

六氯苯作用下鱼肝线粒体蛋白质表达差异研究

蒋舜尧^{1,2}, 周培疆¹

(1. 武汉大学资源与环境科学学院, 湖北 武汉 430072; 2. 长江大学化学与环境工程学院, 湖北 荆州 434025)

摘要:用差速离心和核酸酶消化法从鲫鱼肝组织中提取和纯化线粒体,用不同浓度(0、10、20、30、40、50 mg·L⁻¹)的六氯苯对线粒体进行体外染毒(35℃,2 h),并对线粒体蛋白质进行 SDS-PAGE 分析。结果显示,在一定浓度范围(0~50 mg·L⁻¹)内,随着六氯苯浓度的增加,线粒体表达的蛋白质条带呈现先增加后减少的现象,另外多肽 B(Mr 为 63kD)的表达量明显减小甚至消失,表明六氯苯可能引起线粒体内遗传体系发生改变,导致线粒体蛋白质表达出现差异。这一结果为进一步研究六氯苯对线粒体的毒性作用机理具有一定意义,也为在亚细胞水平上研究污染物的毒性效应提供了一种可能的方式。

关键词:六氯苯; 鲫鱼肝脏; 线粒体蛋白质; 表达差异; SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号:Q593 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)06-1065-04

Difference Expression of the Mitochondrial Protein Isolated from Liver of Carassius auratus Exposed to Hexachlorobenzene

JIANG Shun-yao^{1,2}, ZHOU Pei-jiang¹

(1.College of Resources and Environmental Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China; 2. College of Chemistry and Environmental Engineering, Yangtze University, Jingzhou 434025, China)

Abstract: It has been known that mitochondria from animal cells contain genetic materials uniquely besides cell nucleolus, which means intact and functional mitochondria plays an important role in organism. Hexachlorobenzene is one of the persistent organic pollutants (POPs). Therefore, developing a simple and effective procedure for determination of toxicological impact of the chemical is of significantly essential at subcellular level. The mitochondria were isolated from liver of Carassius auratus and purified through differential centrifugation and nuclease digestion. The isolated mitochondria were infected by different concentrations of hexachlorobenzene (0, 10, 20, 30, 40, 50 mg·L⁻¹) using outside body toxic infection (incubation 2 hours at 35℃), and the mitochondrial protein were analyzed by SDS-PAGE. The results showed that the amount of the expressing band of mitochondrial protein increased first (from 14 to 15 bands at 10, 20 mg·L⁻¹) and then decreased (from 14 to 13 bands at 50 mg·L⁻¹); while, the protein band B (polypeptide B, Mr: 66KDa) became thin gradually with the increasing of hexachlorobenzene concentrations, which indicated that hexachlorobenzene might change the mitochondrial genetic system potentially, resulted in differential expression of mitochondrial protein. These results had some significance for further studying the toxicity mechanism of hexachlorobenzene, and offered a potential method to study the toxicity of contaminant at subcellular level.

Keywords: hexachlorobenzene; liver of carassius auratus; mitochondrial protein; difference of expression; SDS-PAGE

六氯苯 (Hexachlorobenzene,C₆Cl₆, 简称 HCB)是《斯德哥尔摩持久性有机污染物(POPs)公约》公布的

收稿日期:2005-03-02

基金项目: 国家自然科学基金资助 (20177018); 国家自然科学基金 (20577036)

作者简介:蒋舜尧(1970—),男,讲师,硕士研究生,主要从事生态毒理学研究。

联系人:周培疆 E-mail:zhoujpj@whu.edu.cn

12 种典型 POPs 之一,美国和欧盟均将其列入了优先控制污染物"黑名单",其环境污染的主要来源是农业生产和化工污染,以杀菌剂、杀虫剂和氯化物产品生产过程中的副产物和杂质进入环境,据估计,全球每年六氯苯的排放量约为 23 000 kg^[1]。

六氯苯具有高脂溶性,且不易降解,可通过生物富集和食物链的放大作用以较高浓度残留于人体和其

他生物体内^[2-4],王子键等^[3]曾报道淮河 4 个断面鲤鱼体内六氯苯的浓度高达 0.45~0.98 mg·kg⁻¹。六氯苯毒性作用的主要靶器官是动物的肝脏,有研究发现六氯苯暴露引起的卟啉症有引起原发性肝癌的倾向^[5],Randi 的研究也发现鼠肝中的六氯苯能激活原癌基因,起着肿瘤促进剂的作用^[6]。六氯苯已成为全球性的环境污染物,其健康危害已越来越引起广泛的重视。

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,也是一个半自主性细胞器,它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。据估计,线粒体(包括外膜,内膜,内外膜间隙,基质)内含的约 1 000 种蛋白质中有近 2%是线粒体合成的,线粒体蛋白质合成系统负责合成自身内膜上氧化磷酸化酶的部分亚基^[7]。线粒体通过电子传递链的氧化磷酸化反应偶联为有机体提供 90%以上的 ATP,作为生理功能的主要能源。线粒体还具有一系列重要功能,如产生超氧阴离子等活性氧自由基,调节细胞氧化还原电势和信号转导以及调控细胞凋亡和基因表达等^[8]。因此,线粒体结构和功能的完整对生命体的存在具有重要意义,线粒体蛋白质的变化对线粒体影响巨大。目前,有关化学污染物毒理效应的研究正逐步走向生理生化水平与分子机制的探索以及毒性效应生物标志物的研究^[9],近年来的研究也表明,线粒体是众多环境化学污染物作用的优先靶标^[10-13]。为此,本试验在亚细胞器水平上研究了六氯苯作用下鲫鱼肝脏线粒体蛋白质分子表达的差异,并探讨了将六氯苯作用下线粒体差异表达蛋白质作为六氯苯毒性作用分子生物标志物的可能性。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验生物为鲫鱼(*Carassius auratus*),平均体长 15 cm,平均体重 0.20 kg,在室温下用曝气充氧除氯后的自来水驯养 2 d,健康状况良好。六氯苯为上海化学试剂一厂生产的分析纯试剂。

1.2 鲫鱼肝脏线粒体的提取

参照黎双飞的方法^[14],有修改。取新鲜的鲫鱼肝组织,除净结缔组织和脂肪组织,称重,用 0℃Buffer A (0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.001 mol·L⁻¹ 2-巯基乙醇, 0.001 mol·L⁻¹ Na₂EDTA, pH7.5)洗涤数次后剪碎,加入 10 倍体积的 0℃Buffer A,玻璃匀浆器冰浴匀浆,匀浆液过滤分离,滤液在 4℃高速冷冻离心机中 1 000×g 4℃离心 10 min,去除细胞核及细胞膜

碎片,取上清液 15 000×g 4℃离心 30 min,沉淀出线粒体。粗制线粒体按每克肝加 0.5 mL 的 Buffer B (0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.007 mol·L⁻¹ MgCl₂, pH7.5)悬浮,加 DNase I 至终浓度为 0.1 g·L⁻¹,在 4℃反应 1 h 以除去线粒体外的核 DNA,加入 2 倍体积的 DNase I 反应终止液 (0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖, 0.1 mol Na₂EDTA, pH8.0), 15 000×g 4℃离心 30 min,沉淀用适量 DNase I 反应终止液洗涤 1 次,重复离心,沉淀即为纯化的线粒体,用少量 Buffer A 悬浮 4℃保存。以上操作均在 0~4℃、无菌条件下快速完成。

1.3 蛋白质含量测定

线粒体蛋白含量的测定采用 Bradford 法^[15],以牛血清白蛋白为标准。

1.4 线粒体的染毒处理

采用不同浓度的六氯苯对线粒体进行染毒处理。加入六氯苯溶液后,每 1.0 mL 线粒体悬浮液中含六氯苯分别为 0、10、20、30、40、50 mg·L⁻¹(对照组不加六氯苯溶液),线粒体蛋白浓度均为 1 g·L⁻¹,35℃水浴振荡 2 h 后,迅速移入冰浴中终止反应。

1.5 线粒体蛋白质的 SDS-PAGE

上述反应混合液经 15 000×g 4℃条件下离心 30 min,小心吸去上清液,沉淀悬浮于 200 μL 上样缓冲液 (0.05 mol·L⁻¹ Tris/HCl, 0.002 mol·L⁻¹ Na₂EDTA, 0.143 mol·L⁻¹ 2-巯基乙醇, 2% SDS, 10% 甘油, 0.1% 溴酚蓝, pH6.8)中, 100℃水浴煮沸 10 min,冰浴 2 min 后上样(上样量相等)。采用 Laemmli^[16]的方法,在不连续的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上进行电泳,浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 9%。20 mA 电流电泳大约 4 h,当溴酚蓝条带离凝胶底部 1 cm 时停止电泳,凝胶用考马斯亮蓝 R-250 染色 3 h 后,用脱色液将其背景脱至无色,摄影。

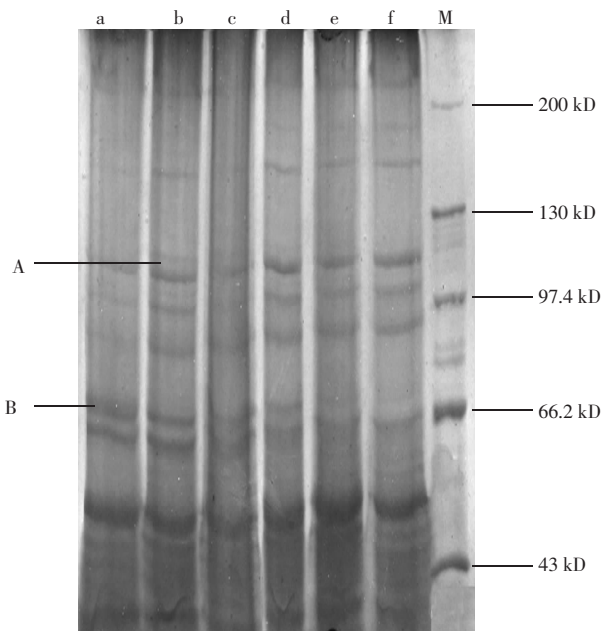
1.6 计算蛋白质分子量

计算相对迁移率 (样品迁移距离/指示剂迁移距离),以标准蛋白分子量对数对其相对迁移率作标准曲线,根据待测样品相对迁移率查该曲线计算其分子量。

2 结果与分析

本试验中不同浓度的六氯苯对鲫鱼肝脏线粒体进行体外染毒后 SDS-PAGE 结果如图 1 所示。

由图 1 可以看出,在六氯苯作用下,鲫鱼肝脏线粒体蛋白质的表达条带数随着六氯苯浓度的增加呈现出先增加后减少的现象。在未受到六氯苯胁迫的情况



a: $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; b: $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; c: $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; d: $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;
e: $40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; f: $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; M: 标准分子量蛋白质

图1 六氯苯作用下鲫鱼肝脏线粒体蛋白质 SDS-PAGE 图谱
Figure 1 SDS-PAGE mapping of mitochondrial protein from liver
of *Carassius auratus* exposed to hexachlorobenzene

下,蛋白质的表达条带数为 14 条,当六氯苯的浓度为 10 和 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蛋白质的表达条带数为 15 条,增加的条带是分子量为 116kD 的多肽 A (图中的条带 A)。当六氯苯浓度的进一步加大为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,多肽 A 几乎消失。此时,蛋白质的表达条带数仍为 14 条。当六氯苯的浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,分子量为 66kD 蛋白质条带即多肽 B 几乎消失,此时蛋白质表达条带数减少为 13 条。同时,从图 1 还可看到,随着六氯苯浓度的增大,线粒体中多肽 B (Mr 为 66kD) 的表达量呈现出明显减少的趋势。根据文献报道^[17],分子量为 66kD 的多肽 B 可能是线粒体 DNA 编码合成的氧化磷酸化复合酶的亚基之一——NADH 还原酶的 5 亚基 (ND5),若进一步确切鉴定需用特异性的抗体。另外,此结果还暗示,多肽 B 有可能作为环境中六氯苯污染的毒性效应生物标志物。

由于离体线粒体蛋白质的表达差异在较大程度上反映了线粒体 DNA 在六氯苯作用下所引发的遗传变异,本试验中鲫鱼肝脏线粒体蛋白质的表达条带数随着六氯苯剂量的增加呈现先增加后减少的现象。这可能是在低浓度六氯苯毒性作用下,线粒体对六氯苯胁迫产生应急反应,出现应急蛋白,导致在这一剂量下的蛋白质表达条带数增加。随着六氯苯浓度的增加,

蛋白质表达条带数及部分多肽表达量相应减少,则可能是线粒体 DNA 受到损伤逐渐加大,转录和翻译活性受到了抑制所致。

3 讨论

近年来,由于线粒体 DNA 损伤在细胞凋亡、肿瘤发生过程中的重要作用的确认,环境化学污染对线粒体 DNA 毒性作用成为环境生态毒理学研究的热点之一。

研究证明,在体外代谢过程中,线粒体可利用自身的营养物质通过线粒体 DNA 转录和翻译产生相关的呼吸链功能酶等,以维持其代谢活性。但由于线粒体的 DNA 及其转录系统具有不同于核 DNA 的一系列特点,如缺乏组蛋白保护,位于内源性氧自由基产生的主要场所——呼吸链附近,复制快速且无校对功能以及缺乏有效的修复机制等,较易受到自由基和外源化学物的攻击而发生线粒体的 DNA 及其转录系统的损害^[18]。据 Sashwati 报道^[19],六氯苯暴露可诱导水生植物和鱼肝脏中抗氧化酶活性显著增加,而鱼肝脏中的单加氧酶被显著抑制,这证明六氯苯的暴露,导致鱼肝线粒体电子传递过程中电子泄露增加,活性氧 (ROS) 等自由基大量产生,消除活性氧的抗氧化酶系统的协调性遭到破坏,活性氧积累,从而引起线粒体 DNA 的氧化损伤。活性氧自由基的氧化损伤可能是六氯苯作用下线粒体 DNA 突变的主要原因之一。同时,化学污染物也可与 DNA 形成加合物^[20],特别是由于线粒体内脂肪/DNA 的比值很高,使具有嗜脂性的化学污染物优先在线粒体 DNA 上聚集,线粒体 DNA 与化学污染物的结合比核 DNA 更充分,常导致线粒体 DNA 链的断裂。高脂溶性的六氯苯也可能具有此作用机制。

在外源污染物作用下,由于线粒体 DNA 相对于核 DNA 更易发生突变,且能表达出差异性的蛋白质,这提示差异性蛋白质可作为化学污染物毒性效应的分子生物标志物,特别是在检测某些持久性有机污染物是否具有潜在“三致”(致畸、致癌、致突变)作用方面具有一定可行性。

线粒体是细胞内死亡信号的重要感受者和放大者,外源化学污染物作用于线粒体 DNA,引起线粒体 DNA 的缺失与突变,氧化磷酸化基因受损,使线粒体 DNA 转录翻译的蛋白质(与呼吸链有关的酶)出现异常,导致活性氧 (ROS) 自由基增加,ATP 合成减少,这将进一步促使呼吸链功能失衡,如此恶性循环,最终导致整个细胞体系功能紊乱甚至死亡^[21]。这可能是六氯苯

等外源污染物重要的毒性作用机理之一。

参考文献:

[1] Bailey R E.Global hexachlorobenzene emissions[J]. *Chemosphere*, 2001, 43:167–182.

[2] 阮禄章,张迎梅,赵东芹,等. 白鹭作为无锡太湖地区环境污染指示生物的研究[J].应用生态学报, 2003,14(2):263–268.

[3] 王子健,吕怡兵,王毅,等.淮河水体取代苯类污染及其生态风险[J].环境科学学报, 2002,22(3):300–305.

[4] Courtney K D.Hexachlorobenzene(HCB):a review[J]. *Environ Res*, 1979, 20:225–266.

[5] Axelson O.A review of porphyria and cancer and the missing link with human exposure to hexachlorobenzene[J]. *IARC Sci Publ*, 1986,7:585–591.

[6] Randi A S, Hernandez S. Hexachlorobenzene increases ornithine decarboxylase activity,free polyamines content and c–Myc,c–Fos and c–Jun protein levels in rat liver[J]. *Toxicology letters*, 2003,144:168.

[7] 杨福愉.蛋白质跨线粒体的运送[J].生物化学与生物物理学报,1999, 31(4):353–356.

[8] Kiberstis P A. Mitochondria make a comeback[J]. *Science*, 1999,283: 1475–1488.

[9] 丁竹红,谢标,王晓蓉.生物标志物及其在环境中的应用[J].农业环境保护,2002,21(5):465–467.

[10] Stephan K.Mitochondria. important target for drug toxicity[J]. *Journal of Hepatology*,2001,34:334–336.

[11] 鲁双庆,刘少军,刘筠,等.Cu²⁺对黄鳝肝脏和性腺组织及其线粒体中(Na⁺+K⁺)–ATPase 活性的影响[J].农业环境保护,2002,21(6):508–

511.

[12] Bragadin M, Dell A P. Mitochondrial bioenergetics as affected by cationic detergent[J]. *Arch Environ ContamToxicol*,1996,30:280–284.

[13] Kehrer J P,Jones D P, Lemasters J J. Contemporary issue in toxicology: mechanisms of hypoxic cell injury [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*,1990, 106:165–178.

[14] 黎双飞,刘少军,张轩杰,等.三倍体湘云鲫及其亲本线粒体 DNA 的比较研究[J].中国水产科学,2001,8(1):1–5.

[15] Bradford M M. A rapid and sensitive method after the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein–dye binding[J].*Anal Biochem*, 1976,72:248–254.

[16] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. *Nature*, 1970,227 :680–685

[17] Mills N C,Ray D B,Rosalind A. Optimization of in vitro protein synthesis by isolated mouse adrenal mitochondria [J]. *Anal Biochem*, 1984, 138:164–180.

[18] Schapira A H,Cooper J M.Mitochondrial Function in Neurodegeneration and Aging[J] . *Mutat Res*, 1992, 275(3):133–143.

[19] Sashwati R, Pirjo L S, Sirpa H. Responses of biotransformation and antioxidant enzymes in lemna minor and oncorhynchus mykiss exposed simultaneously to hexachlorobenzens [J]. *Chemosphere*, 1995,30(8): 1489–1498.

[20] 王美娥,周启星.DNA 加合物的形成、诊断与污染暴露指示研究进展[J].应用生态学报,2004,15(10):1983–1987.

[21] Ozawa T.Mechanism of somatic mitochondrial DNA mutations associated with age and diseases[J].*Biochim Biophys Acta*, 1995,1271: 177–189.

中国科技期刊引证报告——《农业环境科学学报》

《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)自 1996 年开始被中国科学引文数据库列为来源期刊,连续进入“被引频次最高的中国科技期刊 500 名排行表”内。据 2005 年统计,《农业环境科学学报》影响因子为 0.604,总被引频次为 913 次,在 1608 种统计源期刊总排序中按被引频次排在第 174 位,在环境科学类排名第 5 位。本刊 2004 年共发稿 287 篇,参考文献量 3133 篇,平均引文数为 10.92,论文来自全国 25 个地区,100 个研究机构,基金论文比为 80%。引用刊数为 193,扩散因子为 21.14,被引半衰期为 4.8,他引总比为 86%,国际论文比为 3%。

在此我们对长期支持本刊的广大作者和读者深表谢意,让我们携起手来,共同办好刊物,为农业环境科学的繁荣与发展做出更大的贡献!

(摘自《中国科技期刊引证报告》2005 年版)