

全氟辛烷磺化物 (PFOS) 诱导斑马鱼 胚胎 p53 基因的点突变*

陈蔚丰¹ 赵庆顺² 尹大强^{3**}

(1 南京大学环境学院, 污染控制与资源化国家重点实验室, 南京, 210093; 2 南京大学模式动物研究所, 南京, 210061;

3 同济大学环境科学与工程学院, 污染控制与资源化国家重点实验室, 上海, 200092)

摘 要 将斑马鱼胚胎于 $0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ (空白对照), $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $16\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 全氟辛烷磺化物 (PFOS) 溶液中暴露染毒 5h, 采用变性高效液相色谱方法对 PCR 扩增的含斑马鱼胚胎 p53 基因外显子 7 的 173 bp 的目标片段进行突变分析. 结果显示, $16\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 两个处理组与对照组相比均有显著性差异, 表明 PFOS 可以诱导斑马鱼胚胎 p53 基因外显子 7 的点突变.

关键词 全氟辛烷磺化物, 斑马鱼胚胎, 点突变, p53 基因.

全氟辛烷磺化物 (PFOS) 可以在有机生物体内聚积, 水生生物对 PFOS 有较强的富积作用. 水中的 PFOS 通过水生生物的富积作用和食物链向包括人类在内的高位生物转移^[1]. 研究人员对 PFOS 的遗传毒性进行了广泛的研究, 研究结果表明水生生物尤其是鱼类由于对致癌物敏感, 而且可以直接指示水环境中存在的致癌物, 是一种理想的用来进行致癌物检测和筛选的模式系统^[2-3]. 相对于成年斑马鱼, 其胚胎具有一些独特的优点: 胚胎体外发育, 并且透明, 易于观察; 斑马鱼胚胎对有害物质相对于成鱼更加敏感; 发生的基因突变易保留, 并可进行发育毒性研究.

本文以斑马鱼胚胎 p53 基因为目标功能基因, 通过变性高效液相色谱 (DHPLC) 方法, 研究低剂量 PFOS 对鱼类 DNA 功能基因的损伤, 从分子水平上分析和验证 PFOS 的致点突变性.

1 实验部分

1.1 PFOS 暴露染毒

选择体格健壮、体表无伤的个体作为亲鱼. 将成年斑马鱼 (雌雄鱼数量比为 1:1) 混合饲养在经生物滤器过滤并充分曝气的水中, 水温 $26\pm 1^\circ\text{C}$, 光暗比 14 h: 10 h. 当早上由暗转光时, 斑马鱼会产卵, 收集斑马鱼胚胎用于暴露染毒试验.

将 PFOS 溶于 0.1% DMSO, 设 $5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $16\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 3 个 PFOS 暴露浓度, 同时设置空白对照, 将斑马鱼胚胎暴露染毒 5h.

1.2 斑马鱼胚胎基因组 DNA 提取

胚胎中加入 500 μL 消化液, 于在 37°C 水浴消化 5h, 每半小时震荡悬浮一次. 消化产物与同等体积的平衡苯酚轻轻混合, 形成乳状, 以 4000g 离心 10min, 用大孔吸管移出水相, 再用同等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 2) 抽提两次. 将水相转移到新的离心管中, 加入 1/10 体积的 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOAc 和 2.5 倍体积的冰乙醇, 轻轻混合, 使 DNA 沉淀下来, 室温下 3000g 离心 10min. 沉淀用适量 70% 乙醇漂洗, 晾干, 在 TE 缓冲液 ($10\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, $100\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaCl, $100\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ DNase-free Nase A, $1\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH 8.0) 中再悬浮, 于 37°C 下培养 30min, 再用同等体积的苯酚: 氯仿: 异戊醇抽提两次. 将水相转移到新的离心管中, 加入 1/10 体积的 $3\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NaOAc 和 2.5 倍体积的冰乙醇, 轻轻混合, 使 DNA 沉淀下来, 室温下 3000g 离心 10min. 沉淀用适量 70% 乙醇漂洗, 晾干, 溶于适量无菌水中.

2008 年 5 月 19 日收稿.

* 国家自然科学基金 (20577022) 资助项目. ** 责任作者: yindq@mail.tongji.edu.cn

1.3 斑马鱼 p53基因片段扩增

根据斑马鱼 p53基因全序列 (GenBank number NW_634667), 从中找出一个片段, 长 173 bp 包含了 p53基因的外显子 7, 以它为目标片段, 设计引物 (由上海英俊生物技术有限公司合成), 以提取的基因组 DNA 为模版进行 PCR 扩增 (图 1). 正向引物为: 5'-GTTTAAACAGTCACATTTTCCT-3', 反向引物为: 5'-ACAAGAGGAGGAATCAAATA-3'. PCR 参数为: 95°C 起始变性 1 min, 94°C 变性 40 s, 52°C 退火 30 s, 72°C 延伸 30 s, 循环 30 次, 最后在 72°C 延伸 10 min. 取 1 μ l PCR 产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳检测.

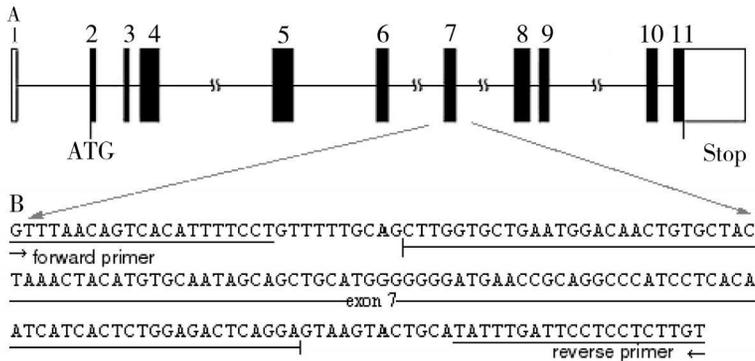


图 1 斑马鱼 p53 基因结构及扩增目标片段图

Fig 1 The Structure of Zebrafish p53 gene and sequence of the 173 bp genomic fragment with primers used in PCR underlined

1.4 分子亚克隆与阳性克隆鉴定

分子亚克隆: 将纯化后的 PCR 产物与 PMD18-T 载体在 4°C 下连接过夜, 连接反应体系 (10 μ l) 中包含 50 ng \cdot μ l⁻¹ PMD18-T 载体 0.5 μ l, 高效连接液 1.5 μ l, PCR 纯化产物 4.5 μ l. 将 10 μ l 连接产物加入 100 μ l 大肠杆菌感受态细胞中, 冰上放置 30 min, 在 42°C 水浴中热激 60 s, 然后重新放在冰上 2 min, 加入 125 μ l SOC 培养基, 37°C 振摇 (200 r \cdot min⁻¹) 培养 45 min, 涂布 B+ ampicillin 平板, 37°C 培养过夜.

阳性克隆鉴定: 挑取 B+ ampicillin 平板上的白色克隆, 接种入 1.5 ml B+ ampicillin 液体培养基中, 37°C 振摇 (200 r \cdot min⁻¹) 培养 6 h, 以 12000 g 离心 2 min, 移去上清液 (留 100 μ l 菌液加入 80% 灭菌甘油 (1:1), -80°C 保种); 用 40 μ l 1 \times STE 缓冲液再悬浮菌体, 加入 40 μ l 苯酚: 氯仿 (1:1) 溶液振荡抽提; 12000 g 离心 2 min, 直接用上清液做阳性克隆的 PCR 鉴定. 如果克隆成功, 则用外显子 7 的引物可以扩增出特异性的条带.

1.5 高效变性液相色谱 (DHPLC) 分析

以筛选到的插入目标片段的阳性克隆为模版, 重新进行 PCR 扩增目标片段. 每 4 个 PCR 产物为一组, 等比混合, PCR 混合产物进行缓慢变性, 条件为 95°C 起始变性 5 min, 94.5°C 变性 20 s, 以后每 20 s 一个循环降低 0.5°C, 缓慢降温到 25°C, 以形成同源和异源双链 DNA 分子混合物.

将 PCR 样品放入 DHPLC 进样室, 输入被检测片段的序列. 设定每次进样 8 μ l, 注入 DNA Sep 检测柱内. 根据本实验室之前的研究确定该片段的最优化检测条件, 选择检测柱温 60°C. 如果 DHPLC 峰型图谱显示, 在混合样品中有异源双链存在, 4 个样品将分别与标准片段的 PCR 样品混合, 再次进行 DHPLC 分析, 以确定发生目标片段基因突变的阳性克隆.

实验结果用 Spss 软件进行独立 t 检验统计分析.

2 结果与讨论

DHPLC 检测结果表明, 当检测样品中不存在突变位点时, DHPLC 的峰型图谱显示为一个尖锐的单峰 (图 2A), 而含有突变成分的样品在 DHPLC 图谱上出现两个或两个以上的峰型 (图 2B, C).

D). 以斑马鱼胚胎基因组 DNA 为模版扩增的 PCR 产物中, 发现了不同序列的目标片段 (图 2B, C, D), 在检测的 1230 个阳性克隆子的 PCR 产物中, 81 个被 DHPLC 检测到了碱基突变 (表 1)

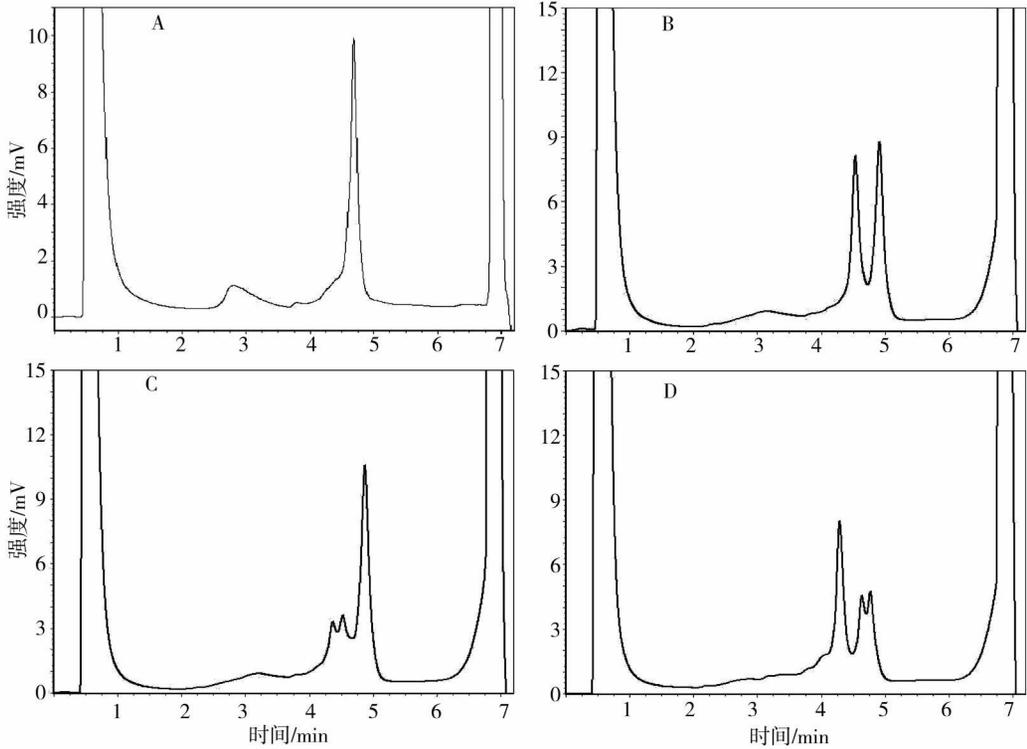


图 2 DHPLC 筛查突变峰型图

Fig. 2 DHPLC analysis showing whether heteroduplex molecules were present

表 1 斑马鱼胚胎 p53 基因外显子 7 片段的 DHPLC 筛查突变克隆数

Table 1 Number of mutated molecules in zebrafish p53 gene exon 7 detected by DHPLC

PFOS 暴露浓度 / $\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$	斑马鱼胚胎编号	筛查克隆数	DHPLC 检测突变克隆数	突变率 /%
0	A0	96	3	3.13
	B0	104	3	2.88
	C0	107	6	5.61
	Subtotal	307	12	3.91
5	A1	113	6	5.31
	B1	98	6	6.12
	C1	115	3	2.61
	Subtotal	326	15	4.60
16	A2	110	10	9.09
	B2	108	8	7.41
	C2	106	9	8.49
	Subtotal	324	27	8.33
50	A3	95	10	10.53
	B3	94	8	8.51
	C3	84	9	10.71
	Subtotal	273	27	9.89

由表 1 可见, 在 $50\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 、 $16\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 和 $5\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 浓度 PFOS 暴露组中, 分别筛选了 273、324 和 326 个插入目标片段的阳性克隆进行点突变筛查, 经 DHPLC 检测得到的突变克隆数目为 27、27 和 15; 而在空白对照组 ($0\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$) 筛查的 307 个阳性克隆中, 只有 12 个检测到了突变。 $50\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$,

$16\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$, $5\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 和空白对照组中, 克隆突变率分别为 $9.89\% \pm 1.22\%$, $8.33\% \pm 0.85\%$, $4.60\% \pm 1.84\%$ 和 $3.91\% \pm 1.51\%$. 统计学分析结果表明, $50\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 和 $16\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ PFOS处理组的克隆突变率与空白对照组的克隆突变率有显著性差异 ($p = 0.006$ 和 $p = 0.011$), $5\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ PFOS处理组的克隆突变率与空白对照组的克隆突变率没有显著性差异 ($p = 0.588$); 在三个暴露浓度之间, $50\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 和 $16\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ PFOS处理组的克隆突变率与 $5.0\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ PFOS处理组的克隆突变率具有显著性差异 ($p < 0.05$).

含外显子 7 的斑马鱼 p53 基因样本片段的 DHPLC 突变检测分析表明^[4], 通过克隆测序方法检测出的点突变, 用 DHPLC 同样可以检出, 并摸索到了 DHPLC 检测该片段突变的最优化条件. 本实验在此基础上, 利用 DHPLC 高通量筛查 PFOS 诱导的基因点突变.

目前, PFOS 已经在全世界范围内的许多环境介质和人体、动物体中广泛存在. 在 Olsen 的研究中, PFOS 在男性受测者血清中的平均浓度为 $18.2\text{ng}\cdot\text{m}\Gamma^{-1}$, 女性为 $17.2\text{ng}\cdot\text{m}\Gamma^{-1}$, 而肝脏中男女平均浓度则分别为 $19.2\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $18.4\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[5]. 遗传毒性研究认为, PFOS 无致突变作用和染色体畸变作用, 而我们的研究则显示, $50\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 和 $16\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ PFOS 处理组的克隆突变率显著高于空白对照组的克隆突变率.

另外, PFOS 暴露同大多数癌症的死亡率无显著相关^[6]. 暴露于高浓度 PFOS 下工作最少一年的男性工人的膀胱癌死亡率却有显著提高. 而最近的研究却不能为膀胱癌和 PFOS 暴露之间的联系提供支持^[7]. 因此, 由于样本的有限性, 我们还不能就 PFOS 的暴露同癌症的关系作出判断. 抑癌基因 p53 是迄今为止发现的与人类肿瘤相关性最高的基因, 人类 50% 肿瘤与 p53 基因突变有关^[8]. 因此, 研究 p53 基因突变对于研究 PFOS 的遗传毒性具有重要意义.

大部分化学物质的致突变及致癌过程是非常复杂的, 涉及大量基因和相关通路^[9]. 在对生物体内繁多的生化反应和生理过程尚没有完全了解的情况下, 要阐明毒物的致突变和致癌机制是相当困难的. 外来化合物作用于组织 DNA 后, 导致 DNA 损伤, 但这时 DNA 结构的改变并不是真正的基因型突变, 而是“前突变”. 前突变成形之后, 经过细胞的修复, DNA 恢复到原来的正常结构. 只有少数在进一步复制过程中按诱变机理转变为突变状态, 即只有当修复无效或修复中出现错误时才表现突变或个体的死亡. 点突变是导致遗传性疾病的重要原因之一, 已证明许多疾病就是由于基因的点突变造成的, 点突变往往造成表达蛋白质氨基酸序列的紊乱, 使得表达蛋白失去原有的功能, 造成功能障碍. 本研究的结果表明, $16\mu\text{g}\cdot\Gamma^{-1}$ 浓度的 PFOS 暴露就能诱导斑马鱼胚胎的 p53 基因外显子 7 片段发生碱基突变, 揭示了 PFOS 具有潜在的致癌性, 其致癌机理可能与其诱导功能基因突变有关.

参 考 文 献

- [1] Seacat AM, Thornford P J, Hansen K J et al, Subchronic Toxicity Studies on Perfluorooctanesulfonate Potassium. Salt in Cynomolgus Monkeys *Toxicol Sci*, 2002, **68**: 249—264
- [2] Langheirich U, Hennen E, Stott G et al, Zebrafish as a Model Organism for the Identification and Characterization of Drugs and Genes Affecting p53 Signaling *Current Biology*, 2002, **12**: 2023—2028
- [3] Amanuma K, Takeda H, Amanuma H et al, Transgenic Zebrafish for Detecting Mutations Caused by Compounds in Aquatic Environments *Nature Biotech*, 2000, **18**: 62—65
- [4] Yin Daqiang, Gu Ying, Li Yan et al, Pentachlorophenol Treatment in vivo Elevates Point Mutation Rate in Zebrafish p53 Gene Mutation Research, 2006, **609**: 92—101
- [5] Olsen G W, Hansen K J, Stevenson L A et al, Human Donor Liver and Serum Concentrations of Perfluorooctanesulfonate and Other Perfluorochemicals *Environ Sci Technol*, 2003, **37**: 888—891
- [6] Alexander B H, Olsen G W, Burris J M et al, Mortality of Employees of a Perfluorooctanesulfonate Manufacturing Facility. *Occup Environ Med*, 2003, **60**: 722—729
- [7] Alexander B H, Olsen G W, Bladder Cancer in Perfluorooctanesulfonate Manufacturing Workers *Ann Epidemiol*, 2007, **6**: 471—478
- [8] Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, p53 Mutations in Human Cancers *Science*, 1991, **253**: 49—53
- [9] Splaing J W, French J E, Stasiewicz S et al, Responses of Transgenic Mouse Lines p53+/- and TgAC to Agents Tested in Conventional Carcinogenicity Bioassays *Toxicol Sci*, 2000, **53**: 213—223

TREATMENT WITH PFOS CAUSES POINT MUTATIONS IN ZEBRAFISH EMBRYOS GENOME

CHEN Weifeng¹ ZHAO Qing-shun² YN Da-qiang³

(1 School of the Environment, State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Nanjing University, Nanjing 210093, China;

2 Model Animal Research Center, Nanjing University, Nanjing 210061, China; 3 College of Environmental Science and Engineering,

State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, Tongji University, Shanghai 200092, China)

ABSTRACT

Perfluorooctane sulfonate (PFOS) levels in nonoccupational male and female donors were $18.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ for male, $17.2 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ for female in serum. The research on PFOS's genotoxicity has been conducted, but whether it can be involved in inducing point mutations in genome is unknown. To determine the genotoxicity of PFOS on vertebrate, we first treated zebrafish embryos with PFOS for 5 hours at 0 (control), 5, 16 and $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively, to determine whether PFOS could be involved in inducing point mutations. Employing denaturing high-performance liquid chromatography analysis, we demonstrated that exposure of PFOS to zebrafish embryos at a concentration as low as $16 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for 5 hours elevates point mutation rate in p53 gene.

Keywords perfluorooctane sulfonate; point mutation; zebrafish embryos; p53 gene

2007年化学类期刊(中文)高被引指数

序号	期刊名称	五年影响因子	五年被引频次	序号	期刊名称	五年影响因子	五年被引频次
1	分析化学	1.371	2681	18	化学通报(印刷版)	0.818	670
2	环境化学	1.202	834	19	分析实验室	0.797	1076
3	色谱	1.179	1109	20	应用化学	0.779	1258
4	催化学报	1.170	1195	21	影像科学与光化学	0.765	238
5	化学进展	1.134	685	22	高分子材料科学与工程	0.757	1370
6	化学学报	1.108	2287	23	分子科学学报	0.727	224
7	高分子学报	1.089	1014	24	分析科学学报	0.688	677
8	燃料化学学报	1.079	761	25	化学研究与应用	0.562	819
9	分析测试学报	1.070	1103	26	广州化学	0.528	130
10	物理化学学报	0.949	1310	27	电化学	0.510	198
11	无机化学学报	0.899	1509	28	化学研究	0.459	224
12	高等学校化学学报	0.898	2695	29	化学与生物工程	0.439	400
13	有机化学	0.896	1207	30	化学试剂	0.436	408
14	高分子通报	0.869	423	31	合成化学	0.405	337
15	中国科学 B 辑	0.861	232	32	化学与黏合	0.394	233
16	煤炭转化	0.851	354	33	化学分析计量	0.367	247
17	分子催化	0.839	418				