

研究简报

石油污染对梭鱼肝脏混合功能氧化酶影响的初步研究*

孙 凤 刘发义

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

海洋的石油污染是世界沿海国家普遍关心的问题,因此,国内外对于石油及其产品对海洋生物的影响,以及海洋石油污染的监测都非常重视,并进行了大量的研究。

混合功能氧化酶 (Mixed-function oxidase, MFO) 是存在于动物肝脏等组织细胞内质网上的多酶系统,它们能够催化羟化、加氧和脱烷基等多种类型的代谢反应,能够代谢芳烃和农药等外源有机物,把这类亲脂性的有毒化合物通过生物转化,变成极性强的易溶物质,使之易于排出体外,从而起到解毒作用。研究表明,有些外源化合物或者它们的代谢物对 MFO 酶系具有诱导效应^[4]。近年来,国外的科学家正在致力于研究利用 MFO 活性的变化来作为石油和农药等有机污染物的生物监测指标。目前研究较多的是利用鱼类肝脏的细胞色素 P-450 和芳烃羟化酶 (AHH) 作为石油污染的监测指标^[3,5,6]。

本文报道了梭鱼 (*Mugil so-iuy*) 生活于含石油的海水后,其肝脏 MFO 酶系中的 AHH 活性的变化,以作为探讨用 AHH 作为污染监测指标的可能性的第一步。

一、材料和方法

1. 含油实验海水的制备

称取约 0.48 g 胜利油田的原油,放入盛有 400 ml 海水的烧杯中,用 Jc 型超声波处理机(通化市超声设备厂)振荡 40 min,然后在室温下静置 1 h,用虹吸法取表层以下的海水作为母液,用紫外分光光度法测定其中的石油浓度,方法详见文献[1]。

将上述制得的母液,于 ϕ 30 cm 的玻璃圆缸内,用海水稀释至 15 000 ml; 稀释后海水中的石油浓度在 $0.13-0.16 \times 10^{-3}$ g/L 范围内(由母液中的浓度值计算得出)。

2. 实验动物

实验用梭鱼于 1986 年 10 月捕自青岛汇泉湾,平均体长为 9.8 cm。捕回的鱼先在清洁海水中暂养两天,然后移入玻璃圆缸中,用微型充气机充气。实验期间,每天投喂人工配合饵料一次,每天更换浓度基本相同的含油海水。分别于 1,3,5,7,14,21 和 28 d 后取样,每次取鱼 2 尾,测定其肝脏 AHH 活性。在最后一次取样时,同时取生活在未加石油

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1734 号。
收稿日期: 1988 年 5 月 30 日。

的海水中的鱼作为对照,按同样方法测定。

3. 酶活性测定

参照文献[7]和[8]的方法,将鱼活体解剖,取出肝脏迅速称重后置于冰浴中,加 10 倍体积 (V/W) 冰冷的缓冲液 (0.25 mol/L 蔗糖、0.05 mol/L Tris-HCl, pH = 7.5), 用玻璃匀浆器匀浆,然后以高速冷冻离心机于 4°C, 3 000 r/min (10 000 × g) 条件下离心 15 min, 上清液即为制得的粗酶液。

取一定量的粗酶液,加入所需试剂,使其中含有 50 μmol Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.5)、0.36 μmol NADPH 及 3 μmol MgCl₂, 然后加入 20 μl 二苯基噁唑 (PPO) 溶液 (10 μg PPO 溶解在 20 μl 甲醇中) 作底物使反应开始,反应液总体积为 1 ml, 于 37°C 保温 30 min, 保温期间不断振摇, 然后加入 1 ml 经冰浴冷却过的丙酮终止反应, 再加入 3.25 ml 正己烷充分混匀。取 1 ml 有机相,用 1 mol/L 的 NaOH 3 ml 萃取, 水相用日立 851 型荧光分光光度计测定,激发波长为 345 nm, 发射波长 532.5 nm。

对照反应是在加底物 PPO 之前先加 1 ml 丙酮,其它步骤与上述完全相同。

4. 蛋白质测定

粗酶液中的蛋白质含量用双缩尿法测定^[2]。

二、结果与讨论

梭鱼在含油海水中生活不同时间后,其肝脏 AHH 活性的测定结果示于表 1。从表中数据看出,梭鱼转移到含油海水中 1 d 后,其肝脏中 AHH 的比活性就有所上升; 3 d

表 1 石油污染对梭鱼肝脏 AHH 活性的影响

Tab.1 Induction of hepatic AHH activity in *Mugil so-inuy* by crude oil

暴露时间 (d)	对 照	1	3	5	7	14	21	28
荧光强度	1.10	2.25	8.92	10.20	7.82	7.40	9.06	9.50
蛋白质含量 (g/L)	1.83	2.90	2.52	2.20	1.60	1.50	1.85	1.96
AHH 比活性 ^①	0.60	0.77	3.56	4.64	4.89	4.93	4.90	4.85

① AHH 比活性以每毫克蛋白中的荧光强度表示。

后,比活性由 0.60 上升到 3.56, 增加了近 5 倍; 7 d 后差不多达到最高值; 以后的 20 多天中则基本不再增加, 维持在比较稳定的水平。可见梭鱼肝脏 AHH 对石油的反应非常灵敏。据文献报道, 黑面隆头鱼 (cunner) 暴露于石油 1—2 d 后, AHH 活性开始上升^[8]; 虹鳟和毛鳞鱼 (capelin) 则需暴露两周后, 其肝脏 AHH 的活性才开始上升^[7]。可见梭鱼肝脏 AHH 对石油的反应比虹鳟和毛鳞鱼快得多, 与黑面隆头鱼差不多。而水生无脊椎动物的 MFO 对石油的反应则更加迟钝, 如小头虫 (*Capitella capitata*) 暴露于石油 6 周后, 其 MFO 的活性仍然很低, 10 周后才比较高。

目前, 石油污染的监测比起重金属来要困难得多, 特别是生物体内的石油含量的测定更加困难, 一般对仪器设备和技术人员的技术要求都比较高, 给常规监测带来困难。梭鱼肝脏 AHH 对石油污染反应具有快速灵敏的特点, 为用其进行海洋石油污染的生物监测

提供了可能性,而且梭鱼是我国沿海广泛分布的鱼种之一,多生活在沿岸浅海或河口咸淡水处,适应性强,活动范围不大,易于捕捉和养殖,适于作为监测生物,因此对其肝脏混合功能氧化酶作进一步的研究将会更有意义。

关于 AHH 活性的测定,目前国际上应用较多的是以 3,4-苯并芘 (BP) 作底物,用荧光分光光度计测定其荧光产物 3-羟基苯并芘,但是苯并芘价格贵,也不易搞到;另外发现反应产物 3-羟基苯并芘不太稳定^[8],而且该产物和苯并芘都是强致癌物,对分析人员比较危险,用其进行常规监测很不利。Walton 等人^[8]曾用 PPO 作为底物代替苯并芘,证明是可行的。我们在本研究中用 PPO 作为底物也获得了成功。另外在大多数研究中都是以绝对单位,即每分钟每毫克蛋白中 3-羟基苯并芘的含量 (p mol) 来表示 AHH 的比活性,这要求对荧光分光光度计进行标定,比较麻烦。在本实验中,我们采用 Walton 等人的办法,用“每毫克蛋白的荧光强度”来进行 AHH 活性的相对比较,代替使用绝对单位,这就使得测定步骤大为简化,更适宜于进行常规分析和监测。

本文报道的只是石油原油对梭鱼肝脏 AHH 活性影响的初步研究,进一步的工作,包括石油诱导 AHH 的剂量-效应关系、被诱导而升高的 AHH 活性在清洁海水中的可恢复性、环境因子和生物本身的生理状态对这种诱导效应的影响、AHH 活性变化与生物生长发育的关系,以及对 MFO 酶系中其它酶成分的有关内容的研究等等,均有待于今后逐步开展,为利用 MFO 酶系进行石油污染的生物监测提供可靠的依据。

参 考 文 献

- [1] 《环境污染分析方法》编辑组, 1980. 环境污染分析方法. 科学出版社, 第 286 页。
- [2] 蔡武城、袁厚积主编, 1982. 生物物质常用化学分析方法. 科学出版社, 第 96 页。
- [3] Addison, R. F., 1984. Hepatic mixed function oxidase (MFO) induction in fish as a possible biological monitoring system. In *Contaminant Effects on Fisheries*, ed. by V. W. Cairns, A Wiley-Interscience Publication, pp. 51—60.
- [4] Kurclec, B., S. Britvic and M. Rijavec, et al. 1977. Benzo[a]pyrene monooxygenase induction in marine fish—molecular response to oil pollution. *Mar. Biol.* 44: 211—216.
- [5] Livingstone, D. R., 1985. Response of the detoxication/toxication enzyme systems of molluscs to organic pollutants and xenobiotics. *Mar. Pollut. Bull.* 16(4): 158—164.
- [6] Payne, J. F., 1976. Field evaluation of benzo[a]pyrene hydroxylase induction as a monitor for marine pollution. *Science* 191: 945—946.
- [7] Payne, J. F. and W. R. Penrose, 1975. Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petroleum. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 14: 112—116.
- [8] Walton, D. G., W. R. Penrose and J. M. Green, 1978. The petroleum-inducible mixed function oxidase of cunner (*Tautoglabrus adspersus* Walbaum): Some characteristics relevant to hydrocarbon monitoring. *J. Fish. Res. Board Can.* 35(12): 1547—1552.

INDUCTION OF HEPATIC MIXED-FUNCTION OXIDASE OF THE MULLET, *MUGIL SO-IUY* BY CRUDE OIL*

Sun Feng and Liu Fayi

(*Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao*)

ABSTRACT

Induction of hepatic aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) of the *Mugil so-iuy* captured from Bay Huiquan, Qingdao in 1986 by Shengli crude oil was studied. After 3-or 5-day's exposure in sea water with an oil concentration of $0.13-0.16 \times 10^{-3} \text{g/L}$, six or eightfold increase of the enzyme activity, in comparison with the uninduced control, was observed. After 7-day's exposure or longer, the specific activity of the enzyme reached maximum without obvious change. *Mugil so-iuy* is a shore-dwelling fish with a limited home range. It is therefore possible to use this organism to test the hepatic AHH activity as an indicator to monitor marine petroleum pollution.

* Contribution No.1734 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.