

七种染料对鲤鱼肝微粒体芳烃羟化酶的诱导¹⁾

徐楠²⁾ 王春霞³⁾ 莫争

(中国科学院生态环境研究中心, 环境水化学国家重点实验室, 北京, 100085)

呼世斌

(西北农林科技大学基础科学系, 杨凌, 712100)

摘 要

以鲤鱼肝微粒体为实验体系, 研究了七种染料化合物对其芳烃羟化酶 (AHH) 的诱导, 发现七种染料都可以诱导 AHH 的活性, 随染料浓度增大 AHH 的活性升高. 七种染料对 AHH 活性诱导能力大小为: 酸性红 B > 派拉丁蓝 RRN > 普拉红 B > 活性艳红 K-2BP > 活性艳红 K-2G, 媒介大红 S-80 > 分散红 E-4B, 与其毒性大小相关.

关键词: 芳烃羟化酶, 染料, 鲤鱼, 诱导.

化合物在生物体内所发生的一系列代谢主要是在位于细胞内质网上的细胞色素 P450-混合功能氧化酶 (mixed function oxygenases, 简称 MFO) 的参与下进行的. 这个系统主要存在于肝脏中, 是一种非特异性的酶系统. 它可用来反映生物体系的代谢活性和外来化合物对生物细胞的影响, 可以作为评价环境中有机物污染的一种灵敏、方便的早期诊断信号^[1]. 芳烃羟化酶 (AHH) 是细胞色素 P-450 混合功能氧化酶体系的成员之一^[2].

本文以肝微粒体为研究体系, 利用体外实验的方法研究五种偶氮染料和两种含酮基染料对鲤鱼肝脏 AHH 活性的影响, 探讨用 AHH 作为环境质量生物监测指标的可能性.

1 材料和方法

1.1 仪器和试剂

UV-120-02 可见分光光度计 (Shimadzu 公司), RF-520 荧光光度计 (Shimadzu 公司) 和 J2-HS 冷冻高速离心机 (Beckman 公司).

五种偶氮染料为: 普拉红 B、酸性红 B、活性艳红 K-2G、活性艳红 K-2BP、派拉丁蓝 RRN, 两种含酮基的染料为: 分散红 E-4B、媒介大红 S-80 均为商品染料. 还原型辅酶 II (NADPH) 为 Sigma 公司产品, 二苯基噁唑 (PPO, > 99%) 为 Merck 公司产品, Tris (> 99.9%) 为 GIBCO BRL 公司产品. 其他所用试剂为国产分析纯.

1.2 酶活性测定

粗酶液的制备 实验用鲤鱼 (*Cyprinus Carpio*, 0.75kg 左右, 雄性, 北京小汤山养

1) 国家自然科学基金(29637010和39770152)资助项目; 2) 现在西北农林科技大学基础科学系; 3) 通讯联系人.

渔场), 将鱼体解剖, 取出肝脏, 用预冷的 0.05% KCl 溶液冲洗, 剥离出肝脂肪, 用滤纸浸干, 迅速称重后置于冰浴中, 加冰冷的缓冲液 ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ Tris- $0.25\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ 蔗糖, $\text{pH}=7.6$), 体积为 (V/W) 2:1, 用玻璃匀浆器匀浆, 然后用高速冷冻离心机于 4°C , $9000\text{g}\cdot\text{min}^{-1}$ 下离心 20min, 上清液即为制得的粗酶液。

体外染毒 取粗酶液 0.5ml, 染料溶液 $10\mu\text{l}$, NADPH ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) $100\mu\text{l}$, 用 Tris-蔗糖缓冲液定量至 1.0ml, 于 25°C 水浴摇床中培育 15min。

酶活性测定 取染毒液 $400\mu\text{l}$, 加入 MgCl_2 ($50\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) 和 NADPH ($1.0\text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$) 各 $100\mu\text{l}$, 用 Tris-蔗糖缓冲液定容到 1ml. 反应开始时加 $20\mu\text{l}$ 二苯基噁唑 (PPO)-甲醇 ($2.5\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) 作底物, 于 25°C 水浴摇床中培育 15min, 然后加入 1ml 经冰浴冷却过的丙酮终止反应, 用 1.5ml 正己烷萃取后, RF-520 荧光光度计测定荧光值, 激发波长为 355nm, 发射波长为 515nm。

1.3 蛋白质测定

粗酶液中的蛋白质含量测定采用 Bradford 方法^[3], 以牛血清白蛋白为标准. 酶活性计算采用 Walton 等人的方法^[4], 用“每毫克蛋白的荧光强度”比较 AHH 的相对活性。

2 结果与讨论

实验以五种偶氮染料和两种酮基染料为代表, 研究偶氮和酮基染料对鲤鱼肝微粒体 AHH 酶活性的影响, 结果见图 1。

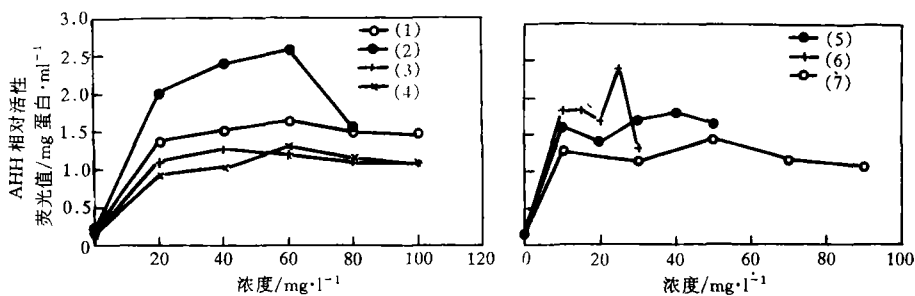


图 1 不同浓度的 7 种染料对鲤鱼肝微粒体 AHH 活性的影响

(1) 活性艳红 K-2BP, (2) 活性艳红 K-2G, (3) 媒介大红 S-80, (4) 分散红 E-4B, (5) 派拉丁蓝 RRN, (6) 酸性红 B, (7) 普拉红 B

Fig. 1 The AHH activity induced by different concentration of seven dyes

从图 1 可以看出, 七种染料对鲤鱼肝微粒体 AHH 都具有诱导作用. 鲤鱼肝微粒体在无污染的情况下, AHH 活性很低, 为 0.16 ± 0.02 , 当水体受染料污染时, 芳烃羟化酶诱导活性升高, 最大可增高 8—13 倍. Kurelec et al^[5]曾发现受到石油污染的亚得里亚海中鱼体 AHH 活性增高了 8—10 倍, 表明染料对 AHH 的诱导与石油对其诱导具有可比性. 化合物浓度增大, AHH 酶活性增高; 当化合物的浓度达到一定值时, AHH 的活性达到一个最大值, 之后随化合物浓度的增大, 酶活性开始降低. 这与 Paul Collodi 等人^[6]用 Coho salmon 鱼所得的结果相符。

化合物诱导 AHH 酶活性达到最大时，化合物浓度越小，其诱导 AHH 的能力越强；而化合物浓度相同时，诱导 AHH 酶活性值越大，诱导 AHH 的能力越强，表 1 为七种染料对鲤鱼肝微粒体 AHH 活性诱导的最大值及所对应的化合物浓度。由表 1 可以看出，五种偶氮染料对鲤鱼肝微粒体 AHH 诱导的顺序为：酸性红 B > 派拉丁蓝 RRN > 普拉红 B > 活性艳红 K-2BP > 活性艳红 K-2G；两种含酮基染料为：媒介大红 S-80 > 分散红 E-4B。

表 1 七种染料诱导 AHH 活性的最大值及所对应的化合物浓度

Table 1 The maximum AHH activity induced by seven dyes and the corresponding compounds concentrations

染料名称	对照	普拉红 B	酸性红 B	活性艳红 K-2G	活性艳红 K-2BP	派拉丁蓝 RRN	分散红 E-4B	媒介大红 S-80
AHH 活性* (Max)	0.16 ± 0.02	1.45 ± 0.10	2.41 ± 0.10	2.56 ± 0.11	1.63 ± 0.11	1.80 ± 0.10	1.29 ± 0.08	1.26 ± 0.05
浓度/mg·l ⁻¹ (n ≥ 3)	0	50	25	60	60	40	60	40

* AHH 活性强度用荧光强度/(毫克蛋白·ml⁻¹)表示。

AHH 由广泛存在于肝脏和其它器官中的胞间蛋白-芳烃受体所调节诱导。偶氮染料生产所用的中间体绝大部分是苯环、萘环、蒽醌环之类的多环芳烃类有机物，这些环境污染物的平面芳香环与受体结合以后，引发诱导，导致 AHH 数目、蛋白、酶活力增加^[7]。

Rifkind 等人^[8]认为化合物对 AHH 的诱导能力与其毒性大小相关，毒性越大诱导能力越强。化合物的结构，决定着它在动物体内可能参与和干扰的生化过程，是决定毒性的重要物质基础，因而研究化合物结构与其生物效应之间的关系，找出其一般性规律，有利于对毒性作用的估计和预测。一般而言，分子对称者毒性较不对称者大，取代基的位置不同也影响其毒性，如带两个基团的苯环化合物，其毒性顺序是：对位 > 邻位 > 间位。所带基团越大，位阻效应越大，越能阻碍平面芳香环与受体结合，从而其诱导 AHH 活性能力越低。由七种染料的化学结构可以知道空间位阻依酸性红 B、派拉丁蓝 RRN、普拉红 B、活性艳红 K-2BP、活性艳红 K-2G 逐渐增大，与我们所得到的其对 AHH 诱导能力的顺序相反，体现了化合物的位阻效应。对媒介大红 S-80 和分散红 E-4B 两种酮基染料而言，分散红 E-4B 化学结构与媒介大红 S-80 相比有一较大苯环取代基，其基团位阻效应大，对 AHH 的诱导能力弱，分散红 E-4B 毒性小于媒介大红 S-80。

3 结论

通过鱼体实验，研究了七种染料化合物对鲤鱼肝微粒体芳烃羟化酶的诱导，结果表明，七种染料对 AHH 都有不同程度的诱导，随着染料浓度的增大，AHH 活性升高，诱导能力的大小与化合物的结构相关，有以下顺序：酸性红 B > 派拉丁蓝 RRN > 普拉红 B > 活性艳红 K-2BP > 活性艳红 K-2G，媒介大红 S-80 > 分散红 E-4B。说明水环境受印染废水污染可以使鱼体 AHH 的活性升高。

参 考 文 献

- [1] Bcheli T D, Fent K, Induction of Cytochrome P450 as a Biomarker for Studying the Monooxygenase Induction Response in Environmental Monitoring and Ecotoxicological Testing of Fish. *Sci. Total Environ.*, 1995, 25:201—268
- [2] Moor M J, Myers M S, Pathobiology of Chemical-Associated Neoplasia in Fish. In: Malins D C and Ostrander G K (Eds), *Aquatic Toxicology: Molecular, Biochemical, and Cellular Perspectives*. Lewis Publisher, Boca Raton, 1994, pp327—386
- [3] Marion M Bradford, A Rapid and Sensitive Method for the Quantification of Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72: 248—254
- [4] Walton D G, Penrose W R, Green J M, The Petroleum-Induced Mixed Function Oxidase of Cunner (*Tautoglabrus Adspersus Walbaum*): Some Characteristics Relevant to Hydrocarbon Monitoring. *J. Fish. Res. Board Can.*, 1978, 35 (12) :1547—1552
- [5] Kurelec B, Britvic S, Rijavec M et al., Benz (a)pyrene Monooxygenase Induction in Marine Fish-Molecular Response to Oil Pollution. *Mar. Biol.*, 1977, 44:16—211
- [6] Paul Collodi, Michael S Stekoll, Stanley Drice, Hepatic Aryl Hydrocarbon Hydroxylase Activities in Coho Salmon. *Science*, 1987, 30 (2) :337—341
- [7] Goksoyr A, Use of Cytochrome P450 1A (CYP1A) in Fish as a Biomarker of Aquatic Pollution. *Arch. Toxicology* (Supp. 17), 1995, 80—95
- [8] Rifkind A B, Gannon M, Gross S S, Arachidonic Acid Metabolism by Dioxin-Induced Cytochrome P450: a New Hypothesis on the Role of P450 in Dioxin Toxicity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 1990, 172:1180—1188

2000年4月24日收到.

THE INDUCTION OF ARYL HYDROCARBON HYDROXYLASE (AHH) OF CARP (*CYPRINUS CARPIO*) LIVER MICROSOME BY SEVEN DYES

Xu Nan Wang Chunxia Mo Zheng

(Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences,
State Key Laboratory of Environmental Aquatic Chemistry, Beijing, 100085)

Hu Shibing

(Basic Science Department of North-West Agriculture University, Yangling, 712100)

ABSTRACT

The aryl hydrocarbon hydroxylase (AHH) activity of carp (*Cyprinus Carpio*) liver microsome induced by seven dyes was examined. The all tested dyes induced AHH activity to different extent. The AHH activity increased according to the increase of the dye concentration. The intense of AHH activity induced by seven dyes was as following order: acid red B > acid complex blue RRN > weak acid brilliant red B > reactive brilliant red K-2BP > reactive brilliant red K-2G, acid mordant red S-80 > disperse red E-4B. The intense of AHH activity was related to the toxicity of the chemicals.

Keywords: AHH, dyes, carp, induction.