

阴离子表面活性剂 SDS 和 SDBS 对紫贻贝生化指标的影响研究

刘波^{1,2}, 俞志明^{1*}, 宋秀贤¹, 周斌³

(1. 中国科学院海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 青岛 266071; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 中国海洋大学, 青岛 266003)

摘要: 以青岛胶州湾现场调查数据为依据, 选择阴离子表面活性剂十二烷基硫酸钠(SDS)和十二烷基苯磺酸钠(SDBS)作为污染物, 以近海底栖生物紫贻贝为受试生物, 研究了长期暴露后紫贻贝生化指标(SOD, CAT, GSH, GPx, GST, iNOS, AKP)的变化。结果表明, 经过 72 d 不同浓度暴露后, SDBS 实验组紫贻贝体内的 SOD、CAT 和 iNOS 活性均有显著下降(除 CAT 0.1 mg/L 组外), GSH、GST 和 GPx 在 3.0 mg/L SDS 和 SDBS 组较各自对照组均有显著升高。SDBS 对紫贻贝生化指标影响的显著性水平大于 SDS。统计分析显示, SDBS 暴露组下 GST 与 GPx 呈显著正相关关系, iNOS 与 SOD 也表现出一定正相关, 但 GSH 与 CAT、GSH 与 SOD 呈现显著负相关关系。此外, 结果发现后闭壳肌中 iNOS 可能是一个具有应用前景的阴离子表面活性剂暴露生物标志物。

关键词: 紫贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*); 十二烷基硫酸钠(SDS); 十二烷基苯磺酸钠(SDBS); 生物标志物; 污染

中图分类号: X171.5; X55 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)01-0165-05

Effect of Two Anionic Surfactants Sodium-Dodecylbenzene Sulfonate (SDBS) and Sodium Dodecyl Sulfate (SDS) on Biochemical Indice in *Mytilus galloprovincialis*

LIU Bo^{1,2}, YU Zhi-ming¹, SONG Xiu-xian¹, ZHOU Bin³

(1. Key Laboratory of Marine Ecology & Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: We investigated anionic surfactants concentration in Jiaozhou Bay, China in May and August 2003. Two anionic surfactants sodium dodecylbenzene sulfonate (SDBS) and sodium dodecyl sulfate (SDS) were selected as contaminants to detect their effect on the biochemical indice in *Mytilus galloprovincialis*. Results show that after 72 days exposing, activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and induced nitric oxide synthase (iNOS) were significantly inhibited by challenged SDBS (except CAT activity in 0.1mg/L group). Activities of reduced glutathione (GSH), glutathione-S-transferase (GST) and glutathione peroxidase (GPx) were significantly higher than their corresponding control groups under 3.0 mg /L SDS and SDBS. Biochemical indice in *Mytilus galloprovincialis* were more easily effected by SDBS than by SDS. Statistical analysis suggested that significant positive relationships were found between GST and GPx, iNOS and SOD. But negative relationships were found between GSH and CAT, GSH and SOD under SBDS exposing. iNOS activity in the posterior adductor muscle may be a promising exposed biomarker in *Mytilus galloprovincialis* for anionic surfactants exposure.

Key words: *Mytilus galloprovincialis*; sodium dodecylbenzene sulfonate; sodium dodecyl sulfate; biomarker; contaminants

贻贝属生物是一种分布广泛的底栖滤食类海洋生物。因其具有积聚和耐受多种高浓度有机或无机污染物, 分布广泛, 底栖、滤食的特性, 和易于大量获得的优点, 它们在海洋污染监测中被广泛用做受试生物^[1]。香港 Cheung 等^[2]和 Lau 等^[3]用谷胱甘肽硫转酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽还原酶(GR)和脂质的过氧化反应(LPO)等指标来检测多种污染物对分布于香港水域的翡翠贻贝(*Perna viridis*)影响情况。结果发现, 贻贝组织中多环芳烃(PAHs)的升高可诱导大多数抗氧化酶的表达, 氧自由基清除剂 GSH 与组织中 PAH 的相关性最好, 而 GPx 对组织有机氯污染物多氯联苯(PCBs)的反应最

为显著。同一研究证实 GST/GSH 和氯化碳酸盐之间存在显著的相关性。然而 Cheung 等^[4]研究并未发现氯化碳酸盐与实验中检测的其他抗氧化酶间有显著的相关性。尽管上述结果暗示着一些抗氧化酶生物标志物具有作为现场早期预警污染的潜力, 但这些指标也受到一些其他因子比如食物利用情况、水温^[5]、生殖活动^[6]和季节^[7]等因素的影响。

胶州湾中阴离子表面活性剂主要来自生活污水

收稿日期: 2006-01-27; 修订日期: 2006-02-21

基金项目: 中国科学院知识创新工程前沿领域项目(KZCX3-SW-214); 国家杰出青年科学基金项目(40025614)

作者简介: 刘波(1978~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为海洋污染生态学。

* 通讯联系人, E-mail: zyu@ms.qdio.ac.cn

及工业废水,这类污水进入环境后,其主要成分是带有支链烷烃的烷基苯磺酸盐,成为了重要的有害物质^[8].2003-05 胶州湾全湾表层海水中阴离子表面活性剂含量范围在 5 ~ 122 $\mu\text{g/L}$ ^[9].近年来,国内外已有研究表明表面活性剂对抗氧化酶等指标会产生不同程度的影响作用^[10~12].但国内尚未见到使用紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)作受试生物进行生物标志物方面的研究报道.本实验依据胶州湾现场调查数据^[9]和室内 96 h 半致死浓度实验数据(未发表),研究不同浓度的 2 个阴离子表面活性剂 SDS 和 SDBS 对紫贻贝多项生化指标(CAT, SOD, AKP, iNOS, GSH, GPx, GST)的影响情况.通过研究污染条件下紫贻贝生化指标变化来反映环境污染特征及影响程度,以期海洋环境质量监测提供一种高灵敏性、特异性和预警性的方法和技术.

1 材料与方法

1.1 实验生物

紫贻贝于 2005-07-21 购自山东青岛市污染较少的太平角近海养殖区,壳长(3.94 ± 0.33) cm,壳高(2.24 ± 0.23) cm.运回中国科学院海洋研究所培育楼,洗去壳外污物,根据实验用数量适当分割(尽量保护足丝).实验用紫贻贝在洁净的沙滤海水中净化和暂养 7 ~ 10 d.分别将 20 个贻贝移入 30 L 预先设置好污染物浓度的海水的缸中.

1.2 暴露实验

紫贻贝暴露于一定浓度梯度的 2 种污染物中,设组 1 为对照组,2 ~ 7 组分别为 0.1 mg/L SDS 组,1.0 mg/L SDS 组,3.0 mg/L SDS 组,0.1 mg/L SDBS 组,1.0 mg/L SDBS 组,3.0 mg/L SDBS 组.每天换水,并喂食饵料藻三角褐指藻(*Phaeodactylum tricorutum* Bohlin),保持密度在 3×10^6 cells/L.实验过程中温度保持在 20℃,过滤海水的盐度为 32‰.每天早晚 2 次检查各组贻贝的存活情况,到实验结束时仅 3.0 mg/L SDS 组和 3.0 mg/L SDBS 组分别死亡 1 个和 2 个个体.暴露后 72 d,每组取 5 个贻贝解剖分别取消化腺和后闭壳肌,置入消毒预冷的 1.5 mL Eppendorf 管中待处理.

1.3 生化分析

1.3.1 组织匀浆的制备

取上述组织块在预冷的贻贝生理盐水^[13]中漂洗,在滤纸上吸干水分,并按照质量浓度 1:10 加入贻贝生理盐水,冰浴匀浆.将制备好的匀浆用普通离心机 3 000 r/min 左右离心 10 ~ 15 min,取上清液进行

检测.其中 AKP 和 iNOS 检测的是后闭壳肌, GSH, GST, GPx, CAT 和 SOD 检测的是消化腺组织.所有指标的测定均设 3 个平行样,酶活力测定方法参照文献^[14]进行.

1.3.2 酶活力单位定义

GST 1 个酶活单位(U)定义为每 mg 组织蛋白在 37℃ 反应 1 min 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$.一个 SOD 活力单位(U)定义为每 mg 组织蛋白在 1 mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量.GPx 1 个酶活单位(U)定义为每 mg 组织蛋白每 min 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$.CAT 一个活力单位定义为每 mg 组织蛋白每 s 分解 1 $\mu\text{mol H}_2\text{O}_2$ 的量.一个酶活力单位碱性磷酸酶(AKP)定义为每 mg 组织蛋白在 37℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚.iNOS 1 个酶活单位(U)定义为每 mg 组织蛋白每 min 生成 1 nmol NO 为一个酶活力单位. GSH 是在 412 nm 比色测定.

1.4 统计分析

使用软件 SPSS 11.5 对所获数据进行显著性和相关性分析,显著性水平设为 $p < 0.05$.

2 结果与分析

2.1 暴露后 72 d 紫贻贝生化指标的变化情况

SDS、SDBS 暴露 72d 后实验组和对照组 CAT, SOD, AKP, iNOS, GSH, GPx, GST 的变化情况见图 1. SDBS 暴露下, SOD、CAT 和 iNOS 活性均有显著下降(除 CAT 0.1 mg/L 组外), SOD 和 CAT 活性与 SDBS 暴露浓度呈负相关关系.3.0 mg/L SDS、SDBS 组 72 d 暴露后, GSH, GST 和 GPx 较对照组均有显著升高; GSH, GST 在 1.0 mg/L SDBS 作用下较对照组也有显著升高. SDBS 对各项指标影响的显著性水平大于 SDS.但 SDS 和 SDBS 对后闭壳肌中的 AKP 均无显著影响.

2.2 暴露后 72 d 紫贻贝生化指标间的 Pearson 相关系数分析

紫贻贝生化指标间的 Pearson 相关系数统计见表 1. SDBS 暴露 72 d 后, GST 与 GPx 呈显著正相关关系, iNOS 与 SOD 也表现出一定正相关, 而 GSH 与 CAT、GSH 与 SOD 呈现显著负相关关系.在实验浓度下 SDS 72 d 暴露后各指标间相关性不明显.

3 讨论

在生物抗氧化酶体系中, SOD 的重要性体现在可以阻止脂质过氧化反应发生, 这一机制的完成是

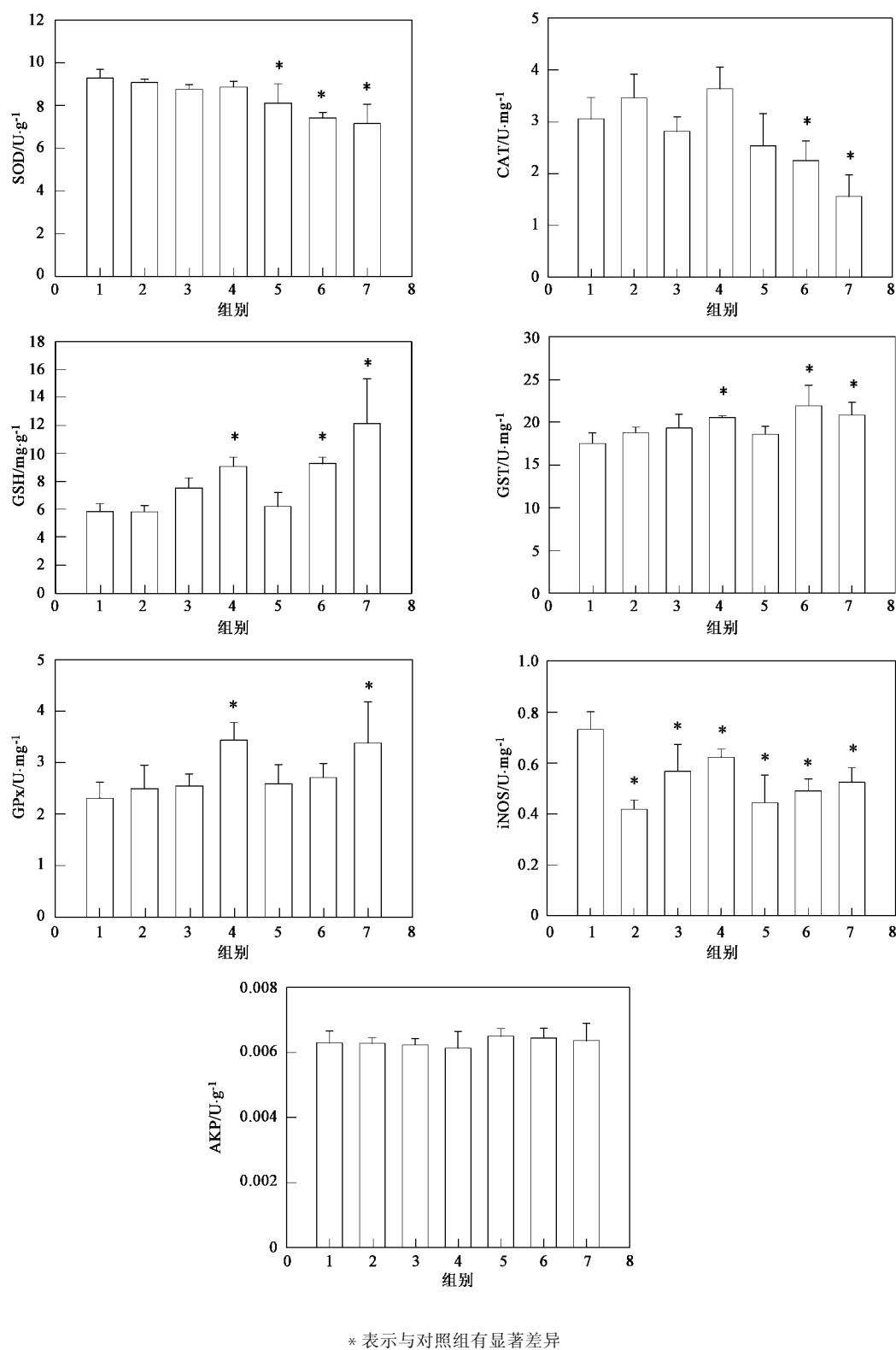


图 1 SDS、SDBS 暴露 72 d 后实验组和对照组 SOD、CAT、GSH、GPx、GST、iNOS、AKP 的变化情况

Fig.1 Activities of SOD, CAT, GSH, GPx, GST, iNOS, AKP in *Mytilus galloprovincialis* after 72 days exposing under SDS and SDBS

通过破坏脂质过氧化反应的起始因子 $\cdot\text{O}_2^-$ ，使之形成 H_2O_2 来完成^[2]。在本试验中，SOD活性在SBDS暴露72 d后均较对照组有显著下降，并且酶活与SDBS

浓度呈负相关关系。Cheung等^[15]发现SOD活性与Aroclor1254和Aroclor1254及B[α]P的混合污染物间呈正相关关系，与本研究结果相反，这可能是本试

表 1 紫贻贝生化指标间的 Pearson 相关系数统计¹⁾

Table 1 Pearson correlation coefficients between the indice detected in *Mytilus galloprovincialis*

	CAT	SOD	GSH	GPx	GST	AKP	iNOS
CAT		-0.158	0.413	0.012	0.053	0.205	-0.149
SOD	0.448		-0.530	-0.218	-0.357	0.153	0.324
GSH	-0.779**	-0.709**		0.335	0.174	-0.257	-0.128
GPx	-0.366	-0.283	0.168		0.572	-0.165	-0.125
GST	-0.530	-0.363	0.296	0.826**		0.155	-0.458
AKP	0.047	-0.095	-0.032	0.175	0.102		-0.133
iNOS	0.376	0.667*	-0.340	-0.147	-0.444	-0.425	

1)SDS 右上角部分, SDBS 左下角部分, ** 表示 $p < 0.01$, * 表示 $p < 0.05$

验污染时间长致使 SOD 活性受损的原因。

CAT 催化活性氧中间体(比如过氧化氢)形成水,大多数异生物质包括 B[α]P^[16,17]和 Aroclor1254^[18]可以刺激贻体内氧自由基的微粒体生成,但 CAT 可否作为 B[α]P 等的暴露生物标志物存在争议。Cheung 等^[2]实验中观察到翡翠贻贝鳃中 CAT 活性和鳃中 B[α]P 水平间存在正相关关系,因而认为翡翠贻贝鳃中 CAT 活性是一个具有应用前景的 B[α]P 暴露生物标志物。但 Livingstone 等^[16]对贻贝 *Mytilus edulis* 在室内经过 50×10^{-9} g/L B[α]P 19 d 暴露后,未发现消化腺中 CAT 活性有任何变化。本试验中 CAT 活性在 SDS 暴露下未有显著变化,但在 1.0, 3.0 mg/L SDBS 暴露下酶活均较对照组有显著下降,说明 CAT 活性可否作为生物标志物可能与污染物种类以及取样组织部位有关。

GSH 参与很多解毒过程,比如 GST 首先催化 GSH 与亲电复合物结合,然后在消耗 GSH 条件下, GPx 催化有机氢过氧化物(organohydroperoxide)转化成乙醇和水^[19]。本试验中 1.0, 3.0 mg/L SDBS 和 3.0 mg/L SDS 组实验贻贝消化腺组织中 GSH 检出量较对照组均有显著升高,与 Cheung 等^[2,15]在翡翠贻贝鳃中检测到的结果一致。这些结果暗示着上述组织中的抗氧化反应开启了贻贝体内抗击异生物质入侵的第一道防线。实验中高水平的 GSH 总伴随着高水平的 GPx,这是因为 GPx 活性会受到 GSH 水平的调控。另外, SDBS 暴露组中, GPx 活性与 CAT 活性与对照相比变化趋势相反,这与二者间底物存在竞争关系相关^[20]。

生物转化相 II 组分 GST 催化巯基尿酸合成的初始步骤,并催化 GSH 与异生物质及其代谢物结合,从而解毒细胞色素 P450 产生的 PAH 的环氧化物^[21]。GST 已被用作有机工业废水^[22]和人工合成有机物^[23]的生物标志物。在实验中, 3.0 mg/L SDS, SDBS 和 1.0 mg/L SDBS 组的 GST 活性均较对照组有

显著升高,此结果与 Suteau 等^[24]和 Livingstone^[25]的报道相一致。但 Akcha 等^[26]得到了相反的结果,即在污染地点取样的 GST 活性反而有下降。这是因为并不是所有的 GST 同工酶都是可诱导的,测定 GST 同工酶活性时必须考虑使用的底物的因素^[27]。另外,数据统计显示 SDBS 暴露组下 GST 与 GPx 呈显著正相关关系,这可能是 GST 和它的过氧化物类似异构体表达量相当所致^[7]。

一氧化氮(NO)由一氧化氮合成酶产生。已有研究表明, iNOS 可被异生物质诱导表达^[28]。本试验中所有实验组紫贻贝后闭壳肌中 iNOS 活性较对照都有显著下降,显示了它在作为此类污染物生物标志物方面可能具有广阔的应用前途。另外,后闭壳肌中 AKP 在暴露 72 d 后酶活性均无显著差异,可能是由于取样组织不合适的原因。

Pearson 相关系数分析显示多个酶间(GST 与 GPx、iNOS 与 SOD 等)均有一定的相关性。这是因为许多复合物都具有异生物质特性,但由抗氧化酶承担的细胞抗氧化反应在功能上有重叠,其活性之间也存在相关性。

4 结论

(1)综合分析污染物及其浓度和各项参数的关系,发现 SDBS 对紫贻贝生化指标影响的显著性水平要大于 SDS。

(2)数据统计分析显示多个酶间(GST 与 GPx、iNOS 与 SOD 等)均有一定的相关性。

(3)可以通过研究紫贻贝生化指标变化来反映阴离子表面活性剂污染的特征及影响程度,进而为海洋环境质量监测提供一种灵敏的预警方法和技术。

参考文献:

[1] Pisoni M, Cogotzi L, Frigeri A, et al. DNA adducts, benzo(a)pyrene monooxygenase activity, and lysosomal membrane stability in *Mytilus galloprovincialis* from different areas in Taranto coastal waters (Italy) [J]. Environmental Research, 2004, 96: 163 ~ 175.

- [2] Cheung C C C, Zheng G J, Li A M Y, *et al.* Relationships between tissue concentrations of polycyclic aromatic hydrocarbons and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*[J]. Aquatic Toxicology, 2001, **52**: 189 ~ 203.
- [3] Lau P S, Wong H L. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussels, *Perna viridis*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2003, **46**: 1563 ~ 1572.
- [4] Cheung C C C, Zheng G J, Lam P K S, *et al.* Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*[J]. Marine Pollution Bulletin, 2002, **45**: 181 ~ 191.
- [5] Niyogi S, Biswas S, Sarker S, *et al.* Seasonal variation of antioxidant and biotransformation enzymes in barnacle, *Balanus balanoides*, and their relation with polyaromatic hydrocarbons [J]. Marine Environmental Research, 2001, **52**: 13 ~ 26.
- [6] Viarengo A, Canesi L, Pertica M, *et al.* Seasonal variations in the antioxidant defence systems and lipid peroxidation of the digestive gland of mussels [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1991, **100C**: 187 ~ 190.
- [7] Borković S S, Šaponjić J S, Pavlović S Z, *et al.* The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2005, **141**(4): 366 ~ 374.
- [8] Leisinger T. Microorganisms and xenobiotic compounds [J]. Experientia, 1983, **39**: 1183 ~ 1191.
- [9] 李玉, 俞志明, 宋秀贤, 等. 胶州湾海水中阴离子表面活性剂的含量及分布[J]. 海洋与湖沼, 2005, **36**(3): 284 ~ 288.
- [10] Ye X, Li X, Shu C, *et al.* The effects of surfactants on the activity of invertase and superoxide dismutase of soybean leaf in vitro and in vivo[J]. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2000, **175**: 249 ~ 255.
- [11] da Silva M E F, Nice C M. Interaction of non-ionic surfactants with hepatic CYP in *Prochilodus scrofa*[J]. Toxicology In Vitro, 2004, **18**: 859 ~ 867.
- [12] Wu J F, Yu Z M, Song X X, *et al.* Comparative researches on effects of sodium dodecylbenzene sulfonate and sodium dodecyl sulfate upon *Lateolabrax japonicus* biomarker system [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, **20**: 465 ~ 470.
- [13] Peek K, Gabbot P A. Adipogranular cells from the mantle tissues of *Mytilus edulis* L. I. Isolation, purification and biochemical characteristics of dispersed cells[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1989, **126**: 203 ~ 216.
- [14] Livingstone D R, Lips F, Martinez P G, *et al.* Antioxidant enzymes in the digestive gland of the common mussel *Mytilus edulis*[J]. Marine Biology, 1992, **112**: 265 ~ 276.
- [15] Cheung C C C, Siu W H L, Richardson B J, *et al.* Antioxidant response to benzo[α]pyrene and Aroclor 1254 exposure in the green-lipped mussel, *Perna viridis* [J]. Environmental Pollution, 2004, **128**: 393 ~ 403.
- [16] Livingstone D R, Garcia-Martinez P, Michel X, *et al.* Oxyradical production as pollution-mediated mechanisms of toxicity in the common mussels, *Mytilus edulis* L., and other mollusks [J]. Functional Ecology, 1990, **4**: 415 ~ 424.
- [17] Lemaire P, Livingstone D R. Pro-oxidant/antioxidant processes and organic xenobiotic interactions in marine organisms, in particular the flounder *Platichthys flesus* and the mussel *Mytilus edulis*[J]. Trends in Comparative Biochemistry and Physiology I, 1993: 1119 ~ 1150.
- [18] Livingstone D R, Nasci C, Sole M, *et al.* Apparent induction of a cytochrome P450 with immunochemical similarities to CYP1A in digestive gland of the common mussel (*Mytilus galloprovincialis* L.) with exposure to 2, 2', 3, 4, 4', 5-hexachlorobiphenyl and Aroclor 1254[J]. Aquatic Toxicology, 1997, **38**: 205 ~ 224.
- [19] Thomas J P, Maiorino M, Ursini F, *et al.* Protective action of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase against membrane-damaging lipid peroxidation [J]. Journal of Biological Chemistry, 1990, **265**: 454 ~ 461.
- [20] Guyton K Z, Xu Q, Holbrook N. Induction of the mammalian stress response gene GADD153 by oxidative stress: role of AP-1 element [J]. Biochemical Journal, 1996, **314**: 547 ~ 554.
- [21] George S G. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes[A]. In: Malins D C, Ostrander G K (eds), Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives[C]. Boca Raton: Lewis Publishers, 1994. 37 ~ 85.
- [22] Sheehan D, Mc Intosh J, Power A, *et al.* Drug metabolism enzymes of mussels as bioindicators of chemical pollution [J]. Biochemical Society Transactions, 1995, **23**: 419 ~ 422.
- [23] Fitzpatrick P J, O' Halloran J, Sheehan D, *et al.* Assessment of a glutathione S-transferase and related proteins in the gill and digestive gland of *Mytilus edulis* (L.) as potential organic pollution biomarkers[J]. Biomarkers, 1997, **2**: 51 ~ 56.
- [24] Suteau P, Daubezz M, Migaud M L, *et al.* PAH metabolizing enzymes in whole mussel as biochemical tests for chemical pollution monitoring[J]. Marine Ecology Progress Series, 1988, **46**: 45 ~ 49.
- [25] Livingstone D R. The fate of organic xenobiotics in aquatic ecosystems: quantitative and qualitative differences in biotransformation by invertebrates and fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1998, **120A**: 43 ~ 49.
- [26] Akcha F, Izuel C, Venier P, *et al.* Enzymetic biomarker measurement and stud of DNA adduct formation in bezen[α]pyrene-contaminated mussels, *Mytilus galloprovincialis*[J]. Aquatic Toxicology, 2000, **49**: 269 ~ 287.
- [27] Fitzpatrick P J, Karg R O B, Hojrup P, *et al.* Characterization of a glutathione S-transferase and a related glutathione-binding protein from gill of the blue mussel, *Mytilus edulis* [J]. Biochemical Journal, 1995, **305**: 145 ~ 150.
- [28] Xiang Y, Rice C D. Expression of fish iNOS is increased by pro-inflammatory signals and xenobiotics [J]. Marine Environmental Research, 2000, **50**: 466 ~ 467.