

文章编号: 1000- 0615(2000)04- 0359- 05

## 苯并(a) 芘对大弹涂鱼肝脏 DNA 的损伤

冯 涛<sup>1</sup>, 郑微云<sup>2</sup>, 洪万树<sup>3</sup>, 郭祥群<sup>4</sup>

(1. 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学国家教委海洋生态环境开放研究实验室, 福建 厦门 361005; 3. 厦门大学海洋系, 福建 厦门 361005; 4. 厦门大学化学系, 福建 厦门 361005; )

**摘要:** 在实验生态条件下, 采用碱解旋技术检测了暴露于 BaP 后大弹涂鱼肝脏的 DNA 单链断裂程度, 结果发现 DNA 单链断裂程度同时受到曝污时间和曝污浓度的影响, 并具有一定的时间-效应和剂量-效应特征; 污染解除后 DNA 单链断裂程度未明显减轻, 表明 DNA 损伤的修复能力较弱。以上这些结果表明 DNA 单链断裂适于作为 BaP 暴露后 DNA 损伤的检测指标。

**关键词:** 苯并(a) 芘; 大弹涂鱼; DNA 损伤

中图分类号: S941. 91 文献标识码: A

### DNA damage in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* with benzo(a) pyrene exposure

FENG Tao<sup>1</sup>, ZHENG Wei-yun<sup>2</sup>, HONG Wan-shu<sup>3</sup>, GUO Xiang-qun<sup>4</sup>

(1. Environmental Science Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Research Laboratory of SEDC of Marine Ecological Environment, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

3. Oceanography Department of Xiamen University, Xiamen 361005, China;

4. Chemistry Department of Xiamen University, Xiamen 361005, China)

**Abstract:** DNA single strand breaks in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* with benzo(a) pyrene exposure were detected using DNA alkaline unwinding assay under experimental ecological conditions. It turned out that DNA single strand breaks were effected by exposure time and exposure concentration and were time-dependent and dose-related. The repair of DNA damage was weak because no significant change was observed after the fishes were transferred to clean sea water. All of the results show that DNA single strand breaks are suitable to be the bioindicator of DNA damage with BaP exposure.

**Key words:** benzo(a) pyrene; *Boleophthalmus pectinirostris*; DNA damage

苯并(a) 芘(BaP) 是一种强致癌性的多环芳烃, 在环境中广泛存在。研究表明, BaP 在体内代谢过程中转化为多种中间代谢产物, 这些中间代谢产物多为活性极高的亲电化合物<sup>[1,2]</sup>, 可与 DNA 大分子相互作用, 形成多种类型的 DNA 损伤, 如加合物形成、链断裂、碱基的非正常化学修饰或缺失等<sup>[3]</sup>, 各种类

收稿日期: 1999- 11- 30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(49876029); 福建省自然科学基金资助项目(C9810003)

作者简介: 冯 涛(1969- ), 女, 博士研究生, 主要从事海洋生态毒理学研究。Tel: 0592- 2186416, E-mail: wyzheng@jingxian. xmu.

型的 DNA 损伤都可能对细胞最终的转化产生影响。

DNA 单链断裂是一种重要类型的 DNA 损伤。化学物诱导的 DNA 单链断裂主要是由于化学物经细胞代谢产生的中间代谢物与 DNA 结合形成的加合物转化而来。如 BaP 经细胞转化为具化学活性的二醇环氧化物(BaPDE)<sup>[2]</sup>, BaPDE 可与 DNA 形成三种类型的加合物: (1) 稳定加合物; (2) 可进一步导致形成碱不稳定的无嘌呤位点的加合物; (3) 可引起单链断裂的不稳定加合物; DNA 单链断裂主要是由后两种加合物转化而来<sup>[4]</sup>。

碱解旋法(DAU)是一种灵敏的检测 DNA 损伤的分析技术<sup>[4-7]</sup>。在一定条件(pH 及温度)下, DNA 分子在单链断裂处发生链分离。碱解旋法正是利用了 DNA 分子的这一特性, 经一定时间的碱解旋, 残余的双链 DNA 量与断裂点的数目成反比, 或转化为单链 DNA 的双链 DNA 的数量正比于断裂点的数目<sup>[8]</sup>。这种方法通过检测 DNA 分子的完整性来证明化学物对 DNA 的作用。这项技术目前在国外已应用于培养细胞及环境中生物样品的分析, 检测潜在的致癌/致突变化学物可能引起的单链断裂<sup>[4,8-11]</sup>, 国内这方面的研究则报道较少<sup>[12]</sup>。

本实验试图通过对暴露于不同浓度 BaP 的大弹涂鱼肝脏 DNA 单链断裂变化的研究, 探讨 BaP 的致毒机理以及以 DNA 单链断裂作为污染物遗传毒性生物标记的可能性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 仪器与试剂

实验仪器采用 Hitachi 850 型荧光分光光度计, Beckman J2- MC 型冷冻离心机。

苯并(a)芘和葡聚糖凝胶 G-50 为 Sigma 公司产品; Triton-X 100 为 Amresco 公司产品; Hoechst dye 33258 为 Calbiochem 公司产品; 其余试剂为国产市售产品。

### 1.2 实验鱼和曝污条件

苯并(a)芘先用少量丙酮溶解, 再配制成一定浓度的储备液, 避光于 4℃ 保存。实验前将储备液用清洁海水稀释为  $0.05\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  三个不同的浓度组, 分别置于直径为 50cm, 高为 50cm 的陶瓷缸中, 每缸海水体积 40L。对照组海水中加入与污染组相同体积的丙酮。

实验用鱼大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*), 捕自福建省福清海域, 平均体长为  $(12.8\pm 1.0)\text{cm}$ , 平均体重为  $(15.05\pm 3.4)\text{g}$ , 放在室内饲养。实验鱼先在清洁海水中暂养三天, 然后分别放入上述几个浓度的海水中, 每组设两个平行样。实验期间, 用微型充气机连续充气, 每天更换相同污染浓度的海水, 其间投喂藻类; 水温基本稳定在  $(20\pm 2)\text{℃}$ 。

### 1.3 DNA 的分离纯化及碱解旋分析

分别于曝污后不同时间取样, 每次每组取鱼 6 尾, 活体解剖, 取出肝脏, 迅速冷冻于液氮中。

#### 1.3.1 DNA 的分离纯化

DNA 的分离纯化方法见参考文献[4]: ① 肝脏于含 0.2% Triton X-100 的 1N  $\text{NH}_4\text{OH}$  中匀浆。④ 匀浆液用氯仿: 异戊醇: 酚(24: 1: 25 v/v) 抽提以纯化 DNA。④ 离心后取上清液过葡聚糖凝胶 G-50 柱, 洗脱液弃去; 用 G-50 缓冲液( $10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris,  $150\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl,  $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.5\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, pH 7.4) 洗脱, 收集洗脱液, 即得到分离纯化的 DNA 样品。

#### 1.3.2 碱解旋分析

按照碱解旋程序分析 DNA 链断裂<sup>[4]</sup>, 需测定三个参数: 双链 DNA、单链 DNA 以及碱解旋 DNA 的荧光值。碱解旋 DNA 的测定: 将分离纯化的 DNA 样品 100 $\mu\text{L}$ , 加入 50 $\mu\text{L}$   $0.05\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH, 混匀后于

38°C 孵育 30min, 快速加入 50 $\mu$ L 0.05mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> HCl 及 5 $\mu$ L 含 0.2% SDS 的 2mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA。在上述碱解旋后的 DNA 样品中加入 3mL 0.2M 磷酸钾缓冲液 (pH6.9), 3 $\mu$ L Hoechst dye 33258(二苯丙咪唑), 混匀后置于暗处反应 15 min 后测荧光(激发波长为 360nm, 发射波长为 450nm)。

双链及单链 DNA 的测定: 荧光试剂 Hoechst dye 33258(二苯丙咪唑) 与双链 DNA 结合, 形成稳定的荧光产物, 而与单链 DNA 结合, 其荧光强度降低。利用此性质, 可定量双链及单链 DNA。分别取分离纯化的双链 DNA 及单链 DNA (将分离纯化的双链 DNA 样品于 80°C 加热 30min, 即可制得单链 DNA<sup>[13]</sup>), 100 $\mu$ L 于测试管中, 加入 100 $\mu$ L 25mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> NaCl, 5 $\mu$ L 含 0.2% SDS 的 2mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> EDTA, 3mL 0.2mol $\cdot$ L<sup>-1</sup> 磷酸钾缓冲液 (pH6.9), 3 $\mu$ L Hoechst dye 33258, 混匀后置于暗处反应 15min 后测荧光(激发波长为 360nm, 发射波长为 450nm)。

### 1.3.3 F- 值的计算

DNA 完整性通常以 F- 值表示, F- 值的计算公式为:

$$F = \frac{X_{(auDNA)} - X_{(ssDNA)}}{X_{(dsDNA)} - X_{(ssDNA)}}$$

式中, X 为荧光值, dsDNA 为双链 DNA, ssDNA 为单链 DNA, auDNA 为碱解旋后的 DNA。

## 1.4 数据处理

实验数据用统计学方法进行处理。所给的结果为平均数  $\pm$  标准误差 (Mean  $\pm$  SDE); 用单因素方差分析方法分析苯并(a) 芘曝污引起的差异; 组间数据的两两比较采用单尾 t- 检验法。

## 2 结果

### 2.1 不同 BaP 暴露时间对大弹涂鱼肝脏 DNA 单链断裂的影响

将大弹涂鱼暴露于 0.5mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> BaP 一周时间, 分别于 6h、12h、24h、36h、3d、7d 取样, 并于 6h、3d、7d 取对照组, 所得结果如图 1 所示。与对照组相比, 大弹涂鱼肝脏 DNA 单链断裂程度显著增加(表现为 F 值的降低), 除 6h 以外的其它时间组均与对照组差异显著 (P  $\leq$  0.05)。其中暴露于 BaP 的 36h 内, F 值迅速降低(与对照组相比, 约降低了 40%), 表明该 BaP 浓度的暴露可在短时间内对大弹涂鱼肝脏 DNA 造成严重损伤; 更长时间的暴露(3~7d), DNA 单链断裂程度继续加重, 但变化幅度减缓, 其变化量仅占对照组 F 值的 20% 左右。

Shugart<sup>[4]</sup> 曾将蓝鳃太阳鱼 (*Lepomis macrochirus*) 暴露于含 BaP 浓度 1 $\mu$ g $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的海水中达一个月之久, 结果发现在第 16d 时 F 值降至最低; 而 McCarthy 等<sup>[11]</sup> 将日本青鳉 (*Oryzias latipes*) 暴露于 200mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 的二亚硝酸胺中 24h, 再移至清水中 6d, 如此反复四次, 其 F 值降为对照组的 50%。本实验中大弹涂鱼 F 值在 36h 内即迅速降低, 可能与本实验所采用的 BaP 浓度大大高于文献[4] 中的实验浓度有很大关系。

### 2.2 不同 BaP 暴露浓度对大弹涂鱼肝脏 DNA 单链断裂的影响

将大弹涂鱼暴露于 0.05mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、0.2mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>、0.5mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 三种不同浓度 BaP 一周时, 其 F 值随浓度升高而降低(图 2)。用回归方法分析 F 值与 BaP 暴露浓度之间的剂量-效应关系, 发现二者呈近似二次曲线相关, 其回归方程为  $y = 3.8512x^2 - 2.9809x + 0.8023$ , 相关系数  $R^2 = 0.9101$ 。从相关系数可以看出, 在本实验的浓度范围内, 大弹涂鱼肝脏 DNA 单链断裂程度与 BaP 暴露浓度密切相关。值得注意的是 0.2mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 和 0.5mg $\cdot$ L<sup>-1</sup> 两个浓度组的 F 值相当接近, 分别占对照组 F 值的 44% 和 38%, 可能表明随着 BaP 浓度的升高 (> 0.2mg $\cdot$ L<sup>-1</sup>), 其对 DNA 单链断裂的影响并不会进一步增强, 而是达到饱和。

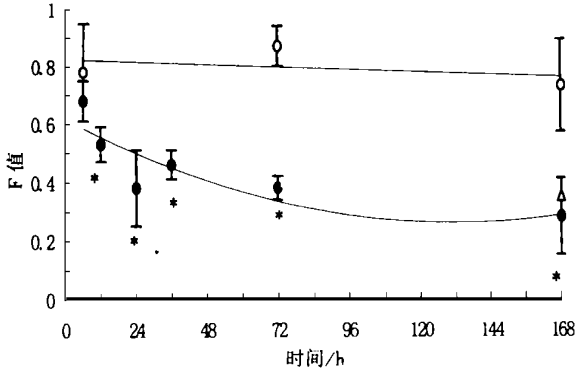


图1 BaP暴露一周时间内大弹涂鱼肝脏F值的变化

Fig. 1 The changes of F values in the liver of

*B. chinensis* expose to BaP in a week

○: 对照组; ●: 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BaP 组; △: 暴露于 0.5 mg·L<sup>-1</sup> BaP 3天再转入清洁海水中 4天测得的 F 值

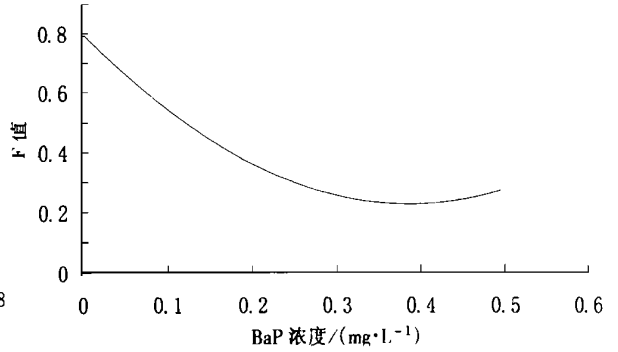


图2 BaP暴露一周时不同BaP浓度

对大弹涂鱼肝脏DNA单链断裂的影响

Fig. 2 The effects of BaP exposure in different concentration on the DNA single strand breaks in the liver of *B. chinensis* at 7 days

Daniel 等<sup>[8]</sup>曾对四种化学物(BPDE, BaP-7,8-二醇-反-9,10-环氧化物; DMS, 二甲基硫酸盐; MNU, N-甲基-N-亚硝基脲; ENU N-乙基-N-亚硝基脲)的遗传毒性进行了体外研究,他将人类淋巴瘤细胞系(CCRF-CEM)分别暴露于上述四种化学物中以研究其剂量-效应关系。暴露1h后的结果表明,这四种化学物均表现为典型的一次曲线( $y = kx + b$ )即线性剂量-效应关系,只是相对于不同的化学物,其k值有很大不同。而本实验利用回归分析方法得到的剂量-效应关系为二次曲线,不同于以上研究结果,提示我们体外研究的结果通常不能简单地外推于体内研究,因为体内实验往往受到较多不确定因素的影响,结果也因而更复杂。

### 2.3 BaP污染解除后大弹涂鱼肝脏DNA单链断裂的修复

如图1所示,大弹涂鱼暴露于0.5 mg·L<sup>-1</sup> BaP 3d后,再转入清洁海水中4d,其F值既与持续暴露于0.5 mg·L<sup>-1</sup> BaP 7d的F值相近,又与暴露3d时的F值无显著差异,表明在此浓度下,大弹涂鱼肝脏DNA单链断裂的修复能力极弱。

在鱼类中,污染物引起的DNA损伤的修复研究尚不充分。Varanasi 等<sup>[14]</sup>发现英国舌鳎(*Parophrys vetulus*) 在停止BaP暴露后60d,其肝脏中DNA加合物水平仍无显著改变,这可能表明鱼类机体内DNA修复机制尚不完善;但Shugart<sup>[4]</sup>研究暴露于低浓度BaP海水中的蓝鳃太阳鱼(*Lepomis macrochirus*),结果发现其自身具有修复DNA单链断裂的能力。这些不同的研究结果表明,鱼类机体对其DNA损伤的修复能力可能受物种、污染物种类、污染物浓度以及曝污时间等多种因素的制约,本实验中弹涂鱼肝脏DNA单链断裂未被修复,可能与实验所采用的BaP浓度较高有关。

## 3 讨论

污染物对机体的DNA损伤反映了污染物具有的遗传毒性。许多污染物,如PAHs,在机体内很容易代谢,不易在组织中累积,机体内PAHs蓄积水平的检测通常仅能反映污染物在体内代谢后所残留的部分PAHs水平;而机体因暴露于PAHs而产生的生物标记,如肝中的芳烃羟化酶,停止暴露后会很快回复到基底水平<sup>[15]</sup>。一些研究表明,鱼体内遗传物质的损伤较不易修复,其损伤水平可反映遗传毒性污染物暴露的累积效应<sup>[14]</sup>,因此以DNA损伤水平作为遗传毒性污染物的生物指标可能比其它生物指标更能反映污染物作用的本质。

包括BaP在内的许多污染物在机体代谢过程中会引起多种类型的DNA损伤,如DNA加合物、链断

裂、DNA 甲基化比例的改变、碱基的氧化、碱基的缺失等<sup>[3]</sup>。研究表明,不同类型的 DNA 损伤之间存在密切的相关性<sup>[16,17]</sup>,因而,一种类型的 DNA 损伤常常可以指示其它的 DNA 损伤的存在。这一方面是由于污染物在体内代谢过程中会产生多种中间代谢物,这些中间代谢物不仅会直接作用于 DNA 分子,许多中间代谢物还可进行氧化还原循环,产生大量活性氧,进而对遗传物质造成多种类型的损伤;另一方面,不同类型的 DNA 损伤之间还会相互转化,如中间代谢物与 DNA 形成的不稳定加合物可引起 DNA 单链断裂等。因而,在实际的污染监测中常常采用可操作性强的技术检测一种或几种 DNA 损伤作为污染物遗传毒性的研究指标。

本实验采用碱解旋技术检测了暴露于 BaP 后大弹涂鱼肝脏的 DNA 单链断裂程度,结果发现 DNA 单链断裂程度同时受到曝污时间和曝污浓度的影响,并具有一定的时间-效应和剂量-效应特征,污染解除后 DNA 单链断裂程度未明显减轻,表明在该实验条件下 DNA 损伤的修复能力较弱。以上这些结果表明 DNA 单链断裂适于作为 BaP 暴露后 DNA 损伤的检测指标,至于作为野外环境污染中水生生物遗传损伤的监测指标,则需进一步的研究。

### 参考文献:

- [ 1 ] Harvey R C. Polycyclic hydrocarbons and cancer[J]. *Am Scientist*, 1982, 70: 386- 393.
- [ 2 ] Phillips D. Fifty years of benz(a) pyrene[J]. *Nature*, 1983, 303: 468- 472.
- [ 3 ] Shugart L R, Bickham J, Jackim G, et al. DNA alterations[A]. Huggett R A, Kimerle P M, Mehrle P M Jr, et al. Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress[C]. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1992. 125- 153.
- [ 4 ] Shugart L R. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding assay[J]. *Aquatic Toxicol*, 1988, 13: 43- 52.
- [ 5 ] Rydberg B. The rate of strand separation in alkali of DNA or irradiated mammalian cells[J]. *Radiat Res*, 1975, 61: 274- 287.
- [ 6 ] Kanter P M, Schwartz H S. A hydroxyapatite hatch assay for quantitation of cellular DNA damage[J]. *Anal Biochem*, 1979, 97: 77- 84.
- [ 7 ] Ahnstrom G, Erixon K. Measurement of strand breaks by alkaline denaturation and hydroxyapatite chromatography[A]. Friedberg E C, Hanawaldt P C. DNA repair[C]. NY: Dekker. 1980. 403- 419.
- [ 8 ] Daniel F B, Haas D L, Santi L. Quantitation of chemically induced DNA strand breaks in human cells via an alkaline unwinding assay[J]. *Anal Biochem*, 1985, 144: 390- 402.
- [ 9 ] Kanter P M, Schwartz H S. A fluorescence enhancement assay for cellular DNA damage[J]. *Molec Pharmacol*, 1982, 22: 145- 151.
- [ 10 ] Shugart L R. An alkaline unwinding assay for the detection of DNA damage in aquatic organisms[J]. *Mar Environ Res*, 1988, 24: 321- 325.
- [ 11 ] McCarthy J F, Gardner H, Wolfe M J, et al. DNA alterations and enzyme activities in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) exposed to diethylnitrosamine[J]. *Neuro Biobehavioral Reviews*, 1991, 15: 99- 102.
- [ 12 ] 陈奕欣, 王重刚, 李 钦, 等. 苯并(a) 芘和芘对梭鱼肝脏 DNA 损伤的研究[J]. *海洋学报*, 2000, 22(2): 92- 96.
- [ 13 ] Stout D L, Becker F F. Fluorometric quantitation of single stranded DNA: a method applicable to the technique of alkaline elution[J]. *Anal Biochem*, 1982, 127: 302- 307.
- [ 14 ] Varanasi U, Reichert W L, Eberhart B-T, et al. Formation and persistence of benzo[a] pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of english sole (*Parophrys vetulus*)[J]. *Chem Biol Interact*, 1989, 69: 203- 216.
- [ 15 ] Collier T K, Varanasi U. Biochemical indicators of contaminant exposure in Flatfish from Puget Sound[A]. WA. In Proceedings Oceans 87 (Washington DC: IEEE). 1987, 5: 1544- 1549.
- [ 16 ] Brunborg G, Holme J A, Soderlund E J, et al. An automated alkaline elution system: DNA damage induced by 1,2-Dibromo-3-chloropropane *in Vivo* and *in Vitro*[J]. *Anal Biochem*, 1988, 174: 522- 536.
- [ 17 ] 郑微云, 翁恩琪. 环境毒理学概论[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1993. 78- 90.