多环芳烃与胞外DNA非共价结合及机制

秦超, 杨兵, 程浩, 胡小婕, 高彦征*

南京农业大学土壤有机污染控制与修复研究所, 南京 210095

* 联系人, E-mail: gaoyanzheng@njau.edu.cn

2021-09-06 收稿, 2021-10-09 修回, 2021-10-18 接受, 2021-10-28 网络版发表

国家杰出青年科学基金(41925029)和国家自然科学基金(42107221)资助

摘要 多环芳烃(PAHs)作为持久性有机污染物, 因具有“三致”效应, 其环境污染与人体健康问题一直是环境领域的研究热点. PAHs与生命遗传物质DNA结合形成PAHs-DNA加合物进而阻碍细胞正常复制是其诱发癌症的主要机理. 然而, 该过程尚未引起足够重视. 本文采用荧光猝灭法, 分别研究了低、中、高环PAHs与水中胞外DNA之间的结合强度及机制. 结果表明, 静态猝灭与动态猝灭过程共存, 且PAHs可与DNA结合形成稳定的PAHs-DNA复合物, 二者之间的结合常数 K_A 分别为 2.05×10^{10} L/mol(萘烯)、 4.42×10^7 L/mol(萘)、 1.71×10^4 L/mol(荧蒹)、 1.20×10^4 L/mol(芘)、 1.80×10^2 L/mol(苯并[a]蒹)、 4.96×10^4 L/mol(屈)、 1.11×10^2 L/mol(苯并[k]荧蒹)和 4.86×10^2 L/mol(苯并[a]芘). 红外光谱结果证实胸腺嘧啶为PAHs与DNA结合的主要作用位点. 分子对接和量子化学计算明确了PAHs可通过范德华力、 π - π 堆积与DNA结合并插入其双螺旋结构的小沟中. 紫外可见光谱分析结果表明, PAHs与DNA结合可导致DNA分子的紫外吸收光谱产生增色效应, 造成DNA分子局部损伤、扭曲或降解. 相关性分析结果发现, PAHs理化性质(分子量、熔点、沸点、水溶性、 $\log K_{ow}$ 、 $\log K_{oc}$ 、 $\log K_{oa}$)与猝灭常数显著相关, 但与结合常数无相关关系, 表明PAHs本身理化性质差异可影响PAHs与DNA结合的动态猝灭过程, 但未影响二者间静态猝灭过程. 本研究对认识水环境中PAHs污染的分子生态效应具有重要的科学意义.

关键词 荧光猝灭法, 多环芳烃, DNA, 分子对接, 量子化学计算

多环芳烃(PAHs)指分子结构中包含两个或两个以上以稠环形式相连苯环的化合物. 因其具有较高毒性和持久性, PAHs作为持久性有机污染物引起了环境科学工作者的广泛关注^[1,2]. PAHs进入环境后较难被水解、光解以及微生物降解, 因此在各种环境介质中均具有较高的持久性和检出率. 特别是, 环境中PAHs通过工业废水灌溉、大气干湿沉降、施用城市污泥肥等途径进入土壤, 其含量可达mg/kg. 土壤中的PAHs易被农作物吸收累积, 进而通过食物链传递暴露于人体. 环境中PAHs的长期暴露对人体具有“三致”(致畸、致癌、致突变)效应^[3]. PAHs暴露途径包括: 摄取、吸入

和皮肤接触^[4]. PAHs一旦进入人体, 将进入淋巴系统, 随血液流动在体内循环, 最终进入肝脏和肾脏进行代谢. PAHs诱发癌症的机理主要是通过生命遗传物质DNA结合形成PAHs-DNA加合物^[5,6], 影响细胞正常复制进而诱发癌症. 由于PAHs与DNA结合是二者形成加合物的前提, 此重要过程往往被忽视. 研究该过程对从分子水平阐明PAHs致癌机理具有重要意义.

DNA是带有遗传信息的生物大分子, 在绝大多数生物蛋白质合成与复制中起着主要的存储和传递遗传信息的作用. 通常, 有机污染物可影响DNA的正常结构和功能. 以往研究发现, PAHs可引起DNA损伤增加和

引用格式: 秦超, 杨兵, 程浩, 等. 多环芳烃与胞外DNA非共价结合及机制. 科学通报, 2022, 67: 74–84

Qin C, Yang B, Cheng H, et al. Non-covalent binding interaction and mechanism between polycyclic aromatic hydrocarbons and extracellular DNA (in Chinese). Chin Sci Bull, 2022, 67: 74–84, doi: [10.1360/TB-2021-0927](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0927)

细胞周期异常^[7]。另有研究证实,妥布霉素、卡那霉素、新霉素等抗生素可诱导小牛胸腺DNA缩合,从而降低DNA的生物活性^[8]。此外,毒死蜱和甲基毒死蜱可促进水中DNA降解^[9]。大量前期研究还发现,PAHs可导致DNA分子结构扭曲^[10]、引起DNA甲基化^[11]、改变基因表达^[12]等。我们认为有机污染物与DNA之间的结合作用是其引起DNA结构和功能改变的前提。因此,以往研究大都关注了特定种类的有机污染物(如农药、抗生素等)与DNA之间的结合作用,包括结合方式、结合强度、作用机理以及影响因素。与农药、抗生素等亲水性有机污染物相比,具有多个平面芳环结构的疏水性有机污染物PAHs与DNA体外结合作用的研究较少。PAHs与DNA之间的结合方式是通过共价结合^[13,14],还是插入结合或沟槽结合等非共价结合的作用机理仍不统一^[15]。此外,多数研究只关注了少数或单一具有致癌性的多环芳烃(例如苯并[a]芘^[16]),研究结论的普遍性难以获得认可。对于不同PAHs,由于理化性质差异,其能否与DNA结合,结合的强度、作用机理以及影响因素等信息仍未明确^[17],相关研究亟待开展。

PAHs-DNA结合过程是二者形成加合物的前提,此重要过程尚未引起足够重视。基于此,本研究采用荧光猝灭法探究8种典型PAHs与水中胞外DNA的结合强度,结合光谱技术(红外光谱、紫外光谱)与理论计算(分子对接、量子化学计算)等方法探究PAHs-DNA结合位点及作用机理。在此基础上,通过皮尔森(Pearson)相关性分析,探讨PAHs理化性质对PAHs与DNA结合的影响,剖析影响PAHs与DNA结合的主控因素,试图从分子水平深入挖掘和理解PAHs的致癌机理。研究结果有助于增进人们对PAHs污染分子生态效应方面的认识和理解。

1 实验

(i) 化学试剂. 鲑鱼精DNA(1.3×10^6 Da; 41.2%G-C含量)购自Sigma-Aldrich公司(美国)。将0.1 g DNA溶解并定容于100 mL Tris-HCl(10 mmol/L, pH 7.0)溶液,制备1 g/L DNA储备液。萘烯、萘、荧蒹、芘、苯并[a]蒹、屈、苯并[k]荧蒹、苯并[a]芘(图1)购自AccuStandard公司(美国)。取每种PAH 0.02 g,用乙醇(AR)将其溶解并定容至100 mL容量瓶,制备200 mg/L PAHs储备液,并保存于4℃冰箱中。PAHs的分子量、熔点、沸点、溶解度、亨利常数、辛醇/水分配系数($\log K_{ow}$)、有机化合物的吸着系数($\log K_{oc}$)、辛醇/空气分配系数($\log K_{oa}$)等理化性质采用US EPI Suite 4.1分析(表S1)。采用统计学常用软件SPSS 25.0进行皮尔森相关性分析。

(ii) 荧光猝灭试验. 首先,将不同PAHs溶液置于光路长度为1 cm石英比色皿中,采用三维荧光分光光度计(F96PRO, 棱光, 中国)测量每种PAH最大荧光值(100~1000)所对应的污染物浓度(50~200 $\mu\text{g/L}$)。以该浓度作为PAHs初始浓度进行荧光猝灭试验。将1 g/L的DNA储备液用浓度为10 mmol/L的Tris-HCl溶液稀释至100 mg/L。再将200 mg/L的PAHs储备液用18.25 M Ω cm超纯水稀释至50~200 $\mu\text{g/L}$ 。然后,用50 μL 微量进样器将100 mg/L的DNA溶液以0、2.5、5、7.5、10、15和20 μL 的滴定体积,逐滴滴加至20 mL各PAH溶液中。另取同样体积的10 mmol/L Tris-HCl逐滴滴加至各PAH溶液作为背景,用以扣除其对PAHs荧光值的影响。每次滴加后,将溶液在160 r/min、pH 7.0、25℃条件下磁力搅拌20 min。最后用5 mL移液枪准确移取2 mL混合样品到4 mL的石英比色皿中,测量每个样品在特定波长下的最大荧光值。表S2列出了每种PAH最大荧光值所对应的激发波长和发射波长。所有样品的荧光值为两次

图1 供试PAHs的分子结构

Figure 1 Structures of PAHs used in the present study

测量的平均值. 基于荧光猝灭理论, PAHs与DNA结合的荧光猝灭过程一般包括动态猝灭和静态猝灭. 其中, 动态猝灭过程用来描述由荧光猝灭反应导致的PAHs与DNA结合. 对于动态猝灭过程, 荧光强度的峰值与相应的猝灭剂(此处为DNA)浓度之间的关系由Stern-Volmer方程描述:

$$\frac{F_0}{F} = 1 + K_q \tau_0 [Q] = 1 + K_{sv} [Q], \quad (1)$$

其中, F_0 和 F 分别为猝灭剂加入前后PAHs的荧光值, K_q 代表双分子猝灭速率常数, τ_0 是污染物分子荧光团的平均寿命, $[Q]$ 代表猝灭剂的摩尔浓度, K_{sv} 为动态猝灭方程拟合获得的猝灭常数.

对于静态猝灭过程, 可根据下式计算结合常数(K_A)和结合位点数(n):

$$\log\left[\frac{F_0 - F}{F}\right] = \log K_A + n \log [Q], \quad (2)$$

根据测量的荧光值, 计算 F_0/F 或 $\log[(F_0 - F)/F]$, 并分别对 $[Q]$ 或 $\log[Q]$ 作图, 通过线性拟合分别计算 K_q 、 K_{sv} 、 K_A 和 n 值.

(iii) 傅里叶变换衰减全反射红外光谱(ATR-FTIR)分析. 为了获得足够的DNA-PAHs复合物样品用于ATR-FTIR分析, 在与荧光猝灭实验相同的条件下制备PAHs与DNA结合前后的液体样品(即将1 mL 100 mg/L的DNA溶液与50~200 $\mu\text{g/L}$ PAHs溶液混合), 在160 r/min、pH 7.0、25°C条件下反应2 h. 然后, 将该液体样品在-65°C冷冻干燥器(Beta 1-8 LD plus, Christ, 奥斯特罗德, 德国)中冷冻干燥2 d. 将冷冻干燥后的DNA样品通过配有ATR附件的红外光谱仪(岛津, 京都, 日本)在600~4000 cm^{-1} 的光谱范围内以1 cm^{-1} 的分辨率进行扫描. 本研究中每个FTIR光谱均扣除了空气背景, 并使用IR Solution软件对ATR测量结果进行校正. 最后, 将光谱数据导出, 用Origin 2020b软件作图.

(iv) 分子对接. DNA原始结构(PDB ID: 2B0K)从国际标准蛋白质数据库(<http://www.wwpdb.org/>)下载. 每种PAH结构由ChemBioDraw Ultra 14.0参照其分子结构进行构建, 并采用ChemBio3D Ultra 14.0进行结构优化. 分子对接前, 从DNA原始结构中除去水分子, 并对DNA分子加氢, 以确保其分子结构的完整性. 然后将DNA分子定义为受体分子. 使用来自受体-腔的发现位点方法在受体中确定可能的结合位点, 基于结合位点定义球体, 并且通过配体分子最小化修饰活性半径. 采

用Discovery Studio 2.5(DS)进行分子对接计算. 对接过程运行结束后, 根据所得数据绘制PAHs与DNA相互作用的分子对接图表.

(v) 紫外可见光谱分析. 分别将100 mg/L DNA溶液与0、5、10、20、30、40 μL 200 mg/L PAHs混合, 使PAHs终浓度分别为0、50、100、200、300、400 $\mu\text{g/L}$, 总体积为20 mL. 在160 r/min、pH 7.0、25°C条件下恒温震荡2 h. 每次取3 mL样品于4 mL石英比色皿中, 采用Varian Cary 5000分光光度计(Cary 5000, 瓦里安, 帕洛阿尔托, 加拿大)在(25±0.1)°C下测定其在250~270 nm波长范围内的吸光度.

(vi) 量子化学计算及作用力分析. 为了减少计算量, 根据FTIR分析结果, 构建基本模型. 首先, 采用GaussView 5.0分别构建PAHs和胸腺嘧啶的几何结构, 并将每种PAH与胸腺嘧啶进行组合. 通过半经验方法PM7(MOPAC2012程序)优化所构建的几何模型. 使用Gaussian 09W软件进行基于密度泛函理论(density functional theory, DFT)的结构优化和频率分析, 并用 $\omega\text{B97XD/6-311G}^{**}$ 基组优化几何结构. 通过上述计算获得PAHs与胸腺嘧啶复合物的频率分析结果后, 使用Multiwfn程序^[18]分析每种复合物的电子密度分布. 采用独立梯度模型(independent gradient model, IGM)^[19]进行弱相互作用分析. 通过该模型可分析基于原子水平分子片段之间相互作用力的类型及强度, 目前已被广泛应用于研究分子间和分子内的弱相互作用. 其相互作用分析结果可通过VMD^[20]程序进行直观呈现. 通常, 模拟计算后获得的初始分子密度梯度 $g(\mathbf{r})$ 可通过各个原子密度梯度的叠加获得. 因此, 对于IGM密度梯度 $g^{\text{IGM}}(\mathbf{r})$ 可通过叠加计算每个原子密度梯度的绝对值获得. $g^{\text{IGM}}(\mathbf{r})$ 和 $g(\mathbf{r})$ 之间的区别是 δg 函数. δg 测量系统中所有原子之间的相互作用, 并在数学上定义如下:

$$g(\mathbf{r}) = \left| \sum_i \nabla \rho_i(\mathbf{r}) \right|, \quad (3)$$

$$g^{\text{IGM}}(\mathbf{r}) = \left| \sum_i \text{abs}[\nabla \rho_i(\mathbf{r})] \right|, \quad (4)$$

$$\delta g(\mathbf{r}) = g^{\text{IGM}}(\mathbf{r}) - g(\mathbf{r}), \quad (5)$$

式中, i 为原子序数, ρ 为密度向量, $\text{abs}(\nabla \rho)$ 表示内部 $\nabla \rho$ 向量每个分量的绝对值(或向量形式), $|\cdot|$ 表示向量的绝对值. δg 可分为分子片段内相互作用 δg^{intra} 和分子片段间相互作用 δg^{inter} . 通过绘制 δg^{intra} 和 δg^{inter} 的等值面图, 可清楚地呈现分子内与分子间相互作用区域. 针对每

个原子可根据其 δg 指数在VMD中进行着色,该分析结果可清晰地展示原子对片段之间相互作用的贡献。

(vii) 统计分析. 采用SPSS 25.0软件(IBM, Armonk, NY, 美国)对实验结果进行统计分析. 数据均采用平均值 $\pm$ 标准差表示. 采用单边学生 t 检验以分析统计数据的显著性. $P<0.05$ 被认为具有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 PAHs与DNA结合

采用荧光猝灭实验探究水中低环PAHs(萘烯和萘)、中环PAHs(荧蒹、芘、苯并[a]蒹和屈)、高环PAHs(苯并[k]荧蒹和苯并[a]芘)与DNA之间的结合作用,结果如图2所示. 随着猝灭剂(DNA)摩尔浓度的增加,PAHs的最大荧光值相应地减少,表明DNA可导致PAHs发生荧光猝灭,即PAHs可与DNA结合. 将荧光猝

灭过程中PAHs的荧光值变化与DNA浓度通过Stern-Volmer方程进行拟合,结果表明,二者之间具有线性相关关系(其决定系数 $R^2=0.7589\sim0.9803$). 由此可计算出PAHs与DNA结合的猝灭常数(K_{SV})和生物双分子猝灭速率常数(K_q). 由表1可知,8种PAHs与DNA结合的猝灭常数 K_{SV} 分别为 2.84×10^7 L/mol(萘烯)、 1.74×10^7 L/mol(萘)、 3.01×10^6 L/mol(荧蒹)、 2.43×10^6 L/mol(芘)、 2.34×10^6 L/mol(苯并[a]蒹)、 5.76×10^6 L/mol(屈)、 2.74×10^6 L/mol(苯并[k]荧蒹)和 3.99×10^6 L/mol(苯并[a]芘). 从猝灭常数的角度分析,PAHs与DNA之间的结合强弱顺序为: 萘烯>萘>>屈>苯并[a]芘>荧蒹>苯并[k]荧蒹>芘>苯并[a]蒹. 该结果表明,具有较多共轭结构的低环PAHs更易与DNA结合. 以往关于菲、芘、苯并[g,h,i]花与抗性质粒DNA结合的研究发现,分子量更小的菲、芘结合常数明显高于分子量更大的苯并[g,h,i]花,因此更易与抗性质粒DNA结合^[21]. 该研究结果与上述

图2 DNA与PAHs结合导致PAHs发生荧光猝灭. (a) 动态猝灭; (b) 静态猝灭. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

Figure 2 PAHs-DNA binding interaction led to the fluorescence of PAHs quenching. (a) Dynamic quenching; (b) static quenching. * $P<0.05$, ** $P<0.01$

表1 由Stern-Volmer方程和静态猝灭方程拟合的PAHs与DNA结合的相关参数

Table 1 The related parameters of PAHs binding with DNA calculated from the Stern-Volmer equation and the static quenching equation

多环芳烃	动态猝灭			静态猝灭		
	$K_{SV}(\text{L/mol})$	$K_q(\text{L}/(\text{mol s}))$	R^2	$K_A(\text{L/mol})$	n	R^2
萘烯	2.84×10^7	$(0.22\sim1.89)\times10^{15}$	0.9803	2.05×10^{10}	1.4158	0.9701
萘	1.74×10^7	$(0.14\sim1.16)\times10^{15}$	0.9593	4.42×10^7	1.0516	0.9648
荧蒹	3.01×10^6	$(0.24\sim2.01)\times10^{14}$	0.9604	1.71×10^4	0.6621	0.9975
芘	2.43×10^6	$(0.19\sim1.62)\times10^{14}$	0.9278	1.20×10^4	0.6501	0.9846
苯并[a]蒹	2.34×10^6	$(0.18\sim1.56)\times10^{14}$	0.7834	1.80×10^2	0.3756	0.9884
屈	5.76×10^6	$(0.45\sim3.84)\times10^{14}$	0.9428	4.96×10^4	0.6864	0.9899
苯并[k]荧蒹	2.74×10^6	$(0.21\sim1.83)\times10^{14}$	0.8209	1.11×10^2	0.3381	0.9496
苯并[a]芘	3.99×10^6	$(0.31\sim2.66)\times10^{14}$	0.7589	4.86×10^2	0.4035	0.9307

结论一致。

据报道,具有芳香核发色团的荧光寿命(τ_0)平均为 $(1.5\sim 12.8)\times 10^{-8}$ s^[22]。根据该值,由Stern-Volmer方程计算所得8种PAHs与DNA结合的猝灭速率常数(K_q 值)均在 $1.80\times 10^{13}\sim 1.89\times 10^{15}$ L/(mol s)之间(表1),比生物聚合物扩散控制猝灭过程的最大 K_q 值(2.0×10^{10} L/(mol s))^[23]高3~5个数量级,表明PAHs与DNA之间的荧光猝灭过程中同时还存在静态荧光猝灭过程,进而形成PAHs-DNA复合物。

通过 $\log[(F_0-F)/F]$ 对 $\log[Q]$ 作图,并根据静态猝灭方程进行数据拟合,相关拟合参数列入表1。由表1可知,PAHs与DNA之间静态猝灭过程的结合常数分别为 2.05×10^{10} L/mol(萘烯)、 4.42×10^7 L/mol(萘)、 1.71×10^4 L/mol(荧蒹)、 1.20×10^4 L/mol(芘)、 1.80×10^2 L/mol(苯并[a]蒹)、 4.96×10^4 L/mol(屈)、 1.11×10^2 L/mol(苯并[k]荧蒹)和 4.86×10^2 L/mol(苯并[a]芘)。该结果表明,不同PAHs与DNA结合的强弱顺序为:萘烯>萘>屈>荧蒹>芘>苯并[a]芘>苯并[a]蒹>苯并[k]荧蒹。该结合强弱顺序与动态猝灭过程中的猝灭常数变化规律不同。由此可知,动态猝灭过程和静态猝灭过程是两个相对独立的过程。此外,萘烯、萘、荧蒹、芘、屈与DNA之间的结合位点数分别为1.4158、1.0516、0.6621、0.6501、0.6864。其结合位点数均接近于1,表明上述几种PAHs与DNA之间仅存在单个结合位点。而高环PAHs(苯并[a]蒹、苯并[k]荧蒹和苯并[a]芘)与DNA结合位点数均小于0.5,表明其与DNA结合弱于中低环PAHs。由此可见,PAHs环数越低,越易与DNA结合。DNA通过动态地打开其碱基对之间的空间以容纳进入的物质^[24]。一方面,低环PAHs分子相比于高环PAHs可能更适合DNA碱基对之间的空间。另一方面,可能是由于低环PAHs比高环PAHs具有更小的空间位阻。

2.2 PAHs-DNA结合位点

分子间的相互吸引受其外部电子控制从而影响官能团振动的位置和强度。而DNA分子中特定官能团的振动和电子之间的相互作用可通过ATR-FTIR表征。以纯DNA为参照,分析PAHs与DNA结合后DNA特征官能团的振动位置和强度变化,用于评估PAHs与DNA的结合位点,结果如图3所示。未添加任何污染物的纯DNA(图3中的黑色CK曲线)在1690、1653、1604和1486 cm^{-1} 处的特征峰分别代表鸟嘌呤(G)、胸腺嘧啶

(T)、腺嘌呤(A)、胞嘧啶(C)等DNA含氮碱基的C=O、C=C和C=N的不对称伸缩振动^[25,26]。1419和1371 cm^{-1} 处的红外光谱特征峰分别代表DNA分子结构中的 PO_2^- 和鸟嘌呤的不对称伸缩振动^[27]。DNA在1218 cm^{-1} 处特征峰的出现证实本研究选用的鲑鱼精DNA为B-DNA。600~900 cm^{-1} 的指纹区与DNA分子中其他官能团的伸缩振动有关,例如磷酸酯和苯基等。与低环PAHs(萘烯和萘)、中环PAHs(荧蒹、芘、苯并[a]蒹和屈)、高环PAHs(苯并[k]荧蒹和苯并[a]芘)结合后,DNA在1653 cm^{-1} (胸腺嘧啶)处的红外振动峰均向低波数方向偏移了6~1647 cm^{-1} 。该结果表明,DNA碱基中的胸腺嘧啶是PAHs与DNA结合的主要作用位点。以往关于芘与DNA结合的研究同样证实了DNA碱基中的胸腺嘧啶为主要结合位点^[10]。此外,以往关于大黄素与DNA结合的研究中也观察到了相同的峰位变化^[28],表明大黄素与DNA结合的作用位点同样为DNA分子结构中的胸腺嘧啶。

分子对接是目前计算化学中一种重要的研究方法,也可用于PAHs与DNA结合位点的研究。PAHs与DNA对接后的最优位置如图4所示。PAHs与DNA对接后的最优位置均在DNA分子双螺旋结构的沟槽中。该结果表明,PAHs与DNA发生沟槽结合,使带有苯环结构的PAHs非特异性插入DNA的小沟中。此外,表S3列出了分子对接的相关参数(包括绝对能量、评分和

图3 DNA和PAHs-DNA复合物的红外光谱图
Figure 3 FTIR spectra of DNA and PAHs-DNA complexes

图4 PAHs与DNA结合的分子对接结果

Figure 4 Molecular docking results of PAHs-DNA binding interaction

最优坐标参数). 由表S3可知, 低环PAHs(芴烯和芴)、中环PAHs(荧蒽、芘、苯并[a]蒽和屈)、高环PAHs(苯并[k]荧蒽和苯并[a]芘)PAHs与受体B-DNA进行分子对接, 其最优位置的评分分别为71.04、71.11、87.20、84.29、109.11、105.13、117.71、109.06. 早期研究认为, PAHs与DNA碱基通过共价结合形成加合物^[29]. 近年来, PAHs与DNA之间通过非共价键结合已成为普遍认知. 一方面, 由于PAHs具有共轭芳环结构, 可通过 π - π 相互作用插入DNA碱基对之间^[30]. 另一方面, 特定条件下PAHs也可通过沟槽结合的方式与DNA形成加合物^[15]. 例如, 苯并[a]芘主要通过沟槽结合与小牛胸腺DNA相互作用, 并诱导DNA损伤^[16]. 虽然上述PAHs与DNA通过沟槽结合是基于理论计算的结论, 但已有诸多研究采用多种光谱学实验的方法, 证实了PAHs与DNA之间的非共价结合机制^[31,32]. 因此, 该结论具有普遍意义.

2.3 PAHs与DNA结合驱动力

使用Multiwfn分析量子化学计算结果时, 还可基于DFT通过独立梯度模型^[33]分析 δg 指数. 通过计算某两个分子间的 δg^{inter} 指数和 δg^{intra} 指数, 再用VMD对 $\delta g^{\text{inter/intra}}$ 指数进行着色, 即可从结果中直观分析分子间相互作用力的种类及贡献, 其分析结果见图5. 如图5(a), (c), (e), (g), (i), (k), (m), (o)所示, 8种PAHs与DNA碱基中的胸腺嘧啶相互作用的量子化学计算结果中, 分子之间的绿色梯度等值面为范德华力. 研究表明, 8种PAHs均可通过范德华力与胸腺嘧啶结合. 同时, 采用Multiwfn结合VMD绘制 $\delta g^{\text{intra}}/\delta g^{\text{inter}}$ vs. $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ 的散点图, 用以清晰呈现不同PAHs与胸腺嘧啶两分子间的弱相互作用. 如图5(b), (d), (f), (h), (j), (l), (n), (p)所示, 在 $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ 符号显著大于0的区域出现了大量清晰的点, 表明系统中存在微弱的位阻效应(排斥力). 在 $\text{sign}(\lambda_2)\rho$

图5 PAHs与胸腺嘧啶之间的梯度等值面和 $\delta g^{\text{inter/intra}}$ vs. $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ 散点图。(a, b) 芴烯; (c, d) 芴; (e, f) 荧蒽; (g, h) 芘; (i, j) 苯并[a]蒽; (k, l) 屈; (m, n) 苯并[k]荧蒽; (o, p) 苯并[a]芘

Figure 5 Gradient isosurface and $\delta g^{\text{inter/intra}}$ vs. $\text{sign}(\lambda_2)\rho$ scatter plots between PAHs and thymine. (a, b) Acenaphthylene; (c, d) acenaphthene; (e, f) fluoranthene; (g, h) pyrene; (i, j) benzo[a]anthracene; (k, l) chrysene; (m, n) benzo[k]fluoranthene; (o, p) benzo[a]pyrene

符号为负的区域中,也存在较大面积的点。由于这些位置具有高电子密度,因此在这些位置常表示范德华相互作用。通常,通过弱相互作用力(例如范德华力、氢键等)结合的复合物,二者分子间会出现一定的空间位阻效应但不会太强,否则其过强的排斥力将不足以被弱相互作用抵消,会导致分子无法结合。因此,单靠范德华作用(色散力、诱导力、取向力)结合的复合物由于其强度较弱,结合过程中本不应出现空间位阻区域,但图5中红色箭头所指的空间位阻区域的产生,表明PAHs与DNA之间具有很强的相互作用力(如 π - π 堆积),才可能出现微弱的空间位阻区域。以往研究发现,其他PAHs与DNA之间的相互作用是由 π - π 堆积等较强的弱

相互作用力引起的^[34,35]。因此,我们推测,范德华力、 π - π 堆积共同为PAHs与DNA结合的驱动力。

2.4 PAHs-DNA结合导致DNA分子结构变化

采用紫外可见光谱法分析了PAHs插入DNA后对DNA分子结构产生的影响,结果如图6所示。据报道,DNA在260 nm处吸光度的增加(即增色效应)是由DNA双螺旋的损伤、扭曲或降解导致的DNA碱基更多暴露于溶液中造成的;而260 nm处吸光度的减少(即减色效应)则是由DNA螺旋轴收缩导致的DNA结构变化引起的^[10]。由图6可见,随着8种PAHs浓度由0 $\mu\text{g/L}$ 增加至400 $\mu\text{g/L}$,DNA在260 nm处特征峰的吸光度逐渐增大,

图 6 PAHs对DNA紫外可见光谱的影响
Figure 6 The influence of PAHs on the UV-vis absorption spectra of DNA

也就是PAHs可引起DNA紫外可见吸收光谱发生增色效应，即PAHs促进了DNA碱基的暴露。该结果表明，PAHs与DNA结合作用可导致DNA双螺旋结构的局部损伤、扭曲或降解。结合前期研究^[10]，我们推断PAHs与DNA结合引起DNA分子结构改变可能是其影响DNA结构与功能的关键过程。

2.5 PAHs-DNA结合的主控因素

PAHs分子结构的不同导致其理化性质差异显著(如分子量、熔点、沸点、溶解度、亨利常数、辛醇/水分配系数、有机化合物的吸着系数、辛醇/空气分配系数,表S1)。为了明确PAHs和DNA的结合强度与PAHs物理化学性质之间的关系，我们采用SPSS软件中的Pearson相关性分析了表S1中8种与溶解度、热稳定性、疏水性、热力学性质相关的物理化学性质，与荧光猝灭过程的猝灭常数(K_{SV})和结合常数(K_A)之间的相关性，

结果见表2。由表2可知， K_{SV} 与分子量、水溶性在0.05和0.01水平的相关系数分别为-0.819、0.948，表明 K_{SV} 与分子量呈负相关关系，与水溶性呈正相关关系。此外， K_{SV} 与熔点、沸点的相关系数分别为-0.846、-0.852，并在0.01水平显著，表明 K_{SV} 与熔点、沸点具有显著负相关关系。显然， K_{SV} 与 $\log K_{ow}$ 、 $\log K_{oc}$ 、 $\log K_{oa}$ 的相关系数分别为-0.808、-0.822、-0.833，且呈现0.05水平的显著性，因而说明 K_{SV} 与 $\log K_{ow}$ 、 $\log K_{oc}$ 、 $\log K_{oa}$ 呈显著负相关关系。 K_{SV} 与亨利常数的相关系数为-0.547，接近于0，并且 P 值为0.16>0.05，由此可知， K_{SV} 与亨利常数之间无相关关系。然而，结合常数 K_A 与PAHs物理化学性质之间均无显著相关性(相关系数<0.10且 $P>0.05$)。上述研究表明，PAHs理化性质差异与PAHs-DNA结合的动态猝灭过程密切相关，与静态猝灭过程无关，即PAHs理化性质差异可直接影响PAHs与DNA结合的动态猝灭过程，但不影响二者之间结合物的稳定性。

表 2 PAHs-DNA结合的 K_{SV} 和 K_A 值与8种理化性质之间的相关性分析结果^{a)}Table 2 Correlation analysis results for K_{SV} and K_A values of PAHs-DNA binding interactions among 8 physicochemical properties

理化性质	与 K_{SV} 的相关系数	与 K_{SV} 的P值	与 K_A 的相关系数	与 K_A 的P值
分子量(g/mol)	-0.819*	0.013	0.023	0.958
熔点(°C)	-0.846**	0.008	-0.041	0.924
沸点(°C)	-0.852**	0.007	-0.038	0.928
水溶性(mg/L)	0.948**	0.000	-0.083	0.844
$\log K_{ow}$	-0.808*	0.015	0.053	0.900
$\log K_{oc}$	-0.822*	0.010	0.021	0.961
$\log K_{oa}$	-0.833*	0.010	-0.002	0.966
亨利常数(atm m ³ /mol)	-0.547	0.161	0.123	0.771

a) * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

3 结论

本文研究了低、中、高环PAHs与水中胞外DNA之间的结合强度及机制。结果表明, PAHs分子可与DNA发生结合作用, 并形成稳定的PAHs-DNA复合物, 其结合常数 K_A 为 2.05×10^{10} L/mol(萘烯)、 4.42×10^7 L/mol(萘)、 1.71×10^4 L/mol(荧蒹)、 1.20×10^4 L/mol(苈)、 1.80×10^2 L/mol(苯并[a]蒹)、 4.96×10^4 L/mol(屈)、 1.11×10^2 L/mol(苯并[k]荧蒹)、 4.86×10^2 L/mol(苯并[a]苈)。PAHs可通过范德华作用、

π - π 堆积与DNA碱基中的胸腺嘧啶结合, 进而非特异性地插入DNA分子双螺旋结构的小沟中。PAHs与DNA结合可进一步引起DNA分子在260 nm处的吸收光谱产生增色效应, 导致DNA结构局部损伤、扭曲或降解。PAHs理化性质不同可影响其与DNA动态猝灭过程。研究结果增进了人们对水中PAHs与生命遗传物质DNA作用关系的认识和理解, 为今后进一步探究人体细胞实际环境体系下PAHs及衍生物的分子毒理提供理论依据。

参考文献

- 1 Sun K, Song Y, He F, et al. A review of human and animals exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Health risk and adverse effects, photo-induced toxicity and regulating effect of microplastics. *Sci Total Environ*, 2021, 773: 145403
- 2 Shen D, Yuan X, Han Y, et al. Evaluation of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in bamboo shoots from soil. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2021, 106: 589–593
- 3 Wang M, Jia S, Lee S H, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in indoor environments are still imposing carcinogenic risk. *J Hazard Mater*, 2021, 409: 124531
- 4 Sopian N A, Jalaludin J, Bakar S A, et al. Exposure to particulate PAHs on potential genotoxicity and cancer risk among school children living near the petrochemical industry. *Int J Environ Res Public Health*, 2021, 18: 2575
- 5 Perera F P, Tang D, Rauh V, et al. Relationship between polycyclic aromatic hydrocarbon-DNA adducts, environmental tobacco smoke, and child development in the world trade center cohort. *Environ Health Perspect*, 2007, 115: 1497–1502
- 6 Zhang Z, Xing X, Jiang S, et al. Global H3K79 di-methylation mediates DNA damage response to PAH exposure in Chinese coke oven workers. *Environ Pollut*, 2021, 268: 115956
- 7 Fu Y, Niu Y, Pan B, et al. OGG1 methylation mediated the effects of cell cycle and oxidative DNA damage related to PAHs exposure in Chinese coke oven workers. *Chemosphere*, 2019, 224: 48–57
- 8 Kopaczynska M, Schulz A, Fraczowska K, et al. Selective condensation of DNA by aminoglycoside antibiotics. *Eur Biophys J*, 2016, 45: 287–299
- 9 Yang B, Qin C, Hu X, et al. Enzymatic degradation of extracellular DNA exposed to chlorpyrifos and chlorpyrifos-methyl in an aqueous system. *Environ Int*, 2019, 132: 105087
- 10 Qin C, Hu X, Waigi M G, et al. Amino and hydroxy substitution influences pyrene-DNA binding. *Sci Total Environ*, 2020, 725: 138542
- 11 Liu K, Jiang J, Lin Y, et al. Exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons, DNA methylation and heart rate variability among non-current smokers. *Environ Pollut*, 2021, 288: 117777
- 12 Sørhus E, Donald C E, da Silva D, et al. Untangling mechanisms of crude oil toxicity: Linking gene expression, morphology and PAHs at two

- developmental stages in a cold-water fish. *Sci Total Environ*, 2021, 757: 143896
- 13 Macii F, Salvadori G, Bonini R, et al. Binding of model polycyclic aromatic hydrocarbons and carbamate-pesticides to DNA, BSA, micelles and liposomes. *Spectrosc Acta Pt A-Molec Biomolec Spectr*, 2019, 223: 117313
- 14 Rodrigues F P, dos Reis Martinez C B, Malafaia G, et al. Are the damaging effects of oil refinery effluents on *Corbicula fluminea* (mollusca) reversible after its transfer to clean water? *Ecol Indic*, 2019, 101: 1045–1054
- 15 Rescifina A, Zagni C, Mineo P G, et al. DNA recognition with polycyclic-aromatic-hydrocarbon-presenting calixarene conjugates. *Eur J Org Chem*, 2014, 2014: 7605–7613
- 16 Hu M, Zhu M, Xin L, et al. Change of benzo(a)pyrene during frying and its groove binding to calf thymus DNA. *Food Chem*, 2021, 350: 129276
- 17 Gao P, da Silva E, Hou L, et al. Human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons: Metabolomics perspective. *Environ Int*, 2018, 119: 466–477
- 18 Lu T, Chen F W. Multiwfn: A multifunctional wavefunction analyzer. *J Comput Chem*, 2012, 33: 580–592
- 19 Lefebvre C, Khartabil H, Boisson J C, et al. The independent gradient model: A new approach for probing strong and weak interactions in molecules from wave function calculations. *ChemPhysChem*, 2018, 19: 724–735
- 20 Biarnés X, Pietrucci F, Marinelli F, et al. METAGUI. A VMD interface for analyzing metadynamics and molecular dynamics simulations. *Comput Phys Commun*, 2012, 183: 203–211
- 21 Kang F, Hu X, Liu J, et al. Noncovalent binding of polycyclic aromatic hydrocarbons with genetic bases reducing the *in vitro* lateral transfer of antibiotic resistant genes. *Environ Sci Technol*, 2015, 49: 10340–10348
- 22 Gauthier T D, Shane E C, Guerin W F, et al. Fluorescence quenching method for determining equilibrium constants for polycyclic aromatic hydrocarbons binding to dissolved humic materials. *Environ Sci Technol*, 1986, 20: 1162–1166
- 23 Lakowicz J R. Principles of Fluorescence Spectroscopy. 3rd ed. New York: Plenum Press, 1983. 496
- 24 Lerman L S. Structural considerations in the interaction of DNA and acridines. *J Mol Biol*, 1961, 3: 14–18
- 25 Jangir D K, Tyagi G, Mehrotra R, et al. Carboplatin interaction with calf-thymus DNA: A FTIR spectroscopic approach. *J Mol Struct*, 2010, 969: 126–129
- 26 Qin C, Zhang W, Yang B, et al. DNA facilitates the sorption of polycyclic aromatic hydrocarbons on montmorillonites. *Environ Sci Technol*, 2018, 52: 2694–2703
- 27 Qin C, Kang F, Zhang W, et al. Environmentally-relevant concentrations of Al(III) and Fe(III) cations induce aggregation of free DNA by complexation with phosphate group. *Water Res*, 2017, 123: 58–66
- 28 Saito S T, Silva G, Pungartnik C, et al. Study of DNA-emodin interaction by FTIR and UV-vis spectroscopy. *J Photochem Photobiol B-Biol*, 2012, 111: 59–63
- 29 Shaw G, Connell D, Baron W. The use of *in vitro* DNA adduct formation to estimate the genotoxicity of residues at contaminated sites. *Chemosphere*, 1995, 30: 1957–1968
- 30 Hu X, Kang F, Gao Y, et al. Bacterial diversity losses: A potential extracellular driving mechanism involving the molecular ecological function of hydrophobic polycyclic aromatic hydrocarbons. *Biotechnol Rep*, 2015, 5: 27–30
- 31 Yu H, Li J, Huang G, et al. Binding characteristics of dibenzo[a,h]anthracene with DNA *in vitro*: Investigated by spectroscopic and magnetic bead methods. *Polycycl Aromat Compd*, 2020, doi: 10.1080/10406638.2020.1855218
- 32 Ma Y, Cai C, Yang H, et al. The amplified resonance light scattering signal detection of DNA hybridization using polycyclic aromatic hydrocarbons as a probe. *Spectr Lett*, 2014, 47: 184–191
- 33 Lefebvre C, Rubes G, Khartabil H, et al. Accurately extracting the signature of intermolecular interactions present in the NCI plot of the reduced density gradient versus electron density. *Phys Chem Chem Phys*, 2017, 19: 17928–17936
- 34 Trujillo C, Sánchez-Sanz G. A study of π - π stacking interactions and aromaticity in polycyclic aromatic hydrocarbon/nucleobase complexes. *ChemPhysChem*, 2016, 17: 395–405
- 35 Tiefenbacher K, Rebek Jr J. Selective stabilization of self-assembled hydrogen-bonded molecular capsules through π - π interactions. *J Am Chem Soc*, 2012, 134: 2914–2917

补充材料

表S1 8种多环芳烃的理化性质

表S2 荧光猝灭实验中PAHs最大荧光值所对应的激发波长和发射波长

表S3 PAHs与DNA结合的分子对接参数

本文以上补充材料见网络版csb.scichina.com. 补充材料为作者提供的原始数据, 作者对其学术质量和内容负责.

Summary for “多环芳烃与胞外DNA非共价结合及机制”

Non-covalent binding interaction and mechanism between polycyclic aromatic hydrocarbons and extracellular DNA

Chao Qin, Bing Yang, Hao Cheng, Xiaojie Hu & Yanzheng Gao*

Institute of Organic Contaminant Control and Soil Remediation, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

* Corresponding author, E-mail: gaoyanzheng@njau.edu.cn

Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs), as persistent organic pollutants, can induce teratogenic, carcinogenic and mutagenic effects. Thus, their environmental pollution and human health issues have always been hotspots in the environmental field. PAHs binding with DNA to form PAHs-DNA adducts is the main carcinogenic mechanism. However, this important process has not attracted enough attention. Few previous studies reported the binding interactions between hydrophilic organic pollutants (such as pesticides, antibiotics, etc.) and DNA, including binding affinities, binding modes, binding mechanisms, and influencing factors. However, reports on the *in vitro* binding of hydrophobic organic pollutants (e.g., PAHs) to DNA are scarce. In this study, fluorescence quenching tests were performed to study the binding interactions between PAHs with low, medium, high rings and extracellular DNA in water. During the binding interaction, both static quenching and dynamic quenching processes occurred simultaneously. PAHs bound to DNA to form stable PAHs-DNA complexes. The binding constants (K_A) for PAHs-DNA were 2.05×10^{10} L/mol (acenaphthylene), 4.42×10^7 L/mol (acenaphthene), 1.71×10^4 L/mol (fluoranthene), 1.20×10^4 L/mol (pyrene), 1.80×10^2 L/mol (benzo[a]anthracene), 4.96×10^4 L/mol (flexion), 1.11×10^2 L/mol (benzo[k]fluoranthene), and 4.86×10^2 L/mol (benzo[a]pyrene), respectively. In addition, PAHs-DNA binding sites can be characterized by the attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) to detect the vibration changes of specific functional groups in DNA molecules. The infrared vibration peaks of thymine were shifted from 1653 to 1647 cm^{-1} after binding with PAHs, indicating that thymine was the main binding site for PAHs-DNA binding interaction. After that, molecular docking and quantum chemical calculations were performed to identify the binding modes and driving forces of PAHs-DNA binding interaction, respectively. On one hand, molecular docking results of PAHs-DNA binding clarified that PAHs could insert into the minor grooves of DNA double helix structure. On the other hand, the results of quantum chemical calculations confirmed that van der Waals force and π - π stacking interaction were the main driving forces for the binding interactions between PAHs and thymine. Furthermore, UV-vis spectroscopy was used to analyze the influence of PAHs on DNA molecular structure after binding with DNA. The results showed that the characteristic peak intensities of DNA at 260 nm were gradually increased with the concentrations of PAHs increasing. This result indicated that the binding of PAHs and DNA could cause hyperchromic effect in the absorption spectra of DNA molecules, and lead to local damage, distortion or degradation of the DNA molecular. In order to clarify the relationship between the PAHs-DNA binding strength and the physicochemical properties of PAHs, we used Pearson correlation analysis in SPSS software to analyze the correlation between physicochemical properties of PAHs and the quenching constants and binding constants of the fluorescence quenching process. The results suggested that the physicochemical properties of PAHs (molecular weight, melting point, boiling point, water solubility, $\log K_{ow}$, $\log K_{oc}$, and $\log K_{oa}$) were significantly correlated with quenching constants; but there was no correlation with the binding constants, indicating that the physical-chemical properties of PAHs were closely related to dynamic quenching process but had nothing to do with static quenching process. In all, this work investigated the binding strength and mechanism of eight PAHs with extracellular DNA. The research results probably enhance people's knowledge and understanding of the relationship between PAHs and genetic materials such as DNA, and can provide a theoretical basis for further exploring the molecular toxicology of PAHs and their derivatives in the actual environmental system of human cells in the future.

fluorescence quenching, polycyclic aromatic hydrocarbons, DNA, molecular docking, quantum chemical calculations

doi: [10.1360/TB-2021-0927](https://doi.org/10.1360/TB-2021-0927)