

赵莎莎,袁华根. 苯并芘对鲤鱼肾脏 SOD 和 CAT 的影响[J]. 江苏农业科学,2017,45(24):168-170.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.24.044

苯并芘对鲤鱼肾脏 SOD 和 CAT 的影响

赵莎莎,袁华根

(江苏农牧科技职业学院,江苏泰州 225300)

摘要:以鲤鱼为研究对象,研究水环境中的苯并芘浓度对鲤鱼肾脏 SOD、CAT 的影响。试验共设 3 个处理组,1 个对照组。暴露的方式采用静态水质接触染毒法。在 30 d 后测定超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化物酶(CAT)的活性。结果显示,在不同浓度的苯并芘(0、0.1、0.5、1.0 μg/L)暴露 30 d 后,与对照组比较,SOD 在低浓度苯并芘(0.1 μg/L)作用下活性高于对照组;在浓度为(0.5 μg/L)的苯并芘作用下,与对照组差异不明显;在浓度为 1.0 μg/L 苯并芘作用下,SOD 活性明显下降。CAT 在浓度为 0.1 μg/L 的苯并芘作用下,高于对照组,在浓度为 1.0 μg/L 苯并芘作用下与对照组相比,显著下降。结果表明,苯并芘能对鲤鱼肾脏中的抗氧化性酶产生一定的影响。因此可以通过研究探索有机污染物鱼类的生活现象,进一步为水环境污染提供理论依据。

关键词:苯并芘;鲤鱼;肾脏;SOD;CAT

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)24-0168-03

多环芳烃(PAHs)是一类的常见污染物,主要来源于煤、石油等燃烧产生的烟气、尾气以及焦化炼油等工业废水中,具有致癌、致畸和致突变型特性。在水环境中通过重点监测,PAHs 在体内代谢时通过自身或中间代谢物氧化产生大量活性氧自由基^[1],进而产生 DNA 断裂、脂质过氧化、酶失活等毒性反应^[2]。苯并芘由于其性质稳定、致癌性强所以是 PAHs 的典型代表^[3]。一些研究表明,苯并芘是高活性致癌剂,而并不是直接的致癌物,必须与细胞微粒体中的混合功能

氧化酶相互作用才具有致癌性。随着苯并芘浓度的增加,癌症的发生率也会明显提高,且肿瘤的潜伏期也会明显缩短,苯并芘不仅会引发动物产生癌症而且还会导致子代发生肿瘤癌变,不但会造成动物免疫功能下降,而且也会造成胚胎畸形甚至死亡^[4-9]。

鱼类体内抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)。其中 SOD 是机体内天然存在的超氧自由基清除因子,它通过上述反应可以把有害的超氧自由基转化为过氧化氢^[10]。CAT 则是催化体内废物过氧化氢,将其分解为完全无害的水,减少对机体的损害^[11]。肾脏是机体的重要器官,承担机体排泄功能,可排除蛋白质代谢的最终产物和对机体有害的毒物和废物,以调节体液平衡和调节电解质酸碱平衡;分泌生物活性物质,同时可以通过重吸收功能保留水分

收稿日期:2017-06-15

基金项目:江苏高校品牌专业建设工程资助(编号:PPZY2015C230)。

作者简介:赵莎莎(1979—),女,江苏沛县人,实验师,主要从事基础兽医研究。E-mail:641042228@qq.com。

菌毒力因子为基础开发口服的亚单位疫苗是未来防治嗜水气单胞菌感染的重要方向。

参考文献:

[1] 陆承平. 致病性嗜水气单胞菌及其所致鱼病综述[J]. 水产学报,1992,16(3):282-287.

[2] 朱芝秀,何后军,邓舜洲,等. 嗜水气单胞菌江西地区分离株耐药性及耐药质粒分析[J]. 江西农业大学学报,2012,34(6):1262-1268.

[3] 蔡丽娟,许宝青,林启存. 水产致病性嗜水气单胞菌耐药性比较与分析[J]. 水产科学,2011,30(1):42-45.

[4] 李莲瑞. 嗜水气单胞菌 Aer 毒素的表达与抗原性分析[D]. 长春:中国人民解放军军需大学,2003:33.

[5] 储卫华. 嗜水气单胞菌侵袭机制及其胞外蛋白酶的研究[D]. 南京:南京农业大学,2002:54.

[6] 于生兰,王帅兵,朱善元,等. 嗜水气单胞菌卵黄抗体的制备[J]. 黑龙江畜牧兽医,2011,12(23):119-122.

[7] 叶应妩,王毓三,申子瑜. 全国临床检验操作规程[M]. 南京:东南大学出版社,2006:890-923.

[8] 王春林,曹雪,刘晓丹,等. 嗜水气单胞菌不同分离株生化特性及胞外蛋白酶的检测[J]. 畜牧与兽医,2008,40(6):16-19.

[9] 邱军强,杨先乐,程训佳. 嗜水气单胞菌毒力因子特性及作用机理研究进展[J]. 中国病原生物学杂志,2009,4(8):616-619.

[10] 李焕荣,陈怀青,陆承平. 嗜水气单胞菌胞外蛋白酶 ECPase54 的纯化及特性分析[J]. 南京农业大学学报,1996,19(3):88-94.

[11] 肖根辉,王萍,刘明超,等. 中华鳖致病性嗜水气单胞菌分离鉴定与药敏试验[J]. 经济动物学报,2011,15(1):56-60.

[12] 周毅,张培培,徐晔,等. 金鱼嗜水气单胞菌的分离鉴定及药敏试验[J]. 水产科学,2014,33(6):379-384.

[13] 陈强,周建武,饶平凡,等. 卵黄抗体在防治中华鳖气单胞菌病中的应用[J]. 福州大学学报(自然科学版),2001,29(5):115-118,126.

[14] 陈学年,朱大世. 中草药防治鲫鱼败血症试验[J]. 淡水渔业,2001,31(1):43-45.

[15] 钱冬,陈月英,沈锦玉,等. 引起鱼类暴发性流行病的嗜水气单胞菌的血清型、毒力及溶血性[J]. 微生物学报,1995,35(6):460-464.

及其他有用物质^[12]。在鱼类肾脏中含有丰富的抗氧化酶,因此通过研究不同浓度的苯并芘对鱼类肾脏的SOD、CAT酶含量的影响来描述水体受污染的程度。目前,已有很多关于海洋鱼类的报道^[13-14],但是在淡水鱼方面的研究较少,而鲤鱼又是淡水鱼中的代表,希望通过研究苯并芘对鲤鱼的抗氧化酶的影响为改善水环境的污染提供理论依据。

1 材料与与方法

试验时间:2016年6月;试验地点:江苏省兽用生物制药高新技术研究重点实验室。

1.1 试验动物

试验鱼选购自无污染的渔场,所购鲤鱼来自同一鱼池,平均体质量为 (25.16 ± 2.15) g,经5%食盐消毒后进入实验室^[15]。

1.2 仪器与试剂

紫外分光光度计UV 2000(优尼科);匀浆机ART、苯并芘(BaP),购自美国AccuStandard公司;助溶剂二甲基亚砜(DMSO),购自美国Amreccr公司;超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)试剂盒,购自南京建成生物工程研究所;其余试剂均为分析纯级别。

1.3 试验方法

1.3.1 暴露 所有试验用鱼在去氯自来水中培养,通过对水中成分分析,水中的重金属元素几乎没有或者不能被监测出来,水质满足鲤鱼生存所需的要求。驯养2周后,随机分组,每个处理组4尾。分别置于长×宽×高为100 cm×70 cm×50 cm的塑料缸中,盛水200 L/缸。试验时每天更换用水,换水量为原来的1/2,以便浓度保持基本一致。试验期间用充气泵连续进行充气,每天按时投放饲料,水温基本控制在约23℃,自然光照,试验进行30 d,并每5 d换1次水,彻底清洗水箱。将苯并芘溶于水,由于苯并芘的溶解度比较小,所以在水中再加入助溶剂二甲基亚砜(DMSO)。4个处理组分别接受苯并芘浓度为0、0.1、0.5、1.0 μg/L的染毒,每个浓度设2个平行,对照组只投放二甲基亚砜(DMSO)^[16]。

1.3.2 取样及样品处理 将鱼捞出迅速解剖鱼体取出肾脏,用预冷的0.9%生理盐水冲洗表面血液,在滤纸上除去多余的液体后,-4℃保存,按质量体积比1 g:10 mL加入0.9%生理盐水充分匀浆,4℃下,5 000 r/min离心约10 min,去上清液进行酶活力分析和蛋白质含量测定。每尾鱼都独立作为一个样本。

1.4 酶活性的测定

1.4.1 超氧化物歧化酶(SOD)的活性测定 采用黄嘌呤氧化酶法^[17-18]。SOD活性的定义:1 mg蛋白在1 mL反应液中SOD抑制表达率达50%时,所对应的SOD量为一个亚硝酸盐单位(NU)。而鲤鱼肾脏SOD活性用SOD试剂盒测定。

测定原理:肾脏SOD活性 $A(SOD)/(NU \cdot mg) = 2 \{ (D \text{ 对照管} - D \text{ 测定管}) / D \text{ 对照管} \} \times (\text{反应液总体积} / \text{样品量}) / \text{蛋白质含量}$ 。

1.4.2 过氧化氢酶(CAT)的活性测定^[19] CAT活性的定义:1 mg蛋白质1 min分解底物过氧化氢的相对量为1个活力单位。

测定原理:CAT分解H₂O₂的反应通过加入钼酸铵中止反应,剩余的H₂O₂与钼酸铵作用产生一种淡黄色的络合物,

在405 nm处测定其生成量,可计算出CAT活力。

1.5 蛋白质含量的测定

样品中蛋白质含量用Lowry法测定,以牛血清白蛋白为参照^[18]。

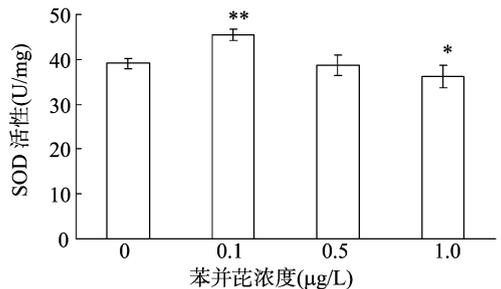
1.6 数据处理

试验数据用SPSS 13.0版软件进行单因素方差分析处理,并用CORREL进行相关性分析。

2 结果与分析

2.1 苯并芘对鲤鱼肾脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

不同浓度的苯并芘30 d后对鲤鱼肾脏中SOD的影响见图1。由图1可见,不同浓度苯并芘水溶液暴露30 d后,0.1、0.5、1.0 μg/L浓度组分别比对照组高6.355 U/mg、低0.415 U/mg、低2.985 U/mg。Excel软件中的CORREL函数相关性分析表明,鲤鱼在含有不同浓度苯并芘的水中暴露30 d后,SOD活性与苯并芘浓度($r = -0.81$)呈负相关。苯并芘浓度在0.1 μg/L与对照组相比差异极显著($P < 0.01$);在浓度为1.0 μg/L与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。



$n=6$; *表示与对照相比差异明显($P < 0.05$); **表示与对照相比差异极显著($P < 0.01$)。下同

图1 苯并芘浓度对鲤鱼肾脏SOD活性的影响

2.2 苯并芘对鲤鱼肾脏过氧化氢酶(CAT)活性的影响

由图2可见,不同浓度苯并芘水溶液暴露30 d后,0.1、0.5、1.0 μg/L浓度组分别比对照组高1.155 U/mg、低0.993 U/mg、低1.678 U/mg。Excel软件中的CORREL函数相关性分析表明,鲤鱼在含有不同浓度苯并芘的水中暴露30 d后,CAT活性与苯并芘浓度($r = -0.92$)呈负相关,且在浓度为1.0 μg/L时,与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

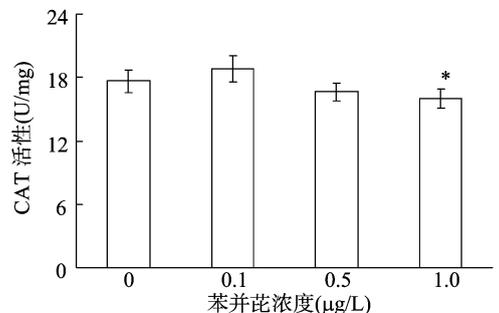


图2 不同浓度苯并芘对鲤鱼肾脏CAT活性的影响

3 讨论

苯并芘属多环芳香烃类的环境污染物,在自然界分布广、致癌性强,通常将其作为环境致癌物的代表,是主要的环境污染检测对象^[1,3]。

在机体氧化还原过程中会产生大量的活性氧,而机体正常的代谢过程中也会产生活性氧,活性氧包括超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot -}$)、羟自由基($\cdot OH$)、过氧化氢(H_2O_2)等。自由基是组成活性氧的重要因素,但是只有少量的自由基是机体必不可少的,这些自由基通常作为第二信使,对信号的传导起重要的作用,能够影响基因的表达,但是自由基本身的性质极为活泼,体内如果积累过多的自由基没有及时被清除,将会攻击体内各种生物大分子,引起生物体的各种生理病变^[19]。生物机体在长期的进化过程中,形成了一套能够抵御外界侵害的自我保护系统,即抗氧化系统,它能够清除体内过多的自由基,而抗氧化性酶类主要包括超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等^[20]。

超氧化物歧化酶(SOD)是存在于生物体内的一种非常重要的抗氧化防御性功能酶,在抗氧化酶中,SOD属于一线酶,对清除活性氧起着重要作用^[21-22]。活性氧自由基是生物正常的代谢产物,当微生物进入机体内后会被机体视为异物从而被体内吞噬细胞所吞噬,引起呼吸的大爆发,产生大量超氧阴离子($O_2^{\cdot -}$)、 H_2O_2 、 $\cdot OH$ 以及各种衍生物等。这些衍生物具有很强的氧化性,能够攻击周边大多数的生物分子,导致蛋白质变性、脂类过氧化以及DNA断裂等现象的发生^[23]。若不能立即清除可能会导致机体老化,机体抵抗力下降甚至死亡。而体内的SOD则可以与有害物质反应形成过氧化氢^[10],过氧化氢作为机体的一种活性氧,CAT与之反应可将机体有害的物质彻底分解成水^[11]。这2种物质都可以保护机体免受外界物质的伤害,且SOD、CAT的活性与生物体的免疫水平之间存在密切的关系,对提高机体免疫功能和增强免疫功能具有重要作用^[24]。在正常情况下,抗氧化物保护酶组成一个清除活性氧的保护系统,使活性氧的产生和清除处于一种动态的平衡,可以使机体免受伤害^[20]。

水体中的污染物主要是PAHs,苯并芘是PAHs典型的一种^[3]。因此,本试验通过对不同浓度的苯并芘对鲫鱼肾脏SOD、CAT含量影响的研究,以期为水体监测提供一些数据。据有关研究试验表明,在抗氧化防御系统中,对低浓度污染物的感染,酶的活力或活性物质的含量升高;当污染程度不断加大,对机体已经构成损害,那么抗氧化酶的活力或活性物质的含量则会下降^[25]。本试验中所得到的数据和结论与之相同,即当苯并芘浓度较低时(0.1 $\mu g/L$),SOD和CAT的活性均高于对照组,当苯并芘浓度逐渐加大时,SOD和CAT的活性均低于对照组。且其相关性分别为-0.81和-0.92,说明变化整体是呈下降趋势的,这可能因为当机体受到外来物质感染时,刺激机体的抗氧化性防御机制,使得抗氧化酶SOD和CAT大量产生,将体内自由基清除,从而起到保护机体的作用;但是随着感染浓度的加大,机体的抗氧化防御作用有限,可能造成活性氧自由基的积累和对细胞膜的损伤,降低机体的健康水平^[19]。

参考文献:

[1] Rey - Saluegui R, Martinez - Carballoe M, Garcia - Falcon M S. et al survey of polycyclic aromatic hydrocarbons in canned bivalves and investigation of their potential sources [J]. Food Research International, 2009, 42(8): 983 - 988.

[2] Winston GW. Oxidants and antioxidants in aquatic animal [J]. Comp Biochem Physiol, 1991, 100: 173 - 176.

[3] 黄长江, 胡晓蓉, 董巧香. 苯并芘对罗非鱼肝脏抗氧化防御系统的影响 [J]. 汕头大学学报(自然科学版), 2006(4): 51 - 56.

[4] 刘宁, 沈明浩. 食品毒理学 [M]. 北京: 中国轻工业出版社, 2007.

[5] 郑榕辉, 王重刚. 多环芳烃对鱼类生殖机能的影响 [J]. 台湾海峡, 2004, 23(2): 245 - 252.

[6] 段小丽, 魏复盛. 苯并(a)芘的环境污染、健康危害及研究热点问题 [J]. 世界科技研究与发展, 2002, 24(1): 11 - 16.

[7] 王广峰. 苯并芘对人体的危害和食品中苯并芘的来源及防控 [J]. 菏泽学院学报, 2014, 36(2): 66 - 70.

[8] 叶萌, 刘秉慈, 杜宏举, 等. 苯并芘诱导人胚肺成纤维细胞 eyelinD1、CDK4、E2F-1/4 的表达改变 [J]. 卫生研究, 2006(2): 135 - 138.

[9] 王家锦, 穆莹, 宋桂宁, 等. 苯并芘致癌致畸作用的观察与研究 [J]. 中国生育健康杂志, 1997(4): 159 - 161.

[10] 徐凤彩. 基础生物化学 [M]. 广州: 华南理工大学出版社, 1999: 202 - 203.

[11] 庄惠生, 杨光. 双酚 A 对鲤鱼急性和亚急性毒性的研究 [J]. 环境化学, 2005, 24(6): 682 - 684.

[12] 杨焕民, 柳巨柳. 动物生理学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2011.

[13] 王重刚, 陈奕欣, 郑微云, 等. 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼脾脏抗氧化防御系统的影响 [J]. 海洋学报, 2003, 25(2): 135 - 139.

[14] Pacheco M, Santos M A. Induction of liver EROD and erythrocytic nuclear abnormalities by cyclophosphamide and PAHs in *Anguilla anguilla* L. [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1998, 40(1/2): 71 - 76.

[15] 沈洪艳, 甄芳芳, 任洪强, 等. 对氯硝基苯对锦鲤 (*Cyprinus carpio*) 的急性毒性试验 [J]. 生态环境, 2007, 16(2): 407 - 409.

[16] 毕妍娇. 白泥脱硫酸废水排海的生态风险评估 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2012.

[17] 季建平. 超氧化物歧化酶微量快速测定法 [J]. 南京铁道医学院学报, 1991, 10(1): 27 - 30.

[18] 李康, 周忠良, 陈立侨, 等. 苯并[a]芘对鲫鱼生物标志物的影响研究 [J]. 环境科学研究, 2006(1): 91 - 95.

[19] Jin L H, Bahn J H, Eum W S, et al. Transduction of human catalase mediated by an HIV-1 TAT protein basic domain and arginine-rich peptides into mammalian cells [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2001, 31(11): 1509 - 1519.

[20] 张克烽, 张子平, 陈芸, 等. 动物抗氧化系统中主要抗氧化酶基因的研究进展 [J]. 动物学杂志, 2007, 42(2): 153 - 160.

[21] 陈剑杰, 曹谨玲, 罗永巨, 等. 氟对鲤鱼鳃组织免疫相关酶及 IL-1 β 表达影响 [J]. 核农学报, 2014, 28(6): 1092 - 1098.

[22] 韩志萍, 杨志红, 吴湘, 等. 铅胁迫对芦竹抗氧化酶活性的影响 [J]. 核农学报, 2010, 24(4): 846 - 850.

[23] Iial I B, Gutterid G J M C. Free radicals in biology and medicine [M]. 2nd ed. Oxford: Clarendon Press, 1989.

[24] 王玥, 胡义波, 姜乃澄. 氨态氮、亚硝态氮对罗氏沼虾免疫相关酶类的影响 [J]. 浙江大学学报(理学版), 2005, 32(6): 698 - 705.

[25] 刘洁, 林智勇, 王克坚. 不同浓度苯并(a)芘对杂色鲍抗氧化酶活性的影响 [J]. 应用海洋学报, 2014(4): 486 - 491.