

多氯联苯对剑尾鱼超氧化物歧化酶活性的影响

方展强,张凤君,郑文彪,马广智

(华南师范大学生命科学学院,广州 510631)

【摘要】 目的 研究多氯联苯(PCBs)暴露对剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响,探讨剑尾鱼器官组织内SOD活性变化作为环境风险评价(ERA)的有效生物学标记的可行性。方法 测定了PCBs对剑尾鱼30 d的半致死浓度(LC₅₀);使用浸浴法以0、2、50 μg/L三个PCBs浓度为剑尾鱼染毒,定量测定了72 h内肝、鳃及卵巢组织中的SOD的活性变化。结果 PCBs对剑尾鱼的30 d LC₅₀为10.580 μg/L;PCBs对剑尾鱼肝脏和卵巢的SOD活性有明显($P < 0.01$)的影响。在最初染毒的12 h内,SOD活性略有上升,但随暴露时间延长,浓度增加,肝和卵巢的SOD活性均呈下降趋势。此外,结果还显示肝组织的SOD活性较高于卵巢的SOD活性,表明不同器官组织的SOD活性对PCBs胁迫的敏感性存在一定的差异。实验中鳃组织SOD活性在PCBs暴露后其变化不明显($P > 0.05$)。结论 表明剑尾鱼肝细胞SOD活性可作为环境风险评价(ERA)的有效生物学标记。

【关键词】 多氯联苯化合物;超氧化物歧化酶;剑尾鱼

【中图分类号】 X820.4 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2004)02-0096-04

Effects of Polychlorinated Biphenyls on Activity of Superoxide Dismutase in Swordtails (*Xiphophorus helleri*)

FANG Zharr-qiáng, ZHANG Feng-jun, ZHENG Werr-biao, MA Guang-zhi

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

【Abstract】 Objective The effect of polychlorinated biphenyls (PCBs) on activity of superoxide dismutase (SOD) in swordtails (*Xiphophorus helleri*) is studied in order to test if the gill, ovary or hepatic SOD activity in fish can be considered a valid bio marker for environmental risk assessment (ERA). **Methods** Swordtails were obtained from Pearl River Fisheries Research Institute. Median lethal concentration (30 d LC₅₀) toxicity tests were conducted. With swordtails exposed to PCBs with 0 μg/L, 2 μg/L, 50 μg/L for 7 days, the activities of SOD of liver, gill and ovary tissues in 72 h were determined by means of improved pyro gallol autoxidation. **Results** The LC₅₀ of 30 d for PCBs to Swordtails was 10.580 μg/L. The activities of SOD in gill didn't make any obvious change at low and high PCBs concentrations in a short time ($P > 0.05$). However, the activities of SOD in liver and ovary tissues were influenced by PCBs remarkably ($P < 0.01$). The liver and ovary SOD activities in fish would increase with the exposure time going at the first 12 h, and then, there was a down trend coupled with the extend of exposure time. PCBs inhibited the activities in liver and ovary after 12 h, the inhibiting strength would increase with the prolonging of exposure time and the concentration enhancing. The results also showed that the activities to PCBs of SOD in liver were higher than those in ovary, which would be associated with their different sensitivities to PCBs. **Conclusion** The results indicated that the hepatic SOD activity in Swordtail fish could be considered a valid biomarker for environmental risk assessment (ERA).

【Key words】 Polychlorinated biphenyls; Superoxide dismutase; *Xiphophorus helleri*

[基金项目]广东省重点攻关科技项目资助(2KB05402N)。

[作者简介]方展强(1953—),男,广东普宁人,教授,硕士,从事环境科学方面的研究工作。Tel: (020)85211602; Email: fangzq@scnu.edu.cn

多氯联苯(polychlorinated biphenyls, PCBs)已被列为重要污染物,其对人类生活环境造成严重污染及对人类健康带来了危害^[1]。已发现,珠江三角洲水体已受PCBs的污染,珠江河口区的翡翠贻贝体内

已富集一定量的 PCBs^[2]。因而,在受到 PCBs 污染的地区开展 PCBs 对环境产生的影响及对生物体的毒性研究,对于环境监测和环境治理具有重要意义。剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 是一种热带淡水小型鱼类,原产南美洲,其具有体型小、繁殖周期短,易饲养,可在实验室条件下进行纯化培育;珠江水产研究所研究开发将该鱼种作为实验动物目的而对其进行定向的纯化培育,目前已通过近亲繁殖达 18 代。由于剑尾鱼对有机氯污染物、重金属敏感,因此可探讨作为水环境污染的“活检测器”,成为生态毒理学测试的理想实验动物^[3]。本实验研究多氯联苯对剑尾鱼超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性的影响,为以上的研究提供有益的资料。

1 材料与方法

1.1 实验鱼及驯养

剑尾鱼体长 4.4~5.0 cm,体重 4.5~4.8 g,为同批孵化的性成熟雌鱼,取自珠江水产研究所。实验于 2001 年 4~5 月在华南师范大学鱼类研究室进行,剑尾鱼先驯养在水族箱 2 周后进行。水源为充分曝气的自来水,水温(16±2)℃,pH 为 6.8,水硬度为 2.4 度(德国度)。饲料由珠江水产研究所提供,研碎成直径约 1/2 米粒大小,每天投喂两次。

1.2 PCBs 对剑尾鱼 30 d 的 LC₅₀ 及染毒实验

实验鱼分 0、0.08、0.4、2、10 和 50 μg/L 6 个 PCBs 浓度组,每组放鱼 10 条,雌雄各半。记录其 10、20、30 d 内的死亡数,镊子夹住尾柄而无反应为死亡。测定 PCBs 对剑尾鱼 30 d 的 LC₅₀ 值。染毒实验分 0、2 和 50 μg/L 3 个 PCBs 浓度组。每组实验均设平行组。每组放鱼 16 条,每隔两天更换一次水样,每天两次喂食前均彻底吸出水族箱中残留的饵料及废物,每组均用同样管径的气头昼夜充气。每 12、24、48 和 72 h 各取 4 条活鱼快速剖取肝脏、鳃及卵巢放入 1.5 mL 离心管中置于 -40℃ 冰箱冷冻待处理。

1.3 样品处理及 SOD 活性测定

每个鳃样品(80 mg)加预冷的双蒸水 6 mL,在冰浴的条件下用超声波细胞破碎仪匀浆,仪器状态设为每隔 4 s 匀浆 2 s,共 30 次;每个肝样品(50 mg)加预冷的双蒸水 4 mL,处理方法同鳃样品;每个卵巢样品(150 mg)加预冷的双蒸水 6 mL,在冰浴条件下用超声波细胞破碎仪匀浆,仪器状态设为每隔 4 s 匀浆 2 s,共 40 次。匀浆好的样品吸取 1.5 mL 用冷冻离心机离心(10000 r/min,10 min),取上清液于

-40℃ 冰箱冷冻保存,用于测定 SOD 活性。SOD 活性的测定方法,采用改良邻苯三酚自氧化法^[4],酶活性单位的定义如下算式:

$$\text{SOD 活性单位 (U)} = \frac{0.07 - \text{O.D.}_{325/\text{min}}}{0.070} \times 100\% \times \text{反应液总体积}$$

SOD 酶比活力 (U/mg) = SOD 酶活性单位 (U) / 蛋白质含量 (mg)。

1.4 数据处理与分析

实验数据用两次重复的平均数及标准差表示,不同处理组数据间的差异应用 SPSS 软件,采用成对样本 T 检验法进行分析, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异, $P < 0.01$ 认为存在极显著差异。

2 结果

2.1 PCBs 对剑尾鱼的 30 d LC₅₀

PCBs 对剑尾鱼的急性毒性实验结果用概率单位法 (Probit method) 可求出 PCBs 对剑尾鱼的 30 d LC₅₀ = 10.580 μg/L。

2.2 PCBs 暴露对剑尾鱼 SOD 活性的影响

2.2.1 肝组织 SOD 活性

表 1 的结果显示,PCBs 各个浓度分别暴露 12 h 后剑尾鱼肝组织的 SOD 活性略有升高,经 24 h 后测得的 SOD 活性与对照组相比虽然有降低的趋势,但无明显的变化 ($P > 0.05$); 2 μg/L PCBs 暴露 48 h 后 SOD 活性与对照组相比显著降低 ($P < 0.05$), 50 μg/L PCBs 暴露 48 h 后肝组织的 SOD 活性与对照组相比极显著地降低 ($P < 0.01$); 2 μg/L 与 50 μg/L PCBs 暴露 72 h 后的剑尾鱼肝组织活性则有显著的降低 ($P < 0.05$)。

2.2.2 卵巢 SOD 活性

表 2 的结果显示,2 μg/L 暴露 12 h 后 SOD 活性与对照组相比略有升高,但不显著 ($P > 0.05$); 50 μg/L 的 PCBs 暴露 48 h 和 72 h 后 SOD 活性与对照组相比有显著性降低 ($P < 0.05$); 50 μg/L PCBs 暴露 24 h 后与对照组相比有极显著的下降趋势 ($P < 0.01$)。结果表明,暴露的 12 h 内, SOD 活性有上升的趋势,但随暴露时间的延长,与对照组相比,各浓度组卵巢 SOD 活性逐渐下降。

2.2.3 鳃组织 SOD 活性

表 3 的结果显示,各个浓度的 PCBs 暴露后在 72 h 内剑尾鱼鳃的 SOD 活性变化与对照相比,虽有降低的趋势,但不显著 ($P > 0.05$)。

表 1 PCBs 对剑尾鱼肝组织 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10$)Tab. 1 Effect of PCBs on the SOD activity of Swordtails liver tissues ($\bar{x} \pm s, n = 10$)

PCBs 浓度 ($\mu\text{g/L}$) PCBs concentration	酶活力 (U/mg) Enzyme activity			
	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组 Control	0.380 \pm 0.014	0.383 \pm 0.018	0.386 \pm 0.020	0.378 \pm 0.027
2	0.437 \pm 0.027	0.351 \pm 0.049	0.308 \pm 0.038 *	0.279 \pm 0.023 *
50	0.429 \pm 0.044	0.300 \pm 0.023	0.276 \pm 0.018 **	0.265 \pm 0.038 *

注: *与对照组相比较 $P < 0.05$; **与对照组相比较 $P < 0.01$ Note: Compared with control group * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; values are expressed as mean \pm SD of observations

表 2 PCBs 对剑尾鱼卵巢组织 SOD 活性的影响

Tab. 2 Effect of PCBs on the SOD activity of Swordtails ovary tissues

PCBs 浓度 ($\mu\text{g/L}$) PCBs concentration	酶活力 (U/mg) Enzymes activity			
	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组 Control	1.114 \pm 0.067	1.221 \pm 0.179	1.211 \pm 0.074	1.200 \pm 0.134
2	1.296 \pm 0.081	1.114 \pm 0.103	1.082 \pm 0.098	0.943 \pm 0.049 *
50	1.179 \pm 0.177	1.007 \pm 0.194 **	0.996 \pm 0.225	0.868 \pm 0.116 *

注:同表 1

Note: the same as note of Tab. 1

表 3 PCBs 对剑尾鱼鳃组织 SOD 活性的影响

Tab. 3 Effect of PCBs on the SOD activity of Swordtails gill tissues

PCBs 浓度 ($\mu\text{g/L}$) PCBs concentration	酶活力/(U/mg) Enzyme activity			
	12 h	24 h	48 h	72 h
对照组 Control	0.245 \pm 0.020	0.243 \pm 0.013	0.242 \pm 0.025	0.242 \pm 0.007
2	0.243 \pm 0.009	0.242 \pm 0.017	0.240 \pm 0.032	0.238 \pm 0.013
50	0.240 \pm 0.015	0.235 \pm 0.043	0.233 \pm 0.024	0.235 \pm 0.014

注:同表 1

Note: the same as note of Tab. 1

3 讨论

3.1 PCBs 暴露对剑尾鱼的半致死浓度 (LC_{50})

PCBs 对剑尾鱼 30 d 的半致死浓度为 10.580 $\mu\text{g/L}$, 远高于曾报道的黑头鲈鱼与 PCBs Aroclor 1260 接触 30 d, 其半致死剂量为 3.3 $\mu\text{g/L}$, 与 PCBs Aroclor 1248 接触 30 d, 其半致死剂量为 4.7 $\mu\text{g/L}$ ^[5], 说明剑尾鱼对 PCBs 有一定的耐受性。张凤君等^[6]报道, 斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 暴露于 PCBs 浓度为 50 $\mu\text{g/L}$ 水体中 28 d 仍未出现死亡个体, 但呈现出明显的中毒特征, 显示不同的鱼种对 PCBs 的耐受能力不同或不同种类的 PCBs 对鱼类的毒性存在明显的差异。该结果也反映了在 PCBs 污染的水体中, 鱼类受到 PCBs 毒害后并不一定表现为立即死亡。而由于 PCBs 有高度的残留性, 这就有可能将 PCBs 浓缩, 转移至食物链上的下一级消费者, 从而最终对人类产生巨大的危害。

3.2 PCBs 暴露对剑尾鱼不同器官组织 SOD 活性的影响

本实验的结果表明, PCBs 对剑尾鱼肝脏和卵巢的 SOD 活性有明显的影 响, 在最初染毒的 12 h 内, SOD 活性略有上升, 但随暴露时间延长, 浓度增加, 肝和卵巢的 SOD 活性均呈下降趋势。已有报道^[1], 在受 PCBs 严重污染的水体中, 鱼类器官组织对 PCBs 污染物的反应表现出诱导产生超氧阴离子自由基 (O_2^-) 的结果。而生物体内存在着清除超氧阴离子 (O_2^-) 的酶系统, 以保护机体细胞免遭损害, 超氧化物歧化酶 (SOD) 是清除阴离子的重要酶, 是催化超氧阴离子自由基发生歧化反应的一类金属酶, 其基本功能是清除生物体内过高浓度的超氧阴离子自由基。在正常的生理条件下, SOD 的生物生成量可以及时满足清除 O_2^- 的需要, 但在衰老及病态下, 氧自由基的生产与清除则会失去平衡^[7]。许多研究表明^[8], 当生物体受到环境污染轻度胁迫

时,出现催剂量效应,SOD 活性往往升高;而当受到重度逆境胁迫时,SOD 活性通常降低,使生物体内积累过量的活性氧,从而导致生物体受到伤害。本实验发现,在剑尾鱼最初染毒的 12 h 内,肝和卵巢 SOD 活性略有上升,但随暴露时间延长,浓度增加,肝和卵巢的 SOD 活性均呈下降趋势,说明剑尾鱼已受到了重度胁迫,SOD 活性的表现与前人的研究结果相一致。

PCBs 对器官组织 SOD 的活性产生了损害,这是由于器官组织内过量的超氧阴离子会使过氧化-抗氧化防御系统失衡,引发脂质过氧化反应,产生过氧化脂质丙二醛(MDA),导致自由基对生物体系的损伤并使生物膜变性,致使组织破坏和老化,表现为细胞膜破裂,胞质内次级溶酶体大量增加,以及细胞内脂肪代谢的异常^[9]。观察暴露在 50 $\mu\text{g/L}$ 的 PCBs 中的斑马鱼其肝组织的透射电镜切片,发现其肝细胞内的线粒体受到了破坏^[6];受 PCBs 污染的鲶鱼肝组织透射电镜切片也发现了同样的线粒体变化^[10]。SOD 主要产生在线粒体,线粒体的异常可能是导致 SOD 活性下降的其中一个原因。本实验的结果表明,PCBs 暴露对鳃组织 SOD 活性的影响不明显,而 PCBs 暴露 48 h 后,肝组织中的 SOD 的活性变化则最明显。这表明不同器官组织的 SOD 活性对 PCBs 胁迫的敏感性存在一定的差异。这在其他鱼类也有类似报道,如鳊(*Sebastodes fuscescens*)不同组织的 SOD 活性对鳃敏感性也表现明显的差异^[8]。

3.3 SOD 活性作为指示鱼类受 PCBs 胁迫的生物学标记的可能性

使用化学分析方法虽然能够准确测定环境及生物体中 PCBs 污染物的含量,但不能反映 PCBs 对生物体的毒害作用。使用生物学标记(Biomarker)的方法,将相关酶活性作为生物体功能和器官损伤的标记,不仅能指示生物体对污染物的暴露,而且还

能指示污染物的毒性效应,具有很好的预警作用。尽管目前有关 SOD 用作生物学标记来反映不同种水生动植物暴露于毒物中的反应的研究在实验室和野外研究的结果不相一致^[11],但本实验的结果表明,剑尾鱼肝细胞 SOD 活性可作为环境风险评价(ERA)的有效生物学标记。

参 考 文 献

- [1] Forlin L, Norrgren L. Physiological and morphological Studies of feral perch before and after remediation of a PCB contaminated lake: Järnsjön[J]. *Ambio*, 1998, 27(5): 418 - 423.
- [2] 方展强,张润兴,黄铭洪. 珠江河口区翡翠贻贝有机氯农药和多氯联苯含量的研究[J]. *环境科学学报*, 2001, 21(1): 113 - 116.
- [3] 黄志斌,吴淑勤,石存斌,等. 剑尾鱼的若干生物学特性研究[J]. *中国水产科学*, 2000, 7(3): 107 - 109.
- [4] 邹国林,桂兴芬,钟晓凌,等. 一种 SOD 的测定方法——邻苯三酚自氧化法的改进[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1986, 13(4): 71 - 73.
- [5] 戴树桂. *环境科学*[M]. 北京:科技出版社,1990:269 - 272.
- [6] 张凤君,郑文彪,方展强,等. PCBs 对斑马鱼鳃和肝脏超微结构的影响的初步研究[J]. *华南师范大学学报(自然科学版)*, 2001, (4): 112 - 114.
- [7] Peter L D, Livingstone D R. Antioxidant enzyme activities in embryonic and early larval stages of turbot[J]. *J Fish Biol*, 1996, 49: 96 - 997.
- [8] 唐学玺,张培玉. 鳊对黑鳃超氧化物歧化酶活性的影响[J]. *水产学报*, 2000, 24(3): 217 - 220.
- [9] Blum J, Fridovich I. Inactivation of glutathione peroxidation by superoxide radical[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1985, 15: 500 - 608.
- [10] Hugla J L, Thome J P. Effects of polychlorinated biphenyls on liver ultrastructure, hepatic monooxygenases, and reproductive success in the Barbel[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1999, 42: 265 - 273.
- [11] Van der Cost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13: 57 - 149.

[收稿日期] 2003-07-21