

苯并(a)对大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统影响的初步研究*

冯涛¹ 郑微云¹ 洪万树² 余群¹ 郑森林¹ 张倩²¹ 厦门大学环境科学研究中心/国家教委海洋生态环境开放研究实验室 361005)² 厦门大学海洋系 361005)

关键词 苯并(a)芘,大弹涂鱼,超氧化物歧化酶(SOD),还原型谷胱甘肽(GSH),丙二醛(MDA)

苯并(a)芘(BaP)是一种具强致癌性的多环芳烃,广泛存在于受污染的海洋环境中。早期对苯并(a)芘的研究主要集中于苯并(a)芘暴露与终反应——癌变的发生或肿瘤的形成之间的相关性研究。近年来,通过对苯并(a)芘在动物体内的代谢过程及其致毒机理的研究,发现苯并(a)芘在动物体内进行生物转化时,可形成多种中间代谢产物,其中许多中间代谢产物可进入氧化还原循环,产生大量活性氧,进而引发机体氧化应激。

抗氧化防御系统是动物体内重要的活性氧清除系统,主要包括酶性清除剂抗氧化酶以及小分子抗氧化剂。超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内唯一一种以自由基为底物的酶,其作用底物为 O_2^- ,可催化 O_2^- 发生歧化反应生成 H_2O_2 ,是动物体内重要的抗氧化酶。还原型谷胱甘肽(GSH)是动物体内重要的水溶性抗氧化剂,它既可作为谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和谷胱甘肽转硫酶(GST)的底物,通过这两种酶起解毒作用,又可直接与动物体内的亲电化合物结合起解毒作用,因此,在动物体内的解毒代谢中起着极其重要的作用。据 Stegeman, J. J. 等 1992 年报道,抗氧化防御系统的一个重要特征是其活性或含量可由于污染的胁迫而发生改变,因而 SOD 活性和 GSH 含量的变化可间接反映环境中氧化污染的存在,可作为环境污染胁迫的指标。

在正常生理条件下,动物体内代谢产生的活性氧可被抗氧化防御系统有效清除。但当机体暴露于可产生氧化还原循环的污染物如多环芳烃时,若活性氧的产生速度超过机体抗氧化防御系统的清除能力,就可使 DNA 断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等,从而引发机体的毒性效应。环境胁迫诱发的活性氧伤害生物膜的主要机制是活性氧诱发膜脂不饱和脂肪酸发生连锁的过氧化反应,使脂肪酸发生降解,产生脂质过氧

化物。最重要的脂质过氧化产物是丙二醛(MDA),它是一种高活性的脂质过氧化产物,能交联脂类、核酸、糖类及蛋白质,也可使蛋白质的 SH 基氧化,其浓度的变化既可用于脂质过氧化程度的衡量指标,也可间接反映机体内活性氧的累积。脂质过氧化与抗氧化防御系统的变化相结合,既可反映具有氧化还原活性污染物的暴露,也可反映生物受到氧化胁迫的程度。

由于近年来海洋污染日益严重,而且许多污染物具有氧化还原循环活性,国外关于氧化胁迫下海洋动物抗氧化防御系统和脂质过氧化的研究正在成为毒理学研究新的热点^[1-3],而国内这一领域的研究则尚未见报道。本实验试图通过研究苯并(a)芘暴露下大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统——SOD 活性和 GSH 含量的变化以及脂质过氧化产物——丙二醛浓度的变化,初步探讨苯并(a)芘通过氧化还原途径的致毒机理以及以上指标作为污染暴露的生物标记的可能性。

1 材料与amp;方法

1.1 仪器与试剂

实验仪器采用国产 751 型分光光度计,美国产 Beckman J2-MC 型冷冻离心机。

苯并(a)芘为 Sigma 公司产品;Fdin 酚试剂为实验室制备;其余试剂为国产市售产品。

1.2 实验动物和曝污条件

苯并(a)芘先用少量丙酮溶解,再配制成一定浓

* 高等学校博士学科点专项科研基金资助项目(PAHs 对海洋动物自由基影响及抗氧化酶作用机理)和国家自然科学基金(石油污染物对鱼类自由基产生的影响及抗氧化酶作用机理)资助项目 29677014 号。

收稿日期:1999-10-21;修回日期:2000-01-08

度的储备液,避光于 4 ℃ 保存。实验前将储备液用干净的海水稀释为 30 μg/L,置于直径为 30 cm,高为 50 cm 的陶瓷缸中,每缸海水体积 20 L。每缸中放入大弹涂鱼 15 尾。对照组海水中加入与处理组相同体积的丙酮。实验用鱼大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*),捕自厦门海沧水域,平均体长为 11.8 ± 1.4 cm,放在室内饲养。实验鱼先在清洁海水中暂养 3 d,然后放入上述海水中,设两个平行样。实验期间,用微型充气机连续充气,每天更换相同污染浓度的海水,其间投喂小球藻;水温基本稳定在 28 ± 2 ℃。

1.3 取样和样品预处理

分别于曝污后第 1, 3, 5 和 7 天取样,每次每组取鱼 6 尾,活体解剖,取出肝脏,迅速称重后置于冰浴中,加两倍体积(w/v) 预冷的双蒸水,少量石英沙,于研钵中研磨,然后立即离心(5 000 r/min, 10 min),取上清液,立即测定 GSH 含量与 LPO 浓度,其余酶液冷冻于 - 20 ℃ 冰箱,24 h 内测定 SOD 活性。每次取样的同时,取 6 条未曝污的鱼作为对照。

1.4 生化分析

SOD 测定采用核黄素光还原法;GSH 的测定采用 DTNB 直接比色法,略做改动;MDA 含量采用 TBA 法;蛋白含量用 Forlin 酚法测定,以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

1.5 数据处理

实验数据用统计学方法进行处理。所给的结果均为平均数 ± 标准误差;用单因素方差分析方法分析苯并(a) 芘曝污引起的差异;组间数据的两两比较采用单尾 t 检验法, P ≤ 0.05,被认为是差异显著。

2 结果

2.1 BaP 对大弹涂鱼肝脏 SOD 活性的影响

如图 1 所示,与对照组相比,30 μg/L BaP 暴露对大弹涂鱼肝脏 SOD 活性表现为明显的诱导效应,第 3 天和第 5 天分别为对照组的 1.72 倍和 1.3 倍,单因素方差分析的结果表明差异显著(P ≤ 0.05)。SOD 活性的诱导表明细胞内该酶的底物 O₂⁻ 浓度大量增加。在不同的实验时间,对照组之间 SOD 活性未表现出显著差异,而 BaP 污染组第 3 天被显著诱导,为第 1 天的 1.49 倍(P ≤ 0.05),随后逐步降低,第七天降至与对照组接近。随着曝污时间的延长,SOD 活性表现为暂时而非持续的增加,可能是由于机体内抗氧化防御系统其他成分的介入,降低了活性氧浓度,也可

能是由于肝脏中该酶代谢外源化合物的能力被饱和,使鱼出现中毒反应,致使其活性降低。

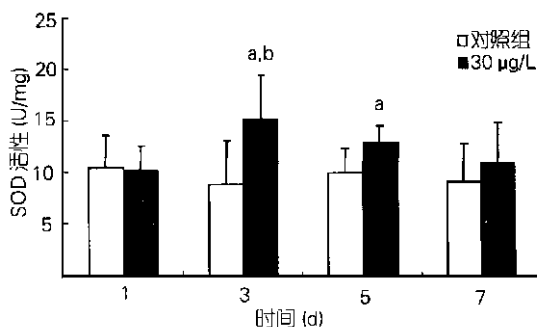


图 1 BaP 对大弹涂鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

a 指污染组与相应对照组相比差异显著,b 指同一试验组不同时间相比差异显著

Fig.1 The effects of BaP on the activities of superoxide dismutase (SOD) in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris*

2.2 BaP 对大弹涂鱼肝脏 GSH 含量的影响

如图 2 所示,苯并(a) 芘暴露对 GSH 含量有显著影响。与对照组相比,曝污第 1 天,GSH 含量增至最高,增加了约 67%,单因素方差分析的结果表明差异显著(P ≤ 0.05);之后 GSH 含量逐渐减少,第 5 天时降至与对照组相当。对同一试验组不同时间的 GSH 含量进行单因素方差分析,结果表明对照组和 BaP 污染组均无显著差异。曝污 1 d 后 GSH 含量的增加可能是由于“超射作用”,即由于 GSH 消耗而导致 GSH 合成的暂时增加。之后,GSH 含量逐步降低,表明机体经 BaP 代谢产生的亲电化合物和活性氧,通过诱导以 GSH 为底物的酶[如谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)]的活力升高,或通过 GSH 的直接结合,不断消耗 GSH。

2.3 BaP 对大弹涂鱼肝脏 MDA 浓度的影响

如图 3 所示,苯并(a) 芘暴露对 MDA 浓度有显著影响。与对照组相比,MDA 浓度在曝污的前 5 d 无明显变化,但在第 7 天显著升高,为对照组的 1.91 倍,单因素方差分析的结果表明差异极显著(P ≤ 0.01)。而对同一试验组不同时间的 MDA 浓度进行单因素方差分析,发现只有 BaP 污染组第 5 天与第 7 天之间有显著差异(P ≤ 0.01),第 7 天比第 5 天增加了约 86%。MDA 浓度的显著升高表明机体由于活性氧

累积造成的脂质过氧化程度明显加重, 活性氧已对细胞内膜系统产生毒害作用。

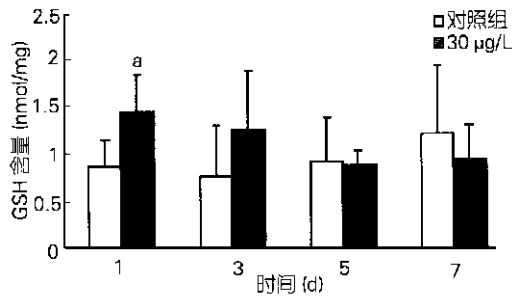


图2 BaP 对大弹涂鱼肝脏还原型谷胱甘肽 (GSH) 含量的影响

a 指污染组与相应对照组相比差异显著

Fig. 2 The effects of BaP on the content of reduced glutathione in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris*

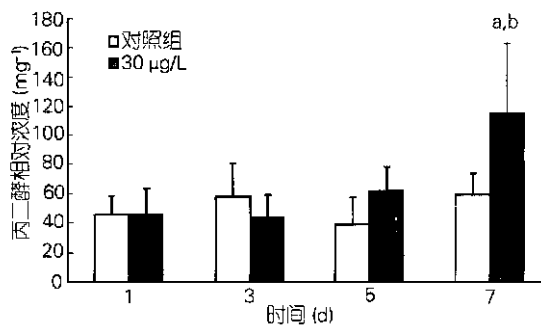


图3 BaP 暴露下大弹涂鱼肝脏丙二醛 (MDA) 浓度的变化

a 指污染组与相应对照组相比差异显著, b 指同一试验组不同时间相比差异显著

Fig. 3 Changes of malondialdehyde (MDA) concentration in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* under BaP exposure

3 讨论

目前对于动物暴露于能在体内产生氧化还原循环的污染物后, 其抗氧化防御系统的变化研究较少, 更多的研究集中于动物体内解毒系统的变化, 不少指标如 AHH, EROD 等已成为较为稳定可靠的污染监测指标^[4]。而实际上, 污染物经氧化还原循环产生大量活性氧是更为重要的代谢形式, 活性氧造成的

氧化损伤如脂质过氧化、酶失活、DNA 损伤等是更为重要的损伤形式。已有研究证实, 抗氧化防御系统的成分可能由于污染的胁迫而发生改变, 如 Vig 和 Nemcsok 于 1989 年报道了将鲤鱼 (*Common carp*) 暴露于 10 mg/L 的百草枯 8 h, 其肝脏和鳃的 SOD 活性增加; Roberts 等在 1987 年的研究中发现, 多环芳烃污染海区平口石首鱼 (*Leiostomus xanthurus*) 肝脏的 SOD 活性通常比非污染海区高; Thomas 和 Wofford^[5] 的研究表明, 在镉和石油污染海区鲮鱼 (*Mugil cephalus*) 肝脏中 GSH 浓度升高。本实验中, 大弹涂鱼暴露于 30 µg/L BaP 后, 其肝脏 SOD 活性被诱导, GSH 含量增加, 与前人的研究结果相一致; 表明 BaP 代谢过程中机体内活性氧大量产生, 进而引发机体氧化应激。

本实验中大弹涂鱼暴露于 30 µg/L BaP 后, 不仅抗氧化防御系统的成分发生了改变, 其 MDA 浓度也显著升高, 表明大弹涂鱼肝脏在代谢 BaP 过程中产生大量活性氧从而导致细胞内膜系统的氧化损伤, 可能是 BaP 的重要致毒机制之一。

本实验结果表明, SOD 活性和 GSH 含量的变化间接反映了环境中氧化污染的存在, 有可能作为环境受到污染胁迫的指标; 而脂质过氧化与抗氧化防御系统的变化相结合, 则可能进一步反映生物受到氧化胁迫的程度及后果。

本实验仅就 30 µg/L BaP 对大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统的影响作了初步研究。进一步深入的研究, 其中包括不同浓度的 BaP 对大弹涂鱼抗氧化防御系统的影响、污染解除后抗氧化防御系统的变化、环境因子和生物本身的生理状态对抗氧化防御系统的影响以及生物不同生长发育阶段抗氧化防御系统的变化等, 需要在今后的工作中逐步展开。

参考文献

- 1 Fridovich, I. J. *Experim. Biol.*, 1998, 201: 1 203 ~ 1 209
- 2 Burgeot, T. et al. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996, 131: 125 ~ 141
- 3 Cossu, C. et al. *Ecotox. Environ. Saf.*, 1997, 38: 122 ~ 131
- 4 Pacheco, M. and Santos M. A. *Ecotox. Environ. Saf.*, 1997, 38: 252 ~ 259
- 5 Thomas, P., Wofford, H. W. and Neff, J. M. Effect of cadmium on glutathione content of mullet (*Mugil cephalus*) tissues. In: Verberg W. B., Calabrese A., Thurberg F. P. and Verberg F. P. *Physiological Mechanisms of Marine Pollutant Toxicity*. New York: Academic Press, 1982. 109 ~ 125

THE EFFECTS OF BENZO(a) PYRENE ON ANTIOXIDANT DEFENSES IN THE LIVER OF *Boleophthalmus pectinirostris*

FENG Tao¹ ZHENG Weiyun¹ HONG Wanshu² YU Qun¹ ZHENG Senglin¹ ZHANG Qian²

(¹ Environmental Science Research Center of Xiamen University/ Research Laboratory of SEDC of Marine Ecological Environment, Xiamen University, 361005)

(² Oceanography Department of Xiamen University, 361005)

Received: Oct. 21, 1999

Key Words: Benzo(a) pyrene, *Boleophthalmus pectinirostris*, Superoxide dismutase(SOD), Reduced glutathione(GSH), Malondialdehyde(MDA)

Abstract

The effects of benzo(a) pyrene(BaP) on superoxide dismutase(SOD) activities, reduced glutathione(GSH) content and malondialdehyde(MDA) concentration in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* are studied in experimental condition. The results show that the activities of SOD is induced, the content of GSH increased and the concentration of MDA elevated significantly under the exposure of 30 $\mu\text{g/L}$ BaP during 7 days. The overall effects are that the oxidative stress occurs under the BaP exposure, which indicates that the reactive oxygen species(ROS) have been produced in large quantities and the membrane system of the cell has been damaged. The experiment results show that it is one of the most important toxicological mechanisms of BaP that the large quantity of ROS, which induced lipid peroxidation, are generated during the metabolism of BaP in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris*. (本文编辑:刘珊珊)