

TCDD 对斑马鱼脂质过氧化作用的初步研究

刘连平¹, 聂芳红², 孔庆波³, 林红英¹, 谢英明¹, 杨蓉¹, 陈进军¹

(1. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

3. 中国刑事警察学院警犬技术系, 辽宁 沈阳 110034)

摘要: 将150条斑马鱼随机等分为5组: 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英 (TCDD) 4个染毒组 (染毒剂量分别为0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.4 μg/L和 0.8 μg/L) 和空白对照组, 水质接触染毒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对斑马鱼的脂质过氧化作用。结果发现, TCDD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 μg/L、0.4 μg/L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 ($P < 0.01$)。一定剂量的TCDD能引起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: 斑马鱼; 丙二醛; 超氧化物歧化酶; 谷胱甘肽-S-转移酶; 2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英

中图分类号: X503.225

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159(2008)01-0081-04

Studies on Lipid Peroxidation of TCDD in Zebrafish

LIU Lian-ping¹, NIE Fang-hong², KONG Qing-bo³, LIN Hong-ying¹, XIE Ying-ming¹,
YANG Rong¹, CHEN Jin-jun¹

(1. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. School of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. Dept. of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China)

Abstract: To study the lipid peroxidation of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in zebrafish, 150 zebrafish were randomly and equally divided into 5 groups: four test groups were exposed to TCDD at 0.1 μg/L, 0.2 μg/L, 0.4 μg/L, 0.8 μg/L, respectively in addition to one control group. Five days after the animals were exposed to the polluted water with different doses of TCDD, respectively, the level of malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and glutathionetransferase (GST) in liver of zebrafish were determined by means of spectrophotometry. It was found that the MDA level showed some increasing tendency in which 0.2 μg/L of TCDD exposure group was different ($P < 0.05$) and 0.4 μg/L and 0.8 μg/L of TCDD exposure groups were significantly different from the control group ($P < 0.01$), that SOD activity showed decreasing tendency and 0.2 μg/L, 0.4 μg/L and 0.8 μg/L of TCDD exposure groups were significantly different from control group ($P < 0.01$), and that GST activity in all TCDD treated groups showed significantly difference from the control group ($P < 0.01$). It was

收稿日期: 2007-08-10

基金项目: 广东省自然科学基金项目“几种 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的生化毒理学机理研究”(05011789); 广东省国际合作项目“斑马鱼生物学标志 CYP1A 在 DLCs 环境污染监测中的应用研究”(2007B050200023); 广东海洋大学 SCI 刊源作者基金项目

第一作者: 刘连平 (1983—), 男, 在读研究生, 研究方向为高效无公害饲料。

通讯作者: 陈进军 (1967—), 博士, 教授, 研究方向为动物毒理学。E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

concluded that TCDD at certain doses caused hepatic lipid peroxidation in zebrafish by induction of MDA increase and SOD and GST inactivation.

Key words: zebrafish; malondialdehyde; superoxide dismutase; glutathionetransferase;
2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD)

2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin, TCDD)是迄今研究最多、最典型和毒性最强的二噁英类化合物(Dioxin-like compounds, DLCs)^[1-3]。研究发现,TCDD具有高残留性、高生物浓集和高生物毒性,能够诱导生物体肝细胞损害、胸腺萎缩、血液循环系统障碍等,引发发育畸形、胚胎毒性、生殖毒性、致癌性等毒性反应^[4-6]。但利用斑马鱼研究TCDD对机体的脂质过氧化作用尚未见报道。本实验用TCDD对斑马鱼进行水质接触染毒,研究其对斑马鱼肝脏丙二醛(MDA)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)活力的影响,探讨TCDD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%):美国SUPELCO公司产品;

二甲基亚砷(DMSO):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:购自南京建成生物工程研究所;

722N型分光光度计:上海精密科学仪器有限公司产品。

1 mL、2 mL玻璃匀浆器:购自上海博通经贸有限公司。

1.2 实验动物处理与分组

供试鱼购自广东省湛江市观赏鱼市场,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*)。斑马鱼购回实验室后适应性饲养一周,鱼体健康,无自然死亡。实验用水为曝气除氯4 d的自来水,水温28℃左右,不断充气。取成年斑马鱼150条,体长4.0±0.5 cm,随机等分为5组:4个TCDD染毒组(染毒剂量分别

为0.1 μg/L、0.2 μg/L、0.4 μg/L和0.8 μg/L)^[2]和溶剂对照组(曝气除氯4 d的自来水中按体积分数0.1%加入DMSO)。用终浓度不超过体积分数0.1%的DMSO将TCDD助溶后,再按不同剂量对各组斑马鱼进行水质接触染毒。

1.3 肝脏总MDA含量的测定

染毒5 d后^[2],解剖斑马鱼,采集肝脏,制备体积分数1%的肝匀浆,肝匀浆中蛋白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,用分光光度法在546 nm处测定吸光度,然后用如下公式计算肝脏总MDA含量:

$$\text{肝脏总MDA含量 (nmol/mg)} = (\text{测定管吸光度} - \text{测定空白管吸光度}) \div (\text{标准管吸光度} - \text{标准空白管吸光度}) \times \text{标准品浓度 (10 nmol/mL)} \div \text{蛋白含量 (mg/mL)}。$$

1.4 肝脏SOD活力的测定

染毒5 d后^[2],解剖斑马鱼,采集肝脏,制备1%肝匀浆,肝匀浆中蛋白含量用考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒测定。取适量肝匀浆,按SOD活力测定试剂盒所述方法,用分光光度法在546 nm处测定吸光度,然后计算肝脏SOD活力。

根据SOD活力测定试剂盒定义,1 mg肝组织蛋白在1 mL反应液中SOD抑制率达50%时所对应的SOD量为一个SOD活力单位(U),则SOD活力(U/mg) = (对照管吸光度 - 测定管吸光度) ÷ 对照管吸光度 ÷ 50% × 反应液总体积(3.31 mL) ÷ 蛋白含量(mg/mL)。

1.5 肝脏GST活力的测定

染毒5 d后^[2],解剖斑马鱼,采集肝脏,制备1%肝匀浆,肝匀浆中蛋白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GST活力测定试剂盒所述方法,用分光光度法在405 nm处测定吸光度,然后计算肝脏GST活力。

根据GST活力测定试剂盒的规定,1 mg肝组织蛋白,在37℃反应1 min扣除非酶促反应,使反应体系中GSH浓度降低1 μmol/L为一个酶活力单位(U),则组织中GST活力(U/mg) = (非

酶管吸光度-酶管吸光度)÷(标准管吸光度-测定管吸光度)×标准管浓度(20 μmol/L)×反应稀释倍数(6倍)÷反应时间(10 min)÷[取样量(0.1 mL)×蛋白含量(mg/mL)]。

1.6 统计学处理

数据用SPSS 11.5软件进行统计分析,结果以平均数±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

2.1 TCDD对斑马鱼肝脏MDA含量的影响

由表1可见,TCDD染毒5d后,与溶剂对照组相比,各染毒组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组差异极显著($P<0.01$)。

2.2 TCDD对斑马鱼肝脏SOD活力的影响

由表1可见,TCDD染毒5d后,与溶剂对照组相比,各染毒组SOD活力均有所下降,其中0.4 μg/L和0.8 μg/L组差异极显著($P<0.01$)。

2.3 TCDD对斑马鱼肝脏GST活力的影响

由表1可见,TCDD染毒5d后,与溶剂对照组相比,各染毒组GST活力均有所下降,且差异极显著($P<0.01$)。

表1 TCDD对斑马鱼肝脏MDA含量和SOD、GST活力的影响

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

TCDD /μg·L ⁻¹	MDA /nmol·mg ⁻¹	SOD /U·mg ⁻¹	GST /U·mg ⁻¹
0	3.93±0.17	121.68±4.82	86.56±4.36
0.1	4.28±0.11	114.24±3.35	76.94±4.41**
0.2	4.64±0.13*	104.21±5.24**	72.86±4.50**
0.4	5.14±0.12**	97.17±5.55**	66.24±3.02**
0.8	5.41±0.07**	81.30±5.42**	59.02±4.63**

说明: *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

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^[7]。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。

MDA是机体脂质过氧化作用的产物,其含量的高低间接反应了机体细胞受自由基攻击的严重程度^[8];SOD、GST都是机体内的主要抗氧化酶,SOD的功能是把O₂⁻歧化成H₂O₂和O₂,是保护机体免受O₂⁻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活力的高低间接反应了机体清除自由基的能力。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^[5,9]。

TCDD能参与哺乳动物机体的脂质过氧化作用,能增加哺乳动物包括大鼠等机体O₂⁻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^[10]。本研究利用模式动物斑马鱼,首次发现TCDD能导致肝脏MDA含量增加,使SOD和GST活力下降。受试斑马鱼肝脏MDA含量增加,间接说明了斑马鱼机体细胞受到了自由基的攻击;受试斑马鱼肝脏SOD和GST活力下降,间接反应了机体清除自由基的能力降低;可见,TCDD一方面使机体降低了清除自由基的能力,另一方面又使机体细胞易于受到自由基的损伤,最终导致机体细胞的脂质过氧化作用。上述结果说明,TCDD的重要毒作用机制之一是,使斑马鱼机体细胞受到过多氧自由基的攻击,引起斑马鱼的脂质过氧化作用,从而造成相应的细胞毒性效应和损伤。

4 小 结

以一定剂量的 TCDD 对斑马鱼进行水浴染毒 5d 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,从而造成相应的细胞毒性效应和损伤。

参 考 文 献

- [1] Poland A, Kuntson J K. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin and related halogenated aromatic hydrocarbons of the mechanism of toxicity [J]. *Ann Rev Pharmacol Toxicol*, 1982, 22: 517-541.
- [2] Carney S A, Peterson R E, Heideman W. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin activation of the aryl hydrocarbon receptor/ aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator pathway causes developmental toxicity through a CYP1A-independent mechanism in zebrafish [J]. *Mol Pharmacol*, 2004, 66: 512-521.
- [3] 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.
- [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-tetrachlorodibenzo-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] 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.
- [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.
- [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.
- [9] 黄 勇. 斑马鱼早期胚胎发育及其超氧化物歧化酶时空表达特点研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2006.
- [10] 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.