

苯并芘 B[a]P 对泥蚶组织 EROD、GST 酶活力和 MDA 含量的影响

肖国强, 张炯明, 邵艳卿, 柴雪良, 吴洪喜, 刘 博, 方 军, 滕爽爽

(浙江省海洋水产养殖研究所, 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室, 浙江 温州 325005)

摘要:采用实验生态学的方法, 通过染毒和清除, 研究了不同浓度(0.05、0.5、5 和 10 $\mu\text{g/L}$)苯并芘 B[a]P 胁迫 15 d 和释放 15 d 后, 泥蚶(*Tegillarca granosa*)消化盲囊和鳃丝乙氧基异吩噻唑脱乙酰基酶(EROD)、谷胱甘肽转移酶(GST)活力和脂质过氧化物(MDA)含量的变化。结果表明: 在胁迫阶段 0.5、5 和 10 $\mu\text{g/L}$ B[a]P 处理组对泥蚶消化盲囊和鳃丝 EROD、GST 酶活力和 MDA 含量显著影响($P < 0.05$), EROD、GST 酶活力分别被诱导和抑制, 第 5 d 趋于稳定, MDA 含量随时间呈上升趋势, 在第 10 d 基本达到峰值并趋于稳定。在清除阶段, EROD 活力和 MDA 含量逐渐下降, GST 活力逐渐升高, 并在 5 ~ 10 d 恢复到对照组水平。本研究中, EROD 和 GST 活力的变化能够反映机体解毒代谢的能力, MDA 含量的变化反映了机体氧化损伤的程度, 表现出了一定的剂量和时间效应。

关键词: 苯并(a)芘; 泥蚶(*Tegillarca granosa*); 消化盲囊; 鳃丝; EROD; GST; MDA

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2013)08-0028-07

多环芳烃(PAHs)是一类广泛存在于环境中的持久性有机污染物, 主要源于有机物的热解和石油、煤等化石燃料的燃烧, 通过地面径流、污水排放以及大气颗粒沉降进入海洋环境^[1]。PAHs 易被悬浮颗粒物所吸附结合在沉积物中, 很难发生光化学降解或微生物氧化分解, 并且可能会重新释放进入到海水和生物体中对环境造成二次污染。苯并芘 B[a]P 是致癌性最强的一种 PAHs。已有研究表明^[2]厦门西港表层海水中 16 种 PAHs 的含量, 其总浓度达到 103.4 ~ 2141.1 ng/L(B[a]P 为 5.5 ~ 23.4 ng/L), 而表层沉积物中 PAHs 的浓度在 105.3 ~ 5118.3 ng/g。台州湾^[3]海洋环境中表层、中层和底层水中 16 种 PAHs 总浓度的平均值为 3440.7、3067.1 和 3726.9 ng/L(B[a]P 为 92.15、87.31 和 85.66 ng/L), 沉积物中 PAHs 含量为 85.4 ~ 167.6 ng/g(B[a]P 为 0.06 ng/g)。研究表明, 生物体细胞、生物化学和分子水平上的变化可以最先反映污染物的毒性作用, EROD 和 GST 是主要检测指标, 能够反映细胞色素 P450 依赖的混合功能氧化酶活性的变化, 用于检测多环芳烃亲脂性污染物的毒性效应; 而 MDA 是膜脂质过氧化反应的主要产物之一, 其含量的高低可以指示生物膜受氧化损伤的程度^[4-5]。

双壳贝类与其他海洋生物相比, 具有分布广、

富集能力强、采样和检测较容易等优点, 更重要的是其体内有机污染物水平能够较准确地反应出环境中的污染水平, 被广泛地应用于海洋环境中有机污染物的检测, 如全球性的“Mussel Watch”计划。目前, 一些学者开展了 B[a]P 对贝类毒理学研究, 但是主要集中在牡蛎、贻贝和扇贝^[6-8], 对营埋栖生活的滩涂贝类却未见报道。本文研究了 B[a]P 对代表性滩涂贝类泥蚶(*Tegillarca granosa*)的胁迫和释放 2 个阶段, 泥蚶消化盲囊和鳃丝 EROD、GST 活性和脂质过氧化物(MDA 含量)的变化规律, 探讨 EROD、GST 和 MDA 作为泥蚶解毒代谢指标的可行性, 为滩涂贝类的健康养殖和养殖环境 PAHs 污染监测提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用泥蚶取自温岭市乐海水产养殖场(国家贝类产业技术体系浙江综合试验站核心示范区),

收稿日期: 2013-06-08; 修回日期: 2013-06-19

基金项目: 温州市科技计划项目(N20100066); 浙江省近岸水域生物资源开发与保护重点实验室基金项目(J2012006)

作者简介: 肖国强(1978-), 男, 江苏镇江人, 副研究员, 硕士, 主要从事滩涂贝类生态生理研究, 电话: 0577-88210966, E-mail: xiaogq1978@163.com

平均壳长(3.2±0.13)cm。实验在浙江省海洋水产养殖研究所清江基地开展,实验开始前暂养7 d,实验用海水为二级砂滤海水,海水盐度 21~24, pH 为 7.9~8.1,温度为(25±2)°C,连续充气,日换水 100%,每天早晚投喂适量的金藻或者角毛藻,暂养密度为 400 个/m³。

1.2 实验方法

B[a]P 胁迫浓度梯度设置为 0.05、0.5、5 和 10 μg/L,实验用 B[a]P 购自 Sigma 公司,采用丙酮作为助溶剂配置成 B[a]P 储备液,实验用时分别用砂滤海水配置成各浓度梯度,以自然海水组为对照,每个实验梯度均设 3 个平行。实验组丙酮的浓度小于 0.005%,预实验结果显示,自然海水组和含有 0.005%的丙酮实验组,泥蚶的解毒代谢酶活力无显著差异。

实验在 30 cm×40 cm×50 cm 的塑料水槽内进行,实验水体为 50 L,每个水槽放入活力好,无损伤的泥蚶 45 只,实验期间的养殖管理和暂养期间完全相同,换水时分别加入对应各梯度的海水。实验分为胁迫阶段 15 d 和清除阶段 15 d,实验开始后分别于 0、1、5、10、15、20、25、30 d 取样,每个平行随机取 3 只泥蚶个体,分别取消化盲囊和鳃丝,用预冷双蒸水洗净、滤纸吸干后,置于 1.5 mL 离心管中,保存于-80°C 超低温冰箱中待测。

1.3 样品制备

将泥蚶消化盲囊和鳃丝分别置于预冷磷酸缓冲液(pH=7.6)和 Tri-HCl 缓冲液中(0.1 mmol 的 EDTA, pH=8.3),冰浴 12 000 r/min 匀浆 3 min,将匀浆液 3 000 r/min 离心 20 min(4°C),上清液即为待测酶液。

1.4 酶活性测定

EROD 活性参照 Pohl^[9]改进的快速终止荧光分光光度法,活力单位用每分钟每毫克蛋白产生的异吩嗪酮(resorufin)相对量的多少来表示,单位: nmol/(min·mg prot);谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione S-transferase,GST)和脂质过氧化物含量 LPO 采用试剂盒测定(购自南京建成生物工程研究所),GST 通过催化还原型胱甘肽(GSH)与 1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)结合的能力,通过检测 GSH 浓度的高低反映 GST 活力的大小,单位: nmol/(min·mg);LPO 含量通过检测 MDA 含量的变化,定义为每毫克组织蛋白中所含有丙二醛的质量,单位: (nmol/mg);蛋白含量测定采用考马斯亮蓝比色法。

1.5 数据分析

实验数据用统计学方法分析,数据平均值±标准偏差(Means ± SD)表示,并用单因素方差分析对数据进行统计,以 $P < 0.05$ 为显著性差异,以 $P < 0.01$ 为极显著性差异。

2 结果

2.1 B[a]P 对泥蚶组织 EROD 活力的影响

图 1 可看出,泥蚶消化盲囊和鳃丝低浓度组(0.05 μg/L)EROD 活力随时间变化不明显($P > 0.05$),其他各处理组 EROD 活性均被诱导,其中 0.5 μg/L 处理组 EROD 活性与对照组相比差异显著($P < 0.05$),而 5 μg/L 和 10 μg/L 处理组与对照组相比差异极显著($P < 0.01$),5 d 后达到峰值并处于稳定。在清除阶段,0.5 μg/L 处理组 5 d 后与对照组无显著差异,而 5 μg/L 和 10 μg/L 处理组 10 d 无显著差异。

2.2 B[a]P 对泥蚶组织 GST 活力的影响

泥蚶消化盲囊和鳃丝 GST 活力的变化如图 2 所示,呈逐渐下降趋势,5 d 后基本趋于稳定,除低浓度组(0.05 μg/L)与对照物无明显差异,其他处理组与对照组差异显著($P < 0.05$)。清除阶段 0.5 μg/L 处理组 5 d 即与对照组无显著差异($P > 0.05$),而 5 μg/L 和 10 μg/L 处理组 10 d 时恢复至对照组水平。

2.3 B[a]P 对泥蚶组织 LPO 水平的影响

B[a]P 染毒和清除阶段,泥蚶消化盲囊和鳃丝 MDA 含量的变化如图 3 所示。MDA 含量随时间呈上升趋势,在染毒 1 d 后,除低浓度组(0.05 μg/L)外,各处理组 MDA 含量与对照组差异显著($P < 0.05$),并在第 10 d 基本达到峰值并趋于稳定。清除 5 d 后,5 μg/L 处理组鳃丝和 10 μg/L 仍显著高于对照组,清除 10 d 后,各处理组与对照组无显著差异。

3 讨论

3.1 B[a]P 对泥蚶组织 EROD, GST 活力和 MDA 含量的影响

许多学者研究发现一些鱼类受到 PAHs 的影响,能够明显诱导 EROD 的活力,EROD 活力越大,污染物的毒性效应越高^[10-12]。研究表明,青鳉的 EROD 活力能够被 PAHs 显著诱导,可以作为污染监测的标志物^[13],黑鲷的肝脏的 EROD 活力也与 B[a]P 浓度呈较好的线性关系^[14]。本研究中,低浓度处理组

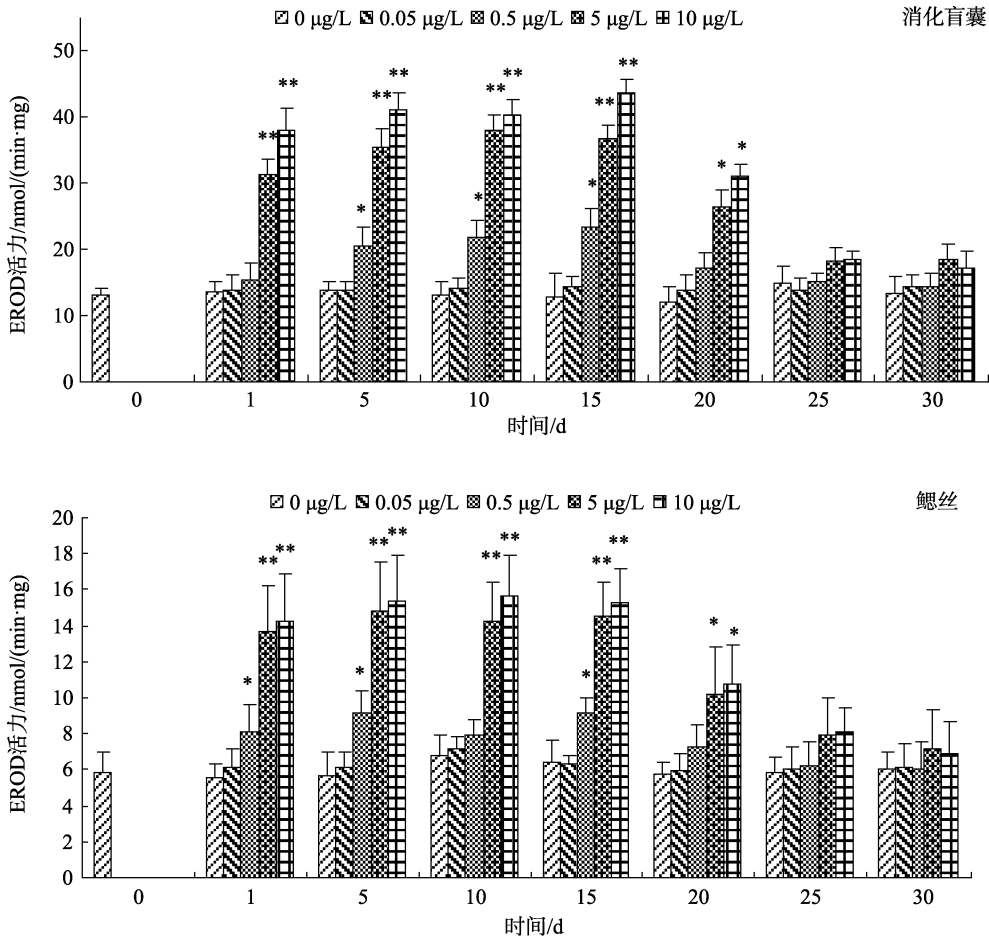


图1 不同浓度 B[a]P 对泥蚶组织 EROD 活力的影响

Fig. 1 Effect of B[a]P on EROD activities of tissues in *Tegillarca granosa*

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

(0.05µg/L)EROD 活力变化不大,而在 5 µg/L 和 10 µg/L 处理组 EROD 活力则被极显著诱导($P < 0.01$),5 d 后趋于稳定,表现出一定的剂量效应关系,但是有研究发现长期暴露在大剂量的 PAHs 的环境中,会破坏 CYP1A 的结构,导致 EROD 的活性下降^[15]。本实验中在清除阶段 EROD 活力在 5~10 d 即恢复到了对照组水平,表明 B[a]P 对泥蚶造成的损伤可以可逆的,未超出生物体的自我修复能力。鳃丝的 EROD 活力小于消化盲囊,可能是由于 B[a]P 在鳃丝积累程度和敏感度均较低。

研究表明,PAHs 进入生物体经过 I 相代谢,形成的中间产物可产生大量的活性氧物质^[16],GST 是 II 相代谢抗氧化酶的代表成分可催化中间代谢物的结合,使之形成水溶物排出机体外。一些研究表明^[17-18]生物受到 PAHs 胁迫时,GST 活力在低剂量短时间内会被诱导,但是长时间或者高剂量的胁迫下会呈下降趋势,表现出一定的时间效应和剂量,通过一定

时间的清除能够恢复对照组水平。从本实验结果来看,除低浓度组(0.05 µg/L)与对照物无明显差异,其他处理组与对照组差异显著($P < 0.05$)。清除阶段 0.5 µg/L 处理组 5 d 即与对照组无显著差异($P > 0.05$),而 5 µg/L 和 10 µg/L 处理组 10 d 时恢复至对照组水平,这与上述结果基本一致,但是各处理组未表现出先诱导后抑制的变化趋势,作者认为可能泥蚶对 B[a]P 的胁迫响应较为迅速,短时间内表现出被诱导效应(小于 24 h)。通过清除恢复处理,各实验组 5~10 d 即恢复正常水平,有些生物需要 15~20 d,才能完全恢复到正常水平,虽然不同生物对 PAHs 胁迫的响应略有差别,但均能有效的反应生物受胁迫、解毒和恢复的过程。

本实验的高浓度处理组 MDA 含量随时间一直呈上升趋势,在 10 d 后基本达到了峰值,这表明泥蚶受到 B[a]P 的胁迫后,GST 活力和抗氧化酶系统活力下降,不能被及时清除的活性氧物质对机体产生一定

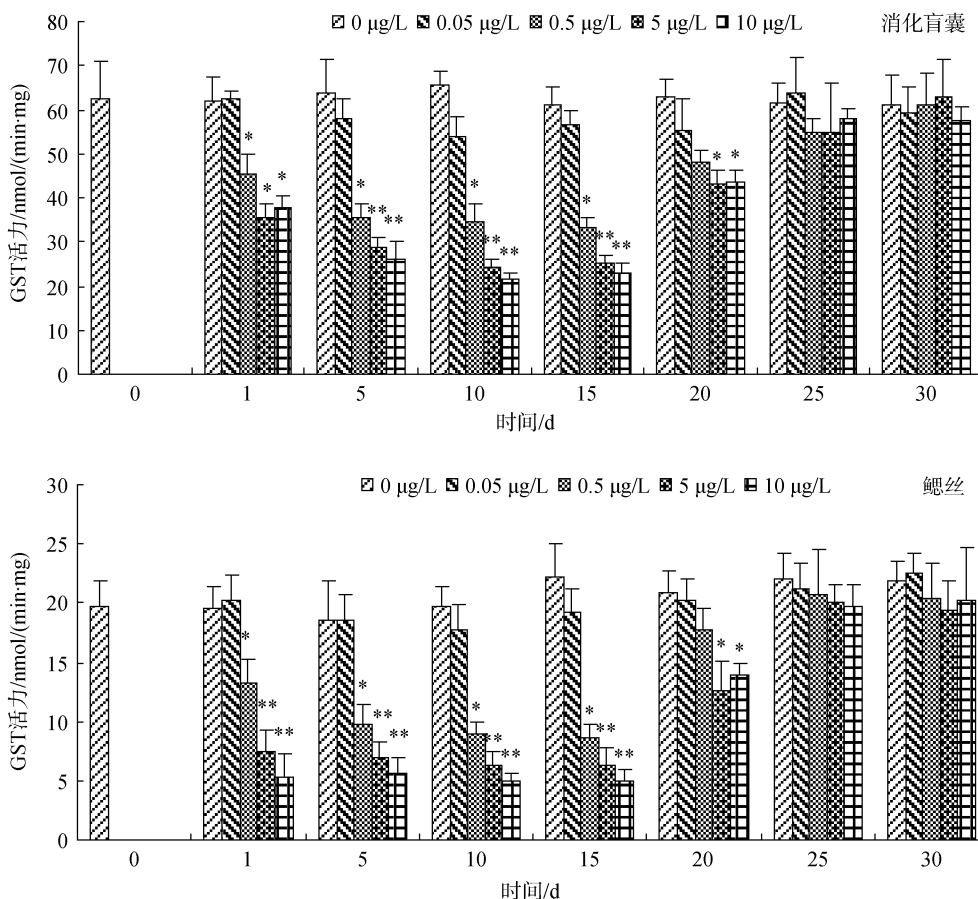


图2 不同浓度 B[a]P 对泥蚶组织 GST 活力的影响
 Fig. 2 Effect of B[a]P on GST activities of tissues in *Tegillarca granosa*
 * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$

的损伤, 泥蚶处于中毒状态。清除5~10 d后各处理组与对照无显著差异, 这与杨涛研究苯并(b)荧蒽对翡翠贻贝的胁迫结果相似^[7]。

3.2 EROD, GST 和 MDA 作为泥蚶解毒代谢指标的探讨

本实验中无论是 B[a]P 的胁迫阶段还是清除阶段, 泥蚶组织中 EROD、GST 和 MDA 含量都表现出很强的规律性。高浓度处理组 EROD 活力和 MDA 含量随着浓度的升高和胁迫时间的延长呈上升趋势, 但是在5~10 d左右会达到峰值, 而 GST 活力则明显被抑制, 5 d 达到最低值, 均具有一定的时间效应和剂量效应。这种效应关系在 Huang Zhouying^[19]利用 B[a]P 和 TBT 对蛤的胁迫研究, Kristin^{e[20]}利用 B[a]P 2 种鲶鱼的胁迫研究, 任加云^[18]利用苯并(a)芘和苯并(k)荧蒽混合物对栉孔扇贝的胁迫研究中得到了验证。研究表明, 生物在污染物的胁迫下, 组织细胞中的褐脂质小粒和过氧化物酶体密度变大, 从而导致

EROD 活力升高^[21]。本实验 5 μg/L 和 10 μg/L 处理组 5 d 后 EROD 活力达到峰值并趋于稳定, 这表明 EROD 活力被诱导达到极限, 而 XU Wenju^[22]研究表明, 超高剂量菲(Phen 100~400 μg/L)长时间胁迫罗非鱼(4 d 以上)会导致 EROD 活力诱导后被抑制, 泥蚶是否会在超高剂量的胁迫下 EROD 活力出现诱导后被抑制有待进一步认证。

GST 活力受到抑制表明, 当机体受到重度胁迫, 产生的氧化压力超过机体的调节能力时, 此时不能被及时清除的活性氧物质就会对机体产生一定的损伤, 抗氧化酶活力可能会下降^[23], 需氧生物的细胞膜磷脂分子不断受到氧化压力的攻击, 导致膜和脂质的过氧化。通过测定 MDA 含量能够有效评价脂质过氧化程度, 比较准确的反映 PHAs 对生物体的胁迫和自我解毒作用。

本研究选择的 EROD、GST 和 MDA 表现出较强的敏感性, 并且在海洋无脊椎动物的抗氧化防御系统已广泛用作污染检测的指标^[24-25]。但是泥蚶作为

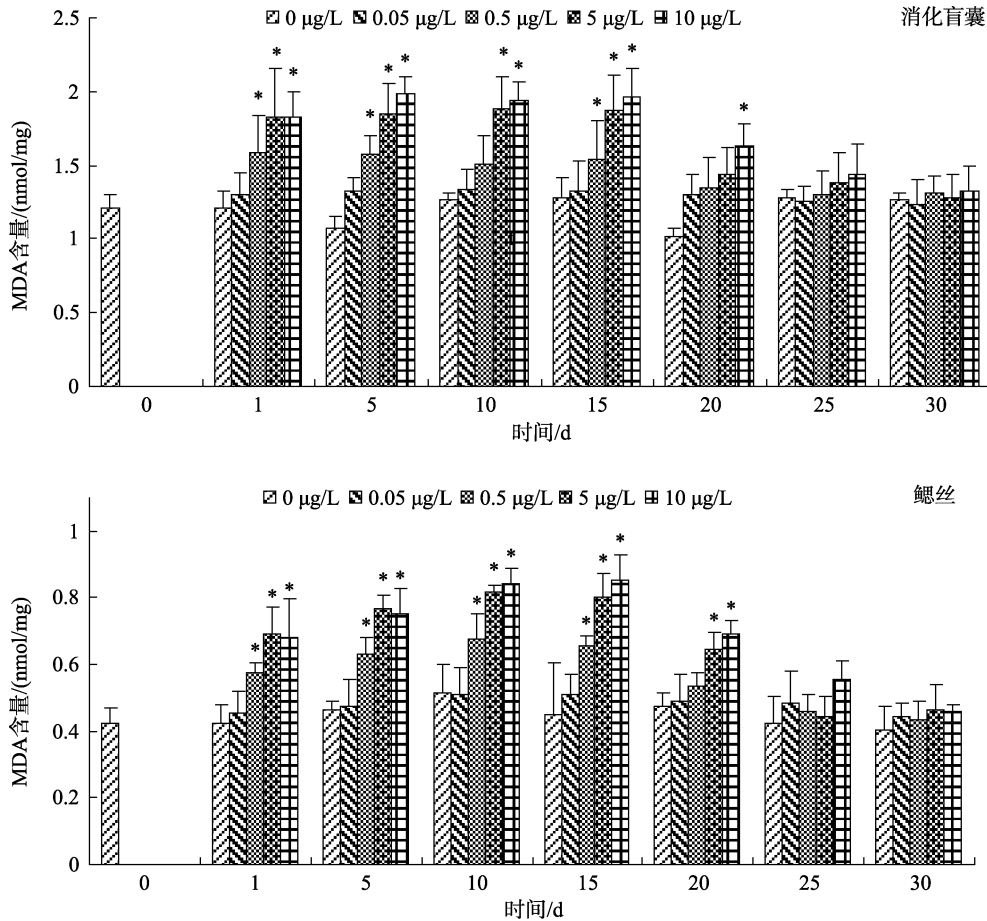


图3 不同浓度 B[a]P 对泥蚶组织 MDA 含量的影响

Fig. 3 Effect of B[a]P on MDA content of tissues in *Tegillarca granosa*

* $P < 0.05$

滩涂贝类的典型代表, 主要营埋栖生活, 不仅受海水中 PHAs 的影响, 可能还受到海洋沉积物中 PHAs 的影响, 因此要综合考虑两方面的因素进一步开展相关研究。

参考文献:

[1] 朱利中, 松下秀鹤. 空气中 PAHs 的研究现状[J]. 环境科学进展, 1997, 5: 19-29.

[2] 刘岩, 张祖麟, 洪毕生. 厦门西港表层海水中 PAHs 含量分布特征和来源进行分析[J]. 海洋通报, 1999, 18: 38-43.

[3] 江锦花. 近海海洋环境中多环芳烃的浓度水平及来源分析 [D]. 杭州: 浙江大学硕士学位论文. 2009.

[4] Au D WT, Wu R S S, Zhou B S, et al. Relationship between ultra-structural changes and EROD activities in liver of fish exposed to benzo[a]pyrene[J]. Environ Pollut, 1999, 104: 235-247.

[5] 王菊英, 霍传林, 韩庚辰. 多氯联苯 CB-28 对牙鲆肝脏中 EROD 活性的诱导作用研究[J]. 海洋学报, 2003, 25(增 2): 35-40.

[6] Goldberg E D. The Mussel Watch: a first step in global marine monitoring[J]. Mar Pollut Bull, 1975, 6: 111-120.

[7] 杨涛, 陈海刚, 蔡文贵, 等. 翡翠贻贝内脏团抗氧化酶活性及脂质过氧化物含量对苯并(b)荧蒽胁迫的生物响应研究[J]. 生态毒理学报, 2011, 6(5): 539-545.

[8] 潘鲁青, 刘娜. 栉孔扇贝在 B[a]P 胁迫下生物标志物筛选的研究[J]. 水生生物学报, 2012, 36(2): 299-306.

[9] Pohl R J, Serabjit-Singh C J. Hepatic microsomal naph-cytochrome P-450 reductase from little skate, *Raja erinacea*, comparison of thermo-lability and other molecular properties with a mammalian enzyme [J]. Chem Biol, 1983, 45: 283-294.

[10] Goksoyr A, Forlin L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring

- [J]. *Aquat Toxicol*, 1992, 22: 287-312.
- [11] David F V, Loannides L C. Cytochromes *P450* and species differences in xenobiotic metabolism and activation of carcinogen[J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(10): 633-640.
- [12] Bucheli T D, Kent K. Induction of cytochrome *P450* as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystem[J]. *Critical Review of Environmental Science Technology*, 1995, 52: 201-268.
- [13] Orkuma J C, Jiro K. Comparative study of bioconcentration and EROD activity induction in the Japanese flounder, red sea bream, and java medaka exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Environ Toxicol*, 2008, 23: 354-362.
- [14] 穆景利, 王新红, 王淑红, 等. 苯并(a)芘影响黑鲷肝脏 EROD 活性变化的动力学研究[J]. 2009, 33(1), 68-71.
- [15] Stegeman J J, Hahn M E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenase: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome *P450* in aquatic species[J]. Boca Raton: Lewis Publishers, CRC Press, 1994, 87-206.
- [16] Winsten G W, Thomas P. Prooxidant and antioxidant mechanisms in aquatic organisms[J]. *Toxicol*, 1991, 19: 137-161.
- [17] WANG Chonggang, ZHAO Ying, ZHENG Ronghui, et al. Effects of tributyltin, benzo[a]pyrene, and their mixture on antioxidant defense systems in *Sebastiscus marmoratus*[J]. *Environ Toxicol*, 2006, 65: 381-387.
- [18] 任加云, 潘鲁青, 苗晶晶. 苯并(a)芘和苯并(k)荧蒽混合物对栉孔扇贝毒理学指标的影响[J]. *环境科学学报*, 2006, 26(7): 1180-1186.
- [19] Zhouying Huang, Yixin Chen, Yang Zhao. Antioxidant responses in *Meretrix meretrix* exposed to environmentally relevant doses of tributyltin[J]. *Environ Toxicol*, 2005, 20: 107-111.
- [20] Kristine L W, Piero R G, Laila A. Lienesch. Comparative metabolism and excretion of benzo(a)pyrene in 2 species of lctalurid catfish[J]. *Toxicological Sciences*, 2000, 58: 68-76.
- [21] Krishnakumar P K, Casillas E, Varanasi U. Effect of chemical contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington. II Cytochemical detection of subcellular changes in digestive cells[J]. *Marine Biology*, 1995, 124: 251-259.
- [22] XU Wenju, LI Yuanyou, WU Qingyang. Effects of phenanthrene on hepatic enzymatic activities in tilapia [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 6: 854-857.
- [23] 王丽平, 郑丙辉, 孟伟. 环境污染物对水生生物产生氧化压力的分子生物标志物[J]. *生态学报*, 2007, 27(1): 380-388.
- [24] Brown R J, Galloway T S, Lowe D, et al. Differential sensitivity of three marine invertebrates to copper assessed using multiple biomarkers[J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 66(3): 267-278.
- [25] Gorinstein S, Moncheva S, Katrich E, et al. Antioxidants in the black mussel (*Mytilus galloprovincialis*) as an indicator of black sea coastal pollution[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2003, 46(10): 1317-1325.

Effect of Benzo[a]pyrene on two enzymes activity and lipid peroxidation MDA in *Tegillarca granosa*

XIAO Guo-qiang, ZHANG Jiong-ming, SHAO Yan-qing, CHAI Xue-liang,
WU Hong-xi, LIU Bo, FANG Jun, TENG Shuang-shuang

(Zhejiang Mariculture Research Institute, Zhejiang Key Laboratory of Exploitation and Preservation of Coastal Bio-resource, Wenzhou 325005 China)

Received: Jun., 8, 2013

Key words: Benzo[a]pyrene; *Tegillarca granosa*; digestive gland; gill; EROD; GST; MDA

Abstract: The effects of different concentrations of B[a]P (0.05、0.5、5 and 10 μ g/L) on EROD, GST and MDA in digestive gland and gills of *Tegillarca granosa* were studied during 15 days' exposure to B[a]P. After B[a]P exposure, *Tegillarca granosa* were transferred to fresh seawater to be cultivated for 15 days. The results indicated that the activity of EROD, GST and MDA content were significantly effected in the 0.5, 5 and 10 μ g/L groups ($P < 0.05$). EROD activity was induced while GST activity was inhibited until the fifth day. MDA content was rising with the treating time and arrived the peak, in the tenth day. All parameters were returned to the control level after 5-10 days' clearance phase in the fresh seawater. According to our studies, the changes of EROD and GST activity could reflect the body's detoxification metabolism ability. The MDA content showed dose-effect and time-effect relationships, which indicated B[a]P exerted toxic effects on *Tegillarca granosa* by way of oxidative damage.

(本文编辑: 康亦兼)