

苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

王重刚¹, 郑微云², 余 群², 郁 昂², 陈 荣² (1. 厦门大学生命科学学院, 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, 研究浓度范围从 0.1—50 $\mu\text{g/L}$ 的苯并(a)芘和芘的等浓度混合物暴露对梭鱼(*Mugil so-iuy*) 肝脏抗氧化酶活性的影响。结果显示, 对肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响主要表现出抑制效应。在暴露过程中, 抗氧化酶活性也有出现短暂的诱导, 高浓度组出现诱导的时间比低浓度组早。SOD 和 GPx 活性的变化有一定的同步性。CAT 活性在暴露早期出现诱导。抗氧化酶活性的变化间接反映了环境中氧化胁迫的存在。

关键词: 苯并(a)芘; 芘; 抗氧化酶; 梭鱼

Effects of mixture of benzo(a)pyrene and pyrene exposure on hepatic antioxidant enzymes activities in *Mugil so-iuy*

WANG Chonggang¹, ZHENG Weiyun², YU Qur², Yu Ang², Chen Rong² (1 School of life science, Xiamen University, Xiamen 361005; 2 Environmental Science Research Center)

Abstract: The effects of the mixture of benzo(a)pyrene and pyrene (concentration range of 0.1—50 $\mu\text{g/L}$) exposure on hepatic antioxidant enzymes activities in *Mugil so-iuy* were studied under experimental condition. The results mostly showed that the activities of glutathione peroxidase (GPx) and superoxide dismutase (SOD) were inhibited. The activities of the antioxidant enzymes were sometimes induced briefly during exposure. The enzyme activities induction appeared sooner at higher concentration group than that at lower concentration group. The SOD and GPx activities changed quite in phase. The CAT activity was induced at the early exposure. The changes of antioxidant enzymes activities reflected indirectly the existence of oxidation stress.

Keywords: Benzo(a)pyrene; pyrene; antioxidant enzymes; *Mugil so-iuy*

多环芳烃(PAHs)是海洋常见的污染物, 由于其具有致癌性和致突变性而成为必须检测的污染物。PAHs 在动物体内进行生物转化时, 可形成多种中间产物, 许多中间产物可进入氧化还原循环, 产生大量的活性氧物质, 进而引发机体的氧化应激。抗氧化酶存在于所有生物的组织, 其功能是清除氧自由基。抗氧化酶包括超氧化物歧化酶[Superoxide dismutase (SOD)]、过氧化氢酶[Catalase (CAT)]以及谷胱甘肽过氧化物酶[Glutathione peroxidase (GPx)]。抗氧化酶作为鱼类氧化胁迫的生物标志物已有研究报道^[1-3]。但 Hasspieler 等指出不同种类鱼的抗氧化酶活性是不同的, 这导致其对氧化胁迫的敏感性不同^[2]。赵云英等指出, 靠近油田或其他污染源的水体的 PAHs 浓度可高达 50 $\mu\text{g/L}$, 大洋或未污染湖水中 PAHs 含量往往低于 1 $\mu\text{g/L}$ ^[4]。为此, 我们选择

收稿日期: 2001-08-20; 修订日期: 2001-10-29

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(49876029); 福建省自然科学基金资助项目(D9910004)

作者简介: 王重刚(1963—), 男, 副教授(博士)

常见的两种 PAHs——苯并(a)芘和芘作为污染物,观察它们在 0.1—50 $\mu\text{g/L}$ 的浓度范围,混合暴露情况下对梭鱼肝脏抗氧化酶活性的影响.梭鱼 (*Mugil xuyi*) 是我国近海常见的底层生活的鱼类,主要以藻类为食,较多地接触底质,已有报道用梭鱼作为材料进行有关毒理学的研究.因此,采用梭鱼作为环境污染的监测种类有实际意义.

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

实验仪器采用国产 721 型分光光度计, Beckman DU-8B 型紫外可见分光光度计, Beckman J2-Mc 型冷冻离心机. BaP, 芘为 Sigma 公司产品,其余试剂为国产市售产品.

1.2 实验动物和暴露条件

BaP 和芘等浓度混合物先用二氧六环 (dioxane) 配制成一定浓度的储备液,避光于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存.实验时用沙滤海水分别配制为 0.1、1.0、5.0、10.0、50.0 $\mu\text{g/L}$ 的浓度.梭鱼捕自福建省平潭县竹屿乡,体长 13.5 \pm 2.1 cm,体重 26.8 \pm 7.1 g ($n=45$).实验鱼先在清洁沙滤海水中暂养 7 天,然后随机每组 6 条鱼放入不同浓度污染物的海水中避光饲养,每组设两个平行样.饲养水体为 30 L,用充气机连续充气,喂以小球藻 (*Chlorella* sp.),每天更换 15 L 相同污染浓度的海水,饲养期间水温 13—15.5 $^{\circ}\text{C}$,盐度 15—17.空白对照为不加助溶剂和毒物,二氧六环对照为只加二氧六环,二氧六环终浓度均为 1 mL/L(海水).

1.3 取样和样品预处理

分别于暴露后一定天数取样,取出肝脏于液氮中保存.测定时,先加 4 倍体积 (w/v) 预冷的匀浆液于玻璃匀浆器中匀浆,然后立即离心 (10000 r/min, 30 min),取上清液测定抗氧化酶活性. GPx 的测定方法采用荣征星等的方法^[5].定义 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,每分钟每毫克蛋白使谷胱甘肽下降的浓度为 1 个 GPx 活性单位. CAT 活性的测定采用徐镜波等的方法^[6].定义 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,100 s 内使过氧化氢分解一半时的酶蛋白量为 1 个 CAT 活性单位. SOD 酶采用邻苯三酚自氧化法.定义 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,每分钟抑制邻苯三酚自氧化率达 50% 时所需酶量为 1 个 SOD 酶比活力.酶活性均表示为 (U/mg).上清液中的蛋白含量用考马斯亮蓝法^[7]测定.

1.4 数据分析

实验数据用统计学方法进行处理.结果用平均值 \pm 标准误差表示,组间数据用单尾 t -检验法进行比较, $P < 0.05$,被认为有显著差异; $P < 0.01$,被认为有极显著差异.

2 结果

2.1 BaP 和芘的混合物暴露对 GPx 活性的影响

如图 1 所示,混合物暴露主要表现出对 GPx 活性的抑制效应,5 $\mu\text{g/L}$ 组在暴露第 12 天出现对 GPx 活性的诱导;50 $\mu\text{g/L}$ 组在第 4 天表现出对 GPx 活性的诱导,但很快就呈现抑制.剂量-效应关系如图 2 所示,暴露 4 天后,低浓度表现出对 GPx 活性的抑制效应,而 50 $\mu\text{g/L}$ 组则表现出诱导效应. GPx 活性的变化率分别为: -36.54%、-63.74%、-69.19%、-31.89% 和 29.28%.以变化率为纵坐标,浓度为横坐标,进行回归分析,得到回归方程为: $y = 0.0154x^2 + 0.9109x - 54.563$ ($R^2 = 0.845$).

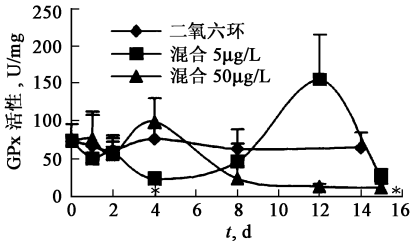


图1 苯并(a)芘和芘的混合物暴露影响梭鱼肝脏 GPx 活性的时间-效应 ($n=4-7$) (*表示与二氧六环组比较有显著差异)

Fig. 1 Time-effect of GPx activity of liver in *Mugil so-so* exposed to mixture of BaP and pyrene ($n=4-7$)

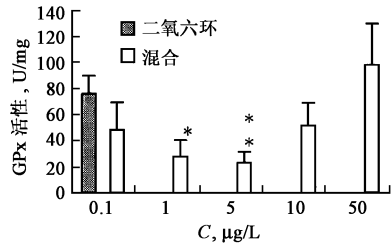


图2 苯并(a)芘和芘的混合物暴露影响梭鱼肝脏 GPx 活性的剂量-效应 ($n=4-9$) (*表示与二氧六环组比较有显著差异)

**表示与二氧六环组比较有极显著差异)
Fig. 2 Dose-effect of GPx activity of liver in *Mugil so-so* exposed to mixture of BaP and pyrene ($n=4-9$)

2.2 BaP 和芘的混合物对 CAT 活性的影响

图3所示, $5\mu\text{g/L}$ 浓度组在暴露2天后 CAT 活性出现诱导, 随后 CAT 活性维持在比对照组略高的水平上; $50\mu\text{g/L}$ 浓度组在暴露一天后出现诱导, 随后 CAT 活性被逐渐抑制. 剂量-效应关系如图4所示, 混合污染暴露4天后, 但各浓度组的 CAT 活性均比对照组高, 表现出诱导现象. 变化率分别为比对照组高出 57.75%、21.17%、27.47%、25.61%和 16.03%. 以变化率为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行对数分析, 得到回归方程为: $y = -5.8281\ln(x) + 36.042$ ($R^2 = 0.7124$).

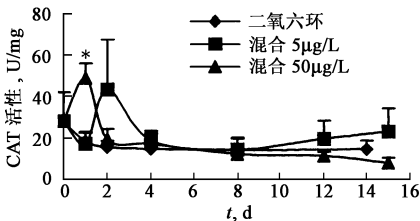


图3 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏 CAT 活性影响的时间-效应 ($n=4-7$) (*表示与二氧六环组比较有显著差异)

Fig. 3 Time-effect of CAT activity of liver in *Mugil so-so* exposed to mixture of BaP and pyrene ($n=4-7$)

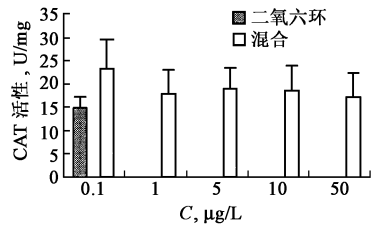


图4 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏 CAT 活性影响的剂量-效应 ($n=4-9$)

Fig. 4 Dose-effect of CAT activity of liver in *Mugil so-so* exposed to mixture of BaP and pyrene ($n=4-9$)

2.3 BaP 和芘的混合物对肝脏 SOD 活性的影响

图5所示, $5\mu\text{g/L}$ 浓度组在暴露8天和12天后似乎产生 SOD 活性的诱导, $50\mu\text{g/L}$ 组呈现先诱导后抑制的变化. 剂量-效应关系如图6所示, 苯并芘和芘的混合物对梭鱼暴露4天后, 主要表现出抑制效应. 各浓度组的 SOD 活性变化率分别为: -76.51%、-70.03%、-68.13%、-77.41%和 -48.76%. 以变化率为纵坐标, 浓度为横坐标, 进行多项式回归分析, 得到回归方程为: $y = 0.0171x^2 - 0.3907x - 71.966$ ($R^2 = 0.8787$).

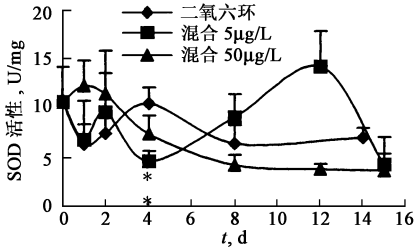


图5 苯并(a)芘和芘的混合物暴露影响梭鱼肝脏 SOD 活性的时间-效应 ($n=4-7$)
(**表示与二氧六环组比较有极显著差异)

Fig.5 Time-effect of SOD activity of liver in *Mugil soiyu* exposed to mixture of BaP and pyrene ($n=4-7$)

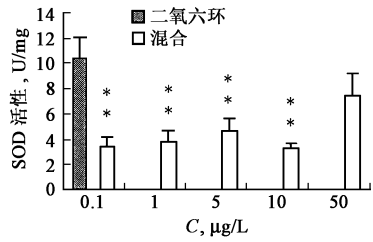


图6 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏 SOD 活性影响的剂量-效应 ($n=4-9$)
(**表示与二氧六环组比较有极显著差异)

Fig.6 Dose-effect of SOD activity of liver in *Mugil soiyu* exposed to mixture of BaP and pyrene ($n=4-9$)

3 讨论

本实验参照 Shugart (1988)^[8] 的方法,用二氧六环作为助溶剂,与空白对照组比较,GPx 活性略有升高,CAT 活性有所下降,SOD 活性处于一定的波动中,与空白组相似.但与同一天的空白组比较,均无显著差异.说明用二氧六环作为助溶剂是可行的.

抗氧化酶中,SOD 是生物体内唯一一种以自由基为底物的酶,可催化 O_2^- 歧化反应生成 H_2O_2 ,而 H_2O_2 可在 CAT 或 GPx 作用下分解为 H_2O 与 O_2 .生物体内羟自由基($^{\circ}OH$)产生的一个重要途径是 Haber-Weiss 反应: $M^{+} + O_2^{-} + H_2O_2 \rightarrow M^{2+} + ^{\circ}OH + OH^{-} + O_2$ (M^{+} 为金属离子),研究表明,生物体内尚无直接清除 $^{\circ}OH$ 的物质,而 $^{\circ}OH$ 活性很高,具极大的危害性,因而 SOD、CAT 和 GPx 对 O_2^{-} 和 H_2O_2 及时清除就显得极为重要,这 3 种酶对于阻断 $^{\circ}OH$ 的生成有重要意义.

暴露于含有多种 PAHs 和其他毒性化学物的沉积物中的尾纹鳉 (*Italus punctatus*),CAT、SOD 活性比参照位点高^[9].从冰岛西南岸的 4 个港口捕获的大杜父鱼 (*Myoxocephalus scorpius*)观察到,在污染位点捕获的鱼 CAT 活性升高,但 GPx 活性却没有升高^[10].污染位点捕获的欧洲黄盖鲈 (*Limanda limanda*)上观察到较高的 SOD、CAT 和 GPx 活性^[11].Peter 等在欧洲沙丁鱼 (*Sardina pilchardus*)观察到相似的结果,即越离开海岸(污染主要是 PCBs 和 PAHs),SOD、CAT 活性越下降^[12].这与在欧洲黄盖鲈肝脏中观察到的一致^[10],但欧洲黄盖鲈肝脏抗氧化酶的活性在离海岸最远处的位点又重新升高.从污染水域捕获的鲮鱼 (*Mugil sp.*)比未受污染的鲮鱼肝脏 SOD、CAT 和 GPx 活性均显著升高^[1];冯涛等将大弹涂鱼 (*Bolophthalmus pectinirostris*)暴露于高浓度的 BaP,随着暴露时间的延长和暴露浓度的增加,其肝脏 SOD 活性和 GSH 含量被显著诱导,而 CAT 活性和 GPx 活性则被显著抑制^[13].

本实验的结果显示,BaP 和芘的混合物暴露对 SOD 和 GPx 的作用以抑制为主,出现诱导的时间较短.高浓度 ($50 \mu\text{g/L}$) 组对抗氧化酶活性出现诱导的时间比低浓度组 ($5 \mu\text{g/L}$) 要早,低浓度组在暴露早期 SOD 和 GPx 活性下降,我们认为可能是因为低浓度下,短期暴露尚未对酶活性产生诱导,却对酶蛋白产生了破坏或消耗所致;SOD 和 GPx 在暴露情况下,活性的诱导和抑制在时间上有一定的同步性,CAT 与 SOD、GPx 的活性变化则没有同步性,Livingstone 等在沙丁鱼 (*S. pilchardus*) 上观察到 SOD 和 CAT 的影响模式不完全相同^[10],因为 O_2^{-} 的歧化反应并不是 H_2O_2 的唯一来源, H_2O_2 还可从氨基酸或细胞色素 P450 氧化酶激活产生.在我们的实验中,暴露早期 CAT

活性表现出诱导现象, 随着暴露时间的延长, CAT 活性下降, 在高浓度组已经出现抑制效应. 根据我们的结果以及前人的结果, 可总结出在污染情况下, 抗氧化酶活性可能诱导升高, 也可能受到抑制, 这也说明污染物对鱼类抗氧化酶活性的影响模式比较复杂, 还需要进一步的深入研究. 但无论其活性是增加还是下降, 均表示机体内活性氧大量增加, 并已扰乱机体抗氧化防御系统的正常功能, 而抗氧化酶活性下降则提示可能已经受到较严重或较长时间的污染. 在应用抗氧化酶活性进行海洋环境监测时, 不能仅依据某一种抗氧化酶的活性, 而是应该将几种抗氧化酶甚至其他的生物标志物结合起来分析.

参考文献:

- [1] 余 群, 郑微云, 翁 妍, 等. 0[#]柴油水溶性成分对真鲷幼体抗氧化酶活性的影响[J]. 环境科学学报, 2000 (增刊): 71—75
- [1] Rodriguez-Ariza A, Peinado J, Pueyo C, *et al.* Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas[J]. *Can J Fish Aquat Sci.* 1993, 50(12): 2568—2573
- [2] Hasspieler B M, Behar J V, Carlson D B, *et al.* Susceptibility of channel catfish (*Ictalurus punctatus*) and brown bullhead (*Ameiurus nebulosus*) to oxidative stress: a comparative study[J]. *Aquat Toxicol.* 1994, 28(1-2): 53—64
- [3] Petrivalsky M, Machala M, Nezveda K, *et al.* Glutathione dependent detoxifying enzymes in rainbow trout liver: Search for specific biochemical markers of chemical stress[J]. *Environ Toxicol Chem.* 1997, 16(7): 1417—1421
- [4] 赵云英, 马永安. 天然环境中多环芳烃的迁移转化及其对生态环境的影响[J]. *海洋环境科学.* 1998, 17(2): 68—72
- [5] 荣征星, 刘慧中, 鲍景奇, 等. 小鼠全血中谷胱甘肽过氧化物酶活力的微量测定法[J]. *生物化学与生物物理进展.* 1994, 21(4): 362—366
- [6] 徐镜波, 袁晓凡, 郎佩珍. 过氧化氢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
- [7] 郭敬亮, 姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组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
- [8] Shugart L R. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding[J]. *Aquatic Toxicology.* 1988, 13: 43—52
- [9] Di Giulio R T, Habig C, Gallagher E P. 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
- [10] Stephensen E, Svavarsson J, Sturve J, *et al.* Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquatic Toxicology* 48: *scorpius*, caught in four harbours on the southwest coast of Iceland[J]. *Aquatic Toxicology.* 2000, 48: 431—442
- [11] Livingstone D R, Archibald S, Chipman J K, *et al.* Antioxidant enzymes in liver of the dab (*Limanda limanda*) from the North Sea[J]. *Mar Ecol Prog Ser.* 1992, 91: 97—104
- [12] Peters L D, Porte C, Allaiges J, Livingstone D R. 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of Sardine (*Sardina Pilchardus*) from the North coast of Spain[J]. *Marine Pollution Bulletin.* 1994, 28(5): 299—304
- [13] 冯 涛, 郑微云, 洪万树, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统的初步研究[J]. *海洋科学.* 2000, 24(5): 27—30