

蚯蚓细胞色素 P450 生物标记物方法研究

张薇^{1,2}, 宋玉芳^{1,3*}, 孙铁珩^{1,3}, 周启星^{1,3}, 刘淼^{1,2}, 宋雪英^{1,2}

(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. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 沈阳大学沈阳环境工程重点实验室, 沈阳 110041)

摘要: 以蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 为试验动物, 通过强化预处理 (盐水洗脱)、改变离心力和溶解微粒体膜等实验, 建立了蚯蚓细胞色素 P450 含量的定性、定量测定方法. 在此基础上, 以多环芳烃 (菲) 为供试外源污染物, 分别以滤纸接触法和土壤投加法, 进行了蚯蚓细胞色素 P450 含量与菲污染诱导的剂量-效应关系试验. 结果表明, 增加和调整离心力, 加入增溶剂等方法, 可有效去除干扰, 使蚯蚓微粒体样品的 450 峰值由完全被干扰掩盖 (在 455~457nm 处滞后出现), 转变为在 450nm $\pm$ 1nm 达到最大值. 滤纸接触试验 (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} 和 10^{-2} mg $\cdot$ mL $^{-1}$) 和土壤染毒试验 (1, 2, 4, 8 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) 均表明, 蚯蚓体内 P450 含量与菲浓度存在剂量-效应关系. 对土壤染毒不同诱导时间 (1, 3, 7, 14, 28d) 的测定结果表明, 不同浓度的菲对蚯蚓毒性为诱导刺激 (7d) 效应和诱导抑制 (14d 和 28d) 效应, 导致蚯蚓体内 P450 总量分别为对照组的 0.99~1.41 倍及 0.77~0.88 倍 ($p < 0.05$). 蚯蚓细胞色素 P450 含量测定方法具有简单、快速、低耗、敏感的优点, 是适合于土壤低剂量污染暴露毒性诊断的生物标记物指标.

关键词: 赤子爱胜蚓; 细胞色素 P450; 生物标记物; 土壤污染; 剂量-效应

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2006)08-1636-07

Establishment of Method for Cytochrome P450 of Earthworms (*Eisenia fetida*) as a Biomarker

ZHANG Wei^{1,2}, SONG Yufang^{1,3}, SUN Tieheng^{1,3}, ZHOU Qixing^{1,3}, LIU Miao^{1,2}, SONG Xueying^{1,2}

(1. Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2. Graduated School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Key Laboratory of Environment Engineering, Shenyang University, Shenyang 110041, China)

Abstract: Earthworm (*Eisenia fetida*) was chosen as test soil fauna to establish the method for determination of cytochrome P450 content. By means of thoroughly washing with salt solution, changing centrifugal acceleration and dissolving microsomal membranes of earthworms with sodium cholate, the determination of cytochrome P450 was performed. Base on the method, dynamic relationships of dose-response for cytochrome P450 contents in earthworm and phenanthrene concentrations were conducted by contact filter paper and soil contaminated with phenanthrene. Results indicate that cytochrome P450 are covered up by interferential material in earthworm, which makes the classic peak lag and appear at 455~457nm in the CO difference spectrum with a spectrophotometer. Through increasing centrifugal acceleration and adding reagent of solubilization, the interference is removed mostly and the classic peak of P450 returns to appear at 450nm $\pm$ 1nm. The exposure tests of phenanthrene with contact filter paper (10^{-6} , 10^{-5} , 10^{-4} , 10^{-3} and 10^{-2} mg $\cdot$ mL $^{-1}$) and soil (1, 2, 4 and 8 mg $\cdot$ kg $^{-1}$) reveal that the dose-response relationships exist between the pollutant and cytochrome P450. Soil tests of different exposure durations (1, 3, 7, 14 and 28d) show the effects of different phenanthrene concentration on earthworm cytochrome P450 contents are to activate (7d) and to inhibit (14d and 28d), and the content of P450 is 0.99~1.41 and 0.77~0.88 ($p < 0.05$) times of control respectively. From this study, cytochrome P450 content of earthworm has the merit of simpleness, speediness and economy for determination, and it could be used as a sensitive biomarker for monitoring the exposure of sublethal pollution in terrestrial ecosystem.

Key words: earthworms (*Eisenia fetida*); cytochrome P450; biomarker; soil pollution; dose-response

细胞色素 P450(CYP) 是广泛存在于动物、植物和微生物等不同生物体内的一类具有重要生理功能的代谢酶系, 它可以催化大量亲脂性外源物质, 承担大量肝脏药物的代谢解毒作用^[1,2], 在临床医学、医药学等领域广泛应用. 细胞色素 P450 酶系还有另外一种功能, 即可被外源污染物诱导或抑制而使 CYP 活性显著增加或降低. 利用生物代谢过程中 CYP 含量或活性与污染物毒性之间的显著响应关

系, 可将细胞色素 P450 含量作为生物标记物, 进行

收稿日期: 2005-09-03; 修订日期: 2005-10-19

基金项目: 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 (20277041, 20337010); 沈阳大学沈阳环境工程实验室及中国科学院沈阳应用生态研究所海外留学基金项目

作者简介: 张薇 (1980~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为陆地生态系统污染生态学, E-mail: Zhangweilm@hotmail.com

* 通讯联系人, E-mail: Songyufang@iae.ac.cn

环境污染的早期诊断. 对此, 很多学者进行了尝试, 但到目前为止, 大多数研究都集中在以水生生物肝脏为靶器官, 进行 P450 含量或 P4501A1 族酶活性与水体污染物的诱导关系研究, 如多环芳烃、多氯联苯、二噁英等与鱼类肝脏 BROD (benzoxo-resorufin O-dealkase) 和 EROD (ethoxycoumarin O-dealkylase) 等的量-效关系, 以及水体污染监测研究^[3~6].

随着土壤污染生态毒理诊断研究的深入开展, 以土壤生物急性致死率等毒理指标为试验终点的研究已经不能满足在亚致死浓度或污染条件下毒理诊断的需要. 为此, 新的更敏感试验终点的研究受到日益关注. 细胞色素 P450 酶系作为土壤污染诊断的指标研究, 多数集中在利用蚯蚓体 EROD、ECOD 和 BROD 等酶活性指示土壤污染^[7~10], 而以 P450 含量为生物标记物的研究却未见成功报道^[11]. 其主要原因在于土壤生物没有与医学实验动物小鼠和水生生物鱼类类似的肝脏或肺等靶器官, 而以土壤生物整体进行试验, 存在严重的试验干扰, 致使 P450 含量的测定难以实现. 有人以小鼠口服多环芳烃 (PAHs) 污染土壤的方式对其染毒, 进行土壤污染程度与鼠肝微粒体 P450 含量诱导关系研究, 发现了高诱导响应^[12, 13]. 这表明, 若能实现土壤动物微粒体 P450 含量的测定, 很可能是找到新的土壤污染敏感诊断试验终点^[14].

研究在参照鼠肝微粒体细胞色素 P450 含量测定方法^[1, 15]基础上, 以国际标准方法组织推荐的土壤动物赤子爱胜蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 为试验动物, 进行 P450 含量定性、定量的测定方法研究, 并在此基础上, 以蚯蚓微粒体细胞色素 P450 含量为生物标记物, 进行土壤污染诱导条件下菲含量与 P450 含量的量-效关系研究, 研究旨在建立 1 种新的适合土壤污染诊断的生物标记物方法, 为亚致死浓度或污染条件下的土壤毒理诊断提供新的手段.

1 材料与方法

1.1 药品与溶液配制

菲为分析纯购于 Fluka 公司(瑞士). 胆酸钠购于 Aldrich 公司(德国). 牛血清白蛋白 (BSA) 与考马斯亮蓝 G-250 (CBG) 均购于上海生工, 为分析纯. 其他药品均为市购分析纯. CO 购于沈阳市气体站, 纯度 99.99%.

20% 甘油溶液; 0.15 mol/L KCL 溶液; 匀浆缓冲液 (250 mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA); 保存缓冲液 (250

mmol/L 蔗糖, 50 mmol/L Tris pH 7.5, 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L EDTA, 20% 甘油).

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); 内切式组织匀浆器 (宁波新芝); 手动玻璃匀浆器; 受控环境生长箱; 硬质玻璃培养皿; 1L 标本瓶; 无灰定性滤纸.

1.3 试验土壤和蚯蚓

土壤为 0~20cm 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. 蚯蚓赤子爱胜 (*Eisenia fetida*) 购自天津蚯蚓养殖中心. 选用 2~3 月龄, 体重 300~500mg, 带有环带的健康蚯蚓为供试品.

表 1 供试土壤的理化性质¹⁾

Table 1 Physical and chemical properties of test soils

土壤类型	TP/%	TK/%	凯氏氮/%	有机质/%	CEC/kg	pH
草甸棕壤	0.04	0.18	0.091	1.65	1.226	6.22

1) CEC 为阳离子交换量

1.4 蚯蚓微粒体 P450 总量测定

1.4.1 预处理

将实验用活体蚯蚓用自来水洗净后用滤纸吸干, 称重. 于室温下在湿润的滤纸中放置 12h, 使其排净体内物质后待用.

1.4.2 微粒体制备

将排净体内物质后的活体蚯蚓在 4℃ 甘油溶液 (20%) 中浸泡 1h 后, 转移到冷的 0.15 mol/L KCL 溶液中, 将整条蚯蚓用剪刀分割破碎后, 放置在过滤装置 (漏斗、三角杯和纱布组合) 中用冰冷的 0.15 mol/L KCL 溶液清洗体内血液及黄色体液, 直至清洗液呈无色为止. 再将蚯蚓转移到装有 6mL 匀浆缓冲液的 25mL 离心管中, 内切式组织匀浆器以 8 000 r/min 匀浆 30s. 匀浆物通过 1 层纱布过滤, 将滤液装入 10mL 的离心管中, 在低温 (4℃) 超速离心机上 14 700 r/min 离心 30min. 离心后所得上清液于超速离心机 4℃, 以 46 500 r/min 再次离心 90 min. 所得沉淀用少许保存缓冲液溶解微粒体, 逐滴加入 20% 的胆酸钠溶液至终浓度为 0.5%, 同时在冰浴中轻轻搅拌, 30min 后以 38 000 r/min 冷冻离心 45min, 小心收集上清液. 取上清液 1mL 用保存缓冲液稀释 7 倍, 取 1mL 待测蛋白含量, 其余部分于紫外分光光度计待测 P450 总量.

1.4.3 细胞色素 P450 总量测定

蚯蚓体内 P450 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. 各样品组 P450 含量采用酶相对含量表示: 将某浓度下 P450 酶含量除以同一时间段对照组的 P450 含量, 即得该浓度下 P450 酶的相对含量.

微粒体悬液的蛋白质含量应用考马斯亮蓝法^[17]测定.

1.5 多环芳烃菲污染诱导细胞色素 P450 试验

1.5.1 滤纸接触试验:

菲滤纸接触试验参照国际标准方法组织草案 OECD 指南建立^[18]. 采用长 7cm, 直径 4cm 的平底玻璃管, 玻璃管内壁衬铺滤纸, 滤纸大小以覆盖玻璃管且不重合为准. 以 10 的对数设计从 10^{-2} 到 10^{-6} $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 5 个浓度和 1 个空白. 将菲溶于丙酮并稀释至所需浓度系列. 在每 1 个试验瓶中均加入 1mL 丙酮(空白)或所需浓度菲溶液, 自然挥发 2h 后, 用 1mL 蒸馏水润湿滤纸. 每个试验瓶中均加入 1 条蚯蚓(400mg $\pm$ 50mg), 再用塑料薄膜封住玻璃瓶口, 于 20 $\pm$ 1 $^{\circ}\text{C}$ 生化培养箱中避光培养. 48h 后, 将蚯蚓取出, 测定蚯蚓体内细胞色素 P450 含量. 为减少样本带来的误差影响, 每个处理组和对照组均设 4 个平行.

1.5.2 土壤染毒试验:

以几何级数系列设计 5 种浓度: 1 2 4 8 mg/kg 和 1 个空白对照 CK. 分别将一定浓度的菲溶液(溶于丙酮)与 500g 土壤混合, 待丙酮自然挥发后, 调节土壤水分含量为最大持水量的 60%. 平衡 48h 后, 转移到 1L 冲洗干净的玻璃瓶中, 加入 12 条已在人工条件下饲养 24h 蚯蚓. 将玻璃瓶用纱布扎好瓶口, 置于 20 $\pm$ 2 $^{\circ}\text{C}$, 湿度为 80% 的受控环境生长箱中连续光照培养. 试验的第 1, 3, 7, 14 和 28d, 从各处理组分别取出 2 条蚯蚓测定微粒体 P450 总量. 各组均设 4 个平行样.

1.6 土壤和滤纸中菲的提取与测定

取 2~5g(过 1mm 筛)风干染毒土壤或染毒滤纸于离心管, 加入 25mL 二氯甲烷超声提取 2h. 提取液于离心机上以 2 500 r/min 离心 5min, 收集上清液于旋转浓缩仪上浓缩至 1mL. 将浓缩液转至装有 1g 硅胶的玻璃预柱中, 以 1:1 的二氯甲烷: 正己烷为淋洗液, 接收淋洗液 3mL. 用氮气吹脱至干, 乙腈定容至 1mL, 于高效液相色谱仪分析检测多环芳烃.

高效液相色谱检测多环芳烃: 20 μL 提取液经自动进样器注入 RP-C18 (250 $\times$ 4.6mm, I.D. 5 μm Octadecylsilane) 反相柱中, 乙腈/水为流动相, 双通

道液相色谱泵以 1.0 mL/min 流速梯度淋洗 30min, 二级阵列检测器检测. 根据保留时间对非定性、定量分析.

1.7 数据分析

采用统计软件 SPSS 11.0 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. 应用单变量双因素方差分析(Univariate analyses)确定 2 因素(暴露时间和剂量)及其交互作用对蚯蚓 P450 含量影响的贡献情况. 多重比较分析(Post-hoc comparison, Tamhane test)对各处理组间的均值进行了差异显著性检验. 对滤纸接触试验及土壤暴露试验的样品与对照组之间的 P450 含量进行了以暴露剂量为因子的单因素方差分析[One-way ANOVA, Dunnett's t -test(2-sided)].

2 结果与讨论

2.1 蚯蚓体内细胞色素 P450 含量测定方法研究

2.1.1 离心力试验

以制备小鼠、鱼类肝脏微粒体的差速离心力为参考, 进行蚯蚓微粒体制备的离心力试验. 结果表明, 在一次离心力 11 400 r/min , 二次离心力 38 900 r/min 条件下, 制备蚯蚓微粒体, 因干扰存在使样品在 450nm 处无检出峰(表 2), 表明小鼠肝微粒体制备条件不能满足蚯蚓微粒体制备的要求. 于是, 将一次离心力增加至 12 000 r/min . 二次离心力由 38 900 r/min 增加至 46 500 r/min 时, 样品在 450nm 处仍无检出峰. 进一步改进试验条件, 将一次离心力由 12 000 r/min 增加至 14 700 r/min . 二次离心力保持在 46 500 r/min , 并加入增溶剂胆酸钠, 于 38 000 r/min 进行第三次离心, 有效地去除了干扰物质, 在 450nm 处有检出峰.

表 2 不同离心力下蚯蚓整体微粒体制备试验

Table 2 Test for determination of P450 content under different centrifugal acceleration

试验	一次离心力	二次离心力	三次离心力	P450
1	11 400 r/min 20min	38 900 r/min 60min		N ¹⁾
2	12 000 r/min 30min	46 500 r/min 90min		N
3	14 700 r/min 30min	46 500 r/min 90min	胆酸钠 38 000 r/min 45min	Y

1) N 为 450nm 处无峰值, Y 为 450nm 处有峰值

2.1.2 溶膜试验

向第二次离心所得微粒体悬液中逐滴加入增溶剂胆酸钠(20%)至溶液终浓度为 5%, 同时在冰浴

中缓慢搅拌 30min, 于 38 000 r/min 进行第三次低温超速离心, 并以不加增溶剂胆酸钠样品作对照, 结果见表 3 和图 1 2. 由图 1 表 3 可见, 对照样品的干扰物质使 P450 产物峰滞后, 最大峰值在 455~ 457nm 之间. 微粒体膜结构经胆酸钠增溶后, 酶蛋白得到释放, 干扰物质得以排除, 样品的扫描光谱在 450nm ± 1nm 处出现最大峰(表 3).

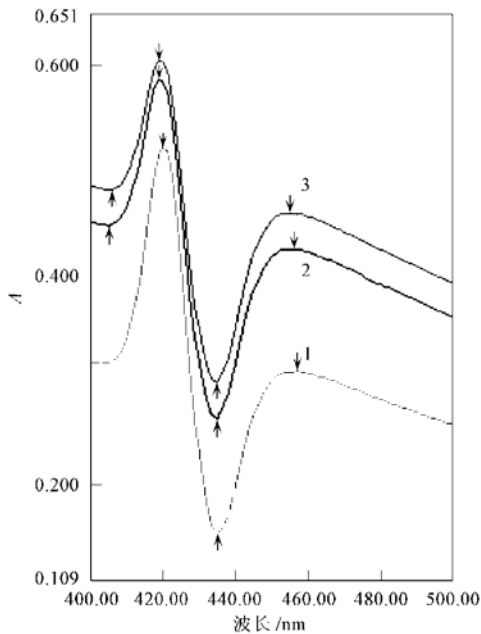


图 1 微粒体膜溶解处理前的扫描光谱
Fig. 1 Spectrum of treatments without solubilization

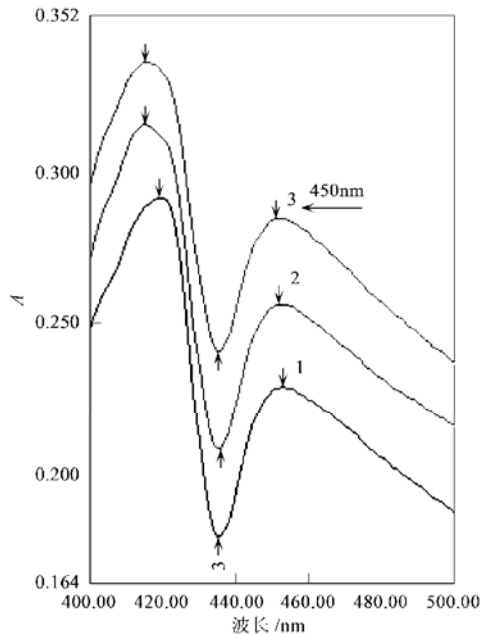


图 2 微粒体膜溶解处理后的扫描光谱
Fig. 2 Spectrum of treatments with solubilization condition

表 3 微粒体膜溶解前后 P450 产物峰的变化
Table 3 Changes of P450 peak in solubilization and no solubilization conditions

项目	未经膜溶解			微粒体膜溶解		
	曲线 1	曲线 2	曲线 3	曲线 1	曲线 2	曲线 3
峰值/nm	457	456	455	451	450	449

2.1.3 CO 通气量试验

微粒体经连二亚硫酸钠还原后与 CO 结合, 生成的反应产物在 450nm 产生特征吸收峰. 在这一反应中, CO 作为反应物之一, 其作用十分重要. 反应物 CO 量的不足将使反应不完全, 直接影响产物的生成以及 P450 定量的准确性. 为此, 在微粒体膜溶解的基础上, 进行了不同 CO 通气量, 不同反应时间下, P450 含量测定的条件试验(如表 4 与图 3).

表 4 不同 CO 通气量光谱峰及 P450 含量比较
Table 4 Changes of peaks and P450 contents with different CO charge quantum

样品	CO 通气时间 ¹⁾	反应时间	峰值	P450 含量
	/min	/min	/nm	/nmol·mg ⁻¹
1	0.5	1	460	0
2	1	2	456	0.115
3	1.5	3	453	0.265
4	2.0	4	450	0.351

1) CO 流速为 10 cm³·min⁻¹

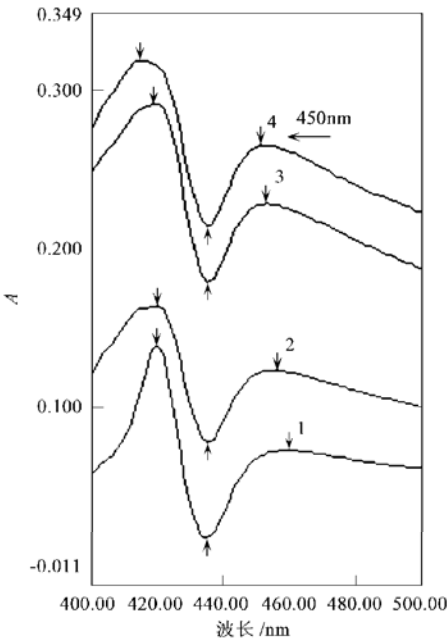


图 3 不同 CO 通气量的 P450 扫描光谱
Fig. 3 Spectrums of P450 with different charge quantum of CO

由表 4 可见, 在通气少(0.5min), 反应时间较短情况下, 450 nm 处没有反应产物特征峰出现, 试验

测得的最大吸收值在 460 nm 处. 进一步增加通气量, 将通气后的样品放置 2min, 允许反应充分进行, 最大吸收值由 460nm 移动至 456nm. 进一步增加通气量和反应时间, 最大吸收值继续前移, 当通气量为 3min, 反应时间 5min 时, 样品在 450 nm 处出现最大吸收值. 实验继续通气, 则 P450 含量基本恒定, 表明反应已经完全(图 3).

试验产生的 420nm 吸收峰与蚯蚓微粒体膜吸附的血色素有关, 并非细胞色素 P450 降解或失活的产物(如细胞色素 P420), 这一点已经通过本研究的 CO 通气量试验, 以及相关文献中的杂质纯化试验得以证实. 如 Achazi 等人^[11]采用 Sepharose 2B 柱凝胶过滤和疏水柱色谱 2 种方法分离蚯蚓血色素与微粒体发现, 分离后的 CO 差光谱仍有 450nm 和 420nm 2 个吸收峰存在, 并证明 420nm 是赤子爱胜蚯蚓的血色素光谱, 这与本试验结果一致. 其他研究也表明, 不同生物的微粒体样品均有 420nm 吸收峰^[19-25].

2.1.4 取样量试验

分别选取 6、5、4、3 和 2 条蚯蚓(平均体重 400mg $\pm$ 50mg) 为一个处理, 进行蚯蚓细胞色素 P450 含量的测定. 由图 4 可见, 各取样量间 P450 含量测定值相差不大. 但随着取样量的减少, P450 含量测定值有上升趋势. 由此可见, 2 条蚯蚓完全可以满足测定要求. 分析取样量减少, P450 含量上升的原因可能与蚯蚓体红色干扰物也相应减少有关. Achazi 等人取 20~50 条蚯蚓制备微粒体^[11], 没有测得 P450 含量, 很可能是由样品中含有太多的干扰物质所致.

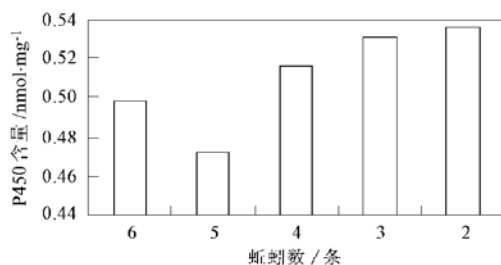


图 4 不同取样量条件下蚯蚓 P450 含量

Fig. 4 Relationships between P450 content and sampling amounts

2.2 以细胞色素 P450 为生物标记物的菲污染诱导试验

2.2.1 滤纸接触毒性试验

分别在 6 个浓度下 (10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mg/mL 和 CK), 以滤纸接触法将蚯蚓染毒 48h

后, 测定其体内细胞色素 P450 的含量. 由图 5 可见, 在较低浓度时 (10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} mg/mL 和 CK), 蚯蚓 P450 含量随着菲暴露浓度的增加呈上升趋势, 且在 10^{-3} mg/mL 的样品中达到最大值, 为对照组的 1.6 倍; 而在高浓度 (10^{-2} mg/mL) 时, P450 含量明显下降, 其值与对照相当 (为对照的 1.1 倍), 各样品组 P450 含量与对照组间差异显著 ($p < 0.05$, Dunnett t -test).

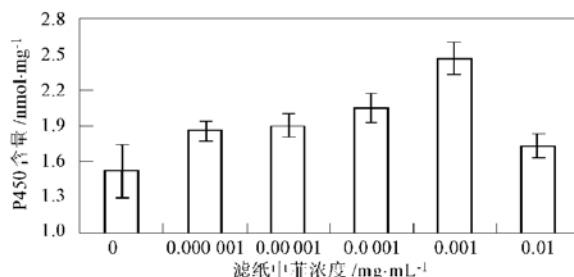


图 5 滤纸接触法染毒 48h 后, 蚯蚓体内细胞色素 P450 含量

Fig. 5 Cytochrome P450 content in earthworm, after 48h exposure in contact filter paper test

2.2.2 土壤污染暴露毒性试验

(1) 不同污染暴露时间内蚯蚓 P450 含量的动态变化 在 1、2、4 和 8 mg/kg 浓度暴露下, 分别于试验的 1、3、7、14 和 28d 测定蚯蚓微粒体 P450 总量, 其变化情况见图 6.

由图 6 可见, 试验初期的第 1d 和第 3d, 多数样品中, 蚯蚓体内 P450 总量与对照相比无明显差别, 只有菲含量为 4 mg/kg 的样品, 蚯蚓体内 P450 总量升高. 在实验第 3d, 1mg/kg 处理组, P450 总量比对照增加了 16%. 而试验第 7d, 多数样品中蚯蚓体内 P450 总量均呈现明显升高趋势. 各处理组 (1、2、4 和 8 mg/kg) 的 P450 总量分别为对照组的 0.99、1.41、1.30 和 1.2 倍, 表现为诱导刺激作用. 王咏等人^[28]对多环芳烃诱导下, 鲤鱼肝脏中 P450 1A 族 EROD 酶活性的研究发现, 在 65 μ mol/L 浓度下, 微粒体体外诱导, 菲对蚯蚓整体 EROD 酶的诱导倍数为 1.3, 与本实验结果相似. 试验进行到第 14d 和 28d, 所有处理土壤中, 蚯蚓体 P450 总量明显下降, 14d 时, 分别为对照组的 0.77、0.82、0.86、0.88 倍, 28d 时分别为对照的 0.79、0.82、0.87、0.83 倍, 表现为诱导抑制作用, 与对照组相比差异显著 ($p < 0.05$).

经单变量双因素方差分析显示, 暴露时间和浓度, 以及相互间的交互效应对 P450 含量的影响均极为显著 ($p = 0$), 其中时间和浓度 $\times$ 时间的交互效

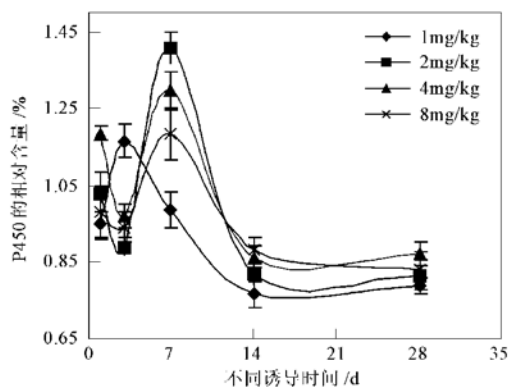


图 6 不同暴露时间下各处理组 P450 含量变化
Fig. 6 Changes of cytochrome P450 in all treatments under different exposure time

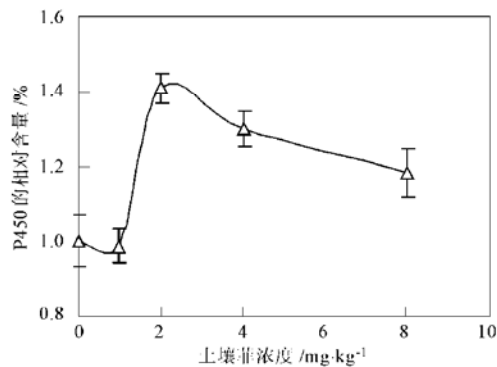


图 7 诱导第 7d 不同浓度下蚯蚓 P450 含量
Fig. 7 Cytochrome P450 contents in all treatments at the 7 exposure day

应对 P450 含量的变异贡献最大. 对暴露时间和浓度 2 因素进行多重比较分析 (Tamhane 检验), 检验结果表明, 浓度因素对各处理组 P450 含量作用的差异不显著 ($p > 0.05$), 而污染物暴露时间对各处理组 P450 含量的影响在 0.05 水平极为显著 ($p = 0$). 这种时间效应的产生, 可能与菲在蚯蚓体内的累积有关, 随着暴露时间的增加, 蚯蚓体内菲含量增多, 细胞色素 P450 也就随之产生响应.

(2) 蚯蚓 P450 总量与菲浓度的量-效关系 由图 7 可见, 土壤中菲的浓度与蚯蚓体内 P450 总量之间存在明显剂量-效应关系. 单因素方差分析 [Dunnett's t -test (2-sided)] 结果表明, 处理组与对照组之间均存在显著性差异 ($p = 0$). 在较低浓度下 (2 mg/kg 以下), 土壤中菲可导致蚯蚓 P450 总量显著升高, 当土壤中菲的浓度增加后, 蚯蚓 P450 总量显著下降, 以 P450 总量为指标可以敏感指示这种污染诱导的荷尔蒙效应.

(3) 土壤和滤纸中菲的回收率 如表 5 所示, 滤纸菲的回收率在 98.7% ~ 101.4% ($p < 0.01$). 土壤中菲的回收率在 74.1% ~ 76.3%, 与先前的测定结果相近^[26,27]. 与滤纸法相比, 菲的回收率略低, 这与土壤试验过程有关, 土壤染毒后, 丙酮液在挥发作用可能造成菲的损失, 而滤纸染毒后, 直接进行菲提取, 减少了中间环节.

表 5 土壤和滤纸中菲的回收率 (平均值 $\pm$ 标准方差, $n = 3$)
Table 5 Recovery of amended phenanthrene from soil and filter paper (mean $\pm$ standard deviation, $n = 3$)

滤纸		土壤	
试验设计浓度	回收率	试验设计浓度	回收率
/mg·mL ⁻¹	/%	/mg·kg ⁻¹	/%
10 ⁻⁶	100.2 $\pm$ 6.9	1	75.2 $\pm$ 4.8
10 ⁻⁵	101.4 $\pm$ 6.2	2	74.1 $\pm$ 5.2
10 ⁻⁴	99.3 $\pm$ 7.3	4	75.7 $\pm$ 5.8
10 ⁻³	98.7 $\pm$ 5.8	8	76.3 $\pm$ 5.5
10 ⁻²	99.5 $\pm$ 4.1	—	—

3 结论

选择蚯蚓为供试土壤生物, 通过利用高盐溶液清洗, 改变离心力及溶解微粒体膜的手段最终去除蚯蚓体内的干扰, 实现了蚯蚓整体生物微粒体 P450 含量的定量测定. 在此基础上, 通过滤纸接触和土壤投加的方式, 建立了蚯蚓微粒体细胞色素 P450 含量与多环芳烃 (菲) 诱导的量-效关系. 结果表明, 蚯蚓体内 P450 含量对土壤低剂量菲污染响应较为敏感, 该指标具有简单、快速, 低耗等特点, 可通过进一步研究去证明蚯蚓体 P450 含量作为亚致死浓度或污染条件下土壤毒理诊断生物标记物的可行性.

参考文献:

[1] 沈钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进[J]. 工业卫生与职业病, 1997, 23(4): 236~ 238.

[2] 冷欣夫, 邱星辉. 细胞色素 P450 酶系的结构、功能与应用前景[M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[3] Galgani F, Bocquene G, Truquet P H, et al. Monitoring of pollutant biochemical effects on marine organisms of the French coasts [J]. Oceanologica ACTA, 1992, 15(4): 52~ 61.

[4] Haasch M L, Prince R. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P450 as an environmental biomonitor[J]. Environ. Toxicol. Chem., 1993, 12: 885~ 889.

[6] 朱必凤. 鲫鱼肝微粒体芳烃羟化酶指示多环芳烃对水体污染的研究[J]. 中国环境科学, 1995, 15(2): 153~ 156.

[6] 顾海峰. 海水养殖污染区鱼肝 EROD 酶活力[J]. 台湾海峡, 2002, 21(3): 292~ 295.

[7] Berghout A G R V, Wenzel E, Buld J, et al. Isolation, partial purification and characterisation of the cytochrome P450-dependent monooxygenase system from the midgut of the earthworm *Lumbricus terrestris* [J]. Comp. Biochem. Physiol., 1991, 100C (3): 389~ 396.

- [8] Khan M A Q, Stanton R H, Reddy G. Detoxication of foreign chemicals by invertebrates[A]. In: Khan M A Q, Bederka J P. (eds) Survival in Toxic Environments[C]. New York: Academic Press, 1974. 191~ 220.
- [9] Liimaitainen A, Hänninen O. Occurrence of cytochrome P450 in the earthworm *Lumbricus terrestris*[A]. In: Hietanen E, Laitinen M, Hänninen O. (eds) Biochemistry, Biophysics and Environmental Implications[C]. Amsterdam: Elsevier, 1982. 255~ 258.
- [10] Milligan D L, Babish J G, Neuhauser E F. Noninducibility of cytochrome P-450 in the earthworm *Dendrobaena veneta*[J]. Comp. Biochem. Physiol., 1986, **85C** (1): 85~ 87.
- [11] Achazi R K, Flenner C, Livingstone D R, *et al.* Cytochrome P450 and dependent activities in unexposed and PAH-exposed terrestrial annelids [J]. Comp. Biochem. Physiol., 1998, **121C**: 339~ 350.
- [12] Roos P H, Van Afferden M, Strotkamp D, *et al.* Liver microsomal levels of cytochrome P450IA1 as biomarker for exposure and bioavailability of soil-bound polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1996, **30**(1): 107~ 113.
- [13] Roos P H. Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. Arch. Toxicol., 2002, **76**(2): 75~ 82.
- [14] Fouchecourt M O, Berny P, Riviere J L. Bioavailability of PCBs to male laboratory rats maintained on litters of contaminated soils: PCBs burden and induction of alkoxyresorufin σ -dealkylase activities in liver and lung [J]. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1998, **35**(4): 680~ 687.
- [15] 徐承敏, 张增利, 童建. 环磷酸胺对小鼠肝细胞色素 P450 含量的影响[J]. 苏州大学学报(医学版), 2003, **23**(2): 135~ 136, 141.
- [16] Omura T, Sato R. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. Journ. Biol. Chem., 1964, **239**(7): 2370~ 2378.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Anal. Biochem., 1976, **72**: 248~ 254.
- [18] Organization for Economic Cooperation and Development, (OECD). Proposal for Updating Guideline 207: Earthworm, acute toxicity tests-OECD Guideline for Testing of Chemicals 207[R]. Paris: European Committee, 1984.
- [19] Gilewicz M, Guillaume J R, Carles D, *et al.* Effects of petroleum hydrocarbons on the cytochrome-P450 content of the mollusc bivalve *Mytilus galloprovincialis* [J]. Mar. Biol., 1984, **80**: 155~ 159.
- [20] Stegeman J J. Benzo [a] pyrene oxidation and microsomal enzyme activity in the mussel *Mytilus edulis* and other bivalve mollusc species from the Western North Atlantic [J]. Mar. Biol., 1985, **89**: 21~ 30.
- [21] Ndifor A M, Ward S A, Howells R E. Cytochrome P450 activity in malarial parasites and its possible relationship to chloroquine resistance [J]. Mol. Biochem. Parasitol., 1990, **41**: 251~ 258.
- [22] Wilbrink M, Groot E J, Jansen R, *et al.* Occurrence of a cytochrome P450-containing mixed-function oxidase system in the pond snail, *Lymnaea stagnalis* [J]. Xenobiotica, 1991, **21**: 223~ 234.
- [23] den Besten P J. Cytochrome P450 monooxygenase system in echinoderms [J]. Comp. Biochem. Physiol., 1998, **121C** (1-3): 139~ 146.
- [24] Leitão M A S, Affonso E G, da Silva M E F, *et al.* Peculiarities of the liver monooxygenase system of Brazilian freshwater fish [J]. Comp. Biochem. Physiol., 2000, **126C**: 29~ 38.
- [25] Rocha-silva T A, Farley B, Nonaka K O, *et al.* Spectral characteristics of a compound altering cytochrome P450 spectra from vertebrate microsomes suggest that it is a functional protein [J]. Comp. Biochem. Physiol., 2001, **130C** (1): 53~ 66.
- [26] Song Y F, Jing X, Fleischmann S, *et al.* Comparative study of extraction methods for the determination of PAHs from contaminated soils and sediments [J]. Chemosphere, 2002, **48** (9): 993~ 1001.
- [27] Sverdrup L E, Jensen J, Krogh P H, *et al.* Studies on the effect of soil aging on the toxicity of pyrene and phenanthrene to a soil-dwelling springtail [J]. Environ. Toxicol. Chem., 2002, **21**(3): 489~ 492.
- [28] 王咏, 王春霞, 徐静波. 多环芳烃化合物对鲤鱼肝微粒体 EROD 的体外诱导[J]. 环境科学学报, 2000, **20**(增刊): 176 ~ 180.
- [29] 宋玉芳, 周启星, 许华夏, 等. 菲、蒽、1, 2, 4-三氯苯对蚯蚓的急性毒性效应[J]. 农村生态环境, 2003, **19**(1): 36~ 39.