

菲和芘对蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 细胞色素 P450 和 抗氧化酶系的影响*

张 薇^{1, 2} 宋玉芳^{1, 3*, *} 孙铁珩^{1, 3} 宋雪英^{1, 3} 周启星^{1, 3} 郑森林^{1, 2}

(1 中国科学院沈阳应用生态研究所陆地生态过程重点实验室, 沈阳, 110016 2 中国科学院研究生院, 北京, 100039;
3 沈阳大学沈阳环境工程重点实验室, 沈阳, 100041)

摘 要 研究了菲和芘在单一低剂量污染胁迫下对蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 体内细胞色素 P450 酶系和抗氧化酶系的影响. 通过滤纸接触染毒法, 检测蚯蚓细胞色素 P450 含量以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的活性. 结果表明, 在供试浓度范围内, 蚯蚓体内细胞色素 P450 含量和三种抗氧化酶活性均对毒物产生了不同程度的响应. 菲和芘在蚯蚓体内的代谢诱发了细胞色素 P450 总含量的增加, 且在此过程中有活性氧自由基产生. 不同酶对毒性效应响应的域值不同, 其敏感性大小为: P450 > SOD (POD) > CAT. 根据四个指标对污染物浓度响应的域值不同, 可将四者联合应用互为补充作为一套生物标记物体系, 以满足污染物不同暴露浓度下土壤的毒理诊断, 增强指示的敏感性和有效性.

关键词 菲, 芘, 蚯蚓 (*Eisenia fetida*), 细胞色素 P450, 抗氧化酶, 生物标记物.

目前, 应用蚯蚓体内一些敏感的生理和生化指标作为污染物暴露的标记物已成为研究的热点, 其中细胞色素 P450 以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶 (CAT) 抗氧化酶系的生物指示效应, 已在水生和陆生污染暴露环境中不同生物体内得到了证实, 并且受到了广泛的关注^[1-7].

对菲和芘毒性效应的研究多集中于蚯蚓急性毒性和高等植物的毒理试验等^[8-10], 例如选取细胞色素 P450 酶系中的乙氧基异吩噻酮-脱乙基酶 (EROD) 活性和抗氧化酶系中的过氧化氢酶 (CAT) 活性来指示较高浓度芘暴露下蚯蚓的生化响应, 但是在供试浓度内未检测到 EROD 活性, 而 CAT 活性也未发生变化, 只是在芘浓度较高 ($640\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 的情况下 CAT 活性略有下降^[11].

本实验以蚯蚓为供试生物, 以细胞色素 P450 总含量和抗氧化酶系中的 SOD, POD 和 CAT 活性为指标, 通过滤纸接触试验, 研究菲和芘在单一低剂量污染胁迫下蚯蚓的生理响应. 探讨适合土壤多环芳烃亚致死浓度污染诊断的生物标记物, 为土壤毒理诊断提供新的手段. 进而, 为解释蚯蚓代谢有机污染物的可能生理机制提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 滤纸接触诱导试验

蚯蚓赤子爱胜 (*Eisenia fetida*) 购自天津蚯蚓养殖中心. 选用 2—3 月龄, 体重 350—450mg 带有环带的健康蚯蚓为供试品.

滤纸接触试验参照国际标准方法组织草案 OECD (1984) 指南建立^[12]. 采用长 7cm, 直径 4cm 的平底玻璃管, 玻璃管内壁衬铺滤纸, 滤纸大小以覆盖玻璃管且不重合为准. 以 10 的指数设计从 10^{-2} 到 $10^{-6} \text{mg} \cdot \text{m}^{-1}$ 5 个浓度和 1 个空白. 将菲和芘溶于丙酮并稀释至所需浓度系列. 在每一个试验瓶中均加入 1m l 丙酮 (空白) 或所需浓度的菲和芘溶液, 自然挥发 2h 后, 用 1m l 蒸馏水润湿滤纸. 每个试验瓶中均加入 1 条蚯蚓 ($400\text{mg} \pm 50\text{mg}$), 再用塑料薄膜封住玻璃瓶口, 于 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中避光培养. 48h 后, 将蚯蚓取出, 测定蚯蚓体内细胞色素 P450 含量和抗氧化酶活性. 为减少样本带

2006 年 2 月 26 日收稿.
* 国家自然科学基金项目 (2033701Q 20577056); 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418503); 沈阳大学沈阳环境工程实验室及中国科学院沈阳应用生态研究所海外留学基金项目. ** 通讯联系人, E-mail Songyufang@iae.ac.cn

来的误差影响, 每个处理组和对照组均选择 8 条蚯蚓染毒, 随机两两组合, 每组测定 3 次.

1.2 生化测定

将蚯蚓在 4℃甘油溶液 (20%) 中浸泡 1h 移至冰冷的 0.15mol·l⁻¹ KCl 溶液中, 将整条蚯蚓用剪刀分割破碎后, 放置在过滤装置 (漏斗、三角杯和纱布组合) 中用冰冷的 0.15mol·l⁻¹ KCl 溶液清洗体内血液及黄色体液, 直至清洗液呈无色为止. 再将蚯蚓移入装有 6ml 匀浆缓冲液 (250mmol·l⁻¹ 蔗糖, 50mmol·l⁻¹ Tris pH 7.5, 1mmol·l⁻¹ DTT, 1mmol·l⁻¹ EDTA) 的 25ml 离心管中, 内切式组织匀浆器以 8000 r·min⁻¹ 匀浆 30s 匀浆物通过纱布过滤, 将滤液装入 10ml 的离心管中, 于低温 (4℃) 超速离心机上以 14700 r·min⁻¹ 离心 30min 所得上清液一部分用于测定蚯蚓的抗氧化酶活性, 另一部分制备微粒体, 于 4℃以 46500 r·min⁻¹ 再次离心 90min 所得沉淀用少许缓冲液重新悬浮, 逐滴加入 20% 的胆酸钠溶液至终浓度为 0.5%, 同时在冰浴中轻轻搅拌 30min 以 38000 r·min⁻¹ (4℃) 离心 45min 小心收集上清液. 取 1ml 上清液用缓冲液稀释 7 倍, 取 1ml 测定蛋白含量, 其余部分用于紫外分光光度计测定 P450 总量.

蚯蚓体内 P450 含量的测定参照 Omura 和 Sato 的方法^[13], 应用连二亚硫酸钠还原细胞色素 P450 的 CO 差光谱进行. 抗氧化酶活性采用紫外-可见分光光度计测定. SOD 活性采用氮蓝四唑法^[11]测定, 单位为 U·mg⁻¹Pr, 一个酶活力单位 (U) 以抑制 NBT 光化学反应的 50% 来表示. POD 活性的测定, 采用愈创木酚法^[14], 单位为 ΔA₄₇₀mg⁻¹Pr·min⁻¹, 以每分钟吸光度的变化表示酶活力的大小. CAT 活性的测定采用徐镜波等^[15]的方法, 一个酶活性单位定义为: 25℃, 100s 内使 H₂O₂ 分解一半时的酶蛋白量.

2 结果与讨论

2.1 菲和芘对蚯蚓体内细胞色素 P450 的影响

如图 1 所示, 当菲浓度低于 10⁻³mg·ml⁻¹ 时, 蚯蚓体内 P450 含量随菲浓度的增加呈上升趋势, 并在 10⁻³mg·ml⁻¹ 样品中达到最大值, 为对照组的 1.58 倍; 但当菲增至 10⁻²mg·ml⁻¹ 时, P450 含量与对照组相当 (为对照组的 1.1 倍), 各样品组 (10⁻²mg·ml⁻¹ 除外) P450 含量与对照组相比差异显著 (p < 0.05). 当芘的浓度增至 10⁻⁵mg·ml⁻¹ 时开始对 P450 产生诱导效应, 并且这种诱导趋势随着芘暴露浓度的增加而增大, 在 10⁻²mg·ml⁻¹ 样品中 P450 含量达到最大值, 为对照组的 1.98 倍, 差异极显著 (p < 0.01). 芘浓度为 10⁻⁵ 和 10⁻³mg·ml⁻¹ 的样品与对照组差异显著 (p < 0.05).

2.2 菲和芘对蚯蚓体内超氧化物歧化酶 (SOD) 的影响

图 2 显示菲暴露浓度小于或等于 10⁻⁵mg·ml⁻¹ 时, 蚯蚓体内 SOD 活性与对照组无显著差异 (p > 0.05), 而当菲浓度为 10⁻⁴mg·ml⁻¹ 时, SOD 的活性显著低于对照组, 仅为对照组的 70% (p < 0.01), 并且随着菲暴露浓度的增加, SOD 有升高趋势, 最大诱导倍数可达对照组的 1.6 倍. 芘在暴露浓度大于 10⁻⁶mg·ml⁻¹ 时, 对 SOD 活性产生了不同程度的诱导, 最大诱导倍数可达对照组的 2.55 倍 (10⁻⁵mg·ml⁻¹), 差异极显著 (p < 0.01). 另外, 暴露浓度相同, 芘对 SOD 的诱导程度大于菲.

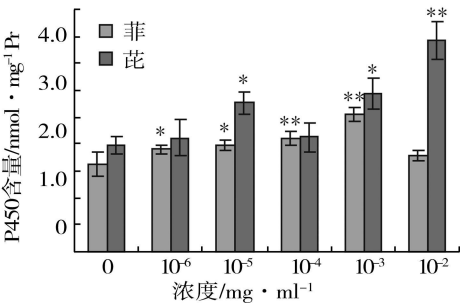


图 1 菲和芘对蚯蚓体内细胞色素 P450 含量的影响 (* p < 0.05 ** p < 0.01)

Fig 1 Cytochrome P450 in earthworms exposed to phenanthrene and pyrene

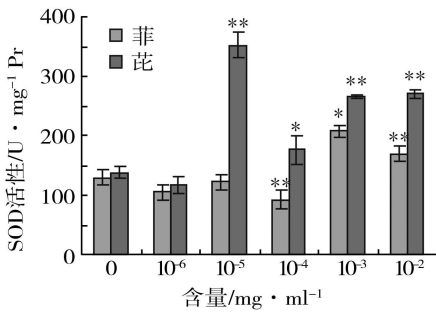


图 2 菲和芘对蚯蚓体内 SOD 活性的影响 (* p < 0.05 ** p < 0.01)

Fig 2 SOD in earthworms exposed to phenanthrene and pyrene

2.3 菲和芘对蚯蚓体内过氧化物酶 (POD)的影响

如图 3所示, 当菲的浓度大于或等于 $10^{-4}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时, 蚯蚓 POD 活性显著高于对照水平 ($p < 0.05$), 且在 $10^{-4}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 暴露组产生最大诱导, 为对照的 1.85倍. 而芘在浓度为 $10^{-5}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时, 即对蚯蚓 POD 活性产生了极显著的诱导效应 ($p < 0.01$), 并随其浓度的增加有升高趋势, 在芘为 $10^{-3}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时达到最大值 (1.88倍对照), 随后略有下降, 但仍显著高于对照水平. 在效应浓度范围内, 芘对 POD的诱导强度大于菲.

2.4 菲和芘对蚯蚓体内过氧化氢酶 (CAT)的影响

图 4显示, 菲浓度在小于或等于 $10^{-4}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时, 未对蚯蚓 CAT活性产生任何影响 ($p > 0.05$), 而当其增至 10^{-3} 和 $10^{-2}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时, CAT 活性明显升高, 分别为对照组的 1.72和 2.27倍且差异极显著 ($p < 0.01$). 芘在 $10^{-6}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时对 CAT活性无影响, 但随着浓度的升高, 芘对 CAT产生了诱导效应, 并在 $10^{-3}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 时出现最大诱导 (对照的 2.83倍), 与对照组相比差异极显著 ($p < 0.01$). 总体来看, 污染物对蚯蚓 CAT的诱导效应是芘大于菲.

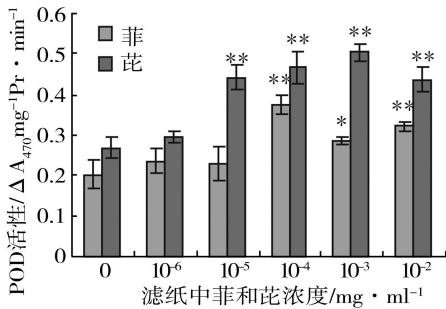


图 3 菲和芘对蚯蚓体内 POD 活性的影响
(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

Fig 3 POD in earthworms exposed to phenanthrene and pyrene

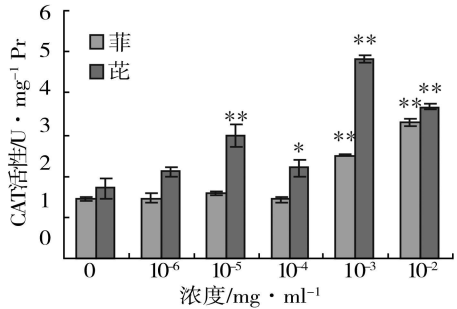


图 4 菲和芘对蚯蚓体内 CAT 活性的影响
(* $p < 0.05$ ** $p < 0.01$)

Fig 4 CAT in earthworms exposed to phenanthrene and pyrene

2.5 讨论

细胞色素 P450酶系作为生物体内的第一代谢阶段酶, 对外源有机化合物的代谢具有重要作用, 它通常将分子氧拆分成原子氧, 并将其加入到底物中促使底物羟基化或环氧化, 为第二阶段的谷胱甘肽转移酶 (GST)对外源物的转化提供基础^[8-16].

本研究的结果表明, 菲和芘在不同暴露浓度下对蚯蚓体内 P450酶系具有一定的诱导作用, 特别是在低剂量污染时即可观察到这种响应 (10^{-6} 和 $10^{-5}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$), 并且随着暴露浓度的增加诱导效应整体上呈现增强趋势. 这种诱导的量效关系为细胞色素 P450作为生物标志物指示环境污染提供了基础. 菲 $10^{-2}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$ 处理组的 P450含量与对照组差异不显著, 这可能是由于菲浓度的升高对 P450酶系中的某些酶起到诱导作用, 同时抑制了另外一些酶的表达, 从而使其总量变化不明显.

另外, 对比试验结果显示, 从 P450酶诱导强度上看, 在供试浓度范围内芘对 P450的诱导大于菲, 说明芘比菲和 Ah受体有更好的亲和性, 因此, 具有更强的 P450诱导活性.

SOD以氧自由基为底物, 在活性氧的代谢中处于重要地位, 可将超氧阴离子 ($\cdot\text{O}_2^-$)歧化成 O_2 和 H_2O_2 ^[17]. CAT的主要功能是调控细胞中 H_2O_2 的水平. POD也可将 H_2O_2 还原成 H_2O .

本研究结果显示, 蚯蚓体内的三种抗氧化酶对不同暴露浓度的菲和芘均有响应, 但是不同抗氧化酶对两者响应的毒性域值是不同的. 如, 对菲产生响应的域值, SOD和 POD是 $10^{-4}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$, CAT是 $10^{-3}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$; 而对芘产生响应的域值, 三种酶均为 $10^{-5}\text{mg}\cdot\text{m l}^{-1}$. 因而, 三种酶对菲和芘毒性效应的灵敏度有所不同. 从机理角度分析, 菲和芘在蚯蚓体内的代谢过程产生了大量的活性氧自由基, SOD活性的增加是蚯蚓生物应激的一种体现, 用以去除过量的自由基 ($\cdot\text{O}_2^-$)使细胞免受氧化损伤; POD和 CAT在此过程中, 同时参与了调控细胞内 H_2O_2 的水平, 其中一部分 H_2O_2 来自菲和芘在蚯蚓体内的转化过程, 另一部分来自 SOD的歧化产物.

三种酶的活性响应还表明, 在试验的浓度范围内, 两种污染物并未对蚯蚓细胞造成严重损伤, 这是因为三种酶活性在最大暴露浓度下均未产生抑制效应, 说明细胞中抗氧化酶可及时、有效地去除产生的自由基, 维持细胞的正常运作. 另外, 从菲和茈对三种酶的诱导强度上看, 茈的诱导效应明显强于菲, 说明茈对蚯蚓造成的氧化胁迫效应要比菲严重.

3 结论

- (1) 在菲和茈亚致死浓度污染下, 蚯蚓体内 P450 含量和三种抗氧化酶活性均对其产生了不同程度的响应. 但是不同酶对毒性效应响应的域值不同, 其敏感性大小为: P450 > SOD (POD) > CAT.
- (2) 菲和茈的代谢诱导了蚯蚓体内 P450 含量的增加, 而三种抗氧化酶活性的升高说明此代谢过程中有活性氧自由基产生.
- (3) 根据四个指标对污染物浓度响应域值的不同, 可将四者联合应用作为一套生物标记物体系, 互为补充, 以满足污染物不同暴露浓度下的土壤毒理诊断, 增强指示的敏感性和有效性, 避免由单一指标的结果而可能导致的片面结论.

参 考 文 献

[1] Luo Y, Zang Y, Zhong Y et al., Toxicological Study of Two Novel Pesticides on Earthworm, *Eisenia foetida*. *Chemosphere*, 1999, **39** (13) : 2347—2356

[2] Osman A M, Den Besten P J, van Noort P C M, Menadine Enhances Oxyradical Formation in Earthworm Extracts: Vulnerability of Earthworms to Quinone Toxicity. *Aquatic Toxicology*, 2003, **66**: 101—109

[3] Osman A M, Van Noort P C M, Activation of Paraquat in the Earthworm *Allolobophora chlorotica* is Mediated by NAD(P)H-cytochrome c Reductase Activities. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 2004, **79**: 101—110

[4] Achazi R K, Flenner C, Livingstone D R et al., Cytochrome P450 and Dependent Activities in Unexposed and PAH-exposed Terrestrial Annelids. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1998, **121C**: 339—350

[5] Kim K B, Lee B M, Oxidative Stress to DNA, Protein, and Antioxidant Enzymes (Superoxide Dismutase and Catalase) in Rats Treated with Benzo(a) pyrene. *Cancer. Lett.*, 1997, **113** 205—212

[6] Livingstone D R, Contaminant Stimulated Reactive Oxygen Species Production and Oxidative Damage in Aquatic Organisms. *Mar. Pollut. Bul.*, 2001, **42**: 656—666

[7] Peters L D, Porte C, Livingstone D R, Variation of Antioxidant Enzyme Activities of Sprat (*Sprattus sprattus*) Larvae and Organic Contaminant Levels in Mixed Zooplankton from the Southern North Sea. *Marine Pollution Bulletin*, 2001, **42** 1087—1095

[8] 宋玉芳, 周启星, 许华夏等, 菲、茈、1, 2, 4-三氯苯对蚯蚓的急性毒性效应. 农村生态环境, 2003, **19** (1) : 36—39

[9] 宋玉芳, 周启星, 许华夏等, 菲、茈、1, 2, 4-三氯苯对土壤高等植物根伸长抑制的生态毒性效应. 生态学报, 2002, **22**(11) : 1945—1950

[10] 宋玉芳, 周启星, 宋雪英等, 菲和茈对土壤中植物根伸长抑制的生态毒性效应. 生态学杂志, 2003, **22** (5) : 6—9

[11] Brown P J, Long S M, Spurgeon D J et al., Toxicological and Biochemical Responses of the Earthworm *Lumbricus Rubellus* to Pyrene, a Non-Carcinogenic Polycyclic Aromatic Hydrocarbon. *Chemosphere*, 2004, **57**: 1675—1681

[12] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Proposal for Updating Guideline 207: Earthworm, Acute Toxicity Test—OECD Guideline for Testing of Chemicals 207, Paris, France: European Committee, 1984

[13] Omura T, Sato R, The Carbon Monoxide-Binding Pigment of Liver Microsomes. *Journ. Biol. Chem.*, 1964, **239** (7) : 2370—2378

[14] 张志良, 瞿伟菁主编, 植物生理学试验指导. 北京: 高等教育出版社, 第三版, 2003

[15] 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. 环境化学, 1997, **16** (1) : 73—76

[16] Pacheco M, Santos M A, *Anguilla anguilla* L. Liver EROD and Erythrocytic Nuclear Abnormalities Induction by Cyclophosphamide and PAHs. *Ecotoxicol Environ. Saf.*, 1998, **40**: 71—76

[17] Pan L Q, Ren J Y, Liu J, Responses of Antioxidant Systems and LPO Level to Benzo(a) pyrene and Benzo(k) fluoranthene in the Haemolymph of the Scallop *Chlamys Ferrari*. *Environmental Pollution*, 2005, **141** (3) : 443—451

INFLUENCE OF PHENANTHRENE AND PYRENE ON CYTOCHROME P450
AND ANTIOXIDANT ENZYMES IN EARTHWORMS(*EISENIA FETIDA*)

ZHANG Wei^{1 2} SONG Yu-fang^{1 3} SUN Tie-heng^{1 3}
SONG Xue-ying^{1 3} ZHOU Qi-xing^{1 3} ZHENG Sen-lin^{1 2}

(1 Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process Institute of Applied Ecology Chinese Academy of Sciences Shenyang 110016 China
2 Graduated School Chinese Academy of Sciences Beijing 100039 China
3 Key Laboratory of Environment Engineering Shenyang University, Shenyang 110041 China)

ABSTRACT

The influence of phenanthrene and pyrene on cytochrome P450 and antioxidant enzymes of earthworms (*Eisenia fetida*) was studied. By means of contacting with contaminated filter paper, earthworms were exposed to the pollutants. Earthworm was used to detect total cytochrome P450 content and the activities of superoxide dismutases (SOD), guaiacol peroxidases (POD) and catalase (CAT). Results indicated that within tested concentrations, total P450 contents and the activities of three antioxidant enzymes had responses to the toxicities of phenanthrene and pyrene. Metabolism of these two PAHs in earthworm induced the increasing of P450 content, and reactive oxygen species could be generated as by-product in that process. In contrast, the oxidative stress of earthworms caused by pyrene was harder than by phenanthrene. Concentration thresholds of response for different enzymes differed, and their sensibilities to the PAH pollutants follow the sequence of P450 > SOD (POD) > CAT. Therefore, the four indexes could be used together as a suit of biomarkers to satisfy the diagnosis in different exposure concentrations and to enhance the sensitivity and effectivity of indicating.

Keywords phenanthrene, pyrene, earthworms (*Eisenia fetida*), cytochrome P450, antioxidant enzymes, biomarker