

3个湖泊中黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)体内 CYP1A1 和 GST 的比较及其功效分析

宋超¹, 钟立强², 裘丽萍¹, 陈校辉², 刘颖³, 范锋³, 陈家长^{1,4*}

(1.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081; 2.江苏省淡水水产研究所, 南京 210017; 3.无锡市动物疫病控制中心, 江苏 无锡 214000; 4.南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘要:环境中污染物生物标志物的选取和研究是环境监测的重要内容之一,作为污染物肝脏解毒作用的关键酶,多功能氧化酶(CYP1A1)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)常被用来作为多种污染物监测的生物标志物。比较了3个湖泊(巢湖、洪泽湖和鄱阳湖)黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)体内的 CYP1A1 和 GST 的活性,并对其进行功效分析。结果显示,3个湖泊中黄颡鱼体内 CYP1A1 和 GST 之间呈现反相关关系;洪泽湖黄颡鱼体内 CYP1A1 值明显小于其他两个湖,而洪泽湖黄颡鱼体内 GST 值明显大于巢湖,与鄱阳湖相比差异不显著。巢湖、洪泽湖和鄱阳湖黄颡鱼体内 CYP1A1 和 GST 的平均功效值分别为 0.81 和 0.42,当设定功效等于 0.8 时,3个湖泊 CYP1A1 的最佳样本量平均值为 20,而 GST 的最佳样本量平均值为 47。本文为利用功效分析的手段评估监测过程中所需要的最佳样本量,以期为进一步的污染物生物监测提供重要的数据参考。

关键词:黄颡鱼;CYP1A1;GST;功效分析;生物标志物

中图分类号:X835 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)10-2072-05 doi:10.11654/jaes.2013.10.025

The Activities of Glutathione S-transferase(GST) and Cytochrome P450 1A1(CYP1A1) of Yellow Catfish(*Pelteobagrus fulvidraco*) and Its Power Analysis from Three Lakes in the Middle and Lower Reaches of the Yangtze River

SONG Chao¹, ZHONG Li-qiang², QIU Li-ping¹, CHEN Jiao-hui², LIU Ying³, FAN Feng³, CHEN Jia-zhang^{1,4*}

(1.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2.Freshwater Fisheries Research Institute of Jiangsu Province, Nanjing 210017, China; 3.Wuxi Animal Disease Control Center, Wuxi 214000, China; 4.Wuxi Fishery College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China)

Abstract: The select and research of biomarker in environment pollutant is a key hotspot of environment monitoring. As key enzymes of detoxifying of liver, CYP1A1 and GST are often selected to be biomarkers of many related environment pollutants. The paper compared the activities and power of CYP1A1 and GST of yellow catfish(*Pelteobagrus fulvidraco*) in three lakes(Chaohu Lake, Poyanghu Lake, and Hongzehu Lake). The results showed that, the relationship of CYP1A1 and GST presented antidependence effect; the activity of CYP1A1 in Hongzehu Lake was obviously less than the other two lakes; the activity of GST in Hongzehu Lake was obviously more than Chaohu Lake. The average power of CYP1A1 and GST in Chaohu Lake, Poyanghu Lake, and Hongzehu Lake were 0.81 and 0.42, respectively. When the power was set to be 0.8, the optimum sample size of CYP1A1 in three lakes was 20, but the optimum sample size of GST was 47. Power analysis is used mainly to estimate sample sizes of biomarkers adopted for ecological and environmental monitoring in fisheries, as well as to estimate the required number of years to identify a significant reduction of protected fish populations in resource assessments. As an important statistical method, power analysis depends on the variability of data and the size of the target effect. The paper provided more detailed data of biology monitoring via using power analysis to estimate the optimum sample size of biomarkers.

Keywords: *Pelteobagrus fulvidraco*; CYP1A1; GST; power analysis; biomarker

收稿日期:2013-03-20

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2011JBFA16);江苏省科技自主创新基金[CX(11)1036]

作者简介:宋超,男,硕士,助理研究员,研究方向为渔业生态环境与生态毒理学。E-mail:songc@ffrc.cn

*通信作者:陈家长 E-mail:chenjz@ffrc.cn

随着工业化的发展,由于地表径流及不规范排放的影响,我国部分水体的污染日趋严重^[1],湖泊水体的“水华”^[2],以及有机污染物和重金属等在水生动物体内的富集现象时有发生。对污染物的形态分析、监测,及其生态环境效应的研究已成为环境科学研究的重点内容之一。

理化监测和生物监测是进行污染物环境监测的主要手段。理化监测能够使研究人员实时、精确地掌握某种污染物的时空分布特征,为污染限值及标准的制定提供详细的数据基础。但理化监测无法全面地反映生物体的综合效应,通过生物监测能够弥补这一缺点^[3]。如何选取合适的生物标志物一直是生物监测研究的热点之一。研究表明,近年来,长江中下游流域重点江段主要污染类型以富营养化的氮、磷和石油类污染为主,而富营养化产生的次级代谢产物,如藻毒素,以及石油类污染物的重要组分,即多种类型的多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs),在脊椎动物体内的代谢降解一般经过由多功能氧化酶(如 CYP1A1, 属细胞色素 P450 亚酶)催化的 I 相反应和由谷胱甘肽硫转移酶(Glutathione-S-transferase, GST)催化的 II 相反应后,进行解毒后的排泄。因此, CYP1A1 和 GST 常被用来作为污染物环境监测的生物标志物^[4-7]。

在利用生物标志物来对污染物进行生物监测时,其主要目的是检测出生物标志物所反映的生化效应的时空变化,而能够对效应值做出有效区分主要依赖于样本之间的变异(处理变异)、样本内的变异(自然变异)以及样本量的大小。目前的研究多关注于变异的统计处理,而很少解决样本量的选择带来的统计问题^[3]。

黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*)隶属于鲇形目(Siluriformes), 鲿科(Bagridae), 黄颡鱼属(*Pelteobagrus*), 是一种常见的中小型经济鱼类,广泛分布于长

江流域各湖泊及其他水系。属杂食性鱼类,主食底栖无脊椎动物^[8]。选择黄颡鱼作为生物指示物的优点在于其个体大小合适,不像鲢鱼、鳙鱼那样,幼鱼和成鱼相差太大,且黄颡鱼在长江流域各湖泊均易获得,方便采样和保存。本文监测了长江流域的洪泽湖、巢湖和鄱阳湖中黄颡鱼体内肝脏中 CYP1A1 和 GST 的空间变化,并试图利用功效分析(Power analysis)的手段评估监测过程中所需要的最佳样本量,以期为进一步的污染物生物监测提供数据参考。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

721 紫外可见分光光度计;荧光分光光度计(Varian Cary Eclipse);组织匀浆器(Pro 200);高速冷冻离心机(Sigma 2-16k);恒温水浴锅等。

谷胱甘肽硫转移酶测定试剂盒、总蛋白定量试剂盒(BCA 法)购自南京建成生物工程研究所;细胞色素 P450 亚酶 CYP1A1 活性荧光定量试剂盒购自上海杰美基因医药科技有限公司。

1.2 样本采集

样本采集地点在洪泽湖、巢湖、鄱阳湖,均属于长江水域。具体地理位置见图 1。

采集品种为黄颡鱼(*Pelteobagrus fulvidraco*),采集方式为人工捕捞。各个湖泊所采集到的黄颡鱼的基本参数见表 1。

1.3 酶活性的测定

取黄颡鱼的肝脏,按肝脏:匀浆缓冲液(重量:体

表 1 3 个湖泊所采集黄颡鱼的体长、体重和样本量

Table 1 The body length, body weight and sample size of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in three lakes

采样点	体长/cm	体重/g	样本量/n
巢湖	21.3±2.2	125.2±10.2	20
洪泽湖	19.8±1.8	113.3±9.5	20
鄱阳湖	20.8±2.3	119.5±11.2	21

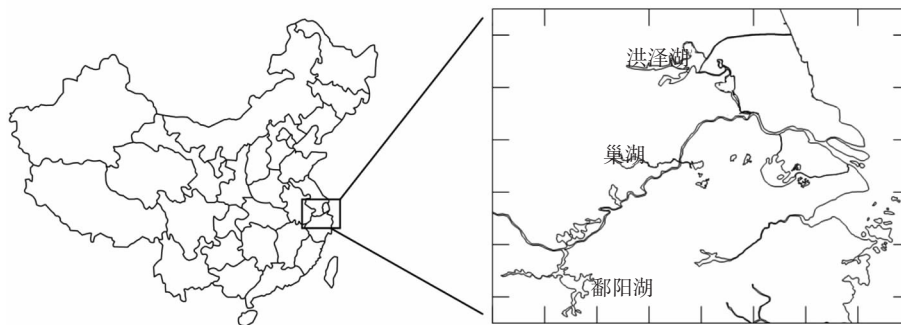


图 1 样本采集的地理位置

Figure 1 The geographic location of sample

积)为 1:9 加入匀浆缓冲液(0.1 mol·L⁻¹ Tris-HCl, 0.25 mol·L⁻¹ 蔗糖, pH7.4), 冰水浴中匀浆, 制成 10% 的组织匀浆液。匀浆液在 4 ℃, 13 500 r·min⁻¹ 离心 20~25 min, 即得肝脏微粒体上清液。取上清液用于酶活性分析。

采用试剂盒测定 GST 的活性, 单位为 U·mg⁻¹ prot, 定义为每毫克蛋白在 37 ℃ 反应 1 min 扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol·L⁻¹ 为一个酶活力单位, 具体方法见试剂盒说明书。

采用荧光定量试剂盒检测 CYP1A1 的活性, 单位为 pmol·mg⁻¹·min⁻¹, 定义为 37 ℃, pH7.5 条件下, 每分钟能够转化 1 nmol 乙氧基异吩噻唑至羟基吩噻唑酮所需的酶量作为一个活性单位, 具体操作方法见说明书。

采用 BCA 法测定蛋白含量。

1.4 统计分析

数据整理和绘图利用 Microsoft Excel 2003 和 PowerPoint 2003 完成; 方差分析和相关性分析利用 JMP 7.0 统计软件完成; 统计功效使用 G*Power 3.1 软件的单样本 *t* 检验和因果分析 (*Post-hoc*) 模式来计算。统计分析中使用的显著性水平为 $\alpha=0.05$ [9]。

功效分析的意义是可靠地拒绝原假设的概率, 由于 II 型错误 (The II error) 的概率 β 是一个错误的原假设被接受的概率, 根据功效的意义, 功效值应为 $1-\beta$ (图 2)。一般认为, 功效达到 0.8 是一个可以接受的阈值。在本文中, 功效被定义为在能够检测的最小效应值 ($\delta=20\%$) 条件下检测出的样本平均数 (μ) 与真实的总体平均数 (μ_0) 之间的差异显著的概率。通过上述关于功效分析的阐述, 在定义功效为 0.8, 最小效应值为 20% 时, 可以计算得到每个生物标志物在每个监测点的最佳样本量。其计算公式如下:

$$t_{\beta(1), (n-1)} = \delta / (s^2/n)^{1/2} - t_{\alpha, (n-1)}$$

式中: s^2 指样本的方差, n 指样本量, α 指 5% 的显著性水平。按上述公式表述, 在图 2 中, 横坐标表示两个样

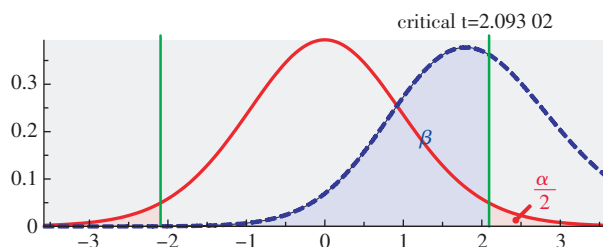


图2 统计功效(1-β)的示意图(由 G*Power 软件绘制)
Figure 2 The diagram of power analysis(1-β)(Drafted by G*Power software)

本统计量均值之差, 即效应大小, 而纵坐标为 *t* 分布统计量的值。具体方法请参考文献[3]。

2 结果与分析

2.1 3 个湖泊的黄颡鱼肝脏中 CYP1A1 和 GST 的空间变化及相关性分析

由表 2 和图 3 可知, 3 个湖泊中黄颡鱼肝脏中 CYP1A1 和 GST 的均值分别在 1.02~1.35 pmol·mg⁻¹·min⁻¹ 和 3.01~4.54 U·mg⁻¹ prot, 洪泽湖黄颡鱼体内 CYP1A1 值明显小于其他两个湖 ($P<0.05$), 而洪泽湖黄颡鱼体内 GST 值明显大于巢湖, 与鄱阳湖相比差异不显著。

由图 4 可知, 3 个湖泊中黄颡鱼肝脏中 CYP1A1

表 2 3 个湖泊黄颡鱼肝脏中 CYP1A1 和 GST 的均值

Table 2 The average activities of CYP1A and GST in liver of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in three lakes

采样点	CYP1A1/pmole·mg ⁻¹ ·min ⁻¹		GST/U·mg ⁻¹ prot	
	平均值	标准差	平均值	标准差
巢湖	1.29	0.28	3.01	1.79
洪泽湖	1.02	0.23	4.54	1.05
鄱阳湖	1.35	0.47	3.90	2.17

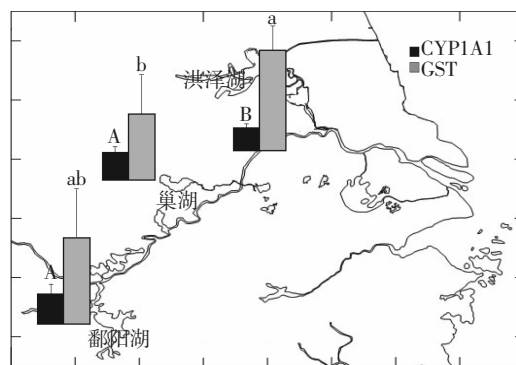


图3 3 个湖泊黄颡鱼肝脏中 CYP1A1 和 GST 的空间变化
Figure 3 The space variation of the activities of CYP1A1 and GST in liver of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in three lakes

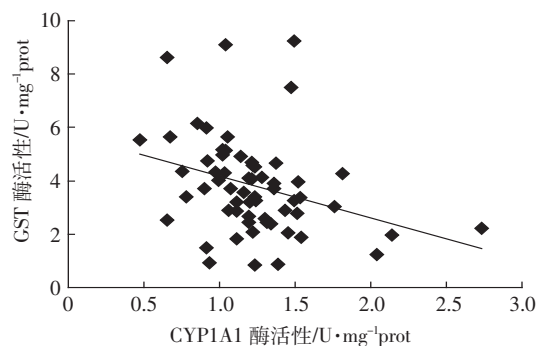


图4 3 个湖泊中黄颡鱼肝脏中 CYP1A1 和 GST 的相关性
Figure 4 The relationship of the activities of CYP1A1 and GST in liver of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in three lakes

和 GST 之间呈现反相关关系(可拟合方程为 $GST=5.73-1.57 \times CYP1A1$), $R^2=0.1013$,经检验反相关关系显著($P<0.05$)。

2.2 3 个湖泊的黄颡鱼肝脏中 CYP1A1 和 GST 的功效分析

由表 3 可知,3 个湖泊黄颡鱼体内 CYP1A1 和 GST 的变异系数分别为 0.22~0.35 和 0.23~0.59,后者平均值大于前者。

表 3 3 个湖泊黄颡鱼体内 CYP1A1 和 GST 的变异系数及功效分析

Table 3 The variation coefficients and power analysis of CYP1A1 and GST in liver of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) in three lakes

采样点	CYP1A1			GST		
	变异系数	功效值	$P=0.8$ 时的 sample size	变异系数	功效值	$P=0.8$ 时的 sample size
巢湖	0.22	0.97	12	0.59	0.30	70
洪泽湖	0.23	0.96	13	0.23	0.96	13
鄱阳湖	0.35	0.70	26	0.56	0.34	60
平均值	0.30	0.81	20	0.48	0.42	47

按此变异系数,根据采集时的样本量,可计算得到巢湖、洪泽湖和鄱阳湖黄颡鱼体内 CYP1A1 和 GST 的功效值分别为 0.97、0.96、0.70 (平均值为 0.81) 和 0.30、0.96、0.34 (平均值为 0.42)。在 CYP1A1 中,除鄱阳湖的功效值小于 0.8,其他均在 0.9 以上,而在 GST 中,除洪泽湖的功效值达到 0.96,其他均远小于 0.8。因此,当设定功效值等于 0.8 时,3 个湖泊 CYP1A1 的最佳样本量为 12~26,平均值为 20;而 GST 的最佳样本量为 13~70,平均值为 47。用于黄颡鱼生物标志物监测时,选择 GST 所需要的最佳样本量要大于 CYP1A1。图 5 反映了 CYP1A1 和 GST 的样本量与功效之间的关系。

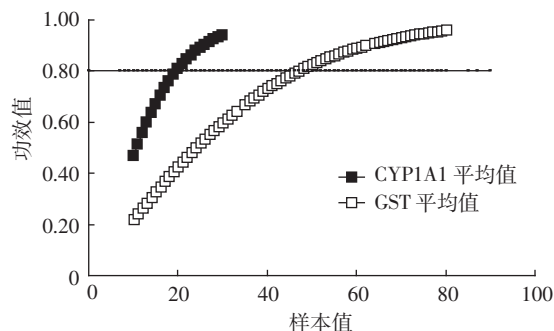


图 5 CYP1A1 和 GST 的样本量与功效之间的关系

Figure 5 The relationship between sample size and power of the analysis of CYP1A1 and GST in liver of yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*)

3 讨论

生物标志物能够反映鱼类对其周围环境污染的生物效应。与理化监测相比,该方法能够有效地避免污染物形态分析和时空监测的繁琐工作。CYP1A1 和 GST 作为常见的生物标志物,已被广泛应用于多种类型有机污染物的环境监测。国内常见的相关报道多集中在实验室内研究有机污染物对鱼类肝脏解毒酶 CYP1A1 和 GST 的剂量-效应和时间-效应关系^[6,10-13]。将此标志物从实验室研究扩展到野外的环境监测并不多见。将生物标志物单独用于环境监测,虽能反映鱼类对污染物的综合生物效应,但并不能具体细分是哪类污染物在所监测水域占主要成分。因此,某种污染物引起的相关生物标志物的变化只是污染水平表征的必要条件,将生物标志物的变化与污染物时空分布联系在一起研究能够较为全面地反映监测水域从理化到生物污染状况。而本文侧重于生物标志物的监测,并对用于环境中生物监测的生物标志物的最佳样本量做了详细的研究。

本文比较了巢湖、鄱阳湖和洪泽湖黄颡鱼体内肝脏中 CYP1A1 和 GST 的量。研究发现洪泽湖黄颡鱼体内这两种生物标志物的水平与其他两个湖泊有明显不同。这可能指示洪泽湖相关污染物的综合污染水平有别于巢湖和鄱阳湖。从地理位置上看,洪泽湖虽然与巢湖和鄱阳湖同属于长江水系,有着较为相似的生态环境,但是后两个湖泊与长江直接相连,而前者与长江间隔着高邮湖。地理位置的差异可能正是污染物种类或水平差异的依赖因素。

按照变异系数和样本量计算各自的统计功效,3 个湖泊 CYP1A1 的功效值在 0.70~0.97 之间,GST 的功效值在 0.30~0.96 之间。按照功效值达到 0.8 时可以认为已达到最佳样本量,CYP1A1 的样本量平均值为 20,刚好为采样时的样本量,说明 CYP1A1 的采样符合功效分析。而同样分析 GST,采样所需的最佳样本量为 47,已不能满足功效分析的要求。从两种生物标志物变异系数的分析来看,3 个湖泊的 GST 的变异系数平均值高于 CYP1A1,但是并没有产生显著差异。这可能是因为 GST 和 CYP1A1 两种酶均为肝脏解毒酶,处于同一个水平,相互之间变异系数并不能产生明显差异,只有与更低的水平(如形态差异)或更高的水平(如 DNA)之间比较,才有可能产生显著差异,以及更大的样本量差异。因此,虽然两者的最佳样本量相差一倍,但在变异允许的范围,这与以前的

研究结果相近^[14]。由于野外监测所观察的生物指示物背景差异较大,通过野外监测得到的数据通常具有较大的变异系数,这也就意味着野外监测需要较大的样本量,而室内试验条件可控、背景清晰,所得数据变异系数较小,因此样本量也较小。不论是室内监测,还是野外监测,样本量的大小是在最佳样本量和成本之间的平衡。如果在给定的样本量下,无法得到显著的效应差别,这也说明需要进行机制性的转变来替代原有的处理条件。

功效分析在渔业领域主要是被用来估算渔业生态环境监测中使用的生物标志物的样本量^[3],以及在渔业资源评估领域估算被保护鱼类种群出现显著性降低需要的年限^[15]。通过功效分析得到的最佳样本量能够较为准确地为接下来的该生物标志物的监测提供最佳采样样本量的参考。通常,文献中提及功效分析的使用仅占总文献数的5%左右^[16],且是在已取得不显著的试验数据之后(*Post-hoc*)用来估算此次试验的样本量是否合理。基于已得到不显著结果的*Post-hoc*功效分析是不合理的,而应将其使用集中在试验(*A-Priori*)功效分析的样本量估算中。在已得到试验结果时,应利用置信区间(Confidence intervals, CI)来估计与统计数据相一致的效应的大小^[16]。本文并不是对此次试验的样本量进行评判,而是利用已取得的基础数据,预估检出比例在15%或20%时的合理样本量,符合*A-Priori*功效分析的使用。

4 小结

(1)对巢湖、洪泽湖和鄱阳湖水体中黄颡鱼体内的CYP1A1和GST的值进行比较分析,发现洪泽湖黄颡鱼体内CYP1A1值明显小于其他两个湖,而其GST值明显大于巢湖,与鄱阳湖相比差异不明显。3个湖泊中黄颡鱼体内的CYP1A1和GST之间呈现显著的反相关关系。

(2)功效分析的结果认为,3个湖泊CYP1A1的最佳样本量平均值为20,而GST的最佳样本量平均值为47。

参考文献:

- [1] Cao L, Wang W, Yang Y, et al. Environmental impact of aquaculture and countermeasures to aquaculture pollution in China[J]. *Environmental Science and Pollutant Research*, 2007, 7(14):452-462.
- [2] Peter B. Aquaculture a solution, or source of new problems[J]. *Nature*, 1997, 386:109.
- [3] Fang J K H, Wu R S S, Yip C K M, et al. Power analysis for biomarkers in mussels for use in coastal pollution monitoring[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2009, 58:1152-1158.
- [4] Tairova Z M, Strand J, Chevalier J, et al. PAH biomarkers in common eelpout (*Zoarces viviparus*) from Danish waters[J]. *Marine Environmental Research*, 2012, 75:45-53.
- [5] Curtis L R, Garzon C B, Arkoosh M, et al. Reduced cytochrome P4501A activity and recovery from oxidative stress during subchronic benzo[a]pyrene and benzo[e]pyrene treatment of rainbow trout[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2011, 254(1):1-7.
- [6] Wang Y, Zheng R, Zuo Z, et al. Relation of hepatic EROD activity and cytochrome P4501A level in *Sebastiscus marmoratus* exposed to benzo[a]pyrene[J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2008, 20(1):101-104.
- [7] Wessel N, Santos R, Menard D, et al. Relationship between PAH biotransformation as measured by biliary metabolites and EROD activity, and genotoxicity in juveniles of sole (*Solea solea*) [J]. *Marine Environmental Research*, 2010, 69(Suppl):71-73.
- [8] Wu S, Gao T, Zheng Y, et al. Microbial diversity of intestinal contents and mucus in yellow catfish (*Pelteobagrus fulvidraco*) [J]. *Aquaculture*, 2010, 303:1-7.
- [9] Faul F, Erdfelder E, Lang A, et al. G*power3: A flexible statistical power analysis program for the social behavioral and biomedical sciences[J]. *Behavior Research Methods*, 2007, 39(2):175-191.
- [10] Billiard S M, Bols N C, Hodson P V. In vitro and in vivo comparisons of fish-specific CYP1A induction relative potency factors for selected polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2004, 59(3):292-299.
- [11] Willett K L, Wassenberg D, Lienesch L, et al. In vivo and in vitro inhibition of CYP1A-dependent activity in fundulus heteroclitus by the polynuclear aromatic hydrocarbon fluoranthene[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2001, 177(3):264-271.
- [12] Gorbi S, Regoli F. Induction of cytochrome P4501A and biliary PAH metabolites in European eel *Anguilla anguilla*: Seasonal, dose- and time-response variability in field and laboratory conditions[J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58(2-5):511-515.
- [13] Della Torre C, Tornambè A, Cappello S, et al. Modulation of CYP1A and genotoxic effects in European seabass (*Dicentrarchus labrax*) exposed to weathered oil: A mesocosm study[J]. *Marine Environmental Research*, 2012, 76:48-55.
- [14] 宋超, 胡庚东, 范立民, 等. 环境中多环芳烃(PAHs)的生物标志物的功效分析[J]. *生态毒理学报*, 2011, 6(6):589-594.
SONG Chao, HU Geng-dong, FAN Li-min, et al. Power analysis on the biomarkers used in biological monitoring of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2011, 6(6):589-594.
- [15] Maxwell D, Jennings S. Power of monitoring programmes to detect decline and recovery of rare and vulnerable fish[J]. *Journal of Applied Ecology*, 2005, 42:25-37.
- [16] Baker D H. Problems and pitfalls in animal experiments designed to establish dietary requirements for essential nutrients[J]. *The Journal of Nutrition*, 1986, 116:2339-2349.