

文章编号:1000-0615(2005)02-0150-04

0 号柴油水溶性成分对僧帽牡蛎脂质过氧化的影响

陈 荣¹, 魏凤琴², 王重刚³

(1. 厦门大学环境科学研究中心教育部海洋生态环境开放实验室, 福建 厦门 361005;
2. 福建省平潭县白青乡水产技术推广站, 福建 平潭 350400; 3. 厦门大学生物学系, 福建 厦门 361005)

摘要:在实验条件下,将僧帽牡蛎分别置于含有 0.5、2.5 mg·L⁻¹ 0 号柴油水溶性成分的海水中,在污染后 1、4、7、11、15 d 采样,15 d 后转入清洁海水中进行 6 d 的恢复实验,采样,观察消化腺和鳃脂质过氧化的程度。结果表明:(1)正常生理条件下消化腺和鳃也有一定程度的脂质过氧化,消化腺显著高于鳃;(2)脂质过氧化的程度随污染时间的延长而增加,并存在一定的剂量-效应关系,可作为监测海洋石油污染的生物标志物;(3)解除污染后,脂质过氧化恢复到对照水平。

关键词:0 号柴油水溶性成分;僧帽牡蛎;脂质过氧化
中图分类号:X503.225 **文献标识码:**A

Lipid peroxidation in *Ostrea cucullata* exposed to water-soluble fraction of No.0 oil

CHEN Rong¹, WEI Feng-qin², WANG Chong-gang³

(1. The Key Laboratory for Marine Environmental Science of the Ministry of Education of China, Environmental Science Research Center of Xiamen University, Xiamen 361005, China;
2. Agriculture Technique Spreading Section at Baiqing Village, Pingtan Country, Pingtan 350400, China;
3. Department of Biology, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: Lipid peroxidation is a process in which the polyunsaturated fatty acid components of lipids are oxidized to form free radicals and lipid peroxide metabolites, therefore capable of causing extensive tissue damage. Lipid peroxidation maybe has more important meaning to aquatic organism than to other organism, because of the abundant polyunsaturated fatty acid in aquatic organism. This paper is the first report about the effect of oil pollution on lipid peroxidation in marine bivalve from China. In laboratory condition, oyster, *Ostrea cucullata* was exposed to different concentrations of water-soluble fraction (WSF) of No.0 diesel oil (0.5, 2.5 mg·L⁻¹) for 15 d, and then transferred into clean sea water for 6 d restoring experiment. The lipid peroxidation (determined as malondialdehyde levels, MDA) in digestive gland and gill of 1, 4, 7, 11, 15, 21 d samples were measured, the results showed: (1) Lipid peroxidation also occurred in digestive gland and gill of control group, and the former was higher than the latter; (2) In digestive gland sample of 0.5, 2.5 mg·L⁻¹ group, the significant enhancement of lipid peroxidation in comparison with control group appeared in 15, 11, 4 d respectively, and the increases of lipid peroxidation were observed with the prolonged exposure time, and a dose-effect relationship was occurred in 15 d sample; there was a similar trend of change in gill lipid peroxidation, but less obvious than that of digestive gland; (3) Lipid peroxidation of all concentration groups returned to control level after recovery experiment. According to our data, the lipid peroxidation of marine bivalve can be a biomarker to marine oil pollution, and that needs further research.

Key words: water-soluble fraction of No.0 diesel oil; *Ostrea cucullata*; lipid peroxidation

脂质过氧化是脂中不饱和脂肪酸(LH)氧化 降解的链反应过程,由启动、延伸、终止 3 个阶段

收稿日期:2003-11-03

资助项目:国家自然科学基金青年基金(20207006);校级自选课题基金资助项目

作者简介:陈 荣(1974-),男,福建福州人,副教授,博士,主要从事海洋生态毒理学研究。Tel: 0592-2184896, E-mail: limbo_chen

@163.com

组成。脂质过氧化过程的延伸阶段产生多种自由基如脂过氧自由基 LOO^{\cdot} , 脂氧自由基 LO^{\cdot} 和脂自由基 L^{\cdot} , 终止阶段产生多种小分子产物如丙二醛。这些产物可以造成多种细胞功能的损伤, 引起多种疾病。水生生物体内富含多不饱和脂肪酸, 因此脂质过氧化对水生生物的意义也许比其他生物更重要。在环境污染物对水生生物脂质过氧化的影响方面, 国内仅有少数关于重金属对鱼类脂质过氧化影响的研究^[1,2], 本文首次研究了海洋污染中最常见的石油污染物对海洋双壳类脂质过氧化的影响。

1 材料与方法

1.1 污染实验

实验用僧帽牡蛎购自同安大嶝岛养殖区, 先用沙滤海水暂养 1 周, 待其状态稳定后, 选取活力好、体长 5~6 cm 的个体进行污染实验。

取 0 号柴油与沙滤海水按 1:10(v/v) 混合, 电动低速搅拌机连续搅拌 24 h, 静置 4 h 后吸取表层下水相作为母液, 置于冰箱 4℃ 保存, 实验前稀释至所需浓度。

0 号柴油浓度的测定采用荧光分光光度法^[3], 略有改动。以 0 号柴油为标准, 荧光测定波长 $\text{Ex} = 231 \text{ nm}$, $\text{Em} = 332 \text{ nm}$ 。测定母液和不同倍数稀释后的总石油烃浓度, 以确定达到实验所需总石油烃浓度的稀释倍数。

随机选取僧帽牡蛎分为 4 组, 对照组、低浓度组 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)、中浓度组 ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 和高浓度组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。每集约 120 个僧帽牡蛎, 置于含 100 L 沙滤海水的玻璃箱 ($100 \text{ cm} \times 30 \text{ cm} \times 50 \text{ cm}$)

中, 充气机 24 h 充气, 每日投喂金藻 1 000 mL 和小球藻 500 mL 一次, 清除死贝。每日更换相同浓度的污染液, 实验期间水温 23~25℃。

在污染实验开始后 1、4、7、11、15 d 采样, 15 d 后将污染液全部换成清洁沙滤海水进行为期 6 d 的恢复实验。采样时仔细分离出鳃和消化腺, 双蒸水冲洗后用 1.5 mL Eppendorf 管装取。每次采样每个实验组采集鳃和消化腺样品各 6 个, 液氮保存至测定。

1.2 脂质过氧化含量的测定

脂质过氧化含量测定采用 TBA 荧光法^[4]。以 1,1,3,3-四乙氧基丙烷 (TEP) 为标准, 测定脂质过氧化终产物丙二醛 (MDA) 与硫代巴比妥酸 (TBA) 复合物的荧光值, $\text{Ex} = 515 \text{ nm}$, $\text{Em} = 550 \text{ nm}$ 测定, 脂质过氧化含量表示为: $\text{nmol MDA} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白。

1.3 数据处理

实验结果进行统计处理。数据结果均为平均数 \pm 标准误差 ($\text{mean} \pm \text{SDE}$); 用单因素方差分析方法分析 0 号柴油污染引起的差异; 用 t -检验法对组间数据进行差异性显著分析, $P < 0.05$, 认为是差异显著, $P < 0.01$, 认为是差异极显著。

2 结果

2.1 0号柴油水溶性成分对僧帽牡蛎脂质过氧化作用的剂量-效应关系

0 号柴油水溶性成分对僧帽牡蛎消化腺和鳃脂质过氧化的影响见表 1、2。比较两个表中对照组的数据, 可以看出在正常生理条件下消化腺脂质过氧化程度比鳃高。

表 1 0号柴油水溶性成分对僧帽牡蛎消化腺脂质过氧化的影响

Tab.1 Effects of WSF of No.0 diesel oil on digestive gland lipid peroxidation in *Ostrea cucullata*

时间(d) time	对照组 control	低浓度组 low concentration	中浓度组 medium concentration	高浓度组 high concentration
1	3.711 \pm 0.507	3.561 \pm 0.515	3.654 \pm 0.420	3.685 \pm 0.523
4	3.465 \pm 0.470	3.231 \pm 0.371	3.441 \pm 0.626	4.175 \pm 0.448 [*]
7	3.473 \pm 0.518	3.474 \pm 1.418	3.952 \pm 0.639	4.989 \pm 1.186 [*]
11	3.235 \pm 0.585	3.901 \pm 0.560	4.197 \pm 0.629 [*]	5.838 \pm 1.836 [*]
15	3.638 \pm 0.836	4.510 \pm 0.535 [†]	5.570 \pm 0.716 ^{**a}	7.121 \pm 1.560 ^{**a}
21(恢复实验) (restoring experiment)	4.500 \pm 1.075	4.240 \pm 0.517	4.369 \pm 0.954	4.741 \pm 1.542

注: 表中数据为平均值 \pm 标准误差 ($n = 4 \sim 6$); 脂质过氧化水平表示为 $\text{nmol MDA} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白; * 表示对该数据和相应对照组数据进行 t -检验 (双样本异方差假设) 的结果表明差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$); a 表示相邻浓度组之间差异显著 ($P < 0.05$)

Notes: Results represent the means \pm SDE of $n = 4 \sim 6$; units are $\text{nmol MDA} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein; * significant differences in comparison with relevant control group by t -test ($P < 0.05$); ** very significant differences ($P < 0.01$); a significant differences between contiguous groups ($P < 0.05$)

表 2 0 号柴油水溶性成分对僧帽牡蛎鳃脂质过氧化的影响
Tab.2 Effects of WSF of No.0 diesel oil on gill lipid peroxidation in *Ostrea cucullata*

时间(d) time	对照组 control	低浓度组 low concentration	中浓度组 medium concentration	高浓度组 high concentration
1	2.580 ± 0.681	2.404 ± 0.379	2.641 ± 0.648	2.545 ± 0.573
4	2.455 ± 0.216	2.312 ± 0.460	2.442 ± 0.350	2.434 ± 0.349
7	2.425 ± 0.425	2.362 ± 0.835	2.990 ± 0.573	3.523 ± 0.788 *
11	2.447 ± 0.571	2.685 ± 0.594	2.809 ± 0.407	3.443 ± 0.422 * * a
15	2.622 ± 0.453	2.818 ± 0.478	3.866 ± 0.746 * a	4.465 ± 0.917 * *
21(恢复实验) (restoring experiment)	2.868 ± 0.753	2.871 ± 0.534	2.803 ± 0.626	2.814 ± 0.602

污染后 4 d, 高浓度消化腺脂质过氧化作用首先显著增强, 并表现出显著的组间差异(表 1)。污染后 11 d, 中、高浓度消化腺脂质过氧化作用都继续增强到显著差异, 但没有组间差异。污染后 15 d, 各浓度组消化腺脂质过氧化作用都有显著提高, 中、高浓度组达到极显著水平, 各组相邻组间差异显著。表现出显著的剂量-效应关系。

污染后 7 d, 高浓度组鳃脂质过氧化作用开始显著增强(表 2)。污染后 11 d, 高浓度组鳃脂质过氧化作用进一步增强达到极显著, 组间差异显著。污染后 15 d, 各组鳃脂质过氧化作用均有增加, 低浓度增加不显著, 中浓度达到显著, 且与低浓度组差异显著; 高浓度组鳃脂质过氧化作用极显著, 但与中浓度组间差异不显著。

总的来看, 在污染前期剂量-效应不显著, 随污染时间延长, 剂量-效应逐渐显现, 在污染后 15 d, 消化腺和鳃都表现出随污染程度提高脂质过氧化作用增强, 而且消化腺比鳃明显。

2.2 0 号柴油水溶性成分对僧帽牡蛎脂质过氧化作用的时间-效应关系

由图 1~图 3 可见, 低浓度组前 7 d 消化腺和鳃脂质过氧化作用变化不大, 而后开始增强, 污染后 15 d 分别为 123.97%、107.48%, 消化腺达到显著水平。中浓度组消化腺和鳃脂质过氧化作用随污染时间的延长持续提高, 污染后 15 d 分别为 153.11%、147.44%。高浓度组消化腺和鳃脂质过氧化作用随污染时间延长的变化趋势与中浓度组类似, 但提高的幅度较大, 污染后 7d 就达到 143.65%、145.28%, 污染后 15 d 提高到 195.74%、170.29%。消化腺脂质过氧化作用随污染时间延长而增强的时间-效应关系比鳃显著。

2.3 污染解除后僧帽牡蛎脂质过氧化含量变化

由表 1 和表 2 可见, 污染解除后各污染组脂

质过氧化程度都下降至对照组水平。

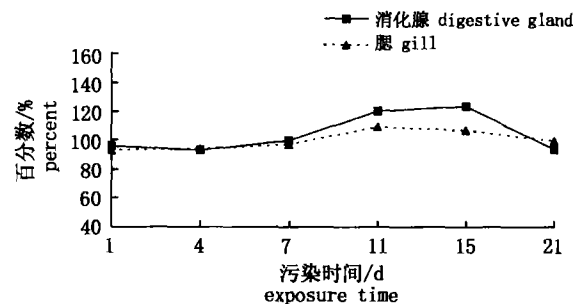


图 1 低浓度 WSF 影响僧帽牡蛎脂质过氧化的时间-效应曲线

Fig.1 The time-effect response of lipid peroxidation in *Ostrea cucullata* exposed to low concentration WSF

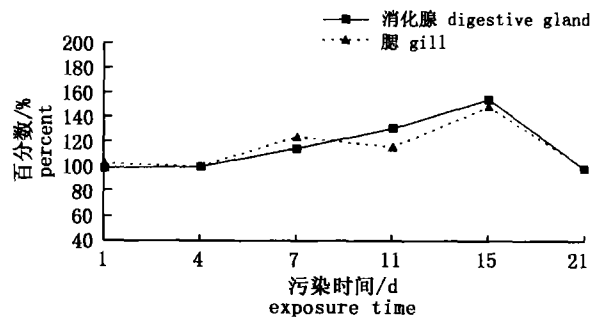


图 2 中浓度 WSF 影响僧帽牡蛎脂质过氧化的时间-效应曲线

Fig.2 The time-effect response of lipid peroxidation in *Ostrea cucullata* exposed to medium concentration WSF

3 讨论

在本文的污染实验中, 随着石油烃污染浓度和时间的增加, 僧帽牡蛎消化腺和鳃中 MDA 含量也不断增加, 表明脂质过氧化程度的加剧。Moore^[5]在研究中也发现贻贝消化腺细胞暴露于 PAH 后, 细胞中脂质过氧化的产物——脂褐素含量增加。其他有机污染也可引起水生生物的脂质过氧化, 贝类 *Geuškensia demissa* 暴露于 4 mmol·

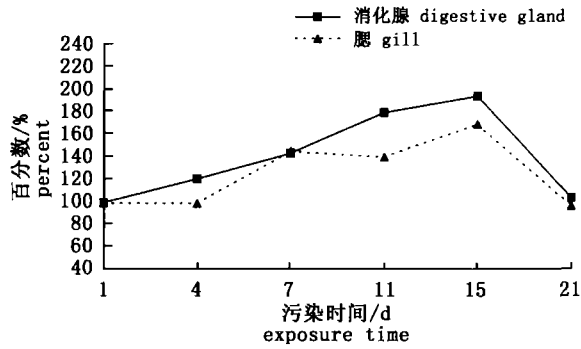


图3 高浓度 WSF 影响僧帽牡蛎脂质过氧化的时间-效应曲线

Fig.3 The time-effect response of lipid peroxidation on *Ostrea cucullata* exposed to high concentration WSF

L⁻¹百草枯 96 h 后,其消化腺脂质过氧化程度增加^[6],体内和体外实验都表明 Aroclor 1254 提高了细须石首鱼 (*Micropogonias undulatus*) 肝脏脂质过氧化程度^[7],但尼罗罗非鱼 (*Oreochromis niloticus*) 暴露于两种农药 2,4-D 和 azinphosmethyl 96 h 后,肝脏脂质过氧化程度不受影响^[8]。在本研究中,污染解除后各浓度组脂质过氧化程度均下降至对照组水平,说明僧帽牡蛎有较好的修复能力。但在污染长期存在的情况下,脂质过氧化的增加也可能会长期存在。脂质过氧化被认为是细胞损伤的基本机制之一,其程度的增加意味着细胞器和细胞结构与功能的破坏,进而可能导致组织器官的病变,发生疾病。本文的研究还发现,在中浓度组中消化腺和鳃脂质过氧化程度和 DNA 断链有很好的正相关性,相关系数分别为 0.92、0.95 ($n = 6, P < 0.05$),高浓度组相关性较低,为 0.71、0.60。这说明脂质过氧化和 DNA 损伤有着相似的代谢过程,脂质过氧化的加剧也伴随着 DNA 损伤的增加,而 DNA 损伤正是许多疾病如肿瘤的引发阶段。

从时间-效应曲线来看,低、中浓度组织差异性不大,而高浓度组中消化腺显示出较鳃高的敏感性。而 Cossu 等^[9]利用淡水双壳类珠蚌 *Unio tumidus* 进行的移植实验却发现,当鳃脂质过氧化程度明显增加时,消化腺却没有明显变化,表明鳃的敏感性高于消化腺。但在另一次移植实验中,Cossu^[10]等的结果表明在其中两个不同的实验站点鳃和消化腺的敏感性正好相反。这种组织敏感性的差异也许和污染物的不同有关。

根据本文的实验结果,在污染实验后期消化腺和鳃脂质过氧化都表现出一定的剂量-效应关

系,这表明僧帽牡蛎的消化腺和鳃脂质过氧化有可能作为监测海洋石油污染的生物标志物。Michele 等^[11]将地中海贻贝 (*Mytilus galloprovincialis*) 脂质过氧化作为生物标志物之一来评价地中海尼斯湾 (Nice Bay) 的水质状况,结果显示重金属污染增加时脂质过氧化程度也增加^[11]。但 Suwarna 等发现叉尾鲷 *Wallago attu* 肝、肾、鳃脂质过氧化程度都不能反映印度 Yamuna 河的污染状况^[12]。总之,利用水生生物脂质过氧化程度作为监测水体污染的生物标志物的可行性还需要更多的资料积累。将脂质过氧化程度单独作为生物标志物的敏感性也许不足,需要和其他指标如生物代谢酶、抗氧化系统参数和 DNA 损伤等指标共同使用进行综合评价。

参考文献:

- [1] 蔺玉华,卢健民. 镉对鲤鱼离体肝脏的脂质过氧化及红细胞膜的毒性影响[J]. 水产学杂志,1998,11(1):53-56.
- [2] 周新文,朱国念, Jilisa Mwalilino, 等. 混合重金属离子相互作用诱导的 LPO 与 Cu, Pb 在鲫鱼组织中积累[J]. 农业环境保护,2002,21(6):505-507,511.
- [3] 国家海洋局. 海洋监测规范[S]. 北京:海洋出版社,1991.
- [4] 张秀明,严丽娟,柴建开,等. 改良硫代巴比妥酸荧光法测定血清过氧化脂质[J]. 生物化学与生物物理进展,1996,23(2):175-179.
- [5] Moore M N. Cytochemical responses of the lysosomal system and NADP-H ferrihemoprotein reductase in molluscan digestive cells to environmental and experimental exposure to xenobiotics [J]. Mar Ecol Prog Ser, 1988, 46: 81-89.
- [6] Wenning R J, DiGiulio R T, Gallagher E P. Oxidant-mediated biochemical effects of paraquat in the ribbed mussels, *Geukensia demissa* [J]. Aquat Toxicol, 1988, 12: 157-170.
- [7] Thomas P, Wofford H W. Effects of cadmium and Aroclor 1254 on lipid peroxidation, glutathione peroxidase activity, and selected antioxidants in Atlantic croaker tissues [J]. Aquat Toxicol, 1993, 27: 159-178.
- [8] Elif O Oruc, Nevin U. Combined effects of 2,4-D and azinphosmethyl on antioxidant enzymes and lipid peroxidation in liver of *Oreochromis niloticus* [J]. Comp Biochem Physiol, 2000, 127C: 291-296.
- [9] Cossu C, Doyotte A, Jacquin M C, et al. Glutathione reductase, selenium-dependent glutathione peroxidase, glutathione levels, and lipid peroxidation in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, as biomarkers of aquatic contamination in field studies [J]. Ecotoxicol Environ Safe, 1997, 38(2): 122-131.
- [10] Cossu C, Doyotte A, Babut M, et al. Antioxidant biomarkers in freshwater bivalves, *Unio tumidus*, in response to different contamination profiles of aquatic sediments [J]. Ecotoxicol Environ Safe, 2000, 5(2): 106-121.
- [11] Michele R, Pascal H, Ginette G, et al. Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean [J]. Environ Pollut, 2003, 122:369-378.
- [12] Suwarna P, Suhel P, Iqbal S, et al. Biomarkers of oxidative stress: a comparative study of river Yamuna fish *Wallago attu* (Bl. & Schn.) [J]. The Science of the Total Environment, 2003, 309: 105-115.