

多氯联苯(Aroclor 1242)胁迫下 鲤鱼肝脏组织氧化应激

王仁君 王建国 丁宁 孙萌 高配科

(曲阜师范大学生命科学学院 曲阜 273165)

摘要 本文在实验室条件下通过静态水质染毒方式在生理生化和转录水平上探究了我国重要经济鱼种鲤鱼(*Cyprinus carpio*)对多氯联苯 Aroclor 1242 的氧化应激: 鲤鱼肝脏组织抗氧化酶[超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD)和过氧化氢酶(Catalase, CAT)]活性、脂质过氧化产物丙二醛(Malonydialdehyde, MDA)含量、相关抗氧化酶编码基因(Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、CAT)、应激蛋白 HSP70、转录因子 Nrf2 和芳烃受体 AhR2 基因表达。结果表明: Aroclor 1242 胁迫下, 鲤鱼肝脏组织抗氧化酶活性表现出低浓度促进高浓度抑制的趋势; 肝脏组织丙二醛含量显著升高, 其中 390 μ g/L 暴露组鲤鱼肝脏组织 MDA 含量在第 6d 高于对照组 92.1% ($P < 0.01$), 表明肝脏组织发生脂质过氧化, 膜系统受到损伤; 鲤鱼肝脏组织中 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、CAT、HSP70、Nrf2 和 AhR2 编码基因表达出现不同程度下调。本文从酶学和基因转录水平上揭示了 Aroclor 1242 胁迫下鲤鱼肝脏组织细胞的氧化应激。

关键词 多氯联苯; 鲤鱼; 氧化应激; 脂质过氧化; 基因表达

中图分类号 Q958.8 **doi:** 10.11693/hyh20180700170

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)属于氯代烃类化合物, 是氯化联苯异构体组成的一类有机氯化物, 根据氯原子取代数目和取代位置的不同, 多氯联苯同分异构体和同系物多达 209 种(李娜, 2012)。多氯联苯具有低溶性、高介电常数、低蒸汽压、抗热性且绝缘性好等优势, 因此被广泛应用于各种生产领域。1968 年日本“米糠油事件”发生后多氯联苯对环境的危害和影响才引起高度重视(虞俊超, 2014)。

多氯联苯理化性质稳定, 自然条件下很难被降解, 具有持久性、高毒性、高蓄积性和远距离迁移性等特征, 属于典型的环境持久性有机污染物(Safe, 1994)。尽管目前多氯联苯在国际上逐渐被禁止生产, 但仍有部分多氯联苯产品在被使用或被填埋, 这些残留物广泛存在于水体、大气和土壤等各种环境介

质中。多氯联苯可通过皮肤、呼吸道、消化道等途径进入鱼和其他动物体, 并循环累积, 能够干扰生物体的孵化、内分泌系统及生殖功能, 与生物体内蛋白质、DNA 形成加和物而致突变作用, 导致畸形甚至毒性遗传(Giesy *et al.*, 1998; 许友卿等, 2014)。多氯联苯潜在的生物毒性给环境、生态系统乃至人类健康带来潜在威胁(Fattore *et al.*, 2008; Diletti *et al.*, 2018)。

当生物体受到环境不利胁迫时, 机体通常会首先表现出氧化应激现象, 当氧自由基的生成与清除速率失去平衡, 过量积累的活性氧自由基会对细胞造成氧化损伤(奉斌等, 2009; 陈家长等, 2011; Liu *et al.*, 2016)。生物体为了减轻氧化应激过程中过多的自由基对机体所造成的伤害, 会通过抗氧化系统来清除体内过量的自由基。因此, 通过测定抗氧化酶活性

* 国家自然科学基金, 31200400 号, 31500414 号; 山东省自然科学基金, ZR2017MC037 号。王仁君, 硕士生导师, 教授, E-mail: wangrenjun2002@126.com

通讯作者: 高配科, 硕士生导师, 副教授, E-mail: gpkyl-001@163.com

收稿日期: 2018-07-13, 收修改稿日期: 2018-08-31

及其编码基因的转录表达情况能够有效表征生物体对特定环境胁迫的响应。鲤鱼(*Cyprinus carpio*)是我国重要经济型鱼类, 具有环境适应性强, 耐寒、耐碱、耐缺氧的特性, 栖息于江河、湖泊、水库等环境的水体底层, 以食底栖生物为主。多氯联苯胁迫下, 鲤鱼氧化应激方面的数据鲜有报道。鉴于鲤鱼的强环境适应性和底栖生活特性, 相较于其他小型水生鱼类, 以鲤鱼为受试生物, 探究多氯联苯的生物毒性具有更高研究价值。因此, 本实验以鲤鱼为受试生物, 将其暴露于 Aroclor 1242(高氯代的 PCBs 混合物)中, 通过静态水质接触染毒方式探究 PCBs 胁迫下鲤鱼肝脏组织中抗氧化酶[超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化氢酶(catalase, CAT)]活性、脂质过氧化水平物(丙二醛 malonydialdehyde, MDA)、抗氧化酶编码基因(Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 CAT)、应激蛋白 HSP70、转录因子 Nrf2 和芳烃受体 AhR2 编码基因表达, 以期揭示鲤鱼对多氯联苯的氧化应激, 揭示多氯联苯的潜在毒性机制。

1 材料与方 法

1.1 实验用鱼及预处理

本实验所用鲤鱼(*C. carpio*)购自微山湖水产养殖中心, 平均体长为(11.5±0.5)cm, 平均体重为(61.6±10.5)g。实验前先在水族箱中进行驯养 7 天。驯养期间每日按时喂养自制的饲料并及时清理箱底粪便及剩余饲料。实验前 1d 停止喂食, 选择大小均匀、体色光泽、食欲好的个体作为实验用鱼。实验器具为 90L 透明塑料水族箱(60cm×50cm×30cm), 试验用水为曝气 3 天后除氯的自来水, pH 为 7.0 左右, 水温为(24±1)°C。

1.2 Aroclor 1242 实验浓度选择

Aroclor 1242 在使用前先用一定量的 0.05%二甲亚砜(DMSO)作为助溶剂配成一定浓度的储备液。按等差间距设置为 5 个浓度梯度实验组和 1 个对照组, 每个实验组设置 3 个平行, 每个水族箱放 10 尾鱼, 分别于 12、24、48、72 和 96h 观察和记录死鱼数目, 期间若有鱼死亡, 及时捞出以免污染水质(胡伟华等,

2017)。选择 1/40、1/10、1/5 和 1/2 96h 半致死浓度(LC₅₀)值为亚急性毒性试验暴露浓度。

1.3 Aroclor 1242 暴露实验

用曝气除氯自来水在水族箱中将 Aroclor 1242 配置成浓度为 20、78、156 和 390μg/L 的溶液, 以不加 PCBs 的作为空白对照组, 以只加 DMSO 的做溶剂对照组, 所有浓度均设 3 个平行组, 每个浓度组下含体长重量均相近的鲤鱼 20 条。试验期间每隔 24h 更换培养溶液并及时除去死亡的鱼, 基于预实验数据于暴露后第 3、6 和 9 天测定鲤鱼肝脏中 SOD 和 CAT 活性以及 MDA 的含量。根据前期实验结果选取能引起氧化应激的浓度(78、156 和 390μg/L), 在此浓度胁迫下暴露 8 天, 以只加 DMSO 的溶剂对照组作为对照, 检测鲤鱼肝脏中相关抗氧化酶编码基因 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、CAT 和应激蛋白 HSP70、转录因子 Nrf2、芳烃受体 AhR2 基因表达变化。

1.4 鲤鱼肝脏组织中 SOD、CAT 和 MDA 的测定

从预设的每个实验组中随机取出鲤鱼 3 尾, 用纱布擦干鱼体表面的粘液后用木棍将其敲晕, 将鲤鱼放于冰面上迅速解剖取出肝脏并除去表面附带的结缔组织, 然后用 4°C 的生理盐水中洗去肝脏组织上的血渍。用滤纸拭干表面的水后准确称取肝脏组织 1g 转入 10mL 的匀浆管中, 按重量(g): 体积(mL)=1:9 的比例先用加入总量 2/3 预冷(4°C)的匀浆介质(0.01mol/L 蔗糖, 0.01mol/L Tris-HCl, 0.0001mol/L Na₂EDTA, 0.14mol/L NaCl, pH 7.4)于匀浆管中, 在冰水浴条件下 8000—10000r/min 匀浆 3min, 再将剩余的 1/3 匀浆介质冲洗残留在匀浆机上的组织, 一并倒入匀浆管, 制成 10%的肝脏组织的匀浆液。将所得到的 10%鲤鱼肝脏组织匀浆液在 4°C 预冷离心机上 12000g 离心 15min, 取上清液测定 SOD、CAT 活性和 MDA 含量。

SOD 活性用 SOD 试剂盒(黄嘌呤氧化酶法)测定, 操作按试剂盒说明书(碧云天生物技术, 上海, 中国)进行。SOD 活性的单位为 U/mg prot, U 的定义为: 每 mg 蛋白在 1mL 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个酶活力单位。计算公式为:

$$\text{SOD活力(U/mg prot)} = \left(\frac{\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度}}{\text{对照管吸光度} \times 50\%} \right) \left(\frac{\text{反应液总体积}}{\text{取样量} \times \text{组织中蛋白含量(mg prot/mL)}} \right)$$

CAT 活性用 CAT 试剂盒测定, 操作按试剂盒说明书(碧云天生物技术, 上海, 中国)进行。CAT 的单位为

U/mg prot, U 的定义为: 每 mg 组织蛋白每秒钟分解 1μmol 的 H₂O₂ 的量为一个酶活力单位。计算公式为:

$$\text{CAT活力(U/mg prot)} = \frac{271 \times (\text{对照管吸光度} - \text{测定管吸光度})}{60 \times \text{取样量} \times \text{组织中蛋白浓度(mg prot/mL)}}$$

MDA 含量测定用 MDA 试剂盒(TBA 法)测定, 操作按试剂盒说明书(碧云天生物技术, 上海, 中国)进

行, MDA 单位为 nmol/mg prot。组织中 MDA 含量计算公式:

$$\text{MDA含量(nmol/mg prot)} = \left(\frac{\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}}{\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}} \right) \left(\frac{\text{标准样品浓度(10nmol/mL)}}{\text{待测样本蛋白浓度(mg prot/mL)}} \right)$$

1.5 总 RNA 提取与 cDNA 合成

用 EasyPure® RNA kit 试剂盒提取鲤鱼肝脏组织总 RNA: 鲤鱼肝脏采集过程同 1.4, 总 RNA 提取过程按照 TransGen Biotech 公司 EasyPure® RNA kit 说明书要求进行操作。提取的总 RNA 通过琼脂糖凝胶电泳观察 18S 和 28S rRNA 是否完整, 并测定其 A260nm/A280nm 的吸光度比值是否在 1.8—2.0, 以此评价所提取的 RNA 质量。cDNA 合成参照 TransScript® One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix 说明书进行。

1.6 实时荧光定量

实时定量 PCR 利用 LightCycler®480 全自动荧

光定量 PCR 系统, 荧光染料为 SYBR, 内参基因为 β -actin, 实时定量 PCR 引物序列见表 1: Cu/Zn-SOD(姜维丹, 2008)、Mn-SOD(姜维丹, 2008)、CAT(姜维丹, 2008)、HSP70(邢厚娟, 2010)、Nrf2(Jiang *et al*, 2015)、AhR2(Du *et al*, 2016)。反应体系 20 μ L: 2 \times ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix 10.0 μ L, Primer 1(20 μ mol/L) 0.25 μ L, Primer 2(20 μ mol/L) 0.25 μ L, Template DNA/cDNA 1 μ L, ddH₂O 8.5 μ L。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30s; 95 $^{\circ}$ C 10s, (55—60 $^{\circ}$ C)退火 45s, 扩增 40 个循环, 在延伸时采集荧光信号, 每个样品设置 3 个重复。相对表达量的计算采用 2^{-CT} 法。

表 1 定量 PCR 检测的基因及引物信息
Tab.1 Genes and Primers used for quantitative real-time PCR

基因	基因全称	引物序列(5'到 3')
Cu/Zn-SOD	Cu/Zn superoxide dismutase	F: TGGCGAAGAAGGCTGTTTGT R: TTCACTGGAGACCCGTCCT
Mn-SOD	Mn superoxide dismutase	F: CTGCCTGACCTTCCATACGA R: CCTTAGCCAGTGCTCTTGATA
CAT	Catalase	F: CTGGAAGTGAATCCGTTTG R: CGACCTCAGCGAAATAGTTG
HSP70	heat shock protein 70	F: CCC CTG TCC CTG GGT ATT G R: CAC CAG GCT GGT TGT CTG AGT
Nrf2	nuclear factor erythroid 2-related factor 2	F: TTCCCGCTGGTTTACCTTAC R: CGTTTCTTCTGCTTGTCTTT
AhR2	Aryl hydrocarbon receptor 2	F: ATTCCCTTCTCAAAAACCGT R: AGTCCAGGATTGGCAGCGT

1.7 统计和分析

试验结果用平均值 \pm 标准偏差(Mean \pm Standard deviation)表示, 运用 SPSS17.0 统计学分析软件对数据进行统计学分析, 采用方差分析中的在 Dunnett's test 检验处理组和对照组之间的差异是否显著性, $P < 0.05$ 表示暴露组与对照组差异显著, $P < 0.01$ 表示暴露组与对照组差异极显著。

2 结果

2.1 Aroclor 1242 对鲤鱼急性毒性实验

不同浓度 Aroclor1242 暴露后, 鲤鱼个体死亡数量随时间的变化情况如表 2 所示。通过概率单位法计算得出 Aroclor1242 对鲤鱼 96h 半数致死浓度为 780 μ g/L。

2.2 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响

如图 1 所示, 不同浓度 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响整体表现为低浓度促进高浓度抑制的趋势。由图可知, 空白对照组和溶剂对照组鲤鱼肝脏组织 SOD 活性在三个测试时间段内没有发生显著变化($P > 0.05$), 表明少量二甲基亚砜(DMSO)作为助溶剂对鲤鱼肝脏组织 SOD 活性无影响。与对照组相比, 20 μ g/L Aroclor 1242 暴露组鲤鱼肝脏组织 SOD 活性在第 3 天和第 6 日均显著升高, 分别高出对照组 18.9%、26.7% ($P < 0.05$); 156 μ g/L 暴露组鲤鱼肝脏组织 SOD 活性在第 3 天和第 6 日均显著下降, 分别低于对照组 31.9%和 29.2% ($P < 0.05$); 390 μ g/L 暴露组鲤鱼肝脏组织 SOD 活性在第 3 天、6 天和 9 日均显著

下降, 分别降低 35.5%、35.1% ($P<0.05$)和 20.7% ($P<0.01$)。以上数据表明, SOD 活性表现出低浓度促

进高浓度抑制的趋势, 且中高浓度实验组还表现出一定的先下降后上升的趋势。

表 2 不同浓度不同时长 Aroclor1242 暴露下鲤鱼的死亡情况

Tab.2 The mortality of *C. carpio* under exposure to different concentrations of Aroclor1242 in different durations

浓度($\mu\text{g/L}$)	个体数	死亡数(24h)	死亡数(48h)	死亡数(96h)
30	10	0	0	0
50	10	0	0	1
100	10	0	1	2
200	10	1	0	2
500	10	1	3	3
1000	10	3	5	6
2000	10	10	10	10

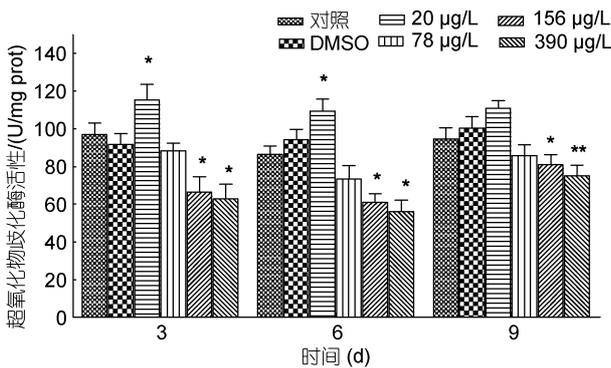


图 1 不同浓度 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏组织 SOD 活性的影响

Fig.1 Effects of different concentrations of Aroclor 1242 on SOD activity in liver tissue of *C. carpio*

2.3 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏 CAT 活性的影响

如图 2 所示, 不同浓度 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏 CAT 活性的影响整体表现为低浓度促进高浓度抑制的趋势。与对照组相比, 20 和 78 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织 CAT 活性在第 3 天时显著升高, 分别高于对照组 44.1%和 46.8% ($P<0.05$)。在第 9 天时 CAT 活性均有所降低, 其中, 78 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织 CAT 活性低于对照组 24.1% ($P<0.05$), 156 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织 CAT 活性低于对照组 23.2% ($P<0.05$), 390 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏 CAT 活性低于对照组 30.4% ($P<0.01$)。以上数据表明, CAT 活性亦表现出低浓度促进高浓度抑制的趋势, 且中高浓度实验组还表现出一定的先下降后上升的趋势。

2.4 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏 MDA 含量的影响

不同浓度 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏组织 MDA 含量的影响如图 3 所示。与对照组相比, 20 $\mu\text{g/L}$ 暴露组

鲤鱼肝脏组织 MDA 含量在各个时间段无显著变化 ($P>0.05$); 78 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织 MDA 含量在第 3 天、第 6 天和第 9 天均呈现升高趋势; 156 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织 MDA 含量在各个时间段内均显著升高, 分别高于对照组 54.8%、58.3%和 56.9% ($P<0.05$); 390 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织 MDA 含量在三个时间段分别高于对照组 77.5% ($P<0.05$)、92.1% ($P<0.01$)和 65.1% ($P<0.05$)。

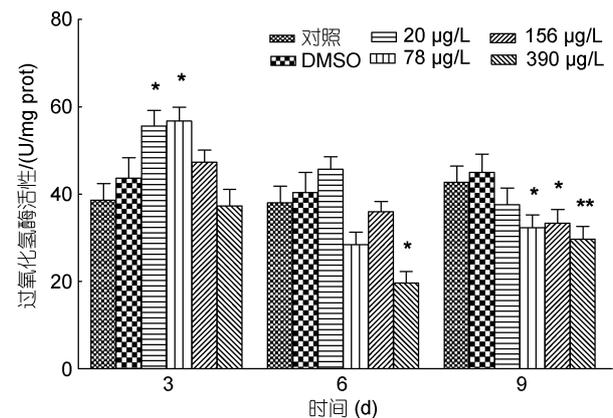


图 2 不同浓度 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏组织 CAT 活性的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of Aroclor 1242 on CAT activity in liver tissue of *C. carpio*

2.5 Aroclor 1242 胁迫下鲤鱼肝脏相关抗氧化基因表达

图 4 为不同浓度 Aroclor 1242 暴露 8d 后鲤鱼肝脏组织抗氧化相关基因表达情况。78、156 和 390 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组 Cu/Zn-SOD mRNA 比对照组分别显著降低了 48%、57%和 76%(图 4a, $P<0.05$)。与对照组相比, 156 和 390 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组

Mn-SOD mRNA 的表达量分别降低了 37%和 58%(图 4b, $P<0.05$)。与对照组相比, 78 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组中 CAT mRNA 的表达量降低了 56%(图 4c, $P<0.05$), 但高浓度组有所升高。156 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组 HSP70 mRNA 的表达量比对照组降低了 80%(图 4d, $P<0.05$), 390 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组 HSP70 mRNA 的表达量降低了 90% ($P<0.01$)。如图 4e 所示, 与对照组相比, 78 $\mu\text{g/L}$ 暴露组 Nrf2 mRNA 的表达量升高了 120%, 156 和 390 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组 Nrf2 mRNA 的表达量分别降低了 50%和 70% ($P<0.05$)。如图 4f 所示, 与对照组相比, 156 和 390 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露组 AhR2 mRNA 的表达量分别降低了 52%和 80% ($P<0.05$)。

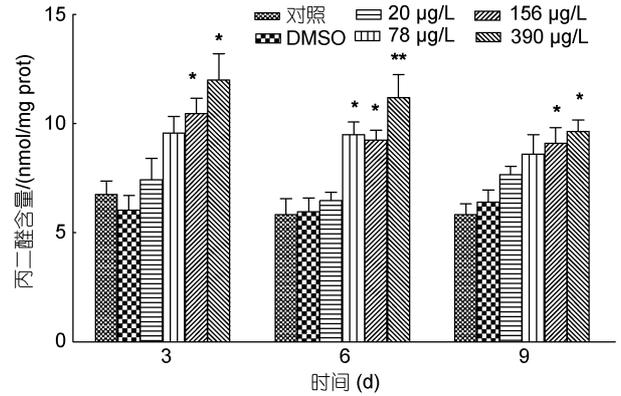


图 3 不同浓度 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏组织 MDA 含量的影响

Fig.3 Effects of different concentrations of Aroclor 1242 on MDA content in liver tissue of *C. carpio*

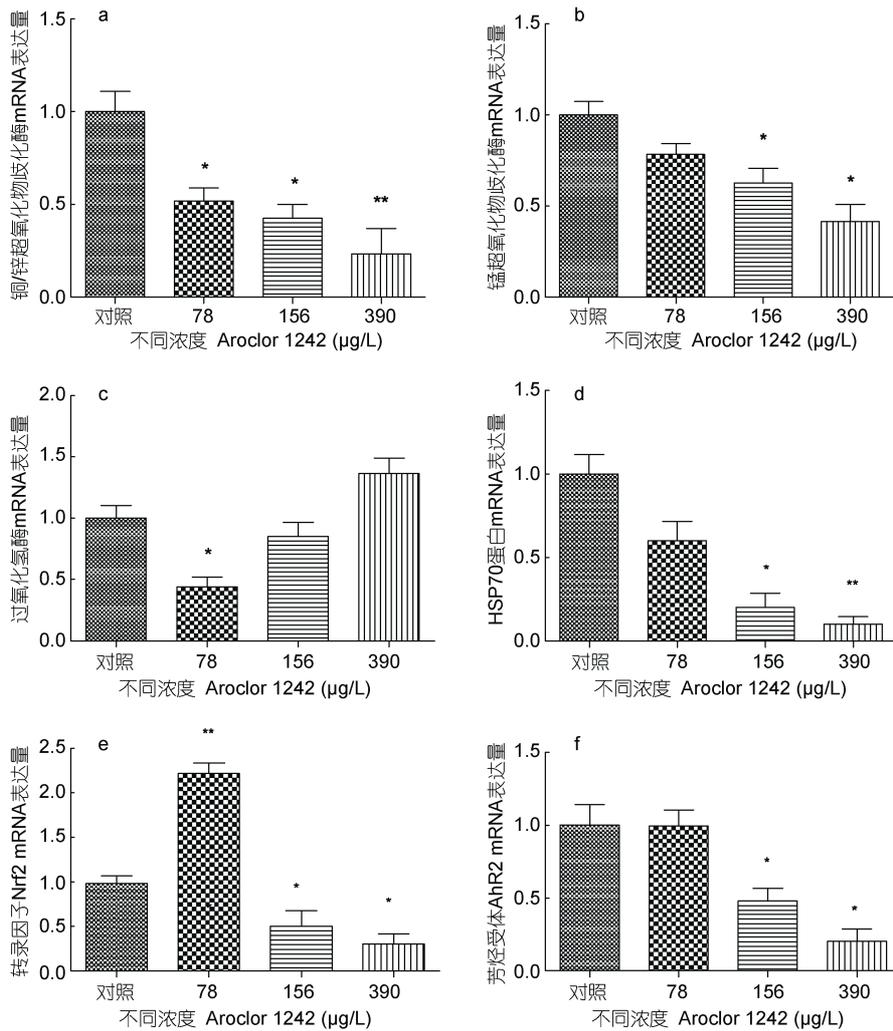


图 4 Aroclor 1242 暴露 8d 对鲤鱼肝脏组织抗氧化相关基因 Cu/Zn-SOD (a)、Mn-SOD (b)、CAT (c)、HSP70 (d)、Nrf2 (e)、AhR2 (f) 表达的影响

Fig.4 Effects of 8-day Aroclor 1242 exposure on the expression of antioxidant related genes Cu/Zn-SOD (a)、Mn-SOD (b)、CAT (c)、HSP70 (d)、Nrf2 (e)、AhR2 (f) in liver tissue of *C. carpio*

注: 对照组只用溶剂暴露。“*”表示 $P<0.05$, 与对照组相比差异显著; “**”表示 $P<0.01$, 与对照组相比差异极显著。

3 讨论

3.1 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏抗氧化酶活性的影响

SOD 是生物体内最先参与氧自由基清除作用的酶, 是抗氧化防御系统的第一道防线(Zhang *et al.*, 2014)。在 SOD 催化下氧自由基被转化生成 H_2O_2 和 O_2 , H_2O_2 再经过 CAT 或谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathioneperoxidase, GPx)催化转化为水排出体外, 从而保护机体免受氧化损伤, 并且减少脂质过氧化的发生(梅丹等, 2012; 刘燕等, 2014)。本实验中, 与对照组相比, 20 $\mu\text{g/L}$ 暴露组鲤鱼肝脏组织中内 SOD 活性显著被诱导, 表明当外界环境胁迫程度较轻时, 机体内的抗氧化系统会因受到刺激而作出迅速反应, 为了减少氧自由基对机体所造成的伤害, SOD 活性往往被诱导。Stebbing(1982)认为由低浓度的污染物引起生物体内酶活性升高的现象是生物体未受到污染物损伤情况下的刺激反应-毒物兴奋效应。后续研究表明, 这一现象适用于大多数生物, 如细菌(程逸飞等, 2018)和海洋微藻(黄健等, 2002)。中高浓度处理组 SOD 活性还显示出一定的先下降后上升的趋势: 随着外界胁迫强度的增加, 如 78、156、390 $\mu\text{g/L}$ 暴露组, 鲤鱼肝脏组织 SOD 活性在初始阶段(第 3 和 6 天)显著降低, 说明当胁迫因子超过生物体所承受范围时, 生物体内抗氧化系统不能清除过量的氧自由基, 氧自由基对细胞造成一定氧化损伤, 致使 SOD 的活性受到抑制; 在胁迫的第 9 天, SOD 活性略有上升, 这可能与毒物的代谢消耗或者生物体的自我修复调节功能有关。

CAT 能够直接将过氧化氢分解为水和氧气, 可清除微粒体中由尿酸酶、黄嘌呤氧化酶、 α -羟酸氧化酶等多种酶促反应产生的过氧化氢, 清除线粒体中由超氧化物歧化酶催化自由基 $\cdot O_2^-$ 歧化反应所产生的过氧化氢(许友卿等, 2014)。本实验中, CAT 活性表现出低浓度促进趋势: 与对照组相比, 20 和 78 $\mu\text{g/L}$ 暴露组 CAT 活性在第 3 天被显著诱导, 进一步表明低浓度 Aroclor1242 暴露下鱼体内会不断产生氧自由基, 产生的氧自由基会被 SOD 转化为 H_2O_2 , 为保护细胞免受 H_2O_2 的氧化损伤, 生物体内的 CAT 活性会增加来将 H_2O_2 催化转化为 H_2O 和 O_2 。同 SOD, 中高浓度毒物作用下 CAT 活性表现出一定的先下降后上升的趋势。

生物膜的主要成分为多不饱和脂肪酸, 当生物体受到外界胁迫时多不饱和脂肪酸会受到细胞内产

生的氧自由基的攻击, 造成脂质过氧化作用形成脂质过氧化物丙二醛(MDA), 因此通过测定 MDA 含量我们能够间接得知细胞受损伤的程度(Brucka-Jastrzebska, 2010; Liu *et al.*, 2016)。在本实验中, 与对照组相比, 随着 Aroclor 1242 浓度的升高鲤鱼肝脏组织 MDA 含量呈显著上升趋势, 表明 Aroclor 1242 达到一定浓度时, 鲤鱼肝脏组织的抗氧化系统已无法及时消除肝脏组织内积累的过量氧自由基, 从而引起脂质过氧化生成 MDA。

3.2 Aroclor 1242 对鲤鱼肝脏相关抗氧化酶基因的影响

穆希岩等(2015)将斑马鱼暴露于 1.0mg/L 苯醚甲环唑暴露组中, 其肝脏 SOD、CAT 和 GPx 的活性显著受到抑制, 且编码这些抗氧化酶的基因表达水平也显著下调。在本实验中, 在中高浓度(78、156 和 390 $\mu\text{g/L}$)的 Aroclor 1242 暴露 8 天后, 鲤鱼肝脏组织抗氧化基因 Cu/Zn-SOD、Mn-SOD 和 CAT 的 mRNA 表达量整体上呈现出不同程度的下调趋势。需要说明的是, 基因的转录、翻译和相关酶作用的时相不同, 以及随着毒物的代谢消耗或者生物体的自我修复调节功能的恢复, 文中出现了部分基因(CAT)的表达量出现在某时间段上升的现象。

生物细胞在遭受某些外界因素如重金属、有机污染物等应激原刺激时, 机体会产生一类具有保护作用的蛋白质—应激蛋白(Heat Shock Proteins, HSPs)来保护细胞免受胁迫损害, 它们不但可以提高细胞的耐受性, 而且对生物细胞具有保护修复的作用。应激蛋白目前已发现 10 余种, 根据其分子量的大小可分为 HSP90、HSP70、HSP60 和小分子量应激蛋白 4 个主要的家族, 而 HSP70 家族是最保守和最主要的一类应激蛋白, 也是生物体发生应激反应后生成最为显著的一类蛋白。邢厚娟(2010)通过试验发现, 当鱼类暴露于浓度为 4.28、42.8、428 $\mu\text{g/L}$ 的阿特拉津中时, 肝脏组织 HSP70 基因 mRNA 的表达水平显著降低, $P < 0.05$ 。沈骅等(2004)研究指出, 鲫鱼经过 40d Pb^{2+} 、 Cd^{2+} 不同浓度的暴露后, 肝脏内 HSP70 有显著的诱导($P < 0.05$), 但在 Cd^{2+} 浓度为 0.2mg/L 有停止表达 HSP70 的现象, 他认为这可能是由于浓度过高造成了组织病理损伤而破坏了诱导表达机制。本实验中, 在 156 $\mu\text{g/L}$ 和 390 $\mu\text{g/L}$ Aroclor 1242 暴露 8 天后, 鲤鱼肝脏组织 HSP70 mRNA 表达与对照组相比显著下调, 表明鲤鱼在较长时间 Aroclor 1242 胁迫下, 机体肝脏组织可能已出现损伤。

芳烃受体 AhR2 和核转录因子 Nrf2 是参与代谢酶系统转录调控的主要转录因子(薄军等, 2010; 殷健, 2014)。AhR2 是一种配体激活转录因子, Aroclor 1242 与 AhR2 结合后会转移到细胞核中, 与核芳烃受体 2 转运蛋白结合, 激活或抑制核内靶基因 CYP1A 的表达(赵娜等, 2005; 刘仕博, 2012)。Nrf2 是生物体的抗氧化防御系统的调控因子, 存在于细胞质中与 KEAP1(Kelch-like ECH-associated protein 1)结合, 处于合成与降解的平衡状态。众多研究表明在 Keap1-Nrf2 通路中, 转录因子 Nrf2 参与调控下游靶基因表达。已有大量研究表明多环芳烃类化合物通过结合激活芳烃受体 2, 从而启动下游靶基因的表达, 例如: CYP1A、GST 等(袁立来, 2013; 吴菲力, 2016)。因此, 转录因子 Nrf2、AhR2 可能参与 Aroclor 1242 调控抗氧化酶编码基因表达的机制。本实验结果显示, 中高浓度暴露组(156 和 390 $\mu\text{g/L}$), 鲤鱼肝脏中 Nrf2、AhR2 基因表达显著下调, 因此从转录水平变化可以推测 Nrf2 和 AhR2 可能参与 Aroclor 1242 暴露下鲤鱼肝脏组织中抗氧化酶编码基因的表达调控。

4 结论

(1) Aroclor 1242 能够引起鲤鱼肝脏组织中 SOD 和 CAT 活性发生显著变化, 表现出低浓度促进高浓度抑制的趋势, 表明 Aroclor 1242 诱导鲤鱼肝脏组织细胞发生氧化应激反应。

(2) Aroclor 1242 能够引起鲤鱼肝脏组织 MDA 含量显著升高, 表明 Aroclor 1242 导致肝脏组织脂质过氧化, 膜系统受到损伤。

(3) Aroclor 1242 暴露下, 鲤鱼肝脏组织中抗氧化酶编码基因(Cu/Zn-SOD、Mn-SOD、CAT)、应激蛋白 70 基因和代谢酶系统转录调控的主要转录因子(Nrf2 和 AhR2)表达量呈现下调趋势。

参 考 文 献

邢厚娟, 2010. 阿特拉津和毒死蜱单一及联合暴露对鲤鱼毒理作用的研究. 哈尔滨: 东北农业大学博士学位论文
 刘 燕, 梁 敏, 张玄可等, 2014. 铬暴露对草鱼鳃抗氧化酶活性和脂质过氧化作用的影响. 西南大学学报(自然科学版), 36(5): 46—51
 刘仕博, 2012. 苯并三唑对黄斑蓝子鱼免疫毒性的研究. 长春: 东北师范大学硕士学位论文
 许友卿, 梅 婕, 丁兆坤等, 2014. 多氯联苯对水生动物抗氧化酶的影响及机理. 水产科学, 33(4): 258—262
 李 娜, 2012. 多氯联苯在水生食物链中的生物毒性及富集效应研究. 广州: 暨南大学硕士学位论文
 吴菲力, 2016. Aroclor1254 诱导稀有鮰鲫氧化应激反应和细胞

凋亡相关基因表达的研究. 杨凌: 西北农林科技大学硕士学位论文
 沈 骅, 王晓蓉, 张景飞等, 2004. 低浓度 Zn 对幼龄鲫鱼肝脏组织应激蛋白 HSP70 诱导的影响. 农业环境科学学报, 23(3): 441—443
 陈家长, 宋 超, 胡庚东等, 2011. 微囊藻毒素-LR 对罗非鱼肝脏活性氧自由基含量及相关抗氧化酶活性的影响. 农业环境科学学报, 30(8): 1521—1525
 奉 斌, 代其林, 王 劲, 2009. 非生物胁迫下植物体内活性氧清除酶系统的研究进展. 绵阳师范学院学报, 28(11): 50—53, 77
 赵 娜, 张万起, 2005. 芳香烃受体及其介导的二噁英毒性研究进展. 毒理学杂志, 19(1): 67—69
 赵雪松, 任 新, 段小月等, 2016. 全氟辛烷磺酸盐暴露对斑马鱼胚胎发育毒性与氧化应激的影响. 唐山学院学报, 29(6): 12—16
 胡伟华, 何 辉, 袁勇超等, 2017. 敌百虫、溴氰菊酯对大鳞副泥鳅仔鱼及多刺裸腹蚤的急性毒性实验. 淡水渔业, 47(1): 66—70
 姜维丹, 2008. 肌醇对幼建鲤消化吸收能力和免疫能力的影响. 雅安: 四川农业大学硕士学位论文
 袁立来, 2013. 典型多环芳烃暴露对稀有鮰鲫药物代谢系统相关基因表达的影响. 武汉: 华中农业大学博士学位论文
 殷 健, 2014. 重金属对斑马鱼的毒性效应及作用机制研究. 北京: 北京协和医学院博士学位论文
 黄 健, 唐学玺, 宫相忠等, 2002. 低浓度毒物对海洋微藻生长刺激效应的初步研究. 应用生态学报, 13(11): 1516—1518
 梅 丹, 周少奇, 2012. 垃圾渗滤液对斑马鱼的毒性及抗氧化酶活性的影响. 生态环境学报, 21(5): 902—906
 程逸飞, 曾鸿鹄, 于 洋等, 2018. 磺胺类抗生素对不同革兰氏阴性菌的毒物兴奋效应研究. 生态毒理学报, 13(2): 57—65
 虞俊超, 2014. 多氯联苯和短链氯化石蜡在典型区域环境中的分布及迁移转化研究. 济南: 山东大学硕士学位论文
 薄 军, 吴世军, 李裕红等, 2010. 苯并[a]芘(BaP)对真鲷细胞色素 P450 和芳香烃受体基因表达的影响. 中山大学学报(自然科学版), 49(3): 93—97
 穆希岩, 2015. 苯醚甲环唑对斑马鱼毒性及作用机制研究. 北京: 中国农业大学博士学位论文
 Brucka-Jastrzebska E, 2010. The effect of aquatic cadmium and lead pollution on lipid peroxidation and superoxide dismutase activity in freshwater fish. Polish Journal of Environmental Studies, 19(6): 1139—1150
 Diletti G, Scortichini G, Abete M C *et al*, 2018. Intake estimates of dioxins and dioxin-like polychlorobiphenyls in the italian general population from the 2013—2016 results of official monitoring plans in food. Science of the Total Environment, 627: 11—19
 Dorantes-Aranda J J, Seger A, Mardones J I *et al*, 2015. Progress in understanding algal bloom-mediated fish kills: the role of superoxide radicals, phycotoxins and fatty acids. PLoS One, 10(7): e0133549
 Du J L, Cao L P, Liu Y J *et al*, 2016. A study of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induced liver injury in

- Jian Carp (*Cyprinus carpio* var. Jian) using precision-cut liver slices. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 96(1): 55—61
- Fattore E, Fanelli R, Dellatte E *et al*, 2008. Assessment of the dietary exposure to non-dioxin-like PCBs of the Italian general population. *Chemosphere*, 73(S1): S278—S283
- Giesy J P, Kannan K, 1998. Dioxin-like and non-dioxin-like toxic effects of polychlorinated biphenyls (PCBs): implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 28(6): 511—569
- Jiang J, Shi D, Zhou X Q *et al*, 2015. Effects of glutamate on growth, antioxidant capacity, and antioxidant-related signaling molecule expression in primary cultures of fish enterocytes. *Fish Physiology and Biochemistry*, 41(5): 1143—1153
- Liu N, Wen F L, Li F M, *et al*, 2016. Inhibitory mechanism of phthalate esters on *Karenia brevis*. *Chemosphere*, 155: 498—508
- Safe S H, 1994. Polychlorinated biphenyls (PCBs): environmental impact, biochemical and toxic responses, and implications for risk assessment. *Critical Reviews in Toxicology*, 24(2): 87—149
- Stebbing A R D, 1982. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors. *Science of the Total Environment*, 22(3): 213—234
- Zhang Q, Chen S, Deng F, 2014. Effect of heavy metals and organic pollutants on antioxidant enzyme activities in zebra fish by polyacrylamide gel electrophoresis. *Journal of Chemical & Pharmaceutical Research*, 18(9): 68—72

OXIDATIVE STRESS IN LIVER OF *CYPRINUS CARPIO* EXPOSED TO PCBS AROCLOR 1242

WANG Ren-Jun, WANG Jian-Guo, DING Ning, SUN Meng, GAO Pei-Ke
(College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu 273165, China)

Abstract We investigated the effects of polychlorinated biphenyls Aroclor 1242 on the oxidative stress of *Cyprinus carpio* liver under static water exposure in the laboratory. The activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT), content of lipid peroxidation products (MDA), expression of genes encoding Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, and CAT, heat shock protein 70 (HSP70), nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (Nrf2), and Aryl hydrocarbon receptor 2 (AhR2) were analyzed. The results show that Aroclor 1242 changed significantly the SOD and CAT activities in the liver, showing promotion at low concentration and inhibition at high concentration. Aroclor 1242 significantly increased MDA content in the liver tissue. Compared to the control, the MDA content was 77.5% higher in the liver exposed to 390 μ g/L for three days, indicating that Aroclor 1242 induced strong lipid peroxidation. After exposure to medium-high concentrations of Aroclor 1242 (78, 156, and 390 μ g/L) for 8 days, the expression of antioxidant enzyme encoding gene Cu/Zn-SOD, Mn-SOD, CAT, heat shock protein 70 (HSP70), and Nrf2 and AhR2 genes were down-regulated in the liver tissue of the carp. Collectively, this study revealed the influences of Aroclor 1242 on oxidative stress of *Cyprinus carpio* liver from the perspectives of enzyme and gene transcription levels.

Key words Polychlorinated biphenyls; *C. carpio*; oxidative stress; lipid peroxidation; gene expression