

苯并(a)芘影响黑鲷肝脏 EROD 活性变化的动力学研究

穆景利^{1,2}, 王新红¹, 王淑红³, 林建清⁴, 王克坚¹, 洪华生¹

(1. 近海海洋环境国家重点实验室 厦门大学环境科学中心, 福建 厦门 361005; 2. 国家海洋环境监测中心, 辽宁 大连 116023; 3. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 4. 集美大学 生物工程学院, 福建 厦门 361021)

摘要: 研究了黑鲷 (*Sparusmacro cephalus*) 在实验生态条件下暴露于不同浓度苯并(a)芘 (benzo(a)pyrene, BaP)后, 肝脏乙氧基异吩噻唑酮脱乙基酶 (EROD)活性在不同暴露时相的动力学变化情况。EROD 活性采用动力学方法测定。实验结果表明,暴露于较低质量浓度 BaP (0.5,1.0 μg/L)黑鲷肝脏的 EROD 活性在 2 d 后极显著高于对照组($P<0.01$), 2.0 μg/L 组则在 2 h 后极显著高于对照组, 并且随暴露时间的延长,诱导程度表现出不同的下降趋势, 而暴露于高质量浓度组(5.0 μg/L) 的肝脏 EROD 活性极显著性诱导出现在 12 h。总体上较高质量浓度组(2.0,5.0μg/L) EROD 活性出现极显著性诱导的时间比低质量浓度组(0.5,1.0μg/L)早, 诱导程度也比低质量浓度组的高。在净化实验中各暴露组肝脏 EROD 活性均下降, 与空白对照组比较均没有显著性差异, 说明试验浓度没有超出严重损伤肝脏自身恢复系统的范围, 在此浓度范围内污染的鱼通过净化可清除 BaP 污染。

关键词: 苯并(a)芘; 乙氧基异吩噻唑酮脱乙基酶 (EROD); 黑鲷 (*Sparusmacro cephalus*); 肝脏
中图分类号: X503.225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2009)01-0068-04

苯并(a)芘 (benzo(a)pyrene, BaP) 是海洋中广泛存在的一类污染物, 能通过鳃和表皮或摄入被污染的沉积物和食物被鱼类吸收^[1]。细胞色素P4501A (Cytochrome P4501A, CYP4501A) 是BaP活化最重要的代谢酶, 可将BaP和乙氧基异吩恶唑酮 (ethoxyresorufin, ERF)羟化和脱乙基,即CYP4501A具有芳香羟化酶(AHH)和乙氧基异吩噻唑酮脱乙基酶 (EROD)活力, 其中EROD的反应具有代表性^[2,3]。BaP在化学性质上没有太大的活性,但经过生物体内多种代谢酶的作用活化后,可转化为化学性质活泼的化合物, 从而对机体产生多种毒害作用^[4], BaP诱导不同鱼种肝脏EROD活性在实验室实验和野外实验都有所报道^[5-8]。

黑鲷(*Sparusmacro cephalus*)属于浅海温水性底层鱼类, 喜欢栖息于岩礁或沙泥底质的海域, 具有适温适盐性广、食谱杂、抗病能力较强、生长迅速等生理和生态特点^[9], 在中国东南沿海属经济鱼种, 因此是一种比较理想的试验动物, 已有报道用黑鲷幼鱼作为材料进行毒理学的研究^[10], 作者研究了黑鲷暴露于不同浓度BaP下肝脏EROD活性变化的动力学过程, 旨在了解EROD活性对BaP的响应关系。

1 材料和方法

1.1 化学试剂和仪器

牛血清白蛋白(BSA),考马斯亮蓝购自 Fluka 化学品公司; BaP、乙氧基异吩噻唑酮、异吩噻唑酮 (Resorufin, RF)、还原性辅酶 II 四钠盐(NADPH)均购自 Sigma 公司; MilliQ 水。

Cary-Eclipse型荧光分光光度计(美国瓦里安公司产品); 自动酶标仪(Tecan Genesis, 瑞士Tecan 公司产品); 高速冷冻离心机(Beckman J2-MC, 美国 Beckman 公司产品); 高速台式离心机(TGL-16B, 上海安亭科学仪器厂生产)。

1.2 实验动物和暴露设计

黑鲷采自福建厦门市同安湾刘五店养殖鱼排, 选择健康、活力强的黑鲷(体长 9.12 cm±1.3 cm, 体

收稿日期: 2006-10-23; 修回日期: 2006-12-22

基金项目: 国家自然科学基金项目(40106012)

作者简介: 穆景利 (1979-), 男, 硕士, 主要从事有机污染及其生态效应研究, E-mail: jlmu@nmemc.gov.cn; 王新红, 通讯作者, 电话: 0592-2187857, E-mail: xhwang@jingxian. xmu.edu.cn

质量 $11.20 \text{ g} \pm 1.5 \text{ g}$) 用于试验。实验容器为聚乙烯水族箱 ($115 \text{ cm} \times 63 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$), 实验用水为沙滤海水, BaP 用丙酮配制成一定浓度的储备液, 避光保存。设置 4 个质量浓度组 ($0.5, 1.0, 2, 5 \mu\text{g/L}$) 及一个空白对照组和一个丙酮对照组, 每组设置两个平行, 饲养水体根据鱼的数量而定。暴露 2, 6, 12, 24, 48h 和 4, 7, 14d 时随机取 6 条鱼, 测量后, 取出肝脏放进冻存管中, 并立即放入液氮中保存。暴露期间黑鲷在自然光照条件下, 不喂食。在暴露 14 d 后, 不同暴露浓度组中的鱼均在沙滤海水中净化 7 d 后, 采样测定肝脏 EROD 活性。

1.3 样品的制备

取冷冻的肝脏样品 ($30 \text{ mg} \pm 1.5 \text{ mg}$) 加 1.5 mL 预冷的匀浆液 (磷酸缓冲液 pH 7.6) 于组织匀浆机中匀浆 2 min, 然后立即进行冷冻离心 ($-4^\circ\text{C}, 10\ 000 \text{ r/min}, 20 \text{ min}$), 上清液分装 3 份, 一份用来测 EROD, 一份用来测定蛋白质, 一份备用。上清液分装后马上保存在 4°C 下待分析测定。

1.4 EROD 的测定

EROD 酶活性的测定根据文献 [11, 12] 的方法稍加改进, 采用动力学方法。反应温度为室温 20°C , 反应总体积为 4 mL, 内含 pH 7.6 PBS 3.9 mL, $40 \mu\text{L}$ 待测酶样, $20 \mu\text{L}$ 0.40 mmol/L 乙氧基异吩噻嗪酮, $20 \mu\text{L}$

$5 \mu\text{mol/L}$ 异吩噻嗪酮作为内标。反应通过加入 $20 \mu\text{L}$ 0.25 mmol/L NADPH 启动。激发波长为 320 nm , 发射波长 593 nm , 反应开始后 30 s 计时, 每隔 30 s 记录其荧光值, 将所测得的数据作线性回归, 求其产物异吩噻嗪酮每分钟的变化情况, 经蛋白质数据归一化处理, 即可计算出其活性。EROD 活性的特定产物为异吩噻嗪酮, 因此加入内标异吩噻嗪酮后可以提高其灵敏度和检测限, 通过测定标准物质异吩噻嗪酮的荧光值来进行定量。EROD 活性单位为 $\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ 。

蛋白含量的测定采用考马斯亮蓝法 [13], 以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.5 数据分析

实验数据用统计学方法进行处理。结果用平均值 \pm 标准偏差来表示, 并用单因素方差分析对数据进行统计学分析, 以 $P < 0.05$ 为显著性差异, 以 $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

如图 1 所示, 空白对照组和丙酮对照组在暴露期间 EROD 活性虽有一定的变化但均没有显著性差异。

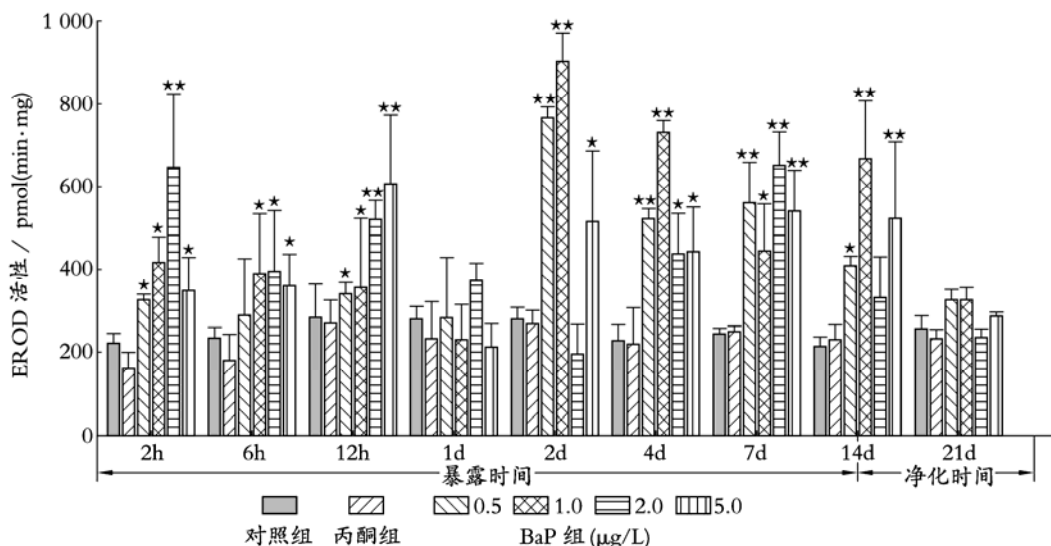


图 1 黑鲷暴露于不同浓度的 BaP 和暴露解除 7d 后肝脏 EROD 活性的变化

Fig. 1 *Sparus macrocephalus* liver EROD activity change ($\text{pmol}/(\text{min} \cdot \text{mg})$ protein) after exposure to benzo[a]pyrene (BaP), and cleaned in sand filter seawater for 7 days after the exposure experiments, respectively

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

低质量浓度组 ($0.5, 1.0 \mu\text{g/L}$) EROD 活性随暴露时间的增加诱导程度呈现不同的变化趋势, 在 12 h 之前 EROD 活性和对照组比较被显著诱导, 但各个

时相之间的变化不大, 在暴露 2, 4, 7 d 时 EROD 活性被极显著诱导, 尤其在暴露 2 d 时 EROD 活性出现最大值, 极显著高于对照组和高质量浓度组

(2.0, 5.0 μg/L)。

高质量浓度组 2.0, 5.0 μg/L BaP EROD 活性极显著高于对照组的时间比低浓度组早, 分别在暴露 2 h 和 12 h。在暴露后期 EROD 活性虽极显著被诱导, 但诱导的程度比低浓度组弱。

在 BaP 暴露解除 7 d 后, 各暴露组中黑鲟肝脏的 EROD 活性均下降, 与空白对照相比均没有显著性差异。

3 讨论

在这次实验中作者用丙酮作为助溶剂, 与空白对照组比较, 丙酮组肝脏 EROD 活性处于一定的波动中, 与空白组相似, 但与同一时相的空白组比较均无显著差异, 这说明丙酮作为助溶剂是可行的。

通过对黑鲟暴露于不同浓度 BaP 肝脏 EROD 活性随暴露时相的动力学变化研究发现, 暴露于高质量浓度组 (5.0 μg/L) 的黑鲟肝脏 EROD 活性被极显著诱导的时间比低质量浓度组 (0.5 μg/L) 早。王重刚等^[14]在研究 *Mugil soiyu* 体内注射 BaP 后发现高质量浓度组 (50 μg/L) EROD 活性最高出现时间比低质量浓度组 (5 μg/L) 早, 这个结果与作者的实验结果有一定的相似性, 同时也表明黑鲟是一种对 PAHs 比较敏感的鱼种, 适宜用来监测 PAHs 的污染。同时作者的实验结果还发现, 暴露在 1.0, 2.0, 5.0 μg/L BaP 组中肝脏 EROD 活性在暴露期间均出现了先升高后降低再升高的变化趋势, 且这种趋势在高浓度组 5.0 μg/L 变化最明显, 这有可能是当肝脏 EROD 受到 BaP 诱导时, 其活力迅速增加, 表明肝细胞对外来物质诱导刺激的反应大大增强, 随着 BaP 和其代谢产物在体内的富集, 当接触更高浓度的刺激时 EROD 活力反而降低, 也可能与脂质过氧化有关。BaP 在活化代谢过程中可生成 20 余种代谢物, 均有不同程度的脂质过氧化作用, 可导致 CYP1A1 的组装或构型的改变, 从而降低 EROD 活力水平^[15]。再升高的原因可能是脂质过氧化产生的自由基被及时清除, 没有对肝脏细胞造成严重的损伤, 另一方面也可能与黑鲟自身的免疫防御系统和 BaP 的代谢产物有关, 因为 BaP 进入鱼体后产生的多种代谢产物, 究竟是哪一种或哪几种代谢产物起主要作用还有待进一步研究。

在暴露初期 (2, 6, 12 h) 不同暴露水平组在同一暴露时相黑鲟肝脏 EROD 活性均呈现出随暴露水平的升高诱导程度相应增强, 尤其在暴露 12 h 后肝脏 EROD 活性与 BaP 浓度呈较好的线性关系 ($R^2=0.920$

1), Au^[16] 在实验室对 *Solea ovata* 注射不同浓度 BaP 1 d 后发现肝脏 EROD 活性和 BaP 的用量有很好的相关性。

本次实验, 黑鲟 14 d 后解除暴露, 净化 7 d 后发现各暴露水平中肝脏 EROD 活性均下降, 与空白对照比较均没有显著性差异, 一方面表明作者设计的暴露浓度没有超出严重损伤黑鲟自身恢复能力的浓度范围, 另一方面表明, 鱼体被低浓度 BaP 污染后, 通过净化, 抗氧化酶系统可恢复至正常水平, 这是一个值得进一步研究的问题。

4 结语

研究了黑鲟暴露于不同浓度苯并(a)芘 (BaP) 后, 肝脏 EROD 活性在不同暴露时相的动力学变化情况, 结果表明, BaP 可引起黑鲟肝脏 EROD 活性在暴露 14 d 内出现一定的波动变化, 高质量浓度组 (2.0, 5.0 μg/L) 比低质量浓度组 (0.5, 1.0 μg/L) 诱导肝脏 EROD 活性出现的早, 且诱导程度也高。净化实验可使黑鲟肝脏 EROD 活性恢复至正常水平, 这既为进一步研究 BaP 毒作用机制提供了有力的证据, 也提醒人们, 净化实验似乎有助于清除 BaP 对黑鲟肝脏的污染, 但其中的机制还需要结合基因毒理学和组织病理学来研究阐述。

参考文献:

- [1] Vander O R, Opperhuizen A, Satumalay K, et al. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*): I. Bioaccumulation: biota-sediment ratios of PCBs, OCPs, PCDDs and PCDFs [J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 35: 21-46.
- [2] Collier T K, Anulacion B F, Stein J E, et al. A field evaluation of cytochrome P450 1A as a biomarker of contaminant exposure in three species of flatfish, *Environ Toxicol Chem*, 1995, 14: 143-152.
- [3] Goksøyr A, Foörlin L. The cytochrome P450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring [J]. *Aquat Toxicol*, 1992, 22: 287-312.
- [4] Haasch M L, Prince R, Wejksnora P J, et al. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P-450 (CYP1A1) as an environmental biomonitor [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1993, 12(6): 885-895.
- [5] Devaux A, Flammarion P, Bernardon V, et al. Monitoring of the chemical pollution of the River Rhone through measurement of DNA damage and cytochrome P4501A induction in chub (*Leuciscus cephalus*) [J]. *Mar Environ*

- Res, 1998, **46**(1- 5):257- 62.
- [6] Pacheco M, Santos M A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L.[J]. **Ecotoxicol Environ Saf**, 1998, 40:71 -76.
- [7] Raza H, Otaiba A, Montague W. β -naphthoflavone inducible cytochrome P4501A1 activity in liver microsomes of the marine safi fish (*Siganus canaliculatus*) [J]. **Biochem Pharmacol**, 1995, **50** (99): 1401-1406.
- [8] Fenet H, Casellas C, Bontoux J. Laboratory and field-caging studies on hepatic enzymatic activities in European eel and rainbow trout [J]. **Ecotoxicol Environ Saf**, 1998, 40:137-143.
- [9] 朱德芬. 黑鲟人工养殖技术讲座[J].水产养殖, 1996 , 3: 30-31.
- [10] 杨玻利,郑微云. 重金属对黑鲟幼鱼和真鲷幼鱼的毒理效应[J]. 厦门大学学报, 1994, **33**(增刊): 28-31.
- [11] Kirby M F, Neall P, Tylor T. EROD activity measured in flatfish from the area of the sea empress oil spill [J]. **Chemosphere**, 1999, **38**(12): 2 929-2 949.
- [12] Hodson P V. Measuring the potency of pulp mill effluents for induction of hepatic mixed-function oxygenase activity in fish [J]. **Journal of Toxicology and Environmental Health**, 1992, 49:83-110.
- [13] 郭敏亮,姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, **23**(6): 558-561.
- [14] Wang chonggang, Chen jixin, Yu ang , *et al.* EROD activities of liver in Mugil so-iuy exposed to benzo(a) pyrene, pyrene and their mixture [J]. **Acta Oceanologica Sinica**, 2003, **22**(2): 213-220,250.
- [15] Rahman Q,Khan S G, Ali S. Effect of chrysotile asbestos on cytochrome p-450-dependent monooxygenase and glutathione-S-transferase activities in rat lung [J]. **Chem Biol Interact**, 1990, 75:305-313.
- [16] Au D W T, Wu R S S, Zhou B S, *et al.* Relationship between ultrastructural changes and EROD activities in liver of fish exposed to Benzo[a]pyrene [J]. **Environmental Pollution**, 1999, 104: 235-247.

Study on the kinetics of hepatic EROD activities in black porgy(*Sparusmacro cephalus*) exposed to benzo(a)pyrene

MU Jing-li^{1,2}, WANG Xin-hong¹, WANG Shu-hong³, LIN Jian-qing⁴,
WANG Ke-jian¹, HONG Hua-sheng¹

(1. State Key Laboratory of Marine Environmental Science, Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005,China;2. National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116023,China; 3. Fisheries College, Jimei University , Xiamen 361021, China;4. College of Bioengineering , Jimei University , Xiamen 361021,China)

Received: Oct., 23, 2006

Keywords : benzo(a)pyrene; EROD; *Sparusmacro cephalus*, liver

Abstract : Laboratory experiments were carried out to study the kinetic processes of the activities of EROD (7-ethoxyresorufin O-deethylase) in the liver of *Bacsilewsky* exposed to benzo(a)pyrene at the different concentrations during 14 days's exposure. Hepatic EROD activities were assayed by a slight modification of the method described by Hodson and Kirby. Our Experiments found that the strong induction of EROD activity exposure to the relatively higher concentration groups, appeared earlier than that of exposure to the relatively lower concentration groups. Results showed that the hepatic EROD activities were strong significantly induced at the second day's exposure to the lower concentrations of benzo[a]pyrene(0.5 μ g/L and 1.0 μ g/L), at 12h exposure to the higher concentrations of benzo[a]pyrene(2.0 μ g/L and 5.0 μ g/L) ,compared to the blank control. The activities of hepatic EROD decreased under the different exposure levels after 7 days cleaned in the sand filtered seawater and had not significant statistic difference compared with the blank control group. This indicates that BaP at our experimental concentrations did not damage the system of hepatic restored of *Bacsilewsky*.

(本文编辑:张培新)