

DOI: 10.13671/j.hjkxxb.2014.0659

肖丹, 王海燕, 韩大雄, 等. 2014. 4 种典型溴代阻燃剂对离体条件下罗非鱼肝脏抗氧化系统影响的研究 [J]. 环境科学学报, 34(11): 2956-2962
Xiao D, Wang H Y, Han D X, et al. 2014. Effects of four typical brominated flame retardants on hepatic antioxidant system of *Mossambica tilapia* in vitro [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 34(11): 2956-2962

4 种典型溴代阻燃剂对离体条件下罗非鱼肝脏抗氧化系统影响的研究

肖丹¹, 王海燕², 韩大雄^{1,*}, 张伟东¹, 沈宇飞¹

1. 厦门大学药学院, 厦门 361102

2. 国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005

收稿日期: 2014-01-15 修回日期: 2014-03-10 录用日期: 2014-03-11

摘要: 以罗非鱼 (*Mossambica tilapia*) 为实验生物, 研究了离体条件下其肝脏抗氧化系统中谷胱甘肽 (GSH) 含量、谷胱甘肽硫转移酶 (GST) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性对 4 种溴代阻燃剂 (Brominated flame retardants, BFRs) —— 四溴联苯醚 (BDE-47)、十溴联苯醚 (BDE-209)、六溴环十二烷 (HBCD) 和四溴双酚 A (TBBPA) 的响应。研究结果表明: 离体暴露于 4 种 BFRs 1 h 后, 罗非鱼肝脏上清液中 GSH 含量和 SOD 活性随暴露剂量升高均呈现先升高后回落的趋势, 但总体均高于对照组水平; GST 活性则被抑制。上述 3 种抗氧化参数中, 同一参数对 4 种 BFRs 响应均呈现一致的变化趋势, 其中 GST 和 SOD 活性响应更为灵敏。GST 活性对 BDE-47、BDE-209 和 HBCD 的最低响应浓度均低于 $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 且与 TBBPA 和 BDE-209 在一定浓度范围内存在较好的剂量-效应关系; SOD 活性对 4 种 BFRs 暴露较为敏感, 最低响应浓度均低于 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$, 并且与除 BDE-209 外的上述 3 种污染物在一定的浓度范围内具有良好的剂量-效应关系。因此, GST 和 SOD 活性指标是值得进一步研究的溴代阻燃剂污染候选生物标志物。

关键词: 溴代阻燃剂 (BFRs); 肝脏抗氧化系统; 离体

文章编号: 0253-2468(2014)11-2956-07 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of four typical brominated flame retardants on hepatic antioxidant system of *Mossambica tilapia* in vitro

XIAO Dan¹, WANG Haiyan², HAN Daxiong^{1,*}, ZHANG Weidong¹, SHEN Yufei¹

1. School of Pharmaceutical Sciences, Xiamen University, Xiamen 361102

2. Third Institute of Oceanography, SOA, Xiamen 361005

Received 15 January 2014; received in revised form 10 March 2014; accepted 11 March 2014

Abstract: The present work aims to investigate the responses of glutathione (GSH), glutathione S-transferase (GST) and superoxide dismutase (SOD) in *Mossambica tilapia* liver supernatant exposed in vitro to four kinds of brominated flame retardants (BFRs) (BDE-47, BDE-209, HBCD and TBBPA) for 1 h at different doses. The results showed that hepatic GSH content and SOD activity increased at lower concentrations, and then decreased at higher concentrations, while GSH content and SOD activity in the exposed groups were higher than that in the control at all mentioned concentrations. The GST activity was inhibited by the four types of BFRs. The results indicated that the same antioxidant parameter had the similar response trend to the 4 BFRs. Moreover, the responses of the activity of GST and SOD to the BFRs were more sensitive than that of GSH content. The lowest observed effect concentration (LOEC) of GST activity to BDE-47, BDE-209 and HBCD was less than $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ and GST activity values had a good linear relationship with the certain concentrations of TBBPA and BDE-209. The SOD activity was sensitive to all four types of BFRs and the LOEC was less than $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$. The values of SOD activity had a good linear relationship with the certain concentrations of BDE-47, HBCD and TBBPA. Our results suggested that the parameters of

基金项目: 海洋公益性项目 (No.201105013); 国家海洋局第三海洋研究所基本科研业务费专项基金项目 (No.201221); 福建省重大专项/专题项目 (No.2011YZ0001-1); 福建省自然科学基金项目 (No.2013J01386)

Supported by the National Public Benefit (Ocean) Research Foundation of China (No. 201105013), the Scientific Research Foundation of Third Institute of Oceanography, SOA (No. 201221), the Grand Research Foundation of Fujian Province (No. 2011YZ0001-1) and the Natural Science Foundation of Fujian Province (No. 2013J01386)

作者简介: 肖丹 (1989—), 女, E-mail: danxiao1989@163.com; * 通讯作者 (责任作者), E-mail: daxiong@xmu.edu.cn

Biography: XIAO Dan (1989—), female, E-mail: danxiao1989@163.com; * Corresponding author, E-mail: daxiong@xmu.edu.cn

GST and SOD in Mossambica tilapia liver antioxidant system had the potential to serve as biomarkers to evaluate the adverse effects of BFRs pollution.

Keywords: brominated flame retardants(BFRs); hepatic antioxidant system; in vitro

1 引言(Introduction)

作为一类新型持久性有机污染物, 溴代阻燃剂(BFRs) 的生产和使用有 30 多年的历史, 市场上广泛使用的 BFRs 主要为多溴联苯醚(PBDEs)、六溴环十二烷(HBCD) 以及四溴双酚 A(TBBPA)。目前, 我国多溴联苯醚的需求量仍以每年 8% 的速度在增长(Mai *et al.*, 2005), 这些 BFRs 在生产、使用和废物处理过程中均会不同程度地流入到环境中(Alcock *et al.*, 2003; Morris *et al.*, 2004; 陈社军等, 2005)。环境中溴代阻燃剂能够进入生物体和人体, 并对其产生不同的不良影响(Hurd and Whalen, 2011; Lilienthal *et al.*, 2009; 翟璟琰等, 2008)。目前, 对溴代阻燃剂的毒理研究, TBBPA 主要集中于哺乳动物, 水生生物研究较少; PBDEs 的研究多以混合物为主, 单体研究很少; 特别是近年来被发现有更强生物蓄积性的 BDE-47 研究甚少(Birnbaum and Staskal, 2004), 而 HBCD 的毒性尚缺乏急性毒性等相关数据(杜苗苗等, 2012)。

抗氧化系统中的酶如 SOD、GST 和小分子清除剂如 GSH 等是其发挥解毒功能的重要物质, 其酶活性和小分子清除剂含量的变化与生物体受胁迫程度存在密切的关系(Song *et al.*, 2006)。近年来一些学者研究了抗氧化系统对外源胁迫因子的响应(Atli and Canli, 2010; 王素敏, 2012), 但是关于鱼类肝脏抗氧化系统对溴代阻燃剂污染的响应尚未有明确清晰的认识和评价, 对于其是否有潜力成为溴代阻燃剂的生物标志物指标缺乏深入和完善的研究数据和结论。

Van der Oost 等认为在水生生态系统中, 研究与氧化相关的生物标志物指标时通常采用本地鱼群作为受试生物来研究污染物对其影响(Van der Oost *et al.*, 2003), 而罗非鱼具有适应性强、鱼病少、食性广等特点, 是我国东南沿海一带重要的经济鱼类, 已有报道用罗非鱼作为受试生物进行毒理学研究(王素敏, 2012)。有关粗酶液离体实验方法, 目前已有一些文献报道(王素敏, 2012; 岳宏伟, 2009; Coban *et al.*, 1996; Han *et al.*, 2013; 吴伟等, 2009)。离体实验方法与传统的体内动物实验相比, 污染物与肝脏粗酶液直接接触, 在较低浓度即可引起响应, 并且实验过程中的物化环境参数更易精确的限

定和控制, 有较优的灵活性、灵敏性和重复性。本实验中将粗酶液离体暴露方法与微孔板检测系统结合, 兼具同时处理数十个样品、快速、直接、灵敏的特点, 这对于快速评价基数庞大并且日益增长的环境污染物对生物抗氧化系统的早期影响是十分有意义的。综上, 本实验以来自于 3 类不同结构的 4 种市场上常见的 BFRs 单体化合物(BDE-47, BDE-209, HBCD 和 TBBPA, 结构如图 1) 为目标污染物, 采用离体实验方法, 系统研究了罗非鱼肝脏抗氧化系统对这 4 种污染物的响应, 并探讨 3 个抗氧化生物指标作为溴代阻燃剂生物标志物的可能性。

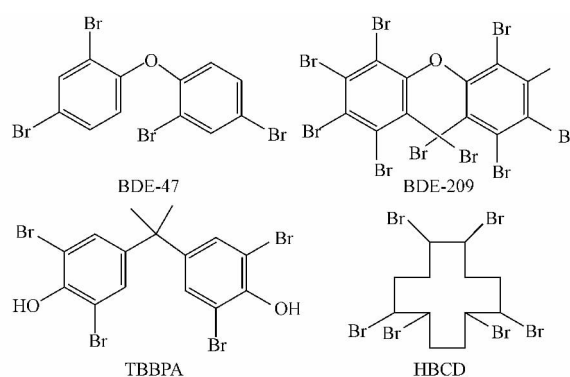


图 1 4 种溴代阻燃剂结构式

Fig.1 Structures of the 4 BFRs

2 材料和方法(Materials and methods)

2.1 实验材料

受试生物为罗非鱼(*Mossambica tilapia*), 购自厦门同安养殖鱼场, 体长 15~18 cm, 体重 25~30 g, 实验室暂养一周后挑选生存状态良好的个体用于实验。

2.2 仪器与试剂

SpectraMax M2/M5 微孔板检测系统(Molecular Devices), Mikro 220R 冷冻离心机(Hettich)。四溴联苯醚(BDE-47, 99.5%)、十溴联苯醚(BDE-209, 99%)、六溴环十二烷(HBCD, >95.0%)、四溴双酚 A(TBBPA) 和还原型谷胱甘肽(GSH, >98%) 购于 sigma 公司, 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)、邻苯三酚、邻苯二甲醛和其他试剂均为国产分析纯。

2.3 实验方法

2.3.1 罗非鱼肝脏粗酶液样品的制备 粗酶液的制备参照文献(Stegeman *et al.*, 1979; Förlin, 1980)

方法.剖鱼取出肝脏后,用预冷的 0.15% 的 KCl 溶液洗涤,滤纸吸掉血渍.按 1:5 (g/mL) 的比例加入预冷的 PBS (pH 7.4),冰浴下匀浆.匀浆液在 4 °C 下,10000 g 离心 30 min,取上清液分装,于 -80 °C 保存,用于抗氧化指标的测定.

2.3.2 离体暴污实验 4 种 BFRs 用 DMSO 配成一定浓度的储备液,用超纯水逐级稀释,实验同时设一个空白对照组(未经任何暴露处理的肝粗酶液样品,用 NC 表示),一个溶剂对照组(5% DMSO 暴露处理的肝粗酶液样品,用 SC 表示)和 11 个暴污组,暴污实验参照文献 (Viarengo *et al.*, 1997) 方法,分别取 10 μL 不同浓度的污染物,10 μL 肝粗酶液样品,相应缓冲液于 96 孔板中混匀,室温孵育 1 h,污染物终浓度分别为 0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1, 10, 50, 100, 500, 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,每个浓度设 9 个平行.

2.3.3 抗氧化系统指标的测定 GSH 含量测定采用文献 (Hissin and Hilf, 1976) 的方法,略作修改. GSH 在 pH = 8.0 下,与邻苯二甲醛 (OPA) 反应生成具有高度荧光的化合物.室温下,于 96 孔板中加入 10 μL 粗酶液,180 μL 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液 (pH 8.0) 和 10 μL 邻苯二甲醛的乙醇溶液 (1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$),充分混合,室温下放置 20 min.以 340 nm 为激发波长,在 430 nm 下测定荧光强度. GSH 含量的变化以相对溶剂对照组的百分比表示.

GST 活性检测参考文献 (Habig *et al.*, 1974) 的方法,稍作修改.室温下,于 96 孔板中加入粗酶液 10 μL , 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的磷酸缓冲溶液 (pH 6.5) 170 μL , 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 GSH 溶液 10 μL ,最后加入 30 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 CDNB 溶液 10 μL ,混匀.立即在 340 nm 下每 30 s 测定一次吸光值,测定 5 min.非酶反应不加粗酶液,其它步骤同上. GST 活性的变化以相对溶剂对照组的百分比表示.

SOD 活性参考文献 (Marklund *et al.*, 1974; 邹国林等, 1984) 方法,略作修改.室温下,于 96 孔板中加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Tris-HCl 溶液 (pH 8.2) 100 μL ,超纯水 90 μL ,最后加入 4.5 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的邻苯三酚溶液 10 μL ,混匀.立即在 325 nm 下每 30 s 测定一次吸光值,测定 5 min.计算邻苯三酚自氧化速率,按以上步骤加入上清液 10 μL ,使自氧化速率抑制约 50%. SOD 活性的变化以相对溶剂对照组的百分比表示.

2.4 数据处理

所有数据均以 9 个平行数据的平均值 \pm 标准差

(Means \pm SD) 表示.采用统计学软件 SPSS 16.0 进行分析.正态分布检验采用 Shapiro-wilk 分析,方差齐性检验采用 Levene's Test,单因素方差分析 (one-way ANOVA) 采用 Dunnett (2-sided) 分析,并以 $p \leq 0.05$ (*) 表示差异显著, $p \leq 0.01$ (**) 表示差异极显著.

3 结果 (Results)

3.1 4 种 BFRs 对罗非鱼肝 GSH 含量的影响

由图 2 可知,空白对照组和溶剂对照组无差异,表明溶剂对 GSH 含量无影响(下同).在 4 种 BFRs 胁迫下,罗非鱼肝中 GSH 含量均呈现先升高后回落的变化趋势.在整个浓度范围内 GSH 含量均高于对照组水平.其中 BDE-47 和 TBBPA (低溴含量污染物) 处理组响应最为敏感,在 0.1 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, GSH 含量分别上升为对照组的 120.61%、132.92% ($p \leq 0.01$).较于高溴含量化合物 (BDE-209 和 HBCD),其 GSH 含量上升幅度更大. BDE-209 和 HBCD 则分别在浓度为 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, GSH 含量上

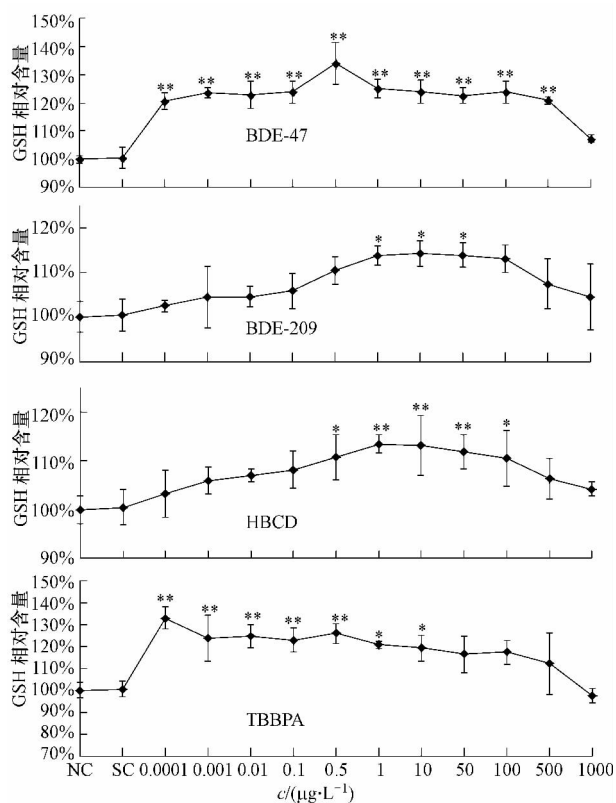


图 2 罗非鱼肝脏中 GSH 含量对 4 种 BFRs 的响应 (* 表示与对照组相比差异显著 $p \leq 0.05$, ** 表示与对照组差异极显著 $p \leq 0.01$)

Fig. 2 Effects of 4 BFRs on GSH content in the liver of *Mossambica tilapia*

升到与对照组呈显著差异 ($p \leq 0.05$)。GSH 含量的增加与污染物浓度在一定范围呈正相关关系, 而随着暴污浓度的进一步增大, GSH 均回落到与对照组无显著差异水平。

3.2 4 种 BFRs 对罗非鱼肝 GST 活性的影响

如图 3 所示, 在 4 种 BFRs 胁迫下, 罗非鱼肝中 GST 活性基本呈下降趋势, 并且除 TBBPA 外, GST 对其余 3 种 BFRs (2 个 PBDEs 同系物和 HBCD) 反应均十分敏感, 极低浓度即被显著抑制。BDE-47 和 HBCD 在 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, GST 活性分别为对照组的 81.55% ($p \leq 0.05$) 和 78.58% ($p \leq 0.01$); BDE-209 浓度为 $1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, GST 活性为对照组的 82.10% ($p \leq 0.01$); 低浓度的 TBBPA 对 GST 的影响不明显, 但在高浓度 ($\geq 100 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 与其它 3 个 BFRs 一样, 显著抑制 GST 的活性。

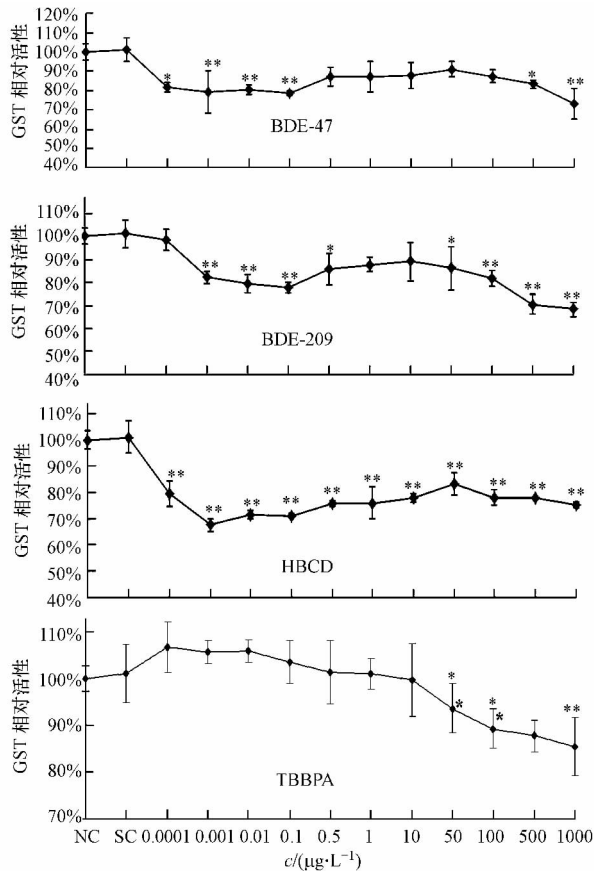


图 3 罗非鱼肝脏中 GST 活性对 4 种 BFRs 的响应 (* 表示与对照组相比差异显著 $p \leq 0.05$; ** 表示与对照组差异极显著 $p \leq 0.01$)

Fig.3 Effects of 4 BFRs on GST activity in the liver of *Mossambica tilapia*

3.3 4 种 BFRs 对罗非鱼肝 SOD 活性的影响

如图 4 所示, 罗非鱼肝中 SOD 对 4 种 BFRs 响

应与 GSH 的变化趋势一致: 均表现为浓度低时活性被诱导, 高浓度时活性回落, 但活性值总体高于对照组水平。SOD 活性对 4 种 BFRs 响应均较为敏感: 当 BDE-47 和 BDE-209 浓度为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SOD 活性即被明显诱导, 而 HBCD 和 TBBPA 则在 $10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SOD 活性被显著诱导。BDE-47, BDE-209, HBCD 均在浓度为 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SOD 活性达到最大值, 而 TBBPA 则在 $1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, SOD 活性达到最大, 其中 BDE-47 和 TBBPA (低溴含量污染物) 处理组 SOD 活性诱导上升幅度相对更大, 与 GSH 响应结果一致。

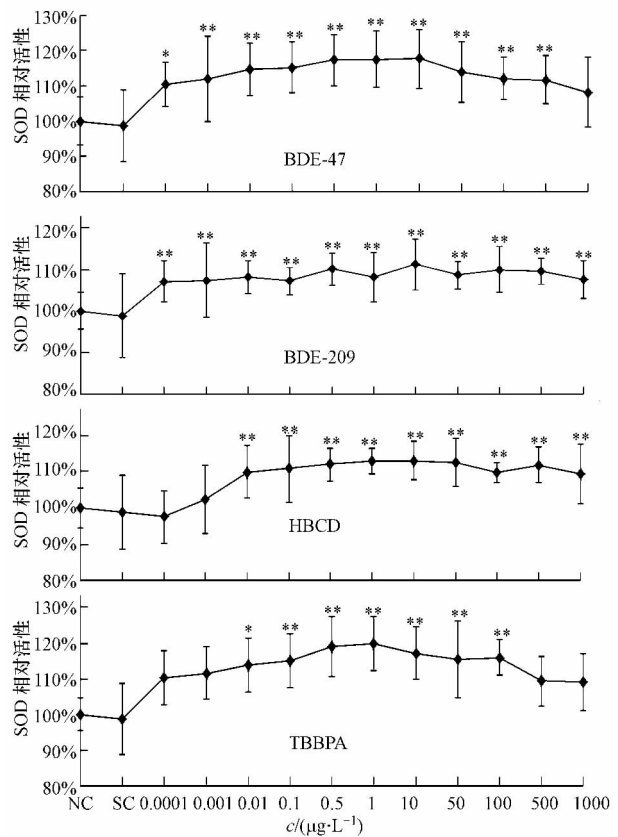


图 4 罗非鱼肝脏中 SOD 活性对 4 种 BFRs 的响应 (* 表示与对照组相比差异显著 $p \leq 0.05$; ** 表示与对照组差异极显著 $p \leq 0.01$)

Fig.4 Effects of 4 BFRs on SOD activity in the liver of *Mossambica tilapia*

3.4 3 个抗氧化指标与 4 种 BFRs 浓度之间的线性关系分析

对本研究结果进行部分浓度区间的线性分析, 如图 5 所示。HBCD 在低浓度区间 ($0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 与 GSH 含量之间具有良好的浓度-效应线性关系 (图 5a), 线性方程为 $y = 2.0699x + 99.122$ ($R^2 = 0.9317$), 浓度跨度为 10^5 。TBBPA 在整个浓度

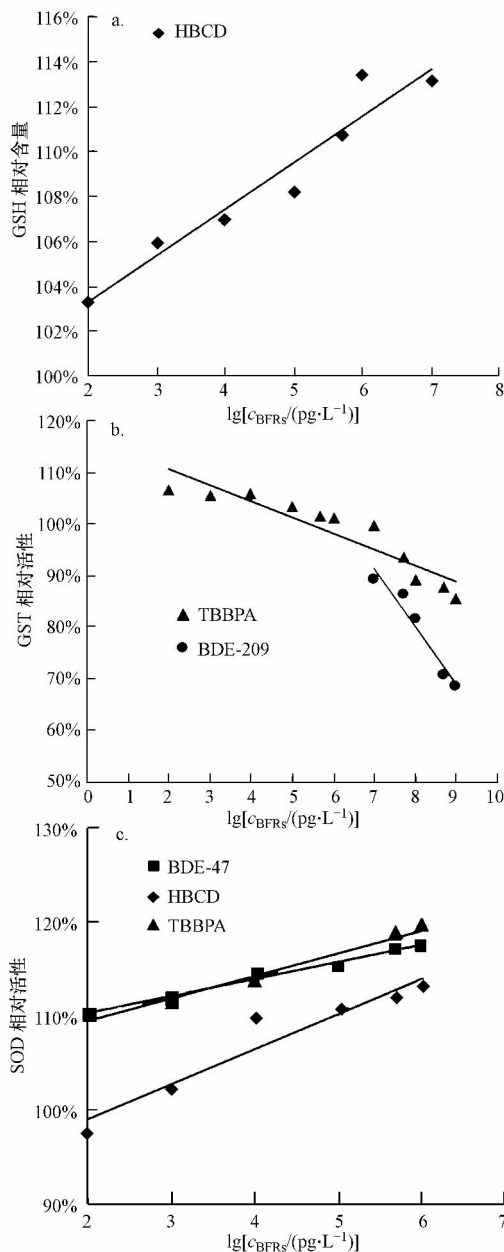


图5 3个抗氧化指标与4种BFRs浓度之间的线性关系分析 (a: GSH相对含量与BFRs浓度常用对数值线性分析, b: GST相对活性与BFRs浓度常用对数值线性分析, c: SOD相对活性与BFRs浓度常用对数值线性分析)

Fig.5 Dose-response linear regression analysis

区间($0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) GST 响应与浓度线性关系良好,线性方程为 $y = -3.1051x + 116.83$ ($R^2 = 0.8598$) ,浓度跨度为 10^7 (图 5b).对于 BDE-209,其高浓度区间($10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)与 GST 活性之间线性关系良好($y = -11.31x + 170.53$, $R^2 = 0.9493$) (图 5b).对于 SOD 活性指标,其与低浓度的 BDE-47、HBCD 和 TBBPA (BDE-47 和 HBCD 为 0.1

$\text{ng} \cdot \text{L}^{-1} \sim 10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, TBBPA 为 $0.1 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1} \sim 1 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 存在良好的线性关系(图 5c).BDE-47 和 HBCD 线性方程分别为 $y = 1.5964x + 107.54$ ($R^2 = 0.9473$) , $y = 3.1678x + 93.535$ ($R^2 = 0.8688$) ,浓度跨度为 10^5 ,TBBPA 线性方程为 $y = 2.3946x + 104.7$ ($R^2 = 0.9383$) ,浓度跨度为 10^4 .

4 讨论 (Discussion)

本实验中 4 种 BFRs 胁迫下,罗非鱼离体肝脏中 GSH 含量均在低、中暴露浓度时升高,高浓度时回落到对照组水平.GSH 含量升高可能是由于活性氧自由基(ROS)的形成,有研究表明 ROS 的存在能够诱导 GSH 的生成(苏燕等 2007);并且在解毒过程中 GST 能够催化 GSH 与活性亲电化合物(主要为中间代谢产物)结合从而降低毒性,本研究结果显示 GST 活性显著下降,减少了 GSH 的消耗,因此 GSH 含量增加.而高浓度暴露时 GSH 回落,可能是由于产生的 ROS 超出了抗氧化系统的清除能力,整个系统平衡被打破,各项功能(包括 GST 和 SOD)都处于下降状态.4 个 BFRs 处理组中,GSH 对低溴含量污染物(BDE-47 和 TBBPA)的响应更为敏感且上升幅度更大,并且 SOD 活性也呈现类似的响应,这可能与化合物中溴含量有关.溴含量低者(如 BDE-47 和 TBBPA)水溶性较好,且分子体积较小,因此容易被吸收转化,因而在实验中表现出在较低浓度即可引起显著影响.Birnbaum 等的研究也表明 PBDEs 中低溴代的 BDE-47 具有更强的生物蓄积性(Birnbaum *et al.* 2004),因此有必要加强对 BDE-47 和 TBBPA 等低溴含量污染物的环境浓度监测.虽然,本实验结果显示 GSH 对 BDE-47 和 TBBPA 响应敏感,但线性关系分析结果表明,GSH 与两者均不存在良好的剂量-效应线性关系;GSH 仅与 HBCD 存在较宽的线性关系浓度范围,但其对 HBCD 的响应不敏感,大部分线性范围区间与对照组无显著差异,因此 GSH 不适合作为 BFRs 的潜在生物标志物.

本研究中 4 种 BFRs 胁迫下,肝粗酶液中 GST 活性基本呈下降趋势.有文献报道 BDE-209 经脱溴反应转化成低溴代二苯醚是其重要的代谢过程,而亲电性的 Br^+ 和活性氧自由基可能与 GST 活性中心结合从而导致抗氧化功能混乱并对 GST 产生毒性作用,并最终导致 GST 活性明显降低(Santos *et al.* 2004);另外脂质过氧化产物可能与蛋白中氨基酸残基结合,改变蛋白质功能,使酶活性降低.并且

GST 通常很容易被氧化剂灭活 (Modesto and Martinez 2010). 因此, 由于 ROS 等过量氧化剂的存在, GST 抗氧化防御的过程也成为自身灭活的过程. 其他研究者对生物体内的研究也得到类似的结果, Feng 等通过腹腔注射给药将鲫鱼分别暴露于 5、10、100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 三个不同剂量的十溴联苯醚 14 d 和 30 d, 结果表明 3 个剂量组鲫鱼肝中 GST 活性均被抑制 (Feng *et al.* 2013). 聂芳红等将模式生物斑马鱼暴露于含不同浓度 TCDD 和 PCB77 的水体中 5 d, 发现与对照组相比, 低剂量的 TCDD ($0.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 和 PCB77 ($0.2\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 即可极显著抑制肝脏中 GST 活性 (聂芳红等 2009), 与本文中 GST 活性被抑制的结果一致. SOD 活性变化趋势则与 GSH 类似, 4 种 BFRs 暴露浓度 $\geq 10\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 离体鱼肝中 SOD 活性均显著升高 ($p \leq 0.01$), 高浓度时又回落. 周科等通过研究发现, 铜锈环棱螺暴露于含有 40、160、640 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以沉积物干重计) BDE-47 的沉积物中 20 d, 与对照组相比, 低剂量 ($40\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $160\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$) 实验组肝胰脏中 SOD 活性能够被显著诱导, 而随着 BDE-47 浓度升高至 $640\ \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$, SOD 活性又恢复到与对照组无显著差异水平. 其认为在低浓度外源胁迫作用下, SOD 能够表现出一定的氧化应激效应, 活性被诱导, 发挥清除活性氧自由基的作用, 而高浓度时 SOD 活性下降则说明污染物激发的 O_2^- 超出了 SOD 的防御能力, 造成抗氧化系统功能受损, 致使 SOD 活性下降 (周科等, 2010), 与本文研究结果一致. SOD 是体内唯一直接以自由基为底物的抗氧化酶, 其可以通过歧化反应直接消除 O_2^- , 因此在较低污染物浓度时即被显著诱导, 直接发挥抗氧化功能, 并在一定浓度范围内随污染物浓度升高而升高. 其它研究中也发现 SOD 活性随污染物浓度升高而被显著诱导, 认为 SOD 是一个非常具有潜力的生物标志物 (郭红岩等, 2001; 王淑红等, 2000). 结合本实验线性关系分析和敏感性分析结果, SOD 对 3 个 BFRs 均在低浓度区间存在较好的剂量-效应线性关系, 且对 4 个 BFRs 均具有较好的敏感性, 因此其极有可能成为 BFRs 污染的潜在生物标志物. 而 GST 则与 BDE-209 和 TBBPA 存在一定的剂量-效应线性关系, 且对除 TBBPA 外的多个 BFRs 有极强的敏感性, 最低响应浓度仅为 $0.1\ \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$, 因此其有潜力作为补充生物指标, 与 SOD 共同成为 BFRs 污染的潜在生物标志物.

5 结论 (Conclusions)

1) 实验结果表明低浓度的 BDE-47 和 TBBPA (溴含量相对更低的污染物) 可显著诱导 GSH 含量和 SOD 活性, 且诱导上升幅度比高溴含量的 BDE-209 和 HBCD 更大, 说明低溴含量的污染物对生物抗氧化系统可能具有更强干扰效应, 因此有必要加强对其环境浓度的监测.

2) 3 个抗氧化系统生物指标中, 相较于 GSH 酶类指标 (GST 和 SOD) 对 BFRs 的响应, 具有较好的敏感性和较宽的剂量-效应线性范围, 因此酶类指标是值得进一步探索优化的候选生物标志物.

3) 肝脏粗酶液含有丰富的细胞器和酶, 可作为外源污染物一个相对简化的体外暴污模型. 本文中 3 个抗氧化指标体外实验结果与文献中体内研究的结果相比, 二者的结论具有一定的一致性, 表明肝脏粗酶液离体实验方法可作为污染物生物抗氧化系统影响的快速预检手段, 与传统体内实验共同应用于环境毒理学研究中.

责任作者简介: 韩大雄 (1970—), 男, 博士, 副教授, 研究方向为化学生物学、环境化学. E-mail: daxiong@xmu.edu.cn.

参考文献 (References):

- Alcock R E, Sweetman A J, Prevedouros K, *et al.* 2003. Understanding levels and trends of BDE-47 in the UK and North America: an assessment of principal reservoirs and source inputs [J]. *Environment International*, 29 (6): 691-698
- Atli G, Canli M. 2010. Response of antioxidant system of freshwater fish *Oreochromis niloticus* to acute and chronic metal (Cd, Cu, Cr, Zn, Fe) exposures [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 73 (8): 1884-1889
- Birnbaum L S, Staskal D F. 2004. Brominated flame retardants: cause for concern? [J]. *Environmental Health Perspectives*, 112 (1): 1-9
- 陈社军, 麦碧娴, 曾永平, 等. 2005. 珠江三角洲及南海北部海域表层沉积物中多溴联苯醚的分布特征 [J]. *环境科学学报*, 25 (9): 1265-1271
- Çoban T, Bedük Y, Işcan M. 1996. In vitro effects of cadmium and nickel on glutathione, lipid peroxidation and glutathione S-transferase in human kidney [J]. *Toxicology in vitro*, 10 (2): 241-245
- 杜苗苗, 张娴, 颜昌宙. 2012. 溴系阻燃剂的毒理学研究进展 [J]. *生态毒理学报*, 7 (6): 575-584
- Förlin L. 1980. Effects of clophen A50, 3-methylcholanthrene, pregnenolone-16 α -carbonitril and phenobarbital on the hepatic microsomal cytochrome P-450-dependen monooxygenase system in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, of different age and sex [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 54 (3): 420-430

- Feng M B, Li Y, Qu R J, *et al.* 2013. Oxidative stress biomarkers in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to decabromodiphenyl ether and ethane, or their mixture [J]. *Ecotoxicology*, 22(7): 1101-1110
- 郭红岩, 陈亮, 王晓蓉, 等. 2001. 低浓度镉暴露对鲫鱼肝脏多种酶活性的影响 [J]. *南京大学学报(自然科学版)*, 37(6): 665-670
- Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. 1974. Glutathione S-transferases the first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22): 7130-7139
- Han D X, Wang H Y, Yue H W, *et al.* 2013. Study on the in vitro effects of the mixtures of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs) and heavy metals on Ethoxyresorufin-O-Deethylase (EROD) activity in *Mossambica tilapia* liver [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicity*, 91(4): 460-464
- Hissin P J, Hilf R. 1976. A fluorometric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues [J]. *Analytical Biochemistry*, 74(1): 214-226
- Hurd T, Whalen M M. 2011. Tetrabromobisphenol A decreases cell-surface proteins involved in human natural killer (NK) cell-dependent target cell lysis [J]. *Journal of Immunotoxicology*, 8(3): 219-227
- Lilienthal H, Van Der Ven L T M, Piersma A H, *et al.* 2009. Effects of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on dopamine-dependent behavior and brainstem auditory evoked potentials in a one-generation reproduction study in Wistar rats [J]. *Toxicology Letters*, 185(1): 63-72
- Mai B X, Chen S J, Luo X J, *et al.* 2005. Distribution of polybrominated diphenyl ethers in sediments of the Pearl River Delta and adjacent South China Sea [J]. *Environmental Science & Technology*, 39(10): 3521-3527
- Marklund S, Marklund G. 1974. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J]. *European Journal of Biochemistry*, 47(3): 469-474
- Modesto K A, Martinez C B R. 2010. Roundup © causes oxidative stress in liver and inhibits acetylcholinesterase in muscle and brain of the fish *Prochilodus lineatus* [J]. *Chemosphere*, 78(3): 294-299
- Morris S, Allchin C R, Zegers B N, *et al.* 2004. Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs [J]. *Environmental Science & Technology*, 38(21): 5497-5504
- 聂芳红, 孔庆波, 刘连平, 等. 2009. 两种二噁英类化合物对斑马鱼肝脏 MDA、SOD 和 GST 的影响 [J]. *食品与生物科学技术学报*, 28(2): 210-213
- Santos M A, Pacheco M, Ahmad I. 2004. *Anguilla anguilla* L. antioxidants responses to *in situ* bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure [J]. *Environment International*, 30(3): 301-308
- Song S B, Xu Y, Zhou B S. 2006. Effects of hexachlorobenzene on antioxidant status of liver and brain of common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Chemosphere*, 65(4): 699-706
- Stegeman J J, Binder R L, Orren A. 1979. Hepatic and extrahepatic microsomal electron transport components and mixed-function oxygenases in the marine fish *Stenotomus versicolor* [J]. *Biochemical Pharmacology*, 28(23): 3431-3439
- 苏燕, 范涤敏, 罗义, 等. 2007. 四溴双酚 A 对鲫鱼血清抗氧化系统的影响 [J]. *南京大学学报(自然科学版)*, 43(2): 164-170
- Van Der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 13(2): 57-149
- Viarengo A, Bettella E, Fabbri R, *et al.* 1997. Heavy metal inhibition of EROD activity in liver microsomes from the bass *Dicentrarchus labrax* exposed to organic xenobiotics: Role of GSH in the reduction of heavy metal effects [J]. *Marine Environmental Research*, 44(1): 1-11
- 王淑红, 王新红, 陈荣, 等. 2000. 茛菪、菲、苊对菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 超氧化物歧化酶的影响 [J]. *厦门大学学报(自然科学版)*, 39(4): 504-507
- 王素敏. 2012. 重金属和持久性有机污染物对罗非鱼肝脏抗氧化系统的影响 [D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所. 1-71
- 吴伟, 聂风琴, 翟建宏. 2009. 多溴联苯醚对鲫鱼离体肝脏组织中 CAT 和 GSH-Px 的影响 [J]. *生态环境学报*, 18(2): 408-413
- 岳宏伟. 2009. 基于酶活性的海洋环境中多环芳烃重金属复合污染的生物毒性效应研究 [D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所. 1-59
- 翟璟琰, 施华宏, 刘清波, 等. 2008. 四溴双酚 A 和五溴酚对红鲫甲状腺激素和脱碘酶的影响 [J]. *环境科学学报*, 28(8): 1625-1630
- 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 1986. 一种 SOD 的测活方法——邻苯三酚自氧化法的改进 [J]. *生物化学与生物物理进展*, (4): 71-73
- 周科, 马陶武, 朱程, 等. 2010. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚 (BDE-47) 污染沉积物对铜锈环棱螺肝脏的 SOD、CAT 和 EROD 活性的影响 [J]. *环境科学学报*, 30(8): 1666-1673