

苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏过氧化氢酶活性的影响*

冯涛 郑微云

(厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

郭祥群

(厦门大学化学系, 厦门 361005)

陈荣

(厦门大学环境科学研究中心, 厦门 361005)

Effects of Catalase Activities in the Liver of *Boleophthalmus pectinirostris* with Benzo(a) Pyrene Exposure. Feng Tao, Zheng Weiyun, Chen Rong(Environmental Science Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005), Guo Xiangqun(Chemistry Department of Xiamen University, Xiamen 361005). Chinese Journal of Ecology, 2001, 20(5): 73 - 75.

Changes of catalase(CAT) activities in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* with benzo(a) pyrene(BaP) exposure are detected in experimental condition. The results show that there is no significant changes for CAT activities in control group and 0.05mg#L⁻¹ BaP group with prolonged exposure (P > 0.05), whereas they are depressed significantly at concentration of 0.5mg#L⁻¹ (P [0.05). In 3 days exposure, CAT activities decrease significantly with the increase of BaP concentration (P [0.05). This might indicate that exposure to higher BaP concentrations might have toxic effect to fishes. The activities of CAT increase significantly to control level after BaP was removed. It turned out that the physiological modulatory mechanism still existed in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris*. All the results show that CAT activity might be suitable to be the bioindicator of BaP exposure.

Key words: benzo(a) pyrene(BaP), *Boleophthalmus pectinirostris*, catalase (CAT).

中图分类号: X131.2 文献标识码: A 文章编号: 100024890(2001)052007303

过氧化氢酶(CAT)是生物体内一种含巯基(-SH)的抗氧化酶,可与谷胱甘肽过氧化物酶一起,清除超氧化物歧化酶歧化超氧阴离子自由基(O₂⁻)产生的过氧化氢(H₂O₂),进而阻断可产生活性极高的羟自由基(OH)的Haber-Weiss反应: M⁺ + O₂⁻ + H₂O₂ → M₂⁺ + OH⁺ + OH + O₂ (M⁺为金属离子),因而在生物体的抗氧化防御系统中占有重要地位^[12]。

研究表明,包括CAT在内的抗氧化防御系统的成分可由于氧化污染的胁迫而发生改变,尝试以这些抗氧化防御系统成分的变化作为氧化胁迫的生物指标的研究正在成为毒理学研究的新热点^[2,5,7],而国内这一领域的研究较少。

本文试图通过对苯并(a)芘(BaP)胁迫下大弹涂鱼肝脏CAT活性变化的研究,进一步了解BaP可能的致毒机理,探讨以CAT活性变化作为氧化污染生物指标的可能性,并为抗氧化防御系统的毒理学研究提供更多的基础资料。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

实验仪器采用AIC UV 9100型紫外可见分光光度计, Beckman J22MC型冷冻离心机。

苯并(a)芘为Sigma公司产品;其余试剂为国产市售产品。

1.2 实验鱼和曝污条件

苯并(a)芘先用少量丙酮溶解,再配制成一定浓度的储备液,避光于4℃保存。实验前将储备液用清洁海水稀释为0.05, 0.2和0.5mg#L⁻¹,三个不同的浓度组,分别置于直径为50cm,高为50cm的陶瓷缸中,每缸海水体积40L。对照组海水中加入与污染组相同体积的丙酮。

实验用大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*),捕自福建省福清海域,平均体长为12.8±1.0cm,平均体重为15.05±3.4g,放在室内饲养。实验鱼先在清洁海水中暂养72h,然后分别放入上述几个浓度的海水中,每组设两个平行样。实验期间,用微型充气机连续充气,每天更换相同污染浓度的海水,其间投喂藻类;水温基本稳定在20

* 高等学校博士学科点专项科研基金项目(49876029)资助。

作者简介:冯涛,女,32岁,博士。研究方向为生态毒理学。

? 2 e。

1.3 实验设计和样品预处理

0.05 和 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组于曝污后第 6, 12, 24, 36 和 72h 取样, 0.2 mg#L⁻¹ BaP 浓度组于曝污后 72h 取样, 对照组于曝污后 6h 和 72h 取样 (表 1)。每次每组取鱼 6 尾, 活体解剖, 取出肝脏, 迅速冷冻于液氮中。测定时, 从液氮中取出肝脏, 称重后置于冰浴中, 加 10 倍体积(w/v) 预冷的缓冲液, 冰浴匀浆, 4 e 冷冻离心 (15 000 转# min⁻¹, 20min), 取上清液, 用于 CAT 活性测定。

表 1 实验设计(mg#L⁻¹)
Tab. 1 Design of the experiment

暴露时间 (h)	暴露浓度			
	对照组	0.05	0.2	0.5
6	+	+	-	+
12	-	+	-	+
24	-	+	-	+
36	-	+	-	+
				(+)
72	+	+	+	+

注: + 指取样; - 指未取样; (+) 指曝污 24h 后再转入清洁海水 12h 取样。

1.4 酶活性的测定

参照 Cohen 等^[4] 和徐镜波等^[11], 略做改动。最终总体积为 1ml 的反应混合物中含一定量的匀浆上清液, 10Lmol 磷酸钠缓冲液 (pH 7.0), 10Lmol H₂O₂。反应温度为 25 e, 混匀后立即开始反应, 于波长 240nm 处测定其 3min 内的反应速率, 每隔 30s 测 A 值 1 次。

酶活力单位定义为每毫克蛋白、每分钟分解 H₂O₂ 的纳摩尔数 [nmol H₂O₂#min⁻¹#(mg Pr)⁻¹]。

1.5 蛋白质含量的测定

上清液中的蛋白含量用 lowry^[9] 法测定, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.6 数据处理

实验数据用统计学方法进行处理。所给的结果均为平均数? 标准误差; 用单因素方差分析方法分析苯并(a) 芘曝污引起的差异; 组间数据的两两比较采用单尾 t 检验法, P [0.05, 被认为是差异显著。

2 结果

2.1 BaP 暴露时间延长对大弹涂鱼肝脏 CAT 活性的影响(表 2), 0.05 和 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组分别于暴露后的 6, 12, 24, 36 和 72h 取样, 而对照

组则分别于暴露后 6h 和 72h 取样, 暴露组 36h 内的样品均以对照组 6h 的样品作为对照。

对各浓度组不同时间的 CAT 活性进行单因素方差分析的结果表明, 对照组与 0.05 mg#L⁻¹ BaP 浓度组无显著差异, 而 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组则差异显著 (P [0.05); 用单尾 t 检验法对 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组相邻时间点的 CAT 活性进行两两比较, 仅有 12 和 24h 两个时间点之间差异显著 (P [0.05), 后者为前者的 37.9%。表明在该 BaP 浓度下, 随着曝污时间的延长, 大弹涂鱼肝脏 CAT 活性在暴露 24h 即开始被显著抑制。

用单尾 t 检验法分别将 0.05 和 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组与对照组的 CAT 活性进行两两比较, 结果表明 0.05 mg#L⁻¹ BaP 浓度组与对照组无显著差异, 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组则从 24h 开始显著低于对照组 (P [0.05), 分别为对照组的 51.5%, 32.9% 和 49.6%, 表明 0.5 mg#L⁻¹ 的 BaP 暴露对大弹涂鱼肝脏的 CAT 活性有显著抑制作用。

表 2 BaP 暴露时间延长对大弹涂鱼肝脏 CAT 活性的影响
(mg#L⁻¹)

Tab. 2 Effects of prolonged BaP exposure on CAT activities in the liver of *Boleophthalmus chinensis*

暴露时间 (h)	对照组	BaP (0.05)	BaP (0.5)
6	4.27? 1.44	4.08? 0.44	5.85? 1.63
12	-	4.56? 2.06	5.80? 1.54
24	-	4.46? 0.91	2.20? 1.10 ^{ab}
36	-	4.08? 2.84	1.41? 0.63 ^a (5.37? 1.77 ^b)
72	3.64? 1.22	3.79? 1.34	1.80? 0.64 ^a

单因素方差分析

*

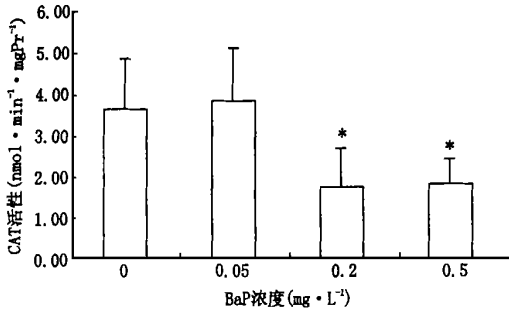
注: 表中数据为平均值? 标准误差, n= 6; CAT 活性单位为 nmol H₂O₂#min⁻¹#(mg Pr); * 表示对该浓度组数据进行单因素方差分析的结果表明差异显著 (P [0.05); a 指对 BaP 暴露组与相应对照组的数据进行单尾 t 检验的结果表明差异显著 (P [0.05); b 指对相邻时间点的两组数据进行单尾 t 检验的结果表明差异显著 (P [0.05); () 中的值表示在 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组中暴露 72h 再转入清洁海水中 96h 后的 CAT 活性值; - 指未被检测。

2.2 不同 BaP 浓度对大弹涂鱼肝脏 CAT 活性的影响

将大弹涂鱼暴露于 0, 0.05, 0.2 和 0.5 mg#L⁻¹ 等不同浓度的 BaP 72h, 用单因素方差分析方法对不同浓度的大弹涂鱼肝脏 CAT 活性进行统计分析, 结果表明, 显著差异 (P [0.05), 随 BaP 浓度的升高, 大弹涂鱼肝脏 CAT 活性显著降低 (图 1)。分别用单尾 t- 检验法对各 BaP 浓度组的 CAT 活性与对照组数据进行两两比较, 结果表明, 0.2 和 0.5 mg#L⁻¹ BaP 浓度组 CAT 活性均显著低于对照组 (P [0.05), 分别为对照组的 48% 和 49.6%。

2.3 污染解除后 CAT 活性的变化

从表 1 可知, 将大弹涂鱼在 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP 浓度组中暴露 24h 再转入清洁海水中 12h, 其 CAT 活性显著高于暴露 24h 和暴露 36h 时的值(分别为二者的 2.44 倍和 3.81 倍, $P < 0.05$), 恢复至与对照组水平接近。



* 表示与对照组相比差异显著($P < 0.05$)

图 1 不同浓度 BaP 暴露对大弹涂鱼 CAT 活性的影响

Fig. 1 Effects of BaP exposure at different concentrations on CAT activities in the liver of *Boleophthalmus chinensis*

3 讨论

在污染物代谢机理的研究中, 发现许多污染物(包括多环芳烃)在体内代谢过程中可进行氧化还原循环, 并产生大量活性氧^[6], 这些活性氧可引发机体氧化应激, 进而产生毒性效应。生物体内抗氧化酶对活性氧的清除有重要作用, 因而研究污染物暴露下抗氧化酶活性的变化规律, 探索污染物的致毒机理, 探讨以抗氧化酶作为污染监测指标的可能性, 引起有关科学工作者的广泛重视^[2,5,7]。

已有研究表明 CAT 活性可由于氧化污染的胁迫而发生改变, 如 Rodriguez Ariza 等^[11]报道, 从污染水域捕获的鲮鱼 (*Mugil sp.*) 比未受污染水域的鲮鱼肝脏 CAT 活性显著升高。Mather Mihaich 和 Di Giulio 则发现鲟鱼 (*Ictalurus punctatus*) 暴露于造纸厂废水中 CAT 活性升高^[10]。这些关于低浓度污染物长期暴露下鱼类 CAT 活性的变化表明, 在污染胁迫下, 生物体可通过调节抗氧化酶水平增强其清除活性氧的能力, 以减轻污染物的伤害。本实验中, 大弹涂鱼暴露于亚致死浓度的 BaP 72h, 其肝脏 CAT 活性随浓度的升高及曝污时间的延长被显著抑制, 表明 BaP 代谢过程中机体内活性氧大量产生, 并对机体产生毒性作用; 但将大弹涂鱼在 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP 浓度组中暴露 24h 再转入清洁海水中 12h, 其 CAT 活性恢复至与对照组水平接近, 表明

这种高浓度 ($0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 短期内 (24h) 的 BaP 暴露所产生的毒性作用在一定程度上仍可得到恢复。本实验中未检测出 CAT 活性的诱导, 可能与较短的暴露时间有关, 低浓度下更长时间的 BaP 暴露对 CAT 活性可能产生的影响, 值得进一步探讨。

参考文献

- [1] 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.
- [2] Burgeot, T. et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea[J]. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1996, 131: 125- 141.
- [3] Chen, G. et al. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp[J]. Ecotox. Environ. Safe, 1998, 40: 234- 238.
- [4] Cohen, G. et al. Measurement of catalase activity in tissue extracts[J]. Analytic Biochem., 1970, 34: 30- 38.
- [5] Cosu, C. et al. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unionidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies[J]. Ecotox. Environ. Safe, 1997, 38: 122- 131.
- [6] Di Giulio, R. T. et al. Biochemical responses in aquatic animals: a review of determinants of oxidative stress[J]. Environ. Toxicol. Chem., 1989, 8: 1103- 1123.
- [7] Livingstone, D. R. et al. Antioxidant enzymes in liver of dab *Limanda limanda* from the North Sea[J]. Mar. Ecol. Prog. Ser., 1992, 91: 97- 104.
- [8] Livingstone, D. R. et al. Prooxidant, antioxidant and 2-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals[J]. Mar. Pollut. Bull., 1993, 26: 602- 606.
- [9] Lowry, O. H. et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent[J]. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265- 275.
- [10] Mather Mihaich E and Di Giulio, R. T. Oxidant, mixed function oxidase and peroxisomal responses in channel catfish exposed to a bleached kraft mill effluent[J]. Arch. Environ. Contam Toxicol., 1991, 20: 391- 397.
- [11] Rodriguez Ariza A et al. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas[J]. Can. J. Fish. Aquat. Sci., 1993, 50: 2568- 2573.
- [12] Stegeman, J. J. et al. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects[A]. In: Huggett, R. A. (eds). Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress[C]. Boca Raton Florida: Lewis Publishers, 1992. 235- 335.

(收稿: 2000 年 7 月 24 日, 改回: 2001 年 6 月 25 日)