

致癌物双甲基亚硝酸胺掩护物的研究

杭州市第二人民医院 科研组

1962年Magee及Barnes等发现双甲基亚硝酸胺可引起肝癌,并发现其作用原理为使腺嘌呤和鸟嘌呤变为7-甲基鸟嘌呤。1964年Brooky和Lawley讨论两个诱变的可能性,不规则的碱基配对或脱嘌呤作用,即7-甲基鸟嘌呤从DNA链上脱去,引起细胞突变。

Yanofsky (1967年)从人的血红蛋白的各种变种以及影响色氨酸合成酶A蛋白突变,可获得相似的证据。以上研究为亚硝酸胺致癌奠定了理论基础。

1967年Druckrey应用70多种亚硝酸胺,在1000多只大鼠身上进行诱癌实验,全身各部都可致癌,致癌率以肝癌为最高,食道、咽喉次之。其后还有很多研究者以亚硝酸胺作成动物癌模型。亚硝酸胺是致癌物已经肯定,由于动物和人不同,并且根据外源性亚硝酸——亚硝酸胺学说防癌效果不够好,再加致癌物品种很多,搞不清那种物质引起何种癌肿,因此亚硝酸胺作为人体致癌物尚未确定。双甲基亚硝酸胺性质很活跃,既可被氧化,又能被还原,它还能使鸟嘌呤甲基化,故极易被破坏。我们实验发现不但维生素丙等活性物质能破坏它,就是葡萄糖和许多中草药都能使之破坏,尤其血清、米汤、蕃薯、葱、大蒜、茶、酒精等都能破坏亚硝酸胺。因之,尽管输入大量亚硝酸胺,也有被食物或血清破坏的可能。所以亚硝酸胺致癌的说法,有继续深入研究

的必要。人体和食物的化学成分非常复杂,相互间必有化学变化,可能影响破坏亚硝酸胺的作用,反之如掩护了亚硝酸胺,则亚硝酸胺可能发挥其致癌作用,如掩护物同亚硝酸胺起协同作用,尤为危险。故设计以下化学实验,希望发现亚硝酸胺致癌的辅助因素。

方 法

1、用人工合成的双甲基亚硝酸胺 $(\text{CH}_3)_2\text{N}\cdot\text{NO}$ 水溶液作为亚硝酸胺($\text{R}_2\text{N}\cdot\text{NO}$)代表,先测定其浓度约5 ppm,加能破坏亚硝酸胺的物质和另外一种物质,使之发生变化,而后用Griess法或其变法——橙黄色反应,测定残余亚硝酸胺量,同对照比较,以观察三者互相干扰,是加强破坏亚硝酸胺或掩护亚硝酸胺,还是使之不被破坏或少破坏。

2、一般认为维生素丙能改善身体代谢机能和破坏亚硝酸胺,作为防癌药物,故以维生素丙作标准,找寻能掩护亚硝酸胺的物质(以M代表),维生素丙用临床应用的注射剂,因易破坏,临用时稀释成100、50、25、12.5、6.25、3.125 ppm备用。

3、选择人体内微量元素或可能致癌的有机物作为掩护剂,比较各物的化学反应,微量元素的浓度,力求接近体内血中浓度或饮食中输入量,各元素化合物稀释成20、2.0、0.2 ppm浓度备用。其元素浓度列表如下:

元 素	铅	汞	锌	铜	铁	砷	硒	钴	钼	铬	钨
血中浓应 (ppm)	0.04	0 0.315	0.6 1.087	0.16 3.48	8.0 10.0	0.01 0.64	0.01 0.034	<0.0025	0 0.041	0.012 0.055	痕 19.0
1 天输入 量 (mg)	0.45	0.02	8.0—15.0	3.2	15.0	0.1	0.068	0.3	0.3	0.05 0.1	
试剂中所 含元素量 (ppm)	6.0 0.6 0.06	12.0 1.2 0.2	7.0 0.7 0.07	7.0 0.7 0.07	6.0 0.6 0.06	14.0 1.4 0.14	12.0 1.2 0.12	0.83 0.083 0.0083	10.9 1.09 0.109	6.0 0.6 0.06	14.4 1.44 0.144

注：雄黄系加热溶解饱和液稀释而成，苯甲酸也由饱和液稀释而成。

3、试管全部浸洗清洁烤干；试剂专用量具，用 H_2O_2 浸泡后蒸馏水洗净，以防外加亚硝酸等干扰。实验前将试剂稀释好，先吸取掩护剂 1 毫升，分盛各试管中，再分别将每个浓度维生素丙或中草药水，加入 1 毫升，最后加入双甲基亚硝酸胺溶液 2 毫升，摇匀，各对照管用蒸馏水加至 4 毫升。为防止掩护剂本身颜色，或同维生素作用显色，或同 Griess 试剂显色，故均设置对照，如有显色或沉淀，结果中

应减去它的光密度，一律用 58 I 型光电比色计 50Mu 滤光片比色测定光密度，因残余亚硝酸量少，亚硝酸胺浓度同光密度成正比，故只用光密度作比较，不查标准曲线换算浓度，以减少误差。残余亚硝酸胺浓度测定，都用 Griess 变法——橙黄反应。仅中草药有黄色素者用 Griess 法。为了比较各物作用，设掩护指数。掩护指数计算如下：

$$\begin{aligned} \text{掩护指数} &= \frac{M + VC + R_2N \cdot NO \text{ 作用后残留 } R_2N \cdot NO \text{ 平均数} + \text{加入 } R_2N \cdot NO}{VC + R_2N \cdot NO \text{ 作用后残留 } R_2N \cdot NO \text{ 平均数} + \text{加入 } R_2N \cdot NO} \\ &= \frac{M + VC + R_2N \cdot NO \text{ 作用后残留 } R_2N \cdot NO \text{ 平均数}}{VC + R_2N \cdot NO \text{ 作用后残留 } R_2N \cdot NO \text{ 平均数}} \end{aligned}$$

干 扰 物		维 生 素 丙 (ppm)								Vc加 亚硝酸 钠光密 度	纠正后 残留亚 硝酸胺 光密 度	掩护 指数
名称	浓度 ppm	加Griess 反应后 光密度	100	50	25.5	12.5	6.25	3.125	平均	0		
亚 砷 酸 钠	20.0	0.02	0.145	0.400	0.330	0.425	0.520	0.550	0.395	0.440	0.012	0.363
	2.0	0.015	0.125	0.195	0.300	0.385	0.480	0.580	0.344	0.375	0.010	0.319
	0.2	0.015	0.110	0.170	0.260	0.295	0.390	0.495	0.287	0.330	0.001	0.211
	平均	0.016	0.130	0.282	0.296	0.368	0.463	0.541	0.342		0.007	0.318
	0		0.085	0.110	0.150	0.155	0.250	0.295	0.174	0.325		+

干扰维生素丙破坏亚硝酸胺的物质（掩护剂）筛选结果如下表：

干 扰 物 名 称	同 VC 作用	同亚 硝酸 作用	加入亚 硝酸光 密度	20	2.0	0.2 ppm	残余亚 硝酸平 均光密 度	减去外 加光密 度	纠正后 残余亚 硝酸光 密度	Vc 对 照残余 亚硝酸 光密度	掩 护指 数	梯 度方 向	掩 护作 用
				干扰物同Vc作用后 残余亚硝酸光密度									
亚 硒 酸 钠 N ₂ SeO ₃	+	+	0.325	0.395	0.344	0.287	0.342	0.022	0.318	0.174	1.82	√	+
重 铬 酸 钾 K ₂ Cr ₂ O ₇	+	+	0.325	0.381	0.337	0.309	0.343	0.025	0.318	0.174	1.82	√	+
雄 黄 As ₂ S ₃	+	+	0.570	0.256	0.249	0.232	0.246	0.017	0.229	0.257	0.89	√	±
苯 酚 C ₆ H ₅ OH	+	+	0.570	0.296	0.273	0.250	0.273	0.017	0.256	0.257	0.99	√	±
维 生 素 B ₁₂ (含C ₀)	+	+	0.605	0.089	0.071	0.065	0.075	0.026	0.039	0.063	0.62	=	-
谷 氨 酸 钠 CH ₂ CH ₂ CHCOO COONa NH ₂ Na	+	+	0.605	0.036	0.042	0.057	0.045			0.063	0.71	∧	-
氢 氧 化 铝 Al (OH) ₃	+	+	0.185	0.058	0.057	0.065	0.060	0.019	0.041	0.112	0.36	∧	-
炭 酸 氢 钠 NaHCO ₃	+	+	0.185	0.066	0.076	0.087	0.076	0.010	0.066	0.112	0.59	∧	-
醋 酸 铅 Pb ₂ Ac	+	+	0.176	0.113	0.116	0.108	0.112	0.010	0.102	0.144	0.71	=	-
亚 硒 酸 H ₂ SeO ₃	+	+	0.176	0.160	0.081	0.063	0.101	0.015	0.086	0.144	0.60	√	-
硫 酸 铜 CuSO ₄	+	-	0.100	0.093	0.088	0.081	0.087	0.010	0.077	0.067	1.15	√	+
三 氯 化 铁 FeCl ₃	+	±	0.100	0.094	0.085	0.077	0.085	0.012	0.073	0.067	1.09	√	+
硫 酸 低 铁 FeSO ₄	+	+	0.405	0.235	0.220	0.197	0.217	0.015	0.202	0.405	0.49	√	-
磷 硒 酸 (含P.W.M ₀)	+	+	0.610	0.575	0.574	0.536	0.562	0.023	0.539	0.542	0.99	√	±
硝 酸 汞 Hg (NO ₃) ₂	+	+	0.610	0.444	0.426	0.424	0.431	0.026	0.405	0.542	0.72	√	-
钨 酸 钠 Na ₂ WO ₄	+	+	0.500	0.347	0.305	0.299	0.317	0.025	0.292	0.361	0.80	√	-
苯 甲 酸 C ₆ H ₅ COOH	+	+	0.500	0.373	0.331	0.297	0.334	0.022	0.312	0.361	0.86	√	-
硫 酸 锌 ZnSO ₄	+	+	0.405	0.221	0.198	0.197	0.205	0.015	0.190	0.405	0.49	√	-

注：以下二表中植物色素光密度已减去，其余外加光密度未扣除，故仅作参考。

干扰蒲公英煎液破坏双甲基亚硝胺的掩护剂实验研究

掩 护 剂 名 称	亚硝酸 浓 度 ppm	掩 护 剂 浓 度ppm			平均残留 R_2N_2O 光密度	中药对照 残留光密 度	掩 护 指 数	梯 度	掩 护 作 用
		20	2	0.2					
		残余亚硝酸光密度							
硫 酸 铜 $CuSO_4$	0.440	0.405	0.409	0.395	0.403	0.501	0.80	-	-
三氯化铁 $FeCl_3$	0.440	0.442	0.464	0.440	0.449	0.480	0.93	-	±
硫 酸 锌 $ZnSO_4$	0.440	0.431	0.151	0.429	0.452	0.606	0.74	-	-

干扰车前草煎液破坏双甲基亚硝胺的掩护剂实验研究

掩 护 剂 名 称	亚硝酸 ppm	掩护剂浓度ppm			平均残留 RN_2O 光密度	中药对 照残留 光密度	掩护 指数	梯 度	掩护 作用
		20	2	0.2					
		残余亚硝酸胺光密度							
硫 酸 铜 $CuSO_4$	0.354	0.361	0.365	0.365	0.362	0.450	0.85	-	-
三氯化铁 $FeCl_3$	0.354	0.423	0.481	0.481	0.445	0.363	1.22	-	+
硫酸 锌 $ZnSO_4$	0.354	0.466	0.463	0.464	0.462	0.465	1.97	-	±
醋酸 铅 $Pbac$	0.050	0.122	0.047	0.081	0.094	0.505	1.88	√	+

讨 论

一、本实验化学变化如下：

1、维生素丙能破坏亚硝胺是肯定的，其作用式从略。

2、维生素丙能同金属元素或其盐起作用，其作用式从略。

3、金属元素也能同亚硝胺起作用，其作用视金属元素和N的电位差而定，如金属元素电位高于N，能使NO氧化破坏。如低于N的电位，则金属被还原。例如三价铁和二价铁，其作用显然不同。

4、亚硝胺加Griess试剂显红色反应，其反应式从略。

亚硝胺加维生素丙、加维生素丙及金

属盐或其他干扰物后，同Griess试剂反应生成偶氮苯胺苯磺酸，为亚硝胺被干扰破坏后残留的亚硝胺反应产物。但偶氮苯胺苯磺酸同金属离子可能成盐或生成红色螯合物或沉淀，能加深反应显色，故反应光密度有的较之同量亚硝胺单独同Griess试剂反应光密度为大，但掩护指数大者仍旧是亚硝胺没有破坏或很少破坏的表现，说明该干扰物有掩护作用。以上变化是试管内反应情况，人体内化学成份复杂，变化一定更为复杂。

实验中各干扰物同维生素丙或亚硝胺如发生变化能显色或沉淀，光密度起变化便可测出。例如维生素丙能同硒、铬、铅、铜、铁、汞、钼、钨、苯甲酸、苯酚、维生素B₁₂、谷氨酸钠、氢氧化铝、炭酸氢

钠等或多或少发生变化,维生素丙被破坏,则亚硝酸胺可全部残留或部分残留,这些干扰物就起到掩护亚硝酸胺的作用。硒、铬、砷、酚、维生素 B_{12} 、谷氨酸等除 $FeCl_3$ 以外,都能同亚硝酸胺起变化,变化结果可使亚硝酸胺破坏,但实验过程中亚硝酸胺是在维生素丙加干扰物之后加的,故实验结果基本上仍是掩护亚硝酸胺。

二、实验结果中,掩护物的掩护指数如大于1.0,作为有掩护作用,则掩护物有亚硒酸钠、重铬酸钾、硫酸铜、三氯化铁和苯酚等。再看残余亚硝酸胺的梯度:一般某种物质对亚硝酸胺的破坏作用,其浓度大者,破坏作用大,则残留亚硝酸胺少;但本实验结果中亚硒酸钠、重铬酸钾、苯酚、硫酸铜、三氯化铁等适得其反,并且其掩护指数也较大,似可说明它们对亚硝酸胺有掩护作用。反之,如维生素 B_{12} 、谷氨酸钠、氢氧化铝、碳酸氢钠、醋酸铅等掩护指数小者,其梯度不明显或同有掩护作用者相反。故此掩护指数和残余亚硝酸胺梯度二者似可判断各该干扰物对亚硝酸胺有无掩护作用。唯亚硒酸、雄黄、硝酸汞、磷钼酸、钨酸钠、苯甲酸等例外,其掩护指数虽小,但其梯度同有掩护作用的物质相似,可能是其浓度低之故,似不是干扰物本身无掩护作用之故。这些干扰物对中草药破坏亚硝酸胺也做了少数实验,发现也有掩护作用,但随品种不同,其作用强度也有不同。

三、据记载,Se、As、Cr、Pb、Zn、苯酚都是致癌物,其致癌作用原理未明,本实验适巧碰到它们有掩护亚硝酸胺作

用,如较大量进入人体,除其本身毒性之外,又增加了亚硝酸胺的危险性,在矿山或工业生产上可能发挥其致癌作用。此外,在城市空气或饮水被污染(如四乙铅)或使用它制的器皿,也可较多的输入人体,发挥其危害作用,因此在人口集中的大城市和某些山区癌的发病率较高。在矿产多的山区也可因水利和农作物不同,金属掩护物进入人体量也不同。癌的地理病因调查结果,有的报告土壤微量金属元素含量同癌发病率成正比,有的报告不成正比,本实验似可给以解释。

四、微量元素致癌作用除了放射性元素之外,已确定者有Se、Cu、As、Pb、Zn,本实验中还发现Cu、Fe都有掩护亚硝酸胺作用。慢性铜中毒可致肝、肾、肺发生炎性损伤。慢性铁中毒肝肿大呈铁锈色,纤维收缩呈现细小结节状硬变,铁粉尘吸入可致肺泡间隔局限性增厚、铜、铁虽然不是致癌物,但长期多量进入人体,由于它们对亚硝酸胺有掩护作用,也应注意。

小 结

1、本实验发现数种微量元素和苯酚等物质能掩护双甲基亚硝酸胺,使之不易被维生素丙所破坏,因而可能使其发挥致癌作用,甚至加强它的作用。

2、本实验是以化学实验为基础,并加以推论,动物实验和防癌工作中实际价值如何,有待进一步考验。

本实验报告承蒙杭州市化工研究所科技情报组指导,特此致谢!