

· 研究论文 ·

溴氰菊酯对麦穗鱼谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTs) 的影响

尹晓辉^{1,2}, 林荣华¹, 陶传江¹, 姜 辉¹, 赵震宇³, 高希武^{2*}

(1. 农业部农药检定所 生物技术研究测试中心, 北京 100026; 2 中国农业大学 昆虫学系, 北京 100094;
3. 新疆农业大学 农学院, 新疆 乌鲁木齐 830000)

摘 要: 研究了溴氰菊酯不同浓度、不同处理时间对麦穗鱼体内谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTs) 活性的影响, 同时测定了麦穗鱼不同组织中谷胱甘肽 S 转移酶对低浓度溴氰菊酯处理的反应特点。结果表明, 处理 48 h 后, 高浓度 (0.009 mg/L) 组对肝中 GSTs 活性的抑制率达到 43.7%, 对鳃中 GSTs 活性的抑制率达 54.3%; 而低浓度组 (0.001 mg/L) 对鳃中 GSTs 活性有一定的诱导作用。亚致死剂量的溴氰菊酯 (3.0×10^{-4} mg/L) 处理 96 h 后, 对卵巢的诱导活性最高, 其 GSTs 活性是对照的 2.43 倍, 但对肝、鳃、肾、肠的诱导作用均较低。溴氰菊酯对麦穗鱼不同组织 GSTs 活性诱导的时间效应和强度不同。

关键词: 溴氰菊酯; 谷胱甘肽 S 转移酶 (GSTs); 麦穗鱼; 抑制作用; 诱导作用

中图分类号: S481.1 文献标识码: A 文章编号: 1008-7303(2005)03-0249-05

The Effect of Deltamethrin on Specific Activities of GSTs in *Pseudorasbora parva*

YN Xiao-hui^{1,2}, LN Rong-hua¹, TAO Chuan-jiang¹,
JIANG hui¹, ZHAO Zhen-yu³, GAO Xi-wu^{2*}

(1. The Center for Agrochemicals Biological and Environmental Technology, Institute for the Control of Agrochemicals, Ministry of Agriculture, P. R. China, Beijing 100026, China;
2. Department of Insect, China Agricultural University, Beijing 100094, China;
3. College of Agriculture, Xinjiang Agricultural University, Urumqi 830000, China)

Abstract: The topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*) was exposed to different concentrations of deltamethrin in statics for 96 h, and the effects of deltamethrin on the specific activities of glutathione S-transferase (GSTs) were evaluated at the end of 6 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h, and 96 h pesticide exposure. The specific activities of GSTs were measured in supernatant after centrifugation (10 000 g) of homogenation from liver, gill, kidney, muscle and ovary of topmouth gudgeon. The results indicated that the specific activities of GSTs were significantly inhibited by deltamethrin in high concentrations (0.009 mg/L), and the specific activities of GSTs were reduced 43.7% in liver and 54.3% in gill at the end of 48 h. Under lower concentrations (0.001 mg/L), the specific activities of GSTs in gill were induced, but not significantly. The specific GSTs activities of ovary in topmouth

收稿日期: 2005-03-07; 修回日期: 2005-04-28

作者简介: 尹晓辉 (1977-), 女, 硕士研究生, 主要从事农药环境毒理研究; *通讯作者: 高希武 (1958-), 男, 河北唐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事昆虫毒理学研究。联系电话: 010-62732974; E-mail: gaowixu@263.net.cn

基金项目: “十五”国家科技攻关项目 (2001BA509B08)。

gudgeon, at the end of 96 h exposure to 3.0×10^{-4} mg/L deltamethrin, were 143% increased compare with that of control. The levels of induction were variable in different organ, and changed with exposed time. Therefore, future studies should be carried out to understand the underlying mechanisms involved in longtem toxicity profile of deltamethrin.

Key words: deltamethrin; *Pseudorasbora parva*; glutathion S-transferase (GSTs); inhibition; induction

溴氰菊酯是一种广谱的具有触杀和胃毒作用的拟除虫菊酯类杀虫剂,在大部分动物体内很容易代谢,但由于鱼体内缺乏代谢水解拟除虫菊酯的酶,同时因鱼鳃对溴氰菊酯有很高的吸收率而成为其毒性攻击的靶标器官,故拟除虫菊酯类杀虫剂对鱼等各种水生生物有剧毒^[1]。有报道称在匈牙利曾出现因溴氰菊酯污染导致 30 吨鳗鲡 *Anguilla - anguilla* 死亡的生态灾难^[2]。因此,我国一直禁止在稻田中使用对鱼类毒性较高的拟除虫菊酯类农药。

麦穗鱼 *Pseudorasbora parva* 是广泛分布于淡水中的小型鱼类,属鲤科、鮡亚科,其分布广,数量大,适应性强,易在实验室饲养,对遗传毒性效应比较敏感,是比较理想的水生毒理学实验材料,可作为一种淡水水体污染的监测生物^[3]。

谷胱甘肽 S 转移酶 (glutathione S-transferase, 简称 GSTs) 是生物体内重要的代谢酶系。GSTs 催化内源性谷胱甘肽与底物进行亲核反应,将亲电底物中的基团转移到内源性的还原型谷胱甘肽的 S 原子上^[4]。鱼体中的可溶性 GSTs 能催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与亲电子物质结合形成硫醇尿酸,经肾脏排出体外,这是鱼体内代谢有毒化合物的主要途径之一^[5]。

Hayes 等报道^[6], GSTs 参与有机磷农药的轭合和卤代还原反应是 GSTs 表达和发挥催化作用的一个重要特征。当生物体接触环境中的污染物后, GSTs 作为一种指示标志会发生改变。据报道,林丹和氯菊酯能显著提高钩虾 *Gammarus pulex* 的 GSTs 活性,作为生物标志其灵敏度比毒性试验的要高,且具有明显的剂量效应关系^[7]。van der 等也认为 GSTs 可作为水环境中农药污染物监测的生化标记^[8]。以往更多专家关注于双壳纲水生生物 GSTs 作为生化标记的研究,有关鱼 GSTs 的研究甚少。本研究的目的是明确溴氰菊酯对麦穗鱼 GSTs 影响的剂量-效应关系和时间-效应关系,为进一步探索 GSTs 作为水体菊酯类农药污染的生物化学标记提供科学依据,并为菊酯类农药在生态环境

中的应用和评价提供可靠的信息。

1 材料与方法

1.1 供试药剂和主要仪器

2,4-二硝基氯苯 (CDNB) 和还原型谷胱甘肽 (GSH) 为 Sigma 公司产品;牛血清白蛋白 (BSA) 购自北京同正生物公司。其他试剂均为国产分析纯。

98% 溴氰菊酯 (deltamethrin) 原药由南京第一农药厂提供。

高速冷冻离心机 (Biofuge 28RS), 日本岛津 UV-2550 紫外-可见分光光度计。

1.2 供试鱼和试验用水

麦穗鱼 *Pseudorasbora parva* 购于北京市通州区,体长 8~10 cm,体重 3~5 g/条,实验前在去氯的自来水中驯养 7 d,自然死亡率在 2% 以下,光周期为 L/D (12 h/12 h),室内温度 15 ± 2 ,相对湿度 85% 左右,水温 13 ± 2 ,溶解氧不低于饱和点的 60%,pH 7.8。

1.3 酶液制备

将麦穗鱼暴露于含有不同浓度溴氰菊酯 (0.009、0.008、0.007、0.006、0.005、0.003、0.001 mg/L) 的水中。分别在不同时间取样,解剖并取出肝胰脏、肠、肾、鳃、肌肉、卵巢,按每个组织加 1 mL 磷酸缓冲液 (pH 6.5) 匀浆,匀浆液在 10 000 g 离心 20 min,取上清液于 -80 保存作为酶源。共重复 3 次,并以不加溴氰菊酯的清水为对照。

1.4 GSTs 活性测定

参照 Habig 等^[9]方法。在室温下,加入 0.1 mol/L pH 6.5 的磷酸缓冲液 2.7 mL, 30 mmol/L CDNB 和 20 mmol/L GSH 各 0.1 mL,于 340 nm 波长处,用时间驱动程序自动监测其光吸收值在 3 min 内的变化。并按以下公式计算酶活力单位:

$$\text{GSTs 活力单位 (nmol/min)} = \frac{(OD_{340} \times V)}{(\times L)}$$

式中 OD_{340} 为每分钟光吸收的变化值, V 为酶促反应体积 (3 mL), ϵ 为产物的摩尔消光系数 ($0.0096 \text{ L}/\mu\text{mol} \cdot \text{cm}$), L 为比色杯的光程 (1 cm)。

1.5 蛋白质含量测定和比活力计算

参照 Bradford^[10] 的考马斯亮蓝 G-250 方法, 以牛血清白蛋白作标准曲线。

酶比活力 [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg pro})^{-1}$]: 酶活力单位 / 测定所用酶液蛋白量。

1.6 数据分析

用 Instat 统计软件对结果进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 不同浓度溴氰菊酯对麦穗鱼 GSTs 的影响

在急性毒性浓度范围内测定了 7 个处理组麦

穗鱼 GSTs 活性, 结果如图 1 所示, 不同浓度溴氰菊酯处理麦穗鱼 48 h 后, 对其肝脏和鳃中 GSTs 活性产生了不同的影响。对于肝脏组织, 抑制作用随药剂浓度的增加而增强, 从 0.005 mg/L 处理组开始, 酶活性呈明显下降趋势, 最高浓度 0.009 mg/L 处理组比对照组 GSTs 活性下降了 43.9% ($P < 0.01$); 而最小浓度 0.001 mg/L 处理组酶活性比对照略有升高, 升高了 11.5%。在鳃组织中, 抑制作用也随药剂浓度的增加而增强, 0.009 mg/L 处理组 GSTs 活性显著下降了 54.3% ($P < 0.001$), 而最小浓度 0.001 mg/L 处理组酶活性高于对照, 升高了 33.5% ($P < 0.05$)。肝和鳃中 GSTs 活性均随溴氰菊酯处理浓度的升高而有逐渐下降的趋势, 低浓度时酶活性略有升高。

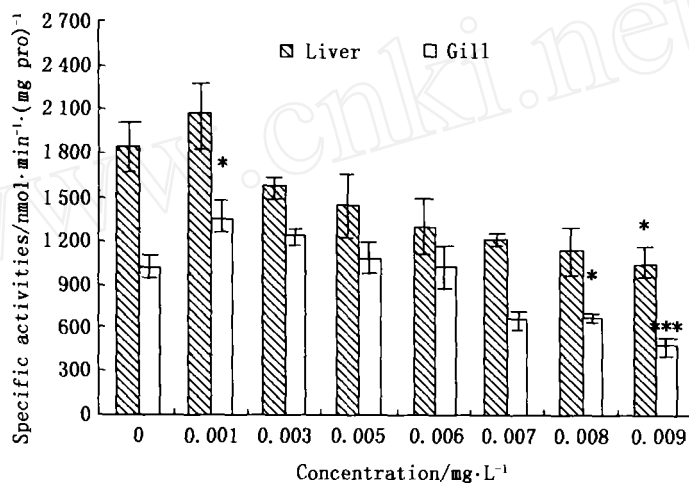


Fig 1 GST activities in *P. pavana* after 48 h exposure to various concentration deltamethrin

Note: Values followed by * and *** are significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.001$)

2.2 溴氰菊酯对麦穗鱼不同组织 GSTs 活性的影响

图 2 表明, 溴氰菊酯 (浓度为 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$) 处理麦穗鱼 6 h 和 96 h 后, 麦穗鱼不同组织中 GSTs 活性的变化。暴露 6 h, 不同组织中 GSTs 活性在处理组和对照之间差异不显著。暴露 96 h, 处理和对照间有显著差异, 其中卵巢的 GSTs 活性处理组显著高于对照组 ($P < 0.01$), 是对照组的 2.43 倍; 肾、肝、肠和鳃中 GSTs 活性处理组分别是对照组的 1.86、1.62、1.60 和 1.24 倍, 差异显著 ($P < 0.05$); 肌肉中 GSTs 活性处理组和对照组间差异不显著。

2.3 溴氰菊酯对麦穗鱼 GSTs 活性影响的时间效应

用 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$ 溴氰菊酯处理 96 h 后, 肝和鳃中 GSTs 活性均受溴氰菊酯胁迫诱导, 但在不同时间溴氰菊酯对 GSTs 活性的影响程度不同。如表 1 所示, 肝中 GSTs 活性在 24 h 时受抑制程度最重 ($P < 0.05$), 比对照下降了 20%; 在 72 h 时 GSTs 活性被诱导 ($P < 0.001$), 是对照组的 2.10 倍。如表 2 所示, 经 $3.0 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$ 溴氰菊酯处理 18 h 后, 鳃中 GSTs 活性受抑制程度最高, 比对照组下降了 27% ($P < 0.01$); 96 h 后, GSTs 活性被显著诱导 ($P < 0.01$), 处理组鳃中 GSTs 活性是对照组的 1.24 倍。肝和鳃中 GSTs 活性由最初的被抑制到恢复, 然后又逐渐升高。

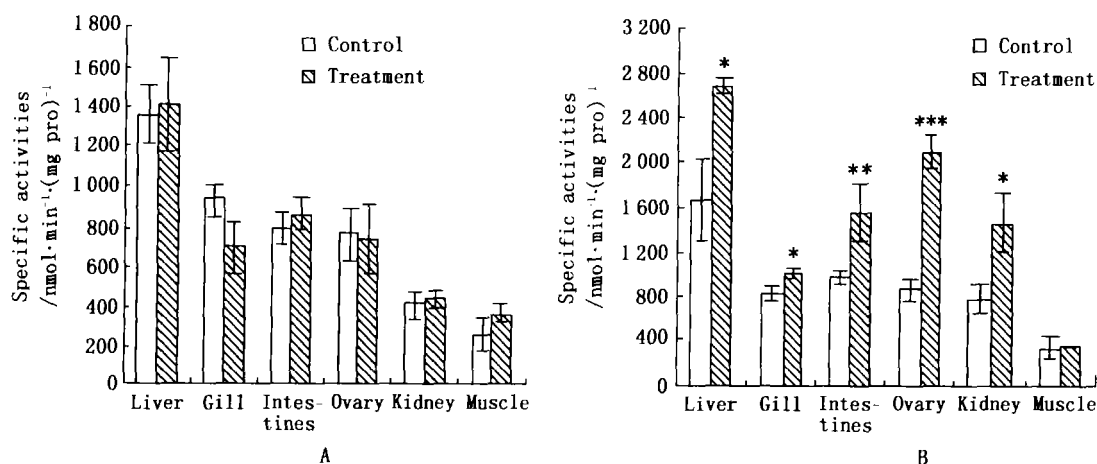


Fig 2 GSTs activities in different tissues of *P. parva* exposed to deltamethrin

Note: Values followed by *, ** and *** are significantly different ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$); A: after 6 h, B: after 96 h

Table 1 GSTs activities of hepatic in *P. parva* exposed to 3.0×10^{-4} mg/L deltamethrin at various times [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg pro})^{-1}$]

Exposure period/h	Mean \pm SE		Ratio (%)
	Control	Treatment	
6	1 361.50 \pm 149.21	1 402.56 \pm 234.67	103
12	1 424.24 \pm 178.70	1 223.46 \pm 113.34*	86
18	1 547.11 \pm 225.95	1 309.46 \pm 19.84*	85
24	1 412.62 \pm 80.75	932.46 \pm 51.03*	80
36	1 432.38 \pm 219.44	1 308.39 \pm 56.06	91
48	1 246.65 \pm 165.20	1 384.74 \pm 225.92	111
72	1 378.45 \pm 364.63	2 898.66 \pm 249.92***	210
96	1 646.32 \pm 35.73	2 665.74 \pm 69.11***	162

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ treatment sample compare to the control group, respectively. The same as in the table 2.

Table 2 GSTs activities of gill in *P. parva* exposed to 3.0×10^{-4} mg/L deltamethrin at various times [$\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot (\text{mg pro})^{-1}$]

Exposure period/h	Mean \pm SE		Ratio (%)
	Control	Treatment	
6	736.27 \pm 170.97	767.54 \pm 126.02	104
12	719.45 \pm 95.56	804.32 \pm 87.96	111
18	727.68 \pm 76.63	437.80 \pm 24.79**	73
24	701.58 \pm 18.82	727.83 \pm 104.09	104
36	703.03 \pm 65.25	720.89 \pm 132.61	103
48	810.06 \pm 21.85	977.24 \pm 146.07	121
72	788.67 \pm 111.28	896.69 \pm 92.04	114
96	817.45 \pm 48.97	1 012.05 \pm 110.37**	124

3 讨论

生物体内的酶能够为有毒物质对环境的伤害提供早期预警,这一发现已受到国内外学者的普遍关注^[11]。发现和利用具有代表性的酶系来指示

农药等污染物对生态系统所产生的生物学效应,对于科学评价农药施用后的环境风险具有重要的理论和实践意义。本研究结果显示,随着处理时间的变化,不同浓度溴氰菊酯对麦穗鱼不同组织中 GSTs活性的影响差异很大。

Sora等^[12]报道,麦穗鱼暴露于杀螟硫磷下,随着药剂浓度的升高,对 GSTs活性的抑制率越高。本实验结果也表明,溴氰菊酯浓度越高,抑制作用越明显,高剂量时 (0.009 mg/L)对麦穗鱼肝和鳃中 GSTs活性有强烈的抑制作用。鳃是鱼吸收溴氰菊酯的主要器官,且最敏感,但其抗氧化防御系统较弱^[13],低剂量处理组 (0.001 mg/L)鳃中 GSTs活性升高,可能是由于溴氰菊酯诱导了 GST活性,增强了对溴氰菊酯的代谢反应。另有报道显示,溴氰菊酯主要影响鱼的神经、呼吸和血液系统,且啮齿类动物肿瘤的发生也与溴氰菊酯有关^[14]。本实验在亚致死剂量 ($3.0 \times 10^{-4} \text{ mg/L}$)作用下,鱼的肝和鳃中酶活性的变化有相似之处,由最初的轻度受抑制,而后逐渐恢复,随着时间的延长最后呈现被诱导趋势。也有专家报道,浓度在 $50 \sim 500 \text{ ng/L}$ 的氯氰菊酯对螃蟹 *Carinus maenas*的 GSTs活性有明显的诱导作用,同时发现注射 10 ng/L 氯氰菊酯进入螃蟹胸腔,肝中 GSTs活性初期明显升高,36 h又恢复到原来的水平^[15]。说明溴氰菊酯对麦穗鱼 GSTs活性的影响不同于氯氰菊酯对螃蟹 GSTs活性的影响。上述结论还需要更进一步的实验验证和系统性的研究分析。Sayeed等^[16]研究暴露于溴氰菊酯中的淡水鱼狐鲮 *Channa punctatus*,发现 48 h后其肝脏和肾中 GSTs活性升高,鳃中 GSTs活性逐渐衰竭,并分析认为肝和肾中

GSTs活性随着 GSH 活性的升高而升高, GSTs活性升高是为了预防氧化反应的损害。本研究结果表明,溴氰菊酯对麦穗鱼 GSTs活性的影响根据作用时间和部位不同而有所差异,并且对 GSTs活性是抑制还是诱导,也与其浓度和作用时间有关。

溴氰菊酯是农业和卫生害虫防治中一种重要药剂,使用量很大。该药对鱼的室内毒性高于田间正常使用的毒性。目前并无文献资料报道溴氰菊酯的沉积物在食物链中的迁移状况和代谢产物,但大量文献表明,该药对双壳类水生生物的群落结构和种群多样性有不利影响^[17]。因此施用菊酯类农药时应该慎重,施用后应避免农田水立即流入鱼、虾塘中。从生态角度比较,溴氰菊酯用于水稻田中,如施用时间和剂量合适,不会对鱼、虾种群造成大的危害,但对枝角类和浮游生物有较大危害^[18];从生理生化角度来看,溴氰菊酯对鱼及其他水生生物的酶系统会产生影响,如多功能氧化酶、解毒酶等,甚至会导致一些组织器官发生病变、致畸、致癌。溴氰菊酯在环境中不能充分代谢和迅速降解,在鱼脂肪组织中残留和蓄积问题比较严重。非致死剂量溴氰菊酯对鱼体内生理生化过程影响的研究较少,且研究结果不是很一致。因此,有关溴氰菊酯对鱼的长期毒性和作用机制还有待于进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Srivastav A K, Srivastava S K, Srivastav S K. Impact of deltamethrin on serum calcium and inorganic phosphate of freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis*[J]. *Bull Environ, Contam Toxicol*, 1997, 59: 841-846.
- [2] Nemcsok J, Balint T, Fazakas J, et al. The contribution of a pyrethroid insecticide to the massive eel (*Anguilla anguilla*) devastation in Lake Balaton, in 1995[J]. *Acta Biol Hung*, 1999, 50: 161-173.
- [3] CHEN Xu-long (陈叙龙), ZHANG Fu-guo (张富国), ZHANG Wen-cheng (张文成), et al. 亚硒酸钠对麦穗鱼的遗传毒性效应研究 [J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Nankaiensis*, (南开大学学报,自然科学版) 1994, (3): 87-89.
- [4] ZHANG Chang-zhong (张常忠), GAO Xi-wu (高希武), ZHENG Bing-zong (郑炳宗). 棉铃虫谷胱甘肽 S 转移酶的活性分布和发育期变化及植物次生物质的诱导作用 [J]. *Chin J Pestic Sci* (农药学报), 2001, 3(1): 30-35.
- [5] George S G, Malins D C, Ostrander G K, et al. Enzymology and molecular biology of phase II xenobiotic-conjugating enzymes in fish[J]. *Aquatic Toxicology*, 1994, 4: 37-85.
- [6] Hayes J D, Pulford D J. The glutathione S-transferase super-gene family: regulation of GST and the contribution of the isoenzymes to cancer chemoprotection and drug resistance [J]. *Crit Rev Biochem, Mol Biol*, 1995, 30: 445-600.
- [7] YN Da-qi (尹大强), JN Hong-jun (金洪钧), YU Hong-xia (于红霞), et al. 钩虾胆碱酯酶 (ChE)和谷胱甘肽转硫酶 (GST)的敏感性和特异性比较研究 [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology (应用生态学报)*, 2001, 12(4): 615-618.
- [8] van der RO, Jonny B, Nico P E, et al. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: a review [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13: 57-149.
- [9] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione S-transferase AA from rat liver[J]. *Biochem Biophys*, 1976, 176: 710-716.
- [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [11] Davies IM, Rodger G K, Redshaw J, et al. Targeted environmental monitoring for the effects of medicines used to treat sea lice infestation on farmed fish [J]. *ICES Journal of Marine Science*, 2001, 58: 477-485.
- [12] Sora S S, Li S N, Fan D F, et al. Hepatic glutathione S-transferase activity in mosquitofish (*Gambusia affinis*) and topmouth gudgeon (*Pseudorasbora parva*) exposed to fenitrothion [J]. *J Zhejiang Univ (Science)*, 2001, (2): 190-195.
- [13] Goering P L. Screen-printed disposable biosensors for environmental pollution monitoring [A]. Butterworth F M. Biomarkers and Biomarkers as Indicators of Environmental Change [M]. New York: Plenum Press, 1995. 217-226.
- [14] Shukla Y, Arora A, Singh A, et al. Tumourigenic studies on deltamethrin in swiss albino mice [J]. *Toxicology*, 2001, 163: 1-9.
- [15] Gowland, Ben T G, Moffat C F, et al. Cypermethrin induces glutathione S-transferase activity in the shore crab, *Carcinus maenas* [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54 (2): 169-177.
- [16] Sayeed I, Suhel Parvez, Suwama Pandey I, et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater, *Channa punctatus* [J]. *Bloch Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56: 295-301.
- [17] Kontreczy C, Farkas A, Nemcsok J, et al. Short and long-term effects of deltamethrin on altering activity of fresh water mussel (*Anodonta cygnera* L.) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1997, 38: 195-199.
- [18] CAI Dao-ji (蔡道基), GONG Rui-zhong (龚瑞忠), TANG Guo-cai (汤国才), et al. 稻田使用溴氰菊酯农药对水生生物的安全评价 [J]. *Research of Environmental Sciences (环境科学研究)*, 1997, 10(3): 30-35.

(Ed. TANG J)