

苯并(a)芘、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

王重刚¹, 陈奕欣¹, 郑微云², 余群²

(1. 厦门大学生命科学学院, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005)

摘要: 在实验生态条件下, 观察苯并(a)芘、芘及其等浓度混合物暴露对梭鱼(*Mugil so-iuy*)肝脏谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性的影响。结果显示, 在7d的暴露中, 苯并(a)芘、芘对肝脏GST活性的影响主要为诱导效应, 芘对GST活性的诱导比苯并(a)芘强。混合物在15d的暴露中未观察到GST活性的诱导, 而是在暴露的后期出现GST活性的抑制。实验表明, 肝脏GST活性的诱导指示受到PAHs污染胁迫, 而GST活性抑制则是受到较长时间或较严重的污染。

关键词: 苯并(a)芘, 芘, 谷胱甘肽硫转移酶, 梭鱼(*Mugil so-iuy*)

中图分类号: X503.225 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2004)03-0040-04

多环芳烃 [Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs)] 是海洋常见的污染物, 由于其具有致癌性和致突变性而成为必须检测的污染物。PAHs在动物体内进行生物转化时, 可形成多种中间产物。谷胱甘肽硫转移酶 [Glutathione s-transferases (GST)] 可催化

收稿日期: 2002-12-12; 修回日期: 2003-06-18

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (49876029)

作者简介: 王重刚 (1963-), 男, 福建厦门人, 副教授, 博士,

电话: 0592-2187353, E-mail: cgwang@xmu.edu.cn

GSH 与中间代谢物的结合,成为水溶性化合物排出体外,起到解毒作用。大量的研究指出,GST 的表达水平是决定细胞对化学物敏感性至关重要的因素,GST 的诱导是生物对化学胁迫适应性反应^[1]。然而,有机污染对 GST 活性效应的现场研究,结论不太一致,有的显示诱导,有的显示没有变化,有的显示抑制^[2,3]。赵云英等指出,靠近油田或其他污染源的水体的 PAHs 浓度可高达 50 $\mu\text{g}/\text{L}$,大洋或未污染湖水中 PAHs 含量往往低于 1 $\mu\text{g}/\text{L}$ ^[4]。为此,我们选择典型的具有强致癌性的多环芳烃—苯并(a)芘[benzo(a)pyrene (BaP)]和弱致癌性的多环芳烃—芘作为污染物,观察它们对我国近海常见的底层生活的鱼类——梭鱼 (*Mugil so - iuy*) 肝脏 GST 活性的影响。以期为利用梭鱼 GST 活性作为 PAHs 污染的生物标志物提供参考资料。

1 材料和方法

1.1 仪器与试剂

实验仪器采用 Beckman DU - 8B 型紫外可见分光光度计,Beckman J2 - Mc 型冷冻离心机。BaP,芘为 Sigma 公司产品,其余试剂为国产市售产品。

1.2 实验动物和暴露条件

采用 Sugar^[5]的方法。BaP、芘及其等浓度混合物先用二氧六环(dioxane)配制成一定浓度的储备液,避光于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。实验时用沙滤海水分别配制为 0.1, 1.0, 5.0, 10, 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 的浓度。梭鱼捕自福建省平潭县竹屿乡,体长 13.5 cm \pm 2.1 cm,体质量 26.8 g \pm 7.1 g ($n = 45$)。实验鱼先在清洁沙滤海水中暂养 7 d,然后随机每组 6 条鱼放入不同浓度污染物的海水中避光饲养,每组设 2 个平行样。饲养水体为 30 L,用充气机连续充气,喂以小球藻 (*Chlorella* sp.),每天更换 15 L 相同污染浓度的海水,饲养期间水温 13 ~ 15.5 $^{\circ}\text{C}$,盐

度 15 ~ 17。对照组为只加二氧六环。

1.3 取样和样品预处理

分别于暴露后一定天数取样,取出肝脏于液氮中保存。先加 4 倍体积预冷的匀浆液于玻璃匀浆器中匀浆,然后 10 000 r/min 离心 30 min,取上清液用于测定,GST 活性的测定采用毛德寿等^[6]的方法,定义 25 $^{\circ}\text{C}$ 下,每分钟每毫克蛋白生成 1 个 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的谷胱甘肽结合物为一个 GST 活性单位。上清液中的蛋白含量用考马斯亮蓝法^[7]测定。

1.4 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 标准误差 (mean \pm SDE) 表示,组间数据用单尾 t -检验法进行比较, $P < 0.05$,被认为有显著差异; $P < 0.01$,被认为有极显著差异。

2 结果

2.1 BaP,及其混合物暴露对肝脏 GST 活性影响的时间效应

从表 1 可见,二氧六环使 GST 活性略有下降,但与同一天的空白组比较,没有显著差异。BaP 在暴露期间,BaP 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组在暴露 7 d 后,GST 活性出现有显著差异的诱导,高浓度组(50 $\mu\text{g}/\text{L}$)在暴露早期出现 GST 活性的诱导,有显著差异,随后 GST 活性下降。芘暴露的前期 GST 活性增加。芘 5 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组比 50 $\mu\text{g}/\text{L}$ 组对 GST 活性的诱导能力强,随着暴露时间的延长,GST 活性下降。混合物暴露随着暴露时间的延长的增加,GST 活性呈现抑制的趋势。

2.2 BaP,芘及其混合物对肝脏 GST 活性的浓度—效应关系

图 1 显示,苯并(a)芘和芘暴露呈现出对 GST 活性的诱导效应,而且芘暴露造成 GST 活性的诱导大于

表 1 BaP,芘及其混合物暴露梭鱼肝脏 GST 活性的时间—效应

Tab.1 Time - effect of hepatic GST activity in *Mugil so - iuy* exposed to BaP, pyrene and their mixture

处理	GST 活性($\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{min})$)				
	1 d	2 d	4 d	7 d	15 d
空白对照	284.1 \pm 63.8	324.0 \pm 79.8	244.2 \pm 30.8	409.3 \pm 113.5	258.2 \pm 19.0
二氧六环对照	210.2 \pm 34.9	213.0 \pm 16.9	176.2 \pm 30.3	328.0 \pm 57.3	327.3 \pm 63.9
BaP 5 $\mu\text{g}/\text{L}$	272.7 \pm 29.2	328.9 \pm 93.8	242.1 \pm 52.2	629.3 \pm 124.3*	-
BaP 50 $\mu\text{g}/\text{L}$	417.6 \pm 72.0*	429.9 \pm 63.7*	198.9 \pm 64.6	212.9 \pm 8.8	-
芘 5 $\mu\text{g}/\text{L}$	624.0 \pm 151.0*	502.0 \pm 170.2*	509.2 \pm 155.2*	429.3 \pm 73.8	-
芘 50 $\mu\text{g}/\text{L}$	620.0 \pm 97.8**	387.3 \pm 135.9	315.4 \pm 96.0	232.6 \pm 28.7	-
混合 5 $\mu\text{g}/\text{L}$	240.1 \pm 54.6	168.4 \pm 46.0	161.0 \pm 24.1	267.0 \pm 75.2	138.6 \pm 39.9*
混合 50 $\mu\text{g}/\text{L}$	266.5 \pm 39.5	174.1 \pm 30.0	261.7 \pm 61.8	57.2 \pm 12.9*	29.18 \pm 3.4**

注:与二氧六环对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ ($n = 4 \sim 7$)

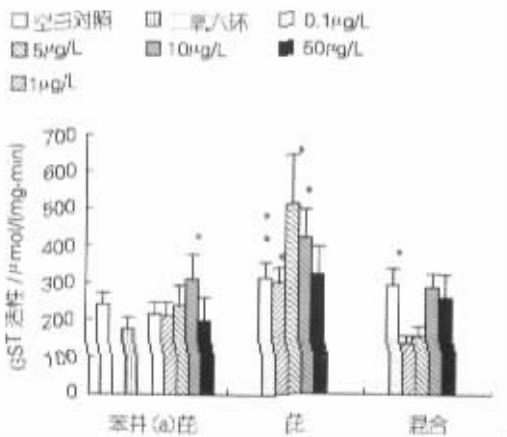


图1 苯并(a)芘、芘及其混合物暴露4 d后对梭鱼肝脏ST活性的影响($n = 4 \sim 9$)。与二氧六组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

Fig. 1 Effects of BaP, pyrene and their mixture exposure for 4 days on hepatic GST activity in *Mugil so-luy* ($n = 4 \sim 9$). Compared to dioxane group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

BaP。混合物暴露只有 $0.1 \mu\text{g/L}$ 组 GST 活性出现有显著差异的诱导。没有呈现良好的剂量—效应关系。

3 讨论

GST 是解毒系统第二阶段的解毒酶,可催化谷胱甘肽(GSH)与亲电中间代谢物的结合,减少这些化合物与细胞内生物大分子如 DNA 等结合的可能性,还可清除脂类过氧化物,在解毒系统中起重要作用。BaP 暴露对肝脏 GST 活性的诱导小于芘暴露所造成的 GST 活性诱导,这导致了 BaP 暴露有更多的活性中间代谢物滞留在体内。而混合污染则似乎对肝脏 GST 活性没有诱导而是抑制,这使其中间代谢物更多地滞留在体内。他们对 GST 活性的影响与所造成的肝脏 DNA 损伤是相关的,即肝脏 DNA 单链断裂的程度为:混合物 > BaP > 芘^[8]。这为 BaP 比芘有更强的致癌性以及芘与 BaP 混合污染有促癌作用^[9]提供了科学理论解释。

在一定条件下,GST 活性可能由于参与污染物的代谢而被诱导。但研究结果不太一致。如 Chen 等^[10]将银鲫(*Carassius auratus gibelio*)暴露于受污染的 Ya-Er 湖的底质中,发现 GST 活性在暴露 4 周时被诱导;Di Giulio 等^[11]将叉尾 暴露于 Black Rock 海港底质中,肝脏 GST 活性在暴露 14 d 时被显著诱导,但 28 d 时则与对照组无显著差异。许多研究显示,在实验室进

行 PAHs 或 PCBs 暴露的几种鱼体上没有测出 GST 活性的显著增加^[12,13];然而,虹鳟在相似的暴露中有约两倍的增加^[14,15],在欧洲鳎(*Pleuronectes platessa*)上也得到相似的结果^[16];野外的研究也不一致, Van Veld 等^[17]从杂酚油(creosote)污染的港湾的底(*Fundulus heteroclitis*)上观察到 GST 活性的明显增加。从冰岛西南岸的 4 个港口捕获的大杜父鱼(*Myoxocephalus scorpius*), GST 活性没有显著差异^[2]。本实验的结果则显示, BaP $5 \mu\text{g/L}$ 浓度组在暴露 7 d 后对 GST 活性产生显著诱导,高浓度组($50 \mu\text{g/L}$)BaP 和芘在暴露的前期即出现 GST 活性的诱导,而后 GST 活性下降,似乎是一种先诱导后抑制的影响模式, BaP 和芘的暴露没有观察到 GST 活性的抑制,可能是暴露时间尚不够长,而混合物暴露没有观察到 GST 活性诱导, $5, 50 \mu\text{g/L}$ 浓度组分别在暴露 7, 15 d 后 GST 活性受到显著抑制。由此看到,不同浓度和不同的 PAHs 对梭鱼肝脏 GST 活性的影响模式是不完全一样的。从上述结果我们可以这样认为,即 GST 活性受到诱导说明有多环芳烃的污染,而 GST 活性抑制则似乎受到较严重或较长时间的污染。因此,我们认为,前人的有关报道所以出现 GST 活性无影响、诱导或抑制多种情形,除了鱼种不同之外,可能与污染物种类和浓度不同以及暴露时间有关。II 相酶的反应没有细胞色素 P450 系统的明显^[18],并且 GST 活性会在一定范围内波动,因此选择合适的参照位点显得尤为重要。

参考文献:

- [1] Gadagbui B, James M. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine[J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 49: 27-37.
- [2] Stephensen E, Svavarsson J, Sturve J, et al. Biochemical indicators of pollution exposure in shortorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the south-west coast of Iceland[J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 48: 431-442.
- [3] Machala M. Responses of carp hepatopancreatic ethoxyresorufin-O-deethylase and glutathione-dependent enzymes to organic pollutants: a field study[J]. *Environ Toxicol Chem*, 1997, 16(7): 1410-1426.
- [4] 赵云英,马永安.天然环境中多环芳烃的迁移转化及其对生态环境的影响[J]. *海洋环境科学*, 1998, 17(2): 68-72.
- [5] Shugart L R. Quantitation of chemically induced damage to DNA of aquatic organisms by alkaline unwinding[J]. *Aquat Toxicol*, 1988, 13: 43-52.
- [6] 毛德寿,周宗灿,王志远,等.环境生化毒理学[M]. 沈阳 辽宁大学出版社, 1986.

- [7] 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.
- [8] 陈奕欣,王重刚,李钦,等. 苯并(a)芘和芘对梭鱼肝脏DNA损伤的研究[J]. 海洋学报, 2000,22(2):90-96.
- [9] 童建,冯致英. 环境化学物的联合毒作用[M]. 上海:上海科学技术文献出版社, 1994.
- [10] Chen G, Xu Y, Xu L, *et al.* Influence of dioxin and contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp[J]. **Ecotoxicology and environmental safety**, 1998, 40:234-238.
- [11] Di Giulio R T, Habig C, Gallagher E P. Effects of Black Rock Harbor sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish[J]. **Aquat Toxicol**, 1993, 26: 1-22.
- [12] James M O, Heard C S, Hawkins W E. Effects of 3-methylcholanthrene on monooxygenase, epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activity in small estuarine and freshwater fish[J]. **Aquat Toxicol**, 1988, 12: 1-15.
- [13] Collier T K, Varanasi U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants[J]. **Arch Environ Contam Toxicol**, 1991, 20:462-473.
- [14] Andersson T, Pesonen M, Johansson C. Differential induction of cytochrome P-450 monooxygenase, epoxide hydrolase, glutathione S-transferase and UDP glucuronosyltransferase activity in the liver of rainbow trout by B-naphthoflavone or clophen A50[J]. **Biochem Pharmacol**, 1985, 34: 3309-3314.
- [15] Goksoyr A, Andersson T, Hansson T, *et al.* Species characteristics of the hepatic Xenobiotic and steroid biotransformation systems of two teleost fish, Atlantic cod (*Gadus morhua*) and rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. **Toxicol Appl Pharmacol**, 1987, 89:347-360.
- [16] Leaver M J, Clarke D J, George S G. Molecular studies of the phase II conjugative enzymes of marine pleuronectid flatfish[J]. **Aquat Toxicol**, 1992, 22:265-278.
- [17] Van Veld P A, Ko U, Vogelbein W K, *et al.* Glutathione transferase in intestine, liver and hepatic lesion of mummichog[J]. **Fish Physiol Biochem**, 1991, 9: 369-376.
- [18] Livingstone D. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish[J]. **Comp Biochem Physiol Part A**, 1998, 120, 43-49.

The effect of exposure of Benzo(a) Pyrene, Pyrene and their mixture on hepatic glutathione - s - transferases activity in *Mugil so - iuy*

WANG Chong-gang¹, CHEN Yi-xin¹, ZHENG Wei-yun², Yu Qun²

(1. School of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China; 2. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Dec., 12, 2002

Key words: benzo(a)pyrene; pyrene; glutathione - s - transferases; *Mugil so - iuy*

Abstract: The effects of benzo(a)pyrene (BaP), pyrene and their mixture of equal concentration exposure on hepatic glutathione s-transferases (GST) activity in *Mugil so - iuy* were studied in experimental condition. The results showed that the GST activities were mostly induced in the fish exposed to BaP or pyrene during 7 days exposure. Pyrene seems to have a stronger ability inducing GST activity than BaP. No GST activity inducins were observed in the fish exposed to the mixture during a 15 day exposure, while the GST activity were inhibited at the anaphase of the exposure. These results suggested that the hepatic GST activity induction indicate PAHs pollution, while the GST activity inhibition indicate more grievous or long lasting pollution.

(本文编辑:刘珊珊)