

学 号: 9734002 UDC:

学校编号: 10384 分类号:      密级

## 学 位 论 文

# 苯并(a)芘对大弹涂鱼的毒性效应研究

冯 涛

指导老师: 郑微云 教授 厦门大学环境科学研究中心

申请学位级别: 博 士 专业名称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2000 年 5 月 答辩日期: 2000 年 6 月

学位授予单位: 厦 门 大 学

答辩委员会主席: 李少菁 教 授

评 阅 人: 翁恩琪 教 授

郭祥群 教 授

张玉生 研究员

2000 年 6 月



## 摘 要

在实验生态条件下,研究了 0.05、0.2、0.5mg/L 等三个不同浓度的苯并(a)芘 (BaP) 暴露后大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)肝脏解毒系统和抗氧化防御系统的变化、DNA 损伤及对细胞超微结构的影响,分别于污染的 2h、6h、12h、24h、36h、3d 和 7d 取样。解毒系统检测了第一阶段解毒酶-----芳烃羟化酶 (AHH) 和第二阶段解毒酶-----谷胱甘肽硫转移酶 (GST),抗氧化防御系统检测了抗氧化酶-----超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx)、过氧化氢酶 (CAT) 及水溶性小分子抗氧化剂-----还原型谷胱甘肽 (GSH),DNA 损伤以 DNA 单链断裂作为检测指标,细胞超微结构则主要观察细胞器的变化。

1) 关于 BaP 暴露后大弹涂鱼肝脏解毒系统参数的变化,结果显示:随 BaP 暴露时间的延长和暴露浓度的升高,AHH 活性总的表现为显著的诱导作用 ( $P<0.05$ ),而 GST 活性在整个实验周期中未被显著诱导 ( $P>0.05$ )。AHH 活性的诱导表明机体代谢外源化学物的能力增强,AHH 积极参与机体解毒;高浓度的 BaP 暴露,随时间延长 AHH 活性受到一定程度的抑制,这可能表明外源化学物的大量中间代谢产物已对包括 AHH 在内的生物大分子产生毒害作用,机体代谢外源化学物的能力已有所降低;污染解除后,AHH 活性显著降低,恢复至与对照组相近,表明大弹涂鱼肝脏仍具有较强的生理调节机能,同时也表明 AHH 活性可及时反映环境中 BaP 的水平。以上这些结果表明 AHH 适于作为大弹涂鱼受 BaP 胁迫的生物指标,而 GST 作为生物指标的研究尚需进一步探讨。

2) 关于 BaP 暴露后大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统参数的变化,结果显示:随 BaP 暴露时间的延长和暴露浓度的升高,SOD 活性、GSH 水平被显著诱导 ( $P<0.05$ ),而 GPx、CAT 活性被显著抑制 ( $P<0.05$ ),表明 BaP 代谢产生的大量活性氧已扰乱机体抗氧化防御系统的正常功能。污染解除后,GPx 和 CAT 活性均得到不同程度的恢复,表明大弹涂鱼肝脏仍具有较强的生理调节机能,也表明这些指标不仅能指示 BaP 污染的存在,还能指示污染胁迫的清除。对照组 SOD 活性、GSH 水平随时间延长而显著降低 ( $P<0.05$ ),表明 SOD 活性、GSH 水平易受污染以外的其它因素的影响,因而在研究中应充分考虑到各种可能的影响因素,设置和选择合适的对照组,以对实验结果作出全面正确的分析。以上结果表明,抗氧化防御系统的变化间接反映了环境中氧化污染的存在,有可能作为大弹涂鱼受 BaP 胁迫的生物指标。

3) 关于 BaP 暴露后大弹涂鱼肝脏 DNA 单链断裂程度的改变,结果显示:随 BaP 暴露时间的延长和暴露浓度的升高,DNA 单链断裂程度显著增加 ( $P<0.05$ ),表明 BaP 具有较强的遗传毒性;污染解除后 DNA 单链断裂程度未明显减轻,表明大弹涂鱼 DNA 损伤的修复能力较弱,其损伤水平可反映遗传毒性污染物暴露的累积效应。以上结果表明,DNA 单链断裂适于作为

BaP 遗传毒性的检测指标。

4) 关于 BaP 暴露后大弹涂鱼肝脏细胞超微结构的变化, 结果显示: 暴露于 0.5mg/L BaP 7d 后, 肝脏细胞内的细胞器受到不同程度的损伤, 其中线粒体和内质网是受 BaP 暴露影响最明显的细胞器, 细胞核也受到不同程度的影响, 细胞质中脂滴也增加; 而暴露于 5mg/L BaP 2h, 不仅是线粒体和内质网, 几乎所有的细胞器都受到 BaP 暴露的严重影响, 细胞器严重退化, 细胞结构遭到严重破坏, 并已威胁到生物的生存。以上结果表明, BaP 对生物大分子如酶蛋白、DNA 等造成的损伤已在细胞及亚细胞水平表现出来, 并且 BaP 浓度越高, 这种损伤作用就越严重; 其中线粒体、内质网等细胞器的异常病理变化有可能作为 BaP 暴露的生物标记。

5) 综上所述, 通过对暴露于 BaP 的大弹涂鱼解毒系统 I 期和 II 期酶、抗氧化防御系统成分、DNA 单链断裂程度、细胞超微结构进行测定和观察, 发现 AHH 活力升高、GST 活力未变、SOD 活力诱导、GPx 和 CAT 活力抑制、GSH 含量增加、DNA 单链断裂增加、肝细胞超微结构异常; 初步认为由于 AHH 与 GST 活性未同步发生诱导而导致的 BaP 中间代谢产物的蓄积可能是 BaP 产生毒性效应的重要原因, 而 BaP 代谢过程中产生大量活性氧可能是 BaP 产生毒性效应的另一重要原因; 这些中间代谢产物及活性氧不仅扰乱了解毒系统及抗氧化防御系统的正常功能, 还会攻击其它生物大分子如脂类、蛋白质、DNA 等, 造成进一步的分子损伤, 而具有重要生物功能的线粒体、内质网等亚细胞结构形态的异常可能正是这些生物大分子损伤在细胞超微结构上的反映; 以上这些研究表明在生物大分子及亚细胞水平的多指标综合研究可以更为全面地分析评价 BaP 对生物的各种可能影响。

关键词 苯并(a)芘 大弹涂鱼 解毒系统 抗氧化防御系统 DNA 损伤 超微结构

# 第一章 前言

## 1 生态毒理学研究简述

生态毒理学是七十年代发展起来的一门新兴的边缘学科，主要是研究污染物—环境—机体三者之间的关系以及有毒物质对生物的毒性效应。

早期的生态毒理学研究主要关注对象是污染物，包括污染物在环境中的物理、化学变化，如污染物的组成、浓度、分布、迁移、转化、降解和归宿等；由于生物体具有吸收、累积、转运、代谢转化和排泄污染物的能力，对污染物在生物体中的蓄积和变化也进行了大量的研究。这些研究准确客观地展现了污染物在自然界(包括非生物及生物)中的存在及变化，但仍不能解释以下令人关注的问题：污染物水平达到多高、暴露时间多长会对生物体以至人类产生危害？会产生什么样的危害？当环境中的污染物减少以至消失后，曾经暴露于污染物的生物体健康状况如何？

有毒物质对生物的毒性效应的研究最初是在个体、种群、群落和生态系统水平上进行的，这些研究主要包括：急慢性毒性效应、生长速率及耗氧量等生理指标的变化以及用微宇宙、受控野外生态系统和实验生态系统研究污染物对各种生物种群或群落的影响。这些在个体或系统水平上的研究可较好地反映污染物对生态系统整体水平上的影响，比较接近自然状况，对污染物的评价和筛选起到了重要作用，但在系统水平上的研究耗时长、花费大，并且生物死亡、生长受阻或繁殖受影响及最终导致生态系统结构破坏已是污染物造成的晚期影响或结果。

毒理学研究者一致认为，污染物对生态系统的作用，无论最终的影响多复杂或后果多严重，其最早期的作用必然是从对个体内的分子水平上开始的，然后逐步在细胞→器官→个体→种群→群落→生态系统各个水平上反映出来。

因此，随着分子生物学、生物化学、生物物理学的发展和实验技术的进步，生态毒理学研究从个体水平、器官水平、细胞水平逐渐发展到了亚细胞水平和分子水平，一个新的学科——分子生态毒理学正逐步形成，即采用现代分子生物学方法与技术研究污染物及其代谢产物与细胞内大分子，包括蛋白质、核酸、酶的相互作用，找出作用的靶位或靶分子并揭示其作用机理，从而对在个体、种群或生态系统水平上的影响作出预报。此外，由此产生的分子生态毒理学指标具有测定周期短、灵敏的特点，也可用于对化学品的筛选以及对可能造成的环境影响作出更为准确的预测。

分子生态毒理学在国外发展很快，并已受到越来越多的重视，从污染物作用方式及靶位来看，目前研究的内容主要可分为以下几个方面：(1) 研究用特定反应中关键酶的活性变化作为机体功能和器官损伤的标志。这些酶主要是一些组织酶、胞内酶和血清中器官专一性的同工酶。如乙酰胆碱酯酶作为有机磷农药污染的指标；蛋白磷酸酶作为促肿瘤物的检测指标

等。(2) 研究用污染物对解毒系统基因活化, 引起 mRNA, 蛋白及酶活性的增加来反映特定化学物质的早期作用。主要是生物体的解毒系统的各种酶或蛋白。如第 I 阶段解毒酶混合多功能氧化酶 (MFO) 以及第 II 阶段解毒酶谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 的研究。(3) 研究用污染物对抗氧化防御系统影响来检测污染物对机体的氧化损伤。主要包括抗氧化酶超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 等, 以及抗氧化剂还原型谷胱甘肽 (GSH) 等的研究。(4) 研究用污染物对 DNA 的化学修饰引起的 DNA 的改变来反映化学物的潜在遗传毒性。常见的 DNA 损伤有 DNA 加合物形成、DNA 甲基化比例的改变、DNA 链断裂、碱基的非正常化学修饰或缺失等。

## 2 多环芳烃生物效应研究简述

早期多环芳烃的毒理学研究主要集中在多环芳烃与各种癌症 (主要是皮肤癌) 的相关性以及多环芳烃致癌机理的研究。

早在 1775 年, Pott 就观察到烟囱清洁工常患阴囊皮肤癌, 这是化学致癌作用的首次发现。之后, 直到二十世纪才有关于石蜡精炼、鲸油加工和煤焦油工业中工人高发皮肤癌的大量报道。日本病理学家 Yamagiwa(1915)和 Tsutsui(1918)用这些工业原料成功地在实验动物身上诱发癌症, 即通过在鼠或兔子身上反复涂抹煤焦油诱发恶性皮肤癌。但当时人们仍不了解煤焦油中的什么成分使动物致癌。

1920s-1930s, 许多科学家(Kennaway,1924; Hewett and Hieger, 1930; Mayneord,1932; Cook, 1932, 1933) 试图从煤焦油中分离出致癌物。科学家们从煤焦油中分离出多种化合物, 通过生物效应试验 (即动物致癌性试验) 确定那些致癌物为某些多环芳烃; 并且还用化学手段合成出这些多环芳烃, 重复出了同样的结果。

并非所有的多环芳烃都具有致癌作用, 相关理论见 Phillips(1983), 本文所涉及的为致癌性多环芳烃。

1940s-1970s, 多环芳烃致癌机理的研究引起人们的广泛关注。利用多环芳烃的荧光特性, 在涂抹多环芳烃的小鼠皮肤中先后检测到多环芳烃与生物大分子尤其是 DNA 分子的共价结合 (Miller,1951; Heidelberger 和 Davenport,1961; Brookes 和 Lawley,1964)。一些学者坚持认为多环芳烃的致癌性是由于它们通过物理作用嵌入 DNA 分子(Boyland 和 Green, 1962; Arcos 和 Argus, 1968), 他们认为多环芳烃母体化合物本身具生物学活性, 生物体对多环芳烃的代谢纯粹是一个解毒过程。但始终未发现直接的证据支持这一观点。

之后对动物代谢系统的研究使得人们对多环芳烃的致癌机理产生了新的认识。研究发现, 动物肝脏微粒体中富含代谢 PAHs 和其它外源化合物的混合功能氧化酶(mixed-function monooxygenases, MFO) (Holtzman 等, 1967); 用 PAHs 处理过的老鼠其体内代谢 PAHs 的酶水平显著增加(Conney, 1957)。代谢系统活性的更为直接的证据来自 Grover 和 Sims(1968)以及 Gelborn(1969)对体外代谢系统的研究, 研究表明, 孵育混合液中只有当被诱导过的鼠肝微

粒体存在时，BaP 及其它 PAHs 才能与 DNA 分子结合。这些研究表明 PAHs 本身不具有生物学活性，只有经动物酶代谢系统的代谢 PAHs 才能与生物大分子共价结合。

关于 PAHs 代谢产物及其致癌性的相关研究论述详见 Phillips(1983)。

通过共价结合物致癌的直接证据来自 1973 年 Ames 的实验，在催化多环芳烃与细胞大分子共价结合的同样的代谢系统存在下，细菌可发生突变。在实验中，Ames 发展了几种组氨酸缺陷型菌株(His<sup>-</sup>) *Salmonella typhimurium*，在鼠或人肝脏匀浆液存在下，用一系列包括 BaP 及其它 PAHs 在内的化学致癌物处理，这些菌株回复突变为可合成组氨酸的野生型菌株(His<sup>+</sup>)。这就是现已广泛用来筛选化学物致癌活性的 Ames 经典实验的基础。

至此，对多环芳烃致癌机理的一系列研究得出如下结论：

- a PAHs 本身不具有生物学活性，
- b PAHs 可被生物体内的混合功能氧化酶(MFO)代谢并产生多种代谢产物，
- c PAHs 的代谢产物可与细胞内生物大分子如 DNA 或蛋白质等共价结合，
- d 这些共价结合产物具有生物学活性(致突变、致癌等)。

进入七十年代，由于海洋环境污染日益严重，对多环芳烃的毒理学研究也从单纯的致癌性研究转移到了海洋生态毒理学研究领域。这些研究包括：在海洋生态系统中的物理化学变化及其生物学效应的研究；如在海洋环境中的组成、分布、迁移、转化、降解和归宿等；在生物体中的吸收、累积、代谢等；对海洋生态系统食物链各环节代表生物的急慢性毒性实验及生态系种群数量和群落结构的影响等。

近年来，对多环芳烃的分子生态毒理学研究逐渐展开，根据多环芳烃在生物体内的代谢途径和特点，这些研究主要包括以下两方面的内容：(1)对生物体内代谢系统影响的研究，(2)对生物体的遗传毒性效应(DNA 损伤)研究。

### 3 多环芳烃的分子生态毒理作用机制及研究进展

多环芳烃进入细胞后，首先被细胞内酶系统代谢，转化为亲电代谢物（有时还伴随着活性氧的产生），才能表现出毒性效应（如酶失活、脂质过氧化、DNA 损伤等）。其中细胞内酶系统的代谢是多环芳烃致毒/解毒的关键步骤。

#### 3.1 代谢系统的研究

多环芳烃的代谢系统主要包括解毒系统和抗氧化防御系统这两大系统。

外源物在体内首先经解毒系统进行生物转化，通常分为两个阶段，第一阶段为亲脂性底物经细胞色素 P450 酶系统氧化代谢形成各种中间代谢产物，这些中间代谢产物具极高的生物活性，容易对生物体产生毒性、致癌性及其它有害影响，第二阶段通常包括氧化的中间代谢

产物与内源性分子如葡糖醛酸、硫酸盐、谷胱甘肽等的结合，这些结合产物通常低毒且易于排出体外（Andersson 和 Forlin，1992）。这是包括多环芳烃在内的污染物代谢的一般方式。这两个阶段的解毒酶在功能上的相互协调配合是进入机体的外源化合物顺利解毒的关键。

图 1-1 氧化还原循环（Kappas，1985）

Fig 1-1 Redox cycle (Adapted from Kappas, 1985)

抗氧化防御系统是需氧生物在长期进化过程中形成的防御过氧化损害的系统。需氧生物通过利用分子氧氧化体内有机物分子获取所需的能量，这一过程产生大量活性氧，如超氧阴离子自由基( $O_2^{\cdot-}$ )、过氧化氢( $H_2O_2$ )及羟自由基( $\cdot OH$ )等。在生理条件下， $\cdot OH$  的产生主要是由于铁离子催化的 Haber-Weiss 反应：



机体自身代谢过程中活性氧的产生途径主要有：酶如黄嘌呤氧化酶、色氨酸加双氧酶、二胺氧化酶等可产生  $O_2^{\cdot-}$  作为中间代谢物；另一些酶如前列腺素合成酶、鸟氨酸环化酶和葡萄糖氧化酶等以不经  $O_2^{\cdot-}$  的方式产生  $\cdot OH$ ；复杂的多酶体系如线粒体、微粒体的电子传递系统以及白细胞的活化吞噬作用（如嗜中性粒细胞和吞噬细胞等）可产生大量活性氧。在生理状态下，由代谢产生的活性氧可为抗氧化防御系统所控制，因此，处于平衡状态的活性氧浓度是极低的，它们不仅不会损伤机体，而且还具有独特的生理作用，如白细胞吞噬细菌时需产生活性

氧来消灭细菌，合成前列腺素时尚需某些活性氧的参与等。但当某些种类污染物(包括多环芳烃)在体内进行生物转化时，同时产生氧化还原循环，这样，不仅母体化合物产生的中间产物本身是自由基代谢物，可与核酸、蛋白共价连接，产生毒害，而且在循环中产生了大量活性氧，这些活性氧又可使 DNA 断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等，从而引发机体产生氧化应激(图 1-1)。

研究表明，能在体内进行生物转化及产生氧化还原循环的污染物种类很多，如 PAHs(Goksoyr 等, 1991; Sole 等, 1996; Livingstone 等, 1990)、有机氯农药(Thomas 和 Wofford, 1993; Boon 等, 1992; Weiden 等, 1993; Clemons 等, 1996)、有机磷农药(Vig 和 Nemcsok, 1989; Wenning 和 Di Giulio, 1988; Mather-Mihaich 和 Di Giulio, 1986; Jensen 等 1991)、重金属(Radi 和 Matkovics, 1988; Cossu 等, 1998; Regogi 等, 1998)及其它许多有机污染物或混合污染物(Peters 等, 1994; Livingstone 等, 1992; Cossu 等, 1997; Burgeot 等, 1996; Chen 等, 1998)等。许多野外研究的结果表明，在受石油、重金属及农药污染严重的海域，鱼类肝癌、肿瘤等疾病的发病率很高，可能与这些污染物在生物体内的代谢密切相关。

生物体内代谢系统的一个重要特征是其成分可由于包括多环芳烃在内多种污染物的暴露而发生改变，因此检测这种改变并且作为指标来反映污染物暴露对生物的影响就成为分子生态毒理学研究的一个重要方面。初步的研究表明，暴露于较低浓度的污染物，生物体内代谢系统中各参数的水平会升高，表现为酶活性的诱导或一些生物大分子如 GSH 含量的增加等(Rodriguez-Ariza 等, 1993; Chipman 等, 1992; Thomas 和 Wofford, 1982; Kurelec 等, 1977; 朱必风和马海燕, 1995; 孙风和刘发义, 1991)。而暴露于较高浓度的污染物，这些参数的水平通常会下降，表现为酶活性的抑制或一些生物大分子含量的减少等(Cossu 等, 1997; Gooch 等, 1989; Miranda 等, 1990; Boon 等, 1991, 1992a,b; Jimenez 等, 1990; Oikari 和 Jimenez, 1992; Gair, 1986; George, 1989; Fent 和 Stegemen, 1993)。一般认为，代谢系统参数水平的增加可能代表了机体对污染物暴露的适应性反应(Kosower, 1978)，机体通过调节代谢系统成分的水平增强其清除污染物及其代谢产物的能力，而其水平的降低则可能与细胞对污染物及其代谢物解毒能力的饱和作用有关，也可能是污染物暴露的毒性效应的反应(Ketterer 等, 1983)。

作为污染物暴露的生物指标，对第一阶段解毒酶 MFO 的系统研究始于八十年代，不少指标如 AHH 和 EROD 等已成为较为稳定可靠的分子生态毒理学监测指标。初步的结果表明，多数生物 MFO 的本底水平较低，有时甚至无法测出，对 MFO 具有诱导作用的污染物不仅种类多、浓度范围广，而且诱导水平高、诱导时间较短，MFO 可作为理想的生物监测指标(Andersson 和 Forlin, 1992; Goksoyr 和 Forlin, 1992)。一些研究不仅检测了污染物暴露下酶活性的诱导，而且进一步对酶蛋白量及 mRNA 水平进行了检测，这三个水平的同时检测可以更为准确全面地反映污染物的诱导作用(Fabacher 和 Baumann, 1985; Lockhart 和 Metner, 1992; Haasch 等, 1993)。对解毒系统第二阶段的酶也有不少研究，但总的说来，远不及对 MFO 的研究那样系

统、全面，结论也不太一致 (Chen 等, 1998; Di Giulio 等, 1993; Fensen 等, 1991), 然而, 由于第二阶段解毒酶在污染物解毒代谢中的重要作用, 随着对其调控和表达的更多了解以及相关靶基因序列分子探针的发展, 第二阶段解毒酶有可能成为有价值的生物监测指标。国内目前对 MFO 已有研究 (孙凤, 刘发义, 1990; 朱必凤, 马海燕, 1995; 陈国胜等, 1997), 而对 GST 的研究则尚未见报道。

早期对抗氧化防御系统的研究主要集中于各种生理因子对它的影响 (Perters, 1996)。随着对污染物代谢机理的深入了解, 进入九十年代, 抗氧化防御系统作为生物指标的研究成为分子生态毒理学研究的新热点。多数研究表明, 抗氧化防御系统的成分可由于污染的胁迫而发生诱导 (Rodriguez-Ariza 等, 1993; Chipman 等, 1992; Thomas 和 Wofford, 1982), 但也有一些研究得到不同的结果, 如在一些研究中, 抗氧化防御系统的成分可由于污染的胁迫表现为诱导, 但随着时间的延长, 又转化为抑制 (Mather-Mihaich 和 Di Giulio, 1986; Livingstone 等, 1990; Sole 等, 1995a,b), 而在另一些研究中观察到相反的现象 (Cossu 等, 1997; Mather-Mihaich 和 Di Giulio, 1991), 也有一些研究仅观察到抗氧化防御系统参数水平的降低或抑制 (Livingstone 等, 1993; Ragoli 和 Principato, 1995)。有关不同的生物、污染物、污染浓度、污染时间及非污染因素 (生理因素如性别、年龄、发育等, 环境因素如水温、盐度、光照、季节等) 对抗氧化防御系统的影响, 现有的研究还不够全面, 还需要对更多有代表性的水生生物和常见污染物做更多的研究。目前虽然抗氧化防御系统的一些成分还没有象 MFO 那样成为广泛应用的指标, 但是, 正是由于它们能反应多种污染物的作用, 而且其变化可定量检测, 充分显示出了其作为分子生态毒理学指标的前景, 是一类有希望的敏感分子生态毒理学指标, 尤其可用于反映能产生含氧自由基污染物的早期影响。国内目前对抗氧化防御系统的研究才刚刚起步 (郑微云, 2000; Chen 等, 1998)。

### 3.2 遗传毒性效应研究

污染物及其亲电代谢物 (及副产物活性氧) 若不能被代谢系统有效控制 (解毒), 则会对生物大分子产生有害的影响, 如酶失活、脂质过氧化、DNA 损伤等。

作为遗传的物质基础, DNA 损伤的研究受到广泛的重视。一般认为, 化学物引起的 DNA 损伤主要有两条途径, 一条途径是化学物通过解毒系统的代谢直接与 DNA 分子共价结合, 另一条途径是化学物通过在体内产生氧化还原循环产生大量活性氧而造成 DNA 的氧化损伤。这两种类型的损伤可能在致癌作用的不同阶段起作用, 但已有研究证实由于氧化作用而造成的 DNA 损伤水平远高于解毒系统产生的代谢物直接与 DNA 形成加合物的损伤水平 (Shugart, 1992), 因此, 氧化损伤被认为是一种更为重要的损伤形式。

现已研究得较为清楚的 BaP 在体内的代谢就很好地反应了这两种类型的 DNA 损伤的形成过程 (图 1-2)。从图中可以看出, BaP 在代谢过程中, 可对 DNA 大分子造成多种类型的损伤,

它既可通过细胞色素 P450 和环氧化物水解酶 (EH) 的作用, 形成 BaPDE I 并与 DNA 形成稳定的加合物; 也可经 BaP-diols 和 BaP-diones 的氧化还原循环产生  $H_2O_2$ , 在  $Fe^{++}$  的诱导下产生高活性的 OH· 自由基, ·OH 自由基会攻击 DNA 碱基, 经碱基修饰形成 8-OH-G 和 FapyGua; 还可通过细胞色素 P450 加单氧酶介导的单电子氧化作用, 形成一个不稳定的  $N^7G/BaP$  加合物, 这个加合物很容易脱嘌呤, 导致 DNA 上形成潜在的无嘌呤突变位点。

图 1-2 BaP 代谢与 DNA 损伤 (Maccubbin, 1994)

Fig 1-2 BaP metabolism and DNA damage (Maccubbin, 1994)

目前, 污染物对海洋生物 DNA 损伤的研究主要包括 DNA 加合物形成、DNA 碱基修饰、DNA 断裂以及染色体畸变等, 其中 DNA 断裂的检测, 如单细胞凝胶电泳和碱解旋的荧光检测等, 由于方法简便易行, 又能综合反映污染物遗传毒作用的结果, 因而得以广泛应用。国外对海洋生物 DNA 损伤, 尤其是 DNA 加合物 (Varanasi 等, 1989b; Shugart 等, 1987)、DNA 链断裂 (Shugart, 1988; McCarthy, 1991; Everaarts 和 Sarkar, 1991; Di Giulio, 1993) 的研究较多, 国内在医学毒理学领域对哺乳动物 DNA 损伤的体外研究较多 (方厂云等, 1997; 王民生, Schin, 1997; 唐国慧等, 1997), 但在分子生态毒理学领域对海洋生物, 尤其是鱼类的 DNA 损伤研究则未见报道。

#### 4 本研究的主要内容及目的

多环芳烃已成为主要的海洋环境污染物质, 而只要检出多环芳烃, 很少发现不存在苯并(a)

芘，苯并(a)芘被认为是环境样品中多环芳烃存在的指示物。苯并(a)芘是最典型的具强致癌性的多环芳烃，我们目前对多环芳烃的化学结构、理化性质以及生物学效应的了解，许多都是来自对苯并(a)芘的研究。在水体中苯并(a)芘的背景值一般为 0.01~100ng/L (伊兹拉埃里等著，1986)，苯并(a)芘的暴露实际上已不可避免。因此，以苯并(a)芘作为研究的污染物，具有重要的理论和现实意义。

实验生物大弹涂鱼广泛分布于我国的广东、福建沿海，生态环境特殊，主要生活于潮间带的中低潮区，肝脏较大，能提供适量的组织样品以供分析，是较为理想的实验材料。

本课题主要研究苯并(a)芘在代谢过程中对大弹涂鱼代谢系统的影响。除了目前已作为生物标记的解毒系统第一阶段解毒酶 MFO 外，对目前结论尚不一致但同样具有重要意义的解毒系统第二阶段解毒酶 GST 和抗氧化防御系统(如 SOD、CAT、GPx、GSH 等)的变化也将进行研究，以期对苯并(a)芘在代谢过程中对大弹涂鱼代谢系统的影响有一个全面的了解；另外，还将进一步对苯并(a)芘代谢后可能产生的毒性效应，尤其是遗传毒理效应进行初步研究，探索以 DNA 损伤作为生物指标的可能性。目前对以上各领域的研究国内外虽已开展了许多工作，如 GST 和抗氧化防御系统的研究正在展开，而 MFO 和 DNA 损伤的研究则已较为成熟，但在不同水平的多指标综合研究，国外报道较少，国内则尚未见报道。此外，本课题还将利用透射电镜观察暴露于苯并(a)芘后大弹涂鱼肝脏细胞的超微结构变化，在亚细胞水平对 BaP 暴露可能产生的影响进行研究。

## 第二章 材料与方法

### 1 仪器与试剂

实验仪器采用 721-100 型分光光度计, Beckman DU-8B 型紫外可见分光光度计, AIC UV 9100 型紫外可见分光光度计, Hitachi 850 型荧光分光光度计, Beckman J2-MC 型冷冻离心机。

苯并(a)芘和葡聚糖凝胶 G-50 为 Sigma 公司产品; Triton -X 100 为 Amresco 公司产品; Hoechst dye 33258 为 Calbiochem 公司产品; NADPH 为上海伯奥生物科技有限公司产品; GSH 为上海生物化学试剂公司产品; 2,4-二硝基氯苯(CDNB)为上海试剂一厂; 二苯基唑(PPO)为上海化学试剂公司; 牛血清白蛋白为上海生工生物工程有限公司; 其余试剂为国产市售产品。

### 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°C 保存。实验前将储备液用清洁海水稀释为 0.05 mg/L、0.2 mg/L 和 0.5 mg/L 三个不同的浓度组, 分别置于直径为 50 cm, 高为 50 cm 的陶瓷缸中, 每缸海水体积 40 L。对照组海水中加入与污染组相同体积的丙酮。

实验用鱼大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*), 于 1999 年 5 月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 ±3.4 g, 放在室内饲养。实验鱼先在清洁海水中暂养 3 天, 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 ±2°C。

### 3 实验设计

对照组于第 6h、3d 和 7d 取样, 0.05 和 0.5mg/L BaP 浓度组分别于曝污后第 6h、12h、24h、36h、3d 和 7d 取样, 0.2 mg/L BaP 浓度组分别于曝污后第 3d 和 7d 取样, 5mg/L BaP 浓度组于曝污后 2h 取样, 0.5mg/L BaP 浓度组于曝污 3d 后再转入清洁海水 4d (见表 2-1)。暴露组 36h 内的样品均以对照组 6h 的样品作为对照, 其余时间的样品则分别以同期的对照组样品作为对照。用于生化测定和 DNA 断裂检测的样品, 每次每组取鱼 6 尾, 活体解剖, 取出肝脏, 迅速冷冻于液氮中待用; 用于电镜观察的样品, 则按照本章 6 中的步骤处

理。

表 2-1 实验设计

Table 2-1 Design of the Experiment

| 暴露<br>时间 | 暴 露 浓 度 |           |          |          |       |
|----------|---------|-----------|----------|----------|-------|
|          | 对照组     | 0.05 mg/L | 0.2 mg/L | 0.5 mg/L | 5mg/L |
| 2h       | -       | -         | -        | -        | *     |
| 6h       | +       | +         | -        | +        | -     |
| 12h      | -       | +         | -        | +        | -     |
| 24h      | -       | +         | -        | +        | -     |
| 36h      | -       | +         | -        | +        | -     |
| 3d       | +       | +         | +        | +        | -     |
| 7d       | +, *    | +         | +        | +, *     | -     |

注：+指取样用于生化测定和 DNA 断裂检测，

-指未取样，

( )指曝污 3d 后再转入清洁海水 4d 取样

\* 指取样用于电镜制样

(+)

#### 4 样品预处理及各生化指标的测定

##### 4.1 样品制备

从液氮中取出肝脏，称重后置于冰浴中，加十倍体积 (w/v) 预冷的缓冲液，冰浴匀浆，4℃冷冻离心 (15 000 rpm, 20 min)，取上清液，用于各指标的测定。

##### 4.2 各生化指标的测定

###### 4.2.1 AHH 活性的测定

参照 Walton 等(1978)的方法，总体积为 1.0 mL 的反应混合物中含一定量的匀浆上清液，50 μmols Tris-HCl 缓冲液(pH7.5)，0.36 μmols NADPH，3 μmols MgCl<sub>2</sub>，最后加入 20 μL 二苯基 唑(PPO)溶液(10 μg PPO 溶解在 20 μL 甲醇中)作底物使反应开始，于 37℃保温 30 min；加入 1.0 mL 经冰浴冷却过的丙酮终止反应，再加入 3.25 mL 正己烷充分混匀；取 1.0 mL 有机相，用 1.0 mol/L 的 NaOH 3.0 mL 萃取，取水相测定，激发波长为

345 nm, 发射波长为 510 nm。

酶活力单位 (U) 表示为每毫克蛋白的荧光强度。

#### 4.2.2 GST活性的测定

参照 Habig 等 (1974) 的方法。最终总体积为 1.0 mL 的反应混合物中含一定量的匀浆上清液, 100  $\mu$  mols 的磷酸钾缓冲液 (pH6.5), 1  $\mu$  mol GSH, 1  $\mu$  mol CDNB, 反应温度为 25  $^{\circ}$ C, 混匀后立即开始反应, 于波长 340nm 处测定其 3 min 内的反应速率, 每隔 30 sec 测 A 值一次。

一个酶活力单位 (U) 定义为在特定条件下, 每分钟催化形成 1  $\mu$  mol 反应产物的酶量, 酶活性定义为每毫克蛋白的酶活力单位数 (nmol/min/mg Pr)。

#### 4.2.3 SOD 活性的测定

参照 Marklund (1974) 和 邹国林 (1986) 的方法。在 25  $^{\circ}$ C, 4.5 mL 50 mmol/L, pH8.2 Tris-HCl 缓冲液中加入适量匀浆上清液及 10  $\mu$  L 50 mmol/L 的连苯三酚, 迅速摇匀, 于波长 325nm 处测定其 3 min 内的反应速率, 每隔 30 sec 测 A 值一次。

一个酶单位 (U) 定义为每毫升反应液中, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量。

#### 4.2.4 GPx 活性的测定

参照夏奕明 (1987) 的方法, 略做改动。最终总体积为 1.0 mL 的反应混合物中含一定量的匀浆上清液, 0.4  $\mu$  mols GSH, 0.4  $\mu$  mols  $H_2O_2$ , 80  $\mu$  mols 磷酸钠缓冲液 (pH7.0, 含 1  $\mu$  mol  $NaN_3$ , 16 nmols EDTA), 于 37  $^{\circ}$ C 水浴反应 3 min; 加入 4.0 mL 偏磷酸沉淀液 (含 1.67%  $HPO_4$ , 28% NaCl, 0.05% EDTA), 于 3000 rpm 离心 10 min, 取 2.0 mL 上清液, 加 2.5 ml 0.32 mol/L  $Na_2HPO_4$ , 0.5 mL 0.04% DTNB 显色液, 于波长 422nm 处读 O.D 值。非酶反应体系以加热失活后的匀浆上清液代替。

酶活力单位表示为每毫克蛋白、每分钟氧化 GSH 的纳摩尔数, 即 (nmol GSH/mg Prot/min)。

#### 4.2.5 CAT活性的测定

参照 Cohen 等 (1970) 和 徐镜波等 (1997), 略做改动。最终总体积为 1 mL 的反应混合物

中含一定量的匀浆上清液， $10\mu\text{ mols}$  磷酸钠缓冲液(PH 7.0)， $10\mu\text{ mols}$   $\text{H}_2\text{O}_2$ 。反应温度为  $25^\circ\text{C}$ ，混匀后立即开始反应，于波长  $240\text{ nm}$  处测定其  $3\text{ min}$  内的反应速率，每隔  $30\text{ sec}$  测 A 值一次。

酶活力单位定义为每毫克蛋白、每分钟分解  $\text{H}_2\text{O}_2$  的纳摩尔数( $\text{nmol H}_2\text{O}_2/\text{min}/\text{mg Pr}$ )。

#### 4.2.6 GSH含量的测定

参照 Cohn 和 Lyle (1966)的方法，略做改动。最终的反应体系中含  $2.8\text{ mL}$  的  $0.1\text{ mol/L}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$  缓冲液 (PH8.0, 含  $0.005\text{ mol/L}$  EDTA),  $100\mu\text{ L}$  稀释上清液和  $100\mu\text{ L}$  OPT( $2\text{ mg/mL}$  甲醇)。混匀后于室温反应  $15\text{ min}$  测定，激发波长为  $350\text{ nm}$ ，发射波长为  $420\text{ nm}$ ；通过标准曲线计算其 GSH 含量 ( $\mu\text{ g/g}$ )。

#### 4.3 蛋白质含量测定

上清液中的蛋白含量用 Lowry 法(1951)测定，以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

### 5 DNA 链断裂的测定(Shugart , 1988a)

#### 5.1 DNA 的分离纯化

- a. 肝脏于含  $0.2\%$  Triton X-100 的  $1\text{ N}$   $\text{NH}_4\text{OH}$  中匀浆
- b. 匀浆液用氯仿/异戊醇/酚( $24/1/25\text{ v/v}$ )抽提以纯化 DNA
- c. 离心后取上清液过葡聚糖凝胶 G-50 柱，洗脱液弃去；用 G-50 缓冲液( $10\text{ mmol/L}$  Tris,  $150\text{ mmol/L}$  NaCl,  $1\text{ mmol/L}$   $\text{MgCl}_2$ ,  $0.5\text{ mmol/L}$  EDTA, PH7.4)洗脱，收集洗脱液，即得到分离纯化的 DNA 样品

#### 5.2 碱解旋分析

按照碱解旋程序分析 DNA 链断裂，需测定三个参数：双链 DNA、单链 DNA 以及碱解旋 DNA 的荧光值。

碱解旋 DNA 的测定：将分离纯化的 DNA 样品  $100\mu\text{ L}$ ，加入  $50\mu\text{ L}$   $0.05\text{ N}$  NaOH，混匀后于  $38^\circ\text{ C}$  孵育  $30\text{ min}$ ，快速加入  $50\mu\text{ L}$   $0.05\text{ N}$  HCl 及  $5\mu\text{ L}$  含  $0.2\%$  SDS 的  $2\text{ mmol/L}$  EDTA。在上述碱解旋后的 DNA 样品中加入  $3.0\text{ mL}$   $0.2\text{ mol/L}$  磷酸钾缓冲液(PH6.9)， $3\mu\text{ L}$  Hoechst dye 33258(二苯丙咪唑)，混匀后置于暗处反应  $15\text{ min}$  后测荧光(激发波长为  $360\text{ nm}$ ，发射波长为  $450\text{ nm}$ )。

Degree papers are in the "[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)". Full texts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.

厦门大学博硕士学位论文摘要库