]. *Chem Res Toxicol*, 1994, 7(1):82-88.
- [10] Kanaly R A , Matsui S , Hanaoka T, et al. Application of the adductome approach to assess intertissue DNA damage variations in human lung and esophagus [J]. *Mutat Res*, 2007, 625(1): 83-93.
- [11] Tretyakova N, Villalta P W, Kotapati S. Mass spectrometry of structurally modified DNA [J]. *Chem Rev*, 2013, 113(4): 2395-2436.
- [12] Douglas D J, Frank A J, Mao D. Linear ion traps in mass spectrometry [J]. *Mass Spectr Rev*, 2005, 24(1): 1-29.
- [13] Gérard H, Husser C, Zell M. Rapid screening and characterization of drug metabolites using a new quadrupole-linear ion trap mass spectrometer [J]. *J Mass Spectr*, 2003, 38(2): 138-150.
- [14] Chowdhury G, Guengerich F P. Direct detection and mapping of sites of base modification in DNA fragments by tandem mass spectrometry [J]. *Angewandte Chem Int Ed*, 2008, 47(2): 381-384.
- [15] Qin J, Chait B T. Identification and characterization of posttranslational modifications of proteins by MALDI ion trap mass spectrometry [J]. *Anal Chem*, 1997, 69(19): 4002-4009.
- [16] Bessette E E, Goodenough A K, Langoue T S, et al. Screening for DNA adducts by data- dependent constant neutral loss-triple stage mass spectrometry with a linear quadrupole ion trap mass spectrometer [J]. *Anal Chem*, 2009, 81(2): 809-819.
- [17] Pietsch K E, van Midwoud P M, Villalta P W, et al. Quantification of acylfulvene and illudin S DNA adducts in cells with variable bioactivation capacities [J]. *Chem Res Toxicol*, 2013, 26(1): 146-155.
- [18] Hager J W, Blanc J C. Product ion scanning using a Q-q-Q linear ion trap (Q TRAP) Mass Spectrometer [J]. *Rapid Commun Mass Spectrom*, 2003, 17(10): 1056-1064.
- [19] Yao C, Feng Y L. A nontargeted screening method for covalent DNA adducts and DNA modification selectivity using liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Talanta*, 2016, 159: 93-102.
- [20] Churchwell M I, Beland F A, Doerge D R. Quantification of O6-methyl and O6-ethyl deoxyguanosine adducts in C57BL/6N/Tk+/- mice using LC/MS/MS [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2006, 844 (1): 60-66.
- [21] Castro-Perez J, Plumb R, Liang L, et al. A high-throughput liquid chromatography/tandem mass spectrometry method for screening glutathione conjugates using exact mass neutral loss acquisition [J]. *Rap Comm Mass Spectr*, 2005, 19(6): 798-804.
- [22] Stanley L A. *Drug Metabolism* [M]. London, UK: Elsevier, 2017.
- [23] Guo J, Villalta P W, Turesky R J. Data-independent mass spectrometry approach for screening and identification of DNA adducts [J]. *Anal Chem*, 2017, 89(21): 11728-11736.
- [24] Lu Z N, Luo Q, Zhao L N, et al. The mutational features of aristolochic acid-induced mouse and human liver cancers [J]. *Hepatology*, 2020, 71(3): 929-942.
- [25] Nortier J L, Martinez M, Schmeiser H H, et al. Urothelial carcinoma associated with the use of a Chinese herb [J]. *New Engl J Med*, 2000, 342(23): 1686-1692.
- [26] Arlt V M, Levova K, Barta F, et al. Role of P450 1A1 and P450 1A2 in bioactivation versus detoxication of the renal carcinogen aristolochic acid I: studies in Cyp1a1 (-/-), Cyp1a2(-/-), and Cyp1a1/1a2(-/-) mice [J]. *Chem Res Toxicol*, 2011, 24(10): 1710-1719.
- [27] Chen C H, Dickman K G, Huang C Y, et al. Aristolochic acid-induced upper tract urothelial carcinoma in Taiwan: clinical characteristics and outcomes [J]. *Int J Cancer*, 2013, 133(1):14-20.
- [28] 季文萱, 杨成对, 谌贻璞. 马兜铃酸I-DNA加合物合成及电喷雾质谱法检测 [J]. *基础医学与临床*, 2007(6): 685-689.
- Ji W X, Yang C D, Shen Y P. Synthesis and electrospray mass spectrometric analysis of aristolochic acid I-DNA adduct [J]. *Bas Med Clinic Pract*, 2007(6): 685-689.
- [29] Jelakovic B, Sandra K, Ivana V, et al. Aristolactam-DNA adducts are a biomarker of environmental exposure to aristolochic acid [J]. *Kidney Int*, 2012, 81(6): 559-567.
- [30] In IARC monographs on the evaluation of the carcinogenic risk of chemicals to humans. polynuclear aromatic compounds, chemical, environmental and experimental data [J]. *Int Agency Res Cancer*, 1983, 32: 211-224.
- [31] Phillips D H. Fifty years of benzo(a)pyrene [J]. *Nature*, 1983, 303(5917): 468-472.
- [32] Hall M, Grover P L. *Polycyclic Aromatic Hydrocarbons: Metabolism, Activation and Tumour Initiation* [M]. Berlin Heidelberg: Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis I, Springer Berlin Heidelberg, 1990, 327-372.
- [33] Reactions of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons with DNA. In DNA adducts: identification and biological significance IARC scientific publications [J]. *Ag Res Cancer*, 1994, 125: 107-129.

- [34] Frederick B A, Churchwell M I, von Tungeln L S, et al. High-performance liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry for the detection and quantitation of benzo[a]pyrene-DNA adducts [J]. *Chem Res Toxicol*, 2005, 18(8): 1306-1315.
- [35] Feng F, Wang X, Yuan H, et al. Ultra-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry for rapid and highly sensitive analysis of stereoisomers of benzo[a]pyrene diol epoxide-DNA adducts [J]. *J Chromatogr B*, 2009, 877(22): 2104-2112.
- [36] Rodgman A. Problems with the Tobacco Products Scientific Advisory Committee (TPSAC) list of harmful or potentially harmful tobacco and/or tobacco smoke components [J]. *Beiträge zur Tabakforschung Int*, 2011, 24(6): 258-276.
- [37] Agents Classified by the IARC Monographs [R]. International Agency for Research on Cancer, 2012: 1-110.
- [38] Zhang S Y, Villalta P W, Wang M Y, et al. Analysis of crotonaldehyde- and acetaldehyde- derived 1, *N*<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine adducts in DNA from human tissues using liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometry [J]. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19(10): 1386-1392.
- [39] Minko I G, Kozekov I D, Harris T M, et al. Chemistry and biology of DNA containing 1, *N*<sup>2</sup>-deoxyguanosine adducts of the  $\alpha$ ,  $\beta$ -unsaturated aldehydes acrolein, crotonaldehyde, and 4-hydroxynonenal [J]. *Chem Res Toxicol*, 2009, 22(5): 759-778.
- [40] Stein S, Lao Y B, Yang I Y, et al. Genotoxicity of acetaldehyde-and crotonaldehyde-induced 1, *N*<sup>2</sup>-propanodeoxyguanosine DNA adducts in human cells [J]. *Mutation Res*, 2006, 608(1): 1-7.
- [41] Fernandes P H, Kanuri M, Nechev L V, et al. Mammalian cell mutagenesis of the DNA adducts of vinyl chloride and crotonaldehyde [J]. *Env Mol Mutagen*, 2005, 45(5): 455-459.
- [42] Budiawan E E. Detection of 1, *N*<sup>2</sup>-Propanodeoxyguanosine adducts in DNA of fischer 344 rats by an adapted <sup>32</sup>P-post-labeling technique after per os application of crotonaldehyde [J]. *Carcinogenesis*, 2000, 21(6): 1191-1196.
- [43] Foiles P G, Chung F L, Hecht S S. Development of a monoclonal antibody-based immunoassay for cyclic DNA adducts resulting from exposure to crotonaldehyde [J]. *Cancer Res*, 1987, 47(2): 360-363.
- [44] 刘鲁娟, 李翔宇, 陈欢, 等. HPLC-MS/MS法检测巴豆醛暴露产生的DNA加合物 [J]. *烟草科技*, 2016, 49(9): 63-69.
- Liu L J, Li X Y, Chen H, et al. Detection of DNA adducts induced by crotonaldehyde exposure with HPLC-MS/MS [J]. *Tobac Sci Technol*, 2016, 49(9): 63-69.
- [45] Wang M Y, Yu N X, Chen L, et al. Identification of an acetaldehyde adduct in human liver DNA and quantitation as *N*<sup>2</sup>-ethyldeoxyguanosine [J]. *Chem Res Toxicol*, 2006, 19(2): 319-324.
- [46] Inagaki S, Esaka Y, Deyashiki Y, et al. Analysis of DNA adducts of acetaldehyde by liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *J Chromatogr A*, 2003, 987(1/2): 341-347.
- [47] Brooks P J, Zakhari S. Acetaldehyde and the Genome: Beyond Nuclear DNA Adducts and Carcinogenesis [J]. *Env Mol Mutag*, 2014, 55(2): 77-91.
- [48] Terashima I, Matsuda T, Fang T W, et al. Miscoding potential of the *N*<sup>2</sup>-ethyl-2'-deoxyguanosine DNA adduct by the exonuclease-free klenow fragment of *Escherichia coli* DNA polymerase I [J]. *Biochemistry*, 2001, 40(13): 4106-4114.
- [49] Garcia C C, Angeli J P, Freitas F P, et al. [<sup>13</sup>C<sup>2</sup>] -acetaldehyde promotes unequivocal formation of 1, *N*<sup>2</sup>-propano-2'-deoxyguanosine in human cells [J]. *J Am Chem Soc*, 2011, 133(24): 9140-9143.
- [50] Fang J L, Vaca C E. Development of a <sup>32</sup>P-postlabelling method for the analysis of adducts arising through the reaction of acetaldehyde with 2'-deoxyguanosine-3'-monophosphate and DNA [J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(9): 2177-2185.
- [51] 李木兰. 典型醛类污染物与DNA形成加合物的机制及检测方法 [D]. 衡阳: 南华大学, 2005.
- Li M L. Mechanism and determination of DNA adducts formed by typical aldehyde pollutants with DNA [D]. Hengyang: Nanhua University, 2005.
- [52] 刘鲁娟, 李翔宇, 陈欢, 等. 液相色谱-串联质谱法同时检测乙醛-DNA加合物 [J]. *分析科学学报*, 2017, 33(1): 21-26.
- Liu L J, Li X Y, Chen H, et al. Simultaneous detection of acetaldehyde-DNA adducts by liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. *Anal Sci*, 2017, 33(1): 21-26.
- [53] Singh R, Gromadzinska J, Mistry Y, et al. Detection of acetaldehyde derived *N*<sup>(2)</sup>-ethyl-2'-deoxyguanosine in human leukocyte DNA following alcohol consumption [J]. *Mutat Res*, 2012, 737: 8-11.
- [54] Chen L, Wang M, Villalta P W, et al. Quantitation of an acetaldehyde adduct in human leukocyte DNA and the effect of smoking cessation [J]. *Chem Res Toxicol*, 2007, 20(1): 108-113.
- [55] Yin R, Liu S, Zhao C, et al. An ammonium bicarbonate-enhanced stable isotope dilution UHPLC-MS/MS method

- for sensitive and accurate quantification of acrolein-DNA adducts in human leukocytes [J]. *Anal Chem*, 2013, 85 (6): 3190-3198.
- [56] Vaissière T, Sawan C, Herceg Z. Epigenetic interplay between histone modifications and DNA methylation in gene silencing [J]. *Mutat Res*, 2008, 659(1/2): 40-48.
- [57] Jones P A, Baylin S B. The fundamental role of epigenetic events in cancer [J]. *Nature Rev Gen*, 2002, 3(6): 415-428.
- [58] 张宁, 刘保东, 汪海林. DNA加合物分析技术与方法 [J]. *中国科学: 化学*, 2017, 47(12): 1432-1444.  
Zhang N, Liu B, Wang H. Technology and methodology of DNA adducts analysis [J]. *Sci Sin Chim*, 2017, 47: 1432-1444.
- [59] Jones P A, Baylin S B. The epigenomics of cancer [J]. *Cell*, 2007, 128(4): 683-692.
- [60] Wang X, Suo Y, Yin R, et al. Ultra-performance liquid chromatography/tandem mass spectrometry for accurate quantification of global DNA methylation in human sperms [J]. *J Chromatogr B Anal Technol Biomed Life Sci*, 2011, 879(19): 1647-1652.
- [61] Yin R, Mao S Q, Zhao B, et al. Ascorbic acid enhances tet-mediated 5-methylcytosine oxidation and promotes DNA demethylation in mammals [J]. *J Am Chem Soc*, 2013, 135(28): 10396-10403.
- [62] Xiao S, Guo J, Yun B H, et al. Biomonitoring DNA adducts of cooked meat carcinogens in human prostate by nano liquid chromatography-high resolution tandem mass spectrometry: identification of 2-amino-1-methyl-6-phenylimidazo[4, 5-b]pyridine DNA adduct [J]. *Anal Chem*, 2016, 88(24): 12508-12515.

[责任编辑 李红珠]