

蚯蚓分子生物标志物在土壤氯代苯胺类污染评价中的应用研究

王晓尉¹, 张 波²

(1.首都师范大学生命科学学院, 北京 100048; 2.北京联合大学应用文理学院, 北京 100191)

摘 要:采用紫外分光光度法测定 DNA 加合物的形成及 Western-Blot 技术检测蚯蚓热休克蛋白 70(HSP70)的表达,研究了蚯蚓 DNA 加合物和 HSP70 作为分子生物标志物在土壤氯代苯胺化合物污染评价中的应用。DNA 加合实验的结果表明,随着 3,4-二氯苯胺浓度的增加(0.77、1.55、3.10 mg·mL⁻¹),特征吸收峰的位移发生显著改变,交联率呈现负相关;Western-Blot 检测结果表明,3,4-二氯苯胺处理后蚯蚓 HSP70 表达增加,与空白组比较有显著性差异。

关键词:DNA 加合;DNA 交联率;Western-Blot;3,4-二氯苯胺;蚯蚓

中图分类号:X825 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2010)08-1490-05

Applied Study of Earthworm Molecular Biomarkers in Risk Assessment of Soil Chloroaniline Contamination

WANG Xiao-wei¹, ZHANG Bo²

(1.College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100048, China; 2.College of Applied Sciences and Humanities, Beijing Union University, Beijing 100191, China)

Abstract: To study the effects of 3,4-dichloroaniline on earthworm DNA adducts and heat shock protein (HSP) 70, which were used as biomarkers in risk assessment of soil chloroaniline contamination. DNA adducts was detected with UV spectrophotometry and HSP70 was measured with Western-Blot methods. The results of DNA adduct and rate of cross-linking showed that characteristic absorption peak significantly shifts and rate of cross-linking presents a negative correlation with 3,4-dichloro-aniline concentration increased (0.77, 1.55, 3.10 mg·mL⁻¹). The results of Western-Blot test showed that earthworms treated with 3,4-dichloroaniline had a high expression of HSP70 comparing with the control group.

Keywords: DNA adduct; DNA rate of cross-linking; Western-Blot; 3,4-dichloroaniline; earthworm

3,4-二氯苯胺 (3,4-Dichloroanilines, 3,4-DCA) 是一种应用广泛的化学合成中间体,用于合成多种农药如敌稗、敌草隆、利谷隆等除草剂,3,4-DCA 也是一些杀虫剂在土壤中的主要降解产物,3,4-二氯苯胺还用于染料工业上合成染料以及医药上合成杀菌剂。由于该类中间产物在土壤环境中相对较稳定,难以生物降解且毒性较大,其生态毒性已引起许多环境科学家的广泛关注^[1-4]。

近年来,细胞或分子水平上的生物标志物作为污

染物暴露和毒性效应的早期预警指标受到广泛关注,已成为国内外生态毒理研究的热点之一。由于其具有特异性、预警性和广泛性等特点,在水和土壤环境生态风险评价中的应用日益广泛^[5-6]。本文以 3,4-二氯苯胺为研究对象,通过利用紫外分光光度法检测 3,4-二氯苯胺与 DNA 形成加合物的情况以及利用 Western Blot 技术检测蚯蚓中热休克蛋白 70 的表达,来探讨和建立快速灵敏评价土壤中 3,4-二氯苯胺潜在毒性的方法,即利用 DNA 加合物以及热休克蛋白 70 作为分子生物标志物用于 3,4-二氯苯胺的土壤污染生态风险评价。

诱发突变的分子生物学基础是 DNA 的序列改变。DNA 水溶液有其特定的吸收光谱,任何化合物嵌入 DNA 或与 DNA 分子形成加合物,都会引起 DNA

收稿日期:2010-03-08

基金项目:北京自然科学基金(6083021)

作者简介:王晓尉(1985—),男,北京人,硕士研究生,主要从事环境毒理学研究。E-mail:foxeer984313@sina.com

通讯作者:张 波 E-mail:zhangbo@ygi.edu.cn

构象的改变,从而导致吸收光谱的改变。吸收光谱移动法能准确迅速地反映大分子物质在水溶液中的构象变化,因此可以用来研究化学物质与大分子物质的结合反应。Western-Blot 技术是分子生物学、生物化学和免疫遗传学中常用的一种实验方法,通过分析着色位置和着色深度获得特定蛋白质在所分析细胞或组织中表达情况的信息^[7-12]。

应激蛋白又称为热休克蛋白,是一切生物细胞在受热、病原体、理化因素等应激原刺激后,发生热休克反应时所产生的一类在生物进化中最保守并由热休克基因所编码的伴随细胞蛋白。应激蛋白是环境压力促使特定基因表达的产物,包括 HSP(热休克蛋白)家族及相关蛋白,是细胞保护机制的重要部分。其中, HSP70 家族是序列最保守并且对污染物的应激反应最为显著的一类应激蛋白,近年来被广泛地应用于指示污染物胁迫的早期预警指标^[13-14]。

1 材料与方法

1.1 仪器与主要试剂

UV-760CRT 双光束紫外可见分光光度计;低温冷冻离心机(Eppendorf);MPF-4 荧光分光光度计(日立);垂直电泳仪及电泳槽(Bio-Rad);半干式转膜仪、PVDF 膜(Bio-Rad)。一抗:鼠源抗 HSP70;二抗:HRP 标记,羊抗鼠(Santa Cruz);发光试剂盒(Therom),蛋白酶抑制剂,预染蛋白 Marker,3,4-二氯苯胺,牛胸腺 DNA(Sigma Chemical Co.);丙烯酰胺,亚甲基双丙烯酰胺,十二烷基磺酸钠(SDS),甘氨酸(北京化学试剂公司产品)。

1.2 试验方法

参考 Shaham 等的方法进行^[1]:准备 4 支 10 mL 的离心管,牛胸腺 DNA 用超纯水溶解后,分别向每管中加入 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}$ DNA 3 mL。由于 3,4-二氯苯胺不易溶于水,需要先用二甲基亚砜(DMSO)溶解,再分别加入各管中。DMSO 与 DNA 溶液的混合液作为空白组,空白组和各剂量组所加的 DMSO 体积相同。将体积稀释到 5 mL,最终使 3,4-二氯苯胺浓度分别为 0、0.77、1.55、3.10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。将 4 支离心管放入 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴锅中孵育 30 min 后取出,加入适量的 NaCl 使其 DNA 的溶解度达到最低,再加入大于体系一倍体积的无水乙醇,使 DNA 完全沉淀下来。用离心机(3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$)离心 5 min,弃上清液。用无水乙醇洗涤沉淀,再用离心机 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 5 min,重复洗 4 次。将洗好的 DNA 在室温下放置,待乙醇挥发干净后,放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中保存,后续分析使用。将挥发完乙醇的 DNA

重新用超纯水溶解,在紫外分光光度计中测吸收光谱,用超纯水校准调零。

交联度反应是指溴乙锭与双链 DNA 结合可产生荧光,而变性后的单链 DNA 则无此现象。由于 DNA 在 3,4-二氯苯胺的作用下发生交联,DNA 复性后其强荧光强度增强,利用此原理可测定 DNA 的交联率 C ,其公式如下:

$$C=(f_i-f_n)/(1-f_n)\times 100\%$$

式中: f_i 为经受试物处理的相对荧光强度($f_i=EM_{i2}/EM_{i1}$); f_n 为未经受试物处理的相对荧光强度($f_n=EM_{n2}/EM_{n1}$); EM_{i1} 为经受试物处理的加热前荧光强度; EM_{i2} 为经受试物处理的加热后荧光强度; EM_{n1} 为未经受试物处理的加热前荧光强度; EM_{n2} 为未经受试物处理的加热后荧光强度。

样品处理与 DNA 加合反应相同,首先准备 4 支 10 mL 离心管,将用不同浓度 3,4-二氯苯胺处理好的 DNA 样品溶解后按空白、0.77、1.55、3.10 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 分别放入 4 支离心管中。向每只离心管加入 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 DNA 溶液 10 μL ,向每管中加入 2 mL 溴乙锭溶液(浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),测其荧光强度。将反应样品放入 100 $^{\circ}\text{C}$ 沸水浴中加热 8 min,在室温下冷却 10 min 后,再测其荧光强度。之后按上面的公式进行计算。

1.2.1 蚯蚓暴露实验

暴露实验所用土壤取自蚯蚓养殖场,符合国标 GB15618 一级土壤标准,其各种参数如表 1。实验采用国际标准赤子爱胜蚓。

表 1 实验土壤污染物检测结果

测试项目	检测值(干重)
有机质	3.95%
As	13.90 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Cd	0.4 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Cr	28.7 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Cu	36.32 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Hg	ND
Ni	18.83 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Pb	20.63 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$
Zn	82.51 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$

土壤配置如下:将 16 mg 3,4-DCA 溶解于丙酮之中,取 200 g 土壤,并与其混合,在通风橱中让丙酮充分挥发 24 h 后,加入适量的蒸馏水并混匀。空白组用相同体积的丙酮混合。铜离子作为阳性对照,将 50 mg 无水 CuSO_4 溶于蒸馏水,与 200 g 土壤混合。最

终,铜离子暴露浓度为 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$,3,4-二氯苯胺浓度为 $85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (两个浓度都为干重浓度)。将空白、铜离子暴露和3,4-二氯苯胺暴露用的土壤分别放于1 000 mL的烧杯中,每个烧杯放入6条体重在0.3~0.5 g清肠后的成年蚯蚓。放于人工气候培养箱中染毒7 d(温度 27°C ,湿度 75%),每日换1次土壤。

1.2.2 Western-Blot 实验

参考 Denis Nadeau 等的方法进行^[15]。将暴露在空白、 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 铜离子和 $85 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 3,4-二氯苯胺的蚯蚓取出并用蒸馏水洗净。用剪刀剪成小段,放入匀浆器中,加入含有 $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 蛋白酶抑制剂和 $2.97 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF 的 MHBSS(参考 Diogene 等,1997)缓冲液,充分匀浆,倒入灭菌的离心管中, 4°C 下 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,吸取上清液,用考马斯亮蓝法测其每个离心管中的蛋白含量。取出一部分用于实验,多余可冻干,用于重复实验。

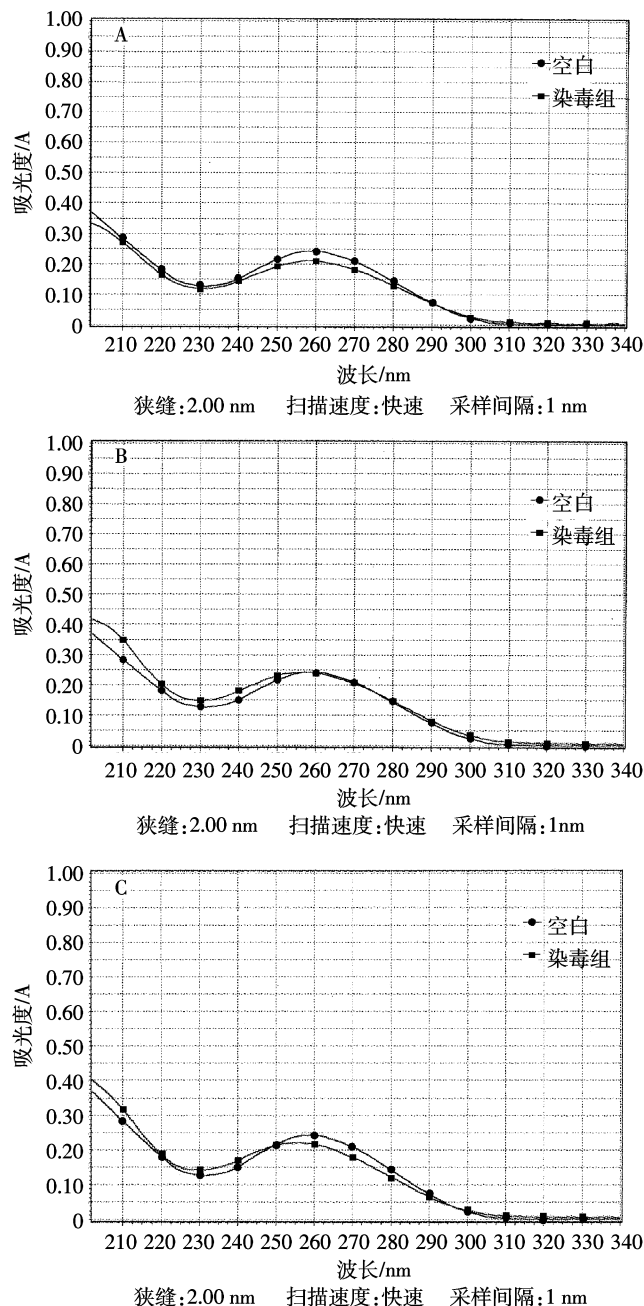
在 SDS-PAGE 电泳中,蛋白样品与 $2\times$ 稀释加样缓冲液混合后,每孔加 $30\sim 40 \mu\text{g}$ 蛋白样品为宜。浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 10%。热休克蛋白 70 分子量为 70 kD 左右,蛋白分子量标记蛋白选择适当范围即可,最好为预染蛋白分子量标记蛋白,转膜后可以看出转膜效果。开始电压为 150 V 电泳 15 min,最后 200 V 电泳 90 min。膜选用 PVDF 膜,孔径为 $0.2 \mu\text{m}$,使用前用甲醇泡 3~5 min。转膜时恒流,电流为 $1.5 \text{ mA} \cdot \text{cm}^{-2}$,持续 90 min。转完后看膜上的预染蛋白分子量标记蛋白是否清晰,如果清晰说明转膜效果很好,也可把转膜后所用的胶染色以及把膜用丽春红染色,看转移效果。转膜后,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min,放入含有 5%脱脂奶粉的 TBS (不含吐温的 TBST), 4°C 下过夜封闭。封闭后,用 TBST 洗 3 次,每次 5 min。加抗体免疫时,只需让抗体溶液稍稍没过膜即可。放在摇床上缓慢摇动,一抗室温下免疫 1 h,抗体用含有 5%脱脂奶粉的 TBST 稀释,比例为 1/500。免疫反应完全后,洗膜 3 次,二抗室温下免疫 1 h,用含有 0.1%牛血清白蛋白的 TBST 稀释,比例为 1/10 000。完成后再洗膜 3 次,加入配好的显色试剂,在 X 射线下显影。

2 结果与分析

2.1 不同浓度 3,4-二氯苯胺对 DNA 加合作用的影响

牛胸腺 DNA 的特征吸收峰在 203 nm 和 256 nm 左右。DNA 加合实验结果表明, $0.77 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下,258 nm 的特征吸收峰无明显位移,而在 1.55、3.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 浓度下,258 nm 的特征吸收峰有明显位移,

说明随着 3,4-二氯苯胺浓度的增加,DNA 的 258 nm 特征吸收峰有明显的位移改变,如图 1 所示。此结果说明 3,4-二氯苯胺对于 DNA 加合作用有显著影响,



注:A:3,4-二氯苯胺浓度 $0.77 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; B:3,4-二氯苯胺浓度 $1.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; C:3,4-二氯苯胺浓度 $3.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。

Note: A: the concentration of 3,4-dichloroaniline is $0.77 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; B: the concentration of 3,4-dichloroaniline is $1.55 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$; C: the concentration of 3,4-dichloroaniline is $3.10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$.

图1 不同3,4-二氯苯胺浓度(0.77、1.55、3.10 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$)对DNA加合作用的影响

Figure 1 the effect of 3,4-dichloroaniline on DNA adduct

随着浓度的加大,特征吸收峰有明显位移。图 2 和表 2 结果表明,随着 3,4-二氯苯胺浓度增加,DNA 的交联率显著降低,3,4-二氯苯胺浓度与 DNA 的交联率呈负相关。

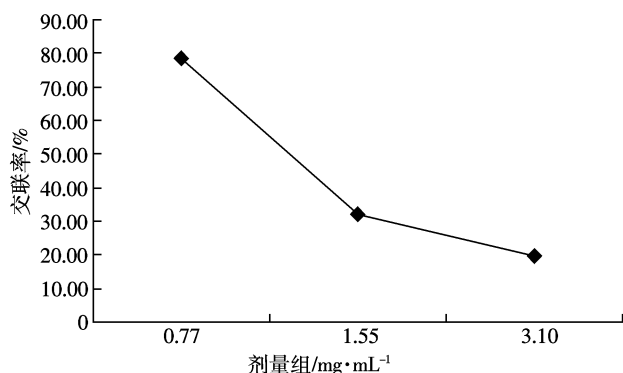


图 2 不同 3,4-二氯苯胺浓度(0.77、1.55、3.10 mg·mL⁻¹)对 DNA 交联率的影响

Figure 2 The effect of 3,4 - dichloroaniline on DNA rate of cross-linking

表 2 DNA 交联率结果

Table 2 The results of DNA rate of cross-linking

项目	空白	0.77 mg·mL ⁻¹	1.55 mg·mL ⁻¹	3.10 mg·mL ⁻¹
EM ₁	12	3.2	5.1	8.9
EM ₂	6.8	2.9	3.6	5.8
f _n	0.567	—	—	—
f _i	—	0.906	0.706	0.652
C%	—	78.29%	32.10%	19.63%

2.2 3,4-二氯苯胺对 HSP70 表达的影响

参考 Denis 方法,本实验以 100 mg·kg⁻¹ Cu²⁺作为阳性对照组,Western-Blot 检测结果表明,85 mg·kg⁻¹ 3,4-二氯苯胺与 Cu²⁺对蚯蚓热休克蛋白 70 表达均有显著影响,均能引起蚯蚓过量表达 HSP70,结果见图 3。通过 Western-Blot 实验检测热休克蛋白 70 可以得出结论:和 Cu²⁺一样,3,4-二氯苯胺可以通过环境进入到蚯蚓体内,并对蚯蚓的热休克蛋白 70 基因表达产生影响。在 Western-Blot 实验中,空白与 3,4-二氯苯胺染毒组有明显不同,我们推测,热休克蛋白 70 的表达很可能与 3,4-二氯苯胺浓度存在剂量效应关系。这将是我们的实验室后续的工作。

3 讨论

目前国内外评估 3,4-二氯苯胺遗传毒性的方法较少,本文采用紫外分光光度法测定 DNA 加合物的形成及 Western-Blot 技术检测蚯蚓热休克蛋白 70

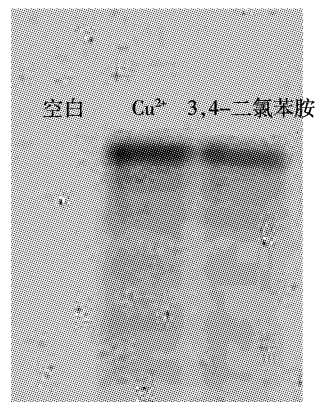


图 3 Western-Blot 检测 3,4-二氯苯胺对 HSP70 表达的影响

Figure 3 The effect of 3,4 - dichloroaniline on expression of HSP70

(HSP70)的表达,研究蚯蚓 DNA 加合物和 HSP70 作为分子生物标志物在氯代苯胺化合物污染评价中的应用。蚯蚓作为土壤中的大型无脊椎动物,已在国内被大量用于土壤污染检测实验中。蚯蚓属环节动物门寡毛纲,是土壤中生物量最大的无脊椎动物。其在地球物质循环和陆地生态系统食物链物质传递中担负着重要作用,是最易受到环境有毒有害物质伤害的土壤生物之一,因而也是开展土壤污染生态风险评估的重要指示生物。

用紫外分光光度法测 DNA 加合作用是一种简便易行的试验方法,可以迅速的检测出有潜在遗传毒性的物质。本实验中,3,4-二氯苯胺可能与 DNA 发生了某种化学反应,引起 DNA 的紫外吸收值发生了明显变化。DNA 这种吸收峰的变化可能有两种情况:一种是 3,4-二氯苯胺分子与 DNA 的侧链基团发生化学结合,3,4-二氯苯胺分子本身有苯环,自身也有吸收紫外的能力,因此改变了 DNA 吸收光谱;另一种是 3,4-二氯苯胺分子与 DNA 发生反应引起单链断裂,碱基暴露使得吸收峰发生改变。我们认为这两种机制都可能存在。DNA 交联率实验证明了 3,4-二氯苯胺对 DNA 有加合作用,DNA 之所以发生交联,是因为 DNA 的碱基发生了修饰,并且其交联率与 3,4-二氯苯胺的浓度呈现负线性关系。我们推测,在低浓度下,DNA 交联占优势,而高浓度下,DNA 断裂占优势。从吴凯等^[16]用甲醛致小鼠肺 DNA 蛋白质交联与 DNA 断裂效应的研究中可知,断裂的 DNA 是不会引起交联的。因此,交联率与 3,4-二氯苯胺浓度呈现负线性关系。我们认为,用紫外分光光度法测定 DNA 加合作用并用于检测 3,4-二氯苯胺的遗传毒性是比较可靠的,对于土壤潜在污染的初步评估会起到一定的

作用。

Nadeau 等^[13]研究了蚯蚓分别暴露在含有氯乙酰胺、五氯酚和重金属(Pb、Cd、Cu 和 Hg)的土壤中,在污染胁迫下,蚯蚓肠组织中相应诱发出热休克蛋白 70,该指标总体上重复性好,属于敏感的生物标志物。本实验以 Cu^{2+} 为阳性对照,研究了赤子爱胜蚓在土壤中 3,4-二氯苯胺的污染胁迫下,诱发热休克蛋白 70 的效应。研究发现,3,4-二氯苯胺和 Cu^{2+} 一样,可以引起蚯蚓热休克蛋白 70 的过量表达,热休克蛋白 70 是土壤中 3,4-二氯苯胺污染敏感的生物标志物。但是,土壤无脊椎动物生物标志物在污染生态评价及应用方面,比水生生物的生物标志物的研究起步晚,也不如植物性生物标志物应用广泛,加之胁迫蛋白热休克蛋白 70 等易受各种环境因素的影响,故在实验过程和样品制备方面需要进一步的优化实验条件,以保证数据的可靠性。总之,这类生物标志物由于具有对某些特定污染物的敏感性、剂量-反应关系的准确性以及对复合污染评价的综合性,通过进一步地完善评价方案,将具有良好的应用前景。

参考文献:

- [1] Crossland N O. A review of the fate and toxicity of 3, 4-dichloroaniline in aquatic environments[J]. *Chemosphere*, 1990, 21(12):1489-1497.
- [2] Giacomazzi S, Cochet N. Environmental impact of diuron transformation: A review[J]. *Chemosphere*, 2004, 56(11):1021-1032.
- [3] Macro G J. Natural product interaction during online metabolism including their incorporation in biopolymers[J]. *Agric Food Chem*, 1991, 39: 2101-2111.
- [4] Smith A E, Briggs G G. The fate of the herbicide chlortoluron and its possible products in soil[J]. *Degradation Chemosphere*, 1988, 18:1-7.
- [5] Kille P, Sturzenbaum S R, Galay M. Molecular diagnosis of pollution impact in earthworms: Toward integrated biomonitoring [J]. *Pedobiologia*, 1999, 43(6):602-607.
- [6] Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment a review[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13:57-149.
- [7] 谭明家, 许建宁, 等. 体外甲基丙烯酸环氧丙酯-DNA 加合物的研究[J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2000, 18:19-21.
- [8] Tan Ming-jia, Xu Jian-ning, et al. Studies oil glycklal methacrylate-DNA adducts in vitro[J]. *Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases*, 2000, 18(1):19-21.
- [8] 杨丹凤, 裘著革, 张华山, 等. 用紫外光谱法检测三种醛类化合物与 DNA 的结合[J]. *环境与健康杂志*, 1999, 16(4):189-190.
- [8] Yang Dan-feng, Xi Zhu-ge, Zhang Hua-shan et al. Detection of binding of three aldehyde compounds with DNA using ultraviolet spectrophotometry[J]. *Journal of Environment and Health*, 1999, 16(4):189-190.
- [9] 张云英, 沈孝英, 等. 用吸收光谱法检测三种烷化剂与 DNA 的结合[J]. *劳动医学*, 1997, 14(4):195-198.
- [9] Zhang Yun-ying, Shen Xiao-ying, et al. Detection of binding of three alkylants with DNA using absorption UV spectrophotometry[J]. *Journal of Labour Medicine*, 1997, 14(4):195-198.
- [10] Edward L Loechler. The role of adducts site-specific mutagenesis in understanding how carcinogen-DNA adducts cause mutations perspective, prospects and problems[J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17:895-902.
- [11] Shaham J, Bomstein Y, Melzer A, et al. DNA-protein crosslinks, a biomarker of exposure to formaldehyde in vitro and in vivo studies[J]. *Carcinogenesis*, 1996, 17(1):121-125.
- [12] Macro G J. Natural product interaction during online metabolism including their incorporation in biopolymers[J]. *Agric Food Chem*, 1991, 39:2101-2111.
- [13] Nadeau D, Corneau S, Plante I, et al. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris* [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2001, 6(2):153-163.
- [14] Migliarini B, Campisi A M, Maradonna F, et al. Effects of cadmium exposure on testis apoptosis in the marine teleost *Gobius niger*[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2005, 142(1-2):241-247.
- [15] Denis N, Sophie C, Isabelle P, et al. Evaluation for Hsp70 as a biomarker of effect of pollutants on the earthworm *Lumbricus terrestris*[J]. *Cell Stress & Chaperones*, 2001, 6(2), 153-163.
- [16] 吴凯, 杨光涛, 娄小华, 等. 甲醛致小鼠肺 DNA 蛋白质交联和 DNA 断裂效应的研究[J]. *公共卫生与预防医学*, 2006, 17(2):15-19.
- [16] Wu Kai, Yang Guang-tao, Lou Xiao-hua, et al. DNA-protein crosslinks and DNA damages of mice lung induced by formaldehyde[J]. *Journal of Public Health and Preventive Medicine*, 2006, 17(2):15-19.