

[C₈mim]Br 对蚯蚓抗氧化系统的亚慢性毒性效应

罗艳蕊¹, 李效宇², 运迷霞³, 王键吉⁴

(1.河南师范大学体育学院, 河南 新乡 453007; 2.河南师范大学生命科学学院, 河南 新乡 453007; 3.华东师范大学生命科学学院, 上海 200062; 4.河南师范大学化学与环境科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要:以 OECD 标准的基质染毒法测定了离子液体溴化 1-辛基-3-甲基咪唑([C₈mim]Br)对蚯蚓(*Eisenia foetida*)的急性毒性效应和亚慢性毒性条件下蚯蚓体内 CAT、SOD、GST 的活性和 GSH、MDA 含量的变化,以期初步分析[C₈mim]Br 对蚯蚓抗氧化系统的作用及其毒性作用的可能机理。结果表明,[C₈mim]Br 对蚯蚓的 7 d-LD₅₀ 和 14 d-LD₅₀ 分别为 206.8 mg·kg⁻¹ 和 159.4 mg·kg⁻¹。亚慢性暴露 42 d 后蚯蚓体内 CAT 的活性受到显著抑制;SOD 的活性在低浓度(1~5 mg·kg⁻¹)受到抑制,高浓度(20~40 mg·kg⁻¹)被激活;在高浓度处理组(20~40 mg·kg⁻¹)GST 的活性显著高于对照。10~40 mg·kg⁻¹ 浓度的[C₈mim]Br 处理组 GSH 的含量显著升高,各处理组 MDA 含量与对照相比没有差异。推测[C₈mim]Br 可能通过肠道吸收进入蚯蚓体内,并诱导了蚯蚓体内抗氧化系统的反馈效应。

关键词:溴化 1-辛基-3-甲基咪唑离子液体;赤子爱胜蚓;急性毒性;亚慢性毒性;抗氧化系统

中图分类号:X503.223 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)02-0343-05

Subchronic Toxic Effects of 1 Methyl-3-Octylimidazolium Bromide Ionic Liquid on the Antioxidant System of Earthworm

LUO Yan-rui¹, LI Xiao-yu², YUN Mi-xia³, WANG Jian-ji⁴

(1.College of Physical Education, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2.School of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 3.School of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062, China; 4.School of Chemistry and Environmental Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: This paper present the results of the acute toxicity determination of 1 methyl-3-octylimidazolium bromide([C₈mim]Br) ionic liquid on earthworm *Eisenia foetida* and responses of the earthworm antioxidant system to the subchronic toxicity of this kind of ionic liquid, in which the activity of CAT, SOD, GST and the content of GSH and MDA were measured to evaluate the possible mechanism of [C₈mim]Br to *E. foetida*. The results showed that; the 7 d and 14 d LD₅₀ of ionic liquids to *E. foetida* were 206.8 mg·kg⁻¹ and 159.4 mg·kg⁻¹, respectively. And after 42 days of subchronic exposure to [C₈mim]Br, the CAT activity of *E. foetida* were inhibited significantly, the SOD activity were also inhibited at low concentrations(1~5 mg·kg⁻¹) of [C₈mim]Br, but were stimulated at high concentrations of 20~40 mg·kg⁻¹. As for the activity of GST, it was significantly higher than the control at 20~40 mg·kg⁻¹ of [C₈mim]Br. The content of GSH increased than the control while the MDA content had no changes after exposure. According to the above results, we assume that [C₈mim]Br might be absorbed by the earthworm gut or via the derma of earthworm, and then they disturb the metabolic reaction of earthworm and induce the feedback reaction of earthworm antioxidant system.

Keywords: 1-methyl-3-octylimidazolium bromide ionic liquid; *Eisenia foetida*; acute toxicity; subchronic toxicity; antioxidant system

一个世纪以来,人类在化工产业中使用了大量的有机溶剂,这些有机溶剂绝大多数都是易挥发、有毒

和有害的,给环境造成了非常严重的影响^[1]。寻找能够替代这类有机溶剂而且不存在(或尽可能低的)环境副作用的新型绿色溶剂成了当务之急。室温离子液体由于其独特的环境友好特性引起了人们越来越多的关注。离子液体熔点较低(低于 100 ℃)、不易挥发、导电性强、性质稳定^[2-3],在许多化学和生物反应中可以代替传统溶剂,显示了良好的应用前景^[4]。

但近年来关于离子液体生物毒性的报道表明,离

收稿日期:2008-05-14

基金项目:国家自然科学基金项目(20573034);河南省杰出人才创新工程项目(2006KYCX021)

作者简介:罗艳蕊(1974—),女,汉族,河南南乐人,博士,副教授。

E-mail:luoyr0227@yahoo.com.cn

通讯作者:李效宇 E-mail:lixiaoyu65@263.net

子液体对微生物^[4-5]、水生生物^[6-7]、哺乳动物细胞系^[3]存在明显的毒性效应,而且有些离子液体的毒性与传统有机溶剂相当。可是到目前为止,离子液体对于生物的毒性作用机理尚不清楚,而且受试生物种类也很有限,关于对土壤生物毒性的报道仅限于 Swatloski 等运用模式生物土壤线虫(*Caenorhabditis elegans*)研究离子液体毒性的初步报道^[8]。

蚯蚓是土壤生态系统的重要组成部分,而且对环境变化非常敏感,OECD 已经将赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)作为标准的毒理实验模式生物^[9]。所以本实验选用赤子爱胜蚓作为实验动物,研究常用的一种离子液体溴化 1-辛基-3-甲基咪唑([C₈mim]Br)对赤子爱胜蚓的急性毒性效应和亚慢性暴露期间赤子爱胜蚓体内 CAT、SOD、GST 活性和 GSH、MDA 含量的变化,研究离子液体对土壤生物的毒性并探讨其可能的毒性机理。

1 材料与方法

1.1 实验动物与药品

赤子爱胜蚓来自中国农业大学蚯蚓养殖基地。挑选 3 月龄以上的健康成蚓,生殖带明显,体长 5~6 cm,体重均匀,在 0.3~0.4 g 之间。

溴化 1-辛基-3-甲基咪唑([C₈mim]Br)根据 Bon-hôte 等的方法制备^[10],1-甲基咪唑和氯代正辛烷为分析纯,由上海化学试剂公司生产。实验所用其他药品均为分析纯。

1.2 实验方法

1.2.1 急性毒性实验

采用标准的 OECD 方法^[9],用人工土壤作为培养基质。每 1 000 g(干重)人工土壤中各成分的比例如下:石英砂 70%、高岭土 20%、草炭土 10%,用蒸馏水调节土壤湿度为 35%,pH(7.0±0.2)。在预实验的基础上选择 5 个等比级数试验浓度:118、141、168、200、237 mg·kg⁻¹ 和一个空白对照。用双蒸水配制[C₈mim]Br,均匀拌入人工土壤中,空白对照组加入同等体积的双蒸水,每个处理和对照组均设 4 个重复。

染毒前蚯蚓在人工土壤中预养 24 h,称重后放入含有不同浓度[C₈mim]Br 的人工土壤中,每 1 000 mL 的烧杯中装 750 g(湿重)人工土壤,每个处理放 10 条体长、体重均匀的蚯蚓,用塑料保鲜膜封口、扎孔,以保持湿度和空气的通透性。实验在人工气候箱中进行,温度(20±1)℃,湿度(75±2)%,光暗比为 12 h:12 h。定期喷洒少量双蒸水以保持基质的湿度。在实验进

行的第 7 d 和第 14 d 记录死亡数量及中毒症状,蚯蚓体对针刺无反应判为死亡,根据改进的寇氏法计算 LD₅₀。

1.2.2 亚慢性毒性实验

在急性毒性试验的基础上,选择 7 个[C₈mim]Br 浓度 0、1、2、5、10、20、40 mg·kg⁻¹ 进行亚慢性毒性实验。选择 10 条体重、体长相对均匀的蚯蚓置于含不同浓度[C₈mim]Br 的人工土壤中,每个处理 4 个重复。前 2 周实验条件与急性毒性实验完全相同,从第 3 周开始,每周在人工土壤的表面添加一次磨成粉末的干牛粪,每条蚯蚓添加 0.5 g 干牛粪^[11]。

于实验进行的第 42 d,将蚯蚓拣出,清洗干净后吸干水分并称重,以 1:4 的比例加入 Tris-HCl 缓冲液(0.1 mol·L⁻¹,pH 7.6),将匀浆用的玻璃试管置于冰块中,XHF-D 高速分散器匀浆,转速 9 000 r·min⁻¹,匀浆 1 min。电子天平配平后冷冻离心机离心,离心力 9 000 r·min⁻¹,离心 15 min,取上清液分装后于-20℃保存待测。主要检测亚慢性暴露 42 d 后,[C₈mim]Br 对蚯蚓 CAT、SOD、GST 的活性和 GSH、MDA 含量的影响。

1.2.3 测定方法

CAT 活力的测定采用紫外法^[12];SOD 活性的测定采用 NBT 法^[13];GST 活性的测定采用 1-氯-2,4-二硝基苯法^[14];GSH 含量的测定采用 Beutler 改良法^[15];MDA 含量的测定采用 TBA 法^[16];蛋白质含量的测定采用考马斯亮兰 G250 法^[17]。

1.3 数据统计与分析

所得实验数据用 SPSS 11.5 进行单因素方差分析,Dunnett-t 方法或者 Tamhane 方法比较处理组和对照组之间差异是否显著,结果用平均数±标准差表示,显著性水平为 $p<0.05$ 。

2 结果

2.1 [C₈mim]Br 对蚯蚓的急性毒性效应

在本实验条件下,[C₈mim]Br 对蚯蚓的 7 d-LD₅₀ 为 206.8 mg·kg⁻¹(可信限为 197.0~217.1 mg·kg⁻¹),14 d-LD₅₀ 为 159.4 mg·kg⁻¹(可信限为 151.0~168.1 mg·kg⁻¹)。

随着染毒时间的延长和染毒剂量的增大,部分蚯蚓出现环带肿大、身体萎缩、体重下降,在高浓度处理组中出现少量黄色渗出液。蚯蚓死亡后如未及时检出,蚯蚓体会自溶并消失。

2.2 [C₈mim]Br 对蚯蚓 CAT 活性的影响

从图 1a 可以看出,亚慢性暴露 42 d 后,所有浓度处理组蚯蚓 CAT 的活性都受到[C₈mim]Br 的抑制,与对照组之间差异显著。

2.3 [C₈mim]Br 对蚯蚓 SOD 活性的影响

图 1b 显示的是亚慢性暴露 42 d 后蚯蚓 SOD 活性的变化。在低浓度处理组(1~5 mg·kg⁻¹)蚯蚓 SOD 的活性受到抑制,而 20~40 mg·kg⁻¹ 处理组蚯蚓 SOD 的活性显著上升。

2.4 [C₈mim]Br 对蚯蚓 GST 活性的影响

图 1c 清晰地显示出在亚慢性暴露 42 d 后只有最高浓度的 2 个处理组(20~40 mg·kg⁻¹)蚯蚓 GST 的活性显著增加,而 1~10 mg·kg⁻¹ 的低浓度[C₈mim]Br 处理对蚯蚓 GST 的活性没有显著影响。

2.5 [C₈mim]Br 对蚯蚓 GSH 含量的影响

从图 1d 可以看出,亚慢性暴露 42 d 后,10~40 mg·kg⁻¹的[C₈mim]Br 引起蚯蚓 GSH 含量的增加,而 1~5 mg·

kg⁻¹ 的[C₈mim]Br 对蚯蚓 GSH 含量没有影响。

2.6 [C₈mim]Br 对蚯蚓 MDA 含量的影响

从图 1e 可以看出,亚慢性暴露 42 d 后[C₈mim]Br 对蚯蚓 MDA 含量没有显著影响。

3 讨论

在本实验条件下[C₈mim]Br 对蚯蚓的 14 d-LD₅₀ 为 159.4 mg·kg⁻¹,到目前为止尚没有关于离子液体对蚯蚓的毒性报道。但关于杀虫剂对蚯蚓的急性毒性的报道已经很多,Kokta 认为杀虫剂的 14 d-LD₅₀ 如果超过 1 000 mg·kg⁻¹ 即可认为对蚯蚓的存活无毒害作用^[1]。根据这个标准判断,[C₈mim]Br 对蚯蚓的存活有一定的毒性影响。在人工土壤中,[C₈mim]Br 对蚯蚓

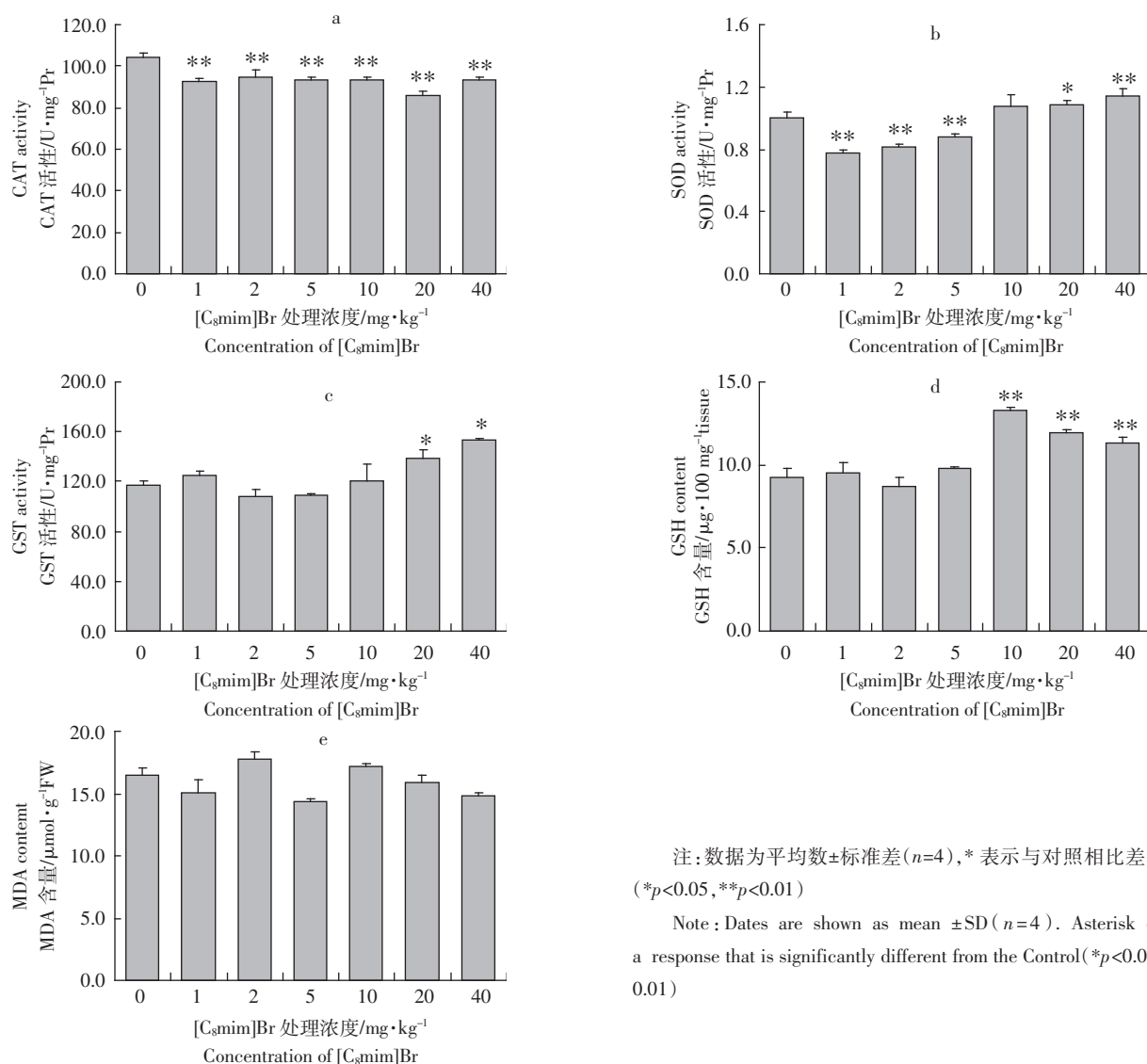


图 1 亚慢性暴露 42 d 后[C₈mim]Br 对蚯蚓 CAT、SOD、GST 的活性和 GSH、MDA 含量的影响

Figure 1 Effects of [C₈mim]Br on the activity of CAT、SOD、GST and the contents of GSH and MDA of *E. foetida* after 42 days of exposure

的毒性作用主要通过皮肤接触和肠道吸收两种途径,其中肠道吸收可能是主要的。

SOD 是一类将体内活跃并具潜在毒性的超氧阴离子 O₂⁻转变成 H₂O₂ 的主要酶,而 CAT 则负责清除体内多余的 H₂O₂,二者都在无脊椎动物体内抗氧化过程中起着重要的作用^[18-19]。本实验中亚慢性暴露 42 d 后,蚯蚓 CAT 活性显著降低,这表明长时间、低浓度的[C₈mim]Br 暴露后造成了蚯蚓体内活性氧的积累^[20]。而亚慢性暴露 42 d 后蚯蚓 SOD 酶活性的变化与[C₈mim]Br 浓度间的关系是先抑制后激活,与罗屿等^[21]观察到的吡虫啉对蚯蚓 SOD 活性的影响一致。低浓度离子液体处理蚯蚓较长时间,SOD 酶活性的抑制可能是通过影响电子传递系统的功能而间接导致的。

GST 由多个组分组成,在生物体内起着清除毒物并保护组织免受氧化压力的重要作用^[22]。据报道,由抗氧化剂或亲电子试剂反应成分所引起的氧化压力下,GST 的活性增强^[23]。在亚慢性的[C₈mim]Br 暴露 42 d 后,20 和 40 mg·kg⁻¹ 处理组刺激蚯蚓 GST 的活性增强,表明一定浓度的[C₈mim]Br 在亚慢性暴露后诱导了蚯蚓 GST 的活性上升。

GSH 是动物体内重要的水溶性抗氧化剂,在动物体内的解毒代谢中起着极其重要的作用。Stegeman 认为抗氧化防御系统的一个重要特征是 GSH 活性或含量可由于污染的胁迫发生改变^[24],本研究中蚯蚓体内 GSH 含量的增加表明[C₈mim]Br 确实引起了蚯蚓体内的氧化应激,GSH 含量的增加可能代表了机体对污染物暴露的适应性反应^[25]。

MDA 是机体内代谢产生的脂质过氧化物的代谢产物,MDA 含量的高低间接反映了机体的组织细胞受损伤的严重程度。本实验条件下蚯蚓体内 MDA 含量与对照组之间没有显著差异,这可能是由于染毒[C₈mim]Br 浓度较低,虽然引起蚯蚓体内活性氧的产生,但其毒性不足以导致蚯蚓体内发生脂质过氧化,因为蚯蚓体内抗氧化系统可能清除或有效地降低了[C₈mim]Br 所诱发的活性氧。

虽然到目前为止离子液体的生物毒性作用机理尚不清楚,对蚯蚓的毒性效应也未见报道,但从本实验结果可以发现,亚慢性浓度的[C₈mim]Br 暴露引起蚯蚓体内的抗氧化系统的反应,而抗氧化系统的负反馈作用引起了一系列抗氧化酶的活性变化及 GSH 含量的改变。在人工土壤中,[C₈mim]Br 对蚯蚓的毒性作用主要通过肠道吸收途径进入蚯蚓体内;同时由于[C₈mim]Br 离子液体能够完全溶解于水中,而且其结

构类似于阳离子表面活性剂^[26],所以在染毒期间因其亲脂性透过蚯蚓体壁细胞而进入体腔,干扰甚至破坏蚯蚓的正常生理生化过程,从而引起对蚯蚓的生物毒性效应。从本实验结果还可以发现,高浓度的[C₈mim]Br 离子液体可以导致蚯蚓的死亡,而较低浓度的离子液体会诱导蚯蚓体内抗氧化系统的反应,如抗氧化酶活性的升高、GSH 含量的增加等,这种负反馈作用是生物体普遍的一种保护机制。关于离子液体对蚯蚓的生物毒性机理,离子液体进入蚯蚓体内后的毒物代谢动力学、离子液体的靶器官等尚需进一步研究。

参考文献:

- [1] 胡常伟,李贤均.绿色化学原理和应用[M].北京:中国石化出版社,2004:11-93.
HU Chang-wei, LI Xian-jun. The principle and application of green chemistry[M]. Beijing: China Petrochemical Press, 2004: 11-93.
- [2] Couling D J, Bernot R J, Docherty K M, et al. Assessing the factors responsible for ionic liquid toxicity to aquatic organisms via quantitative structure property relationship modeling[J]. *Green Chem*, 2006, 8: 82-90.
- [3] Ranke J, Mölter K, Stock F, et al. Biological effects of imidazolium ionic liquids with varying chain lengths in acute *Vibrio fischeri* and WST-1 cell viability assays[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2004, 58: 396-404.
- [4] Matsumoto M, Mochiduki K, Kondo K. Toxicity of ionic liquids and organic solvents to lactic acid-producing bacteria[J]. *J Biosci Bioengin*, 2004, 98(5): 344-347.
- [5] Docherty K M, Kulpa C F. Toxicity and antimicrobial activity of imidazolium and pyridinium ionic liquids[J]. *Green Chem*, 2005, 7: 185-189.
- [6] Latała A, Stepnowski P, Nędzi M, et al. Marine toxicity assessment of imidazolium ionic liquids: acute effects on the Baltic algae *Oocystis sub-marina* and *Cyclotella meneghiniana*[J]. *Aquat Toxicol*, 2005, 73: 91-98.
- [7] Pretti C, Chiappe C, Pieraccini D, et al. Acute toxicity of ionic liquids to the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Green Chem*, 2006, 8: 238-240.
- [8] Swatoski R P, Holbrey J D, Memon S B, et al. Using *Caenorhabditis elegans* to probe toxicity of 1-alkyl-3-methylimidazolium chloride based ionic liquids[J]. *Chem Commun*, 2004, 6: 668-669.
- [9] OECD (The current Organization of Economic and Cooperative Development Acute Earthworm Toxicity Test) Guidelines for the testing of chemicals, No. 207. Earthworm acute toxicity tests. 1984.
- [10] Bonhôte P, Dias A P, Papageorgiou N, et al. Hydrophobic, highly conductive ambient-temperature molten salts[J]. *Inorg Chem*, 1996, 35: 1168-1178.
- [11] Kokta C. Measuring effects of chemicals in the laboratory: effect criteria and endpoints[C]//Greig-Smith P W, Becker H, Edwards P J, et al. (Eds.), *Ecotoxicology of Earthworms*. Springer Verlag, Intersept, UK, 1992: 55-62.
- [12] Beers R F, Sizer I W. Spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase[J]. *J Biol Chem*, 1952, 195: 133-140.

- [13] McCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase; an enzymic function for erythrocyte protein[J]. *J Biol Chem*, 1969, 244: 6049–6055.
- [14] Lukkari T, Taavitsainen M, Soimasuo M, et al. Biomarker responses of the earthworm *Aporrectodea tuberculata* to copper and zinc exposure: differences between populations with and without earlier metal exposure[J]. *Environ Pollut*, 2004, 129(3): 377–386.
- [15] 庞战军, 周 玫, 陈 媛. 自由基医学研究方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2000: 260–261.
PANG Zhan-jun, ZHOU Mei, CHEN Yuan. The studying method of medical free radical[M]. Beijing: Peoples Medical Publishing House, 2000: 260–261.
- [16] 陈建勋, 王晓峰. 植物生理学实验指导[M]. 广州: 华南理工大学出版社, 2002: 124.
CHEN Jian-xun, WANG Xiao-feng. Experimental instruction of plant physiology[M]. Guangzhou: South China University of Technology Press, 2002: 124.
- [17] 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.
- [18] Livingstone D R, Lips F, Martinez P G, et al. Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*[J]. *Mar Biol*, 1992, 112: 265–276.
- [19] Halliwell B, Gutteridge J M C. Free radicals in biology and medicine[M]. Oxford: Oxford University Press, 1999.
- [20] 高玉红, 孙新胜, 孙振钧, 等. 唑乙醇对蚯蚓的毒理学研究[J]. 农业环境科学学报, 2006, 25(6): 1450–1454.
GAO Yu-hong, SUN Xin-sheng, SUN Zhen-jun, et al. Toxicity of o-laquindox on earthworms[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2006, 25(6): 1450–1454.
- [21] 罗 屿, 臧 宇, 钟 远, 等. 新型杀虫剂对蚯蚓的生化毒理学研究[J]. 南京大学学报(自然科学版), 2000, 36(2): 213–217.
LUO Yu, ZANG Yu, ZHONG Yuan, et al. The biochemical toxicity of imidacloprid and RH-5849 on earthworms[J]. *Journal of Nanjing University(Natural sciences)*, 2000, 36(2): 213–217.
- [22] Fournier D, Bride J M, Poirie M, et al. Insect glutathione S-transferases: biochemical characteristics of the major forms of houseflies susceptible and resistant to insecticides[J]. *J Biol Chem*, 1992, 267: 1840–1845.
- [23] Ahlgren-Beckendorf J A, Reising A M, Schander M A, et al. Coordinate regulation of NAD(P)H:quinone oxidoreductase and glutathione-S-transferases in primary cultures of rat neurons and glia: role of the antioxidant/electrophile responsive element[J]. *Glia*, 1999, 25: 131–142.
- [24] Stegeman J J. Molecular responses to environmental contamination: enzyme and protein synthesis as indicators of chemical exposure and effects[C]//Huggett R A, Kimerle P M, Mehrle P M, et al. Biomarkers, biochemical, physiological and histological markers of anthropogenic stress. Florida. Lewis Publishers, Boca Raton, 1992: 235–335.
- [25] Kosower N S, Kosower E N. The glutathione status of cells[J]. *Int Rev Cytol*, 1978, 54: 109–159.
- [26] Cross J. Introduction to cationic surfactants[C]//Cross J, Singer E J. (Eds.). Cationic surfactants: analytical and biological evaluation. New York, Marcel Dekker, 1994: 227–233.