

理过程会增加 HSPC 的丢失,从而影响患者的造血恢复;另一种是要求洗去冷冻保护剂后回输,认为冷冻保护剂对人体可能有一定程度的副作用。本研究提示:洗去冷冻保护剂和体外与 APS 共培养的过程,不但不会造成造血细胞数量的减少,还能提高 CD34⁺细胞的量。故认为回输时洗去冷冻保护剂并在体外和适宜质量浓度的 APS 共同培养,可能更有利于造血的恢复。

体外扩增是克服脐血干细胞数量不足,限制其应用的主要途径^[9,10],联合多种 HGFs 选择适宜的培养条件及扩增时间,可以在有效地扩增其数量的同时保证其质量。APS 能否和 HGFs 发挥协同作用,增强脐血造血细胞冷冻后的扩增潜能,值得进一步探讨。本实验以冷冻复苏的脐血 MNC 作为培养的起始细胞,加入不同质量浓度的 APS 联合 HGFs 组合 (SCF+IL-3+GM-CSF+G-CSF+EPO) 进行体外扩增。实验结果说明适宜质量浓度的 APS 能与 HGFs 组合发挥协同作用,促进冷冻复苏后的脐血造血细胞的体外扩增。但 CD34⁺细胞率增加不明显。Gilmore 等^[11]认为,用 SCF 联合 IL-3、IL-6、GM-CSF 等扩增脐血 CD34⁺细胞,主要导致造血干细胞发生分化,而不是增殖;APS 在实验中可能和以上细胞因子发生了协同作用,促进 CD34⁺细胞发生的分化效应强于增殖效应,从而导致 CD34⁺细胞率变化不显著;也可能是 CD34⁺细胞的扩增和 MNC 的扩增不同步,造成了 CD34⁺细胞在 MNC 的比例发生了不同步的变化,从而各个组 CD34⁺细胞率变化不明显。

综上所述,APS 能促进冷冻脐血造血细胞的复苏、增殖,提高脐血造血细胞冷冻损伤的可恢复性。且能与 HGFs 协同,提高冷冻复苏的脐血造血细胞的体外扩增潜力。但其作用机制有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Broxmeyer H E, Srour E F, Hangoc G, *et al.* High-efficiency recovery of functional hematopoietic progenitor and stem cells from human cord blood cryopreserved for 15 years [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2003, 100(2): 645-650.
- [2] 郑敏,王亚平.当归多糖对骨髓系多向造血祖细胞增殖分化的影响及其机理研究 [J]. 解剖学杂志, 2002, 25(2): 105-109.
- [3] 刘蓓,侯相麟,赵丽,等.当归多糖对脐血单个核细胞的体外扩增研究 [J]. 中华实用中西医杂志, 2004, 4(17): 937-939.
- [4] Thierry D, Hervatin F, Traineau R, *et al.* Hematopoietic progenitors cells in cord blood [J]. *Bone Marrow Transplant*, 1992, 9 (Suppl 1): 101-105.
- [5] Mino E, Kobayashi R, Yoshida M, *et al.* Umbilical cord blood stem cell transplantation from unrelated HLA-matched donor in an infant with severe congenital neutropenia [J]. *Bone Marrow Transplant*, 2004, 33(9): 969-971.
- [6] Liao C, Liu B, Huang Y N, *et al.* Establishment of cord blood stem cell bank and its clinical application [J]. *Chin J Hematol*, 2001, 22 (8): 411-414.
- [7] 商澎,杨铁虹,贾敏,等.当归多糖的分离、纯化及分析鉴定 [J]. 第四军医大学学报, 2001, 22(14): 1311-1314.
- [8] Bubnic S J, Keating A. Donor stem cells home to marrow efficiently and contribute to short and long-term hematopoiesis after low-cell dose unconditioned bone marrow transplantation [J]. *Exp Hematol*, 2002, 30(6): 606-611.
- [9] Zhai Q L, Qiu L G, Li Q, *et al.* Short-term ex vivo expansion sustains the homing-related properties of umbilical cord blood hematopoietic stem and progenitor cells [J]. *Haematologica*, 2004, 89(3): 265-273.
- [10] 刘英,裴雪涛. Flt-3 配基和促血小板生成素对脐血造血祖细胞的协同扩增作用 [J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(2): 89-91.
- [11] Gilmore G L, DePasquale D K, Lister J, *et al.* Ex vivo expansion of human umbilical cord blood and peripheral blood CD34⁺ hematopoietic stem cells [J]. *Exp Hematol*, 2000, 28 (11): 1297-1305.

龙葵碱对人肝癌 HepG2 细胞 N-乙酰基转移酶活性的影响

高世勇^{1,2}, 季宇彬^{1,2}

(1. 哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心 药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨 150076;

2. 国家教育部抗肿瘤天然药物工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150076)

摘要:目的 探讨龙葵碱对 HepG2 细胞 N-乙酰基转移酶 (NAT) 活性的影响。方法 采用 HPLC 方法,以 2-氨基苄 (2-AF) 为底物,以 2-AF 被 NAT 乙酰化为 2-乙酰氨基苄 (2-AAF) 的量来反应 NAT 的活性。结果 龙葵碱能显著降低 HepG2 完整细胞 NAT 的活性;龙葵碱能够降低 HepG2 细胞质内 NAT 的活性,作用具有剂量依赖性。结论 龙葵碱通过抑制 HepG2 细胞 NAT 的活性发挥细胞毒作用。

关键词:龙葵碱; HepG2 细胞; N-乙酰基转移酶 (NAT)

中图分类号:R286.91

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2008)11-1688-04

收稿日期:2008-05-14

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30400591); 黑龙江省自然科学基金资助项目 (D2004-13); 哈尔滨市青年基金资助项目 (2004AFQXJ035)

作者简介:高世勇(1975—),男,博士,副研究员,研究方向为肿瘤药理学。Tel: (0451) 84800297 E-mail: sygao2002@163.com

Effect of solanine on *N*-acetyltransferase activity in HepG2 cellGAO Shi-yong^{1,2}, JI Yu-bin^{1,2}

(1. Postdoctoral Programme, Institute of Materia Medica, Center of Research and Development on Life Sciences and Environment Sciences of Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China; 2. MOE Engineering Research Center of Natural Anticancer Drugs, Harbin University of Commerce, Harbin 150076, China)

Abstract: **Objective** To explore the effect of solanine on *N*-acetyltransferase (NAT) activity in HepG2 cell. **Methods** Employing HPLC, using 2-AF as substrate, taking concentration of 2-AF as concentration of substrate, in intact HepG2 cells and their cytoplasm, taking the speed of 2-AF being acetylated to 2-AFF by NAT as the activity of NAT. **Results** The results show that solanine could inhibit the activity of NAT in intact HepG2 cell and the cytoplasm. **Conclusion** Solanine acts to cytotoxicity to HepG2 cell by inhibiting the NAT activity.

Key words: solanine; HepG2 cell; *N*-acetyltransferase (NAT)

流行病学调查表明人类70%的肿瘤来源于环境中的危险因素,而在众多的环境危险因素中化学类致癌物占70%~90%,这些化学致癌物中芳香胺类化合物是重要代表。芳香胺类化合物大多本身并没有致癌活性,而是在机体内被*N*-乙酰基转移酶(*N*-acetyltransferase, NAT)等相关酶活化为致癌物,并且NAT是这些芳香胺类化合物活化反应的第一步,也是限速步骤。NAT属于Ⅰ相代谢酶,能够将乙酰辅酶A的乙酰基转移至芳香胺类化合物上,而将芳香胺类化合物活化为致癌物质。NAT在人体内活性的大小与肿瘤的易感性密切相关。目前对NAT活性相关研究主要集中在肠癌和膀胱癌,而对肝癌的发生与NAT的相关研究相对较少。前期研究表明龙葵碱具有明显的抗肿瘤作用^[1~3],且对人肝癌HepG2细胞有细胞毒作用^[4]。本研究龙葵碱对NAT活性的影响,探讨龙葵碱对HepG2的细胞毒作用机制。

1 材料

1.1 细胞株: HepG2人肝癌细胞株购自美国ATCC (American Type Culture Collection),由黑龙江省肿瘤医院肿瘤研究所保种提供。

1.2 药品与试剂: 龙葵碱(质量分数99.9%)由黑龙江省药品检验所提供。2-乙酰氨基苄(2-AAF)、Tris、亮抑酶肽、乙酰辅酶A (AcCoA)、BSA、DTNB购自美国Sigma公司; 2-氨基苄(2-AF)、乙酰肉毒碱、肉毒碱乙酰转移酶购自美国Fluka公司; DTT购自国药集团化学试剂有限公司; PMSF购自美国Amresco公司; RPMI-1640细胞培养液购自美国Hyclone公司; 胰酶购自美国Gibco公司; 胎牛血清购自杭州四季青生物工程材料有限公司。

1.3 仪器: Waters高效液相色谱仪(美国Waters公司); 超净工作台(苏州净化设备厂); 二氧化碳培

养箱(美国NBS公司); 超声波提取器(天津奥特赛恩斯仪器有限公司); 台式冷冻离心机(美国Beckman-Coulter公司)。

2 方法

2.1 细胞培养及给药: HepG2细胞在含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中, 5% CO₂、37℃条件下培养, 3~4d传代1次。当细胞生长状态稳定, 呈对数生长期时, 0.25%胰酶消化细胞后用含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基调整细胞浓度为5×10⁵/mL, 将细胞悬液加入100mL培养瓶中培养。实验分龙葵碱10、2、0.4、0.08、0.016 μg/mL组及阴性对照组。放入5% CO₂、37℃培养箱培养24h后, 龙葵碱组分别加入不同质量浓度的龙葵碱, 阴性对照组加入等体积熔媒, 放入5% CO₂、37℃培养箱继续培养。

2.2 龙葵碱对HepG2细胞NAT活性的影响

2.2.1 标准曲线的绘制: 用甲醇配制2-AAF标准品溶液, 质量浓度分别为0.00625、0.0125、0.025、0.05、0.1、0.15、0.2、0.25、0.3、0.35 mg/mL, 依次进样, 进样量1 μL。Waters液相色谱条件: Symmetry Shield C₁₈色谱柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm), 流动相为20 mmol/L KH₂PO₄ (pH 4.5)-CH₃CN (53:47), 检测波长288 nm, 柱温(25±5)℃。峰面积由Empower工作站软件自动积分, 采用Excell软件以对照品质量浓度和峰面积分别为横纵坐标做标准曲线, 并计算相关系数, 给出标准曲线方程。

2.2.2 不同质量浓度龙葵碱对HepG2完整细胞NAT活性的影响: 取生长良好处于对数生长期的HepG2细胞, 胰酶消化后, 用含10%胎牛血清的RPMI-1640细胞培养液调整细胞至适当的浓度, 分装至7个100 mL细胞培养瓶中, 细胞浓度为5×

$10^5/\text{mL}$,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 24 h 后,加入底物 2-AF $45\text{ }\mu\text{mol/L}$ 及不同质量浓度的龙葵碱(终质量浓度 0.016 、 0.08 、 0.4 、 2 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$),阴性对照组不加龙葵碱, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 24 h。吸出培养液, $3\,500\times g$ 离心 10 min,上清液立即以等体积醋酸乙酯-甲醇(95:5)萃取2次,萃取液挥干后,将残渣溶于 2 mL 甲醇中混合均匀,Waters 高效液相色谱(HPLC)自动进样 $20\text{ }\mu\text{L}$ 进行检测,色谱条件同 2.2.1 项。保留时间 2-AAF 约为 13.5 min,2-AF 约为 17 min。经由 HPLC 分析 2-AAF 的量来反应 NAT 的活性。NAT 的活性用 1×10^6 细胞对应的乙酰化底物(nmol)表示。

2.2.3 龙葵碱作用不同时间对 HepG2 完整细胞中 NAT 活性的影响:细胞按 2.2.2 项方法消化后,放入 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 24 h,加入 2-AF $45\text{ }\mu\text{mol/L}$ 及终质量浓度 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 的龙葵碱,阴性对照组给等体积溶媒, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 5% CO_2 培养箱中培养 12、24、36、48 h 后,将细胞及培养基移取离心,按 2.2.2 项实验步骤操作测定。

2.2.4 龙葵碱对 HepG2 细胞质中 NAT 活性的影响:取处于对数生长期的 HepG2 细胞 1×10^7 个,胰酶消化后,PBS 洗两遍,沉淀的细胞悬浮在 2 mL 的裂解液 [20 mmol/L Tris-HCl ($4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $\text{pH } 7.5$), 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, $50\text{ }\mu\text{mol/L}$ PMSF, $10\text{ }\mu\text{mol/L}$ 亮抑酶肽]中。接下来的步骤均在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行,悬液用超声波破碎 20 min,先以 $9\,000\times g$ 离心 1 min,上清液 $10\,000\times g$ 离心 60 min,取上清液置于冰浴中备用,测定 NAT 活性和蛋白的量,蛋白定量测定采用 Bradford 方法,BSA 作为蛋白标准。活性测定实验中通过测定被乙酰辅酶 A 依赖的 NAT 乙酰化的 2-AF 的量,即 2-AAF 生成的量,来反应细胞质中 NAT 的活性。实验分 7 组,分别为阴性对照组,空白对照组, 0.016 、 0.08 、 0.4 、 2 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$ 龙葵碱组。反应混合液总体积 $550\text{ }\mu\text{L}$;包括 $250\text{ }\mu\text{L}$ 的细胞质液, $10\text{ }\mu\text{L}$ 乙酰辅酶 A 循环混合液,加入一定量的 2-AF 及不同量的龙葵碱,

使 2-AF 终浓度为 0.04 mmol/L ,龙葵碱终质量浓度分别为 0.016 、 0.08 、 0.4 、 2 、 $10\text{ }\mu\text{g/mL}$, $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 5 min,加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ 1 mg/mL 的乙酰辅酶 A 开始反应。空白对照组不加乙酰辅酶 A 而加入等量的双蒸水。乙酰辅酶 A 终浓度为 0.45 mmol/L 。将混合液于 $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ 温育 6 h,取出后加入 $900\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈终止反应。混合液经滤膜滤过后,HPLC 测定 2-AAF 的量,条件同 2.2.2 项,观察龙葵碱对细胞质液中 NAT 活性的影响。

2.3 数据处理:数据采用 Excell 进行统计处理,结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示。

3 结果

3.1 龙葵碱对 NAT 活性的影响

3.1.1 标准曲线的绘制:2-AAF 在 287.8 nm 有最大紫外吸收,故在 HPLC 测定过程中,选取 288 nm 作为最大吸收。以 2-AAF 对照品溶液的质量浓度为横坐标,峰面积为纵坐标,绘制标准曲线,得回归方程为 $Y=8\times 10^6 X-4\,010.6$, $r=0.999\,9$ 。

3.1.2 不同质量浓度龙葵碱对 HepG2 完整细胞 NAT 活性的影响:结果见表 1。与阴性对照组比较,龙葵碱能够减少 2-AAF 生成的量,并且随着龙葵碱质量浓度的增加,2-AAF 生成的量逐渐减少。

3.1.3 龙葵碱作用不同时间对 HepG2 完整细胞 NAT 活性的影响:结果见表 2。 $2\text{ }\mu\text{g/mL}$ 龙葵碱

表 1 不同质量浓度龙葵碱对 HepG2 完整细胞 NAT 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 1 Effect of solanine in various concentration on NAT activity in intact HepG2 cells ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	2-AAF 生成量/nmol (1×10^6 细胞)
阴性对照	0	$0.472\,2\pm 0.005\,2$
龙葵碱	0.016	$0.452\,1\pm 0.006\,4^{**}$
	0.08	$0.403\,3\pm 0.005\,5^{**}$
	0.4	$0.341\,4\pm 0.004\,1^{**}$
	2	$0.286\,2\pm 0.003\,7^{**}$
	10	$0.250\,3\pm 0.002\,6^{**}$

与阴性对照组比较: $^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs negative control group

表 2 龙葵碱作用不同时间对 HepG2 完整细胞 NAT 活性的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 2 Effect of solanine on NAT activity in intact HepG2 cells at different times following its administration ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	$\rho/(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	2-AAF 生成量/nmol (1×10^6 细胞)			
		12 h	24 h	36 h	48 h
阴性对照	0	$0.230\,8\pm 0.007\,9$	$0.560\,5\pm 0.014\,8$	$0.931\,1\pm 0.021\,8$	$1.113\,8\pm 0.021\,6$
龙葵碱	2	$0.183\,1\pm 0.006\,9^{**}$	$0.268\,3\pm 0.008\,8^{**}$	$0.458\,1\pm 0.011\,8^{**}$	$0.487\,3\pm 0.012\,6^{**}$

与阴性对照组比较: $^{**}P<0.01$

$^{**}P<0.01$ vs negative control group

分别作用于 HepG2 细胞 12、24、36、48 h,随着作用时间的增加,2-AAF 生成的量逐渐增多,但龙葵碱组与同一时段的阴性对照组比较,能够显著减少 2-AAF 生成的量。

3.1.4 龙葵碱对 HepG2 细胞质中 NAT 活性的影响:结果见表 3。不同质量浓度龙葵碱作用于 HepG2,与阴性对照组比较,能够降低 2-AAF 生成的量,即降低细胞质中的 NAT 活性。

表3 不同质量浓度龙葵碱对 HepG2 细胞质中 NAT 活性的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 3 Effect of solanine in various concentration on NAT activity in cytoplasm of HepG2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	$\rho/$ ($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)	AcCoA/ ($\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$)	2-AAF 生成量/ ($\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$)
空白	0	0	0
阴性对照	0	0.45	$1.11 \times 10^{-3} \pm 1.78 \times 10^{-5} \cdots$
龙葵碱	0.016	0.45	$1.07 \times 10^{-3} \pm 1.47 \times 10^{-5} \cdots$
	0.08	0.45	$1.04 \times 10^{-3} \pm 1.62 \times 10^{-5} \cdots$
	0.4	0.45	$0.99 \times 10^{-3} \pm 1.92 \times 10^{-5} \cdots$
	2	0.45	$0.86 \times 10^{-3} \pm 1.57 \times 10^{-5} \cdots$
	10	0.45	$0.76 \times 10^{-3} \pm 1.72 \times 10^{-5} \cdots$

与阴性对照组比较: $\cdots P < 0.01$

$\cdots P < 0.01$ vs negative control group

4 讨论

芳香胺 *N*-乙酰化转移酶 (arylamine *N*-acetyltransferase, NATs) 为 I 相药物代谢酶,主要的生理功能为将乙酰辅酶A 上的乙酰基转移到芳香胺类、肼^[5]、arylhydroxylamines^[6] 和 arylhydrazines 等物质的氮原子或氧原子上,在药物和毒物的代谢及解毒方面起着重要的作用^[7~9]。以 2-AF 为例,芳香胺类化合物致癌的过程如下:首先细胞中的 NATs 将其转化为 *N*-乙酰化-2-氨基苄 (2-AAF)^[10,11]。2-AAF 被其他酶类如葡萄糖醛酸基转移酶、脱酰(基)酶、磺基转移酶、酰基转移酶等进一步活化^[12,13],最终生成终极致癌物氮宾离子 (nitrenium ion) 和芳香氨离子 (arylamidonium ion)。这些终极致癌物可与 DNA 的鸟嘌呤作用形成 *N*-脱氧鸟嘌呤氨基苄和 *N*-脱氧鸟嘌呤乙酰氨基苄加合物,即 DNA-致癌复合物。DNA-致癌复合物的形成与细胞毒、突变、致癌等密切相关^[14,15],是芳香胺类诱导致癌过程中至关重要的一步。有研究者^[16]指出 NAT 酶活性升高会增加机体对很多芳香胺类致癌物致癌的敏感性。

本实验观察了龙葵碱对 HepG2 细胞 NAT 活性的影响,实验结果表明龙葵碱对 HepG2 完整细

胞和细胞质内 NAT 酶都有一定的影响:龙葵碱能够降低 HepG2 完整细胞和细胞质内 2-AAF 生成的量,并且具有剂量相关性;随着作用时间的延长,2-AAF 生成的量逐渐增多,但在相同作用时间下龙葵碱均能够降低 2-AAF 的生成。因此,龙葵碱是一种 NAT 的抑制剂,龙葵碱对 HepG2 细胞的抑制作用与其抑制 NAT 活性有一定关系,作为 NAT 抑制剂,分为非竞争性抑制、竞争性抑制和反竞争性抑制剂。龙葵碱是通过哪种方式抑制 NAT 活性的,这与龙葵碱抑制 NAT 的进一步作用机制密切相关,还有待于进一步的实验研究。

参考文献:

- [1] 季宇彬,万绪梅,高世勇,等.龙葵碱对 S₁₈₀ 小鼠红细胞膜唾液酸和封闭度的影响 [J]. 中草药, 2006, 37(7): 1052-1053.
- [2] 季宇彬,万绪梅,高世勇,等.龙葵碱对荷瘤小鼠红细胞免疫功能的影响 [J]. 中草药, 2007, 38(3): 412-414.
- [3] 季宇彬,王宏亮,高世勇,等.龙葵碱荷瘤小鼠肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的影响 [J]. 中草药, 2005, 36(8): 1200-1202.
- [4] Gao S Y, Wang Q J, Ji Y B. Effect of solanine on the membrane potential of mitochondria in HepG2 cells and $[\text{Ca}^{2+}]_i$ in the cells [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(21): 3359-3367.
- [5] Weber W W, Hein D W. *N*-acetylation pharmacogenetics [J]. *Pharmacol Rev*, 1985, 37(1): 25-79.
- [6] Hein D W, Doll M A, Rustan T D, et al. Metabolic activation and deactivation of arylamine carcinogens by recombinant human NAT1 and polymorphic NAT2 acetyltransferases [J]. *Carcinogenesis*, 1993, 14(8): 1633-1638.
- [7] Hein D W, Rustan T D, Doll M A, et al. Acetyltransferases and susceptibility to chemicals [J]. *Toxicol Lett*, 1992, 64-65: 123-130.
- [8] Hein D W, Rustan T D, Ferguson R J, et al. Metabolic activation of aromatic and heterocyclic *N*-hydroxyarylamines by wild-type and mutant recombinant human NAT1 and NAT2 acetyltransferases [J]. *Arch Toxicol*, 1994, 68(2): 129-133.
- [9] King C M, Land S J, Jones R F, et al. Role of acetyltransferases in the metabolism and carcinogenicity of aromatic amines [J]. *Mutat Res*, 1997, 12: 123-128.
- [10] King C M, Glowinski I B. Acetylation, deacetylation and acyltransfer [J]. *Environ Health Perspect*, 1983, 49: 43-50.
- [11] Weber W W, Hein D W. *N*-acetylation pharmacogenetics [J]. *Pharmacol Rev*, 1985, 37(1): 25-79.
- [12] Miller E C, Miller J A. Searches for ultimate chemical carcinogens and their reactions with cellular macromolecules [J]. *Cancer*, 1981, 47(10): 2327-2345.
- [13] Dipple A, Michejda C J, Weisburger E K. Metabolism of chemical carcinogens [J]. *Pharmacol Ther*, 1985, 27(3): 265-296.
- [14] Hemminki K, Dipple A, Shuker D E G, et al. *DNA Adducts, Identification and Biological Significance* [C]. Lyon: IARC Scientific Publications no. 125. International Agency for Research on Cancer, 1994.
- [15] Dipple A. DNA adducts of chemical carcinogens [J]. *Carcinogenesis*, 1995, 16(3): 437-441.
- [16] Einisto P, Watanabe M, Ishidate M J, et al. Mutagenicity of 30 chemicals in *Salmonella typhimurium* strains possessing different nitroreductase or *O*-acetyltransferase activities [J]. *Mutat Res*, 1991, 259(1): 95-102.