

苯并(a)芘和芘暴露对梭鱼肝脏超氧化物歧化酶活性的影响

王重刚¹, 余 群², 郁 昂², 陈 荣², 郑微云²

(1. 厦门大学 生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学 环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘 要: 在实验生态条件下, 浓度范围 0.1~50 μ g/L 的苯并(a)芘和芘的短期暴露(7 d), 50 μ g/L 浓度组造成梭鱼肝脏 SOD 活性先抑制后诱导的效应; 5 μ g/L 浓度在 7 d 的暴露中, SOD 活性未出现诱导而是抑制; 同样在 50 μ g/L 浓度下, 苯并(a)芘暴露 4 d 后 SOD 活性出现诱导, 而芘在暴露 7 d 后才出现诱导, 这间接反映了苯并(a)芘和芘的毒性大小。这些结果说明梭鱼肝脏 SOD 活性与苯并(a)芘和芘暴露有一定的相关性, 可以作为海洋环境多环芳烃污染监测的一种生物标志物。

关键词: 苯并(a)芘; 芘; 超氧化物歧化酶; 梭鱼

中图分类号: Q593 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2002)04-0010-04

Effect of benzo(a)pyrene and pyrene exposure on hepatic superoxide dismutase in *Mugil so-iuy*

WANG Chong-gang¹, YU Qun², YU Ang², CHEN Rong², ZHENG Wei-yun²

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2 Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The effects of benzo(a)pyrene and pyrene exposure in a short period of time (7 days) on hepatic Superoxide dismutase (SOD) activity in *Mugil so-iuy* were studied at concentration of 0.1~50 μ g/L, in experimental condition. The results showed that the SOD activities were inhibited at first and then induced in the fishes exposed to concentration of 50 μ g/L. The SOD activity was induced in the fishes exposed to BaP at concentration of 50 μ g/L for 4 days while induced in the fishes exposed to pyrene at same concentration for 7 days. This indicated indirectly the toxicities of BaP and pyrene. These results suggested that the hepatic SOD activity in *Mugil so-iuy* have quite relativity to BaP or pyrene exposure, the SOD activity could be one of the biomarkers applied to monitoring marine PAHs contamination.

Key words: benzo(a)pyrene; pyrene; superoxide dismutase; *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, 其中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。实验暴露或现场采样都证实体外化学物刺激导致氧化基团产生和脂质过氧化以及抗氧化酶活性的变

化^[1,2]。抗氧化酶存在于所有生物的组织, 其功能是清除氧自由基。超氧化物歧化酶[superoxide dismutase(SOD)]是生物体内一种以自由基为底物的酶, 它转化 O_2^- 为 H_2O_2 , 抗氧化酶作为鱼类氧化胁迫的生物标志物已有报道^[3~5]。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^[4]。赵云英等指出, 靠近油田

收稿日期: 2001-11-05, 修改稿收到日期: 2001-12-12

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, 福建厦门人, 副教授, 工学博士, 主要从事鱼类生理和生态毒理研究。

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 $1 \mu\text{g/L}$ ^[6]。为此, 我们选择常见的两种 PAHs——苯并(a)芘(BaP)和芘作为污染物, 观察它们在 $0.1 \sim 50 \mu\text{g/L}$ 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 so-iuy*)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^[7]。因此, 采用梭鱼作为环境污染的检测种类有实际意义。

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 J2-Mc 型冷冻离心机。BaP 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

苯并(a)芘和芘先用二氧六环(dioxane)配制成一定浓度的储备液, 避光于 40°C 保存。实验时用沙滤海水分别配制为 $0.1, 1.0, 10, 20, 50 \mu\text{g/L}$ 的浓度。梭鱼捕自福建省平潭县竹屿乡, 体长(13.5 ± 2.1)cm, 体重(26.8 ± 7.1)g ($n=45$)。实验鱼先在清洁沙滤海水中暂养 7 d, 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 $13 \sim 15.5^\circ\text{C}$, 盐度 $15 \sim 17$ 。空白对照为不加助溶剂和毒物, 二氧六环对照只加二氧六环, 它们的体积分数均为 0.1% 。

1.3 取样和样品预处理

分别于暴污后一定天数取样, 取出肝脏于液氮中保存。测定时, 先加 4 倍体积预冷的匀浆液于玻璃匀浆器中匀浆, 然后立即进行离心($10\ 000 \text{ r/min}$, 30 min), 取上清液测定 SOD 的活性, SOD 酶采用邻苯三酚自氧化法。定义 250°C 下, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化率达

50% 时所需酶量为一个 SOD 酶比活力, 表示为 U/mg 。上清液中的蛋白含量用考马斯亮蓝法测定。

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 结果与讨论

2.1 BaP、芘暴露对肝脏 SOD 活性的时间—效应关系

如图 1 所示, BaP $5 \mu\text{g/L}$ 浓度组在 7 d 的暴露期间 SOD 活性比对照组下降, $50 \mu\text{g/L}$ 浓度组暴露 4 d 后, SOD 活性出现诱导。表现出先抑制后诱导的作用模式。

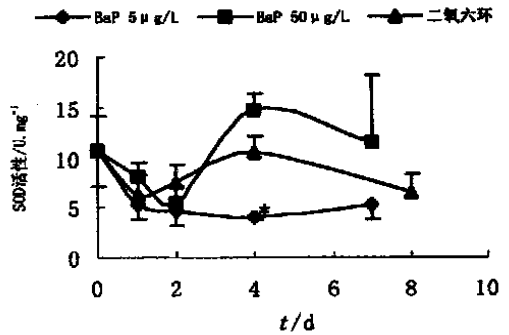


图 1 苯并(a)芘暴露对梭鱼肝脏 SOD 活性影响的时间效应

* 表示与二氧六环对照组比较有显著差异

Fig. 1 Time-response of hepatic SOD activity in *Mugil so-iuy* exposed to BaP

如图 2 所示, 芘 $5 \mu\text{g/L}$ 浓度组造成 SOD 活性的抑制, $50 \mu\text{g/L}$ 浓度组暴露 7 d 后, SOD 活性出现显著诱导。而 $5 \mu\text{g/L}$ 浓度组暴露 7 d 后, SOD 活性尚未出现诱导。

2.2 苯并(a)芘和芘暴露影响梭鱼肝脏 SOD 活性的剂量—效应关系

如图 3 所示, 苯并(a)芘暴露 4 d 后, 肝脏 SOD 活性受到抑制, 而 $50 \mu\text{g/L}$ 浓度组则出现诱导现象。各浓度组的 SOD 活性变化率分

别为-45.98、-26.14、-49.09、-69.96 和 41.3%。以变化率为纵坐标,浓度为横坐标,进行多项式回归分析,得到的回归方程为: $y = 0.120 1x^2 - 4.514 3x - 33.383$, ($r^2 = 0.957 7$)。芘暴露 4 d 后,肝脏 SOD 活性受到抑制,各浓度组的 SOD 活性变化率分别为-62.47、-52.91、-46.74、-80.63 和-37.84%。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: $y = 0.053 4x^2 - 2.378 4x - 52.735$, ($r^2 = 0.573 7$)。

环作为助溶剂,与空白对照组比较,SOD 活性变化基本上一致,并且无统计学差异。说明用二氧六环作为助溶剂是可行的。

Di Giulio 等将叉尾鮠 (*Italurus punctatus*) 暴露于含有多种 PAHs 和其他毒性化学物的沉积物中,观察到 SOD 活性比参照位点高,从胆汁中分析出较高浓度的菲 (phenanthrene) 和苯并(a)芘的代谢物^[9]。Livingstone 等^[2] 在污染位点的欧洲黄盖鲈上观察到较高的 SOD 活性。Livingstone 等^[10] 将欧洲黄盖鲈暴露于含有 PAHs 和 PCBs 的沉积物中,暴露 80 d 后,SOD 活性在污染条件下较高,但认为原因是参照条件下的活性下降。暴露 140 d 后,在污染和参照条件下的抗氧化酶活性都降低到水平,他们认为部分原因是长期实验的一般压力所致,也可能是季节的影响。Peter 等^[11] 在沙丁鱼 (*Sardine pilchardus*) 观察到相似的结果,即越离开海岸(污染主要是 PCBs 和 PAHs),SOD 活性越下降。这与在欧洲黄盖鲈肝脏中观察到的一致^[2],但是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。Rodry' guez-Ariza 等^[3] 报道从污染水域捕获的鲻鱼 (*Mugil sp.*) 比未受污染的鲻鱼肝脏 SOD 活性均显著升高;Chipman 等^[12] 也报道了暴露于多环芳烃和多氯联苯等外源化学物的欧洲鲈 (*Pleuronectes platessa*) 抗氧化酶活性的诱导;冯涛等^[13] 将大弹涂鱼 (*Boleophthalmus 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 活性被显著诱导。

本实验的结果基本上显示 BaP 和芘的暴露对肝脏 SOD 活性主要表现先抑制后诱导的效应,BaP 5 μg/L 组在暴露 7 d 后尚未出现诱导,在暴露期间 SOD 活性受到抑制,BaP 50 μg/L 组在暴露 4 d 后,SOD 活性出现诱导;芘暴露与 BaP 的相似,5 μg/L 组在 7 d 的暴露期间 SOD 活性受到抑制,50 μg/L 组暴露 7 d 后 SOD 活性出现明显诱导。从结果看到,高浓度组比低浓度组在较短的暴露时间即出现

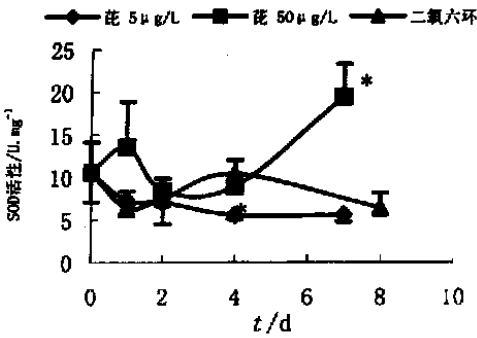


图 2 芘暴露对梭鱼肝脏 SOD 活性影响的时间效应

* 表示与二氧六环对照组比较有显著差异

Fig. 2 Time-response of hepatic SOD activity in *Mugil so-iuy* exposed to pyrene

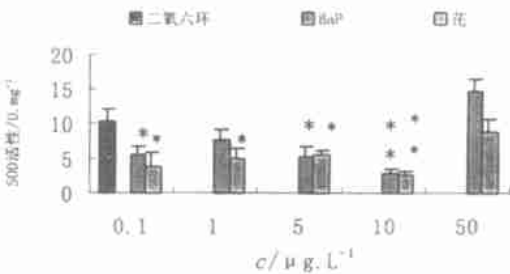


图 3 苯并(a)芘和芘暴露对梭鱼肝脏 SOD 活性影响的剂量效应

* 表示与二氧六环对照组比较有显著差异

** 表示与二氧六环对照组比较有极显著差异

Fig. 3 Dose-effect of hepatic SOD activity in *Mugil so-iuy* exposed to BaP or pyrene

2.3 有关 SOD 活性变化的探讨

本实验参照 Shugart^[8] 的方法,用二氧六

SOD 活性的诱导, 而低浓度组可能需要更长的暴露时间才会产生 SOD 活性的诱导, 而在出现诱导之前, 酶活性受到抑制可能是因为酶蛋白受到毒物的作用结构破坏或消耗所致。同样在 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度下, 苯并(a)芘暴露 4 d 后 SOD 活性出现诱导, 而芘在暴露 7 d 后才出现诱导, 这间接反映了苯并(a)芘和芘的毒性大小。这些结果说明梭鱼肝脏 SOD 活性与苯并(a)芘和芘暴露有一定的相关性, 能够作为海洋环境多环芳烃污染监测的一种生物标志物。

3 结论

浓度范围 0.1 ~ 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的苯并(a)芘和芘的短期暴露, 梭鱼肝脏 SOD 活性主要表现为抑制效应; 高浓度(50 $\mu\text{g}/\text{L}$)组的 SOD 活性表现为先抑制后诱导; 同样在 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 浓度下, BaP 暴露引起 SOD 活性出现诱导的时间比起芘暴露的要早, 这间接反映了 BaP 的毒性比芘的毒性大。

参考文献:

[1] WINSTON G W, Di GIULIO R T. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms [J]. *Aquat Toxicol*, 1991, 19: 137-161.

[2] 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.

[3] 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), 2 568-2 573.

[4] 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.

[5] 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): 1 417-1 421.

[6] 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.

[7] 刘发义, 孙凤. 石油污染对梭鱼肝脏混合功能氧化酶的影响 [J]. *海洋环境科学*, 1991, 10(3): 49-51.

[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. Indices of oxidative stress as biomarkers for environmental contamination [A]. M YAES M A, BARRON M G. *Aquatic toxicology and risk assessment* [C]. Philadelphia PA: American Society for Testing and Materials Fourteenth volume ASTM STP 1124 1991. 15-31.

[10] LIVINGSTONE D, PHILIPPELEMAIRW A, PETERS M L. Pro-oxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1993, 26(11): 602-606.

[11] PETERS L D, PORTE C, ALBAIGES J, *et al.* 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.

[12] CHIPMAN J K, MARSH J W, LIVINGSTONE D R, *et al.* Genetic toxicity in the dab (*Limanda limanda*) from the Normal Sea [J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1992, 91: 121-126.

[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): 27-36.