

文章编号: 1000- 0615(2001)02- 0156- 05

# 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏芳烃羟化酶活性的影响

冯 涛<sup>1</sup>, 郑微云<sup>1</sup>, 洪万树<sup>2</sup>, 张其永<sup>2</sup>

(1. 厦门大学环境科学研究中心, 福建 厦门 361005; 2. 厦门大学海洋系, 福建 厦门 361005)

摘要: 研究了苯并(a)芘(BaP)胁迫下大弹涂鱼肝脏芳烃羟化酶(AHH)活性的变化, 结果显示: BaP 对大弹涂鱼肝脏 AHH 活性总体表现为显著的诱导作用( $P < 0.01$ ), 其中 BaP 暴露的浓度及时间是影响 AHH 活性的重要因素。0.05 mg#L<sup>-1</sup>浓度的 BaP 暴露对 AHH 活性无显著影响, 而 0.2 mg#L<sup>-1</sup>和 0.5 mg#L<sup>-1</sup>浓度组 AHH 活性则显著被诱导( $P < 0.01$ )。随着暴露时间的延长, 0.2 mg#L<sup>-1</sup>浓度组 AHH 活性被显著诱导( $P < 0.01$ ), 而 0.5 mg#L<sup>-1</sup>组 AHH 活性则相对稳定。对 AHH 活性变化的剂量-效应关系进行回归分析的结果表明, 0.5 mg#L<sup>-1</sup>浓度组暴露 7d 时, AHH 活性受到一定程度的抑制。污染解除后, 0.5 mg#L<sup>-1</sup>浓度组 AHH 活性显著降低, 恢复至与对照组相近, 表明大弹涂鱼肝脏仍具有较强的生理调节机能, 同时也表明 AHH 活性可及时反映环境中 BaP 的水平。以上这些结果表明 AHH 适于作为大弹涂鱼受 BaP 胁迫的生物指标。

关键词: 苯并(a)芘; 大弹涂鱼; 芳烃羟化酶

中图分类号: X 171.5 文献标识码: A

## Effects of benzo(a)pyrene exposure on aryl hydrocarbon hydroxylase activities in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris*

FENG Tao<sup>1</sup>, ZHENG Weiyun<sup>1</sup>, HONG Wan2shu<sup>2</sup>, ZHANG Qiyong<sup>2</sup>

(1. Environmental Science Research Center, Xiamen University, Xiamen 361005, China;

2. Oceanography Department, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Changes of aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH) activities in the liver of *Boleophthalmus pectinirostris* with benzo(a)pyrene(BaP) exposure were detected in experimental condition. The results showed that the activities of AHH were significantly induced by BaP ( $P < 0.01$ ). Factors including BaP concentration and exposure time had important effect on AHH activities. The activities of AHH decreased to the control level after BaP was removed. It turned out that the physiological modulatory mechanism was still exist in the liver of *B. pectinirostris* and the activities of AHH could reflect the level of BaP in the environment. All of the results showed that AHH was suitable to be the bioindicator of BaP exposure.

Key words: Benzo(a)pyrene (BaP); *Boleophthalmus pectinirostris*; aryl hydrocarbon hydroxylase(AHH)

苯并(a)芘(BaP)是一种强致癌性的多环芳烃, 广泛存在于受污染的海洋环境中。早期对 BaP 的研究主要集中于 BaP 暴露与终反应——癌变的发生或肿瘤的形成之间的相关性研究。随着对 BaP 在动物体内的代谢过程及其致毒机理的研究, 发现 BaP 进入动物体内后首先进行生物转化, 形成多种中间代谢

收稿日期: 20000214

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(49876029)

第一作者: 冯 涛(1969-), 女, 河南濮阳人, 博士, 主要从事海洋生态毒理学研究。Tel: 05922186416, E-mail: wyzheng@jingxian.

产物, 这些中间代谢产物多为活性极高的亲电化合物, 可与生物体内的大分子如蛋白质、核酸等相互作用, 造成多种类型的损伤。

包括 BaP 在内的许多污染物在体内进行生物转化首先要经过第一阶段解毒酶——细胞色素 P2450 加单氧酶的作用, 该酶是由细胞色素 P2450、NADPH2 细胞色素 P2450 还原酶及磷脂质三种成份组成的多酶系统, 可以代谢多种类型的底物, 包括各种药物、致变物、致癌物、有毒化合物、杀虫剂等不同的外源化合物<sup>[1]</sup>。芳烃羟化酶(AHH) 属于细胞色素 P2450 多酶系统中的一种, 其主要作用底物为包括 BaP 在内的芳香烃类化合物。

研究表明, 细胞色素 P- 450 酶系的一个重要特征是其活性可被多种环境污染物诱导<sup>[1]</sup>, 因此检测这种诱导作用并用作指标来反映环境污染物对生物的影响成为分子生态毒理学研究的重要方面, 一些指标如 EROD、AHH 等已成为较稳定可靠的分子生态毒理学监测指标, 广泛应用于石油、农药等有机污染物的监测<sup>[2- 5]</sup>。但这些研究多数集中于环境中混合污染物的影响, 对于单一污染物暴露下 P2450 酶系诱导的时间效应和剂量效应特征的研究较少<sup>[6]</sup>。

本实验试图通过对暴露于不同浓度 BaP 的大弹涂鱼肝脏 AHH 活性变化的研究, 了解 BaP 对 AHH 活性诱导作用的时间效应和剂量效应特征, 探讨 BaP 的致毒机理及以 AHH 作为 BaP 暴露生物指标的可能性。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

实验仪器采用 Hitachi 850 型荧光分光光度计, Beckman J2MC 型冷冻离心机。

苯并(a) 芘为 Sigma 公司产品; NADPH 为上海伯奥生物科技有限公司产品。

### 1.2 实验鱼和曝污条件

苯并(a) 芘先用少量丙酮溶解, 再配制成一定浓度的储备液, 避光于 4e 保存。实验前将储备液用清洁海水稀释为  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  和  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  三个不同的浓度组, 分别置于直径为 50 cm, 高为 50 cm 的陶瓷缸中, 每缸海水体积 40 L。对照组海水中加入与污染组相同体积的丙酮。

实验用鱼大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*), 捕自福建省福清海域, 平均体长为  $(12.8 \pm 1.0) \text{ cm}$ , 平均体重为  $(15.05 \pm 3.4) \text{ g}$ , 放在室内饲养。实验鱼先在清洁海水中暂养 3d, 然后分别放入上述几个浓度的海水中, 每组设两个平行样。实验期间, 用微型充气机连续充气, 每天更换相同污染浓度的海水, 其间投喂藻类; 水温基本稳定在  $(20 \pm 2) \text{ e}$ 。

### 1.3 取样和样品预处理

分别于曝污后第 3、7 天取样, 每次每组取鱼 6 尾, 活体解剖, 取出肝脏, 迅速冷冻于液氮中。测定时, 从液氮中取出肝脏, 称重后置于冰浴中, 加 10 倍体积(w/v)  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  (pH 7.6) 预冷的缓冲液, 冰浴匀浆, 4e 冷冻离心 ( $15\ 000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 20 min), 取上清液, 立即测定 AHH 活性。每次取样的同时, 取 6 条未曝污的鱼作为对照。

### 1.4 酶活性测定

参照文献[7]的方法, 总体积为 1 mL 的反应混合物中含一定量的上清液, 50Lmol Tri2HCl 缓冲液, pH 7.5, 0.36Lmol NADPH, 3Lmol MgCl<sub>2</sub>, 最后加入 20LL 二苯基 唑(PPO) 溶液(10Lg PPO 溶解在 20LL 甲醇中)作底物使反应开始, 于 37e 保温 30min; 加入 1mL 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  $1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 3mL 萃取, 取水相测定, 激发波长为 345 nm, 发射波长为 510 nm。

酶活力单位(U) 表示为每毫克蛋白的荧光强度。

### 1.5 蛋白质含量测定

上清液中的蛋白含量用 Forlin2 酚法测定<sup>[8]</sup>, 以牛血清白蛋白作为标准蛋白。

## 1.6 数据处理

实验数据用统计学方法进行处理。所给的结果均为平均数±标准误差(Mean±SDE);用单因素方差分析方法分析苯并(a)芘曝污引起的差异;组间数据的两两比较采用单尾t2检验法;用回归方法分析污染的剂量2效应关系,以相关系数表示相关的密切程度。

## 2 结果

### 2.1 不同 BaP 暴露浓度对 AHH 活性的影响

对实验数据进行单因素方差分析的结果见表1。在本实验剂量范围内, BaP 对大弹涂鱼肝脏 AHH 活性总的表现为显著的诱导作用( $P < 0.01$ )。用t-检验法对各组数据进行两两比较的结果表明,不同浓度组之间 AHH 活性与对照组相比有很大差异。0.05mg#L<sup>-1</sup>浓度组大弹涂鱼肝脏 AHH 活性与对照组相比无显著差异,而0.2mg#L<sup>-1</sup>和0.5 mg#L<sup>-1</sup>浓度组 AHH 活性则显著升高( $P < 0.01$ ),0.2 mg#L<sup>-1</sup>浓度组 AHH 活性在第3天、7天分别为对照组的3.22、13.91倍,0.5 mg#L<sup>-1</sup>浓度组 AHH 活性则分别为7.18、9.24倍,表明在一定浓度范围内, BaP 可显著诱导大弹涂鱼肝脏 AHH 水平。AHH 活性的最大值在0.2 mg#L<sup>-1</sup> BaP 浓度组暴露第7天时,为每毫克蛋白荧光强度为14.05。

表1 BaP 对大弹涂鱼肝脏 AHH 活性的影响

Tab.1 Effects of BaP exposure on activities of AHH in the liver of *B. pectinirostris*

天数	对照组	0.05mg#L <sup>-1</sup>	0.2mg#L <sup>-1</sup>	0.5mg#L <sup>-1</sup>	单因素方差分析
3d	1.37±0.42	1.84±0.34	4.41±1.02 <sup>a</sup>	9.83±4.35 <sup>a</sup>	**
7d	1.01±0.27	0.95±0.35	14.05±3.59 <sup>a,b</sup>	9.33±5.26 <sup>a</sup> (2.00±1.11 <sup>b</sup> )	**

注: a 表示处理组与对照组间的显著差异,  $P < 0.01$ ; b 表示相邻两个时间点相比差异显著,  $P < 0.01$ ; () 内的数据表示暴露3d再移入清洁海水4d后的 AHH 活性; \*\* 表示单因素方差分析差异极显著,  $P < 0.01$ 。表内数据为平均数±标准误差,  $n = 6$ 。酶活力单位(U)表示为每毫克蛋白的荧光强度。

对 BaP 暴露后大弹涂鱼肝脏 AHH 活性变化的剂量2效应关系进行回归分析(图1),结果表明,暴露3d时, AHH 活性随 BaP 浓度的增加而升高,并表现出线性剂量2效应关系,其相关方程为  $y = 17.23x + 1.13$ , 相关系数  $R^2 = 0.997$ , 该剂量2效应关系是一种理想的模式, AHH 活性反映了 BaP 浓度的变化;暴露7d时, AHH 活性随 BaP 浓度的增加表现为抛物线型剂量2效应关系,其相关方程为  $y = -162.34x^2 + 101.92x - 0.9$ , 相关系数  $R^2 = 0.898$ , 这种剂量2效应关系则是一种较为复杂的模式,以抛物线最高点为界,前部上升部分依然表现了 AHH 活性的诱导作用,最高点则表明这种诱导作用已达到饱和,而后部下降部分则表明 AHH 活性的抑制,此时虽然 AHH 活性仍显著高于对照组,但却随着 BaP 浓度的升高而降低,在这种剂量2效应关系下,以 AHH 活性作为 BaP 暴露的生物指标则会产生一定的偏差。

### 2.2 不同 BaP 暴露时间对 AHH 活性的影响

不同 BaP 暴露时间对 AHH 活性的影响在不同浓度组的表现也各不相同(表1)。在0.05 mg#L<sup>-1</sup>浓

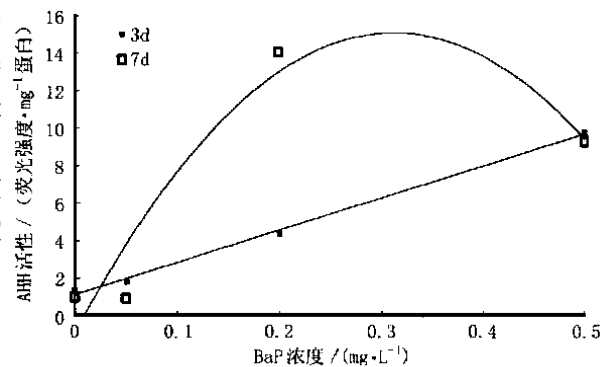


图1 BaP 暴露下大弹涂鱼肝脏 AHH 活性的剂量2效应关系

Fig.1 The dos2related relationship of AHH activities in the liver of *B. pectinirostris* exposed to BaP

度组, 第 3d 和第 7d AHH 活性无显著差别, 并与对照组相近; 在  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组, 与第 3 天相比, 第 7 天时 AHH 活性被显著诱导 ( $P < 0.01$ ), 为第 3 天的 3.19 倍; 而在  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组, 第 3 天与第 7 天 AHH 活性则变化不大, 表现为持续稳定的诱导作用。不同暴露时间不同 BaP 浓度 AHH 活性诱导的差别表明 AHH 活性的诱导是一种动态变化过程, 暴露时间也是一个影响 AHH 活性的重要因子。

### 2.3 BaP 污染解除后 AHH 活性的恢复

如表 1 所示, 大弹涂鱼暴露于  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 3d 后, 再转入清洁海水中 4d, 其 AHH 活性显著降低, 恢复至与对照组相近, 证明在此浓度下, 大弹涂鱼肝脏仍具有较强的生理调节机能, 同时也表明 AHH 活性及时反映了环境中 BaP 的水平。

## 3 讨论

生物对环境条件的恶化都有一定的适应能力, 当污染胁迫较轻时, 机体可能会产生适应性诱导反应, 以减缓或消除污染物代谢过程中产生的各种有害中间产物, 而当污染胁迫严重, 超过机体适应能力时, 则可能产生抑制性中毒反应。污染胁迫下, AHH 活性随暴露浓度的增加及暴露时间的延长而变化的过程是一个值得探讨的问题。

本实验中随 BaP 暴露浓度的增加, AHH 活性在  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组未表现出显著差异, 而在  $0.2$  和  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组均被显著诱导, 表明 BaP 对 AHH 活性的诱导存在一定的浓度范围, 在本实验设定的实验条件下此浓度范围应大于  $0.05 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP。值得注意的是, 对 AHH 活性变化的剂量-效应关系的回归分析表明(图 1), 暴露 3d 时, AHH 活性与 BaP 浓度之间表现为理想的线性剂量-效应关系, 即 AHH 活性随 BaP 浓度增加而升高, 而暴露 7d 时, 则表现为抛物线型剂量-效应关系, 即  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组较之  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组 AHH 活性受到一定程度的抑制。

不同暴露时间 AHH 活性与 BaP 浓度之间剂量-效应关系的差异表明, 随暴露时间的延长, AHH 与污染物的相互作用是一个不断变化的动态过程。理论上讲, 这一过程通常可分为诱导、饱和及抑制三个阶段。诱导反应阶段, 指机体对污染物的适应性反应, 其特点是 AHH 活性随暴露时间的延长不断被诱导, 目的在于消除或至少部分消除污染物在体内代谢产生的中间代谢产物; 饱和阶段, 介于诱导反应与抑制反应之间, 其特点是 AHH 活性随暴露时间的延长不再被诱导, 而是相对稳定在一定的水平, 表明相关指标对污染物中间代谢产物的解毒能力已达到饱和; 抑制反应阶段, 指污染物对机体产生毒性效应的阶段, 其特点是 AHH 活性随暴露时间的延长而不断降低, 表明污染物的大量中间代谢产物已对机体产生毒性作用。本实验中  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组暴露 7d 时 AHH 活性为 3d 时的 3.19 倍, 而  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组暴露 7d 和 3d 时的 AHH 活性十分接近, 每毫克蛋白荧光强度分别为 9.83 和 9.33, 表明随暴露时间的延长  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组 AHH 活性尚处于诱导阶段, 而  $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BaP 浓度组则已接近饱和, 在本实验设定的条件下, AHH 活性表现为低浓度的诱导效应和高浓度的抑制效应。随着暴露时间的继续延长(暴露一周后), 各浓度组 AHH 活性的变化情况如何, 值得进一步探讨。

Payne 和 Penrose 首次在受多环芳烃污染鱼类中检测到 AHH 活性的诱导<sup>[9]</sup>, 许多学者对以 AHH 活性作为污染的生物指标进行了大量的研究, 发现污染水平与诱导反应之间具有很好的相关性, 证明 AHH 活性适于作为污染的生物指标。本实验中, AHH 活性被诱导, 表明机体代谢 BaP 的能力增强, AHH 积极参与机体解毒, 当 BaP 浓度足够高或暴露时间足够长时, AHH 活性受到抑制, 表明机体代谢 BaP 的能力降低, BaP 的大量中间代谢产物已对包括 AHH 在内的生物大分子产生毒害作用。本实验的结果进一步证实, AHH 活性的变化是一个动态的过程, 其中 BaP 暴露浓度和暴露时间是影响 AHH 活性的重要因素, AHH 活性在 BaP 暴露下表现出一定的剂量-效应和时间-效应特征, 适于作为 BaP 暴露的生物监测指标。

## 参考文献:

- [1] Stegeman J J, Brouwer M, Di Giulio R T, et al. Molecular responses to environmental contamination: Enzyme and protein systems as indicators of chemical exposure and effect[A]. Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress[C]. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1992. 235- 335.
- [2] 朱必风, 马海燕. 鲫鱼微粒体芳烃羟化酶指示多环芳烃对水体污染的研究[J]. 中国环境科学, 1995, 15(2): 153- 156.
- [3] 孙 风, 刘发义. 石油污染对梭鱼肝脏混合功能氧化酶影响的初步研究[J]. 海洋与湖沼, 1990, 21(2): 192- 194.
- [4] 刘发义, 孙 风. 石油污染对梭鱼肝脏混合功能氧化酶的影响[J]. 海洋环境科学, 1991, 10(3): 49- 51.
- [5] Bucheli T D, Font K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems[J]. Crit Rev Environ Sci Techn. 1995, 25(3): 201- 268.
- [6] Zhang Y S, Andersson T, Forlin L. Induction of hepatic xenobiotic biotransformation enzymes in rainbow trout by B- naphthoflavone[J]. Comp Biochem Physiol. 1990, 95B, (2): 247- 253.
- [7] Walton D G, Penrose W R, Green J M. The petroleum-inducible mixed function oxidase of cunner *Tautoglabrus adspersus* (Walbaum): Some characteristics relevant to hydrocarbon monitoring[J]. J Fish Res Board Can, 1978, 35(12): 1547- 1552.
- [8] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the Folin-phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193: 265- 275.
- [9] Payre J F, Penrose W R. Induction of aryl hydrocarbon (benzo[a] pyrene) hydroxylase in fish by petroleum[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1975, 14: 112- 116.