

DOI: 10.11766/trxb201703060625

DEHP对土壤蚯蚓氧化胁迫及DNA损伤的研究*

刘文军 高健鹏 王冠颖 朱鲁生 王金花 王军[†]

(山东农业大学资源与环境学院, 山东省高校农业环境重点实验室, 山东泰安 271018)

摘要 土壤环境中的酞酸酯污染日益严重, 为了探讨和分析典型酞酸酯邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)对土壤动物的生态毒理效应, 以赤子爱胜蚓为指示生物, 暴露于DEHP浓度为CK、0.1、1、10、50 mg kg⁻¹人工土壤中, 并于染毒后的7、14、21、28d取样测定。通过蚯蚓体内的超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物(POD)、谷胱甘肽转移酶(GST)等指标反映DEHP对蚯蚓的氧化激活程度, 通过活性氧自由基(ROS)的含量反映DEHP对蚯蚓的细胞毒性, 通过丙二醛(MDA)含量和Olive尾矩反映DEHP对蚯蚓的遗传毒性, 从多个角度评价DEHP对蚯蚓的生态毒理效应。结果表明: (1)在DEHP的刺激下, 各浓度组蚯蚓的SOD、CAT、POD、GST活性均呈激活状态, 表明DEHP对蚯蚓的抗氧化酶有诱导作用; (2)DEHP影响蚯蚓的ROS含量, 各染毒处理组与对照组相比均升高且差异性明显, 表现出明显的剂量—效应关系; (3)对比各染毒处理组之间的数据, DEHP对蚯蚓MDA含量的影响无明显规律; (4)DEHP可使蚯蚓GST呈激活状态, 表明中高浓度的DEHP对蚯蚓GST具有诱导作用; (5)DEHP能够引起蚯蚓体腔细胞DNA的损伤, 且随着浓度的增加, Olive尾矩值随之增加, 说明DNA损伤程度与DEHP浓度之间具有剂量—效应关系。从实验结果可以看出, DEHP可以对蚯蚓机体和DNA造成一定程度的损伤, 表现出较强生态毒理效应。

关键词 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯; 抗氧化酶系; 谷胱甘肽巯基转移酶; 丙二醛; 活性氧; 彗星实验

中图分类号 X171 文献标识码 A

邻苯二甲酸酯(Phthalic acid esters, PAEs)又称酞酸酯, 根据其烷基链的不同共有二十多种, 其中邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP, [CAS 117-81-7])是使用范围最广、产量最大的一种增塑剂, 约占塑化剂产量的75%, 是邻苯二甲酸酯类增塑剂中最重要的一种化合物^[1-5]。研究表明, 我国农业土壤中PAEs含量已经达到mg kg⁻¹数量级^[6-7]。在北方地区设施菜地土壤中DEHP的平均含量达到0.75~29.37 mg kg⁻¹^[8], 其在土壤中降解速度较慢, 半衰期为70d左右^[9], 并且具有类

雌性激素的作用, 会对土壤生态环境, 尤其是土壤动物产生一定的影响。DEHP可能对生物造成多种危害, 但其在生物体内的代谢复杂, 生物毒性不易监测, 因此DEHP的毒性研究越来越受到人们的关注, 其生态毒理效应研究也是环境领域的热点之一。近年来, DEHP对土壤微生物、水生生物与哺乳动物的研究已有较多报道^[10-12], 而关于DEHP对土壤无脊椎动物蚯蚓生态毒性效应的研究则相对较少。

蚯蚓是土壤中生物量最大的无脊椎动物, 约占据土壤动物生物总量的60%, 它易受到环境有

* 国家重点研发计划项目(2016YFD0800304)和山东农业大学泉林黄腐酸肥料工程实验室开放课题(QL2016-26)资助
Supported by the National Key Research and Development Program of China (No. 2016YFD0800304) and the Quanlin Fulvic Acid Fertilizer Engineering Laboratory Open Project of Shandong Agricultural University (No. QL2016-26)

† 通讯作者 Corresponding author, E-mail: jwang@sda.edu.cn

作者简介: 刘文军(1990—), 男, 硕士研究生, 主要从事环境毒理学方面的研究。E-mail: jun2012jun@163.com

收稿日期: 2017-03-06; 收到修改稿日期: 2017-05-05; 优先数字出版日期(www.cnki.net): 2017-05-11

毒有害物质的伤害, 常作为污染物检测的指示生物^[13-15]。赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)繁殖率高、适应性强, 是国际上蚯蚓毒性试验常用的品种。为了尽可能模拟蚯蚓生活的真实环境, 并消除由于土壤差异而带来的影响, 采用人工土壤OECD进行实验^[16]。本研究以DEHP为研究对象, 选取赤子爱胜蚓为指示生物, 从氧化损伤和遗传毒性的角度评价DEHP对蚯蚓的毒理效应, 以评估DEHP的生态安全性, 为全面认识PAEs对土壤的生态风险提供了数据支撑, 对维持土壤生态系统的健康持续发展具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试土壤为按OECD(2004)标准配制的人工土壤, 其组成为: 10%的泥炭藓土, 20%的高岭黏土(高岭土大于50%), 70%的石英砂; 混合均匀, 调节pH至 6.0 ± 0.5 。供试蚯蚓为赤子爱胜蚓, 购于山东农业大学实验站。试验前在人工土壤中驯养一段时间, 选取环带明显且大小较一致的健康成蚓进行试验。

试验试剂: DEHP标准品, 纯度 $\geq 99\%$ (Sigma公司, 美国); 丙酮, 分析纯(天津永大); 牛血清蛋白(Salarbio公司); 考马斯亮蓝(G-250); L-甲硫氨酸(Salarbio公司); 氮蓝四唑(上海恒星); 核黄素(上海蓝季); 愈创木酚(国药集团); 还原型谷胱甘肽, 纯度 $>98\%$ (Salarbio公司); 无水乙醇, 分析纯(天津凯通); 愈创木酚甘油醚(Sigma公司); 琼脂糖(Sigma公司)。

1.2 试验设计

染毒实验前, 用丙酮溶剂配制浓度为10、100、1000、5000 mg L⁻¹的DEHP标准工作溶液。染毒设定浓度: 0(CK)、0.1、1、10、50 mg kg⁻¹, 染毒由溶剂对照至高浓度依次进行。CK组添加5ml丙酮作为空白对照, 其余各处理土样添加5ml标准工作溶液, 每组浓度设置3个重复。染毒时, 每个处理用500g人工土, 放入10条蚯蚓, 置于温度 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, 12h光照12h黑暗条件下培养^[17]。在设定取样时间7、14、21、28d将蚯蚓取出后, 用生理盐水冲洗干净, 放于 $20^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中过夜吐泥, 用于实验测定。

1.3 样品分析与测定

选择超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、过氧化物酶(POD)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)、丙二醛(MDA)用于蚯蚓氧化损伤指标的测定, 其中SOD检测采用氮蓝四唑光还原法, CAT检测采用紫外分光光度计法, POD检测采用愈创木酚比色法, MDA检测采用硫代巴比妥酸法, GST检测采用CDNB比色法。

活性氧自由基(ROS)采用二氯荧光素(DCFH-DA)的方法测定^[18-19]。DEHP对蚯蚓体腔细胞DNA损伤的测定采用彗星实验(Comet Assay)。彗星实验又称为单细胞凝胶电泳实验(SCGE), 是一种通过检测DNA链的损伤程度来判别遗传毒性的技术, 具体方法参照文献[20-21]。

1.4 数据处理

所有数据采用Microsoft Excel2010进行统计、计算与图形绘制, 采用SPSS19.0软件进行数据的显著性分析, 单因素方差分析(One-way ANOVA)与LSD检验被用来分析各处理组与对照组以及各处理组之间的差异, 显著性水平为 $p < 0.05$ 。实验结果以均数 \pm 标准差(mean \pm SD, n=3)的形式表示。

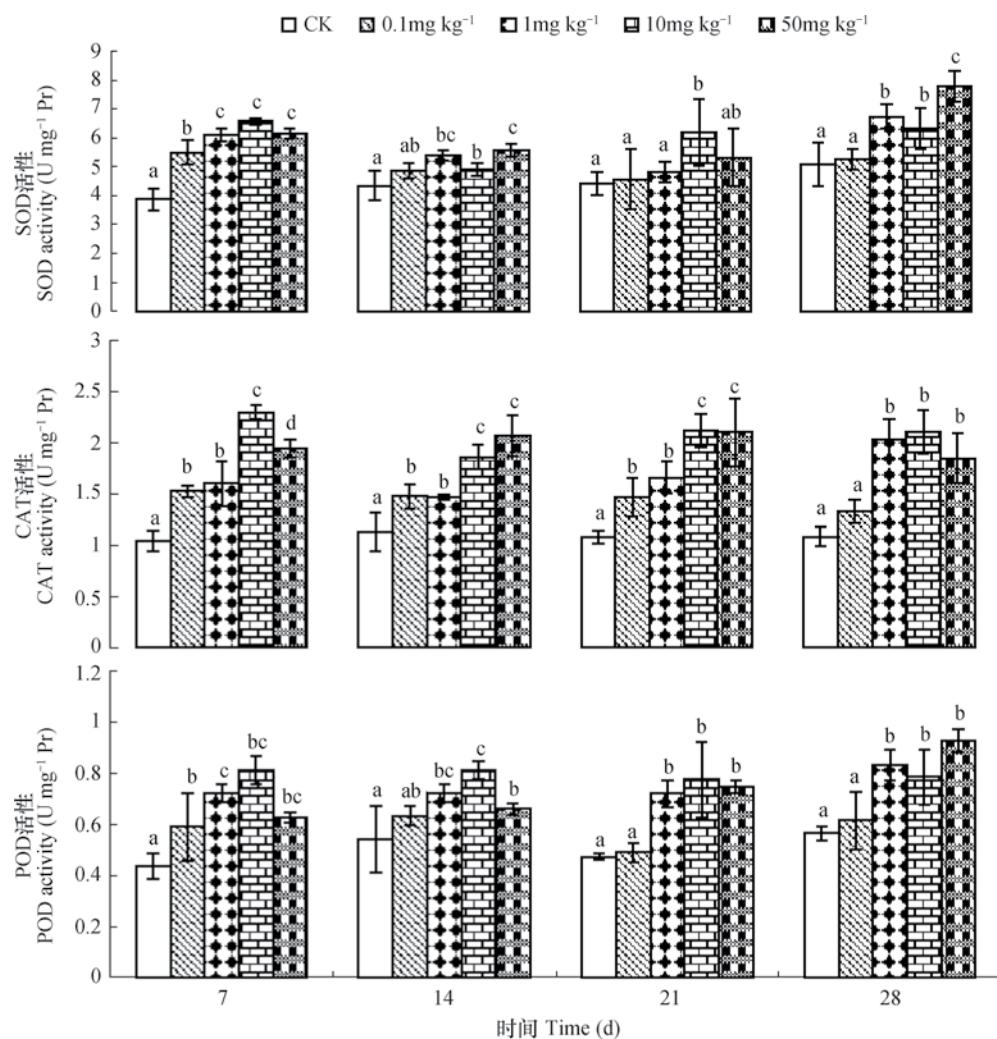
2 结 果

2.1 DEHP对蚯蚓抗氧化酶系的影响

SOD、CAT和POD的活性结果见图1。可以看出, 经过DEHP染毒之后的蚯蚓的SOD活性总体呈现上升趋势, 可见DEHP对蚯蚓的SOD活性有加强的功能, 随着DEHP浓度的升高, SOD活性呈现出不同程度的增加趋势。经过不同浓度的DEHP处理后, CAT活性均有不同程度的增加, 并且除了50 mg kg⁻¹染毒组CAT活性较前一浓度有所降低外, 其余染毒组CAT活性均随药剂浓度的升高而逐步上升。DEHP对蚯蚓POD活性有增强的作用, 在低浓度条件下, POD活性均随着浓度的升高呈现上升的趋势, 在高浓度条件下, POD活性增强趋势较前几组浓度组偶有降低的情况, 因此高浓度DEHP对蚯蚓POD活性的影响与低浓度相似。

2.2 DEHP对蚯蚓MDA含量的影响

MDA含量结果见图2。可以看出, 不同浓度的DEHP对MDA含量较对照组均有提高, 并且随着DEHP浓度的升高, MDA含量整体呈现逐步升高的



注：不同字母表示同一暴露时间内不同浓度DEHP处理组间生化响应的显著性差异 ($p < 0.05$)。图中误差线为标准差。下同
Note: Different letters indicate significant differences ($p < 0.05$) in earthworms biochemical response between treatments different in DEHP concentration, but the same in exposure time. Errors bars mean standard deviation. The same below

图1 DEHP对蚯蚓SOD、CAT和POD活性的影响

Fig. 1 Effect of DEHP on SOD, CAT and POD activity in earthworms

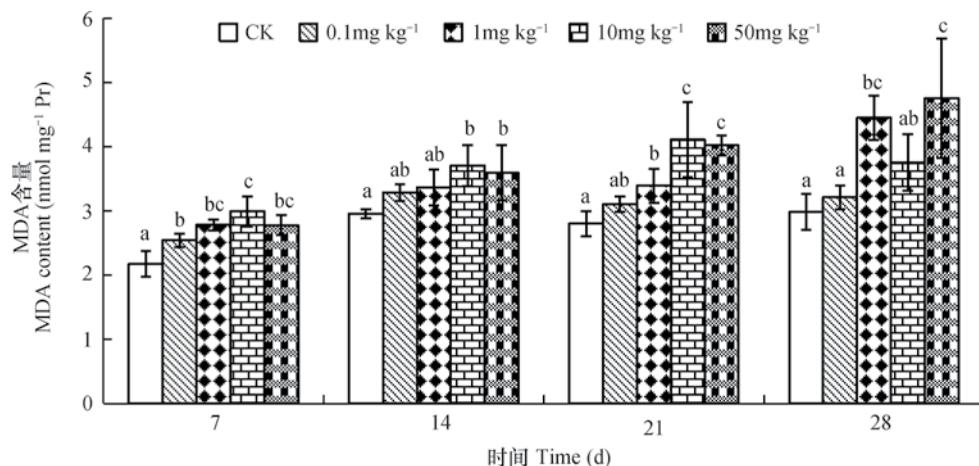


图2 DEHP对蚯蚓MDA含量的影响

Fig. 2 Effect of DEHP on content of MDA in earthworms

趋势,但在染毒阶段的前期,DEHP对MDA含量升高趋势不明显。总体而言,在整个染毒周期内,蚯蚓MDA含量水平呈升高状态。

2.3 DEHP对蚯蚓GST活性的影响

GST活性结果见图3。如图所示,除了DEHP浓度为50 mg kg⁻¹处理组外,GST活性均随药剂浓

度的增加而增强,DEHP对蚯蚓GST活性有促进作用。总体上看,GST活性在染毒初期7、14 d呈激活状态,随着染毒时间的增加,GST活性逐渐恢复至对照组水平,第28天时0.1、1 mg kg⁻¹处理组与对照组相比差异性不明显,10、50 mg kg⁻¹处理组的GST活性激活程度较小。

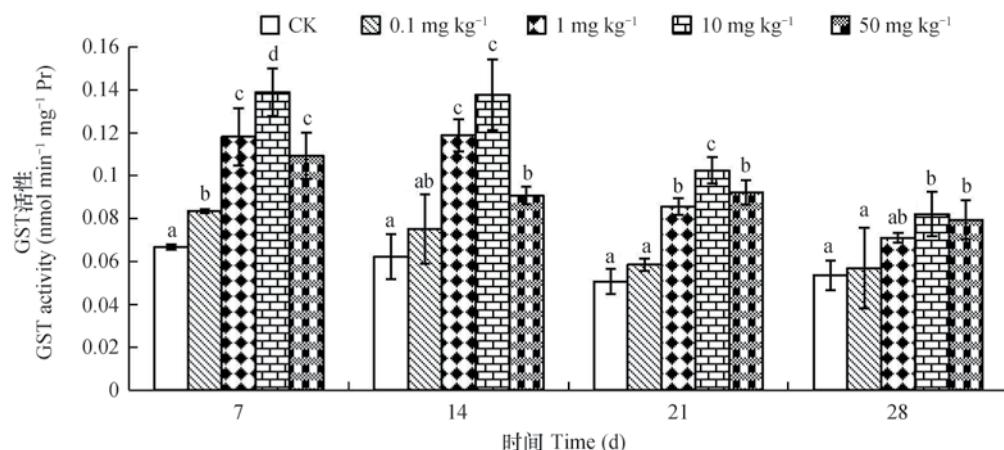


图3 DEHP对蚯蚓GST活性的影响

Fig. 3 Effect of DEHP on GST activity in earthworms

2.4 DEHP对蚯蚓ROS含量的影响

蚯蚓ROS活性变化结果见图4。可以看出不同浓度的DEHP对ROS含量均有促进作用,随着DEHP的浓度升高ROS含量也升高,因此说明蚯蚓ROS含量与DEHP浓度之间存在剂量-效应关系。拟合方程为:第7天, $y=31.796\ln(x)+457.71$, $r=0.9904$; 第14天, $y=41.781\ln(x)+628.41$, $r=0.9117$; 第21天, $y=23.414\ln(x)+573.26$,

$r=0.9314$; 第28天, $y=27.635\ln(x)+631.45$, $r=0.9764$ 。高浓度处理组的ROS含量于14天时达到最高水平,随后ROS含量有所回落;在染毒第14天与第21天低浓度0.1 mg kg⁻¹处理组较对照组ROS含量有所升高,但是差异性不明显。

2.5 DEHP对蚯蚓体腔细胞DNA的损伤

各浓度DEHP处理组的载玻片加入EB染色20 min后,用Olympus51荧光显微镜观察,获取彗

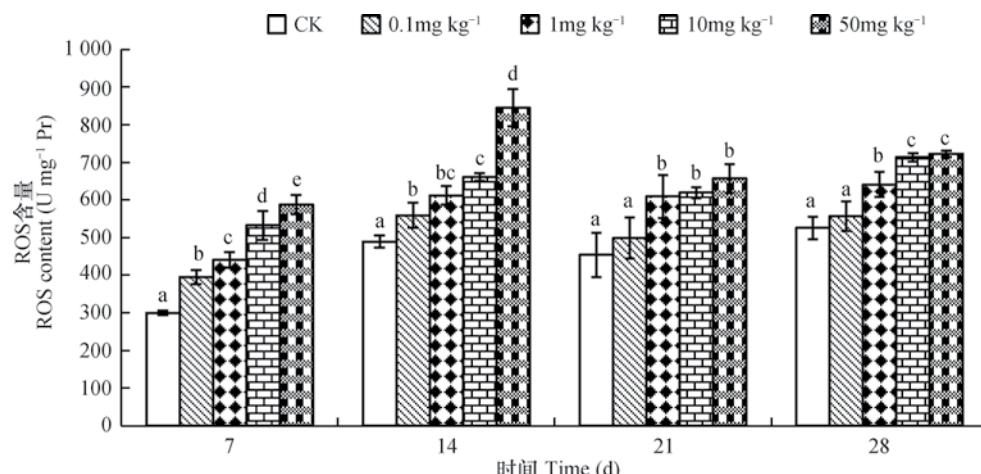


图4 DEHP对蚯蚓ROS含量的影响

Fig. 4 Effect of DEHP on content of ROS in earthworms

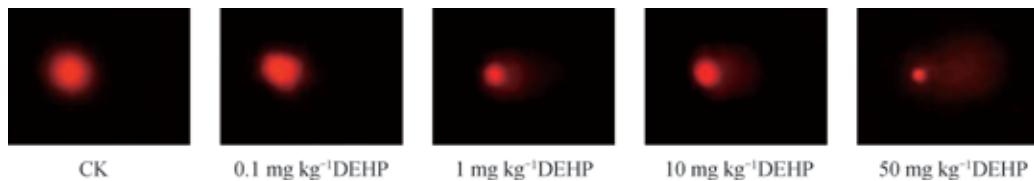


图5 蚯蚓体细胞DNA损伤的彗星实验图像

Fig. 5 Comet assay of DNA damage of somatocyte of the earthworms

星图像如图5所示,从图中可以看出,对照组蚯蚓体腔细胞,细胞核的DNA成团、呈致密圆形,彗头相对大而几乎没有彗尾。染毒处理组可以明显看到细胞受损,经电泳后DNA断链离开核DNA,产生像彗星一样的图像。且随着染毒浓度增加,细胞核逐渐变得疏松,体积逐渐变大,DNA的迁移量逐渐增加;当浓度增加到 10 mg kg^{-1} 和 50 mg kg^{-1} 时,大部分DNA迁移出了细胞核,使细胞核成为一个镂空的组织,表明DEHP处理能够引起DNA损伤,且存在剂量-效应关系:第7天, $y=1.5811n(x)+4.7441$, $r=0.9991$;第14天, $y=1.5794ln(x)+4.9675$, $r=0.9953$;第21天, $y=1.4058ln(x)+4.5581$, $r=0.9869$;第28天, $y=1.3846ln(x)+4.268$, $r=0.9861$ 。

用CASP软件分析彗星实验图像,获得DEHP对蚯蚓体腔细胞DNA迁移的Olive尾矩的影响如图6所示,从图中可以看出,所有浓度处理组均能对蚯蚓体腔细胞造成DNA损伤,且随着染毒浓度的增加,彗星Olive尾矩值随之增加,且与对照组相比差异性明显。但是相同浓度的处理组 10 mg kg^{-1} 、 50 mg kg^{-1} 在整个染毒周期Olive尾矩值有减小的趋势,DNA损伤程度有所减小,这可能是由于蚯蚓在应对高浓度的外界刺激下,具有一定的自我修复作用。

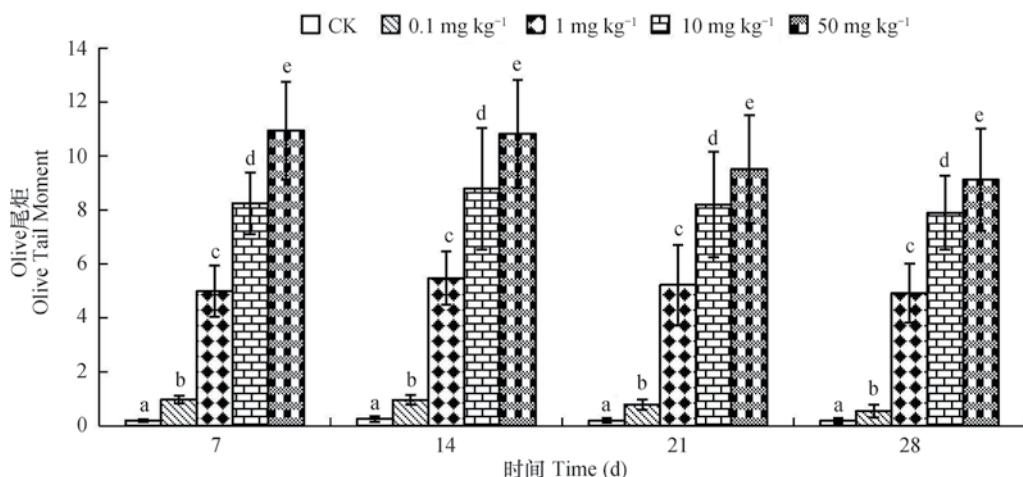


图6 DEHP对蚯蚓体腔细胞DNA损伤程度(Olive尾矩)的影响

Fig. 6 Effect of DEHP on Olive tails moment of coelomocyte in the earthworms

3 讨论

3.1 DEHP对蚯蚓各个测定指标的影响

机体抗氧化酶系主要包括SOD、CAT和POD等,在正常生理条件下,机体产生的活性氧可被细胞内的抗氧化酶系清除。SOD是一种天然的氧自由基清除剂,主要清除超氧自由基,在整个酶促防御系统中占有重要地位,其活性与生物的免疫水平存

在一定的相关性^[22]。CAT是一种含Fe⁻原卟啉的酶,在整个抗氧化酶防御系统中,CAT作为清除过氧化氢自由基的重要酶类。POD是生物体内产生的一种氧化还原酶,它能够催化很多反应,主要清除过氧化物自由基。

实验研究发现,在整个染毒周期内,所有浓度处理组的SOD活性整体上呈激活状态,且与对照组相比差异性显著,这说明蚯蚓在DEHP的胁迫下体

内产生了超氧阴离子，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，这是生物应激的一种体现。对于CAT，低浓度处理组 0.1 mg kg^{-1} 在染毒初期与对照相比差异性明显，随着染毒时间的增加，低浓度处理组的CAT活性逐渐回落至对照水平，与对照组无明显差异，这可能是由于蚯蚓体内抗氧化防御系统介入，快速消除了活性氧；而高浓度处理组的CAT活性显著增加，SOD通过歧化超氧阴离子($\cdot\text{O}_2^-$)产生大量过氧化氢(H_2O_2)，从而显著提高了蚯蚓体内的CAT活性，用于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^[23]。这与蔡文贵等^[11]研究的翡翠贻贝内脏团和外套膜中抗氧化酶SOD、CAT活性的变化情况一致，在不同浓度DEHP长时间胁迫下，翡翠贻贝的SOD、CAT活性具有明显的影响，组织内发生脂质过氧化损伤，并且这种损伤在短期内无法消除。由于SOD活性被激活，因此产生了部分过氧化物，从而POD呈现激活状态，在低浓度 0.1 mg kg^{-1} 处理组中，处理组与对照组差异性不明显，可能是由于在低浓度时DEHP对蚯蚓造成的影响被SOD及CAT消除了，随着污染物质浓度的提高，POD活性显著增强，处于被激活状态，表明蚯蚓在接收到外界的刺激后产生应激反应，通过自身的调节激活POD来达到消除过氧化物的作用。

根据活性氧学说^[24]，蚯蚓在DEHP的刺激作用下，引起体内 O_2^- 的产生量增加，从而引起SOD、CAT、POD生物合成量的显著增加。但在高浓度处理组中，SOD、CAT活性相较于中等浓度处理组有所降低，造成这一现象的原因可能是过量的DEHP进入生物有机体后，对该有机体造成的胁迫作用增强，间接导致SOD与CAT清除活性氧自由基的速度低于活性氧的产生速度^[25]，进而使SOD、CAT消耗殆尽。此时，生物酶的活性降低，细胞膜受到氧化损伤，活性氧自由基累积，降低了生物的适应能力和健康水平，引起中毒反应，从而导致SOD、CAT产生机制的损害，使SOD、CAT的产生量进一步降低。

ROS是生理性氧的代谢产物。蚯蚓体内ROS含量水平随着染毒浓度的增加而增加，且差异性显著，说明蚯蚓在不同浓度的DEHP的胁迫下体内产生了超氧阴离子自由基、氧离子、过氧化物等，激活了蚯蚓体内抗氧化酶，这是一种氧化应激的

体现。在低浓度处理组中，其对蚯蚓的ROS含量造成了一定的增强，但显著性不明显，随着DEHP浓度升高，ROS含量明显增高，对于 50 mg kg^{-1} 处理组，在染毒的第14天出现含量最高值，随着染毒周期的延长，ROS含量出现回落现象，说明蚯蚓在经过外界刺激后所产生的抗氧化酶对ROS起到了良好的消除作用，但是尚未达到平衡，有过量的活性氧存在，故而DEHP对ROS的含量随着染毒周期的延长呈现先升高后降低的趋势。

MDA是自由基引发的脂质过氧化作用的最终分解产物，是细胞发生脂质过氧化反应中最具代表性的产物，其含量的多少可直接反映脂质过氧化的程度，间接反映自由基对机体的损伤程度^[26]。王莉等^[12]研究了DEHP对小鼠的氧化损伤情况，试验结果表明小鼠肝脏MDA含量在DEHP胁迫下增加。本实验中各浓度处理组蚯蚓的MDA含量均升高，除低浓度处理组 0.1 mg kg^{-1} 与对照组相比没有明显差异，其余浓度处理组与对照组相比均有明显差异。这可能是由于蚯蚓在DEHP的胁迫下产生了过量的活性簇，引起了细胞的脂质过氧化反应。随着染毒周期延长，中、高浓度组的蚯蚓体内MDA含量整体呈波动状，跟机体抗氧化酶活性升高或降低有关，表明此时机体的氧化—抗氧化酶系统有一定的自我恢复的能力。

GST是生物体内的一种重要的代谢酶，主要是在肝脏中参与生物转化第二相反应的一种生物酶，是具有解毒功能的三大酶系之一。蚯蚓在各浓度的DEHP胁迫下，体内GST活性均有所升高，这可能是由于蚯蚓在DEHP的刺激下，激活了体内的GST，以消除有毒物质的氧化损伤。并且研究发现，低浓度 0.1 mg kg^{-1} 处理组虽较对照组在对GST的激活作用上有一定程度的增强，但是与对照组无显著性差异，可能是由于DEHP浓度较低，不需要GST进行工作，便可对外界刺激进行自我调控。

蚯蚓在经过不同浓度DEHP染毒处理后，蚯蚓细胞DNA均有损伤，且损伤程度随着染毒浓度的增加而增加，Olive尾矩值也随着浓度的增加而增加，这说明DNA损伤程度随DEHP的剂量增加而增大。Wang等^[27]通过研究DEHP对人类胚胎肾细胞系293(HEK-293)的毒性作用发现，DEHP可能通过氧化胁迫导致DNA损伤。赵春风等^[28]研究了DEHP短期胁迫对马氏珠母贝胚胎发育的影响及胚胎DNA的损伤情况，实验结果表明，DEHP对马氏

珠母贝D型面盘幼虫的发育有显著性影响，对胚胎DNA造成明显的损伤，DNA损伤和染毒浓度之间存在剂量—效应关系，亦与本实验中DEHP对蚯蚓的DNA损伤结果一致。在高浓度 50 mg kg^{-1} 处理下，随着时间的增长，蚯蚓受损体腔细胞Olive尾矩具有减小的趋势，说明在高浓度的外界刺激下，蚯蚓可能表现出了一定的自我修复功能。

3.2 各个测定指标的相关性

如图7所示，在对蚯蚓进行染毒后，DEHP进入到蚯蚓的体腔细胞中，在短期内产生大量的活性氧自由基，造成ROS含量的升高，ROS含量的升高对蚯蚓抗氧化酶防御系统（包括SOD、CAT、POD）以及GST等造成一定的刺激，使其酶活性升

高，来抑制ROS含量的升高，使机体内的活性氧自由基稳定在一定的水平内。然而随着DEHP作用进一步增强，相应的会产生更多的活性氧自由基，GST的活性受到抑制，而蚯蚓抗氧化酶系统的活性逐步增强，但蚯蚓抗氧化酶系统与GST不能完全消除大量新产生的活性氧自由基，导致ROS使脂质发生过氧化作用产生MDA，使蚯蚓体内的MDA含量的升高。随着染毒时间的延长，虽然蚯蚓体内的抗氧化酶系统的活性也会增强，来抑制ROS和MDA含量的升高，但过量的ROS和MDA还是在氧化胁迫作用下对蚯蚓的DNA造成了伤害，导致彗星实验中Olive尾矩逐渐增大。

为探讨不同DEHP浓度污染暴露下蚯蚓各氧化

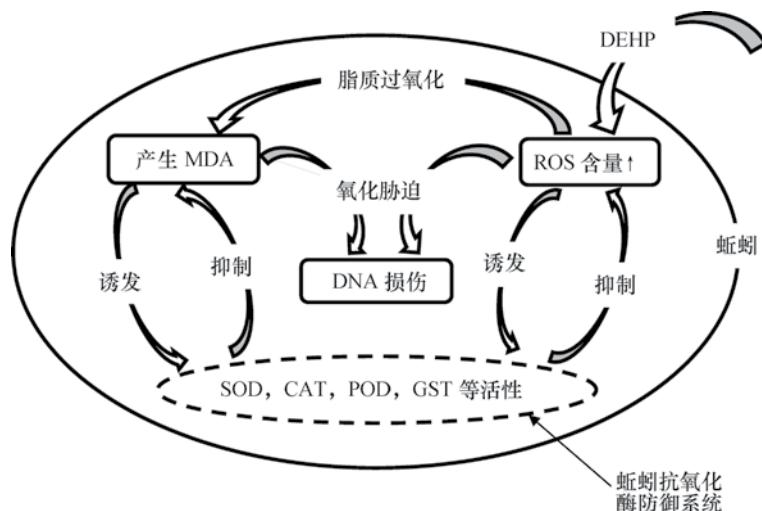


图7 蚯蚓各检测指标关系图

Fig. 7 Matrix of the indices obtained in various tests of the earthworms

损伤指标和DNA损伤之间的相关性，采用SPSS统计软件对其做了相关性分析。由表1看以看出，除DEHP浓度与染毒天数没有相关性之外，其他指标均与染毒天数存在相关性，其中与MDA和ROS含量相关性最高，说明随着染毒时间的增加，DEHP对蚯蚓的氧化胁迫和脂质过氧化作用不断增强，而GST活性和染毒天数存在显著的负相关性，说明随着染毒时间的增加，GST活性明显被抑制。DEHP浓度与各检测指标之间均具有较高的正相关性，说明本实验选择的染毒浓度CK、0.1、1、10和 50 mg kg^{-1} 比较合理，随着染毒浓度的增加，DEHP对蚯蚓的影响也逐渐加强，尤其DEHP浓度与ROS含量和Olive尾矩之间具有极显著的正相关，可以

看出DEHP浓度与ROS含量和Olive尾矩之间存在剂量—效应关系。SOD、CAT和POD活性之间均具有极显著的相关性，说明同属于蚯蚓抗氧化酶防御系统的这三种酶，在蚯蚓受到DEHP污染后，对抑制蚯蚓的氧化胁迫和脂质过氧化具有相似的作用。GST活性和Olive尾矩之间具有极显著的相关性，Olive尾矩反映DEHP对蚯蚓DNA损伤的程度，由前面可以知道，随着染毒时间的增加，GST活性逐渐降低，由此可以看出随着GST活性的降低，蚯蚓DNA损伤程度逐渐增强。MDA是ROS使脂质发生过氧化作用的产物，由表1可以看出，MDA和ROS含量之间具有极显著的正相关性。ROS、MDA含量和Olive尾矩之间具有显著的相关性，由于ROS

表1 不同DEHP浓度污染暴露下蚯蚓各检测指标之间的相关性

Table 1 Relationships between the indices obtained in various tests of the earthworms exposed to DEHP relative to concentration of the substance

检测指标 Detection of indicators	相关系数Correlation coefficient								
	染毒天数 Days of exposure	DEHP浓度 DEHP concentration	SOD活性 SOD activity	CAT活性 CAT activity	POD活性 POD activity	GST活性 GST activity	MDA含量 MDA content	ROS含量 ROS content	Olive尾矩 Olive tail moments
	Days of exposure	DEHP concentration	SOD activity	CAT activity	POD activity	GST activity	MDA content	ROS content	Olive tail moments
染毒天数 Days of exposure	1								
DEHP浓度 DEHP concentration	0.000	1							
SOD活性 SOD activity	0.222	0.460*	1						
CAT活性 CAT activity	0.025	0.551*	0.705**	1					
POD活性 POD activity	0.254	0.367	0.813**	0.780**	1				
GST活性 GST activity	-0.526*	0.241	0.372	0.621**	0.583**	1			
MDA含量 MDA content	0.640**	0.420	0.629**	0.605**	0.795**	0.109	1		
ROS含量 ROS content	0.439	0.615**	0.513*	0.672**	0.666**	0.250	0.789**	1	
Olive尾矩 Olive tail moments	-0.059	0.770**	0.631**	0.872**	0.725**	0.688**	0.551*	0.740**	1

注: “*”表示在0.05水平上显著, “**”表示在0.01水平上显著
Note: “*” indicates significant difference at 0.05 level,
“**” indicates significant difference at 0.01 level

和MDA含量的上升, 越来越强的氧化胁迫导致蚯蚓DNA损伤越来越严重, 因此Olive尾矩也越来越长。

4 结 论

DEHP进入蚯蚓体内后, 对蚯蚓体内的抗氧化酶防御系统(SOD、CAT、POD)和GST有诱导作用, 使其被激活以保护机体不受伤害; 但DEHP还是引起蚯蚓体内ROS含量上升, 并且随着DEHP浓度升高, 表现出明显的剂量—效应关系; 过量的ROS使脂质发生过氧化作用产生MDA; 在ROS和MDA的共同作用下, 蚯蚓细胞内的DNA也受到损伤, 且DNA损伤程度与DEHP浓度之间具有剂量—效应关系。总之, DEHP可以对蚯蚓机体和DNA造

成一定程度的损伤, 表现出较强的生态毒理效应, 需要引起足够的重视。

参 考 文 献

- [1] He L, Gielen G, Bolan N S, et al. Contamination and remediation of phthalic acid esters in agricultural soils in China: A review. *Agronomy for Sustainable Development*, 2015, 35: 519—534
- [2] Daiem M MA, Rivera-Utrilla J, Ocampo-Pérez R, et al. Environmental impact of phthalic acid esters and their removal from water and sediments by different technologies-A review. *Journal of Environmental Management*, 2012, 109: 164—178
- [3] 黄慧娟, 蔡全英, 吕辉雄, 等. 土壤—蔬菜系统中邻苯二甲酸酯的研究进展. *广东农业科学*, 2011 (9):

- 50—53
- Huang H J, Cai Q Y, Lü H X, et al. Progresses on phthalic acid esters in the soil-vegetable system (In Chinese). *Guangdong Agricultural Sciences*, 2011 (9) : 50—53
- [4] 杨杉, 吕圣红, 汪军, 等. 酚酸酯在土壤中的环境行为与健康风险研究进展. *中国生态农业学报*, 2016, 24 (6) : 695—703
- Yang S, Lü S H, Wang J, et al. Environmental fate and health risks of phthalate acid esters in soils: A review (In Chinese). *Chinese Journal of Eco-Agriculture*, 2016, 24 (6) : 695—703
- [5] 夏庆兵. 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯对土壤微生物群落结构多样性的影响. 山东泰安: 山东农业大学, 2016
- Xia Q B. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the diversities of microbial community in soil (In Chinese). Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 2016
- [6] 蔡全英, 莫测辉, 李云辉, 等. 广州、深圳地区蔬菜生产基地土壤中邻苯二甲酸酯(PAEs)研究. *生态学报*, 2005, 25 (2) : 283—288
- Cai Q Y, Mo C H, Li Y H, et al. The study of PAEs in soils from typical vegetable fields in areas of Guangzhou and Shenzhen, South China (In Chinese). *Acta Ecologica Sinica*, 2005, 25 (2) : 283—288
- [7] 陈永山, 骆永明, 章海波, 等. 设施菜地土壤酚酸酯污染的初步研究. *土壤学报*, 2011, 48 (3) : 516—523
- Chen Y S, Luo Y M, Zhang H B, et al. Preliminary study on PAEs pollution of greenhouse soils (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2011, 48 (3) : 516—523
- [8] Wang J, Luo Y M, Teng Y, et al. Soil contamination by phthalate esters in Chinese intensive vegetable production systems with different modes of use of plastic film. *Environmental Pollution*, 2013, 180: 265—273
- [9] 秦华, 林先贵, 尹睿, 等. 接种降解菌对土壤中邻苯二甲酸二异辛酯降解的影响. *应用与环境生物学报*, 2006, 12 (6) : 842—845
- Qin H, Lin X G, Yin R, et al. Degradation of di-(2-Ethylhexyl) phthalate in soil by inoculating microorganisms (In Chinese). *Journal of Applied and Environmental Biology*, 2006, 12 (6) : 842—845
- [10] Wang X H, Yuan X, Hou Z G, et al. Effect of di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) on microbial biomass C and enzymatic activities in soil. *European Journal of Soil Biology*, 2009, 45 (4) : 370—376
- [11] 蔡文贵, 秦洁芳, 贾晓平, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯对翡翠贻贝(*Perna viridis*)生化指标的影响. *生态学杂志*, 2012, 31 (1) : 100—105
- Cai W G, Qin J F, Jia X P, et al. Effects of di-(2-ethylhexyl) phthalate on the biochemical indices of green mussel (*Perna viridis*) (In Chinese). *Chinese Journal of Ecology*, 2012, 31 (1) : 100—105
- [12] 王莉, 郭靖, 韩冰, 等. 邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)对小鼠的氧化损伤及黄豆异黄酮对其保护作用的研究. *生态毒理学报*, 2012, 7 (3) : 268—276
- Wang L, Guo J, Han B, et al. Oxidative damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate and protective effects of soybean isoflavones in mice (In Chinese). *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7 (3) : 268—276
- [13] 颜增光, 何巧力, 李发生. 蚯蚓生态毒理试验在土壤污染风险评价中的应用. *环境科学研究*, 2007, 20 (1) : 134—142
- Yan Z G, He Q L, Li F S. The use of earthworm ecotoxicological test in risk assessment of soil contamination (In Chinese). *Research of Environmental Sciences*, 2007, 20 (1) : 134—142
- [14] 王广驰. 烯啶虫胺和啶虫脒对蚯蚓的氧化胁迫及基因毒性. 山东泰安: 山东农业大学, 2015
- Wang G C. Oxidative stress and genotoxicity induced by nitenpyram and acetamiprid exposure in earthworm (In Chinese). Tai'an, Shandong: Shandong Agricultural University, 2015
- [15] 卢明珠, 吕宪国, 管强, 等. 蚯蚓对土壤温室气体排放的影响及机制研究进展. *土壤学报*, 2015, 52 (6) : 1209—1225
- Lu M Z, Lü X G, Guan Q, et al. Advancement in study on effect of earthworm on greenhouse gas emission in soil and its mechanism (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2015, 52 (6) : 1209—1225
- [16] 周垂帆. 重金属和草甘膦复合污染生态毒理研究. 南京: 南京林业大学, 2013
- Zhou C F. Study of the ecology toxic effects of single and combined pollution between heavy metal and glyphosate (In Chinese). Nanjing: Nanjing Forestry University, 2013
- [17] Liu W, Zhu L S, Wang J, et al. Assessment of the genotoxicity of endosulfan in earthworm and white clover plants using the comet assay. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2009, 56: 742—746
- [18] Rastogi R P, Singh S P, Häder D P, et al. Detection of reactive oxygen species (ROS) by the oxidant-sensing probe 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate in the cyanobacterium *Anabaena variabilis* PCC 7937. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 397: 603—607

- [19] Dikalov S I, Harrison D G. Methods for detection of mitochondrial and cellular reactive oxygen species. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2014, 20 (2) : 372—382
- [20] Song Y, Zhu L S, Wang J, et al. DNA damage and effects on antioxidative enzymes in earthworm (*Eisenia fetida*) induced by atrazine. *Soil Biology & Biochemistry*, 2009, 41: 905—909
- [21] Song Y, Zhu L S, Xie H, et al. Effects of atrazine on DNA damage and antioxidative enzymes in *Vicia faba*. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2009, 28 (5) : 1059—1062
- [22] 肖健. 重金属对斑马鱼的毒性效应及作用机制研究. 北京: 北京协和医学院, 2014
Yin J. Studies on toxic effect and mechanism of heavymetals on zebrafish (In Chinese). Beijing: Peking Union Medical College, 2014
- [23] 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性效应研究. *农业环境科学学报*, 2010, 29 (10) : 1924—1929
Deng L P, Feng Y H, Zhao X, et al. Toxicity effects of chlordane and mirex contaminated soil on earthworm (*Eisenia fetida*) (In Chinese). *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29 (10) : 1924—1929
- [24] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 2002, 7 (9) : 405—410
- [25] Wang X F, Xing M L, Shen Y, et al. Oral administration of Cr (VI) induced oxidative stress, DNA damage and apoptotic cell death in mice. *Toxicology*, 2006, 228 (1) : 16—23
- [26] 陈汉, 王慧君, 李学锋, 等. 甲基苯丙胺对大鼠脑组织中NO, SOD和MDA的影响. *中国药物依赖性杂志*, 2007, 16 (2) : 102—104
Chen H, Wang H J, Li X F, et al. Change of NO, SOD and MDA in methamphetamine-treated rat brain and their correlation (In Chinese). *Chinese Journal of Drug Dependence*, 2007, 16 (2) : 102—104
- [27] Wang X, Jiang L J, Ge L, et al. Oxidative DNA damage induced by di-(2-ethylhexyl) phthalate in HEK-293 cell line. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 39 (3) : 1099—1106
- [28] 赵春风, 刁晓平, 曹佳, 等. 邻苯二甲酸二(2-乙基己)酯(DEHP)对马氏珠母贝(*Pinctada maetensii*)胚胎发育的影响及DNA损伤. *海洋环境科学*, 2015, 34 (4) : 546—552
Zhao C F, Diao X P, Cao J, et al. Effects of DEHP on embryonic development and DNA damage of *Pinctada maetensii* (In Chinese). *Marine Environmental Science*, 2015, 34 (4) : 546—552

Oxidating Stress and DNA Damage of DEHP to Soil Earthworms

LIU Wenjun GAO Jianpeng WANG Guanying ZHU Lusheng WANG Jinhua WANG Jun[†]

(College of Resources and Environment, Key Laboratory of Agricultural Environment in Universities of Shandong, Shandong Agricultural University, Tai'an, Shandong 271018, China)

Abstract 【Objective】Phthalate acid esters (PAEs), also known as phthalate esters or “plasticizer”, are the reaction product of phthalic anhydride and alcohol. PAEs are widely used in the production of a huge number of products such as agricultural plastic film, toys, medical bags and hoses for transfusion, food packaging, cleansers, vinyl floor and wallpaper, and personal care products. Among them, Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) is one PAE, the highest in output and consumption and also a toxic organic compound highly hazardous to human health, disturbing endocrine systems and causing cancers, mutation, oxidative damage and genetic toxicity. As DEHP is weakly bonded to the plastic matrix by hydrogen bond and van der Waals force, it is easily detached and diffused into the air, water and soil environments. Therefore, its pollution and hazard to human health has aroused more and more attention from the people. So far studies have proven that DEHP can enter organisms via a variety of ways, causing poisonous damage to tissues and organs of the organisms. As DEHP is extensively used in agriculture and hence exists in large volumes in the soil system, it is necessary to investigate its ecological and toxicological effects, such as oxidative stress and DNA damage, on typical soil animals, in the hope that the study may serve as scientific

basis for reasonable assessment of soil ecological risk of DEHP. 【Method】 To explore eco-toxicological effects of DEHP on soil animals, Earthworms (*Eisenia foetida*), used as bio-indicator, were exposed to DEHP varying in concentration (0, 0.1, 1, 10 and 50 mg kg⁻¹) in artificial soil. Earthworms were sampled after 7, 14, 21 and 28 days of exposure for analysis of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), peroxidase (POD) and glutathione (GST), which are the indices reflecting the degree of DEHP activating oxidation of earthworms, reactive oxygen species (ROS), which is the indicator of cytotoxicity of DEHP to earthworms, and malondiadehyde (MDA) and olive tail moment, which are the indices reflecting genotoxicity of the substance to earthworms. 【Result】 (1) DEHP, above 0.1 mg kg⁻¹ in concentration, significantly enhanced the activities of SOD, CAT, POD and GST in *Eisenia foetida* by a degree varying with the concentration of DEHP, which demonstrates that DEHP induces antioxidant enzymes in earthworms; (2) DEHP increased ROS concentration in earthworms as compared with control and the effect varied between treatments, displaying an apparent dose-effect relationship; (3) Comparison between the treatments shows that DEHP did have some effect on content of MDA, but the effect did not follow any specific rule and was the most obvious in earthworms exposed to DEHP, 10 mg kg⁻¹ and 50 mg kg⁻¹ in concentration; (4) In the presence of DEHP, GST in the earthworms was apparently activated, except for the treatment of 0.1 mg kg⁻¹, where the earthworms did not have much difference from those in control. The observation demonstrates that DEHP, higher than 0.1 mg kg⁻¹ in concentration induces GST in the earthworms; (5) Single cell gel electrophoresis shows that coelomocyte DNA of the earthworms was damaged in the presence of DEHP, regardless of concentration and Olive tail moment increased with the rising DEHP concentration, which suggests that DNA damage caused by DEHP is dose-dependent. 【Conclusion】 Once DEHP enters earthworms, it activates the defense system of antioxidant enzymes (SOD, CAT and POD) and GST detoxification enzyme in the earthworms to protect the organisms from injury. Nevertheless, DEHP still raises ROS content in the earthworms, and excessive ROS triggers peroxidation of lipids, producing MDA. ROS and MDA act jointly damaging cell DNA of the earthworms. To sum up, DEHP may cause a certain degree of damage to organisms and DNA of the earthworms, manifesting fairly strong eco-toxicological effects. Therefore, adequate attention should be paid to DEHP disposal.

Key words DEHP; Antioxidant enzymes; GST; MDA; ROS; Comet assay

(责任编辑: 卢 萍)