

## 以应激蛋白为生物标志物研究低浓度 2-硝基-4'-羟基二苯胺对鲫鱼肝脏和脑组织的动态暴露的影响\*

沈 骅, 孙媛媛, 张景飞, 王晓蓉\*\*

(南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

**摘 要:**采用实验室模拟方法,以鲫鱼(*Carassius auratus*)作为实验动物,运用 SDS-PAGE 和 Western Blotting 方法,研究了在不同暴露时期,1mg/L 2-硝基-4'-羟基二苯胺对鲫鱼肝脏和脑组织应激蛋白 HSP70 诱导表达的情况.结果表明:应激蛋白 HSP70 对 2-硝基-4'-羟基二苯胺非常敏感.在鲫鱼暴露 2d 后,脑组织中 HSP70 与对照组相比,有显著的表达( $p < 0.05$ );在鱼体暴露 7d 后,肝脏组织中 HSP70 与对照组有显著的诱导表达( $p < 0.05$ );随着暴露天数的增加,肝脏组织和脑组织 HSP70 表达也显著增加,且存在着较好的时间-效应关系.可考虑将应激蛋白 HSP70 作为 2-硝基-4'-羟基二苯胺污染在水生生态系统中的一种敏感的生物标志物.

**关键词:** 2-硝基-4'-羟基二苯胺 HC Orange ; 应激蛋白; 生物标志物; HSP70; Western Blotting

## Dynamic Effects of Low-level 2-nitro-4'-hydroxydiphenylamine on the Induction of HSP70 in the Fish Livers and Brains

SHEN Hua, SUN Yuanyuan, ZHANG Jingfei & WANG Xiaorong\* \*

(State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment Science, Nanjing University, Nanjing 210093 P. R. China)

**Abstract:** *Carassius auratus* was chosen as the experimental materials to study the dynamic effects of 1mg/L 2-nitro-4'-hydroxydiphenylamine on the induction of HSP70 in the fish livers and brains. Using the SDS-PAGE and Western Blotting techniques, the expression level of HSP70 in the fish livers and brains was evaluated. As shown from the results, 2-nitro-4'-hydroxydiphenylamine treatment resulted in a time-dependent elevation in HSP70 expression at 2, 4, 7, 10 and 16 days exposure. Comparing with the control group, the HSP70 in the fish brains and livers began to express significantly after being exposed for 4 days and 7 days respectively. The expression level of HSP70 was enhanced with the exposure days increasing and showed a good time-effect relationship. Results from this study suggest that HSP70 as an environmental biomarker can be a sensitive and rapid indicator in the aquatic ecosystem.

**Keywords:** 2-nitro-4'-hydroxydiphenylamine; HC Orange 1; heat shock protein; biomarker; HSP70; Western Blotting

染发剂是一种特殊用途的化妆品,它们成分复杂,有的染发剂含有 20 多种化学物质,这些化学物质能通过多种途径排放到自然界中,通过迁移转化,其污染范围可进一步扩大.实验证明染发剂能破坏表皮屏障而进入生物体内,导致体内蓄积效应,并进一步对生物体造成损伤<sup>[1]</sup>. HC Orange 1 又名染料橙,被广泛用于多种染料和半永久性染发剂,它的主要成分为 2-硝基-4'-羟基二苯胺.迄今为止,有关它的报道较少,多数仅局限于制造商报道数据.根据 1997 美国食品和药物管理局(FDA)的数据,该产品已广泛应用于 95 种染料和染发剂,并且说明该产品的安全使用浓度范围为  $< 0.15\%$ <sup>[2]</sup>,然而,从目前使用的情况看,实际使用绝大部分都高于这个浓度,并且该产品的生产商表示更高的浓度将会应用到今后的产品中.已有文献报道,50mg/L 的 HC Orange 1 已经引起了鼠类卵巢细胞染色体的断裂<sup>[3]</sup>.因此,其进入水体后对水生生态系统造

\* 国家自然科学基金重点项目(No:20237010)资助.2004–06–30 收稿;2005–02–19 收到修改稿.沈骅,男,1978 年生,博士研究生. E-mail: shenhua@nju.org.cn.

\*\* 通讯作者 E-mail: ekxr@nju.edu.cn.

的毒性效应亟待研究。

应激蛋白(Heat shock protein, HSPs)也称热休克蛋白,是组织细胞暴露于热环境时产生的一类蛋白的总称,是由细胞内高度保守的热应激基因编码的蛋白质产物。应激蛋白存在于所有植物、动物和细菌的细胞内。大量实验已证实,除热刺激外,生物体细胞在受到重金属、有机污染物、紫外线辐射等物理化学应激源刺激后,都会引起体内的应激蛋白表达量的增加,可以提高细胞的耐受性,对生物细胞具有保护作用,并与其它的一些伴随蛋白一起协助恢复变性蛋白的结构与功能<sup>[4,5]</sup>。根据 HSPs 的相对分子量,通常分为四个主要家族:HSP90、HSP70、HSP60 和小分子 HSP。其中对 HSP70 的研究较为深入,它是应激蛋白家族中最保守和最主要的一类。生物体发生应激反应后,HSP70 的诱导表达非常显著,生成的 HSP70 热能诱导哺乳动物机体超氧化物歧化酶活性的增加,从而保护细胞免受伤害<sup>[6]</sup>。

近年来,研究发现,应激蛋白可以作为一种生物标志物(biomarker)应用于分子生态毒理研究中,而且比传统的生物学指标敏感<sup>[7]</sup>。由于 HSPs 具有高度的保守性,将其作为生物标志物运用于不同类别的生物,可以避免传统的环境监测指标由于不同生物物种和环境因数的差异而引起的变异,可以将实验室的低等生物实验结果应用于高等生物。因此,在反映污染物对生物体的早期伤害作用时具有很好的应用前景。鉴于国内外对于2-硝基-4'-羟基二苯胺对水生生物的影响鲜见报道,本文以 HSP70 作为生物标志物,研究了在低浓度不同暴露时间段下,鲫鱼受该有机物胁迫后,鱼体肝脏和脑组织内应激蛋白 HSP70 的表达情况以及该有机物对鱼体的危害程度。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 主要仪器 SIGMA 2K15 高速冷冻离心机(德国 SIGMA 公司),POWER PAC-300 蛋白电泳系统(美国 BIO-RAD 公司),Biophotometer RS-232 分光光度仪(德国 EPPENDORF 公司),半干式电转印仪(英国 Amersham Pharmacia 公司)。

1.1.2 实验试剂 ECL - Plus Western Blotting Detection System PRN2132 免疫印迹化学发光系统(英国 Amersham Biosciences 公司),一抗为小鼠抗人 HSP70 单克隆抗体 IgG<sub>1</sub>(加拿大 Stressgen 公司),二抗为辣根过氧化物标记的山羊抗鼠抗体 IgG-HRP(美国 Santa Cruz 公司),PVDF 膜(英国 Amersham Pharmacia 公司),HC Orange 1 纯度 >99%(南京科邦医药化工有限公司提供)。实验所用生化试剂均由美国 AMRESCO 公司和德国 SIGMA 公司提供的分析纯。

1.1.3 实验生物 实验采用健康的幼龄鲫鱼作为实验生物(由南京市水产研究所禄口养殖基地提供),平均体长为 10.5 cm,体重为 25.2 g,养鱼用水为经过空气泵曝气 3 d 的自来水,实验前将鱼驯养 10 d,控制死亡率小于 2%。

### 1.2 方法

1.2.1 有机污染物水溶液 96 h 急性毒性实验 选取 4mg/L、5mg/L、6mg/L、6.4mg/L、7mg/L、8mg/L 和空白对照组进行 96h 急性毒性实验,每缸 8 条鱼,30L 水,容器密封,微量曝气,控制水温在 15℃左右,pH7.2 ± 0.2,DO > 4mg/L,每 24h 更换溶液的 1/2。经过大量实验,计算 96hLC<sub>50</sub> 为 5.46mg/L,实验期间空白对照组均无死亡现象。

1.2.2 有机污染物水溶液挥发率的测定 模拟实验实际情况,容器密封,微量曝气,在 0 h、4 h、14 h、26 h 后通过 HPLC 对 1 mg/L 2-硝基-4'-羟基二苯胺水溶液进行分析,结果表明在各时间段内水溶液浓度均高于原溶液的 80%,因此在实验条件下,24 h 后有机物的挥发率能控制在 20% 以内,保证了实验的有效性。

1.2.3 实验方法 选取健康的无体表损伤的幼龄鲫鱼作为实验用鱼,实验分为对照组和实验组。采用 40 L 的玻璃缸,盛水 30 L。试验组暴露浓度为 1 mg/L(低于急性毒性实验的 LC<sub>50</sub> 值,且远低于制造商报道的 0.15% 的安全浓度),微量曝气,容器封闭,控制水温在 10℃左右,pH7.2 ± 0.2,DO > 4 mg/L,每天更换溶液的一半,投喂饵料一次,分别暴露 0 d、2 d、4 d、7 d、10 d 和 16 d 后取样。每浓度组取样 4 尾,冲洗后擦干,称重,解剖,取出鲫鱼脑和肝脏组织,迅速放入预冷的玻璃匀浆器,加入事先配制的预冷的蛋白抽提液(66mM Tris/HCl, pH7.2, 3% Nonident-p40, 0.1mM PMSF)<sup>[8]</sup>,进行蛋白抽提,整个操作过程必须在冰浴中进行,温度

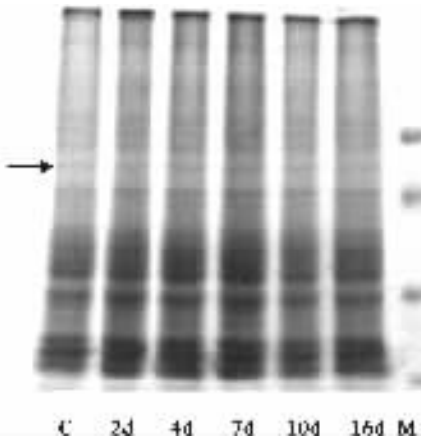


图1 不同暴露时间鱼脑 HSP70 SDS-PAGE  
M 为标准蛋白,从上到下依次为 97.4 Kda,  
66.2 Kda, 44 Kda; C 为对照组

Fig. 1 SDS-PAGE of fish brain exposed  
in different period

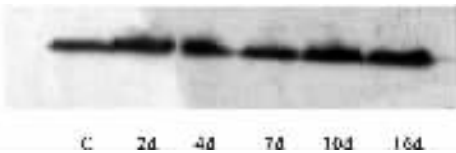


图2 不同暴露时间鱼脑 HSP70 Western Blotting  
Fig. 2 Western Blotting of fish brain exposed  
in different period

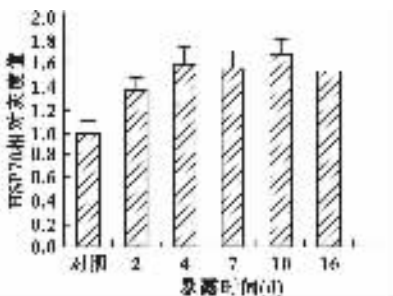


图3 不同暴露时间鱼脑 HSP70 相对灰度值  
Fig. 3 Relativity Gray value of HSP70 in fish brain  
exposed in different period

控制在 4℃ 以下. 随后将匀浆液移入 1.5 ml 的离心管, 在 4℃ 以 15000 r/min 转速下离心 30 min, 将所得上清液冷冻保存在 -80℃ 下待用<sup>[9]</sup>.

在进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳和 Western Blotting 之前, 采用 BRADFORD 法 (1976) 进行蛋白含量的测定<sup>[10]</sup>. 根据《分子克隆实验指南 (第三版)》<sup>[11]</sup> 进行 SDS-PAGE 蛋白质电泳和 Western Blotting 进行操作. SDS-PAGE 电泳采用浓缩胶为 5%, 分离胶为 8%, 电泳缓冲液为 Tris-甘氨酸 (pH = 8.3) 的电泳体系. Western Blotting 免疫印迹实验的一抗采用 1:750 的稀释比, 二抗采用 1:2000 的稀释比. SDS-PAGE 电泳过后, 使用半干式电转移系统将凝胶上的蛋白质转移到 PVDF 膜上, 随后进行 Western Blotting, 所得结果用英国 UVP 数码凝胶分析系统分析灰度, 计算实验各组相对灰度值 (实验组灰度值/对照组灰度值), 并用 SPSS 10.0 for windows 软件进行单因素方差分析,  $p < 0.05$  时具有显著性差异.

## 2 结果与讨论

### 2.1 不同暴露时间段 2-硝基-4'-羟基二苯胺对鲫鱼脑组织 HSP70 的诱导表达

动物的脑组织内的神经元, 神经胶质细胞和星形胶质细胞在受到外界因素应激时都能诱导产生应激蛋白, 且诱导表达非常明显. 已有研究发现, 鲤鱼在浓度为 4 mg/L 的醋酸铵中暴露 30 d 后, 鱼脑组织各部分都出现明显的 HSP70 诱导<sup>[12]</sup>.

经过 SDS-PAGE 蛋白电泳分离可以看出, 在分子量为 70 Kda 处 (图 1, 箭头所指处), 实验组相对于对照组有明显的蛋白诱导表达, 进一步进行 HSP70 的 Western Blotting 免疫印迹检测 (每个泳道总蛋白为 70 μg), 结果表明该 70 Kda 蛋白为 HSP70. 由图 2 可以看出, 脑组织 HSP70 对于 2-硝基-4'-羟基二苯胺非常敏感, 根据 UVP 数码凝胶分析系统进行灰度扫描分析, 可以看出 (如图 3), 在暴露 2 d 后相对于对照组有显著的诱导表达 ( $p < 0.05$ ), 为空白对照组的 1.37 倍, 并且随着暴露时间的增加表达量也随之显著上升 ( $p < 0.05$ ), 分别为空白对照组的 1.58 和 1.55 倍. 在暴露 10 d 时表达量最大, 为空白对照组的 1.66 倍. 脑组织 HSP70 表达量的增加, 一定程度上反应了外界的胁迫效应. Yenari 等人在最近研究证实, HSP70 可以对生物体脑组织具有保护作用<sup>[13]</sup>. Zai 等人研究表明: 给小鼠投喂抗病毒化学药物 2-脱氧葡萄糖后, 能显著诱导小鼠脑组织 HSP70 的表达<sup>[14]</sup>. 可见随着暴露时间的增加有机物对鱼体的胁迫程度也随之加剧, 该有机物对鲫鱼脑组织的胁迫存在着较好的时间-效应关系 (如表 1,  $R^2 = 0.88$ ). 在暴露 16 d 时 HSP70 表达有下降的趋势, 可能由于在长时间该有机物的暴露下, 一定程度上引起脑组织的损伤和破坏, 渐

渐开始丧失其对外部应激因素的耐受能力.

**2.2 不同暴露时间段 2-硝基-4'-羟基二苯胺对鲫鱼肝脏组织 HSP70 的诱导表达**

动物的肝脏是主要的解毒器官.和许多哺乳动物一样,鱼类的肝脏细胞 HSP70 可以被许多外界胁迫因素所诱导,如重金属、有机物和其他的一些外来化学物质. Adrienne N 等人研究发现,鲑鱼在重金属  $Cu^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  暴露后,肝脏细胞 HSP70 出现显著的诱导表达<sup>[15]</sup>. Lynn P. Weber 等人研究发现,鲑鱼经 7,8-苯并黄铜和二甲基苯并蒽暴露 96 h 后,卵巢细胞和肝脏细胞内均有显著的 HSP70 表达<sup>[16]</sup>.

从图 4 的鲫鱼肝脏 SDS-PAGE 蛋白电泳图谱可以看到,在 70 Kda 有明显蛋白表达,经 Western Blotting 免疫印迹检测 HSP70 (每个泳道总蛋白为 70  $\mu g$ ) 确定 70 Kda 蛋白为 HSP70 (图 4),灰度分析结果表明(图 6),暴露 2 d 和 4 d 后与对照组相比,HSP70 表达量增加,分别为对照组的 1.35 和 1.19 倍,表明肝脏组织 HSP70 对该有机物的诱导非常敏感.在暴露 7 d 后,肝脏 HSP70 表达量与对照组相比开始出现有显著性差异( $p < 0.05$ ),为对照组的 1.73 倍,并随暴露时间的增加呈上升趋势,在暴露第 10 d 和 16 d 时相对于对照组均出现极显著差异( $p < 0.01$ ),为对照组的 1.84 和 1.89 倍.可以看出暴露时间的延长使得该有机物对鱼体肝脏组织的损伤也进一步加大,胁迫效应与暴露时间存在着较好的时间-效应关系(表 1,  $R^2 = 0.89$ ).

**3 结论**

污染物与生物体之间的相互作用都始于分子水平且在分子水平上生物体之间共性最大,因此,在分子水平上开展水环境中污染物对水生生物早期伤害的生物标志物研究已成为水环境安全研究关注的热点之一. 应激蛋白作为生物标志物的主要优势在于它们可以将所有的胁迫效应综合的表现在诱导蛋白的完整性上,这一特性国外科学家称之为“蛋白毒性 (proteotoxicity)”<sup>[17]</sup>. 上述研究结果表明:低浓度 2-硝基-4'-羟基二苯胺已经对鲫鱼产生明显的损伤作用,并随着暴露时间的延长损伤程度加剧,鲫鱼体内脑组织和肝脏组织应激蛋白 HSP70 对 2-硝基-4'-羟基二苯胺的胁迫表现出相当的敏感性,且存在着较好的时间-效应关系(表 1),可以考虑作为 2-硝基-4'-羟基二苯胺污染物的一种生物标志物.

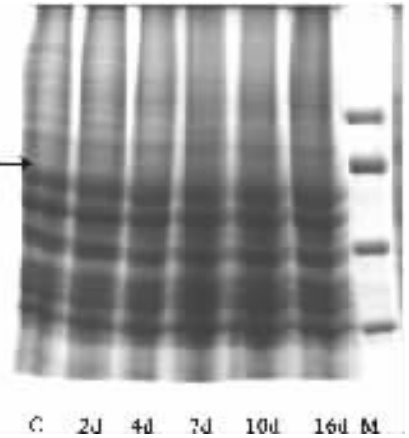


图 4 不同暴露时间鱼肝 HSP70 SDS-PAGE  
Fig .4 SDS-PAGE of fish liver exposed in different period

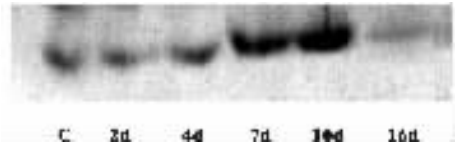


图 5 不同暴露时间鱼肝 HSP70 Western Blotting  
Fig .5 Western Blotting of fish liver exposed in different period

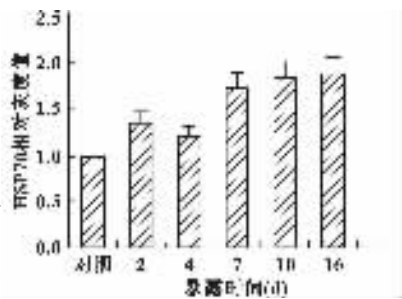


图 6 不同暴露时间鱼肝 HSP70 相对灰度值  
Fig .6 Relativity Gray value of HSP70 in fish liver exposed in different period

表1 脑和肝脏组织 HSP70 相对灰度值与不同暴露时间的回归方程及相关系数<sup>1)</sup>

Tab. 1 Regress equations of relative gray values of HSP70 in fish tissues and exposure time

鱼体内组织	回归方程	R <sup>2</sup>
肝	$y = -0.0041x^2 + 0.1x + 1.0$	0.8919
脑	$y = -0.0059x^2 + 0.1x + 1.1$	0.8878

1)  $y$  表示肝脏 HSP70 相对灰度值,  $x$  为暴露天数  $d$ ,  $n = 4$

#### 4 参考文献

- [1] 吕冬梅, 浦跃朴. 染发剂毒性作用的研究进展. 铁道劳动安全与环保, 2000, 27(4): 214 - 218.
- [2] FDA. Frequency of use of cosmetic ingredients. Washington DC, FDA database, 1996.
- [3] Monice Z F. Final report on the safety assessment of HC ORANGE NO. 1. *International Journal of Toxicology*, 1998, 17(4): 21 - 37.
- [4] 凌明圣. 分子伴侣 HSP70 研究进展. 国外医学分子生物学分册, 1997, 15(5): 227 - 230.
- [5] Grajg E A. Heat shock protein and molecular chaperones; mediations of proteins, stress 70 and chaperones 60 in diverse species. *Cell*, 1994, 34: 253 - 258.
- [6] 范石平等. 热应激对产蛋鸡及其后代机体组织过氧化损伤以及抗氧化微营养素的调控效应. 中国兽医学报, 2001, 21(2): 195 - 199.
- [7] Sanders B M. Stress proteins; Potential as multitieral biomarker. In: Shugart L and Mccarthy J. ed Environmental Biomarkers. Boca Raton, Florida; Lewis Publisher, 1990: 165 - 191.
- [8] Luis A, Cruz R & Chu F E. Heat shock protein(HSP70) response in the eastern oyster, *Crassostrea virginica*. exposed to PAHs sorbed to suspended artificial clay particles and suspended field contaminated sediments. *Aquatic Toxicology*, 2001, 60: 157 - 168.
- [9] Lewis S & Handy R D. Stress Proteins (HSPs): Method of detection and their use as an environmental biomarker. *Ecotoxicology*, 1999, 8: 351 - 368.
- [10] 汪家政, 范明主编. 蛋白质技术手册. 北京: 科学出版社, 2000: 42.
- [11] Sambrook J, Russell D. 黄培堂等译. 分子克隆操作指南. 第三版. 北京: 科学出版社, 2002: 1713.
- [12] Herna' ndeza C, Marty' na M & Bodegaa G, et al. Response of carp central nervous system to hyperammonemic conditions: an immunocytochemical study of glutamine synthetase (GS), glial fibrillary acidic protein (GFAP) and 70 kDa heat-shock protein (HSP70). *Aquatic Toxicology*, 1999, 45: 195 - 207.
- [13] Yenari M A, Fink F L & Sun G H, et al. Gene therapy with HSP72 is neuroprotective in rat models of stroke and epilepsy. *Ann Neurol*, 1998, 44(4): 584 - 592.
- [14] Zai Feng Yu & Mattson M P. Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration reduce focal ischemic brain damage and improve behavioral outcome; evidence for a preconditioning mechanism. *J Neurosci Res*, 1999, 57(6): 67 - 75.
- [15] Adrienne N B & Mathilakath M V. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2002, 132: 223 - 233.
- [16] Lynn P W & David M J. Effect of  $\beta$ -naphthoflavone and dimethylbenz anthracene on apoptosis and HSP70 expression in juvenile channel catfish (*Ictalurus punctatus*) ovary. *Aquatic Toxicology*, 2001, 54: 39 - 50.
- [17] Sanders B M. Stress-proteins in aquatic organisms; an environmental perspective. *Crit Rev Toxicol*, 1993, 23: 49 - 75.