

UV-B 辐射和蒽对三角褐指藻 DNA 伤害的相互作用

唐学玺, 黄 键, 王艳玲, 王 蒙, 王丽丽

(青岛海洋大学生命学院, 青岛 266003)

摘要:运用生态毒理学和生物化学的方法研究了紫外线和多环芳烃——蒽对三角褐指藻 DNA 的伤害作用。结果表明, 蒽对三角褐指藻的生长有抑制作用; 随着蒽浓度的增加, 三角褐指藻 DNA 损伤程度增加; 在蒽浓度固定不变时, 随着处理时间的延长, DNA 的损伤程度同样提高; 在蒽的处理过程中同时伴有紫外线的辐射处理, DNA 的损伤程度加剧; 蒽处理解除一段时间后, DNA 损伤程度未明显减轻, 而 UV-B 处理解除后, DNA 的损伤可明显恢复。说明 DNA 的损伤可在一定程度上指示海洋微藻受伤害的程度。

关键词:紫外线辐射; 三角褐指藻; 蒽; DNA 损伤

Interaction of UV-B Radiation and Anthracene on DNA Damage of *Phaeodactylum tricornutum*

TANG Xue-Xi, HUANG Jian, WANG Yan-Ling, WANG Meng, Wang Li-Li (Marine Life Science College, Ocean University of Qingdao, Qingdao 266003, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2002, 22(3): 375~378.

Abstract: The paper reported that the interactive damage of UV-B(280~320nm) radiation and polycyclic aromatic hydrocarbons(anthracene) to DNA of *Phaeodactylum tricornutum* was studied using ecotoxicological and biochemical methods. The results showed that anthracene could inhibit the growth of *Phaeodactylum tricornutum*, the relative growth rate in *Phaeodactylum tricornutum* gradually decreased with the increment of anthracene concentration, and the calculated 48h • EC₅₀ of anthracene to *Phaeodactylum tricornutum* was 0.0809mg/L. The DNA damage of algae cells was also analyzed after exposure to different concentration of anthracene. The anthracene had obvious damage effect on the DNA of *Phaeodactylum tricornutum*, the DNA damage degree of algae cells exhibited promotion accompanied with increased exposure intensity of anthracene. Meanwhile the exposure time had effect on DNA damage of algae cells. If the anthracene concentration was fixed, the DNA damage also promoted as exposure was elongated. During early 2 days of exposure, the DNA damage degree of algae cells in exposure group had already notable difference from that in control group ($p < 0.05$); and with the exposure time elongated(2 days later), this difference between exposure group and control group showed more remarkable ($p < 0.01$). When *Phaeodactylum tricornutum* was treated with different concentration of anthracene and UV-B(1.25J/m²) radiation synchronously, the experiment results showed that UV-B radiation could enhance DNA damage of algae cells caused by anthracene. This enhancement of DNA damage caused by UV-B radiation had close relationship with anthracene concentration. The enhancement effect of 1.25J/m² UV-B radiation on DNA damage in algae cells was not notable ($p > 0.05$) as the anthracene concentration was less than 0.02 mg/L; on the contrary, it changed very remarkable compared with that under treatment by anthracene alone as anthracene

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39870146)

收稿日期: 2001-11-15 修回日期: 2001-08-03

作者简介: 唐学玺(1965~), 男, 山东潍坊人, 博士, 教授。主要从事生态毒理学研究。

concentration was more than 0.02 mg/L. The repair of DNA damage was not remarkable ($p > 0.05$) after the algae, which were exposed to anthracene, were transferred to anthracene-free fresh medium and cultured for 3 days, while DNA damage was obviously decreased ($p < 0.05$) after the algae were continued to culture for 3 days when UV-B radiation was removed. All these exhibited that the DNA damage could indicate the damage degree of marine microalgae resulted from anthracene exposure.

Key words: UV-B radiation; *Phaeodactylum tricorutum*; anthracene; DNA damage

文章编号:1000-0933(2002)03-0375-04 中图分类号:S941.91 文献标识码:A

由于臭氧层侵蚀和破坏的日趋加重,使得到达地面的紫外线,尤其是对生物 DNA 具损伤作用的紫外线 B 波段(UV-B)的辐射增强。UV-B 辐射的增强已影响整个地面生态系统的变化,这是最引人注目的全球变化现象之一。研究表明:北海海水表面紫外线辐射率的 10% 能够穿透到 6m 深的水层,而在北冰洋的清澈水域,其表面 10% 的辐射率可到达 30m 的水层。因此,整个海洋生态系统和海洋生物(尤其是海洋浮游生物)受紫外线辐射影响和伤害的潜在危险性不断增加。多环芳烃(PAHs)是石油污染中对海洋生物毒性最大的成分,它可在生物体内大量积累,并在紫外线的辐射下发生光敏化作用,进一步加剧对生物体的伤害。UV-B 辐射和 PAHs 对鱼、贝类伤害的相互作用研究国外已有报道^[1~3]。但是,二者共同对海洋微藻影响的研究国内外仍为空白。本文在前期工作^[4,5]的基础上继续探讨 UV-B 辐射和 PAHs 共同对海洋微藻 DNA 的伤害作用。

1 材料和方法

1.1 藻种来源

实验所用的三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum*)取自本院微藻培养室。

1.2 培养方法和条件

按照唐学玺和李永祺^[6]方法和条件进行,并计算相对增长率。

1.3 葱的毒性实验

将葱溶于丙酮配成一定浓度的母液,避光于 4℃ 保存,在预备实验的基础上,配制含有 0、0.03、0.06、0.09、0.12、0.15mg/L 葱的培养液,用于测定葱对三角褐指藻生长的影响。同时配制含 0、0.01、0.02、0.03、0.04、0.05mg/L 低浓度葱的培养液,在不影响其对藻细胞生长的情况下,在第 3 天取样分析 DNA 伤害的程度。另外,固定葱的浓度在 0.03mg/L,每隔 1d 取样 1 次,测试 DNA 伤害程度随时间变化的情况。上述实验重复 3 次,并且对照组中加入与处理组等体积的丙酮,以消除丙酮引起的实验误差。

1.4 UV-B 辐射体系

采用北京曙光电源厂生产的紫外 B 灯,北京师范大学生产的 UV-B 型紫外辐射强度仪测定辐射强度。紫外 B 灯外用乙酸纤维素薄膜(上海生化试剂公司,厚度为 0.12mm)包被,以除去 280nm 的短波辐射。整个体系在正式实验前需连续照射 72h,以减小薄膜滤过作用的不稳定性。所用薄膜每隔 1 周更换 1 次,防止薄膜的老化作用。

1.5 UV-B 辐射处理

辐射强度一定($1.25\mu\text{W}/\text{cm}^2$)通过调整辐射时间控制辐射剂量。在预备实验的前提下,设计 $1.4\text{J}/\text{m}^2$ 的辐射剂量,每天取代日光灯管处理 4h。

1.6 DNA 样品的制备和检测

按 CTAB 法^[7]和 Shugart^[8]的方法进行,用小牛胸腺 DNA 作为标准 DNA 溶液。

1.7 数据处理

采用 Shugart^[8]提出的公式: $F = (X_{\text{sample}} - X_{\text{ssDNA}}) / (X_{\text{dsDNA}} - X_{\text{ssDNA}})$, X_{sample} 为样品解旋后的荧光值, X_{ssDNA} 为样品单链 DNA 的荧光值, X_{dsDNA} 为样品双链 DNA 的荧光值, F 表示解旋后存留双链 DNA 的比例。采用 t 检验分析组间的数据大小。

2 结果

2.1 蒽对三角褐指藻生长的影响

蒽对三角褐指藻的生长具有一定的抑制效应,随着蒽浓度的增加,相对增长率下降,由 K 值的变化计算蒽对三角褐指藻生长的 48h 半抑制剂量(48h · EC₅₀)为 0.0809mg/L(图 1)。

2.2 不同蒽浓度对三角褐指藻 DNA 的损伤作用

蒽对三角褐指藻 DNA 的损伤作用呈现出剂量-效应关系,即随着蒽浓度的提高,DNA 的损伤愈严重,表现在 F 值呈逐渐降低的趋势(图 2)。

2.3 不同处理时间对三角褐指藻 DNA 的损伤作用

蒽对三角褐指藻 DNA 的损伤同样表现出时间-效应关系(图 3)。在处理的前两天,与对照组相比,DNA 的损伤就比较明显(p<0.05),但从第 3 天开始,随着处理时间的延长,DNA 的损伤愈加显著(p<0.01)。

2.4 UV-B 辐射对三角褐指藻 DNA 损伤的加剧作用

在用不同浓度的蒽处理的过程中,同时附加 1.25J/m² 的 UV-B 辐射处理。结果如图 2 所示,在蒽单独作用下,三角褐指藻 DNA 的损伤程度随着蒽浓度的提高逐渐上升;而在蒽和 UV-B 辐射共同作用下,DNA 的损伤程度更加明显。具体来说,蒽浓度小于 0.02mg/L 时,蒽单独作用同其与 UV-B 辐射共同作用时对 DNA 的损伤差别不明显(p>0.05)。当蒽浓度大于 0.02mg/L 时,二者间的差异显著(p<0.05)。说明 UV-B 的辐射处理加剧了蒽对三角褐指藻的伤害(图 2)。

2.5 蒽和 UV-B 辐射处理解除后 DNA 损伤恢复作用

不同浓度的蒽处理 3d 时,更换新鲜的无蒽培养液继续培养 3d, F 值的测定结果表明,三角褐指藻的 DNA 损伤作用恢复不明显(图 2)。相反,UV-B 解除后,日光灯管代之继续培养 3d 后,DNA 的损伤得到了明显的恢复,可恢复到蒽单独处理时的水平(图 4)。

3 讨论

多环芳烃是一类常见的海洋环境污染物,其中一些化合物具有强烈的致癌性,对海洋生物的毒性较大,因此对其进行实时有效的监测是十分必要的。多环芳烃在机体内很容易代谢,不易在生物组织内积累,机体内多环芳烃蓄积量的化学检测通常仅仅反映类污染物在体内代谢后所残留的部分水平^[9],而不能反映其真实的含量的高低。采用生物检测的方法可真实有效地反映污染物的实际水平和累积效应。如生物体遗传物质受污染损伤的修复作用比较困难,其 DNA 的损伤水平可用于反映污染损伤的灵敏而有效的分子生物学检测指标^[10]。万芳数据、陈亦欣等^[11]和冯涛等^[9]都对多环芳烃引起鱼类 DNA 的损伤进行了研究,指出 DNA 的损伤程度可指示海洋多环芳烃污染的程度。本实验采用海洋微藻为生物材料,测试了多环芳烃-蒽

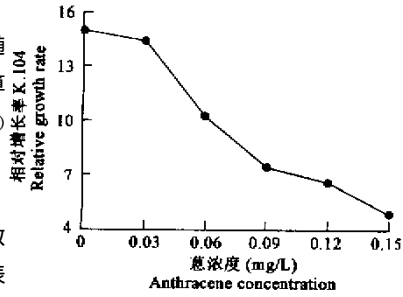


图 1 蒽对三角褐指藻生长的影响

Fig.1 The effect of anthracene on growth of *Phaeodactylum tricoratum*

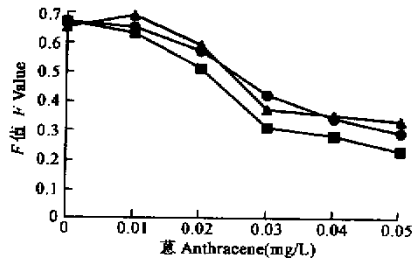


图 2 蒽和 UV-B 辐射对三角褐指藻 DNA 的损伤作用

Fig.2 The effect of anthracene and UV-B radiation on DNA damage of *Phaeodactylum tricoratum*

● 蒽单独处理 Treated by anthracene alone; ■ 蒽与 UV-B 辐射共同处理 Treated by anthracene and UV-B together; ▲ 蒽处理解除 Removal of anthracene treatment

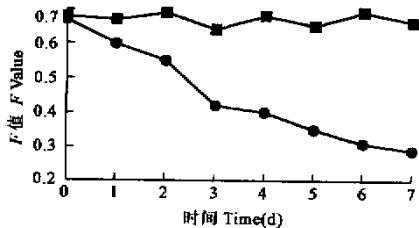


图 3 不同处理时间对三角褐指藻 DNA 的损伤作用

Fig.3 The effect of different time on DNA damage of *Phaeodactylum tricoratum*

■ 对照组 Control group; ● 处理组 Treated group

对藻 DNA 的损伤作用。结果表明,海洋微藻 DNA 的损伤同样可指示多环芳烃的污染状况。

UV-B 辐射对生物体的伤害作用可分为两个方面:

①UV-B 辐射本身对生物体具有很强的伤害作用。②多环芳烃是一类光敏化合物,在 UV-B 的辐射处理下发生光敏化作用,进一步加剧多环芳烃的生物伤害效应。本实验结果也证明了 UV-B 辐射对蒽引起三角褐指藻 DNA 伤害的加剧作用。但是从 UV-B 辐射解除一段时间后 DNA 损伤的明显恢复作用分析,UV-B 辐射引起蒽对三角褐指藻 DNA 损伤作用的加剧主要是由于 UV-B 本身对生物体的伤害作用造成的,而不是由蒽在 UV-B 辐射作用下的发生光敏化作用引起的。

包括多环芳烃在内的许多污染物在机体代谢过程中会引起多种类型的 DNA 的损伤,如 DNA 加合物、链断裂、碱基的氧化和碱基的缺失等。不同类型的 DNA 损伤之间存在密切的相关性,一种类型的 DNA 损伤常常可以指示其它类型 DNA 损伤的存在。这是由于污染物在体内的代谢过程中会产生多种中间产物,一方面这些中间产物会直接作用并伤害 DNA 分子,另一方面,许多中间产物还可以间接地造成 DNA 分子的多种类型的损伤。况且,不同类型的 DNA 损伤之间可以相互转化。因此,在实际的污染检测中通常采用多种类型 DNA 损伤的综合效应来指示污染的状况^[9]。

参考文献

- [1] Lowe D N. Lysosomal membrane responses in mussels to experimental contaminant exposure. *Aquatic Toxicol.* 1995, **33**:105~112.
- [2] Adamo D R. Bioaccumulation and biomagnification of polycyclic aromatic hydrocarbons in aquatic organisms. *Mari Chem*, 1997, **56**(1-2):45~49.
- [3] Weinstein J E. An ultrastructural examination of mode of UV-induced toxic action of fluoranthene in the fathead minnow. *Aquat Toxicol.* 1997, **39**(1):1~22.
- [4] Huang J(黄健), Liu X D(刘向东), Tang X X(唐学玺). The toxic effect of anthracene and benzo(a) pyrene on marine microalgae. *Journal of Ocean University of Qingdao*(in Chinese)(青岛海洋大学学报), 2000, **30**(3):499~502.
- [5] Wang Y(王悠), Tang X X(唐学玺), Li Y Q(李永祺). The joint toxicity of anthracene and organic phosphorus pesticide on marine microalgae. *Marine Sciences*(in Chinese)(海洋科学), 2000, **24**(4):5~6.
- [6] Tang X X(唐学玺), Li Y Q(李永祺). The relationship between monocrotophos-resistance and antioxidant activity in four marine microalgae. *Oceanologia ET Limnologia Sinica*(in Chinese)(海洋与湖沼), 2000, **31**(4):414~418.
- [7] Hong Y K, Kim S D, Miriam P E. DNA extraction conditions from *Porphyra perforata* using LiCl. *Journal of Applied Phycology*, 1995, **7**:101~107.
- [8] Shugart L R. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding. *Aquatic Toxicology*, 1998, **13**:43~52.
- [9] Feng T(冯涛), Zheng W Y(郑微云), Hong W S(洪万树)等. Damage effect of benzo(a)pyrene on liver DNA in *Boleophthalmus pectinirostris*. *Journal of Fisheries of China*(in Chinese)(水产学报), 2000, **24**(4):359~363.
- [10] Varanasi U, Reichert W L, Eberhart B T. Formation and persistence of benzo[a]pyrene-diolepoxide-DNA adducts in liver of english sole (*Parophrys vetulus*). *Chem Bio Interact*, 1989, **69**:203~216.
- [11] Chen Y X(陈亦欣), Wang C G(王重刚), Li Q(李钦)等. Damage of benzo[a]pyrene and pyrene on liver DNA in *Mugil so-iuy* Basileusky. *Acta Oceanologica Sinica*(in Chinese)(海洋学报), 2000, **22**(2):92~96.

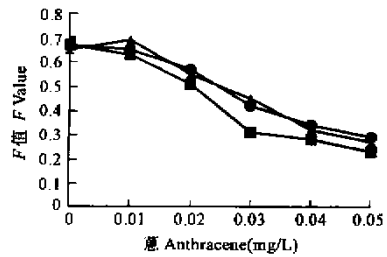


图4 UV-B 解除后三角褐指藻 DNA 的损伤作用

Fig. 4 The recovery of DNA damage after removing of UV-B radiation in *Phaeodactylum tricornutum*

● 蒽单独处理 Treated by anthracene alone; ■ 蒽与 UV-B 辐射共同处理 Treated by anthracene and UV-B together; ▲ UV-B 辐射处理解除 Removal of UV-B treatment