

Sportak 对湘云鲫肝脏 SOD、CAT 酶活性的影响及其机制研究

彭晓春^{1,2}, 杨仁斌¹, 郭正元¹, 陈新庚²

(1. 湖南农业大学环境科学系, 湖南 长沙 410128; 2. 中山大学环境科学研究所, 广东 广州 510275)

摘要: 测定了暴露在 25% EC Sportak 水溶液中的湘云鲫肝脏中的 SOD 酶、CAT 酶活性的变化。结果表明, 随 Sportak 处理浓度和时间的不同, SOD、CAT 酶活性变化比较明显, 在同一浓度 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 不同时间 (8、24、48、72、96 h) 的处理中, SOD 酶、CAT 酶的活性是先降低后升高, 抑制率是先升高后降低; 在同一时间 (96 h) 不同浓度 (0、0.6、0.9、1.2、1.5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 处理组里, SOD、CAT 酶随处理浓度的升高, 活性降低, 抑制率随浓度的升高而升高, SOD 的 $\text{IC}_{50} = 2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, CAT 的 $\text{IC}_{50} = 1.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

关键词: Sportak; SOD; CAT; 酶活性; IC_{50}

中图分类号: X835 文献标识码: A 文章编号: 1000-0267(2002)02-

Effects and Interaction Mechanism of Sportak on SOD and CAT in Fish Xiangyunji's Liver

Peng Xiao-chun¹, Yang Ren-bin², Guo Zheng-yuan² and Chen Xin-geng¹

(1 Institute of Environment Sciences of Zhongshan University 510275 Guangzhou 2 Department of Environmental Sciences of Hunan Agriculture 410128 Changsha)

Abstract: Change of activities of SOD and CAT enzymes in liver of fish Xiangyunji, exposed at solution of 25% EC Sportak, was determined in this present test. The results indicated that the activities of SOD and CAT changed obviously with different concentrations and time. For the test groups treated with same concentration (1.5 mg/L) at different times (8、24、48、72、96h), the activities of SOD and CAT decreased initially, then increased, and the inhibition rate increased initially and then decreased. For the tested groups treated with the same time (96h) but at different concentrations (0、0.6、0.9、1.2、1.5 mg/L , the activity of SOD decreased with concentrations and the inhibition rate increased, $\text{IC}_{50} = 2.0 \text{ mg/L}$. The activity of CAT decreased and its inhibition rate increased with concentrations, IC_{50} was 1.7 mg/L .

Keywords: Sportak; SOD; CAT; enzyme activity; IC_{50}

对农药在水体中的迁移、转化、分布、富积和降解等已有较多研究。杉浦桂等对化学物质在湖水中的迁移转化过程进行了模式测定并建立了理论模型^[1-4]。在江河中, 鱼类是水生生态系统中较高的营养层, 它的变化是众多低营养层生物活性变化的综合反映。生态系统的应激反应可以通过营养物循环、优势种的种群规模、物种多样性的变化以及优势种的更替等方面反映出来。徐镜波、戴家银、王晓容等就有机污染物、重金属、稀土对鱼类等水生生物组织酶活性变化进行了研究, 但在农药方面研究得较少^[5-9]。Sportak (商品名: prochloraz) 作为一种咪唑类广谱性杀菌剂, 在国

内外广泛应用于防治水稻恶苗病、水果的保鲜剂、谷类作物的眼点病、叶斑病和白粉病等。Sportak 属新近引进的农药 (国内 25% EC Sportak 登记号为 LS93022), 有关 Sportak 的毒理学研究国内尚未见报道, 所以了解它的水生生态毒理特性, 特别是对鱼的毒性, 具有重要意义。湘云鲫 (*Carassius auratus*) 是中国工程院院士刘筠利用现代生物技术培育出来的新品种, 目前已在全国得到大面积的推广, 广泛应用于稻-鱼等生态农业模式。湘云鲫既是水生生态系统的重要成员, 对水质的净化和维护起着重要的作用, 又是人们非常喜爱食用的经济鱼类。本试验以湘云鲫作为研究对象, 就农药对湘云鲫肝脏 SOD、CAT 酶活性进行了研究, 为细胞分子水平的毒性机制探讨和农药的安全合理使用提供科学依据。

收稿日期: 2001-04-20

作者简介: 彭晓春 (1973—), 男, 博士研究生, 研究方向为水化学与水环境。

1 试验方法

1.1 试剂与材料

1.1.1 测定 CAT 部分

磷酸盐缓冲液 I ($C = 6.7 \times 10^{-2} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.0$): 用重蒸馏水溶解 3.522 g KH_2PO_4 和 7.268 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 定容至 1 000 mL; H_2O_2 —磷酸盐缓冲液 II: 用磷酸盐缓冲液 I 稀释 0.16 mL H_2O_2 (30%, W/V) 至 100 mL, 该溶液在 240 nm 处, 1 cm 比色皿下测定的吸光度应为 0.500 左右; 将磷酸盐缓冲液 I 稀释 10 倍, 配成 $C = 6.7 \times 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的磷酸盐缓冲液 III; 牛血清蛋白 $1\ 000 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$: 称取 100.00 mg 溶于 100 mL 蒸馏水中; 考马斯亮兰 G-250 溶液: 称取 100.00 mg 考马斯亮兰 G-250 溶于 50 mL 90% 的乙醇中, 加入 85% (W/V) 的磷酸 100 mL, 最后用蒸馏水定容至 1 000 mL。

752 分光光度计、研钵、离心机、计时表、石英比色皿等。

1.1.2 测定 SOD 部分

磷酸盐缓冲液 ($C = 0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $\text{pH} = 7.8$): 14.33 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 与 10.56 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 用蒸馏水定容至 1 000 mL; NBT 溶液 ($189 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 0.016 g NBT 用磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 7.8$) 定容至 100 mL; 甲硫氨酸 ($39 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 1.45 g 甲硫氨酸 (Met) 用磷酸盐缓冲液 ($\text{pH} = 7.8$) 定容至 250 mL; 核黄素 (VB_2) ($3.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 14.7 mg VB_2 用 $\text{pH} = 7.8$ 的磷酸盐缓冲液定容至 100 mL (I), 再从 I 中取 1 mL, 用磷酸盐缓冲液定容至 100 mL; EDTA · Na_2 溶液 ($1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$): 称取 0.018 6 g EDTA · Na_2 溶于 50 mL 蒸馏水中。

752 分光光度计、高速冷冻离心机、日光灯、光照度计、研钵及常用的玻璃仪器。

1.2 试验鱼及处理方法

试验鱼采用湘云鲫 (鲤) 长沙中试基地提供的 6 个月的湘云鲫鱼, 鱼体重全距为 20—30 g。鱼样于正式试验前在生态池里驯养 1—2 个星期, 在该期间未发现有异常现象。养鱼用水为经曝气脱氯的自来水。

1.3 正式试验过程^[20]

1.3.1 考察水中不同 25% EC Sportak 浓度对鱼体中的血液电解质的影响

试验容器用 30 cm × 25 cm × 25 cm 的玻璃缸, 每缸盛 10 L 试验液, 每缸放鱼 3 尾。根据 Sportak 对湘云

鲫的急性毒性试验, 浓度梯度设置为 $1/21\text{LC}_{50}$ — $1/6\text{LC}_{50}$, 试验设 4 个浓度组与 1 个对照组, Sportak 的浓度分别为 $0.6, 0.9, 1.2, 1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 采用静态试验方法, 试验期间不投饵料。试验周期为 96 h, 然后进行采样分析。

1.3.2 考察同一浓度不同试验时间内 25% EC Sportak 对鱼体中血液电解质的影响

试验容器用 60 L 的圆形塑料桶, 每桶盛 40 L 试验溶液 (Sportak 的浓度为 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), 每桶放养 15 条鱼。采用静态试验法, 分别在 8、24、48、72、96 h 对鱼样进行采样分析, 每次 3 尾。试验期间不投放饵料。

1.4 试验数据测定与处理

超氧化物歧化酶 (SOD) 活力水平的测定^[10-13]与过氧化氢酶 (CAT) 活力水平的测定^[5, 6, 12, 13]分别参照有关文献的介绍进行。IC₅₀ (median inhibition concentration) 是表示一种外源化学物将某种酶活力抑制 50% 所需的浓度, 该值的估算方法是: 将被测物暴露组 Sportak 浓度的自然对数值与各浓度组对鲫鱼肝脏 CAT、SOD 活性抑制百分数进行直线回归分析, 求出其 IC₅₀ 的估计值。

图 1 鲫鱼肝脏 SOD 活性与同浓度不同时间 Sportak 处理的关系
Figure. 1 Relationship between the activity of SOD in Xiangyunji' s liver and different treated times with the same Sportak concentrations

图 2 鲫鱼血清 SOD 活性与不同浓度 Sportak 处理的关系
Figure. 2 Relationship between the activity of SOD in Xiangyunji' s liver and different concentrations of Sportak

2 结果与分析

2.1 Sportak(25% EC)对鲫鱼肝脏 SOD 酶水平的影响

鲫鱼肝脏中的 SOD 酶水平随 Sportak 的处理时间和处理浓度的不同而不同,其变化曲线可用图 1、图 2 a 来表示。

图 2 a 曲线方程为 SOD 活性 ($\text{g} \cdot \text{鲜重}^{-1}$) = $218.776 - 62.113 C$, $R = 0.996$,相关性极显著。可见 Sportak 对鲫鱼肝脏 SOD 酶活性影响较大,在不同浓度处理组, SOD 活性随处理浓度的加大而降低,且成线性关系。在不同时间处理组, SOD 活性随时间的增加,首先降低,在 48 h 达到最低,随后,酶活性开始恢复。抑制率与活性变化相同。

2.2 Sportak(25% EC)对鲫鱼肝脏 CAT 酶水平的影响

鲫鱼肝脏 CAT 酶活性的变化随着 Sportak 处理浓度和处理时间的不同而不同, CAT 酶的活性随 Sportak 浓度和处理时间而变化的规律可用图 2 b、图 3 来表示。

图 3 鲫鱼肝脏 CAT 活性与不同 Sportak 处理时间的关系

Figure. 3 Relationship between activity of CAT in Xiangyunji's liver and time treated with Sportak

图 2 b 曲线方程为 CAT 活性 = $3.2 \times 10^4 - 1.0 \times 10^4 C$, $R = 0.995$,相关性相当显著。

右知, Sportak 对 CAT 活性影响较大,随处理浓度的增加,活性迅速降低,与浓度成线性相关,且相关性极显著 ($R = 0.995$);随处理时间的延长,活性首先降低,在 48 h 达到最低值,随后活性慢慢上升。

2.3 Sportak(25% EC)对鲫鱼肝脏 SOD、CAT 的抑制率

2.3.1 不同浓度的 Sportak 处理对 SOD、CAT 的抑制率及 IC_{50}

以 Sportak 处理浓度的自然对数为自变量,抑制率为因变量进行线性回归分析,可知,对于 SOD 的抑制百分率有: $I = 29.145 + 29.93 \ln c$ ($R = 0.985$),线性关系极显著,其酶活性抑制一半时的浓度为: $IC_{50} =$

$2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 对于 CAT: $I = 32.948 + 31.042 \ln c$ ($R = 0.993$),线性关系极显著,其 $IC_{50} = 1.73 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

随着浓度的增加, SOD、CAT 的抑制率都是增加的,且与处理浓度的自然对数成线性相关。这说明: SOD、CAT 这两种酶的活性变化能够在某种程度上灵敏地指示生物体暴露的有毒物质的浓度。

2.3.2 不同时间处理下 Sportak 对鲫鱼肝脏 SOD、CAT 的抑制率

超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的抑制率随处理时间的变化规律见图 4。

图 4 SOD、CAT 抑制率与 Sportak 处理时间的关系

Figure. 4 Relationship of inhibition rates of SOD and CAT in Xiangyunji's liver and time treated with Sportak

可知, SOD、CAT 的抑制率与处理时间存在一个正态分布,首先随处理时间的延长,抑制率是上升的,在 48 h 达到峰值,随后酶活性慢慢恢复,抑制率随之下降。

毒性化学物暴露后普遍后果是生物体酶的活性会受到抑制,这里所强调的酶的活性抑制是指原发的初级酶蛋白功能降低。大量试验研究表明:外源性化学物质进入生物细胞后,会导致大量活性氧的产生,包括超氧阴离子自由基 ($O_2^- \cdot$ 或 $O_2^{\cdot-}$)、氢过氧自由基 ($H O_2^- \cdot$)、过氧化氢 (H_2O_2)、羟基自由基 ($OH \cdot$) 以及单线态氧 ($O_2 \cdot$),从而对机体诱发多种损害,而机体内同时存在着抗氧化作用的酶防卫系统,如 CAT 和 SOD 等,它们在机体内广泛存在,尤其在肝脏中含量很高。SOD 是一类金属酶,能催化 $O_2^- \cdot$ 发生歧化反应: $2 O_2^- \cdot + 2H^+ \rightarrow H_2O + O_2$,从而清除 $O_2^- \cdot$,CAT 则能够催化分解 H_2O_2 : $2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$,从而清除 H_2O_2 。Sportak 进入生物体后,首先在肝脏中进行氧化分解解毒,多功能氧化酶 (MFO) 参与了这一进程, Cyp-450 活性会受到诱导。在微粒体电子传递过程中,会发生 ROS 的泄漏^[14,15]。

细胞内具有许多酶促的防御系统和化学清除剂来清除细胞中形成的氧自由基,这些防御系统又分为初级和次级两大类:所谓初级或预防性防御(preventive defenses)是通过减少自由基浓度来减低自由基反应的启动速率;而次级防御又称为破链防御(chain-breaking defenses),是通过捕捉扩散的自由基而在早期阶段终止它们的有害作用^[16]。

2.4 分析探讨

由前面的分析可知, Sportak 在生物体内的氧化还原转化过程中,会产生活性氧等自由基,为了清除细胞中形成的氧自由基,细胞内 SOD 和 CAT 酶会通过细胞应激作用产生大量的酶蛋白,以减少自由基的浓度,从而清除活性氧对机体的损害作用。水体中 Sportak 的浓度越高,对鱼的伤害作用愈大,机体产生的活性氧含量亦随之增大,因而 SOD、CAT 酶的活性随之降低。而在同一浓度不同时间 Sportak 的处理组中, Sportak 进入生物体后,首先进行肝脏的解毒作用。因初始时,机体内 Sportak 是一个富集占主动的过程,分解量小于富集量,机体内的 Sportak 浓度逐步增加,所以 SOD、CAT 酶活性的抑制是逐渐加大的。随着 Sportak 富集到某一最高浓度后,分解量开始大于富集量,分解作用开始占优势,SOD、CAT 酶活性会出现一个逐渐恢复的过程。试验过程也验证了这一推测:CAT、SOD 酶的活性在 48 h 前是个逐渐降低的过程,48 h 达到最低值,随后 SOD、CAT 的活性逐渐恢复提高。据 Snegaroff, Jacques^[17]、Needham, D^[18]、Laignelet, L^[19]等研究报道,当 Sportak 进入生物体后,经历了广泛的代谢过程(extensive metabolism),首先通过烷基链的水解作用打开咪唑环,形成 N-丙基-N-[2-(2,4,6-三氯苯氧基)乙基]脲(N-propyl-N-[2-(2,4,6-trichlorophenoxy)ethyl]urea, BTS 44 595),这是一种能提高艾氏剂环氧酶(aldrin epoxidase)和 7-试卤灵-O-脱烷基化酶(7-pentoxoresorufin-O-dealkylase)活性的苯巴比通鲁米那(phenobarbitone)型诱导剂(inducer),随后 BTS 44 595 代谢成 2,4,6-三氯苯氧基乙醇(2,4,6-trichlorophenoxyethanol)和 2,4,6-三氯苯氧基乙酸(2,4,6-trichlorophenoxyacetic acid),还伴有微量的其它物质。这是两种安妥明型(clofibrate type)诱导剂,能提高月桂酸-12 羟化酶(lauric acid 12-hydroxylase)的活性。在这一过程中,MFO(mixed-function oxidase)参与了这一反应。

Sportak 在植物体中主要的代谢体是 BTS44 595 和 BTS44 596,伴有微量的 2,4,6-三氯苯氧基乙酸,

这说明 Sportak 对生物体具有较强的选择毒性。在动物体中,肝脏进行解毒时,线粒体和微粒体等细胞器在生物转化过程中会产生 ROS,为了清除机体的活性氧危害,机体会发生氧化应激,SOD 和 CAT 酶的水平会发生变化,并且随处理浓度和处理时间的不同而发生变化。

3 结论

(1) 25% EC Sportak 对湘云鲫肝脏 SOD、CAT 酶的活性有影响,抑制率与处理浓度和时间呈正相关。

(2) 在本试验浓度范围内,在同一浓度(1.5 mg · L⁻¹)不同时间(8、24、48、72、96 h)的处理中,SOD 酶、CAT 酶的活性是先降低后升高,抑制率是先升高后降低;在同一时间(96 h)不同浓度(0、0.6、0.9、1.2、1.5 mg · L⁻¹)处理组里,SOD 酶随浓度的升高,活性降低,抑制率升高,IC₅₀ = 2.0 mg · L⁻¹。CAT 酶活性随浓度的升高而降低,抑制率随浓度的升高而升高,IC₅₀ = 1.7 mg · L⁻¹,且都成正相关。

(3) SOD、CAT 酶作为生物抗氧化防御体系中的两种重要的酶,可以作为鱼类有机污染物的良好生物指示剂。

参考文献:

- [1] [日]杉甫桂. 化学物质对湖泊生态系统影响的评价[J]. 国外环境科学技术,1987,44(3):39-45.
- [2] [日]青山勋. 生态系统中有毒物质的评价模式[J]. 国外环境科学技术,1988,48(1):10-15.
- [3] [日]今村. 低残留化学物质对生态系统毒性影响的评价[J]. 国外环境科学技术,1988,48(1):16-21.
- [4] Connell D. 生态毒理学—认知环境中危险化学品的新途径[J]. 国外环境科学技术,1988,53(6):48-53.
- [5] 徐镜波,等. 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.
- [6] 徐镜波,等. 过氧化氢酶活性及活性抑制的测定[J]. 环境化学,1994,13(3):279-281.
- [7] 戴家银,等. 铜和锌离子对真鲷幼鱼组织酶活性的影响[J]. 环境科学,1998,19(5):60-62.
- [8] 顾晓军. 瑞劲特与马拉硫磷对麦穗鱼乙酰胆碱酯酶协同作用研究[D]. 南京:南京农业大学博士学位论文,1999.
- [9] 王华婷,孙昊,王小蓉. 稀土元素在鱼体内脏中的富集及对肝脏中酶活性的影响[J]. 中国环境科学,1999,19(2):141-144.
- [10] 袁勤生. 超氧化物歧化酶的分析测定[J]. 中国医药工业杂志,1989,20(10):473-477.
- [11] 王继贵. 临床生化检验[M]. 第二版. 长沙:湖南科学技术出版社,1996.
- [12] 湖南农业大学生物化学及分子生物学教研室. 生物化学实验技术(研究生用). 1998.

- [13] 湖南农业大学动物科技学院. 动物生物化学实验指导. 1995.
- [14] 朱昌亮, 吴观陵, 张兆松. 昆虫细胞色素 P-450 分子生物学研究进展[J]. 中国寄生虫学与寄生虫病杂志, 1999, **17**(1): 46 - 49.
- [15] 邱星辉, 冷欣夫. 昆虫细胞色素 P-450 研究: P-450 酶系的可诱导性[J]. 昆虫知识, 1999, **36**(1): 48 - 53.
- [16] 张 铎, 刘毓谷. 毒理学[M]. 北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社, 1997.
- [17] Snegaroff, Jacques et al. Effect of the fungicide prochloraz on Xenobiotic metabolism in rainbow trout: inhibition in vitro and time course of induction in vivo[J]. *Xenobiotica*, 1989, **19**(3): 255 - 267.
- [18] Needham D, et al. The profile of rat liver enzyme induction produced by prochloraz and its major metabolites[J]. *Xenobiotica*, 1992, **22**(3): 283 - 291.
- [19] Laignelet L, et al. Metabolism of an imidazol fungicide (prochloraz) in the rat after oral administration[J]. *Food Chem Toxicol*, 1992, **30**(7): 575 - 583.
- [20] 徐晓白. 典型化学污染物在环境中的变化及生态效应[M]. 北京: 中国科技出版社, 1996.