

# 石油污染对僧帽牡蛎 (*Ostrea cucullata*) 抗氧化酶的影响

陈荣, 郑微云, 余群, 张勇 (国家教委海洋生态环境开放实验室, 厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

**摘要:** 在厦门岛及附近海域的轮渡码头、杏林湾、同安湾、黄厝 4 个地点现场采集牡蛎样品, 研究牡蛎全组织石油烃含量与其消化腺、鳃超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活性之间的关系, 并探讨了将僧帽牡蛎抗氧化酶作为监测海洋石油污染的生物标志物(biomarker)的可能性。结果表明: (1) 采自轮渡码头、杏林湾、同安湾、黄厝的牡蛎全组织石油烃含量分别为 380.68、112.34、27.31、20.37  $\mu\text{g/g}$ ; (2) 牡蛎消化腺 SOD、CAT 活性均高于鳃; (3) 牡蛎消化腺和鳃 CAT、SOD 活性均随石油烃含量的增加而增强。由相关系数来判断两者相关性显著, 适合作为海洋石油污染的生物标志物。

**关键词:** 石油污染; 僧帽牡蛎; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 现场调查

## Effect of oil pollution on antioxidant enzyme of oyster (*Ostrea cucullata*)

CHEN Rong, ZHENG Weiyun, YU Qun, ZHANG Yong (Res Lab of SEDC of Marine Ecol Environ Environ Sci Res Center, Xiamen University, Xiamen 361005)

**Abstract:** The oyster (*Ostrea cucullata*) were collected from four stations around Xiamen island (Lundu port, Xinglin bay, Tong'an bay and Huangcuo). The biological responses measured included the level of petroleum hydrocarbon in whole tissue, the activity of super oxide dismutase (SOD) and catalase in digestive gland and gill. The results showed: (1) The content of petroleum hydrocarbon in oyster collected from four stations were 380.68, 112.34, 27.31 and 20.37  $\mu\text{g/g}$  wet, respectively; (2) The activity of SOD and catalase in digestive gland were higher than in gill; (3) Among the four stations, the SOD and catalase activity showed a good correlation with whole tissue petroleum hydrocarbon, which indicated that the antioxidant enzymes in oyster were suitable biomarker of marine oil pollution.

**Keywords:** oil pollution; *Ostrea cucullata*; SOD; catalase; field study

双壳类特别是贻贝、牡蛎等对重金属、石油烃等污染物有很强的富集能力, 可作为海洋污染的监测生物<sup>[1,2]</sup>, 但体内污染物含量不能及时反映海洋污染的动态变化, 也不能反映污染物对生物体生理生化影响, 因此目前的研究主要集中在海洋污染物对海洋生物各种生物化学参数(如金属硫蛋白、物质代谢酶、抗氧化酶和 DNA 完整性)的影响上, 以期研究污染物的致毒机制并寻找可作为海洋污染早期监测的生物标志物。

海洋污染物可导致水生生物体内自由基含量的增加, 引起氧化胁迫(oxidative stress), 因此抗氧化系统不仅可作为监测海洋污染的生物标志物, 也能从一个侧面揭示污染物对水生生物的毒性机制。近年来, 国外在实验和野外条件下, 都开展了一些污染物对鱼类和双壳类抗氧化系统的影响的研究工作<sup>[3,4]</sup>。在国内对双壳类抗氧化酶已经有了一些基础研究<sup>[5,6]</sup>, 但环境污染对其的影响与将其作为环境污染生物标志物的研究仍属空白。本文首次开展了石油污染对双

收稿日期: 2001-03-05; 修订日期: 2001-09-29

基金项目: 福建省自然科学基金(No. D9910004); 教育部科技重点项目(No. 99180)

作者简介: 陈荣(1974—), 男, 博士

壳类抗氧化酶的影响的野外调查工作, 进而探讨将抗氧化酶作为石油污染的生物标志物的可行性.

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

实验仪器采用 Beckman J2-MC 型高速冷冻离心机, Beckman DU-8B 紫外-可见分光光度计, Shimadzu RF-5000 型荧光分光光度计.

考马斯亮蓝 G50(Fluka 产品)、牛血清白蛋白(上海生工生物工程有限公司产品)、邻苯三酚(遵义化学试剂厂产品), 其他试剂均为国产分析纯药品.

### 1.2 样品采集和前处理



图 1 采样点示意图

Fig.1 Sampling stations

2000 年 6 月在厦门岛东西海域的轮渡码头、杏林湾、同安湾、黄厝海滩(如图 1 所示), 采集退潮后裸露岩石上的僧帽牡蛎, 壳长 4—5 cm. 酶活样品每个地点采集 6 个, 现场解剖分离鳃、消化腺, 双蒸水洗净后用 1.5 mL Eppendorf 管装取, 放入冰壶带回, 置于液氮中保存至测定. 石油烃样品每个地点采集 10 个, 剖开后用双蒸水洗净全组织, 用小广口瓶装取,  $-20^{\circ}\text{C}$  保存至测定.

酶活样品加 5 倍体积预冷的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液( $\text{pH}=7.4$ ), 冰浴, 玻璃匀浆器匀浆,  $4^{\circ}\text{C}$  5000 g 离心 15 min, 取其上清液用于酶活测定.

### 1.3 总石油烃含量测定

采用荧光分光光度法测定. 以国产 0<sup>#</sup> 柴油为标准, 方法按《海洋监测规范》<sup>[7]</sup>, Shimadzu RF-5000 型荧光分光光度计测定样品.

### 1.4 酶活测定

SOD 活性测定方法见文献[8], 一个酶单位定义为在  $25^{\circ}\text{C}$  时, 每 mL  $\text{pH}$  8.2 的反应液中, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量. CAT 活性测定方法见文献[9], 一个单位的 CAT 活性定义为: 在  $25^{\circ}\text{C}$ , 100 s 内使  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解一半时的酶蛋白量.

### 1.5 蛋白质浓度测定

以牛血清白蛋白为标准, 采用改进的考马斯亮蓝比色法<sup>[10]</sup>.

### 1.6 数据处理

实验结果进行统计处理. 酶活性数据结果均为平均数 $\pm$ 标准误差(Mean $\pm$ SDE). 用  $t$ -检验法对组间数据进行差异性显著分析. 用相关系数判断酶活性与石油烃含量之间的相关程度.

## 2 结果

### 2.1 各采样地点僧帽牡蛎总石油烃含量比较

不同采样地点, 牡蛎全组织石油烃含量见表 1. 在轮渡码头采集的牡蛎体内石油烃含量最高, 依次为杏林湾、同安湾、黄厝. 轮渡码头由于来往的客运渡船和各种渔船较多, 石油污染

表 1 不同采样地点牡蛎全组织石油烃含量

Table 1 The content of petroleum hydrocarbon in oyster whole tissue in different site

采样地点	轮渡	杏林	同安	黄厝
石油烃含量, $\mu\text{g/g}$ (湿重)	380.68	112.34	27.31	20.37

较严重,海面上可见一层油污,因此牡蛎体内石油烃含量最高.杏林湾地处厦门西海域,在湾口建有西堤围隔海面以发展水产养殖,不利于海水交换,导致水质下降,因此牡蛎体内石油烃含量也较高.而同安湾和黄厝地处厦门东海域,海面开阔,海水较洁净.

## 2.2 各采样地点僧帽牡蛎抗氧化酶活性比较

各采样点僧帽牡蛎消化腺、鳃的 SOD、CAT 活性见表 2. 由表可见,各站点僧帽牡蛎消化腺 SOD、CAT 活性均高于鳃. 石油烃含量最高的轮渡,牡蛎各组织抗氧化酶活性也最大,与其他站点差异显著. 在石油污染较轻的同安湾,各种酶活性远低于污染较严重的杏林湾,差异极显著. 而与水水质较洁净的黄厝相比,除了消化腺 SOD 和鳃 CAT 活性有显著差异外,其他酶活性没有统计意义上的差异. 总体而言,随着体内石油烃含量的增加,牡蛎抗氧化酶活性也升高,表现出良好的相关性. 相关系数见表 3.

表 2 不同采样地点僧帽牡蛎抗氧化酶活性比较

Table 2 Activity of oyster antioxidant enzyme in different sampling stations

采样地点	消化腺 SOD, U/mg(蛋白)	鳃 SOD, U/mg(蛋白)	消化腺 CAT, nmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/(min·mg(蛋白))	鳃 CAT, nmol(H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> )/(min·mg(蛋白))
轮渡	32.19±6.81	14.32±3.85	614.30±55.29	267.40±34.72
杏林	21.16±2.59**	10.94±3.37	438.48±64.77**	105.65±10.91**
同安	9.21±1.74**	3.63±1.82**	169.47±31.63**	52.20±23.11**
黄厝	6.93±1.14*	1.64±0.85	132.67±30.34	28.17±1.12*

“\*”表示组间差异显著,  $P \leq 0.05$ ; “\*\*”表示组间差异极显著,  $P \leq 0.01$

## 3 讨论

SOD、CAT 是广泛存在于生物体中的抗氧化酶,在生物体各组织器官中都有分布. 牡蛎消化腺 SOD、CAT 活性高于鳃,主要原因是消化腺中包含肝脏,而肝脏是机体代谢解毒的主要器官,因此酶活性较高,这与其他无脊椎动物类似<sup>[4,11]</sup>.

石油烃、PCB、农药等有机污染进入水生生物体内后经过生物转化,在氧化还原循环中产生大量氧自由基(O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>),这些氧自由基具有很高的活性,可攻击各种生物大分子,造成酶失活、蛋白质变性、膜脂质过氧化、DNA 损伤等氧化损伤. 而抗氧化酶的生物作用在于清除氧自由基保护机体,其活性的变化可以间接地反映出生物体内自由基含量的变化. 本文的调查显示,随着牡蛎体内石油烃含量的增加,消化腺和鳃 SOD、CAT 的活性均显著增加. SOD 是生物体内唯一以超氧阴离子作为专一性底物的抗氧化酶,其活性的增加表明体内自由基水平的升高,这说明石油污染已对牡蛎造成氧化胁迫. SOD 和 CAT 活性的增加是机体对抗氧化胁迫的一种适应性变化. 然而抗氧化酶清除自由基的能力毕竟有限,在长期的氧化胁迫下,氧化损伤难以避免,进而造成机体细胞病变导致疾病发生. 有研究表明石油烃可抑制双壳类的免疫力,增加疾病的易感性<sup>[12,13]</sup>. 其作用机制主要是石油烃代谢中产生的自由基对免疫细胞如吞噬细胞的脂质过氧化作用,影响了双壳类的免疫功能. 可见,石油污染对水生生物抗氧化系统的影响是石油对水生生物毒性作用的机制之一.

表 3 抗氧化酶活性与石油烃含量的相关系数

Table 3 Correlation coefficients between antioxidant enzyme and the level of petroleum hydrocarbon

	消化腺 SOD	鳃 SOD	消化腺 CAT	鳃 CAT
石油烃含量	0.95	0.88	0.92	0.99

就石油污染而言,目前公认的生物标志物是细胞色素 P450 和 DNA 加合物<sup>[13]</sup>.但由于石油烃在生物体内代谢时往往伴随产生大量自由基,因此抗氧化系统也有可能作为石油污染的生物标志物.关于这方面的研究正越来越引起各国学者的兴趣.根据本文的现场调查结果,僧帽牡蛎消化腺和鳃的 SOD、CAT 活性与体内石油烃含量均有良好的正相关性.在其他类似的研究中也发现贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)消化腺 SOD 和 CAT 活性与体内 PAH 含量正相关<sup>[15]</sup>.Sole 等比较了 4 种海洋双壳类抗氧化酶和体内污染物含量之后,也指出双壳类 SOD 活性与体内 PAH 含量有一定相关性<sup>[16]</sup>.从这些研究结果来看,海洋双壳类抗氧化酶活性可以作为海洋石油污染的生物标志物.但在另外的研究工作中也发现双壳类暴露于污染物后抗氧化酶活性并没有变化<sup>[17,18]</sup>.这说明在将海洋生物抗氧化系统用于监测海洋污染方面,目前的资料积累仍不够充分,还需要进一步的研究.

#### 参考文献:

- [ 1 ] Viarengo A, Canesi L. Mussels as biological indicators of pollution[ J ]. *Aquaculture*, 1991, 94: 225—243
- [ 2 ] 陆超华, 谢文造, 周国君. 近江牡蛎作为海洋重金属镉污染指示生物的研究[ J ]. *中国水产科学*, 1998, 5(2): 79—83
- [ 3 ] Di Giulio Richard T, Clifford Halig, Evan P Gallagher. Effects of Black Rock harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish[ J ]. *Aquat Toxicol*, 1993, 26: 1—22
- [ 4 ] Winstone Gary W, Di Giulio Richard T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms [ J ]. *Aquat Toxicol*, 1991, 19: 137—161
- [ 5 ] 曾利荣, 林哲莆. 近江牡蛎铜锌超氧化物歧化酶的纯化及部分性质[ J ]. *中国生物化学与分子学报*, 1998, 14(5): 583—587
- [ 6 ] 王跃军, 孙 谡. 扇贝超氧化物歧化酶的纯化及性质研究[ J ]. *海洋水产研究*, 1999, 19(2): 69—75
- [ 7 ] 国家海洋局. 海洋监测规范[ M ]. 北京: 海洋出版社, 1991
- [ 8 ] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进[ J ]. *生物化学与生物物理进展*, 1986(4): 276—287
- [ 9 ] 徐镜波, 袁晓凡, 郎佩珍. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定[ J ]. *环境化学*, 1997, 16(1): 73—76
- [ 10 ] 郭敏亮, 姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[ J ]. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 558—561
- [ 11 ] 曹广力, 周保卫. 四种甲壳动物超氧化物歧化酶活性检测初报[ J ]. *水产养殖*, 1999(1): 15—16
- [ 12 ] Chu F L E, Hale R C, Volety A, *et al.* Relationship between pollution and susceptibility to infectious disease in the eastern oyster, *Crassostrea virginica* [ J ]. *Marine Environment Research*, 1996, 42(1—4): 195
- [ 13 ] Michelle M Grundy, Norman A Ratcliffe, Michael N Moore. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons [ J ]. *Marine Environment research*, 1996, 42(1—4): 187—190
- [ 14 ] 王海黎, 陶 澍. 生物标志物在水环境研究中的应用[ J ]. *中国环境科学*, 1999, 19(5): 421—426
- [ 15 ] Porte C, Sole M, J Albaiges, *et al.* Responses of mixed-function oxygenase and antioxidant enzyme system of *Mytilus* SP to organic pollution [ J ]. *Comp Biochem Physiol*, 1991, 100C(1—2): 183—186
- [ 16 ] Sole M, Porte C, J Albaiges. Mixed-function oxygenase system and antioxidant enzymes in different marine bivalves: its relation with contaminant body burdens [ J ]. *Aquat Toxicol*, 1994, 30: 271—283
- [ 17 ] Da Ros L, Nasci C, G Campesan *et al.* Effects of linear alkylbenzene sulphonate (LAS) and cadmium in the digestive gland of mussel, *Mytilus* SP [ J ]. *Mar Environ Res*, 1995, 39: 321—324
- [ 18 ] Krishnakumar P K, Casillas E, Varanasi U. Cytochemical responses in the digestive tissue of *Mytilus edulis* complex exposed to microencapsulated PAHs or PCBs [ J ]. *Comp Biochem Physiol*, 1997, 118C(1): 11—18