

硝基芳烃对鲤鱼肝 EROD 活性影响的体外研究

王咏^{1,2}, 王春霞¹, 王子健¹, 徐镜波² (1. 中国科学院生态环境研究中心环境水化学国家重点实验室, 北京 100085; 2. 东北师范大学环境科学系, 长春 130024)

摘要:在体外实验条件下,研究了 9 种硝基芳烃化合物对鲤鱼肝脏 7-乙氧基异吩唑酮-脱乙基酶(EROD)的影响。结果表明,9 种硝基芳烃化合物对 EROD 均有激活作用,在实验浓度范围内,EROD 活性与浓度之间存在剂量-效应关系。实验发现苯环上同一位置的取代基不同或同一取代基在苯环上的位置不同,对 EROD 的激活程度的影响也不同。

关键词:硝基芳烃;EROD;鲤鱼肝;环境毒理学

中图分类号:X174 文献标识码:A 文章编号:0250-3301(2001)04-03-0120

EROD Induction in Liver Microsome of Carp (*Cyprinus carpio*) by Nitroaromatic Hydrocarbons *in Vitro*

Wang Yong^{1,2}, Wang Chunxia¹, Wang Zijian¹, Xu Jingbo² (1. SKLEAC, Research Center for Eco Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085; 2. Department of Environment Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

Abstract: Nine nitroaromatic hydrocarbons (NAHs) induction of EROD activity was investigated by an *in vitro* assay based on carp (*Cyprinus carpio*) hepatic microsome system. All nine NAHs tested were found to induce the activity of EROD. There was dose-effect relationship between EROD activity and concentrations of NAHs. It was found that EROD activity was different, when different groups substituted at the same position of benzene ring, or the same group was at different position of benzene ring.

Key words: nitroaromatic hydrocarbon; EROD; liver of carp; environmental toxicology

硝基芳烃化合物是一类重要的环境难降解污染物,在江水中的检出率很高^[1]。其中硝基苯、2,4-二硝基甲苯及 2,6-二硝基甲苯等对水生生物具有很强的急性毒性,同时对鲤鱼肝脏过氧化氢酶(CA)和腺苷三磷酸酶(ATPase)均有影响^[2]。混合功能氧化酶(MFOs)是位于细胞内质网上的多酶系统。大多数外来化合物进入生物体后,首先要经过肝 MFOs 代谢。因此,生物代谢酶活性的变化是一种能反应环境物理和化学变化的生物标记物,它可以对环境的变化提供早期预报。EROD 属 MFOs 中的 P4501A 族,是第一阶段代谢酶。作为分子结构平面性很强的有机污染物(如多氯联苯)敏感的生物标记(biomarker),EROD 已经被用于生态影响评价中^[3]。国外有关工作主要集中在体内 EROD 活性测试,而体外实验的多采用细胞培养技术。硝基芳烃类污染物对 EROD 活性的影响,以及利用 EROD 体外毒性测试研究硝基芳烃类污染物的构效关系的工作

尚未见报道。

本实验运用体外直接处理的方法,研究 9 种硝基芳烃化合物对鲤鱼肝细胞 EROD 的激活作用,并比较分析了 9 种化合物对 EROD 活性的影响。

1 实验部分

1.1 仪器与试剂

化学试剂:邻二硝基苯(σ -DNB)、间二硝基苯(m -DNB)、对二硝基苯(p -DNB)、邻硝基氯苯(σ -NCB)、间硝基氯苯(m -NCB)、对硝基氯苯(p -DNB)、2,4-二硝基甲苯(2,4-DNT)、2,6-二硝基甲苯(2,6-DNT)、对硝基

基金项目:国家自然科学基金项目(20037010);中国科学院项目(KZCX2-410)。

作者简介:王咏(1974~),女,东北师范大学,硕士,主要从事环境毒理学方面的研究。

收稿日期:2000-12-15

甲苯(p -NT),均购自英国 Lancaster 公司,纯度不小于 98%。试卤灵(resorufin)、乙氧基试卤灵(ethoxyresorufin)、败坏翘摇素(dicumarol)、DMSO、HEPES、NADPH、Tris、牛血清白蛋白(BSA),均购自 Sigma 公司,纯度不小于 99%。 $MgSO_4$ 、KCl、 KH_2PO_4 、 Na_2HPO_4 、蔗糖,均购自北京市化工厂。

仪器:RF-520 荧光分光光度计(Shimadzu)、UV-120-02 分光光度计(Shimadzu)、TCL-16C 台式离心机(上海安亭科学仪器厂)、J2-HS 离心机(Beckman 公司,美国)。

1.2 试验动物

实验所用动物为鲤鱼,来自北京小汤山养鱼场,雄性,平均体重为 0.75kg。

1.3 鲤鱼肝去线粒体上清液的制备

所需全部溶液预冷至 0℃,用颈脱白的方法处死动物,取肝,用 0.15 mol/L KCl 溶液洗去血液,用滤纸吸干,称重。将肝放入 0.25 mol/L 蔗糖-50 mmol/L (pH 7.4, 约 4ml 缓冲液/g 肝湿重) 缓冲溶液中,用组织研磨器匀浆,在 4℃,13500r/min 离心 20min,取出上清液,在液氮中保存待用。

1.4 处理

将硝基苯、邻二硝基苯、间二硝基苯、对二硝基苯、邻硝基氯苯、间硝基氯苯、对硝基氯苯、2,4-二硝基甲苯、2,6-二硝基甲苯、对硝基甲苯分别溶于 DMSO 中,按实验所需浓度分别取 10 μ l 与 80 μ l 肝微粒体、1000 μ l HEPES 缓冲液(0.1 mol/L, pH 7.8)在试管中混匀,并在 20℃下孵育 15 min^[4]。

1.5 EROD 酶活性的测定

EROD 酶活性的测定采用 Paster 等^[5]的荧光测定法略加改动。

先将所需反应液 30℃下预热,反应液包括 20 μ l $MgSO_4$ (154 mg/ml)、80 μ l BSA(12 mg/ml)、10 μ l 败坏翘摇素(1 mmol/L)、3 min 后,把反应液移入盛有染毒后微粒体的试管中,然后向空白实验试管加入 2.5 ml 甲醇,并向每个试管加入 50 μ l 乙氧基试卤灵(10 mmol/L)、30 μ l NADPH(10 mg/L),再放在 30℃水浴中进行反应。10 min 后,迅速将试管移至冰浴,向对照和实验试管中分别加入 2.5 ml 甲醇,以终止反应。然后将所有反应液在 5000r/min 室温离心 15 min,吸取上清液,用荧光分光光度计测定荧光值(激发波长 565 nm、发射波长 584 nm),重复 3 次。经实验得出,所选 9 种化合物在此波长范围内无荧光值。

1.6 蛋白质的测定

蛋白质含量测定采用 Bradford 法^[6]。

2 结果与讨论

图 1~3 为所选 9 种硝基芳烃衍生物对鲤鱼肝微粒体 EROD 的影响,可以看到,9 种化合物对 EROD 均有激活作用。在低浓度时,对 EROD 的激活程度随着化合物浓度的升高而增加,当 EROD 的活性增大到一定程度时,9 种化合物对 EROD 的作用不再增加。

图 1 可以看出,对 EROD 的激活值最大的是对硝基氯苯,其次为邻硝基氯苯,再次为间硝基氯苯。这可能是由于与卤素相连的苯环碳的静电荷值(Q_c')的不同所致。邻、间、对硝基苯的 Q_c' 值分别为 0.137、0.129、0.146^[1],其顺序与本实验所得结果相吻合。 Q_c' 值高,表明此处的碳原子极缺电子,易受亲核试剂的进攻。

图 2 中,二硝基苯的激活效应顺序为:邻二硝基苯 > 对二硝基苯 > 间二硝基苯。邻、间、对二硝基苯的最低空轨道能分别为 -1.502、-0.170、-0.348^[1],说明这 3 种化合物对鱼体酶的影响与毒物分子和酶分子间的电子效应相互作用密切相关。化合物的最低空轨道能越小,诱导作用越强^[7]。

在图 3 中,不同取代位置的硝基甲苯,激活顺序为 2,6-二硝基甲苯 > 2,4-二硝基甲苯 > 对硝基甲苯。硝基芳烃衍生物的生物毒性大小主要取决于苯环上硝基的数目、位置及其它取代基的作用^[1]。这与本实验所得二硝基甲苯的诱导作用大于一硝基甲苯的结果一致。

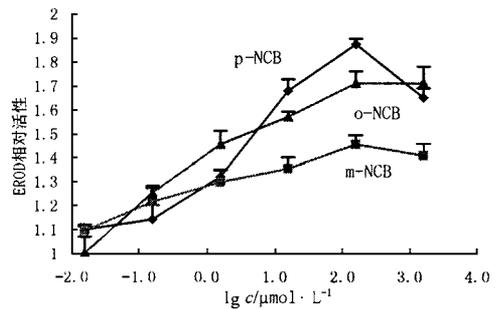


图 1 3 种硝基氯苯对 EROD 的影响

Fig. 1 EROD induction by three NCBs

由表 1 可以看出含有硝基的芳烃,不同取代基对 EROD 的激活程度不同,当取代基在邻位和间位时,硝基的激活作用大于氯基;当取代基在对位时,氯基的激活作用大于硝基。当取代硝基苯上取代基为氯或硝基时,邻位和对位取代的激活作用大于间位。

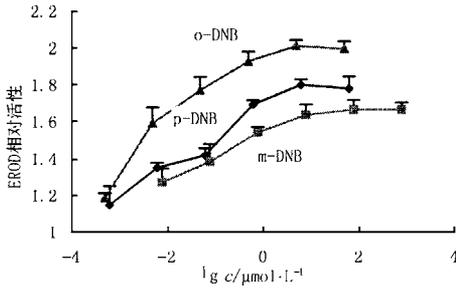


图 2 3 种二硝基苯对 EROD 的影响

Fig.2 EROD induction by three DNBs

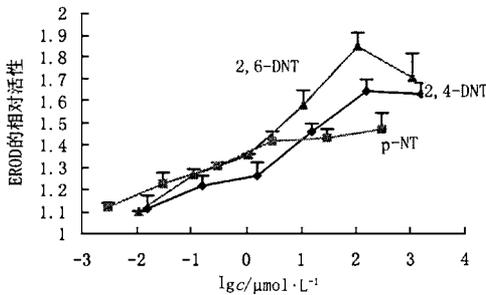


图 3 3 种硝基甲苯对 EROD 的影响

Fig. 3 EROD induction by three NTs

表 1 9 种硝基芳烃对 EROD 活性的影响比较

Table 1 The toxicity values of 9 nitroaromatic hydrocarbons

化合物	对 EROD 最大倍数	激活率 / %
σ NCB	1.71 ± 0.05	(171 ± 5)
p NCB	1.87 ± 0.02	(187 ± 2)
m NCB	1.46 ± 0.04	(146 ± 4)
σ DNB	2.01 ± 0.03	(201 ± 3)
p DNB	1.80 ± 0.03	(180 ± 3)
m DNB	1.67 ± 0.05	(167 ± 5)
2,4-DNT	1.65 ± 0.05	(165 ± 5)
2,6-DNT	1.85 ± 0.06	(185 ± 6)
p NT	1.47 ± 0.08	(147 ± 8)

3 结论

(1) 实验发现取代硝基苯上不同取代基对 EROD 的诱导程度不同,当取代基在邻位和间位时,硝基的作用大于氨基;当取代基在对位时,氨基的作用大于硝基.当取代硝基苯上取代基为氯或硝基时,邻位和对位取代的作用大于间位.

(2) 9 种化合物对 EROD 均有诱导作用.在低浓度时,对 EROD 的诱导随着化合物浓度的升高而增加,当 EROD 的活性增大到一定程度时,除对硝基氯苯和 2,6-二硝基甲苯随浓度的再增加使 EROD 的活性有所下降外,其余 7 种化合物均使 EROD 的活性保持在一定的水平上.

参考文献:

- 朗佩珍等. 松花江中有机物的变化及毒性. 吉林:吉林科学技术出版社,1998.141 ~ 189.
- 徐镜波等. 硝基芳烃对鲤鱼鱼鳃 ATPase 活性抑制和 QSARs. 中国环境科学,1998,18(4):158 ~ 161.
- Marshall Adams S, Bevelhimer Mark S, Mark Stephen Greeley, Levine Daniel A, Teh Swee J. Ecological Risk Assessment in a Large River Reservoir: 6. Bioindicators of fish Population health. Environmental toxicology and chemistry. 1999,18(4):628 ~ 640.
- Aldo Viarengo, Elisa Bettella, Rita Fabbri, Bruno Burlando, Marc Lafaurie. Heavy Metal Inhibition of EROD Activity in Liver Microsomes from the Bass *Dicentrarchus labrax* Exposed to Heavy Metal Effects. Marine Environment Research, 1997, 44(1):1 ~ 11.
- Paster shank G M, Kiparissis Y, Metcalfe C D. Induction of Hepatic Ethoxyresorufin O deethylase (EROD) in Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) Exposed to 3', 3,4,4'-Tetrachlorodiphenyl Ether by Intraperitoneal Injection or Gavage Intubation. Chemosphere, 1999,38(13):3051 ~ 3060.
- Bradford M M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein - dye Binding. Anal. biochem., 1976, 72:248 ~ 254.
- Hall L H, Kier L B. Structure Activity Relationship Studies on the Toxicity of Benzene Derivatives: II. Environ. Toxicol. Chem., 1986,5:333 ~ 337.