

原油污染对栉孔扇贝抗氧化酶活性的影响

蒋凤华¹, 高伟¹, 赵美丽¹, 王振², 郑立¹

(1. 国家海洋局 第一海洋研究所 海洋生态研究中心, 山东 青岛 266061; 2. 青岛科技大学 化学与分子工程学院, 山东 青岛 266042)

摘要: 以原油水溶性成分(water soluble fraction of crude oil, WSF)为污染物, 采用暴露实验法, 研究了栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)鳃和消化腺组织中超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)活性的变化。结果表明, WSF 污染下, 鳃和消化腺组织 SOD 和 CAT 酶活性随暴露时间增加一般表现为降低-升高-降低的趋势, 酶活性达到最高的时间随浓度不同而变化。第 1 天时消化腺 SOD 在 0.08 mg/L 浓度下被诱导, 而后随时间增加表现为抑制效应; 浓度为 0.21 和 0.88 mg/L 时消化腺 SOD 酶活性被抑制, 随暴露时间延长而活性增加。暴露时间为 4 d 时, 石油烃浓度在 0.08 和 0.88 mg/L 时鳃组织 SOD 酶活性均被抑制, 而浓度为 0.21 mg/L 时被诱导。消化腺和鳃组织 SOD 可以作为扇贝被污染胁迫的指标。

关键词: 原油水溶性组分; 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*); 酶活性; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2012)07-0028-06

石油污染是目前海洋环境污染中最严重对海洋生物威胁最大的污染问题, 因此加强对海洋石油污染的监测, 保护海洋生态环境已经迫在眉睫。研究表明, 1996 年–2005 年间, 石油污染使我国渤海湾常见双壳类种群增长率降低了 2.33%^[1-2]。通过化学方法对石油烃进行测定, 只能得到在海洋环境中石油烃浓度含量, 不能给出其生物利用率及对整个生物系统的影响效应。应用生物监测方法, 可以获得被选择生物的系统参数, 以此来反应环境质量或状态的变化, 达到了了解污染性质、分析污染程度、追踪污染发生的历史、预测污染影响及发展趋势的目的^[3-4]。

目前, 抗氧化防御系统的变化作为指示污染物胁迫的生物标志物已成为环境科学领域的研究热点, 在环境胁迫等逆境情况下, 生物体内广泛存在活性氧爆发现象而使自由基增多, 过量自由基会使以超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)为主的抗氧化防御系统遭到破坏, 对细胞构成氧化胁迫, 造成 DNA 链断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等氧化损伤。因此 CAT、SOD 等酶活性的变化在一定程度上能反应出机体在环境胁迫下抗氧化系统的变化, 可作为环境污染胁迫的指标^[5-7]。

国外许多学者对石油烃的海洋生态毒理学进行

了探讨, 并对其富集机理和在生物体内不同组织、器官间的分布、迁移、转化等过程进行了大量的研究。国内学者对石油烃污染下鱼体内的抗氧化酶活性或重金属离子胁迫下贝类体内抗氧化酶活性的变化进行了一些研究^[8-9], 同时也研究了柴油水溶性组分胁迫下贝类体内抗氧化系统酶活性的变化^[10-11], 但原油水溶性组分对贝类的影响则鲜见报道。2010 年墨西哥湾溢油、大连溢油以及 2011 年渤海溢油事件的发生, 使得如何对原油泄漏引起的生态风险及损害评估进行评价变得尤为重要。本文以重要经济贝类栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)为研究对象, 研究了扇贝体内鳃和消化腺组织 SOD 和 CAT 酶对不同浓度原油水溶性组分(water soluble fraction of crude oil, WSF)污染的响应, 以期对海洋石油污染的生态评价及损害评估提供一些有价值的参数。

收稿日期: 2011-05-05; 修回日期: 2012-02-12

基金项目: 海洋公益性课题(200705011, 201105013); 北海区海洋环境质量综合评价项目(DOMEP (MEA)-01-01-C); 国家海洋局第一海洋研究所基本科研业务专项资金项目(2010T04); 国家海洋局青年海洋科学基金项目(2012534)

作者简介: 蒋凤华(1977-), 女, 汉, 山东德州人, 副研究员, 主要从事海洋环境污染评价方向研究, 电话 0532-88962711, E-mail: jiangfh@fio.org.cn; 郑立, 通信作者, 电话 0532-88961802, E-mail: zhengli@fio.org.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用栉孔扇贝购自青岛台东南山市场,洗净后清除其体表附着生物,在室温下暂养于室内 48 L 盛有天然海水的塑料箱中,连续充气,24 h 换水。每天投喂金藻一次,水温为 18~20℃,暂养一周,待其状态稳定后,选取活力好,体长 4~5 cm 的个体进行实验。

1.2 WSF 溶液的制备及浓度测量

实验用原油取自天津中海油平台。原油中含有数百种化合物,主要由烷烃、芳香烃及环烷烃组成,约占原油含量的 50%~98%,其余为非烃类含氧、含硫及含氮等化合物;烷烃是组成原油的主要成分,主要含有直链烷烃以外,还含有支链(异构)烷烃等;环烷烃带 5~6 个碳原子,环状排列,占原油含量的 30%~60%,重要的小量组分为甾烷、萜烷类;芳香烃占原油含量的 2%~4%,有单环芳烃(如苯、甲苯、二甲苯),双环芳烃(萘)、三环芳烃(如蒽和菲)以及多环芳烃(如苯并芘、苯并蒽、多核芳烃)等^[12]。

原油与沙滤海水按 1:10(V/V)混合,超声分散 1 h,静置 4 h 后吸取表层下水相即为母液,母液置于棕色玻璃瓶中 4℃ 保存备用。实验前稀释。海水中石油烃含量按照海洋监测规范^[13]方法,用 Hitachi F-4500 荧光分光光度计进行测量。

1.3 实验方法

选用体积为 50 cm×40 cm×35 cm 的玻璃水槽,分别加入不同体积 WSF 母液,设置为对照组、低浓度组、中浓度组和高浓度组,实验溶液总体积 30 L,测量各组实际浓度分别为 0.04、0.08、0.21 和 0.88 mg/L。将栉孔扇贝随机分为 4 组,每组 40 只扇贝,充气泵 24 h 充气,每日投喂 100 mL 金藻(密度为 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ 个/mL)一次,更换 1/3 体积相同浓度的实验溶液,以使溶液浓度保持相对稳定。实验期间水温 18~20℃。

在污染实验开始的第 0、1、2、4、7 天采样,7 d 后将污染液全部换成清洁的沙滤海水进行为期 3 d 的恢复实验,每次采样随机选取 3 只扇贝。采样时仔细分离出鳃和消化腺样品,用预冷超纯水冲洗并用滤纸吸干水分后,装在铝箔折成的小袋中,称重,−80℃ 保存。

1.4 样品处理及测定

1.4.1 粗酶液的提取

以预冷磷酸缓冲液为提取液,按照 1:9(W/V)比例,先将 1/3 提取液加入组织研磨器进行在冰浴中匀浆,余下的 2/3 提取液冲洗组织研磨器,合并匀浆液,5500 r/min,4℃ 离心 30 min,取上清液(粗酶液)−80℃ 保存至酶活性分析。

1.4.2 抗氧化酶活性和蛋白含量的测定

SOD、CAT 活性测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒,严格按照试剂盒说明书进行。SOD 采用黄嘌呤氧化酶法测定,其活性单位定义为:每毫克组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个单位。CAT 采用可见光法测定,其活性单位定义为:每毫克组织蛋白每秒钟分解 1 mmol 的 H_2O_2 的量为一个活力单位。蛋白含量采用考马斯亮蓝方法进行测定。

1.4.3 数据处理

实验数据采用数理统计法将实验组与对照组差异进行 *t*-检验。数据结果显示为平均值±标准偏差(Mean±SEM), $P < 0.05$ 被认为差异显著, $P < 0.01$ 被认为差异极显著。

2 实验结果

SOD、CAT 是广泛存在于生物体中的抗氧化酶,在生物体各组织器官中都有分布。实验结果表明,各浓度组扇贝体内鳃组织中 SOD、CAT 酶活性一般低于消化腺组织,主要原因在于消化腺中包含肝脏,而肝脏是机体代谢解毒的主要器官,因而酶活性较高,这与其他无脊椎动物类似,与文献报道是一致的^[10,14]。

2.1 原油污染对扇贝鳃组织 SOD 和 CAT 活性的影响

不同浓度 WSF 污染下栉孔扇贝鳃组织 SOD 酶活性变化如图 1 所示。可见,实验期间对照组 SOD 酶活性无显著变化,各实验组与对照组均存在显著差异。第 1 天时 3 个实验组 SOD 酶活性均被抑制,分别比对照组降低了 25.9%、51.2% 和 29.0%。第 2 天各实验组 SOD 酶活性均较第 1 天有所升高,低、高浓度组 SOD 酶活性分别高于对照组 48.0% 和 31.5%,处于被诱导状态;中浓度组则低于对照组 28.0%。第 4 天时低、高浓度组 SOD 酶活性降低,处于被抑制状态,分别较对照组降低了 23.9% 和 26.2%;而中浓度组则被诱导。时间延长至第 7 天时,3 个实验组

SOD 酶活性均被显著抑制, 分别为对照组的 34.5%、36.4%和 66.3%, 且随 WSF 浓度增加抑制率也增加, 呈现浓度-效应关系。3 d 恢复实验后(第 10 天), 低浓度组 SOD 酶活性升高为对照组的 114%, 而中、高浓度组 SOD 酶活性仍然被抑制, 分别只有对照组的 35.3%和 36.0%, 表明低浓度 WSF 胁迫 7 d, 鳃组织 SOD 酶活性可恢复, 随 WSF 浓度增大 SOD 酶活性则不能恢复。从时间梯度上比较, 实验组 SOD 活性有降低-升高-降低的趋势, 酶活性达到最高的时间随 WSF 浓度不同而不同。

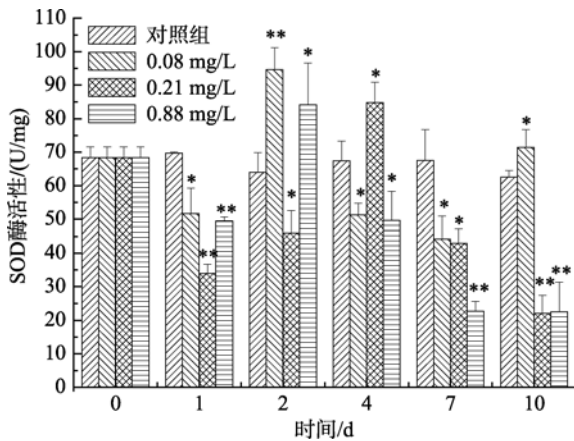


图1 原油水溶性组分对栉孔扇贝鳃组织 SOD 酶活性的影响
Fig. 1 Effects of WSF of crude oil on SOD activity in the gill of *Chlamys farreri*
与对照组相比, *: 显著差异, $0.01 < P < 0.05$; **: 极显著差异, $P < 0.01$

Compared with the control, *: significant difference, $0.01 < P < 0.05$; **: highly significant difference, $P < 0.01$

图 2 为不同浓度 WSF 污染下栉孔扇贝鳃组织 CAT 酶活性的变化。可见, 实验期间各实验组与对照组相比较均表现为抑制效应, 并且第 7 天时酶活性最高。第 1 天时低、中浓度组 CAT 酶活力与对照组之间存在显著差异($P < 0.01$)。第 2 天时中浓度组 CAT 酶活力最低, 与对照组之间存在显著差异($0.01 < P < 0.05$); 而低、高浓度组 CAT 酶活性相近, 并与对照组之间无显著差异。第 4 天和第 7 天时, 各实验组 CAT 酶活性与对照组之间均无显著差异。时间梯度上比较, 各实验组 CAT 酶活力同样存在“降低-升高-降低”的趋势。3 d 恢复实验后, 各实验组 CAT 酶活性均没有恢复到对照组水平。

2.2 石油污染对消化腺 SOD 和 CAT 酶活性的影响

图 3 为不同浓度 WSF 污染下栉孔扇贝消化腺组

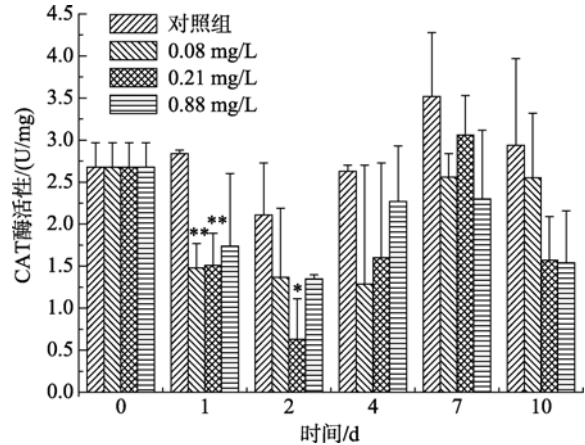


图2 原油水溶性组分对栉孔扇贝鳃组织 CAT 酶活性的影响
Fig. 2 Effects of WSF of crude oil on CAT activity in the gill of *Chlamys farreri*

与对照组相比, *: 显著差异, $0.01 < P < 0.05$; **: 极显著差异, $P < 0.01$

Compared with the control, *: significant difference, $0.01 < P < 0.05$; **: highly significant difference, $P < 0.01$

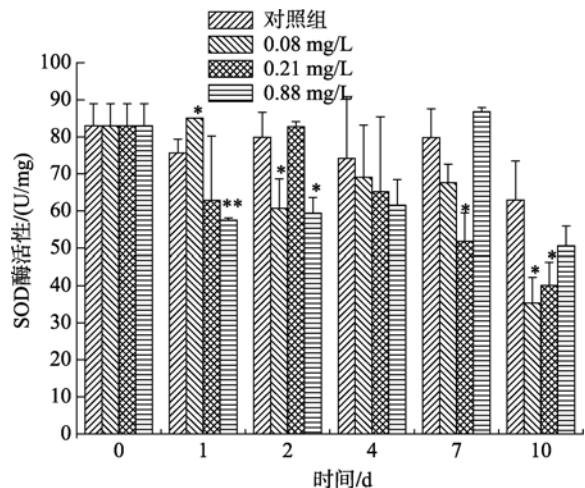


图3 原油水溶性组分对栉孔扇贝消化腺 SOD 酶活性的影响
Fig. 3 Effects of WSF of crude oil on SOD activity in the digestive gland of *Chlamys farreri*

与对照组相比, *: 显著差异, $0.01 < P < 0.05$; **: 极显著差异, $P < 0.01$

Compared with the control, *: significant difference, $0.01 < P < 0.05$; **: highly significant difference, $P < 0.01$

织 SOD 酶活性随时间的变化。可见, 第 1 天时低浓度组 SOD 酶被显著诱导, 高于对照组 24.0%; 中浓度组 SOD 酶活性被抑制, 但与对照组之间无显著差异; 高浓度组 SOD 酶活性则被极显著抑制, 低于对照组 24.0%。第 2 天时, 低浓度组和高浓度组的抑制率分别为 24.0%和 25.7%, 与对照组之间差异显著; 中浓度组 SOD 酶活性与对照组之间无显著差异。第 4 天时各实验组 SOD 酶活性均表现为抑制, 但与对

照组之间无显著差异。第 7 天时低浓度组和中浓度组 SOD 酶活性分别为对照组的 84.8% 和 65.0%，表现为抑制效应；高浓度下则表现为诱导效应，SOD 酶活性升高 8.8%，但只有中浓度组与对照组之间存在显著差异。总之，随暴露时间增加，低浓度 WSF 胁迫下消化腺 SOD 酶活性表现为升高-降低的变化趋势，对 SOD 酶有诱导-抑制作用；而中、高浓度 WSF 胁迫下，SOD 酶活性表现为降低-升高的趋势，有抑制-诱导作用，SOD 酶活性达到最高的时间随 WSF 浓度不同而不同。3 d 恢复实验后，各实验组与对照组相比均处于抑制状态，且低、中浓度组与对照组之间存在显著差异。

由图 4 可见，实验期间，低、中浓度组 CAT 酶活性与对照相比均被抑制，且第 2 天活性最高，低浓度组在第 7 天时与对照组之间差异显著，而中浓度组在第 1 天和第 7 天与对照组之间差异显著；并且第 7 天时抑制率最大，达 76.0%。高浓度组 CAT 酶活性在第 1 天和第 2 天被抑制，抑制率分别为 48.1% 和 22.1%，第 4 天和第 7 天则表现为诱导效应，分别为对照组的 121% 和 104%，但只有第 1 天和第 7 天时与对照组之间存在显著差异。从时间梯度上看，低、中浓度组 CAT 酶活性表现为降低-升高-降低的趋势，而高浓度组表现为降低-升高的变化，如果污染胁迫时间进一步延长，可能会出现降低的趋势。3 d 恢复实验后，低浓度和中浓度下 CAT 酶活性相对于对照组有所提高，高浓度下 CAT 酶活性有所降低，

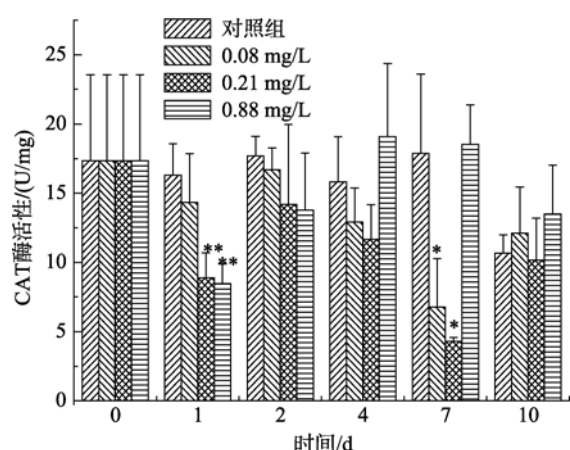


图 4 原油水溶性组分对栉孔扇贝消化腺 CAT 酶活性的影响
Fig. 4 Effects of WSF of crude oil on CAT activity in the digestive gland of *Chlamys farreri*

与对照组相比，*：显著差异， $0.01 < P < 0.05$ ；**：极显著差异， $P < 0.01$

Compared with the control, *: significant difference, $0.01 < P < 0.05$; **: highly significant difference, $P < 0.01$

分别为对照组的 113%、95% 和 126%，但均与对照组之间无显著差异。

3 讨论

石油烃可改变磷脂脂肪酸的构成，其中的多环芳烃可与芳烃受体结合，进而影响相关酶的活性^[15]。目前公认的石油污染的生物标志物是细胞色素 P450 和 DNA 加合物^[16]。但由于石油烃在生物体内代谢时往往伴随产生大量自由基，因此，抗氧化系统也有可能作为石油污染的生物标志物，关于这方面的研究正越来越引起各国学者的兴趣。研究表明，石油的毒性作用机制主要是石油代谢中产生的自由基对免疫细胞如吞噬细胞的脂质过氧化作用，影响了双壳类的免疫功能^[9]。

研究发现，绿贻贝肝脏组织 SOD 活性与体内多氯联苯含量显著相关^[5]，僧帽牡蛎消化腺和鳃的 SOD、CAT 活性与体内石油烃含量均有良好的正相关性^[10]。研究证实，当生物体受到轻度逆境胁迫时，SOD、CAT 活性往往升高，认为是生物体对污染的适应性反应，主要是增强机体消除活性氧自由基的能力；而当受到重度逆境胁迫时，SOD、CAT 活性通常降低，是污染物对生物体的作用已超过机体的适应能力，从而导致生物体的伤害^[10,17]。

本文实验结果显示，WSF 污染下，栉孔扇贝鳃和消化腺组织 SOD 和 CAT 酶活性随暴露时间的增加，一般表现为降低-升高-降低的趋势，酶活性达到最高的时间随浓度不同而变化。鲁双庆等^[18]研究发现，随暴露时间的增加，Cu 污染下，黄鳍鲷肝脏保护酶 GPx(谷胱甘肽过氧化物酶)、CAT 和 SOD 的活性影响同样整体表现为“抑制-诱导-抑制”的规律。暴露时间为 4 d 时，在低(0.08 mg/L)、高(0.88 mg/L)浓度 WSF 污染胁迫下鳃组织 SOD 酶活性均被抑制，而在中浓度(0.21 mg/L)下被诱导。栉孔扇贝暴露于 Cu 溶液 10 d 后，随 Cu 质量浓度的增加，内脏团 SOD、CAT、GPx 活性表现出同样表现为“抑制-诱导-抑制”的规律^[19]。脱氧鬼臼毒素对斑马鱼肌肉组织 SOD 酶活性的影响，同样在 0.5 mg/L 存在抑制作用，在 1.0 和 2.0 mg/L 时具有诱导作用，而达到 4.0 mg/L 时 SOD 和 CAT 活性均被显著抑制^[9]。由此可见，本文研究结果与文献报道相一致。在实验浓度范围内，扇贝体内鳃和消化腺组织 SOD、CAT 酶均发生变化，消化腺和鳃组织 SOD 可以作为扇贝被污染胁迫的指标。

致谢: 感谢中国海监总队业务化经费“海洋石油勘探开发溢油检验鉴定执法业务化运行系统-海洋溢油损害评估”的支持。

参考文献:

- [1] 许思思, 宋金明, 袁华茂, 等. 镉、汞、铅和石油烃复合污染对渤海湾常见渔业资源生物的影响初探[J]. 生态毒理学报, 2011, 5(6): 793-802.
- [2] Xu S S, Song J M, Yuan H M, et al. Petroleum hydrocarbons and their effects on fishery species in the Bohai Sea, North China[J]. Journal of Environmental Sciences, 2011, 23(4): 553-559.
- [3] Wania F, Mackay D. Tracking the distribution of persistent organic pollutants [J]. Environmental Science and Technology, 1996, 30: 390A-396A.
- [4] Wepener V, van Vuren J H J, Chatiza F P, et al. Active biomonitoring in freshwater environments: early warning signals from biomarkers in assessing biological effects of diffuse sources of pollutants [J]. Physics and Chemistry of the Earth, 2005, 30: 751-761.
- [5] Cheung C C C, Siu W H L, Richardson B J, et al. Antioxidant responses to benzo[a]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis*[J]. Environmental Pollution, 2004, 128: 393-403.
- [6] Richardson B J, Mak E, De Luca-Abbott S B, et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): Do mussels “integrate” biomarker responses? [J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57: 503-514.
- [7] Jena K B, Verlecar X N, Chainy G B N. Application of oxidative stress indices in natural populations of *Perna viridis* as biomarker of environmental pollution [J]. Marine Pollution Bulletin, 2009, 58: 107-113.
- [8] 余群, 郑微云, 翁妍, 等. 石油污染对真鲷幼体中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的毒理效应[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 1999, 38(3): 429-434.
- [9] 高蓉, 张守刚, 肖杭. 脱氧鬼臼毒素对斑马鱼(*Danio rerio*)代谢酶和抗氧化酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(5): 700-704.
- [10] 陈荣, 郑微云, 余群, 等. 石油污染对僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata*)抗氧化酶的影响[J]. 环境科学学报, 2002, 22(3): 385-388.
- [11] 陈荣, 郑微云, 郁昂. 0#柴油水溶性成分对僧帽牡蛎(*Ostrea cucullata*)谷胱甘肽硫转移酶活性的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2005, 44(S): 219-221.
- [12] 王振, 郑森林, 刘文华, 等. 原油水溶性成分对斜带髯鲷受精卵及仔鱼的急性毒性效应[J]. 台湾海峡, 2010, 29(3): 367-372.
- [13] 海洋监测规范, 第4部分: 海水分析[S]. GB17378.4-2007.42-43.
- [14] 张培玉, 唐学玺, 董双林. 蒎对太平洋牡蛎不同组织抗氧化酶活性差异性影响与膜脂质过氧化研究[J]. 海洋环境科学, 2007, 26(5): 434-437.
- [15] Billiard S M, Hahn M E, Frank D G, et al. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors (AHRs) [J]. Comparative biochemistry and physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology, 2002, 133(1): 55-68.
- [16] Grundy M M, Ratcliffe N A, Moore M N. Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Marine environment research, 1996, 42(1-4): 187-190.
- [17] 于娟, 唐学玺, 杨震. 蒎对二种海洋微藻抗氧化系统的影响[J]. 应用与环境生物报, 2001, 7(4): 340-343.
- [18] 鲁双庆, 刘少军, 刘红玉. Cu 对黄鳍肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响[J]. 中国水产科学, 2002, 9(2): 138-141.
- [19] 王凡, 赵元凤, 吕景才, 等. 铜污染对扇贝内脏团抗氧化酶活性的影响[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 622-624.

Effect of crude oil on the activity of antioxidant enzyme of scallop *Chlamys farreri*

JIANG Feng-hua¹, GAO Wei¹, ZHAO Mei-li¹, WANG Zhen², ZHENG Li¹

(1. Research center of Marine Ecology, The First Institute of Oceanography, State Ocean Administration (SOA), Qingdao 266061, China; 2 .College of Chemistry and Molecular Engineering, Qingdao University of Science and Technology, Qingdao 266042, China)

Received: May, 5, 2011

Key words: water soluble fraction (WSF) of crude oil; *Chlamys farreri*; activity of enzyme; Super Oxide Dismutase (SOD); Catalase (CAT)

Abstract: The toxic effects of water soluble fraction (WSF) of crude oil on scallop *Chlamys farreri* were examined through exposure tests at different concentrations. The activities of antioxidases in gill and digestive glands were examined. The results showed that the activities of both SOD (Superoxide Dismutase) and CAT (Catalase) in gills and digestive glands showed a decrease-increase-decrease trend with increased exposure time. Time for the enzymes to reach their highest activities varied with the concentration of WSF. The activity of SOD in digestive gland was induced by 0.08 mg/L of WSF on the 1st day of exposure, followed by inhibitory effect. The digestive gland enzyme activities were inhibited first and then increased with time at 0.21 mg/L and 0.88 mg/L of WSF. At the 4th day of the test, the activities of SOD in gills gland were inhibited by both 0.08 and 0.88mg/L of WSF but induced by 0.21 mg/L of WSF. Our study indicated that the SOD activity could be used as a stress indicator of *Chlamys farreri* when exposed to petroleum polluted environments.

(本文编辑: 康亦兼)