

# 苯并 [a] 芘 (BaP) 对真鲷细胞色素 P450 和 芳香烃受体基因表达的影响<sup>\*</sup>

薄 军<sup>1</sup>, 吴世军<sup>2</sup>, 李裕红<sup>2</sup>, 任洪林<sup>1</sup>, 范丹青<sup>1</sup>, 陈芳奕<sup>1</sup>, 王克坚<sup>1</sup>  
(1. 近海海洋环境科学国家重点实验室 / 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005;  
2. 泉州师范学院生物系, 福建 泉州 362000)

**摘 要:** 通过水体暴露方式对海水养殖真鲷进行 BaP 持续染毒, 利用实时定量 PCR 技术研究了真鲷细胞色素 P450 基因 (CYP1A1) 和芳香烃受体基因 (AhR2) 随 BaP 暴露剂量、时间的动力学变化。结果发现, 0.1 ~ 1.5  $\mu\text{g/L}$  环境浓度的 BaP 能够显著性诱导 CYP1A1 基因和 AhR2 基因的表达, 且 AhR2 mRNA 早于 CYP1A1 mRNA 被诱导表达; BaP 持续暴露 48 h, CYP1A1 和 AhR2 基因的表达水平均随暴露时间的延长而显著升高, 染毒 72 h 后又回复到本底水平, 实验表明这两个基因的表达与 BaP 的暴露剂量和暴露时间之间具有显著性的剂量 - 效应和时间 - 效应关系。

**关键词:** 苯并 [a] 芘 (BaP); 真鲷; 实时定量 PCR; 细胞色素 P450 (CYP1A1); 芳香烃受体 (AhR)

**中图分类号:** Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529 - 6579 (2010) 03 - 0093 - 05

## The Effects of Benzo [a] Pyrene (BaP) Exposure on the CYP1A1 mRNA and AhR2 mRNA Expression of Red Seabream (*Pagrus major*)

BO Jun<sup>1</sup>, WU Shijun<sup>2</sup>, LI Yuhong<sup>2</sup>, REN Honglin<sup>1</sup>, FAN Danqing<sup>1</sup>,  
CHEN Fangyi<sup>1</sup>, WANG Kejian<sup>1</sup>

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science // Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Biology Department, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** The gene expression patterns of CYP1A1 and Aryl hydrocarbon receptor (AhR2) of red seabream (*Pagrus major*) were both measured using real-time quantitative PCR (qPCR) when fish exposed to environmentally relevant concentration of BaP (0.1, 0.5 and 1.0  $\mu\text{g/L}$ , respectively). The results showed that CYP1A1 mRNA and AhR2 mRNA could be induced significantly, besides, the time of AhR2 mRNA induced ahead of the time of CYP1A1 mRNA induced. The two genes were induced markedly at the beginning of BaP exposure, and then decreased to the basal levels after 72 h. The results demonstrate that BaP can regulate CYP1A1 and AhR2 transcript in a dose and time dependent manner.

**Key words:** Benzo [a] Pyrene (BaP); *Pagrus major*; real-time quantitative PCR; cytochrome P450 (CYP1A1); aryl hydrocarbon receptor (AhR)

苯并 [a] 芘 (BaP) 在海洋环境中广泛存在, 是一种重要的多环芳烃类环境污染物<sup>[1]</sup>。有机物的燃烧是环境中 BaP 的主要来源, 如生活中燃料的燃烧、汽车和工业生产过程等<sup>[1-2]</sup>。BaP 本身毒

性很小, 但经过新陈代谢后产生的中间代谢物具有很强的遗传毒性和免疫毒性<sup>[3-4]</sup>。

鱼类中免疫系统和新陈代谢系统之间是紧密联系的, 它们均参与有机体抵御诸如病毒、细菌和其

\* 收稿日期: 2009 - 10 - 05

基金项目: 国家“863”计划重点资助项目 (2007AA091406); 国家自然科学基金资助项目 (30770391)

作者简介: 薄军 (1978年生), 男, 博士; 通讯作者: 王克坚; E-mail: wkjian@xmu.edu.cn

它外化物过程, 而生物转化系统 (特别是细胞色素氧化酶 P450 单氧化酶类) 参与了众多激素类产品的调控<sup>[5]</sup>。CYP450 酶系是一个大的基因家族, 普遍存在于生物体亚铁血红素蛋白中, 催化多种亲脂性外源化合物的生物转化, 在解毒和激活食物链中的卤代、非卤代芳烃中发挥重要作用。鱼类中研究最多的是 CYP1A1, 该基因普遍存在于所检测的鱼类中; 同时, 生物暴露于 PAHs、PCBs 等污染物的水平与体内 CYP1A1 表达水平具有显著相关性, 因而许多学者提出将 CYP1A1 的表达水平作为海洋动物暴露于卤化芳香族碳氢化合物及其它相关化合物可靠的生物标志物<sup>[6-7]</sup>。在对水生系统污染监测中, 检测鱼类 CYP1A 基因的诱导表达已经被作为一种灵敏的早期预警手段。

芳香烃受体 (Aryl hydrocarbon receptor, AhR) 主要功能是与外源性芳香烃结合并将其转运进细胞核内, 因此在介导平面卤代芳香烃毒性效应过程中发挥了重要作用<sup>[1]</sup>。CYP1A1 和 AhR 基因均参与 BaP 在细胞内的新陈代谢过程, 目前认为在鱼类中 CYP1A1 主要诱导机制如下: BaP 与 AhR 复合体结合转运进入细胞核, 然后与 AhR 核转运子 (ARNT) 蛋白进一步形成一个四聚体, 这种配体 - AhR-ARNT 复合体能够与不同基因 (如 CYP1A 等) 上游的外化物反应元件 (XREs) 结合, 最终增强这些基因的转录<sup>[5]</sup>。

本文以环境浓度的 BaP 对海水重要养殖鱼类 - 真鲷进行水体暴露方式染毒, 利用 qPCR 技术研究了其肝脏中 CYP1A1 基因和 AhR 基因随 BaP 暴露剂量、时间的动力学变化, 观察了 BaP 毒性效应对海洋养殖真鲷体内参与 BaP 新陈代谢过程的 AhR 和 CYP1A1 基因表达的影响, 为进一步研究 BaP 对水生生物的免疫毒理学效应奠定基础。

## 1 实验材料和方法

### 1.1 化学试剂

BaP (纯度 99%) 购于 Sigma 公司, 以丙酮

(分析纯, 购自上海国药集团化学试剂有限公司) 作为溶剂将其配制为 1 μg/mL 母液, 避光低温保存。

### 1.2 真鲷幼鱼水体暴露实验及采样

真鲷幼鱼购自福建省漳浦海水养殖渔排, 平均体质量为 (58.94 ± 12.81) g, 体长为 (12.56 ± 0.96) cm。正式实验之前先将其在实验室暂养 7 d, 水温为 (14.2 ± 1.24) °C, 盐度为 (30 ± 1) ‰, pH 7.8 左右, 自然光周期。每天按照鱼体质量的 1% ~ 2% 投喂鱼类颗粒饲料, 每次投食后约 10 min 捞出剩余的食物残渣, 并更换一次新的沙滤海水。

实验前一天停止喂食, 选择活力好并且体表无损伤的健康鱼进行实验。实验分为 BaP 水体暴露组 (0.1、0.5 和 1.5 μg · L) 和丙酮溶剂组 ( $V_{\text{acetone}}/V_{\text{seawater}} = 0.005\%$ ), 各浓度均平行设置两个重复, 每个重复随机放入真鲷幼鱼 12 条, 所用玻璃缸大小为 100 cm × 60 cm × 50 cm, 注入溶液为 100 L, 每隔 24 h 更换一次新的暴露液, 整个实验过程不投喂饲料。在玻璃缸上面覆盖上一层黑色遮光纱防止 BaP 光解。染毒后 0、6、24、48、72 h 不同时间点取样, BaP 各浓度组及丙酮溶剂组分别采样 4 条, 先进行尾静脉取血, 再用剪刀剪断脊柱使鱼猝死后迅速采集肝脏, 立即放入液氮中速冻, 然后转移至 -80 °C 超低温冰箱中保存备用。

### 1.3 CYP1A1 和 AhR2 基因表达水平的检测

1.3.1 引物的设计 根据本实验室从真鲷肝脏克隆获得的 CYP1A1 基因序列 (GenBank 登录号为 EU163982) 及已报道的真鲷 AhR2 (GenBank 登录号为 AB197788) 和 18S 基因序列 (GenBank 登录号为 AB259837), 利用 Primer Express 3.0 软件设计相应引物 (表 1), 由上海生工生物公司合成。

1.3.2 应用 qPCR 对 CYP1A1 和 AhR2 基因表达的定量分析 实时定量 PCR 方法同本实验室相关文章<sup>[8]</sup>。主要步骤如下: 以 Trizol 试剂盒 (Invitrogen 公司) 提取各组真鲷肝脏总 RNA, 利用紫外分光光度计 (GE 公司) 检测  $A_{260/280\text{nm}}$  值, 随机选取部分肝脏的总 RNA 样品, 以  $w = 1.2\%$  琼脂糖凝胶电

表 1 实时定量 PCR 分析基因表达所用的引物

Table 1 Sequences of primers used in gene expression analyses by qPCR

基因	上下游引物 (5' 3')	扩增片段 /bp	基因登录号
CYP1A1	上游: GCCGATGGCAGCTTTGAC	69	EU163982
	下游: TTCCGCCACATTGTCGCTCCG		
AhR2	上游: AATGGTGACCTGTGCTCATGTGT	102	AB197788
	下游: CCGTTCCTCATCCTGACTTAA TCT		
18S	上游: CAAA GGGCA GGGACTTAA TCA	69	AB259837
	下游: TCCCA TGAACGAGGAATCC		

泳 EB 染色检测其提取质量。利用 PrimerScript™ RT-PCR 试剂盒 (Perfect Real Time) (TaKaRa 公司) 对总 RNA 进行逆转录。SYBR Green I 染料法对目的基因进行相对定量, 反应体系为 20  $\mu$ L: 2  $\times$ Power SYBR® Green PCR MasterMix (Applied Biosystem) 10  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L 的上下游引物各加 1  $\mu$ L, 模板为相当于从 0.5 ng 的总 RNA 逆转录所得的 cDNA, 用灭菌双蒸水补足为 20  $\mu$ L。每个时间点各处理组分别做 3~4 个平行样品, 每个样品再分别平行做 3 个重复。qPCR 应条件为 50  $^{\circ}$ C, 2 min; 95  $^{\circ}$ C, 10 min; 40 个循环: 95  $^{\circ}$ C 15 s, 60  $^{\circ}$ C 60 s; 在 60  $^{\circ}$ C 延伸步骤对荧光信号进行采集。反应结束后, 直接对该反应体系做融解曲线, 分析 PCR 产物的特异性。所用仪器为 ABI 7500 型荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystem)。目的基因相对表达量分析方法基于  $2^{-CT}$  原理进行<sup>[9]</sup>。

#### 1.4 数据分析

所有数据均以平均值  $\pm$  标准偏差表示。采用 SPSS11.0 软件单因素方差分析 (one-way ANOVA) 所得数据, 当  $p < 0.05$  时认为差异显著。

## 2 结果与分析

### 2.1 真鲷肝脏总 RNA 的提取

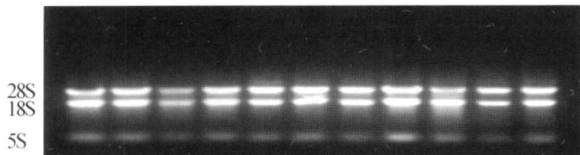


图 1 真鲷肝脏总 RNA 凝胶电泳

Fig. 1 Gel electrophoresis of total RNA from liver of juvenile red seabream

qPCR 实验对样品总 RNA 的质量要求比较高, 通常从两个方面对其评价: 第一是纯度, 要求没有蛋白和有机溶剂污染, 总 RNA 的  $A_{260/280nm}$  要在 1.8~2.0 之间, 最好为 2.0 左右; 第二是完整性比较好, 这一指标可以通过电泳检测, 质量很好的 RNA 电泳后一般可以看到明亮、清晰的 28S、18S 两条带, 5S 亮度较弱。本实验提取的总 RNA 质量符合上述要求 (图 1), 所有样品  $A_{260/280nm}$  值均在 2.0 左右 (各样品  $A_{260/280nm}$  具体值没有给出), 因此可以进行以下的逆转录及对相关基因的定量分析。

### 2.2 BaP 水体暴露对真鲷肝脏 CYP1A1 基因表达的影响

真鲷幼鱼经环境浓度的 BaP 水体持续暴露 72

h, CYP1A1 基因在肝脏中表达模式如图 2 所示: 染毒后 6 h, 0.1、0.5 和 1.5  $\mu$ g/L 的 BaP 处理组 CYP1A1 mRNA 表达与溶剂丙酮对照组相比均没有发生显著性变化。染毒后 24 h, 0.1  $\mu$ g/L 剂量组 CYP1A1 表达水平有所上升, 但是与对照组相比无显著性差异; 1.5  $\mu$ g/L 的 BaP 暴露组 CYP1A1 基因显著诱导表达 ( $p < 0.05$ ), 表达量为对照组的 4.2 倍。CYP1A1 mRNA 表达的总趋势显示, 在 0~48 h 内, CYP1A1 表达与 BaP 染毒剂量和染毒时间分别具有明显的剂量-效应和时间-效应关系, 即在同一时间点 CYP1A1 mRNA 表达水平总体上具有随着 BaP 剂量的升高而上升的趋势, 对于同一 BaP 剂量而言, CYP1A1 mRNA 表达量随着时间的延长而逐步升高。

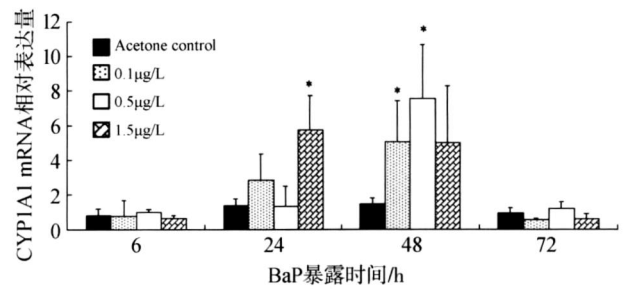


图 2 实时定量 PCR 检测持续暴露于不同浓度 BaP 的真鲷幼鱼肝脏中 CYP1A1 mRNA 的表达变化

Fig. 2 Real-time PCR assay of CYP1A1 mRNA expression in liver of juvenile red seabream upon continuous waterborne exposure to different concentration of BaP (所有数据均以未经任何处理的健康组真鲷肝脏 CYP1A1 mRNA 表达进行校正)

### 2.3 BaP 水体暴露对真鲷肝脏芳香烃受体基因 (AhR2) 表达的影响

真鲷幼鱼经 0.1~1.5  $\mu$ g/L 的 BaP 水体暴露 6~72 h, AhR2 mRNA 表达模式如图 3 所示: BaP 染毒 6 h 后 0.1、0.5  $\mu$ g/L 剂量组显著性地诱导了 AhR2 的表达; 染毒后 24 h, 3 个 BaP 剂量组的 AhR2 均显著诱导表达, 并且 0.1  $\mu$ g/L 剂量组诱导的 AhR2 mRNA 表达水平最高, 3 个 BaP 剂量组 AhR2 基因表达量分别为丙酮对照组的 2.3 倍、1.9 倍和 1.4 倍; 随着 BaP 暴露时间的延长, 在 48~72 h 时间内 AhR2 mRNA 的表达与对照组相比均没有发生显著性变化。整个实验过程中 AhR2 总的变化趋势为先升高后降低。

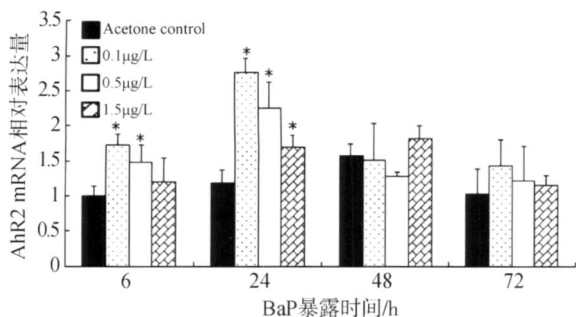


图 3 实时定量 PCR 检测持续暴露于不同浓度 BaP 真鲷幼鱼肝脏中 AhR2 mRNA 的表达变化

Fig. 3 Real-time PCR assay of AhR2 mRNA expression in liver of juvenile red seabream upon continuous waterborne exposure to different concentration of BaP

(所有数据均以未经任何处理的健康组真鲷肝脏 AhR2 mRNA 的表达进行校正)

### 3 讨论

BaP 为非极性物质, 在正常水体中溶解度比较小, 25 °C 下 BaP 在水中溶解度为  $3.8 \mu\text{g/L}^{[10]}$ , 12 °C 下约为  $1 \mu\text{g/L}^{[6]}$ 。水体暴露是水生生物吸收 BaP 最主要的途径<sup>[11]</sup>, 尽管 BaP 在水中可能以完全溶解态、吸附于悬浮颗粒和与胶状物质结合三种状态存在<sup>[12]</sup>, 但是 Carls 等<sup>[13]</sup>在研究石油对斑马鱼 *Danio rerio* 毒性效应过程中发现, 胚胎损伤并非是石油的颗粒物, 而是溶解态的 PAHs。目前在水生生物中开展的实验室研究中, 相当一部分学者采用腹腔注射方式进行 BaP 染毒<sup>[3-4]</sup>, 然而这种暴露方式可能并不是实际环境中暴露方式。即使以水体暴露的方式进行 BaP 染毒, 不同实验室关于 BaP 浓度的设置差别也很大, 甚至相差 2 个数量级<sup>[6, 14-16]</sup>。本实验以环境浓度的 BaP 利用水体暴露方式对海水鱼类进行急性染毒, 结果表明 0.1 ~ 1.5  $\mu\text{g/L}$  的 BaP 在短期内即能够显著性诱导 CYP1A1 基因的表达, 并且这种表达具有显著性的剂量 - 效应和时间 - 效应关系。

AhR 主要功能是与外源性芳香烃结合并将其转运进细胞核内, 在介导芳香烃毒性效应过程中发挥了重要作用。目前, 已经从真鲷中克隆获得了两种芳香烃受体 AhR1 和 AhR2, 并且发现, AhR1 主要在脑、心、卵巢和脾脏中表达, 而 AhR2 在肝、脑、心、卵巢和脾脏等组织中均表达<sup>[17]</sup>。肝脏是鱼类新陈代谢的主要器官, 故本文选取真鲷幼鱼肝脏 AhR2 基因作为靶基因。真鲷 AhR2 mRNA 被 BaP 显著诱导表达的时间早于 CYP1A1 mRNA 被诱

导的时间, 这种结果与 CYP1A1 诱导表达的主要机制是一致的<sup>[5]</sup>, 即 BaP 接触真鲷幼鱼肝脏细胞时, 先与其受体 AhR 相结合, 受体先被 BaP 结合诱导表达, 然后再将 BaP 转运进入细胞核, 进而与 CYP1A1 基因上特定的 XREs 相结合, 最终诱导了 CYP1A1 基因的表达。

BaP 水体暴露真鲷幼鱼 48 h 后, 0.1、0.5  $\mu\text{g/L}$  处理组的真鲷幼鱼 CYP1A1 基因表达量显著性增强, 染毒后 72 h, 3 个 BaP 剂量组 CYP1A1 mRNA 表达水平均回复到本底水平。这种结果与有关报道一致: BaP 水体暴露虹鳟 *Oncorhynchus mykiss* 后, 6 ~ 72 h 内显著诱导了肝 CYP1A mRNA 的表达, 而 72 ~ 120 h 该基因的表达又回复到本底水平<sup>[6]</sup>。斑鲈 *Dorosoma cepedianum* 经 BaP 水体暴露后, 肝脏中 CYP1A mRNA 在 72 ~ 120 h 时间内同样降低到本底水平, 在此过程中鳃内 CYP1A 基因表达水平的提高被认为是产生这种结果的一个重要原因<sup>[18]</sup>。

鱼类中免疫系统和生物转化系统并非完全独立的, 这两个系统之间很多功能相互联系, 它们均参与有机体抵御诸如病毒、细菌和其它外化物。鱼类暴露于异型生物物质 (xenobiotic) 后可能带来细菌感染的积累, 随后免疫系统的激活可能会部分抑制这种解毒活性, 进而导致了鱼类死亡率的升高<sup>[5]</sup>。另一方面, 许多异型生物物质本身并不会产生免疫毒性, 但是能够通过生物转化系统转化为具有很强免疫毒性的新陈代谢物。本文以环境浓度的 BaP 对海水养殖鱼类真鲷进行水体暴露方式染毒, 利用 qPCR 技术研究了其肝脏中参与新陈代谢的重要基因 CYP1A1 和 AhR 随 BaP 暴露剂量、时间的动力学变化, 为进一步研究 BaP 对水生生物的免疫毒理学效应奠定了基础。

### 参考文献:

- [1] REYNAUD S, DESCHAUX P. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: A review [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 77: 229 - 238.
- [2] 赵云英, 马永安. 天然环境中多环芳烃的迁移转化及其对生态环境的影响 [J]. *海洋环境科学*, 1998, 17 (2): 69 - 72.
- [3] CARLSON E A, LI Y, ZELIKOFF J T. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 56a: 289 - 301.

- [4] CARLSON E A, LI Y, ZELIKOFF J T. The Japanese medaka (*Oryzias latipes*) model: applicability for investigating the immunosuppressive effects of the aquatic pollutant benzo[a]pyrene (BaP) [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54b: 565 - 568.
- [5] REYNAUD S, RAVETON M, RAVANEL P. Interactions between immune and biotransformation systems in fish: A review [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 87: 139 - 145.
- [6] LEVINE S L, ORIS J T. CYP1A expression in liver and gill of rainbow trout following waterborne exposure: implications for biomarker determination [J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 46: 279 - 287.
- [7] JÖNSSON E M, ABRAHAMSON A, BRUNSTRÖM, et al. Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3,3',4,4',5'-pentachlorobiphenyl [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 79: 226 - 232.
- [8] WANG K J, BO J, YANG M, et al. Hepcidin gene expression induced in the developmental stages of fish upon exposure to Benzo[a]pyrene (BaP) [J]. *Marine Environmental Research*, 2009, 67(3): 159 - 165.
- [9] LIAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-CT}$  method [J]. *Methods*, 2001, 25: 402 - 408.
- [10] MANOLIE, SAMARA C. Polycyclic aromatic hydrocarbons in natural waters: sources, occurrence and Analysis [J]. *Trends in Analytical Chemistry*, 1999, 18(6): 417 - 428.
- [11] KOLOKA S, HUCKNS J N, PETTY J D, et al. The role of water ventilation and sediment injection in the uptake of benzo[a]pyrene in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15, 1752 - 1759.
- [12] KUCKLICK J R, B DLEMEN T F. Organic contaminants in Winyah Bay, South Carolina: pesticides and polycyclic aromatic hydrocarbons in subsurface and microlayer waters [J]. *Mar Environ Res*, 1994, 37: 63 - 78.
- [13] CARLSM G, HOLLAND L, LARSON M, et al. Fish embryos are damaged by dissolved PAHs, not oil particles [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88: 121 - 127.
- [14] 王春光, 李裕红, 林志勇, 等. 苯并 (a) 芘对真鲷 (*Pagrosomus major*) 血细胞 DNA 损伤的彗星实验研究 [J]. *农业环境科学学报*, 2006, 25(6): 1446 - 1449.
- [15] DONG W, WANG L, THORNTON C, et al. Benzo(a)pyrene decreases brain and ovarian aromatase mRNA expression in *Fundulus heteroclitus* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 88: 289 - 300.
- [16] JÖNSSON E M, BRUNSTRÖM, BRANDT I. The zebrafish gill model: Induction of CYP1A, EROD and PAH adduct formation [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 91: 62 - 70.
- [17] YAMAUCHI M, KMEY, WATA H, et al. Molecular characterization of the aryl hydrocarbon receptors (AHR1 and AHR2) from red seabream (*Pagrus major*) [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2005, Part C 141: 177 - 187.
- [18] LEVINE S L, ORIS J T. Induction of P4501A mRNA and catalytic activity in gizzard shad (*Dorosoma cepedianum*) following waterborne exposure to benzo[a]pyrene [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, C(118): 397 - 404.