

联苯胺对锦鲤肝脏酶活性的影响

刘红玲,于红霞*,徐铁莲,王晓蓉 (南京大学环境学院,污染控制与资源化研究国家重点实验室,江苏 南京 210093)

摘要: 以锦鲤(*Cyprinus carpio*)为试验生物,经不同浓度 (6.0, 3.0, 2.0, 1.2, 0.6mg/L)联苯胺暴露 14d,研究其对肝脏谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px),过氧化氢酶(CAT),超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)以及谷丙转氨酶(GPT)活性的影响.结果表明,锦鲤经联苯胺暴露,肝脏 GSH-Px 活性几乎持续受抑制;暴露第 4d 出现 CAT 的诱导,但随着暴露的延续,在第 7,14d 出现酶活性抑制;对 SOD 的影响多表现为诱导作用,但在高浓度 (6.0,3.0mg/L)暴露第 14d 则出现酶活性抑制;对 GST 和 GPT 的影响一般表现为在低浓度暴露下的酶诱导,高浓度暴露下酶活性受抑制.GSH-Px 对联苯胺暴露最为敏感,有可能成为评价水环境联苯胺污染的生物标志物.

关键词: 联苯胺; 锦鲤(*Cyprinus carpio*); 暴露; 酶

中图分类号: X503.225 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2007)03-0395-05

Effects of benzidine to the hepatic enzymes of brocaded carp (*Cyprinus carpio*). LIU Hong-ling, YU Hong-xia*, XU Tie-lian, WANG Xiao-rong (State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China). *China Environmental Science*, 2007,27(3): 395~399

Abstract: Using brocaded carp (*Cyprinus carpio*) as test organism exposed to different concentrations of benzidine (6.0,3.0,2.0,1.2,0.6mg/L) for 14d, the influence on the activities of liver glutathione peroxidase (GSH-Px), catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione s-transferase (GST), and glutamic-pyruvate transaminase (GPT) were studied. Brocaded carp after benzidine exposure even low concentration exposure, the liver GSH-Px activity almost all was inhibited continuously; after the exposure of fourth day, appeared the inducement of CAT, but with continuing of exposure, in seventh and fourteenth days, appeared inhibiting of enzyme activity; the influence on SOD appeared generally inducing action, but at the fourteen day of high concentration exposure (6.0, 3.0mg/L) appeared inhibiting of enzyme activity; the influence on GST and GPT appeared inducing action under low concentration and inhibiting action under high concentration. GSH-Px was most sensitive to benzidine exposure, possible forming the biomarker of evaluating the benzidine pollution in aquative environment.

Key words: benzidine; brocaded carp (*Cyprinus carpio*); exposure; enzyme

联苯胺广泛用于纺织、染发、造纸、食品和塑料等行业中,通过工业废水和生活污水进入水环境,从而影响水环境的质量^[1].在地表水和工业废水中均有检测到联苯胺的报道^[1-2].水环境中存在的联苯胺可经过食物链直接或间接地威胁着水生生物的生存和人体的健康.目前有关联苯胺作用机制的研究主要集中在对生物体代谢和细胞的影响^[3-4],对水生生物生理生化影响的研究还很少.

本研究以锦鲤为模式生物,在研究联苯胺对肝脏转氨酶活性影响的基础上,进一步研究其对抗氧化系统酶的影响,旨在通过多指标的综合研

究来全面评价联苯胺对锦鲤的潜在毒性.通过其敏感性的比较,确定指示联苯胺存在的生理生化指标.

1 材料与方法

1.1 试验生物

幼龄锦鲤(*Cyprinus carpio*)购自南京市龙潭花鸟市场,平均体长为(12±2)cm,平均体重为(23±2)g.驯养一周以上,在暴露试验前 1d 停止喂

收稿日期: 2006-09-11

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(20237010,20375015)

* 责任作者, 教授, hongxiayu01@hotmail.com

食.试验用水为曝气 24h 以上的自来水.驯养和试验期间锦鲤生长正常.

1.2 仪器与试剂

岛津 UV-220 紫外分光光度计;J2-HS 高速冷冻离心机(Beckman).

联苯胺购自北京化工厂,纯度>99%.其他生化试剂均为分析纯.

1.3 试验方法

根据相关软件预测,联苯胺对鱼的 96h 半致死浓度为 12mg/L^[5],设置联苯胺的暴露浓度为 0.6, 1.2, 2.0, 3.0, 6.0mg/L,每个浓度 3 个平行和 1 个空白,暴露时间分别为 4, 7, 14d.试验时随机将鱼放入装有 10L 不同浓度联苯胺溶液的玻璃圆缸中,每缸投鱼 6 条.采用半静态置换法,每天更换溶液的一半.到预定时间后在 3 个平行浓度组和空白里各取出 2 条鱼,擦干,测体长,称重,迅速解剖,将肝脏分离出来,用生理盐水漂洗,滤纸吸干后称重,放入玻璃匀浆器中匀浆,随后将匀浆液在 4℃,9000r/min 下离心 20min,上清液于-80℃下保存,用于相关酶的测定.

1.4 测定方法

谷丙转氨酶(GPT)活性测定采用赖氏比色法^[6];过氧化氢酶(CAT)活性测定参照文献^[7];超氧化物歧化酶(SOD)活性测定参照改进的邻苯三酚自氧化法^[8]:在 25℃,1.5mL 的 Tris-HCl 缓冲液 (0.1mol/L, pH8.2) 适量酶提取液中加入 0.1mmol/L 邻苯三酚,测定波长为 325nm.酶活性单位定义为每 mL 反应液中,每 min 抑制邻苯三酚自氧化速率达 50%的酶量;谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性测定参照文献^[9],酶活力定义为每 mg 蛋白质,每 min 扣除非酶促反应,使 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活力单位;谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性测定参照文献^[10].

蛋白质含量用色素结合法测定^[11],以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白.

1.5 数据处理

所得结果均为样品的平均数±标准误差;组间数据的两两比较采用单尾 t 检验法, $P<0.05$ 被

认为是差异显著.用 SPSS 10.0 软件处理数据,回归分析污染的剂量-效应关系.

2 结果与分析

2.1 联苯胺对 GPT 活性的影响

由图 1 可见,与对照组相比,暴露 4, 7d 后, GPT 的活性随联苯胺浓度的升高而升高,呈正相关.第 4d, $y = 3.9457x + 26.44$, $R^2 = 0.9503$;第 7d, $y = 3.8686x + 27.327$, $R^2 = 0.9553$.而暴露 14d 的试验组中,随化合物浓度的升高 GPT 活性先升高而后降低,说明联苯胺先诱导 GPT 的活性,长时间高浓度暴露后就开始显著抑制 GPT 的活性.

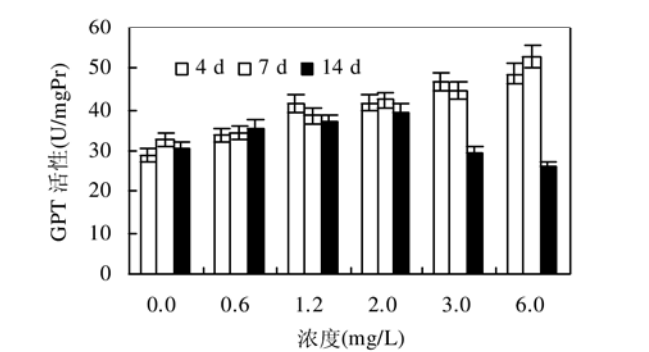


图 1 联苯胺对锦鲤肝脏 GPT 活性的影响
Fig.1 Effect of benzidine on the activities of GPT in brocaded carp liver

2.2 联苯胺对抗氧化防御系统酶的影响

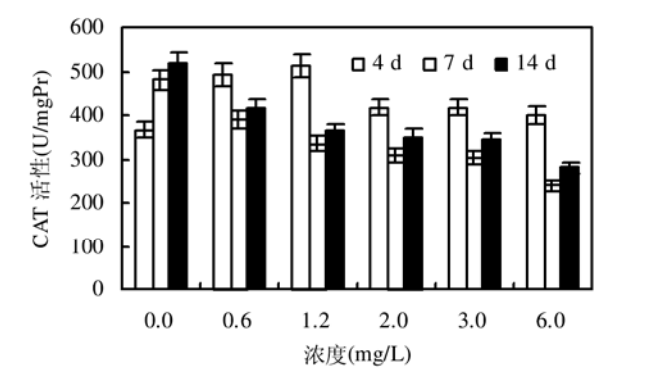


图 2 联苯胺对锦鲤肝脏 CAT 活性的影响
Fig.2 Effect of benzidine on the activities of CAT in brocaded carp liver

由图 2 可见,在暴露 4d 的试验中,CAT 活性均高于对照组,0.6,1.2mg/L 浓度组锦鲤体内的

CAT 活性被显著诱导,说明鱼体内产生了大量的 H_2O_2 .随着染毒浓度的升高,CAT 活性逐渐降低,大量的 H_2O_2 消耗了酶蛋白.这可能是生物体对污染物入侵的一种应激反应,是机体启用防护机制来去除体内多余的活性自由基的结果^[12-13].暴露 7d 时开始出现中毒性抑制反应,说明 H_2O_2 在鱼体内过量累积.Braunbeck 等^[14]的研究也指出,农药污染环境中的鳗鱼,其肝脏 CAT 活性最终被抑制.

由图 3 可见,SOD 活性与暴露时间和暴露浓度的相关性不显著,锦鲤暴露于浓度为 0.6mg/L 的联苯胺中 4, 14d, SOD 活性与对照组无显著差异,而暴露 7d, SOD 活性明显受诱导,说明此时 SOD 出现应激反应,随着暴露时间的延长,开始自我修复.高浓度 6.0mg/L 暴露 4d,诱导显著;7d 开始降低,而到了 14d, SOD 活性显著受抑制.说明高浓度染毒在短时间表现出应激反应,而长时间暴露则出现中毒性 SOD 活性受抑制症状.

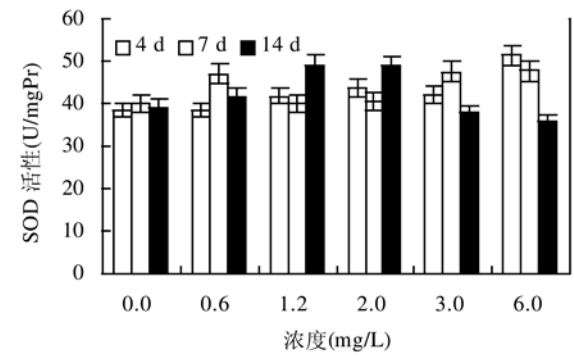


图 3 联苯胺对锦鲤肝脏 SOD 活性的影响
Fig.3 Effect of benzidine on the activities of SOD in brocaded carp liver

由图 4 可见,不论暴露时间长短,GSH-Px 的活性随联苯胺浓度升高而降低.在暴露时间为 4 d 的试验组中,GSH-Px 活性随联苯胺浓度升高而降低的趋势明显,呈负相关: $y=-0.0771x+0.4867$, $R^2=0.8115$.对于 GSH-Px 的活性,没有观察到生物体的应激反应和自我修复作用,仅仅观察到了联苯胺对生物体的抑制作用,这并不表明没有应激反应,可能已于暴露 1~3d 时发生,有待于后续研

究进一步证实.有研究表明,某些外源有机污染物会激发鱼类内脏组织 GSH-Px 活力升高或降低^[15-16].试验中联苯胺引起 GSH-Px 功能水平的下降可能造成活性氧自由基的积累和对细胞膜的损伤,降低生物的适应性反应能力和健康水平,从而出现一系列的中毒反应.

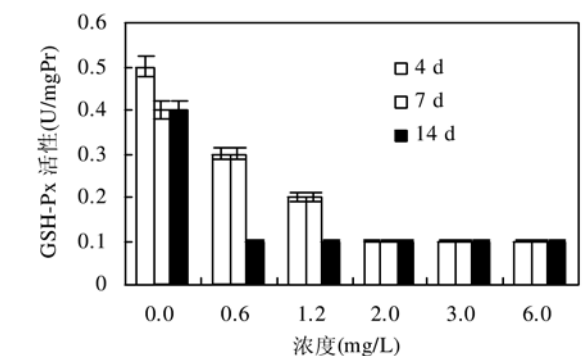


图 4 联苯胺对锦鲤肝脏 GSH-Px 活性的影响
Fig.4 Effect of benzidine on the activities of GSH-Px in brocaded carp liver

肝脏中 GST 活性的增加,可能表示鱼体在建立相应的抵御外源性物质的机制,本研究的结果也说明了这一点.由图 5 可见,随着联苯胺浓度的增加,4d 试验组的 GST 活性逐渐降低,呈负相关: $y=-13.346x+142.86$, $R^2=0.8224$; 7d 试验组的 GST 活性有明显升高的趋势;而 14d 试验组的 GST 活性先升高后降低.说明随着暴露时间的增加,锦鲤体内的修复机制发挥主导作用,而长时间高浓度的暴露对鱼体的抗氧化机制有一定的破坏作用.

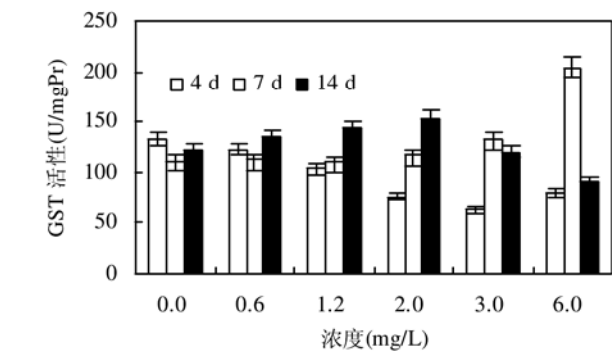


图 5 联苯胺对锦鲤肝脏 GST 活性的影响
Fig.5 Effect of benzidine on the activities of GST in brocaded carp liver

3 讨论

联苯胺是一种致癌物质,生物体经联苯胺体内处理后,其细胞中一些功能酶(如细胞色素氧化酶,过氧化酶以及单氧化酶等)的活性受到抑制^[17].联苯胺能抑制生物细胞核 DNA 的转录和复制,甚至可与细胞核 DNA 生成加合物,造成不可逆转的 DNA 损伤^[3-4].由于生物活体对外界损伤具有保护机制,因此,本试验中,广泛存在于动物线粒体中的重要氨基转氨酶 GPT 活性受到刺激,暴露 4d 受到显著诱导,而长期高浓度暴露则显著受抑制.可能联苯胺与线粒体的 DNA 系统发生上述作用,对转氨酶系统以及复制转录系统造成了相应损伤,GPT 随联苯胺浓度升高而有所下降是必然结果.说明联苯胺进入鱼体肝脏后,不仅干扰了锦鲤体内的氮代谢过程,同时也引起肝脏器官的损伤.

在细胞抗氧化反应中,首先 SOD 催化 O_2^- 生成 H_2O_2 ,接着 GSH-Px 和 CAT 以 H_2O_2 为底物,催化形成 H_2O ,消除 H_2O_2 . SOD 仅以 O_2^- 为底物,而 CAT, GSH-Px 的底物 H_2O_2 既有 SOD 催化生成的,也有外源性污染物代谢过程中产生的,因而其活性变化非常复杂,但是最终酶活都受抑制.在本试验中,CAT 对联苯胺的暴露有明显的应激作用,CAT 和 GST 均表现有修复作用,而高浓度和长时间暴露对 CAT 和 GST 有一定的破坏作用;SOD 活性在低浓度受诱导,高浓度长时间暴露也受抑制;GSH-Px 一直受到抑制作用.上述现象可以说明,在清除氧自由基过程中 SOD 酶蛋白被消耗,在病理期合成抗氧化防御系统酶能力降低,因此 CAT、GST、SOD、GSH-Px 酶活性明显下降.同类研究均表明异物侵入导致抗氧化防御系统酶活性下降^[18-19].这些酶活性降低会使生物体内积累过多的活性氧,从而导致生物体受到伤害.本试验表明,联苯胺对鱼类的伤害之一是通过激发产生大量活性氧造成氧化胁迫来产生的,当胁迫程度增高时,酶活性降低,机体清除活性氧的能力减弱,可能造成活性氧自由基的过量积累和对细胞膜的损伤,降低生物的适应能力和健康水平,

从而导致中毒反应.

本试验中 GSH-Px 活力在暴露 4d 时就和联苯胺存在一定的剂量-效应关系,随着暴露时间的延长,酶活和对照组相比均是显著受抑制.Solé 等^[20]的研究表明,在抗氧化酶 SOD、CAT、GSH-Px 中,GSH-Px 对保护细胞免受氧应激起主要作用.本试验生物酶活性中,GSH-Px 对联苯胺的反应快速灵敏,能反映污染的早期作用,并且很好的“记忆”联苯胺的毒作用.Rudolf 等^[21]认为,最理想的生物标志物是快速诱导,慢慢恢复,这样在检测遭受过污染的生物样本就不会出现“假阴性”结果.说明 GSH-Px 活性抑制不仅可提示联苯胺的作用机理,而且可以作为水环境质量监测的一个指标来评价联苯胺对生态系统的损害.

4 结论

4.1 锦鲤经不同浓度联苯胺暴露,肝脏中生物酶 SOD、CAT、GSH-Px、GST 和 GPT 的活性表现出不同的应激、抑制、修复和破坏过程;SOD 活性与暴露时间和浓度没有显著相关性;CAT 对联苯胺的暴露有明显的应激作用,CAT 和 GST 均表现有修复作用,高浓度和长时间暴露对 GST 和 GPT 有一定的破坏作用,产生抑制作用的主要是 GST 和 GSH-Px.

4.2 联苯胺进入鱼体肝脏后,干扰了锦鲤体内的氮代谢过程;且不同暴露时间试验组中,鱼体肝脏抗氧化防御系统指标呈现出较大变化,说明受到联苯胺作用而产生氧化胁迫.

4.3 生物酶活性中 GSH-Px 对联苯胺的反应快速灵敏,是预警联苯胺污染的理想生物标志物.

参考文献:

- [1] Wang Yi, Wang Zijian, Wang Chunxia, *et al.* Uptake of weakly hydrophobic nitroaromatics from water by semipermeable membrane devices (SPMDs) and by goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Chemosphere, 1999,38(1):51-66.
- [2] Bouzige M, Legeay P, Pichon V, *et al.* Selective on-line immunoextraction coupled to liquid chromatography for the trace determination of benzidine, congeners and related azo dyes in surface water and industrial effluents [J]. Journal of

- Chromatography A, 1999,846:317-329.
- [3] Amutha R, Subramanian V, Unni N B. Interaction of benzidine with DNA: experimental and modeling studies [J]. Chemical Physics Letters, 2001,344:40-48.
- [4] Zaalishvili G, Lomidze E, Buadze O, *et al.* Electron microscopic investigation of benzidine effect on maize root tip cells ultrastructure, DNA synthesis and calcium homeostasis [J]. International Biodeterioration and Biodegradation, 2000,46: 133-140.
- [5] Syracuse Research Corporation. ECOSAR program (VO.99d) [Computer Software] [Z]. New York: SRC, 1994.
- [6] 李影林.临床医学检验手册 [M]. 长春:吉林科学技术出版社, 1987.363-367.
- [7] 徐镜波,袁晓凡,郎佩珍.过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度测定 [J]. 环境化学, 1997,16(1):73-76.
- [8] Maklund S, Marklund G. Involvement of the superoxide anion radical in the auto oxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase [J]. Eur. J. Biochem., 1974,47:469-474.
- [9] 夏弈明,朱莲珍.血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力的测定方法 [J]. 卫生研究,1987,16(4):29-33.
- [10] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione s-transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. J. Biol. Chem., 1974,249:7130-7139.
- [11] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976,72:248-254.
- [12] Hugget J R, Kimerle A R, Mehrle M P Jr. Biomarkers: biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress [M]. Chelsea: Lewis Publishers, 1992.1-3.
- [13] McCarthy F J, Shugart R L. Biological markers of environmental contamination [M]. Chelsea: Lewis Publishers, 1990.3-14.
- [14] Braunbeck T, Volkl A. Induction of biotransformation in the liver of eel (*Anguilla anguilla* L.) by sublethal exposure to dinitro-0-cresol: an ultrastructural and biochemical study [J]. Ecotoxicol. Environ. Saf., 1991,21:109-127.
- [15] Gabryelak T, Klekot J. The effects of paraquat on the peroxide metabolism enzymes in erythrocytes of freshwater fish species [J]. Comp. Biochem. Physiol. C, 1985,81:415-418.
- [16] Matkovics B L, Szabo S I, Varga K. Effects of a herbicide on the peroxide metabolism enzymes and lipid peroxidation in carp fish (*Hypophthalmichthys molitrix*) [J]. Acta. Biol. Hung., 1984,35: 91-96.
- [17] Folmar L C. Effects of chemical contaminants on blood chemistry of teleost fish a bibliography and synopsis of detected effects [J]. Environ. Toxicol. Chem., 1993,12:337-375.
- [18] 彭晓春,杨仁斌,郭正元. Sportak 对湘云鲫肝脏 SOD 酶 CAT 酶活性的影响及其机制研究 [J]. 农业环境保护, 2002,21(2): 126-129.
- [19] 侯丽萍,马广智. 镉对草鱼种肝组织超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 水利渔业, 2003,23(3):14-15.
- [20] Sole M, Peters L D, Magnusson K, *et al.* Responses of the cytochrome P450-dependent monooxygenase and other protective enzyme systems in digestive gland of transplanted common mussel (*Mytilus edulis* L.) to organic contaminants in the Skagerrak and Kattegat (North Sea) [J]. Biomarkers, 1998,3: 49-62.
- [21] Wu Rudolf S S, Siu William H L, Shin Paul K S. Induction, adaptation and recovery of biological responses: implications for environmental monitoring [J]. Marine Pollution Bulletin, 2005,51: 623-634.

作者简介: 刘红玲(1976-),女,江苏盐城人,南京大学环境学院博士研究生,主要研究方向为有机污染物的水生生物成组毒性效应和致毒机理.发表论文 7 篇.