

# 单细胞凝胶电泳检测百草枯对大鳞副泥鳅血细胞 DNA 的损伤

党炳俊, 王 君, 杜启艳, 常重杰

(河南师范大学生命科学院, 新乡 453007)

**摘要:**以大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)为受试对象,设置0.302、0.362、0.434、0.521、0.625 mL/L共5个浓度组和1个对照组,通过单细胞凝胶电泳技术(SCGE),研究除草剂百草枯对大鳞副泥鳅血细胞DNA 6、24、48、96 h所造成的损伤。结果表明,6、24、48、96 h时处理组与对照组相比,在尾部DNA百分比(Tail DNA)、彗星尾长(Tail length, TL)和Olive尾矩(Olive tail moment, OTM)3项指标上均具有显著差异( $P < 0.05$ ),而且在6、24、48 h时,时间一定时,各项指标随除草剂浓度升高而变大;浓度一定时,各项指标随时间推移而变大,而96 h时与48 h时相比,各项指标则有所下降。TL和OTM 2项指标在24 h时0.625 mL/L组达到最大,分别为(553.22 ± 106.92)%和(200.73 ± 50.72)%,Tail DNA在48 h时0.625 mL/L组达到最大,为(75.14 ± 10.99)%。研究结果对于百草枯的合理使用和环境污染监测提供了科学依据,也为其对水生生物的毒性研究提供了资料。

**关键词:**百草枯;单细胞凝胶电泳;大鳞副泥鳅

**中图分类号:**S948 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2011)05-0105-05

随着化学除草剂在农业生产上的广泛应用,其对环境造成的污染也越来越严重。长期大量化学除草剂的应用带来的残毒和环境污染问题,直接危害到人畜健康,影响农业的可持续发展(强胜和陈世国,2009)。百草枯又称克芜踪、对草快,学名1,1'-二甲基-4,4'-联吡啶鎓;是一种速效触杀型灭生性季胺盐类除草剂,可防除各种一年生杂草,对多年生杂草也有强烈的杀伤作用,在农业及林业生产上均有较广泛的应用。百草枯容易被土壤颗粒内吸附,长时间释放会造成土壤中的残留,百草枯对非靶标的陆上或水生生物也有严重的危害(吴厚斌等,2004)。为了保护人类健康和环境安全,研究百草枯的毒性效应是十分迫切和必要的。

大鳞副泥鳅(*Paramisgurnus dabryanus*)属鱼纲、鲤形目、鳅科、花鳅亚科、副泥鳅属,其分布极为广泛,一年四季均可采到,在室内又极易饲养,因此是理想的水生生物试验材料。单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis assay, SCGE)是一种在单个细胞水平上检测真核细胞DNA损伤与修复的方法,具有快速、灵敏、廉价等优点,广泛应用于毒理

学、生物学、预防医学、临床诊断与治疗等领域(王小红和江洪,2001)。本试验采用碱性单细胞凝胶电泳技术,在单个细胞水平下检测不同浓度及不同处理时间百草枯对大鳞副泥鳅DNA的损伤,旨在为环境污染的监测及合理使用除草剂提供一定的基础研究资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大鳞副泥鳅购自河南省新乡市宏达市场,发育情况相似,体长10~13 cm。试验前用曝气自来水驯养1周,每天换水1次,试验时挑选健康正常个体进行处理。试验用水为曝气1周的自来水,水温(20 ± 2)℃,溶解氧5~6 mg/L, pH 6.9~7.2。

### 1.2 方法

1.2.1 泥鳅分组及染毒 在预试验基础上,将百草枯配制成浓度为0.302、0.362、0.434、0.521、0.625 mL/L共5个试验组对大鳞副泥鳅进行处理,每隔24 h换1次等体积浓度的百草枯稀释液;1个对照组采用经曝气处理的自来水,同样每隔24 h换1次等体积的曝气自来水。

1.2.2 血细胞悬液的制备 在试验开始后的6、24、48、96 h,取出大鳞副泥鳅,擦干尾部,剪断尾巴,取0.5 mL血液于EP管中,然后迅速加入1 mL抗凝剂并混匀,尔后加入2 mL PBS缓冲液,1 500 r/min离心10 min,弃上清,取沉淀,最后用PBS缓冲液调节血细胞浓度至 $10^6$  cfu/mL,置入4℃

收稿日期:2011-06-10

基金项目:国家自然科学基金(No. 30771666)和河南省省级重点学科资助。

通讯作者:常重杰,1965年生,男,博士,教授。E-mail: changzhongjie@tom.com 作者简介:党炳俊,1986年生,男,硕士研究生,主要从事动物遗传学研究。E-mail: xuresheng@163.com

冰箱保存。

1.2.3 血细胞 DNA 损伤的 SCGE 检测 本试验所用 SCGE 方法根据 Singh 等(1988)的方法稍加改进而成。步骤如下:(1)制片。采用双层凝胶法;先将 0.6% 正常熔点琼脂糖(NMA)200  $\mu\text{L}$  均匀铺到磨砂载玻片的磨砂面,加上盖玻片,置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷凝 10 min,揭去盖玻片形成第一层胶。然后将 25  $\mu\text{L}$  细胞悬液和 75  $\mu\text{L}$  0.6% 低熔点琼脂糖(LMA)混合,均匀铺到第一层凝胶上,置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱冷凝 10 min。(2)细胞裂解。将冷凝的玻片取出,揭掉盖玻片,浸入含裂解液(2.5 mol/L NaCl、100 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、10 mmol/mL Tris、1% 肌氨酸钠,用前加入 1% Triton X-100 和 10% 二甲亚砜)的染色缸中,置于 4 $^{\circ}\text{C}$  冰箱 1 h。裂解结束后,用 PBS 缓冲液漂洗 3 次。(3)碱解旋。将载玻片放入水平电泳槽中,倒入预冷的电泳缓冲液(1 mmol/L  $\text{Na}_2\text{EDTA}$ 、300 mmol/L NaOH,调节 pH 至 13)至液面刚没过载玻片,4 $^{\circ}\text{C}$  下避光静置 20 min。(4)电泳。调节电泳缓冲液液面高度,使电压为 25V,电流为 300 mA,4 $^{\circ}\text{C}$  下避光电泳 25 min。(5)中和并染色。电泳结束后用 PBS 缓冲液浸洗 3 次,每次 15 min,然后滴加浓度为 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$  EB 染色 20 min,观察之前用蒸馏水漂洗 3 次。(6)观察。用荧光显微镜观察并拍照,激发波长为 515 ~ 560 nm。

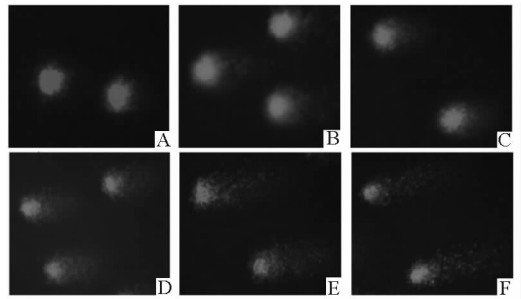
1.2.4 图像分析 用 CASP 软件进行分析,得出彗星头部 DNA 百分含量(Head DNA)、彗星尾部 DNA 百分含量(Tail DNA)、彗星尾部长度的(Tail length, TL)、彗星全长(Comet length, CL)、尾矩(Tail moment, TM)、Olive 尾矩(Olive tail moment, OTM)6 项指标的数据,导入统计分析软件 SPSS 进行统计分析。

1.2.5 统计学处理 用统计软件 SPSS 13.0 对所得数据进行单因素方差分析, $P < 0.05$  表示有显著性差异,具有统计学意义; $P > 0.05$  则无统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 血细胞凝胶电泳图像

在荧光显微镜下可以观察到细胞核呈现桔红色。在对照组中,细胞核均呈现圆球形,彗星头部 DNA 集中;而在各处理组中,细胞核呈现彗星样,具有长度不同的慧尾,而且随着浓度的增加,彗尾越来越长,越来越清晰,彗星头部则逐渐缩小,变得发散(图 1)。



A: 对照组; B: 0.302 mL/L; C: 0.362 mL/L; D: 0.434 mL/L; E: 0.521 mL/L; F: 0.625 mL/L

图 1 经不同浓度百草枯处理 6h 时大鳞副泥鳅血细胞单细胞凝胶电泳图像( $\times 400$ )

Notes: A: control; B: 0.302 mL/L; C: 0.362 mL/L; D: 0.434 mL/L; E: 0.521 mL/L; F: 0.625 mL/L

Fig. 1 Pictures of blood cells with 6h treatment of paraquat at different doses after SCGE( $\times 400$ )

### 2.2 大鳞副泥鳅血细胞 DNA 损伤

分别采用彗星图像的 3 个指标即彗尾 DNA 所占百分含量(Tail DNA)、尾长(TL)和 Olive 尾距(OTM)对对照组和处理组进行测量。所得数据经彗星图像分析软件 CASP 测量及统计软件 SPSS 统计处理后,结果见表 1。

表 1 不同浓度百草枯及不同时间处理对大鳞副泥鳅血细胞 DNA 损伤结果

Tab. 1 Effect of paraquat at different time and doses on DNA damage in *Paramisgurnus dabryanus*

组别	浓度/ $\text{mL} \cdot \text{L}^{-1}$	彗尾 DNA/ %	尾长/ %	Olive 尾矩/ %
对照	0.000	8.15 $\pm$ 3.65	91.50 $\pm$ 45.45	7.68 $\pm$ 3.70
6 h	0.302	13.83 $\pm$ 3.67 *	94.14 $\pm$ 28.44	11.87 $\pm$ 3.90
	0.362	21.40 $\pm$ 4.91 *	167.16 $\pm$ 37.55 *	25.73 $\pm$ 7.15 *
	0.434	29.71 $\pm$ 8.00 *	202.87 $\pm$ 62.31 *	35.41 $\pm$ 14.32 *
	0.521	34.19 $\pm$ 6.87 *	252.16 $\pm$ 51.64 *	49.57 $\pm$ 14.41 *
	0.625	41.18 $\pm$ 9.97 *	283.76 $\pm$ 88.24 *	62.12 $\pm$ 25.98 *
	24 h	0.302	44.28 $\pm$ 11.31 *	342.59 $\pm$ 96.87 *
0.362		61.10 $\pm$ 11.15 *	291.82 $\pm$ 37.25 *	110.96 $\pm$ 22.73 *
0.434		53.78 $\pm$ 10.28 *	319.22 $\pm$ 88.67 *	107.49 $\pm$ 43.71 *
0.521		56.98 $\pm$ 10.88 *	350.28 $\pm$ 54.39 *	119.45 $\pm$ 32.52 *
0.625		66.36 $\pm$ 8.70 *	553.22 $\pm$ 106.92 *	200.73 $\pm$ 50.72 *
48 h		0.302	53.35 $\pm$ 9.02 *	346.53 $\pm$ 80.24 *
	0.362	59.92 $\pm$ 11.65 *	414.38 $\pm$ 80.73 *	126.61 $\pm$ 46.89 *
	0.434	69.95 $\pm$ 11.71 *	449.82 $\pm$ 71.28 *	175.14 $\pm$ 53.51 *
	0.521	64.85 $\pm$ 9.89 *	451.00 $\pm$ 72.80 *	138.83 $\pm$ 48.93 *
	0.625	75.14 $\pm$ 10.99 *	419.71 $\pm$ 80.82 *	189.10 $\pm$ 59.20 *
	96 h	0.302	67.60 $\pm$ 7.82 *	393.42 $\pm$ 82.49 *
0.362		62.31 $\pm$ 10.61 *	428.08 $\pm$ 142.70 *	132.07 $\pm$ 53.51 *
0.434		53.47 $\pm$ 15.54 *	306.14 $\pm$ 95.03 *	85.79 $\pm$ 38.94 *
0.521		43.20 $\pm$ 10.11 *	219.23 $\pm$ 79.19 *	55.75 $\pm$ 25.47 *
0.625		61.83 $\pm$ 5.03 *	354.00 $\pm$ 19.96 *	99.65 $\pm$ 18.54 *

注: \* 表示与对照组相比有显著性差异( $P < 0.05$ )。

Note: \* indicates significant difference compared with control ( $P < 0.05$ ).

由表1可以看出,对于彗尾 DNA 所占百分含量这一指标来说,在相同处理时间时,随着浓度的升高,彗尾 DNA 所占百分含量逐渐升高;在同一浓度组,随着处理浓度的提高,在较低浓度组中二者呈现出正相关关系;在较高浓度组中,彗尾 DNA 所占百分含量在达到一定的高度后,进一步延长处理时间,则呈现下降的趋势,如在 0.434 mL/L 及以上组中,最高值出现在 48 h 时,在 96 h 时的值均小于在 48 h 时的含量(图2)。

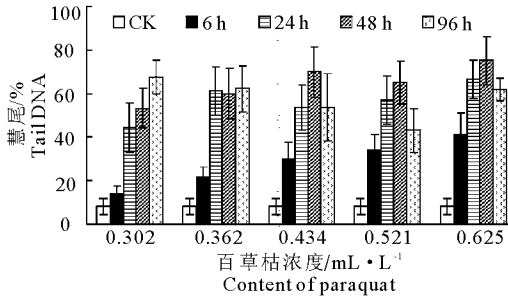


图2 不同时间和浓度时大鳞副泥鳅血细胞彗星尾部 DNA 的百分比

Fig.2 Tail DNA at different time and doses in *Paramisgurnus dabryanus*

对于尾长指标来说,除 0.302 mL/L 处理组中在 6 h 时与对照组无明显差异外,其余各处理组和时间段时与对照组均差异明显;随着处理时间的延长,尾长逐渐增加,最高尾长出现在 96 h 时。0.362 mL/L 处理组中尾长呈现出与前者大致相同的趋势;然而,在 0.434 mL/L 及以上处理组中,48 h 前随着浓度的增加,尾长逐渐加大;48 h 后,则呈现下降的趋势。即在此 3 个组中,最大尾长出现在 48 h 时(图3)。

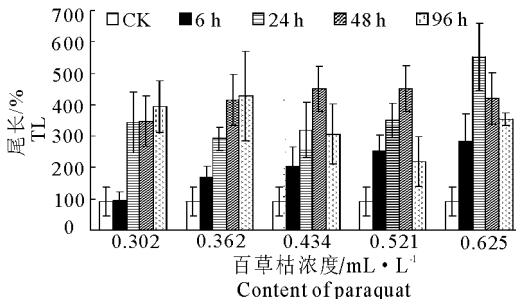


图3 不同时间和浓度时大鳞副泥鳅血细胞彗星尾部长

Fig.3 Tail Length at different time and doses in *Paramisgurnus dabryanus*

图4表示了 Olive 尾距与时间和浓度之间的关系。除 0.302 mL/L 处理组中在 6 h 时, Olive 尾距与对照组无明显差异外,其余各处理组和时间段时

与对照组均差异明显,最高值出现在 96 h 时;在的 0.362 mL/L 处理组中呈现出大致相同的趋势。随着处理浓度的提高,最高值出现的时间迅速提前,0.434、0.521 和 0.625 mL/L 处理组中,最高值出现的时间分别是 48、48 和 96 h;之后尾距迅速下降。值得一提的现象是,各浓度组中,6 h 和 24 h 之间均有较大的差异。

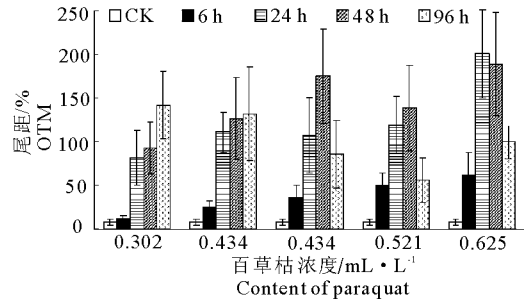


图4 不同时间和浓度时大鳞副泥鳅血细胞 Olive 尾距  
Fig.4 Olive tail moment at different time and doses in *Paramisgurnus dabryanus*

### 3 讨论

#### 3.1 百草枯的作用机理

百草枯虽为常用化学除草剂,但其作用机理目前尚不十分明了。多数学者认为百草枯是一电子受体,可被肺 I 型和 II 型细胞主动转运而摄取到细胞内,作用于细胞的氧化还原反应,在细胞内括化为氧自由基是毒作用的基础,所形成的过量超氧化阴离子自由基及过氧化氢等,可引起肺、肝及其它许多组织器官细胞膜脂质过氧化,从而造成多系统组织器官的损害(闰世序和刘东玲,2006)。而研究证明,自由基及过氧化氢等活性氧是造成 DNA 损伤的重要原因之一(吕星,1992),而活性氧清除剂能显著降低由活性氧造成的 DNA 损伤;李达圣等(2001)研究表明,用羟基自由基( $\cdot\text{OH}/\text{OH}^-$ )清除剂 DMSO 和过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )清除剂过氧化氢酶(catalase, CAT)与不同浓度的砷共同处理人类早幼粒细胞系 HL60 细胞和人淋巴细胞,用单细胞凝胶电泳(SCGE)检测细胞 DNA 损伤,DMSO 和 CAT 完全消除了低剂量砷引起的 DNA 损伤,减少了 70% 以上的高剂量砷引起的 DNA 损伤。

#### 3.2 百草枯对 DNA 的损伤程度

在本研究中,处理组与对照组相比,在 DNA 损伤的各项指标上差异显著,而且在 48 h 内,各项指标大体上随时间的延长而变大,随浓度升高而升高。尾长和 Olive 尾距 2 项指标在 24 h 时 0.625 mL/L

组达到最大,分别为(553.22 ± 106.92)%和(200.73 ± 50.72)%,彗尾DNA所占百分含量在48 h时0.625 mL/L组达到最大,为(75.14 ± 10.99)%。达到最大值之后,各项指标则均有所减小,表明DNA所受损伤降低。这种现象可能的解释有2种:一是细胞内的DNA在受到损伤之后,内部的修复机制迅速启动,经过一定的时间,DNA损伤得以修复;另一种解释是再经过高浓度、长时间处理之后,DNA所受损伤过大,以致电泳时DNA片段丢失,在荧光图片不能显示,故呈现出测量值下降的表象(胡晓馨等,2005;周侃等,2008;Risso-deFavemey et al,2001;Vanzella et al,2007)。

综上所述,百草枯能对大鳞副泥鳅DNA造成显著的损伤,具有明显的遗传毒性作用,而我国又是百草枯等各种化学除草剂的生产及使用大国;因此,合理使用除草剂,研制开发无毒无污染的生物除草剂,对农业生产和环境保护及其它相关领域具有重要的意义。

#### 参考文献

胡晓馨,周建华,时夕金.2005.利用单细胞凝胶电泳技术研究镉对鲫鱼淋巴细胞DNA的损伤[J].农业环境科学学报,24(1):43-45.

李达圣,Kanehisa Morimoto,Tatsuya Takeshita,等.2001.氧自由基清除剂对砷所致细胞DNA损伤的保护作用[J].中

国地方病学杂志,20(4):252-254.

吕星.1992.自由基所致DNA损伤及其致突致癌的研究进展[J].癌变·畸变·突变,4(3):43-46.

强胜,陈世国.2009.环保与生物除草技术[J].国际学术动态,(5):26-28.

闰世序,刘东玲.2006.百草枯中毒毒理与治疗[J].中华临床医学杂志,7(2):49-50.

王小红,江洪.2001.单细胞凝胶电泳技术的研究进展及其应用[J].国外医学:临床生物化学与检验学分册,22(1):5-7.

吴厚斌,宋俊华,马进,等.2004.百草枯在欧盟批准继续使用[J].农药科学与管理,25(1):36-37.

周侃,欧阳珊,吴小平,等.2008.SCGE技术检测镉对背角无齿蚌血细胞DNA的损伤[J].生态科学,27(2):90-94.

Risso-deFavemey C, Devaux A, Iafaurie M, et al. 2001. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygen species[J]. Aquat Toxicol, 53:65-76.

Singh N P, McCoymt, Tice R R, et al. 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 175:184-191.

Vanzella T P, Martinez C B R, C'olus I M S. 2007. Genotoxic and mutagenic effects of diesel oil water soluble fraction on a neotropical fish species[J]. Mutation Research, 631(1):36-43.

(责任编辑 万月华)

## The DNA Damage Effect of Paraquat on Blood Red Cell of *Paramisgurnus dabryanus*

DANG Bing-jun, WANG Jun, DU Qi-yan, CHANG Zhong-jie

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

**Abstract:** We studied the DNA damage effect of paraquat at different time (6, 24, 48, 96 h) and different doses (0.302, 0.362, 0.434, 0.521, 0.625 mL/L and CK) on *Paramisgurnus dabryanus*. SCGE was applied to test DNA damage. For each comet, Tail DNA, Tail Length, Olive Tail Moment was measured with CASP and the data was analyzed with SPSS 13.0 for windows. The results showed that there was significant difference between groups with 6, 24, 48, 96 h treatment of paraquat and CK ( $P < 0.05$ ) in Tail DNA, Tail Length, Olive Tail Moment. Moreover, at identical time, a dose-dependent increase in Tail DNA, Tail Length, Olive Tail Moment in groups of 6, 24, 48 h treatment was observed and a time-dependent increase in Tail DNA, Tail Length, Olive Tail Moment was observed at identical dose in groups of 0.302, 0.362, 0.434, 0.521 mL/L treatment in general. However, there was a decrease in Tail DNA, Tail Length, Olive Tail Moment at 96 h compared to 48 h group. at 24 h treatment of 0.625 mL/L dose Tail Length, Olive Tail Moment reached their maximum levels at  $(553.22 \pm 106.92) \%$  and  $(200.73 \pm 50.72) \%$ ; at 48 h treatment of 0.625 mL/L dose Tail DNA reached its maximum level at  $(75.14 \pm 10.99) \%$ .

**Key words:** paraquat; SCGE; *Paramisgurnus dabryanus*