

植物代谢对荧蒽和 与 DNA 结合的影响¹⁾

郭栋生 袁小英²⁾ 张 芳

(山西大学环境科学系, 太原, 030006)

摘 要

利用紫外和荧光法测定了荧蒽和 经绿豆幼苗代谢前后的光谱变化. 结果表明, 经植物代谢后, 荧蒽的紫外和荧光光谱的精细结构没有发生变化, 而 的紫外和荧光光谱的精细结构以及荧光的最大发射波长均发生了改变. 利用荧光法测定荧蒽和 经植物代谢前后与 DNA 结合的结果表明, 在浓度约为 $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 荧蒽及其植物代谢提取物与浓度为 $5.0 \times 10^{-7} \sim 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内的 DNA 不发生结合, 而 及其植物代谢提取物都能与上述浓度的 DNA 结合, 但经植物代谢后, 提取物与 DNA 的结合能力稍有减弱, 该结果表明, 荧蒽和 母体化合物与 DNA 的结合能力不同, 在试验期内, 植物代谢对这两种在动物体试验中表现不同致癌性的多环芳烃与 DNA 间的结合没有明显的活化或去活化作用.

关键词: 荧蒽, , 植物代谢, DNA, 紫外分光光度法, 荧光法.

传统的诱变性试验常是与动物代谢或与动物肝脏微粒体混合功能氧化酶活化的前诱变剂联系在一起的^[1]. 近年来, 植物体对前诱变剂的活化已受到广泛的重视, 这首先是因为植物对外来物的代谢不完全与动物相同, 这样在动物体内不能被激活的化学物, 可能在植物代谢时变为诱变剂^[2]. 对植物代谢活化物致突变性的检定多采用 Ames 试验进行^[1, 3]. 但普遍认为致癌物与核酸等大分子的共价结合是发生肿瘤的重要原因^[4].

本文采用荧光法测定了荧蒽和 经过绿豆幼苗代谢前后的荧光光谱以及与 DNA 结合的变化. 其中荧蒽在动物试验中被确认经活化无致癌活性, 而 则有致癌活性^[5].

1 试验部分

1.1 植物的处理及其植物代谢物的提取

将绿豆籽粒置于装有石英砂的瓷盘中, 加入浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的荧蒽或 的二甲基亚砜 (DMSO, 0.1%)-水溶液^[6], 置光照培养箱中在 $20 \pm 1^\circ \text{C}$ 和 $12 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 光照的条件下进行培养. 将长至高约 5—6 cm 的幼苗从培养皿中取出, 去掉残留籽粒后^[7], 采用环己烷-丙酮水体系匀浆、提取, DMSO、环己烷溶液分配, 氧化铝-硅胶吸附剂柱层析的方法分离和纯化荧蒽和 的植物代谢物. 层析液低温去除环己烷后, 用 DMSO 溶解. 设置不加荧蒽和 的植物作为对照.

1) 山西省自然科学基金资助项目 (批准号 971020), 2) 山西大学分析测试中心.

1.2 荧蒽、 及其植物提取物与 DNA 作用的测定

将适量的荧蒽、 或其植物提取物的 DMSO-水溶液与 Tris-HCl DNA 溶液 ($\text{pH} = 7.4$) 混合, 保持 $\text{DMSO/Tris-HCl} = 1/9$ (V/V)^[8], 使荧蒽和 的浓度为 $2.5 \times 10^{-6} \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$, 采用和以上浓度的荧蒽和 荧光强度相近的植物提取物浓度, 保持小牛胸腺 DNA 浓度在 $5.0 \times 10^{-7} - 5.0 \times 10^{-5} \text{mg} \cdot \text{l}^{-1}$ (以 P 计) 之间呈梯度变化. 将上述各溶液在避光、 25°C 下放置 48h 后, 分别以 350nm 和 330nm 作为荧蒽和 及其相应提取物的激发波长, 用 PE-LS50B 型荧光分光光度计测定一定波长范围内的荧光峰面积, 记录荧蒽和 最大发射波长下的荧光强度.

2 结果与讨论

2.1 荧蒽和 经植物代谢前后紫外吸收光谱的变化

荧蒽 (A) 和 (C) 及其植物代谢提取物 (B, D) 的紫外光谱如图 1 所示. 紫外光谱分析结果表明, 荧蒽在经植物代谢后, 其紫外光谱没有发生明显的改变, 而 的峰形则发生了明显的变化, 这表明植物代谢可能使 的结构发生了改变.

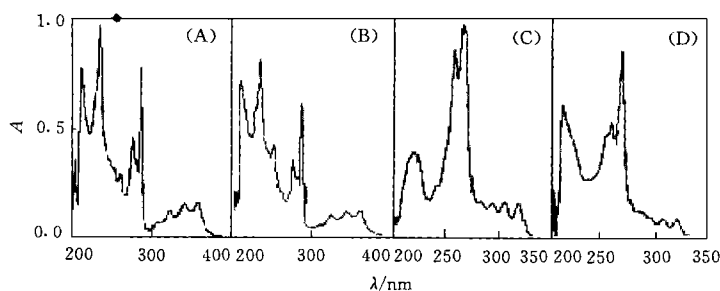


图 1 荧蒽和 代谢前后的紫外吸收光谱

Fig 1 UV spectrum of the fluoranthene and chrysene before and after metabolized by plant

2.2 荧蒽和 经植物代谢前后荧光光谱的变化及其与 DNA 的结合

荧蒽和 及其植物提取物的荧光光谱以及加入 DNA 后荧光峰面积的变化见图 2.

图 2A 结果表明, 荧蒽在 460nm 处有一最大发射峰, 在经过植物代谢后荧光光谱 (图 2B) 的精细结构没有发生变化; 向荧蒽及其代谢物的溶液中加入不同浓度的 DNA 时, 荧光峰面积也不发生改变 (图 2A, B). 这表明, 荧蒽本身不与 DNA 结合, 在经过植物代谢后, 结构没有发生明显的变化, 因而也不与 DNA 发生结合.

图 2C 的结果表明, 在 410nm 处有一最大发射峰. 经植物代谢后荧光光谱 (图 2D) 的精细结构发生了改变, 最大发射峰位移至 413nm. 这表明, 经植物代谢后, 的结构发生了变化. 向 或其植物代谢提取物的溶液中加入 DNA 时, 或其植物代谢物的荧光峰面积随着 DNA 浓度的增加而增加 (图 2C, D). 这表明 及其植物代谢物都能够与 DNA 发生结合. 加入 DNA 后荧光峰面积的变化, 可归结为 或其植物代谢物嵌入到 DNA 的碱基对之间, 引起 或植物代谢物的环境发生了改变^[8].

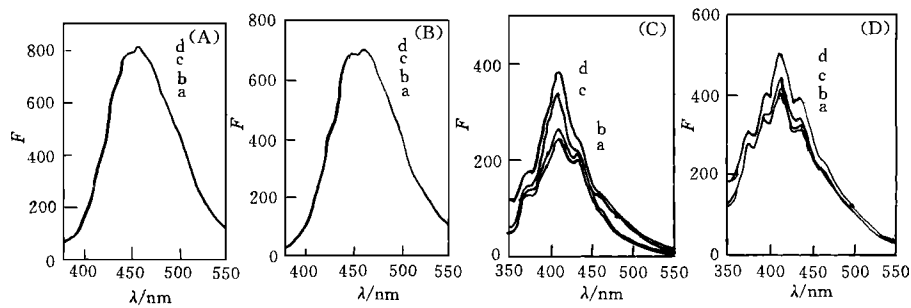


图 2 荧蒽和 代谢前后与 DNA 作用的荧光光谱

$C_{(DNA)}$ ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): a. 0, b. 5.0×10^{-7} , c. 5.0×10^{-6} , d. 5.0×10^{-5}

Fig. 2 Fluorescence spectrum of the fluorancene and chrysene before and after metabolized by plant

2.3 及其代谢物与 DNA 的结合能力

及其代谢物 and 不同浓度的 DNA 作用前后, 在 410nm 和 413nm 处的荧光度 (F_i) 及其变化 ($F_i - F_0$) 如表 1 所示. 表 1 反映了 及其代谢物与 DNA 相互作用的剂量效应关系. 其荧光强度的增加 ($F_i - F_0$) 随 DNA 加入浓度 $[DNA]_0$ 的增加呈正相关变化, 可表示为: $F_i - F_0 = B_i [DNA]_0 + A$. 利用表 1 的数据进行回归分析可得出:

$Y_1 = 0.7809, B_1 = 1.95 \times 10^6 \quad (n = 5)$

$Y_2 = 0.9233, B_2 = 1.58 \times 10^6 \quad (n = 5)$

可见加入不同浓度的 DNA 后, 代谢物荧光强度变化的斜率小于 . 这表明经过植物体代谢后 与 DNA 之间的结合能力稍有减弱, 但仍能与 DNA 发生结合.

表 1 及其植物代谢物与 DNA 相互作用的荧光强度

Table 1 Fluorescence intense of chrysene and its metabolite interacting with DNA

$[DNA]_0 / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$		0	5×10^{-7}	1×10^{-6}	5×10^{-6}	1×10^{-5}	5×10^{-5}
(410nm)	F_1	247.7	261.1	268.6	335.8	347.6	380.9
	$F_1 - F_0$		13.4	20.9	88.7	99.9	133.2
代谢物	F_2	410.4	407.3	414.6	441.5	454.4	496.6
	$F_2 - F_0$		5.9	13.2	40.1	53.0	95.2

3 结论

在动物体代谢活化试验中, 荧蒽的致癌活性为阴性, 的致癌活性为弱阳性^[5]. 在本实验中, 荧蒽在经植物体代谢前不与 DNA 的结合, 而 能与 DNA 结合, 这种和 DNA 结合特性的不同是否和其经动物体肝酶激活后表现致癌性不同有关, 尚须进一步研究. 试验结果还表明, 植物体对荧蒽和 在一定时期内的代谢, 不会引起二者和 DNA 结合能力的增加. 尽管目前对化学致癌物与 DNA 共价结合之间的关系尚未找到明显的规律^[4], 但至少可以说明两种在动物体内致癌性不同的多环芳烃, 经植物体代谢后与生物体遗传物的相互作用没有受到明显的影响.

参 考 文 献

- [1] Sauser K R, Klaie S J, Activation of Promutagens by a Unicellular Green Algae. ASTM STP, 1990, 324—332
- [2] Sandemann H, Environmental Mutagenesis, Carcinogenesis and Plant Biology. New York: Praeger, 1982, 1—32
- [3] Wildeman A G, Nazar R N, Significance of Plant Metabolism in the Mutagenicity and Toxicity of Pesticides. *Can. J. Genet. Cytol.*, 1982, **24** 437—449
- [4] 纪云晶, 实用毒理学手册. 北京: 中国环境科学出版社, 1993, 44—45
- [5] 王连生, 有机污染物化学. 北京: 科学出版社, 1990, 67—70
- [6] Ren L, Zeiler L F, Dixon D G et al., Photoinduced Effect of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Brassica Napus during Germination and Early Seedling Development. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1996, **33** 73—80
- [7] Plewa M J, Gentile J M. The Biochemical Basis of the Activation of Promutagens by Plant GrII System. *Mutation Research*, 1976, **38** 287—292
- [8] 钱旭红, 张玉兰, 徐晓勇等, 四甲基苯并二呋喃的合成和 DNA 嵌入性能及其结构的分子模拟研究. 高等学校化学学报, 1996, **17** (9): 1399—1403

2001 年 4 月 21 日收到.

THE INFLUENCE OF PLANTS METABOLISM TO FLUORANTHENE AND CHRYSENE ON THE COMBINATION OF THEM WITH DNA

GUO Dong-sheng YUAN Xiao-ying ZHANG Fang

(Department of Environmental Sciences, Shanxi University, Taiyuan, 030006)

ABSTRACT

Metabolized by mung bean seedlings, the two kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons, fluoranthene and chrysene, were extracted and separated from the plant. The UV spectrum and the fluorescence spectrum of the two kinds of chemicals had been determined before and after metabolized by plant, and the combination response of the two chemicals and their metabolites with DNA was determined by the method of fluorimetry. The result indicates that fluoranthene has no change to its fine structure of the UV and fluorescence spectrum before and after metabolized by the plant, but chrysene both change in it. In the concentration of $2.5 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, fluoranthene and its metabolites in the same fluorescence intense with it have no combination with DNA which presented in the concentrations of $5.0 \times 10^{-7} \text{—} 5.0 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, while chrysene can do it in the same conditions. Compared with chrysene, the combination capacity of chrysene metabolites with DNA has been weakened in a little. The results indicated that fluoranthene and chrysene in parent compound have different combination capacity with DNA. Metabolized by plant to these two kinds of polycyclic aromatic hydrocarbons, which have showed different carcinogenicity in animal test, has no displayed obvious activation or inactivation action.

Keywords: fluoranthene, chrysene, plant metabolism, DNA, UV spectrophotometry, fluorimetry.