

# 三丁基锡对牡蛎吞噬细胞和保护酶系统活力的影响

李张伟<sup>1</sup>, 韩雅莉<sup>2</sup>, 李平<sup>3</sup>

(1. 韩山师范学院 化学系, 广东 潮州 521011; 2. 广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510000; 3. 汕头大学 生物系, 广东 汕头 515063)

**摘要:**检测了受三丁基锡(tributyltin, TB T)污染的牡蛎的吞噬细胞活力、超氧化物歧化酶活性、过氧化氢酶活性、脂质过氧化作用等生理生化指标。实验结果表明,牡蛎血细胞的吞噬活力随着 TB T 浓度的增加而下降;对不同 TB T 浓度下牡蛎的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性测定发现,在较低浓度下(TB T 质量浓度 < 10  $\mu\text{g/L}$ ),SOD 和 CAT 的酶活力被抑制,随着 TB T 浓度的增大,SOD 和 CAT 的比活力也随着增大,但当 TB T 达到较高浓度时,SOD 和 CAT 的比活力开始下降,而过氧化脂质(LPO)却随着 TB T 的浓度的增加而增大。

**关键词:**三丁基锡;僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*);过氧化氢酶;超氧化物歧化酶;过氧化脂质  
**中图分类号:**Q55      **文献标识码:**A      **文章编号:**1000-3096(2007)12-0038-05

近年来有机锡化合物被广泛用作水下设施及船体保护涂层添加剂,造成了严重的水环境污染,研究表明环境中极低的有机锡含量( $10^{-12}$  g/L)就会对生物造成严重的毒害作用<sup>[1,2]</sup>,特别是牡蛎、螺类等底栖或固着生活的软体动物更易受到污染物的毒害。水生生物对有机锡化合物有极强的富集作用<sup>[3]</sup>,如牡蛎组织对水体中三丁基锡(tributyltin, TB T)的富集系数高达 50 000<sup>[2]</sup>。这类化合物在生物体内累积过多,将会引起机体的酶活性、免疫系统等方面的一系列变化,对其生长和生存造成严重危害<sup>[4,5]</sup>。现已证实, TB T 对牡蛎等非目标生物有严重的毒害作用,干扰机体钙代谢,致使出现贝壳畸形加厚等一系列异常现象。

作者以应用最广、毒性最大的 TB T 为污染物,选用僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*)为实验材料,探讨 TB T 对牡蛎自身防御功能的影响,包括对吞噬细胞的功能和体内保护酶系统活力的影响,保护酶系统包括超氧化物歧化酶(SOD)、脂质过氧化物(LPO)和过氧化氢酶(CAT)。SOD 是牡蛎体内一种具有消除超氧离子自由基功能的抗氧化酶,能保护机体不受超氧离子自由基的毒害。LPO 是牡蛎体内不饱和脂肪酸过氧化作用的产物,是实验动物中常用的过氧化指标。CAT 可分解有机质降解过程中释放的过氧化氢,防止其对生物体的毒害作用。对以上 3 种酶含量的测定,有助于了解牡蛎在不同 TB T 浓度条件下其体内抗氧化作用能力的变化,旨在探讨有机锡对

动物机体的整体效应,为进行环境监测和有效控制有机锡污染提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验用牡蛎购自汕头市南澳牡蛎养殖场,经中国科学院南海海洋研究所鉴定为僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*),购回后用人工海水充气培养备用。将牡蛎分成 6 组,每组 20 只,分别置于 TB T 质量浓度为 0, 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{g/L}$  的 6 个盆内进行活体污染,48 h 后进行有关指标的检测。TB TCL 为美国 Acros 公司产品,其余试剂均为国产分析纯。

### 1.2 TB T 对牡蛎血细胞吞噬能力的影响

将按常规方法<sup>[6]</sup>培养好的酵母菌加过滤海水,4 000 r/min 离心 5 min,去上清液,加固定液(1%戊二醛和 1%的蔗糖)30 min,4 000 r/min 离心 5 min,去上清液,加美蓝染色 6 min,加海水洗涤后,4 000 r/min 离心 5 min,用适量海水配成酵母菌悬浮液。用

收稿日期:2005-12-12;修回日期:2006-06-20

基金项目:国家自然科学基金项目(30271033);广东省科技兴海重大项目(A200005F02)

作者简介:李张伟(1980-),男,广东潮州人,硕士研究生,助教,研究方向:环境化学;韩雅莉,通讯作者,博士,教授, E-mail: ylhlan@stu.edu.cn

注射器从牡蛎心脏抽取血液,加 1 滴 pH7.0 含 L-半胱氨酸的过滤海水,摇匀,制成血细胞悬液。采用文献[7]的方法。在显微镜下随机选择 100 个牡蛎血细胞计算吞噬百分率。再统计每个巨噬细胞吞噬酵母菌的平均个数(吞噬指数)。每个浓度均重复 2 次。

### 1.3 保护酶活力测定

分别剪取牡蛎内脏团、鳃和外套膜三部分,称质量,用 4 预冷的 pH7.2 Tris-HCl 缓冲液按 1:1 的比例研磨,匀浆液置 1.5 mL 离心管中 12 000 r/min 离心 15 min,取上清酶液待测。采用 Bradford 试剂法测定蛋白浓度<sup>[8]</sup>。SOD 活性测定采用邻苯三酚自氧化法<sup>[9]</sup>。CAT 活性测定参照文献[10]的方法。LPO 值测定参照文献[11]的方法。实验结果统计处理采用 *T* 检验法。

## 2 结果

### 2.1 TB T 对牡蛎血细胞吞噬能力的影响

实验结果(图 1)表明,随着 TB T 浓度的增大,牡蛎血细胞的吞噬能力呈线性下降趋势。对照组的血细胞吞噬率为 24.60% ± 4.80%,而 TB T 污染浓度最大的第 5 组(40 μg/L)的血细胞的吞噬率只有 10.50% ± 0.70%。

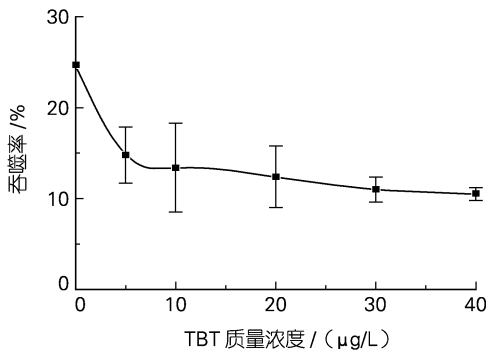


图 1 不同 TB T 浓度对血细胞吞噬率的影响

Fig.1 Effects of different TB T concentrations on phagocytic rate of blood cells

### 2.2 TB T 处理对牡蛎内脏团、鳃和外套膜 SOD 活性的影响

TBT 处理对牡蛎内脏团 SOD 活力测定结果表明(图 2),低浓度 TBT 处理组(TBT 质量浓度 < 10 μg/L) SOD 比活力略有下降,随着 TBT 浓度增大(10 ~ 20 μg/L) SOD 活力升高,当 TBT 达到一定峰值(30 μg/L)后 SOD 活力又随 TBT 浓度增大而降低。

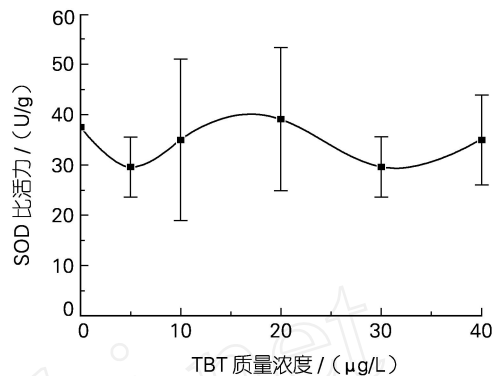


图 2 TB T 处理对牡蛎内脏团 SOD 活性的影响

Fig.2 Effects of TB T on internal organ SOD activity of oyster

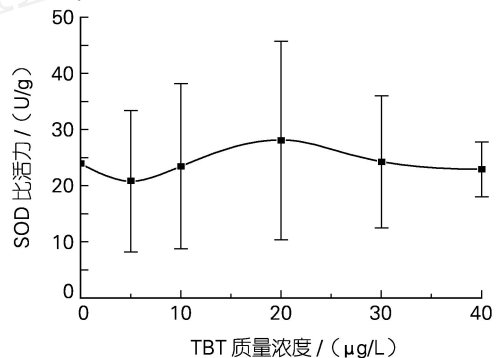


图 3 TB T 处理对牡蛎鳃 SOD 活性的影响

Fig.3 Effects of TB T on gill SOD activity of oyster

TBT 处理对牡蛎鳃 SOD 比活力的影响跟内脏团极其相似(图 3),也是有先降低再升高,再降低的现象,但在用高浓度 TB T 处理时 SOD 比活力并无反弹现象。外套膜 SOD 活力的情况(图 4)与内脏团和鳃的有所不同,随着 TB T 浓度的增大外套膜 SOD 活力持续下降,直到 TB T 的质量浓度达到最大(40 μg/L)时 SOD 的比活力才略有升高。

### 2.3 TB T 处理对牡蛎 LPO 的影响

实验结果(图 5,6)表明,牡蛎内脏团和鳃的 LPO 浓度变化趋势相似,LPO 浓度随着 TB T 质量浓度(5 ~ 20 μg/L)的增大而增大,呈正相关,当 TB T 的质量浓度达到 30 μg/L 时 LPO 浓度就开始下降。从图 7 可以看出 TB T 处理对牡蛎外套膜 LPO 浓度的影响,低质量浓度 TB T 处理(5 μg/L)时,牡蛎外套膜的 LPO 浓度急剧下降,然后随着 TB T 浓度的增大而持续升高,当 TB T 质量浓度达到 30 μg/L 时,牡蛎外套膜 LPO 浓度达到最高值,随着 TB T 处理浓度的进一步增大,LPO 浓度呈下降趋势。

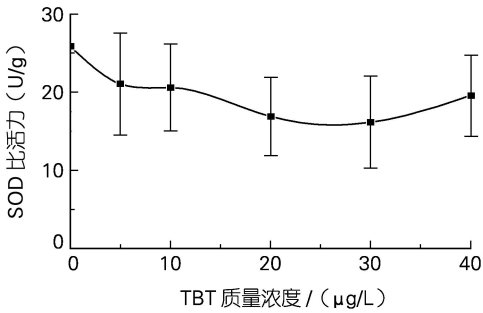


图 4 TBT 处理对牡蛎外套膜 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effects of TBT on outside membrane SOD activity of oyster

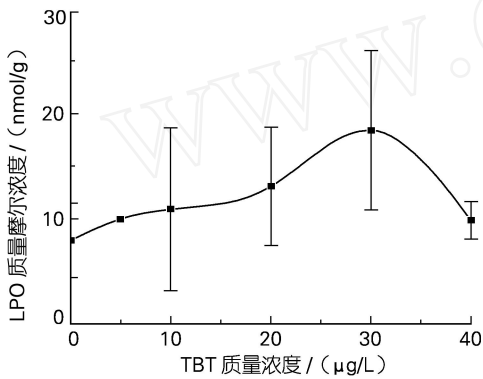


图 5 TBT 处理对牡蛎内脏团 LPO 的影响

Fig. 5 Effects of TBT on internal organ LPO activity of oyster

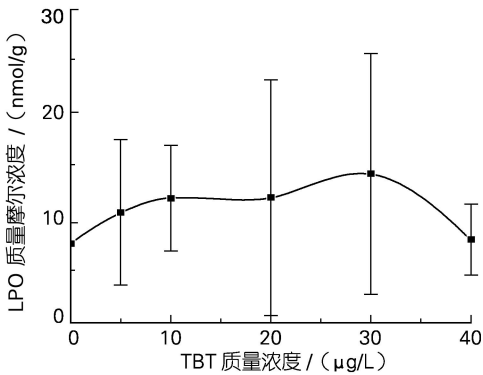


图 6 TBT 处理对牡蛎鳃 LPO 的影响

Fig. 6 Effects of TBT on gill LPO activity of oyster

## 2.4 TBT 处理对牡蛎 CAT 的影响

TBT 处理对牡蛎内脏团、鳃和外套膜 CAT 活性的影响见图 8,9,10。实验结果表明,在这 3 种组织

器官中 CAT 活力变化趋势基本相似,均为在低浓度 TBT 处理下 CAT 活力呈降低趋势,随着 TBT 处理浓度的增大 CAT 活力逐渐增大,当 TBT 质量浓度达到较高程度(20 ~ 30 μg/L)时 CAT 活力开始下降。

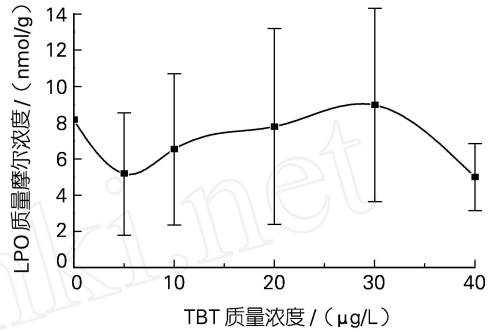


图 7 TBT 处理对牡蛎外套膜 LPO 的影响

Fig. 7 Effects of TBT on outside membrane LPO activity of oyster

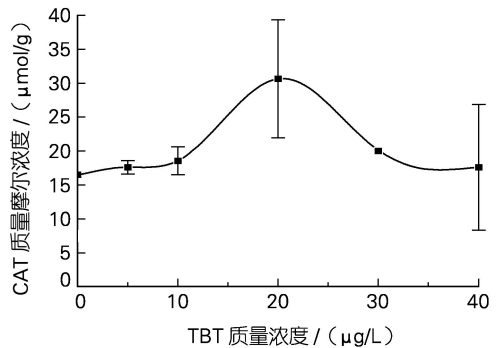


图 8 TBT 处理浓度对牡蛎内脏团 CAT 的影响

Fig. 8 Effects of TBT on internal organ CAT activity of oyster

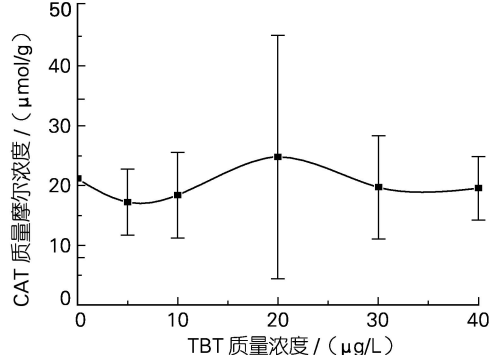


图 9 TBT 处理浓度对牡蛎鳃 CAT 的影响

Fig. 9 Effects of TBT on gill CAT activity of oyster

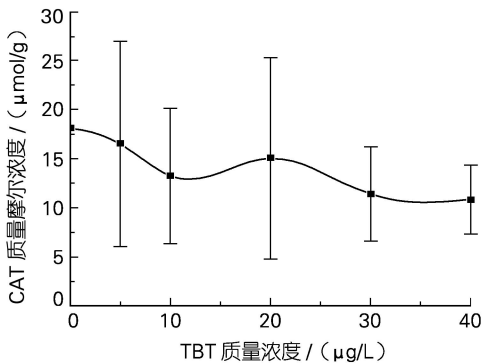


图 10 TBT 处理浓度对牡蛎外套膜 CAT 的影响

Fig. 10 Effects of TBT on outside membrane CAT activity of oyster

### 3 讨论

#### 3.1 TBT 对牡蛎血细胞的伤害作用

本实验表明牡蛎血细胞的吞噬能力随着 TBT 处理浓度的增大而显著下降,呈负相关,说明 TBT 对牡蛎血细胞有一定的毒性作用,致使细胞的正常生理功能遭到严重破坏,这种效应随 TBT 浓度增大越来越显著,由此推测在胁迫条件下,动物机体中可能首先受到毒害的部分是免疫系统,生活于 TBT 污染严重海域的软体动物自身防御功能受到影响,也就意味着它们的抗病能力有所下降,很可能是导致种群死亡率增高的因素之一。

#### 3.2 生物体内的自由基和保护酶系统以及 TBT 对牡蛎 SOD 和 CAT 比活力的影响

逆境条件下生存的生物体内 $O_2^-$ 、单线态氧、过氧化氢、氢氧自由基等活性氧显著增加,这些自由基具有很强的氧化能力,对许多功能分子有破坏作用,但在正常情况下,细胞内自由基水平很低,不会对机体造成伤害,主要是由于细胞内存在着自由基清除系统,这个清除系统主要包括一系列有关的酶,如 SOD, CAT 和 POD 等, SOD 能清除 $O_2^-$ 而形成  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  能与 $O_2^-$ 形成毒性更强的氢氧自由基,但由于细胞内还有过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD), 这两种酶具有分解  $H_2O_2$  的作用,所以在正常情况下,在 SOD, CAT 及 POD 三种酶协调一致作用下细胞内自由基被有效清除,使自由基总维持在一个低水平上,从而防止自由基毒害,因此自由基的产生与清除处于一种动态平衡状态<sup>[12]</sup>,一旦这种平衡受到破坏,就可能产生伤害作用。本研究结果表明,在较低浓度污染情况下,牡蛎内脏团、鳃和外套膜组织中 SOD 和

CAT 的活性呈增加趋势,可见其存在抗逆境的能力,通过增强自由基清除酶 SOD 和 CAT 的活力而清除不利环境因素对机体造成的影响,也就是说,机体通过提高过 SOD 和 CAT 的活性来清除组织中积累的有毒物质,以适应已经到来的逆境,但随着 TBT 浓度的进一步增加,这两种酶的活性不再增加反而降低,这可能与加大浓度的 TBT 对 SOD 和 CAT 有破坏作用或对其活性有抑制作用有关,这也意味着牡蛎机体对逆境的抵御能力是有限度的,超出其自身可以抵御的范围,积累的大量毒素就会对其组织造成损伤。

#### 3.3 TBT 对牡蛎 LPO 值的影响

脂质过氧化物 (LPO) 是牡蛎体内不饱和脂肪酸过氧化作用的产物,是氧自由基与多聚不饱和脂肪酸作用生成的中间代谢产物,包括烷自由基、烷氧基、烷过氧基等<sup>[13]</sup>。本项研究发现,牡蛎受 TBT 处理后 48 h,其内脏团、鳃 LPO 水平随 TBT 剂量的增加而增加,说明 TBT 致动物体内产生了大量自由基和活性氧产物,它们是脂质过氧化作用的引发剂,可引发组织内 LPO 水平的增高,而且随着 TBT 剂量的增加而增高,即脂质过氧化作用的速率随胁迫强度的增加而增加,呈线性关系,从图 5,6 可以看出,随着 TBT 处理浓度的增大,牡蛎内脏团和鳃的 LPO 值持续上升,提示内脏团和鳃对 TBT 更为敏感,易于引发脂质过氧化作用,产生大量 LPO。至于外套膜 LPO 水平与上述 2 种器官有一定差异,其原因可能与组织抗氧化酶活性有关,即抗氧化酶活性降低时 LPO 水平增高,反之则缓解降低。

#### 参考文献:

- [1] Smith B, Bryan G W. The effects of organometallic compounds[J]. *App Organomet Chem*, 1991, 6: 91-97.
- [2] Waldock M.J. The effect of organometallic compounds on marine organism[J]. *Mar Pollut Bull*, 1983, 6: 411-415.
- [3] 全燮, 薛大明, 赵雅芝, 等. 有机锡的生物富集作用与生物效应[J]. *海洋环境科学*, 1997, 4(16): 64-70.
- [4] Horiguchi T, Shiraishi H, Shimizu M, et al. Imposed in japans gastropods (Neogastropoda and Mesogastropoda): Effects of tributyltin and triphenyltin from antifouling paints [J]. *Mar Pollut Bull*, 1995, 31: 402-405.
- [5] Oehlmann J, Fioroni P, Sreoben E, et al. Tributyltin (TBT) effects on *Ocenebrina aciculate* (Gastropoda: Muricidae): imposed development, sterilization, sex change and population decline [J]. *Sci Total Envir*,

- 1996 188: 205-223.
- [6] 沈萍, 范秀容, 李广武, 等. 微生物学实验[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000. 42.
- [7] 耿艳芳. 巨噬细胞吞噬功能的新检测法[J]. 微生物学通报, 1997, 24(3): 183-185.
- [8] 张龙翔, 吴国利. 高级生物化学实验选编[M]. 北京: 高等教育出版社, 1989. 85-120.
- [9] 袁勤生. 邻苯三酚自氧化法测定茶氧化物歧化酶活性[J]. 医药工业, 1983, 1: 16-19.
- [10] 施特尔马赫 B. 酶的测定方法[M]. 北京: 中国轻工业出版社, 1992. 186-194.
- [11] 金丽琴, 吕建新, 胡云良, 等. 细脚拟青霉对大鼠脂质过氧化物和还原型谷胱甘肽水平的影响[J]. 中国病理生理学杂志, 1997, 13(4): 381-384.
- [12] 李周直, 沈惠娟, 将巧根, 等. 几种昆虫体内保护酶系统活力的研究[J]. 昆虫学报, 1994, 37(4): 399-404.
- [13] 何明大, 杨锡兰. 保元口服液对阳虚小白鼠 SOD, LPO 及 VitE 的影响[J]. 湖南医科大学学报, 1994, 19(5): 459-460.
- [14] Tank S. Imposex in *Thais gradate* and *chicoreus capinus* (Mollusca, Neogastropoda, Muricidae) from the Straits of Johor: A case study using penis length area and weight as measures of imposex severity[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1999, 39(1-12): 295-303.
- [15] 李安乐, 陈锡文. 低龄 SD 大鼠主要脏器组织中 GSH 含量和 LPO 水平测定[J]. 温州医学院学报, 1999, 29(3): 222-223.

## Effects of TBT on the phagocytic rate of blood cells and the activities of endogenous enzymes of protective systems in oyster (*Saccostrea cucullata*)

LI Zhang-wei<sup>1</sup>, HAN Ya-li<sup>2</sup>, LI Ping<sup>3</sup>

(1. Department of Chemistry, Hanshan Normal University, Chaozhou 521011, China; 2. College of Chemical Engineering, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510000, China; 3. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063, China)

Received: Dec. 20, 2005

**Key words:** TBT; *Saccostrea cucullata*; superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT); lipid peroxide (LPO)

**Abstract:** Organotin compounds, especially tributyltin (TBT) and triphenyltin (TPHT), are widely used as biocidal additives in antifouling paints due to their effectiveness. However, they also cause damage to non-target organisms and are regarded as the most toxic materials ever deliberately introduced into the sea. In the paper, we study the effects of different TBT concentrations (0, 5, 10, 20, 30, 40  $\mu\text{g/L}$ ) on phagocytic rate of blood cells and the activities of endogenous enzymes of protective systems in oyster (*Saccostrea cucullata*). The endogenous enzymes of the protective systems included superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT). The results showed that the phagocytic ability of blood cell in oyster decreased while the TBT concentration increased and the level of SOD and CAT activity were inhibited in the low concentration and enhanced gradually in the higher concentration, and sharply depressed in the highest concentration (30  $\mu\text{g/L}$  to 40  $\mu\text{g/L}$ ). However, the level of LPO was increased with TBT increase.

(本文编辑: 张培新)