

联苯胺作用下的鱼肝脏线粒体蛋白质表达差异研究

刘 辉, 周培疆

(武汉大学环境科学系, 湖北 武汉 430072)

摘 要: 用具有三致作用且广泛存在于环境中的联苯胺对鱼肝脏线粒体进行了体外染毒, 并进行了线粒体蛋白质的 SDS – PAGE 分析。结果表明, 在一定范围内 ($0 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$), 随着联苯胺剂量的增加, 线粒体蛋白质表达条带数逐渐减少, 且随染毒剂量的逐渐增大同时, 分子量较小的差异表达条带数呈现逐渐消失的趋势。这一结果对进一步研究化学致癌物对线粒体的损伤机理有重要意义。

关键词: 联苯胺; 线粒体损伤; 线粒体蛋白质; 表达差异

中图分类号: X503. 225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1672 – 2043(2004)06 – 1058 – 03

Differences of Expression for Mitochondrion Proteins in Fish Liver Under Exposure of Bianiline

LIU Hui, ZHOU Pei-jiang

(Department of Environmental Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: It has been known that mitochondrion proteins from animal cells contain genetic materials besides cell nucleolus, which means intact and functional mitochondrion plays an important role in existence of life. Bianiline, as many precursors of artificial chemicals and being regarded as a risky pollutant on environment, is entering our environment through a variety of approaches, therefore, development of a simple and effective procedure for determination of toxicological impact of the chemical is of significant essence at sub – cell level. In the present study, we tested the differences of expression for mitochondrion proteins in fish liver under exposure of bianiline with the technique of SDS – PAGE. The mitochondrion proteins in fish liver were firstly separated from the fish liver by homogenization and centrifugations in the presence of Dnase. Then the purified mitochondrion proteins were treated with different concentrations of 0, 10, 20, 30, and $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ for bianiline with an incubation period of 2 hours at $35 \text{ }^{\circ}\text{C}$. To display the distribution of expressive strips of the mitochondrion proteins, the technique of SDS – PAGE was utilized accordingly. It was found that as the increase of the concentrations of bianiline, the number of the displayed strips firstly enhanced, from 12 to 14 strips for 0 and $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$, respectively, and then decreased by 4 strips for the treatment at $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$. It has also been discovered that the low molecules of the proteins exhibited more sensitive response than the high molecules under the exposure of bianiline, suggesting that as the chemical structures containing genes for the proteins be more stable than the low molecules, therefore, they are more tolerant to xenobiotics than the low molecules. As the importance of the mitochondrion proteins, it may be concluded that the procedure developed in our lab may be a new way in evaluation of risk of chemicals on environment.

Keywords: bianiline; damage of mitochondrion; mitochondrion proteins; SDS – PAGE; differences of expression

线粒体是动物细胞中除细胞核外唯一含有遗传物质的细胞器, 有一套相对独立而完整的基因表达、复制、转录、翻译及加工装置, 与细胞核有着千丝万

缕的联系; 同时又是生命体的能量工厂, 几乎提供了生命体 98% 的能量^[1]。因此线粒体结构和功能的完整对生命体的存在具有重大意义。同时, 大量研究也表明线粒体膜蛋白中的 2% 是由线粒体 DNA 翻译转录而成, 而线粒体膜控制着线粒体内外的物质传输、信息传递及能量的交换, 线粒体蛋白质的变化对线粒体影响巨大。因此, 线粒体膜蛋白在环境污染物作用下的表达差异也在一定程度上反映了环境污染物对线粒体遗传机制的损伤情况。

收稿日期: 2004 – 03 – 04

基金项目: 国家自然科学基金(20177018)

作者简介: 刘 辉(1978—), 男, 武汉大学资源与环境科学学院硕士研究生, 主要从事污染物对生物线粒体损伤的研究。

联 系 人: 周培疆, E – mail: zhoujp@whu.edu.cn

联苯胺是一种白色或淡红色的粉状或片状晶体,广泛应用于染料及染料中间体、香料、糖精行业 and 有机化学合成的中间体等行业。随着此类化合物越来越广泛的应用于各个工业部门,尤其是染料、制药和农业杀虫剂等行业,其进入环境的途径也日益增多,带来了极大的环境危害。现有的毒理研究表明联苯胺具有急性中毒性、诱变性与致癌性,能引起一系列诸如高铁血红蛋白症、膀胱癌、老年性痴呆等病症,特别是由于能够深入线粒体,并作用于整个遗传体系进而产生病理作用,而成为目前已公认的 19 种职业致癌物之一。为此 1996 年美国职业安全与卫生局将其定为潜在致癌剂。目前对线粒体的研究主要集中于不同物种的亲缘、特异条带或者集中于毒物对细胞核损伤情况的研究^[2,3],而对于环境污染物作用下的线粒体蛋白质表达差异的研究却鲜见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

武昌鱼(学名团头鲂,取于市场鲜购);联苯胺(中国医药公司北京供应站,90%)。

1.2 方法^[4,5]

1.2.1 线粒体的分离

取新鲜的鱼肝组织 15~20 g,剪碎,加 5~8 倍体积的 Buffer A($0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖 + $30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris/HCl + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA pH8.0),冰浴匀浆。匀浆液过滤分离,取液相 $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,取上清液 $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,沉淀即为粗质线粒体。沉淀以每克肝组织加 0.40 mL Buffer B($30 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris/HCl + $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA + 1.5% NaAc pH7.5)混合,再加入 DNase I 至浓度大于 $0.10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 25°C 反应 30 min,冰浴冷却。加入 2 倍体积的 DNase I 反应终止液,在 $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 30 min,沉淀即为纯净的线粒体。

1.2.2 线粒体的染毒处理

采用梯度染毒法对线粒体进行染毒处理,染毒时间为 2 h,温度为 35°C 。

1.2.3 线粒体蛋白质的提取

以每 5 g 肝组织获得的纯线粒体加入 1 mL 的含 10% TCA 和 0.7% β -巯基乙醇的冷(-20°C)丙酮溶液为基准加入。搅拌后置于 -20°C 过夜。次日在 $15000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 、 4°C 下离心 10 min,弃上清液。沉淀再用含 0.7% β -巯基乙醇的冷(-20°C)丙酮溶液清洗 1~2 次,再次离心沉淀。干燥成粉备用。

1.2.4 线粒体蛋白质的 SDS-PAGE 分析

电泳时按每 1 mg 加样加 20 μL 缓冲液 (50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl、2% SDS、0.1% 溴酚蓝、10% 甘油、100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇),经 100°C 变性处理 5 min, $10000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 10 min,上清液即可用于 SDS-PAGE 电泳。蛋白质经过电泳分离后,用考马斯亮蓝 R₂₅₀ 染色,摄影。

2 结果与分析

在本实验中我们采用不同浓度的联苯胺对鱼线粒体进行体外染毒,如图 1 所示。依次采用的浓度梯度为 0、10、20、30、50 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

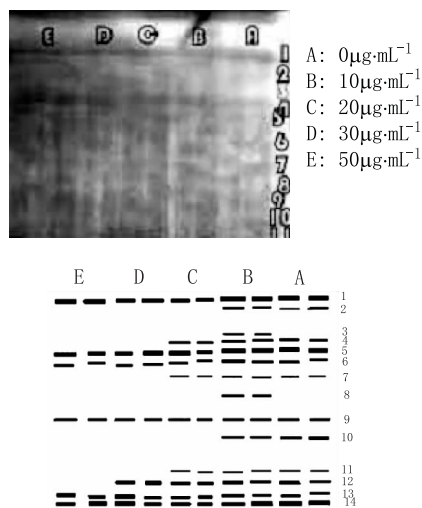


图 1 鱼肝脏线粒体蛋白质的 SDS-PAGE 图

Figure 1 Diagram of mitochondrion proteins in fish liver after treatment with SDS-PAGE

由图 1 可以看出,武昌鱼肝脏线粒体在联苯胺的作用下,线粒体蛋白质的表达条带数随着联苯胺剂量的增加呈现先增加后减少的趋势。在未受到污染的情况下(图中 A),蛋白质的表达条带数为 12 条带,当剂量为 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时,蛋白质的表达条带数为 14 条,增加的条带是较低分子量的蛋白质(如图中条带 3 和 8)。随着联苯胺作用浓度的进一步加大,蛋白质的差异表达条带数逐渐减少,且减少的蛋白质条带呈现由低分子量条带到高分子量条带逐渐减少的趋势。图中我们可以清楚的看到,从 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白质的表达条带数减少了 4 条,且减少的条带为 2, 3, 8, 10 号条带,而这些条带都属于低分子量的条带,特别是 2、3 号条带,同样的从 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白质条带数减少了 3 条,而从 $30 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 到 $50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$,则只减少了 1 条。

综上所述,鱼肝脏线粒体蛋白质的表达条带数随着联苯胺剂量的增加呈现先增加后减少的过程,这可能是在低剂量污染物毒性作用下,线粒体活性增强,导致在这一剂量下的蛋白质表达条带数增多,相反的随着联苯胺剂量的增加,线粒体的活性受到了抑制,蛋白质表达条带数相应减少。同时,由于联苯胺的作用,线粒体蛋白质的表达条带数变化表现为低分子量的条带数变动明显,而高分子量条带数减少缓慢,这是由于高分子量的蛋白质所对应的基因结构相对稳定,外源污染物对线粒体遗传基因组的破坏作用也相对较弱,而低分子量的蛋白质所对应的基因结构的稳定性不如高分子量的蛋白质所对应的基因结构的稳定性,因此容易与外源污染物发生作用,从而造成线粒体蛋白质在表达差异上的不同。

3 讨论

线粒体是细胞内死亡途径的重要感受者和放大器,外源污染物通过对线粒体 DNA 的作用,引发线粒体 DNA 序列的缺失与突变,进而改变线粒体 DNA 的遗传体系,促使线粒体 DNA 在翻译转录线粒体蛋白质时,造成线粒体蛋白质结构的缺失和变异,从而造成线粒体结构与功能的紊乱,最终导致整个细胞体系的程序性凋亡^[6]。

在本实验中,我们采用具有三致作用且广泛存在于环境中的联苯胺对线粒体进行体外染毒,并进行线粒体蛋白质的 SDS - PAGE 分析。结果表明,在一定范

围内 ($0 \sim 50 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$),随着联苯胺剂量的增加,线粒体蛋白质的表达条带数逐渐减少,且呈现染毒剂量逐渐增大时,表达条带数随着差异条带分子量的逐渐增大而逐渐消失的结论。由于致变过程中的线粒体蛋白质主要来源于 mtDNA 翻译转录,因此我们可以认为线粒体蛋白质的表达差异在一定程度上反映了 mtDNA 在外源污染物作用下所引发的遗传变异。这可能是由于联苯胺的分子量小,又有着与碱基对 A、T、G、C 相类似的结构,因此可以进入线粒体膜内,并同时进入线粒体遗传系统,进而对线粒体 DNA 结构产生一定程度破坏,致使线粒体蛋白质产生表达差异。

参考文献:

- [1] 赵云罡,徐建兴. 线粒体、活性氧和细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(2): 168 - 171.
- [2] Bardakei F, Skibinski D O. Application of the RAPD technique in tailspin fish species and subspecies identification[J]. *lieredity*, 1994, 73(2): 117 - 123.
- [3] Kimberling D N, Ferreira A R, Shuster S M, et al. RAPD marker estimation of genetic attraction among isolated northern leopard frog population in the southwestern USA[J]. *Mol Ecol*, 1996, 5(4): 521 - 529.
- [4] 傅俊江, 李麓芸, 等. 一种提高 RAPD 技术扩增效率的有效方法[J]. 遗传, 2000, 22(4): 251 - 252.
- [5] 张 辉, 吴清江. 一种改进的鱼类线粒体 DNA 的快速制备方法[J]. 水生生物学报, 1997, 21(3): 31 - 34.
- [6] 苏 循, 陈国强, 等. 线粒体跨膜电位与细胞凋亡[J]. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(1): 3 - 5.