

异恶草酮对蚯蚓抗氧化酶活性及 DNA 损伤的研究

曹 佳^{1,2}, 刁晓平^{1,2*}, 胡继业^{3*}, 谢 嘉^{1,2}, 杜俊俏^{1,2}, 赵春风^{1,2}

(1. 海南大学农学院, 海口 570228; 2. 海南大学 海口市环境毒理学实验室, 海口 570228; 3. 北京科技大学化学与生物工程学院, 北京 100083)

摘 要: 采用人工土壤法研究了染毒 14 d 后不同浓度(0、10、20、40、80 mg·kg⁻¹)异恶草酮对赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性, 总抗氧化能力(T-AOC)和体腔细胞 DNA 损伤的影响。结果表明: 随着暴露浓度的增加, SOD 活性呈现先上升后逐渐下降的趋势, 低浓度(10、20 mg·kg⁻¹)能显著诱导 SOD 酶活性($P < 0.01$, $P < 0.05$), 诱导率分别为 19.56%、13.03%。CAT 活性在较低浓度时没有显著性变化, 当浓度达到 40、80 mg·kg⁻¹ 时出现显著性诱导($P < 0.01$), 诱导率分别为 43.42%、68.08%。T-AOC 在整个胁迫阶段呈现先降低后上升的趋势, 最终趋于正常水平, 20 mg·kg⁻¹ 暴露组 T-AOC 含量最低(5.74 U·mg⁻¹ pro), 比对照组减少了 44.54%。GSH-Px 酶活性在整个暴露阶段处于抑制状态。不同浓度的异恶草酮均能引起蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤, 暴露浓度与尾部 DNA 含量、Olive 尾距和尾长具有良好的剂量-效应关系($P < 0.01$)。上述结果表明抗氧化酶活性及 DNA 损伤可作为异恶草酮影响的生物标志物, 异恶草酮对土壤动物蚯蚓具有毒性作用, 对土壤环境具有潜在的生态风险。

关键词: 蚯蚓; 异恶草酮; 抗氧化酶; DNA 损伤

中图分类号: X503.223 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2013)05-0925-07 doi:10.11654/jaes.2013.05.007

Effects of Clomazone on Antioxidative Enzymes Activity and DNA Damage of Earthworm(*Eisenia foetida*)

CAO Jia^{1,2}, DIAO Xiao-ping^{1,2*}, HU Ji-ye^{3*}, XIE Jia^{1,2}, DU Jun-qiao^{1,2}, ZHAO Chun-feng^{1,2}

(1. College of Agriculture, Hainan University, Hainan 570228, China; 2. Haikou Key Laboratory of Environment Toxicology, Hainan 570228, China; 3. School of Chemistry and Biological Engineering, University of Science and Technology Beijing, Beijing 100083, China)

Abstract: Effects of clomazone at different concentration (0 mg·kg⁻¹, 10 mg·kg⁻¹, 20 mg·kg⁻¹, 40 mg·kg⁻¹, 80 mg·kg⁻¹) on activity of antioxidative enzymes of SOD, CAT, GSH-Px, T-AOC and DNA damage in earthworm (*Eisenia foetida*) were studied with an artificial soil test in 14 days of exposure. During the exposure period, there was a trend on the SOD activity by an initial significant increase ($P < 0.05$) and then following a gradual decrease. When the earthworms were exposed to 10 mg·kg⁻¹ and 20 mg·kg⁻¹ of clomazone, the activity of SOD increased significantly with induced rate of 19.56% and 13.03%, respectively. The activity of CAT had no significant change at the low concentrations (10 mg·kg⁻¹, 20 mg·kg⁻¹), and was induced at the higher concentrations (40 mg·kg⁻¹, 80 mg·kg⁻¹) with induced rate of 43.42% and 68.08%, respectively. The content of T-AOC was inhibited first but induced, then recovering to the level of control gradually. The content of T-AOC exposed to the concentration of 20 mg·kg⁻¹ decreased significantly with inhibition rate of 44.54%. The activity of GSH-Px was inhibited significantly during the period of exposure. The results showed that clomazone could induce DNA damage of earthworm coelomocytes at different exposure concentration. The significant dose-effect relationships were found among clomazone concentration and tail DNA percent, OTM as well as tail length ($P < 0.01$). The activity of antioxidative enzymes and DNA damage could be as biomarkers to indicate the direct toxic effect of clomazone on soil animals. The results indicated that clomazone had a potential ecological risk on soil environment.

Keywords: earthworm; clomazone; activity of antioxidative enzymes; DNA damage

农药是土壤污染物的重要组成部分, 农药使用后
有 80%~90% 进入土壤, 在土壤中的毒性、移动性和生

物活性都有所降低。异恶草酮(Clomazone)是广谱性
高效恶唑类大田除草剂广灭灵的主要成分, 主要用于
豆科作物防除禾本科及阔叶杂草。由于其显著的除草
效果, 因而使用范围呈不断扩大的趋势。异恶草酮与
土壤有中等积蓄的粘合性, 影响了其在土壤中的移动
性, 所以它在土壤中的生物活性可持续 6 个月以上。
异恶草酮性质稳定且难于降解的特性使其一旦持续

收稿日期: 2012-11-05

基金项目: 农业部农药登记残留试验资助项目

作者简介: 曹 佳(1987—), 女, 河南驻马店人, 硕士研究生, 从事生态
毒理学方面研究。E-mail: jiabiayang2006@126.com

* 通信作者: 刁晓平 E-mail: diaoxip@hainu.edu.cn;

胡继业 E-mail: jiyehu@ustb.edu.cn

大量使用,便会在环境中残留、累积起来,并对土壤生物产生一定的危害。研究表明异恶草酮对水生生物具有毒性作用,如 Crectani 等的研究表明异恶草酮对鲢鱼体内乙酰胆碱酯酶、过氧化氢酶有一定的抑制作用,并会导致肝脏损伤^[1]。何文等研究结果表明低浓度的异恶草酮($0.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对三叶浮萍的生长有明显的刺激作用,浓度较高时对三叶浮萍的生长具有明显抑制作用^[2]。有关农药生态毒理效应方面的研究表明农药可能会引起动物机体的突变、染色体变异或 DNA 损伤^[3]。然而,目前异恶草酮进入土壤环境后对土壤无脊椎动物蚯蚓的抗氧化酶系统与 DNA 损伤的研究尚未见文献报道。

蚯蚓作为陆地上生物量最大的一类土壤动物^[4],由于长期生活在潮湿的土壤中,其表皮角质层较普通陆生生物要薄,蚯蚓体还有很多腺孔与外界相通,因此对土壤中的外源性污染物非常敏感^[5],进而成为评价土壤环境安全的重要指示生物。蚯蚓的抗氧化酶系统能对化学物质的污染状况做出早期的预警^[6-7],该系统中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)均为生物防御系统的关键酶。总抗氧化能力(T-AOC)代表整个机体的抗氧化水平,是体内各种抗氧化酶共同作用的结果^[8]。单细胞凝胶电泳(彗星试验)是目前研究污染物对蚯蚓 DNA 损伤作用的主要方法^[9],蚯蚓体腔细胞彗星实验可以非常灵敏地检测环境污染物对靶位和非靶位生物的遗传毒性效应^[10]。本研究利用人工土壤法研究了不同浓度异恶草酮对赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)抗氧化酶系统如超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)及总抗氧化能力(T-AOC)的影响,同时研究了异恶草酮对赤子爱胜蚓的 DNA 损伤,拟筛选出敏感的生物标志物,以评价异恶草酮的生态毒理效应,并为异恶草酮对土壤环境的生态风险评估提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

异恶草酮原药(纯度 96%)购自山东先达化工有限公司。超氧化物歧化酶(SOD)测试盒、过氧化氢酶(CAT)测试盒、谷胱甘肽-过氧化物酶(GSH-Px)测试盒、总抗氧化能力(T-AOC)测试盒及总蛋白定量测试盒均购于南京建成生物工程研究所。其他药剂均为分析纯。

赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)来自海南大学农

学院动物科学系蚯蚓养殖基地。选用 300~400 mg、环带明显的健康成年蚯蚓为供试品。

1.2 仪器设备

SPX-250C 型人工气候箱(上海博迅公司),AY220 型电子天平(日本 SHIMADZU 公司),MilliQ 型纯水仪(美国 Millipore 公司),DHG-9071A 型电热恒温干燥箱(上海精宏公司),HH-S26s 型电热恒温水浴锅(金坛大地公司),UV-100 型紫外分光光度计(上海美普达公司),CR22G II 型冷冻离心机(日本 HITACHI 公司),玻璃组织研磨器,Olympus IX71 荧光显微镜(日本),DYY-7C 型电泳仪(北京六一公司),100~1000 μL 可调式微量加样器。

1.3 染毒方法

根据毒理实验常用的方法,在预实验的基础上确定异恶草酮的暴露浓度。按照 OECD(1984)的方法配制培养基质,每 1000 g(干重)人工土壤各成分的比例如下:石英砂 70%、高岭土 20%、草炭土 10%,用蒸馏水调节土壤湿度为 35%,适当添加碳酸钙,以调节 pH 值为(7.0 ± 0.2)。在预实验的基础上选择 5 个处理浓度:0、10、20、40、80 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。用丙酮溶解异恶草酮,均匀拌入人工土壤中,空白对照组加入同等体积的丙酮,每个处理和对照组均设 3 个重复。染毒前蚯蚓在人工土壤中育养 7 d,清肠并称重后放入含有不同浓度异恶草酮的人工土壤中,每个容器放入 10 条,同时在容器表面加入 30 g 研细的无药物污染牛粪作为蚯蚓饵料。实验在人工气候箱中进行,温度(20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$,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。

1.4 酶活性的测定

将染毒 14 d 后的蚯蚓置于湿润的滤纸上清肠 24 h,然后用无菌蒸馏水将蚯蚓清洗干净,称重,加入蚯蚓质量 4 倍的匀浆缓冲液($1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 7.8),快速磨成匀浆。匀浆物于低温(4°C)超速离心机上 $10\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 30 min,所得上清液 -80°C 保存备用。

按试剂盒说明测定 SOD、CAT、GSH-Px、T-AOC 的活性,蛋白含量用考马斯亮蓝试剂盒测定。每个处理设 3 个重复,每个重复设 3 个平行,每个平行重复测定 3 次。

1.5 彗星实验

1.5.1 蚯蚓体腔细胞提取

把蚯蚓个体置于 4°C 生理盐水中冲洗干净后移入离心管中,加 1 mL 的蚯蚓体腔细胞抽提液,浸泡

1.5 min,取出蚯蚓,剩余溶液离心($3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 3 min)。用 PBS 缓冲液冲洗沉淀物 2 次,离心($3000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, 3 min)待用。试验前,调整细胞浓度为 $10^6\text{ cells}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

细胞活力检测:取 1 滴细胞悬液加 1 滴苒盼蓝混匀,加至计数板内,高倍镜下镜检,活细胞为折光性良好的不着色细胞,死细胞被染成蓝色,胞体略膨大。

1.5.2 DNA 损伤测定

DNA 损伤测定参照 Singh 等(1998)的方法并加以改造。用细胞缓冲液制备 1.0% 正常熔点琼脂糖(NMA),并取 $150\text{ }\mu\text{L}$ 铺于毛玻璃载玻片上,固化。取 $10\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬浮液与 $75\text{ }\mu\text{L}$ 0.7% 低熔点琼脂糖(LMA)混匀后加到预处理过的毛玻璃载玻片上,固化。再加入 $85\text{ }\mu\text{L}$ 0.7% 低熔点琼脂糖于毛玻璃载玻片上。经细胞裂解和 DNA 解旋后,将电泳槽置于冰上,并在电压 23 V、电流 300 mA 条件下电泳 3 min。用 $\text{pH}7.5$ 、 $0.4\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 漂洗 3 次,使凝胶呈中性。然后用乙醇脱水,放于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,于 1 周内进行荧光分析。观察时将载玻片用 $80\text{ }\mu\text{L}$ 、 $2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ SYBR green 溶液染色,盖上盖玻片,在荧光显微镜下观察。

彗星实验中每条蚯蚓测量 10 个细胞,5 条蚯蚓为 1 组,每组含 50 个细胞的测量数据。通过荧光显微镜观察细胞,并用数码相机拍摄,在电脑上用 CASP 彗星图象分析软件自动分析。分析指标采用国际公认的 Olive 尾矩(Olive tail moment, OTM)、尾矩(TM)、彗尾 DNA 百分含量、彗尾长度。根据彗星尾部 DNA 百分含量,将 DNA 损伤程度分为 5 级^[11]。

0 级: <5%, 无损伤,细胞无拖尾,只有一个圆形细胞核形成的荧光头;

1 级: 5%~20%, 低度损伤,有少量拖尾;

2 级: 20%~40%, 中度损伤,出现明显拖尾;

3 级: 40%~95%, 高度损伤,出现严重拖尾;

4 级: >95%, 重度损伤,成为片断。

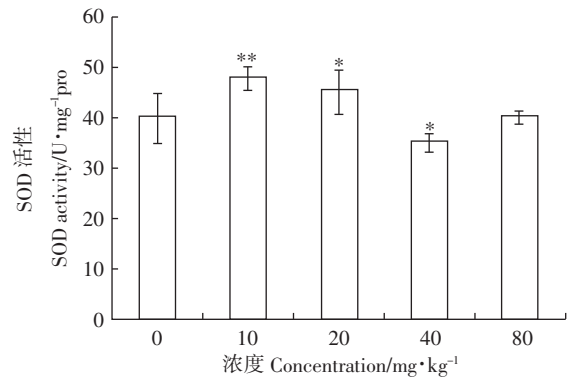
1.6 数据处理

实验结果采用平均数 $\pm$ 标准差表示,所有数据采用 Microsoft Excel 2003 和 SAS 8.1 软件处理,处理间差异的显著性检验采用 SAS 软件的 ANOVA 过程进行方差分析,多重比较采用 Duncan 法。极显著水平为 $\alpha=0.01$,显著水平为 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 异恶草酮对蚯蚓 SOD 活性的影响

异恶草酮对蚯蚓 SOD 活性的影响见图 1。蚯蚓暴露于异恶草酮 14 d 后,随着暴露浓度的增大,SOD



*, **: 与对照组比较, $P<0.05$, $P<0.01$ 。下同

*, **: compared with the control group, $P<0.05$, $P<0.01$. The same below

图 1 异恶草酮暴露对蚯蚓体内 SOD 活性的影响

Figure 1 Effects of clomazone on SOD activities in earthworm

活性先激活后抑制,最终趋于正常。暴露浓度为 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, SOD 活性被激活,诱导率为 19.56%,与对照组差异极显著 ($P<0.01$); 暴露浓度为 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, SOD 活性被激活,诱导率为 13.03%,与对照组差异显著 ($P<0.05$); 暴露浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, SOD 活性被抑制,抑制率为 12.17%,与对照组差异显著 ($P<0.05$); 暴露浓度为 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, SOD 活性与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。

2.2 异恶草酮对蚯蚓 CAT 活性的影响

异恶草酮对蚯蚓 CAT 活性的影响见图 2。与对照组相比,在较低暴露浓度下, CAT 活性无显著性变化; 在较高暴露浓度下, CAT 活性随浓度的增大而增大。异恶草酮暴露浓度较低 (10 、 $20\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 时, CAT 活性与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。异恶草酮暴露浓度为 $40\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, CAT 活性明显增加,诱导率为 43.42%; 当浓度升至 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, CAT 活力达到 $199.90\text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{ pro}$, 其诱导率为 68.08%, 与对照组相比差异极显著 ($P<0.01$)。

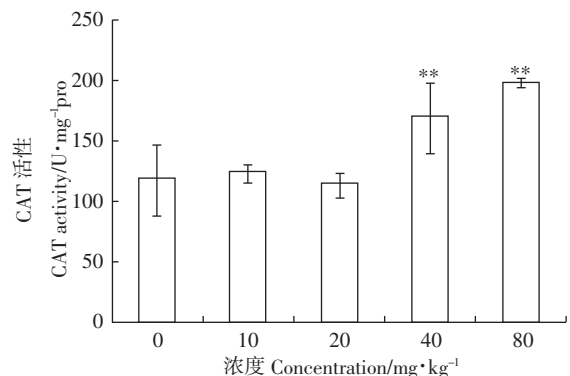


图 2 异恶草酮暴露对蚯蚓体内 CAT 活性的影响

Figure 2 Effects of clomazone on CAT activities in earthworm

2.3 异恶草酮对蚯蚓 GSH-Px 活性的影响

异恶草酮对蚯蚓 GSH-Px 活性的影响见图 3。GSH-Px 活性在整个暴露阶段处于抑制状态。暴露浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, GSH-Px 活性与对照组无显著性差异($P>0.05$); 暴露浓度为 $20, 40, 80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, GSH-Px 活性均呈现极显著抑制($P<0.01$), 抑制率分别为 21.75% 、 29.00% 、 19.48% , 但三个浓度组间 GSH-Px 活性无显著性差异($P>0.05$); 暴露浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, GSH-Px 活性最低($93.05 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$)。

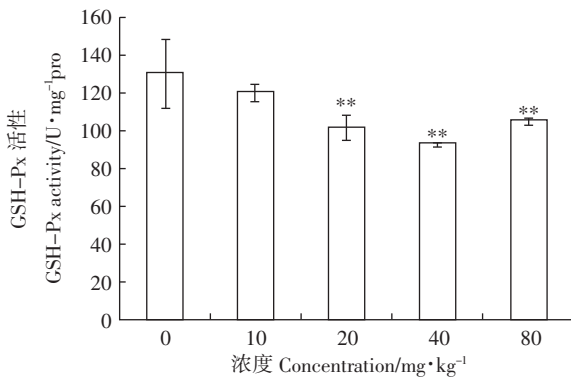


图 3 异恶草酮暴露对蚯蚓体内 GSH-Px 活性的影响

Figure 3 Effects of clomazone on GSH-Px activities in earthworm

2.4 异恶草酮对蚯蚓 T-AOC 的影响

异恶草酮对蚯蚓 T-AOC 含量的影响见图 4。T-AOC 含量呈现先降低再升高的趋势。除 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 暴露组外, T-AOC 水平均显著低于对照组。暴露浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, T-AOC 含量降至对照组的 79.33% , 显著低于对照水平($P<0.05$); 暴露浓度为 $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, T-AOC 含量降至最低($5.74 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ pro}$), 仅为对照组的 55.46% , 与对照组相比差异极显著($P<0.01$); 暴露浓度为 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, T-AOC 含量为对照组的 71.81% , 与对照组相比差异极显著($P<0.01$); 暴露浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时, T-AOC 含量升至对照组水平。

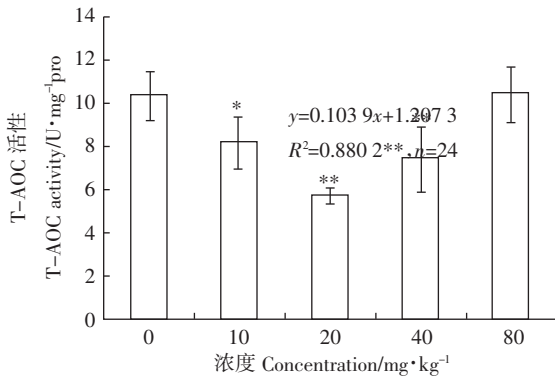


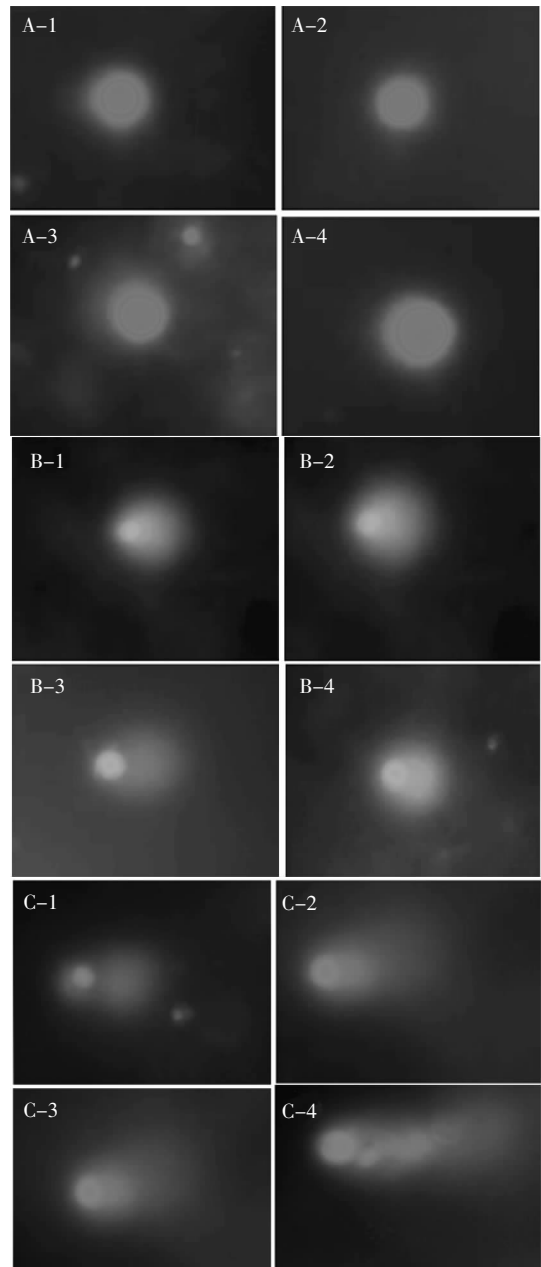
图 4 异恶草酮暴露对蚯蚓体内 T-AOC 的影响

Figure 4 Effects of clomazone on T-AOC activities in earthworm

2.5 异恶草酮对蚯蚓遗传毒性的影响

异恶草酮处理的蚯蚓体细胞经单细胞凝胶电泳后, 在荧光显微镜下可见浓集闪亮的头部和分散暗淡的尾部(图 5B、5C)。

由表 1 可见, 蚯蚓暴露于异恶草酮 14 d 后, 不同浓度异恶草酮的暴露均能引起蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤, 表现为彗尾 DNA 含量的增加、彗尾长度加长、Olive 尾距增加, 三个指标表现出良好的相关性。在较



A: 对照组; B: $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度组; C: $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度组

A: The control group; B: The $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ clomazone group; C: The $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ clomazone group

图 5 蚯蚓体腔细胞彗星图形

Figure 5 The comet figure of coelomocyte cells of earthworms

表 1 异恶草酮对蚯蚓体腔细胞 DNA 的损伤

Table 1 DNA damage of earthworm coelomocytes exposed to clomazone

处理浓度/ mg·kg ⁻¹	彗尾 DNA 含量/ %	彗尾长度/ μm	Olive 尾矩/ %·μm ⁻¹
对照组	0.34±0.59	3.200±0.63	0.096±0.13
10	25.721±9.37**	45.600±9.45**	13.185±5.09**
20	26.856±8.97**	50.750±9.27**	13.948±4.50**
40	35.542±8.28**	61.600±9.69**	20.127±5.08**
80	45.601±7.46**	79.150±10.59**	27.266±5.25**

注:*,** 分别表示与对照组在 $P<0.05$ 、 $P<0.01$ 水平的显著性。

低浓度(10 mg·kg⁻¹)时,蚯蚓体细胞核就出现了明显的拖尾现象,与对照组相比,彗尾 DNA 含量、彗尾长、Olive 尾矩均出现极显著性差异($P<0.01$)。随着异恶草酮暴露浓度的增大,彗尾 DNA 含量、彗尾长、Olive 尾矩均呈现出增大趋势,暴露浓度为 80 mg·kg⁻¹ 时,尾部 DNA 含量、尾长、Olive 尾矩值最大,遗传毒性相对最强,表明在异恶草酮暴露 14 d 后,DNA 的损伤与异恶草酮呈现出很好的剂量-效应关系。

3 讨论

3.1 异恶草酮对蚯蚓体内抗氧化酶系统的影响分析

生物体细胞代谢过程中会产生活性氧,在正常生长代谢条件下,细胞内活性氧的产生与清除处于一种动态平衡。当活性氧产生与清除失去平衡时,就导致氧化胁迫,使生物大分子、生物膜遭到可逆及不可逆损伤,严重时会引起细胞死亡^[12]。在污染物胁迫下,抗氧化酶的活性可能会发生诱导或抑制两种应激改变,这些改变并不是最终的毒理学效应,只是反映了生物体暂时所处的一种状态。诱导或抑制的出现,一方面取决于遭受胁迫的强度和持续时间,另一方面与遭受胁迫的生物种类的敏感性有关。机体抗氧化防御体系(SOD、CAT、GSH-Px 和 T-AOC)对生物体内氧化与抗氧化平衡起着重要作用,可以有效阻断自由基引起的连锁反应,从而起到抗氧化、抗衰老作用。大量的研究表明,生物体的抗氧化酶对污染物胁迫相当敏感,其活性变化可为污染物胁迫下的机体氧化应激提供敏感信息^[13]。

SOD 是消除细胞内生物氧化时产生的超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)的金属酶类,是生物体内重要的氧自由基消除剂。SOD 活性的激活可以更好地抵御氧化损伤,一旦生物体内超氧阴离子自由基过量,则会抑制 SOD 的活性。本研究发现,低浓度异恶草酮均能提高蚯蚓体内的 SOD 活力,其中 10 mg·kg⁻¹ 浓度组极

显著提高了 SOD 酶活性($P<0.01$),而 20 mg·kg⁻¹ 浓度组的 SOD 活力也显著高于对照组($P<0.05$),随着异恶草酮浓度的升高,蚯蚓体内的 SOD 活性开始下降,当异恶草酮浓度为 40 mg·kg⁻¹ 时,蚯蚓体内 SOD 活性显著低于对照组($P<0.05$),异恶草酮对蚯蚓体内 SOD 酶活性的影响呈现一种“先促进后抑制”的响应模式。SOD 活性显著升高说明异恶草酮的胁迫或代谢产生了超氧阴离子,在这些超氧阴离子的作用下机体 SOD 活性增加。机体通过提高 SOD 活力来抵御氧化损伤,一旦生物体内的超氧阴离子浓度超过了机体所能承受的范围,机体所产生的 SOD 无法有效降低超氧阴离子对机体的损害,此时 SOD 的活力就会降低^[14],所以在高浓度组出现了 SOD 活性显著低于对照的现象。刘嫦娥等^[15]发现多种除草剂对蚯蚓 SOD 活性的影响均表现为先升高后降低,与本实验结果相似。

过氧化氢酶(CAT)是存在于生物体内非常重要的抗氧化防御性功能酶之一,清除超氧化物歧化酶(SOD)歧化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)产生的过氧化氢(H_2O_2),因而在生物体抗氧化防御系统中占有重要地位^[16]。CAT 可有效清除生物体内过量的过氧化氢,维持细胞内过氧化氢平衡,其活性成分或含量可受污染的胁迫而发生改变。本研究表明,低浓度异恶草酮(10、20 mg·kg⁻¹)对 CAT 活性没有显著影响,随着异恶草酮浓度的升高,蚯蚓体内的 CAT 酶活性开始升高,当异恶草酮的浓度高于 40 mg·kg⁻¹ 时可以极显著提高蚯蚓体内的 CAT 活性($P<0.01$),可能的原因是低浓度时 SOD 活性诱导产生大量 H_2O_2 ,一旦 H_2O_2 含量超过一定范围,反而抑制 CAT 活性^[17]。也可能是由于蚯蚓体内抗氧化防御系统其他成分的介入,消除了部分活性氧质量分数^[18]。随着异恶草酮浓度的增大,SOD 歧化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)产生的过氧化氢(H_2O_2)则极显著提高了蚯蚓体内的 CAT 活性。蚯蚓体内 CAT 活性显著增加,表明蚯蚓通过提高 CAT 的活性来清除机体因污染胁迫而产生的自由基,以适应环境变化保持体内平衡^[19]。

GSH-Px 是一种含硒(Se)的酶,可以分解过氧化氢和过氧化物,清除细胞内脂质和有机过氧化反应的产物,阻断脂质过氧化连锁反应,从而达到保护细胞膜机构和功能完整的作用^[20]。本研究结果表明,不同浓度的异恶草酮均可以降低蚯蚓体内的 GSH-Px 酶活性,而当异恶草酮的浓度为 20、40、80 mg·kg⁻¹ 时 GSH-Px 活性被极显著抑制($P<0.01$),其中 40 mg·kg⁻¹

浓度组的 GSH-Px 活性最低,异恶草酮可能导致蚯蚓体内活性氧过度积累,其毒害作用超过了机体的承受能力,GSH-Px 活力中心被破坏,因而 GSH-Px 活性降低。也可能是由于 GSH-Px 的反应底物 GSH 被 GST 催化,与各种内源性和外源性亲电子化合物反应而使生物脱毒,GSH 减少进而影响 GSH-Px 的活性^[21]。

总抗氧化能力(T-AOC)是近几年研究发现的用于衡量生物机体抗氧化系统功能状况的综合性指标。T-AOC 的大小可代表和反映生物机体抗氧化酶系统和非酶系统对外来刺激的代偿能力以及生物机体自由基代谢的状态,T-AOC 具有很强的代表性,所以它是反映生物机体组织抗氧化功能的一个良好指标^[22]。其中酶促系统主要包括谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)及过氧化氢酶(CAT)等^[23]。本研究结果表明,除浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时 T-AOC 水平与对照组无显著差异外($P>0.05$),其他浓度组 T-AOC 水平均显著降低。可见,当异恶草酮进入蚯蚓体后,生物机会因抵御毒性效应而消耗大量的抗氧化物质,T-AOC 明显下降,生物机体对有毒物质的抵抗能力明显降低。

动物体的抗氧化能力是反应动物体对外界有毒污染物耐受程度的一项生理生化指标,本研究从抗氧化酶系统和非酶促系统两方面入手来研究异恶草酮对蚯蚓抗氧化能力的影响,而研究表明,低浓度的异恶草酮可以降低 GSH-Px 和 CAT 活力,以及升高 SOD 活力,而高浓度的异恶草酮则可以降低 GSH-Px 和 SOD 活力,以及升高 CAT 活力。这表明,在异恶草酮的胁迫下,蚯蚓通过自身的抗氧化酶系统降低异恶草酮所造成的应激,提高 SOD 活力以利于清除过多的超氧阴离子自由基,而由此产生的过氧化氢(H_2O_2)又促使 CAT 活力上升,过多的超氧阴离子自由基还造成了机体的氧化损伤,而表现出来的就是 GSH-Px 活力的下降。 20 、 40 、 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 浓度组的 T-AOC 的水平均低于对照,可见除了抗氧化酶系统外,异恶草酮还影响了蚯蚓的非酶促系统。异恶草酮对蚯蚓的胁迫,使得蚯蚓的抗氧化能力减弱,而 SOD、GSH-Px、CAT 和 T-AOC 均可以很好地反应异恶草酮对蚯蚓抗氧化能力的作用强度,可作为检测异恶草酮影响蚯蚓的生物标志物。

3.2 异恶草酮对蚯蚓遗传毒性的分析

除草剂对 DNA 损伤的研究已有大量文献报道,彗星实验可以有效地检测除草剂的基因毒性,除草剂(甲草胺、莠去津、百草枯、氟乐灵等)均引起细胞拖尾

的增长^[24]。本实验结果也印证了这个结论。异恶草酮可引起蚯蚓体腔细胞彗尾 DNA 含量、彗尾长、Olive 尾距显著升高($P<0.01$),且随着染毒剂量的增加呈现明显的剂量-效应关系。有研究表明,一些除草剂可以作为烷化剂,将烷基加到 DNA 链中嘌呤或嘧啶的 N 或 O 上使 DNA 烷基化,从而引起 DNA 的损伤。烷化作用是诱变机制中最常见的一种方式。多数有机磷农药含有 2~3 个烷氧基,有可能成为多官能团烷化剂使 DNA 双链间碱基同时烷化,引起交联作用,使得 DNA 不能进行复制和转录,严重时可能造成细胞死亡^[25]。异恶草酮亦存在一个烷氧基,其引起 DNA 损伤的机制可能是烷化作用。研究结果表明,随着异恶草酮暴露剂量的升高,处理组蚯蚓体腔细胞遗传损伤指标均呈上升趋势,可能是由于环境中异恶草酮浓度的增加导致进入蚯蚓体内的异恶草酮浓度上升,因异恶草酮中烷氧基的存在而发生的烷化作用,可能使蚯蚓 DNA 不能进行复制和转录,从而造成基因损伤加剧。

异恶草酮在较低浓度($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)时,彗尾 DNA 含量为 25.72% 已达到中等损伤,异恶草酮暴露浓度为 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 可达到重度损伤。蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤可以作为敏感的生物标志物来反映异恶草酮对土壤动物的毒性作用。

4 结论

(1)异恶草酮对蚯蚓的毒性作用过程中,SOD、GSH-Px、CAT 和 T-AOC 等抗氧化酶均可以很好地反映异恶草酮对蚯蚓体的毒性效应。

(2)异恶草酮暴露浓度与尾部 DNA 含量、Olive 尾距和尾长具有良好的剂量-效应关系,而较低浓度异恶草酮便造成蚯蚓体腔细胞中等损伤。

(3)抗氧化酶系统及 DNA 损伤均可作为指示异恶草酮对蚯蚓毒性作用的生物标志物,具有快速、灵敏的特点。

参考文献:

- [1] Ma'rcia C, Charlene M, Lissandra G, et al. Effect of clomazone herbicide on biochemical and histological aspects of silver catfish (*Rhamdia quelen*) and recovery pattern[J]. *Chemosphere*, 2007, 67: 2305-2311.
- [2] 何文,郭正元,贺仲兵. 异恶草酮水解动力学研究[J]. 武夷科学, 2005, 21(12): 110-112.
- [3] HE Wen, GUO Zheng-yuan, HE Zhong-bing. Hydrolysis dynamics of clomazone[J]. *Wuyi Science Journal*, 2005, 21(12): 110-112.
- [4] Bolognesi C. Genotoxicity of pesticides: A review of human biomonitoring studies[J]. *Mutation Research*, 2003(543): 251-272.
- [5] 左海根,林玉锁,龚瑞忠. 农药污染对蚯蚓毒性毒理研究进展[J]. 农村生态环境, 2004, 20(4): 68-72.

- ZUO Hai-gen, LIN Yu-suo, GONG Rui-zhong. Toxicology of pesticide pollution to earthworms[J]. *Rural Eco-Environment*, 2004, 20(4):68-72.
- [5] 郭非凡,裴国霞,张志,等.典型 POPs 对蚯蚓的亚急性毒性研究[G].持久性有机污染物论坛暨第一届持久性有机污染物全国学术研讨会论文,2006.
- GUO Fei-fan, PEI Guo-xia, ZHANG Zhi, et al. The research about sub-acute toxicity of the typical pops on earthworm[G]. Persistent organic pollutants forum and the first persistent organic pollutants national academic symposium, 2006.
- [6] Viswanathan R. Physiological basis in assessment of ecotoxicity of pesticides to soil organisms[J]. *Chemosphere*, 1997, 35(1-2):323-334.
- [7] 王轶,刁晓平,张先勇,等.莫能菌素对蚯蚓的生态毒理效应[J].农业环境科学学报,2010,29(6):1091-1097.
- WANG Yi, DIAO Xiao-ping, ZHANG Xian-yong, et al. Ecotoxicological effects of monensin pollution on earthworm (*Eisenia foetida*). [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6):1091-1097.
- [8] 王跃,李丽君,张育平,等.铬在中华稻蝗(*Oxya chinensis*)体内的累积及对抗氧化系统的影响[J].农业环境科学学报,2010,29(12):2281-2286.
- WANG Yue, LI Li-jun, ZHANG Yu-ping, et al. Accumulation of chromium in *Oxya chinensis* and its effects on the antioxidant system[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(12):2281-2286.
- [9] 徐冬梅,刘文丽,刘维屏.外源污染物对蚯蚓毒理作用研究进展[J].生态毒理学报,2009,4(1):21-27.
- XU Dong-mei, LIU Wen-li, LIU Wei-ping. Research advances in toxicological effects of external pollutants on earthworms[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(1):21-27.
- [10] 王轶,张先勇,刁晓平,等.莫能菌素对蚯蚓(*Eisenia foetida*)活体DNA的损伤研究[J].农业环境科学学报,2011,30(5):849-854.
- WANG Yi, ZHANG Xian-yong, DIAO Xiao-ping, et al. Effect of monensin exposure on DNA damage in earthworm (*Eisenia foetida*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(5):849-854.
- [11] 陆开宏,张双玲,张春景,等.应用彗星试验研究产毒微囊藻喂食暴露对铜锈环螺肝细胞DNA的损伤[J].农业环境科学学报,2010,29(6):1079-1085.
- LU Kai-hong, ZHANG Shuang-ling, ZHANG Chun-jing, et al. Detection of DNA damage in liver cells of *Bellamya aeruginosa* induced by *Microcystins* with comet assay[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(6):1079-1085.
- [12] 王辅明,朱祥伟,马勇鹏,等.低浓度五氯酚暴露对稀有鮡鲫体内SOD活性、GSH和HSP70含量的影响[J].生态毒理学报,2009,4(3):415-421.
- WANG Fu-ming, ZHU Xiang-wei, MA Yong-peng, et al. Effects of low concentration of pentachlorophenol exposure on SOD activity, GSH and HSP70 content in rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(3):415-421.
- [13] 刘文丽,徐冬梅,刘惠君,等.异丙甲草胺对蚯蚓体重及酶活性的影响[J].环境科学学报,2007,27(14):2025-2031.
- LIU Wen-li, XU Dong-mei, LIU Hui-jun, et al. Effects of metolachlor on the weight and enzyme activities of earthworms[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2007, 27(14):2025-2031.
- [14] 舒迎花,马洪辉,杜艳,等.玉米秸秆杀虫蛋白对赤子爱胜蚓酶活性的影响[J].应用生态学报,2011,22(8):233-239.
- SHU Ying-hua, MA Hong-hui, DU Yan, et al. Effects of Bt corn straw insecticidal proteins on enzyme activities of *Eisenia foetida* [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2011, 22(8):233-239.
- [15] 刘嫦娥.四种除草剂对蚯蚓生理生态的影响及其降解特征[D].昆明:云南大学硕士论文,2012.
- LIU Chang-e. Physiological ecological effects in earthworms treated with four herbicides and their degradation in soils [D]. Kunming: Master Dissertation of Yunnan University, 2012.
- [16] 杨帆,邹容,孙翰昌,等.辛硫磷对岩原鲤肝脏抗氧化防御系统的胁迫与生物响应[J].水生生态学杂志,2011,32(6):115-120.
- YANG Fan, ZOU Rong, SUN Han-chang, et al. Stress and biological response of phoxim on antioxidant defense system in liver of procypris rabaudi [J]. *Journal of Hydroecology*, 2011, 32(6):115-120.
- [17] Geret F, Serafim A, Barreira L, et al. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the clam *Ruditapes decussatus* [J]. *Biomarkers*, 2002, 7:242-256.
- [18] 范学铭,史小航,王哲娟,等.玉迪安对蚯蚓3种抗氧化酶活性的影响[J].中国农学通报,2010,26(13):319-323.
- FAN Xue-ming, SHI Xiao-hang, WANG Zhe-juan, et al. Effect of dean on *Eisenia foetida* three antioxidant enzymes activities [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2010, 26(13):319-323.
- [19] 郑丽萍,冯艳红,赵欣,等.氯丹和灭蚊灵污染场地土壤对蚯蚓的毒理效应研究[J].农业环境科学学报,2010,29(10):1924-1929.
- ZHENG Li-ping, FENG Yan-hong, ZHAO Xin, et al. Toxicity effects of chlordane and mirex contaminated soil on earthworm (*Eisenia foetida*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10):1924-1929.
- [20] 邓思平,赵云涛,朱春华,等.镉对尖紫蛤抗氧化酶活性及脂质过氧化的影响[J].水生生物学报,2012,36(4):689-695.
- DENG Si-ping, ZHAO Yun-tao, ZHU Chun-hua, et al. Effect of cadmium on the antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation in *Sanguinolaria acuta* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, 36(4):689-695.
- [21] 杨涛,陈海刚,蔡文贵,等.翡翠贻贝内脏团抗氧化酶活性及脂质过氧化物含量对苯并(b)荧蒽胁迫的生物响应研究[J].生态毒理学报,2011,5(6):539-545.
- YANG Tao, CHEN Hai-gang, CAI Wen-gui, et al. Response of antioxidant enzymes activities and lipid peroxidation levels in visceral mass of Green-Lipped Mussel (*Perna viridis*) to Benzo[b]fluoranthene stress [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 5(6):539-545.
- [22] 方展强,王春风.硒对汞致剑尾鱼鳃和肝组织总抗氧化能力变化的拮抗作用[J].实验动物与比较医学,2005,25(3):136-139.
- FANG Zhan-qiang, WANG Chun-feng. Antagonistic effect of selenium on the change of total anti-oxidative capacity of liver and gill tissues in swordtail fish initiated by mercury [J]. *Laboratory Animal and Comparative Medicine*, 2005, 25(3):136-139.
- [23] 张春玲,胡俊峰,王丕文,等.苯并(a)比对鲫鱼肝脏总抗氧化能力的影响[J].环境与健康杂志,2004,21(5):325-326.
- ZHANG Chun-ling, HU Jun-feng, WANG Pi-wen, et al. Effects of B(a)P on T-AOC in liver of *carassius auratus* [J]. *Journal of Environment and Health*, 2004, 21(5):325-326.
- [24] 崔永,郭江峰,陈子元.农药遗传毒性研究进展[J].核农学报,2005,19(2):159-162.
- CUI Yong, GUO Jiang-feng, CHEN Zi-yuan. Progress in studies on genotoxicity of pesticides [J]. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*, 2005, 19(2):159-162.
- [25] 林爱军,耿春女,朱永官,等.单细胞凝胶电泳技术及在土壤生态毒理学中的应用[J].生态学杂志,2005,24(8):975-979.
- LIN Ai-jun, GENG Chun-nü, ZHU Yong-guan, et al. Single cell gel electrophoresis technique and its applications in soil ecotoxicology [J]. *Chinese Journal of Ecology*, 2005, 24(8):975-979.