

苯并[a]芘对赤子爱胜蚓线粒体编码基因表达影响研究

郑森林^{1,2,3}, 宋玉芳^{1*}, 邱晓燕⁴, 孙铁珩¹, 张薇^{1,2}, M. L. Ackland⁵

(1. 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049; 3. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005; 4. 集美大学生物工程学院, 厦门 361021; 5. Deakin University, Melbourne, 3125, Australia)

摘要: 根据 ISO 11268-1:1993 方法, 完成了土壤中苯并[a]芘对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)的人工污染模拟实验. 并采用 Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit 构建了污染组和对照组蚯蚓之间的抑制消减文库. 经测序和比对分析, 在苯并[a]芘诱导上调文库中发现 5 个线粒体 DNA(mtDNA)编码的基因, 且在上调文库中具有较高的频率. 它们分别为: 细胞色素 c 氧化酶亚基 I、II、III, NADH 氢脱氢酶亚基 1, ATP 合成酶亚基. 研究表明, 土壤中苯并[a]芘污染改变了蚯蚓线粒体基因组的表达水平, 线粒体基因组表达异常是多环芳烃污染胁迫的重要分子生物标记物.

关键词: 土壤污染; 苯并[a]芘; 赤子爱胜蚓; 线粒体编码基因; 抑制消减杂交

中图分类号: X131; X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)02-0391-07

Impact of Benzo[a]pyrene the Expression of Mitochondrion-encoded Genes in the Earthworm *Eisenia fetida*

ZHENG Sen-lin^{1,2,3}, SONG Yu-fang¹, QIU Xiao-yan⁴, SUN Tie-heng¹, ZHANG Wei^{1,2}, M. L. Ackland⁵

(1. Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China; 4. School of Bioengineering, Jimei University, Xiamen 361021, China; 5. Deakin University, Melbourne, 3125, Australia)

Abstract: The earthworm *Eisenia fetida*'s benzo[a]pyrene (BaP) exposure experiments were carried out in artificial soil according to ISO 11268-1:1993. And then the upregulated and downregulated subtractive cDNA libraries were constructed by Clontech PCR-Select™ cDNA Subtraction Kit. From the BaP exposure upregulated subtractive cDNA library, several cDNA segments matched mitochondrion-encoded genes were found, including cytochrome c oxidase subunit I (CO I), subunit II (CO II), subunit III (CO III), NADH dehydrogenase subunit 1 (NDH1), and ATP synthase subunit 6. The result indicated BaP and the subsequent oxidative stress disturbed the expression of mitochondrion-encoded genes, and this was potential biomarker for oxidative stress following xenobiotic exposure.

Key words: soil pollution; benzo(a)pyrene (BaP); earthworm *Eisenia fetida*; mitochondrion-encoded genes; suppression subtractive hybridization (SSH)

多环芳烃是一类环境中重要的持久性有机污染物,也是一类重要的环境激素. 其中苯并[a]芘等已被确认具有致癌性^[1]. 多环芳烃广泛存在于各种环境介质,如空气、水体、沉积物、土壤以及食品和动植物中. 在环境中难于降解,并可通过食物链在生物体内传递和富集,对人体健康和生态环境造成严重威胁. 土壤中的多环芳烃污染主要来源于工业生产及废物的排放,在污灌土壤中常有较高的蓄积^[2]. 蚯蚓是陆地生态系统中重要的分解者,常被作为污染土壤生态的监测物种^[3]. 有研究表明,急性毒性实验的生物检测指标有益于高污染土壤的监测. 然而,现实中多数土壤中污染物的含量远未达到致死水平. 所以急性毒性指标对此无能为力. 建立新的,更敏感的生态毒理指标和方法,进行环境亚致死含量污染物的生态毒性效应及危害的诊断十分必要^[4]. 然而,由

于种种技术方面限制等原因,目前这方面的研究报道甚少.

为此,本研究参照国际标准组织(ISO 11268-1:1993)方法指南^[5],进行了蚯蚓人工土壤污染实验和 cDNA 抑制消减双杂交实验,构建蚯蚓在土壤低剂量环境浓度苯并[a]芘污染暴露条件下的抑制消减文库,并进行 DNA 测序和比对分析. 本研究试图通过消减文库分析苯并[a]芘胁迫对蚯蚓线粒体编码基因表达的影响,发现新的分子生物标记物,期为土壤亚致死浓度多环芳烃污染诊断提供敏感的生

收稿日期:2007-02-27; 修订日期:2007-04-02

基金项目:国家重点基础研究发展规划(973)项目(2004CB418503); 国家自然科学基金项目(20577056, 20337010)

作者简介:郑森林(1975~),男,博士研究生,主要研究方向为污染生态学, E-mail: zhengsenlin@yahoo.com.cn

* 通讯联系人, E-mail: songyufang@iae.ac.cn

态毒理诊断方法.

1 材料与方法

1.1 药品与溶液配制

苯并[a]芘为分析纯,购自 Fluka 公司(瑞士);RNAiso 试剂、NucleoTrap[®] mRNA Purification Kit、Clontech PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit 和 BD Advanced cDNA PCR Kit 试剂盒均购自大连 Takara 公司;氨苄青霉素等试剂购于上海华美生物工程有限公司. 乙晴,丙酮,正己烷和二氯甲烷,色谱纯,Merck 公司产品.纯净水产自 Milili-Q 系统.硅胶(70~230 目)Sigma 公司产品.苯并[a]芘标样,购自 Merck-Schuchardt 公司.

1.2 仪器设备

THERMO PCRPress PCR 仪(THERMO 公司,美国);ABI 377 DNA 测序仪(ABI 公司,美国).1090II-HPLC 液相色谱仪(Hewlett Packard 公司,美国).

1.3 试验蚯蚓

蚯蚓赤子爱胜(*Eisenia fetida*)购自天津蚯蚓养殖中心.选用 2~3 月龄,体重 400~500 mg,带有环带的健康蚯蚓为供试品.

1.4 蚯蚓人工土壤污染实验

根据国际标准组织方法指南(ISO 11268-1:1993)^[5],配制人工土壤.将 500 g(干重)人工土壤装入食品塑料盒后,将一定量的苯并[a]芘乙醇液均匀的投加到供试土壤中,使土壤中苯并[a]芘的浓度为 1 mg/kg.同时做溶剂空白对照.将其至于通风橱中 48 h 直至溶剂挥发至干后,分别取一定量空白对照和处理土壤用于苯并[a]芘提取测定.其余土壤中加入一定量的水使土壤湿度达到最大持水量的 75%.然后,将事先选好,体重在 400~500 mg 的成年赤子爱胜蚓 10 条放至盒中,同时投入 5 g 牛粪作为饵料,将培养盒放置在光照控温培养箱(SPX-250-BG),20℃±1℃培养,培养箱的光照设置为:光照:黑暗=12 h:12 h.通过定期称重加水保持湿度.试验周期为 4 周,每个处理 4 个重复.试验结束后,将蚯蚓取出放置在湿润的滤纸上清肠吐出内容物,然后将蚯蚓洗净、拭干,放入液氮中保存待用.

1.5 抑制消减文库的构建

从 B[a]P 污染组和溶剂对照组中挑取数条体重相近的个体蚯蚓,采用液氮研磨法将其分别研磨成粉末,再用 RNAiso 试剂(Takara 公司)进行整条蚯蚓总 RNA 提取;在 1.5%的琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 提取的完整性后,用 NucleoTrap[®] mRNA

Purification Kit 纯化试剂盒提取纯化 mRNA.采用 Clontech PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit 试剂盒构建 B[a]P 污染组和溶剂对照组的上调和下调抑制消减文库.并用 BD Advanced cDNA PCR Kit 试剂盒通过 2 次 PCR 扩增,将差异表达的基因片段富集扩增.将差异表达的基因片段连接到 PMD18-T 载体,转化 DH5 α 感受态细胞后,添加一定量的 80 μ g/mL 氨苄青霉素 LB 固体培养基培养过夜,至转化的白色菌落长出,将培养基转至 4℃条件保存待用.

1.6 基因测序与比对

逐个挑取上述转化菌落至 LB 液体培养基,于 37℃摇床分别培养过夜.以 Clontech PCR-Select[™] cDNA Subtraction Kit 试剂盒中的 Nested PCR Primer1 和 Nested PCR Primer2R 为引物,进行菌液 PCR.于 1.0%琼脂糖电泳检测插入 cDNA 片段.将插入片段不小于 100 bp 且 PCR 产物单一的菌液进行测序检测(基因测序由上海英骏生物技术有限公司采用 ABI 377 测序仪及配套的 BigDye Terminator 试剂盒完成),并将获得序列与 NCBI 网站的基因数据库进行比对分析.

1.7 土壤中苯并[a]芘的提取与测定

称取 5g 风干土壤(<1 mm)于离心管,加入 25 mL 二氯甲烷超声提取 2 h.提取液于离心机以 2 500 r/min 离心 5 min,收集上清液于旋转浓缩仪浓缩至 1 mL.将浓缩液转移到装有 1 g 硅胶的玻璃预柱中,以 1:1 的二氯甲烷:正己烷为淋洗液,接收淋洗液 2 mL.用氮气吹脱至干,乙晴定溶至 1 mL,于高效液相色谱仪分析检测苯并[a]芘.实验设 3 个重复.

20 μ L 提取液经自动进样器注入 RP-C₁₈ (250 × 4.6 mm, I. D. 5 μ m Octadecylsilane)反相柱中,85%乙晴/水为流动相,双通道液相色谱泵以 1.0 mL/min 流速淋洗 30 min,荧光检测仪检测.根据苯并[a]芘最大激发和发射波长(290~430 nm)下的峰面积,数据处理系统根据保留时间对苯并[a]芘定性、定量分析,必要时以二级阵列检测器辅助定性分析.

2 结果与讨论

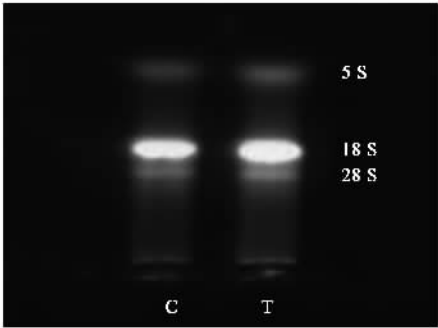
2.1 土壤中苯并[a]芘的含量

实验测得处理组土壤中 B[a]P 的含量为 0.71~0.78 mg/kg,平均值 0.74 mg/kg.比实际投加量减少 0.22~0.29 mg/kg,平均值 0.26 mg/kg.这可能由于 B[a]P 被土壤所吸附为不可提取残渣所致.此外,在样品经溶剂挥发的过程中,也可能造成一小部分 B[a]P 的丢失.这一结果与先前的实验及报道的

结果基本一致^[6]. 对照样品中 B[a]P 未检出.

2.2 抑制消减文库的构建

RNA 易被降解, 完整的 RNA 是 SSH 实验成功的前提. 从图 1 的 RNA 电泳检测结果可见, 蚯蚓处理组和对照组的 5S、18S 和 28S rRNA 条带清晰, 说明所提取的 RNA 完整性良好. 蚯蚓 rRNA 的 18S rRNA 的量明显多于 28S rRNA 的量, 这也是蚯蚓 RNA 与其他物种 RNA 的显著差别.



C 为对照组, T 为 B[a]P 污染组

图 1 总 RNA 提取电泳检测

Fig.1 Electrophoresis image of total RNA in earthworms exposed to B[a]P and control

经过 cDNA 第一链合成、cDNA 第二链合成、*Rsa* I 酶切、接头连接与检测、双杂交、双 PCR 等步骤后, 获得上调组 (Up) 和下调组 (Down) cDNA (图 2). 由图 2 可见, 获得的 cDNA 其分子量集中分布于 250 ~ 2 000 bp 之间. 双 PCR 产物经 TaKaRa DNA Fragment Purification Kit 纯化后, 去除了其中的蛋白质以及小于 100 bp 的 DNA 片段. 采用 pMD18-T vector kit 将差异表达的 DNA 片段连接到载体中并转化 DH5 α 感受态细胞, 上调组和下调组均获得 2 000 多个转化菌落.

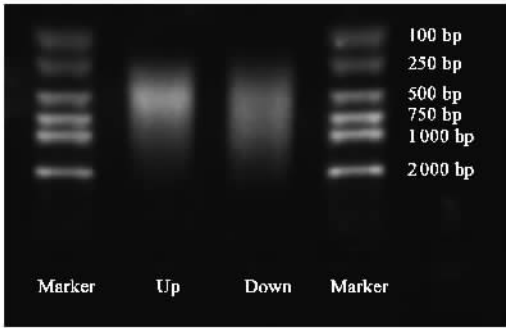


图 2 抑制消减双杂交后双 PCR 的上调组和下调组 cDNA 电泳检测

Fig.2 Electrophoresis image of Nested PCR products following SSH

2.3 粒体编码基因片段的比对

2.3.1 细胞色素 c 氧化酶亚基 I

核酸序列比对 (Blastn) 结果表明 (图 3), 上调文库中获得 3 个基因片段与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 线粒体编码的细胞色素 c 氧化酶亚基 I (*CO I*) 核酸序列相匹配, 其长度分别为 339、198 和 410bp, 且可拼接成为 947 bp 的序列^[7]. 拼接位点的碱基均为 GT|AC, 与 Clontech PCR-SelectTM cDNA Subtraction Kit 试剂盒中 *Rsa* I 内切酶的酶切位点相吻合. 将 3 个基因片段与蛋白质基因数据库比对 (BLASTX) (RID = 1171535922-565-197640580089. BLASTQ2), 由图 3 可见, 这 3 个基因片段为赤子爱胜蚓编码 *CO I* 的线粒体基因序列. 此外, 将上述核酸序列与 Blastn NCBI 的 EST 数据库 (RID = 1171528506-18459-100863188237. BLASTQ2) 比对, 结果发现该基因片段与蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 在镉、铜和阿特拉津 (Atrazine) 污染胁迫差异表达的基因相匹配, 可见 *CO I* 基因对多种污染物的胁迫均有响应. 另一方面, 在上调文库 2 000 多个克隆中随机挑取并测序的 312 个克隆中, *CO I* 基因的重复率高达 32 次, 可见其上调表达丰度在总差异表达 cDNA 中占有比率很高.

2.3.2 细胞色素 c 氧化酶亚基 II

上调文库中另获得 3 个基因片段与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 线粒体编码的细胞色素 c 氧化酶亚基 II (*COX II*) 核酸序列同源, 其长度分别为 310、166 和 212 bp, 且这 3 个基因片段可以拼接起来成为 688 bp 的序列, 其拼接处的碱基均为 GTAC, 与 *Rsa* I 内切酶的酶切位点相吻合 (图 4). 将 3 个基因片段与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 细胞色素 c 氧化酶亚基 II 氨基酸序列比对 (RID: 1171531118-7721-20656985954. BLASTQ3), 如图 4 所示, 这 3 个基因片段为赤子爱胜蚓中编码 *CO II* 的线粒体基因序列. 同样, 将这个 *CO II* 基因片段与 NCBI 的 EST 数据库比对 (RID = 1171531647-28518-139119528566. BLASTQ2), 结果发现, 该序列在与蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 在镉、铜和阿特拉津 (Atrazine) 污染胁迫差异表达的基因相匹配, *CO II* 基因对苯并[a]芘污染胁迫也有响应. 在随机测序的 312 个上调克隆中, *CO II* 基因出现了 15 次, 可见 *CO II* 上调表达丰度在总差异表达 cDNA 中占有很高的比率.

2.3.3 细胞色素 c 氧化酶亚基 III

将上调文库中获得的长度为 175bp 基因片段与 NCBI 蛋白质数据库进行比对 (RID = 1171533705-28431-107546357961. BLASTQ3), 结果表明 (图 5), 该序列与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 线粒体编码的细胞

与gi|5835192|ref|NP_008238.1| cytochrome c oxidase subunit I [*Lumbricus terrestris*]Length = 513的比对结果, Score = 582 bits(1499), Expect=1e-164, Identities = 306/314 (97%), Positives = 308/314 (98%), Gaps = 0/314 (0%), Frame = +2

Query	2	LAGAITMLLTDRNLNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGAISHIVSHY	181
		LAGAITMLLTDRNLNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGAISHIVSHY	
Sbjct	199	LAGAITMLLTDRNLNTSFFDPAGGGDPILYQHLFWFFGHPEVYILILPGFGAISHIVSHY	258
Query	182	TAKLEPFGALGMIYAMLGIAVLGFIWAAHMFVGLDVDTRAYFTAATMIIAVPTGIKVF	361
		TAKLEPFGALGMIYAMLGIAVLGFIWAAHMFVGLDVDTRAYFTA T MIIAVPTGIKVF	
Sbjct	259	TAKLEPFGALGMIYAMLGIAVLGFIWAAHMFVGLDVDTRAYFTAVTMI IAVPTGIKVF	318
Query	362	SWLATLHGSKIKEYETPILWALGFIFLFTTGGLTGIIlsnssldiilHDTYYVVAHFHYVL	541
		SWLAT+HGSKIKEYETP+LWALGFIFLFTTGGLTGIIlsnssldiilHDTYYVVAHFHYVL	
Sbjct	319	SWLATIHGSKIKEYETPVLWALGFIFLFTTGGLTGIIlsnssldiilHDTYYVVAHFHYVL	378
Query	542	SMGAVFAIFAAFTHWFPLLTGLTLHQRWANAQFFLMFLGVNITFFPQHFLGLSGMPRRYS	721
		SMGAVFAIFAAFTHWFPLLTGLTLH RWANAQFFLMFLGVN TFFPQHFLGLSGMPRRYS	
Sbjct	379	SMGAVFAIFAAFTHWFPLLTGLTLHHRWANAQFFLMFLGVNTTFFPQHFLGLSGMPRRYS	438
Query	722	DYPDAFMKWNvvssfgsllsfvALMLFIFILWEAFASQRSVISSPHMPSALEWSDSTLPL	901
		DYPDAFMKWNVVSSFGSLLSFVALMLFIFILWEAFASQRSVISSPHM SALEWSD LPL	
Sbjct	439	DYPDAFMKWNVVSSFGSLLSFVALMLFIFILWEAFASQRSVISSPHMSSALEWSDPILPL	498
Query	902	DFHNLSETGIITYP 943	
		DFHNLSETGIITYP	
Sbjct	499	DFHNLSETGIITYP 512	

图 3 上调文库中 3 个基因片段拼合(上行)与同科蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)细胞色素 c 氧化酶亚基 I 氨基酸序列(下行)比对结果

Fig.3 Blastx result of a cDNA segment from *Eisenia fetida* Bap upregulated library (upper line) and *Lumbricus terrestris* cytochrome c oxidase subunit I(lower line)

与gi|984292|gb|AAC46865.1| cytochrome oxidase subunit II [*Lumbricus terrestris*]Length = 228的比对结果, Score = 346 bits (888), Expect = 5e-94, Identities = 205/220 (93%), Positives = 216/220 (98%), Gaps = 0/220 (0%), Frame = +1

Query	1	VMFQDAASSVMLQLISFHDHtlvlvltvvgyalla1MLNSHLNRYIQEAQTVETVWT	180
		VMFQDAASSVMLQL+SFHDH LLVLTLVLTVVGYALLALMLN +NRYI EAQTVET+WT	
Sbjct	7	VMFQDAASSVMLQLVSFHDHALLVLTLVLTVVGYALLALMLNKQVNRIMEAQTVETIWT	66
Query	181	ilpalillvlalpslrilyITDEVSQPSLTVKTIGHQWYWSYEYDFMNVEMDSYMLPTT	360
		ILPALILLVLALPSLRILYITDEVSQPS+TVKTIGHQWYWSYEYDF+NVEMDSYMLPT+	
Sbjct	67	ILPALILLVLALPSLRILYITDEVSQPSITVKTIGHQWYWSYEYDFLNVEMDSYMLPTS	126
Query	361	DLMPGDYRLLEVDNRVVVPMQLEIRMLITAADVIHSWTPALGVKVDVAPGRLNQIGFTT	540
		DL+PGDYRLLEVDNR+VVPMQLEIRMLITAADVIHSWTPALGVKVDVAPGRLNQIGFTT	
Sbjct	127	DLLPGDYRLLEVDNRMVVPMQLEIRMLITAADVIHSWTPALGVKVDVAPGRLNQIGFTT	186
Query	541	SQPGIFYGQCSEICGANHSFMPIAVEAINTKSFMNWVSNF 660	
		+QPG+FYGQCSEICGANHSFMPIAVEAINTKSFM+WVSNF	
Sbjct	187	TQPGVIFYGQCSEICGANHSFMPIAVEAINTKSFMSWVSNF 226	

图 4 素 c 上调文库中 3 个基因片段拼合(上行)与同科蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)细胞色素 c 氧化酶亚基 II 氨基酸序列(下行)比对结果

Fig.4 Blastx result of a cDNA segment from *Eisenia fetida* Bap upregulated library (upper line) and *Lumbricus terrestris* cytochrome c oxidase subunit II (lower line)

色素 c 氧化酶亚基 III (CO III)同源,可见该基因片段为赤子爱胜蚓编码 CO III 的线粒体基因序列. 同样,将 CO III 基因片段与 NCBI 的 EST 数据库比对(RID = 1171534406-32088-52212135784. BLASTQ3),未发现与蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 在镉、铜 和 阿 特 拉 津 (Atrazine)污染胁迫差异表达的基因序列. 可见 CO III 基因表达对苯并[a]芘污染胁迫响应的特异性. 此外,在随机测序的 312 个上调克隆中, CO III 基因出现 4 次,其差异表达丰度少于 CO I 和 CO II .

2.3.4 NADH 脱氢酶亚基 1

上调文库中获得 1 个基因片段,其长度为 270 bp. 与蚯蚓(*Lumbricus terrestris*)线粒体编码的 NADH 脱氢酶亚基 1 (NDH1)同源 RID = 1171538999-3900-144767354170. BLASTQ3). 可见该序列为赤子爱胜蚓编码 NDH1 的线粒体基因片段. 同样,将这个 NDH1 基因片段与 NCBI 的 EST 数据库比对 (RID: 1171539516-13371-153447551324. BLASTQ2), 结果发现与该序列同源的蚯蚓(*Lumbricus rubellus*)在镉和阿

特拉津污染胁迫差异表达的基因序列(图 6), 可见 *NDH1* 基因表达对苯并[a]芘污染胁迫有响应. 此外, 在随机测序的 312 个上调克隆中, *NDH1* 基因出现 2 次, 其差异表达丰度少于 *CO I* 和 *CO II*.

与gi|984294|gb|AAC46867.1| cytochrome oxidase subunit III [*Lumbricus terrestris*] Length = 259 的比对结果, Score = 116 bits (291), Expect = 3e⁻²⁵, Identities = 51/58 (87%), Positives = 54/58 (93%), Gaps = 0/58, (0%) Frame = +2

Query	2	FHILVEYSPWPLTSSMGAFTLAIGLASWFIINIGITCLILAAFLIIISMFQWWRDVIREG	175
		FHLVEYSPWPLTSS+GAFTLAIGLASWFHNHG CL LAAFLII+SM QWWRDV+REG	
Sbjct	6	FHLVEYSPWPLTSSIGAFTLAIGLASWFHNHGFLCLTLAAFLIIVSMIQWWRDVVREG	63

图 5 上调文库中 1 个基因片段与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) *CO III* 氨基酸序列比对结果

Fig.5 Blastx result of a cDNA segment from *Eisenia fetida* Bap upregulated library (upper line) and *Lumbricus terrestris* cytochrome c oxidase subunit III (lower line)

与gi|984301|gb|AAC46874.1|NADH dehydrogenase subunit 1 [*Lumbricus terrestris*]Length = 308 的比对结果, Score = 170 bits(430), Expect = 2e⁻⁴¹, Identities = 77/89 (86%), Positives = 85/89 (95%), Gaps = 0/89 (0%), Frame = +2

Query	2	ALVAMAFYTLMERKFLGYFHLRKGPKNVGLMGIPQPFADAIKLFVKEQASPTPSNQLPFL	181
		AL+AMAFYTLMERKFLGYFHLRKGPKNVGLMG+PQPFADAIKLFVKEQA P PSNQ PFL	
Sbjct	16	ALLAMAFYTLMERKFLGYFHLRKGPKNVGLMGLPQPFADAIKLFVKEQAKPNP'SNQTIPFL	75
Query	182	LAPTMGLILAIMMWIYPHSHQSFYLQFS	268
		APTMGL+LA++MW+IYPHSHQSF++QF'S	
Sbjct	76	FAPTMGLVLALLMWVIYPHSHQSFFIQFS	104

图 6 上调文库中 1 个基因片段与同科蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) *NADH* 脱氢酶亚基 1 序列比对结果

Fig.6 Blastx result of a cDNA segment from *Eisenia fetida* Bap upregulated library (upper line) and *Lumbricus terrestris* NADH dehydrogenase subunit 1 (lower line)

2.3.5 ATP 合酶亚基 6

在上调文库中发现 1 个基因片段, 长度为 212bp, 与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 线粒体编码的 ATP 合酶亚基 6 同源 (RID = 1171541406-25464-104088471479.BLASTQ2), 可见该序列为赤子爱胜蚓编码 ATP 合酶亚基 6 的线粒体基因片段. 同样, 将其与 NCBI 的 EST 数据库比对 (RID = 1171541790-30557-207252325373.BLASTQ2), 结果发现与该序列

同源的蚯蚓 (*Lumbricus rubellus*) 在镉、铜和阿特拉津污染胁迫差异表达的基因序列(图 7). 可见 ATP 合酶亚基 6 基因表达也对苯并[a]芘污染胁迫有响应. 此外, 在随机测序的 312 个上调克隆中, ATP 合酶亚基 6 基因出现 4 次, 其差异表达丰度较高.

2.4 B[a]P 上调文库中线粒体编码基因在线粒体基因组中的分布及功能

蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) 线粒体 DNA 基因

与gi|984297|gb|AAC46870.1| ATP synthase subunit 6 [*Lumbricus terrestris*] Length=231 的比对结果, Score=111 bits (277), Expect = 1e⁻²³, Identities = 52/70 (74%), Positives = 61/70 (87%), Gaps = 0/70 (0%), Frame = +1

Query	1	IFSSFDPYMYNTLFPNTSMFLMMNTLIIILMLQSSFWMNSRISTLKSPVKDTIFTQLSRT	180
		IFSSFDPYM+NTLFP NS+FL+ NT ILLM+QSSF++N+R S KSPV DTIFTQLSRT	
Sbjct	5	IFSSFDPYMFNTLFPILNSLFLVTNTATILMTQSSFVVLNARTSAFKSPVNDTIFTQLSRT	64
Query	181	SGLHLKGLTS	210
		S HLGKL++	
Sbjct	65	STTHLKGLST	74

图 7 上调文库中 1 个基因片段与蚯蚓 (*Lumbricus terrestris*) ATP 合酶亚基 6 的序列比对结果

Fig.7 Blastx result of a cDNA segment from *Eisenia fetida* Bap upregulated library (upper line) and *Lumbricus terrestris* ATP synthase subunit 6 (lower line)

组^[4,7]编码 13 个蛋白(包括 NADH 脱氢酶亚基 1~6, NADH 脱氢酶亚基 4 L, 细胞色素 c 氧化酶亚基 I~III, 细胞色素 b, ATP 合酶亚基 6 和 ATP 合酶亚基 8), 2 个 rRNA (s- 和 I-rRNA) 以及 22 个 tRNA, 共 37 个基因, 具体结构如图 8 所示. 本试验中发现的 5 个

线粒体编码多肽基因, 在图 8 中的线粒体基因组结构中分别为 *CO I*、*CO II*、*CO III*、*A6* 和 *ND1*. 从实验结果可见, B[a]P 对各蚯蚓线粒体基因表达的影响不一致, 有些基因无上调表达, 而上调表达的 5 个基因中其上调程度不一致, 具体的表达影响程度还需

进一步地定量研究.

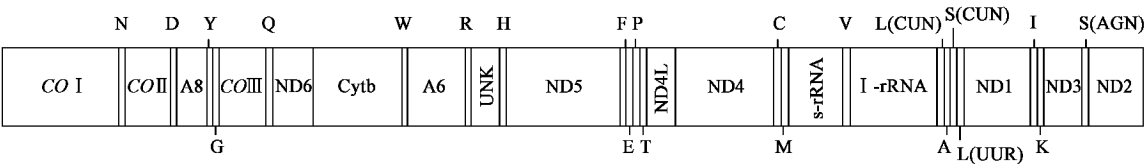
细胞色素 c 氧化酶(cytochrome c oxidase)为呼吸链复合酶体Ⅳ,共有 13 个亚基,是线粒体电子传递链末端的酶体^[8].其主要功能是将电子从细胞色素 c 传递给 O₂ 分子,直接将氧分子还原成水,同时起生化抗氧第一道防线的作用^[9].

NADH 脱氢酶(NADH dehydrogenase)即呼吸链复合酶体 I,又称 NADH-CoQ 还原酶复合酶体.NADH 脱氢酶可抑制细胞内活性氧分子(ROS, reactive oxygen species)过量生成^[10~12].NADH 脱氢酶亚基的上调表达,起到应对外源污染氧化胁迫的抗氧化作用,以减轻细胞氧化损伤^[13].

线粒体 ATP 合酶是线粒体产生 ATP 的关键酶,

其表达水平与线粒体的能量代谢功能直接相关.本研究发现的 B[a]P 诱导线粒体编码的 ATP 合酶亚基转录水平的上调,是线粒体呼吸率上调的表征.Shertzer 等发现^[5],TCDD 使线粒体琥珀酸氧化酶和细胞色素 c 氧化酶的活性升高,而辅酶 Q 显著下降,加快了呼吸链复合物Ⅲ(又称 CoQH₂-细胞色素 c 还原酶复合物)的氧化还原循环,使细胞内的呼吸率提高,细胞内的活性氧含量随之增高,但细胞内 ATP 含量下降,ATP 合成酶的功能出现障碍.由此可见,B[a]P 诱导 ATP 合成酶上调表达不仅增加了细胞内氧化胁迫,也刺激相应的抗氧化酶表达和活性的提高.

2.5 线粒体编码基因上调表达的影响因素分析



CO I ~ CO III 分别表示细胞色素 c 氧化酶亚基 I ~ III, A6 和 A8 表示 ATP 合酶亚基 6 和 8, ND1 ~ 6 和 ND4 L 分别表示 NADH 脱氢酶亚基 1 ~ 6 和亚基 4 L, Cytb 表示细胞色素 b, UNK 表示功能未知的结构域,其余 N、D、Y、G、Q、W、R、H、F、E、P、T、C、M、V、L、S、A、L、I、K、S 等单个大写字母为氨基酸缩写,对应相应的 tRNA

图 8 蚯蚓线粒体基因组结构示意图^[7]
Fig.8 Mitochondrial genome of the common earthworm, *Lumbricus terrestris*

活性氧分子(reactive oxygen species, ROS)可使哺乳动物细胞浆中转录因子 NF- κ B 的无活性形式(由 NF- κ B 二聚体和一个抑制亚基 I κ B 组成)释放出有活性的 NF- κ B 二聚体进入核内,与位于受 NF- κ B 调控的基因上游增强子结合,使该基因转录增强.涉及的基因包括引起炎症反应基因、免疫细胞调节基因、分化基因等.因此,ROS 又被称为“逆向调节”的第二信使^[15~20].

从前面的分析可以看出,低浓度 B[a]P 诱导上调了线粒体 DNA 编码基因的转录表达,其中 NADH 脱氢酶亚基 1、细胞色素 c 氧化酶亚基 I ~ III、ATP 合酶亚基 6 均为呼吸链重要的酶,这些酶的上调表达提高了线粒体呼吸率并导致细胞内活性氧的增加,而活性氧的增加导致线粒体 COX 亚基和 ATP 合成酶亚基表达的增强^[21~23].

人类多种疾病与线粒体基因表达异常相关^[24~27].同样,污染胁迫引起蚯蚓线粒体编码基因表达的异常,对其正常的生理功能产生不良的影响,并最终可能对个体生存乃至生态系统产生影响.从本研究中对上调基因的 EST 数据库比对结果可知,

5 个线粒体编码的多肽亚基中有 4 个在铜、镉、荧蒹和阿特拉津诱导下中均有异常表达,可见 mtDNA 编码基因表达的异常对外源污染物氧化胁迫具有广谱标记,可作为污染生态毒理监测和生态风险评价的指标.

3 结论

土壤低剂量 B[a]P 诱导条件下,蚯蚓线粒体编码 5 个基因为上调表达,它们分别为细胞色素 c 亚基 I ~ III、NADH 脱氢酶亚基 1、ATP 合酶亚基 6 多肽基因.由于这 5 个基因是线粒体呼吸链酶复合体的重要组成部分,可见土壤低剂量 B[a]P 污染对蚯蚓细胞线粒体呼吸产生了较大冲击.一方面,提高了线粒体呼吸效率和 ATP 产生量;另一方面,增加了细胞活性氧分子含量及细胞氧化损伤.土壤中苯并[a]芘污染改变了蚯蚓线粒体基因组的表达水平,线粒体基因组表达异常是多环芳烃污染胁迫的重要分子生物标记物.但与线粒体呼吸链酶亚基协同转录机制所不同的是,本研究在对苯并[a]芘诱导的 312 个上调克隆测序结果中,仅发现线粒体编码的呼吸

链酶亚基, 却未发现细胞核编码的亚基及相关的呼吸链酶亚基转录因子, 表明很可能存在其他调节线呼吸链酶亚基表达的机制, 才使得线粒体编码的呼吸链酶亚基单独上调表达. 此外, 将本实验结果与 NCBI 网站 EST 数据库的数据检索分析比对, 发现 5 个上调表达基因中有 4 个对其他污染物(铜、镉、阿特拉津)胁迫也具有响应, 可见这些 mtDNA 编码基因表达异常具有广谱分子标记物特征. 可将其作为土壤外源污染物生态毒性诊断的敏感生物标记物.

参考文献:

[1] 吴庆龙, 孔志明, 陈开宁. 太湖主要入出湖河道非挥发性有机提取物致突变性分析[J]. 海洋与湖沼, 1998, **29**(5): 514-519.

[2] 董玉瑛, 冯霄. 持久性有机污染物分析和处理技术研究进展[J]. 环境污染治理技术与设备, 2003, **6**: 49-55.

[3] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩. 多环芳烃菲污染土壤的蚯蚓细胞色素 P450 生物标记诊断[J]. 毒理学杂志, 2005, **19**(增刊): 311-312.

[4] Spurgeon D J, Weeks J M, Cornelius A M, *et al.* A summary of eleven years progress in earthworm Ecotoxicology[J]. Pedobiologia, 2003, **47**: 588-606.

[5] Shertzer H G, Genter M B, Shen D X, *et al.* TCDD decreases ATP levels and increases reactive oxygen production through changes in mitochondrial FOF1-ATP synthase and ubiquinone[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, **15**(3): 367-374.

[6] Song Y F, Jing X, Fleischmann S, *et al.* Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments[J]. Chemosphere, 2002, **48**: 993-1001.

[7] Boore J L, Brown W M. Complete Sequence of the Mitochondrial DNA of the Annelid Worm *Lumbricus terrestris*[J]. Genetics, 1995, **141**: 305-319.

[8] Ongwijitwat S, Wong-Riley M T. Is nuclear respiratory factor 2 a master transcriptional coordinator for all ten nuclear-encoded cytochrome c oxidase subunits in neurons [J]. Gene, 2005, **360**: 65-77.

[9] Pridgeon J W, Liu N N. Overexpression of the cytochrome c oxidase subunit I gene associated with a pyrethroid resistant strain of German cockroaches *Blattella germanica* (L.) [J]. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 2003, **33**(10): 1043-1048.

[10] Seo B B, Marella M, Yagi T, *et al.* The single subunit NADH dehydrogenase reduces generation of reactive oxygen species from complex I[J]. FEBS Letters, 2006, **580**: 6105-6108.

[11] Verkaar S, Koopman W J H, Sjenet E, *et al.* Superoxide production is inversely related to complex I activity in inherited complex I deficiency [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007, **1772**: 373-381.

[12] Merlo-Pich M, Raule N, Catani L, *et al.* Increased transcription of mitochondrial genes for Complex I in human platelets during ageing

[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2005, **1723**: 302-308.

[13] Park J S, Li Y F, Bai Y. Yeast NDH improves oxidative phosphorylation capacity and increases protection against oxidative stress and cell death in cells carrying a Leber's hereditary optic neuropathy mutation [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2007. doi: 10.1016/j.bbadis.2007.01.009.

[14] Reyes A, Mezzina M, Gadaleta G. Human mitochondrial transcription factor A (mtTFA): gene structure and characterization of related pseudogenes[J]. Gene, 2002, **291**: 223-232.

[15] Scarpulla Ri C. Transcriptional activators and coactivators in the nuclear control of mitochondrial function in mammalian cells [J]. Gene, 2002, **286**: 81-89.

[16] Wu Z, Puigserver P, Andersson U, *et al.* Mechanisms Controlling Mitochondrial Biogenesis and Respiration through the Thermogenic Coactivator PGC-1[J]. Cell, 1999, **98**: 115-124.

[17] Kain K H, Popov V L, Herzog N K. Alterations in mitochondria and mtTFA in response to LPS-induced differentiation of B-cells [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2000, **1494**: 91-103.

[18] McCulloch V, Shadel G S, Shadel G S A. Human mitochondrial transcription factor is related to RNA adenine methyltransferases and binds S-adenosylmethionine[J]. Molecular and Cellular Biology, 2002, **22**: 1116-1125.

[19] Kepley C L, Lauer F T, Oliver J M, *et al.* Environmental polycyclic aromatic hydrocarbons, benzo(a) pyrene (BaP) and BaP-quinones, enhance IgE-mediated histamine release and IL-4 production in human basophils [J]. Clinical Immunology, 2003, **107**: 10-19.

[20] Perez-de-Arce K, Foncea R, Leighton F. Reactive oxygen species mediates homocysteine-induced mitochondrial biogenesis in human endothelial cells: Modulation by antioxidants [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2005, **338**: 1103-1109.

[21] Lee H C, Wei Y H. Mitochondrial biogenesis and mitochondrial DNA maintenance of mammalian cells under oxidative stress [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2005, **37**: 822-834.

[22] Noack H, Bednarek T, Heidler J, *et al.* TFAM-dependent and independent dynamics of mtDNA levels in C2C12 myoblasts caused by redox stress [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2006, **1760**: 141-150.

[23] Garesse R, Vallejo C G. Animal mitochondrial biogenesis and function: a regulatory cross-talk between two genomes[J]. Gene, 2001, **263**: 1-16.

[24] 蔡明春, 柳君泽. 动物线粒体内的蛋白翻译[J]. 第四军医大学学报, 2001, **22**: 53-55.

[25] 陆松敏. mtDNA 与缺血缺氧性细胞损伤及疾病的关系[J]. 中国病理生理杂志, 2001, **17**: 1104-1105.

[26] 时多, 王璐, 周运恒, 等. 线粒体基因表达的调控及其与某些疾病的关系[J]. 生命的化学, 2006, **26**(3): 250-252.

[27] 李建明, 周红, 蔡黔, 等. 过氧化氢对肠上皮细胞线粒体编码基因 mRNA 的影响[J]. 第三军医大学学报, 2002, **24**: 267-270.