

# The Effects of Antibiotics on Mariculture Antioxidant Enzymes and Lipid Peroxidation in Sea Urchins as Model Organisms

Jun DING, Xuefeng SUN, Bo ZHANG, Yaqing CHANG

Dalian Ocean University, Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture, Dalian, China, 116023

Email: dingjun1119@dloou.edu.cn

**Abstract:** Sea urchin (*Strongylocentrotus intermedius*) was used to study the effect of four kinds of antibiotics most in use on the activity of CAT and SOD, and MDA which reflected the extent of peroxidation of membrane lipid. The results showed that: (1) under the experimental conditions, effects of different concentrations of various antibiotics on the sea urchin body fluid CAT, SOD activity were with the processing time first increased and then decreased, and achieved the maximum impact on the 9th day after treatment. (2) MDA content in each experimental group with the treatment time, showed a rising tendency, and the "Homesis" phenomenon happened in the early stage of experiment; 15 days after treatment, only tetracycline hydrochloride and ampicillin of 1.5mg/L concentrations MDA content significantly higher than the rest at different times and different concentrations of MDA content compared with the control group. This research laid the foundation of biological monitoring of aquaculture water and the safety of using antibiotics for seafood production.

**Keywords:** *Strongylocentrotus intermedius*; antibiotics; CAT; SOD; MDA

## 以海胆为模式生物的抗生素对海水养殖生物抗氧化酶及膜脂质过氧化影响研究

丁君, 孙雪峰, 张勃, 常亚青

(大连海洋大学 农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室, 大连, 中国, 116023)

Email: dingjun1119@dloou.edu.cn

**摘要:**本研究以虾夷马粪海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 为实验材料, 进行4种常见抗生素四环素、硫酸链霉素、青霉素和氨苄青霉素对虾夷马粪海胆体腔液过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 及反映膜脂过氧化程度的丙二醛 (MDA) 含量的影响研究, 结果表明: (1) 实验条件下, 各抗生素不同浓度对海胆体腔液 CAT、SOD 活性影响均随处理时间的延长呈现先上升后下降的趋势, 大体在处理第9天达到最大值, 抗生素对海胆免疫酶影响明显。(2) 各实验组 MDA 含量均随处理时间的延长, 呈现逐渐上升的趋势, 实验初期出现“Homesis”现象; 处理后15天, 仅四环素盐酸盐和氨苄青霉素的1.5mg/L浓度组 MDA 含量显著高于对照组, 其余不同时间、不同浓度处理组的 MDA 含量较对照组变化均不显著。抗生素对海胆膜脂质过氧化作用影响不显著。本研究为分析评价4种抗生素的环境安全性提供相应的毒理学资料; 为利用模式生物监测抗生素对海洋生物的影响研究奠定基础。

**关键词:** 虾夷马粪海胆; 抗生素; CAT; SOD; MDA

### 1 引言

抗生素一般是指由细菌、霉菌或其它微生物在繁殖过程中产生的, 能够杀灭或抑制其它微生物的一类

物质及其衍生物, 及用化学方法合成或半合成的化合物。它不仅能杀灭细菌, 而且对霉菌、支原体、衣原体等其它致病微生物也有良好的抑制和杀灭作用, 因此, 抗生素的发现与应用, 在人类保健及动植物病虫害防治方面发挥着巨大作用。但随着其在生产中的大

\*: 项目资助: 国家海洋局开发研究基金 (200906); 辽宁省“百千万”人才工程支持计划; 辽宁省农业攻关计划 (2007203004)

量应用, 抗生素污染问题变得越来越严重; 同时, 抗生素结构复杂, 属生物难降解物质, 具有较强的抑菌和灭菌作用, 很容易在环境中富集, 诱导耐药菌株产生, 对环境微生态造成严重的影响<sup>[1]</sup>。抗生素药物最终会随着径流进入海洋, 而抗生素对海洋环境及其中的生物造成的影响还少有研究和报道。

以往在评价污染物对生物毒性效应时, 常用半致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 作为评价指标<sup>[2]</sup>, 而存在于环境中的污染物经常是以低浓度、长时间作用于生物体, 因此近年来, 生态毒理学和生态化学领域越来越广泛地把生物体内各种酶学指标作为生物学标志, 以评估受试化学品对生物的生态毒理效应<sup>[3-4]</sup>。本研究选用一种重要的海水养殖棘皮动物, 同时也是胚胎发育的模式生物海胆 (*Strongylocentrotus intermedius*) 为研究对象, 研究了不容暴露浓度和不同作用时间下, 4 种常见抗生素四环素、硫酸链霉素、青霉素和氨苄青霉素对虾夷马粪海胆体腔液过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活力, 及反映膜脂过氧化程度的 MDA 影响研究。本研究为分析评价这四种抗生素的环境安全性提供相应的毒理学资料。研究为分析评价这 4 种抗生素的环境安全性提供相应的毒理学资料; 为利用模式生物监测抗生素对海洋生物的影响研究奠定基础。

## 2 材料与方法

### 2.1 材料

海胆为农业部海洋水产增养殖学重点开放实验室培育的虾夷马粪海胆, 壳径 15 mm -20mm, 实验期间按常规方法在 60L 塑料槽中培育, 饵料为新鲜海带 (*Laminaria japonica*), 海水为经砂滤池过滤的新鲜海水。

### 2.2 方法

#### 2.2.1 样品的制备

实验用抗生素: 四环素、硫酸链霉素、青霉素和氨苄青霉素, 购于北京经科宏达生物技术有限公司, 监测试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

将抗生素分别设为 0.5 mg·L<sup>-1</sup>、1.0 mg·L<sup>-1</sup> 和 1.5mg·L<sup>-1</sup> 三个梯度, 试验容器为 60mL 的塑料水槽, 每组投放 30 个受试虾夷马粪海胆, 在培养第 3、6、9、

12 和 15d 后抽取其体腔液, 培养 15d 后进行恢复实验, 3d 后抽取体腔液。抽取的体腔液置于 -80℃ 冰箱中保存, 测定前将体腔液匀浆, -4℃ 离心后取上清液测定。

#### 2.2.2 蛋白含量测定

考马斯亮兰蛋白法测定体腔液蛋白含量, 反应体系为 305 μl 体腔液用灭菌海水 1:1 稀释后取 5 μl, 加入 300 μl 考马斯亮蓝显色剂, 混匀, 放置 10 分钟, 使用酶标仪在 595nm 处检测 OD 值。

计算公式: 蛋白含量 (g/L) = (测定管 OD 值 - 空白管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 空白管 OD 值) \* 标准蛋白液浓度 (g/L) \* 稀释倍数。

#### 2.2.3 过氧化氢酶 (CAT) 测定

过氧化氢酶活性测定采用钼酸铵法, 体腔液用灭菌海水 1:1 稀释后测定, 操作方法同上, 实验设置 3 个空白对照, 每个样品设置 1 个自身对照, 3 个平行, 酶标仪 405nm 处检测。

计算公式: 体腔液中 CAT 活力 (U/mgHb) = [(空白管 OD 值 + 自身对照管 OD 值 - 测定管 OD 值) \* 271 / (60 \* 加样量) \* 样本稀释倍数] / 体腔液蛋白含量 (mgHb/ml)。

#### 2.2.4 超氧化物歧化酶 (SOD) 测定

黄嘌呤氧化酶法测定超氧化物歧化酶及 Cu-Zn 超氧化物歧化酶活性, 每个样品设置 3 个对照管, 每个样品做 3 个平行, 酶标仪 550nm 处检测。

计算公式: 总 SOD 活力 (U/ml) = (对照管 OD 值 - 测定管 OD 值) / 对照管 OD 值 / 50% \* 反应体系的稀释倍数 \* 样本测试前的稀释倍数。

#### 2.2.5 丙二醛 (MDA) 测定

TAB 法测定体腔液丙二醛含量, 加完试剂后漩涡混匀器混匀, 管口用保鲜膜扎紧, 用针头刺一小孔, 95℃ 水浴 40 分钟, 取出后流水冷却, 将等量反应液转移到 96 孔酶标板, 酶标仪在 532nm 处检测。

计算公式: MDA 含量 (nmol/mg) = [(测定管 OD - 测定空白管 OD) / (标准管 OD - 标准空白管 OD)] \* 标准品浓度 / 蛋白含量。

### 2.3 统计分析

实验数据采用数理统计法将实验组与对照组及其组间差异进行显著性 t-检验, 数据结果显示为平均值 ± 标准误差 (Mean ± SEM), P < 0.05 差异显著, P < 0.01 差异极显著。

### 3 结果与分析

#### 3.1 4种抗生素对海胆CAT的影响

不同浓度的4种抗生素在不同处理时间下,对虾夷马粪海胆体腔液CAT活性变化影响见图1。

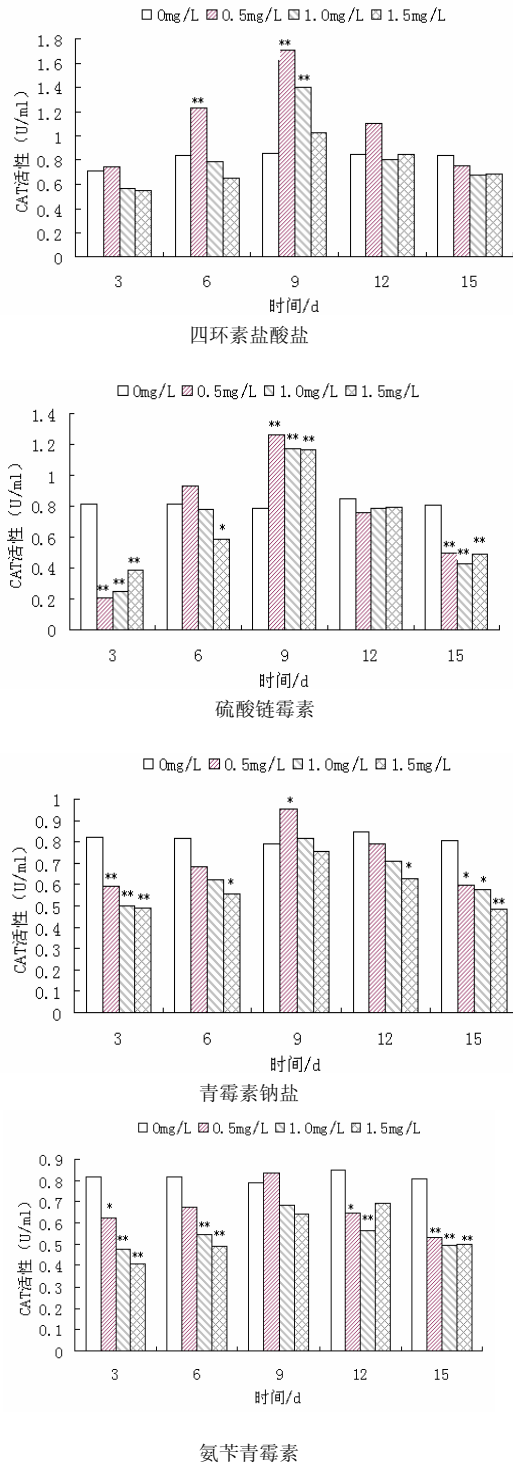


Figure 1. Effects of on CAT activity in coelomic fluid of sea *S. intermedius*

Values are means  $\pm$  SD(n=3), \* < 0.05; \*\* < 0.01

图 1. 4种抗生素对海胆体腔液CAT活性的影响

**四环素盐酸盐** 处理第3-12d, 0.5mg/L浓度对CAT活性起到诱导作用。在6-9d, CAT活性被极显著诱导(P < 0.01), 处理第9d达到最大值, 随后CAT活性逐渐下降; 1.0mg/L、1.5mg/L组仅在第9d时对CAT活性起到诱导作用, 1.0mg/L组CAT活性极显著高于对照组(P < 0.01)。其余各时间均对CAT活性起抑制作用。

**硫酸链霉素** 处理第3d、15d, 各组CAT活性均被极显著抑制(P < 0.01)。处理第6d, 0.5mg/L组对CAT活性起诱导作用, 1.5mg/L组CAT活性极显著低于对照组(P < 0.01)。处理第9d, 各组对CAT活性均起极显著诱导作用(P < 0.01)。处理第12d, 各组CAT活性均被抑制, 但差异不显著。

**青霉素钠盐** 处理第9d, 0.5mg/L浓度组可诱导CAT活性, 其含量显著高于对照组(P < 0.05), 1.0mg/L浓度组CAT活性稍高于对照组, 其余各组均起抑制作用。处理第3d, 各组CAT活性均极显著低于对照组(P < 0.01)。处理第6、12d, 仅1.5mg/L组显著低于对照组(P < 0.05); 处理第15d, 1.0mg/L组显著低于对照组(P < 0.05), 1.5mg/L组极显著低于对照组(P < 0.01)。

**氨苄青霉素** 处理第9d, 0.5mg/L组对CAT活性起诱导作用, 其余各组均为抑制作用。处理第3d, 0.5mg/L组CAT活性显著低于对照组(P < 0.05), 1.0mg/L、1.5mg/L组极显著低于对照组(P < 0.01)。处理第6d, 1.0mg/L、1.5mg/L组CAT活性极显著低于对照组(P < 0.01)。处理第12d, 0.5mg/L组CAT活性显著低于对照组(P < 0.05), 1.0mg/L组极显著低于对照组(P < 0.01)。处理第15d, 各组CAT活性均极显著低于对照组(P < 0.01)。

由结果可知, 各实验组CAT活性均随着处理时间的延长大体呈现先上升后下降的趋势, 4种抗生素各浓度组均在处理第9d诱导海胆体腔液种CAT活性达到最大值。

#### 3.2 4种抗生素对海胆SOD的影响

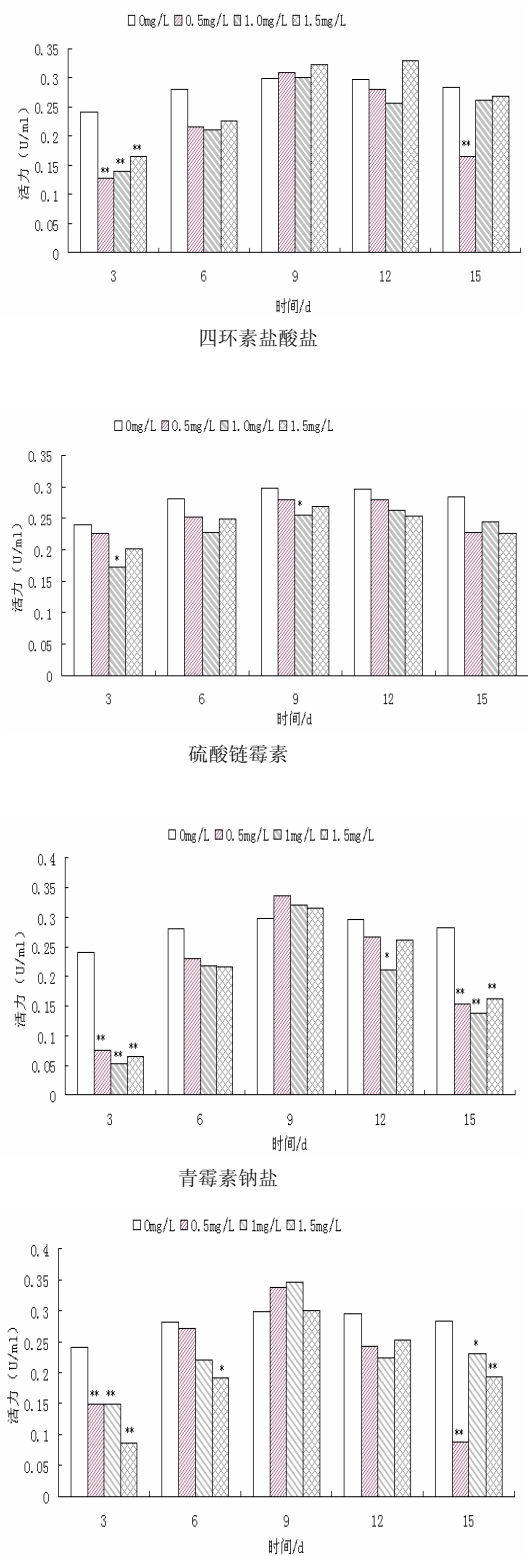
不同浓度的 4 种抗生素在不同处理时间下, 对虾夷马粪海胆体腔液 SOD 活性变化的影响见图 2。

氨苄青霉素

Fig.2 Effects of on SOD activity in coelomic fluid of sea *S. intermedius*

Values are means  $\pm$  SD(n=3), \* $<$ 0.05; \*\* $<$ 0.01

图 2. 各抗生素对海胆体腔液 SOD 的影响



**四环素盐酸盐** 处理第 3d, 各浓度组抑制海胆体腔液 SOD 活性, 与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 随后, 后 SOD 活性逐渐上升。处理第 9d, 各浓度组对 SOD 活性起诱导作用, 并且达到最大值, 随后 SOD 活性逐渐下降。处理第 15d, 仅有 0.5mg/L 浓度组海胆体腔液 SOD 活性极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 其余各组差异不显著。

**硫酸链霉素** 整个实验过程, 硫酸链霉素对海胆体腔液 SOD 活性均产生抑制作用。处理第 3、9d, 1mg/L 浓度组 SOD 活性显著低于对照组, 随后各组呈现先上升后下降的趋势, 于第 9d 天达到最大值。

**青霉素钠盐** 处理第 3d, 各浓度组对 SOD 活性产生抑制作用, 且与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 随后 SOD 活性开始逐渐上升; 处理第 9d, 各浓度组对 SOD 活性表现为诱导作用, 各组 SOD 活性上升达到最大值, 并高于对照组。处理第 15d, 各组海胆体腔液 SOD 活性均极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。

**氨苄青霉素** 处理第 3d, 氨苄青霉素各浓度对 SOD 活性产生抑制作用, 与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 随后 SOD 活性逐渐上升。处理第 6d, 仅 1.5mg/L 组 SOD 活性显著低于对照组。处理第 9d, 各浓度组对 SOD 活性表现为诱导作用, 各组 SOD 活性均达到最大值。处理第 15d, 各组海胆体腔液 SOD 活性下降, 0.5mg/L、1.5mg/L 组极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ), 1.0 mg/L 组显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。

由实验结果可知, 各实验组 SOD 活性均随着处理时间的延长呈现先上升后下降的趋势, 且各抗生素在处理第 9d SOD 活性达到最大值。

### 3.3 4 种抗生素对海胆 MDA 的影响

不同浓度的 4 种抗生素在不同处理时间下, 对虾夷马粪海胆体腔液 MDA 活性变化的影响见图 3。

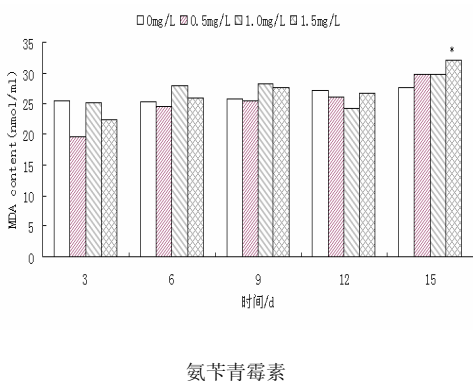
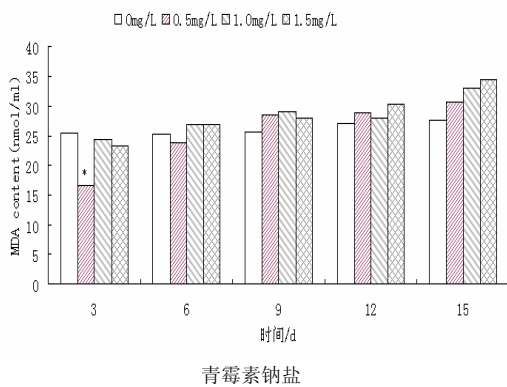
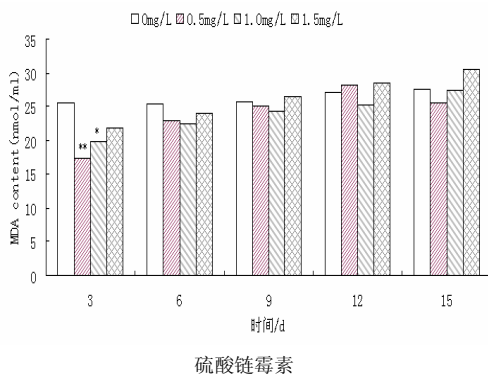
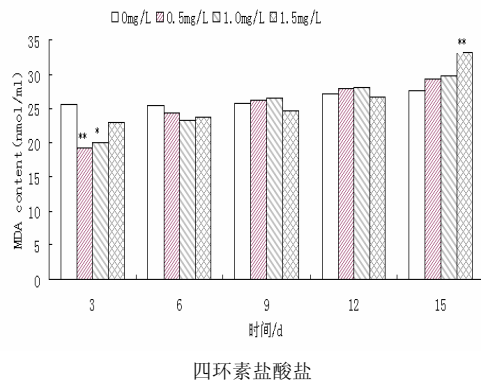


Fig.3 Effects of on MDA in coelomic fluid of sea *S. intermedius*  
Values are means ± SD(n=3), \* < 0.05; \*\* < 0.01

图 3. 各抗生素对海胆体腔液 MDA 含量的影响

**四环素盐酸盐** 处理第 3d, 0.5mg/L 组脂质过氧化作用极显著减弱 ( $P < 0.01$ ), 1mg/L 浓度组显著减弱 ( $P < 0.05$ ), 随后各组脂质过氧化作用逐渐增强; 处理第 15d, 各组 MDA 含量高于对照组, 且达到最大值, 其中 1.5mg/L 浓度组脂质过氧化作用极显著增强 ( $P < 0.01$ ).

**硫酸链霉素** 处理第 3d, 0.5mg/L 浓度组脂质过氧化作用极显著减弱 ( $P < 0.01$ ), 1.0mg/L 浓度组脂质过氧化作用显著减弱 ( $P < 0.05$ ), 处理后第 6d, 脂质过氧化作用缓慢增强。

**青霉素钠盐** 处理第 3d, 0.5mg/L 浓度组脂质过氧化作用显著减弱 ( $P < 0.01$ ), 从处理后第 6d, 脂质过氧化作用缓慢增强, 且高于对照组。

**氨苄青霉素** 处理第 3d, 各组脂质过氧化程度低于对照组, 从处理后第 6d, 脂质过氧化作用缓慢增强。处理第 15d, 1.5mg/L 浓度组脂质过氧化作用显著增强 ( $P < 0.01$ ).

由图 3 可知, 各组 MDA 含量均随处理时间的延长, 大体呈现缓慢上升趋势。处理后一段时间内有 MDA 含量低于对照组的出现, 尤其是处理后 3d, 即有“Homesis”现象出现。仅在处理第 15d, 四环素盐酸盐、氨苄青霉素 1.5mg/L 浓度组的海胆体腔液 MDA 含量显著高于对照组, 其余各时间与对照组相比较差异不显著, 说明除处理后第 15d, 各抗生素未对海胆体腔液产生显著的脂质过氧化作用。

#### 4 讨论

生物膜的膜质过氧化会降低膜的流动性和选择透性, 导致生物膜功能的部分或全部丧失, MDA<sup>[5-7]</sup>是膜脂质氧化的主要产物之一, 其浓度的变化既可用于脂质过氧化程度的衡量指标, 也可间接反映机体活性氧的累积。过氧化氢酶、超氧化物歧化酶是机体内的 2 种抗氧化酶, 作用是清除体内的自由基, 防止自由基对细胞结构的损伤, 特别是防止机体内过氧化脂质生成而导致的细胞膜流动性降低, 核酸和染色体被破坏<sup>[8]</sup>。脂质过氧化与抗氧化防御系统的变化相结合,

既可反映具有氧化还原活性污染物的暴露，也可反映生物受到氧化胁迫的程度。

国内外有关抗生素对生物体内抗氧化酶影响的报道不多，区炳庆<sup>[9]</sup>等报道了多黏菌素对雏鸭血液中超氧化物歧化酶活性及丙二醛含量的影响，研究表明口服组及肌肉注射低剂量组给药 2d 后，雏鸭血浆中 SOD 活性明显升高，血浆中 MDA 含量于给药后 4d 显著或极显著升高；肌肉注射中、高剂量组给药 2d 后，雏鸭血浆中 SOD 活性极显著降低，而血浆中 MDA 含量显著或极显著升高，随后各处理组雏鸭血浆中 SOD 活性均极显著下降。表明机体在给予多黏菌素刺激后，引起组织细胞内一系列变化，产生一定量的自由基<sup>[10]</sup>，从而诱导 SOD 合成，以减弱自由基对膜脂质过氧化作用，使血浆中 MDA 含量降低，随着时间的延长及给药剂量的增大，自由基过量产生，超过了 SOD 的清除能力，引起血浆中 SOD 活性下降而 MDA 含量显著升高。

本实验的研究结果分析，海胆体腔液在抗生素作用下产生大量自由基，CAT、SOD 活性随之升高，以清除过量的自由基，因此出现 CAT、SOD 酶活性在处理第 6d 逐渐升高，处理后第 9d，各组 CAT、SOD 活性达到峰值，但一些未及时清除的自由基对细胞产生了伤害，CAT、SOD 酶活性逐渐回落。随着抗生素对海胆处理时间的延长，海胆体腔液脂质过氧化程度逐渐增强，体腔液中 CAT、SOD 活性的增强不足以弥补抗生素对机体造成的氧化损伤，MDA 含量不断升高，处理 15d 后，四环素盐酸盐和氨苄青霉素处理下的海胆体腔液 MDA 含量显著高于对照组，CAT、SOD 活性与 MDA 含量呈现一种负相关性，显示机体中 MDA 含量的增加可能与机体 CAT 和 SOD 活性的下降有关。

本研究显示，CAT、SOD 对海胆伤害程度反应较灵敏，在处理 3d 后活性急剧下降，以后逐渐回升，处理 9d 后达到峰值，可以考虑将海胆免疫酶作为海洋抗生素污染的生物监测指标。

本研究显示，海胆在 4 种抗生素处理 3d 后的脂质过氧化程度低于对照组，随后缓慢上升，推测是“Homesis”现象<sup>[11-12]</sup>。近年来“Hormesis”现象成为毒理学中关注的热点，它是指化学物对生物体在高剂量时表现负面影响，但在低剂量时却表现为有益作用的现象。而其相应提出的毒物兴奋模型也成为一种新的剂量-效应关系模型，并在环境、医学、公共卫生等领域产生了一定的影响。海胆对 4 种抗生素的这种反应将在随后的研究中继续关注。

## References (参考文献)

- [1] Wanglan. Antibiotic pollution and environmental impact of microbial[J].Pharmaceutical Biotechnology,2006,13 (2): 144-148.
- [2] Wang guoxiang. Monitoring of aquatic organisms in China revised specifications [J]. Environmental Science & Technology,1998,10 (3): 21-25.
- [3]Zhong caigao,Liu xinmin. Toxic effects of mercury on microbial[J]. Practical Preventive Medicine.1995,2(1):1-4.
- [4]Xiu ruiqin,Xu yongxiang,Gao shirong. Several environmental biotechnology research to test new technology[J]. Ecological Science,1992,2:18-22.
- [5] Zhang peiyu,Tang xuexi,Dong shuanglin. Anthracene on antioxidant enzyme activities in different tissues of different effects on membrane lipid peroxidation [J]. Marine Environmental Science,2007,6 (5): 434-437.
- [6] Michele R. Pascal H. Ginette G. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediteranean[J]. Environ Pollut,2003,122:369-378.
- [7] Chenrong,Wei fengqin,Wang chonggang. 0 # Diesel water-soluble components on the cucullata lipid peroxidation [J]. Fisheries Science,2005,29(2):150-153.
- [8] Hiramisu M.E. Danasur Moria. Free radicals,lipid peroxidation,SOD activity,neurofransmitters and choline acetyltransferase activity in the aged rat brain[J].EXS,1992,62:213-218.
- [9] Qu bingqing,Zhao haiquan. Polymyxin B on chicken blood SOD activity and MDA content[J]. Veterinary Technology,2004.
- [10] Sun cunshan,Zhang jianzhong,Duan shaojin. Introduction to Free Radical Biology[M].Heifei: Science and Technology University Press,1999.
- [11] Stebbing A R D. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. Sci Tol Envir,1988,22(1):213-234.
- [12]Calabrese EJ, Baldwin LA. Hormesis as biological hypothesis[J]. Environ Health Perpec,1998,106(Supp 1):357-362.