

0[#]柴油水溶性成分对真鲷幼体抗氧化酶活性的影响

余群, 郑微云, 翁妍, 彭荔红, 郁昂 (1. 教育部厦门大学海洋生态环境开放研究实验室, 厦门 361005; 2. 厦门大学环境科学研究中心)

摘要: 在实验生态条件下, 研究了不同浓度0[#]柴油的水溶性成分(water soluble fraction, WSF)对真鲷幼体内脏组织抗氧化酶活性变化的影响。结果表明: 不同浓度的WSF污染对抗氧化酶活性变化的影响表现为抛物线型剂量-效应作用形式; 同一剂量组随着污染时间的延长, 过氧化物歧化酶(SOD)活力上升, 硒谷胱甘肽过氧化物酶(Se-GPx)和过氧化氢酶(Ca)的活力下降; 受污染幼体在污染解除之后, 其抗氧化酶活性得到不同程度的恢复。

关键词: 真鲷幼体; 0[#]柴油水溶性成分(WSF); 抗氧化酶

Response of antioxidase in viscera tissue of *Pagrosomus major* larvae to water-soluble fraction in No. 0 diesel oil

YU Qun, ZHENG Weiyun, WENG Yan, PENG Lihong, YU Ang (1. Research Laboratory of SEDC of Marine Environmental Science; 2. Environmental Science Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005)

Abstract: Response of antioxidase (superoxide dismutase, SOD; catalase, Ca; seldium-dependent glutathione peroxidase, Se-Gpx) in viscera tissues of *Pagrosomus Major* larvae to water-soluble fraction in No. 0 diesel oil were tested. *Pagrosomus Major* larvae were exposed to the solutions with the conc. at 0.017, 1.22, 8.82 mg(No. 0 diesel oil)/L for 15 days. The results showed that the activity of antioxidase was statistically significant dose-related effect in different WSF concentrations. Under same dosed-concentration exposure, significant increases in SOD activity and decreases of Ca and Se-Gpx activity were observed with the prolonged exposure time. The activity of antioxidase returned to corresponding control level after the recovery experiment.

Keywords: antioxidase; water soluble fraction in diesel oil; *Pagrosomus major*; larvae

石油污染已成为威胁全球海洋环境的最严重的污染问题之一, 但关于其对海洋生物毒性效应的研究, 特别是其亚致死浓度污染对海洋生物致毒机理的研究, 却一直是个薄弱环节。有关的科学工作者虽已从不同方面研究石油污染对鱼类的生理生化过程的影响^[1,2], 但研究对象一般都是原油的分散液, 关于水溶性石油烃对海洋生物的毒性效应和致毒机理的研究则较少^[3], 关于石油污染对鱼类抗氧化酶活性影响的研究至今尚未见报道。

在研究污染的致毒机理中, 人们发现许多外源性化学物能通过产生大量的活性氧自由基(reactive oxygen radical, ROR)对机体产生氧化胁迫, 引起脂质过氧化、DNA损伤、酶失活等一系列氧化损伤^[4-6]。研究表明, 抗氧化酶在ROR的产生和消除过程中起着重要的作用, 而且对于这些可能产生ROR的污染物的暴露, 既可由由于适应性反应而被诱导, 也可由于中毒反应而受到抑制, 因而探索利用抗氧化酶来反映污染的致毒机理和检测污染物的早期影响, 引起有

收稿日期: 2000-04-10; 修订日期: 2000-07-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(项目批准号: 29677014); 福建省自然科学基金资助项目(C981003)

作者简介: 余群(1955—), 女, 副研究员

关科学工作者的广泛重视^[4, 7, 8]. 本文选择典型的石油污染物——0[#]柴油, 主要研究亚致死浓度条件下其水溶性成分(water soluble fraction, WSF)对真鲷幼体内脏组织抗氧化酶(DOD、Se-GPx & Ca)活性变化的影响, 由此探讨 WSF 对鱼类 ROR 产生的影响和致毒机理, 为科学评价石油污染对海洋生物的影响提供更多的理论依据和生物监测指标.

1 材料与方 法

1.1 WSF 实验海水的制备^[9]

取 0[#]柴油与沙滤海水, 按 1:10 (*V*:*V*) 混合, 用电动低速搅拌机连续搅拌 18 h, 静置 5 h, 用虹吸法取出表面以下的海水作为母液, 避光 4℃下保存. 实验前测定其中的石油浓度, 然后将母液用干净的沙滤海水稀释为高、中、低 3 个不同的浓度组(见表 1), 分别置于直径为 30 cm, 高为 80 cm 的搪瓷缸中, 每缸海水体积 20 L. 在实验过程中, 每次按上述方法制备海水.

表 1 实验所用的 WSF 的浓度(*n* = 6)

Table 1 WSF concentration of 0[#] diesel oil in the experiments

组别	对照组	低浓度组	中浓度组	高浓度组
油浓度, mg/L	0	0.17 ± 0.02	1.22 ± 0.06	8.82 ± 0.05

海水中油浓度的测定采用分光光度法^[10], (略有改动). 因所用的 0[#]柴油的 WSF 与原方法所用的标准物质成分相差较多, 荧光扫描的结果表明, 0[#]柴油的 WSF 在这一条件参数下的荧光强度非常小. 为了提高测定结果的准确性, 根据原方法的测定原理, 直接采用所购的 0[#]号柴油做为标准物质, 配成标准溶液, 进行荧光扫描, 根据其荧光扫描图谱, 把测定的仪器参数定为 $E_x = 231 \text{ nm}$, $E_m = 332 \text{ nm}$.

1.2 实验动物和曝污条件

实验鱼类先用厦门沿海重要海水经济养殖鱼类之一——真鲷, 其幼体购自集美海水养殖场, 平均体重为 $1.80 \pm 0.18 \text{ g}$.

真鲷幼体购来后, 先在清洁的海水中暂养 2 天. 然后分成 3 个浓度组和一个对照组, 用微型充气机连续充气, 水温 $24 \pm 2^\circ\text{C}$; 每 2 天更换浓度基本相同的含油海水, 基本没有出现死亡情况.

1.3 取样和样品预处理

分别于曝油后第 9 和 15 天取样(采样前 2 天停止喂食), 每次每组取鱼 3—6 尾, 活体解剖, 取出内脏, 迅速称重后置于冰浴中, 加入等体积的 4℃二次重蒸水, 少量石英砂于研钵中研磨, 然后马上离心(5000 r/min, 10 min), 取上清液. 进一步的酶液处理分别按照各个酶测定方法所要求的步骤进行.

1.4 酶活的测定

SOD、Se-GPx 和 Ca 酶活性的测定分别采用核黄素光还原法^[11]、DTNB 直接比色法^[12]和硫代硫酸钠滴定法^[13].

1.5 蛋白质测定

粗酶液中蛋白质的含量采用福林-酚试剂法^[14]测定.

2 结果

实验中真鲷幼体内脏组织抗氧化酶——SOD、Se-GPx 和 Ca 的活性变化如表 2 所示.

表 2 WSF 污染变化对 SOD、Se-GPx 和 Ca 的活性变化的影响($n=3-6$)

Table 2 Effects of water-soluble fraction exposure on activities of SOD, SeGpx and

Ca conc. in *Pagrosomus major* larvae viscera tissue

	SOD(U)	Se-GPx(U)	Ca(U)	
第 9 d	C	105.51±6.25	13.55±1.83	17.16±3.97
	L	175.03 ^a ±0.56	24.94 ^a ±2.82	21.55±3.96
	M	336.30 ^a ±0.33	31.29 ^a ±4.07	26.71±7.97
	H	429.15 ^a ±0.94	8.62 ^a ±1.65	27.38±2.53
第 15 d	C	799.36 ^b ±57.22	2.96 ^b ±0.91	16.63±0.05
	L	834.61 ^b ±47.03	9.97 ^a ±4.23	16.39±1.62
	M	617.30±54.16	15.45 ^a ±0.71	22.11±2.81
	H	1182.86±70.93	2.73 ^b ±0.97	14.96 ^b ±0.23
	(H)	(235.63±20.15)	(15.35±6.77)	(21.79±0.87)

注: C: 对照组; L: 低浓度组; M: 中浓度组; H: 高浓度组; “a”表示处理组与对照组间的显著差异($P < 0.05$ 或 0.01); “b”表示曝污时间不同引起的 GSH 浓度的显著差异($P < 0.05$ 或 0.01); 无上标表示不存在任何形式的显著差异($P > 0.05$); () 内的数据表示放入清水后的抗氧化酶活性;

2.1 WSF 作用浓度对抗氧化酶活性变化的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, 本实验浓度范围内污染组的 SOD 活力普遍受到诱导. 第 9 天, L、M 和 H 组的 SOD 活力分别为对照组的 1.66、3.19 和 4.17 倍, 诱导量随着作用剂量的升高而升高, 单因素分析的结果表明, WSF 对 SOD 活性产生极为显著的诱导($P < 0.01$). 相关回归分析的结果表明, WSF 对 SOD 活性的作用表现为抛物线型剂量-诱导效应($r^2=0.99$), 第 15 天, L 和 H 组 SOD 的活力与对照组相比虽然仍表现为诱导, 但诱导量已较第 9 天下降, 仅分别为对照组的 1.04 和 1.48 倍, M 组幼体则表现出中毒抑制反应, 其 SOD 的活力仅为对照组的 0.77 倍, 说明随着曝污时间的延长, WSF 以外的因素对 SOD 活力造成的影响的复杂性逐渐加大, 使得 SOD 对 WSF 的剂量-效应反应表现出不稳定性.

观察 Se-GPx 对 WSF 污染的反应发现, 第 9 天 L 和 M 组中 Se-GPx 的活性分别为对照组的 1.84 和 2.31 倍, 但 H 组中 Se-GPx 仅为对照组的 0.64 倍; 同样, 第 15 天 L 和 M 组中 Se-GPx 的活性分别为对照组的 3.37 和 5.22 倍, 但 H 组中 Se-GPx 仅为对照组的 0.92 倍, 说明 H 组的剂量已引起 Se-GPx 产生中毒反应. 对其进行单因素方差分析的结果表明, 在本实验浓度范围内, WSF 污染对 Se-GPx 活性总的表现为诱导($P < 0.01$, 第九天; $P < 0.05$, 第 15 天), 相关回归分析的结果发现, 二者之间的抛物线型剂量-效应反应关系(第 9 天, $r^2=0.8705$).

如表 2 所示, 本实验浓度范围内 WSF 引起的 Ca 活性的变化是不显著的($P > 0.05$), 但对其进行相关回归分析的结果表明, 二者之间的剂量-效应反应也表现为抛物线型(第 9 天, $r^2=0.9298$; 第 15 天, $r^2=0.9758$).

2.2 污染时间的延长对抗氧化酶活性变化的影响

实验结果表明(表 2), 同一作用浓度下随着污染时间的延长, SOD 活性明显升高, Se-GPx 活性则显著降低. 第 15 天, L、M 和 H 组 SOD 的活性分别升高到第 9 天的 4.77、1.87 和 2.76 倍, Se-GPx 的活性则分别为第九天的 0.40、0.49 和 0.32 倍. 污染时间的延长仅引起 H 组 Ca 活性的显著下降($P < 0.01$), 为第 9 天的 0.55 倍, L 和 M 组的 Ca 活性虽也有所降低, 但差异不显著($P > 0.05$). H 组 Ca 在第 9 天最高, 但在第 15 天却为最低, 说明污染浓度越大, 引起 Ca 产生中毒反应的速度越快.

2.3 污染解除后抗氧化酶活性的变化

污幼体在污染解除后, 抗氧化酶活性是否可以恢复, 在曝污 9 天后, 从 H 组分出部分幼鱼, 移入清洁海水, 6 天后与其他实验组一起采样分析, 结果如表 2 所示. 以第九天对照组的酶活力水平为参照, 发现污染解除后幼体 SOD、Se-GPx 和 Ca 的活力分别为对照组的 2.2、1.1 和 1.3 倍, 相比之下, H 组中幼体 SOD、Se-GPx 和 Ca 的活力分别为对照组的 11.2 倍、0.2 倍和 0.87 倍, 可见幼体内脏组织的抗氧化酶活力在污染解除之后均得到不同程度的恢复.

3 讨论

抛物线型剂量-效应反应形式是生物体对外源性污染物最常见的反应形式^[15], 它表明随着污染浓度的升高, 生物的解毒系统先是表现为正诱导反应, 然后是负诱导反应, 最后则是抑制反应. 说明解毒系统对污染有一定的适应能力, 正诱导反应说明其解毒能力随着浓度的升高而升高, 负诱导反应说明其解毒能力随着污染浓度的升高而降低, 尽管二者总的都表现为对污染的适应性反应; 抑制性反应说明污染对生物的毒性效应占优势, 超过解毒系统的功能水平, 并使之产生中毒反应. 从表 2 可以看出, L 和 M 组作用剂量引起的抗氧化酶活性的升高均属于正诱导作用范围, 而 H 组的作用剂量引起的 SOD 或 Ca(第 9 天)活力的升高则在负诱导作用范围内, Se-GPx 在这一作用剂量下, 已明显表现为中毒性抑制反应, 说明三者中 Se-GPx 对 WSF 的作用剂量最为敏感.

SOD 是生物体内唯一的 O_2^- 为底物的酶, 主要分布胞液中, 可催化 O_2^- 发生歧化反应生成 H_2O_2 , 再通过 Se-GPx 和 Ca 把 H_2O_2 转化为 H_2O , 阻断危害更大的 $\cdot OH$ 的生成, 保护细胞免受活性氧自由基的伤害, 因此其抗氧化酶活性的改变程度既可作为具有氧化还原活性污染物暴露的标记, 也可作为生物受到氧化胁迫的标记^[5, 5, 16]. 实验中观察到的 WSF 引起的 SOD 和 Se-GPx 活性的剂量-效应反应, 以及污染解除后二者的恢复, 均明显反映了 WSF 对幼体 ROR 产生的影响和造成的氧化胁迫, 可见幼体对 WSF 的代谢过程中伴有大量的 ROR 产生, 当 WSF 的作用浓度较小时, 如本实验 L 和 M 组的浓度, 幼体可通过 SOD 的升高来提高对 O_2^- 的消除能力, 通过 Se-GPx 的升高提高去除 H_2O_2 的能力, 从而保护机体细胞免受 ROR 的损伤; 但当 WSF 的作用浓度较大时, 一方面其激发产生的 ROR 量增加, 另一方面过量的 ROR 使抗氧化酶产生中毒反应, 降低了对 ROR 的消除能力, 二者的结果都导致了 ROR 的积累, 从而引发脂质过氧化、DNA 损伤、酶失活等一系列氧化损伤. 本实验 H 组的剂量引起的 SOD 升高和 Se-GPx 降低的不平衡性, 反映了此时 ROR, 特别是 H_2O_2 的积累, 说明此作用剂量已对幼体构成氧化胁迫甚至氧化损伤, 因为 H_2O_2 不仅本身是重要的 ROR 之一, 可对细胞产生过氧化损伤, 还可通过 Haber-Weiss 反应生成危害更大的 $\cdot OH$ ^[4].

同一浓度组 SOD 和 Se-GPx 的活性随着污染时间的延长, 一个上升, 一个下降, 说明随着污染时间的延长, 幼体对 O_2^- 的歧化能力增加, 但对 H_2O_2 的消除能力下降, 其结果是幼体受到 ROR, 特别是 H_2O_2 的氧化胁迫程度加大. 但值得注意的是, 随着实验时间的延长, 对照组幼体的抗氧化酶除 Ca 基本保持稳定, SOD 和 Se-GPx 均产生与污染组一样的变化, 且变化程度比污染组更大, 如第 15 天 SOD 为第 9 天的 7.58 倍, Se-GPx 为第 9 天的 0.20 倍, 说明实验时间的延长引起的 SOD 和 Se-GPx 的变化主要不是由污染的时间效应引起的, 而是由于其他条件的限制造成的, 如实验室小水体养殖造成的环境制约.

在细胞内 Se-GPx 与 SOD 一样主要分布于胞液中, Ca 则主要分布于微粒体中, 二者的作

用存在一定的互补性^[4]。实验中 Ca 活性变化的不显著性, 可能原因有二: 一是 H₂O₂ 主要在胞液中由 SOD 产生, 因此主要由 Se-GPx 起作用; 另一原因则是 Ca 与脂肪代谢密切相关^[4], 可能与实验中以 0 #柴油的 WSF 为污染物也有一定关系。

4 结语

过去关于石油污染对鱼类致毒机理的研究, 多集中于鱼肝脏混合功能氧化酶系统(MFO), 其中的 AHH 和 EROD 已发展成广为应用的环境质量生物监测指标, 而忽视了以抗氧化酶来指示石油污染通过 ROR 对鱼类产生氧化胁迫和氧化损伤的研究。本研究结果表明了 WSF 对真鲷幼体 ROR 产生的影响和抗氧化酶对其指示作用, 说明通过影响 ROR 的产生和消除机制, 至少是石油烃对鱼类产生毒性, 特别是产生遗传毒性和肿瘤形成的重要途径之一。

参考文献:

- [1] 刘发义, 孙凤. 石油污染对梭鱼肝脏混合功能氧化酶的影响 II. 不同浓度原油对 AHH 的诱导[J]. 海洋环境科学, 1991, 10(3): 49—51
- [2] 沈弘, 等. 石油污染对非洲鲫鱼血清蛋白的影响[J]. 海洋环境科学, 1997, 16(1): 1—5
- [3] 贾晓平, 林钦. 南海原油和燃料油对仔虾和仔鱼的急性毒性实验[J]. 热带海洋, 1998 17(1): 93—97
- [4] Stegeman J J, *et al.* Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects. In *Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress* (Huggett R. A., Kimerle P. M., Mehrle P. M. Jr & Bergman, H. L., eds)[M]. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida, 1992. 235—335
- [5] Di Giubio, Washburn R T, Wenning P C, *et al.* Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress[J]. *Environ Toxicol & Chem*, 1989, 8: 1103—1123
- [6] Livingstone D R, Archibald S, Chipman K L *et al.* Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1992, 91: 97—104
- [7] Stein J E, *et al.* Bioindicators of contaminant exposure and sublethal effects: studies with benthic fish in Puget sound[J]. *Environ Toxicol and Chem*, 1992, 11: 701—714
- [8] Brugeot T, *et al.* Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1996, 131: 125—141
- [9] James R R, Patricia S F, William S F. Characterization of grass shrimp (*Palaemonetes pugio*) embryo toxicity test using the water-soluble fraction of number 2 fuel oil[J]. *Mar Pollut Bull*, 1996, 32(12): 860—866
- [10] 国家海洋局. 海洋监测规范[M]. 北京: 海洋出版社, 1991
- [11] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase. Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. *Analyt Biochem*, 1971, 44(1): 276—287
- [12] 夏亦明, 等. 血和组织中谷胱甘肽过氧化酶活力的测定方法(1) IDTNB 直接比色法[J]. 卫生研究, 1987, 16(4): 29—33
- [13] 荣翠琴, 等. 环境生物学实验技术与方法[M]. 南京: 南京大学出版社, 1989
- [14] Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall R J. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265—275
- [15] 郑微云, 翁恩琪. 环境毒理学概论[M]. 厦门: 厦门大学出版社, 1993
- [16] Pannunzio T M, Storev K B. Antioxidant defenses and peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*[J]. *Exp Mar Biol Ecol*, (1998), 221(2): 277—292