

研究报告

Research Report

双酚 A 对三角涡虫 *DjSOD*, *DjCAT*, *DjGPx* 基因及相关酶活性的影响

邹杨建 吴素格 李娟 类艳贝 张秀芳*

山东理工大学生命科学院发育与进化生物学实验室, 淄博, 255049

* 通讯作者, zhxfshd@163.com

摘要 本试验旨在探讨环境内分泌干扰物双酚 A (BPA)对涡虫抗氧化酶(SOD, CAT, GPx)的活性及相关基因表达的影响。采用不同浓度的 BPA 处理涡虫 48 h,然后测定抗氧化酶活性,并应用半定量 RT-PCR 技术探讨相关基因的变化。在 BPA 胁迫下,SOD 活性呈现上升趋势、CAT 活性表现出了先上升后下降的趋势,GPx 活性总体上变化不大。随 BPA 浓度的增加,*DjSOD* mRNA 表达量上升,并呈现剂量-反应关系,*DjCAT* 及 *DjGPx* mRNA 表达量也呈现出明显的上调现象,但变化趋势并不同于酶活性。BPA 诱导涡虫的氧化应激反应,改变抗氧化酶 SOD、CAT 基因的转录水平。

关键词 双酚 A, 三角涡虫, 抗氧化酶, 基因表达

Effects of BPA on Activity and Gene Expression of Antioxidant Enzymes in Planarian *Dugesia japonica*

Zou Yangjian Wu Suge Li Juan Lei Yanbei Zhang Xiufang*

Laboratory of Developmental and Evolutionary Biology, School of Life Sciences, Shandong University of Technology, Zibo, 255049

* Corresponding author, zhxfshd@163.com

DOI: 10.13417/j.gab.034.001184

Abstract To understand the effect of Bisphenol A (BPA) on antioxidant enzymes (superoxide dismutase SOD, catalase CAT and glutathione peroxidase GSH-Px) activity and the mRNA levels for the genes encoding these antioxidant proteins, we used planarian as experimental material to study the antioxidant enzyme activities and the mRNA levels for the genes encoding these antioxidant proteins, under stress of different concentration of BPA for 48 h, the increase of SOD activities were most visible, meanwhile the CAT activities were found to be elevated first and then to be declined with the concentration of BPA exposure. No significant effects on glutathione peroxidase (GSH-Px) activities were observed excluding 0.564 mol/L BPA exposure. Real-time quantitative PCR showed that the transcripts of *DjSOD* were up-regulated and showed dose-response relationship with the concentration of BPA exposure. The transcripts of *DjCAT* and *DjGPx* were up-regulated also. However, the mRNA induction patterns were not in accordance with the changes in levels of antioxidant enzymes observed. BPA exposure promotes an oxidative stress response and changes the transcription level of antioxidant enzyme genes in planarian *Dugesia japonica*.

Keywords Bisphenol A (BPA), Planarian *Dugesia japonica*, Antioxidant enzyme, Gene expression

双酚 A (BPA),学名为 2,2-(4-羟基苯基)丙烷,是全球生产量最大的化学原料之一,调查显示,我国 2000~2006 年间 BPA 以平均每年 13%的速度增长 (Huang et al., 2012)。Zhang 等(2013)人抽样调查发现,我国 84%被测人群尿液中含有 BPA,46%被测人群血液中含有 BPA。BPA 是一类典型的环境内分泌

干扰物,具有潜在的生殖发育毒性、免疫毒性、神经毒性、致癌及内分泌干扰等作用,如:诱导斑马鱼胚胎产生氧化应激反应(Wu et al., 2011),导致鱼类的睾丸结构发生改变,性别分化受到干扰(Mandich et al., 2007)。但至今为止未见对三角涡虫影响的报道。

三角涡虫(*Dugesia japonica*)属扁形动物门、涡虫

基金项目:本研究由山东省自然科学基金(No.ZR2014DM015 和 ZR2013CM011)、国家级大学生创新创业训练计划项目(2014104-33036)和国家自然科学基金(No.31172074)共同资助

纲,具有极强的再生能力,作为水体污染指示生物之一,以其分布范围广、结构简单、易采集和培养等特点,日益受到众多毒理学研究者的重视。涡虫的DNA损伤、成体干细胞的微核频率、繁殖及再生等已被用作试验重点来进行生态毒理的研究(Knakievicz and Ferreira, 2008; 袁佐清和宫晓宁, 2014),但鲜见在基因表达水平的研究。本论文以三角涡虫为实验材料,研究 *DjSOD*、*DjCAT*、*DjGPx* 基因表达量及相关酶活性的变化,为应用涡虫的抗氧化系统评价 BPA 潜在的风险提供参考。

1 结果与分析

1.1 双酚 A 对抗氧化酶活性的影响

染毒各组涡虫均浆液超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)酶活性结果见表 1。从中可以看出,在实验浓度及染毒时间内,SOD 活性总体上表现出上升趋势,对照组平均值为 9.14 U/mg prot;但在低浓度时,与对照组相比并没有明显的差异,在浓度高于 0.564×10^{-5} mol/L 时,表现出了明显的上升,并在 BPA 浓度为 1.41×10^{-5} mol/L 时达到最大值,为 25.16/mg prot,明显高于其它浓度组($p < 0.05$)。CAT 活性表现出了先上升后下降的趋势,对照组平均值为 33.33 U/mg prot,在 BPA 浓度为 0.282×10^{-5} mol/L 时达到最大值,为 74.29 U/mg prot,之后随着 BPA 浓度增加 CAT 活性反而下降,在 BPA 浓度为 1.41×10^{-5} mol/L 时,为 49.52 U/mg prot,但仍明显高于对照组($p < 0.05$)。GPx 活性总体上变化不大,只在处理浓度为 0.564×10^{-5} mol/L 时,与对照组相比表现出了明显的上升($p < 0.05$)。

1.2 双酚 A 对基因表达的影响

BPA 诱导涡虫 *DjSOD*、*DjCAT*、*DjGPx* mRNA 相对表达量变化见图 1、图 2 和图 3。结果显示 BPA 胁迫

均导致三种基因 mRNA 相对表达量上升。*DjSOD* mRNA 表达量呈现剂量 - 反应关系,在 BPA 为 0.94×10^{-5} mol/L 时达到最大值。在 BPA 为 1.41×10^{-5} mol/L 时出现下降,但仍高于对照。*DjCAT* 及 *DjGPx* mRNA 表达量也呈现出随 BPA 浓度增加而增加的现象,但在低浓度时并没有统计学意义。*DjCAT* mRNA 表达量在 BPA 0.94×10^{-5} mol/L 时,是对照的 1.28 倍,在 BPA 1.41×10^{-5} mol/L 时,是对照的 1.22 倍。*DjGPx* mRNA 表达量在 BPA 1.41×10^{-5} mol/L 时达到最大值,是对照的 1.35 倍,表现出显著上调现象。

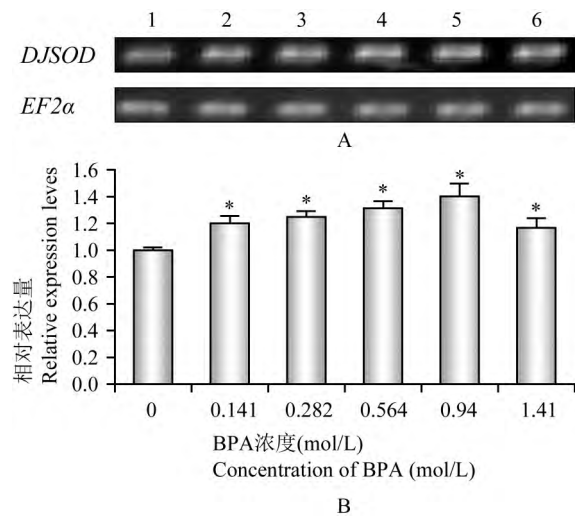


图 1 涡虫暴露于 BPA (48 h) 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L 时 *DjSOD* mRNA 基因表达水平

注: 1~6: BPA 浓度分别为 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

Figure 1 PCR results and relative expression of *DjSOD* in *D. japonica* incubated with (48 h) BPA for 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L
Note: 1~6: The *D. japonica* was exposed to BPA (48 h) for 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

表 1 BPA 对涡虫抗氧化酶活性的影响

Table 1 Effect of BPA on the activity of antioxidant enzymes in planarian *Dugesia japonica*

BPA 浓度($\times 10^{-5}$ mol/L)	超氧化物歧化酶(U/mg protein)	过氧化氢酶(U/mg protein)	谷胱甘肽过氧化物酶(ng/mg protein)
Concentration of BPA ($\times 10^{-5}$ mol/L)	Superoxide dismutase (U/mg protein)	Catalase (U/mg protein)	Glutathione peroxidase (ng/mg protein)
对照组	9.40 \pm 1.31	33.33 \pm 2.62	104.23 \pm 6.67
Control			
0.141	10.32 \pm 1.80	55.24 \pm 2.83*	109.86 \pm 3.47
0.282	11.58 \pm 1.32	74.29 \pm 4.71*	112.68 \pm 4.35
0.564	15.81 \pm 0.81*	62.86 \pm 3.03*	123.94 \pm 4.00*
0.940	19.03 \pm 2.53*	64.76 \pm 4.43*	108.45 \pm 4.75
1.410	25.16 \pm 2.28*	49.52 \pm 3.03*	106.86 \pm 4.51

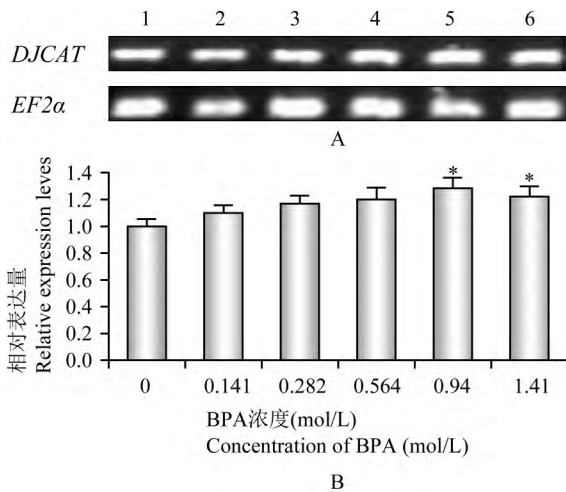


图2 涡虫暴露于BPA (48 h) 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L 时 *DjCAT* mRNA 基因表达水平

注: 1~6: 分别表示 BPA 浓度为 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

Figure 2 PCR results and relative expression of *DjCAT* in *D. japonica* incubated with (48 h) BPA for 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

Note: 1~6: The *D. japonica* was exposed to BPA (48 h) for 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

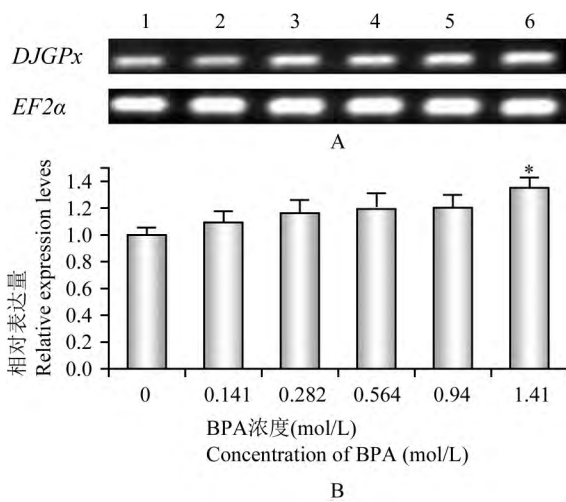


图3 涡虫暴露于BPA (48 h) 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L 时 *DjGPx* mRNA 基因表达水平

注: 1~6 分别表示 BPA 浓度为 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

Figure 3 PCR results and relative expression of *DjGPx* in *D. japonica* incubated with (48 h) BPA for 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

Note: 1~6: The *D. japonica* was exposed to BPA (48 h) for 0.141×10^{-5} mol/L, 0.282×10^{-5} mol/L, 0.564×10^{-5} mol/L, 0.94×10^{-5} mol/L, 1.41×10^{-5} mol/L

2 讨论

双酚 A 是重要的化工原料,随着工业和经济的迅速发展,其使用量日益增加,并大量排放到环境中,其最终归宿是由各种途径进入水体,对水生生物产生毒害作用。然而,BPA 对水生动物生态毒性的研究资料非常少,且多集中在对鱼类毒性的研究(Saili et al., 2011),对淡水无脊椎动物毒性的研究资料更是相当匮乏(Mihaich et al., 2009)。因此,有必要将用涡虫作为实验材料研究 BPA 对水生生态系统的毒性。

生物体遭受污染物胁迫时,体内会产生大量自由基,若不及时清除,会在机体内积累并造成氧化损伤,使机体处于氧化应激状态。已有研究表明,持续暴露在低剂量 BPA 下,小鼠体内抗氧化酶 SOD、GPx、CAT 活性均下降,并产生较多的丙二醛(MDA),致使肝肾细胞氧化损伤(王晓梅等, 2013)。曾丽璇等报道:在一定的浓度范围内,河蚬(*Corbicula fluminea*)体内 SOD、CAT 活性对水体中 BPA 反应敏感,可与其它敏感性指标一起作为 BPA 污染的早期监测指标(曾丽璇等, 2014)。然而,也有学者提出不同的见解,抗氧化酶活性的变化只能间接反映生物体受污染胁迫的程度,且其活性变化是动态过程,将其作为污染物暴露的生物标志物时需考虑多种因素的影响(Faria et al., 2009)。

虽然 BPA 可能影响抗氧化酶系统,但对其分子机制知之甚少,为了能够更好地理解 BPA 的氧化应激过程,我们研究了 BPA 暴露对涡虫抗氧化酶活性及相关基因表达量变化的影响。在实验浓度及染毒时间内,涡虫体内 SOD、CAT 活性均表现出上升趋势,GPx 活性变化不大,或许表明涡虫对前两者的敏感程度高于后者。SOD 和 CAT 活性变化趋势不一致,其成因可能是由于 H_2O_2 的来源不只是 SOD 催化的歧化反应产物,它还可以通过氨基酸或细胞色素 P450 氧化酶激活等其它途径。*DjSOD* mRNA 相对表达量上升,变化趋势同 SOD 酶活性。*DjCAT* mRNA 相对表达量在 BPA 浓度为 0.94×10^{-5} mol/L、 1.41×10^{-5} mol/L 时升高,*DjGPx* mRNA 相对表达量在 BPA 浓度为 1.41×10^{-5} mol/L 时升高。然而,变化趋势并不同于 CAT 及 GPx 活性的变化。这与一些学者在鱼类的研究结果相似(Jin et al., 2010)。我们推测在涡虫体内,CAT 酶活力的变化可能是在后翻译水平调节的。但 Hassan 等(2012)报道 BPA 可以降低小鼠体内抗氧化基因的表达,降低抗氧化酶活性,这或许与实验浓度、染毒时间、实验动物及动物的发育时期有关。

BPA 暴露可诱导涡虫抗氧化酶(SOD 和 CAT)显

著变化,表明 BPA 诱导了涡虫的氧化应激反应。相应地,我们的研究证明了抗氧化酶基因的转录水平也发生了变化。

3 材料与方 法

3.1 实验材料

三角涡虫采集于山东博山区泉河头的小溪中,在实验室应用凉开水避光养殖 2~3 d 换水 1 次,每周喂养线虫 1 次,实验前饥饿 5~7 d。双酚 A 购自阿拉丁公司 AR,实验所用 RNAiso Reagent、Oligo (dT)、RNase Inhibitor、dNTP、RtaseM-MLV、MLVBuffer、*Taq* 酶购自大连宝生物 TaKaRa 公司,引物由生工生物工程(上海)有限公司合成。SOD、CAT、GPx 测定试剂盒购自南京建成生物工程公司。

3.2 实验方法

3.2.1 双酚 A 胁迫

先用二甲基亚砷溶解 BPA,配成 0.001 mol/L 贮存液,实验时稀释成所需浓度,试液浓度最高时二甲基亚砷含量低于 0.01%。根据毒性实验结果,涡虫 48 h LC50 值为 2.82×10^{-5} mol/L。设置 BPA 浓度梯度为 48 h LC50 值的 1/2、1/3、1/5、1/10、1/20,即 1.41×10^{-5} mol/L、 0.94×10^{-5} mol/L、 0.564×10^{-5} mol/L、 0.282×10^{-5} mol/L、 0.141×10^{-5} mol/L,同时设置对照组。每组设置 3 个平行组,每个平行组选择 10 条大小相同的涡虫,处理期间置于 22℃ 的恒温培养箱中,培养 48 h,每天定时更换实验溶液。

3.2.2 酶提取及生化分析

分别取处理组和对照涡虫,放入预冷的研钵中,加入磷酸缓冲液研磨,并用磷酸缓冲液清洗研钵,一并倒入离心管,平衡 4℃,10 000 r/min 离心 10 min,上清液即为酶液,用于抗氧化酶活性的测定。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活性和酶液蛋白含量按试剂盒说明书测定(试剂盒购自南京建成生物工程公司)。

3.2.3 基因表达

总 RNA 提取采用 Trizol 试剂,总 RNA 经 DNAase 处理及纯化后,采用 Reverse Transcriptase M-MLV 进行涡虫总 RNA 反转录,合成第一链 cDNA。应用基因 *EF2 α* 为内参,使用反转录产物单链 cDNA 作为模板进行 PCR 扩增。SOD、CAT、GPx 及 *EF2 α* 基因的引物见表 2。PCR 反应 94℃ 5 min,94℃ 30 s;退火 40 s,72℃ 45 s;反应 30~33 个循环,72℃ 10 min,

表 2 半定量 RT-PCR 引物

Table 2 Sequences of primer pairs used in the real-time quantitative PCR reactions

基因	PCR 引物序列(5'-3')	产物长度(bp)
Gene	Primer sequences (5'-3')	Product length (bp)
<i>EF2α</i>	GGTCTTTACGGATGTCAAGC TCTCCGTATGTCCCTGTCTG	215
<i>SOD</i>	CAAGGGTCNCGGNTGGGG GCATGTTCCCAKACATCWAT	249
<i>CAT</i>	CGAGACACTCAGCGACATAG GACCTCAACTTTCAGCGATA	119
<i>GSH-PX</i>	AGGAAATGAGACAGCGG CATTCAATCCCATCTCCAAG	108

退火温度及反应循环根据各引物变化而变化。电泳并保存图片,应用 Gel-Pro analyzer 软件进行亮度分析。

3.2.4 数据分析

实验结果以平均值 \pm 标准差表示,使用 SPSS 16.0 软件进行分析,对于有显著差异的与对照组进行 LSD 比较($p < 0.05$)。

作者贡献

邹杨建、李娟和类艳贝负责实验操作及撰写论文;吴素格负责实验技术指导;张秀芳负责设计实验及修改论文。

致谢

本研究由山东省自然科学基金(No.ZR2014DM015 和 ZR2013CM011)、国家级大学生创新创业训练计划项目(201410433036)和国家自然科学基金(No.31172074)共同资助。

参考文献

- Faria M., Carrasco L., Diez S., Riva M.C., Bayona J.M., and Barata C., 2009, Multi-biomarker responses in the freshwater mussel *Dreissena polymorpha* exposed to polychlorobiphenyls and metals, *Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology and Pharmacology*, 149(3): 281-288
- Hassan Z., Elobeid M., Virk P., Omer S.A., ELAmin M., Daghestani M.H., and AlOlayan E.M., 2012, Bisphenol A induces hepatotoxicity through oxidative stress in rat model, *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2012: 1-6
- Huang Y., Wong C., Zheng J., Bouwman H., Barra R., Wahlström B., Neretin L., and Wong M.H., 2012, Bisphenol A (BPA) in China: a review of sources, environmental levels, and potential human health impacts, *Environment International*, 42: 91-99

- Jin Y., Zhang X., Shu L., Chen L., Sun L., Qian H., Liu W., and Fu Z., 2010, Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*), *Chemosphere*, 78(7): 864-852
- Knakievicz T., and Ferreira H.B., 2008, Evaluation of copper effects upon *Girardia tigrina* freshwater planarians based on a set of biomarkers, *Chemosphere*, 71(3): 419-428
- Mandich A., Bottero S., Benfenati E., Cevasco A., Erratico C., Maggioni S., Massari A., Pedemonte F., and Viganò L., 2007, *In vivo* exposure of carp to graded concentrations of bisphenol A, *General and Comparative Endocrinology*, 153(1-3): 15-24
- Mihaich E.M., Friederich U., Caspers N., Hall A.T., Klecka G.M., Dimond S.S., Staples C.A., Ortego L.S., and Hentges S.G., 2009, Acute and chronic toxicity testing of bisphenol A with aquatic invertebrates and plants, *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 72(5): 1392-1399
- Saili K.S., Corvia M.M., Weber D.N., Patel A.U., Das S.R., Przybyla J., Anderson K.A., and Tanguay R.L., 2012, Neurodevelopmental low-dose bisphenol A exposure leads to early life-stage hyperactivity and learning deficits in adult zebrafish, *Toxicology*, 291(1-3): 83-92
- Wang X.M., Hong Y., and Chen F., 2013, Experimental study on the oxidative damage by bisphenol A at middle and low doses in mice, *Shiyong Yufang Yixue (Practical Preventive Medicine)*, 20(3): 280-282 (王晓梅, 洪燕, 陈锋, 2013, 中低剂量双酚 A 对小鼠肝、肾氧化损伤作用的实验研究, *实用预防医学*, 20(3): 280-282)
- Wu M., Xu H., Shen Y., Qiu W., and Yang M., 2011, Oxidative stress in zebrafish embryos induced by short-term exposure to bisphenol A, nonylphenol, and their mixture, *Environmental Toxicology & Chemistry*, 30(10): 2335-2341
- Yuan Z.Q., and Gong X.N., 2014, Detection of genotoxicity of PFOS and PFOA in planarian *Dugesia japonica* by SCGE, *Jiyinzxue Yu Yingyong Shengwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 33(4): 906-909 (袁佐清, 宫晓宁, 2014, 单细胞凝胶电泳检测 PFOS 和 PFOA 对三角涡虫核 DNA 的损伤作用, *基因组学与应用生物学*, 33(4): 906-909)
- Zeng L.X., Zhang Y.J., Kang Y., and Zhang Q.Y., 2014, Effects of BPA and NP on respiratory metabolism and antioxidant enzymes in *Asian clam*, *Shengtai Huanjing Xuebao (Ecology and Environmental Sciences)*, 23(1): 122-128 (曾丽璇, 张悦君, 康园, 张秋云, 2014, 双酚 A 和壬基酚对河蚬呼吸代谢和抗氧化酶活性的影响, *生态环境学报*, 23(1): 122-128)
- Zhang T., Sun H., and Kannan K., 2013, Blood and urinary bisphenol A concentrations in children, adults, and pregnant women from China: partitioning between blood and urine and maternal and fetal cord blood, *Environmental Science & Technology*, 47(9): 4686-4694