

生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学研究进展

戴家银, 王建设

(中国科学院动物研究所, 北京 100080)

摘要:将基因组学和蛋白质组学知识整合到生态毒理学中形成了生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学。通过生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学的研究能够在基因组和蛋白质组水平更深入理解毒物的作用机制, 寻找更敏感、有效的生物标记物, 形成潜在的强有力的生态风险评价工具。介绍了生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学的研究进展, 以及 DNA 芯片技术和 2D-凝胶电泳技术在持久性有毒污染物的生态毒理学研究中的应用。

关键词:生态毒理基因组学; 生态毒理蛋白质组学; DNA 芯片技术; 2D-凝胶电泳; 持久性有机污染物

文章编号:1000-0933(2006)03-0930-05 **中图分类号:**X171 **文献标识码:**A

Progress in ecotoxicogenomics and ecotoxicoproteomics

DAI Jia-Yin, WANG Jian-She (Institute of Zoology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(3): 930 ~ 934.

Abstract: Ecotoxicogenomics and ecotoxicoproteomics are integration of genomics and proteomics into ecotoxicology. Ecotoxicogenomics is defined as the study of gene and protein expression in non-target organisms that is important in responses to environmental toxicant exposures. Ecotoxicogenomic tools may provide us with a better mechanistic understanding of ecotoxicology, and they are likely to provide a vital role in ecological risk assessment. Progress in ecotoxicogenomics and ecotoxicoproteomics are discussed in this paper. DNA gene chip and 2D-gel usually used in ecotoxicogenomics and ecotoxicoproteomics are also expounded by examples.

Key words: ecotoxicogenomics; ecotoxicoproteomics; DNA microarray; 2D-gel; persistent organic pollutants

随着生态学和环境科学的深入发展, 生态毒理学已成为生态学和环境科学前沿研究领域, 正从基因、蛋白质、器官和整体水平深入开展研究工作。

在人类基因组计划实施的短短几年间, 以“组学(-omics)”构成的学科及其相关研究如雨后春笋般在生命科学界迅速蔓延、蓬勃发展。在环境科学领域中也出现了环境基因组学(environmental genomics)、毒理基因组学(toxicogenomics)等学科。Snape 等人^[1-3]将基因组学知识整合到生态毒理学中, 于 2004 年提出了“生态毒理基因组学(ecotoxicogenomics)”的概念, 通过生态毒理基因组学研究确认一系列毒物效应基因, 从而在基因组水平更深入理解毒物的作用机制, 并在基因和蛋白质水平寻找更敏感、有效的生物标记物(biomarkers), 形成潜在的强有力的生态风险评价工具。

持久性有机污染物(Persistent Organic Pollutants, POPs)是指能持久存在于环境中、通过食物链蓄积、逐级传递, 经直接或间接途径进入人体的化学物质。POPs 具有致癌、致畸、致突变性、内分泌干扰等毒作用。POPs 对人体健康和生态环境带来的危害受到全社会的普遍关注, 引起世界各国的决策者和科学家的高度重视, 也成为环境科学和生态毒理学研究的热点课题之一^[4,5]。我国已于 2001 年 5 月签署了控制 12 种 POPs 对人类健康

基金项目:中国科学院知识创新工程重要方向性资助项目(KSCX2-SW-128)

收稿日期:2005-08-30; **修订日期:**2005-12-05

作者简介:戴家银(1965~), 男, 安徽怀宁人, 博士, 研究员, 主要从事生态毒理学和生物化学研究. E-mail: daijy@ioz.ac.cn

Foundation item: The project was supported by the Innovation Project of Chinese Academy of Sciences (No. KSCX2-SW-128)

Received date: 2005-08-30; **Accepted date:** 2005-12-05

Biography: DAI Jia-Yin, Ph.D., Professor, mainly engaged in ecotoxicology and biochemistry. E-mail: daijy@ioz.ac.cn

和环境造成威胁的国际公约《斯德哥尔摩公约》。目前我国履行该国际公约面临着巨大的挑战,缺乏 POPs 这类污染物的第一手资料,有关该类污染物对自然环境、生态系统和人类健康影响的基础研究薄弱^[6,7]。同时,一些未包括在公约 12 种 POPs 之内的新的持久性有机污染物也引起各国科学家的注意,如阻燃剂多溴联苯醚(PBDEs),全氟辛酸胺(PFOS)等,它们在生物体内的累积及其毒理研究也已成为迫切需要开展的工作^[8,9]。

本文重点介绍了 DNA 芯片技术和 2D-凝胶电泳技术在持久性有机污染物的生态毒理研究中的应用。阐述了生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学的研究进展,以期进一步提升我国生态毒理学研究水平。

1 生态毒理基因组学研究进展

基因芯片(gene chip),又称 DNA 微阵列(microarray),是由大量 DNA 或寡核苷酸探针密集排列所形成的探针阵列,待检测样本的核酸序列可根据碱基互补配对的原理与芯片上相应探针分子结合。经过标记的两等量不同 RNA 样本同时与 DNA 阵列杂交,可高通量、迅捷精确的比较两样本基因表达谱的差异。利用 DNA 微阵列技术,一个单一的毒理基因组分析就可能产生成千上万个数据。通过检测哪些基因受到特殊化学污染物的影响,寻找同污染物密切相关的基因,用于研究污染物的毒作用机制。通过分析不同污染物暴露的基因表达谱特征,确定不同污染物暴露的生物标志物,可实现对污染物毒性的早期预警。通过比较新化学物和已知污染物暴露基因表达谱的变化,可在新化合物研发阶段比传统方法更早地了解该化学物的毒理以及潜在的副作用。通过研究不同有毒污染物暴露所致特征性基因表达谱的改变(应答“指纹”),可快速确定环境污染物的性质并对其进行分类。结合生物信息学可开发具有同各类污染物相关基因的新一代小型检测芯片,如“环境激素”芯片,用于检测专一性环境激素对生物的影响;“有毒污染物”芯片,专一检测水体中持久性有机污染物以及饮用水加氯消毒产生的痕量有毒物质。

Forrest 等人应用基因芯片技术和实时聚合酶链反应(RT-PCR)技术,在职业性接触苯的工人中检测了苯接触对外周血单核细胞基因表达的影响。结果显示,CXCL16、ZNF331、JUN 和 PF4 等基因的表达发生特异性改变,这些基因可作为苯接触的潜在的生物标志物,为利用生物芯片技术检测苯暴露提供了重要信息^[10]。Wang 等人用全血总 RNA 分析了锅炉制造工人职业接触金属烟雾前后的基因表达。由于接触微粒而引起表达改变的基因与炎症反应、氧化应激、胞内信号转导、细胞周期和细胞凋亡密切相关^[11]。

双氯醋酸(Dichloroacetic acid, DCA)是自来水加氯消毒的副产物,能引起啮齿类动物的肝细胞癌变。2003 年,Thai 运用 DNA 芯片技术对 DCA 的致癌作用进行了研究。基因表达谱分析显示 24 个基因表达改变,其中 15 个基因进一步经 Northern 印迹证实。在 15 个基因中,14 个基因表达明显下调,包括细胞色素 P450 2C29(CYP 2C29)、CYP3A11、肝羧酸脂酶等。另一个基因 CYP2A4/5 表达上调。相应研究为快速分析水环境中微量有机物的毒性提供新的途径^[12]。

日本学者 Azumi 利用海鞘 DNA 芯片,分析比较海鞘基因表达谱变化,据此推测海鞘暴露何种污染物并用来监测环境污染程度^[13]。该技术在环境保护和环境监测领域中具有广阔的应用前景。Taroncher-Oldenburg 等应用 70mer 的寡核苷酸芯片监测并量化环境氮循环中的功能基因多样性^[14]。

2 生态毒理蛋白质组学的研究进展

基因芯片技术对于揭示有毒污染物诱导的基因表达谱变化具有十分的重要意义。但是在多数情况下,mRNA 与蛋白质的关系在结构上和动力学上是高度非线性的,mRNA 表达分析不能有效地预测有毒污染物与蛋白质的作用。生态毒理蛋白质组学是从整体的蛋白质水平上,探讨生物在同毒物接触或环境胁迫下,细胞蛋白质的存在及其活动方式(蛋白质谱)的变化。2D-凝胶电泳技术将蛋白质混合物在二维平面上充分展开,而基质辅助激光解析飞行时间质谱(MALDI-TOF)和生物信息学相结合用于确定感兴趣蛋白斑点的性质特征,是目前蛋白质组学研究中最常用的方法。将蛋白质组学的相关技术应用到生态毒理学中,可在蛋白质水平上认识外源性化学物的毒作用及其机制。同时,与基因表达谱相类似,有毒污染物及其浓度变化所致细胞蛋白质谱改变的“指纹特征”,可作为有效表征污染物暴露的生物学标记物(图 1)。

虹鳟暴露壬基酚、地亚农(diazinon)和烯虫磷(propetamphos)3 种污染物,以及污水厂排放口和排放口上游

参考点, 21d 后取样分析腮的蛋白质谱变化。结果显示虹鳟暴露三种污染物后腮蛋白质谱中 10% ~ 30% 蛋白质出现在污水厂排放口暴露的蛋白质谱中。结果为混合污染暴露监测提供了可能^①。

Shrader 研究了斑马鱼胚胎在不同种类(雌二醇和壬基酚)和浓度(1.0mg/L 和 0.1mg/L)内分泌干扰物暴露时的蛋白质谱变化^[15]。如图 2A 所示, 1.0mg/L 的雌二醇暴露引起 9 + 31 种蛋白质被抑制, 诱导产生 27 + 23 种新的蛋白质, 其中 36(27 + 9)种蛋白质是专一性的诱导和抑制; 而 1.0mg/L 的壬基酚暴露导致 14 + 31 种蛋白质被抑制, 诱导产生 32 + 23 种新的蛋白质; 46(32 + 14)种蛋白质属于专一性的诱导和抑制。对比图 2A 和 2B, 可见不同浓度雌二醇和壬基酚暴露的蛋白表达谱明显不同。作者发现在雌二醇和壬基酚暴露诱导产生的蛋白质中, 1.0mg/L 条件下 28% 的蛋白质是相同的, 而在 0.1mg/L 条件下只有 7% 的蛋白质是相同的, 说明两种化合物的反应路径不同。

3 生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学近期的研究目标

基于基因芯片的表达谱技术具有高通量、特异性强等特点, 在生命科学领域已呈现出广阔的应用前景。随着研究的不断深入和技术的日臻完善, 基因芯片和 2D-凝胶电泳技术将对环境保护和监测、环境污染控制等研究起到巨大的推动作用, 使人类对化学物暴露和环境健康之间的关系产生全新的认识。以持久性有机污染物为例, 近期内利用该类技术可以开展如下研究。

3.1 在分子水平寻找人类及动物暴露的生物标志物

生物对污染物暴露或环境胁迫具有独特的反应, 不同化学物诱导的基因和蛋白质表达方式的细微差别体

现了化学物专一暴露的特征。采用基因芯片技术和 2D-凝胶电泳技术研究持久性有机污染物暴露所致特征性基因表达谱及蛋白质谱的改变, 以这些特征性改变为生物标志物, 可判断生物体生存环境的变化。现阶段由于不了解污染物作用的早期反映及真正靶位, 难以对污染物的环境影响作出准确的预测或早期警报, 而以特定污染物所致生物体表达谱的改变作为其专一暴露的生物标记物, 能更敏感、更准确的实现对持久性有机污染物的早期预警。应用生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学研究同一生物对不同类型污染物、不同生物对相同或相似污染物的表达谱的专一性, 以及生物毒性随时间变化的差异性等, 最终可实现根据应答“指纹”快速、准确确定持久性有机污染物性质的目标。应用生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学比较对照样本和有毒物质暴露所致模式生物基因表达谱和蛋白质谱改变, 可预测新 POPs 的毒性, 并对其毒性进行分类。

3.2 通过基因表达谱(网络)来表征持久性有机污染物的毒作用机制

在基因转录和蛋白质水平上的表达谱改变反应了污染物暴露和环境胁迫所致生物体生理、生化代谢的变

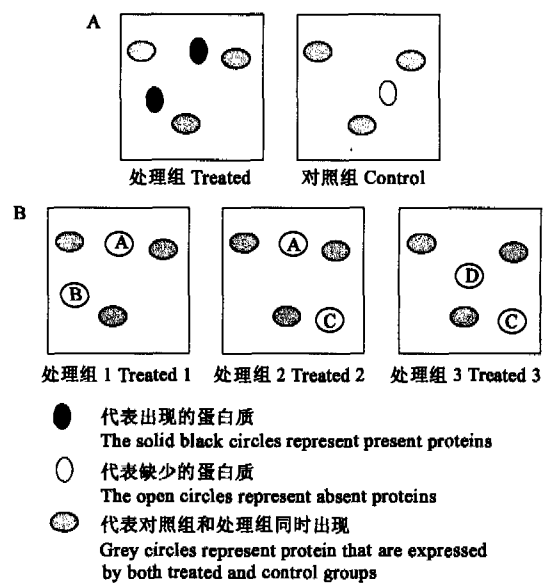


图 1 蛋白质谱的“指纹”特征
Fig. 1 Illustration of protein expression signature (PES)

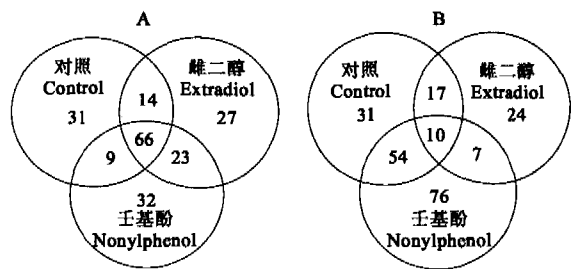


图 2 斑马鱼胚胎内分泌干扰物暴露时蛋白质谱变化^[15]
Fig. 2 Venn diagrams of features from images of exposed zebrafish embryos. Each ring contains all of the features from the indicated treatment. Features that are shared by two or more treatments are indicated in the overlapping areas.

(A) 1.0mg/L 处理浓度; (A) 1.0mg/L treatment dose. (B) 0.1mg/L 处理浓度; (B) 0.1mg/L treatment dose.

① 数据来自: <http://depts.washington.edu/irarc>

化,构成了污染物暴露和环境胁迫所致毒作用的分子基础。基因芯片技术和 2D-凝胶电泳技术所表征的特定时空点表达谱网络改变为研究污染物发挥毒作用的整个动态过程提供重要参照信息。

3.3 研究复合污染暴露的毒性效应

在现实环境中往往不是仅一种污染物独立存在,而是多种污染物共同或协同发挥作用。应用生态毒理基因组学的技术,发挥高通量、高覆盖率芯片技术的特点,在对单一 POPs 暴露表达谱变化及毒性效应充分认识的基础上,开展复合污染的联合毒性效应及分子机制方面的研究,实现对复合污染的联合毒性效应评价。

3.4 建设基于生态毒理基因表达谱的公共数据库,实现信息共享与交换

微阵列一次性地可在成百上千个基因上获得有研究价值的信息。并且随着芯片技术的快速发展,获取数据的质量得到了很大的改善。进一步通过解决微阵列巨大的数据总量和限定可用数据量之间的矛盾,实现在不同的微阵列、实验室信息管理系统、数据库和分析软件之间的数据交换,开发微阵列基因表达标识语言(简称 MAGE-ML),建立微阵列数据公共信息库。

4 生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学研究存在的问题及发展趋势

4.1 生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学研究存在的问题

基于 DNA 芯片和 2D-凝胶电泳技术的生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学研究具有广阔的发展前景,但这类检测技术的特异性、重复性、标准化等问题亟待解决。

4.1.1 如何克服基因型、表型和环境因素对基因表达谱的影响 在理想状态下,以非暴露组为对照,污染物诱导的基因表达直接映射了暴露组生物生理、生化路径的变化。但基因表达是一个动态、复杂的过程,表型的可塑性、基因型的多样性及环境因子都直接影响到基因的表达。另外,受试生物的生理因素如年龄、性别和营养状况对基因表达也具有调节作用。目前,在毒理基因组学实验中采用标准模式生物来减少遗传差异性的影响,但未能控制表型和污染物暴露的环境条件对基因表达的影响。由于非暴露组个体基因的表达受上述因素的影响,因此难以界定非暴露组的“正常”反应。通过加大对对照组样品数量来减少个体差异,通过芯片分析软件的改进,以及寻找对照组基因表达趋势作为“正常”反应等方法可望对这类实验偏差实现有效控制^[16]。

4.1.2 能否基于同源基因表达谱的变化来进行毒性推理 同源基因的核酸序列具有较高的相似性,编码具有相同或相似功能的蛋白质,而且物种亲缘关系越近,相似性就越高。但物种间的基因表达和调控网络存在较大的差异,不同的基因可编码相同或相近功能的蛋白,相同基因亦可编码不同功能的蛋白(如异构重整酶),因此应当慎重对待基于同源基因表达谱的实验结论在不同物种之间的推理。尤其是对基因序列、细胞代谢路径、结构功能各方面信息了解甚少的非模式生物,必须要有其它毒性实验来验证。

4.2 生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学发展趋势

随着分子生物学理论和方法在毒理学研究中的应用,使外源性化学物的毒性评价发展到体外细胞、分子水平的毒性测试与动物毒性试验相结合的新模式。

4.2.1 大量新技术和新方法的应用将使生态毒理学研究水平更加深入 应用常规的生态毒理学方法研究外源性化学物的毒性,费用高,耗时长,难以获得足够的毒理学信息。要想对众多的外源性化学物的毒性有一个合理评价,就应该建立新的毒理学研究方法。这些新方法应该符合以下标准:减少动物用量;缩短试验周期;研究化学物在环境中的实际浓度;充分利用统计或数学模型等。

DNA 芯片可同时测定数以千计的基因表达,通过基因表达谱的变化,为环境污染物的毒性研究提供全新的线索。寻找污染物的靶基因及受靶基因调控的基因,通过基因功能分析,深入理解污染物的作用机制。研究不同层次的多基因协同作用的生命过程,发现新的基因功能,研究生物体在环境胁迫下遗传、发育过程中的规律。DNA 芯片还可用来检测单核苷酸多态性(SNP),深入研究遗传因素对环境污染物的影响和不同的基因型个体对污染物的反应差异。基于 NMR 技术的代谢组学(metabolomics)可以研究环境污染物的生物降解、转化过程以及中间产物的形成,特定污染物的代谢图谱可以作为毒物代谢的生物标记物^[17]。如:用 NMR 分析尿中的代谢产物,可以确定作为毒性反应生物标记物的代谢变化模式,特异的 DNA 和蛋白质加合物用于有效

暴露的生物标记。另外,随机扩增多态 DNA(RAPD),可变数串联重复(VNTR),示差逆转录(DDRT)等技术在检测定位突变方面具有广阔的发展前途。

4.2.2 微观与宏观方法相结合来评价有毒污染物的毒性将是一个重要趋势 分子、细胞、个体、种群、群落直至整个生态系统是一个有机联系的整体。在不同结构和功能层次上阐述污染效应对生态毒理学的环境解释能力是不同的。从细胞到分子水平是生态毒理学微观技术发展的必然趋势。但仅从基因和蛋白质水平上研究外源性化学物的毒性及其机制是不够的。只有通过将细胞、分子水平的研究与整体、种群等各不同层次的研究结合起来才能正确评价污染物的毒性效应。

5 结论

生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学的研究将生态学、环境化学、环境生物学等多学科有机地结合起来,从基因和蛋白质水平上深入研究污染物的毒作用及其机制,呈现了广阔的应用前景。随着研究的不断深入和技术的日趋完善,生态毒理基因组学和生态毒理蛋白质组学在污染物的环境风险评价中必将发挥越来越重要的作用。

References:

- [1] Snape J R, Maund S J, Pickford D B, *et al.* Ecotoxicogenomics: the challenge of integrating genomics into aquatic and terrestrial ecotoxicology. *Aquatic Toxicology*, 2004, 67: 143 ~ 154.
- [2] Miracle A L, Ankley G T. Ecotoxicogenomics: linkages between exposure and effects in assessing risks of aquatic contaminants to fish. *Reproductive Toxicology*, 2005, 19, 321 ~ 326.
- [3] Hermens J L, Ankley G T, Sumpter J P. Ecotoxicology-A multidisciplinary, problem-driven science. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38, 446A ~ 447A.
- [4] Jones K C, de Voogt P. Persistent organic pollutants (POPs): state of the science. *Environmental Pollution*, 1999, 100(1-3): 209 ~ 221.
- [5] National Natural Science Foundation of China "Guideline for third major program project of 10·15", 2004. http://www.nsf.gov.cn/nsfclcen/xman/2004_zdzn/2004_0723-005.htm.
- [6] Cao H Y, Tao S, Xu F L, *et al.* Multimedia fate model for hexachlorocyclohexane in Tianjin, China. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(7): 2126 ~ 2132.
- [7] Zhou J M, Qin Z F, Cong L, *et al.* Research progress of the endocrine disrupting activities of polychlorinated biphenyls. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(3): 215 ~ 219.
- [8] Kuiper R V, Bergman A, Voß J G, *et al.* Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution inhibit TCDD-induced EROD activity in primary culture carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes. *Aquatic Toxicology*, 2004, 68: 129 ~ 139.
- [9] Meerts A T M, Zanden J J V, Luijckx E A C, *et al.* Potent competitive interactions of some brominated flame retardants and related compounds with human transthyretin in Vitro. *Toxicological sciences*, 2001, 56: 95 ~ 104.
- [10] Forrest M S, Lan Q, Hubbard A F, *et al.* Discovery of novel biomarkers by microarray analysis of peripheral blood mononuclear cell gene expression in benzene-exposed workers. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(6): 801 ~ 807.
- [11] Wang Z, Neuberg D, Li C, *et al.* Global gene expression profiling in whole-blood samples from individuals exposed to metal fumes. *Environ Health Perspect*, 2005, 113(2): 233 ~ 241.
- [12] Thai S F, Allen J W, DeAngelo A B, *et al.* Altered gene expression in mouse livers after dichloroacetic acid exposure. *Mutat Res*, 2003, 543(2): 167 ~ 180.
- [13] Azumi K, Fujie M, Usami T, *et al.* A cDNA microarray technique applied for analysis of global gene expression profiles in tributyltin-exposed ascidians. *Marine Environmental Research*, 2004, 58: 543 ~ 546.
- [14] Taroncher-Oldenburg G, Griner E M, Francis C A, *et al.* Oligonucleotide microarray for the study of functional gene diversity in the nitrogen cycle in the environment. *Appl. Environ Microbiol*, 2003, 69(2): 1159 ~ 1171.
- [15] Shrader E A, Henry T R, Greeley M S, *et al.* Proteomics in zebrafish exposed to endocrine disrupting chemicals. *Ecotoxicology*, 2003, 12: 485 ~ 488.
- [16] Neumann N F, Galvez F. DNA microarrays and toxicogenomics: applications for ecotoxicology? *Biotechnology Advances*, 2002, 20: 391 ~ 419.
- [17] Gundert-Remy U, Dahl S G, Boobis A, *et al.* Molecular approaches to the identification of biomarkers of exposure and effect—report of an expert meeting organized by COST Action. *Toxicology Letters*, 2005, 156: 227 ~ 240.

参考文献:

- [5] 国家自然科学基金委《“十五”第三批国家自然科学基金重大项目申请指南》, 2004. http://www.nsf.gov.cn/nsfclcen/xman/2004_zdzn/2004_0723-005.htm.