

杜金梁,曹丽萍,贾睿,等. 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英对建鲤肝组织损伤作用研究[J]. 江苏农业科学,2016,44(1):248-251.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.073

2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英 对建鲤肝组织损伤作用研究

杜金梁^{1,2},曹丽萍^{1,2},贾睿³,刘英娟³,赵才源³,申玉金³,丁炜东^{1,2},殷国俊^{1,2,3}

(1. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部淡水渔业和种质资源利用重点实验室,江苏无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心农业部鱼类免疫药理学国际联合实验室,江苏无锡 214081;

3. 南京农业大学无锡渔业学院,江苏无锡 214081)

摘要:利用精密肝切片培养技术研究 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英(TCDD)对建鲤肝组织的损伤作用,将精密肝切片组织分为 5 个处理组,每个处理组 4 个重复,将不同浓度 TCDD(浓度设定为 0.00、0.05、0.10、0.30、0.60 $\mu\text{g/L}$)处理肝切片 3 h 后,收集上清培养液及肝切片组织测定丙氨酸转氨酶(GPT)、天冬氨酸转氨酶(GOT)、乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、丙二醛(MDA)、三磷酸腺苷(ATP)等生化指标含量变化。结果表明:TCDD 浓度在 0.30 $\mu\text{g/L}$ 时,对精密肝切片组织损伤较大,可以显著提高上清培养液中 GPT、GOT、MDA 的含量,显著提高切片匀浆上清液中 LDH 的活性值,与空白对照组相比,差异极显著($P<0.01$);可以显著降低切片匀浆上清液中 ATP、GSH-PX 的含量,与空白对照组相比,差异极显著($P<0.01$);显著降低上清培养液中 SOD 活性值,与空白对照组相比,差异显著($P<0.05$)。这说明采用 TCDD 进行急性染毒后,可以造成建鲤肝组织的损伤,使机体组织处于氧化应激状态,产生一系列氧化应激反应。

关键词:2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英(TCDD);精密肝切片;建鲤;毒性机理

中图分类号:S941.8 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0248-03

二恶英为三环芳杂化合物,是一类多种化合物的统称,能够持续危害自然界环境和生物体。而 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英(TCDD)是其中毒性最强的一类物质,目前关于 TCDD 的研究主要涉及自然界环境以及哺乳动物方面,涉及到鱼类的研究相对较少。在水产方面报道主要有黄金华等对 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英(TCDD)对鱼类功能基因表达的研究^[1],许友卿等对 2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英对鱼类生长的影响^[2],关于 TCDD 对鱼类肝组织受 TCDD 损伤的研究鲜有报道。鱼类对水体污染较敏感,鱼组织吸收了污染物 TCDD 后会影响到其许多生理和生化作用,且 TCDD 进入机体后首先是在肝脏进行解毒和生物转化,机体肝脏是一个重要的解毒器官。由于 TCDD 的毒性强、危害大,关于其毒性机理尚未弄清,难以防治,给水产养殖业带来较大的负面影响。因此,一方面应该积极防止和减少 TCDD 的产生和污染,另一方面努力深入研究 TCDD 的毒性及其机制,为防治 TCDD 毒害提供技术依据。

目前,有很多毒物可以引起机体的氧化应激反应,但

TCDD 是否会引起鱼类肝组织的氧化应激反应尚不清楚,因此本研究以建鲤为试验材料,利用不同浓度 TCDD 处理建鲤肝组织切片,来研究 TCDD 对鱼类肝组织的毒害作用,为以后研究 TCDD 对鱼类毒害机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 试验鱼 试验用建鲤取自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心渔场,体质健康、无伤,取回后将建鲤于循环水系统中暂养 1 周。

1.1.2 试剂和仪器 L15 培养基、HBSS(Hanks, balanced salt solution)溶液、庆大霉素和两性霉素 B(购自美国 SIGMA 公司);新生小牛血清(FCS)(浙江天杭生物科技有限公司)和细胞培养板(GIBCO 公司);2,3,7,8-四氯二苯并-p-二恶英(厦门慧嘉生物科技有限公司);GPT、GOT、LDH、GSH-PX、ATP、MDA 和 SOD 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所科技有限公司);MS-222 麻醉剂(购自美国 SIGMA 公司);723 分光光度计(上海欣茂仪器有限公司);酶标仪 MK3(美国 Thermo 公司),KD-400 切片机(购自浙江金华科迪仪器有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 建鲤精密肝切片的制备 选取健康无病体质量在 800~1 500 g 的建鲤来进行试验,采用 MS-222 麻醉。无菌采取肝脏后放入冷的 L15 培养基中(50 $\mu\text{g/ml}$ 庆大霉素和 2.5 mg/mL 两性霉素 B),修整肝组织块,选取 5 mm×5 mm 的肝组织块来进行切片,切片厚度为 300 μm ,选取完整切片置

收稿日期:2014-11-19

基金项目:国家自然科学基金青年基金(31202002、31200918);中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2013JBFM12、2014A08YQ01);江苏省自然科学基金(BK2012535)

作者简介:杜金梁(1982—),河北沧州人,硕士,助理研究员,主要从事临床药理与药物代谢研究。E-mail:dujl@ffrc.cn。

通信作者:殷国俊(1967—),江苏淮安人,博士,研究员,主要从事鱼类免疫与药理研究。E-mail:yingj@ffrc.cn。

于 24 孔培养板中,每组 4 孔,每孔 6 片,置于 27 ℃、5% 体积分数 CO_2 条件下培养备用。

1.2.2 TCDD 诱导精密肝切片损伤模型制备 将获得的精密肝切片预培养 30 min 后,弃掉培养液换用含不同浓度(0.00、0.05、0.10、0.30、0.60 $\mu\text{g/L}$)的 TCDD 进行处理,继续培养 3 h。然后收集上清培养液以及肝切片进行 GOT、GPT、LDH、GSH-PX、MDA、SOD 等指标测定。

1.2.3 ATP 含量的测定 收集不同浓度(0.00、0.05、0.10、0.30、0.60 $\mu\text{g/L}$)TCDD 处理的精密肝组织切片来进行 ATP 含量的测定,具体操作方法参照试剂盒说明书。

1.2.4 建鲤精密肝切片上清培养液中 SOD、GPT、MDA、GOT 的测定 将收集精密肝切片上清培养液按照南京建成生物工程研究所试剂盒说明书操作方法进行各项指标测定。

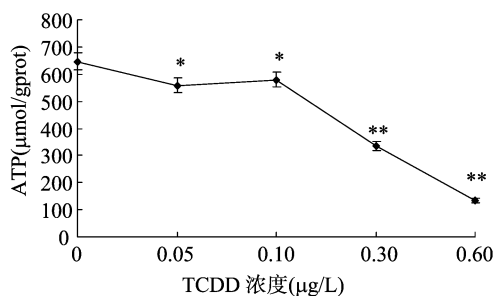
1.2.5 精密肝组织切片匀浆上清液中 LDH 和 GSH-PX 含量的测定 收集肝组织切片进行匀浆液制备,按照切片质量与生理盐水 1:9 比例制备成 10% 的组织匀浆,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于 LDH 和 GSH-PX 的测定。

1.2.6 统计学处理 所有数据均用 SPSS 16.0 软件进行处理。采用 One-Way ANOVA 检验法进行显著性分析,结果以平均值 \pm 标准差表示,对样本间进行 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 TCDD 对精密肝组织切片活力的影响

由图 1 可知,加入不同浓度的 TCDD 后,ATP 含量呈下降趋势,且随着药物浓度的不断加大,其含量下降越明显,TCDD 浓度在 0.30、0.60 $\mu\text{g/L}$ 时,与空白对照组相比差异极显著($P < 0.01$)。



*、**分别表示与对照相比,差异显著($P < 0.05$)、极显著($P < 0.01$)。下图同

图1 不同浓度TCDD对精密肝切片匀浆液中ATP含量的影响

2.2 TCDD 对精密肝切片培养液中 GPT、GOT 活性的影响

由图 2-A 可知,切片经过 TCDD 处理,GPT 活性值明显升高,其浓度在 0.10、0.60 $\mu\text{g/L}$ 时,GPT 活性值与空白对照组相比显著升高($P < 0.05$);TCDD 浓度在 0.30 $\mu\text{g/L}$ 时,GPT 活性值与空白对照组相比极显著升高($P < 0.01$)。由图 2-B 可知,在 TCDD 浓度达到 0.30 $\mu\text{g/L}$ 时,GOT 活性值与空白对照组相比极显著升高($P < 0.01$)。

2.3 TCDD 对精密肝切片匀浆上清液中 LDH 活性的影响

由图 3 可知,LDH 活性值有随着药物浓度增加而升高趋势,TCDD 浓度在 0.10 $\mu\text{g/L}$ 时,LDH 活性值与空白对照组相比显著升高($P < 0.05$);TCDD 浓度达到 0.30 $\mu\text{g/L}$ 时,LDH

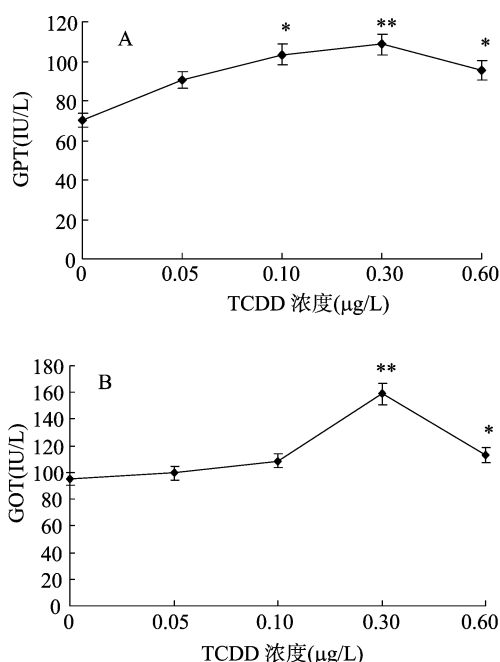


图2 不同浓度TCDD对精密肝切片培养液中GPT(A)、GOT(B)活性的影响

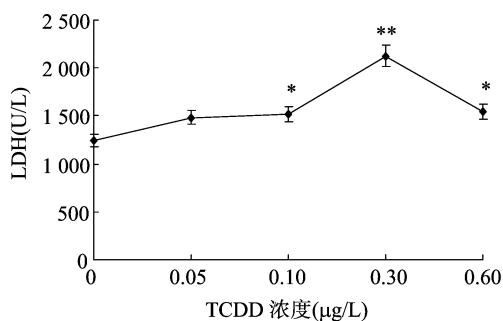


图3 不同浓度TCDD对精密肝切片匀浆液中LDH活性的影响

活性值与空白对照组相比极显著升高($P < 0.01$)。

2.4 TCDD 对精密肝切片培养液中 SOD、MDA 含量的影响

由图 4 可知,TCDD 处理后的 SOD 活性值呈降低趋势,当浓度在 0.30 $\mu\text{g/L}$ 时,SOD 活性值与空白对照组相比显著降低($P < 0.05$);当浓度在 0.60 $\mu\text{g/L}$ 时,SOD 活性值与空白对照组相比极显著降低($P < 0.01$)。TCDD 处理后的 MDA 含量呈升高趋势,有随着浓度加大其含量不断增加趋势,TCDD 浓度在 0.10、0.30 $\mu\text{g/L}$ 时,MDA 含量与空白对照组相比极显著增加($P < 0.01$)。

2.5 TCDD 对精密肝切片匀浆上清液中 GSH-PX 含量的影响

由图 5 可知,经过 TCDD 处理后,随着 TCDD 浓度的加大,其活性值在不断下降,在 TCDD 浓度为 0.30、0.60 $\mu\text{g/L}$ 时,GSH-PX 含量与空白对照组相比极显著降低($P < 0.01$)。

3 讨论

精密肝切片培养技术是一种介于器官和细胞之间的试验手段^[3-5],由于具有制片相对简单、能保证组织完整性等特点,此项技术被国内外广泛应用于药物筛选过程中,但精密肝切片技术也有它自身的缺点,不如肝细胞培养时间长^[4,6]。

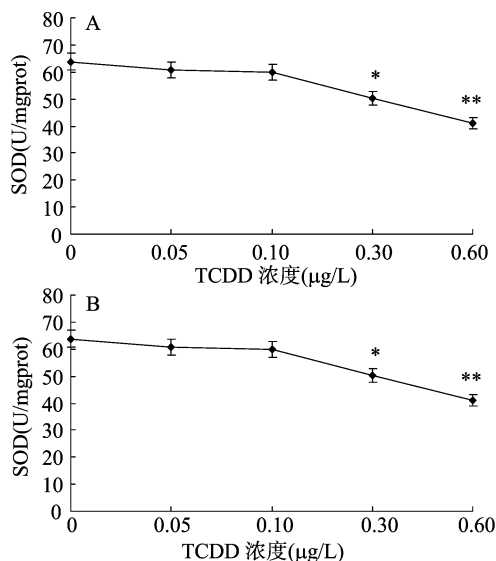


图4 不同浓度TCDD对精密肝切片培养液中SOD(A)、MDA(B)含量的影响

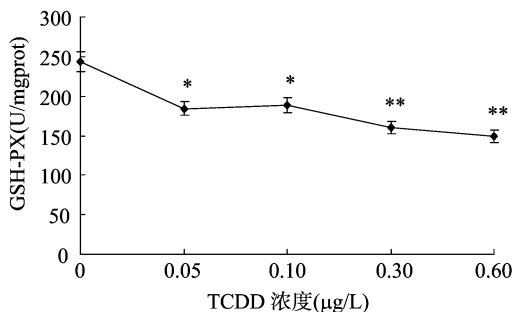


图5 不同浓度 TCDD 对精密肝切片匀浆液中 GSH-PX 活性的影响

对水产动物而言,国内外没有应用鱼类肝精密组织切片技术来研究 TCDD 损伤机制的报道,本实验室成功研制了鱼类精密肝切片培养技术,为以后了解药物对鱼类肝组织损伤研究提供了一种新的技术手段。

有相关报道称 TCDD 可以促使机体发生氧化应激反应,如使脂质过氧化产物 MDA 含量增加,抗氧化酶指标 SOD、GSH-PX 等活力下降。经过 TCDD 处理后所产生的一系列氧化应激反应具体作用机制是由于 TCDD 与机体内的芳香烃受体 AHR 结合后,改变了一些酶的活性和蛋白质^[7-8]。正常情况下,氧自由基在机体内是不断产生并不断清除的,当遇到毒物刺激时,机体就会产生氧自由基,如果产生氧自由基过多,机体来不及进行自身代谢来消除,就会引起机体的抗氧化体系失去平衡,进而引起机体组织损伤。GOT、GPT 是判定肝组织健康状态的经典指标,被广泛应用到肝损伤模型的构建当中,如在本试验中,加入不同浓度的 TCDD 后发现,肝切片上清培养液中 GOT、GPT 活性值明显升高,这说明 TCDD 可以引起肝切片组织的损伤,使 GOT、GPT 这 2 个酶学指标不断从机体中释放出来,加重了肝组织的损伤,TCDD 浓度在 0.30 µg/L 时其活性值达到一个高点,与空白对照组相比,差异显著 ($P < 0.01$)。当 TCDD 浓度达到 0.60 µg/L 时其活性值出现下降的趋势。LDH 存在于机体细胞的胞质内,如果机体受到损伤,其含量也会发生一定的变化,在本试验中 TCDD 浓度在 0.10、0.30 µg/L 时,其活性值明显增加,这说明切片

肝组织受到了 TCDD 的攻击,因而造成其数值发生变化。本试验结果与前人结果类似。

ATP 是机体内重要的能量分子,它在机体生理和病理过程中发挥着重要作用,当机体处于病理或毒物刺激时,其含量就会下降,依此来判断机体的健康水平^[9-10]。在本试验中主要应用于判定切片的活性水平,当用不同浓度 TCDD 处理切片组织后发现,ATP 含量随着药物浓度不断加大而逐渐降低,TCDD 浓度在 0.3、0.6 µg/L 时,其含量值最低,与空白对照组相比,差异极显著 ($P < 0.01$),这说明随着药物浓度的加大,肝切片活力下降。

当机体受到自由基攻击后就会出现脂质过氧化反应,MDA 就是其中一个判定指标,其含量高低反映了机体受损伤程度^[11],可以准确反映脂质过氧化程度。而 SOD、GSH-PX 这 2 个指标属于抗氧化酶体系,其含量变化反映的是机体抗氧化能力的高低。在本试验中,经过 TCDD 处理后,SOD、GSH-PX 活性值随着药物浓度的增加呈逐渐降低趋势,TCDD 浓度达到 0.30 µg/L 时,SOD、GSH-PX 活性值明显下降,与空白对照组相比,差异显著或者极显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);TCDD 浓度达到 0.60 µg/L 时,SOD、GSH-PX 活性值明显下降,与空白对照组相比,差异极显著 ($P < 0.01$)。而 MDA 含量随着药物浓度增加不断增加,这说明建鲤肝组织损伤程度在不断加大。通过以上指标的测定说明 TCDD 使精密肝切片组织处于氧化应激状态,造成机体的损伤。

综上所述,TCDD 可以造成鱼类肝组织的氧化应激反应,且在浓度为 0.30 µg/L 时,精密肝切片组织的损伤较为严重,关于其具体毒性机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 许友卿,李太元,丁兆坤,等. 2,3,7,8-四氯二苯并-对-二恶英对鱼类生长的影响及投喂调控[J]. 饲料工业,2010,31(12):4-8.
- [2] 黄金华,丁兆坤,许友卿,等. 2,3,7,8-四氯二苯并-对-二恶英对鱼类功能基因表达的影响及其机理[C]. 2009 年全国博士生学术会议,2009:216-229.
- [3] Kanbagli O, Balkan J, Aykac - Toker G, et al. Hepatic mitochondrial prooxidant and antioxidant status in ethanol - induced liver injury in rats [J]. Biological & Pharmaceutical Bulletin, 2002, 25 (11): 1482 - 1484.
- [4] Schaffert C S, Duryee M J, Bennett R G, et al. Exposure of precision - cut rat liver slices to ethanol accelerates fibrogenesis [J]. Am J Physiol: Gastrointestinal Liver Physiol, 2010, 299 (3): G661 - G668.
- [5] Burkhardt B, Wittenauer J, Pfeiffer E, et al. Oxidative metabolism of the mycotoxins alternariol and alternariol - 9 - methyl ether in precision - cut rat liver slices *in vitro* [J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2011, 55 (7): 1079 - 1086.
- [6] Kane A S, Thohan S, Weine M. Tissue slice technology for assessing alteration in fish hepatic phase I and phase II XME activity [J]. Marine Environmental Research, 1998, 46: 61 - 63.
- [7] Maier A, Dalton T P, Puga A. Disruption of dioxin - inducible phase I and phase II gene expression patterns by cadmium, chromium, and arsenic [J]. Molecular Carcinogenesis, 2000, 28 (4): 225 - 235.
- [8] Bestervelt L L, Piper D W, Pitt J A, et al. Lipid peroxidation in the adrenal glands of male rats exposed to 2,3,7,8 - tetrachlorodibenzo - p - dioxin (TCDD) [J]. Toxicology Letters, 1994, 70 (2): 139 - 145.

邓平,张生元,艾桃山,等.食物浓度和温度对萼花臂尾轮虫种群动态的影响[J].江苏农业科学,2016,44(1):251-253.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.01.074

食物浓度和温度对萼花臂尾轮虫种群动态的影响

邓平,张生元,艾桃山,喻运珍

(湖北省武汉市水产科学研究所,湖北武汉 430207)

摘要:以浓度分别为 2.5×10^6 、 5×10^6 、 10×10^6 、 20×10^6 cells/mL 的蛋白核小球藻为食物,在温度分别为 25、28、30 °C 条件下对萼花臂尾轮虫进行群体累积培养研究。结果表明,食物浓度对轮虫的种群动态、最大种群密度、种群增长率及非混交卵的日产生量动态、产量均有明显影响;温度对轮虫的种群动态、最大种群密度及非混交卵的产量、形成效率、最大形成效率均有显著影响。食物浓度为 20×10^6 cells/mL 的小球藻投喂轮虫,在 25~30 °C 均能达到较高的种群密度,但 25 °C 培养的轮虫较 28 °C 和 30 °C 推迟到达峰值。非混交卵的日产生量与种群密度有相似的变化趋势,28 °C 和 30 °C 培养的轮虫非混交卵较 25 °C 提前到达峰值。当轮虫的种群密度还处于增长阶段,非混交卵日产生量已达峰值。因此在轮虫的培养过程中可考虑监测非混交卵的动态变化预测轮虫密度达到峰值的时间。

关键词:萼花臂尾轮虫;种群;非混交卵;食物浓度;温度

中图分类号:S955.3+2 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2016)01-0251-03

食物浓度和温度是影响轮虫种群动态的 2 个重要生态因子。有关食物浓度和温度对轮虫种群动态的影响研究已有较多报道,内容涉及温度和食物浓度对轮虫种群增长率、最大种群密度、怀卵率、休眠卵产量及形成效率等方面的影响^[1-4]。研究表明温度和食物浓度对轮虫的种群增长及休眠卵形成均有明显的影响,但不同种类、同种种类的不同品系得出的种群增长最适温度和最适食物浓度各不相同^[5-6]。迄今为止,关于食物浓度和温度对轮虫非混交卵影响方面的研究未见报道。非混交雌体所产的卵为非混交卵,与轮虫种群数量密切相关。

萼花臂尾轮虫(*Brachionus calyciflorus*)是淡水中常见的轮虫种类,也是淡水轮虫工厂化培养的首选种类。本研究以萼花臂尾轮虫为对象,研究了适宜温度范围内不同食物浓度对轮虫种群及非混交卵的影响,以丰富此方面的内容,同时为该轮虫的规模化培养提供理论参考。

1 材料与方法

1.1 轮虫来源及饵料

萼花臂尾轮虫于 2012 年 6 月采自湖北省武汉市水产科学研究所旁的水库,所采水样首先用多层纱布滤去其中的枝角类和桡足类等大型浮游动物及杂质,然后置于解剖镜下观察,用微吸管吸出其中的萼花臂尾轮虫并接种到事先准备好的轮虫培养液中进行培养。试验时先用纱布过滤,去除在培

养轮虫的过程中产生的废弃物和剩余饵料的絮凝,再用 300 目的筛绢滤取轮虫,并用蒸馏水冲洗轮虫数次。

选用蛋白核小球藻(*Chlorella pyrenoidsa*)作为培养轮虫的饵料。藻种购自中国科学院水生生物研究所。小球藻采用 SE 培养液在光暗周期 12 h-12 h 实验室条件下培养,光照度 2 000~3 000 lx,培养温度 25 °C,充气培养。每 7~10 d 转接 1 次。投喂轮虫的藻液经 300 目筛绢过滤,以去除藻液中的絮凝。

1.2 试验方法

本试验小球藻密度共设 4 个梯度,分别为 2.5×10^6 、 5×10^6 、 10×10^6 、 20×10^6 cells/mL。设置 3 个温度梯度,分别为 25、28、30 °C。轮虫起始密度 0.5 ind/mL。每组设 3 个平行。

每 24 h 测定培养液中轮虫数量及每个雌体的带卵量,并更换培养液、投喂饵料。试验持续到轮虫种群不再增长为止。

1.3 计算方法

轮虫及其非混交卵的计数方法、有关参数的定义和计算方法均与文献[7]相同。

1.4 统计分析

不同培养条件下的轮虫种群数量及非混交卵日产生量的动态变化采用重复测量的方差分析(repeated measure ANOVA)。对不同食物浓度、不同温度条件下的轮虫种群最大密度、种群增长率的差异显著性采用两因素方差分析进行分析。对非混交卵的产量、形成效率及最大形成效率的差异显著性也采用两因素方差分析(two-way ANOVA)进行分析(SPSS 19.0, $P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 食物浓度和温度对轮虫种群增长的影响

2.1.1 食物浓度和温度对轮虫种群数量的影响

含量的测定[J].湖北农业科学,2010,49(4):954-955.

[11]唐云安,刘玉清,王国钦,等.肝损伤动物模型研究进展[J].卫生毒理学杂志,2002,16(4):236-238.

[9]罗刚,张国斌,谢增柱,等.缺氧大鼠心肌线粒体呼吸功能、ATP 含量的变化[J].第三军医大学学报,1997,3(3):58-60.

[10]廖梅香,李银保,朱卫丰,等.热证大鼠模型肝脏组织中腺苷酸