

2,4-二氯苯酚诱导鲫鱼肝脏自由基的产生和脂质过氧化

罗义^{1,2}, 施华宏¹, 王晓蓉^{1*}, 纪靓靓²

(1. 南京大学环境学院 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 辽宁大学环境科学系, 沈阳 110036)

摘要:以 α -苯基- N -叔丁基甲亚胺- N -氧化物(α -phenyl- N -tert-butyl nitron, PBN)为自旋捕获剂,利用电子顺磁共振(electron paramagnetic resonance, EPR)研究了 2,4-二氯苯酚(2,4-dichlorophenol, 2,4-DCP)腹腔注射 24h 后,引起鲫鱼(*Carassius auratus*)幼体肝脏内自由基含量变化.结果表明,不同剂量 2,4-DCP(0.025, 0.05, 0.5, 5, 25 mg/kg)腹腔注射 24h 后可引起鲫鱼肝脏内自由基信号明显增强,与对照组相比具有显著性差异($p < 0.05$).自由基的产生与 2,4-DCP 注射剂量呈较好的剂量-效应关系,回归方程为: $y = 1189 \ln(x) + 9220$, $r^2 = 0.9856$.EPR 波谱的 3 组双重峰分裂谱线为典型的 PBN 捕获羟自由基形成 PBN/ $\cdot$ OH 的 EPR 波谱,经谱图解析表明,PBN 捕获自由基形成加合物的超精细分裂常数 $a_N = 13.7$ Gauss, $a_H = 1.8$ Gauss, g 因子为 2.0058.与文献报道的 PBN 捕获羟自由基的特征参数一致.研究发现,2,4-DCP 腹腔注射引起鲫鱼肝脏丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量明显增加,与对照组相比有显著性差异($p < 0.05$),并对 2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏自由基的产生与脂质过氧化的机理进行了探讨.

关键词:自由基; 2,4-二氯苯酚; 鲫鱼; 剂量-效应关系; 脂质过氧化

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)03-0029-04

Free Radical Generation and Lipid Peroxidation Induced by 2,4-Dichlorophenol in Liver of *Carassius auratus*

LUO Yi^{1,2}, SHI Hua-hong¹, WANG Xiao-rong¹, JI Liang-liang²

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Department of Environmental Science, Liaoning University, Shenyang 110036, China)

Abstract:Free radical generation in liver of larval fish (*Carassius auratus*) after 2,4-dichlorophenol (2,4-DCP) injected intraperitoneally 24h was studied with electron paramagnetic resonance (EPR) spin trapping technique and α -phenyl- N -tert-butyl nitron (PBN) as spin trap reagent. The results show that there is a significant increase of free radical generation in the liver of the fish treated with 2,4-DCP (0.025, 0.05, 0.5, 5, 25 mg/kg) compared with that of the control ($p < 0.05$). The free radical generation correlates well with the dose of 2,4-DCP administered. The regress equation for dose-effect relation is $y = 1189 \ln(x) + 9220$, $r^2 = 0.9856$. The six-line composed of three groups with two hyperfine splitting peaks in each shows a typical PBN/ $\cdot$ OH EPR spectrum. The hyperfine splitting constants for the PBN-adducts is $a_N = 13.7$ Gauss, $a_H = 1.8$ Gauss, g factor is 2.0058, which is consistent with the characteristics of PBN-hydroxyl radical adduct reported from the literature. Results also show that there is a significant increase for malondialdehyde (MDA) content in the treated groups compared with that of the control ($p < 0.05$). The mechanisms of free radical generation and lipid peroxidation induced by 2,4-DCP are discussed in this study.

Key words: free radical; 2,4-dichlorophenol; *Carassius auratus*; dose-effect relation; lipid peroxidation

2,4-Dichlorophenol(2,4-DCP)是水生生态系统中含量最为丰富的氯代苯酚类化合物^[1],被我国列入“中国环境优先控制污染物黑名单”中的重要污染物之一.目前,对 2,4-DCP 的研究少有报道^[2].张景飞等^[3]研究了低浓度 2,4-DCP 对鲫鱼肝脏抗氧化防御系统的影响,结果表明鲫鱼肝脏抗氧化系统在酶学水平上反映了污染物对鱼体肝脏细胞的早期损伤.为了更好地揭示 2,4-DCP 诱导生物体产生氧化应激从而导致氧化损伤以及对生物体在分子水平上的微观致毒机理,本研究采用电子顺磁共振自旋捕获技术,以 α -苯基- N -叔丁基甲亚胺- N -氧化物

(α -phenyl- N -tert-butyl nitron, PBN)为自旋捕获剂研究了不同剂量的 2,4-DCP 对淡水种类鲫鱼(*Carassius auratus*)的幼体腹腔注射 24h 后,在鱼肝内引发自由基以及脂质过氧化情况,以期探讨环境中广泛存在的污染物质 2,4-DCP 诱导鲫鱼(*Carassius auratus*)产生氧化应激以及造成氧化损

收稿日期: 2004-09-12; 修订日期: 2004-12-03

基金项目: 国家重点基础研究发展规划(973)项目(2003CB415002), 国家自然科学基金资助项目(20237010)

作者简介: 罗义(1971~), 辽宁抚顺人, 博士生, 副教授, 研究方向为环境毒理学; E-mail: yiluo@lnu.edu.cn

* 通讯联系人

伤的分子机理。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器: Bruker EMX 10/12 型 EPR 谱仪(德国 Bruker 公司); 岛津 UV-220 型分光光度计; J2-HS 高速冷冻离心机(Beckman 公司)。

所用试剂均采用分析纯试剂, 其中 2,4-DCP (A.R) 购自上海试剂一厂, PBN 为 Sigma 公司产品, 2-硫代巴比妥酸(2-thiobarbituric acid, TBA) 购自 Sigma 公司。

1.2 实验浓度设置

将 2,4-DCP(分析纯, 上海试剂一厂) 溶于植物油, 按 0.0005, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5 mg/mL 浓度配置成不同浓度 2,4-DCP 的油溶液。

1.3 实验材料及染毒条件

实验对象为鲫鱼幼体, 购自南京市花鸟市场, 平均体长为(10.9 ± 0.19) cm 左右, 平均体重为(20.4 ± 0.33) g。鲫鱼幼体买来后, 先在曝气自来水中驯养 7 d, 然后随机分出 6 组, 每组 6 条鱼, 放入玻璃缸(实验前用稀硝酸浸泡 2 d) 中, 水温 25 °C, pH 7.0, 硬度约为 100 mg·L⁻¹。驯养及实验期间幼鱼生长无异常。

将 2,4-DCP 按上述配好的浓度梯度以每条鱼 1 mL 的容量经腹腔注入各组鱼体内(共 6 组), 设 5 个实验组和一个未注射 2,4-DCP 的空白对照组, 不同组鱼体内 2,4-DCP 的最终注射剂量为 0.025 mg/kg, 0.05 mg/kg, 0.5 mg/kg, 5 mg/kg, 25 mg/kg, 空白对照组除未注射 2,4-DCP 外, 其余实验条件均与各实验组相同。

1.4 取样和样品预处理

粗酶液的制备: 鲫鱼腹腔注射 2,4-DCP, 染毒 24 h 后, 将鲫鱼活体解剖, 取出肝脏, 在冰浴条件下用生理盐水清洗, 去除血液、结缔组织和脂肪组织, 迅速称取肝脏适量置于冰浴中, 按 1 g: 10 mL(肝脏质量/缓冲液体积) 的比例加入预冷的 Tris-HCl 缓冲液(0.01 mol/L Tris, 0.25 mol/L 蔗糖, 0.1 mmol/L EDTA, pH 7.5), 在 Teflon 玻璃匀浆器中匀浆, 然后将匀浆液置于 -80 °C 冰箱内保存。

1.5 脂质过氧化产物(malondialdehyde, MDA)测定

采用 TBA 比色法, 用向荣^[4]的改良方法, 略作修改: 取组织匀浆液 200 μL, 按如下顺序依次加入 8.1% SDS 0.2 mL, 20% 醋酸缓冲液(pH 3.5) 1.5 mL, 1% TBA 1.5 mL, 蒸馏水 1 mL。将上述反应

液于 90 °C 水浴 60 min, 冷却后, 3000 r/min 离心 15 min, 取上清液在 532 nm 处测 OD 值, 脂质过氧化产物 MDA 以每 mg 蛋白中含 TBARS 的量即 nmol·mL⁻¹ 表示, 克分子消光系数 $\epsilon = 1.56 \times 10^5 / (\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{cm})$ ^[5]。

1.6 总蛋白测定

蛋白质含量用 Bradford 方法测定, 以牛血清白蛋白(BSA)为标准蛋白^[6]。

1.7 自由基的 PBN 自旋捕获与 EPR 测定

将鱼活体解剖, 取出肝脏, 用冰冷的生理盐水冲洗, 迅速称量 0.1 g 肝脏置于玻璃匀浆器内, 加入 1 mL 环己烷为溶剂配制的浓度为 50 mmol/L 的 PBN 溶液(加入过程中, 避免水分进入, 影响 EPR 波谱信号), 冰浴条件下匀浆后, 静置 3 ~ 5 min, 待组织匀浆液出现有机相与水相的 2 相分层后, 取上层液 400 μL 注入直径为 3 mm 石英管中, 迅速放入液氮中保存, 准备进行 EPR 测定。样品在液氮中最多可保存 4 h, 整个过程应避免水分沾入。EPR 测定使用 Bruker 公司的 EMX 10/12 型电子顺磁共振仪。

EPR 操作参数: 测试温度(TE) 130 K, 微波功率(SP) 20 mW, 微波频率(SF) 9.751 GHz, 调制频率(MF) 100 KHz, 调制幅度(MA) 0.5 G, 中心磁场(CF) 3470 G, 扫场时间(TI) 84 s, 时间常数(TC) 41 ms, 扫场宽度(SW) 200 G, 信号为 5 次叠加。

1.8 统计分析

实验结果表示为平均数 + 标准误差(Mean ± S. D. E), 使用 Origin 7.0 统计软件 Two sample t test 将实验组与空白对照组间数据进行差异显著性分析, $p < 0.05$ 表明差异显著, $p < 0.01$ 表明差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 2,4-DCP 引起鲫鱼肝脏自由基信号的变化

图 1 为 2,4-DCP 腹腔注射 24 h 后鲫鱼肝脏内自由基信号变化的 EPR 波谱。未加入鲫鱼肝脏样品的 PBN 基线没有自由基信号产生, 未以 2,4-DCP 染毒的对照组产生 PBN 捕获微弱的自由基信号, 而注射不同剂量 2,4-DCP 后的各个实验组, PBN 捕获自由基信号比对照组明显增强($p < 0.05$), 并随着 2,4-DCP 腹腔注射剂量的增加, 自由基信号强度也随之增强。说明经 2,4-DCP 诱导, 在鲫鱼肝内产生了自由基。然后将鱼的肝脏分离出体外并加入自由基的捕获剂 PBN, PBN 捕获肝脏中的自由基形成 PBN-自由基加合物, 然后用 EPR 谱仪检测。为了避

免在鱼肝的体外分离和匀浆过程中 PBN 捕获空气混有的微量游离的自由基,鱼肝的分离和匀浆的整个操作过程在吹入氮气的密闭环境中进行.因此,可以认为 PBN 捕获的自由基是经 2,4-DCP 诱导在鲫鱼肝脏内产生的自由基,而不是发生在体外的自由基.从图 1 可以看出,经 2,4-DCP 诱导在肝脏内产生的自由基谱线为 3 组具有双重超精细分裂谱线的 6 个峰,以第 1 组双重峰的第 1 个超精细分裂峰的峰高的差值代表所产生的自由基信号强度,可以得到鲫鱼肝脏产生的自由基信号强度与 2,4-DCP 不同注射剂量的剂量-效应关系,如图 2 所示.回归方程为: $y = 1189 \ln(x) + 9220$, $r^2 = 0.9856$, y 代表自由基信号强度, x 代表 2,4-DCP 注射剂量.从剂量-效应的回归方程可以看出,在 2,4-DCP 诱导下,鲫鱼肝脏自由基的产生呈对数趋势增长.经统计学软件 Origin 7.0 进行 two sample t -test 分析表明,2,4-DCP 从低剂量到高剂量注射到鲫鱼肝脏后各组所产生的 EPR 信号强度与对照组间差异具有显著性($p < 0.05$).

当 2,4-DCP 注射剂量仅为 0.025 mg/kg 时, PBN 捕获鱼肝脏内的自由基形成 PBN 自由基加合物的信号强度就明显高于对照组($p < 0.05$),这说明,在环境污染物 2,4-DCP 的胁迫下,鱼体内已经产生了少量的自由基,而且自由基的水平高于未经 2,4-DCP 诱导的正常生理条件下(对照组)鱼体内所形成的自由基.此时机体已处于氧化应激态,而导致氧化应激的直接原因就是 2,4-DCP 的诱导.由于体内注射与体外暴露导致鱼体对污染物的吸收路径和在体内的富集与代谢有很大差异,体内注射的方式对鱼的染毒剂量与污染物在自然水体中的实际浓度之间关系可以通过研究该种鲫鱼从水体中富集 2,4-DCP 的富集系数以及富集动力学得到.这样可以将 2,4-DCP 引起鱼体内氧化应激的机理研究与天然水体的该污染物的实际污染水平之间建立一种剂量-效应关系,将更具实际意义.

2.2 2,4-DCP 引起鲫鱼肝脏产生的脂质过氧化

2,4-DCP 引起鲫鱼肝脏产生脂质过氧化情况见图 3.从图 3 可以看出,2,4-DCP 腹腔注射 24 h 后,可引起鲫鱼肝内 MDA 含量的升高,并随着 2,4-DCP 注射剂量的增大,MDA 含量也随之增大,经 Origin 7.0 统计学软件进行 two sample t -test 分析表明,2,4-DCP 各浓度组与对照组相比差异具有显著性($p < 0.05$),其中,0.05,0.5,5,25 mg/kg 剂量组与对照组相比差异具有极显著性($p < 0.01$).

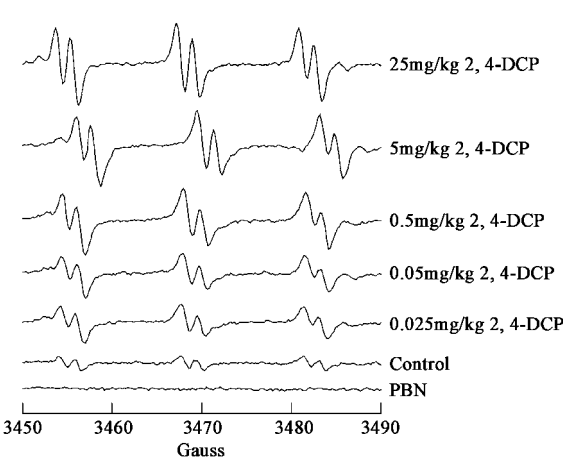


图 1 2,4-DCP 腹腔注射产生 PBN 自由基加合物的 EPR 波谱
Fig.1 The EPR spectrum of PBN-free radical adduct after 2,4-DCP injection

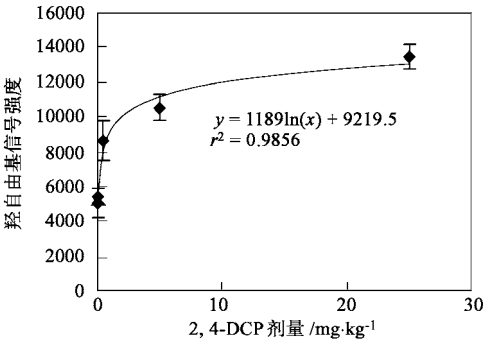


图 2 自由基信号强度与 2,4-DCP 注射剂量的剂量-效应关系
Fig.2 The dose-effect relationship between free radical signal intensity and 2,4-DCP injection dose

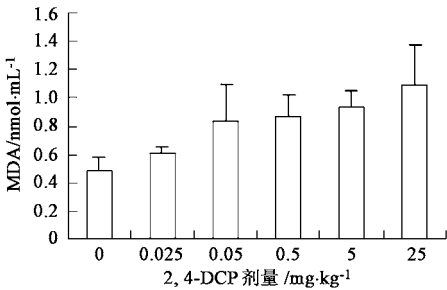


图 3 2,4-DCP 对脂质过氧化的影响
Fig.3 Effect of 2,4-DCP on lipid peroxidation

EPR 自旋捕集技术直接证明了 2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏自由基的产生,经计算机拟合分析计算其超精细分裂常数为 $a_N = 13.7$ Gauss, $a_H = 1.8$ Gauss, g 因子为 2.0058,与文献报道的 PBN 捕获羟自由基的特征参数一致^[7~9].产生的 3 组双重峰分裂谱线为典型的 PBN 捕获羟自由基形成 PBN/

$\cdot\text{OH}$ 的 ESR 波谱,因此初步认为 2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏内产生的自由基为 $\cdot\text{OH}$,并且羟自由基的产生与 2,4-DCP 注射剂量呈良好的剂量-效应关系,即随着污染物浓度的增加,诱导体内产生的自由基呈对数增长趋势.羟自由基是存在生物体内的对细胞和组织危害性最大的一类自由基,可攻击蛋白质、不饱和脂肪酸和 DNA 等大分子,引起蛋白质过氧化、脂质过氧化以及遗传物质 DNA 的氧化损伤等.脂质过氧化水平升高,在研究中已得到了证实,表明此时机体已处于氧化应激态,而引起机体产生氧化应激的原因,可能是 2,4-DCP 诱发鲫鱼肝脏内自由基的生成.

根据 Siraki^[10]和 Jerzy^[11],2,4-二氯苯酚进入鱼体内后在过氧化物酶(Peroxidase)的催化氧化作用下,很可能可被 H_2O_2 氧化成含一个未成对电子的 2,4-二氯苯氧基(Phenoxyl),该苯氧基又将位于电子传递链上的 NADH 氧化,生成 NAD^+ ,在好氧状态下生成超氧阴离子($\text{O}_2^{\cdot-}$).当体内有 H_2O_2 存在时, $\text{O}_2^{\cdot-}$ 与 H_2O_2 亦发生 Haber-Weiss 反应生成 $\cdot\text{OH}$,当体内有 Fe^{2+} 存在时,该反应可以被大大加快.因此在 2,4-DCP 诱导下,鲫鱼肝脏内最初产生的自由基可能不是羟自由基($\cdot\text{OH}$),而是 2,4-二氯苯氧基,在体内 2,4-二氯苯氧基经上述一系列反应后生成了羟自由基.无论是 2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏产生的最初自由基产物苯氧基自由基或经过一系列反应间接生成的三级或四级自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$,都会造成机体氧化损伤,使机体处于氧化应激态.而且研究发现,自由基的生成与 2,4-DCP 的注射剂量呈良好的剂量-效应关系.该研究还发现脂质过氧化水平随 2,4-DCP 注射剂量增加而逐渐加重,这就证明了自由基引发了机体的氧化损伤.

3 结论

研究获得了 2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏内产生自由基的直接证据,为揭示环境污染物 2,4-DCP 导致机体产生氧化应激乃至氧化损伤的机理研究提供了有力证据.经 EPR 谱图解析表明,2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏内产生自由基的 EPR 波谱谱峰的超精细分裂常数为 $a_N = 13.7$ Gauss, $a_H = 1.8$ Gauss, g 因子为 2.0058.与文献报道的 PBN 捕获 $\cdot\text{OH}$ 的特征参数一致.因此,2,4-DCP 诱导鲫鱼肝脏产生的自由基可能是羟自由基.羟自由基的产生与 2,4-DCP 的注射剂量呈现良好的剂量-效应关系,回归方程为:

$y = 1189 \ln(x) + 9220$, $r^2 = 0.9856$. 2,4-DCP 诱导在鲫鱼肝脏内产生自由基的同时,还引起脂质过氧化,使鲫鱼肝脏 MDA 含量增加,而且随着羟自由基在肝脏内信号强度的不断增强,MDA 含量也随之增加.说明此时机体已处于氧化应激态,而脂质过氧化与自由基的产生之间可能存在着某种联系,而引起机体产生氧化应激的直接原因,可能是 2,4-DCP 诱发鲫鱼肝脏内自由基的生成.

致谢:感谢南京大学现代分析测试中心睦云霞老师提供 EPR 测试以及有关 EPR 谱图解析指导.

参考文献:

- [1] House W A, Leach D, Long J L A, et al. Micro-organic compounds in the Humber rivers [J]. Sci. Total Environ., 1997, **194** ~ **195**: 357 ~ 371.
- [2] Shao Y, Rudolf S S W, Richard Y C K. Biodegradation and enzymatic responses in the marine diatom *Skeletonema costatum* upon exposure to 2,4-dichlorophenol [J]. Aquat. Toxicol., 2002, **59**: 191 ~ 200.
- [3] Zhang J F, Shen H, Wang X R, et al. Effects of chronic exposure of 2,4-dichlorophenol on the antioxidant system in liver of freshwater fish *Carassius auratus* [J]. Chemosphere, 2004, **55**: 167 ~ 174.
- [4] 向荣,王鼎年. 过氧化脂质硫代巴比妥酸分光光度法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1990, **17**(3): 241 ~ 242.
- [5] Gonzalez F B S, Repetto M, Evelson P, et al. Inhibition of microsomal lipid peroxidation by α -tocopherol and α -tocopherol acetate [J]. Xenobiotica, 1991, **21**: 1013 ~ 1022.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976, **72**: 248 ~ 254.
- [7] Ashton T, Rowlands C C, Jones E, et al. Electron spin resonance spectroscopic detection of oxygen-centred radicals in human serum following exhaustive exercise [J]. Eur. J. Appl. Physiol., 1998, **77**: 498 ~ 502.
- [8] Tortolani A J, Powers S R, Misik V, et al. Detection of alkoxyl and carbon-centered free radicals in coronary sinus blood from patients undergoing elective cardioplegia [J]. Free Radic. Biol. Med., 1993, **14**: 421 ~ 426.
- [9] Rousseau D L, Nastuk W L. Structural and Resonance Techniques in Biological Research [M]. Newyork: Academic Press, 1984, 32 ~ 108.
- [10] Siraki A G, O'Brien P J. Prooxidant activity of free radicals derived from phenol-containing neurotransmitters [J]. Toxicology, 2002, **177**: 81 ~ 90.
- [11] Dec J, Haider K, Bollag J M. Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions [J]. Chemosphere, 2003, **52**: 549 ~ 556.