

## 综 述

## 监测流动水体污染程度的生物标志物研究进展

包晓东 朱金勇 卓慧钦 方财王 黄慧英 黄河清

(厦门大学生命科学学院分析测试中心, 厦门, 361005)

**摘 要** 利用生物监测流动水体污染程度一直是环境科学研究领域中的热点课题之一。本文综述酶、蛋白质和核酸等生物标记物在监测流动水体污染程度方面的研究进展, 描述铁蛋白反应器监测流动海水中重金属离子污染的特点, 并介绍近年来蛋白组学技术在筛选监测环境污染程度生物标志物中的应用进展。

**关键词** 生物标志物 污染监测 流动水体 研究进展

## 1 前 言

流动水体污染程度的连续监测技术一直是环境科学研究的热点课题之一。流动水体污染监测方法可以分为两大类, 即理化监测(仪器监测)和生物监测。常用的理化监测方法有原子吸收分光光度法、氢化物发生-原子荧光法、电感耦合等离子体原子发射光谱法(ICP-AES)<sup>[1]</sup>、质子激发 X 射线荧光光谱法(PIXE)、全反射 X 荧光法(TRXRF)、气相色谱法、离子选择电极法(ISE)、电感耦合等离子体质谱法(ICP-MS)、阳极溶出伏安法(ASV)、石墨炉原子吸收光谱法(GFAAS)<sup>[2,3]</sup>等。现代仪器分析方法有很高的精确度、重复性和灵敏度, 可快速而灵敏地分析金属污染物的种类和浓度, 但也存在不足之处: 只能反映瞬时、局部的污染状况, 无法反映多种污染物所形成的整体污染效应。

由于影响流动水体的有毒物质其生化反应呈现复杂性, 多数情况下不能用单纯的物理化学指标直接确定其后果, 因而理化监测无法直观地反映和评价污染源对生物体的危害程度, 难于胜任对流动水域总体污染指标的连续监测, 作出污染物对生物体危害性的评价<sup>[4]</sup>。

近年来, 许多国际组织和环保机构已经充分认识到, 单独基于物理、化学分析手段所获得的信息,

不足以反映污染物对生物体包括人类在内的危害程度。因此, 基于生物效应的监测方法逐渐成为环境质量评价的主要参考依据之一, 并在近 10 几年来得到迅速发展。生物监测技术利用生物个体、种群或群落对水体环境污染或变化所产生的反应, 阐明环境污染状况, 从生物学角度为环境质量监测和评价提供证据。

水生生物与其生存环境是相互依赖、相互影响的动态系统, 水体污染对水生生物产生威胁, 同时生物也会做出相应的反应和变化。因此, 水生生物的反应和变化可作为水环境评价的良好指标。目前广泛使用的污染指示生物有藻类、藤壶<sup>[5]</sup>、浮游生物、软体动物、甲壳类(贻贝、牡蛎等)<sup>[6]</sup>以及各种鱼类, 尤其是各种底栖鱼类, 例如牙鲆和鲈类<sup>[7,8]</sup>。

生物标志物(biomarker)的优点是, 能了解污染物在时间空间上的累积效应; 可确定环境污染物暴露和风险的对应关系, 通过生物反应的特异性, 从机理上了解对生物体的危害, 建立暴露和风险间的因果关系; 能表现混合污染物之间毒性相互作用的联合效应<sup>[9]</sup>。

此外, 生物标志物往往反映分子、细胞水平上的生化变化, 可解释污染物毒性的分子机理, 提供污染效应的早期预警。本文侧重于介绍生物标志物监测流动水体中重金属及有机磷农药污染程度及评价污

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No. 40276033); 厦门大学预研基金(No. 2004xdex207)。

作者简介: 包晓东, 男, 硕士研究生。

联系人: 黄河清, 男, 教授, 博士生导师, E-mail: hqhuang@xmu.edu.cn

染物对水生动物生存危害性的研究进展。

## 2 酶蛋白标志物

早在上世纪 50 年代末, Weiss 就发现鱼脑或无脊椎动物中的乙酰胆脂酶可用于评价流动水体中的有机磷含量。一旦体内的乙酰胆脂酶活性被有机磷化合物抑制达到 50% 以上, 即可对生物生存产生威胁。近 10 几年来, 乙酰胆脂酶神经传导抑制剂的特异性标志物已被用于监测流动水体中有机农药含量及危害性<sup>[10]</sup>。大量实验结果证实, 有机氯农药对水生生物包括水生昆虫、乌贼、虾以及鱼类器官中的腺嘌呤核苷三磷酸酶(ATPase)等有抑制作用<sup>[11, 12]</sup>。流动水体中的许多金属离子能以不同方式与细胞中酶的特定底物及活性产物产生极强亲和力, 干扰酶催化反应过程, 或直接抑制酶活性。因此, 通过分析生物体内代谢过程中乳酸脱氢酶、肌酸磷酸激酶、谷胱甘肽过氧化酶和超氧化物歧化酶<sup>[11]</sup>的活性, 即可获得各类重金属离子污染程度的相关信息。此外, 镉离子能强烈抑制鱼肝、肾和鳃中谷草转氨酶和谷丙转氨酶的活性, 因此这些酶也可以作为指示物, 反映流动水体中镉的污染程度。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)广泛存在于原生动、真菌、植物、无脊椎动物和脊椎动物中, 对二价金属离子有极高亲和力, 是最适合于反映金属 Cd、Cu、Zn 和 Hg 污染的生物标志物之一。如大鼠经镉盐处理后, 其大脑中的 MT 水平会增加<sup>[13]</sup>。MT 的重要特点是可在转录水平上被环境中重金属诱导合成。MT 的水平与环境中金属离子浓度成正对应关系, 反映出环境中重金属污染程度, 因而成为一种重要的分子生物标志物<sup>[14]</sup>。然而研究发现, 除了金属之外, 其他一些因素也可以诱导合成 MT。Hylland 等人<sup>[15]</sup>发现, MT 和细胞色素 P450 的变化与季节、性别和个体是否成熟有关, Rotchel 等<sup>[16]</sup>的研究也得到类似结果。

此外, 体内热休克蛋白(HSF70)<sup>[17]</sup>和转铁蛋白<sup>[18]</sup>含量增加与动物所接触环境中的镉盐水平呈现出正对应关系, 这两种蛋白质适合于作为监测流动水体中镉盐污染程度的生物标志物。

## 3 细胞与核酸标志物

污染物的积累、代谢和毒性都是在细胞中发生作用的。细胞溶酶体胀大、溶酶体膜不稳定是污染

在细胞水平上的生物标志物。溶酶体大小与环境污染程度有对应关系, 软体动物消化细胞中溶酶体胀大幅度已作为监测环境胁迫的标志物<sup>[19, 20]</sup>。溶酶体体积变化也是世界卫生组织(WHO)和粮食及农业组织(FAO)用来评价环境质量的方法之一。

各种化学或物理因子对 DNA 结构与功能的破坏称为基因毒性。许多化学致癌和致突变物质可以引起 DNA 损伤, 有毒物质与 DNA 形成共价结合物, 是化学致癌/致突变过程启动的关键步骤。所以, DNA 损伤是一项可以用来评价环境化学物质遗传毒性的参数, 是生物分子标志物研究的重要内容之一<sup>[21]</sup>。

## 4 铁蛋白和铁蛋白反应器

铁蛋白是一种较为特殊的蛋白质, 其分子结构由蛋白质外壳、铁核和三相隧道组成。大量研究证实, 铁蛋白具有络合及储存重金属离子, 尤其是二价过渡金属离子( $M^{2+}$ )的能力, 此外还具有储存有机磷、苯乙烯基、中性红等多种小分子的能力。Mann 实验室曾把磁性物质组装到脱铁核铁蛋白中, 并报道脱铁核的铁蛋白能将三氧化二锰储存在铁蛋白的蛋白壳内, 最终形成锰核<sup>[22, 23]</sup>。Hainfeld<sup>[24]</sup>成功地将放射性铀( $^{238}U$ )组装到脱铁核的铁蛋白中, 每个铁蛋白分子可储存多达 800 个 $^{238}U$ , 并形成稳定的铀核。Watt 等人把腺嘌呤核苷三磷酸三钠组装到铁蛋白壳内, 并认为铁蛋白具有储存磁性物质和有机磷化合物的能力。

铁蛋白已经用来构建铁蛋白反应器, 进行环境检测。由透析袋、脱铁核铁蛋白、磁力搅拌系统、酸度计、恒温系统构成的铁蛋白反应器, 可以捕获和储存水体中微量有机小分子, 如外加扫描电位, 则不仅能提高捕获有机小分子的数量, 而且还能加速储存速率<sup>[1, 25]</sup>。经改造后的铁蛋白反应器能提高有机磷农药的储存量<sup>[26]</sup>。Huang 等<sup>[1]</sup>利用铁蛋白反应器监测流动海水中有有机磷农药的含量, 并拟用于海底水质中超微量农药含量监测及迁移规律与过程的研究。Kong 等<sup>[4, 27-29]</sup>构建了一种简易型铁蛋白反应器, 直接用于监测厦门内海流动水体中重金属离子( $Cd^{2+}$ ,  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ), 评价重金属离子的污染程度。

为了探索和揭示铁蛋白储存和释放小分子的生物学机制, 人们进行了大量理论研究。2002 年,

Park 等<sup>[30]</sup> 选用高分辨率双向凝胶电泳技术分离人类铁蛋白轻链亚基,并用胰蛋白酶消化技术和 MALDI-TOF 质谱技术研究该亚基的肽指纹图谱和轻链亚基一级结构。黄河清等人<sup>[31]</sup> 用 MALDI-TOF 质谱技术研究鱼肝铁蛋白蛋白壳外表层电荷分布,发现蛋白壳存在着高密度的正电荷区域,并提出了电荷分布模型和亚基解离方式与途径。这些研究为正确理解铁蛋白是一种非电中性蛋白质提供了理论依据和实验证据,同时为铁蛋白反应器在环境检测中的应用提供了科学根据。

## 5 蛋白质组学技术的应用

蛋白质组学以其独特的在整体水平上研究生命现象的特点引起环境工作者的重视,并被引入环境污染监测和污染机理研究,在环境生物学和生态毒理研究中发挥着越来越重要的作用,逐渐形成了一门新的蛋白质组学分支——环境蛋白质组学(environmental proteomics)。

环境蛋白质组学的研究内容主要包括以下几个方面:(1) 研究蛋白质表达与环境关系,探讨环境因子引发的生物反应途径,在整体蛋白质水平上研究环境因子作用机制;(2) 发现污染物毒害作用的蛋白标志物并应用于污染监测和危害评估,提供早期警报;(3) 建立环境因子与生物学反应的相关数据库,收集环境接触与疾病相关的信息,将毒理学、病理学与蛋白质组学分析结合起来。目前的重点主要是,应用蛋白质组学技术研究外源物质对生物体的毒害机制,筛选特定蛋白质作为外源物质危害性评价的生物标志物<sup>[32-35]</sup>。

在传统的毒理研究中,对外源物质毒害作用的研究通常以动物模型为基础,进行包括组织病理学和生物化学在内的各种研究。这些技术虽然已经较为成熟,但费时费力,缺乏高灵敏度。对毒性机制的探索很难在较短时间或用体外分析方法完成,而利用蛋白质组学研究手段可以使这一过程大大简单化。目前应用蛋白质组学技术进行外源毒物毒性研究的方法是,通过比较特定细胞、组织或器官在接触不同外源物质时蛋白质发生的变化,对发生变化的蛋白质进行鉴定。

Meiller 等<sup>[36]</sup> 用蛋白质组学分析技术,发现东方牡蛎(eastern oyster)在不同浓度锌盐条件下,鳃组织中表达了 7 种差异蛋白质,而铜和镉却没有出

现相似的效应。Marrero 等<sup>[37]</sup> 采用蛋白质组学技术比较了革兰氏阴性菌 *Enterobacter liquefaciens* strain G-1 在高浓度 Co(II) 条件下蛋白质组的变化,检测到 13 个蛋白点有明显变化,通过肽指纹图谱(PMF)和串连质谱(MS/MS)技术鉴定了 12 个不同蛋白质点,其中有 10 个与细胞抗氧化机制有关。Sharma 等<sup>[38]</sup> 研究了用 BPM C ( $\alpha$ -see butylphenyl methylcarbamate) 处理过的水稻 *Nilaparvata lugens*,发现 22 个蛋白质有不同表达,其中 10 个表达增加,8 个降低,4 个出现特异性。Hogstrand 等<sup>[39]</sup> 采用蛋白质芯片技术研究了虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)在亚致死剂量 Zn 环境下鳃组织所发生的反应。结果表明,有 7 种蛋白质发生了变化。近期,本文作者采用蛋白质组技术研究牙鲈暴露在镉盐条件下的变化,采用 PMF 技术对牙鲈大脑、鳃和肝脏所表达的差异蛋白质逐一鉴定,发现转铁蛋白、热休克蛋白(70S)和钙调节蛋白均可以作为流动海水中镉污染程度监测的标志物,监测效果比现有的其他生物监测技术显示出独特优势,有潜在的应用前景。预计今后蛋白质组学技术将在环境污染监测和评价污染物对人类及水生动物危害性方面起极其重要的作用。

### 参考文献

- 1 Huang H Q, Kofford M, Simpson F B et al. *J Inorg Biochem*, 1993, 52(1): 59- 75
- 2 Huang H Q, Lin Q M, Kong B et al. *J Protein Chem*, 1999, 18(4): 497- 504
- 3 Polec K, Garcia-Arribas O, Perez-Calvo M et al. *J Anal At Spectrom*, 2000, 15 (10): 1363- 1368
- 4 Huang H Q, Lin Q M, Lou Z B. *J Protein Chem*, 2000, 19(6): 441- 447
- 5 Rainbow P S, Blackmore G. *Mar Environ Res*, 2001, 51(5): 441- 463
- 6 Abdallah A T, Moustafa M A. *Environ Pollut*, 2002, 116(2): 185- 191
- 7 Goksoyr A, Beyer J, Egaas E. *Mar Pollut Bull*, 1996, 33: 36- 45
- 8 Hylland K, Sandvik M, Skare J U. *Mar Environ Res*, 1996, 42: 223- 227
- 9 Besten P J. *Mar Environ Res*, 1998, 46: 253- 256
- 10 Yadwad V B, Kallapur V L, Basalingappa S. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1990, 44 (4): 585- 589
- 11 Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F. *Environ Int*,

- 2002, 27 (8): 673- 679
- 12 McCloskey J T, Oris J T. *Aquat Toxicol*, 1993, 24: 207- 218
- 13 Mendez Armenta M, Villeda Hernandez J, Barros-Moguel R et al. *Toxicol Lett (Amst)*, 2003, 144 (2): 151- 157
- 14 林梵, 任宏伟, 茹炳根. *北京大学学报(自然科学版)*, 2001, 37(6): 779- 784
- 15 Hylland K, Nissen-Lie T, Christensen P G et al. *Mar Environ Res*, 1998, 46: 51- 55
- 16 Rotchell J M, Clarke K R, Newton L C et al. *Mar Environ Res*, 2001, 52 (2): 151- 171
- 17 Tedengren M, Olsson B, Bradley B et al. *Hydrobiologia*, 1999, 393: 261- 269
- 18 Carginale V, Capasso C, Scudiero R et al. *Gene*, 2002, 299: 117- 124
- 19 Porte C, Sole M, Borghi V et al. *Biomarkers*, 2001, 6 (5): 335- 350
- 20 Giamberini L, Cajaville M P. *Environ Res*, 2005, 98 (2): 210- 214
- 21 Van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2003, 13 (2): 57- 149
- 22 Douglas T, Dickson D P E, Betteridge S et al. *Science*, 1995, 269: 54- 57
- 23 Meldrum F C, Wade V J, Nimmo D L et al. *Nature*, 1991, 349, 684- 687
- 24 Hainfeld J F. *PNAS USA*, 1992, 89: 11064- 11068
- 25 黄河清, 林庆梅, 肖志群等. *生物物理学报*, 2000, 16: 39- 47
- 26 黄河清, 吴楠, 林庆梅等. *生物物理学报*, 2001, 17: 554- 559
- 27 林庆梅, 乔玉欢, 黄河清. *厦门大学学报(自然科学版)*, 1999, 43: 393- 397
- 28 Kong B, Huang H Q, Lin Q M. *J Protein Chem*, 2003, 22: 61- 71
- 29 Kong B, Huang H Q, Lin Q M et al. *Appl Biochem Biotech*, 2005, 126: 133- 148
- 30 Park K S, Kim H, Kim N G et al. *Hepatology*, 2002, 35: 1459- 1466
- 31 黄河清, 孔波, 林庆梅. *生物物理学报*, 2002, 18: 99- 103
- 32 Kennedy S. *Biomarkers*, 2002, 7(4): 269- 290
- 33 Wetmore B A, Merrick B A. *Toxicol Pathol*, 2004, 32 (6): 619- 642
- 34 Bandara L R, Kennedy S. *Drug Discov Today*, 2002, 7 (7): 411- 418
- 35 Kroger M, Hellmann J, Toldo L et al. *ALTEX*, 2004, 21 (Suppl 3): 28- 40
- 36 Meiller J C, Bradley B P. *Mar Environ Res*, 2002, 54: 401- 404
- 37 Marrero J, Gonzalez L J, Sanchez A et al. *Proteomics*, 2004, 4 (5): 1265- 1279
- 38 Sharma R, Komatsu S, Noda H. *Insect Biochem Mol Biol*, 2004, 34: 425- 432
- 39 Hogstrand C, Balesaria S, Glover C N. *Comp Biochem Physiol B*, 2002, 133: 523- 535

收稿日期: 2005- 09- 28

**Progress of research on biomarkers for monitoring contamination level of flowing water system.** *Bao Xiaodong, Zhu Jinyong, Zhuo Huiqin, Fang Caiwang, Huang Huiying, Huang Heqing (The Center for Analysis and Testing, School of Life Sciences, Xiamen University, Xiamen, 361005)*

Monitoring the contamination level of flowing water system with biological monitoring techniques is one of the challenging subjects in environmental science. This paper summarises the progress of research on enzyme, cell and nucleic acid as biomarkers for monitoring flowing water system contamination. The characteristics of ferritin reactor in monitoring heavy metal ion contaminants in flowing seawater is described. The application of proteomic techniques in the selection of biomarkers is described also.

### 《分析仪器》编辑部声明

《分析仪器》已入编《万方数据- 数字化期刊群》,《中国核心期刊(遴选)数据库》,《中国期刊网》,《中国学术期刊(光盘版)》,《中国学术期刊综合评价数据库》,《中国科学引文数据库》,《中文电子期刊服务(CEPS)》,本刊所发稿酬已含以上各数据库期刊文章著作权使用费。特此声明。

《分析仪器》编辑部