DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2015.05.008

苯系物对仿刺参肠、呼吸树谷胱甘肽过氧化物酶基因表达的影响

董 颖[1],王 摆[1],崔 程[2],李姝熳[3],高士博[1],
高 杉[1],关晓燕[1],姜 北[1],周遵春[1]

(1.辽宁省海洋水产科学研究院,辽宁 大连 116023;2.辽宁省水产技术推广总站,辽宁 沈阳 110031
3.山东省南四湖水质监测中心,山东 济宁 272100)

摘 要:选择我国黄、渤海重要底栖生物—仿刺参幼参为受试生物,采用实时定量 PCR 方法,检测 6 种苯系物(苯、甲苯、乙基苯、邻—二甲苯、间—二甲苯、对—二甲苯)对仿刺参肠、呼吸树两种组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因相对表达量的影响。结果表明,6 种苯系物造成仿刺参呼吸树、肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因相对表达量显著变化,并具有显著的剂量—效应关系。其中,苯、邻—二甲苯、对—二甲苯导致呼吸树中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数为 2.6~41.7;甲苯、间—二甲苯导致呼吸树中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著上调,上调倍数为 2.6~86.4。邻—二甲苯、间—二甲苯、对—二甲苯处理组肠谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数为 1.2~38.5。6 种苯系物对仿刺参具有氧化胁迫作用。

关键词:苯系物;仿刺参;谷胱甘肽过氧物酶;呼吸树;肠

中图分类号:S968.9 **文献标识码**:A **文章编号**:1003-1111(2015)05-0311-05

谷胱甘肽过氧化物酶是机体内广泛存在的一种重要过氧化物分解酶,可以将体内的还原性谷胱甘肽催化成氧化型谷胱甘肽,消除机体内过氧化氢和脂质过氧化物[1]。作为重要的抗氧化酶,谷胱甘肽过氧化物酶与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶等协同作用,维持机体内正常的氧化还原水平[2-3],还可以指示机体因污染物胁迫产生的氧化压力[4-5]。欧美地区已将谷胱甘肽过氧化物酶列为指示和评价水环境污染的重要生化指标之一[6-9]。大量研究表明,水体中重金属、农药、多环芳烃等污染物均可造成水生物体内谷胱甘肽过氧化物酶活力和转录水平的异常变化[10-16],因此谷胱甘肽过氧化物酶常被用作指示海洋环境污染评价的生物标志物[17-19]。目前,在环境污染评价中大多选择鱼类、贝类的谷胱甘肽过氧化物酶活性作为评价指标,而将仿刺参谷胱甘肽过氧化物酶基因相对表达量应用于污染物评价尚未见报道。

近年来,由于海上石油运输、突发海洋溢油以及沿海石油化工废水排放,造成苯系物入海量增加。朱四喜等[20]曾报道浙江舟山潮间带沉积物中二甲苯含量高达 40.24~124.45 mg/kg,苯系物对我国近岸海洋生态环境安全构成潜在威胁。因此,开展苯系物对海洋生物毒性研究尤为重要。笔者选择我国北方地区代表性底栖生物仿刺参(*Apostichopus japonicus*)幼参为试验生物,用定时定量 PCR 检测 6 种苯系物处理后,仿刺参呼吸树和肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因转录水平的变化,指示 6 种苯系物对仿刺参氧化胁迫作用,为开展近岸海洋环境苯系物的生物毒性评价提供基础数据。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

仪器:Mx3000p™ 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Stratagene),Nano Photometer 微量核酸蛋白分析仪(德国 Implen 公司),CT15RE 型台式微量高速离心机(日本 Hitachi)。

药品和试剂:组织 RNA 常温保存液(TaKaRa),Trizol 试剂(TaKaRa),PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa),SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit II (TaKaRa),苯、甲苯、乙基苯、邻—二甲苯、

收稿日期:2014-10-31; 修回日期:2014-12-24.
基金项目:国家海洋公益性行业科研经费专项项目(201205012-7);大连市科学技术基金资助项目(2012J21DW029).
作者简介:董颖(1971-),女,副研究员;研究方向:水产养殖.E-mail:ebuma@sina.com.通讯作者:周遵春(1967-),男,研究员,研究方向:海洋生物学.E-mail:zunchunz@hotmail.com.

间—二甲苯、对—二甲苯和二甲基亚砜(DMSO)均为分析纯(中国国药有限公司)。

1.2 仿刺参的苯系物处理及取样

仿刺参为辽宁省海洋水产科学研究院引育种中心培育的幼参,幼参体质量(10±2) g,驯养 7 d 后,选取健康幼参用于试验。

6 种苯系物的试验质量浓度设置为 1/5、1/25 和 1/125 的 96 h LC_{50}(表 1),分别对应苯(B1、B2、B3)、甲苯(T1、T2、T3)、乙基苯(E1、E2、E3)、邻—二甲苯(O1、O2、O3)、间—二甲苯(M1、M2、M3)、对—二甲苯(P1、P2、P3)处理组,同时设置空白对照组(C),各处理组设 3 个平行。配置 1000 倍试验母液,在玻璃缸中配制 15 L 试验溶液,每个缸中加5～6 头幼参,试验条件:水温 15 ℃,盐度 30,pH 8.0,溶解氧大于 4.5 mg/L,避光。根据预试验结果,取各处理组 12 h 的仿刺参,在冰上取用于仿刺参呼吸树、肠 RNA 提取样品,放于 RNA-Be-Lockebr A,4 ℃过夜,—20 ℃保存备用。

表 1 6 种苯系物试验质量浓度设置 mg/L

苯系物	1/5 96 hLC_{50}	1/25 96 hLC_{50}	1/125 96 hLC_{50}
苯	20.32 (B1)	4.06 (B2)	0.81 (B3)
甲苯	11.66 (T1)	2.33 (T2)	0.47 (T3)
乙基苯	8.68 (E1)	1.74 (E2)	0.35 (E3)
邻—二甲苯	6.92 (O1)	1.38 (O2)	0.28 (O3)
间—二甲苯	5.44 (M1)	1.09 (M2)	0.22 (M3)
对—二甲苯	4.05 (P1)	0.81 (P2)	0.16 (P3)

用 Trizol 法提取仿刺参呼吸树、肠总 RNA,电泳检测 RNA 的完整性,核酸蛋白分析仪检测 RNA 的纯度和浓度。

1.3 实时定量 PCR

仿刺参呼吸树、肠谷胱甘肽过氧化物酶 GPx 基因实时定量 PCR 参照高杉等试验方法[21-22]。分别取各处理组呼吸树、肠 900 ng 总 RNA 用 PrimeScript™ RT reagent Kit (TaKaRa)进行反转录。使用 Mx3000p™ 荧光定量 PCR 仪,采用 SYBR PrimeScript™ RT-PCR Kit Ⅱ进行实时定量 PCR,谷胱甘肽过氧化物酶基因的引物序列:

GPx-F:5'-CTTCAGGAACCGGGAGCAA-3';

GPx-R:5'- CGTTAGCGCCATTGACGTCACA -3'。

内参基因 Cytb 的引物序列:

Cytb-F:5'-TGAGCCGCAAC AGTAATC-3';

Cytb-R:5'-AAGGGAAAAGGAAGTGAAAG-3'。

反应条件:95 ℃ 30 s;95 ℃ 10 s,55 ℃ 25 s,72 ℃ 25 s,40 个循环。采用 384 v.2 (REST) 软件计算仿刺参呼吸树、肠的谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量[22]。

1.4 数据统计分析

采用 SPSS 17.0 软件,在 $P=0.05$,$P=0.01$ 的置信水平对谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量变化情况进行 ANOVA 分析,并用 Origin 7.5 软件作图。

2 结果

2.1 苯系物对仿刺参呼吸树谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量的影响

6 种苯系物对仿刺参呼吸树谷胱甘肽过氧化物基因 mRNA 相对表达量的影响见图 1。各质量浓度苯、邻—二甲苯、对—二甲苯处理组呼吸树基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数为 2.6～41.7,呈显著非单调性剂量—效应关系。各质量浓度甲苯、间—二甲苯处理组呼吸树谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著上调,上调倍数为 2.6～86.4,呈显著剂量—效应负相关性。高、中质量浓度乙苯处理组呼吸树谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数分别为 43.5、2.8,低质量浓度处理组的极显著上调,上调倍数 4.8。

2.2 苯系物对仿刺参肠谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量的影响

6 种苯系物对仿刺参肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量的影响结果见图 2。6 种苯系物对肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因转录水平的影响主要表现为下调。各质量浓度邻—二甲苯、间—二甲苯、对—二甲苯处理组肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达极显著下调,下调倍数为 1.2～38.5,其中,邻—二甲苯与肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量呈非单调性剂量—效应关系,间—二甲苯、对—二甲苯表现为剂量—效应负相关性。苯、甲苯、乙基苯与肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量均呈非单调性剂量—效应关系,其中,高质量浓度苯处理肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著上调,上调倍数为 3.6,中、低质量浓度苯处理的极显著下调,下调倍数分别为 1.1、2.3;高质量浓度甲苯处理组肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数为 1.8,低质量浓度甲苯处理的极显著上调,上调倍数为 1.3;高、中质量浓度乙基苯处理组肠组织中谷胱甘肽过氧化物基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数分别为 45.5、35.7,低质量浓度处理组的极显著上调,上调倍数为22.5。

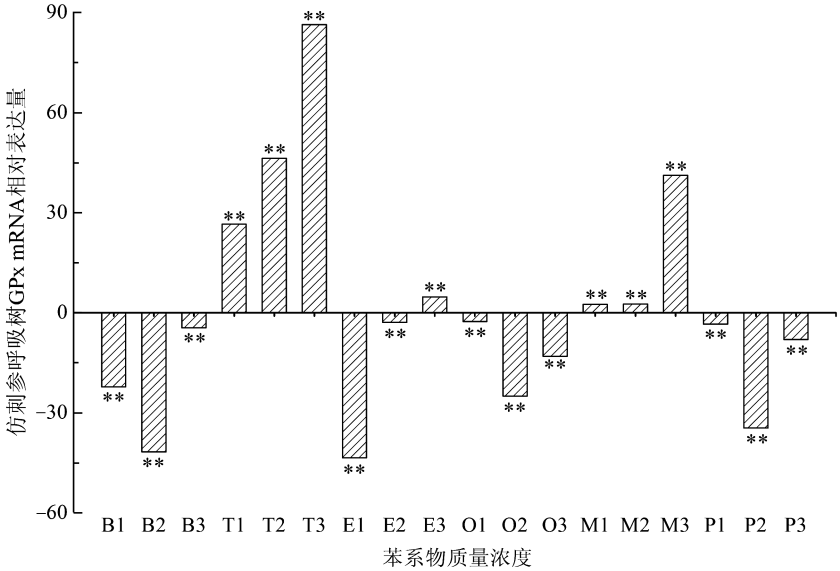

图 1　苯系物对仿刺参呼吸树谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量的影响

注:* * 表示与对照的相比差异极显著 $P<0.01$.图 2 同.

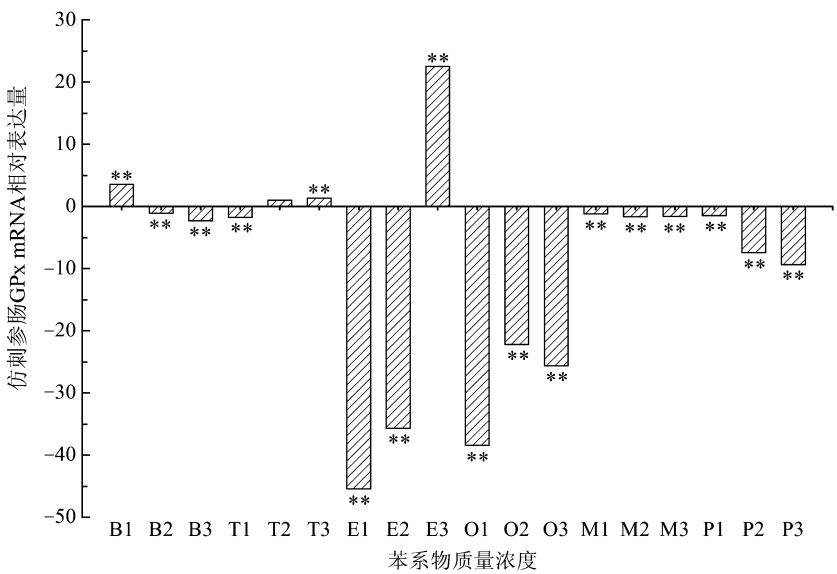

图 2　苯系物对仿刺参肠谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量的影响

3　讨论

谷胱甘肽过氧化物酶作为反映机体内氧化胁迫状况的生化指标,已广泛应用于多种污染物的生物毒性检测与评价。大量研究表明,芳香烃类、重金属、原油导致生物体内谷胱甘肽过氧化物酶活性异常变化。王悠等[14]研究发现,0.1、1 mg/L 的十二烷基苯磺酸钠和 2 μg/L、20 μg/L 的苯并[α]芘暴露可导致鲈鱼(*Lateolabrax japonicus*)肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性显著变化,与超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽、乙酰胆碱酯酶几种生化指标相比,谷胱甘肽过氧化物酶是对 2 种有机污染物胁迫响应最灵敏的生化指标,十二烷基苯磺酸钠、苯并[α]芘与鲈鱼肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性之间均表现为显著的剂量—效应正相关性。冯涛等[15]研究发现,0.5 mg/L 的苯并[α]芘暴露,可显著抑制大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性,暴露 3 d 后,苯并[α]芘与大弹涂鱼肝脏组织中谷胱甘肽过氧化物酶活性呈显著的剂量—效应负相关性。王隽媛等[16]报道,1.97～5.9 mg/L 萘暴露 12 h 导致斑马鱼(*Danio rerio*)内脏团谷胱甘肽过氧化物酶活性显著升高,具有显著的剂量—效应正相关性,而随着暴露时间的延长,呈显著地非单调性剂量—效应关系。王凡等[11]试验发现,0.5 mg/L 铅暴露 8 d 内导致牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)鳃、

肌肉、全部内脏组织谷胱甘肽过氧化物酶活性显著降低。0.01～0.15 mg/L 的铜暴露显著抑制栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)内脏团谷胱甘肽过氧化物酶活性[12],呈显著地非单调性剂量—效应关系。李传慧等[5]研究报道,3.2 mg/L 胜利原油暴露 1 d 后,导致半滑舌鳎(*cynoglossus semilaevis*)幼鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性显著升高,暴露 2 d 后,胜利原油与肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性表现为显著的剂量—效应正相关性,暴露 8 d 后,则表现为显著的非单调性剂量—效应关系。本试验研究发现,6 种苯系物造成仿刺参呼吸树、肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因相对表达量显著变化,并具有不同类型的剂量—效应关系。其中,苯、邻—二甲苯、对—二甲苯导致呼吸树中谷胱甘肽过氧化物酶基因转录表达极显著下调,下调倍数为 2.6～41.7;甲苯、间—二甲苯导致呼吸树中谷胱甘肽过氧化物酶基因表达极显著上调,上调倍数为 2.6～86.4。邻—二甲苯、间—二甲苯、对—二甲苯处理组肠谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 表达极显著下调,下调倍数为 1.2～38.5。结果表明,苯系物造成仿刺参呼吸树、肠的氧化胁迫,可能导致 2 种组织的氧化损伤,这与姜北等[23]研究结论一致。

苯系物作为一类全球广泛使用的工业原料,因海洋溢油和沿海石油化工废水排放,其潜在的威胁近岸海域生态安全问题日益受到政府和学者的重视。而利用生物标志物进行环境污染评价可以反映污染物的早期影响。自 1999 年,Narbonne 等[6]利用生物标志物在欧洲近岸海域开展环境污染评价。越来越多的生物标志物(超氧化物歧化酶、过氧化氢酶、谷胱甘肽过氧化物酶、金属硫蛋白、7-乙氧基-3-异酚唑酮脱乙基酶、乙酰胆碱酯酶等)应用于海洋环境污染评价[7-9,24]。基于生物组织中的标志物活性与环境污染的相关性,国内学者已开展相关研究[17-19]。笔者发现 6 种苯系物暴露 12 h 后,仿刺参呼吸树和肠组织中谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 的相对表达量呈显著变化,呈显著的剂量—效应关系。可将仿刺参的谷胱甘肽过氧化物酶 mRNA 相对表达量作为候选的苯系物的生物毒性指标应用于近岸海域环境污染评价。

4 结论

6 种苯系物造成仿刺参呼吸树、肠组织中的谷胱甘肽过氧化物酶基因转录水平显著变化,可能导致呼吸树、肠的氧化损伤,仿刺参的谷胱甘肽过氧化物酶基因 mRNA 相对表达量可作为候选的苯系物生物毒性评价指标。

参考文献:

[1] Lennarz W J, Lane M D. Encyclopedia of biological chemistry [M]. New York: Academic Press, 2004: 224-228.

[2] Flohé L. Selenoproteins and Mimics [M]. Springer Berlin: Heidelberg, 2012: 1-25.

[3] Brigelius-Flohé R, Maiorino M. Glutathione peroxidases [J]. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects, 2013, 1830 (5): 3289-3303.

[4] 韩春艳,郑清梅,陈桂丹,等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响[J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 47-52.

[5] 李传慧,夏斌,陈碧鹃,等. 胜利原油对半滑舌鳎幼鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶和谷胱甘肽转硫酶活性的影响[J]. 海洋环境科学, 2011, 30(6): 827-830.

[6] Narbonne J F, Daubèze M, Clérandeau C, et al. Scale of classification based on biochemical markers in mussles: application to pollution monitoring in European coasts [J]. Biomarkers, 1999, 4(6): 415-424.

[7] Zanette J, Monserrat J M, Bianchini A. Biochemical biomarkers in gills of mangrove oyster *Crassostrea rhizophorae* from three Brazilian estuaries [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2006, 143(2): 187-195.

[8] Oliveira M, Maria V L, Ahmad I, et al. Contamination assessment of a coastal lagoon (Ria de Aveiro, Portugal) using defence and damage biochemical indicators in gill of *Liza aurata*——an integrated biomarker approach [J]. Environmental Pollution, 2009, 157(3): 959-967.

[9] Richardson B J, Mak E, De Luca-Abbott S B, et al. Antioxidant responses to polycyclic aromatic hydrocarbons and organochlorine pesticides in green-lipped mussels (*Perna viridis*): do mussels "integrate" biomarker responses? [J]. Marine Pollution Bulletin, 2008, 57(6): 503-514.

[10] 王丽丽,夏斌,陈碧鹃,等. 镉胁迫对虾夷扇贝抗氧化防御系统的影响[J]. 海洋环境科学, 2012, 31(1): 39-42.

[11] 王凡,赵元凤,吕景才,等. 铅污染对牙鲆 GSH-PX 酶活性的影响[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(1): 20-23.

[12] 王凡,赵元凤,吕景才,等. 铜污染对扇贝内脏团抗氧化酶活性的影响[J]. 水产科学, 2008, 27(12): 622-624.

[13] 陈仪取,冯涛,郭祥,等. 3 种农药对花鲈抗氧化酶和乙酰胆碱酯酶影响的研究[J]. 厦门大学学报:自然科学版, 2004, 43(6): 828-832.

[14] 王悠,姜爽,赵晓玮,等. 2 种有机污染物对鲈鱼生化标志物系统的影响及作用评价[J]. 环境科学,2010(3):801-807.

[15] 冯涛,洪万树. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响[J]. 中国水产科学,2000,17(4):19-21.

[16] 王隽媛,边红枫,金香琴,等. 萘对斑马鱼(*Danio rerio*)内脏团抗氧化防御系统的胁迫与生物响应[J]. 环境科学 ISTIC PKU,2009,30(2):516-521.

[17] 张爱波,房燕,吕振波. 生物标志物技术在莱州湾污染评价中的应用[J]. 海洋渔业,2013,35(3):316-323.

[18] 孟范平,程凤莲,王建春,等. 基于氧化逆境标志物的北部湾潮间带沉积物有机污染程度综合评价[J]. 海洋学报:中文版,2013,35(3):156-165.

[19] 杜秀萍,孟范平,王志峰,等. 基于多生物标志物污染指数法的北部湾潮间带污染程度评价[J]. 环境科学,2012,33(10):3336-3343.

[20] 朱四喜,周唯,杨红丽,等. 浙江舟山潮间带沉积物中二甲苯的检测[J]. 广东化工,2010,37(2):125-127.

[21] 高杉,周遵春,董颖,等. 仿刺参过氧化氢酶基因全长 cDNA 的克隆及表达分析[J]. 中国农业科技导报,2014,16(2):127-134.

[22] Sun H, Zhou Z, Dong Y, et al. Identification and expression analysis of two Toll-like receptor genes from sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2013, 34(1):147-158.

[23] 姜北,刘薇,周遵春,等. 苯系物对仿刺参体内脂质过氧化程度的影响[J]. 水产科学,2014,33(1):15-21.

[24] Van Der Oost R, Vindimian E, Van Den Brink P J, et al. Biomonitoring aquatic pollution with feral eel (*Anguilla anguilla*). III. Statistical analyses of relationships between contaminant exposure and biomarkers [J]. Aquatic Toxicology, 1997, 39(1):45-75.

Effects of BTEXs on Expression of Glutathione Peroxidase Gene in Intestine and Respiratory Tree of Sea Cucumber *Apostichopus japonicus*

DONG Ying[1], WANG Bai[1], CUI Cheng[2], LI Shuman[3], GAO Shibo, GAO Shan[1], GUAN Xiaoyan[1], JIANG Bei[1], ZHOU Zunchun[1]

(1. Liaoning Ocean and Fisheries Science Research Institute, Dalian 116023, China;
2. Fisheries Technical Extension General Station of Liaoning Province, Shenyang 110031, China;
3. Shandong Province Monitoring Center of Water Quality in the Nansi Lake, Jining 272100, China)

Abstract: The present study is aimed to evaluate the effects of six kinds of BTEXs (benzene, toluene, ethyl benzene, *o*-xylene, *m*-xylene and *p*-xylene) on the relative expression levels of glutathione peroxidase (GPx) gene in the respiratory tree and intestine of sea cucumber *Apostichopus japonicus*, which is an important benthic organism in the Yellow Sea and the Bohai Sea of China, using quantitative real-time PCR method. The results showed that the relative expression levels of GPx gene in respiratory tree and intestine were remarkably changed in different BTEXs treatment groups, and showed dose-effect relationship. The relative expression levels of GPx gene in respiratory tree was down-regulated in the benzene, *o*-xylene and *p*-xylene treatment groups, from 2.6-fold to 41.7-fold; and up-regulated in the toluene and *m*-xylene treatment groups, from 2.6-fold to 86.4-fold. The relative expression levels of GPx gene in intestine was down-regulated in the *o*-xylene, *m*-xylene and *p*-xylene treatment groups, from 1.2-fold to 38.5-fold. This suggested that the BTEXs had oxidative stress on the respiratory tree and intestine of the sea cucumber, and might have oxidative damage in the two tissues.

Key words: BTEX; *Apostichopus japonicus*; glutathione peroxidase; respiratory tree; intestine