多环芳烃化合物对栉孔扇贝组织芳烃羟化酶活力的影响

王 静,潘鲁青,苗晶晶

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室,山东 青岛 266003)

摘要:研究了苯并(a) 芘(B[a] P)、苯并(k) 荧蒽(B[k]F)以及两者的混合物对栉孔扇贝 (Chlamysfarreri) 鳃丝和消化盲囊芳烃羟化酶(AHH)活力的影响。结果表明,多环芳烃化 合物(PAHs)对栉孔扇贝鳃丝和消化盲囊 AHH 活力具有显著的诱导作用(P<0.05),并且 呈现了明显的时间、剂量效应特征。B[a]P和B[k]F 混合物处理组鳃丝和消化盲囊的AHH 活力在实验期间呈现先升高后稳定趋势,B[a]P处理组则表现峰值变化,然后呈下降趋势。 消化盲囊各处理组 AHH活力显著高于鳃丝。作者认为可以采用消化盲囊的 AHH 活力来 反映周围环境 PAHs的污染,并应以最大饱和浓度为标准。3种 PAHs 中 B[a]P 的毒性最 强,PAHs 对栉孔扇贝的毒性大小与 PAHs 的组成有关,不能以不同种类单一 PAHs 毒性的 总和来代表 PAHs 混合物的毒性。

关键词:多环芳烃化合物;栉孔扇贝;鳃丝;消化盲囊;芳烃羟化酶 中图分类号:X174 文献标识码:A 文章编号:100023096(2007)1220012005

多环芳烃(PAHs)来源于有机物的热解或不完 全燃烧,是最早被发现和研究的致癌类化合物之一, 迄今已发现致癌性的 PAHs 及其衍生物达 400 多 种,其中苯并(a) 芘(B[a]P) 和苯并(k) 荧菌(B[k]F) 是致癌作用最强的两种 PAHs。近年来、随着海上石 油和轮船运输业的发展以及工业、生活污水的大量 排放,海洋环境中 PAHs 的污染日益加重, PAHs 已 经成为海洋环境中优先控制和必须检测的污染 物[1~4]。多环芳烃进入生物体后首先要经过细胞色 素 P450 混合功能氧化酶系(MFO)代谢,形成许多中 间代谢产物、产生大量的活性氧物质、造成生物机体 脂质过氧化、蛋白质(酶)和 DNA 损伤^[5~7]。 芳烃羟 化酶(AHH) 是 MFO 中代谢 PAHs 最先起作用的 酶、大量的研究表明 PAHs 能够诱导生物体内 AHH 的合成,且 PAHs 污染水平与 AHH 活力之间存在很 好的相关性,AHH 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[8~1],目前这些研究主要集中在哺乳动物和 鱼类中,而有关贝类方面的研究很少[12~18]。

贝类为滤食性生物,代谢率低,对有机污染物具 有较强的累积作用,常被用作海洋环境污染的指示 生物^[19,20]。栉孔扇贝(Chlamysfarreri)是中国浅海 重要的经济种类,污染物主要通过贝类摄食的水流 进入鳃丝和消化道,通过血淋巴循环到达各组织器 官(主要是消化盲囊)。作者研究了 PAHs 对栉孔扇 贝鳃丝和消化盲囊 AHH 活力的影响,探讨了 PAHs 对栉孔扇贝的毒理学效应,为贝类环境毒理学的研究 奠定了理论基础,也为海洋环境的污染监测提供科学 依据。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用栉孔扇贝购自青岛太平角养殖场,平均壳高6.0 cm? 0.5 cm。采用青岛近海的自然海水将栉孔扇贝暂养7~10 d,海水盐度为30,pH为8.0,温度为8~10 e,连续充气,日换水1/3~1/2,养殖密度为300~450个/m³,并投喂螺旋藻粉,日投饵量为6 g/m³。

- 1.2 方法
- 1.2.1 实验梯度的设置

经 HPLC 检测实验用青岛近海自然海水中 B[a]P 和 B[k]F 的质量浓度分别为 0.155 ng/L 和 0.079

Marine Sciences/ Vol. 31, No. 12/2007

panlq@ouc.edu.cn

收稿日期: 200@05228;修回日期: 2007201215

基金项目:中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室开放基 金项目;青岛市科技发展计划项目(0@222212jch) 作者简介:王静(1982)女,河北石家庄人,硕士,从事养殖环 境毒理学的研究;潘鲁青,通讯作者,博士,教授,E2mail:

ng/L。实验所用 PAHs 为 B[a] P、B[k] F、B[a] P 和 B[k]F 的混合物(B[a] P 和 B[k] F 按 1 B 1 同浓度配 制), B[a] P 和 B[k] F 分别为 Sigma 公司和 Fluka 公 司的产品。实验设 3 个梯度(0.5,3,10 Lg/L),首先 用一定量 3 LL/L 的丙酮(助溶剂)分别溶解 B[a] P 和 B[k] F,配成一定浓度的储备液。实验时分别用自 然海水配置 3 个实验梯度,分别以不加入 PAHs 和 只加入 3 LL/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,各处理组丙酮维持相 同浓度。

实验在 50 cm @40 cm @30 cm 的塑料水槽内进 行,各实验梯度每个水槽分别放健康、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,换水时分别加入相应各实验梯度的养殖用水, 实验期间栉孔扇贝无死亡现象。实验开始后于 0,12 h,1 d,3 d,6 d,10 d,15 d,20 d 取样。取样时每个梯 度各水槽随机选取 3 只栉孔扇贝,分别取鳃丝和消化 盲囊,去除多余的组织块,置于 1.5 mL 离心管中,所 有样品均放入- 80 e 冰箱保存。

1.2.2 测定方法

1.2.2.1 酶液的制备

分别将栉孔扇贝鳃丝和消化盲囊样品约 0.5 g 置于 pH= 7.6 预冷的缓冲液(Tris20 mmol/L, 蔗糖 0.5 mol/L, KCl 0.15 mol/L, EDT A 1 mmol/L, 10% 甘油), 在冰浴中匀浆 3 min, 转速为 12 000 r/min, 然 后将匀浆液离心 25 min, 转速为 3 000 r/min, 再取上 清液离心 45 min, 转速为 11 000 r/min, 所得上清液 即为酶液。

1.2.2.2 酶活力的测定

参照 Walton^[21]的方法并加以改进, 取 0.440 mL 酶液, 加入 50 LL 2 mmol/L NADPH, 10LL 3 mol/L MgCb, 用 0.1 mol/L Tri&HCl(pH 7.0) 加至 1 mL, 于 30 e 水浴锅中预孵育 2 min, 最后加入 20 LL 2.5 g/L 二苯基噁唑(PPO), 于 37 e 下孵育 30 min; 加入 1 mL 预冷丙酮终止反应, 再加入 3.25 mL 正己烷萃 取;取 2mL 有机相, 用 5 mL 1 mol/L NaOH 萃取, 取 3 mL 水相在荧光分光光度计上测荧光值(激发 396 nm/发射 522 nm)。酶活力单位(U)表示为每 mg 蛋 白的荧光强度。

蛋白含量用 Bradford 的 G2250 染料法方法^[22] 测定。

1.2.3 数据处理与分析

所有数据均以3个平行组数据的平均值?标准 差(Means?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

PAHs 对栉孔扇贝组织 AHH 活力的 影响

由图 1、图 2 可以看出, PAHs 对栉孔扇贝组织 AHH 活力具有显著的诱导作用(P< 0.05), 鳃丝和 消化盲囊各处理组分别于第 1 天和第 3 天开始与对 照组差异显著(P< 0.05)。B[a] P 处理组鳃丝 AHH 活力呈现明显的峰值变化, 0.5 Lg/L 处理组在 10 d 时达到最大值, 15 d 后趋于稳定, 3 Lg/L 和 10 Lg/L 处理组分别于 6 d 和 3 d 达到最大值, 然后呈下降趋 势; 消化盲囊各处理组的变化趋势与鳃丝基本相同。 B[k]F 0.5 Lg/L处理组鳃丝和消化盲囊 AHH 活力 在 15 d 内呈上升趋势, 然后达到稳定, 3 Lg/L 处理组 AHH 活力分别于 10 d 和 15 d 后趋于稳定, 10 Lg/L 处理组两种组织 AHH 活力在 6 d 后趋于稳定。 B[a]P和 B[k]F 混合物各处理组鳃丝和消化盲囊 AHH 活力在 15 d 内呈逐渐上升趋势, 然后达到稳定 状态。



图 1 多环芳烃化合物对栉孔扇贝鳃丝 AHH 活力的影响

Fig. 1 Effect of PAHs on AHH activity of the gills of Chlamys farreri





图 2 多环芳烃化合物对栉孔扇贝消化盲囊 AHH 活力的 影响

2.2 PAHs 对栉孔扇贝组织 AHH 活力诱 导的剂量效应





Fig. 3 The dose effect of PAHs on AHH activity of Chla2 mys far rer i (15 d)

图 3表明,将栉孔扇贝暴露 15 d 时鳃丝和消化 盲囊 AHH 活力随着 PAHs 浓度的增加表现为抛物 线型剂量效应关系。PAHs 对栉孔扇贝组织 AHH 活力诱导的最大饱和浓度在 7~ 8 Lg/L 之间。低于这 一浓度时 PAHs 对 AHH 活力表现为诱导作用,高于 这一浓度时表现为抑制作用。栉孔扇贝组织 B[a]P 处理组 AHH 活力显著高于 B[k]F 以及 B[a] P 和 B[k]F的混合物处理组(P< 0.05)。

3 讨论

3.1 PAHs 对栉孔扇贝鳃丝和消化盲囊 AHH 活力的影响

Payne& Penrose^[23] 首次发现多环芳烃对鱼类 AHH 活力具有诱导性; 据 Michel 等^[24] 报道贻贝 (Mytilus galloprovincialis)组织 AHH 活力高低与 海区 PAHs 污染程度呈正相关。本研究表明 PAHs 对栉孔扇贝组织 AHH 活力具有显著的诱导作用, 其 中 B[a] P 处理组在 20 d 内呈峰值变化, 然后呈下降 趋势, B[k] F 和混合物处理组均呈现先升高后稳定趋 势, 这与冯涛^[25] 对大弹涂鱼(Boleop hthalmus p ecti2 nirostris)的研究结果类似。由此说明 PAHs 对栉孔 扇贝组织 AHH 活力作用表现为诱导、饱和和抑制 3 个阶段, 具有明显的时间效应。

本实验依据暴露于 PAHs 中 15 d 时, 栉孔扇贝 鳃丝和消化盲囊 AHH 活力与 PAHs 浓度, 表现出抛 物线型剂量效应关系, 且 PAHs 对 AHH 活力诱导的 最大饱和浓度位于 7~ 8 Lg/L 之间, 当环境中 PAHs 浓度低于这一浓度时, AHH 活力与 PAHs 之间为正 相关关系, 表现为诱导作用; 而 PAHs 浓度高于这一 浓度时, 这说明 PAHs 对 AHH 活力的诱导作用已受 到抑制, 此时 AHH 活力仍可能显著高于其他处理组 或对照组, 但随着 PAHs 浓度的升高和时间的延长 抑制作用逐渐增强。这说明当环境中 PAHs 污染浓 度大于最大饱和浓度时, 以 AHH 活力作为 PAHs 暴 露的生物指标则 会产生一定的偏差。因此, 采用 AHH 活力作为 PAHs 污染指标, 应以最大饱和浓度 为标准。

3.2 PAHs 对栉孔扇贝的致毒机理

细胞色素 P450 混合功能氧化酶系位于细胞内 质网上,由细胞色素 P2450、NADPH2细胞色素 P2450 还原酶及磷脂质 3 种成分组成的多酶系统,其中 AHH 催化 PAHs 的第一步反应,将具有平面结构的 PAHs 氧化生成酚类和环氧化物^[36]。在生物体内 AHH 一方面使 PAHs 氧化,降低 PAHs 在机体中的 累积量;同时 AHH 氧化 PAHs 所形成的环氧化合物

Fig. 2 Effect of PAHs on AHH activity of the digestive gland of Chlamys farrer i

等活性中间代谢产物与生物体内脂类、蛋白质、DNA 等生物大分子形成共价键,对生物体造成损伤。

Kristine 等^[27]研究发现在高浓度 PAHs 污染海 区所采集的偏顶蛤(Modiolus modiolus) 消化盲囊的 AHH 活力要高于鳃丝;本实验也得到相同的结果, 而且 PAHs 对栉孔扇贝鳃丝 AHH 活力的诱导时间 比消化盲囊要短,分别为1 d 和3 d。作者认为这主 要是因为鳃丝与水体直接接触,而消化盲囊作为贝 类主要的解毒器官,对 PAHs 代谢和累积能力较强, 易造成组织损伤,因此,栉孔扇贝消化盲囊的 AHH 活力更适合作为 PAHs 污染的指标。

PAHs 对栉孔扇贝组织 AHH 活力的诱导作用 是一个不断变化的动态过程。本实验表明 PAHs 对 栉孔扇贝组织 AHH 活力的作用具有明显的时间、剂 量效应。B[k]F、B[k]F和B[a]P 混合物处理组为先 诱导后饱和稳定,而B[a]P 处理组为诱导、饱和,后 抑制的状态,而且在诱导饱和阶段 PAHs 对AHH 活 力的诱导作用表现为 B[a]P>B[k]F>B[k]F和 B[a]P混合物处理组,由此说明在实验 PAHs 浓度范 围内 B[a]P 对栉孔扇贝的毒性最强,而且 B[k]F和 B[a]P 混合物对 AHH 活力的诱导作用并不是两种 PAHs 作用简单的叠加。作者认为 PAHs 对栉孔扇 贝的毒性大小与 PAHs 的组成有关,不能以不同种 类单一 PAHs 毒性的总和来代表 PAHs 的毒性,这 可能与 PAHs 对栉孔扇贝的毒性作用机理有关,在 这方面还需进一步研究。

参考文献:

- [1] 田蕴,郑天凌,胡忠.海洋环境中多环芳烃的微生物 降解研究进展[J].应用与环境生物学报,2003,9 (4):4392443.
- [2] Varanas U. Metabolism of Polycyclic Aromatic H y2 drocarbons in the Aquatic Environment[M]. Boca Ra2 ton, FL, USA: CRC Press Inc, 1989.
- [3] 岳敏,谷学新.多环芳烃的危害与防治[J].首都师范 大学学报(自然科学版),2003,24(3):40244.
- [4] 安社娟. 多环芳烃致癌的分子毒理学研究进展[J]. 国 外医学卫生学分册, 2005, 32 (1): 10213.
- [5] 孔繁翔.环境生物学[M].北京:高等教育出版社, 2000.38251.
- [6] Willett K, Steinberg M. Exposure of killifish to benzo [a] pyrene: comparative metabolism, DNA adduct formation and aryl hydr ocarb on (Ah) receptor agonist activities [J]. Biochem Physiol, 1995, 112(1): 92103.
- [7] Thomas M, Boleslaw M, Beate E, et al. DNA adduct formation of benzo[a] pyrene in white blood cells of work ers exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons

[J]. International Journal of Hygiene and Environmen2 tal Health, 2005, 208: 1722178.

- [8] 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):152156.
- [9] 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):1922 194.
- [10] 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):49251.
- [11] Bucheli T D, Font K. Induction of cytochrome P450 as a biomarker for environmental contamination in aquatic ecosystems [J]. Grit Rev Environ Sci Techn, 1995, 25(3): 2012 268.
- [12] Lee R F. Mix ed function oxygenase (MFO) in ma2 rine invertebrates[J]. Mar Biol Lett, 1982, 2: 872 105.
- [13] James M O. Cytochrome P450 monooxygenase in crustaceans [J]. Xeno Biotica, 1989, 19: 1 0632 1 076.
- [14] Livingstone D R. Organic xenobiotic metabolism in marine invertebrates [A]. Gilles R. Advances in Comparative and Environmental Physiology [C]. New York: Springe2 Verlag, 1991. 42185.
- [15] Lee R F, Sauer hebel R, Benson A A. Petroleum hy2 drocarbons: uptak e and discharge by the marine mus2 sel Mytilus edulis [J]. Science, 1972, 177: 3442 346.
- [16] Payne J F. Mixed function oxidase in marine organ2 isms in relation to petroleum hydrocarbon metabolism and detection [J]. Mar Pollut Bull, 1977, 8: 1122 116.
- [17] James M O, Little P J. 22methylcholanthrene does not induce in vitro xenobiotic metabolism in spiney lobster hepatopancreas, or affect in vivo disposition of benzo (a)2pyrene [J]. Comp Biochem Physiol, 1984, 78: 2412245.
- [18] Kur elec B, Britivic S, Kr
 ça S. Metabolic fate of aro2 matic amines in the mussel Mytilus galloprovincalis
 [J]. Mar Biol, 1986, 91: 5232527.
- [19] Geyer H, Sheenan P, Kotzias K, et al. Prediction of ecotoxicological behavior of chemicals: relationship between physiochemical properties and bioaccumula2 tion of organic chemicals in the mussel My tilus ed ulis [J]. Chemosphere, 1982, 11: 1 12 D 1 134.
- [20] Goldberg E D, Bowen V T, Farrington J W, et al. The mussel watch [J]. Environ Conserv, 1978, 5: 1012125.
- [21] Walton DG, Penrose WR, Green JM. The petrole2

um2indu cible mixed function oxidase of cunner Tau2 togolabrus adspersus (Walbaum): Some characteris2 tics relevant to hydrocarbon monitoring [J]. J Fish Res Board Can, 1978, 35(12): 1 54721 552.

- [22] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein util2 zing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 2482254.
- [23] Payre J F, Penrose W R. Induction of aryl hydrocar2 bon (benzo[a]pyrene) hydroxylase in fish by petrol& um[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1975, 14: 1122 116.
- [24] Michel X R, Salaun J2P, Galgani F, et al. Benzo(a)2 pyrene hydroxylase activity in the marine mussel Mytilusgalloprovincialis: a potential marker of con2 tamination by polycyclic aromatic hydrocarbon2type

compounds [J]. Mar Environ Res, 1994, 38: 2572 273.

- [25] 冯涛,郑微云,洪万树,张其永.苯并(a)花对大弹涂鱼 肝脏芳烃羟化酶活力的影响[J].水产学报,2001, 25:15@160.
- [26] Maurizio R, Andrea C. SAR of Damin 21, 2, 3, 42 tetrahydroacridin@based ac2tylcholinesterase inhibi2 tors: sythesis, enzyme in2hibitory activity, QSAR and structur@based comFA of tacrine analogaes [J]. Med Chem, 2000, 43: 2 00722 018.
- [27] Kristin e L W, Cody W, Jane T, et al. Evidence for and against the presence of polynuclear aromatic hy2 drocarbon and 2, 3, 7, & tetrachlor& Edioxin b inding proteins in the marine mussels, Bathymodiolus and Modiolus modiolus [J]. Aquatic Toxicology, 1999, 48: 5264.

Effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on aryl hydrocar2 bon hydroxylase activities of marine scallop Chlamys f arreri

WANG Jing, PAN Lu2qing, MIAO Jing2jing

(The Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Received: May, 28, 2006 Key words: PAHs; Chlamys farreri; gills; digestive gland; AHH

Abstract: The effects of B[a]P, B[k]F and their mixture on AHH activerties of gills and digestive gland of scallop Chlamys farreri were studied. The results indicated that the AHH activerties of gills and digestive gland of scallop C. farreri were significantly induced (P < 0.05) by PAHs. And there were a good timerela tionship and a doserelationship between the activities of AHH and polycyclic aromatic hydrocarbons. The AHH activities of B[k]F and the mixture group at first changed to high and then became stable. And the AHH activities of B[a]P group changed to a peak and then fell. The AHH activities of digestive gland were higher than that of gillsp. Therefore AHH activities can be used as a biomarker to reflect the pollution of PAHs based on the biggest saturation concentration. Furthermore B[a]P has the greatest toxicity in 3 PAHs. The toxicity of PAHs is related to the composition it contains, the summation of single PAHs toxicity is not equal to the toxicity of total PAHs for scallops, this is mainly related to the mechanism of toxicity for scallop C. farreri of PAHs.

(本文编辑:张培新)