



水基钻井液对诸氏鲮虾虎鱼抗氧化酶的影响

蔡文超, 陈小曲, 李建军, 黄 韧

(广东省实验动物重点实验室 广东省实验动物监测所, 广州 510663)

【摘要】 目的 研究我国南海区某海洋钻井水基钻井液对诸氏鲮虾虎鱼抗氧化酶的影响。方法 在 19.75 ~ 158 mg/L 浓度下, 对 3 月龄诸氏鲮虾虎鱼染毒, 并用试剂盒法测定超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性。结果 SOD 对水基钻井液的毒性暴露不太敏感, 在染毒第 1 天只有最低浓度组受到一定程度的抑制, 染毒第 2 天各浓度组酶活性均受到一定程度的诱导(12.4% ~ 25.5%), 这种诱导作用在第 4 天即有所减弱, 之后酶活性的变化变缓。CAT 则对水基钻井液表现出较强的敏感性。染毒第 1 天, 各组酶活性均受到明显的诱导, 并且各组酶活性表现出明显的浓度效应关系。最高浓度组酶活性最大诱导率达到 97% ($P > 0.05$)。随后虾虎鱼 CAT 酶活性逐渐下降, 第 7 天, 各染毒组酶活性的抑制率达到 58.4% ~ 89.1%。结论 CAT 在中毒反应中表现出了敏感性, 具备了作为生物标志物的重要条件, 有望在今后的实际应用中发挥作用。

【关键词】 水基钻井液; 诸氏鲮虾虎鱼; 生物毒性; SOD; CAT

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 02-0016-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.002.004

Effect of waterbased drilling fluid exposure on the activity of antioxidant enzymes in *Mugilogobius chulae*

CAI Wen-chao, CHEN Xiao-qu, LI Jian-jun, HUANG Ren

(Guangdong Key Laboratory of Laboratory Animals, Guangdong Laboratory Animal Monitoring Institute, Guangzhou 510663, China)

【Abstract】 **Objective** To study the effect of waterbased drilling fluid (from a drilling platform in Nanhai district, China) exposure on the activity of antioxidant enzyme in *Mugilogobius chulae*. **Methods** The SOD and CAT activity of 3-month-old juvenile *Mugilogobius chulae* were tested by reagent kit method during the exposure at 19.75 to 158 mg/L concentration. **Results** The SOD activity of 3-month-old juveniles was not sensitive during the exposure. At the first day of exposure, the SOD activity was slightly inhibited at the lowest concentration ($P > 0.05$). However, the activity was induced (12.4% to 25.5%, $P > 0.05$) in all treatment at the second day. On the 7-day exposure, the change of SOD activity was limited. The activity of CAT showed high sensitivity to the drilling fluid. During the first day of exposure, the CAT activities of each treatment were induced and they had a concentration effect. The inductivity of the highest concentration even reached to 97% ($P < 0.05$). Then, the inductivity slowed down to 58.4% to 89.1% at the 7th day. **Conclusion** CAT, which shows an apparent sensitivity, meets the important requirement as a biomarker, and is expected to play a role in practical application in the future.

【Key words】 Waterbased drilling fluid; *Mugilogobius chulae*; Biototoxicity; SOD; CAT

[基金项目] 1. 广东省自然科学基金项目(8151026005000002); 2. 广东省中国科学院全面战略合作项目(2010B090301027); 3. 广东省科技计划项目(2007B080501005, 2010B030600008)。

[作者简介] 蔡文超(1983 -), 男, 硕士, 助理研究员, 从事海洋环境污染生物毒性监测研究。E-mail: hopewenchao@126.com。

鱼类常常作为水体污染监测的受试生物。当水体出现污染时,鱼类的内环境就会发生各种变化,严重时可导致死亡。众多污染物中,一些有机污染物由于毒性大、难以降解等特性,影响机体正常的代谢,对生物体带来持久性毒性。抗氧化酶是生物体中一类毒物敏感反应大分子,常用于污染物毒性检测,这些抗氧化酶的活性变化在一定程度上反映了生物中毒的程度以及污染物的浓度水平。研究发现,接近河口的鲢鱼(*Sprattus sprattus*)仔鱼 SOD 和 CAT 酶活性明显较高($P < 0.05$),同时此处的浮游生物总 PCBs 和 p,p'-DDE 的含量也最高($P < 0.05$)^[1]。

石油开发污染物是污染海洋环境的一类物质,其包括生产水和钻井液等物质,对海洋生物表现出一定的毒性^[2]。本研究利用诸氏鲮虾虎鱼(*Mugilogobius chulae*)为研究对象,研究了水基钻井液对虾虎鱼肝脏 CAT、SOD 酶活性的影响,为进一步筛选石油开发污染物毒性生物标志物提供参考。

1 材料和方法

1.1 实验材料

水基钻井液来自我国南海区某石油钻井平台。实验用诸氏鲮虾虎鱼为本实验室室内人工繁殖和养殖群体。实验仔鱼为 6 日龄,均为同批次孵化而成(孵出时间间隔不超过 24 h),健康活泼,无畸形。试验用虾虎鱼成鱼为同批次孵化并养殖的 3 月龄群体,雌雄兼有,体长(1.24 ± 0.21) cm,体重(0.041 ± 0.023) g。

1.2 实验方法

1.2.1 染毒实验:急性生物毒性试验表明,该样品对 6 日龄诸氏鲮虾虎鱼仔鱼的 96 h-LC50 为 316 mg/L(作者另文发表)。

根据半数致死浓度结果,设置钻井液的梯度浓度(浓度分别为 96 h-LC50 的 1/16、1/8、1/4 和 1/2,记为 C1、C2、C3 和 C4)并立即进行成鱼毒性试验。设置 1 个对照和 4 个浓度,每个浓度设 3 个重复。实验开始前的 24 h 之内不投喂。使用 3 L 的广口玻璃容器进行试验,染毒液体积均为 1.5 L,每个容器中随机放 6 尾诸氏鲮虾虎鱼。

染毒时间为 7 d。试验期间不充气,投喂适量的卤虫无节幼体或配合饲料,保证组间投喂饵料无差异。每次取样前 24 h 不投喂。在实验进行至第 84 小时更换相同浓度的新鲜染毒液或海水。试验期

间每 2 天测定 1 次盐度、pH 和溶解氧。在第 0 天取 6 尾鱼作为对照,第 1、2、4 和 7 天每天每个容器随机取 1 尾作为测试鱼。进行生物学测量之后立即全鱼置于 -80°C 冰箱冻存。所有样品于取样后 2 周内测完。

1.2.2 水基钻井液对虾虎鱼酶活力的影响:用生化试剂盒测定幼鱼(全鱼匀浆制备酶液)过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)的活性。进行酶活力测定时,样品解冻后按照试剂盒的方法制备酶液。每个组织样品在加入稀释液后用德国 IKA T10 分散机 2 500 r/min 分散 40 s,冷冻离心机 1 500 r/min 离心 10 min,取上清液进行酶活力测定。检测方法按照试剂盒说明书进行,分光光度计法进行检测。过氧化氢酶(CAT)测试盒、超氧化物歧化酶(SOD)测试盒和考马斯亮兰蛋白测定试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。

CAT 活力定义为每毫克组织蛋白每秒钟分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为 1 个活力单位(U/mgprot); SOD 活力定义为每毫克组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U/mgprot)。

1.3 数据处理与统计分析

由于鱼类的抗氧化酶(如 SOD)容易受到多种因素的影响,检测结果往往存在较大波动^[3]。因此,参照杨永滨等^[4]的方法,以酶活性影响率(比活力)表示抗氧化酶活性的变化:酶比活力 = 暴露组酶活性/空白对照组酶活性。

统计数据采用平均值 \pm 标准差(Mean \pm S. D.)的方法来表示,用 SPSS 13.0 统计软件对数据进行统计学分析,对数据作单因素方差分析(ANOVA),用 Duncan 多重比较进行组间差异显著性分析, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 水基钻井液对 3 月龄虾虎鱼机体抗氧化酶活力的影响

水基钻井液影响 3 月龄虾虎鱼 SOD 和 CAT 的酶活力,见表 1 和表 2。

从表中的数据可以得知,SOD 对水基钻井液的毒性暴露不太敏感,在染毒之后的 4 d 里,各染毒浓度组的酶活性与对照组差异无显著性($P > 0.05$)。直到第 7 天,仅有 C3 染毒组的酶活性与对照组差异有显著性($P < 0.05$),但 C3 浓度组的酶活性与

表 1 水基钻井液对 3 月龄虾虎鱼 SOD 活力的影响

Tab. 1 Effect of water based drilling fluid on SOD in 3-month-old *Mugilogobius chulae*

组别 Groups	0 d	1 d	2 d	4 d	7 d
C0	2.06 ± 0.31	2.01 ± 0.28a	1.81 ± 0.18a	2.07 ± 0.14a	1.91 ± 0.16a
C1	2.06 ± 0.31	1.86 ± 0.11a	2.10 ± 0.35a	2.02 ± 0.30a	2.01 ± 0.10ab
C2	2.06 ± 0.31	1.99 ± 0.24a	2.03 ± 0.16a	2.05 ± 0.16a	2.00 ± 0.13ab
C3	2.06 ± 0.31	2.07 ± 0.18a	2.27 ± 0.18a	2.23 ± 0.12a	2.15 ± 0.07b
C4	2.06 ± 0.31	2.09 ± 0.21a	2.26 ± 0.29a	2.23 ± 0.06a	2.00 ± 0.08ab

表 2 水基钻井液对 3 月龄虾虎鱼 CAT 活力的影响

Tab. 2 Effect of water based drilling fluid on CAT in 3-month-old *Mugilogobius chulae*

组别 Groups	0 d	1 d	2 d	4 d	7 d
C0	3.55 ± 0.73	0.91 ± 0.50a	2.30 ± 1.50a	3.16 ± 0.71a	2.83 ± 0.48a
C1	3.55 ± 0.73	1.53 ± 0.27ab	2.60 ± 1.47a	1.30 ± 0.59b	0.31 ± 0.15b
C2	3.55 ± 0.73	1.56 ± 0.43ab	2.80 ± 0.43a	1.61 ± 0.79b	0.48 ± 0.28b
C3	3.55 ± 0.73	1.75 ± 0.43b	3.27 ± 0.44a	1.36 ± 0.18b	0.59 ± 0.24b
C4	3.55 ± 0.73	1.80 ± 0.45b	3.70 ± 0.88a	1.62 ± 1.28b	1.18 ± 0.28c

其他染毒浓度组的酶活性差异无显著性($P > 0.05$)。

2.2 水基钻井液对 3 月龄虾虎鱼机体抗氧化酶比活力的影响

CAT 则对水基钻井液表现出敏感特性。在染毒第 1 天, C3 和 C4 浓度组的酶活性被诱导, 与对照组的酶活性差异显著($P < 0.05$)。但随后第 2 天酶活性恢复, 第 4 天各浓度组酶活性被显著抑制($P < 0.05$), 这种抑制作用抑制延续到第 7 天。

虽然 CAT 表现出较强的敏感性, 但表 4 中对照组的酶活性却有较大的变化, 经显著性检验, 各组之间差异显著($P < 0.05$)。因此, CAT 酶活性除了受到毒物的影响之外, 还与其他因素有关。为了消除其他因素的影响, 采用酶的比活力进行数据分析, 见图 1。

图 1 的曲线表明, 对于 SOD, 在染毒第 1 天只有 C1 浓度组受到一定程度的抑制, 染毒第 2 天各浓度组酶活性均受到一定程度的诱导 (12.4% ~ 25.5%), 这种诱导作用在第 4 天即有所减弱, 之后酶活性的变化变缓。

水基钻井液对 CAT 的活性影响较强。染毒第 1 天, 各组酶活性均受到明显的诱导, 并且各组酶活性表现出明显的浓度效应关系。C4 组酶活性最大诱导率达到 97%。随后虾虎鱼 CAT 酶活性逐渐下降, 表明毒物对该酶的抑制作用越来越强。第 4 天, 各染毒组酶活性的抑制率达到 48.7% ~ 58.8%, 第 7 天, 各染毒组酶活性的抑制率达到 58.4% ~ 89.1%。

3 讨论

3.1 石油开发污染物对虾虎鱼酶活力的影响

鱼体抗氧化酶在污染物暴露中常常产生氧化

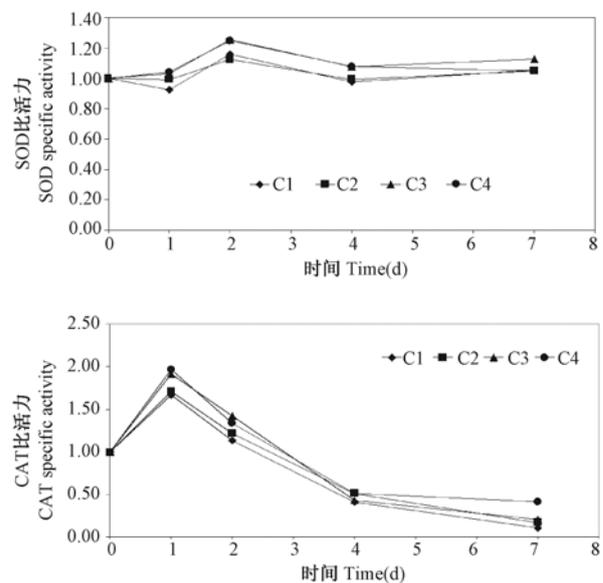


图 1 水基钻井液对 3 月龄虾虎鱼 SOD 和 CAT 比活力的影响

Fig. 1 Effect of water based drilling fluid on SOD and CAT specific activity in 3-month-old *Mugilogobius chulae*

应激反应, 某些鱼类的抗氧化酶 (CAT 和 SOD) 活性与水环境污染以及浮游生物的富集的毒物含量呈正相关关系^[1], 因此也可以用于一些河口等地区有机污染物 (PAHs、PCBs) 的检测和分析^[5]。本研究利用虾虎鱼作为水基钻井液生物毒性检测的受试生物, 进行了抗氧化酶动力学实验。结果显示, 毒物对虾虎鱼的 CAT 和 SOD 的活性均可产生不同程度的影响, 并且表现出一定的浓度效应关系。本研究中所用污染物对虾虎鱼 CAT 的抑制率最高可达 50% 以上。另外, 1.0% 和 1.5% 的石油分散液可以使非洲鲶鱼 (*Clarias gariepinus*) CAT 和 SOD 的活

性在暴露 7 d 后显著降低,但 14 d 后均显著升高^[6],显示石油分散液对水生生物产生了一定的氧化应激反应。然而,氯代苯类化合物对斑马鱼胚胎发育均有明显抑制作用,可以造成胚胎发育畸形甚至死亡,但该类化合物对斑马鱼胚胎抗氧化酶体系(SOD 和 CAT)影响并不显著^[7],氯代苯对胚胎和成鱼的致毒机制以及抗氧化酶体系的关系值得进一步深入探讨。

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) CAT 的活性随 BaP 浓度增加而显著降低^[8]。本试验中水基钻井液的暴露试验结果与此相似。抗氧化酶在染毒过程中,其活性的增加是生物对毒物的适应性反应,以增强机体消除活性自由基的能力。而酶活性的降低则可以认为水基钻井液对生物体的胁迫已超过机体的适应能力,酶活性的降低是该生物即将发生中毒反应的前兆。由此可以推测,虾虎鱼在毒物的 96 h-LC50 浓度以上将给生物带来更大的胁迫作用。

水基钻井液影响 CAT 的活性,在染毒 7 d 后表现得非常明显($P < 0.05$),而 SOD 虽然在染毒初期表现出一定的活性变化,但染毒 7 d 时与对照组无显著差异($P > 0.05$)。水基钻井液对 CAT 的影响更加明显。CAT 酶比 SOD 表现出更强的敏感性。Vutukuru et al 等^[9]在研究铜对 *Esomus danricus* 的毒性影响时,发现在其半致死浓度的 10% ~ 100% 范围内,该鱼的 CAT 比 SOD 更加敏感。本研究的结果与此相似。CAT 在中毒反应中表现出了敏感性,具备了作为生物标志物的重要条件,有望在今后的实际应用中发挥作用。

3.2 影响抗氧化酶活力的其他因素

本研究中,对照组抗氧化酶 CAT 和 SOD 的活性出现较大的变动,表现出一定的不稳定性。一方面,表明虾虎鱼的抗氧化酶活力变化存在一定的个体差异;另一方面,研究结果说明 CAT 和 SOD 活性的变化更容易受到外界其他因素的影响,这与冯涛等^[3]的研究结果有一定相似性。

另外,影响抗氧化酶活力的因素还可能与其他方面。氧化鱼油可使大黄鱼血清抗氧化酶 CAT 和 SOD 活性显著升高($P < 0.05$),而维生素 E 对这种负面影响有一定的补偿作用^[10]。有机磷杀虫剂毒死蜱可以显著降低淡水鲶鱼(*Heteropneustes fossilis*)脑、肝脏、鳃和骨骼肌中 CAT 的活性;但在维生素 C

和甲状腺素(T4)单独或者联合作用下,可以使毒性暴露鱼的 CAT 恢复到他们的对照水平,表明两者可以修复毒死蜱带来的损伤^[11]。因此,今后在进行抗氧化酶研究时,应控制注意投喂饵料的维生素含量以及甲状腺素等其他因素的水平,防止给结果带来干扰。

参考文献:

- [1] Peters LD, Porte C, Livingstone DR. Variation of antioxidant enzyme activities of sprat (*Sprattus sprattus*) larvae and organic contaminant levels in mixed zooplankton from the Southern North Sea [J]. Mar Pollut Bull, 2001, 42(11):1087-1095.
- [2] 黄韧, 杨丰华, 程树军. 海洋石油勘探开发污染物对海洋生物的影响与生物监测的研究进展 [J]. 湛江海洋大学学报, 2001, 21(4):71-76.
- [3] 冯涛, 郑微云, 郭祥群, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏超氧化氢酶活性的影响 [J]. 生态学杂志, 2001a, 20(5):73-75.
- [4] 杨永滨, 刘征涛, 卢志杰, 等. 卤代酚复合污染对鲤科金鱼的生化毒性效应研究 [J]. 环境科学研究, 2007, 20(2):1-4.
- [5] Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Sole M, et al. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay) [J]. Aquat Toxicol, 2002, 58(1-2):75-98.
- [6] Achuba FI, Osakwe SA. Petroleum-induced free radical toxicity in African catfish (*Clarias gariepinus*) [J]. Fish Physiol Biochem, 2003, 29(2):97-103.
- [7] 周宇, 于红霞, 丁翔, 等. 氯代苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效应的研究 [J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3):340-344.
- [8] 冯涛, 郑微云, 郭祥群, 等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 台湾海峡, 2001b, 20(2):182-186.
- [9] Vutukuru SS, Chintada S, Madhavi KR, et al. Acute effects of copper on superoxide dismutase, catalase and lipid peroxidation in the freshwater teleost fish, *Esomus danricus* [J]. Fish Physiol Biochem. 2006, 32(3):221-229.
- [10] 唐筱, 王珺, 徐后国, 等. 氧化鱼油和维生素 E 对大黄鱼 SOD 和 CAT 酶活性的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2010, 40(S):55-58.
- [11] Tripathi G, Shasmal J. Reparation of chlorpyrifos-induced impairment by thyroxine and vitamin C in fish [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2010, 73(6):1397-1401.

[修回日期]2013-12-11