

Effects of BBP on Activities of Metabolic Enzymes and Antioxidant Enzymes of *Danio Rerio*

Can Zhang¹, Xue Yang, Zhen He, Wen Mu, Qiaoqiao Zhou, Xiaojing Hu, Li Xiong², Deli Liu

Hubei Key Laboratory of Genetic Regulation and Integrative Biology, College of Life Sciences, Hua Zhong Normal University, Hubei, Wuhan, China

Email: cc.zhang@hotmail.com, xionglily@mail.ccnu.edu.cn

Abstract: This study evaluated the effect of butyl benzyl phthalate(BBP), an important class of environmental endocrine disruptors on SOD、AChE、CAT of *Danio rerio*. Based on the BBP LC₅₀, zebrafish were exposed to different BBP concentrations (0、0.332、0.665、1.33 mg·L⁻¹). The activities were determined in the fish collected at 7d, 14d, 21d and 28d post-exposure. It showed that as the extension of time and the exposure concentrations, from 0d to 28d, the AChE activity was significantly inhibited. The SOD activity increased firstly and then declined with time extension. The CAT activity, in 7d, except 0.665 mg · L⁻¹ group was inhibited significantly ($p < 0.01$), the rest groups were of no significant difference compared with the control. At 14d, except 0.332 mg · L⁻¹ group, which was always higher than the control, it showed a downward trend after the first rise for other groups; for 28d, the CAT activity of each treated group showed induction effect compared with the control.

Keywords: butyl benzyl phthalate; *Danio rerio*; AChE; SOD; CAT

BBP 对斑马鱼代谢酶和抗氧化酶活性的影响

张 灿¹, 杨 雪, 何 桢, 牟 文, 周巧巧, 胡晓静, 熊 丽², 刘德立

湖北省遗传调控与整合生物学重点实验室, 华中师范大学生命科学院, 湖北 武汉, 中国, 430079

Email: cc.zhang@hotmail.com, xionglily@mail.ccnu.edu.cn

摘 要: 为了探讨邻苯二甲酸丁基苄酯 (BBP) 对鱼类的毒性效应, 采用静态鱼类急性毒性试验方法测定了不同浓度 BBP 对斑马鱼超氧化物歧化酶 (SOD)、乙酰胆碱酯酶 (AChE)、过氧化氢酶 (CAT) 活性的影响。参照 BBP 的 96hLC₅₀ 值, 设定 4 个浓度 (0、0.332、0.665、1.33 mg·L⁻¹) 处理斑马鱼, 测定不同的时间 (7、14、21、28d) 暴露下, 各酶活的变化。结果表明: 随着时间的延长和暴露浓度的升高, 实验期间 (0-28d), 各暴露组 AChE 活性均被显著抑制, 整体呈现下降趋势; SOD 活性呈现先上升后下降的趋势, 在 14d 时, 各暴露组 SOD 活性达到最高水平; CAT 活性, 在 7d 时, 除 0.665 mg·L⁻¹ 浓度组有极显著抑制作用 ($p < 0.01$) 外, 其余各暴露组 CAT 活性均与对照接近, 无显著差异, 14d 开始, 除了 0.332 mg·L⁻¹ 浓度组高于对照组, 其他暴露组与对照组相比均呈现先下降后上升的趋势, 28d 时, 各暴露组 CAT 活性相对对照组最后都呈现出诱导作用。

关键词: 邻苯二甲酸丁基苄酯; 斑马鱼; AChE; SOD; CAT

1 引言

邻苯二甲酸酯 (phthalate acid esters, PAEs) 是一种人工合成的聚氯乙烯增塑剂类化合物, 作为增塑剂, 软化剂及添加剂, 广泛用于塑料、化妆品、汽车、润滑剂、服装和农药等行业, 由于 PAEs 与塑料主体结构之间不以化学键相结合, 在使用过程中会不断从塑料中释放出来, 污染环境, 普遍存在空气、土壤、水

体中, 甚至在人的尿液、乳汁、血液和精液等体液中都已检测出 PAEs^[1]。PAEs 及其代谢产物对人群健康会产生不同程度的危害作用, 他们能够诱导肝过氧化物酶体增殖, 荷尔蒙失调, 生殖毒性, 以及肝癌等^[2]。

邻苯二甲酸丁基苄酯 (BBP) 是已经被报道的具有明显雌激素生物效应的 8 种 PAEs 中的一种^[3], 其来源广, 难降解, 目前欧盟及美日等国均将此类化合物列为优先控制污染物。目前有关 BBP 的毒性研究

和毒性机理渐渐多了起来, 但是对鱼类的影响尚未报道。在 PAEs 大规模使用的情况下探讨其对环境和生物体可能产生的不利影响具有重要意义。本研究利用静态鱼类急性试验初步研究了 BBP 进入水环境后可能对鱼类造成的毒性效应, 为生态风险性评定、阻断污染途径和确定防治对策提供理论依据。

2 材料与方法

2.1 实验材料

实验动物: 斑马鱼 (*Danio rerio*), 购自武汉市雄楚大道某水族馆, 雌雄兼有, 平均体重 $0.3\text{g}\pm 0.02\text{g}$ 。实验前在实验室 $50\text{cm}\times 60\text{cm}\times 50\text{cm}$ 的玻璃缸驯养7d, 采用曝气自来水, 水温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 水质条件: pH7.0 左右, 溶解氧 $4.5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上。每日保持光照12~14h, 早晚定时投喂饲料2次, 自然死亡率 < 5%。

实验仪器: 高速冷冻离心机 (Eppendorf 5417R)、水质分析仪 (美国HACH公司)、酶标仪 (Bio-Tek), 匀浆器, 恒温水浴锅。

实验试剂: 邻苯二甲酸丁基苄酯 (BBP) 购自天津市博迪化工有限公司 (纯度 $\geq 95\%$), 考马斯亮蓝, AChE、SOD测定试剂购自Sigma公司, 其余均为国产分析纯。

2.2 试验方法

2.2.1 急性毒性试验

按照文献方法进行鱼类急性毒性实验^[4]。在预实验的基础上以对数浓度梯度设置6个BBP质量浓度组, 分别为3.25、3.65、4.05、4.45、4.85、5.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 每个浓度设3个平行, 以曝气自来水为空白对照组。在3L烧杯中放入2L试验用水, 随机放置斑马鱼10尾, 试验期间水温 $25\text{ }^{\circ}\text{C}\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, 不投饵, 每24h更换试验溶液的一半, 然后观察0~96h内斑马鱼的死亡数量, 用SPSS13.0统计分析软件计算96h半数致死浓度 (median lethal concentration, 96h-LC₅₀)。

2.2.2 邻苯二甲酸丁基苄酯毒性试验

在急性半致死试验基础上, 设置4个质量浓度梯度0、0.332、0.665、1.33 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 均设3个平行, 每个浓度组随机放入12尾斑马鱼, 其余试验条件同前。

分别于暴露后第7、14、21、28d 取样, 每次取3尾鱼杀死, 取鱼肌肉组织, 用眼科剪刀剪碎放入匀浆器, 加入10倍 (W/V) 的4 $^{\circ}\text{C}$ 生理盐水 (0.86%NaCl溶液), 匀浆, 离心 (4 $^{\circ}\text{C}$, 8000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$, 10 min),

取上清液测定蛋白质含量、SOD、AChE及CAT活性。

2.2.3 指标测定

a. 蛋白质含量测定

蛋白质含量用考马斯亮蓝法测定^[5]。

b. AChE测定:

采用Gorun改进的Ellman方法^[6]。

c. SOD活性测定:

采用Beachchamp建立的Bewley改良的氮蓝四唑 (NBT) 光化学还原反应法^[7-8]

d. CAT活性测定:

采用血清过氧化氢酶的比色测定^[9]。

2.3 统计分析

实验数据用SPSS 13.0和Origin 5.0软件进行处理, 并进行t检测分析差异性, $p < 0.05$ 表示差异显著, $p < 0.01$ 为差异极显著。

3 结果与分析

3.1 96h急性毒性试验

BBP对斑马鱼急性试验结果如表1所示。从表1中可以看出, 在96h内, 随着BBP质量浓度的升高, 斑马鱼死亡率也随着升高。用SPSS 13.0求得BBP对斑马鱼96h-LC₅₀为 $3.98\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

Table1 The acute toxicity test of butyl benzyl phthalate on *Danio rerio*

表1 邻苯二甲酸丁基苄酯对斑马鱼96h急性毒性试验

项 目	组 别						
	0	1	2	3	4	5	6
BBP 浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	0	3.2	3.6	4.0	4.4	4.8	5.2
		5	5	5	5	5	5
对数浓度	0	0.5	0.5	0.6	0.6	0.6	0.7
		1	6	1	5	9	2
死亡率	0	0.2	0.3	0.4	0.7	0.9	1
96h-LC ₅₀ / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				3.98			
95%的置信区间/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$				3.67~4.25			

3.2 BBP对斑马鱼毒性作用的影响

3.2.1 BBP处理对AChE活性的影响

BBP对斑马鱼AChE活性的影响见图1。由图1可以看出: 各浓度组分别随着时间的延长, 其AChE活性基本呈现下降趋势, 并且AChE活性与染毒浓度呈现一定的剂量效应关系, 即随着染毒浓度组的升高, AChE活性的抑制作用增强。在 $1.33\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组, AChE活性抑制率在7d, 14d, 21d, 28d与其它浓度组相比都达

到了一个最高值,分别为27.2%, 24.2%, 31.4%和46%。

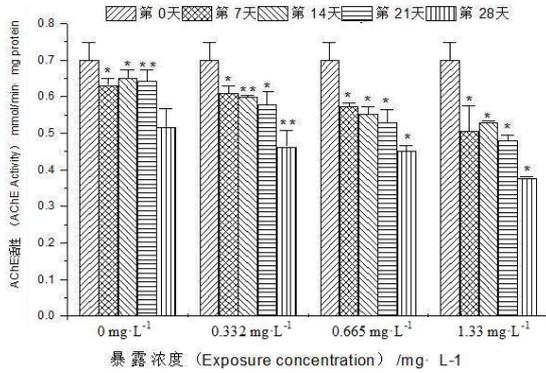


Figure 1. Effects of Butyl benzyl phthalate on AChE activities of *Danio rerio* (*, **: compared with the control, $p < 0.05$, $p < 0.01$)
图1.不同浓度邻苯二甲酸丁基苯酯处理后斑马鱼AChE活性的影响 (*, **: 与对照相比, $p < 0.05$, $p < 0.01$)

3.2.2 BBP处理对SOD活性的影响

BBP对斑马鱼AChE活性的影响见图2。由图2可以看出: SOD活性整体呈现低浓度刺激-高浓度抑制效应。在0.332 mg·L⁻¹时, SOD活性在第7d, 14d均被显著诱导 ($p < 0.05$), 诱导率分别为49.8%和63.2%, 其中在第14d达到最大值 (14.72 U/h·mg protein), 随着染毒时间的增加诱导率降低, 分别在21d、28d为30.8%和13%; 在0.665 mg·L⁻¹时, SOD活性相比对照组在各个时间均被抑制; 在1.33 mg·L⁻¹, SOD活性被显著抑制达到最低值, 在7d, 14d, 21d, 28d分别为70.4%, 67%, 60.2%和66%, 其中在第7d有极显著抑制作用 ($p < 0.01$)。

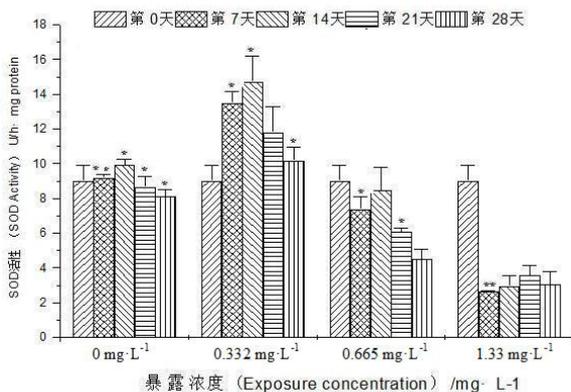


Figure 2. Effects of Butyl benzyl phthalate on SOD activities of *Danio rerio* (*, **: compared with the control, $p < 0.05$, $p < 0.01$)
图2.不同浓度邻苯二甲酸丁基苯酯处理后斑马鱼SOD活性的影响 (*, **: 与对照相比, $p < 0.05$, $p < 0.01$)

3.2.3 不同浓度BBP处理对CAT活性的影响

BBP对斑马鱼CAT活性的影响见图3。由图3可以看出: 各浓度组CAT活性随着染毒时间的增加, 最后都呈现出诱导作用。在0.332 mg·L⁻¹时, CAT活性呈现先上升后下降的趋势, 但相比对照组均显示诱导作用; 在0.665 mg·L⁻¹时, CAT活性在第7d和14d呈现极显著抑制作用 ($p < 0.01$), 在21d和28天逐步呈现上升趋势; 在1.332 mg·L⁻¹时, CAT活性呈现先下降后上升的趋势, 在第21d呈现极显著抑制作用 ($p < 0.01$), 达到最低值 (14.17 μmol/min·L·mg protein)。

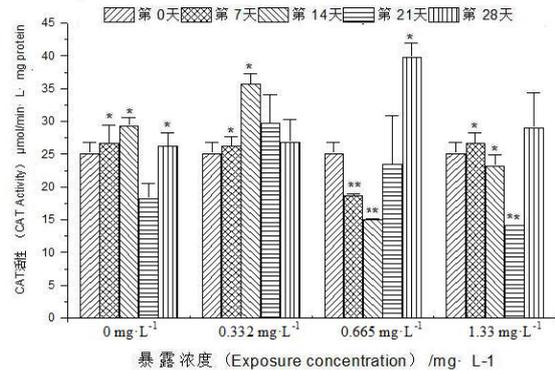


Figure 3. Effects of Butyl benzyl phthalate on CAT activities of *Danio rerio* (*, **: compared with the control, $p < 0.05$, $p < 0.01$)
图3.不同浓度邻苯二甲酸丁基苯酯处理后斑马鱼CAT活性的影响 (*, **: 与对照相比, $p < 0.05$, $p < 0.01$)

4 讨论

研究表明, BBP 其具有明显的睾丸毒性、致畸性和胚胎毒性, 可引发血清中睾酮减少、促卵激素的增加及子宫增大, 并改变性别分化。本研究从对水体生物安全性角度研究了BBP对斑马鱼的毒性。实验表明, BBP 斑马鱼 96 h-LC₅₀ 为 3.98 mg·L⁻¹, 根据毒物对鱼类的毒性分级标准^[10], BBP 对斑马鱼属中等毒性。

BBP对斑马鱼的急性毒性效应可能与BBP抑制机体关键酶如AChE、SOD、CAT活性有关。AChE是一种丝氨酸水解酶, 在脊椎动物和无脊椎动物体内广泛分布, 是生物正常的神经传导活动中必不可少的一种关键性酶。SOD是一种广泛存在于生物体内与细胞氧化代谢密切相关的蛋白质, 是集体防御过氧化损害系统的关键酶之一, 是超氧阴离子自由基 (O²⁻) 的清除剂。CAT是鱼体内的一种重要的抗氧化酶, 它可以与谷胱甘肽过氧化物酶一起, 清除长链脂肪酸代谢以及SOD歧化超氧阴离子自由基 (O²⁻) 产生的过氧化氢, 阻断活性氧的大量产生。本实验表明, BBP对AChE、SOD、CAT具有明显影响。

随着暴露浓度的增加和时间的延长, AChE活性明显呈现递减趋势, BBP对于鱼类AChE的作用机制尚未被报道, 由于AChE是膜结合蛋白质, 主要定位于细胞膜和突触前膜, 因此, BBP对斑马鱼AChE的抑制作用表明BBP可能具有膜毒性作用, BBP通过对膜的影响从而影响AChE活性, 发挥其毒性作用。

低剂量作用时, SOD、CAT活性均呈现出诱导作用, 当BBP进入到斑马鱼体内后, 生物体受到轻度逆境胁迫, 引起 $O_2^{\cdot -}$ 的大量产生, 此时, 机体为防止细胞膜系统过氧化作用的发生而被诱导合成大量的SOD来清除 $O_2^{\cdot -}$, 此时CAT也被诱导产生来清除那些过多的 H_2O_2 。随着暴露浓度的增加和时间的延长, SOD活性呈现下降的趋势, 这是由于过多的BBP进入, 重度和长时间逆境胁迫超过生物体抗氧化防御系统的防御能力, 使体内积累过量的活性氧, 使得机体对于SOD的诱导跟不上体内 $O_2^{\cdot -}$ 增加的速度, 最终导致机体细胞膜系统过氧化。但是在高浓度暴露下, CAT活性最后仍显示出诱导作用, 这说明, SOD与CAT的变化模式并不完全等同, 这与Livingstone等报道一致, 这种现象可能主要由于 $O_2^{\cdot -}$ 歧化反应并不是 H_2O_2 的唯一来源^[1]。

综合以上分析可以看出, BBP对斑马鱼属中等毒性, 斑马鱼肌肉AChE和抗氧化系统是BBP重要的作用靶点, BBP可能是通过对机体AChE的影响和抗氧化系统的作用而发挥毒性作用的。

References (参考文献)

- [1] Liu Huijie. Toxicological effect and risks of phthalate acid esters on the health of population [J]. *Acta Academiae Medicinae militaris Tertiae*, 2004, 26 (19):1778-1781.
- [2] 刘慧杰. 邻苯二甲酸酯类化合物的毒理学效应及对人群健康的危害[J]. *第三军医大学学报*, 2004, 26 (19): 1778-1781.
- [3] R.M. David, M.R. Moore, M.A. Cifone, D.C. Finney, D. Guest. Chronic peroxisome proliferation and hepatomegaly associated with the hepatocellular tumorigenesis of di-(2-ethylhexyl) phthalate and the effects of recovery [J]. *Toxicol Sci*, 1999, 50:195-205.
- [4] Chen Zhengfu, Zhu Jian, Zhou Yakang. Analysis and evaluation of environmental hormones [M]. Beijing Chemical Industry Press, 2004.
- [5] 陈正夫, 朱坚, 周亚康. 环境激素的分析与评价[M].北京: 化学工业出版社, 2004.
- [6] Zhou Yongxin, Zhang Zongshe. Aquatic toxicity test methods [M]. Beijing: Agriculture Press, 1989.
- [7] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性实验方法[M]. 1989, 北京: 农业出版社.
- [8] Bradford M. A Rapid and Sensitive Assay of Protein Utilizing the Principle of Dye Binding [J]. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72:248-254.
- [9] GAO Xi-wu. The method of Ellman about the cholinesterase activity determination improved by Gorun [J]. *Entomol Knowl*, 1987, 24(4):245-246.
- [10] GAO Xi-wu(高希武). Gorun等改进的Ellman胆碱酯酶活性测定方法介绍[J]. *Entomol Knowl(昆虫识)*, 1987, 24(4): 245-246.
- [11] BeauchampC. I Fridovich, Superoxide dismutas, Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel [J].*Anal Biochem*, 1971, 44:246-278.
- [12] Bewley T D. Physiological aspects of desiccation tolerance [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1979, 30:195-238.
- [13] Zhou Qiang, Cao Chunyan, 2001. Serum catalase colorimetric determination [J]. *Journal of Harbin medical university*, 2001, 35(6):473.
- [14] 周强, 曹春燕.血清过氧化氢酶的比色测定[J].*哈尔滨医科大学学报*, 2001, 35 (6) :473.
- [15] Cai Daoji. Environmental Toxicology of Pesticides [M]. Beijing, China Environmental Science Press, 1999.
- [16] 蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1999.
- [17] Livingstone DR, Archibald S, Chipman J K, et al. Antioxidantenzymes in liver of the dab (*Limanda*) from the North Sea[J]. *Mar Ecol Prog Ser*, 1992, 91:97-104.