

RAPD 法探究百草枯对 HepG2 细胞基因组稳定性的影响

唐超智, 张玉玲, 刘庆荟, 张子喻, 王雅茹

(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:目的:探讨百草枯(PQ)处理对 HepG2 细胞基因组稳定性的影响.方法:采用随机扩增多态性 DNA (RAPD)标记技术,选取 20 种随机引物分析 PQ 处理 24 h 对 HepG2 细胞基因组稳定性的影响.结果:引物 5'-GGAAGTCGCC-3'、5'-ACGCGCATGT-3'和 5'-GAATCGGCCA-3'的扩增产物在正常组与 7.21、10.67、15.78、22.36 和 34.57 mg/L 的 PQ 处理组间有较明显差异.其中,引物 5'-GGAAGTCGCC-3'的 2 种扩增产物(约 2 200 和 2 600 bp)在所有 PQ 处理组均缺失;引物 5'-ACGCGCATGT-3'的 2 种扩增产物(约 250 和 1 200 bp)在高于 7.21 mg/L 的 PQ 处理组均发生缺失,1 种扩增产物(约 1 500 bp)在 34.57 mg/L 的 PQ 处理组发生缺失,另有 2 种扩增产物(约 400 和 550 bp)在 34.57 mg/L 的 PQ 处理组含量较低;引物 5'-GAATCGGCCA-3'有 2 种扩增产物(约 900 和 1 900 bp)在全部 PQ 处理组均缺失,另 2 种扩增产物(约 530 和 560 bp)新出现在各 PQ 处理组.结论 PQ 处理会破坏 HepG2 细胞基因组的完整性和稳定性.

关键词: RAPD;百草枯;HepG2 细胞;基因组稳定性;引物;扩增产物

中图分类号: S859.7

文献标志码: A

百草枯(paraquat, PQ)又名克无踪,因其具有水溶性好、可速效触杀等特点,PQ 深受全球农民的喜爱,自 20 世纪 70 年代以来一直是世界第二大除草剂.从 20 世纪 90 年代以后,随着农业生产力的需求,PQ 在中国农村广泛使用,在生产中发挥了举足轻重的作用,大大推动了我国农业发展.但 PQ 是剧毒类农药,对动物和人体有明显毒性,其在农业领域的大量使用,已经严重危及到人们的健康.由于目前尚未有针对 PQ 中毒的有效治疗方法和特效解毒剂,通过皮肤接触、呼吸道吸入、误服百草枯而死亡的案例被频频报道^[1-3].

来自 PQ 中毒病人、死者和实验处理动物的实验结果提示,摄入的 PQ 一般情况下会随血液循环首先在肺部沉积^[4-6].其次,肾作为水溶物质的排泄器官,在 PQ 中毒后也会受到严重损伤^[7, 8].近年来的低剂量慢性毒性实验发现,PQ 引起的部分病理特征与一些衰老疾病症状相似,特定时间和浓度的 PQ 处理甚至会引起老年性痴呆^[9-10].但 PQ 中毒对肝的影响尚未受到足够的关注.肝是机体降解外源毒物最重要的功能器官,解析肝细胞在 PQ 处理后发生的变化,不仅有助于进一步理解 PQ 的毒性机制,也对寻求新的方法增强肝对 PQ 的解毒能力和治疗 PQ 中毒具有重要意义.人肝癌 HepG2 细胞具有肝细胞的多种代谢和转化酶系,是良好的肝细胞研究模型^[11, 12].因此,本研究以 HepG2 细胞为试验对象,采用随扩增多态性 DNA(random amplified polymorphic DNA, RAPD)标记技术检测了 PQ 对 HepG2 细胞基因组稳定性的影响.

1 材料和方法

1.1 细胞、试剂和仪器

试验使用的 HepG2 细胞株、细胞培养用常规试剂和耗材、细胞培养和传代方法均与文献[12]相同.基因组 DNA 提取试剂盒、DM 2000 DNA marker 和 2× Taq Master Mix(含 dNTP、Taq 酶、反应 buffer)均购自

收稿日期:2017-05-10;修回日期:2017-12-15.

基金项目:国家自然科学基金(31170733);河南省重点科技攻关项目(172102310053);河南师范大学博士科研启动费(qd15170).

作者简介(通信作者):唐超智(1980-),男,河南潢川人,河南师范大学副教授,博士,主要从事毒理学研究,E-mail:041128@htu.cn.

北京康为世纪生物科技有限公司(CW2298、CW0632 和 CW0682).DYCP-32C 水平电泳槽为北京六一仪器厂生产.PowerPac Universal 电泳仪电源、GelDoc XR 凝胶成像系统和 C1000 touch PCR 仪均为美国 Bio-Rad 公司生产.Nanodrop 2000 超微量分光光度计为美国 Thermo 公司生产.RAPD 随机引物 20 种委托北京金唯智生物科技有限公司合成,信息见表 1.

1.2 RAPD 试验

(1)常规培养 HepG2 细胞,以 0、7.21、10.67、15.78、23.36 和 34.57 mg/L 的 PQ 处理 24 h,按照试剂盒操作指南提取各实验组的基因组 DNA.

(2)超微量分光光度计测定基因组 DNA 样品的浓度后,以去离子水(deionized water, DW)稀释至 50 ng/ μ L.

表 1 随机引物信息

引物名称	引物序列	引物名称	引物序列
primer1	5'-GGTCGGAGAA-3'	primer 11	5'-CTTCGCAGT-3'
primer 2	5'-TCGGACGTGA-3'	primer 12	5'-ACGCGCATGT-3'
primer 3	5'-AGACGTCCAC-3'	primer 13	5'-GACGCCACAC-3'
primer 4	5'-GGAAGTCGCC-3'	primer 14	5'-ACCAGGTTGG-3'
primer 5	5'-AGTCGTCCCC-3'	primer 15	5'-AATGGCGCAG-3'
primer 6	5'-ACGCATCGCA-3'	primer 16	5'-TCTCAGCTGG-3'
primer 7	5'-CTGCATCGTG-3'	primer 17	5'-CACTCTCCTC-3'
primer 8	5'-GAAACACCCC-3'	primer 18	5'-GAATCGGCCA-3'
primer 9	5'-TGTAGCTGGG-3'	primer 19	5'-CTGACCAGCC-3'
primer 10	5'-CCTACGTCAG-3'	primer 20	5'-GGGAGACATC-3'

(3)超微量分光光度计测定基因组 DNA 样品的浓度后,以去离子水(deionized water, DW)稀释至 50 ng/ μ L.

(4)按表 2 配成每个实验组 DNA 样品的 PCR 反应体系.

表 2 PCR 反应体系

反应物名称	V/ μ L
2 \times Taq Master Mix	12.5
基因组 DNA 样品	2.0
随机引物(10 μ mol/L)	0.5
加 DW 至	25.0

(5)按表 3 程序对 PCR 反应体系进行扩增反应.

表 3 PCR 反应程序

反应步骤	反应条件
第 1 步	94 $^{\circ}$ C, 300 s
第 2 步(5 个循环)	94 $^{\circ}$ C, 60 s; 36 $^{\circ}$ C, 60 s; 72 $^{\circ}$ C, 120 s
第 3 步(35 个循环)	94 $^{\circ}$ C, 60 s; 40 $^{\circ}$ C, 60 s; 72 $^{\circ}$ C, 120 s
第 4 步	72 $^{\circ}$ C, 600 s

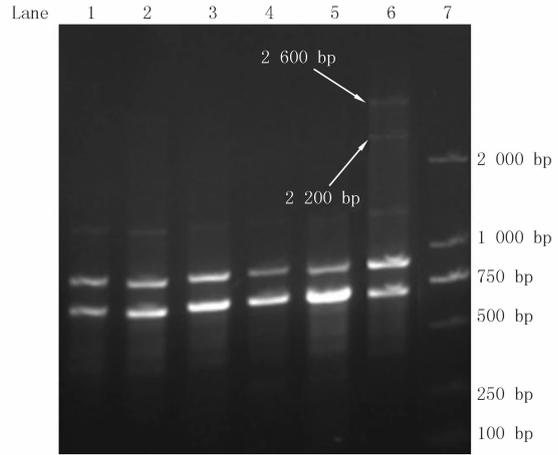
(6)对 PCR 产物进行水平电泳.电泳条件:质量分数 1.5%琼脂糖凝胶,上样量 10 μ L,90 V 恒压,水平电泳槽放置于冰盒内降温避免化胶,每轮电泳的时间为 3 h.

(7)凝胶成像系统下观察、摄像,分析各实验组的基因组 DNA 扩增产物的差异性.

2 结 果

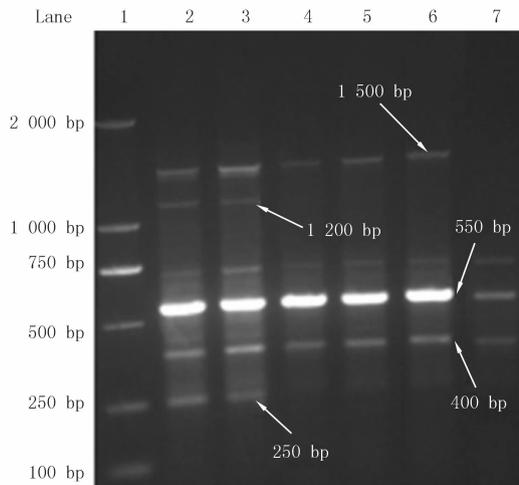
利用 RAPD 法,结果筛选出了 3 种引物可以产生清晰的扩增产物差异带型且表现出良好的重复性和多

态性,该 3 种引物为 Primer4、Primer12 和 Primer18,该 3 种引物的扩增产物条带分别如图 1、2 和 3 所示.由图 1 可见,Primer4 的扩增产物中明显有 2 种(分别约为 2 200 和 2 600 bp)在所有 PQ 处理组均缺失.由图 2 可见,Primer12 的扩增产物中明显有 2 种(分别约为 250 和 1 200 bp)在高于 7.21 mg/L 的 PQ 处理组发生缺失,另有 1 种(约为 1 500 bp)在 34.57 mg/L 的 PQ 处理组发生缺失,还有 2 种(约为 400 和 550 bp)在 34.57 mg/L 的 PQ 处理组含量较低.由图 3 可见,Primer18 的扩增产物中明显有 2 种(约为 900 和 1 900 bp)在所有 PQ 处理组均明显缺失,另 2 种(分别约为 530 和 560 bp)新出现在各 PQ 处理组.该结果提示,PQ 处理明显破坏了 HepG2 细胞基因组的完整性和稳定性.



Lane1-7 依次为 34.57、23.36、15.78、10.67、7.21、0 mg/L 的 PQ 处理组和 DNA marker, 箭头指示处理组与正常组间的明显差异条带.

图 1 基因组 DNA 的 Primer4 扩增产物

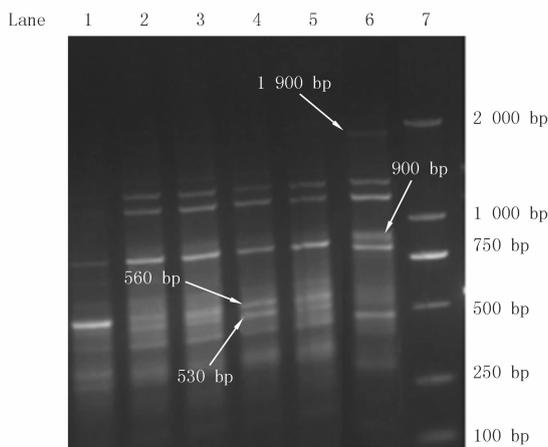


Lane1-7 依次为 DNA marker 和 0、7.21、10.67、15.78、23.36、34.57 mg/L 的 PQ 处理组, 箭头指示处理组与正常组间的明显差异条带.

图 2 基因组 DNA 的 Primer12 扩增产物

3 讨论

RAPD 技术是遗传多态性分析、系谱分析、遗传图谱构建、突变体检测等遗传学领域研究的重要方法,应用 RAPD 技术进行基因组信息变化分析则可以指示 DNA 发生突变或损伤的状况.随着 RAPD 技术应用的日趋成熟,近年来从事毒理学研究的部分学者开始尝试应用该技术调查毒物对基因组 DNA 多态性和稳定性的影响^[13-15],以检测毒物的基因毒性.如 Erturk 通过 RAPD 实验检测了钴和镍对玉米籽的基因组 DNA 多态性变化,发现随着钴和镍处理浓度的增大,新增 RAPD 产物和缺失的正常 RAPD 产物的数量均增多^[13].Singh 等应用 RAPD 实验检测到慢性 Cd 处理可导致小鼠睾丸间质细胞的基因组稳定性明显下降^[15].Puglisi 等研究拟南芥幼苗发现,RAPD 技术能检测出生物细胞中 DNA 的临时变化,比传统的微核试验、彗星分析等遗传毒性检测方法更为灵敏有效^[16].



Lane1-7 依次为 34.57、23.36、15.78、10.67、7.21、0 mg/L 的 PQ 处理组和 marker, 箭头指示处理组与正常组间的明显差异条带。

图 3 基因组 DNA 的 Primer18 扩增产物

关于 PQ 处理对基因组稳定性变化的影响至今尚未见报道,本研究首次进行该领域研究是一项开拓性工作.本文采用灵敏度较高、信息量较具体的 RAPD 技术分析 PQ 处理后 HepG2 细胞基因组信息的变化,在 PQ 的基因毒性研究领域也属首例,这对于食品和健康领域内检测测量 PQ 残留导致生物遗传性状变化的工作具有重要参考价值.

本研究结果显示,一定浓度的 PQ 处理,导致 HepG2 细胞的基因组信息发生了明显的改变.与对照组相比,PQ 处理组 HepG2 细胞的基因组扩增产物在引物 5'-GGAAGTCGCC-3'、5'-ACGCGCATGT-3' 和 5'-GAATCGGCCA-3' 中出现明显差异,主要表现为扩增产物种类减少,也有少量新的扩增产物产生.扩增产物减少表明 PQ 处理后,模板基因组 DNA 信息有所减少,尤其在高浓度处理组,原谱带的缺失和减弱表现明显,反映出高浓度的 PQ 处理对细胞 DNA 的破坏导致基因组 DNA 的稳定性严重降低,基因组的信息量减少程度较大.而出现新的扩增产物表明一些基因组 DNA 在 PQ 处理时先发生了单链或双链断裂,再发生了 DNA 重组,从而有了新的 RAPD 图谱^[17].根据 RAPD 技术的原理^[18],无论扩增产物条带发生怎样的变化,都表明 PQ 处理引起了基因组 DNA 的改变,基因组受到了一定的破坏.PQ 处理改变了 HepG2 细胞基因组信息的完整性和稳定性之后,则势必将进一步导致细胞的结构和功能出现故障,这一定程度上也解释了 PQ 处理会导致细胞其它多种毒理学指标发生变化的原因^[12,19-20].

肝是人体重要的解毒器官,本研究检测到 PQ 对人肝 HepG2 细胞基因组稳定性有负面影响,暗示 PQ 对肝细胞的基因毒性可能是多年以来人们无法攻克 PQ 中毒的最根本原因,应用 DNA 修复药物可能是治疗 PQ 中毒的有效手段.

参 考 文 献

- [1] Zhou Q, Kan B, Jian X, et al. Paraquat poisoning by skin absorption: Two case reports and a literature review[J]. *Exp Ther Med*, 2013, 6(6): 1504-1506.
- [2] Jones B C, Huang X, Mailman R B, et al. The perplexing paradox of paraquat: the case for host-based susceptibility and postulated neurodegenerative effects[J]. *J Biochem Mol Toxicol*, 2014, 28(5): 191-197.
- [3] Spangenberg T, Grahn H, van der Schalk H, et al. Paraquat poisoning: Case report and overview[J]. *Med Klin Intensivmed Notfmed*, 2012, 107(4): 270-274.
- [4] Toygar M, Aydin I, Agilli M, et al. The relation between oxidative stress, inflammation, and neopterin in the paraquat-induced lung toxicity[J]. *Hum Exp Toxicol*, 2015, 34(2): 198-204.
- [5] Hara H, Yoneyama H, Tanabe J, et al. Observations of the fibrosing process in paraquat lung injury by chest X-ray and CT[J]. *Nihon Kyo-bu Shikkan Gakkai Zasshi*, 1991, 29(5): 638-643.
- [6] Xie H, Wang R, Tang X, et al. Paraquat-induced pulmonary fibrosis starts at an early stage of inflammation in rats[J]. *Immunotherapy*, 2012, 4(12): 1809-1815.

- [7] Wunnapak K, Liu X, Peake P, et al. Renal biomarkers predict nephrotoxicity after paraquat[J]. *Toxicol Lett*, 2013, 222(3): 280-288.
- [8] Pavan M. Acute kidney injury following paraquat poisoning in India[J]. *Iran J Kidney Dis*, 2013, 7(1): 64-66.
- [9] Mangano E N, Litteljohn D, So R, et al. Interferon- γ plays a role in paraquat-induced neurodegeneration involving oxidative and proinflammatory pathways[J]. *Neurobiol Aging*, 2012, 33(7): 1411-1426.
- [10] Rappold P M, Cui M, Chesser A S, et al. Paraquat neurotoxicity is mediated by the dopamine transporter and organic cation transporter-3[J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2011, 108(51): 20766-20771.
- [11] Pinti M, Troiano L, Nasi M, et al. Hepatoma HepG2 cells as a model for in vitro studies on mitochondrial toxicity of antiviral drugs: which correlation with the patient[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*, 2003, 17(2): 166-171.
- [12] 唐超智, 张玉玲, 王文晟. 百草枯对人肝 HepG2 细胞生长和周期的影响[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2015, 43(6): 94-101.
- [13] Erturk FA, Ay H, Nardemir G, et al. Molecular determination of genotoxic effects of cobalt and nickel on maize (*Zea mays*) by RAPD and protein analyses[J]. *Toxicol Ind Health*, 2013, 29(7): 662-671.
- [14] Gnat S, Malek W, Oleńska E, et al. Insight into the genomic diversity and relationship of *Astragalus glycyphyllos* symbionts by RAPD, ERIC-PCR, and AFLP fingerprinting[J]. *J Appl Genet*, 2015, 56(4): 551-554.
- [15] Singh K P, Kumari R, Pevey C, et al. Long duration exposure to cadmium leads to increased cell survival, decreased DNA repair capacity and genomic instability in mouse testicular Leydig cells[J]. *Cancer Lett*, 2009, 279(1): 84-92.
- [16] Conte C, Mutti I, Puglisi P, et al. DNA fingerprinting analysis by a PCR based method for monitoring the genotoxic effects of heavy metals pollution[J]. *Chemosphere*, 1998, 37(14/15): 2739-2749.
- [17] Czochoch JR, Sulkowski P, Glazer P M. miR-155 overexpression promotes genomic instability by reducing high-fidelity polymerase delta expression and activating error-prone DSB repair[J]. *Mol Cancer Res*, 2016, 14(4): 363-373.
- [18] De Wolf H, Blust R, Backeljau T. The use of RAPD in ecotoxicology[J]. *Mutat Res*, 2004, 566(3): 249-262.
- [19] 张玉玲, 唐超智. 百草枯应用现状及其对动物的毒性机制研究进展[J]. *河南师范大学学报(自然科学版)*, 2016, 44(6): 120-125.
- [20] Fortenberry G Z, Beckman J, Schwartz A, et al. Magnitude and characteristics of acute paraquat- and diquat-related illnesses in the US: 1998-2013[J]. *Environ Res*, 2016, 146: 191-199.

The effects of paraquat on genome stability in HepG2 cells by RAPD labeling technique

Tang Chaozhi, Zhang Yuling, Liu Qinhuai, Zhang Ziyu, Wang Yaru

(College of Life Science, Henan Normal University, Xixiang 453007, China)

Abstract: Objective: To explore the effects of paraquat (PQ) on genome stability in HepG2 cells. Methods: By randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) labeling technique, the paper selected 20 kinds of random primers to analyze the effects of 24 h - PQ treatment on genome stability in HepG2 cells. Results: The amplification products of the primers 5'-GGAAGTCGCC-3', 5'-ACGCGCATGT-3' and 5'-GAATCGGCCA-3' were significantly different between the normal group and 7.21, 10.67, 15.78, 22.36, 34.57 mg/L of PQ treatment groups. For the primer 5'-GGAAGTCGCC-3', two kinds of amplification products (about 2 200 and 2 600 bp respectively) were absent in all PQ treatment groups. For the primer 5'-ACGCGCATGT-3', two kinds of amplification products (about 250 and 1 200 bp respectively) were absent in greater than 7.21 mg/L of PQ treatment groups and another of amplification products (about 1 500 bp) was absent in 34.57 mg/L of PQ treatment group. In addition, two kinds of amplification products (about 400 and 550 bp respectively) were less in 34.57 mg/L of PQ treatment group than normal group. For the primer 5'-GAATCGGCCA-3', two kinds of amplification products (about 900 and 1 900 bp respectively) were absent and two kinds of new amplification products (about 530 and 560 bp respectively) were found in all PQ treatment groups. Conclusion PQ treatment could break genome integrity and stability of HepG2 cells.

Keywords: RAPD; PQ; HepG2 cells; genome stability; primer; amplification product

[责任编辑 王凤产]