学校编码：10384　　分类号____密级____

学号：32720131150562　　UDC____

厦门大学

硕 士 学 位 论 文

MAPK 信号通路参与调控苯并（a）芘和滴滴涕联合暴露致 DNA 损伤的机制研究

The mechanism of BaP and DDT co-exposure induced DNA damage via MAPK signal pathway

刘 敏

指导教师姓名：　赵苒　助理教授

范春　教　　授

专 业 名 称：　劳动卫生与环境卫生学

论文提交日期：　2016 年 04 月 15 日

论文答辩时间：　2016 年 05 月 23 日

学位授予时间：　2016 年 06 月

答辩委员会主席：_____

评　　阅　　人：_____

2016 年 5 月

MAPK 信号通路参与调控苯并（a）芘和滴滴涕联合暴露致 DNA 损伤的机制研究

指导教师：赵苒 助理教授 范春 教授

厦门大学

厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下,独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范（试行）》。

另外，该学位论文为（　　）课题（组）的研究成果，获得（　　）课题（组）经费或实验室的资助，在（　　）实验室完成。（请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文（包括纸质版和电子版），允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

（　）1.经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于年　月　日解密，解密后适用上述授权。

（√）2.不保密，适用上述授权。

（请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。）

声明人（签名）：

年　　月　　日

摘 要

【目的】

苯并(a)芘(benzo[a]pyrene，BaP)是多环芳烃类化合物的典型代表之一，于各种环境介质中广泛存在，具有很强的致癌性，被国际癌症研究机构列为 1 类致癌物。滴滴涕(2,2-bis (4- chlorophenyl)-1,1,1-trichloroethane，DDT)曾是生产及使用范围最广的一类有机氯农药，在环境中非常难于降解，具有高亲脂性，可以对哺乳动物的肝脏、肾脏、神经等系统造成损害。BaP 和 DDT 常共存于环境并可通过食物链的生物放大作用富集于人体，危害人类健康。因此，探讨二者联合暴露对机体的毒性效应及机制，不仅可以揭示二者联合效应的作用模式，更为评估多种污染物联合暴露的生态安全性提供科学依据，具较好的理论价值和现实意义。

【方法】

以遗传毒理学试验研究中常用的 HepG2 细胞株为研究对象，以 DNA 损伤早期出现的组蛋白 H2AX 磷酸化焦点 γH2AX（gamma-H2AX）的形成为效应指标，设 0.1% 二甲基亚砜（DMSO）为溶剂对照组，12.5、25、50μmol/L BaP 和 0.1、1、10μmol/L DDT 为处理组。单独暴露组为上述浓度的 BaP 或 DDT 分别作用 24h；联合暴露组为 0.1、1 或 10μmol/L 的 DDT 处理 HepG2 细胞 24h 后，再分别加入 12.5、25 或 50μmol/L 的 BaP 作用 24h。采用免疫荧光及 western blot 法分析单独及联合暴露组 γH2AX 焦点及蛋白的表达量，明确二者联合作用的毒效应类型。针对具有明确联合毒效应的组别：采用 western blot 法检测磷酸化蛋白 p-p38、p-ERK 和 p-JNK 的表达，揭示丝裂原活化蛋白激酶家族(mitogen-activated protein kinase, MAPK) 的三条经典信号通路：c-jun 氨基末端激酶(c-Jun N-terminal kinase, JNK) 通路、细胞外信号调节激酶(extracelluar

signal-regulated kinase, ERK) 通路和/或 P38MAPK 通路的活化情况；采用细胞色素 P4501A（cytochromeP4501A, CYP4501A）抑制剂 α-萘黄酮（α-Naphthoflavone, ANF）预处理 1h 后，检测 γH2AX、CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 蛋白的表达，找到参与 BaP 和 DDT 联合暴露致 DNA 损伤效应的 CYPP450 酶；采用 MAPK 通路抑制剂 SB203580 和 PD98059 处理 30min 后，检测 γH2AX、CYP1A1、CYP1A2 和 CYP1B1 蛋白的表达，探讨 BaP 和 DDT 联合暴露致 HepG2 细胞 DNA 损伤的 MAPK 信号通路调控机制。

【结果】

（1）BaP 和 DDT 单独诱导 DNA 损伤的剂量效应关系：BaP 和 DDT 均可诱导 HepG2 细胞产生 γH2AX。与溶剂对照组相比，BaP 处理组随着染毒剂量升高(12.5、25、50μmol/L)，γH2AX 表达量增高，差异有统计学意义（P<0.05）。DDT 处理组未发现剂量效应关系。

（2）BaP 和 DDT 联合诱导 DNA 损伤的效应类型：免疫荧光结果经 2 因素 3 水平析因设计方差分析得出：BaP 和 DDT 间存在联合效应（F=5.070，P<0.001）。其中，具有协同作用的组为：0.1μmol/L DDT+12.5μmol/L BaP；具有拮抗作用的组为：0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP、10μmol/L DDT+25μmol/L BaP、10μmol/L DDT+50μmol/L BaP。western blot 结果经 2 因素 3 水平析因设计方差分析得出，BaP 和 DDT 间存在联合效应（F=13.279，P<0.001）。其中，具有协同作用的组为：10μmol/L DDT+12.5μmol/L BaP；具有拮抗作用的组为：0.1μmol/L DDT+25μmol/L BaP、1μmol/L DDT+25μmol/L BaP、0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP、1μmol/L DDT+50μmol/L BaP。因此，确定具有拮抗作用的 0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP 联合暴露组进行后续研究。

（3）CYP450 酶参与 BaP 和 DDT 联合暴露的 DNA 损伤效应：与溶剂对照组相比，50μmol/L BaP 可以诱导 HepG2 细胞 CYP1A1、CYP1A2、CYP1B1 和 γH2AX 表达量升高，加入 ANF 处理后，CYP1A1、CYP1A2 和 γH2AX 表达量降低，差异有统计学意义（P<0.05）。0.1μmol/L DDT 可以诱导 HepG2 细胞

CYP1A1、CYP1B1 和 γH2AX 表达量升高，加入 ANF 处理后，CYP1A1、CYP1B1 和 γH2AX 表达量降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）。0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP 可以诱导 HepG2 细胞 CYP1A1、CYP1A2 和 γH2AX 表达量升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）。加入 ANF 处理后，与 0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP 相比，CYP1A1、1A2、γH2AX 表达量降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）。

（4）MAPK 通路参与调控 CYP450 酶介导的 BaP 和 DDT 联合暴露致 DNA 损伤：与对照组相比，50μmol/L BaP 诱导 HepG2 中 p-p38、p-JNK、p-ERK 表达量升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；0.1μmol/L DDT 诱导 HepG2 中 p-p38 和 p-JNK 表达量升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）；0.1μmol/L DDT+50μmol/L 诱导 HepG2 中 p-p38 和 p-ERK 表达量升高，差异有统计学意义（*P*<0.05）。与 0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP 组相比， SB203580、PD98059 处理后 CYP1A1、CYP1A2 和 γH2AX 蛋白表达量降低，差异有统计学意义（*P*<0.05）。

【结论】

（1）BaP 和 DDT 均可诱导 HepG2 细胞产生 γH2AX，且 BaP 诱导的 γH2AX 表达量随着浓度的升高而升高；DDT 组未发现剂量效应关系。

（2）BaP和DDT联合暴露致HepG2的细胞DNA损伤类型既可以表现为协同作用，也可以表现为拮抗作用。其中，免疫荧光和western blot结果均显示0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP联合暴露组为拮抗作用。

（3）CYP1A1和CYP1A2参与50μmol/L BaP致HepG2细胞的DNA损伤过程。CYP1A1和CYP1B1参与0.1μmol/L DDT致HepG2细胞的DNA损伤过程。CYP1A1和CYP1A2参与0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP致HepG2细胞的DNA损伤过程。

（4）P38MAPK 和 ERK 信号通路参与调控 CYP1A2 介导的 0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP联合暴露致HepG2的DNA损伤。

关键词：BaP　DDT　联合效应　DNA 损伤　MAPK　CYP1A2

Abstract

【Object 】

Benzo(a)pyrene (BaP), a potent carcinogen and representative compound of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), has been classified as group Ⅰ carcinogen by the International Agency for Research on Cancer is ubiquitously distributed throughout the environment. Dichlorodiphenyltrichloroethane (DDT), a commonly used pesticide in agriculture and malaria control, can still be detected in human samples although banned for decades, due to its lipophilic nature as well as slow chemical and biological degradation. Increasingly studies have confirmed that BaP and DDT often coexist in various environmental media, indicating potential combined effects on human health.Therefore,it is practical to study the role of genetic toxic effects in their joint action in order to provide scientific basis about evaluating the ecological security of the pollutions.

【Methods】

In this study, a biomarker of DNA double-strand breaks (DSBs), phosphorylation of histone H2AX (γH2AX) was used to investigate the genotoxic effects in HepG2 cells due to it is commomly used in genetic toxicology experiments. 0.1% DMSO was used as the vehicle control. To study the effects of the individual compounds, cells were treated with BaP (12.5, 25, 50μmol/L) or DDT (0.1, 1, 10μmol/L) for 24h. To investigate the combined effect of these two compounds, cells were pretreated with DDT for 24h before BaP treatment. Immunofluorescence microscopy and western blot have been used to measure γH2AX protein levels to study the role of genetic toxic effects in their joint action.Then, western blot have been used to measure p-p38,

activated protein kinase (MAPK) signal pathways. Alpha-naphthoflavone (ANF), an inhibitor of cytochromeP450(CYP450)'s subfamily, SB203580 and PD98059 inhibitors of MAPKs, were also used to investigate DNA damage mechanism caused by BaP and DDT co-exposure.

【Result】

(1) Representative images of HepG2 cells treated with different concentrations of BaP and DDT alone clearly demonstrated that BaP induced γH2AX foci in a concentration-dependent manner rather than DDT.

(2) The factorial design analysis of variance show that the joint effect caused by BaP and DDT can be combined effect as well as antagonistic effect. The group of 0.1μmol/L DDT+12.5μmol/L BaP can be combined effect and the group of 0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP、10μmol/L DDT+25μmol/L BaP、10μmol/L DDT+50μmol/L BaP can be antagonistic effect from the results of immunofluorescence microscopy. The group of 10μmol/L DDT+12.5μmol/L BaP can be combined effect and the group of 0.1μmol/L DDT+25μmol/L BaP、1μmol/L DDT+25μmol/L BaP、0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP、1μmol/L DDT+50μmol/L BaP can be antagonistic effect from the results of western blot. Then we choose the group of 0.1μmol/L DDT+50μmol/L BaP to further study.

(3) CYP1A1, CYP1A2, CYP1B1 and γH2AX protein levels were significantly increased after BaP (50μmol/L) treatment. CYP1A1, CYP1B1 and γH2AX protein levels were significantly increased after DDT (0.1μmol/L) treatment.CYP1A1, CYP1A2 and γH2AX protein levels were significantly increased after BaP (50μmol/L) and DDT (0.1μmol/L) co-exposure treatment, compared with that in DMSO solvent control (P<0.05), while CYP1B1 protein level was decreased by the co-exposure. Compared with BaP and DDT co-exposure, statistically significant decreasing of CYP1A1, CYP1A2 and γH2AX protein levels were observed in treatment of both co-

exposure and ANF (P<0.05), while CYP1B1 protein level was increased, CYP1A1 and CYP1A2 mRNA expresssion levels were decreased.

(4) The expression of phospho-p38MAPK, phospho-ERK and phospho-JNK were significantly increased after BaP (50μmol) treatment, while DDT (0.1μmol) inhibited the activation. Only phospho-p38MAPK and phospho-ERK expression were observed significantly increased in BaP (50μmol) and DDT (0.1μmol) co-exposure. P38MAPK and ERK inhibition induced significant reduction of CYP1A2 and γH2AX protein levels. Compared with the co-exposure group, statistically significant reduction of CYP1A2 and γH2AX protein levels were observed in the groups pretreated with SB or PD (P<0.05), while CYP1A1 protein level was increased (P<0.05).

【Conclusion】

(1) Both BaP and DDT can induced γH2AX in HepG2 cells, Immunofluorescence microscopy and western blot results showed that BaP significantly induced γH2AX-foci in a concentration-dependent manner.

(2) The joint effect caused by BaP and DDT can be combined effect as well as antagonistic effect. Immunofluorescence microscopy and western blot results showed that DDT (0.1μmol) inhibited BaP (50μmol) induced H2AX phosphorylation, indicating an antagonistic effect.

(3) CYP1A1 and CYP1A2 were involved in H2AX phosphorylation after BaP (50μmol/L) exposure. CYP1A1 and CYP1B1 were involved in H2AX phosphorylation after DDT (0.1μmol/L) exposure. CYP1A1 and 1A2 rather than CYP1B1, were involved in H2AX phosphorylation after BaP (50μmol/L) and DDT (0.1μmol/L) co-exposure.

(4) P38MAPK and ERK pathways played an essential role in modulating CYP1A2 to induce H2AX phosphorylation after BaP (50μmol/L) and DDT

(0.1μmol/L) co-exposure.

Keywords: BaP; DDT; Co-exposure; DNA damage; MAPK; CYP1A2

目 录

Table of Contents

英文缩略词语汇表

（List of Abbreviation）

AhR	aromatic hydrocarbon receptor	芳烃受体
ANF	α-Naphthoflavone	α-萘黄酮
ATM	ataxia telangiectasia-mutated	毛细血管共济失调突变基因
ATR	ataxia telangiectasia and Rad3 related	ATM 和 Rad3 相关蛋白
AP- 1	activator protein-1	激活蛋白 1
BaP	benzo(a)pyrene	苯并(a)芘
BPDE	benzo(a)pyrene diolepoxide	苯并(a)芘二氢二醇环氧化物
CYP450	cytochromeP450	细胞色素 P450
DAPI	4',6-diamidino-2-phenylindole	4',6-二脒基-2-苯基吲哚
DDT	Dichlorodiphenyltrichloroethane	滴滴涕
DNA-PK	DNA-dependent protein kinase	DNA 依赖性蛋白激酶
DSBs	DNA Double-stand breaks	DNA 双链断裂
ERK	extracelluar signal-regulated kinase	细胞外调节蛋白激酶
IARC	International Agency for Research on Cancer	国际癌症研究组织
Grb2	growth factor receptorbound protein2	生长因子受体结合蛋白 2
JNK	c-Jun N-terminal kinase	c-Jun 氨基端激酶
MAPK	mitogen-activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶家族
PAHs	polycyclic aromatic hydrocarbons	PAHs 多环芳烃
PI3K	phosphatidylinositol 3-kinase	磷脂酰肌醇 3-激酶