

DOI: 10.3969/j.issn.2095-3704.2012.03.016

二甲苯对锦鲤鱼肝脏抗氧化酶的影响

吴志刚, 沈洪艳*, 武晨虹, 王丽新, 张国霞

(河北科技大学 环境科学与工程学院, 河北 石家庄 050080)

摘要: 采用暴露试验方法, 研究了不同浓度二甲苯对锦鲤鱼肝脏组织中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的影响。结果表明, 不同浓度组二甲苯在暴露期间对锦鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响较小, 只有在个别浓度和个别时间段下发生了显著诱导或抑制作用; 锦鲤鱼暴露于二甲苯时对 CAT 活性影响主要表现为诱导作用, 但 CAT 对 1/16 96hLC₅₀ 浓度二甲苯反应较滞后; 随着暴露时间的延长, 试验 15 d 后, CAT 活性随着暴露浓度的降低而整体呈下降趋势; 试验中 CAT 活性的变化与 SOD 活性的变化具有一定的同步性: 在 3 d 和 15 d 时, 1/4 96hLC₅₀ 浓度组的 SOD 活性受到诱导, CAT 活性也受到诱导; 在 12 d 时, 1/8 96hLC₅₀ 浓度组的 SOD 活性受到抑制, CAT 活性也受到抑制。在本次暴露试验中, CAT 活性对二甲苯较敏感, 从分子水平上反映了污染物对鱼体肝细胞的损伤, 也反映了环境中氧化作用的存在, 因此, 可以考虑其作为水环境中二甲苯早期污染的生物监测指标。

关键词: 二甲苯; 锦鲤鱼; 抗氧化酶; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶

中图分类号: X174

文献标志码: A

文章编号: 2095-3704 (2012) 03-0295-05

Effects of Xylene on Antioxidant Enzymes in the Liver of *Cyprinus carpio*

WU Zhi-gang, SHEN Hong-yan*, WU Chen-hong, WANG Li-xin, ZHANG Guo-xia

(College of Environmental Science and Engineering, Hebei Science and Technology University,
Shijiazhuang 050018, China)

Abstract: An exposure experiment was conducted to study the effect of different concentrations of xylene on the activity of the antioxidant enzymes: superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) in liver tissue of *Cyprinus carpio*. The results showed that it has not significant effect on the activity of SOD in the liver of *Cyprinus carpio* exposed to xylene at different concentrations. Only in the individual concentration and individual time, the activity of SOD was significantly induced or inhibited. The activity of CAT in the liver of *Cyprinus carpio* exposed to xylene was mainly induced, but in the concentration of xylene for 1/16 96hLC₅₀ conditions, the reaction of the activity of CAT was slowly. However, with the increased of the exposure time, after 15 days, the activity of CAT, declined with the lower of the exposure concentrations. During the whole exposure experiment, the activity of SOD and CAT changed with synchronization. In the exposure of 3 days and 15 days, the activity of SOD was induced in the concentration of 1/4 96h LC₅₀, the activity of CAT was also induced under the same conditions. In the exposure of 12 days, the activity of SOD was inhibited in the concentration of 1/8 96hLC₅₀, the

收稿日期: 2012-09-15

基金项目: 国家环保部公益课题 (201109004)、河北省科技厅 (12276708D)、河北省教育厅重点课题 (ZH2011119) 和河北省重点学科建设基金项目资助。

作者简介: 吴志刚, 男, 江西婺源人, 硕士, E-mail: gangpin163_com@163.com; * 通信作者: 沈洪艳, 副教授, 博士后, 主要从事环境生态研究, E-mail: shy0405@sina.com。

activity of CAT was also inhibited under the same conditions. In this exposure experiment, the activity of CAT was more sensitive to xylene, it reflected the existence of oxidation in the environment, it could be considered as the early pollution of biological monitoring index in the water environment.

Key words: Xylene; *Cyprinus carpio*; antioxidant enzymes; superoxide dismutase; catalase

二甲苯是一种重要的有机溶剂和化工原料,工业用途广泛,其对人体和水生生物均有不同程度的毒性^[1-2]。二甲苯属于 EPA 优先控制污染物,同时也被列入中国环境优先控制污染物黑名单^[3]。研究发现多数污染物都具有氧化还原活性,可参与生物体内的氧化还原循环,产生大量的活性氧自由基等有害物质,从而对机体细胞产生氧化损伤^[4]。生物机体内的抗氧化防御酶系作为一类可反映污染物对细胞氧化损伤程度的分子生态毒理指标,已逐渐成为国内外学者研究的热点^[5]。抗氧化酶的一个重要特征是其活性成分或含量可由于污染胁迫而发生改变,因而,其能间接反映环境中氧化作用的存在,可作为环境污染胁迫程度的指标^[6]。

抗氧化酶存在于所有生物的组织,其功能是清除氧自由基。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)可以分别清除体内过量的超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2),保护细胞免受活性氧自由基的氧化损伤,因此,CAT和SOD的活性高低可以间接地反映鱼体内活性氧的水平和细胞受氧化损伤的程度。目前,关于海洋污染对生物抗氧化防御系统影响研究已有较多报道^[6-7],而对淡水鱼类锦鲤鱼CAT和SOD活性的研究尚少。本试验研究了暴露于二甲苯21d对鱼体肝脏抗氧化酶的影响,探讨将以CAT、SOD活性变化作为氧化污染生化指标的可能性,并为抗氧化酶的毒理学研究提供基础资料。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

UV-2550 型紫外可见分光光度计、DK-S26 型恒温水浴锅、微量移液器若干、TG16-WS 台式高速离心机、SYZ-A 型石英亚沸高纯水蒸馏器、XK96-B 型快速混匀器、玻璃组织匀浆器若干、JPBJ—608 型便携式溶解氧测定仪、EL204 型电子分析天平、FE20 型 pH 计、微型温度计和水硬度计(WAD-TH)等。

CAT 和 SOD 试剂盒均购自于南京建成生物工程研究所;二甲苯购自石家庄试剂厂,为分析纯;以乙醇为助溶剂,乙醇为分析纯,购自天津市永大化学试剂有限公司。在试验中,乙醇的用量 ≤ 1 ml/l。

1.2 受试生物

选用锦鲤鱼(*Cyprinus carpio*)为受试生物,由石家庄水产养殖基地提供,体长为 5.65 ± 0.91 cm,体重为 3.56 ± 0.28 g,鱼苗经 5%食盐水消毒后进入实验室,用 48 h 曝气的脱氯自来水在实验室驯养 2 周用于试验,试验水质符合渔业水质标准,驯养期间锦鲤鱼死亡率 $< 5\%$ 。

1.3 试验方法

根据二甲苯对锦鲤鱼肝脏的急性毒性试验结果($96hLC_{50} = 35.78$ mg/L)进行亚急性毒性浓度组设置,设置暴露浓度分别为 $1/4$ $96hLC_{50}$ 、 $1/8$ $96hLC_{50}$ 、 $1/16$ $96hLC_{50}$ 和 $1/64$ $96hLC_{50}$ 。试验液用 48 h 脱氯自来水进行稀释。水质条件:pH 值为 $6.0 \sim 8.5$;总硬度为 50 mg/L(以 $CaCO_3$ 计),试验温度为 $23 \sim 25$ °C;溶解氧不低于 5 mg/L;采用自然光照。

将在实验室内驯养 2 周的试验鱼,随机放入暴露组和空白对照组,同时每一浓度组设置三个平行。在 25 L 水族箱中分别加入 20 L 试验溶液,每组投 30 尾锦鲤鱼,暴露 21 d,每 3 d 测一次 CAT 和 SOD 活性。暴露期间每天喂食,但为防止饵料的影响,测试指标的前一天不喂食。试验期间用曝气装置连续曝气,采用静态置换法^[8]每天更新一半溶液,每天至少测定 1 次试验溶液的水温、硬度、pH 值、溶解氧含量。

1.4 数据处理

数据统计结果表示为平均值 \pm 标准偏差(Mean \pm SD)。本试验的数据应用 SPSS15.0 统计软件进行显著性 t-检验, $0.01 < P < 0.05$,被认为差异显著, $P < 0.01$,被认为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 二甲苯对锦鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响

在暴露的第 3、6、9、12、15、18 和 21 d, 对 1/4、1/8、1/16、1/64 浓度组和空白浓度组锦鲤鱼进行取样, 测定肝脏中 SOD 活性, 测定结果如图 1 所示。

不同浓度组的 SOD 活性随暴露时间的延长, 具有不同的变化趋势。1/4 浓度组在 3 d 时 SOD 活性显著高于对照组, 说明高浓度对 SOD 活性产生显著的诱导作用 ($0.01 < P < 0.05$), 而其它浓度组却与对照组相差不大 ($P > 0.05$)。1/8 浓度组在试验前期 (3~9 d), SOD 活性开始受到抑制, 到 12 d 时 SOD 活性受到显著抑制 ($0.01 < P < 0.05$), 说明二甲苯已通过氧化还原代谢产生大量的 O_2^- , 抗氧化机体不能及时增强 SOD 活性, 出现了暂时的活性抑制; 而到 15 d 的时候 1/4、1/8

浓度组二甲苯对 SOD 活性表现出显著的诱导作用, 这可能是二甲苯在进一步富集与代谢过程中, 机体内出现大量 O_2^- , 在 O_2^- 的诱导下, SOD 合成能力增强, 这也说明高浓度的二甲苯仍然能够显著诱导 SOD 的活性。1/16 浓度组的变化趋势与空白对照组的变化趋势相似, 没有显著性差异 ($P > 0.05$)。1/64 浓度组在 3 d 时 SOD 活性受到轻微诱导, 而 6 d 时 SOD 活性却低于对照组, 且差异达到了极显著水平 ($P < 0.01$), SOD 活性受到严重抑制, 这可能与此时机体内 CAT 活性被显著激活有一定关系。总体来说, 各浓度组的二甲苯在暴露期间对锦鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响较小 ($P > 0.05$), 只在个别浓度和个别时间段下发生了显著诱导或抑制作用。

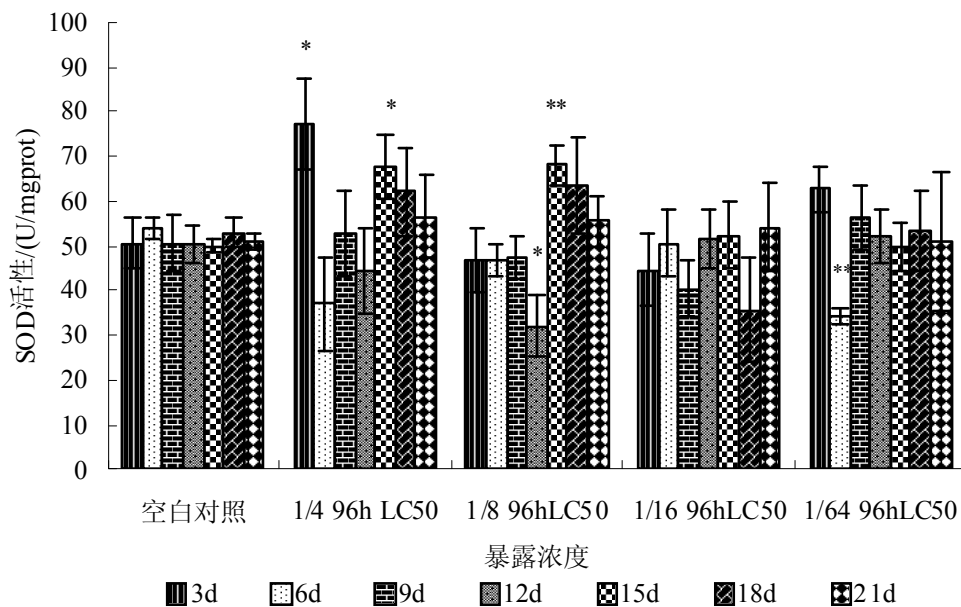


图 1 二甲苯对锦鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响

(与同一天对照组比较: $0.01 < P < 0.05$, 差异显著; $**P < 0.01$, 差异极显著)

2.2 二甲苯对锦鲤鱼肝脏 CAT 活性的影响

在暴露的第 3、6、9、12、15、18 和 21 d, 对 1/4、1/8、1/16、1/64 浓度组和空白浓度组锦鲤鱼进行取样, 测定肝脏中 CAT 活性, 测定结果如图 2 所示。

由图 2 可知, 随着暴露时间的延长, 各浓度组 CAT 活性与对照组相比, 整体呈上升趋势, 主要表现为诱导作用。在第 3 d 时, 各浓度组的 CAT 活性都高于对照组, 1/4 浓度组与对照组的差异达到了

显著水平 ($0.01 < P < 0.05$), 说明暴露 3 d 后 CAT 活性开始被激活, 暴露浓度越大, 激活率越大, 可能此时 H_2O_2 在鱼体内不断积累, 但还不足以使 CAT 产生中毒反应。试验进行到第 9 d 时, 各浓度组 CAT 活性与对照组比较都有显著性差异 ($P < 0.05$), 且 1/8 浓度组 CAT 活性达到整个试验过程中的最大值 1134.775 U/mgprot, 其激活率为对照组的 213.25%, 这可能是二甲苯已进入鱼体, 对肝脏组织产生了损伤, 使 SOD 酶不能及时生成, SOD 活性受到抑制,

并不能将机体内产生大量的 O_2^- 转化为 H_2O_2 ，但由于 H_2O_2 还存在其它来源（如从氨基酸或细胞色素 P450 氧化酶激活产生^[9]），从而导致 CAT 活性升高。在第 12 d 时，1/8 浓度组 CAT 活性却下降到最低值 262.775 U/mgprot，与最空白值 380.15 U/mgprot 对比差异显著 ($0.01 < P < 0.05$)，而此时机体内的 SOD 活性受到显著抑制， O_2^- 不能转化为 H_2O_2 ，导致 CAT 活性下降。在第 15 d 时，各浓度组中只有 1/4 浓度组 CAT 活性与对照组比较有显著性差异 ($0.01 < P < 0.05$)，说明高暴露浓度还是能够刺激机体产生

CAT，CAT 的合成能力依然未达到饱和状态。试验进行的后期（18~21 d），CAT 活性随着暴露浓度的降低而整体呈下降趋势，到 21 d 时 1/64 浓度组 CAT 活性开始受到显著抑制 ($0.01 < P < 0.05$)，而其它浓度组 CAT 活性与对照组持平，这可能是试验后期 CAT 代谢 H_2O_2 能力达到饱和，致使鱼体出现中毒反应，故 CAT 活性降低。当二甲苯浓度接近（1/64 $LC_{50}=0.56$ mg/L）中国（GB3838-2002）地表水环境质量标准限值（0.5 mg/L）时，也会对 CAT 产生显著影响，表现出先诱导升高，再降低至抑制状态。

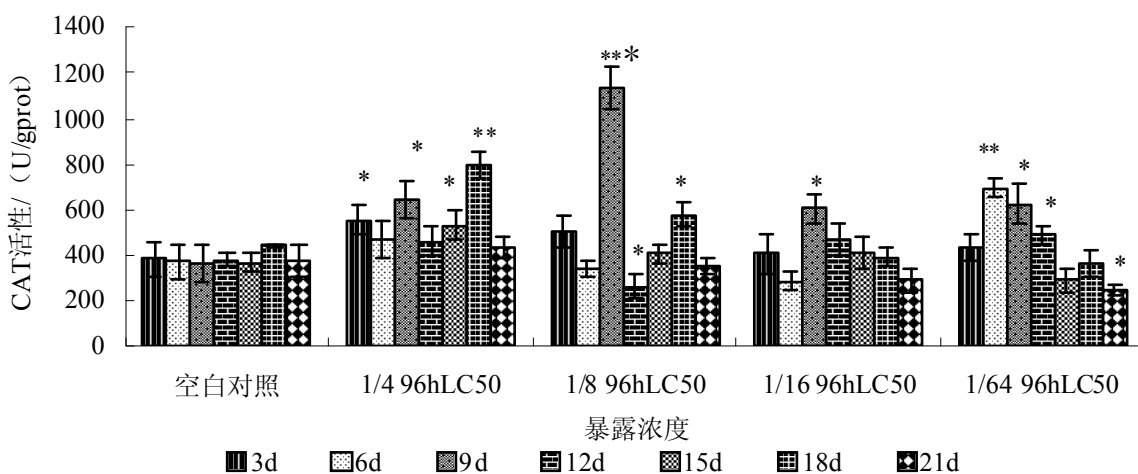


图 2 二甲苯对锦鲤鱼肝脏 CAT 活性的影响

(与同一天对照组比较: * $0.01 < P < 0.05$, 差异显著; ** $P < 0.01$, 差异极显著)

2.3 SOD 和 CAT 活性的变化规律之间的关系

SOD 是水生生物抗氧化酶系统的重要组成部分，其普遍存在于需氧生物的组织中^[10]，SOD 是最先与细胞中产生的活性氧自由基发生作用的酶^[11]，可将 O_2^- 歧化分解为 H_2O_2 和 O_2 ，由此构成了机体防御活性氧自由基损伤的第一道防线^[12]。CAT 是一种血红蛋白酶^[13]，使过氧化氢分解为分子氧和水。细胞内的 CAT 担负着过氧化氢和过氧化物的分解和转化的任务，从而降低细胞内 H_2O_2 的浓度，因此，它是一种重要的抗氧化酶，且大多数需氧生物组织细胞内都含有 CAT。

在机体抗氧化酶防御系统中，CAT 和 SOD 协同构成防御活性氧自由基损伤的有效防御体系^[14]，SOD 催化 O_2^- 催产生 H_2O_2 ，而 CAT 进一步催化 H_2O_2 产生 H_2O 和 O_2 。若机体细胞内 CAT 酶活性降低，将会造成 H_2O_2 在细胞内堆积，从而对生物体造成损伤。

在试验中发现，CAT 活性的变化与 SOD 活性的变化具有一定的同步性；当 SOD 活性受到诱导时（1/4 LC_{50} ，3 d、15 d），CAT 活性也受到诱导（1/4 LC_{50} ，3 d、15 d），当 SOD 活性受到抑制时（1/8 LC_{50} ，12 d），CAT 活性也受到抑制（1/8 LC_{50} ，12 d），可以看出 SOD 的诱导引起体内 H_2O_2 含量的增加，从而刺激 CAT 活性的升高来清除过量 H_2O_2 ，而 SOD 的抑制引起体内 H_2O_2 含量的降低以及 O_2^- 含量的升高，从而使得 CAT 活性下降。

3 结论与讨论

不同浓度组二甲苯在暴露期间对锦鲤鱼肝脏 SOD 活性的影响较小 ($P > 0.05$)，只在个别浓度和个别时间段下发生了显著诱导或抑制作用。锦鲤鱼暴露于二甲苯时对 CAT 活性影响主要表现为诱导作用，但 CAT 对 1/16 96h LC_{50} 浓度二甲苯反应较滞后；随着暴露时间的延长，试验 15 d 后，CAT 活性

随着暴露浓度的降低而整体呈下降趋势。试验中CAT活性的变化与SOD活性的变化具有一定的同步性,在3 d和15 d时,1/4 96hLC₅₀浓度组的SOD活性受到诱导,CAT活性也受到诱导;在12 d时,1/8 96hLC₅₀浓度组的SOD活性受到抑制,CAT活性也受到抑制。在本次暴露试验中,CAT活性对二甲苯较敏感,反映了环境中氧化作用的存在,因此可以考虑其作为水环境中二甲苯早期污染的生物监测指标。

参考文献:

- [1] 王龙义,孙志杰,毕先伟,等. 苯及苯系物对接触人员健康状况的影响[J]. 中国工业医学杂志, 2005, (2): 109-110.
- [2] 金相灿. 有机化合物污染化学-有毒有机物污染化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1990: 236-237.
- [3] 中国环境优先监测研究课题组. 环境优先污染物[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 7-9.
- [4] 赵元凤,吕景才,宋晓阳,等. 镉污染对鲢鱼超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性的影响[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 267-271
- [5] 徐立红,张甬元,陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 171-184
- [6] Stegeman J J. Molecular Responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects[C]//Huggett R A. Biomarkers, Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress. Boca Raton Florida: Lewis Publishers, 1992: 235-335.
- [7] Lemaire P, Matthews A, Forlin L, et al. Stimulation of oxyradical production of hepatic microsome of flounder (*Platichthys flesus*) and Perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1994, 26: 191-200.
- [8] 周永欣,章宗涉. 水生生物毒性试验方法[M]. 北京: 农业出版社, 1989: 75-76.
- [9] 陈荣. 石油烃污染对僧帽牡蛎的氧化胁迫[D]. 厦门: 厦门大学环境科学中心, 2001.
- [10] 张凤君. 多氯联苯暴露对实验鱼主要器官组织微细结构变化及几种酶活性的影响[D]. 广州: 华南师范大学, 2002.
- [11] 王燕. 用多项生物标志物评价三丁基锡对大鼠的早期影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
- [12] 张全武,孙少华,杨迪. 慢性甲醛吸入对小鼠肝脏的氧化性损伤[J]. 现代预防医学, 2003, 30(6): 767-768.
- [13] 张波,刘承芸,孟紫强. 二氧化硫吸入对小鼠各脏器过氧化氢酶活性的影响[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(1): 10-12.
- [14] 连灵君. 用多项生物标志物评价铅对小鼠的氧化损伤[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.