

土壤低剂量荧蒽胁迫下蚯蚓的抗氧化防御反应*

张薇^{1,3} 宋玉芳^{1,2†} 孙铁珩^{1,2} 李昕馨² 刘森^{1,3} 陈朗¹

(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 沈阳大学沈阳环境工程重点实验室, 沈阳 110041)

(3 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要 以人工污染土壤为介质, 荧蒽为供试化学品, 以蚯蚓内脏中细胞色素 P450 含量、谷胱甘肽转移酶 (GST)、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT) 活性和丙二醛 (MDA) 含量为指标, 进行了不同暴露时间 (1、3、7 和 14d) 下低剂量荧蒽 (60、120、240、480 和 960 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 污染胁迫对蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 的毒性效应研究。结果表明, 在供试浓度范围内, 蚯蚓内脏中各生化酶系产生了不同程度的响应。其中 P450 含量、SOD 和 POD 活性比较敏感; 而 GST 和 CAT 活性, 以及 MDA 含量在供试浓度范围内对荧蒽的暴露没有明显的指示作用。研究发现, 低剂量污染物暴露的时间效应较剂量效应更有指示作用, 并且生物体内各生化酶系对污染物暴露的敏感性存在差异, 因而在土壤污染生态毒性诊断时, 选择多时段检测和多指标联合诊断, 对污染暴露指示的有效性和敏感性尤为重要。

关键词 荧蒽; 蚯蚓; 细胞色素 P450; 谷胱甘肽转移酶; 抗氧化酶; 生物标记物

中图分类号 X53 **文献标识码** A

在土壤生态毒理诊断中多选用蚯蚓为模式生物^[1], 研究其在不同污染状态下生存、生长、繁殖的响应 (如, 蚯蚓急性致死率和慢性体重抑制率), 以此来反映环境的健康状况。然而, 随着生态毒理诊断研究的深入开展, 这些指标不能满足亚致死浓度污染条件下土壤生态毒理诊断的需要。为此, 土壤污染生态毒理学研究要寻求新的更敏感试验终点。

生物体内的第一代谢阶段细胞色素 P450 酶系、第二代谢阶段的谷胱甘肽转移酶、抗氧化酶系 (SOD、POD 和 CAT) 和金属硫蛋白等指标, 在生物代谢污染物以及防御污染物毒害方面发挥着重要作用, 它们可以从微观分子水平反映环境介质 (土壤、沉积物和水体等) 亚致死污染的状态, 因此, 有望成为环境污染早期预警的生物标记物^[2-7]。有关生物细胞色素 P450、谷胱甘肽转移酶和抗氧化酶系的生物指示效应, 已在不同生物体内得到了证实^[3,5,6,8-12], 然而对于符合现实土壤状况的低剂量 PAH 的污染诊断, 这些指标是否可行, 目前尚缺少足够的研究予以证明。

多环芳烃 (PAHs) 是一类受广泛关注的持久性有机污染物, 目前多集中对其污染土壤的生物修复研究^[13-15]。荧蒽 (Fluoranthene, Fla) 是美国环境保护署优先控制有机污染物黑名单中典型的代表性多环芳烃, 在环境中普遍存在。应用蚯蚓生化指标对 Fla 毒性评价的研究目前还少见报道。有研究以蚯蚓体内细胞色素 P450 的特异性同工酶活性 EROD、BROD 和 PROD 为指标诊断较高剂量 (100 mg kg^{-1}) 的 Fla 污染土壤, 发现这些指标对 Fla 暴露没有明显的响应变化^[8]。另外, 目前对蚯蚓生化指标的研究多以蚯蚓整体为研究对象, 由于其结构的复杂性使得各类酶活性测定的过程中会带来许多干扰的因素 (如细胞色素 P450 含量的测定^[8]), 而蚯蚓内脏是其代谢外源污染物的重要场所, 也是生化酶类分布较为集中的部分, 选择其内脏作为生化酶活性测定的对象更加直接和有效, 有望成为毒理诊断的新手段。

为此, 本实验以细胞色素 P450 含量、谷胱甘肽转移酶 (GST) 活性和抗氧化酶系中超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化物酶 (POD) 和过氧化氢酶

* 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418503)、国家自然科学基金项目 (20337010 和 20577056) 和国家高技术研究发展计划 (863) 项目 (2006AA06Z386) 资助

† 通讯作者, E-mail: Songyufang@iae.ac.cn

作者简介: 张薇 (1980~), 女, 博士研究生, 主要从事环境污染生态毒理学研究。E-mail: Zhangweilm04@163.com

收稿日期: 2006-08-28; 收到修改稿日期: 2006-10-31

(CAT)活性,以及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量为指标,以蚯蚓内脏为供试生物样品,通过人工污染土壤的方法,研究 Fla 在单一低剂量污染胁迫下蚯蚓内脏中的生物化学响应。本研究旨在探讨适合土壤 PAHs 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 药品与溶液配制

茈萸为分析纯,购于 Fluka 公司(瑞士)。牛血清白蛋白(BSA)与考马斯亮蓝 G-250(CBG)均

购于上海生物工程技术服务有限公司,为分析纯。其他药品均为市购分析纯。一氧化碳(CO)购于沈阳市气体站,纯度99.99%。

1.2 仪器设备

CP-80MX 低温超速离心机(日立);紫外双光束分光光度计 UV-2550(岛津);玻璃组织研磨器;受控环境生长箱。

1.3 试验土壤和蚯蚓

土壤为 0~20 cm 表层清洁土壤,采自中国科学院沈阳应用生态所实验站,其理化性质见表 1。赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)购自天津蚯蚓养殖中心。选用 2~3 月龄,体重 300~400 mg,带有环带的健康蚯蚓为供试品。

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of tested soil

土壤类型 Soil type	总磷 Total P	总钾 Total K	凯氏氮 Kjeldahl N	有机质 OM	阳离子交换量 CEC	pH
	(g kg ⁻¹)				(cmol kg ⁻¹)	
草甸棕壤 Meadow brown soil	0.4	1.8	0.91	16.5	12.3	6.22

1.4 土壤染毒试验

采用土壤染毒法,根据沈阳污灌区 Fla 的实际浓度设计 5 个暴露浓度(60、120、240、480 和 960 μg kg⁻¹)和溶剂对照 CK。分别将 50 ml 不同浓度的 Fla-丙酮溶液或丙酮与 500 g 土壤混合,充分混合 30 min 以上,待丙酮自然挥发 18 h 后,调节土壤水分含量为最大持水量的 40%。暗处平衡 72 h 后,转移至方形带盖(盖有孔)的塑料盒中,加入 10 条成熟蚯蚓,置于 20 ± 1 °C、湿度为 80% 的受控环境生长箱中避光培养。蚯蚓暴露 1、3、7 和 14 d 后,测定其内脏中各生化指标含量或活性。每个浓度处理设 4 个平行,每个平行重复测定 3 次。

1.5 生化测定

1.5.1 粗酶液和微粒体的制备 蚯蚓在 4% 甘油溶液(20%)中浸泡 30 min 后,迅速解剖取其内脏。内脏用冰冷的 0.15 mol L⁻¹ KCl 溶液清洗后,移入 5 ml 匀浆缓冲液(250 mmol L⁻¹蔗糖, 50 mmol L⁻¹ Tris pH 7.5, 1 mmol L⁻¹ DTT, 1 mmol L⁻¹ EDTA)中,用玻璃组织研磨器在冰水浴中将其细胞破碎。匀浆物通过一层纱布过滤,将滤液装入 10 ml 的离心管中,于低温(4 °C)超速离心机上 12 000 r min⁻¹离心 30 min。

所得上清液一部分待测蚯蚓抗氧化酶和谷胱甘肽转移酶活性,另一部分制备微粒体,于超速离心机 4 °C 以 46 500 r min⁻¹再次离心 90 min。所得沉淀用 1 ml 保存缓冲液(250 mmol L⁻¹蔗糖, 50 mmol L⁻¹ Tris pH 7.5, 1 mmol L⁻¹ DTT, 1 mmol L⁻¹ EDTA, 20%甘油)重新悬浮,待测蛋白含量和 P450 含量。

1.5.2 酶活性的测定 本试验所有生化指标的测定均采用紫外-可见分光光度计。细胞色素 P450 总含量测定参照 Omura 和 Sato 的方法^[16],应用连二亚硫酸钠还原细胞色素 P450 的 CO 差光谱进行。SOD 活性测定采用氮蓝四唑法^[3],单位为 U mg⁻¹ Protein,一个酶活力单位(U)以抑制 NBT 光化学反应的 50%来表示。POD 活性测定采用愈创木酚法^[17],单位为 A_{470nm} mg⁻¹ min⁻¹ Protein,以每分钟吸光度变化值表示酶活力的大小。CAT 活性测定采用徐镜波等^[18]的方法,单位为 U mg⁻¹ Protein,一个酶活性单位(U)定义为:25 °C,100 s 内使 H₂O₂ 分解 1/2 时的酶蛋白量。MDA 含量测定采用硫代苯巴比妥酸(TBA)比色法^[17],单位为 nmol mg⁻¹ Protein。GST 活性测定参照毛德寿等^[19]的方法,单位为 nmol mg⁻¹ min⁻¹ Protein,酶活性单位定义为:

25, 每毫克蛋白每分钟催化形成 1 nmol 反应产物的量。微粒体悬液的蛋白含量和粗酶液蛋白含量均采用考马斯亮蓝法^[20]测定,以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.6 数据分析

采用统计软件 SPSS 12.0 进行数据统计分析。在对参变量分析之前,先对各组数据进行方差齐次性检验。以 Fla 的暴露剂量和时间为自变量,通过单变量分析(Univariate analyses)判定各单一效应及交互效应对整体变异的贡献。应用单因素方差分析(One-way ANOVA)对各样品组进行方差检验。采用判别分析(Discriminant analyses, DA)对每个暴露时间段的 Fla 剂量进行判别区分。

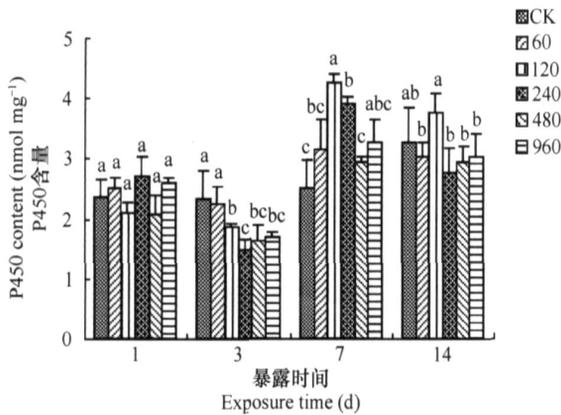


图 1 不同暴露时间下荧蒽对蚯蚓内脏中 P450 含量的影响

Fig. 1 Cytochrome P450 content in the guts of earthworms varying with duration of incubation

注:不同字母表示同一暴露时间内不同浓度荧蒽处理组生化响应的显著性差异($p < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences in biochemical response between earthworms in treatments different in Fla concentrations, but the same in exposure time at $p < 0.05$

2.2 Fla 对蚯蚓内脏中谷胱甘肽转移酶(GST)活性的影响

研究结果显示(图 2),蚯蚓暴露于 Fla 污染土壤 1d 后,虽然低剂量组(60、120 和 240 $\mu\text{g kg}^{-1}$) GST 活性相对对照有增加趋势但统计学差异不显著($p > 0.05$);在暴露 3d 后,除最高剂量组(960 $\mu\text{g kg}^{-1}$)被显著诱导外($p < 0.05$),其余各组均围绕对照水平波动。随着暴露时间的增加(7~14 d),各处理组 GST 活性与对照无显著差异($p > 0.05$)。

2.3 Fla 对蚯蚓内脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

如图 3 所示,Fla 在中低暴露剂量(60~240 $\mu\text{g kg}^{-1}$)胁迫下蚯蚓 SOD 活性只在暴露的第 3 天表现出明显的诱导效应,其余各时段与对照组相比无显著差异($p >$

2 结果

2.1 Fla 对蚯蚓内脏中细胞色素 P450 含量的影响

蚯蚓于 Fla 污染土壤中暴露 1、3、7 和 14 d 后,其内脏中 P450 含量如图 1 所示。在暴露 1 d 后,Fla 处理组与对照组没有显著差异($p > 0.05$);暴露 3 d 时,除最低剂量组(60 $\mu\text{g kg}^{-1}$)外各处理组 P450 含量均显著低于对照($p < 0.05$)。当暴露进行到第 7 天,120 和 240 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 样品组中 P450 显著高于对照,表现为明显的诱导效应;而高剂量组(480 和 960 $\mu\text{g kg}^{-1}$) P450 虽高于对照但差异不显著。Fla 污染胁迫 14 d 后,各处理组与对照 P450 含量无明显差异。

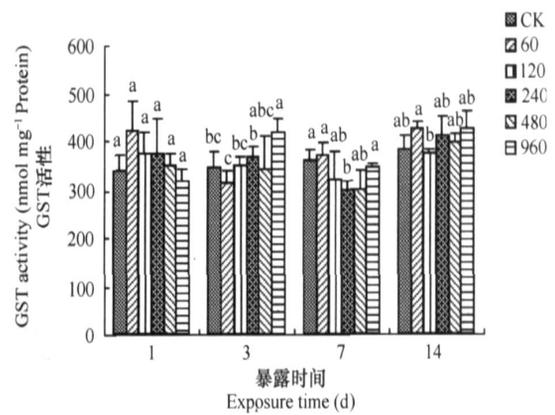


图 2 不同诱导时间下荧蒽对蚯蚓内脏中 GST 活性的影响

Fig. 2 GST activity in the guts of earthworms varying with duration of incubation

0.05);而较高暴露剂量组(480 和 960 $\mu\text{g kg}^{-1}$),SOD 活性在整个试验过程中分别表现为抑制(1 d)、恢复(3 d)、再抑制(7 d)和再恢复(14 d)的响应过程。

2.4 Fla 对蚯蚓内脏中过氧化物酶(POD)活性的影响

低剂量 Fla 污染对蚯蚓内脏 POD 活性的影响如图 4 所示。在暴露的初期(1 d),Fla 处理组 POD 活性与对照组无显著差异($p > 0.05$);当暴露 3 d 时,大于 60 $\mu\text{g kg}^{-1}$ 的处理组蚯蚓 POD 活性明显被抑制,并且于暴露的第 7 天活性显著上升,表现为明显的诱导效应($p < 0.05$);暴露 2 周后,Fla 处理组 POD 活性与对照组无显著差异($p > 0.05$)。

2.5 Fla 对蚯蚓内脏中过氧化氢酶(CAT)活性的影响

如图 5 所示,蚯蚓暴露 Fla 污染土壤 1 d 后,各

处理组 CAT 活性明显高于对照组,但是较高剂量组 (480 和 960 $\mu\text{g kg}^{-1}$) 与对照差异不显著 ($p > 0.05$)。

当暴露 Fla 3、7 和 14 d 时,各处理组均在对照水平波动,未表现出明显的诱导或抑制效应 ($p > 0.05$)。

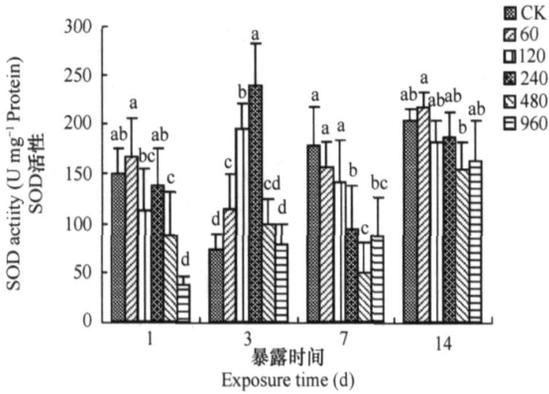


图 3 不同诱导时间下茈菟对蚯蚓内脏中 SOD 活性的影响

Fig. 3 SOD activity in the guts of earthworms varying with duration of incubation

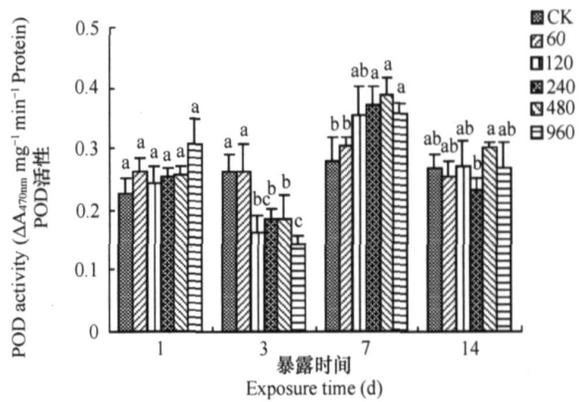


图 4 不同诱导时间下茈菟对蚯蚓内脏中 POD 活性的影响

Fig. 4 POD activity in the guts of earthworms varying with duration of incubation

注:不同字母表示同一暴露时间内不同浓度茈菟处理组生化响应的显著性差异 ($p < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences in biochemical response between earthworms in treatments different in Fla concentrations, but the same in exposure time at $p < 0.05$

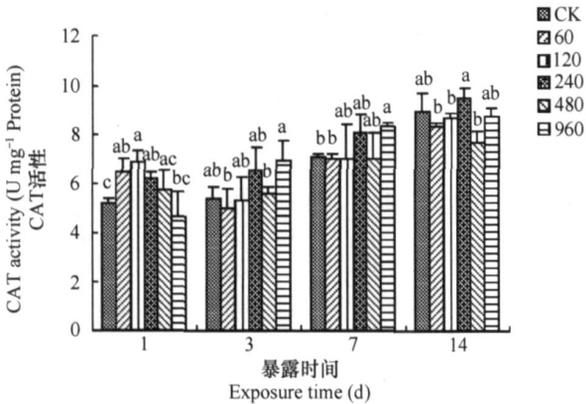


图 5 不同诱导时间下茈菟对蚯蚓内脏中 CAT 活性的影响

Fig. 5 CAT activity in the guts of earthworms varying with duration of incubation

注:不同字母表示同一暴露时间内不同浓度茈菟处理组生化响应的显著性差异 ($p < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences in biochemical response between earthworms in treatments different in Fla concentrations, but the same in exposure time at $p < 0.05$

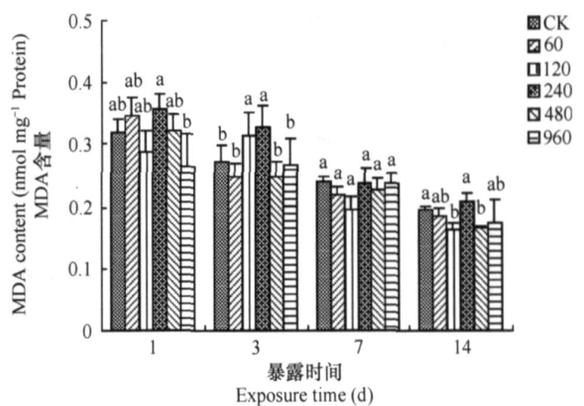


图 6 不同诱导时间下茈菟对蚯蚓内脏中 MDA 含量的影响

Fig. 6 MDA content in the guts of earthworms varying with duration of incubation

注:不同字母表示同一暴露时间内不同浓度茈菟处理组生化响应的显著性差异 ($p < 0.05$)

Note: Different letters indicate significant differences in biochemical response between earthworms in treatments different in Fla concentrations, but the same in exposure time at $p < 0.05$

2.6 Fla 对蚯蚓内脏中丙二醛(MDA)含量的影响

如图 6 所示,在 Fla 供试浓度范围内,不同暴露时段的试验结果表明,各处理组中蚯蚓内脏 MDA 含量与同暴露时段的对照组相比差异不显著 ($p > 0.05$),各处理组均在对照水平范围内上下波动,没有明显的规律性。

3 讨论

3.1 低剂量 Fla 胁迫下蚯蚓内脏中生化指标的响应

细胞色素 P450 酶系是生物代谢外源有机物的第一阶段酶系,它由多种同工酶组成。由于可被外源污染物诱导或抑制而使其活性(含量)显著增加或降低,P450 常被用来作为生物标记物诊断环境污

染^[2,4,7,8]。P450 含量作为常用的诊断指标之一是对 P450 蛋白总水平的量度。本研究结果显示,蚯蚓内脏 P450 含量对低剂量 Fla 暴露的响应情况是一个动态变化过程:抑制(3 d)—诱导(7 d)—稳定(14 d),这个过程可能与 Fla 在土壤中的生物有效性有关。暴露初期 Fla 的生物有效性较高,进入蚯蚓体内后抑制了某些 P450 同工酶蛋白的合成,使其总量下降,如有研究报道在较高剂量(10 和 100 mg kg⁻¹)Fla 胁迫下蚯蚓 P450 同工酶 PROD 活性下降^[8]。随着土壤对 Fla 的固定和老化作用的加强,其有效性降低,体内积累的 Fla 被慢慢分解,从而诱发了某些 P450 同工酶合成速度的加快,使其含量增加。PAHs 对生物体内 P450 特异性同工酶具有选择性诱导已被广泛证实,如 Saint-Denis 等^[7]发现 B[a]P 污染土壤中蚯蚓 MROD 活性与 B[a]P 的浓度和暴露时间均相关,且在低剂量暴露时 MROD 活性被显著诱导。本试验的后期(14 d),Fla 在土壤老化作用下,其极低的生物有效性使 P450 总量回落并趋于稳定。

GST 是生物体内的代谢第二阶段酶,可催化谷胱甘肽(GSH)和亲电性中间代谢物(如第一代代谢阶段产物)结合,使之成为水溶性化合物排出体外,起到解毒的作用;还可清除生物体内脂类过氧化物,保护生物体免受氧化损伤。通常,GST 活性的升高是由于参与了外源物在生物体内的代谢所致。本试验中,诱导效应只在最高剂量组观察到,说明供试浓度范围内 GST 对 Fla 的指示效应并不十分明显。在以 GST 活性为指标的毒理诊断中,GST 对污染物暴露的响应规律有所不同,这方面尤以水生鱼类的研究居多。例如,王重刚等^[12]发现,B[a]P 和芘暴露 7d 对梭鱼肝脏 GST 活性的影响主要为诱导效应,而在暴露于两者的混合物 15d 后,GST 活性显著被抑制;Di Gulio 等^[21]将鲑鱼暴露于 Black Rock 海港底质中,发现肝脏 GST 活性在 14 d 时被显著诱导,但 28 d 时与对照无明显差异。而 James 等^[22]与 Collier 等^[23]研究显示,PAHs 或 PCBs 的暴露并没有诱导供试鱼体 GST 活性的显著增加。对蚯蚓的研究也发现,在 B[a]P 不同暴露时间和浓度处理下,蚯蚓 *Eisenia fetida andrei* GST 活性保持不变^[7];而胺甲萘却使其出现了抑制和诱导两种效应^[24]。由上可知,GST 的指示效应是供试生物种类、污染物类型,以及暴露剂量和时间的综合作用结果;就其敏感性而言,GST 不如第一代代谢阶段 P450 酶系对外源有机物的指示敏感。

SOD 作为生物体内重要的抗氧化酶之一,对机体的氧化与抗氧化平衡起着重要作用,它能有效清除体内产生的超氧阴离子,终止自由基连锁反应,保护生物体免受氧化损伤。以往应用 SOD 等抗氧化酶作为污染诊断指标多应用于重金属污染胁迫的研究。然而,有关研究表明,PAHs 在生物体内的代谢过程也可诱发活性氧自由基的大量产生^[25~27],且由此引起的氧化胁迫已在不同生物体内得到了证实^[2,7,10,21]。本试验结果显示,中低剂量 Fla 暴露 3d 后 SOD 活性显著升高,说明 Fla 的胁迫或代谢过程产生了超氧阴离子,从而诱发了 SOD 活性增加。然而随着土壤老化作用的加强,Fla 生物有效性下降,SOD 活性下降并趋于稳定。与此相似,冯涛等^[28]发现 B[a]P(30 μg L⁻¹)胁迫下大弹涂鱼肝脏 SOD 活性在第 3 天显著升高,随后降至对照水平。另外,本试验中 Fla 较高剂量组蚯蚓 SOD 活性产生了“抑制—恢复—抑制—恢复”的动态响应。这可能因为暴露初期 Fla 生物有效性较大,其急性胁迫使 SOD 受到影响,在毒性缓解后,Fla 代谢产物的积累抑制了 SOD 酶活性。此后,随着 Fla 有效性降低,SOD 趋于稳定。王重刚等^[29]发现 B[a]P 和芘暴露(50 μg L⁻¹)使梭鱼肝脏 SOD 活性主要表现为先抑制后诱导效应,而 5 μg L⁻¹的处理组在暴露 7 d 后 SOD 未表现出诱导,而是抑制效应。这与本试验结果相似。

POD 作为生物体内重要的抗氧化酶之一,在调控生物体内过氧化物平衡方面具有重要的作用。本试验中 POD 活性的变化趋势与蚯蚓 P450 含量的响应情况相似,即在暴露 3 d 时活性被抑制,而在 7 d 后被诱导。POD 活性的升高说明在 Fla 的代谢过程中,有过氧化物或过氧化氢产生。POD 活性的这种“先抑制后诱导”的响应趋势在王重刚等^[30]的研究中也被观察到,即 B[a]P 和芘的低剂量(0.1~50 μg L⁻¹)短期暴露造成梭鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性产生先抑制后诱导的效应。此外,在 PAHs 胁迫下,POD 活性的升高同样在水生植物体内被观察到,如随着萘暴露浓度的增加,水葫芦和水花生的 POD 活性逐渐升高^[31]。

CAT 可有效清除生物体内过量的 H₂O₂,维持细胞内 H₂O₂平衡。本研究发现,蚯蚓内脏 CAT 活性对土壤低剂量 Fla 暴露在短期内反应较为敏感,表现为明显的诱导效应。这说明 Fla 的急性胁迫增加了细胞内 H₂O₂的含量,从而诱发 CAT 活性增加,这是生物应激的体现。但是随着暴露时间的增加,CAT 活性恢复至对照水平,而不具备明显的指示作用。

这可能与 H_2O_2 在生物体内的转化机制有关。有研究表明,对于清除整个细胞中的 H_2O_2 ,POD 和 CAT 显示出了很好的协同作用^[32]。CAT 存在于过氧化体中,而 POD 则存在于胞浆与线粒体的基质中,因而二者分工有所不同。试验中 CAT 活性在暴露中、后期变化不显著,可能是由于 H_2O_2 主要在胞液中由 SOD 产生,因而主要由 POD 起作用。此结论与苾在较高剂量(10、40 和 160 mg kg^{-1})长期暴露(42 d)下的蚯蚓检测结果类似,即蚯蚓 CAT 活性不受苾的胁迫影响,只在最大剂量为 640 mg kg^{-1} 时 CAT 略有下降^[2]。另外,B[a]P 对大弹涂鱼肝脏 CAT 活性影响也显示,CAT 活性不因 B[a]P 暴露浓度和时间的改变而发生显著变化^[28]。一些研究发现^[21,32,33],对于野外污染样地原位暴露,不同供试生物体内 CAT 活性均显示出明显的诱导或抑制效应,具有敏感的生物指示作用。这可能与原位暴露污染物的复杂组分有关。在多种污染物共存的情况下,污染物之间、污染物与生物之间均存在着复杂的交互作用,因而产生的氧化胁迫效应更为明显,最终导致抗氧化酶活性的相应变化。

MDA 是氧化损伤最终形成的脂质过氧化产物,其含量可间接提示机体自由基水平^[34]。本研究结果显示,在供试低剂量暴露下,Fla 对蚯蚓内脏中 MDA 含量的影响不显著。这说明低剂量的 Fla 未对蚯蚓造成明显的氧化损伤,Fla 胁迫产生的自由基可被体内的抗氧化防御酶系及时、有效的去除。这点也可以从上述指标的响应情况得到证实:即在供试的浓度范围内,上述指标的活性或含量均没有被污染物不可逆的抑制,它们都是经过短暂的响应之后,最终恢复并趋于稳定。因而,可以看出,低剂量的 Fla 并没有造成明显的毒性效应。其他研究发现,在高剂量 PAHs 暴露情况下,生物体内 MDA 含量可产生响应,如通过一次性腹腔注射 50 mg kg^{-1} 的 B[a]P 后,小鼠肝脏中 MDA 含量在 24 和 48 h 显著升高^[35]。

3.2 诊断指标选择

蚯蚓暴露于低剂量 Fla 污染土壤时,其内脏中各生化指标的响应情况有所不同:其中 P450 含量、SOD 和 POD 活性比较敏感;而 GST 和 CAT 活性,以及 MDA 含量对低剂量 Fla 的暴露没有明显的指示作用。各生化指标对污染指示的灵敏度不同,不仅与生化酶类本身的特性有关,还与污染物类型、暴

露时间、剂量、接触途径以及供试生物的种类和状态等相关。因而,在进行实地土壤污染生态毒理诊断时,应尽可能的选用多指标联合应用,彼此相互补充,以适应不同污染状况下的污染诊断,增强其灵敏性和有效性。

本研究结果的单变量分析表明,Fla 的暴露剂量和时间及两者的交互作用均对蚯蚓内脏中各生化酶类产生了影响(MDA 含量除外),并且三者对酶活性总变异的贡献为:时间 > 两者的交互效应 > 剂量。酶活性对毒物暴露的响应在时间上是一个动态变化过程,这不仅与污染物在生物体内的代谢过程有关,还与土壤对污染物的固定和老化作用相关。因而,在使用生化指标进行污染物毒理诊断时,单一时段的暴露结果可能不足以揭示污染物的毒性效应,选择多时段的检测对污染暴露的指示尤为重要。

综合如上分析,对 Fla 暴露剂量的判别分析(DA)结果如图 7。当以蚯蚓内脏中所有供试指标为自变量对 Fla 剂量进行判别分析时发现,在特定暴露时段内可清楚地判别出 Fla 的剂量效应,尽管某些指标在试验中并未表现出明显的指示作用(CAT、GST 和 MDA)。如在 Fla 暴露第 1 天和第 3 天,多指标联合对高剂量组(120 、 480 和 $960\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$)的判别较为敏感;在暴露 1 周后对低剂量组(CK、60 和 $120\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$)的判别较明显。而 Fla 暴露 2 周后,指标联合诊断对各剂量组($120\text{ }\mu\text{g kg}^{-1}$ 组除外)的判别均不理想,这可能是由于生物体各酶系在此时已趋于稳定的缘故。由此可见,多指标联合和多时段检测是单一指标和单一时段毒理诊断在敏感性方面的有效补充,特别是在低剂量污染暴露情况下这种优越性更为明显。

4 结 论

在低剂量 Fla 胁迫下,蚯蚓内脏中各生化指标的响应情况有所不同:其中 P450 含量、SOD 和 POD 活性比较敏感;而 GST 和 CAT 活性,以及 MDA 含量没有明显的指示作用。研究发现,酶活性对污染物暴露的响应在时间上是一个动态变化过程。这提示我们,在进行实地土壤污染生态毒理诊断时,应尽可能地选用多指标联合和多时段检测,以适应不同污染状况下的污染诊断,增强其指示的灵敏性和有效性。

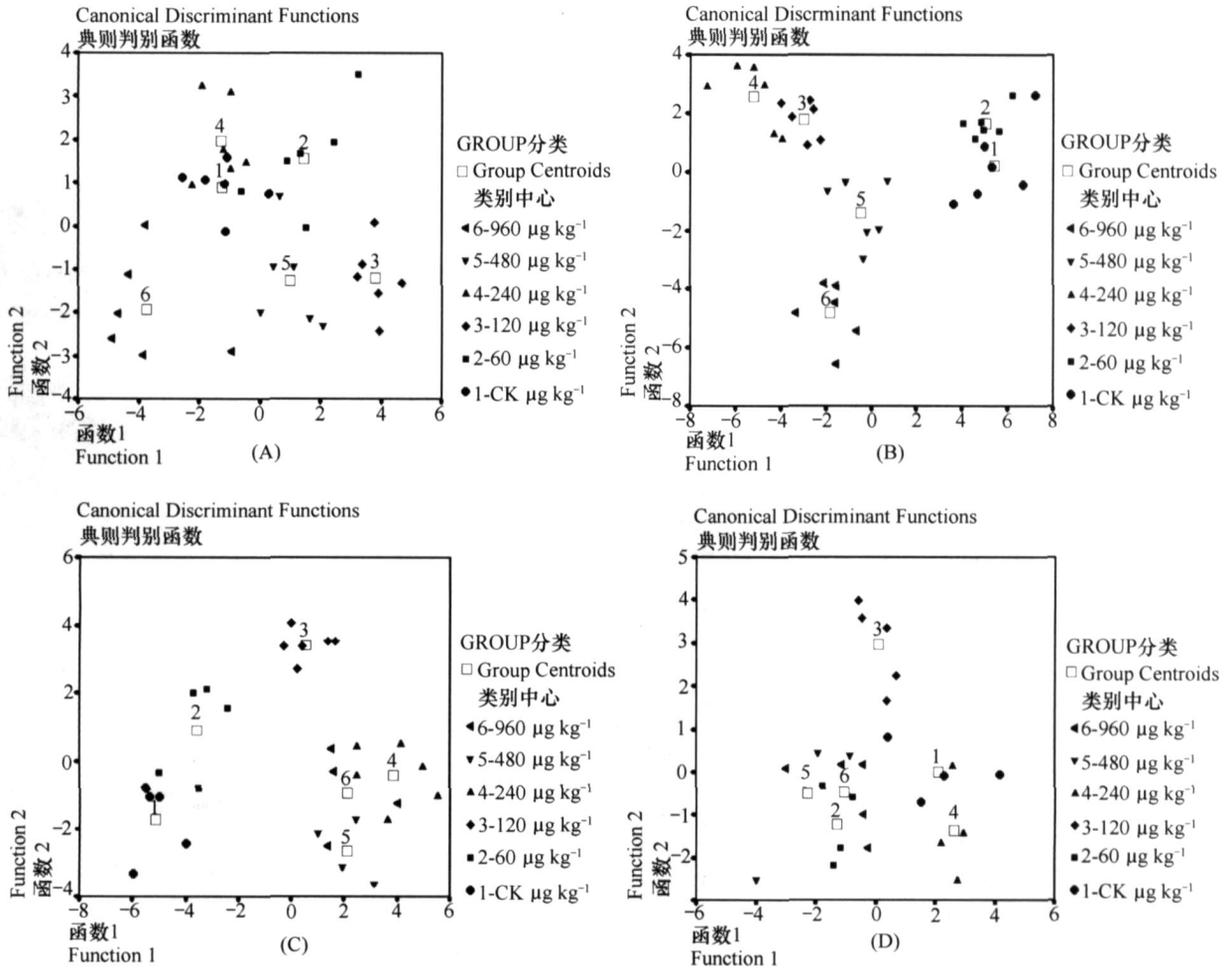


图7 不同诱导时间下(1 d (A)、3 d (B)、7 d (C)和14 d (D)),以蚯蚓内脏中所有生化指标为自变量的荧蒽暴露剂量判别分析

Fig.7 Discriminant Analysis of Fla exposure concentrations in different duration of incubation with all biochemical indexes of the guts of earthworms as independent variable

参考文献

- [1] Edwards C A, Bohlen P J. The effects of toxic chemicals in earthworms. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, 125: 24 ~ 99
- [2] 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
- [3] Luo Y, Zang Y, Zhong Y, *et al.* Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. *Chemosphere*, 1999, 39 (13): 2347 ~ 2356
- [4] Milligan D L, Babish J G, Neuhauser E F. Noninducibility of cytochrome P-450 in the earthworm *Dendrobaena veneta*. *Comp. Biochem. Physiol. Part C*, 1986, 85(1): 85 ~ 87
- [5] Osman A M, Den Besten P J, van Noort P C M. Menadione enhances oxyradical formation in earthworm extracts: Vulnerability of earthworms to quinone toxicity. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65: 101 ~ 109
- [6] 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
- [7] Saint-Denis M, Narbonne J F, Arnaud C, *et al.* Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil: Effects of benzo (a) pyrene. *Soil Biology and Biochemistry*, 1999, 31: 1837 ~ 1846
- [8] 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. Part C*, 1998, 121: 339 ~ 350
- [9] 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
- [10] Livingstone D R. Contaminant-stimulated reactive oxygen species production and oxidative damage in aquatic organisms. *Mar. Pollut. Bull.*, 2001, 42(8): 656 ~ 666

- [11] 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
- [12] 王重刚, 陈奕欣, 郑微云, 等. 苯并(a)芘、芘及其混合物暴露对梭鱼肝脏谷胱甘肽硫转移酶活性的影响. *海洋科学*, 2004, 28(3): 40 ~ 43. Wang C G, Chen Y X, Zheng W Y, *et al.* The effect of exposure of benzo(a)pyrene, pyrene and their mixture on hepatic glutathione-S-transferases activity in *Mugil scriuy* (In Chinese). *Marine Sciences*, 2004, 28(3): 40 ~ 43
- [13] 丁克强, 骆永明, 刘世亮, 等. 黑麦草对菲污染土壤修复的初步研究. *土壤*, 2002, (4): 233 ~ 236. Ding K Q, Luo Y M, Liu S L, *et al.* Remediation of phenanthrene contaminated soil by growing ryegrass (In Chinese). *Soils*, 2002, (4): 233 ~ 236
- [14] 韦保仁, 高为. 多环芳烃污染土壤的可行处理技术. *土壤*, 2006, 38(4): 374 ~ 378. Wei B R, Gao W. Workable technologies for treating PAH-contaminated soil (In Chinese). *Soils*, 2006, 38(4): 374 ~ 378
- [15] 徐圣友, 陈英旭, 林琦, 等. 玉米对土壤中菲芘修复作用的初步研究. *土壤学报*, 2006, 43(2): 226 ~ 232. Xu S Y, Chen Y X, Lin Q, *et al.* Remediation of phenanthrene and pyrene contaminated soil by growing maize (*Zea Mays* L.) (In Chinese). *Acta Pedologica Sinica*, 2006, 43(2): 226 ~ 232
- [16] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. *Jour. Biol. Chem.*, 1964, 239(7): 2370 ~ 2378
- [17] 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, 2003. 123 ~ 124. Zhang Z L, Qu W J. eds. *Test Guidance of Phytophysiology* (In Chinese). Beijing: Higher Education Press, 2003. 123 ~ 124
- [18] 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. Xu J B, Yuan X F, Lang P Z. The determination of enzymic activity and its inhibition on catalase by ultraviolet spectrophotometry (In Chinese). *Environmental Chemistry*, 1997, 16(1): 73 ~ 76
- [19] 毛德寿, 周宗灿, 王志远, 等. 环境生化毒理学. 沈阳: 辽宁大学出版社, 1986. Mao D S, Zhou Z C, Wang Z Y, *et al.* eds. *Environmental Biochemical Toxicology* (In Chinese). Shenyang: Liaoning University Press, 1986
- [20] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 1976, 72: 248 ~ 254
- [21] Di Giulio R T, Habig C, Gallagher E P. Effects of black rock harbour sediments on indices of biotransformation, oxidative stress, and DNA integrity in channel catfish. *Aquat. Toxicol.*, 1993, 26: 1 ~ 22
- [22] James M O, Heard C S, Hawkins W E. Effects of 3-methylcholanthrene on monooxygenase epoxide hydrolase, and glutathione S-transferase activity in small estuarine and freshwater fish. *Aquat. Toxicol.*, 1988, 12: 1 ~ 15
- [23] Collier T K, Varanasi U. Hepatic activities of xenobiotic metabolizing enzymes and biliary levels of xenobiotics in English sole (*Parophrys vetulus*) exposed to environmental contaminants. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 1991, 20: 462 ~ 473
- [24] Ribera D, Narbonne J F, Arnaud C, *et al.* Biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida andrei* exposed to contaminated artificial soil, effects of carbaryl. *Soil Biology and Biochemistry*, 2001, 33: 1123 ~ 1130
- [25] 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
- [26] 周启星, 孔繁翔, 朱琳主编. 生态毒理学. 北京: 科学出版社, 2004. 161 ~ 274. Zhou Q X, Kong F X, Zhu L. eds. *Ecotoxicology* (In Chinese). Beijing: Science Press, 2004. 161 ~ 274
- [27] del Rio L A, Corpas F J, Sandalio L M, *et al.* Plant peroxisomes, reactive oxygen metabolism and nitric oxide. *IUBMB Life*, 2003, 55: 71 ~ 81
- [28] 冯涛, 郑微云, 洪万树, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化酶活性影响的初步研究. *应用生态学报*, 2001, 12(3): 422 ~ 424. Feng T, Zheng W Y, Hong W S, *et al.* Effect of benzo(a)pyrene on antioxidant enzyme activities in *Boleophthalmus pectinirostris* liver (In Chinese). *Chin. J. Appl. Ecol.*, 2001, 12(3): 422 ~ 424
- [29] 王重刚, 余群, 郁昂, 等. 苯并(a)芘和芘暴露对梭鱼肝脏超氧化物歧化酶活性的影响. *海洋环境科学*, 2002, 21(4): 10 ~ 13. Wang C G, Yu Q, Yu A, *et al.* Effect of benzo(a)pyrene and pyrene exposure on hepatic superoxide dismutase in *Mugil scriuy* (In Chinese). *Marine Environmental Sciences*, 2002, 21(4): 10 ~ 13
- [30] 王重刚, 郑微云, 余群, 等. 苯并(a)芘和芘对梭鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响. *海洋科学*, 2002, 26(6): 35 ~ 38. Wang C G, Zheng W Y, Yu Q, *et al.* The effect of benzo(a)pyrene and pyrene exposure on hepatic glutathione peroxidase in *Mugil scriuy* (In Chinese). *Marine Sciences*, 2002, 26(6): 35 ~ 38
- [31] 刘建武, 林逢凯, 王郁, 等. 多环芳烃萘污染对水生植物生理指标的影响. *华东理工大学学报*, 2002, 28(5): 520 ~ 524, 536. Liu J W, Lin F K, Wang Y, *et al.* Effects of PAHs (naphthalene) pollution on the physiological index of hydrophyte (In Chinese). *Journal of East China University of Science and Technology*, 2002, 28(5): 520 ~ 524, 536
- [32] Burgeot T, Bocquené G, Porte C, *et al.* Bioindicators of pollutant exposure in the northwestern Mediterranean Sea. *Mar. Ecol. Prog. Ser.*, 1996, 131: 125 ~ 141
- [33] Stephensen E, Svavarsson J, Sturve J, *et al.* Biochemical indicators of pollution exposure in shorthorn sculpin (*Myoxocephalus scorpius*), caught in four harbours on the southwest coast of Iceland. *Aquat. Toxicol.*, 2000, 48(4): 431 ~ 442
- [34] Porter N A. Chemistry of lipid peroxidation. *Methods in Enzymology*, 1984, 105: 273 ~ 282
- [35] 张宝旭, 阮明, 邱飞婵, 等. 二甲基苯蒽和苯并(a)芘对小鼠肝脏金属硫蛋白及氧化损伤的诱导作用. *环境科学学报*, 2002, 22(6): 764 ~ 767. Zhang B X, Ruan M, Qiu F C, *et al.* Effect of 12-dimethylbenz(a)anthracene and benzo(a)pyrene on metallothionein expression and lipid peroxidation in mouse liver (In Chinese). *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, 22(6): 764 ~ 767

ANTIOXIDING DEFENSIVE RESPONSES OF EARTHWORMS (*EISENIA FETIDA*) EXPOSED TO LOW DOSAGE OF FLUORANTHENE IN SOIL

Zhang Wei^{1,3} Song Yufang^{1,2†} Sun Tieheng^{1,2} Li Xinxin² Liu Miao^{1,3} Chen Lang^{1,3}

(1 Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China)

(2 Key Laboratory of Environment Engineering, Shenyang University, Shenyang 110041, China)

(3 Graduated School, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract Biochemical responses of earthworm (*Eisenia fetida*) to fluoranthene were studied and cited as biomarkers for monitoring PAHs-contamination of sublethal concentration in the soil. Earthworms were exposed to soils contaminated with different concentrations of fluoranthene (60, 120, 240, 480, 960 $\mu\text{g kg}^{-1}$ and CK). After exposure for 1, 3, 7 and 14 days, earthworms were collected for analysis of contents of total cytochrome P450 and MDA and the activities of glutathione-S-transferase (GST), superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) in the guts. Results indicate that within the range of concentrations in the test, fluoranthene triggered varying responses from biochemical enzymes in the guts of the earthworms, particularly from P450 in content, and from SOD and POD in activity but not as significantly from GST, CAT and MDA. The research also revealed that the effect of duration of the exposure was stronger than that of dosage limited within the range of sublethal concentrations on the biochemical responses. As biochemical sensitivity to the pollutant varies from enzyme to enzyme, it is necessary to use a combined multi-time multi-index diagnostic method in diagnosing ecotoxicity of the pollutant in soil, with special stress on sensitivity and effectiveness of the indicators of exposure to the pollutant.

Key words Fluoranthene; Earthworm; Cytochrome P450; Glutathione-S-transferase; Antioxidant enzymes; Biomarker