

三氯异氰尿酸对剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)毒性及其抗氧化酶影响*

聂湘平¹ 王翔^{1,2} 李凯彬³ 吴淑勤³

(1. 暨南大学水生生物研究所 广州 510632; 2. 水利部中国科学院水工程生态研究所 武汉 430079;
3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所 广州 510380)

提要 采用生物毒性测试与评价方法对常用消毒剂药物三氯异氰尿酸(Trichloroisocyanuric acid, TCCA)对剑尾鱼的急性毒性及其、相代谢酶活性影响进行了研究。结果表明, TCCA 对剑尾鱼的 96h LC_{50} 为 2.15mg/L。TCCA 对剑尾鱼肝脏还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽硫转酶(GST)和 7-乙氧基异吩恶唑酮-脱乙酰酶(EROD)都存在诱导作用。雌雄个体在 GST 和 EROD 的诱导响应时间有显著差异性, 其中雄性个体 GST 对 TCCA 暴露响应比雌性个体敏感。

关键词 三氯异氰尿酸, 剑尾鱼, 毒性效应, 抗氧化酶

中图分类号 X171.5, Q178.1

三氯异氰尿酸(Trichloroisocyanuric acid, TCCA)是一种常用的水体消毒剂, 不仅广泛用于宾馆、餐饮、医院、游泳池等公共设施的消毒, 而且在水产养殖业中作为一种高效、价格低廉的消毒杀菌剂也被普遍用于水体消毒。但目前这种具有代表性的水体消毒药物对水生生物, 特别是对鱼类的毒性及其生长代谢的影响尚未有明确的认识和评价(Costanzo *et al.*, 2005; Kostich *et al.*, 2008)。有关 TCCA 药物对水生生物的毒性影响文献还鲜见报道(Bound *et al.*, 2004; Fent *et al.*, 2006)。剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)具有体形小、繁殖周期短、繁殖力强、便于在实验室内饲养管理, 并且对许多毒物敏感等特点, 适合作为毒理学水生实验动物(吴淑勤等, 2003)。本实验选择剑尾鱼作为实验材料, 研究 TCCA 对鱼类的毒性及其相、相生生化代谢酶活性的响应变化(王丽平等, 2007), 以评价 TCCA 药物对鱼类生长的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)取自中国水产科学

研究院珠江水产研究所。雄鱼平均体长(5.13 ± 0.7)cm ($n = 30$), 平均质量(2.83 ± 0.5)g; 雌鱼平均体长(5.96 ± 0.5)cm ($n = 30$), 平均质量(4.31 ± 0.4)g。驯养于曝气 48h 以上的自来水中, pH 7.6, 温度(24 ± 2), 自然光照, 实验鱼种在药物暴露实验前在实验条件下驯养一周。实验药品 TCCA 为分析纯(购自 Sigma 公司)。

1.2 仪器设备

Thermo forma 超低温冰箱; Sigma 2-16k 冷冻高速离心机; Thermo Helios 紫外可见分光光度计; HITACHI F-4500 荧光分光光度计。

1.3 毒性实验

1.3.1 预备实验 实验设置 5 个质量浓度组, TCCA : 0.0、0.1、0.5、2.5、5.0、10mg/L。实验在体积为 10L 的水族箱中进行, 内盛 7L 实验液。实验当天用曝气自来水配制成母液, 实验时用曝气自来水稀释到所需浓度。每个水族箱放 10 尾鱼。实验开始后第 0、24、48、72、96h 观察并记录各水族箱实验鱼的存活情况。

1.3.2 急性毒性实验 从预实验得到 TCCA 的无

* 国家自然科学基金资助项目, 40471118 号、U0633006 号; 科技部公益研究专项资助项目, 2004DIB1Z-029 号。聂湘平, 博士, 副研究员, E-mail : txpnie@jnu.edu.cn

收稿日期: 2007-08-15, 收修改稿日期: 2007-10-30

死亡浓度和 100%死亡浓度之间按等对数间距取 5 个质量浓度:空白对照、0.40、0.80、1.60、3.20、6.40mg/L, 每个浓度组设 3 个平行, 每个水族箱放 10 尾鱼, 雌雄各 5 尾。实验周期每 48h 更换一次试液。实验开始后第 0、24、48、72、96h 观察并记录实验鱼的存活情况。用概率单位法计算 96h LC_{50} , 并求出 95%置信限, 安全质量浓度(C_s): $C_s = 96h LC_{50} \times 0.1$ 。

1.4 样品处理与酶活性测定

根据急性毒性实验的结果, 按等对数间距取 4 个质量浓度梯度和一个空白对照, 分别为: 0.00、0.01、0.05、0.25、1.25mg/L。条件同预备实验, 实验周期每 48h 更换一次试液。实验开始后 24、72 和 168h 从各浓度水族箱中取雄鱼、雌鱼各两条, 解剖出肝脏, 立即放入 -80 超低温冰箱冷冻待测。

酶指标测定于实验当天将冷冻的肝脏取出, 在预冷的研钵中加入少许石英砂和 1.5ml Tris-蔗糖缓冲液, 研碎后转入离心管, 10000r/min 离心 15min, 上清液为粗酶液, 作测定用。蛋白测定采用考马斯亮兰法, 用小牛血清蛋白作标准曲线。

1.4.1 谷胱甘肽硫转移酶(GST)测定 参照 Habig 等(1974)方法进行。一个 GST 活力单位定义为: 每 mg 蛋白质, 扣除非酶反应, 每 min 使 GSH 浓度下降 $1 \mu\text{mol/L}$ 。

1.4.2 7-乙氧基异吩恶唑酮-脱乙酰基酶(EROD)测定 参考 Pohl 等(1980)方法。

1.4.3 还原型谷胱甘肽(GSH)测定 采用 DTNB 显色分光光度法。反应体积为 5ml, 粗酶提取液 0.40ml, 磷酸钠缓冲液(0.10mol/L, pH 8.0)4.55ml, 0.01mol/L DTNB 0.05ml。在波长 412nm 处测定吸光度, 由 GSH 标准曲线计算样品中 GSH 的含量。

1.5 数据处理

采用 SPSS 12.0 统计软件处理, 结果用平均值 \pm 标准误差(Mean \pm SD)表示, 数据用单尾检验法进行比较, $P < 0.05$ 为显著差异。

2 结果

2.1 TCCA 对剑尾鱼的毒性

TCCA 质量浓度大于 0.80mg/L 时实验鱼开始死亡, 其 96h LC_{50} 为 2.15mg/L, 95%可置信限在 1.68—2.75, 其安全浓度为 0.22mg/L; 按照水生生物毒性分级属于高毒(国家环保局《水生生物监测手册》编委会, 1993)。

2.2 TCCA 对剑尾鱼相、相代谢酶的影响

TCCA 对剑尾鱼 GSH 的影响见图 1。在暴露初期(在 24h 时), 只有高浓度组(0.25 和 1.25mg/L 浓度组)GSH 显著被诱导($P < 0.05$); 但随时间延长, 高浓度处理组 GSH 含量不再增加, 而低浓度处理(0.01 和 0.05mg/L)逐渐增加。至 168h 时各浓度组均受到显著诱导($P < 0.05$)。剑尾鱼肝脏中 GSH 含量随暴露时间和暴露浓度的升高均呈现升高的趋势。雌鱼个体没有显著差别。

剑尾鱼雄性个体 GST 对 TCCA 暴露响应比较敏感, 高浓度组(1.25mg/L)暴露 24h 后或所有处理组暴露 72h 后 GST 受到显著诱导, 明显高于对照组($P < 0.05$)。但雌性个体各处理组暴露 72h 后与对照组相比, 其 GST 均无显著变化($P > 0.05$); 暴露 168h 后各处理组 GST 与对照组相比均受到显著诱导($P < 0.05$), 各处理组之间无显著差异($P > 0.05$)。

相对于对照组, 在 24h 时只有高浓度组(0.25 和 1.25mg/L)EROD 显著被诱导($P < 0.05$); 随暴露时间延长各处理组(0.01mg/L 浓度组除外)EROD 均被诱导($P < 0.05$), 至 72h 时 EROD 值达到最高值; 168h 时各处理组 EROD 值逐渐下降, 其中 0.25 和 1.25mg/L 浓度组其 EROD 与对照组仍有显著诱导($P < 0.05$)。相对于雄鱼来说, 雌鱼在 EROD 酶的反应上变化更大。

3 讨论

3.1 TCCA 对剑尾鱼的急性毒性

TCCA 是一种强的氧化剂, 在水产养殖中常被用于水体消毒。有文献报道 TCCA 对翘嘴红鲌的 96h LC_{50} 为 5.25mg/L(沈智华等, 2002); 对秀丽白虾的 96h LC_{50} 为 0.59mg/L(徐镇等, 2005)。本实验 TCCA 对剑尾鱼的 96h LC_{50} 为 2.15mg/L, 剑尾鱼对 TCCA 敏感程度高于一般鱼类但低于虾类。实验结果表明, TCCA 对鱼类有较强急性毒性。当浓度达到 3.20mg/L 时, 12h 内剑尾鱼出现了大量死亡, 而在 24h 以后只有少量死亡。说明 TCCA 毒性作用快, 但对鱼毒性持续时间不长。这是由于 TCCA 溶于水中可迅速产生大量次氯酸分子。次氯酸具有强氧化作用, 因其分子小, 不带电荷, 容易侵入细胞内攻击蛋白质中半胱氨酸和精氨酸残基, 与蛋白质发生氧化作用形成蛋白质多聚体, 导致鱼类死亡(Nouguchi *et al*, 2002)。但随时间延长, TCCA 浓度迅速衰减, 其相应的毒性也随之降低。

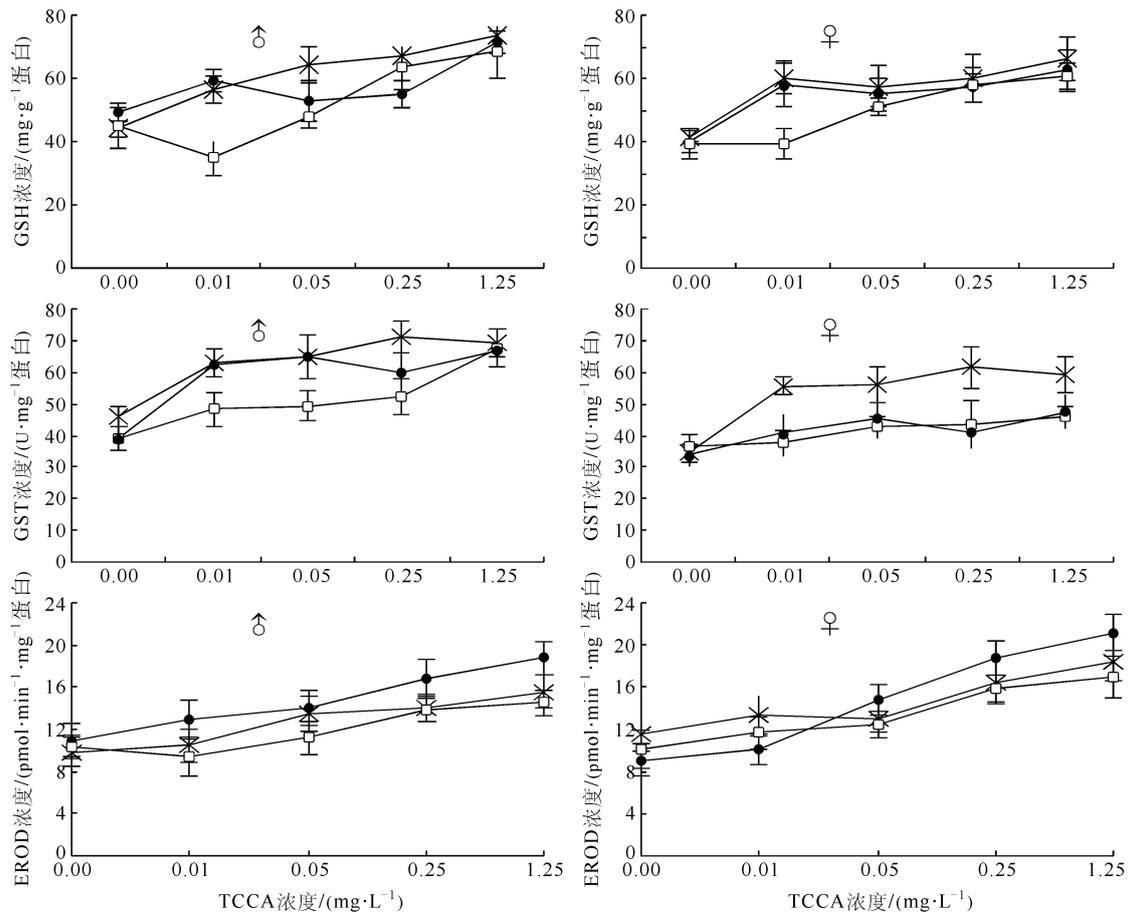


图1 TCCA对剑尾鱼GSH、GST和EROD的影响

Fig.1 Effect of TCCA in different concentrations on GSH, GST and EROD in *X. helleri*
表示与对照差异显著($P < 0.05$)。— — 24h, - - - 72h, - * - 168h

3.2 不同浓度 TCCA 暴露对剑尾鱼、相代谢的影响

EROD 和 GST 是生物体内参与外源污染物 I 相反应和 相反应代谢过程中重要的解毒酶。有研究表明这些酶对许多污染物(如洗涤剂、有机氯和一些药物)都表现出一种适应性变化(Vaccaro *et al.*, 2003; 丁诗华等, 2006; 任加云等, 2006; 张薇等, 2007), 在一定浓度毒物的胁迫下, 细胞内一些抗氧化酶被诱导如 GST 活性增强, GSH 含量增加, 保持细胞的氧化还原势, 以抵抗毒物的作用。这在许多相关研究都有相似报道(李康等, 2006; 蒋舜尧等, 2007), 如苯并[a]芘对梭鱼肝脏 GST 活性存在诱导效应(王重刚等, 2004); 多氯联苯等对鱼肝微粒体 EROD 的活性均有诱导作用(王菊英等, 2003)。实验中随着 TCCA 暴露浓度的增加, 剑尾鱼肝脏 GSH、GST、EROD 都表现出活性增大的趋势。其中 GST 和 EROD 对 TCCA 暴露响应较敏感, 适合作为 TCCA 暴露的生物标记物。

GSH 从 TCCA 暴露 24h 即受到诱导, 并且这种诱导会持续到实验周期结束(168h); GST 的诱导表现出一定的时间滞后效应, 在 168h 时 GST 活性显著高于 24h 和 72h GST 活性。EROD 在暴露 24h 时只有高浓度组被诱导, 随着时间的延长, 诱导作用逐渐增强, 72h 后达到峰值, 随后 EROD 活性诱导又开始下降, 至 168h 后 EROD 已缓慢恢复到原来的状态。这与许多文献报道相类似(林茂等, 2006)。由此可见, 生物体不同的代谢酶在污染物暴露时间的响应上存在一定的差异性, 所以在毒性实验过程中选择合适的暴露时间对于全面准确反映生物对污染物暴露的响应有重要的影响。

雄鱼、雌鱼在 TCCA 暴露下 GSH 响应均未发现明显差异。而 GST 变化雄鱼、雌鱼之间存在一定差异。动物对环境的胁迫都有一定的适应性, 随着暴露时间的延长和暴露浓度的逐步增加, 鱼类 GST 活力先受到诱导。相对于雌鱼, 雄鱼其 GST 对 TCCA 的

暴露响应变化更快一些。这种生物雌、雄不同个体之间代谢的差异可能既受和性染色体连锁的代谢酶差异的影响,也可能受激素水平和不同生理状态控制。如文昌鱼不同性别的个体在一些代谢同工酶如苹果酸脱氢酶、酸性磷酸酶的之间存在明显差异(庞秋香等, 2004)。软体动物螺在有机锡暴露中雌性个体体内抗氧化酶 CAT 活性也明显低于雄性个体(李张伟等, 2006)。

在 TCCA 暴露 72h 时 EROD 诱导到达峰值,但随着暴露时间的延长,雄鱼 EROD 开始下降,而雌鱼 EROD 则持续受到诱导。有文献报道雌雄激素能抑制二噁英诱导的 EROD 酶活性(夏革清等, 2003),因为 P4501A1 的编码的 EROD 酶不仅参与众多外源污染物和药物代谢,而且还与生物体内源性物质如性激素、类固醇物质代谢有关,生物体内激素水平的差异可能反过来影响到 EROD 酶活性的高低和响应的快慢(吴伟等, 2006)。推测这可能是鱼体不同性别个体在 EROD 酶表现差异的原因之一,但还须进一步验证。

4 结论

TCCA 对剑尾鱼都属于高毒物质,对剑尾鱼 96h LC_{50} 为 2.15mg/L, TCCA 的安全浓度为 0.22mg/L。TCCA 暴露可显著诱导剑尾鱼肝脏 GST、EROD 活性以及 GSH 含量增加,其中 EROD 受诱导最显著,适合作为 TCCA 暴露的生物标记物。剑尾鱼肝脏 GST、EROD 的诱导和暴露时间密切相关,并且雄鱼和雌鱼在 GST 和 EROD 上的诱导时间响应有显著差异性。

参 考 文 献

- 丁诗华,孙翰昌,陈大庆等, 2006. 阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠对草鱼抗氧化功能的影响. 海洋与湖沼, 37(2): 111—116
- 王丽平,郑丙辉,孟 伟, 2007. 环境污染对水生生物产生氧化压力的分子生物标志物. 生态学报, 27(1): 380—388
- 王重刚,陈奕欣,郑微云, 2004. 苯并[a]芘及其混合物暴露对梭鱼肝脏谷胱甘肽硫转移酶活性的影响. 海洋科学, 28(3): 40—43
- 王菊英,霍传林,韩庚辰, 2003. 多氯联苯 CB-28 对牙鲆肝脏中 EROD 活性的诱导作用研究. 海洋学报, 25: 35—40
- 任加云,潘鲁青,苗晶晶, 2006. 苯并[a]芘和苯并[k]荧蒽混合物对栉孔扇贝毒理学指标的影响. 环境科学学报, 26(7): 1180—1186
- 李 康,周忠良,陈立侨等, 2006. 苯并[a]芘对鲫鱼生物标志物的影响研究. 环境科学研究, 19(1): 91—95
- 李张伟,韩雅莉,简如君, 2006. 性畸变疣荔枝螺体内保护酶系统活力的研究. 海洋环境科学, 25(4): 36—38
- 吴 伟,瞿建宏,陈家长等, 2006. 多氯联苯(PCBs)胁迫下鲫鱼肝脏 EROD 酶活性与血清性激素含量的相关性研究. 生态与农村环境学报, 22(4): 52—56
- 吴淑勤,黄志斌,石存斌等, 2003. 鱼类实验动物与剑尾鱼水生实验动物化. 实验动物科学与管理, 20: 20—21
- 沈智华,胡廷尖,尹文林等, 2002. 翘嘴红鲌对几种常用渔药的敏感性实验. 浙江海洋学院学报(自然科学版), 21(4): 340—343
- 张 薇,宋玉芳,孙铁珩等, 2007. 菲和芘对蚯蚓(*Eisenia fetida*)细胞色素 P450 和抗氧化酶系的影响. 环境化学, 26(2): 202—206
- 林 茂,杨先乐,房文红等, 2006. 草鱼肝细胞中诱导剂对 EROD 作用的剂量效应研究. 水产学报, 30(3): 311—315
- 国家环保局《水生生物监测手册》编委会, 1993. 水生生物监测手册. 南京: 东南大学出版社, 192—202
- 庞秋香,张士瑾,王长法等, 2004. 雌雄文昌鱼同工酶的表型差异. 动物学报, 50(1): 62—67
- 夏革清,韩 平, 2003. 二噁英的拟雌激素作用和雌激素拮抗作用. 国外医学卫生学分册, 30(6): 325—328
- 徐 镇,徐如卫,周志明等, 2005. 四种常用渔药对秀丽白虾的急性毒性实验. 水产科学, 24(7): 29—31
- 蒋舜尧,周培疆,董玉良, 2007. 六氯苯对离体鱼肝线粒体抗氧化酶的作用. 中国环境科学, 27(1): 102—105
- Bound J P, Voulvoulis N, 2004. Pharmaceuticals in the aquatic environment — a comparison of risk assessment strategies. Chemosphere, 56: 1143—1155
- Costanzo S D, Murby J, Bates J, 2005. Ecosystem response to antibiotics entering the aquatic environment. Marine Pollution Bulletin, 51: 218—223
- Fent K, Weston A A, Caminada D, 2006. Ecotoxicology of human pharmaceuticals. Aquatic Toxicology, 76, 122—159
- Habig W H, Pabst M J, Jacoby W B, 1974. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in the mercapturic acid formation. Journal of Biology Chemistry, 249: 7130—7139
- Kostich M S, Lazorchak J M, 2008. Risks to aquatic organisms posed by human pharmaceutical use. Science of Total Environment, 389: 329—339
- Nouguchi N, Nakada A, Itoh Y, 2002. Formation of active oxygen species and lipid peroxide induced by hypochlorite. Archive of Biochemistry & Biophysics, 397(2): 440—445
- Pohl R J, Fouts J R, 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. Analytical Biochemistry, 107: 150—155
- Vaccaro E, Giorgi M, Longo V, 2003. Inhibition of cytochrome P450 enzymes by enrofloxacin in the sea bass (*Dicentrarchus labrax*). Aquatic Toxicology, 62: 27—33

TOXICITY AND ITS EFFECTS UPON THE ANTIOXIDANT ENZYMES OF TRICHLOROISOCYANURIC ACID TO SWORDTAIL FISH *XIPHOPHORUS HELLERI*

NIE Xiang-Ping¹, WANG Xiang^{1,2}, LI Kai-Bin³, WU Shu-Qin³

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou, 510632; 2. Institute of Hydroecology, Ministry of Water Resources & Chinese Academy of Sciences, Wuhan, 430079; 3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou, 510380)

Abstract The toxicity and effect of TCCA (trichloroisocyanuric acid) upon swordtail fish *Xiphophorus helleri* were studied in acute toxicity tests with the values of biomarkers in Phase and Phase . The biomarkers included activities of EROD (7-ethoxyresorufin-O-deethylase), GST (glutathione S-transferase) and total GSH (glutathione). Results showed that TCCA was highly noxious to the swordtail fish during early exposure period. The 96h LC_{50} of TCCA was 2.15mg/L. Induction effects were observed for GSH, EROD and GST in liver tissues of swordtail fish under the exposure of TCCA. Among them, GST and EROD were more sensitive to the exposure of TCCA and may be used as alternative biomarkers of TCCA exposure. However, some differences were noticed between female and male individuals for GST and EROD in response time to TCCA exposure; male fish were more sensitive to TCCA. In term of EROD, female individuals showed persistent induction during the whole exposure period, while male ones did so only in the early and middle period of the exposure and decrease afterwards.

Key words Trichloroisocyanuric acid, Swordtail fish *Xiphophorus helleri*, Toxicity effect, Antioxidant enzyme