

• 研究简报 •

多氯联苯 (PCB₁₂₅₄) 对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 EROD、GST 酶活力的影响

任加云, 李树峰

(滨州学院 山东省黄河三角洲生态研究重点实验室, 山东 滨州 256600)

摘要: 研究了 4 种质量浓度 (0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1 $\mu\text{g/L}$ 、10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$) PCB₁₂₅₄ 暴露下, 栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 消化盲囊和鳃丝 7- 乙氧基 -3- 异吩唑酮 - 脱乙基酶 (EROD)、谷胱甘肽转移酶 (GST) 活力的变化。于实验开始后 0、0.5 d、1 d、3 d、6 d、9 d、15 d、21 d、30 d 取样测定, 结果显示, 除鳃丝 EROD 活力在低质量浓度 (0.5 $\mu\text{g/L}$ 和 1.0 $\mu\text{g/L}$) 随时间变化不明显 ($P>0.05$) 外, 其他各处理组 PCB₁₂₅₄ 对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝的 EROD 都具有明显的激活作用, 而且具有明显的剂量-效应关系。低浓度 (0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$) 处理下, 消化盲囊和鳃丝的 GST 活力都呈现激活的趋势, 而高浓度 (10 $\mu\text{g/L}$ 、50 $\mu\text{g/L}$) 下, GST 活力都呈现先上升后下降的趋势, 且鳃丝 GST 活力变化幅度较为明显。结果表明, EROD 和 GST 活力的变化在一定程度上能够反应 PCBs 对栉孔扇贝影响的规律性, 是合适的毒理学指标, 栉孔扇贝是比较好的评价多氯联苯污染的指示生物, 本研究也对栉孔扇贝对多氯联苯的生物转化机制作了初步的探讨。[中国水产科学, 2008, 15 (2): 342-346]

关键词: PCB₁₂₅₄; 栉孔扇贝; EROD; GST

中图分类号: X171

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737-(2008)02-0342-05

多氯联苯 (PCBs) 是较为常见的一类有机污染物, 由于其难以降解, 加上其高度的生物富集性, 已经引起了很多国内外学者的重视^[1-4]。当今, 关于鱼类受多氯联苯影响的研究较多^[3,5], 但是作为中国重要的经济型贝类栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 的研究却未见报道, 由于现在栉孔扇贝大规模死亡的现象时有发生, 所以污染物特别是多氯联苯对栉孔扇贝影响的研究具有重要的意义。

大多数有机污染物进入生物体内首先要经过生物转化, 而生物转化也需要两个过程, 首先经过相 I 阶段, 在这个阶段混合功能氧化酶系统 (MFO) 起着最关键的作用, 其中 7- 乙氧基 -3- 异吩唑酮 - 脱乙基酶 (EROD) 的反应更具有代表性, 因此被用于监测水质对于水产动物生理影响的指标^[5-6], 经过相 I 阶段后, 代谢物再和相 II 阶段的酶系结合, 起到一定的解毒作用, 谷胱甘肽转移酶 (GST) 能催化 GSH 与各种内源性和外源性亲电子化合物反应, 生成无毒或毒性小的水溶性化合物, 易于排除体外, 起到脱毒作用。

本实验研究了比较常见的多氯联苯 PCB₁₂₅₄ 对栉孔扇贝 EROD 和 GST 活性的影响, 以揭示其影

响下栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 EROD 和 GST 的变化规律, 从而确定合适的毒理学评价指标, 旨在探讨栉孔扇贝对 PCBs 的生物转化机制, 为对贝类毒理学的研究有较好的补充作用。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用栉孔扇贝于 2006 年 4 月购自青岛太平角养殖场, 壳高 (6.0 $\pm$ 0.5) cm。采用青岛近海的自然海水暂养栉孔扇贝 10 d, 盐度为 30, pH 8.0, 温度 12~13 $^{\circ}\text{C}$, 连续充气, 日换水 1/3~1/2, 养殖密度为 320 个/ m^3 , 并投喂螺旋藻粉, 平均日投饵量为贝类软体部湿体质量的 6‰。

1.2 方法

1.2.1 实验梯度的设置 实验用 PCB₁₂₅₄ 购自 Fluka 公司, 首先用一定量 3 $\mu\text{L/L}$ 的丙酮 (助溶剂) 溶解 PCB₁₂₅₄, 配成一定浓度的储备液, 实验时分别用自然海水配制为 0.5 $\mu\text{g/L}$ 、1.0 $\mu\text{g/L}$ 、10.0 $\mu\text{g/L}$ 、50.0 $\mu\text{g/L}$ 各浓度梯度, 分别以不加入 PCBs 和只加入 3 $\mu\text{L/L}$ 丙酮的自然海水处理组作为对照组, 所有实验梯度均设 3 个平行组。实验期间, 每 2 天测定各处理

收稿日期: 2007-07-20; 修订日期: 2007-10-07.

基金项目: 滨州学院青年人才创新工程项目资助 (BZXYQNLG200505).

作者简介: 任加云 (1980-), 男, 硕士, 从事养殖环境毒理学研究. E-mail: renjiayun@163.com

组水体中 PCB₁₂₅₄ 含量, 经过分析 PCB₁₂₅₄ 水中实际浓度分别为 $(0.52 \pm 0.09) \mu\text{g/L}$ 、 $(1.20 \pm 0.06) \mu\text{g/L}$ 、 $(9.75 \pm 0.20) \mu\text{g/L}$ 、 $(45.65 \pm 2.73) \mu\text{g/L}$ 。

实验在 $50 \text{ cm} \times 40 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ 的塑料水槽内进行, 各实验组分别放活力强的栉孔扇贝各 36 只, 实验期间的养殖管理与暂养期间完全相同, 换水时分别加入相对应各实验梯度的养殖用水, 实验期间, 除高浓度 PCBs ($1.0 \mu\text{g/L}$ 和 $50.0 \mu\text{g/L}$) 处理组的栉孔扇贝有个别死亡现象和活力不强外, 其他处理组均无死亡现象。实验开始后于 0 d、0.5 d、1 d、3 d、6 d、9 d、15 d、21 d、30 d 取样。取样时每个平行组取 3 只规格相同的扇贝, 分别取其消化盲囊和鳃丝, 用预冷重蒸水洗净、滤纸吸干后, 置于 1.5 mL 离心管中。所有样品取样后 24 h 内迅速测定。

测定前将消化盲囊和鳃丝置 pH 7.7, 温度为 4°C 的磷酸盐缓冲液 ($0.125 \text{ mol/L Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} + 0.125 \text{ mol/L KH}_2\text{PO}_4 + 0.05 \text{ mol/L Na}_2\text{EDTA}$) 在冰浴中 ($0 \sim 4^\circ\text{C}$) 匀浆 3 min, 转速为 12 000 r/min, 然后将匀浆液在 10 000 r/min 离心 20 min (4°C), 取上清液作为酶液样品以测定 EROD 和 GST 的活力。

1.2.2 酶活力和蛋白浓度的测定 EROD 活力的测定参照 Pohl 等^[7] 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 9-羟基-3-异吩唑酮 (resorufin) 相对量的多少来表示, 单位为 $\text{nmol}/[\text{min} \cdot \text{mg}(\text{protein})]$; GST 活力测定根据 Habig 等^[8] 的测定方法稍加改进, 匀浆与反应均用 0.05 mol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 7.0), 15 mmol/L 2,4-二硝基氯苯 (CDNB) (95% 乙醇溶解) 与 15 mmol/L 谷胱甘肽 (GSH) 在使用时现配, 反应系统为缓冲液 2 mL, H_2O 400 μL , CDBN 200 μL , GSH 200 μL , 样品 200 μL , 对照用 H_2O 代替 GSH, 利用分光光度计在 340 nm 处连续读数 120 s。酶活力用每分钟每毫克蛋白催化产生的 2,4-二硝基苯谷胱甘肽 (2,4-dinitrophenyl glutathione) 的 nmol 量来表示, 单位为 $\text{nmol}/[\text{min} \cdot \text{mg}(\text{protein})]$ 。

蛋白含量用 Bradford 的 G-250 染色法^[9] 测定。

1.3 数据的处理和分析

所有数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{X} \pm \text{SD}$) 表示, 并采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 检验法统计分析。

2 结果与分析

2.1 丙酮作为 PCBs 助溶剂的可行性

实验结果显示, 丙酮处理组栉孔扇贝组织 EROD、GST 活力与空白对照组相比变化不显著 ($P > 0.05$), 由此避免了因为使用助溶剂而导致 PCBs 毒性的改变, 这样可以单一比较 PCB₁₂₅₄ 对栉孔扇贝组织 EROD 和 GST 活力的影响。

2.2 PCB₁₂₅₄ 对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 EROD 活力的诱导程度

由图 1、图 2 看出, 除鳃丝 EROD 活力在低浓度 ($0.5 \mu\text{g/L}$ 和 $1.0 \mu\text{g/L}$) 随时间变化不明显 ($P > 0.05$) 外, 其他各处理组 EROD 活力明显被激活 ($P < 0.05$), 而且具有剂量-效应关系, 同浓度同时间下, 消化盲囊的 EROD 的激活程度比鳃丝高, 且同浓度下与对照组相比活力变化较为明显 ($P < 0.05$), 在 $50 \mu\text{g/L}$ 处理组中, 消化盲囊 EROD 活力相比对照组增高了 5 倍。

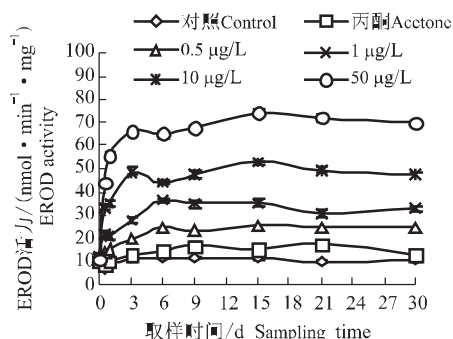


图 1 PCB₁₂₅₄ 对栉孔扇贝肝胰脏 EROD 活力的影响

Fig.1 Effects of PCB₁₂₅₄ on EROD activity of digestive gland

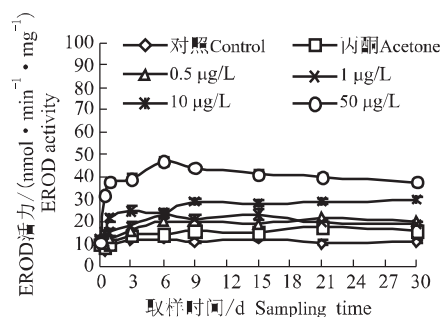


图 2 PCB₁₂₅₄ 对栉孔扇贝鳃丝 EROD 活力的影响

Fig.2 Effects of PCB₁₂₅₄ on EROD activity of gills

2.3 PCB₁₂₅₄对栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝GST活力的影响

栉孔扇贝消化盲囊和鳃丝 GST 活力的变化如图3、图4所示,低浓度组(0.5 μg/L 和 1 μg/L)的消化盲囊 GST 活力随时间呈现激活的趋势($P<0.05$),而2个高浓度组(5 μg/L, 50 μg/L)都呈现先上升后降低的趋势,而且在6 d之后明显低于对照组的水平($P<0.05$)。低浓度组鳃丝 GST 活力也呈现激活的趋势,而1 μg/L 处理组在取样后期出现下降趋势,而且在30 d左右接近于对照组水平,鳃丝两高浓度组 GST 在24 h内呈现瞬间激活的现象,而随后明显下降并且低于对照组的水平,从9 d后,50 μg/L 处理组的 GST 的活力明显低于10 nmol/(min·mg Protein)。

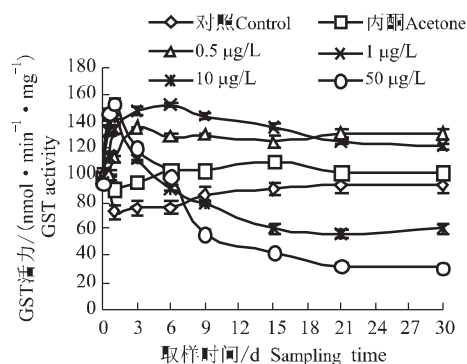


图3 PCB₁₂₅₄对栉孔扇贝消化盲囊GST活力的影响

Fig.3 Effects of PCB₁₂₅₄ on GST activity of digestive gland

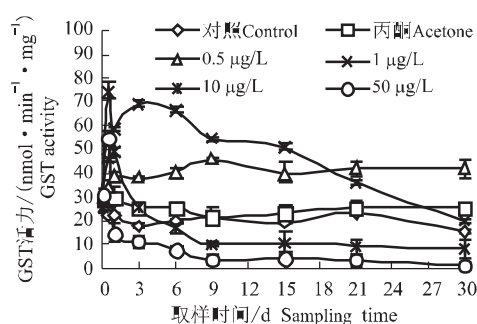


图4 PCB₁₂₅₄对栉孔扇贝鳃丝GST活力的影响

Fig.4 Effects of PCB₁₂₅₄ on GST activity of gills

3 讨论

3.1 EROD、GST作为PCB₁₂₅₄评价指标的可行性探讨

本研究根据以往研究其他有机污染物的方

法^[6],选取 EROD 和 GST 这两种具有代表性的生物转化酶进行研究,以确定合适的评价指标。EROD 依赖于细胞色素 P450,存在于细胞膜上,有人认为 EROD 的活性越大,污染物潜在的毒性和致癌危险性越高^[6,10],许多研究者已经发现鱼类在一些有机污染物影响下,可以大幅度地提高 EROD 的活力^[5-6], EROD 的激活可以作为某污染物致毒效应的重要标志。研究发现,消化盲囊 EROD 活力在较低浓度的 PCBs 就能表现出明显的激活,且呈现出明显的剂量效应关系,而且随取样时间 6d 后各浓度 EROD 活力都趋于稳定,表现出了生物机体在不同时间不同浓度下的解毒状态, EROD 随时间变化表现出了明显的规律性。鳃丝的 EROD 活力变化相对于消化盲囊来说变化不明显,只有在高浓度才出现激活现象, EROD 活力相对于消化盲囊要低,一方面可能是由于鳃丝 EROD 在解毒方面的惰性;另一方面 PCBs 在鳃丝积累程度较低。随后各浓度处理下, EROD 活力表现较为稳定,作者认为,由于 PCBs 过多的积累,此段过程很可能是生物体对于毒物的一段耐受临界状态,具体机理尚待进一步的研究。

在较多的研究中,某些海区污染会造成水产动物 GST 活力的升高^[11-13];也有人发现在高程度污染的情况下, GST 活力会降低^[14]。从本实验结果来看,低浓度组消化盲囊和鳃丝的 GST 活力都被激活(除鳃丝 1 μg/L 组外),高浓度组处理下消化盲囊和鳃丝的 GST 活力都呈现先激活后抑制的现象,而且鳃丝的 GST 活力下降幅度较高,说明了鳃丝对毒物的敏感程度要高于消化盲囊;从另一方面说明了栉孔扇贝在低浓度下能够提高组织中的 GST 活力以强化 GSH 与毒物的结合能力;而高浓度组处理下栉孔扇贝在短期内能够催化 GSH 解毒,但是由于毒物在组织中的积累过多难以代谢反过来抑制了 GST 活力,此时栉孔扇贝可能是其他更有效的解毒途径正在起作用,例如抗氧化酶^[6]。由于本实验中,两组织的 GST 活力在不同浓度不同时间下都表现出不同的激活和抑制程度, GST 活力反映了毒物对于栉孔扇贝的致毒程度和栉孔扇贝的解毒过程,是一个合适的评价 PCBs 毒性的指标。

3.2 PCB₁₂₅₄的对栉孔扇贝的致毒机理和各指标的相互关系

已有研究表明,当紫贻贝(*Mytilus edulis* L.)在污染物的影响下,组织细胞中的褐脂质小粒和过氧化

物酶体密度都变大,由此导致了 EROD 活力的升高^[15-16],在本实验中, EROD 活力处于一个激活状态(除鳃丝低浓度下),说明了细胞中过氧化物酶体(微体)数量不断增以代谢进入机体的 PCBs,而稳定后的状态意味着细胞产生微体的能力受到抑制,即不能无限制地产生新的微体,意味着细胞的耐受性已经到了极限,细胞受到了损伤,从侧面也说明了有害代谢产物例如活性氧的大量积累^[6];从 GST 的活力变化来看,高浓度下 GST 活力都最终被抑制,也说明了生物机体解毒能力已达到极限,此时扇贝活力下降,鳃丝成黑褐色,机体正常生理机能受到了影响。由于生物转化后的代谢物还需要其他抗氧化系统的代谢,所以过多的代谢物可能也会导致抗氧化系统的崩溃^[17-18],结合本实验的结果也可以看出 EROD 和 GST 在解毒过程中密不可分的关系。

栉孔扇贝的解毒系统本身是一个相互联系和复杂的系统^[6,18],生物转化中的 EROD 活力的大幅度升高,或者抗氧化酶和 GST 活力的显著被抑制,都能够反映生物体的被致毒的状态,所以通过测定这几种酶在污染物影响下的活力变化,可以用来评价污染物的毒性和生物体的受伤害程度。另外 PCBs 首先经过水流通过鳃丝,再经过其他各组织器官,虽然此时鳃丝并不积累大量的污染物,但是还是有少量的 PCBs 经过鳃丝表皮进入内部,超出了鳃丝的解毒能力呈现出 GST 活力在高浓度下基本失活的现象,相反,消化盲囊的 EROD 激活程度较大,说明大部分毒物主要在其中积累代谢,反映了其高效的解毒能力,这和作者先前对甲壳类动物的研究结论基本一致^[6,19],但是这种解毒能力最终会受到毒物浓度升高的限制,到了一定程度,污染物的致毒作用大于栉孔扇贝的解毒作用,造成机体损伤,乃至个体死亡,所以栉孔扇贝作为一种海水养殖的常见种类,是比较敏感的指示生物。

参考文献:

- [1] 聂湘平. 多氯联苯的环境毒理研究动态[J]. 生态科学, 2003, 22(2): 171-176.
- [2] 储少刚, 徐晓白, 童逸平. 多氯联苯在典型污染地区环境中的分布及其环境行为[J]. 环境科学学报, 1995, 15: 42-43.
- [3] 聂湘平, 张凤君, 蓝崇玉. 多氯联苯对斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 毒性及其组织结构的影响[J]. 生态科学, 2004, 23(2): 106-109.
- [4] Richard H M E., Wouter Z, Cor A S, et al. Effects of PCB126 and Cadmium on the Anaerobic Metabolism of the Mussel *Mytilus edulis* L. [J]. *Com Biochem Physiol*, 1996, 113(2)C: 267-272.
- [5] 王菊英, 霍传林, 韩庚辰, 等. 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: 35-40.
- [6] Luqing P, Jiayun R, Jing L. Effects of benzo(k)fluoranthene exposure on the biomarkers of scallop *Chlamys farreri* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2005, 141 (C): 248-256.
- [7] Pohl R J, Fouts J R. *Anal, Biochem*, 1980, 107, 150-155.
- [8] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *J Biol Chem*, 1974, 249: 7 130-7 139.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [10] Deena M W, Erin E S, Richard T D G. Effects of single and combined exposures to benzo(a)pyrene and 1,3',4',5-pentachlorobiphenyl on EROD activity and development in *Fundulus heteroclitus* [J]. *Mar Environ Res*, 2002, 54: 279-283.
- [11] Sheehan D, Crimmins K M, Burnell G M. Evidence for glutathione S-transferase activity in *Mytilus edulis* as an index of chemical pollution in marine estuaries [M] // Jeffrey D W, Maden B. *Bioindicators and environmental management*. London: Academic Press, 1991: 419-425.
- [12] Fitzpatrick P J, Sheehan D, Livingstone D R. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution [J]. *Mar Environ Res*, 1995, 39: 241-244.
- [13] Ben T G G., Colin F M, Ron M S, et al. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *Mar Environ Res*, 2002, 54: 169-177.
- [14] Akcha F, Izuel C, Venier P, et al. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis* [J]. *Aquat Toxicol*, 2000, 49: 269-287.
- [15] Krishnakumar P K, Casillas E, Varanasi U. Effect of environmental contaminants on the health of *Mytilus edulis* from Puget Sound, Washington, USA. I. Cytochemical measures of lysosomal responses in the digestive cells using automatic image analysis [J]. *Mar Ecol Progr Ser*, 1994, 106: 249-261.

- [16] Krisknakumar 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]. Mar Biol, 1995, 124: 251-259.
- [17] Van Ommen B, Ploemen J H, Bogaards J J, et al. Irreversible inhibition of rat glutathione S-transferase 1-1 by quinones and their glutathione conjugates. Structure-activity relationship and mechanism[J]. Biochem J, 1991, 276: 661-666.
- [18] Luqing P, Jiayun R, Jing L. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo(a)pyrene and benzo(k)fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys ferrari*[J]. Environ Poll, 2006, 141: 443-451.
- [19] 潘鲁青, 任加云, 吴众望. 重金属离子对中华绒螯蟹肝胰脏和鳃丝 SOD, CAT 活力的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2004, 34(2): 189-194.

Effects of polychlorinated biphenyls 1254 (PCB₁₂₅₄) on two enzyme activity of biotransformation in digestive gland and gills of scallop *Chlamys ferrari*

REN Jia-yun, LI Shu-feng

(Key Laboratory of Research Center for Eco-environmental Sciences of Yellow River Delta, Binzhou University of China Binzhou 256603, China)

Abstract: The effects of different concentrations of PCB₁₂₅₄ (0.5 µg/L, 1.0 µg/L, 10.0 µg/L, 50.0 µg/L) on EROD, GST in digestive gland and gills on scallop *Chlamys ferrari* were studied. Three replicates were designed for each treatment. The sampling time was at 0 d, 0.5 d, 1 d, 3 d, 6 d, 9 d, 15 d, 21 d and 30 d respectively. The gills and digestive gland were placed under -20 °C for following measurement. The results showed that EROD activity increased significantly ($P < 0.05$) in digestive gland and gills except that in gills of 0.5 µg/L and 1.0 µg/L groups, the EROD activity and PCB₁₂₅₄ had effect-dose relationship in digestive gland. GST activity increased in two tissues in low concentrations groups, but it was restrained in high concentrations groups. The GST activity changed more distinctly in gills than in digestive gland. The results indicated the changes of EROD and GST activities could reflect the effects of PCB₁₂₅₄ on scallops, and EROD and GST were suitable biomarkers to evaluate the toxicity of PCB₁₂₅₄. The scallop *Chlamys ferrari* was a suitable aquatic animal to evaluate PCB₁₂₅₄ pollution effects. The biotransformation mechanisms of *Chlamys ferrari* were discussed in this paper. [Journal of Fishery Sciences of China, 2008, 15 (2): 342-346]

Key words: polychlorinated biphenyls; *Chlamys ferrari*; EROD; GST