

蒽对太平洋牡蛎不同发育时期 抗氧化酶活性差异性影响

朱道玉^① 张培玉^②

(^① 菏泽学院生命科学系 菏泽 274015; ^② 青岛大学环境科学与工程系 青岛 266071)

摘要: 在实验条件下采用生态毒理学和生物化学方法, 选用常见的环境污染多环芳烃蒽(Anthracene), 以太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)为实验材料进行毒理实验。研究了太平洋牡蛎D型幼虫、壳顶幼虫、幼贝和成贝4个不同发育时期中的3种抗氧化酶: 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)对蒽胁迫的敏感性。结果表明, 在蒽胁迫下, D型幼虫和壳顶幼虫期3种抗氧化酶敏感性均为: POD > SOD > CAT, 在幼贝和成贝期, 其敏感性为 SOD > CAT, 而POD表现出不稳定性。

关键词: 蒽, 超氧化物歧化酶(SOD), 过氧化物酶(POD), 过氧化氢酶(CAT), 牡蛎

中图分类号: Q494 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263(2006)04-06-04

Effects of Anthracene on Antioxidant Enzymes Activities at Different Developmental Phases of *Crassostrea gigas*

ZHU Dao-Yu^① ZHANG Pei-Yu^②

(^① Department of Biology, Heze College, Heze Shandong 274015;

^② Department of Environmental Science and Engineering, Qingdao University, Qingdao 266071, China)

Abstract: The toxicological effect of environmental pollutant-polycyclic aromatic hydrocarbon-anthracene on Pacific *Crassostrea gigas* was examined using the methods of eco-toxicology and biochemistry. The sensitivity of three kinds of antioxidant enzymes SOD, POD and CAT to anthracene at four different developmental phases was examined. The results showed that the sensitivity of three kinds of antioxidant enzymes to anthracene in D-type larva and numbone larva was POD > SOD > CAT, while in larvae and adult *C. gigas*, the sensitivity order was changed to SOD > CAT, with unstable POD's sensitivity.

Key words: Anthracene, SOD, POD, CAT; *Crassostrea gigas*

多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)是一类广泛存在于天然环境中的化学污染物,对生物体有较强的致癌和致突变作用,严重影响了人类健康和生态环境质量,已引起科学家的极大关注^[1]。海上石油开发及运输中的泄露是海洋生态系统中PAHs的主要来源,另外大气沉降以及陆源因素是导致海洋环境PAHs污染的其他途径。蒽(Anthracene)是多环芳烃的一种,是线形三环芳烃,常被用作合成染料、除草剂和农药或药物的原料,化学性质比较

活泼,是其他复杂芳烃的母体,对水生生物具有一定的毒性。海洋PAHs污染和其他污染物对海洋鱼类、贝类和海洋微藻的致毒效应在国内外已有报道^[2-7]。本研究选用一种重要的海产养殖贝类太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)为研究

基金项目: 国家“863”项目(No. 2002AA648010), 青岛大学引进人才基金(2005012);

第一作者介绍: 朱道玉,男,副教授;主要研究方向: 动物学;
E-mail: daoyuzh@sina.com

收稿日期: 2005-12-20, 修回日期: 2006-04-23

对象,测定了葱胁迫下太平洋牡蛎 4 个不同发育时期的 3 种抗氧化酶活性变化。对检测和控制海水污染、改善海水养殖环境和选择灵敏的指示海洋 PAHs 污染的生物学指标有一定指导意义。

1 材料与方法

1.1 材料 实验采用的太平洋牡蛎均取自于荣城桑沟湾海区育苗场。海水经孔径 $0.45 \mu\text{m}$ 醋酸纤维滤膜抽滤,盐度 $30\text{‰} \pm 1\text{‰}$,温度 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,分别培养至 D 型幼虫期、壳顶幼虫期、幼贝期和成贝期后待用。

1.2 葱溶液的配备 葱为黄色固体粉末,分子式为 $\text{C}_{14}\text{H}_{10}$,将葱溶解在 80°C 热苯中,配成葱-苯溶液,置于棕色瓶中,现用现配,以避免葱的难水性和挥发性。

1.3 样品的制备与测定 分别取以上培养 4 个不同发育时期的太平洋牡蛎,各组分别投放 10 个不同发育时期、个体大小一致的受试生物,试验容器为 10 L 的玻璃缸。4 个不同发育时期的实验均设计 6 个试验组,其中 1 组为对照组,其他 5 组为处理组,葱浓度分别为 D 型幼虫期和壳顶幼虫期 0.5 mg/L ;幼贝期和成贝期 1.1 mg/L 。分别在葱胁迫 0 h、24 h、48 h、72 h 和 96 h 时取样。

分别取 4 个不同发育时期经葱处理的样品的内脏团,用滤纸吸干,称重后加入少量石英砂和 3 ml 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液, $\text{pH} 8.5$,于冰浴的研钵中,在 4°C 下研磨匀浆,经高速冷冻离心机 ($15\ 000 \text{ r/min}$, 4°C , 15 min) 离心后,取上清液,置于 -20°C 下待测。所有样品在 48 h 内测定完成,并按以下方法测定酶活性。

1.3.1 超氧化物歧化酶(SOD)活性检测 采用 Beauchamp^[8]所建立, Bewley 等^[9]改进的氮蓝四唑光化学还原反应法进行测定。反应体系总体积为 3 ml,其中含有 $5 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 7.8$)、 $13 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 蛋氨酸、 $75 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 氮蓝四唑 (NTB)、 100 nmol/L EDTA 和 $2 \times 10^{-3} \text{ mol/L}$ 核黄素。实验中加入酶制剂 0.1 ml,荧光灯下光照 20 min。光照时,反应体系中产

生的氧自由基使 NTB 还原,形成蓝色加肤 (Blueformazan),SOD 作为氧自由基清除剂可抑制此反应。光照后,利用 721 型分光光度计在 560 nm 波长处比色测定光吸收值。测定使用 0.1 ml 磷酸缓冲液代替酶制剂测得对照组的 OD 值。一个 SOD 单位定义为能引起反应初速度(指不加酶时)半抑制时的酶用量。按下式求得:

$$\text{SOD 单位} = \frac{(\text{对照组 OD 值} - \text{样品组 OD 值})}{50\% \text{ 对照组 OD 值}} \times \text{样品稀释倍数 (U/g)}$$

1.3.2 过氧化物酶(POD)活性检测 POD 活性测定按照 Kar 和 Choudhuri^[10]的方法。反应体系总体积为 3 ml,其中含 0.2% (w/v) 愈创木酚和 0.06% (v/v) H_2O_2 ,以 50 mmol/L 磷酸缓冲液 ($\text{pH} = 7.0$) 配制而成,反应液在 28°C 温育 5 min 后加 1 ml 5% H_2SO_4 终止反应。 $4\ 000 \text{ r/min}$ 离心 10 min,取上清液在 470 nm 比色。

1.3.3 过氧化氢酶(CAT)活性检测 CAT 活性测定按照 Kato 和 Shimizu^[11]的方法,通过测定 H_2O_2 的消失来测定 CAT 的活性。

1.4 数据处理 实验数据采用数理统计法将实验组与对照组及其组间差异进行显著性 t -检验。数据结果显示为平均值 \pm 标准误差 (Mean \pm SE), $P < 0.05$ 被认为差异显著, $P < 0.01$ 被认为差异极显著。

2 结果与分析

葱胁迫下,太平洋牡蛎 4 个发育时期 3 种抗氧化酶:超氧化物歧化酶、过氧化物酶和过氧化氢酶活性的变化结果见表 1~4。

2.1 葱对太平洋牡蛎 D 型幼虫期和壳顶幼虫期抗氧化酶活性的影响 太平洋牡蛎在 D 型幼虫期时,POD 活性对葱胁迫表现得最为敏感,随着葱胁迫时间的延长,其活性迅速下降;CAT 活性表现得对葱不敏感,随着葱胁迫时间的延长,其活性下降比较平缓;SOD 活性对葱敏感性位于 CAT 和 POD 之间。在壳顶幼虫期,太平洋牡蛎 3 种酶的变化规律类似于 D 型幼虫,POD 活性对葱表现得仍最为敏感(表 1,2)。

表 1 D 型幼虫 3 种抗氧化酶活性变化

Table 1 The activity changes of three antioxidant enzymes in D-type larvae

蒽浓度 Anthracene concentrations (mg/L)	胁迫时间 Stress times (h)	活性 Activities(U/g)		
		SOD	POD	CAT
0.5	0	114.7 ± 10.5	45.8 ± 5.1	16.9 ± 2.2
0.5	24	97.6 ± 9.1 ^b	22.4 ± 2.5	17.2 ± 2.3
0.5	48	80.6 ± 9.2 ^a	20.6 ± 3.0 ^b	14.1 ± 1.6 ^b
0.5	72	74.1 ± 6.9 ^a	21.4 ± 2.5	15.9 ± 2.2
0.5	96	50.2 ± 4.8 ^a	17.4 ± 2.6 ^a	11.7 ± 2.3 ^a

表内酶活性数据为平均值 ± 标准误差 (Mean ± SE); a 表示处理组与对照组极显著差异 ($P < 0.01$); b 表示处理组与对照组显著差异 ($P < 0.05$)。以下描述同本表格。

The data of enzyme activity is Mean ± SE; a: indicates very significant difference ($P < 0.01$); b: indicates significant difference ($P < 0.05$). The same in the following tables.

表 2 壳顶幼虫 3 种抗氧化酶活性变化

Table 2 The activity changes of three antioxidant enzymes in numbone larvae

蒽浓度 Anthracene concentrations (mg/L)	胁迫时间 Stress times (h)	活性 Activities(U/g)		
		SOD	POD	CAT
0.5	0	102.6 ± 11.5	51.7 ± 6.1	19.6 ± 2.3
0.5	24	96.6 ± 10.8 ^b	27.4 ± 3.2	15.2 ± 1.9
0.5	48	80.7 ± 9.6 ^a	21.7 ± 3.1	17.1 ± 2.0
0.5	72	64.4 ± 7.4 ^a	20.9 ± 3.1 ^b	14.4 ± 1.7 ^b
0.5	96	50.2 ± 6.1 ^a	19.9 ± 2.3 ^a	10.4 ± 2.1 ^b

2.2 蒽对太平洋牡蛎幼贝期和成贝期抗氧化酶活性的影响 太平洋牡蛎的幼贝期和成贝期 3 种酶活性变化规律不同于幼虫期(D 型幼虫和壳顶幼虫)。幼贝期 3 种酶的活性明显高于幼虫期,其在蒽胁迫下的变化规律与幼虫期相比也有显著差异 ($P < 0.05$),幼贝期 SOD 活性最为敏感,其次为 CAT 活性,POD 活性时而上升,时而下降,表现出无规律性的变化。成贝期 3 种抗氧化酶活性对蒽的敏感性类似于幼贝期,SOD 活性仍最敏感。但成贝期 3 种酶的活性普遍高于幼贝期;与幼贝相比,对蒽胁迫也表现得相当稳定(表 3 A)。

表 3 幼贝期 3 种抗氧化酶活性变化

Table 3 The activity changes of three antioxidant enzymes in larvae giga

蒽浓度 Anthracene concentrations (mg/L)	胁迫时间 Stress times (h)	活性 Activities(U/g)		
		SOD	POD	CAT
1.1	0	214.6 ± 30.8	71.9 ± 8.9	54.4 ± 6.7
1.1	24	175.6 ± 20.5	82.4 ± 9.6	55.1 ± 6.3 ^b
1.1	48	100.7 ± 12.8 ^b	67.7 ± 9.2 ^b	40.9 ± 5.7
1.1	72	97.6 ± 10.1 ^a	72.4 ± 8.6	25.6 ± 3.5 ^b
1.1	96	84.5 ± 9.3 ^a	75.6 ± 8.2	23.7 ± 4.1 ^b

表 4 成贝 3 种抗氧化酶活性变化

Table 4 The activity changes of three antioxidant enzymes in adult giga

蒽浓度 Anthracene concentrations (mg/L)	胁迫时间 Stress times (h)	活性 Activities(U/g)		
		SOD	POD	CAT
1.1	0	251.6 ± 30.6	102.4 ± 12.3	63.7 ± 7.8
1.1	24	200.1 ± 23.1	96.9 ± 12.3 ^b	64.1 ± 8.3
1.1	48	197.6 ± 24.3 ^b	110.7 ± 13.2	58.4 ± 6.8
1.1	72	110.4 ± 15.2 ^a	98.7 ± 12.1 ^b	47.2 ± 5.9 ^b
1.1	96	101.3 ± 11.4 ^a	109.5 ± 13.6	30.9 ± 5.6 ^a

3 讨论

在所有的需氧生物中,都含有抗氧化防御系统来防止内源代谢活性氧自由基产生。这个系统关键组成是一些能够被氧应激诱导的酶类,包括超氧化物歧化酶、过氧化氢酶和谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)等^[12,13]。它们处于氧自由基初始发生的鱼、牡蛎等的细胞浆和亚细胞器官中。活性氧是生物体内氧的某些代谢产物如超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)、过氧化氢(H_2O_2)与羟自由基($\cdot OH$)等,具有较氧活泼的化学特性。它们的产生、清除在正常的生物体内处于动态平衡中。在逆境胁迫下,生物体会因为积累过多的氧自由基,超出自身的清除能力而受到伤害。抗氧化酶系统,尤其是 SOD 在防止和降低生物体受逆境胁迫伤害中起主要作用。研究证明,长期处于 C_r 的亚致死浓度的鱼类,其体内

SOD 可保持较高水平,说明其体内清除自由基的能力增强。

研究表明^[12],太平洋牡蛎虫期与贝期 24 h、72 h 和 96 h 对葱的半数致死浓度有显著差异(表 5),贝期(幼贝和成贝期)对葱的敏感性低于幼虫(D 型幼虫和壳顶幼虫)期($P < 0.05$);而幼贝和成贝期之间以及 D 型幼虫和壳顶幼虫之间无显著差异($P > 0.05$)。太平洋牡蛎中的 3 种抗氧化酶(SOD、POD、CAT)活性在不同的发育时期敏感性也说明了贝期(幼贝和成贝期)对葱的敏感性低于幼虫(D 型幼虫和壳顶幼虫)期。

表 5 太平洋牡蛎不同发育时期对葱的敏感性分析

Table 5 Sensitivity of *Crassostrea gigas* at different growth period to anthracene stress

发育时期 Growth period	LC ₅₀ (mg/L)		
	24 h	72 h	96 h
D 型幼虫 D-type larvae	1.13	1.10	0.98
壳顶幼虫 Numbone larvae	1.17	1.06	0.97
幼贝 Larvae	2.04	2.03	1.98
成贝 Adult	2.07	2.06	2.01

在葱胁迫下,太平洋牡蛎在不同的发育时期存在不同的变化规律。这可能与太平洋牡蛎不同时期具不同形态结构及不同生理生化代谢方式和类型有关,其机理有待于进一步证实。在虫期(D 型幼虫和壳顶幼虫),POD 敏感性最强,SOD 次之,CAT 最不敏感,故幼虫期可用 POD 指标指示葱污染状况。在贝期(幼贝和成贝期),SOD 敏感性最强,CAT 次之,POD 则不稳定。因而在幼贝和成贝期可用 SOD 作为指示葱污染的灵敏指标。

参 考 文 献

[1] 赵云英,马永安.天然环境中多环芳烃的迁移转化及其

对生态环境的影响.海洋环境科学,1998,17(2):68~72.

- [2] 唐学玺,张培玉.葱对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响.水产学报,2000,24(3):217~220.
- [3] 张培玉,唐学玺,王悠.臭氧处理对海带膜脂过氧化和脱酯化伤害研究.环境科学学报,2003,23(6):792~796.
- [4] 陈荣,郑微云,余群等.石油对增帽牡蛎抗氧化酶的影响.环境科学学报,2002,22(3):385~388.
- [5] Weinstein J E. An ultrastructural examination of UV-induced toxic action of fluoranthene in the fathead minnow. *Aquat Toxicol*,1997,39(1):17~22.
- [6] Kirchin M A, Moor M N, Dean R T. The role oxyradicals in intracellular proteolysis and toxicity in muscels. *Mar Environ Res*,1992,34(3):315~320.
- [7] 刘向东,王清印,李永祺等.有机磷农药和多环芳烃对太平洋牡蛎毒性效应的初步研究.海洋通报,2000,19(6):88~90.
- [8] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*,1971,44(5):276~278.
- [9] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance. *Ann Rev Plant Physiol*,1979,30(2):195~238.
- [10] Kar R K, Choudhuri M A. Possible mechanisms of light-induced chlorophyll degradation in senescing leaves of *Hydrilla verticillata*. *Physiol Plant*,1987,70(6):729.
- [11] Kato M, Shimizu S. Chlorophyll metabolism in higher plants. VII. Chlorophyll degradation in senescing tobacco leaves: phenolic-dependent peroxidative degradation. *Can J Bot*,1987,65(3):729~735.
- [12] Burgeot T, Bocquene G, Porte C, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Marine Ecology Progress Series*,1996,131:125~141.
- [13] Peters L D, Livingstone D R. Antioxidant enzyme activities in embryologic and early larval stages of turbot. *Journal of Biology*,1996,49:986~997.