

文章编号:1673-1689(2008)02-0210-04

## 两种二噁英类化合物对斑马鱼肝脏 MDA、SOD和GST的影响

聂芳红<sup>1</sup>, 孔庆波<sup>2</sup>, 刘连平<sup>3</sup>, 杨蓉<sup>3</sup>, 谢英明<sup>3</sup>, 林红英<sup>3</sup>, 陈进军<sup>\*3</sup>

(1. 广东海洋大学食品科技学院, 广东湛江 524088; 2. 中国刑事警察学院警犬技术系, 辽宁沈阳 110034; 3. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东湛江 524088)

**摘要:** 将300条斑马鱼随机等分为10组和空白对照组。水浴染毒5 d后, 采用分光光度法测定其肝组织中丙二醛(MDA)含量和超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的活力, 研究TCDD和PCB77对斑马鱼肝脏MDA、SOD、GST的影响。结果发现, TCDD染毒5 d后, 各剂量染毒组MDA含量均有所增加, 其中0.2 μg/L组差异显著( $P < 0.05$ ), 0.4 μg/L和0.8 μg/L剂量组差异极显著( $P < 0.01$ ); 各染毒组SOD活性均有所下降, 其中0.2、0.4和0.8 μg/L剂量组差异极显著( $P < 0.01$ ); 各染毒组GST活力均降低且差异极显著( $P < 0.01$ )。PCB77染毒5 d后, 各剂量染毒组MDA含量均有所增加, 其中0.2 mg/L组差异显著( $P < 0.05$ ), 0.4 mg/L和0.8 mg/L组差异极显著( $P < 0.01$ ); 各剂量染毒组SOD活力均有所下降, 其中0.2 mg/L组差异显著( $P < 0.05$ ), 0.4 mg/L和0.8 mg/L组差异极显著( $P < 0.01$ ); 各剂量染毒组GST活力也均有所下降, 其中0.2、0.4和0.8 mg/L组差异极显著( $P < 0.01$ )。可见, 一定剂量的TCDD和PCB77能分别引起MDA含量增加, 使SOD和GST活力降低, 对斑马鱼具有脂质过氧化作用。

**关键词:** 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英; 3,3',4,4'-四氯联苯; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽-S-转移酶; 斑马鱼

中图分类号: S 912; R 994. 6

文献标识码: A

### Effects of Two DLCs on Hepatic MDA, SOD and GST in Zebrafish

NIE Fang-hong<sup>1</sup>, KONG Qing-bo<sup>2</sup>, LIU Lian-ping<sup>3</sup>, YANG Rong<sup>3</sup>,  
XIE Ying-ming<sup>3</sup>, LIN Hong-ying<sup>3</sup>, CHEN Jin-jun<sup>\*3</sup>

(1. School of Food Science and Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Department of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China; 3. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China)

**Abstract:** In this manuscript, in order to investigate the effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) and 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (PCB77) on hepatic malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD) and glutathionetransferase (GST) in zebrafish, 300 zebrafish were randomly divided into 10 groups: Four test groups exposed to TCDD at 0.1, 0.2, 0.34, 0.8 μg/L and control group. Four test groups exposed to PCB77 at 0.1, 0.2, 0.34, 0.8 μg/L and

收稿日期: 2007-10-01.

基金项目: 广东省自然科学基金项目(05011789); 广东省国际合作项目(2007B050200023).

作者简介: 聂芳红(1969-), 女, 陕西杨凌人, 实验师, 主要从事食品质量与安全研究.

\* 通讯作者: 陈进军(1967-), 男, 宁夏中卫人, 工学博士, 教授, 主要从事动物毒理学方向研究.

Email: jjchen777@yahoo.com.cn

control group. Five days after the animals were exposed to the polluted water with TCDD or PCB77, the MDA level and the SOD/GST activities in zebrafish liver were measured by spectrophotometrically. It was found that the MDA level and SOD activity increased in which TCDD was more than 0.2  $\mu\text{g/L}$  ( $P < 0.05$ ). The GST activity increased in all the groups. Furthermore, the MDA level increased in which PCB77 was more than 0.2  $\mu\text{g/L}$  ( $P < 0.05$ ) while the SOD activity decreased in the conditions ( $P < 0.01$ ). It was concluded that TCDD and PCB77 at certain doses could cause hepatic lipid peroxidation in zebrafish by induction of MDA increase and SOD/GST inactivation.

**Key words:** 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin, 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl, malondialdehyde, superoxide dismutase, glutathionetransferase, zebrafish

二噁英类化合物(Dioxin-like compounds, DLCs)是指能与芳烃受体结合,导致机体产生各种生化变化的物质总称,包括:多氯/溴代二苯并二噁英如2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(TCDD);共平面多氯/溴联苯如3,3',4,4'-四氯联苯(PCB77)和多氯/溴代二苯并呋喃。其中研究最多也是最典型和毒性最强的化学物为TCDD<sup>[1-2]</sup>。已发现DLCs来源广泛,污染环境、食品和饲料等,具有高残留性、高生物浓集和高生物毒性,能够诱导肝细胞损害、胸腺萎缩、发育畸形、胚胎毒性、生殖毒性和致癌性等毒性反应<sup>[3-6]</sup>。丙二醛(MDA)是机体脂质过氧化作用的产物,其含量增加,间接反应了机体细胞受到了自由基的攻击;超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)是反映机体清除自由基能力的重要标志性抗氧化酶<sup>[7-10]</sup>。据报道,TCDD能增强大鼠等哺乳动物细胞的脂质过氧化作用<sup>[11]</sup>。斑马鱼(Danio rerio)是国际标准化组织推荐的五大试验鱼种之一,许多调控蛋白质的表现位置与时间也都与哺乳动物相似,是毒理学和癌症研究中非常有价值的模式动物<sup>[6]</sup>。利用斑马鱼研究DLCs对机体的脂质过氧化作用尚未见报道。作者分别用TCDD和PCB77作为供试化学物,对斑马鱼进行水浴染毒,研究供试化学物对斑马鱼肝脏MDA含量及SOD和GST活力的影响,探讨供试化学物是否通过引起斑马鱼的脂质过氧化作用,使机体产生过多自由基,导致氧化应激而发挥其毒性作用。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

TCDD(纯度99%)为美国SUPELCO公司产品;PCB77为德国Dr. Ehrenstorfer GmbH公司产品;二甲亚砜(DMSO)为国产分析纯;超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测定试剂

盒、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)测定试剂盒、考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;722N型分光光度计为上海精密科学仪器有限公司产品。

### 1.2 试验动物及其分组与染毒

供试鱼购自湛江市观赏鱼市场,经广东海洋大学水产学院鉴定为鲤科短担尼鱼属的斑马鱼(Danio rerio)。成年斑马鱼300条,体长(4.0±0.5)cm,随机等分为10组:TCDD 4个染毒组(染毒剂量分别为0.1、0.2、0.4和0.8  $\mu\text{g/L}$ )和空白对照组,PCB77 4个染毒组(染毒剂量分别为0.1、0.2、0.4和0.8 mg/L)和空白对照组。用终质量分数小于0.1%的DMSO分别将TCDD和PCB77助溶后,再分别按不同剂量分组进行水浴染毒。

### 1.3 MDA、SOD和GST的测定

染毒5d后,解剖斑马鱼采集肝脏,制备质量分数1%的肝匀浆,肝匀浆中蛋白质含量用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。取适量的肝匀浆,按试剂盒所述方法,分别用分光光度法测定吸光度,波长分别为546、546和405 nm,然后分别用下述公式计算肝脏总MDA含量、SOD和GST活力。

#### 1.3.1 肝脏总MDA含量计算公式

$$b_M = \frac{C(A_{测} - A_{测空})}{\rho_{蛋白}(A_{标} - A_{标空})}$$

其中A为吸光值;C为标准品浓度; $\rho$ 为蛋白质质量浓度。 $b_M$ 为MDA的质量摩尔浓度;

#### 1.3.2 肝脏SOD活力计算公式

$$\text{SOD活力} = \frac{2V(A_{对} - A_{对空})}{\rho A_{对}}$$

其中V为反应液总体积。

#### 1.3.3 肝脏GST活力计算公式

$$\text{GST活力} = \frac{CB(A_{非} - A_{测})}{tV\rho(A_{标} - A_{测})}$$

其中C为标准管浓度,B为反应稀释倍数;t为反应

时间;V为取标品体积。

#### 1.4 统计学处理

数据用“统计产品与服务解决方案(SPSS)”11.5软件进行统计分析,结果以 $\bar{x} \pm SD$ 表示,采用单因素方差分析进行组间差异显著性比较。

## 2 结果与讨论

### 2.1 TCDD对斑马鱼肝脏MDA含量和SOD、GST活力的影响

TCDD染毒5d后,与对照组相比,各染毒组MDA含量均有所增加,其中0.2  $\mu\text{g/L}$ 组差异显著( $P < 0.05$ ),0.4  $\mu\text{g/L}$ 和0.8  $\mu\text{g/L}$ 组差异极显著( $P < 0.01$ );各染毒组SOD活力均有所下降,其中0.4  $\mu\text{g/L}$ 和0.8  $\mu\text{g/L}$ 组差异极显著( $P < 0.01$ );各染毒组GST活力均有所下降,且差异极显著( $P < 0.01$ )。见表1。

表1 TCDD对斑马鱼肝脏MDA含量和SOD、GST活力的影响

Tab.1 Effects of TCDD on hepatic MDA, SOD and GST in zebrafish

TCDD 质量 浓度/ ( $\mu\text{g/L}$ )	MDA质量 摩尔浓度/ (nmol/mg)	SOD/ (U/mg)	GST活力/ (U/mg)
0	3.93 $\pm$ 0.17	121.68 $\pm$ 4.82	86.56 $\pm$ 4.36
0.1	4.28 $\pm$ 0.11	114.24 $\pm$ 3.35	76.94 $\pm$ 4.41**
0.2	4.64 $\pm$ 0.13*	104.21 $\pm$ 5.24**	72.86 $\pm$ 4.50**
0.4	5.14 $\pm$ 0.12**	97.17 $\pm$ 5.55**	66.24 $\pm$ 3.02**
0.8	5.41 $\pm$ 0.07**	81.30 $\pm$ 5.42**	59.02 $\pm$ 4.63**

注:\*表示 $P < 0.05$ ,\*\*表示 $P < 0.01$ 。以下同。

### 2.2 PCB77对斑马鱼肝脏MDA含量和SOD、GST活力的影响

PCB77染毒5d后,与对照组相比,各染毒组MDA含量均有所增加,其中0.2 mg/L组差异显著( $P < 0.05$ ),0.4 mg/L和0.8 mg/L组差异极显著( $P < 0.01$ );各染毒组SOD活力均有所下降,0.2 mg/L组差异显著( $P < 0.05$ ),0.4 mg/L和0.8 mg/L组差异极显著( $P < 0.01$ );各染毒组GST活力均有所下降,0.2、0.4和0.8 mg/L组差异极显著( $P < 0.01$ )。见表2。

#### 2.3 讨论

由氧自由基产生的细胞毒性效应称为氧化应激。氧化应激实际上是促氧化与抗氧化之间的平衡失调,促氧化作用超过抗氧化作用,即当自由基的产生超过机体防御系统的清除能力,或机体防御

体系受损而不能发挥正常功能时导致的细胞毒性效应<sup>[7]</sup>。自由基对所有的细胞成分,包括核酸、蛋白质及脂质等都有损害,过多的氧自由基就能引起机体的脂质过氧化作用。

表2 PCB77对斑马鱼肝脏MDA含量和SOD、GST活力的影响

Tab.2 Effects of PCB77 on hepatic MDA, SOD and GST in zebrafish

PCB77 质量 浓度/ (mg/L)	MDA质量 摩尔浓度/ (nmol/mg)	SOD 活力/ (U/mg)	GST 活力/ (U/mg)
0	3.30 $\pm$ 0.12	144.54 $\pm$ 5.63	90.97 $\pm$ 5.02
0.1	3.70 $\pm$ 0.17	129.83 $\pm$ 8.30	85.37 $\pm$ 3.51
0.2	4.22 $\pm$ 0.13*	119.79 $\pm$ 4.63*	75.54 $\pm$ 6.19**
0.4	4.64 $\pm$ 0.24**	99.19 $\pm$ 7.85**	67.57 $\pm$ 3.51**
0.8	5.52 $\pm$ 0.15**	88.51 $\pm$ 4.54**	61.57 $\pm$ 2.93**

MDA是机体脂质过氧化作用的产物,其含量的高低间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度<sup>[8]</sup>;SOD、GST都是机体内的主要抗氧化酶,SOD的功能是把 $\text{O}_2^-$ 歧化成 $\text{H}_2\text{O}_2$ 和 $\text{O}_2$ ,是保护机体免受 $\text{O}_2^-$ 毒性的重要抗氧化酶,维持细胞内适宜的氧自由基浓度,保护细胞免受活性氧对DNA等生物大分子的损伤;GST的功能是催化谷胱甘肽(GSH)与各种内源性和外源性亲电子化合物反应,生成无毒或毒性小的GSH硫结合物,它还能催化有机过氧化物还原成相应的醇。SOD、GST活力的高低间接反映了机体清除自由基的能力<sup>[7-10]</sup>。斑马鱼在其胚胎发育早期,SOD就开始表达,囊胚期的SOD主要表达在卵裂球的细胞核中。在斑马鱼胚胎原肠期,SOD在各胚层胞浆与胞间质中有较强的表达;在体节分化的不同时期SOD在脊索、神经管、眼等形成中的器官的胞浆与胞质部位有不同程度的表达;在咽弓形成期,SOD在咽弓中表达微弱,在脑组织中表达较强;到孵化期,SOD在终末器官中的表达程度不尽相同,在脑中SOD在大脑区域的表达略强于间脑区域,在肌肉组织中的表达较微弱,在肠道中却有很强的表达。可见斑马鱼在胚胎早期发育过程中以SOD为代表的酶性抗氧化系统就开始逐步建立,维持胚胎组织器官细胞中的正常活性氧浓度,确保胚胎的正常发育<sup>[5]</sup>。

TCDD能参与机体的脂质过氧化作用,能增加哺乳动物包括大鼠等机体 $\text{O}_2^-$ 的产生,使脂质过氧化的中间产物如MDA等增加,引起抗氧化酶如SOD、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和过氧化氢酶等活力下降<sup>[7,11]</sup>。本研究中利用模式动物斑马鱼,首

次发现 TCDD 和 PCB77 分别能导致肝脏 MDA 含量增加, SOD 和 GST 活力下降。受试斑马鱼肝脏 MDA 含量增加, 间接说明了斑马鱼的机体细胞受到自由基的攻击。受试斑马鱼肝脏 SOD 和 GST 活力下降, 间接反映了机体清除自由基的能力降低。上述结果说明, TCDD 和 PCB77 的重要毒理机制之一是, 引起斑马鱼的脂质过氧化作用, 导致机体受到过多氧自由基的攻击, 从而造成机体细胞相应的毒性反应。

### 3 结 语

以一定剂量的 TCDD 和 PCB77 分别对斑马鱼进行水浴染毒 5 d 后, 能引起受试斑马鱼肝脏总 MDA 含量增加, 使 SOD 和 GST 活力降低, 对斑马鱼具有脂质过氧化作用, 导致机体受到过多氧自由基的攻击, 从而造成机体细胞相应的毒性反应, 使机体细胞产生氧化应激和损伤。

### 参考文献(References):

- [1] Poland A, Kuntson J K. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related haio genated aromatic hydrocarbons of the mechanism of toxicity[J]. *Aun Rev Pharmacol Toxicol*, 1982, 22: 517-541.
- [2] McGregor D B, Partensky C, Wilbourn J, et al. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzodioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis[J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106: 2755-2760.
- [3] Wu Q, Ohsako S, Baba T, et al. Effects of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on preimplantation mouse embryos[J]. *Toxicology*, 2002, 174: 119-129.
- [4] Dong W, Teraoka H, Tsujimoto Y, et al. Role of Aryl hydrocarbon receptor in mesencephalic circulation failure and apoptosis in zebrafish embryos exposed to 2,3,7,8-tetrachlorodibenxo-p-dioxin [J]. *Toxicological Sciences*, 2004, 77: 109-116.
- [5] Henry T R, Spitsbergen J M, Hornung M W, et al. Early life stage toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1997, 142: 56-68.
- [6] 聂芳红, 刘连平, 陈进军, 等. 二噁英类化合物对斑马鱼 CYP1A 毒理作用的研究新进展 [J], 广东海洋大学学报, 2007, 27(3): 123-128.  
NIE Fang-hong, LIU Lian-ping, CHEN Jing-jun, et al. Application of zebrafish CYP1A into toxicological studies on dioxin-like compounds [J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2007, 27(3): 123-128. (in Chinese)
- [7] 汤乃军, 刘云儒, 任大林. 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英对 SD 大鼠肝脏 SOD、GST、MDA 影响的实验研究[J]. 中国工业医学杂志, 2003, 16(6): 335-337.  
TANG Nai-jun, LIU Yun-ru, REN Da-lin. Experimental study on the effects of TCDD on SOD, GST, MDA in livers of SD rats [J]. *Chinese Journal of Industrial Medicine*, 2003, 16(6): 335-337. (in Chinese)
- [8] 陈汉, 王慧君, 李学峰. 甲基苯丙胺对大鼠脑组织中 NO、SOD 和 MDA 的影响[J]. 中国药物依赖性杂志, 2007, 16(2): 102-104.  
CHEN Han, WANG Hui-jun, LI Xue-feng. Change of No, SOD and MDA in methamphetamine-treated rat brain and their correlation[J]. *Chin J Drug Depend*, 2007, 16(2): 102-104. (in Chinese)
- [9] 张红梅, 金征宇, 朱立贤, 等. 花生衣红抗氧化活性的研究 [J]. 食品与生物技术学报, 2005 (6): 83-87.  
ZHANG Hong-mei, JIN Zheng-yu, ZHU Li-xian, et al. Study on the antioxidant activity of peanut skin[J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005(6): 83-87. (in Chinese)
- [10] 于文利, 舒伯, 赵亚平, 等. 番茄红素生理功能的动物实验评价 [J]. 食品与生物技术学报, 2005(1): 99-101.  
YU Wen-li, SHU Bo, ZHAO Ya-pin, et al. The Physiological functions of lycopene evaluated by animal experiments [J]. *Journal of Food Science and Biotechnology*, 2005(1): 99-101. (in Chinese)
- [11] Kern P A, Fishman R B, Song W, et al. The effect of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on oxidative enzymes in adipocytes and liver[J]. *Toxicology*, 2002, 171(2): 117-125.

(责任编辑: 杨 萌)