

土壤中亚致死剂量毒死蜱对蚯蚓 抗氧化防御系统酶活性的影响*

周世萍¹ 段昌群² 刘守庆¹ 杨发忠¹

(1 西南山地森林资源保育与利用省部共建教育部重点实验室(西南林业大学),昆明 650224)

(2 云南大学环境科学与生态修复研究所暨云南生物资源保护与利用国家重点实验室培育基地,昆明 650091)

摘要 以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为供试生物,研究了暴露于含有亚致死剂量毒死蜱的人工土壤中 8 周时间内蚯蚓超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性的变化。结果表明,毒死蜱对蚯蚓 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性具有显著抑制。蚯蚓抗氧化防御系统酶对毒死蜱毒性具有一定的指示作用。除蚯蚓的 LC₅₀、产卵率、卵孵化率等常用的蚯蚓生态毒理学指标外,蚯蚓的 SOD、CAT、GSH-Px 抗氧化酶活性与实验农药的毒性效应应具有相关性,但各指标在对毒性的响应敏感性上存在差异,其中,SOD、GSH-Px 最为敏感,而 CAT 最不敏感。因此,在生态毒性诊断时,应选择不同指标作为一套指标体系相互补充,以增强污染诊断的灵敏性及长期诊断。

关键词 毒死蜱;蚯蚓;抗氧化酶;生物标记物

中图分类号 X53 **文献标识码** A

蚯蚓作为土壤生态系统中重要的生物类群,在维持土壤生态系统的功能中起着重要作用。可利用蚯蚓作为土壤环境的指示生物,评价污染物可能对环境的危害程度,从而对污染物可能导致的生态风险进行监测和管理。在此基础上发展起来的蚯蚓生物标志物研究已成为环境研究领域较受关注的研究热点之一。

目前,蚯蚓生物标志物的研究多集中在大剂量、短期、急性毒性效应研究上,对污染物小剂量的长期暴露毒性效应的研究较少,难以满足低剂量污染条件的土壤毒理长期诊断需求。抗氧化酶由于具有反映污染物早期影响的特点,是一类很有希望的敏感生态毒理生物标记物^[1]。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)等抗氧化酶作为生物标记物的可行性已经在不同生物体的研究中得到了证实^[1-3]。近年来已有蚯蚓体内抗氧化酶对污染物诱导响应的研究报告,这些研究大多采用滤纸接触法^[4-5]。虽然也有学者利用土壤接触法进行研究,但暴露时间均小于 30 d^[6-7]。目前这些研究多集中在金属、PAHs(茈、苯并茈)等,对蚯蚓抗氧化酶就农药污染尤其

是低剂量、长期慢性毒性的响应研究鲜见报道。

毒死蜱的化学名称为 O, O-二乙基-O-(3, 5, 6-三氯-2-吡啶基)硫代磷酸酯,为低毒有机磷农药,具有胃毒、触杀、熏蒸三重作用,对水稻、小麦、棉花、果树、蔬菜、茶树上多种咀嚼式和刺吸式害虫均具有较好防治效果。土壤具有较强的吸持毒死蜱农药能力,药效不受土壤温湿度及施肥的影响。毒死蜱在土壤中的持留受土壤类型、气候等条件的影响较大,半衰期通常为 60 ~ 120 d,已报道的半衰期从 2 周至一年不等^[8-9]。毒死蜱对土壤环境的污染具有普遍性和持久性的特点。近年来毒死蜱及系列产品的研究发现,毒死蜱对内分泌可能具有干扰效应,为环境激素(EDCs)类可疑农药。我们以往的研究也已发现毒死蜱对蚯蚓的急性毒性虽然较低,LC₅₀为 118.5 mg kg⁻¹,但对蚯蚓的慢性毒性危害较大。毒死蜱对蚯蚓的生长、生殖、行为等不同功能层次均产生了直接毒性效应^[10]。

因此,本文采用人工土壤接触法,将赤子爱胜蚓暴露于含有亚致死剂量毒死蜱的土壤中 8 周,监测其体内的 SOD、GST 和 CAT 酶活性的变化,旨在探讨土壤中亚致死剂量毒死蜱污染对蚯蚓体内上

* 云南省教育厅重点项目(08Z0028)、云南省自然科学基金项目(2009ZC078M)、西南林业大学大学重点项目(1110005)共同资助

作者简介:周世萍(1968—),女,云南昭通人,博士,教授,主要从事污染生态学研究。E-mail: kmzhoushiping@163.com

收稿日期:2013-04-11;收到修改稿日期:2013-06-30

述酶含量或活性的剂量及时间效应,寻找适合的生物标记物,为农药污染环境的长期诊断以及环境监测标准的制定提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

供试动物为蚯蚓 (*Eisenia fetida*),由天津贾立明养殖公司提供。选用三月龄以上、生殖带明显、体长 5~6 cm、体重 350~400 mg 的成熟蚯蚓。人工土壤的组成与配制方法参考 OECD 标准^[11],其组成成分为:石英砂 70%,高岭土 20%,苔藓草碳土 10%,以碳酸钙调节 pH 为 6.0 ± 0.5 。

1.2 土壤暴露实验

参照文献[12]方法,根据实验设计的处理浓度分别加入毒死蜱农药的丙酮溶液,充分混匀。毒死蜱的处理浓度为 5、10、40、60、80 mg kg⁻¹,以去离子水作对照处理,每个处理设 4 个重复。

将配制好的人工土壤分别装入 500 ml 培养瓶内,将实验前已在人工土壤中适应 24 h 的健康蚯蚓放入培养瓶,每个处理瓶内 10 条蚯蚓,以保鲜膜封口(预留换气孔)。每周在土壤表面添加 5 g 牛粪,并检查土壤湿度,使其保持最大持水量的 50%。为避免新生蚯蚓引起结果误差,每周定期将土壤中的卵茧剔除。记录培养期间每周的蚯蚓数量和体重变化,并测定蚯蚓的 GSH-Px、SOD、CAT 酶活性及蛋白质、MDA 含量。

1.3 生化测定

蚯蚓用清水浸泡,洗去泥沙污物等,放在滤纸

上吸干,加入等量 0.02 mol L⁻¹ 含有 0.5% 的 TritonX-100 的 pH 7.6 磷酸盐缓冲液冰浴匀浆。冰浴搅拌抽提 10 min,于 4℃ 6 000 r min⁻¹ 冷冻离心 20 min,取上清液,加入 2 倍体积预冷丙酮液,冷冻离心 30 min。收集沉淀,冷冻干燥制成蚯蚓丙酮粉。用时以 0.02 mol L⁻¹ 磷酸盐缓冲液 (pH 为 7.6) 溶解,配成约 1.5 mg ml⁻¹ 蛋白酶溶液。

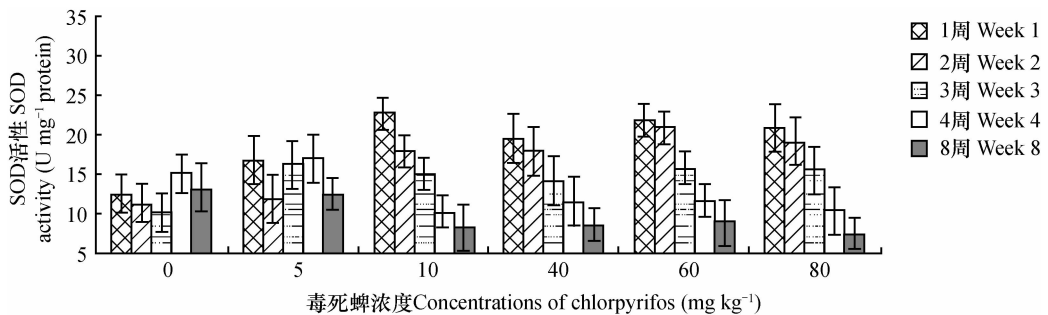
各酶活性或含量的测定均采用紫外-可见分光光度计。SOD 活性采用改进的抑制 NBT 光还原法^[13]进行测定。CAT、GSH-Px、MDA 测定参照文献[14]。蛋白含量的测定均采用考马斯亮蓝法,以牛血清蛋白为标准蛋白。

1.4 数据分析

SOD、CAT、GSH-Px、MDA 在数据分析时采用 ANOVA 和 LSD 的分析方法,比较在各采样时间点上处理组和对照组的测定量的差异性,当 $p < 0.05$ 时认为差异显著。所有的统计分析采用 SPSS 处理。

2 结果

毒死蜱浓度对蚯蚓的 SOD 活性的影响见图 1。如图 1 所示,毒死蜱处理组中蚯蚓的 SOD 活性在实验开始 1~3 周较对照组有所上升,基本呈上升趋势,但随着实验时间的延长,蚯蚓的 SOD 活性受到抑制,SOD 活力下降,实验后期 4~8 周,除最低处理剂量 5 mg kg⁻¹ 组,其余剂量组的 SOD 均低于对照。



注: 图中误差线为标准误。下同 Note: Error bars stand for standard errors. The same below

图 1 毒死蜱对蚯蚓的 SOD 活性影响

Fig. 1 Effects of exposure to chlorpyrifos on SOD activity in earthworms

图 2 实验结果可见,毒死蜱处理组中蚯蚓的 CAT 活性在第 1 周均高于对照组,表明毒死蜱对蚯蚓的 CAT 活性短期表现为激活影响。但随着实验

时间的延长,实验 2 周时这种激活影响已不明显,实验 3 周至实验结束,CAT 活性基本呈下降趋势,且毒死蜱的处理剂量越高 CAT 活性抑制越显著。

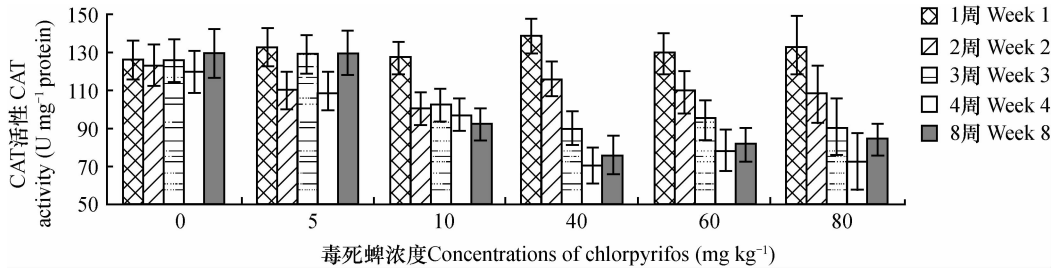


图2 毒死蜱对蚯蚓的CAT活性影响

Fig. 2 Effects of exposure to chlorpyrifos on CAT activity in earthworms

毒死蜱对蚯蚓 GSH-Px 活性的实验结果见图 3。毒死蜱处理组中蚯蚓的 GSH-Px 活性在第 1 周时, 低剂量组的 GSH-Px 活性表现为激活影响, 但高剂

量组 60、80 mg kg⁻¹ 组的 GSH-Px 活性被抑制, 显著低于对照组, 实验后期, 蚯蚓的 GSH-Px 活性基本呈下降趋势。

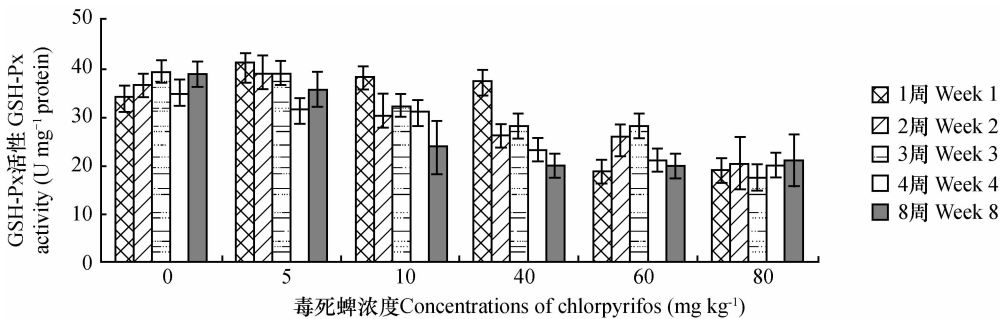


图3 毒死蜱对蚯蚓的GSH-Px影响

Fig. 3 Effects of exposure to chlorpyrifos on GSH-Px activity in earthworms

毒死蜱对蚯蚓 MDA 的实验结果见图 4。对照组中蚯蚓的 MDA 含量在整个实验期间基本稳定,

无显著变化, 但毒死蜱处理组中毒死蜱处理剂量越高、处理时间越长, 蚯蚓的 MDA 含量越高。

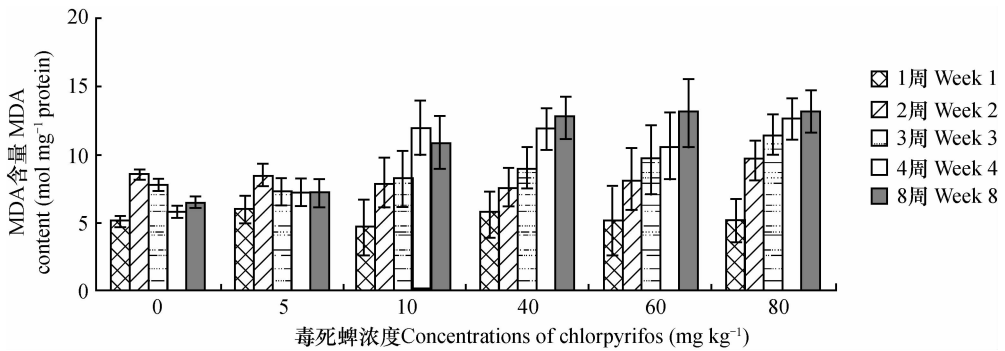


图4 毒死蜱对蚯蚓的MDA影响

Fig. 4 Effects of exposure to chlorpyrifos on MDA in earthworms

3 讨论

3.1 毒死蜱对蚯蚓的毒性效应

毒死蜱分子由亲电子性磷原子和带有正电荷的部分组成, 其致毒机制通常认为是由于正电荷部分与胆碱酯酶的氨基酸的侧链结合, 亲电子性磷原

子与活性中心酯解部分(丝氨酸残基的羧基)结合, 形成磷酸化胆碱酯酶, 使乙酰胆碱酯酶失去分解乙酰胆碱的作用, 引发一系列的神经系统中毒^[15]。但本研究发现毒死蜱对蚯蚓的 SOD、CAT、GSH-Px 均有不同程度的影响, 其作用时间越长、染毒剂量越大, 对蚯蚓 SOD、CAT、GSH-Px 的活性抑制越严重, 这表明毒死蜱对蚯蚓的毒性除了与神经毒性有关

外,还与对蚯蚓的脂质过氧化作用密切相关。

本研究的结果表明,毒死蜱对蚯蚓的抗氧化酶主要表现为抑制作用。与对照组比较,在实验至 8 周时,除最低处理剂量 5mg kg^{-1} 组,其余剂量组处理的蚯蚓 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性与对照组均出现显著抑制,这种抑制作用引发了蚯蚓的脂质过氧化。

在活性氧产生、转化的过程中,CAT、GSH-Px 能去除过氧化氢 H_2O_2 ; 而 SOD 能消除超氧阴离子 O_2^- 。CAT、GSH-Px 及 SOD 通过清除 H_2O_2 和 O_2^- 减轻和阻断了脂质过氧化反应的引发作用。当这些抗氧化防御酶的活性受到抑制时,会导致氧自由基不能及时清除,造成活性氧的积累,引发膜的脂质过氧化,导致细胞损伤,降低生物的适应能力和健康水平,从而导致中毒反应。

MDA 是自由基对生物细胞膜损伤的主要代谢产物,MDA 的含量可反映机体内脂质过氧化的程度,其含量越高,过氧化损伤越严重。与对照比较,处理组中蚯蚓的 MDA 含量均显著上升,与 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性下降呈负相关。毒死蜱对蚯蚓的 CAT、GSH-Px 及 SOD 的抑制及 MDA 的变化均表明蚯蚓防御过氧化酶系统受到了损伤,这可能是毒死蜱中毒造成蚯蚓机体器官功能受损的早期机制之一。

3.2 蚯蚓生物标志物的指示性

不同蚯蚓生物标志物对毒死蜱毒性指示的最小观测剂量见表 1。如表所示,蚯蚓不同层次的生物学属性变化可以不同程度地反映蚯蚓对实验农药的生态毒理效应影响。从各指标的响应敏感性来说,SOD、GSH-Px 最为敏感,而 CAT 最不敏感。但这些指标的响应时间均优于 LC_{50} 、产卵量、孵化量等常用指标。如孵化量指标需要 56 d 后才能检出,体重、产卵量指标异常变化的检出时间为 28 d,而 SOD、GSH-Px 的异常变化 7 d 后即可检出。与 LC_{50} 、产卵量、孵化量等常用的生态毒理学指标相比,蚯蚓 SOD、GSH-Px 抗氧化系统酶指标不仅具有灵敏、快速的特点,而且对实验农药的毒性机理及可能产生的生态后果具有一定的相关性。

Guptha 等^[16]对 39 日龄雌性小鼠囊状卵泡体外培养研究发现,甲氧滴滴涕可以抑制卵泡生长,诱发闭锁,并且能降低 SOD、GSH-Px、CAT mRNA 的表达,提示甲氧滴滴涕通过氧化应激导致卵泡生长缓慢、增加卵泡闭锁,推测氧化损伤可能是甲氧滴滴涕生殖毒性的作用机制之一。我们以往的研究也表明,小剂量的毒死蜱长期作用对蚯蚓的慢性毒性尤其是生殖毒性影响较大。实验至 8 周时,剂量为

20 mg kg^{-1} 的毒死蜱对蚯蚓的体重有显著的抑制,而毒死蜱处理剂量达到 5 mg kg^{-1} 即可对蚯蚓的产卵率、卵孵化率有显著毒性抑制^[10]。毒死蜱对蚯蚓的生殖毒性与 SOD、GSH-Px、CAT 的表达降低存在一定的相关性。虽然毒死蜱对蚯蚓生殖毒性的机理尚未查明,但二者之间的相关性对实验农药的生殖毒性具有一定的指示性。

表 1 蚯蚓不同实验指标对毒死蜱毒性的响应

Table 1 Summary of concentrations of pesticides causing adverse impacts on endpoints in *Eisenia fetida* Andrei

实验指标 Endpoints	响应时间 Time of response (d)	最小响应 剂量 Minimum response dose (mg kg^{-1})
$\text{LC}_{50}^{[10]}$	14	118.5
体重 Growth ^[10]	28	80
产卵量 Cocoon production ^[10]	28	20
孵化量 Maturity percentage ^[10]	56	20
SOD	7	10
CAT	14	60
GSH-Px	7	10

4 结 论

毒死蜱对蚯蚓 SOD、CAT、GSH-Px 酶活性具有显著抑制,其作用时间越长、染毒剂量越大,对蚯蚓 SOD、CAT、GSH-Px 的活性抑制越严重,表明毒死蜱对蚯蚓的毒性除与神经毒性有关外,还与对蚯蚓的脂质过氧化作用密切相关。此外,蚯蚓的抗氧化防御系统酶对毒死蜱毒性具有一定的指示作用。除蚯蚓的 LC_{50} 、产卵率、卵孵化率等常用的蚯蚓生态毒理学指标外,蚯蚓 SOD、CAT、GSH-Px 抗氧化酶活性与实验农药的毒性效应具有相关性,但各指标在对毒性的响应敏感性上存在差异,其中,SOD、GSH-Px 最为敏感,而 CAT 最不敏感。因此,在生态毒性诊断时,应选择不同指标作为一套指标体系相互补充,以增强污染诊断的灵敏性及长期诊断。

参 考 文 献

- [1] Brown P J, Long S M, Spurgeon D J, et al. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Lumbricus rubellus* to pyrene, a noncarcinogenic polycyclic aromatic hydrocarbon. *Chemosphere*, 2004, 57: 1675—1681
- [2] 冯涛, 郑微云, 洪万树, 等. 苯并(a) 芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化

- 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 Journal of Applied Ecology, 2001, 12(3): 422—424
- [3] 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 soiyu* (In Chinese). Marine Sciences, 2004, 28(3): 40—43
- [4] 王磊, 宋玉芳, 张薇, 等. 蚯蚓(*Eisenia fetida*) 细胞色素 P450 及抗氧化酶系对环境浓度苯并(a)芘的响应. 农业环境科学学报, 2009, 28(2): 337—342. Wang L, Song Y F, Zhang W, et al. Influence of Benzo (a) Pyrene on Cytochrome P450 and Antioxidant Enzymes in Earthworms (*Eisenia fetida*) (In Chinese). Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(2): 337—342
- [5] 卜元卿, 骆永明, 滕应, 等. 铜暴露对赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*) 抗氧化酶活力的影响. 环境化学, 2007, 26(5): 93—97. Bu Y Q, Luo Y M, Teng Y, et al. Effect of copper on antioxidant enzyme activities of earthworms (*Eisenia fetida*) (In Chinese). Environmental Chemistry, 2007, 26(5): 93—97
- [6] 卜元卿, 骆永明, 单正军, 等. 类二噁英多氯联苯对赤子爱胜蚓生理活性的影响. 中国环境科学, 2010, 30(5): 699—704. Bu Y Q, Luo Y M, Shan Z J, et al. Effect of dioxin-like PCBs on physiological activities of earthworms (*Eisenia fetida*) (In Chinese). China Environmental Science, 2010, 30(5): 699—704
- [7] 范学铭, 史小航, 王哲娟, 等. 玉迪安对蚯蚓 3 种抗氧化酶活性的影响. 中国农学通报, 2010, 26(13): 319—323. Fan X M, Shi X H, Wang Z J, et al. Effect of dean on *Eisenia foetida* three antioxidant enzymes activities (In Chinese). Chinese Agricultural Science Bulletin, 2010, 26(13): 319—323
- [8] Cox C. Insecticide fact sheet. Chlorpyrifos, Part 2: Human exposure. Journal of Pesticide Reform, 1995, 15: 14—20
- [9] Racke K D. Environmental fate of Chlorpyrifos. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 1993, 131: 1—151
- [10] Zhou S P, Duan C Q, Fu H, et al. Toxicity assessment for chlorpyrifos-contaminated soil with different earthworm test methods. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19(7): 854—858
- [11] OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). Test 207: Earthworm, acute toxicity tests//OECD Guidelines for the Testing of Chemical. OECD Publishing, 1984
- [12] Khalil M A, Abdellateif H M, Bayoumi B M, et al. Effects of metals and metal mixtures on survival and cocoon production of the earthworm *Aporre-ctodea caliginosa*. Pedobiologia, 1996, 40(6): 548—556
- [13] Luo Y, Zang Y, Zhong Y A, et al. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia foetida*. Chemosphere, 1999, 39(13): 2347—2356
- [14] Saint Denis M, Labrot R, Narbonne J R, et al. Glutathione, glutathione-related enzymes, and catalase activities in the earthworm *Eisenia fetida* andrei. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1998, 35(4): 602—614
- [15] Andrea C G. Environmental toxicant effects on neuroendocrine function. Endocrine, 2001, 14(2): 235—246
- [16] Gupta R K, Miller K P, Babus J K, et al. Methoxychlor inhibits growth and induces atresia of antral follicles through an oxidative stress pathway. Toxicological Sciences, 2006, 93(2): 382—389

EFFECT OF CHLORPYRIFOS OF A SUBLETHAL DOSE ON ENZYME ACTIVITY OF THE ANTIOXIDANT DEFENSE SYSTEM OF EARTHWORMS

Zhou Shiping¹ Duan Changqun² Liu Shouqing¹ Yang Fazhong¹

(¹ Key Laboratory for Forest Resources Conservation and Use in the Southwest Mountains of China (Southwest Forestry University), Ministry of Education, Kunming 650224, China)

(² Laboratory for Conservation and Utilization of Bio-Resource & School of Life Science, Yunnan University, Kunming 650091, China)

Abstract Earthworms (*Eisenia fetida*) as subject in the test are exposed to chlorpyrifos of a sub-lethal dose for 8 weeks in artificial soil. Effects of the exposure on SOD, CAT, and GSH-Px activities in earthworms were observed. Results show that the compound suppressed the activities significantly. So the enzymes of the anti-oxidizing defense system of earthworms can be cited as indicators of chlorpyrifos toxicity. Besides the commonly used ecological toxicity indexes, such as LC₅₀, oviposition rate and hatching rate, the activities of the antioxidant enzymes, were closely related to the toxic effect of the pesticide. However, the enzymes varied in sensitivity to the chemical. SOD and GSH-Px were more sensitive than CAT. Therefore, in diagnosing ecological toxicity, it is advisable to have different indices form a mutually supplementary indicator system to improve the sensitivity and efficiency of pollution identification and long term diagnosis.

Key words Chlorpyrifos; Earthworm; Antioxidase; Biomarker

(责任编辑: 卢 萍)