

苯并[a]芘暴露对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织毒理学指标的影响

李磊^① 蒋玫^① 沈新强^{①*} 王云龙^① 吴庆元^② 牛俊翔^② 许高鹏^②

① 中国水产科学研究院东海水产研究所 上海 200090; ② 上海海洋大学 海洋科学学院 上海 201306

摘要: 本文研究了三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 在对苯并[a]芘 (BaP) 富集 (15 d)、释放 (15 d) 过程中其鳃和肝胰腺组织的 4 种毒理学指标的响应。4 种毒理学指标分别为 7-乙氧基异吩噁唑酮-脱乙酰酶 (EROD)、谷胱甘肽硫转移酶 (GST)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和脂质过氧化 (LPO)。设置了 0.05 $\mu\text{g/L}$ 和 0.45 $\mu\text{g/L}$ 两个实验组以及海水和丙酮对照组。结果显示, 在富集阶段, 与海水对照组相比, 第 1 天时 0.05 $\mu\text{g/L}$ 和 0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃、肝胰腺组织的各毒理指标均显著受到诱导 ($P < 0.05$), 诱导程度随 BaP 暴露浓度的增加而增大。而后鳃、肝胰腺组织的 EROD、GST 活性以及鳃组织的 SOD 活性达到峰值后下降, 肝胰腺组织的 SOD 活性以及鳃、肝胰腺组织的丙二醛 (MDA) 含量则持续增加。鳃组织的 EROD、GST、SOD 活性到达峰值时间早于肝胰腺组织, 其活性以及 MDA 含量也低于肝胰腺组织。在释放阶段, 0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的 SOD 活性, 0.05 $\mu\text{g/L}$ 和 0.45 $\mu\text{g/L}$ 两个实验组肝胰腺组织的 SOD 活性均依然显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$), 其余各浓度实验组鳃、肝胰腺组织均能恢复到同期海水对照组水平 ($P > 0.05$)。实验结果表明, 三疣梭子蟹的鳃组织对于 BaP 暴露响应时间比肝胰腺组织更早, 但均具有一定的恢复能力。

关键词: 三疣梭子蟹; 苯并[a]芘; 鳃; 肝胰腺; 毒理学指标

中图分类号: X171 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2015) 02-252-10

Effects of Benzo[a]pyrene Exposure on the Toxicological Parameters in Gill and Hepatopancreas Tissues of *Portunus trituberculatus*

LI Lei^① JIANG Mei^① SHEN Xin-Qiang^① WANG Yun-Long^① WU Qing-Yuan^②
NIU Jun-Xiang^② XU Gao-Peng^②

① East China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Shanghai 200090;

② College of Marine Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China

Abstract: Of the wide range of organic contaminants in the environment, polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) are of concern because several of them show a high carcinogenic and mutagenic activity.

基金项目 上海市科学技术委员会项目 (No. 12231203403), 农业部应对溢油关键技术专项 (No. 2012-2014), 中国水产科学研究院基本科研业务费 (No. 2014A02XK01), 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项 (No. 2014T06);

* 通讯作者, E-mail: xinqiang_shen@hotmail.com;

第一作者简介 李磊, 男, 助理研究员; 研究方向: 海洋生态毒理学; E-mail: zheyilee@126.com.

收稿日期: 2014-06-03, 修回日期: 2014-11-04 DOI: 10.13859/j.cjz.201502011

Benzo[a]pyrene (BaP) is a typical representative of PAHs due to its carcinogenic and mutagenic effects to animals and human. In order to assess biological effect of BaP on the gill and hepatopancreas tissues of *Portunus trituberculatus*, the *P. trituberculatus* were exposed to BaP at two doses (0.45 $\mu\text{g/L}$, 0.05 $\mu\text{g/L}$) for an exposure period of fifteen days and an elimination period of fifteen days; meanwhile, the seawater control group and acetone control group were designed. The detoxifying enzyme activities of ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) (Fig. 1) and glutathione S-transferase (GST) (Fig. 2), the antioxidant enzyme activity of superoxide dismutase (SOD) (Fig. 3) as well as lipid peroxidation (LPO) (Fig. 4) levels in gill and hepatopancreas tissues of *P. trituberculatus* were measured. The experimental data were analyzed with *t* test. The results showed that the activities of four toxicological parameters were significantly induced by BaP in the first day ($P < 0.05$) of BaP exposure compared with the seawater control group over the same time period, and reduced with the increase of concentration of BaP. From an overall perspective, the activities of EROD and GST in the hepatopancreas and the activity of SOD in gill tissues declined after the peaks (Fig. 1, Fig. 2), while the activity of SOD in hepatopancreas tissues and content of malondialdehyde (MDA) in hepatopancreas and gill tissues continued to rise (Fig. 3, Fig. 4). The time of the activities of EROD, GST and SOD reaching their max value in gill tissues was shorter than in the hepatopancreas tissues (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3); the activities of EROD, GST, SOD and content of MDA in gill tissues were lower than in hepatopancreas tissues, too (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 3, Fig. 4). During the elimination period, the activity of SOD in gill tissues with a high exposure concentration (0.45 $\mu\text{g/L}$) (Fig. 3a), and in hepatopancreas tissues with both exposure concentrations could not resume to the level of seawater control group over the same time period ($P < 0.05$) (Fig. 3b); in contrast, the other groups could resume to the level of seawater control group over the same time period ($P > 0.05$) (Fig. 1, Fig. 2, Fig. 4). The results indicate that both gill and hepatopancreas tissues of *P. trituberculatus* possess resuming capacity; gill tissues are more sensitive to BaP than hepatopancreas tissues; EROD, GST, SOD, and MDA all could be used as sensitive biomarkers of BaP toxicity studies.

Key words: *Portunus trituberculatus*; Benzo[a]pyrene; Gill; Hepatopancreas; Toxicological parameter

苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, BaP) 是在海洋环境中广泛存在、致癌性最强的一类多环芳烃 (polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs), 有机物的热解活不完全燃烧是其主要来源, 与其他多环芳烃 (PAHs) 有一定的相关性, 是 PAHs 的典型代表 (Reynaud et al. 2006)。各种来源途径的 BaP 进入水体后, 由于其物理化学性质稳定, 在自然环境中难于降解, 亲脂性强, 能够在生物体内富集并通过食物链进入生态系统 (Kidd et al. 1998)。进入生物体的 BaP 首先进行生物转化, 形成多种中间代谢产物, 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, 具有很强的遗传毒性和免疫毒性 (Carlson

et al. 2002)。7-乙氧基异吩噁唑酮-脱乙基酶 (ethoxyresorufin-O-deethylase, EROD) (Beyer et al. 1996)、谷胱甘肽硫转移酶 (glutathione S-transferase, GST) (Fitzpatrick et al. 1995) 等解毒代谢酶和超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) (任加云等 2006) 等抗氧化酶以及脂质过氧化 (lipid peroxidation, LPO) 水平 (Thomas et al. 1990) 等, 可以直接反映 BaP 毒性作用。目前 BaP 广泛应用于对海洋双壳贝类 (Akcha et al. 2000)、鱼类 (Tridico et al. 2010)、虾类 (Silva et al. 2013)、蟹类 (van Oosterom et al. 2010) 等生物的毒理学研究以及水域生态系统的健康风险评价中, 但还未见 BaP 对三疣梭子蟹 (*Portunus trituberculatus*) 不

同组织毒理学指标的比较分析研究。本文以我国重要的养殖经济动物三疣梭子蟹为研究对象,通过对BaP胁迫下三疣梭子蟹的呼吸器官——鳃组织,重要的解毒代谢器官——肝胰腺的毒理指标变化的比较分析,以期进一步了解三疣梭子蟹不同组织对BaP胁迫的响应,为BaP的毒理学研究提供更多的基础资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用海水取自自然海区,盐度为 20 ~ 21, pH 为 8.1,海水经沉淀、砂滤和充分曝气(24 h 以上)后备用,由于生物幼体对污染物的敏感性比成体更强,因此本实验受试生物选择三疣梭子蟹幼体,受试三疣梭子蟹(土塘养殖)由江苏省金海岸水产研究所提供,实验前先将三疣梭子蟹驯养 15 d,然后挑选健康个体进行实验,其平均体重为 (10.89 ± 2.20) g ($n = 30$)。实验使用 150 L 的玻璃容器。BaP 购自 Sigma 公司(Sigma-Aldrich Corporation, USA),使用丙酮作为助溶剂配制成母液。

1.2 实验方法

实验分为富集和释放两个阶段,分别进行 15 d。在经过预实验确定 BaP 的安全浓度后,将母液用过滤海水稀释成 0.45 μ g/L 和 0.05 μ g/L 两个实验浓度组,另设海水对照组(0 μ g/L)和丙酮对照组(丙酮与溶液总体积比小于 0.01%),每组设 3 个重复。每个实验容器内分别放入 60 只三疣梭子蟹,保持 24 h 充氧,溶氧量大于 5 mg/L,水温为 23.6 ~ 24.4 $^{\circ}$ C。每天定时定量投喂配合饲料,8:00 时和 18:00 时各投喂一次,投喂量为三疣梭子蟹体重的 2%,并及时将行为异常或者死亡的三疣梭子蟹个体去除。

富集阶段:富集实验采用半静态法进行,加入海水量为 100 L,每 24 h 更换全部相应浓度的实验用水。于第 0、1、5、10、15 天分别采集 3 只三疣梭子蟹样品,解剖取其鳃、肝胰腺组织,迅速冷冻于液氮中备用。释放阶段:

富集阶段结束后,将每个容器中的实验溶液全部排出,在流速 3.6 L/h 的流水条件下进行三疣梭子蟹体内 BaP 的释放实验。于第 18、20、25、30 天分别采集 3 只三疣梭子蟹,解剖取其鳃、肝胰腺组织,迅速冷冻于液氮中备用。

1.3 样品制备与毒理学指标的测定

1.3.1 样品制备 将鳃、肝胰腺组织置于 pH 7.7 预冷(0 ~ 4 $^{\circ}$ C)的磷酸盐缓冲液中($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.125 mol/L, KH_2PO_4 0.125 mol/L, Na_2EDTA 0.05 mol/L),冰浴匀浆 3 min,转速为 12 000 r/min;然后将匀浆液在 10 000 r/min(4 $^{\circ}$ C)下离心 20 min,取上清液分别测定 EROD 和 GST 的活性。将鳃、肝胰腺组织在预冷重蒸水(0 ~ 4 $^{\circ}$ C)冰浴中匀浆 3 min,转速为 12 000 r/min,然后匀浆液在 4 $^{\circ}$ C 10 000 r/min 下离心 20 min 后,取上清液测定 SOD 活性。脂质过氧化(LPO)水平用丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量来衡量,将肝胰腺组织在 0 ~ 4 $^{\circ}$ C 的 Tris-HCl(pH 7.4, 50 mmol/L)缓冲液中冰浴匀浆 3 min,转速为 12 000 r/min,继续将匀浆液在 3 000 r/min 离心 10 min 后,取上清液测定 MDA 含量。

1.3.2 毒理学指标的测定 采用快速终止荧光法(Pohl et al. 1980)测定 EROD 活性,测定在 pH 7.6 的 NaH_2PO_4 缓冲液(0.1 mol/L) 4 $^{\circ}$ C 下进行,反应温度为 22 $^{\circ}$ C,于 970CRT 荧光分光光度计(上海三科仪器有限公司)中测定 EROD 的活性,激发波长为 535 nm,发射波长为 585 nm,开始反应后 30 s 计时,每 30 s 记录一次荧光值至 3 min,将数据通过线性回归求其斜率,将数据归一化后求得其活性。采用 Habig 等(1974)的方法测定 GST 活性,在两个石英比色杯中分别加入 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液 2.9 ml, 50 μ l 60 mmol/L 二硝基氯苯, 50 μ l 60 mmol/L 谷胱甘肽(glutathione)混匀,一个作为空白对照,另一个用微量注射器加入 10 μ l 酶液,立即混匀并计时,用 752N 紫外分光光度计(上海光学仪器厂)于波长 340 nm 处测其吸光度,每隔 30 s 读数一次,直至底物反应完

全。采用黄嘌呤氧化酶法(李康等 2006)测定 SOD 活性,测定参照试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行,用 722S 可见分光光度计(上海棱光技术有限公司)于波长 550 nm 处测其吸光度,每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50%时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U/mg)。MDA 含量采用硫代巴比妥酸法测定,测定参照试剂盒(南京建成生物工程研究所)说明书进行,用 722S 可见分光光度计于波长 530 nm 处测其吸光度,单位为每毫克组织蛋白丙二醛的含量(nmol/mg)。蛋白含量采用考马斯亮兰法进行测定,以试剂盒中的蛋白标准液为标准蛋白。

1.4 数据的处理和分析

所有数据均以3个重复组数据的平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示,并采用 *t* 检验法统计分析海水对照组与实验组之间的差异,显著性水平设为0.05。

2 结果与分析

2.1 丙酮作为BaP助溶剂的可行性

在本实验中,使用丙酮溶解BaP,丙酮对照组的各毒理指标与海水对照组相比变化不显著($P > 0.05$),表明采用丙酮作为助溶剂是可行的。

2.2 BaP对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织EROD活性的诱导作用

在富集阶段,与同期海水对照组相比较,第1天时0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ BaP实验组三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织的EROD活性均被显著诱导增加($P < 0.05$) (图1)。0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ 两个实验组鳃组织的EROD活性在第1天即达到峰值,分别为第0天的4.96倍、3.09倍,随后均呈持续下降的趋势,在第10天基本达到稳定状态,但依然高于同期海水对照组水平($P < 0.05$) (图1a)。两个实验组肝胰腺组织的EROD活性呈持续上升趋势,0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组肝胰腺组织的EROD活性在第10天达到峰值,为第0天的5.62倍,随后下降,但第15天时

依然显著高于同期海水对照组水平($P < 0.05$),0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组肝胰腺组织的EROD活性在第15天达到峰值,为第0天的3.44倍,但与第10天时的EROD活性并无显著性差异($P > 0.05$) (图1b)。在整个富集阶段,0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组诱导的程度比0.45 $\mu\text{g/L}$ 组弱(图1)。

在释放阶段,实验组鳃、肝胰腺组织的EROD活性均呈持续下降的趋势,0.05 $\mu\text{g/L}$ 和0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的EROD活性分别在第18天和第25天基本恢复到同期海水对照组水平($P > 0.05$);实验组肝胰腺组织的EROD活性分别在第20天和第30天基本恢复到同期海水对照组水平($P > 0.05$) (图1)。

2.3 BaP对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织GST活性的诱导作用

在富集阶段,第1天时0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织的GST活性均显著受到诱导升高($P < 0.05$) (图2)。0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的GST活性在第1天时达到峰值,分别为第0天的2.74倍和2.04倍,随后GST活性均呈持续下降的趋势,但15天时0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的GST活性依然显著高于同期海水对照组水平($P < 0.05$),与第10天时GST的活性无显著性差异($P > 0.05$),0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的GST活性则第5天时基本达到稳定状态,且依然高于同期海水对照组水平($P < 0.05$) (图2a)。0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ 两个实验组肝胰腺组织的GST活性在第1天后均继续上升,在第10天达到峰值,分别为第0天的3.05、2.28倍,随后0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组的活性下降,但第15天时依然显著高于对照组水平($P < 0.05$)。0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组在第10天时基本达到稳定状态($P < 0.05$)。在整个富集阶段,0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组诱导的程度比0.45 $\mu\text{g/L}$ 组弱(图2)。

在释放阶段,两个实验组鳃、肝胰腺组织的GST活性均呈持续下降的趋势,0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的GST活性分别第25天、第18天基本恢复到同期海水对照组水平

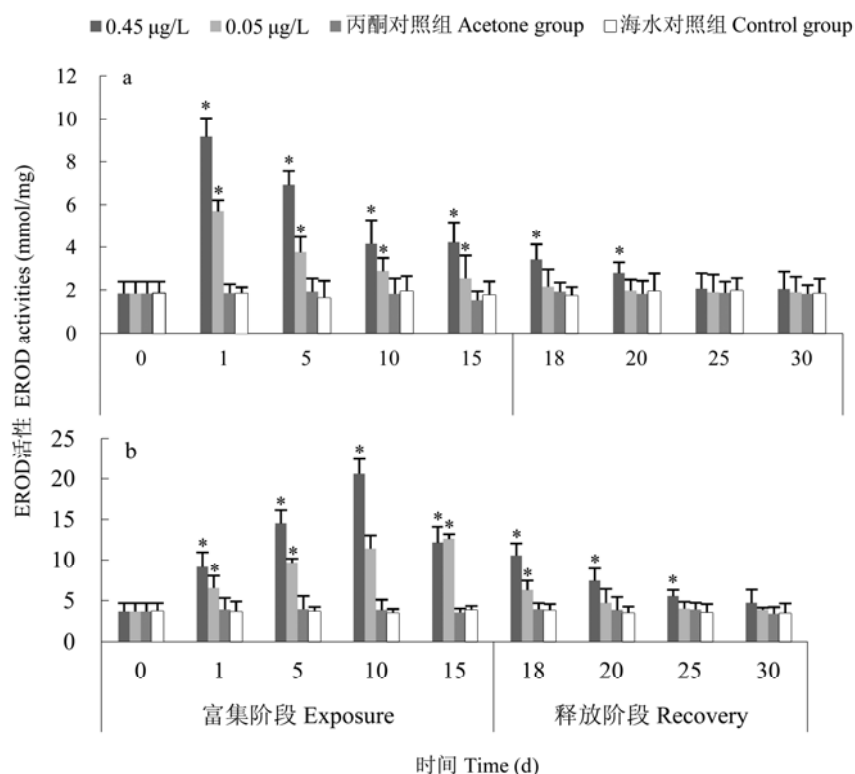


图1 苯并[a]芘 (BaP) 对三疣梭子蟹鳃 (a)、肝胰腺组织 (b) EROD活性的影响
 Fig. 1 Effects of benzo[a]pyrene (BaP) on EROD activities of gill (a) and hepatopancreas (b) in *Portunus trituberculatus*

* 表示与同期海水对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Single asterisk (*) indicates significant difference between the treatment groups and the seawater control group over the same time period ($P < 0.05$).

($P > 0.05$); 0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组肝胰腺组织的GST活性在第30天依然显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$), 0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组肝胰腺组织的GST活性在第20天基本恢复到同期海水对照组水平 ($P > 0.05$) (图2)。

2.4 BaP对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织SOD活性的诱导作用

在富集阶段, 0.45 $\mu\text{g/L}$ 和0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组三疣梭子蟹鳃组织的SOD活性均显著受到诱导 ($P < 0.05$), 并呈持续上升的趋势, 在第5天时均达到峰值, 分别为第0天的2.36倍、1.71倍, 随后持续下降 (图3)。但15天时两个实验组鳃组织的SOD活性依然均显著高于同期海水对照

组水平 ($P < 0.05$) (图3a)。两个实验组肝胰腺组织的SOD活性持续继续上升, 至第15天时分别为第0天的3.04、2.38倍, 均显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$) (图3b)。在整个富集阶段, 0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组诱导的程度比0.45 $\mu\text{g/L}$ 组弱 (图3)。

在释放阶段, 两个实验组鳃组织的SOD活性均呈先上升后下降的趋势, 0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的SOD活性在第30天时依然显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$), 0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的SOD活性在第25天基本恢复到同期海水对照组水平 ($P > 0.05$); 两个实验组肝胰腺组织的SOD活性均呈持续下降的趋势, 但在

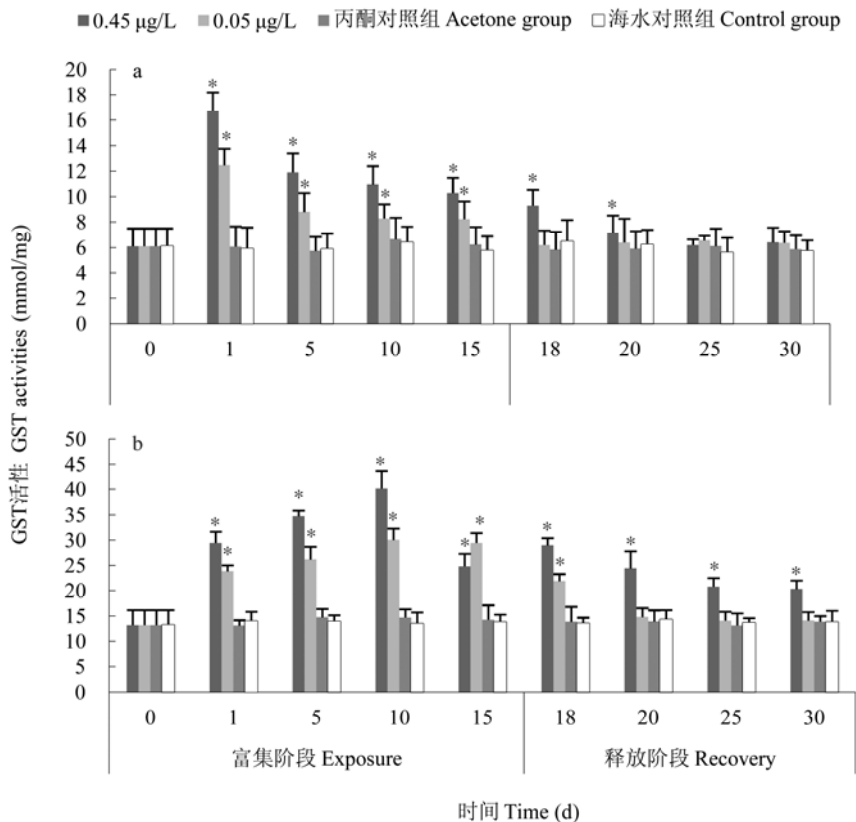


图2 苯并[a]芘 (BaP) 对鳃 (a)、肝胰腺组织 (b) GST活性的影响

Fig. 2 Effects of benzo[a]pyrene (BaP) on GST activities of gill (a) and hepatopancreas (b)

* 表示与同期海水对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Single asterisk (*) indicates significant difference between the treatment groups and the seawater control group over the same time period ($P < 0.05$).

第30天时均依然显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$) (图3)。

2.5 BaP对三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织MDA含量的影响

在富集阶段, 0.45 µg/L和0.05 µg/L实验组三疣梭子蟹鳃、肝胰腺组织的MDA含量即均显著上升 ($P < 0.05$) 并均呈持续上升的趋势, 在第15天时分别为第0天的16.18倍、9.10倍和19.39倍、10.90倍 (图4)。

在释放阶段, 两个实验组鳃组织的MDA含量均呈持续下降的趋势, 0.45 µg/L和0.05 µg/L实验组鳃组织的MDA含量在第25天、第20天时基本恢复到同期海水对照组水平 ($P > 0.05$);

实验组肝胰腺组织的MDA含量在第30天、第25天时基本恢复到对同期海水对照组水平 ($P > 0.05$) (图4)。

3 讨论

苯并[a]芘 (BaP) 可高度诱导细胞色素P4501A, 表明BaP能诱导其自身的代谢 (Eberhart et al. 1992)。EROD是典型的细胞色素P450依赖的混合功能氧化酶 (mixed function oxygenases, MFO) 的I相代谢酶, 可被苯并[a]芘 (BaP)、多环芳烃 (PAHs)、多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 等外源污染物所诱导, 催化生物体中内源和外源脂

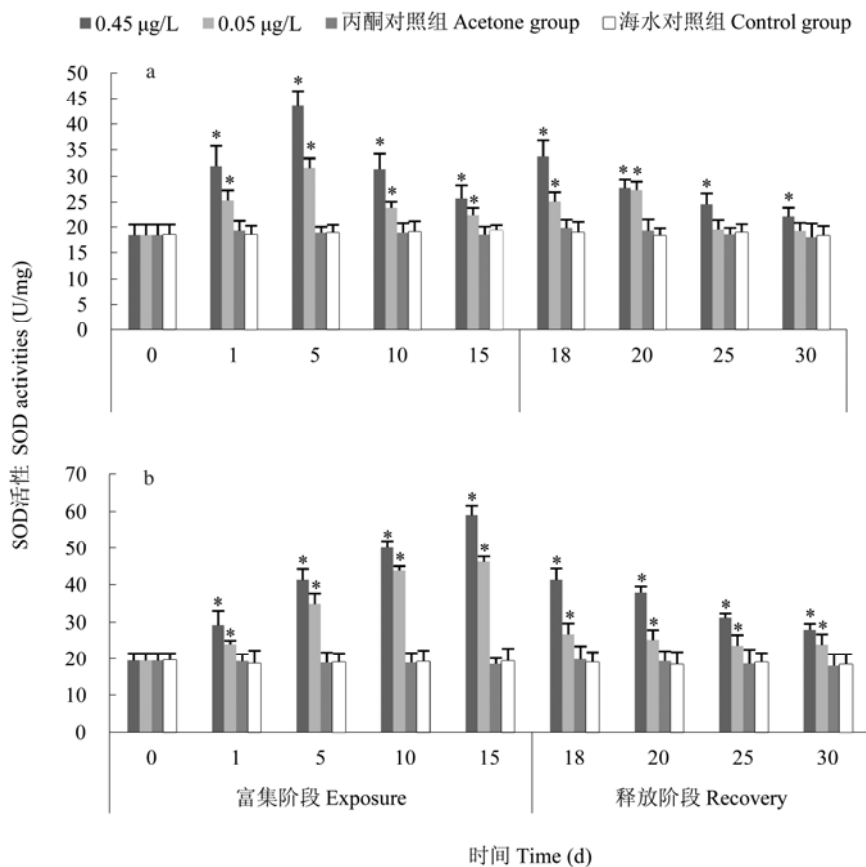


图3 苯并[a]芘 (BaP) 对鳃 (a)、肝胰腺组织 (b) SOD活性的影响

Fig. 3 Effects of benzo[a]pyrene (BaP) on SOD activities of gill (a) and hepatopancreas (b)

* 表示与同期海水对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Single asterisk (*) indicates significant difference between the treatment groups and the seawater control group over the same time period ($P < 0.05$).

溶性底物的降解过程，是一种评价有机污染生物毒性的敏感酶学指标，是暴露于污染环境的生物体的真实反应参数 (Gagnon et al. 2000, Gravato et al. 2002)。在随后的II相反应中，在GST的催化下，生物内源性的水溶性分子与I相代谢产物结合，促使脂溶性物质转化为水溶性物质排出体外，从而起解毒作用，其表达水平是决定细胞对化学物敏感性至关重要的因素 (Fitzpatrick et al. 1995, Gadagbui et al. 2000)。在本研究的富集阶段，0.45 µg/L实验组的鳃和肝胰腺组织对EROD、GST的诱导效应均高于同期0.05 µg/L实验组，这种酶的诱导程度随

BaP暴露浓度的增加而增大的相似结果在鱼 (黎雯等 2000)、贝 (任加云等 2006) 的研究中也有报道。两个实验组鳃、肝胰腺组织的EROD和GST活性的变化趋势也表现出一定的同步性，均表现为先上升后下降的钟型 (bell) 曲线，EROD、GST活性被诱导达到峰值的时间点也一致，但鳃组织的EROD、GST活性被诱导上升达到峰值时间明显短于肝胰腺组织，表明鳃组织对BaP暴露的响应时间要短于肝胰腺组织，同时鳃组织的EROD、GST活性达到峰值时的活性也低于肝胰腺组织。其原因是鳃组织与污染物直接接触，是体内吸收污染物的

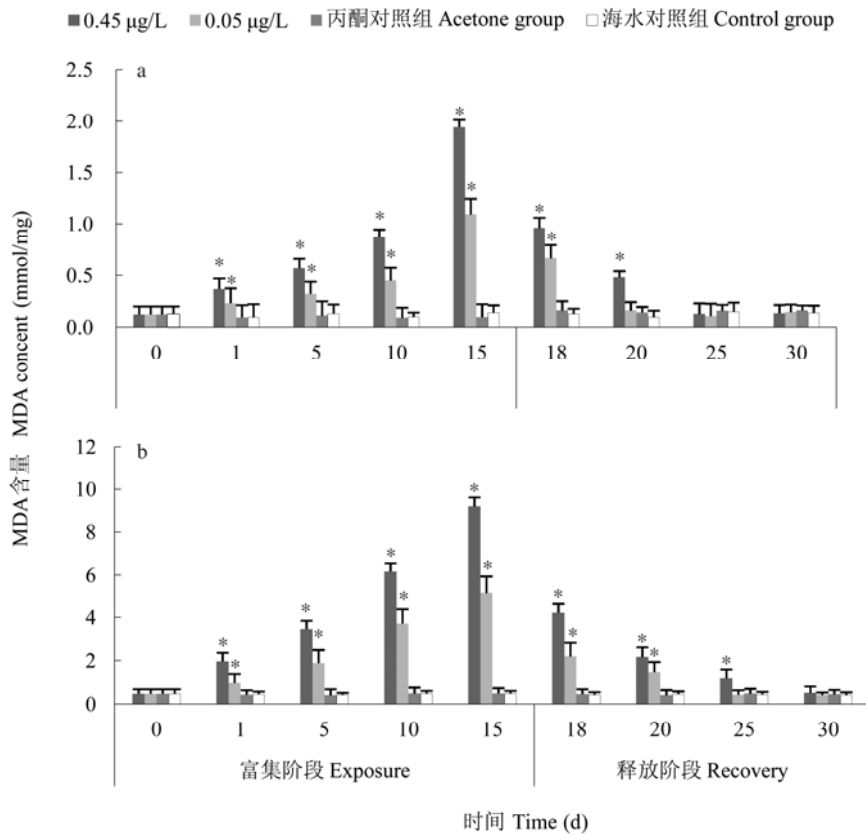


图4 苯并[a]芘 (BaP) 对鳃 (a)、肝胰腺组织 (b) MDA含量的影响

Fig. 4 Effects of benzo[a]pyrene (BaP) on MDA contents of gill (a) and hepatopancreas (b)

* 表示与同期海水对照组相比差异显著 ($P < 0.05$)。

Single asterisk (*) indicates significant difference between the treatment groups and the seawater control group over the same time period ($P < 0.05$).

重要位点 (Jonsson et al. 2006), 肝胰腺组织则不仅是许多内源性和外源性化合物代谢解毒的场所, 也是参与免疫反应的相关器官, 其代谢转化功能更活跃 (陈玛丽等 2008), 因此鳃组织的EROD、GST活性低于肝胰腺组织。Santos等 (2004) 的研究也证实欧洲鳗鲡 (*Anguilla Anguilla*) 的肝胰腺组织相比鳃、肾等组织具有更强的解毒代谢功能。两个实验组鳃、肝胰腺组织EROD和GST活性达到峰值后随之均下降, 尽管15天时仍显著高于对照组水平 ($P < 0.05$), 但这种趋势表明, 随着BaP富集量的增加, BaP在体内代谢产生的中间代谢产物已经

超过了EROD和GST的解毒能力, 导致了相关表达基因的构型改变 (Solé et al. 2001), 并最终表现为对EROD和GST的活性产生抑制作用, 这种反应在包括哺乳动物、鸟类、鱼等生物中均普遍存在 (王春光 2006)。在释放阶段结束后, 除了0.45 µg/L实验组肝胰腺组织的GST活性外, 两个实验组鳃、肝胰腺组织EROD和GST活性基本恢复至与同期海水对照组水平并保持稳定状态 ($P > 0.05$), 说明尽管在富集阶段的后期EROD和GST活性被诱导的程度下降, 但并未造成不可逆的损伤, 依然可以通过自身修复能力恢复到正常水平。0.45 µg/L实验

组肝胰腺组织的GST活性依然显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$), 表明在释放15天后肝胰腺组织中依然残留有相当含量的BaP, BaP较难被生物体完全代谢。而BaP较难在生物体完全代谢已被海洋贝类(杨慧赞 2008)等生物的富集、释放实验所验证。

污染物经过生物 I 相、II 相转化过程中会产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 和部分 H_2O_2 , 如果不能及时清除就会对生物体造成氧化损伤, 在防御机体氧化损伤中抗氧化酶 SOD 起到了重要作用, 其功能可以将 O_2 转化成 H_2O_2 , 是暴露于污染物中诱导的氧化应激响应最好的指示物 (Thomas et al. 1990)。SOD 存在于所有的需氧组织, 且在肝、肾组织中活性最强 (林建清 2008)。在本研究的富集阶段, 两个浓度实验组鳃组织的 SOD 活性整体变化均表现为先上升后下降的钟型曲线, 肝胰腺组织的 SOD 活性则表现为持续上升的趋势。同样, 鳃组织的 SOD 活性到达峰值时间也短于肝胰腺组织, 峰值时活性也低于肝胰腺组织, 也验证了鳃组织比肝胰腺组织对 BaP 更敏感, 酶活性也更易被抑制。两个浓度实验组鳃组织的 SOD 活性达到峰值后下降, 尽管第 15 天时仍然显著高于同期海水对照组水平 ($P < 0.05$), 但此时依然有大量的活性氧 (ROS) 存在, SOD 活性依然被抑制。在释放阶段, 两个实验组鳃组织的 SOD 活性表现为先升高再逐渐下降, 其原因可能是 SOD 酶活性较为敏感, 生物体解除污染物暴露后可呈现一定范围的“过度应激”反应。0.05 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的 SOD 活性基本能恢复到同期海水对照组水平 ($P > 0.05$), 而 0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组鳃组织的 SOD 活性以及 0.05 $\mu\text{g/L}$ 和 0.45 $\mu\text{g/L}$ 实验组肝胰腺组织的 SOD 活性均依然显著高于同期海水对照组 ($P < 0.05$), 也进一步表明了释放 15 天后鳃、肝胰腺组织中依然残留有相当含量的 BaP。

当污染过于严重, 超出甚至抑制体内抗氧化防御酶系的功能时, 可导致脂质过氧化作用, 进而造成生物膜损伤, DNA 损伤以及酶失活

等, 这一过程与抗氧化酶有密切的相关性, 脂质过氧化水平可以用丙二醛 (MDA) 含量代表, 已经被作为一种细胞膜氧化损伤的指标 (Thomas et al. 1990)。在富集阶段, 两个实验组的 MDA 含量均在第 1 天时开始显著升高 ($P < 0.05$) 并持续上升, 表明此时已经开始产生脂质过氧化作用并趋于严重, 且作为解毒代谢中心的肝胰腺组织受到的脂质过氧化作用高于鳃组织, 之后活性氧继续增加, 脂质过氧化水平也持续上升。释放阶段结束后, 两个实验组 MDA 含量基本能恢复到同期海水对照组水平 ($P > 0.05$)。这是由于释放阶段 BaP 不断被排出体外, 活性氧的产生相应减少, 降低了抗氧化系统的胁迫压力, SOD 等抗氧化酶活性逐渐恢复。但肝胰腺组织 MDA 含量恢复时间长于鳃组织, 表明作为主要的解毒代谢器官, 肝胰腺组织受到的脂质过氧化作用相比较鳃组织更高, 同时也表明, 一定 BaP 胁迫浓度与时间范围导致的氧化损伤是可逆的。

参 考 文 献

- Akcha F, Izuel C, Venier P, et al. 2000. Enzymatic biomarker measurement and study of DNA adduct formation in benzo[a]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*. *Aquatic Toxicology*, 49(4): 269–287.
- Beyer J, Sandvik M, Hylland K, et al. 1996. Contaminant accumulation and biomarker responses in flounder (*Platichthys flesus* L.) and Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) exposed by caging to polluted sediments in Sørkjorden, Norway. *Aquatic Toxicology*, 36(1/2): 75–98.
- Carlson E A, Li Y, Zelikoff J T. 2002. Exposure of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) to benzo[a]pyrene suppresses immune function and host resistance against bacterial challenge. *Aquatic Toxicology*, 56(4): 289–301.
- Eberhart J, Coffing S L, Anderson J N, et al. 1992. The time-dependent increase in the binding of benzo[a]pyrene to DNA through (+)-anti-benzo[a]pyrene-7, 8-diol-9, 10-epoxide in primary rat hepatocyte cultures results from induction of cytochrome P450IA1 by benzo[a]pyrene treatment.

- Carcinogenesis, 13(2): 297–301.
- Fitzpatrick P J, Sheehan D, Livingstone D R. 1995. Studies on isoenzymes of glutathione S-transferase in the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* with exposure to pollution. *Marine Environmental Research*, 39(1/4): 241–244.
- Gadagbui B K M, James M O. 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. *Aquatic Toxicology*, 49(1/2): 27–37.
- Gagnon M M, Holdway D A. 2000. EROD induction and biliary metabolite excretion following exposure to the water accommodated fraction of crude oil and to chemically dispersed crude oil. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 38(1): 70–77.
- Gravato C, Santos M A. 2002. Juvenile sea bass liver P450, EROD induction, and erythrocytic genotoxic responses to PAH and PAH-like compounds. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 51(2): 115–127.
- Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. 1974. Glutathione S-transferases. The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *The Journal of Biological Chemistry*, 249(22): 7130–7139.
- Jonsson E M, Abrahamson A, Brunstrom B, et al. 2006. Cytochrome P4501A induction in rainbow trout gills and liver following exposure to waterborne indigo, benzo[a]pyrene and 3, 3', 4, 4', 5-pentachlorobiphenyl. *Aquatic Toxicology*, 79(3): 226–232.
- Kidd K A, Hesslein R H, Ross B J, et al. 1998. Bioaccumulation of organochlorines through a remote freshwater food web in the Canadian Arctic. *Environmental Pollution*, 102(1): 91–103.
- Pohl R J, Fouts J R. 1980. A rapid method for assaying the metabolism of 7-ethoxyresorufin by microsomal subcellular fractions. *Analytical Biochemistry*, 107(1): 150–155.
- Reynaud S, Deschaux P. 2006. The effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on the immune system of fish: a review. *Aquatic Toxicology*, 77(2): 229–238.
- Santos M A, Pacheco M, Ahmad I. 2004. *Anguilla anguilla* L. antioxidants responses to *in situ* bleached kraft pulp mill effluent outlet exposure. *Environment International*, 30(3): 301–308.
- Silva C, Oliveira C, Gravato C, et al. 2013. Behaviour and biomarkers as tools to assess the acute toxicity of benzo (a) pyrene in the common prawn *Palaemon serratus*. *Marine Environmental Research*, 90: 39–46.
- Solé M, Porte C, Albaigés J. 2001. Hydrocarbons, PCBs and DDT in the NW Mediterranean deep-sea fish *Mora moro*. *Deep Sea Research Part I: Oceanographic Research Papers*, 48(2): 495–513.
- Thomas J P, Maiorino M, Ursini F, et al. 1990. Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation. *In situ* reduction of phospholipid and cholesterol hydroperoxides. *Journal of Biological Chemistry*, 265(1): 454–461.
- Trídico C P, Rodrigues A C F, Nogueira L, et al. 2010. Biochemical biomarkers in *Oreochromis niloticus* exposed to mixtures of benzo[a]pyrene and diazinon. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 73(5): 858–863.
- van Oosterom J, King S C, Negri A, et al. 2010. Investigation of the mud crab (*Scylla serrata*) as a potential bio-monitoring species for tropical coastal marine environments of Australia. *Marine Pollution Bulletin*, 60(2): 283–290.
- 陈玛丽, 瞿璟琰, 刘青坡, 等. 2008. 四溴双酚-A和五溴酚对红鲫肝脏组织和超微结构的影响. *安全与环境学报*, 8(4): 8–11.
- 李康, 周忠良, 陈立桥, 等. 2006. 苯并[a]芘对鲫鱼生物标志物的影响研究. *环境科学研究*, 19(1): 91–95.
- 黎雯, 徐盈, 吴文忠, 等. 2000. 鱼肝EROD酶活力诱导作为二恶英的水生态毒理学指标. *水生生物学报*, 24(3): 201–207.
- 林建清. 2002. 生物标志物法研究多环芳烃对海水养殖鱼类的毒性效应. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 8–9.
- 任加云, 潘鲁青, 苗晶晶. 2006. 苯并(a)芘和苯并(k)荧蒽混合物对栉孔扇贝毒理学指标的影响. *环境科学学报*, 26(7): 1180–1186.
- 王春光. 2006. 苯并(a)芘暴露对真鲷 (*Pagrus major*) 细胞DNA的损伤及肝脏P4501A1的毒性效应. 厦门: 厦门大学硕士学位论文, 10–12.
- 杨慧赞. 2008. 苯并[a]芘在栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 体内的毒代与毒效动力学研究. 青岛: 中国海洋大学硕士学位论文, 29–35.
- 林建清. 2002. 生物标志物法研究多环芳烃对海水养殖鱼类的毒性效应. 厦门: 厦门大学博士学位论文, 8–9.