

多溴联苯醚对鲫鱼组织 DNA 损伤及 p53 蛋白表达的影响

吴 伟^{1,2}, 瞿建宏¹, 陈家长^{1,2}, 聂凤琴²

(1.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2.南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘 要:以鲫鱼(*Carassius auratus*)为试验材料,研究了经不同浓度的 2,2',4,4'-四溴联苯醚(PBDE-47)和十溴联苯醚(PBDE-209)暴露后,鲫鱼体内 DNA 损伤产物 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)的含量及 p53 蛋白的水平。结果表明,采用浓度为 0.10~5.00 mg·L⁻¹ 的 PBDE-47 和 10.0~50.0 mg·L⁻¹ 的 PBDE-209 处理鲫鱼 20 d,除了 0.10 mg·L⁻¹ PBDE-47 和 10.0 mg·L⁻¹ PBDE-209 浓度组的 8-OHdG 和 p53 蛋白含量与对照组相比无显著差异($P>0.05$),其余各浓度组的 8-OHdG 和 p53 蛋白含量均随 PBDE-47 和 PBDE-209 浓度增加而逐渐上升,呈显著的相关关系($P<0.01$),且 8-OHdG 和 p53 蛋白之间也呈显著的正相关。说明 PBDE-47 和 PBDE-209 对鲫鱼组织的 DNA 产生了损伤,具有遗传毒性影响。

关键词:多溴联苯醚;鲫鱼;DNA;损伤;p53 蛋白

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2011)09-1836-06

Effects of Polybrominated Diphenyl Ethers on DNA Damage and p53 Protein Expression in *Carassius auratus* Linn.

WU Wei^{1,2}, QU Jian-hong¹, CHEN Jia-zhang^{1,2}, NIE Feng-qin²

(1.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Inland Fishery Eco-environment and Resource, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2.Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: Persistent organic pollutants (POPs) has a long-term threat to different biota, including aquatic animals, mammals, especially humans, due to their biomagnified effect in food chain, the study on the toxic effect of POPs to aquatic animals was evidently important and concerned. This paper discussed the variation of DNA-damage product 8-Hydroxy-desoxyguanosine (8-OHdG) and p53 protein to *Carassius auratus* in exposed to poly-brominated diphenyl ethers (PBDE-47 and PBDE-209), where the exposed dose of PBDE-47 and PBDE-209 ranged from 0.10 to 5.00 mg·L⁻¹ and 10.0 to 50.0 mg·L⁻¹, respectively. The results showed that, DNA-damage product 8-OHdG and p53 protein were generated extraordinary in all treatment lasted for 20 days, expect the 0.1 mg·L⁻¹ in PBDE-47 and 10.0 mg·L⁻¹ in PBDE-209. The variation of 8-OHdG and p53 protein to *Carassius auratus* when exposed to PBDE-47 and PBDE-209 were significantly dose-depend ($P<0.01$), respectively, and the variation of 8-OHdG was significantly correlated with the variation of p53 protein as well. The results indicated that, the genotoxic effect, characterized by DNA-damage product, such as 8-OHdG and p53 protein in *Carassius auratus* when exposed to PBDE-47 and PBDE-209 were produced. The paper provided more scientific details to the research on the toxic effect, especially genotoxic effect of POPs to aquatic animals, with a result to recognize, control and eliminate POPs in different environmental medium.

Keywords: polybrominated diphenyl ethers; *Carassius auratus*; DNA; damage; p53 protein

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)属于溴系阻燃剂的一种,应用广泛^[1],具有一定的挥发性,可随大气长距离迁移,且亲脂性强、化学性

质稳定、可随食物链生物富集和放大,是一种持久性有机污染物^[2]。自 1981 年首次在瑞典的梭鱼、鳎鲷中检出后, PBDEs 已被发现在多种环境介质、人体和生物材料中广泛存在,且含量呈逐年增加的趋势^[3]。PBDEs 已被认为是普遍存在的环境污染物,对其环境问题的研究成为当前环境科学的一大热点。迄今的研究结果发现, PBDEs 对生物体的神经系统、甲状腺、肝和肾的影响较为明显^[4-5]。在 PBDEs 中, 2,2',4,4'-四溴联苯醚(PBDE-47)是分布最广、生物材料中含量最

收稿日期:2011-02-24

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007JBF02);中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室开放课题(YM2007-10)

作者简介:吴 伟(1967—),男,研究员,主要从事污染生态学及环境毒理学的研究。E-mail:wuw@ffrc.cn; wuwzh@263.net

高、对生物和人体毒性最强的多溴联苯醚同系物之一^[6],而十溴联苯醚(PBDE-209)是中国国内产量最大的含溴阻燃剂。目前国内外学术界对不同分子量的多溴联苯醚的毒性研究主要集中在哺乳动物上^[2,4],且存在争议^[7-10];对鱼类的影响仅局限在组织残留方面^[3],对水生动物组织DNA损伤的影响及由此而引发的p53蛋白的表达尚未见报导,因此有必要进行这方面的研究。

化学毒物导致的细胞氧化应激是机体损伤的重要机制之一,过去多注重于脂质过氧化,近年来DNA和蛋白质的氧化损伤引起极大关注^[11]。由于DNA在细胞复制过程中起着重要的信息传递作用,其氧化损伤可导致衰老、肿瘤及相关疾病。DNA氧化损伤的生物标志物通常为DNA加合物,在已发现的20多种DNA氧化损伤加合物中,8-羟基脱氧鸟苷(即8-hydroxy-2-deoxyguanosine,8-OHdG)最受关注,它是DNA中的脱氧鸟苷经羟自由基($\cdot\text{OH}$)进攻其C-8位形成的,其在机体内生成量相对较高,存在普遍且稳定,不受食物影响,能用灵敏度较高的分析方法检测,因此是当今DNA氧化损伤研究中的热点^[12]。而p53蛋白在维持细胞正常生长、抑制恶性增殖中起着重要的作用。p53基因时刻监控着基因的完整性,如果检测到DNA受损,p53就激活其转录水平的细胞周期阻滞,停止细胞分裂,直到DNA得到修复^[13],或者调控细胞走向死亡。当p53不能执行此功能时,往往就导致细胞发生癌变。当DNA受到损伤时可反馈性地激发p53基因的表达,引起细胞内野生型p53蛋白的表达增加^[14]。本文以8-OHdG和p53蛋白作为生物标志物,研究不同分子量的多溴联苯醚对鲫鱼DNA的损伤作用,为进一步探讨多溴联苯醚的分子毒理机制提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鲫鱼(*Carassius auratus* Linn.)由中国水产科学研究院淡水渔业研究中心试验场提供,平均体长为 (15.32 ± 0.63) cm,平均体重为 (310.60 ± 5.69) g。试验前经筛选并在水族箱中驯养10d以上,自然死亡率低于5%,驯养期间每日定时投自制的颗粒饵料。试验用水为曝气3d后除氯的自来水,pH值为7.05~7.20,总硬度为8.10~8.15(德国度),水质溶氧量保持在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。水中含Zn $0.02 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,Fe $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,Pb、Cu和Cd未检出。水质COD含量为2.20~2.54

$\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$,水温为 $(22 \pm 1)^\circ\text{C}$ 。试验前1d开始禁食,选择活动性强的健康鲫鱼作为试验用鱼。

1.2 仪器与试剂

2,2',4,4'-四溴联苯醚(PBDE-47,分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_6\text{Br}_4\text{O}$)和十溴联苯醚(PBDE-209,分子式为 $\text{C}_{12}\text{Br}_{10}\text{O}$),SIGMA-ALDRICH公司产品;8-OHdG ELISA试剂盒和p53蛋白ELISA试剂盒,美国Adlitteram Diagnostic Laboratories Inc.产品;二甲亚砜(DMSO)、丙三醇等其他试剂为分析纯,上海化学试剂厂产品。

所用仪器为BioTek Elx808酶标仪,BioTek Elx50洗板机,SANYO MIR153培养箱,SIGMA 2-16 K低温冷冻离心机,721分光光度计,HH.W21.Cu600电热恒温水温箱,80-2离心沉淀器,玻璃组织匀浆器,水族箱等。

1.3 试验设计

1.3.1 PBDE-47和PBDE-209染毒浓度的选择

根据文献[15]的方法进行了PBDE-47和PBDE-209对鲫鱼的96h急性毒性试验,得到PBDE-47和PBDE-209对鲫鱼96hLC₅₀值分别为 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $100.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。选择1/2 96hLC₅₀值及以下的浓度为染毒浓度(以保证试验期间鱼类基本存活),即PBDE-47分别为0.10、1.00、2.50、5.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$;PBDE-209分别为10.0、20.0、30.0、50.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3.2 鱼类的染毒方式

鱼类的染毒方式采用静态水质接触染毒。在水族箱中放入试验液250L,选择体质健壮的受试鱼20尾放入。试验分设空白对照组1个、试验浓度组4个,每组设2个平行。因PBDE-47和PBDE-209为疏水性物质,故采用W(DMSO):W(丙三醇)=70:30的有机溶液作为溶剂^[16]。试验同时设溶剂对照组1个。试验期间每日吸污并更换试验液10%。分别在染毒后的0、5、10、20d取样,分析鲫鱼血清、肾脏中8-OHdG的含量及肝肾组织的p53蛋白的含量。

1.3.3 鱼类血清和组织样的采集选取及前处理

随机抽取健康试验鱼3条,用纱布擦干其表面后,用无菌注射器在其尾静脉采血,血样经离心冷藏后获得血清。同时解剖取鱼类的肝(或肾)脏并混合。取组织样(约6g)在4℃的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干后称重,放入5~10mL的烧杯中。先用移液管取总量2/3并预冷(4℃)的匀浆介质(内含 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $0.0001 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Na₂EDTA, $0.14 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,pH7.4;体积总量应是组

织重量的 9 倍)于烧杯中,用眼科剪刀尽快剪碎组织,倒入匀浆器中,再将剩余的 1/3 匀浆介质冲洗残留在烧杯中的组织,一并倒入匀浆器。在冰水浴中充分转动研磨,制成 10%的组织匀浆液。

1.3.4 鱼类血清和肾组织中 8-OHdG 以及肝肾组织中 p53 蛋白的含量测定

采用 ELISA 试剂盒测定鲫鱼血清和肾脏组织中 8-OHdG 的含量以及肝肾组织中 p53 蛋白的含量(p53 蛋白是分子量为 53 KD 的蛋白,非哺乳动物的 p53 蛋白和哺乳动物的一样,都能参与细胞在面对基因毒性应激反应时被激活的凋亡途径。因鱼的 p53 蛋白试剂盒尚没有,故以大鼠的试剂盒代用),测试方法均为 96 微孔板比色法,酶标仪波长为 450 nm(操作按试剂盒说明书进行)。血清中 8-OHdG 的单位为 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$,最低检出限为 $0.5\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$;肾脏组织中 8-OHdG 的单位为 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,最低检出限为 $5\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。p53 蛋白的单位为 $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$,最低检出限为 $10\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 。试验结果使用 SPSS 软件进行差异显著性分析(T 检验), $P<0.05$ 表明处理组与空白对照组差异显著, $P<0.01$ 表明处理组与空白对照组差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 不同分子量多溴联苯醚作用下鲫鱼血清和肾脏中 8-OHdG 的含量变化

分别在试验开始后的 0、5、10、20 d 从各组试验鲫鱼体内采集静脉血液和肾脏组织,分析血清和肾脏中 8-OHdG 的含量,了解 PBDE-47 和 PBDE-209 对鲫鱼 DNA 损伤的影响,结果见表 1。

由表 1 可知,在试验的 20 d 内,空白对照组和溶

剂对照组鲫鱼血清中的 8-OHdG 分别维持在 $0.651\sim 0.670\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 和 $0.692\sim 0.701\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的范围内;而肾脏组织中的 8-OHdG 分别维持在 $8.52\sim 8.62\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $8.96\sim 9.25\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 的范围内。表明在一定的试验条件下,鲫鱼血清和肾脏中的 8-OHdG 基本维持稳态,试验所用的溶剂对 8-OHdG 无影响。表 1 数据显示,在 20 d 的试验中,除了 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-47 试验组和 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-209 试验组与空白对照无差异($P>0.05$)外,其他各试验组鲫鱼血清和肾脏中的 8-OHdG 含量呈明显的上升趋势。在 PBDE-47 作用下,鲫鱼血清和肾脏中 8-OHdG 的含量随着作用时间的延续而递增,20 d 时的含量最高。此时鲫鱼血清和肾脏中的 8-OHdG 分别上升了 113%~327%和 178%~360%,呈现显著的剂量-效应关系。鲫鱼血清中 8-OHdG 含量与 PBDE-47 浓度的相关方程为:

$$y_1=0.458\ 0x_1+0.825\ 0, r_1=0.954\ 6(n=5)$$

肾脏中的相关方程为:

$$y_2=0.684\ 2x_2+7.480, r_2=0.965\ 4(n=5)$$

式中 y 为 8-OHdG 含量, x 为受试物浓度, n 为参与统计的平均样本数。下同。

鲫鱼肾脏中 8-OHdG 的升高幅度较血清中的高,与受试浓度的相关性比血清略好,这可能与 8-OHdG 的产生与代谢有关。8-OHdG 是活性氧自由基(ROS)引起 DNA 氧化损伤修饰产物之一,其生成原因很多,主要是电离辐射、化学致癌物代谢活化及细胞正常新陈代谢过程产生的大量 ROS 直接攻击 DNA 中的鸟嘌呤(dG),使脱氧鸟苷氧化而生成 8-OHdG。8-OHdG 通过改变碱基配对的性质,导致抑癌基因 p53 基因和 ras 原癌基因等基因发生难以修复的 DNA G→T 或

表 1 2 种多溴联苯醚作用下鲫鱼血清和肾脏中 8-OHdG 的含量变化 *

Table 1 Effects of two PBDEs on the content of 8-OHdG in blood serum and kidney of *Carassius auratus*

受试物	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	血清中 8-OHdG 含量/ $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$				肾脏中 8-OHdG 含量/ $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$			
		0 d	5 d	10 d	20 d	0 d	5 d	10 d	20 d
PBDE-47	0.10	0.658	0.662	0.658	0.677	8.58	8.64	8.72	9.17
	1.00	0.651	0.839	1.125 ^a	1.428 ^a	8.62	10.17	16.85 ^b	23.95 ^b
	2.50	0.664	0.936	1.530 ^b	2.428 ^b	8.60	10.84	20.68 ^b	31.28 ^b
	5.00	0.680	1.254 ^a	2.384 ^b	2.861 ^b	8.58	14.36 ^a	29.78 ^b	39.64 ^b
PBDE-209	10.0	0.682	0.732	0.770	0.782	8.62	8.68	8.74	9.26
	20.0	0.700	0.928	1.384 ^a	1.846 ^b	8.68	11.82 ^a	15.43 ^b	20.51 ^b
	30.0	0.668	1.405 ^a	2.768 ^b	3.051 ^b	8.58	13.81 ^a	23.60 ^b	36.72 ^b
	50.0	0.694	1.845 ^b	3.026 ^b	3.282 ^b	8.70	16.76 ^b	32.88 ^b	43.90 ^b
空白对照 CK ₀	0	0.651	0.668	0.658	0.670	8.62	8.52	8.58	8.62
溶剂对照 CK ₁	10 000	0.701	0.692	0.698	0.700	9.23	8.96	9.20	9.25

*:表中各组数据以平均值表示,其中 a: $P<0.05$;b: $P<0.01$ 。下同。

A→C 碱基颠换,导致 DNA 误读,产生突变,从而启动细胞癌变的过程。8-OHdG 产生后相对较稳定,可由组织进入血液,最后通过肾脏进入尿液排出。因此血清中的含量可能仅为一个瞬时含量,而肾脏中的含量却是一个总体累积含量。鲫鱼血清与肾脏中的 8-OHdG 含量也存在良好的相关性,20 d 时的相关方程为:

$$C_{\text{肾脏}}=16.52C_{\text{血清}}+1.25, r_c=0.973\ 0(n=4)$$

在此需指出的是,虽然试验进行 20 d 时 8-OHdG 的含量最高,但其增加速率最快的阶段是在试验后的 5~10 d。以 $5.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-47 试验组为例,在 0~5、5~10 d 和 10~20 d 间,鲫鱼血清 8-OHdG 的增加速率分别为 $0.114\ 8$ 、 $0.226\ 0\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $0.047\ 7\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$; 而肾脏中 8-OHdG 的增加速率分别为 1.156 、 $3.084\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 和 $0.986\ 0\text{ ng}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 。由此可见 PBDE-47 对鲫鱼 DNA 氧化损伤产生 8-OHdG 主要在接触后的 5~10 d,属于亚急性毒性作用。但因 8-OHdG 在组织中比较稳定,不易受其他物质影响,故其生成量在接触多日后仍与受试浓度呈较好的相关性。

PBDE-209 对鲫鱼 DNA 损伤产生 8-OHdG 与 PBDE-47 的作用规律相似。鲫鱼血清和肾脏中 8-OHdG 的含量在 20 d 时最高,此时鲫鱼血清和肾脏中的 8-OHdG 分别上升了 176%~390%和 138%~409%,呈现显著的剂量-效应关系。鲫鱼血清和肾脏中的剂量-效应相关系数分别为 $r_3=0.900\ 1(n=5)$ 和 $r_4=0.959\ 6(n=5)$ 。

表 1 结果显示,一定浓度的 PBDE-47 和 PBDE-209 连续暴露,可使受试鲫鱼组织 DNA 损伤产生 8-

OHdG。但要使鲫鱼组织产生同样含量的 8-OHdG, PBDE-209 的作用浓度几乎是 PBDE-47 的 10 倍。表明 PBDE 随着分子量的增大,其对鱼类 DNA 的损伤作用下降。故两种 PBDE 损伤 DNA 的具体作用途径还有待进一步研究探讨。

2.2 不同分子量多溴联苯醚作用下鲫鱼肝脏和肾脏中 p53 蛋白的含量变化

分别在试验开始后的 0、5、10、20 d 从各组试验鲫鱼体内采集肝脏和肾脏,分析肝肾组织中 p53 蛋白的含量,了解 PBDE-47 和 PBDE-209 对鲫鱼 DNA 损伤的影响,结果见表 2。

由表 2 可知,在试验的 20 d 内,空白对照组和溶剂对照组鲫鱼肝脏中的 p53 蛋白含量分别维持在 $32.85\sim 32.92\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $34.48\sim 34.65\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的范围内;而肾脏组织中的 p53 蛋白含量分别维持在 $34.48\sim 34.55\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $36.02\sim 36.12\text{ pg}\cdot\text{g}^{-1}$ 的范围内。表明在一定的试验条件下,鲫鱼肝脏和肾脏中的 P53 蛋白含量基本维持稳态,试验所用的溶剂对 p53 蛋白含量无影响。表 2 数据显示,在 20 d 的试验中,除了 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-47 试验组和 $10.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-209 试验组与空白对照无差异($P>0.05$)外,其他各试验组鲫鱼肝脏和肾脏中的 p53 蛋白含量呈明显的上升趋势。在 PBDE-47 作用下,鲫鱼肝脏和肾脏中 P53 蛋白含量随着作用时间的延续而递增,20 d 时的含量最高。此时鲫鱼肝脏和肾脏中的 p53 蛋白含量分别上升了 39.75%~78.86%和 17.95%~42.55%,呈现显著的剂量-效应关系。鲫鱼肝脏中 p53 蛋白含量与 PBDE-47 浓度的相关方程为:

$$y_5=4.847x_5+36.43, r_5=0.951\ 6(n=5)$$

表 2 2 种多溴联苯醚作用下鲫鱼肝脏和肾脏中 p53 蛋白的含量变化

Table 2 Effects of two PBDEs on the content of p53 in liver and kidney of *Carassius auratus*

受试物	浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	肝脏中 p53 蛋白含量/ $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$				肾脏中 p53 蛋白含量/ $\text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$			
		0 d	5 d	10 d	20 d	0 d	5 d	10 d	20 d
PBDE-47	0.10	32.85	33.04	34.28	35.76	34.53	34.60	34.82	35.12
	1.00	32.90	33.60	38.72 ^a	45.95 ^b	34.62	35.02	37.46	40.75 ^a
	2.50	32.82	34.78	40.27 ^a	50.43 ^b	34.58	36.85	40.24 ^a	45.07 ^b
	5.00	32.78	36.89	44.21 ^b	58.81 ^b	34.65	38.19	43.57 ^b	49.25 ^b
PBDE-209	10.0	32.90	33.25	34.81	36.02	34.62	34.88	35.63	37.05
	20.0	32.92	33.78	37.45 ^a	48.76 ^b	34.60	36.28	40.65 ^a	44.86 ^b
	30.0	32.85	35.88	43.08 ^b	54.76 ^b	34.55	36.89	43.17 ^b	48.35 ^b
	50.0	32.80	37.24 ^a	50.18 ^b	63.15 ^b	34.65	38.05	45.26 ^b	53.64 ^b
空白对照 CK ₀	0	32.85	32.90	32.92	32.88	34.53	34.50	34.48	34.55
溶剂对照 CK ₁	10 000	34.62	34.48	34.55	34.65	36.02	36.12	36.10	36.12

肾脏中的相关方程为:

$$y_6=0.322 0x_6+33.86, r_6=0.976 7(n=5)$$

式中 y 为 p53 蛋白含量, x 为受试物浓度。下同。

鲫鱼肾脏中 p53 蛋白的增幅较肝脏中略低,但与受试浓度的相关性比肝脏略好。研究结果表明, p53 蛋白在 PBDE-47 的诱导下表达增多, 参与细胞凋亡过程。合理的解释是 PBDE-47 导致的 DNA 损伤激活了 p53 的表达, 从而引导损伤细胞进入修复途径或凋亡。p53 主要参与调控 DNA 复制和修复, 也是凋亡通路的组成部分, 可修复 DNA 加合物等多种 DNA 损伤, 从而减少自发的和化学物诱导的 DNA 损伤, 可减少基因突变积累并具有抑制细胞癌变的能力。p53 的正常功能是监控细胞分裂时 DNA 的复制, 如果检测到 DNA 受损, p53 就负责或者停止细胞分裂, 直到 DNA 得到修复; 或者调控细胞走向死亡^[3]。当 p53 不能执行此功能时, 往往导致细胞发生癌变。已发现多种肿瘤存在 p53 基因异常表达, 其改变可发生在癌变的早期阶段, 并于血清和组织中出现相应的蛋白产物^[17]。研究表明 PBDE-47 可引起组织中 DNA 的损伤, 而 DNA 受到损伤时可反馈性地激发 p53 基因的表达, 引起细胞内野生型 p53 蛋白的表达增加, 但 p53 在 PBDE-47 导致的组织细胞 DNA 损伤修复中的作用机制还有待进一步研究。

PBDE-209 对鲫鱼肝肾组织中 p53 蛋白含量的影响规律与 PBDE-47 相似。鲫鱼肝肾中 p53 蛋白的含量在 20 d 时最高, 分别上升了 48.30%~92.06% 和 29.84%~55.25%, 呈现显著的剂量-效应关系, 相关系数分别为 $r_7=0.976 3(n=5)$ 和 $r_8=0.977 6(n=5)$ 。

2.3 不同分子量多溴联苯醚作用下鲫鱼肾脏中 8-OHdG 和 p53 蛋白含量的相关性

根据表 1 和表 2 的试验数据, 对多溴联苯醚作用下鲫鱼肾脏组织中 8-OHdG 和 p53 蛋白含量的相关性进行了分析。当 PBDE-47 的浓度为 0.1~5.0 mg·L⁻¹ 时, 经试验 20 d, 其肾脏中的 8-OHdG 和 p53 蛋白含量呈正相关, 相关系数为 0.823 8~0.997 3, 其中相关性最好的是 2.50 mg·L⁻¹ 试验组; 当 PBDE-209 的浓度为 10.0~50.0 mg·L⁻¹ 时, 经试验 20 d, 其肾脏中的 8-OHdG 和 p53 蛋白含量也呈正相关, 相关系数为 0.908 8~0.947 0, 其中相关性最好的是 20.0 mg·L⁻¹ 试验组。结果显示, 在受试鲫鱼的同一个组织中, 机体受多溴联苯醚作用产生的 DNA 损伤产物与机体为抵御这种损伤而表达的 p53 蛋白的量呈较好的相关性, 8-OHdG 和 p53 蛋白具有一定的联动性。其较好的相

关性可能还是缘于 8-OHdG 在体内累积的稳定性, 至于其相互间的作用关系和机制还有待进一步研究探索。

3 结论

(1)一定浓度的 PBDE-47 和 PBDE-209 的连续暴露, 可使受试鲫鱼组织 DNA 损伤产生 8-OHdG。这种 DNA 损伤产物可在鲫鱼的血清和组织中检出, 并呈显著的剂量-效应关系。

(2)一定浓度的 PBDE-47 和 PBDE-209 的连续暴露, 可促使受试鲫鱼组织中 p53 蛋白的异常表达, p53 蛋白的含量与受试物浓度呈显著正相关。

(3)在受试鲫鱼的组织中, 因受多溴联苯醚作用产生的 DNA 损伤产物 8-OHdG 与机体为抵御这种损伤而表达的 p53 蛋白含量间呈一定的关联性。

参考文献:

- [1] 刘汉霞, 张庆华, 江桂斌, 等. 多溴联苯醚及其环境问题 [J]. 化学进展, 2005, 17(3): 554-562.
LIU Han-xia, ZHANG Qing-hua, JIANG Gui-bin, et al. Polybrominated diphenyl ethers and its related environmental problems[J]. *Progress in Chemistry*, 2005, 17(3): 554-562.
- [2] 魏爱雪, 王学彤, 徐晓白. 环境中多溴联苯醚 PBDES 类化合物污染研究[J]. 化学进展, 2006, 18(9): 1227-1233.
WEI Ai-xue, WANG Xue-tong, XU Xiao-bai. The pollution research aspect on poly-brominated diphenyl esters(PBDEs) compounds in environment[J]. *Progress in Chemistry*, 2006, 18(9): 1227-1233.
- [3] HITES R A. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentration[J]. *Environmental Science Technology*, 2004, 38(4): 945-956.
- [4] 聂芳红, 陈进军, Bunce Nigel. 多溴联苯醚对大鼠肝细胞 CYP1 A2 依赖性 MROD 活性的影响[J]. 中国农学通报, 2005, 21(12): 11-13.
NIE Fang-hong, CHEN Jin-jun, Nigel B. MROD analysis of competitive inhibition from polybrominated diphenyl ethers to CYP 1A2 in rat hepatocytic microsomes[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21(12): 11-13.
- [5] 何 平, 何卫红, 王爱国, 等. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚对 SH-SY5Y 细胞氧化应激与 DNA 损伤的影响[J]. 卫生研究, 2007, 36(3): 266-268.
HE Ping, HE Wei-hong, WANG Ai-guo, et al. Effects of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ethers on oxidative stress and DNA damage in SH-SY5Y cells[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2007, 36(3): 266-268.
- [6] 孙福红, 周启星. 多溴二苯醚的环境暴露与生态毒理研究进展[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2): 379-384.
SUN Fu-hong, ZHOU Qi-xing. Research advance on environmental exposure and ecotoxicological effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(2): 379-384.

- [7] Watanabe I, Tatsukawa R. Formation of brominated dibenzofurans from the photolysis of flame retardant decabromobiphenyl ether in hexane solution by UV and sunlight[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1987, 39: 953-961.
- [8] Fair P, Mitchum G, Hulsey T, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in blubber of free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops truncatus*) from two Southeast Atlantic Estuarine Areas[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2007, 53(3):483-494.
- [9] Schantz M, Keller J, Leigh S, et al. Certification of SRM 1589a PCBs, pesticides, PBDEs, and dioxins/furans in human serum[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(4):1201-1208.
- [10] HU X Z, XU Y, HU D C, et al. Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209)[J]. *Toxicology Letters*, 2007, 171(1/2):19-28.
- [11] Hirano T, Yamaguchi Y, Galsai H. Inhibition of 8-hydroxyguanine repair in testes after administration of cadmium chloride to GSH-depleted rats[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 147(1):9-14.
- [12] 潘洪志, 李 蓉. DNA 氧化损伤标志物 8-羟基脱氧鸟苷及其检测[J]. 中国卫生检验杂志, 2003, 13(4):404-405.
PAN Hong-zhi, LI Rong. Detection of 8-hydroxy-2-deoxyguanosine, a marker for oxidative DNA damage[J]. *Chin J of Health Laboratory Technology*, 2003, 13(4):404-405.
- [13] Muller P, Nenutil R, Vojtesek B. Relevance of p53 protein and its mutations for novel strategies in cancer therapy [J]. *Cas Lek Cesk*, 2004, 143(5):313-317.
- [14] 马 煜, 钱德芳, 曹利平. p53 蛋白研究进展[J]. 国外医学·临床生物化学与检验学分册, 2002, 23(1):41-42.
MA Yu, QIAN De-fang, CAO Li-ping. Advance in research of p53 protein[J]. *Clinical Biochemistry and Laboratory Medicine, Foreign Medical Science*, 2002, 23(1):41-42.
- [15] 程树培. 环境生物技术实验指南[M]. 南京: 南京大学出版社, 1995: 177-243.
CHENG Shu-peí. Laboratory guidances of environmental technology [M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1995: 177-243.
- [16] 王连生, 韩朔葵. 有机污染化学进展 [M]. 北京: 化学工业出版社, 1998: 96-117.
WANG Lian-sheng, HAN Shuo-kui. Advances in chemistry of organic pollutants[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998: 96-117.
- [17] 唐 萌, 曾垂焕, 王 波, 等. 八氯二丙醚生产工人 p53 蛋白及氧化损伤检测[J]. 中国公共卫生, 2007, 23(8):964-965.
TANG Meng, ZENG Chui-huan, WANG Bo, et al. Detection of serum p53 protein and oxidative damage in octachlorodipropyl ether exposed population[J]. *Chin J Public Health*, 2007, 23(8):964-965.