

苯并(a)芘和芘对梭鱼肝脏谷胱甘肽过氧化酶活性的影响*

王重刚¹ 郑微云² 余群² 赵扬¹ 陈纪新²

(¹ 厦门大学生命科学学院 361005)

(² 厦门大学环境科学研究中心 361005)

提要 在实验生态条件下,浓度范围 0.1 ~ 50 μg/L 的苯并(a)芘和芘的短期暴露造成梭鱼肝脏 GPx 活性先抑制后诱导的效应。相同的污染物,高浓度组对 GPx 活性的抑制大于低浓度组,出现 GPx 活性诱导的时间早于低浓度组;相同浓度下,苯并(a)芘对 GPx 活性的作用大于芘,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 GPx 活性与苯并(a)芘和芘暴露有一定的相关性,可以作为海洋环境污染监测的一种生物标志物。

关键词 苯并(a)芘,芘,谷胱甘肽过氧化物酶,梭鱼

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。早期的研究主要集中在 PAHs 暴露与肿瘤发生的关系, Winsten 等^[15] 1991 年观察到 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(如超氧阴离子基团 O⁻, H₂O₂),进而引发机体的氧化应激。据 Malins 等^[10] 1990、Nshimoto 等^[11] 1991 年、Chipman 等^[6] 1992 年报道,在鱼类, DNA 的氧化损伤已在污染环境中的侧枝鳎 (*Parophrys vetulus*) 及其稚鱼体内、欧洲黄盖鲽 (*Limanda limanda*) 上观察到。据 Roberts 等^[13] 1987 年、Winsten 等^[15] 1991 年、Livingstone 等^[9] 1992 年报道,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。David 1993 年指出,抗氧化酶存在于所有生物的组织中,其功能是清除氧自由基。谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx) 是抗氧化酶的一种,它催化下列反应: $H_2O_2 + 2GSH = GSSG + 2H_2O$ 。GSH 作为供氢者。Rodríguez Ariza 等^[16] 1993 年、Petruvalsky 等 1997 年报道^[3], 抗氧化酶可作为鱼类氧化胁迫的生物标志物。但 Hasspieler 等^[7] 1994 年指出不同种类鱼的抗氧化酶的活性是不同的,这导致其对氧化胁迫的敏感性不同。为此,作者选择典型的具有强致癌性的多环芳烃——苯并(a)芘 [benzo(a)pyrene (BaP)] 和弱致癌性的多环芳烃——芘作为污染物,观察和比较它们对梭鱼 GPx 活性的影响,了解 GPx 活性作为海洋环境 PAHs 污染监测的生物标志物的可能性。水体中 BaP 的背景值一般为 0.01 ~ 100 ng/L, BaP 的暴露实际上已不可避免,芘也是海洋环境中常见的多环芳烃,梭鱼

(*Mugil soiuy*) 是我国近海常见的底层生活的鱼类,主要吃底栖藻类,较多地接触底质,刘发义等^[2] 1991 年报道了用梭鱼作为材料进行的有关毒理学的研究。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 Beckman DU8B 型紫外可见分光光度计, 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配制成一定浓度的储备液,避光于 4 °C 保存。实验时用沙滤海水分别配制成 0.1, 1.0, 10, 20, 50 μg/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,喂以底栖硅藻[舟形藻 (*Nitzschia* sp.)] 或小球藻 (*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 °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 × 10⁻³ 海水。

* 国家自然科学基金资助项目 49876029 号。

第一作者:王重刚,出生于 1963 年,博士,副教授,目前从事鱼类生理学和毒理学研究。通信地址:厦门大学生命科学学院,361005。

收稿日期:2001-05-18;修回日期:2001-11-18

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(W/V)预冷的匀浆液于玻璃匀浆器中匀浆,然后立即离心(10 000 r/min, 30 min),取上清液测定 GPx 的活性,测定方法采用荣征星等 1994 年的方法。定义 25 °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。上清液中的蛋白含量用郭敏亮等 1996 报道的考马斯亮蓝法测定。

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±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 二氧六环对梭鱼肝脏 GPx 活性的影响

如图 1 所示,二氧六环使 GPx 活性略有升高,但与同一天的空白组比较,无显著差异。空白组 GPx 活性也有波动,但也没有显著性差异。说明助溶剂的浓度在允许范围内。

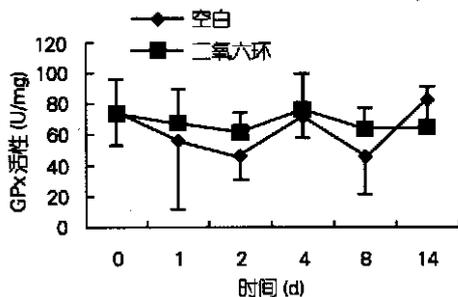


图 1 二氧六环对梭鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响

Fig.1 The effect of dioxane on the activity of hepatic Gutathione peroxidase (GPx) in *Migil scriuy*

2.2 BaP 暴露与梭鱼肝脏 GPx 活性的时间 - 效应关系

如图 2 所示, BaP 对 GPx 活性的影响是先抑制后诱导,污染物浓度高,则抑制较明显,同时出现诱导也较早。BaP 50 μg/L 组在暴污 4 d 后 GPx 活性已出现诱导;而 BaP 5 μg/L 组直到暴污 11 d, GPx 活性尚未出现明显的诱导。

2.3 芘暴露与梭鱼肝脏 GPx 活性的时间 - 效应关系

如图 3 所示, 50 μg/L 组暴露引起的 GPx 活性抑制大于 5 μg/L 组的,随着暴露天数增加, GPx 活性下降, 50 μg/L 组暴露 7 d 后 GPx 活性出现诱导,而 5 μg/L

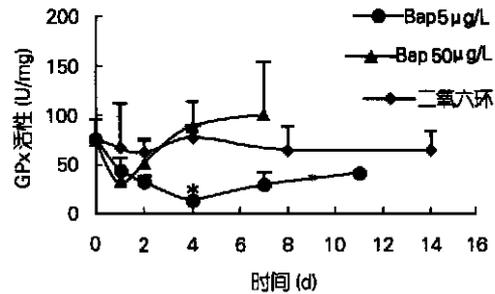


图 2 苯并(a)芘暴露对梭鱼肝脏 GPx 活性的影响 * 表示与二氧六环对照组比较有显著差异

Fig.2 Time-course of hepatic GPx activity in *Migil scriuy* exposed to BaP

组暴露 7 d 后 GPx 活性尚未出现诱导。暴露 4 d 后, 5 μg/L 组与二氧六环组比较有显著差异, 50 μg/L 组

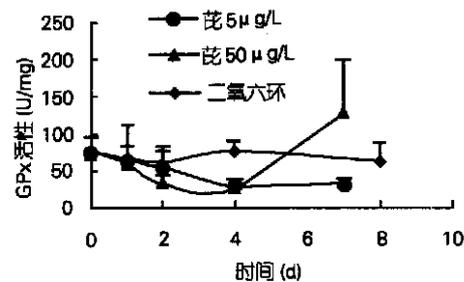


图 3 芘暴露对梭鱼肝脏 GPx 活性的影响

Fig.3 Time-course of hepatic GPx activity in *Migil scriuy* exposed to Pyrene

有极显著差异。

2.4 BaP、芘暴露与梭鱼肝脏 GPx 活性的剂量 - 效应关系

如图 4 所示, BaP 暴露从 0.01 ~ 10.0 μg/L 浓度组, GPx 活性呈抑制的趋势, 而 50.0 μg/L 浓度组, GPx 活性显著升高, 主要原因是暴污 4 d 后, 50 μg/L 组 GPx 活性已被诱导。GPx 活性的变化率分别为:

- 23.67%, - 54.51%, - 80.01%, - 79.73% 和 17.25%。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: $y = 0.1531x^2 - 6.5451x - 38.009$ ($R^2 = 0.9168$)。芘暴露 4 d 的 GPx 活性随着暴露浓度的增加而下降。GPx 活性的变化率分别为: - 13.01%, - 46.09%, - 60.74%, - 49.99% 和 - 66.62%。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: $y = - 8.1433 \ln x -$

38.297($R^2 = 0.8545$)。相同浓度下, BaP 暴露对 GPx 活性的抑制大于芘, 50 $\mu\text{g/L}$ 组的例外是因为 BaP50

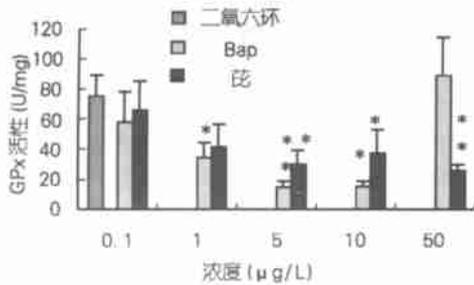


图4 苯并(a)芘和芘暴露对梭鱼肝脏 GPx 活性影响的浓度效应

* 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.4 Dose-effect of hepatic GPx activity in *Mugil sorituy* exposed to BaP pyrene

$\mu\text{g/L}$ 组暴露 4 d 后已出现 GPx 活性的诱导, 而芘 50 $\mu\text{g/L}$ 组暴露 4 d 尚未出现诱导。

3 讨论

Giulio 等 1993 年将叉尾鲱 (*Ictalurus punctatus*) 暴露于含有多种 PAHs 和其他毒性化学物的沉积物中, 观察到过氧化氢酶 (CAT) 和超氧化物歧化酶 (SOD) 活性比参照位点高, 从胆汁中分析出较高浓度的菲 (phenanthrene) 和 BaP 的代谢物。Stephensen 等^[4]从冰岛西南岸的 4 个港口捕获的大杜父鱼 (*Moxocephalus scorpius*) 观察到, 有些位点捕获的鱼 CAT 活性升高, 但 GPx 活性却没有升高, 胆汁分析并没有揭示出原因。Livingstone 等^[9]1992 年在污染位点的欧洲黄盖鲈上观察到较高的 SOD, CAT 和 GPx 活性。Livingstone 等^[8]1993 年将欧洲黄盖鲈暴露于含有 PAHs 和 PCBs 的沉积物中, 暴露 80 d 后, CAT 活性比对照的高, 而 GPx 则相反。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^[12]1994 年在欧洲沙丁鱼 (*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。这与在欧洲黄盖鲈肝脏中观察到的一致, 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。Rodriguez - Ariza 等^[14]1993 年报道从污染水域捕获的鲱鱼 (*Mugil sp.*) 比未

受污染的鲱鱼肝脏 SOD, CAT 和 GPx 活性均显著升高; 但也有些研究得到不同的结果, 如 Cossu 等^[5]将 *Unio tumidus* 转移至受多环芳烃和多氯联苯严重污染的河流中, 发现经 15 d 的暴露, 几种抗氧化指标均显著低于对照组。冯涛等^[1]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 GPx 活性则被显著抑制。

本实验的结果显示 BaP 和芘的暴露对梭鱼肝脏 GPx 活性呈现先抑制后诱导的效应, 短期暴露以抑制效应为主, 因为统计学分析有显著差异的数值全部是显示 GPx 活性的抑制; 同一种污染物, 高浓度组所造成的 GPx 活性的抑制程度大于低浓度组的, 对 GPx 活性的诱导比低浓度组要早, 呈现明显的浓度效应关系; 相同浓度下, BaP 对 GPx 活性的作用 (抑制或诱导) 大于芘, 这间接反映了 BaP 的毒性大于芘。这说明肝脏 GPx 活性与 PAHs 暴露存在有规律性的关系, 可以作为 PAHs 污染监测的一种生物标志物。

本实验结果与已有的报道是一致的, 在 PAHs 暴露下, GPx 活性可能诱导升高, 也可能受到抑制, 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。由于 GPx 活性在污染条件下, 既有抑制, 又有诱导, 而且不同浓度出现诱导的时间不同, 在应用 GPx 活性进行海洋环境监测时, 尚不能很好地定量评价污染状况, 因此作者认为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, 才能较准确客观地评估海洋环境的污染状况。

参考文献

- 1 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, 海洋科学, 2000, 24(5): 27 ~ 29, 36
- 2 刘发义, 孙凤. 石油污染对梭鱼肝脏混合功能氧化酶的影响, 海洋环境科学, 1991, 10(3): 49 ~ 51
- 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, Environ. Toxicol. Chem., 1997, 16(7): 1417 ~ 1421
- 4 Stephensen E., Svavarsson J., Sturve J. et al.. Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Moxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland, Aquatic Toxicology, 2000, 48: 431 ~ 442
- 5 Cossun C., Doyotte A., Jacquin M. C. et al.. Glutathione reductase, selenium dependent glutathione peroxidase,

- glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Union tumida*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies, *Ecotoxicology and environmental safety*, 1997, 38:122 ~ 131
- 6 Chipman J. K., Marsh J. W., Livingstone D. R. *et al.*. Genetic toxicity in the dab (*Limanda limanda*) from the North Sea, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1992, 91:121 ~ 126
- 7 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, *Aquat. Toxicol.*, 1994, 28(1 ~ 2), 53 ~ 64
- 8 Livingstone D. R., Philippe mairw, Matteus A., Peters L. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) activity responses in liver of Dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals, *Marine Pollution Bulletin*, 1993, 26(11):602 ~ 606
- 9 Livingstone D. R., Archibald S., Chipman J. K. *et al.*. Antioxidant enzymes in liver of the dab (*Limanda limanda*) from the North Sea, *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1992, 91:97 ~ 104
- 10 Malins D. C., Ostrander G. K., Hai manot R. *et al.*. A novel DNA lesion in neoplastic livers of feral fish: 2, 6-diamino-4-hydroxy-5-formamidopyrimidine, *Carcinogenesis*, 1990, 11:1045 ~ 1047
- 11 Nshimoto M., Roubal T., Stein J. E. *et al.*. Oxidative DNA damage in tissues of English Sole (*Parophrys vetulus*) exposed to nitrofurantoin, *Chem-biol. Interact.*, 1991, 80:317 ~ 326
- 12 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, *Marine Pollution Bulletin*, 1994, 28(5):299 ~ 304
- 13 Roberts M. H., Sved D. W. & Felton S. P. Temporal changes in AHH and SOD activities in feral spot from the Elizabeth River, a polluted subestuary, *Mar. Env. Res.*, 1987, 23:89 ~ 101
- 14 Rodriguez-Ariza A., Peinado J., Pueyo C. *et al.*. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral area, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1993, 50:2568 ~ 2573
- 15 Winsten G. W. & Thomas P. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms, *Toxicol.*, 1991, 19:137 ~ 161
- 16 Rodriguez-Ariza A., Peinado J., Pueyo C. *et al.*. Biochemical indicators of oxidative stress in fish from polluted littoral areas, *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 1993, 50(12):2568 ~ 2573

THE EFFECT OF BENZO(a) PYRENE AND PYRENE EXPOSURE ON HEPATIC GLUTATHIONE PEROXIDASE IN *Mugil so-iuy*

WANG Chong-gang¹ ZHENG Wei-yun² YU Qun² ZHAO Yang¹ CHEN Ji-xin²

(¹ School of Life Science, Xi'an University, 361005)

(² Environmental Science Research Center, Xi'an University, 361005)

Received: May, 18, 2001

Key Words: Benzo(a) pyrene, Pyrene, Glutathione peroxidase, *Mugil so-iuy*

Abstract

The effects of benzo(a) pyrene and pyrene exposure in a short period of time on hepatic Glutathione peroxidase (GPx) activity in *Mugil so-iuy* were studied at concentration of 0.1 ~ 50 µg/L in experimental condition. The results showed that the GPx activities were inhibited at first, and then induced. The inhibition of the GPx activity was greater in high concentration than in low concentration when the fish was exposed to the same pollutant. The enzyme activity induction appeared earlier at higher concentration groups than at lower concentration groups. At same concentration, the effect of BaP on the GPx activities was greater than that of pyrene. This indicated indirectly the toxicity of both BaP and pyrene. These results suggested that the hepatic GPx activity in *Mugil so-iuy* be quite correlative to BaP or pyrene exposure. The GPx activity could be one of the biomarkers applied to monitoring marine contamination.