

# Effects of Organic Compounds From Untreated and Chlorinated Drinking Water on DNA Damage and Expression of *gadd153* Gene in HepG2 Cell Line

# 源水和氯化饮用水中有机提取物对 HepG2 细胞 DNA 损伤的诱导作用及对 *gadd153* 基因表达的影响

ZHANG Rong, HAO Qiao-ling, SHI Dan, ZHOU Yi-kai\*  
(MOE Key Lab of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China)

张 荣/郝巧玲/石 丹/周宜开\*  
(华中科技大学同济医学院公共卫生学院教育部  
环境与健康重点实验室,湖北 武汉 430030)

**【摘要】**背景与目的: 研究源水和氯化饮用水有机提取物对 DNA 的损伤作用以及对 *gadd153* 启动子和 mRNA 表达的影响。材料与  
方法: 应用彗星试验检测源水和氯化饮用水有机提取物对 HepG2 细胞的 DNA 损伤作用; 构建含有 *gadd153* 启动子和荧光素酶报告基  
因的载体 pGADD153-Luc, 以检测荧光素酶活性(发光检测荧光素酶活性)反映 *gadd153* 启动子的活性, RT-PCR 检测 *gadd153* 基因 mRNA  
的表达。结果: 彗星试验显示在 10、100 ml/ml 培养基剂量组源水和氯化饮用水有机提取物处理 24 h 后, OTM(Olive 尾距)显著高于  
对照组 ( $P < 0.01$ ), 并有良好的剂量反应关系(源水  $r = 0.882$ ,  $P < 0.05$ ; 氯化饮用水  $r = 0.940$ ,  $P < 0.05$ ); 氯化饮用水中有机提取物诱  
导 OTM 显著高于源水 ( $P < 0.05$ ); 荧光素酶表达在源水和氯化饮用水有机提取物各剂量组均显著高于对照组 ( $P < 0.01$ ) 并有良好的  
剂量反应关系(源水  $r = 0.814$ ,  $P < 0.05$ ; 氯化饮用水  $r = 0.921$ ,  $P < 0.05$ ); 相关分析表明荧光素酶活性与 OTM 呈正相关(源水  $r =$   
 $0.980$ ,  $P < 0.01$ ; 氯化饮用水  $r = 0.995$ ,  $P < 0.01$ ); RT-PCR 结果显示在 100 ml/ml 培养基剂量组, 源水和氯化饮用水中有机提取物诱导  
*gadd153*mRNA 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 并与 OTM 有良好的相关性(源水  $r = 0.864$ ,  $P < 0.05$ ; 氯化饮用水  $r = 0.897$ ,  $P < 0.05$ )。结  
论: 源水和氯化饮用水有机提取物可诱导 HepG2 细胞 DNA 损伤, 导致 *gadd153* 启动子区的激活, 并进一步调控下游 *gadd153* 基因  
mRNA 的表达。

**【关键词】** 源水和氯化饮用水有机提取物; DNA 损伤; *gadd153* 启动子; *gadd153* 基因; 荧光素酶报告基因

中图分类号: R123 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2006)05-0363-04

**【ABSTRACT】 BACKGROUND & AIM:** To investigate the effects of the untreated water and chlorinated drinking water  
extracts of the Han River on DNA damage and the expression of the *gadd153* promoter and mRNA. **MATERIAL AND  
METHODS:** The DNA damage was assessed by the alkaline comet assay. The plasmid(pGADD153-Luc) containing DNA  
damage and repair inducible gene 153 (*gadd153*) promoter and luciferase reporter gene were constructed. The activity of  
*gadd153* promoter was represented by the luciferase activity, and the inducible luciferase activity was detected by  
bioluminescence. The expression of *gadd153* mRNA was detected by RT-PCR. **RESULTS:** The Olive Tail Moment(OTM)  
induced by the untreated water and chlorinated drinking water extracts was increased at the dose of 10, 100ml/ml  
medium ( $P < 0.01$ ), compared with control. There was a good dose-response relationship ( $r = 0.882$ ,  $P < 0.05$ ;  $r =$   
 $0.940$ ,  $P < 0.05$ ); The OTM induced by the chlorinated drinking water extracts was higher than that of untreated water  
( $P < 0.05$ ). The luciferase activity was significantly increased in each treatment group at each dose ( $P < 0.01$ ) and  
there were a good dose-response relationship ( $r = 0.814$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = 0.921$ ,  $P < 0.05$ ). There were positive  
correlations between the OTM and the luciferase activities ( $r = 0.980$ ,  $P < 0.01$ ,  $r = 0.995$ ,  $P < 0.01$ ); The high  
expression of *gadd153* mRNA was induced by the water extracts at dose of 100 ml/ml medium ( $P < 0.05$ ). There were

收稿日期: 2006-05-24 修订日期: 2006-07-11  
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号:30471433)  
作者简介: 张 荣(1971- ),女,河北人,博士研究生,研究方向:环境医学  
监测

\* Correspondence to: ZHOU Yi-kai, E-mail: zhouyk@mails.tjmu.edu.cn, Tel:  
027-83640991

positive correlation between the OTM and the expressions of gadd153 mRNA ( $r = 0.864, P < 0.05; r = 0.897, P < 0.05$ ). **CONCLUSION:** The untreated water and chlorinated drinking water extracts of Han River could induce DNA damage and further activated the gadd153 promoter which regulated the expression of gadd153 mRNA.

**【KEY WORDS】** untreated water and chlorinated drinking water extracts; DNA damage; gadd153 promoter; gadd153; luciferase reporter gene

大量研究表明,水源水中的有机物及污染物经水厂加氯消毒后,可形成致突变、致癌的氯化副产物<sup>[1]</sup>。汉江是武汉市主要的供水水源,近年来研究表明以汉江为水源的氯化饮水有机提取物对哺乳动物细胞DNA有损伤作用<sup>[2]</sup>。

gadd(growth-arrested and DNA-damage)基因编码产物具有细胞生长抑制作用,其过度表达,可使细胞内碱基摄取速度减慢,细胞克隆形成能力下降。本研究采用彗星试验检测了汉江源水和以汉江为水源的饮水氯化消毒副产物对HepG2细胞的DNA损伤作用,荧光素酶活性及RT-PCR检测源水和氯化饮用水有机提取物对生长抑制和DNA损伤修复基因gadd153启动子区和mRNA表达的影响,为进一步揭示水中有机污染物诱导DNA损伤的作用机制提供科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** 限制性内切酶Kpn I、Hind III, T4连接酶均购自华美公司; pGL3-Basic载体、M-MLV、TaqDNA聚合酶、荧光素酶检测试剂盒(Promega公司); pEGFP-C2载体(Clontech公司); LB培养基、胎牛血清、DMEM培养基(Gibco公司); Trizol试剂盒、Lipofectamine 2000转染试剂盒(Invitrogen公司); λDNA/Hind III Marker、G418(Life Scientific公司); BCA试剂盒(Pierce公司); 二甲基亚砜(DMSO)(Sigma公司); 荧光显微镜(ONLYMPUS公司; 日本); 凝胶成像分析系统(Vilber Lourant, 法国); 紫外可见分光光度计(日本岛津公司); 弱光仪(EP公司, LB9507型, 美国); 吸附树脂(美国AmberliteXAD-2型大孔树脂)。无机盐、有机试剂等为分析纯或优级纯。HepG2细胞株购自武汉大学典型培养物收藏中心。

**1.2 水中非挥发性有机物的浓集** 于2004年12月采集汉江有关水厂的水源水及其自来水水样。200L水样以每分钟1床体(床体为40 ml时,即为40 ml/min)的流速通过预先净化的XAD-2树脂柱,吸附水中微量有机物,然后用4床体丙酮、4床体二氯甲烷浸柱并洗脱所吸附的有机物,洗脱液通氮减压条件下浓缩,再在70℃烘箱中干燥制得有机物干品,用DMSO定容为10 ml,即为水样有机提取物的储备液,置于4℃保存。对照组为1% DMSO。

**1.3 细胞培养** HepG2细胞于含10%新生小牛血清的DMEM培养液(Gibco), 5% CO<sub>2</sub>饱和湿度, 37℃常规培养。调整细胞浓度至10<sup>5</sup>个/ml接种于培养瓶,取指数生长期细胞进行实验。

**1.4 彗星试验** 1、10、100ml/ml培养基有机提取物(以每ml培养液中加入的水样有机提取物储备液相当于原水样的ml数表示)处理细胞24h收获细胞,每个浓度制3个平行样,同时分别以1% DMSO和25 μmol/L苯并芘(Benzo(a)pyrene, BaP)作为阴性对照和阳性对照。具体操作见参考文献<sup>[3]</sup>。用CASP彗星分析软件分析,以Olive尾距(Olive Tail Moment, OTM)作为分析指标进行统计学分析, Olive尾距 = 尾部DNA含量 × 头部中心到尾部中心的距离。

**1.5 pGADD153-Luc质粒构建** gadd153启动子序列来源于质粒pGADD153-EGFP载体中的启动子,由美国加利福尼亚大学Dr. Stephen B. Howell惠赠; pGADD153-EGFP经Kpn I, Hind III双酶切后得到gadd153启动子全长的804 bp片断,插入pGL3-Basic载体中,转化菌落酶切鉴定。所得到的重组质粒结构见图1。

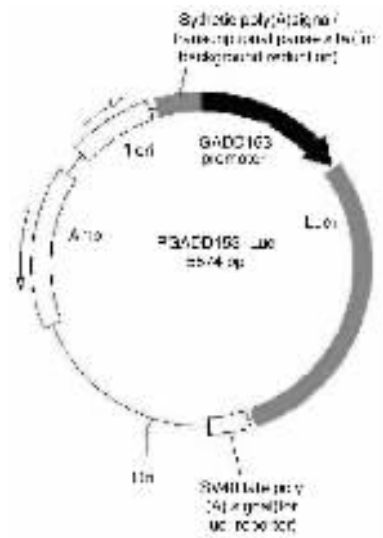


图1 重组质粒pGADD153-Luc图谱  
Figure 1 The map of the reconstructed vector pGADD153-Luc

**1.6 细胞转染** 将pGADD153-Luc和选择性质粒pEGFP-C2各8 μg用Lipofectamine 2000 20 μg共转染HepG2细胞, 400 μg/L G418选择培养, 3d后换为100 μg/L G418维持培养。无限稀释法稀释制备单克隆细胞。每个细胞克隆分别加入10 μmol/L氯化镉作为诱导

剂,检测荧光素酶活性,于其中挑选有诱导活性的细胞做进一步的培养及研究。

**1.7 细胞染毒和发光检测**  $2 \times 10^5$  个细胞/ml 的细胞悬液中,加入不同浓度的有机提取物,每个浓度制 3 个平行样,对照组加入 1% DMSO, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub> 继续培养 24 h。染毒结束后按荧光素酶测定试剂盒说明检测荧光素酶活性(计算 8 s 发光值,每个样品重复检测 3 次,取平均值),同时按 BCA 测定试剂盒说明检测蛋白浓度。酶活性以 RLU/ $\mu$ g 蛋白[每微克蛋白多少个相对发光单位(RLU)]表示。

**1.8 RT-PCR 分析** 细胞经有机提取物处理 24h 后,剂量同前,每个浓度制 3 个平行样。依 Trizol 试剂盒说明提取细胞总 RNA, M-MLV 逆转录试剂盒合成 cDNA。PCR 所用引物由上海博亚生物技术公司合成。序列如下。gadd153 引物, F: 5' AACCAGCAGAGGTCACAAGC3', R: 5' AGCCGTTTCATTCTCTTCAGC3', 扩增长度为 217 bp;  $\beta$ -actin 引物, F: 5' TCCTGTGGCATTCCACGAAACT3', R: 5' GAAGCATTTCGCGTGGACGAT3', 扩增长度为 316 bp。循环条件分别为: gadd153 基因: 95 °C 变性 30 s, 60 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 1 min, 循环 30 次;  $\beta$ -actin 基因: 72 °C 延伸 5 min; 94 °C 变性 1 min, 55 °C 退火 30 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 30 次; 72 °C 延伸 10 min。扩增产物于 2% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5  $\mu$ g/ml 的溴化乙锭),凝胶成像系统拍照并分析光密度, PCR 产物量以积分光密度  $\times$  面积表示。 $\beta$ -actin 作内对照,目的条带与  $\beta$ -actin 灰度值的比值表示 mRNA 的相对表达水平。

**1.9 统计学方法** 所有数据用  $\bar{x} \pm s$  表示,用 SPSS 11.0 分析软件进行统计,组间比较采用单因素方差分析和 Dunnett-t 检验,  $\alpha = 0.05$  为检验水准。

## 2 结果

**2.1 源水和氯化饮用水有机提取物对细胞 DNA 损伤的诱导作用** 表 1 显示采用彗星试验检测有机提取物处理细胞后的 DNA 损伤情况(OTM), 1 ml/ml 培养基的水有机提取物均未引起 OTM 增加,而 10 ml/ml、100

表 1 源水和氯化饮用水有机提取物对 DNA 损伤的诱导

Table 1 DNA damage induced by the organic extraction from untreated water and chlorinated drinking water ( $\bar{x} \pm s$ )

Dose	Untreated water (OTM)	Chlorinated drinking water(OTM)
Control	0.65 $\pm$ 0.05	0.65 $\pm$ 0.05
1 ml/ml	1.06 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.08
10 ml/ml	1.53 $\pm$ 0.46 <sup>a</sup>	2.84 $\pm$ 0.88 <sup>ab</sup>
100 ml/ml	2.19 $\pm$ 0.14 <sup>a</sup>	5.58 $\pm$ 0.57 <sup>ab</sup>
25 $\mu$ mol/L BaP	8.24 $\pm$ 1.70 <sup>a</sup>	

Compared with the control, a:  $P < 0.01$ ; compared with untreated water, b:  $P < 0.05$ ; BaP(25  $\mu$ mol/L): positive control.

ml/ml 的有机提取物可引起 OTM 显著增加,与对照组相比有显著差异( $P < 0.01$ ),并有良好的剂量反应关系(源水  $r = 0.882$ ,  $P < 0.05$ ; 氯化饮用水  $r = 0.940$ , 且  $P < 0.05$ )。10 ml/ml、100 ml/ml 培养基的氯化饮用水有机提取物诱导 OTM 显著高于源水( $P < 0.05$ )。

**2.2 荧光素酶活性表达** GADD153-Luc 细胞经有机提取物处理 24 h 后,可明显诱导荧光素酶表达,与对照组相比有统计学意义( $P < 0.01$ ),且具有良好的剂量反应关系(源水与氯化饮用水有机提取物分别为:  $r = 0.814$ ,  $P < 0.05$ ;  $r = 0.921$ ,  $P < 0.05$ ); 100 ml/ml 培养基的氯化饮用水有机提取物诱导荧光素酶表达显著高于源水( $P < 0.05$ ),结果见图 2。各剂量组诱导 HepG2 细胞荧光素酶活性和 DNA 损伤程度(OTM)呈正相关(源水与氯化饮用水有机提取物分别为:  $r = 0.980$ ,  $P < 0.01$ ;  $r = 0.995$ ,  $P < 0.01$ )。

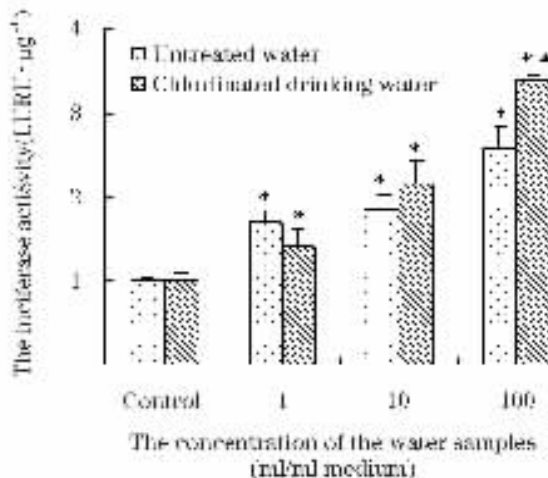


图 2 源水和氯化饮用水有机提取物对荧光素酶活性的诱导  
Figure 2 The luciferase activity induced by the organic extraction from untreated water and chlorinated drinking water. Compared with control, \*  $P < 0.01$ ; compared with untreated water, ▲  $P < 0.05$

**2.3 源水和氯化饮用水有机提取物诱导 gadd153 基因 mRNA 表达的影响** 经有机提取物处理细胞 24 h 后,在 1、10 ml/ml 培养基的剂量 gadd153 mRNA 表达无显著改变,在 100 ml/ml 培养基浓度的有机提取物均可明显诱导 gadd153 mRNA 表达增加( $P < 0.05$ )。结果见图 3、表 2。各剂量组诱导 gadd153 基因 mRNA 表达与 DNA 损伤(OTM)之间呈正相关(源水和氯化饮用水分别

表 2 源水和氯化饮用水有机提取物诱导 gadd153 基因 mRNA 的表达  
Table 2 The expression of gadd153 mRNA induced by the organic extraction from untreated water and chlorinated drinking water ( $\bar{x} \pm s$ )

Dose	Untreated water	Chlorinated drinking water
Control	0.73 $\pm$ 0.01	0.73 $\pm$ 0.01
1 ml/ml	0.72 $\pm$ 0.02	0.71 $\pm$ 0.01
10 ml/ml	0.74 $\pm$ 0.02	0.72 $\pm$ 0.01
100 ml/ml	0.89 $\pm$ 0.01*	0.93 $\pm$ 0.02*

Compared with the control, \*  $P < 0.01$ ;



为  $r = 0.864, P < 0.05; r = 0.897, P < 0.05$ 。

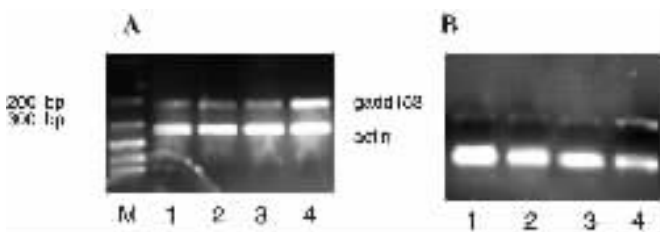


图 3 源水和氯化饮用水有机提取物诱导 *gadd153* mRNA 表达的 PCR 电泳图

Figure 3 The gel electrophoresis of the *gadd153* mRNA expression induced by the organic extraction from untreated water and chlorinated drinking water. A: organic extraction from untreated water; B: organic extraction from chlorinated drinking water M: DNA Maker: 1 ~ 4: control. 1. 10. 100 ml/ml medium, respectively

### 3 讨论

氯化消毒作为经济有效的消毒方法被国内外广泛采用,但加氯消毒不仅可使水样诱变活性增高,且产生多种类型的致癌致突变性的有机物<sup>[4]</sup>,已有研究表明暴露于氯化饮水的人群,其淋巴瘤、胰腺瘤的发病率明显增高<sup>[5]</sup>。

DNA 单链断裂是致细胞基因突变、肿瘤的一个前期行为,在外来化合物致细胞恶性转化中具有重要作用。碱性彗星试验可直接检测单个细胞内的 DNA 单链断裂<sup>[3]</sup>,本研究发现源水和氯化饮用水中有机提取物在 10 ml/ml 培养基的浓度即诱导 HepG2 细胞 DNA 单链断裂, DNA 断裂程度与源水和氯化饮水有机提取物染毒浓度之间呈现剂量依赖性。氯化饮用水中有机提取物的 DNA 链断裂的诱导作用比源水更明显 ( $P < 0.05$ ),提示以汉江为水源水经氯化消毒处理后 DNA 损伤能力增加,对当地供水区的人群健康形成一个潜在的危害。

*gadd* 是 80 年代末提出的、与细胞生长抑制和凋亡有关的基因家族, *gadd153* 是其家族的一个成员。*gadd153* 是 DNA 损伤诱导蛋白,化学物质和 UV 诱导后,可诱导 *gadd153* 表达增高<sup>[6]</sup>。本研究将 *gadd153* 启动子全长 804 bp 插入 pGL3 basic 荧光素酶表达质粒的荧光素酶基因上游。由于外源性启动子序列的活性将诱导荧光素酶表达,因此荧光素酶的表达量可以反映该启动子序列的活性程度。结果显示 *gadd153* 启动子可以被源水与氯化饮用水有机提取物激活进而诱导下游基因的表达,在低剂量 1 ml/ml 培养基时荧光素酶活性即显著增加,并显示良好的剂量反应关系。

DNA 损伤是诱导 *gadd* 基因表达的重要信号,相关分析表明, *gadd153* 启动子区的诱导与 DNA 损伤程度呈正相关。有研究表明,在某些低剂量的 DNA 损伤剂的作用下, DNA 未受到损伤时,同时启动子区亦未被激活,

但可通过其他的途径如 p53 通路诱导 *gadd* 家族中 *gadd45* 基因的表达<sup>[7]</sup>,本研究却发现,在低剂量时 (1 ml/ml), DNA 损伤未显著增加但在相同的剂量下荧光素酶活性却显著增加,提示除了 DNA 损伤外,还可能其他的因素诱导 *gadd153* 的启动子的激活。

RT-PCR 结果发现,低剂量的源水和氯化消毒水 (1, 10 ml/ml 培养基)并未诱导 *gadd153* 基因 mRNA 的表达,仅在 100 ml/ml 培养基剂量时诱导 *gadd153* 基因 mRNA 的高表达,而 *gadd153* 启动子在低剂量 (1 ml/ml 培养基) 时即被激活,提示 *gadd153* 启动子激活后可能会受到其他的调控网络的影响,如同时伴随转录调节因子和抑制性基因结合位点的激活,但这些重要的结合位点所在的具体区域及其具体的作用尚需进一步研究。

本研究结果提示源水和氯化饮水有机提取物诱导细胞 DNA 损伤,且以氯化饮水有机提取物诱导的 DNA 损伤更严重,进而导致 *gadd153* 启动子区的激活,诱导下游基因 mRNA 的表达。但在低剂量时,细胞 *gadd153* 启动子的激活除 DNA 的损伤外还可能其他的诱导机制;水中有机提取物对 *gadd153* 启动子的激活可能同时激活某些抑制性基因的结合位点使下游基因的表达受到抑制。

### 参考文献:

- [1] Cheh AM, Skochdopole J, Koski P, *et al.* Nonvolatile mutagens in drinking water: production by chlorination and destruction by sulfite[J]. *Science*, 1980, 207(4426): 90 - 92
- [2] 刘爱林, 吴建军, 鲁文清. 彗星试验检测武汉市氯化饮水有机提取物对 HepG2 DNA 的损伤[J]. *华中科技大学学报(医学版)*, 2003, 32(2): 137 - 140
- [3] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, *et al.* A simple technique for quantitation of low level of DNA damage in individual cells [J]. *Exp. Cells Res*, 1988(175): 184 - 191.
- [4] 徐凤丹, 范美云, 宋瑞霞, 等. 我国典型地区饮水中致突变性表征[J]. *环境科学*, 1994, 15(1): 1 - 6
- [5] Koivusalo M, Vartiainen T, Hakulinen T, *et al.* Drinking water mutagenicity and leukemia, lymphomas, and cancers of the liver, pancreas, and soft tissue[J]. *Arch Environ Health*, 1995, 50(4): 269 - 275.
- [6] Luethy JD, flobrook NJ. Activation of the *gadd 153* Promoter by genotoxic agents: a rapid and specific response to DNA damage. *Cancer Res*, 1992; 52(1): 5 - 10
- [7] Papanthasiou MA, Kerr NC, Robbins J H, *et al.* Induction by ionizing radiation of the *gadd45* gene in cultured human cells: lack of mediation by protein kinase C[J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(2): 1009 - 1016