

邻苯二甲酸二丁酯对翡翠贻贝抗氧化酶及脂质过氧化水平的影响*

秦洁芳^{1,2} 陈海刚^{1,2} 蔡文贵¹ 杨涛^{1,2} 贾晓平^{1**}

(¹ 中国水产研究院南海水产研究所广东省渔业生态环境重点实验室/农业部南海渔业资源环境重点野外科学观测实验站, 广州 510300; ² 上海海洋大学海洋科学学院, 上海 201306)

摘要 实验室条件下,研究了不同浓度邻苯二甲酸二丁酯(DBP)长期胁迫(15 d)对翡翠贻贝内脏团和外套膜抗氧化酶(超氧化物歧化酶SOD、过氧化氢酶CAT)及脂质过氧化(LPO)水平(以MDA含量表示)的影响,以及受胁迫翡翠贻贝在清洁海水中恢复阶段上述生化指标的变化特征。结果表明:胁迫阶段,0.5和2.5 mg·L⁻¹DBP下翡翠贻贝内脏团SOD活性表现为先抑制后逐渐恢复,12.5和62.5 mg·L⁻¹下则持续受到显著抑制;不同浓度组CAT活性均明显被抑制。LPO水平明显升高。外套膜中,2.5 mg·L⁻¹下SOD活性受到持续诱导,其他浓度组则先被抑制,后随曝露时间延长逐渐被诱导;各浓度组CAT的变化波动较大,没有明显规律;而LPO水平明显升高。净化恢复阶段,12.5和62.5 mg·L⁻¹DBP胁迫下的内脏团SOD和CAT活性恢复较慢,其LPO水平随时间延长逐渐恢复至对照组水平;外套膜中SOD活性呈持续升高趋势,CAT活性和LPO水平则随时间延长恢复到对照组水平。

关键词 邻苯二甲酸二丁酯 翡翠贻贝 超氧化物歧化酶 过氧化氢酶 丙二醛 脂质过氧化

文章编号 1001-9332(2011)07-1878-07 **中图分类号** X52, X592 **文献标识码** A

Effects of di-n-butyl phthalate on the antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation level of *Perna viridis*. QIN Jie-fang^{1,2}, CHEN Hai-gang^{1,2}, CAI Wen-gui¹, YANG Tao^{1,2}, JIA Xiao-ping¹ (¹Guangdong Province Key Laboratory of Fishery Ecology Environment/ Ministry of Agriculture Key Field Scientific Experimental Station of South China Fishery Resource and Environment, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China; ²College of Marine Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China). -*Chin. J. Appl. Ecol.*, 2011, 22(7): 1878-1884.

Abstract: A laboratory experiment was conducted to examine the superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) activities and the lipid peroxidation (LPO) level presented by malondialdehyde (MDA) in visceral mass and mantle of green mussel (*Perna viridis*) after exposure to 0.5- 62.5 mg·L⁻¹ of di-n-butyl phthalate (DBP) for 15 days, and to study the change characteristics of these biochemical indicators after the green mussel released into DBP-free seawater for 10 days. During exposure period, the SOD activity in visceral mass was inhibited first and then reached the level of the control at 0.5 and 2.5 mg·L⁻¹ of DBP, but inhibited significantly ($P < 0.01$) at 12.5 and 62.5 mg·L⁻¹ of DBP. The CAT activity in visceral mass was inhibited at all test concentrations of DBP, while the LPO level was obviously induced. During the chronic DBP exposure, the SOD and CAT activities in the mantle were induced significantly but had no regular pattern, and the LPO level was also obviously induced. After the exposed green mussel was released into clean seawater, the SOD and CAT activities in the visceral mass in 12.5 and 62.5 mg DBP·L⁻¹ groups recovered much slowly, but the LPO level gradually recovered to control

* 科技部科研院所社会公益研究专项(2005DIB3J021)、中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2009YD01)、广东省科技计划项目(2009B030600001)、中国水产科学研究院淡水生态与健康养殖重点开放实验室项目(2010FEA03006)和中央级公益性科研院所基本科研业务费专项(2010YD04)资助。

** 通讯作者。E-mail: jxp60@tom.com

2010-11-03 收稿, 2011-04-02 接受。

level. During the recovery period, the SOD activity in the mantle showed an increasing trend with time, but the CAT activity and LPO level reached gradually to the level of the control.

Key words: di-n-butyl phthalate (DBP); *Perna viridis*; superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT); malondialdehyde (MDA); lipid peroxidation (LPO).

2006 年,全球增塑剂消费量约 665×10^4 t,其中邻苯二甲酸酯类化合物(phthalate ester, PAEs)占所使用增塑剂的 88%,我国是世界最大的增塑剂消费国之一,PAEs 作为增塑剂在我国使用量巨大^[1]. 邻苯二甲酸二丁酯(di-n-butyl phthalate, DBP)是一种重要的 PAEs 化合物,是增塑剂中产量和用量最大的一类,同时也可用作油漆、胶粘剂、人造纤维、印刷油墨、安全玻璃、染料、杀虫剂、化妆品的溶剂和织物润滑剂等. 有研究认为, DBP 能抑制胚胎睾丸间质细胞类固醇生成、导致雄性生殖系统畸变,同时作为一种内分泌干扰激素, DBP 也具有明显的遗传毒性^[2]. DBP 被美国国家环保局列为优先控制的有毒污染物之一,在我国也被列入水体优先控制污染物名单. 当前的加工工艺过程中, DBP 没有与高分子碳链结合而极易释放到环境中,对环境安全造成危害. 目前,国外水体底泥中的 DBP 检出量为 $0.06 \sim 2.08 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[3], Huang 等^[4]对台湾 17 条河流底泥中的 PAEs 进行调查发现, DBP 含量在丰水期为 $0.05 \sim 0.22 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 枯水期为 $0.05 \sim 1.3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$; 在黄河干流小浪底和孟津桥水体中 DBP 的检出浓度为 21.0 和 $4.28 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[5], 长江武汉段丰水期和枯水期分别为 0.16 和 $24 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[6].

国内外对 DBP 毒性研究从 20 世纪 70 年代开始不断受到重视,目前 DBP 对水生动植物的毒性作用均有报道,主要涉及 DBP 对藻类、浮游生物和鱼类的繁殖、发育的影响以及 DBP 的富集和降解. 研究表明, DBP 对藻类生长具有抑制作用并呈现明显的剂量-效应关系^[7],且藻类对 DBP 存在明显的富集作用但生物降解作用并不明显^[8]. 一定浓度的 DBP 可缩短多刺裸腹蚤(*Moina macrocopa*)的世代时间、提高种群内禀增长率^[9],大型蚤生长繁殖在低浓度 DBP 下受刺激而高浓度下被抑制^[10]. Patyna 和 Cooper^[11]认为,低浓度的 DBP 持续暴露将使日本鳉(*Oryzias latipes*)子代繁殖力明显下降. DBP 对鱼的生理生化指标也存在明显影响.

海洋双壳贝类分布广,对有机污染胁迫反应明显并有极强的蓄积能力,其组织污染物浓度能够反映环境污染状况,因此常被用于监测海洋环境污染^[12]. 目前贝类作为试验生物进行生态毒理学研究

主要集中在两方面:1)利用贝类对污染物的高富集能力监测化合物的污染水平和在生物体内的蓄积过程,2)利用其生化指标的敏感性来研究污染物对水生生物的毒性效应. 翡翠贻贝(*Perna viridis*)是生态毒理学研究中的常用贝类,其对 PAHs 的蓄积量在短期生长个体中最大,且外套膜高于内脏团^[13]. 李晓东等^[14]研究表明,翡翠贻贝在三丁基锡胁迫下 GST 酶发生显著变化且组织差异明显. 目前国内外尚未见有关 DBP 对海洋贝类毒性效应的研究. 本文研究了 DBP 对翡翠贻贝内脏团和外套膜生化指标的影响,探讨了 DBP 对翡翠贻贝的毒性效应,为海洋贝类养殖的环境毒理学研究和海洋环境 PAEs 污染监测提供理论基础.

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

供试仪器 UV-7504 单光束紫外可见分光光度计购自江苏省常州市诺基仪器有限公司, DBP 购自广州化学试剂厂,纯度大于 99%. 以分析纯级丙酮助溶制备 $25 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 储备液. 试验容器为玻璃钢材质育苗桶,体积 500 L. 蛋白质和酶活性测试试剂盒,购于南京建成生物工程研究所.

1.2 试验动物和曝露条件

试验用翡翠贻贝购于海南陵水新村港市场,体质量 $15.58 \pm 3.39 \text{ g}$,暂养 7 d 后选取健康的个体进行试验. 根据预试验结果将 DBP 浓度设为 0.5 、 2.5 、 12.5 和 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以及溶剂对照组(丙酮 $<0.001\%$),试验用水量 100 L,每组放入 55 只翡翠贻贝. 试验水温 $20.5 \text{ }^\circ\text{C} \pm 1.9 \text{ }^\circ\text{C}$,盐度 36.0 ± 0.3 , pH 8.0,昼夜连续充气. 每 2 d 全部更换试验用水以保持稳定的试验浓度,每天定时投喂适量小球藻一次.

1.3 取样和测定方法

分别于曝露后的 0.5(12 h)、1、2、4、8、15 d 及移入干净海水进行恢复 2、5、10 d 取样,每组随机取 5 只翡翠贻贝,取出内脏团和外套膜,用 0.9% 预冷生理盐水淋洗、滤纸吸附后用预冷的 Tris-HCl 缓冲液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH 7.5)匀浆,组织质量(g)/缓冲液体积(mL)为 1/9, $4500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min

后,立即取上清液进行蛋白质含量和酶活力测定, LPO 水平以 MDA 含量衡量. 蛋白质和酶活性测定按照南京建成生物工程研究所蛋白质试剂盒、SOD 试剂盒和 MDA 试剂盒使用说明操作.

1.4 数据分析

基于 SPSS 13.0 采用 one-way ANOVA 进行单因素方差分析,显著水平设置在 $\alpha=0.05$. 抑制率的计算公式为:抑制率 = $(1 - \text{DBP 浓度组}/\text{对照组}) \times 100\%$.

2 结果

2.1 DBP 胁迫对翡翠贻贝内脏团和外套膜 SOD 活性的影响

2.1.1 内脏团 SOD 活性 与对照组相比, DBP $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组在胁迫前 4 d SOD 活性受到显著抑制 ($P < 0.05$), 8 d 开始恢复到对照组水平直到胁迫结束; $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组在胁迫前 4 d 都受到极显著抑制 ($P < 0.01$), 但 8 d 时恢复到对照组水平, 15 d 时极显著升高 ($P < 0.01$); 12.5 和 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ DBP 胁迫下 SOD 活性一直受到极显著抑制 ($P < 0.01$, 图 1a). 在 DBP 胁迫过程中, 0.5、2.5、12.5 和 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 SOD 活性在 2 d 时受到的抑制作用最强烈, 抑制率分别为 26.0%、44.2%、46.5% 和 35.1%. 表明低浓度 DBP 致翡翠贻贝内脏团 SOD 活性先抑制后升高, 而高浓度 DBP 则持续抑制其 SOD 活性.

DBP 胁迫解除并在清洁水体中净化 2 d 后, 各浓度组翡翠贻贝内脏团 SOD 活性均恢复至对照组水平; 但随着净化时间延长, 第 5 天内脏团 SOD 活性被显著诱导并明显升高; 而 SOD 活性在净化的第 10 天显著降低, 并且受到的抑制作用与 DBP 胁迫浓度呈明显的剂量-效应关系, 其中 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的抑制率为 44.6%.

2.1.2 外套膜 SOD 活性 在 DBP 胁迫前 2 d, 与对照组相比, 0.5 、 12.5 和 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组主要表现为受到抑制, 而 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组则受到显著诱导 ($P < 0.01$); 4 d 和 8 d 时各浓度组在对照组水平波动; 胁迫 15 d 各浓度组 SOD 与对照相比极显著升高 ($P < 0.01$, 图 1b). 可以看出, 0.5 、 12.5 和 $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组的 SOD 活性在 DBP 胁迫下表现为先受抑制降低, 而后逐渐升高; $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组则一直高于对照; 整个 DBP 胁迫过程中剂量-效应关系并不明显.

DBP 污染解除并在清洁水体中净化 2 d 后翡翠

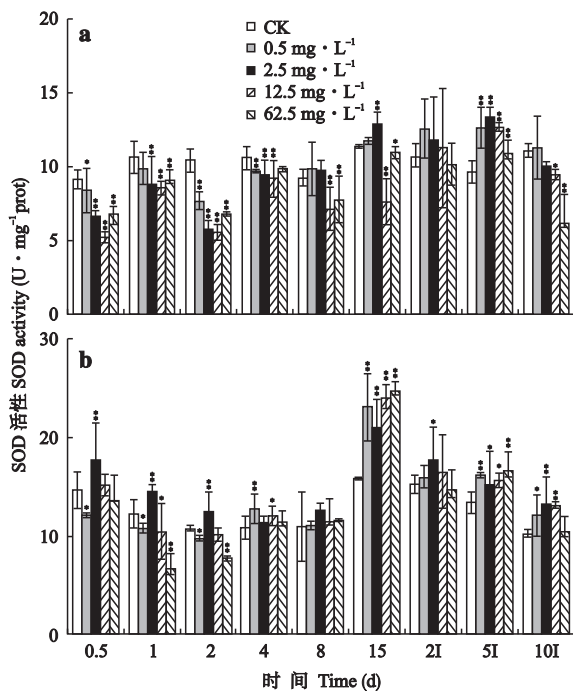


图 1 DBP 胁迫下翡翠贻贝内脏团和外套膜 SOD 活性变化
Fig. 1 Changes of SOD activity in visceral mass and mantle of *Perna viridis* exposed to DBP (mean \pm SD).

a) 内脏团 Visceral mass; b) 外套膜 Mantle; CK: 对照 Control. * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$. I: 释放 Recovery time. 下同 The same below.

贻贝外套膜 SOD 诱导率显著降低, 并基本恢复到对照水平, 但 5 d、10 d 的 SOD 活性又显著升高. 说明蓄积在外套膜上的 DBP 使其 SOD 活性仍受到影响.

2.2 DBP 胁迫对翡翠贻贝内脏团和外套膜 CAT 活性的影响

2.2.1 内脏团 CAT 活性 如图 2a 所示, DBP 胁迫开始 0.5 d 后翡翠贻贝内脏团 CAT 活性表现为受抑制降低; 胁迫 1 d 后, 0.5 、 2.5 、 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 活性比对照组极显著升高 ($P < 0.01$), $62.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组与对照组无显著差异; 2 d 时恢复到对照组水平, 其后 CAT 活性被抑制, 到 15 d 各浓度组 CAT 活性除 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组外都显著低于对照组 ($P < 0.05$). 翡翠贻贝内脏团 CAT 活性在 DBP 胁迫 15 d 过程中表现为抑制-诱导-抑制, 表明 DBP 对翡翠贻贝内脏团 CAT 活性的诱导具有滞后性. DBP 对翡翠贻贝内脏团 CAT 的影响具有较明显的时间-效应关系, 长期的 DBP 胁迫将抑制 CAT 活性.

DBP 胁迫解除并于清洁水体中净化 2 d 后, 2.5 和 $12.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 活性升高, 5 d 后 0.5 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组 CAT 活性升高, 10 d 后 0.5 和 $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组恢复到对照水平, 12.5 和

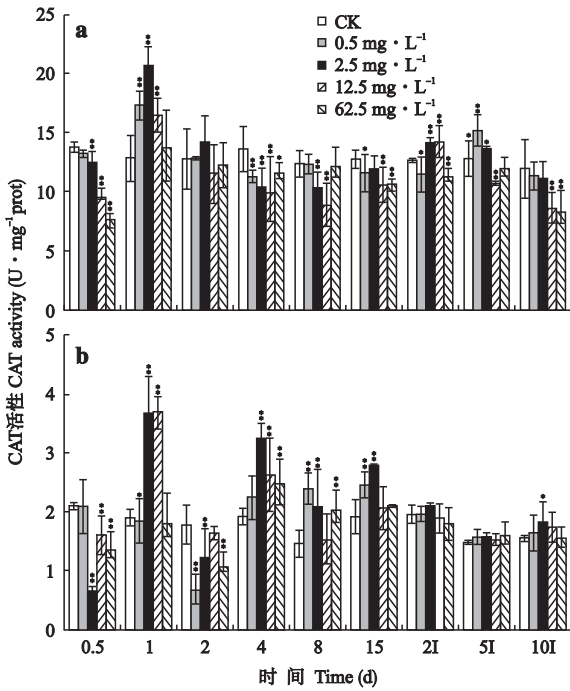


图2 DBP胁迫下翡翠贻贝内脏团和外套膜CAT活性变化
Fig.2 Changes of CAT activity in visceral mass and mantle of *Perna viridis* exposed to DBP (mean±SD).

62.5 mg · L⁻¹浓度组则极显著低于对照($P < 0.01$).表明低浓度的DBP胁迫后翡翠贻贝内脏团CAT活性在置于清洁水体一段时间后能恢复正常;而高浓度DBP胁迫下即使在DBP污染解除较长时间后翡翠贻贝内脏团CAT活性也难以恢复.

2.2.2 DBP外套膜CAT活性 与对照相比,DBP胁迫0.5 d后2.5、12.5和62.5 mg · L⁻¹浓度组翡翠贻贝外套膜CAT活性均表现为受抑制降低;1 d后2.5和12.5 mg · L⁻¹浓度组CAT活性极显著升高($P < 0.01$),其他无显著变化($P > 0.05$);2 d后各浓度组CAT活性再次表现为受抑制;其后在DBP持续胁迫下外套膜CAT活性升高,15 d后0.5和2.5 mg · L⁻¹浓度组极显著高于对照组($P < 0.01$),其他浓度组无显著变化($P > 0.05$,图2b).表明DBP胁迫对翡翠贻贝外套膜CAT活性在胁迫前期波动较明显,诱导具有一定的滞后性,而后期逐渐平稳,但都表现出显著的诱导或抑制.

DBP污染解除并于清洁水体中净化后,翡翠贻贝外套膜CAT活性均恢复到对照组水平($P > 0.05$).表明当DBP污染解除后翡翠贻贝外套膜CAT活性能够恢复到正常水平.

2.3 DBP胁迫对翡翠贻贝内脏团和外套膜LPO水平的影响

2.3.1 内脏团LPO水平 如图3a所示,DBP胁迫下

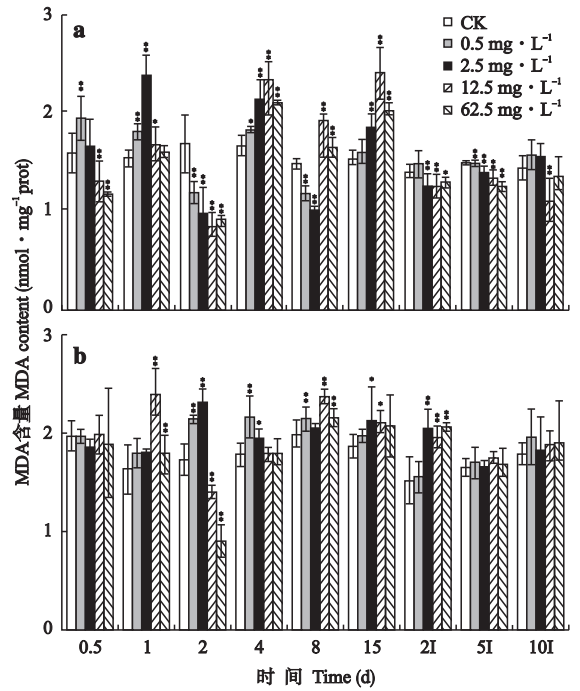


图3 DBP胁迫下翡翠贻贝内脏团和外套膜MDA含量变化
Fig.3 Changes of MDA content in visceral mass and mantle of *Perna viridis* exposed to DBP (mean±SD).

各浓度组翡翠贻贝内脏团中的MDA含量均有不同程度的增加,但波动较大,规律性不明显.与对照相比,0.5 d后0.5 mg · L⁻¹浓度组MDA含量极显著升高($P < 0.01$),其他浓度组无显著变化或低于对照;1 d后0.5、2.5和12.5 mg · L⁻¹浓度组MDA含量显著升高($P < 0.05$),62.5 mg · L⁻¹浓度组无显著变化;2 d后各浓度组MDA含量都低于对照,4 d后又显著升高($P < 0.05$);8 d后仅12.5和62.5 mg · L⁻¹浓度组MDA含量显著高于对照;胁迫15 d时各处理组MDA含量除0.5 mg · L⁻¹浓度组外都显著高于对照($P < 0.01$).可见DBP胁迫下翡翠贻贝内脏团LPO水平明显升高,过氧化损伤明显,但波动性大,时间-效应和剂量-效应都不明显.

DBP胁迫解除并于清洁水体中净化后,翡翠贻贝内脏团MDA含量下降,试验结束时恢复到或低于对照水平.表明DBP胁迫解除后翡翠贻贝内脏团LPO水平可恢复到正常.

2.3.2 外套膜LPO水平 如图3b所示,DBP胁迫0.5 d下翡翠贻贝外套膜MDA含量没有明显变化;DBP胁迫1 d后与对照相比,仅12.5 mg · L⁻¹浓度组MDA含量极显著升高($P < 0.01$),其他浓度组保持不变;DBP胁迫2 d、4 d后0.5和2.5 mg · L⁻¹浓度组MDA含量显著高于对照($P < 0.05$),其他浓度组低于对照或无显著变化;DBP胁迫8 d后0.5、

12.5 和 62.5 mg · L⁻¹ 浓度组 MDA 含量均极显著高于对照 ($P < 0.01$); 15 d 后, 2.5 和 12.5 mg · L⁻¹ 浓度组 MDA 含量仍显著高于对照 ($P < 0.05$). 表明 DBP 胁迫中期显著提高了翡翠贻贝外套膜的 LPO 水平, 氧化损伤严重; 但胁迫后期 LPO 水平降低, 氧化损伤程度减轻.

DBP 污染解除并于清洁水体中净化 2 d, 与对照相比, 2.5、12.5 和 62.5 mg · L⁻¹ 浓度组 MDA 含量仍极显著升高, 5 d、10 d 各浓度组 MDA 含量即恢复到对照水平. 表明翡翠贻贝外套膜 LPO 水平在 DBP 污染解除后可恢复到正常, DBP 对外套膜造成的氧化损伤消除.

3 讨 论

3.1 DBP 胁迫下翡翠贻贝体内生化指标的响应

抗氧化酶在防御机体氧化损伤中具有重要作用, 其中 SOD 能将氧自由基转化成 H₂O₂, CAT 能进一步将 H₂O₂ 转化成水, 消除污染物造成的自由基离子损伤. 有研究认为, DBP 对生物 SOD 和 CAT 活性均有抑制作用^[15]. 本研究中长期 DBP 胁迫下翡翠贻贝内脏团 SOD 和 CAT 活性都受到了显著抑制; 2.5 mg · L⁻¹ 浓度组外套膜 SOD 活性一直受到抑制, 而其他浓度组在 DBP 胁迫早期受到抑制、后期被诱导, 其 CAT 活性变化波动较大, 但诱导和抑制变化都很明显. 可以看出翡翠贻贝抗氧化酶防御系统对 DBP 胁迫产生抗氧化压力做出了应激反应, 且反应明显, 但不同的抗氧化酶变化存在差异. 蔡立哲等^[16]研究 PAHs 对菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*) 抗氧化酶活性的影响时发现, PAHs 对 SOD 和 CAT 活性的影响均表现为先诱导后抑制. 翡翠贻贝体内 SOD 和 CAT 活性的变化符合生物免疫机能的作用规律: 首先由于 DBP 胁迫初期翡翠贻贝抗氧化应激作用的延迟, SOD 和 CAT 活性尚未被诱导使酶蛋白被破坏或消耗从而导致抗氧化酶活性降低; 之后随着 DBP 胁迫时间的延长, 生物体产生的氧自由基逐渐超出了其自我代偿能力导致相关酶活性下降. 本研究中 SOD 和 CAT 活性的变化没有明显的同步性, 这可能与两种酶的受影响模式不同有关. SOD 歧化 O₂⁻ 产生的 H₂O₂ 并不是完全由 CAT 还原, GPx 也可将其还原, 且此途径也不是 H₂O₂ 的唯一来源, 氨基酸或细胞色素 P450 氧化酶激活也可产生 H₂O₂^[17].

MDA 是脂质过氧化的主要产物之一, 其含量的高低可指示生物膜脂过氧化的程度, 目前已较多

地应用于水生生态毒理学研究. 谷巍等^[18]发现, 重金属作用下鱼草 (*Cabomba caroliniana*) 活性氧和 MDA 含量上升, 其抗氧化酶系统活性紊乱, LPO 水平上升; 纪靓靓等^[19]发现污染物促进了自由基的产生, 使抗氧化酶活性改变, MDA 极显著升高. 本研究中翡翠贻贝内脏团和外套膜中 MDA 含量在 DBP 胁迫下波动虽然较大, 但与对照组相比仍均有明显升高, 至 DBP 胁迫结束其 LPO 水平仍表现为升高. 陈海刚等^[20]研究中, 氯化三丁基锡胁迫下黑鲷 (*Sparus macrocephalus*) 鳃 SOD 活性受抑制而肝脏的受促进, 但两组织的 MDA 含量起初升高到试验结束时降低, 与本研究结果存在一定差异. 无论 SOD 和 CAT 活性是受到显著抑制还是促进, 翡翠贻贝组织的 LPO 水平仍升高, 表明 DBP 胁迫使翡翠贻贝体内氧自由基迅速增加, 抗氧化防御体系仅能清除出部分自由基从而缓解其对贻贝造成的部分损伤, 余下未能及时清除的自由基对细胞产生了不可逆转的损害, 导致机体 LPO 水平升高.

污染物浓度不同对机体的损害也不尽相同, 往往表现出一定的剂量-效应关系. 目前对石油类的研究中, 水生生物体内酶活性都呈现不同程度的剂量-效应关系^[21]. 但也有研究认为, 不同浓度的有机污染物对机体酶活性影响不显著, 李佳华等^[22]研究认为, 苦草 (*Vallisneria spiralis*) 中 MDA 和可溶性糖含量以及叶片中叶绿素含量与 DBP 浓度之间相关关系不显著. 本研究中 DBP 胁迫下翡翠贻贝的 SOD 和 CAT 活性没有表现出明显的剂量-效应关系, 但从总体来看外套膜 SOD 活性在时间上表现为先抑制后激活 (除外套膜 2.5 mg · L⁻¹ 浓度组), 内脏团 CAT 活性先由于生物的延迟效应受抑制, 而后被激活再被抑制, 表现出一定的时间-效应关系; 2.5 mg · L⁻¹ 浓度组的抗氧化酶活性与其他浓度组间表现出明显差异, 可能与污染物低剂量胁迫诱导生物体产生的相关应激反应有关. Stebbing^[23]认为, 机体在毒物低浓度下会出现这种现象, 并把这一现象称为“毒物兴奋效应”. Pan 等^[24]试验过程中发现, 低浓度 PAHs 胁迫下栉孔扇贝 (*Chlamys farreri*) 血淋巴 SOD 活性持续上升, 高浓度胁迫下 SOD 活性表现为先升后降. DBP 胁迫下翡翠贻贝外套膜 CAT 活性和 MDA 含量随曝露时间的变化呈无规律的波动变化, 具体表现为“抑制-诱导”效应、“升高-降低”的反复, 王隽媛^[25]对斑马鱼 (*Danio rerio*) 受萘胁迫的研究中也发现其内脏团抗氧化系统酶出现了如此反复的情况. 综上, 翡翠贻贝抗氧化系统的变

化可以从三方面解释:1)DBP 重度和(或)长期胁迫产生的氧化压力超出了翡翠贻贝个体的调节能力,使抗氧化酶活性降低,抗氧化物减少,LPO 水平升高;2)抗氧化酶防御体系中存在过多的氧化剂,包括抗氧化酶体系中产生的氧化剂,则其体系内的酶活性将受到抑制,如 SOD 活性会受到过氧化氢的抑制,过氧化氢酶也会受到过多的超氧根离子的抑制^[26];3)抗氧化酶可受到来自环境条件、试验生物、污染物性质等方面的影响,其变化可能呈现不同的规律。

3.2 DBP 污染解除后翡翠贻贝体内生化指标的响应

机体对污染物胁迫而产生的应激效应一般会随着胁迫的解除而停止。黄周英等^[27]研究认为,三丁基锡(TBT)胁迫下文蛤(*Meretrix meretrix*)消化腺 SOD 活性和 MDA 含量都明显升高,CAT 活性在初期受到诱导而后无影响,在清水中恢复 20 d 后各指标恢复到对照组水平。在苯并[a]芘胁迫下褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)抗氧化酶被显著诱导,随着胁迫时间延长 DNA 损伤加重,但胁迫 50 d 结束后进行 20 d 的恢复其抗氧化酶和 DNA 损伤都得到了恢复^[28]。本研究中,清洁海水净化期间翡翠贻贝内脏团 SOD 和 CAT 活性在 12.5 和 62.5 mg·L⁻¹浓度组中仍受到显著抑制($P < 0.05$),但 LPO 水平恢复到或低于对照;外套膜中的 SOD 活性表现出上升趋势,CAT 活性和 LPO 水平则恢复到对照水平,表明 DBP 胁迫对翡翠贻贝产生的损伤在污染解除后能够恢复,但由于不同酶的性质不同,其所需的恢复时间也不一样;外套膜与污染物长时间直接接触,胁迫解除后其 SOD 迅速恢复。本试验 SOD 活性恢复并持续升高的原因可能由于 SOD 较敏感,生物体解除曝露后可呈现一定范围的“过度应激”反应,但其机理有待进一步深入探讨。此外,污染解除后,低剂量 DBP 比高剂量 DBP 的翡翠贻贝恢复得更快,说明虽然受 DBP 胁迫 15 d 后各浓度组翡翠贻贝 LPO 水平较对照组没有显著升高,但从它们的恢复情况来看,低剂量 DBP 对翡翠贻贝的胁迫程度低于高剂量 DBP。综上,DBP 胁迫对翡翠贻贝造成的氧化损伤是可以恢复的,在实际的污染治理中可以通过控制水体中 PAEs 含量来降低其对水生生物的危害,但长期的 PAEs 对水生生物造成的可遗传的毒性破坏则可能是不可逆的,这就需要从根本上解决 PAEs 污染问题。

3.3 翡翠贻贝不同组织对 DBP 胁迫响应的差异性

不同的组织由于其生理功能上的差异导致其解毒能力也会不同,因此各种酶在不同组织间的活性存在很大差异。内脏团是贻贝消化道和其他内脏器官的总称,而外套膜上的粘液细胞作为贝类免疫的第一道防线在防护免疫过程中作用十分重要,但贻贝对有毒物质的排出主要通过血细胞渗出和分泌贝壳进行;另外贻贝为滤食性动物,而水体中的污染物仅有大小适中的能够进入其体内,那些颗粒较大的则沉淀在外套膜上,导致外套膜上的污染物蓄积较其他组织多^[13]。陈荣等^[29]认为,牡蛎(*Ostrea cucullata*)消化腺的 SOD 和 CAT 活性远高于鳃,且活性随着石油烃含量的增加而增强。李文英等^[30]认为,DBP 胁迫下斑马鱼(*Brachydanio rerio*)不同组织中 SOD 活性变化的差异也很明显,内脏团中 SOD 活性为先抑制后激活总体为抑制,鳃丝中为先激活后抑制总体也为抑制。本研究中,翡翠贻贝内脏团 CAT 活性显著高于外套膜,外套膜 SOD 活性显著高于内脏团,两种组织的 LPO 水平变化近似。表明翡翠贻贝内脏团和外套膜中的抗氧化酶由于组织生理功能的差异而不同,同时对 DBP 胁迫反应的灵敏性也不同。

总之,抗氧化体系的变化反应了 DBP 对翡翠贻贝的毒性作用;SOD 和 CAT 活性被明显诱导(或抑制),MDA 含量在 DBP 胁迫下明显升高。值得注意的是,抗氧化酶活性的变化是一个动态过程,其变化受到多因素制约,这些因素可以是污染物种类和浓度,也可以是试验生物、环境条件等;MDA 含量也可能因时间累积而升高;翡翠贻贝内脏团和外套膜中的 SOD 和 CAT 活性大小和变化规律差异显著。因此,在考虑利用生理生化指标监测环境中的 PAEs 时需要考虑多方面的条件和因素,筛选出最合理、最具指示性的生物和指标。

参考文献

- [1] Tao G (陶刚), Liang C (梁诚). Analysis on development tendency of domestic and global plasticizer market. *Plastics Science* (塑料科技), 2008, **36**(6): 78-81 (in Chinese)
- [2] Liu H-J (刘慧杰), Shu W-Q (舒为群). Advances in reproductive and developmental toxicity of dibutyl phthalate. *Journal of Environment and Health* (环境与健康杂志), 2004, **21**(2): 122-124 (in Chinese)
- [3] Hermann F, Thomas K, Thomas O, et al. Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the environment. *Water Research*, 2002, **36**: 1429-1438
- [4] Huang PC, Tien CJ, Sun YM, et al. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor. *Chemosphere*, 2008, **73**: 539-544

- [5] Sha Y-J (沙玉娟), Xia X-H (夏星辉), Xiao X-Q (肖翔群). Distribution characters of phthalic acid ester in the waters middle and lower reaches of the Yellow River. *China Environmental Science* (中国环境科学), 2006, **26**(1): 120-124 (in Chinese)
- [6] Wang F (王凡), Sha Y-J (沙玉娟), Xia X-H (夏星辉), et al. Distribution characteristics of phthalic acid esters in the Wuhan section of the Yangtze River. *Environmental Science* (环境科学), 2008, **29**(5): 1163-1169 (in Chinese)
- [7] Hu Q-Q (胡芹芹), Xiong L (熊丽), Tianper XZ, et al. Toxic effects of dibutyl phthalate (DBP) on *Scenedesmus obliquus*. *Asian Journal of Ecotoxicology* (生态毒理学报), 2008, **3**(1): 87-92 (in Chinese)
- [8] Liu H (刘华), Shen X-T (沈新天), Sun L-N (孙丽娜), et al. Accumulation and biodegradation of dibutyl phthalate in *Chlorella vulgaris*. *Journal of Agro-Environment Science* (农业环境科学学报), 2008, **27**(6): 2391-2395 (in Chinese)
- [9] Wang J-X (王金霞), Xi Y-L (席贻龙), Liu X-B (刘晓波), et al. Toxicity of dibutyl phthalate to cladoceran *Moina macrocopa*. *Chinese Journal of Ecology* (生态学杂志), 2009, **28**(7): 1335-1339 (in Chinese)
- [10] Huang G-L (黄国兰), Sun H-W (孙红文), Gao J (高娟), et al. Study on toxic effects of dibutyl phthalate on *Daphnia magna*. *Environmental Chemistry* (环境化学), 1998, **17**(5): 428-433 (in Chinese)
- [11] Patyna P, Cooper KR. Multigeneration reproductive effects of three phthalate esters in Japanese medaka (*Oryzias latipes*). *Marine Environmental Research*, 2000, **50**: 194-199
- [12] Yang X-L (杨小玲), Yang R-Q (杨瑞强), Jiang G-B (江桂斌). Using *Mytilus edulis* and *Perna viridis* as bioindicators to monitor butyltins pollution along the Bohai coastal sites. *Environmental Chemistry* (环境化学), 2006, **25**(1): 88-91 (in Chinese)
- [13] Wang S-H (王淑红), Wang X-H (王新红), Hong H-S (洪华生). Specific characteristic of tissue bioaccumulation of PAHs in green lipped mussels (*Perna viridis*) at different growth stages. *Marine Environmental Science* (海洋环境科学), 2005, **24**(3): 29-32 (in Chinese)
- [14] Li X-D (李晓东), Chen R (陈荣), Liu H (刘辉). Effects of TBT on the activity of glutathione S-transferase in green mussel. *Journal of Xiamen University* (Natural Science) (厦门大学学报·自然科学版), 2009, **48**(3): 423-428 (in Chinese)
- [15] Prasanth GK, Divya LM, Sadasivan C. Effects of mono and di(n-butyl)phthalate on superoxide dismutase. *Toxicology*, 2009, **262**: 38-42
- [16] Cai L-Z (蔡立哲), Ma L (马丽), Gao Y (高阳), et al. The effects of anthracene, phenanthrene, pyrene and chrysene on activity of antioxidant enzyme of *Ruditapes philippinarum*. *Marine Science* (海洋科学), 2005, **29**(8): 47-52 (in Chinese)
- [17] Peters LD, Porte C, Albaiges J, et al. 7-Ethoxyresorufin O-deethylase (EROD) and antioxidant enzyme activities in larvae of sardine (*Sardina pilchardus*) from the north coast of Spain. *Marine Pollution Bulletin*, 1994, **28**: 299-304
- [18] Gu W (谷巍), Shi G-X (施国新), Cao J-G (巢建国), et al. Toxic effects of Hg²⁺, Cd²⁺ and Cu²⁺ on cell membrane system of *Cabomba caroliniana*. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2008, **19**(5): 1138-1143 (in Chinese)
- [19] Ji L-L (纪靓靓), Li F-Y (李法云), Luo Y (罗义). Free radicals in *Carassius auratus* liver: Their generation and oxidative stress induced by 2, 4, 6-trichlorophenol. *Chinese Journal of Applied Ecology* (应用生态学报), 2007, **18**(1): 129-132 (in Chinese)
- [20] Chen H-G (陈海刚), Ma S-W (马胜伟), Lin Q (林钦), et al. Effects of tributyltin chloride (TBTCl) on SOD activities, MDA contents and GPx activities in gill and liver of the black porgy (*Sparus macrocephalus*). *South China Fisheries Science* (南方水产), 2009, **5**(2): 23-27 (in Chinese)
- [21] Yu Q (余群), Zheng W-Y (郑微云), Weng Y (翁妍), et al. Effect of petroleum pollutant on SOD and CAT enzyme in viscera tissue of *Pagrosomus major*. *Journal of Xiamen University* (Natural Science) (厦门大学学报·自然科学版), 1999, **38**(3): 429-434 (in Chinese)
- [22] Li J-H (李佳华), Mu J-L (慕君玲), Guo H-Y (郭红岩), et al. Effects of dibutyl phthalate (DBP) pollution on the physiological index of *Vallisneria spiralis* L. *Environmental Chemistry* (环境化学), 2005, **24**(1): 31-35 (in Chinese)
- [23] Stebbing ARD. Tolerance and hormesis-increased resistance to copper in hydroids linked to hormesis. *Marine Environmental Research*, **54**: 805-809
- [24] Pan LQ, Ren JY, Liu J. Responses of antioxidant systems and LPO level to benzo (a) pyrene and benzo (k) fluoranthene in the haemolymph of the scallop *Chlamys farreri*. *Environmental Pollution*, 2006, **141**: 443-451
- [25] Wang J-Y (王隽媛). Stress and Biological Response of Naphthalene on the Antioxidant Defense System in Zebrafish (*Danio rerio*). Master Thesis. Changchun: Northeast Normal University, 2008 (in Chinese)
- [26] Bagnyukova TV, Chaharak OI, Lushchak VI. Coordinated response of goldfish antioxidant defenses to environmental stress. *Aquatic Toxicology*, 2006, **78**: 325-331
- [27] Huang Z-Y (黄周英), Chen Y-X (陈奕欣), Zuo Z-H (左正宏), et al. Effects of tributyltin on lipid peroxidation and antioxidant enzymes activity of digestive gland in hard clam *Meretrix meretrix*. *Journal of Xiamen University* (Natural Science) (厦门大学学报·自然科学版), 2006, **45**(1): 102-105 (in Chinese)
- [28] Wang Y (王云), Wang S-C (王顺昌), Lu J-F (陆剑锋). Impact of benzo (a) pyrene on DNA damage and antioxidative activities in liver of *Sebastes marmoratus*. *Carcinogenesis, Teratogenesis & Mutagenesis* (癌变·畸变·突变), 2009, **21**(4): 276-279 (in Chinese)
- [29] Chen R (陈荣), Zheng W-Y (郑微云), Yu Q (余群), et al. Effect of oil pollution on antioxidant enzyme of oyster (*Ostrea cucullata*). *Acta Scientiae Circumstantiae* (环境科学学报), 2002, **22**(3): 385-389 (in Chinese)
- [30] Li W-Y (李文英), Xiong L (熊丽), Liu R (刘荣), et al. Effects of DBP on physiological and biochemical characteristics of *Brachydanio rerio*. *Asian Journal of Ecotoxicology* (生态毒理学报), 2007, **2**(1): 117-122 (in Chinese)

作者简介 秦洁芳,女,1985年生,硕士研究生.主要从事渔业生态环境保护研究. E-mail: qjf.31128@yahoo.com.cn

责任编辑 肖红