

Cd²⁺、Al³⁺ 对蚕豆 (*Vicia faba*) DNA 合成及修复的影响

常学秀, 王焕校

(云南大学生物系, 昆明 650091)

X 3 0 3 . 2 3

摘要: 利用³H-TdR 掺入方法, 研究了不同浓度单金属离子 Cd²⁺、Al³⁺ 对蚕豆 DNA 合成、DNA 修复(以 UDS 为指标)的影响。结果表明, 在低浓度 Cd²⁺、Al³⁺ (Cd²⁺ 浓度 < 20mg/l, Al³⁺ 浓度 < 100mg/l) 处理后, 蚕豆 DNA 合成加快, 并且不同程度地诱导了 UDS 的发生; 但在高于此浓度的 Cd²⁺、Al³⁺ 作用下, 蚕豆 DNA 合成受抑制, 浓度越高, 抑制作用越强; 并且几乎不表现出 UDS 效应。这一结果说明 Cd²⁺、Al³⁺ 对蚕豆的遗传物质 DNA 有损伤作用。在一定受损范围内, 蚕豆自身有 DNA 损伤修复能力, 超过这个限度, DNA 损伤不能被修复。Cd²⁺、Al³⁺ 对 DNA 合成和修复的影响是高等植物金属中毒的机制之一。

关键词: 蚕豆 (*Vicia faba*); 金属离子; DNA 合成; UDS (Cd Al)

Effects of Cd²⁺、Al³⁺ on the DNA synthesis and DNA repair in *Vicia faba*

CHANG Xue-Xiu, WANG Huan-Xiao (Biology Department, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract: With the method of incorporating ³H-TdR into DNA in *Vicia faba* in vivo, the effects of different concentrations of metal ions (Cd²⁺ and Al³⁺) on the scheduled DNA synthesis and DNA repair (using the unscheduled DNA synthesis, UDS, as its endpoint) were studied. The results show as follows. The low concentrations of Cd²⁺ and Al³⁺ promoted the DNA synthesis and induced UDS in *Vicia faba* in vivo (Cd²⁺ < 20mg/l, Al³⁺ < 100mg/l). When the concentrations of Cd²⁺ and Al³⁺ became higher, however, they inhibited the DNA synthesis, and their UDS inductive activities was not found. These results indicate that metal ions, as Cd²⁺ and Al³⁺, could injure DNA in *Vicia faba* in vivo. And the plant had the ability of DNA repair within a certain lower damage degree. The effect of Cd²⁺、Al³⁺ on the DNA synthesis and repair was one kind of the toxic mechanism of metal ions on the higher plants.

Key words: *Vicia faba*; metal ion; DNA synthesis; UDS

文章编号: 1000-0933(1999)06-0855-05

中图分类号: X 171

文献标识码: A

研究表明, 环境污染物能影响生物 DNA 的结构、功能和代谢(包括合成、分解和修复)^[1~4]。而 DNA 结构和功能的稳定、完整对保持生物遗传性的稳定是必要的。DNA 损伤修复功能在这里起着很大的作用。自 1958 年 Repert 等首次证明紫外线照射造成的 DNA 损伤可被修复后, 有关 DNA 修复的研究长期以来为生命科学工作者所重视。DNA 损伤修复有多种类型, 很多遗传毒理学所用的 DNA 修复测试方法是细胞非按期 DNA 合成(unscheduled DNA synthesis, 简称 UDS)技术。目前 UDS 成为研究 DNA 损伤修复的重要指标。但是, 前人关于污染物对生物 DNA 合成影响、UDS 效应方面的研究多见于以动物为实验对象, 且多以离体培养细胞为材料^[5~10], 对高等植物的研究并不多见。另一方面, 金属离子作为一类广泛存在于环境中

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39360020)

本文在实验及写作过程中, 云南大学生物系段昌群教授一直给予极大的关心和帮助, 在此深表谢意:

收稿日期: 1997-12-01; 修订日期: 1998-06-10

的潜在有毒物质,有关它们对生物毒害机制的研究成果国内外均有很多报道^[11~13]。但它们对生物,特别是整体动植物的DNA合成和修复的研究尚少见报道。为此,在前人研究的基础上以蚕豆为材料,用³H-TdR前体掺入法探讨了Cd²⁺、Al³⁺对植物DNA合成及修复的影响,进一步研究金属离子的遗传毒性,并且为高等植物DNA损伤修复的研究提供一点参考材料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

蚕豆(*Vicia faba*)品种8363,由云南省农业科学研究所提供。

1.2 试验方法

供试材料的培养:选择饱满,大小均匀的蚕豆种子,用蒸馏水冲洗后放在垫有滤纸的培养皿中(每皿10粒种子),在培养箱中无光培养(24±0.5℃),每天早晚各换一次水。待多数胚根突破种皮(培养30h),进行染毒处理。对照组用双蒸水培养。40h后将种子冲洗干净,并用蒸馏水恢复培养后进行以下测定。

1.2.1 蚕豆DNA合成速率的测定 参照孟祥栋等^[14],周晓强等^[15],王浩丹等^[16]研究者的实验方法并略加改进。取恢复培养5h的萌发种子胚分别置于有1ml标记液的青霉素小瓶中(标记液配方:³H-TdR3uci/ml,青霉素G50μg/ml,硫酸链霉素50μg/ml),24±0.5℃暗中保温3h,中间经常摇动通气。保温后的胚先用自来水冲洗表面标记物,再用冷无水乙醇冲洗,吸干置于-20℃冰箱中冰冻20h以终止细胞活动,然后用冷乙醇在冰上研磨,提取定容至3ml,2000r/min离心20min。弃上清,沉淀部分用冷无水乙醇反复冲洗,离心多次,直至游离标记物冲洗干净,加2ml 5%高氯酸,70℃水解40min,50℃水解过夜,再加NaOH中和,取上清液0.5ml,加5ml闪烁液(5gPPO,0.3gPOPOP,溶于1L甲苯)。暗中静置24h,于FJ-2101双道液闪仪上测定cpm值,作为³H-TdR对DNA的掺入,其大小表示DNA合成速率的大小。结果以3次重复的平均值表示。

1.2.2 蚕豆胚非按期DNA合成(UDS)的测定 将恢复培养3h的萌发种子换至10μmol/ml(共50ml)羟基脲溶液中连续培养2h,然后取胚进行标记3h,(标记液配方:羟基脲10μmol/ml,其余同上)。为了检测羟基脲对DNA合成的抑制作用,特加了一个不经染毒,标记液中也无HU的对照处理。以后的处理步骤同DNA合成速率的测定。结果以3次重复的平均值表示。

2 实验结果

2.1 不同浓度Cd²⁺、Al³⁺对蚕豆DNA合成的影响,实验结果见图1和图2。

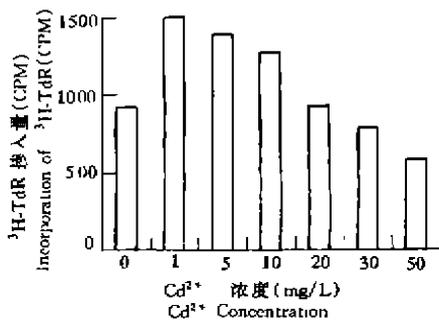


图1 Cd²⁺对蚕豆DNA合成的影响

Fig. 1 Effect of Cd²⁺ on DNA synthesis in *Vicia faba*

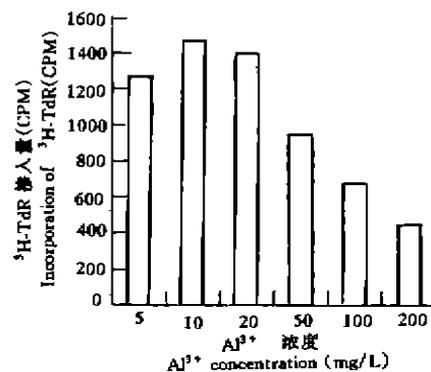


图2 Al³⁺对蚕豆DNA合成的影响

Fig. 2 Effect of Al³⁺ on DNA synthesis in *Vicia faba*

由图1、图2可见,金属离子Cd²⁺、Al³⁺能影响蚕豆DNA合成,且不同浓度的Cd²⁺、Al³⁺对蚕豆DNA合成的影响是不同的。与对照相比,Al³⁺、Cd²⁺在低浓度时对DNA合成有促进作用(Cd²⁺浓度<20mg/L, Al³⁺浓度<50mg/L);而当它们增加到一定浓度时,促进作用减弱,DNA合成接近对照水平;高浓度的金属

离子抑制了 DNA 的合成, 表现为当 Cd²⁺ 浓度 > 20mg/L, 浓度 Al³⁺ > 50mg/L 时, DNA 提取物放射性强度 (cpm 值) 降低。Cd²⁺ 浓度为 1mg/L 时, 对 DNA 合成速率具有最大的促进作用, 而 Al³⁺ 则在其浓度为 10mg/L 时才表现出这种最大促进作用。另外, 50mg/L 的 Cd²⁺ 使 DNA 合成速率比对照降低了 0.6 倍, 而此浓度水平的 Al³⁺ 尚未表现出对 DNA 合成的抑制作用。甚至 100mg/L 的 Al³⁺ 的抑制作用都没有 50mg/L 的 Cd²⁺ 的抑制作用强烈。说明 Cd²⁺ 和 Al³⁺ 促进或抑制 DNA 合成的临界浓度不同。

2.2 Cd²⁺、Al³⁺ 诱导蚕豆非按期 DNA 合成 (UDS) 的效应

实验结果见图 3、图 4。

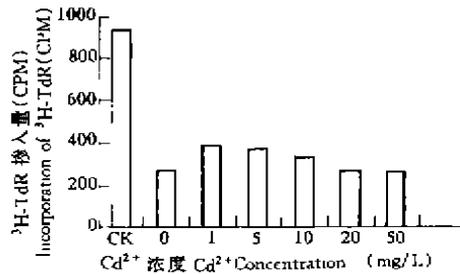


图 3 Cd²⁺ 诱导蚕豆 UDS 的效应

Fig. 3 Inductive effect of Cd²⁺ on UDS in *Vicia faba*

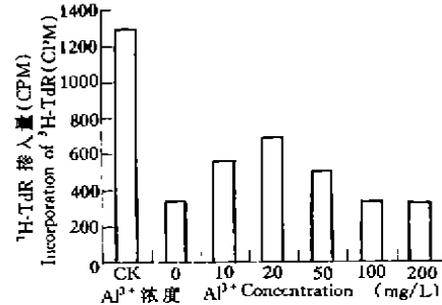


图 4 Al³⁺ 诱导蚕豆 UDS 的效应

Fig. 4 Inductive effect of Al³⁺ on UDS in *Vicia faba*

由图 3、图 4 可见, Cd²⁺、Al³⁺ 均能诱导蚕豆发生 UDS, 而且不同浓度的金属离子诱导蚕豆 UDS 的效应是不同的。加入羟基脲抑制正常的 S 期 DNA 合成。结果表明这种抑制作用是明显的 ($P < 0.01$), 不加羟基脲时对照组的 ³H-TdR 掺入量是加入羟基脲后的 2~3 倍。小于 20mg/L 的 Cd²⁺ 和小于 100mg/L 的 Al³⁺ 都能不同程度地诱导蚕豆发生 UDS, 表现为 DNA 提取物放射性强度 (cpm 值) 的升高。其中, Cd²⁺ 浓度在 1mg/L 时, 表现出最大诱导作用 (其 cpm 值是对照组的 1.5 倍), 而 Al³⁺ 则在 20mg/L 时诱导作用最强 (其 cpm 值是对照组的 2 倍)。大于 20mg/L 的 Cd²⁺ 和大于 100mg/L 的 Al³⁺ 则几乎没有 UDS 效应, 表明此浓度水平的 Cd²⁺、Al³⁺ 作用下, 蚕豆几乎没有 DNA 修复能力。

3 结论

Cd²⁺、Al³⁺ 对 DNA 合成和修复的影响是高等植物金属中毒的机制之一。

3.1 Cd²⁺、Al³⁺ 能直接或间接损伤 DNA 分子, 具有遗传基因毒性

UDS 的发生是 DNA 分子受损伤的表现^[25]。较低浓度 Cd²⁺、Al³⁺ 作用下高等植物发生 UDS 表明 Cd²⁺、Al³⁺ 能直接或间接损伤 DNA 分子, 使植物在遗传基因水平上中毒。较高浓度的 Cd²⁺、Al³⁺ 引起 DNA 分子过度损伤, 也包括修复系统本身, DNA 修复活动难以进行。DNA 修复不完全将使损伤固定为突变或染色体断裂, 并因而提高突变率。

3.1 Cd²⁺、Al³⁺ 能直接或间接影响 DNA 合成, 具有生理生化毒性

DNA 损伤使 DNA 模板完整性丧失, 引起低效的转录及翻译; DNA 损伤引起的修复活动也会抑制 DNA 正常复制。Cd²⁺、Al³⁺ 对 DNA 合成的影响会给高等植物带来一系列不良后果, 这种“链式反应”使植物在各个层次上受到毒害, ①DNA 修复是以 DNA 合成为基础的, DNA 合成受抑制影响了 DNA 修复的顺利进行^[15], 提高突变机率; ②间期 DNA 复制是细胞有丝分裂的基础, DNA 合成受抑制将使细胞有丝分裂频率降低; ③组织、器官和个体的生长将因有丝分裂的减少而停滞; ④根的生长受抑制将降低植物对水分和矿质养分的吸收; 叶的生长受抑制将降低植物光合作用合成有机物的能力; ⑤整个植物个体将因新陈代谢的紊乱而受害, 甚至死亡。

4 讨论

4.1 金属离子影响高等植物 UDS 效应分析

研究表明,羟基脲抑制³H-TdR 掺入 NDA 的作用是明显的(图 3、图 4),不加羟基脲时³H-TdR 的掺入量是加入羟基脲后的 2~3 倍。在羟基脲存在条件下,金属离子 Cd²⁺、Al³⁺ 所刺激的³H-TdR 掺入量增加是它们诱导 UDS 效应的结果,是 DNA 修复合成的表现。在高浓度(Cd²⁺ 浓度 > 20mg/L, Al³⁺ > 100mg/L) 下,³H-TdR 掺入量保持在对照水平而没有进一步下降也证明了这种增加是 DNA 修复的表现。

很多遗传毒理学实验所采用的 DNA 修复测试是 UDS 技术,只要发现 UDS 量增加,就表明曾经发生了 DNA 损伤^[25]。本文的结果表明,金属离子能诱导蚕豆胚发生 UDS,说明它们对 DNA 分子有损伤作用,而生物在一定范围内能修复受损伤的 DNA,以维持其遗传上的稳定性。由图 3、图 4 可见,金属离子在一定浓度范围内,随着浓度升高,诱导 UDS 的能力也加强,表明对 DNA 的损伤作用增大。超过一定浓度后,随着浓度增加,诱导 UDS 的能力下降。在大于 20mg/L 的 Cd²⁺ 或大于 100mg/L 的 Al³⁺ 的作用下,蚕豆胚几乎不表现出 UDS 效应。但这不是说没有 DNA 损伤,而是修复合成能力的丧失。分析这一结果表明,生物的 DNA 修复能力是有一定限度的,超过这个限度, DNA 损伤不能修复。因为 DNA 修复是一个酶促过程,而且修复与转录相偶联^[26],过高的诱变物剂量使参与这一生理过程的酶等修复系统失活^[27],同时 DNA 修复是以 DNA 合成为基础的, DNA 合成受抑制影响了 UDS 的发生^[28]。早期的研究者认为,高等植物没有切除修复能力,就是因为它们所用的辐射剂量太高,产生的二聚体比例均高于能修复的范围^[27],即 DNA 分子上的损伤数量超过细胞修复能力的限度。

Jackson 和 Linskens 用 22 种金属离子加到矮牵牛花粉的悬浮培养液中,观察到非预定 DNA 合成。这个结果与本文的实验结果相一致^[29],他们发现 Al³⁺ 的作用最强,并把这种现象解释为这些金属离子,如 Al³⁺ 与 DNA 分子相结合,引起这部分 DNA 的切除修复,从而发生非预定 DNA 合成。但杨瑞等在研究 BHC 和 CdCl₂ 对草鱼原代肝细胞培养物中 DNA 修复的诱导作用时发现, BHC 可诱导 DNA 修复,但 CdCl₂ 没有活性^[10],这与本文的结果相悖,可能与所用供试材料和受检物浓度不同有关。

4.2 金属离子影响高等植物 DNA 合成机制探讨

在低剂量金属离子作用下, DNA 合成有明显加速现象,这可能是由于 DNA 分子一定的损伤而诱发的一种适应性反应。有人认为小剂量诱变剂前处理,可能加快了植物核酸代谢活动,使单位 DNA 分子复制时同诱变剂作用机会降低^[13]。按冗余理论来理解,生物在低浓度金属离子的诱导下产生较多的 DNA,一方面可部分抵消金属离子促进 DNA 降解而引起的 DNA 含量下降;另一方面,部分 DNA 分子受损的同时,生物加快 DNA 的“生产”以保证有足够的完整 DNA 来维持生物体遗传性的稳定和完整。本文的实验结果表明 DNA 合成加速与 UDS 效应这两个生物学终点具有相近的剂量效应区,推测低浓度金属离子处理时 DNA 合成量的增加与 DNA 修复有关,这种增加可能部分是 UDS 效应的结果。

前人的研究表明,诱变剂能抑制 DNA 合成^[17,30]。孟紫强研究了砷对人血淋巴细胞 DNA 合成的效应时,发现无机砷化合物在低浓度下,对植物血凝素刺激的人外周血淋巴细胞 DNA 合成有显著促进作用,而当其达到一定浓度时,对 DNA 合成有显著抑制作用^[3]。这与本文的结果相一致。另外,体外试验表明,铝可减少 DNA 的合成^[19]。有人认为细胞 DNA 合成速率受抑制表明 DNA 复制模块受到损害^[20]。张治平对亚砷酸钠致整体动物 DNA 合成抑制的研究表明,亚砷酸钠对各组织均有明显的抑制 DNA 合成作用^[7]。汪丽虹等研究 C⁶⁰ 重离子辐射对枸杞萌发种子核酸合成的抑制作用表明, DNA 链断裂使 DNA 模板完整性丧失,引起低效的转录及转译^[21]。关于金属离子引起 DNA 链损伤断裂、DNA 构象改变、DNA 合成酶活性变化等影响的报道还有很多^[31-33,22,23]。这些因素都能使 DNA 合成受影响。有的学者认为,金属离子能与 DNA 结合成牢固的“DNA-金属离子”复合物,造成 DNA 的交联,这样会妨碍 S 期增殖细胞 DNA 的解链^[24]。而解链是 DNA 复制的基础。

总之,金属离子影响 DNA 合成、UDS 效应的机理可能是多元的,是多种效应的综合结果。本文的研究仅揭示了金属离子对新合成 DNA 速度的影响,至于这种影响到底发生在哪些环节上还不甚清楚,有待进一步研究。但有一点值得指出,如果没有 DNA 损伤,则不会发生 UDS 效应^[25]。Cd²⁺、Al³⁺ 能诱导蚕豆胚 UDS 的发生,说明它们能够损伤 DNA 模板。这种损伤是它们影响 DNA 合成的原因之一。

参考文献

- [1] 龙耀庭. 有毒化学物质对 DNA 的损伤——生成 DNA 加合物. 环境科学进展, 1993, 1(4): 24~37.
- [2] 段昌群, 王焕校. 重金属对蚕豆的细胞遗传学毒理作用和对蚕豆根尖微核技术的探讨. 植物学报, 1995, 37(1): 14~24.
- [3] Carvan M J, Flood L P, et al. Effects of benzopyrene and tetrachlorodibenzop dioxin on fetal dolphin kidney cells. *Chemosphere*, 1995, 30(1): 187~198.
- [4] Costa M, Zhuang, et al. Molecular mechanisms of nickel carcino genesis. *Nickel Biochemistry, Toxicity, and ecological issues*, 1994. 191~199.
- [5] Holz, O, Scherer G, et al. Determination of low level exposure to volatile aromatic hydrocarbons and genotoxic effects in workers at a styrene plant. *Occupational and Environmental Medicine*, 1995, 52(6): 420~428.
- [6] Parrott J L, Sprague J B, et al. Patterns in toxicity of sublethal mixtures of metals and organic chemicals determined by microtox by DNA, RNA and protein content of fathead minnows. *CAN. J. FISH. AQUAT. SCI.*, 1993, 50(10): 2245~2253.
- [7] 张治平, 丁 恬, 王福林. 亚砷酸钠致整体动物 DNA 合成抑制的研究. 中国环境科学, 1993, 13(4): 293~296.
- [8] 原福胜, 邢 权, 马亚萍. 大气中不同粒径颗粒物诱导人羊膜 FL 细胞 UDS 的研究. 环境与健康杂志, 1994, 11(2): 49~51.
- [9] 孟紫强. 砷对人血淋巴细胞 DNA 合成的效应. 中国环境科学, 1993, 13(3): 174~178.
- [10] 杨 端, 周仁珍. 致癌物对草鱼原代肝细胞培养物中 DNA 修复的诱导作用. 环境科学学报, 1984, 4(4): 368~374.
- [11] 段昌群, 王焕校. 重金属对蚕豆根尖的核酸含量及核酸酶活性影响的研究. 环境科学, 1992, 13(5): 31~35.
- [12] 彭 安, 王文华. 环境生物无机化学. 北京: 北京大学出版社, 1991. 56~61.
- [13] Woolhouse H W. Toxicity and tolerance in the responses of plants to metals. In: *Physiological Plant Ecology* ■. Edited by O L Lange, P S Nobel, C B Osmond, H Ziegler. Press: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, 1988, 245~300.
- [14] 孟祥栋, 李曜轩. 菜用大豆种子活力与 DNA、RNA 及蛋白质合成的关系. 植物生理学报, 1997, 18(2): 121~125.
- [15] 周晓强, 傅家瑞. 花生种子萌发早期胚轴细胞 DNA 合成的特点. 植物生理学报, 1993, 19(1): 77~81.
- [16] 王浩丹, 周 申. 生物医学标记示踪技术. 北京: 人民卫生出版社, 1995. 21~25.
- [17] 金锡鹏. 诱变物、致癌物的一种快速初筛法——DNA 合成抑制的研究. 中华预防医学杂志, 1982, 16(2): 105~108.
- [18] 高振强, 张振东. 应用整体动物 DNA 合成抑制试验检测城市污水致突变性. 中国环境科学, 1990, 10(2): 138~141.
- [19] 王 葵. 生命科学中的微量元素. 北京: 中国计量出版社, 1991. 224~247.
- [20] 王孝萱, 郑荣梁. 槲皮素诱发人淋巴细胞 SCE 及 DAN 损伤. 兰州大学学报, 1989, 25(4): 103~105.
- [21] 汪丽虹, 程金华, 杨汉民. C⁶⁰ 重离子辐射对枸杞萌发种子核酸合成的影响. 实验生物学报, 1992, 25(3): 249~252.
- [22] 郁建栓. 浅谈重金属对生物毒性效应的分子机理. 环境污染与防治, 1996, 18(4): 28~31.
- [23] 戴维·布鲁西克著. 吕 群, 强义国, 江绍慧译. 遗传毒理学原理. 上海: 复旦大学出版社, 1987. 39~43.
- [24] Yamaguchi H, A Tatara and T Naito. Unscheduled DNA synthesis induced in barley seeds by gamma ray and 4-nitroquinoline-1-oxide. *Jpn. J. Genetics*, 1975, 50(4): 307~318.
- [25] Penkel D, Markus P I, et al. Cytogenetic analysis using quantitative high sensitive fluorescence hybridization. *Proc Natl. Acad. Sci. USA*, 1986, 83: 2934~2945.
- [26] 周平坤. DNA 切除修复与转录偶联. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(2): 141~145.
- [27] Howland G P, Hart P W, et al. Repair of DNA strand breaks after gamma-irradiation of protoplasts isolated from cultured wild carrot cells. *Mutat. Res.* 1975, 27: 81~87.
- [28] Jackson J F, Linskens H F, et al. Metal ion induced unscheduled DNA synthesis in *Petunia pollen*. *Mol. Gen. Genet.*, 1982, 187: 112~115.