

DOI: 10.5846/stxb201306181734

余铭恩, 郑榕辉, 张玉生. 3 种海洋鱼类肝微粒体 EROD 活的性测定. 生态学报, 2014, 34(19): 5416-5424.

Yu M E, Zheng R H, Zhang Y S. The measuring method of hepatic microsomal EROD activity in three species of marine fish. Acta Ecologica Sinica, 2014, 34(19): 5416-5424.

3 种海洋鱼类肝微粒体 EROD 活性的测定

余铭恩, 郑榕辉, 张玉生*

(国家海洋局第三海洋研究所, 厦门 361005)

摘要: 根据鱼类的生态习性选择了暖温性近岸底层岩礁鱼类褐菖鲉和浅海底层鱼类黄鳍鲷和黑鲷作为实验动物, 系统地研究了 0# 柴油 WSF 诱导组 and 对照组褐菖鲉肝微粒体 EROD 动力学反应系统的测定条件, 确定了最适测定条件为: pH 值 7.60、温度 15 °C、底物 7-乙氧基异吩恶唑啉浓度 0.5 μmol/L、样品蛋白量 100—800 μg、还原型辅酶 II NADPH 70 nmol/mL。诱导组和对照组的最适反应条件没有差别, 但是诱导组的酶活性比对照组的高; 对照组和诱导组 EROD 的 K_m 值分别为 0.144 μmol/L 和 0.357 μmol/L, V_{max} 值分别为 0.466 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 蛋白和 2.360 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 蛋白。首次在我国建立了褐菖鲉肝微粒体 EROD 活性检测技术。此外, 比较了上述 3 种实验鱼类肝微粒体 EROD 反应系统的最适 pH 值和最适温度。结果表明, 与褐菖鲉不同, 黄鳍鲷和黑鲷肝 EROD 反应最适 pH 值都是 7.80, 最适温度都是 25 °C。

关键词: 褐菖鲉; 黄鳍鲷; 黑鲷; 肝微粒体 EROD; 0# 柴油 WSF; 原油 WSF

The measuring method of hepatic microsomal EROD activity in three species of marine fish

YU Ming'en, ZHENG Ronghui, ZHANG Yusheng*

Third Institute of Oceanography, State Oceanic Administration, Xiamen 361005, China

Abstract: Cytochrome P450 (CYP) enzymes are a large and ubiquitous family of heme-containing proteins found in vertebrates, invertebrates, plants, and microorganisms that catalyze the oxidative biotransformation of diverse lipophilic xenobiotic and endogenous compounds including steroids, fatty acids, drugs, and organic pollutants. CYP enzymes play a role both in the detoxification and activation of halogenated and non-halogenated hydrocarbons found in the food chain. Because CYP enzymes are central to metabolism, levels of individual CYP enzymes are important determinants of bioaccumulation and ultimately of susceptibility to environmental contaminant exposure. A toxicologically relevant aspect of CYP regulation is the observation that several substrates can increase expression of specific CYP enzymes involved in their metabolism. For example, induction of hepatic CYP1A enzymes is a common and characteristic biochemical response in vertebrates of exposure to certain planar halogenated and non-halogenated hydrocarbons, such as polychlorinated dibenzo-p-dioxins (PCDDs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and polynuclear aromatic hydrocarbons (PAHs), that often precedes toxicity. In mammals, the CYP1A subfamily contains two related forms, CYP1A1 and CYP1A2, that can be separated by chromatographic, electrophoretic and immunochemical means. Expression of both CYP1A1 and CYP1A2 is regulated in a differential and tissue-specific manner by the aryl hydrocarbon (Ah) receptor. Although several different CYP enzymes have been identified in fish, CYP1A has received the most attention as the major hydrocarbon inducible form and as a possible biomarker of exposure to marine hydrocarbon contaminants. CYP1A enzyme induction in fish populations is generally

基金项目: 国家自然科学基金 (40476042); 国家海洋局青年海洋科学基金 (2007111); 海洋公益性行业科研专项经费 (201005016)

收稿日期: 2013-06-18; **修订日期:** 2014-07-14

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: zhangyusheng@tio.org.cn

recognized as a useful and sensitive biochemical marker of contaminant exposure, and by inference, of marine ecosystem health. Usually, induction of CYP1A was determined by measurement of an associated enzyme activity, namely ethoxyresorufin *O*-deethylase (EROD). The EROD activity is measured by following the increment in fluorescence of the reaction product resorufin. But the optimal conditions for the EROD activity vary from marine fish species. According to ecological features, *Sebastes marmoratus*, *Sparus latus* and *Sparus macrocephalus* were selected as experimental animals in the present study. A systematic study had been performed on optimal conditions of hepatic microsomal EROD kinetic reaction system for the control and the induced groups of *Sebastes marmoratus* with the water soluble fraction (WSF) of 0# diesel fuel. The optimal conditions for the microsomal EROD activity of the *Sebastes marmoratus* were pH 7.60, 15 °C, 0.5 μmol/L 7-ethoxyresorufin (substrate), 100—800 μg microsomal protein and 70 nmol/mL NADPH, which showed no difference between the control and the induced groups. However, the EROD activity was apparently higher in the induced groups than the control ones. The optimal conditions for the hepatic microsomal EROD activity from *Sebastes marmoratus* were firstly established in this study. Moreover, K_m values for the control and the induced groups were 0.144 μmol/L and 0.357 μmol/L, and V_{max} values for the two groups were 0.466 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein and 2.360 nmol min⁻¹ mg⁻¹ protein, respectively. Furthermore, the comparison of optimal pH values and temperatures (two major factors) for the hepatic microsomal EROD activity among the three species of fish were conducted in the study. The results indicated that optimal pH values and temperatures for the EROD activity of both *Sparus latus* and *Sparus macrocephalus* were pH 7.80 and 25 °C, which were different from those of *Sebastes marmoratus*.

Key Words: *Sebastes marmoratus*; *Sparus latus*; *Sparus macrocephalus*; EROD activity; 0# diesel oil WSF; crude oil WSF.

自从 20 世纪 60 年代发现了鱼类细胞色素 P450 加单氧酶以来,许多研究表明鱼类细胞色素 P450 加单氧酶与哺乳动物的相似,是一组主要存在肝和肾脏组织中的异构酶系,分子量为 45000—60000,在生物体内的解毒过程中起着重要的作用^[1-2]。7-乙氧基异吩恶唑-O-脱乙基酶[7-Ethoxyresorufin-*O*-deethylase (EROD)]是该酶系中的一种,因催化 7-乙氧基异吩恶唑-O-脱乙基反应而得名,属于多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbon, PAH)诱导型。自从 20 世纪 70 年代中期加拿大科学家^[3-4]首先提出利用这种酶监测水环境石油烃污染以来,该酶已经发展成为一种敏感的生物标志物监测技术,越来越广泛地应用于环境中石油类、PAHs、PCBs 等有毒有机污染物污染监测及其生物效应评价中^[5-7]。鱼类肝 EROD 生物标志物监测技术的研究与应用已成为海洋环境科学领域的研究热点,引起了有关国际组织和国家的广泛关注^[8-9]。

然而,由于种类的不同,鱼类肝 EROD 的最适测定条件往往存在差异,因此摸索鱼类酶反应的最适测定条件(尤其是最适 pH 值和最适温度),建立规范性的检测技术,不仅是应用 EROD 活性指标进行环

境有机污染物污染监测和生化效应研究,而且也是不同实验室实验结果具有可比性必不可少的前提。本研究以我国近海底栖鱼类褐菖鲉(*Sebastes marmoratus*)、黄鳍鲷(*Sparus latus*)和黑鲷(*Sparus macrocephalus*)为实验鱼类,通过系统地摸索鱼肝微粒体 EROD 酶活性测定的最适条件,旨在研究和建立鱼肝微粒体 EROD 活性检测技术,使不同实验室的检/监测数据具有可比性,为我国海洋石油类等有机有毒污染物污染及其生物效应的监测与评估以及生态毒理学的研究提供一种新的生物标志物监测技术。

1 材料与方法

1.1 实验鱼类

褐菖鲉购自厦门市鼓浪屿三丘田码头,由渔民捕自金门附近海域,平均体长(12.7±0.5)cm,平均体重(28.9±2.7)g。黄鳍鲷和黑鲷均购自厦门市东海域鱼排。黄鳍鲷平均体长为(13.8±1.0)cm,平均体重为(46.45±12.36)g。黑鲷平均体长为(15.2±1.8)cm,平均体重为(57.51±13.18)g。每次购买时,均挑选健康状况良好,大小比较一致的鱼类作为实验

动物。实验前,鱼类先在水族厅清洁沙滤海水养殖池中暂养 7 d,用充气机连续充气。暂养期间褐菖鲉的水温为 15.4—17.0 °C,盐度为 25.6,pH 值 7.98;黄鳍鲷和黑鲷的水温为 22—24 °C,盐度为 27,pH 值 7.81。暂养和实验期间均采用自然光照周期。

1.2 0#柴油和原油

0#柴油购自厦门文灶中国石化总公司加油站。原油由福建石化公司赠送,购自阿根廷。

1.3 仪器设备

实验中使用的主要仪器设备包括:AL104 电子分析天平(中国-瑞士合资 METTLER 公司),PHS-3C 精密酸度计(厦门分析仪器厂),J-25 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),-86°C 超低温冰箱(美国 Forma 公司),Varian Cary Eclipse 荧光分光光度计(美国 Varian 公司),Unico UV-2600 紫外/可见分光光度计(Unico(上海)仪器有限公司)。

1.4 化学药品与试剂

7-乙氧基异吩噁唑(7-Ethoxyresorufin)、7-羟基异吩噁唑(Resorufin)和还原型辅酶 II[β -Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate, reduced tetra(cyclohexylammonium) salt, NADPH]为美国 Sigma 公司产品;牛血清白蛋白(BSA)为上海实生细胞生物技术有限公司进口分装;其余化学药品和试剂均为国产分析纯的产品。

1.5 石油类水溶性组分(WSF)制备与测定

石油类 WSF 制备:0#柴油和原油分别与沙滤海水按 1:10 混合;混合后,0#柴油的混合物用康氏电动振荡机连续震荡 5 h,原油混合物用电动搅拌机搅拌 8 h,静置过夜后分别分离下层水溶相,避光保存,使用前分别测定 0#柴油和原油的 WSF 油浓度。

油浓度测定以国家海洋环境监测中心生产的油标为标准,按照 GB17378《海洋监测规范》采用荧光分光光度法进行,测定波长 $E_x = 310$ nm, $E_m = 365$ nm。测定后的 WSF 为母液,实验时根据预先设计用清洁沙滤海水稀释到相应浓度和体积。

1.6 诱导实验

0#柴油 WSF 对褐菖鲉肝微粒体 EROD 诱导实验:采用静置实验,分对照组和诱导组,每组 12 条褐菖鲉,诱导组置于 40 L 含有 100 $\mu\text{g/L}$ 0#柴油 WSF 的清洁沙滤海水中,对照组只有相同体积的沙滤海水。实验期间喂以人工饵料,取样前一天停止投饵;

用充气机连续充气,每两天更换相应浓度的含油海水或沙滤海水。诱导时间为 7 d,诱导期间水温为 15.4—17.0 °C,盐度为 25.6,pH 值 7.98。

原油 WSF 对黄鳍鲷和黑鲷肝微粒体 EROD 诱导实验:由于诱导组和对照组的褐菖鲉肝微粒体 EROD 的最适 pH 值和最适温度值没有差别,而且诱导第 4 天的酶活性最高^[10],因此黑鲷和黄鳍鲷肝微粒体 EROD 最适条件实验只做诱导组,而且只诱导 4 d。实验中每组随机放置 8 条鱼,在 55 L 的沙滤海水中分别含有 100 $\mu\text{g/L}$ 的原油 WSF。每两天更换相应浓度的含油海水。水温 22—24 °C,盐度为 27,pH 值 7.81。其它条件同褐菖鲉诱导实验。

1.7 酶提取

实验鱼类诱导后,量体长,称体重,解剖取出肝并称重,将肝置于-70 °C 超低温冰箱保存。鱼肝微粒体酶蛋白提取和制备参考 Forlin^[11]和 Stegeman 等^[12]的方法,进行了部分改进。将各组鱼肝样品两两合并,剪碎后置于玻璃匀浆器中,加 5 倍体积预冷的匀浆缓冲液(0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 0.15 mol/L KCl,pH 值 7.40),按 1:5,冰浴下匀浆,4 °C 下 10000g 离心 15 min,取上清 4 °C 下 55000 g 离心 90 min。鱼肝微粒体沉淀按 1:1 溶解于预冷的微粒体缓冲液(0.1 mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$, 0.15 mol/L KCl,20% Glycerol,pH 值 7.40)中,置于-70 °C 超低温冰箱保存,用于酶活性和蛋白质含量的测定。

1.8 EROD 活性测定

褐菖鲉肝微粒体 EROD 活性的测定以 Andersson 等^[13]参照 Burke 和 Mayer^[14]的方法建立的基本反应体系,略有改进。反应在荧光分光光度计的比色杯中进行,总体积为 2.5 mL。反应体系中的缓冲液由 0.1 mol/L Tris-HCl 改为 0.1 mol/L Na-PBS(Sodium phosphate buffer solution:磷酸钠缓冲液)。酶反应 30 s 后测量形成产物 7-羟基异吩噁唑的荧光值, $E_x = 530$ nm, $E_m = 585$ nm。在酶动力学反应条件测定中,逐一对最适的 pH 值(7.20、7.40、7.60、7.80 和 8.00)、温度(5、10、15、20、25、30、35 °C 和 40 °C)、蛋白量(100、200、400、600、800 μg 和 1000 μg)、NADPH(10、30、50、70 nmol/mL 和 90 nmol/mL)和底物浓度(0.1、0.3、0.5、0.7 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.9 $\mu\text{mol/L}$)进行摸索,以建立鱼肝 EROD 活性测定技术。

黄鳍鲷和黑鲷肝 EROD 活性最适条件的试验,在上述方法的基础上只测定两种主要的反应条件即 pH 值(7.20、7.40、7.60、7.80 和 8.00)和温度(10、15、20、25、30 °C 和 35 °C),以确定它们的酶反应体系中这两种最适的反应条件。

酶活性以每毫克微粒体蛋白每分钟催化形成的产物表示($\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白)。

1.9 蛋白质测定

鱼肝微粒体蛋白质含量的测定以小牛血清白蛋白为标准,采用改进的考马斯亮蓝比色法^[15]进行测定。

1.10 数据分析

实验数据采用每个样品两次测定数据的平均值表示。

2 结果与讨论

2.1 褐菖鲉肝 EROD 反应系统最适条件

2.1.1 最适 pH 值

以 Andersson 等^[13]基于 Burke 和 Mayer^[14]的方法改进建立的鱼肝 EROD 测定体系为基本反应体系,在其它参数条件不变的情况下首先进行缓冲液最适 pH 值的摸索。在不同 pH 值条件下,EROD 催化底物 7-乙氧基异吩噻唑的反应速率不同,即酶活性不同。反应中酶活性最高时的 pH 值,就是酶反应体系的最适 pH 值。本实验测定了 pH 值为 7.20、7.40、7.60、7.80 和 8.00 的 0.1 mol/L PBS 对对照组和诱导组的褐菖鲉肝 EROD 活性的影响。从图 1 可以明显看出,不管是对照组还是 100 $\mu\text{g/L}$ 诱导组,褐菖鲉肝 EROD 活性最适 pH 值都是 7.60。

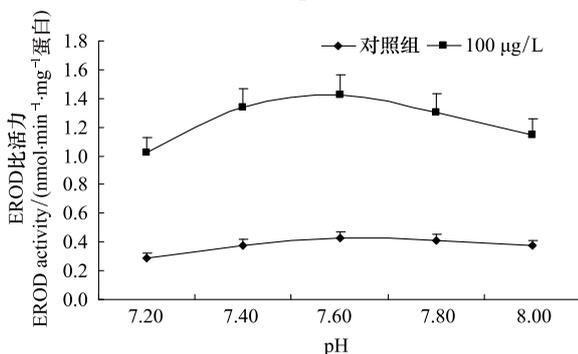


图 1 不同 pH 值对褐菖鲉肝 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD)活性的影响

Fig.1 Effect of pH on hepatic 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in *Sebastiscus marmoratus*

2.1.2 最适温度

细胞色素 P450 酶活性与温度的变化密切相关,通常鱼类肝微粒体细胞色素 P450 酶活最适温度比哺乳动物要低。为了摸索褐菖鲉肝 EROD 活性与温度的相关性,确定反应体系的最适温度,实验以上述酶反应基本系统和最适 pH 值 7.60 为反应条件,测定了 5、10、15、20、25、30、35 °C 和 40 °C 时对对照组和诱导组的褐菖鲉肝 EROD 活性,结果如图 2 所示。从 5 °C 到 15 °C,褐菖鲉 EROD 活性随着温度的升高而升高;而 15 °C 时,对照组和 100 $\mu\text{g/L}$ 诱导组 EROD 活性都达到峰值;之后,随着温度继续升高 EROD 活性反而呈下降趋势;并且 100 $\mu\text{g/L}$ 诱导组下降的趋势更为剧烈。当温度升高到 40 °C 时,酶活性几乎完全失活。因此褐菖鲉肝 EROD 的最适反应温度为 15 °C。

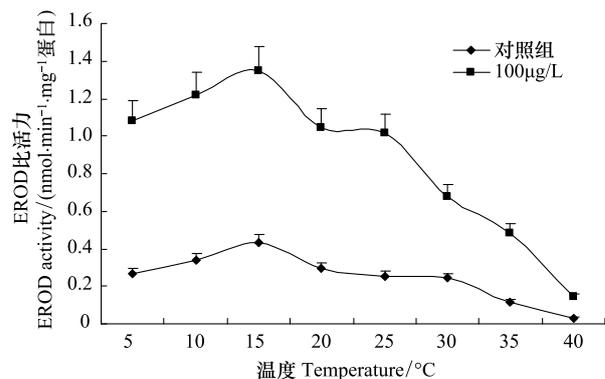


图 2 不同温度对褐菖鲉肝 EROD 活性的影响

Fig.2 Effect of temperature on hepatic EROD activity in *Sebastiscus marmoratus*

2.1.3 最适蛋白量

在酶促反应中,相对于酶来说底物通常是过量的,这时测得的反应速率是最大反应速率。反应开始时随着酶量的增加,反应速度加快,此时酶量与反应速度几乎呈线性关系;随着酶量的继续增加,由于底物量的减少而相对不足,则反应速度逐渐趋向于一个极限值。实验在上述取得的最适 pH 值 7.60、最适温度 15 °C、及其基本反应体系底物和 NADPH 浓度不变的条件下,在不同微粒体蛋白量情况下测定了对照组和诱导组的褐菖鲉肝 EROD 活性。从图 3 可以看出,在对照组和 100 $\mu\text{g/L}$ 诱导组中,当样品总蛋白量在 100—800 μg 之间变化时,蛋白量与 EROD 活性基本呈线性关系,在 1000 μg 处曲线略有降低。

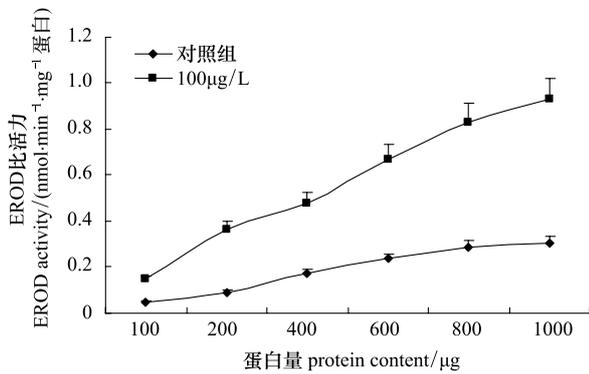


图3 不同蛋白量对褐菖鲉肝 EROD 活性的影响

Fig.3 Effect of protein content on hepatic EROD activity in *Sebastiscus marmoratus*

2.1.4 最适 NADPH 浓度

在 EROD 的酶促反应中, NADPH 的主要作用是提供电子, 没有它的参与反应几乎不能正常进行。一般说来, 反应体系中 NADPH 往往是过量的, 当其量不足时 EROD 活性偏低。在上述最适的 pH、温度和固定样品总蛋白量 400 μg 条件下, 在不同 NADPH 浓度条件下测定了对照组和诱导组的褐菖鲉肝 EROD 活性, 具体结果如图 4 所示。

从图 4 可以看出, 不同浓度的 NADPH 对酶活性影响不大, 曲线变化比较平缓, 在 70 nmol/mL 浓度时酶活性达到最大值。总体上看在本实验条件下 NADPH 对 EROD 活性的影响不是十分明显, 对对照组的影响尤其不明显。

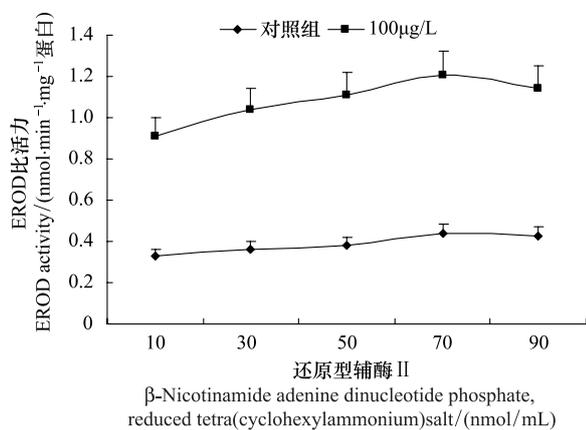


图4 不同 NADPH 浓度对褐菖鲉肝 EROD 活性的影响

Fig.4 Effect of NADPH concentration on hepatic EROD activity in *Sebastiscus marmoratus*

2.1.5 最适底物浓度

在一定的反应体系中, 催化底物反应时, 底物的多少与酶活性的大小密切相关。底物量不足, 测定

得到的酶活性偏低, 当底物过量时, 酶完全被底物饱和, 测定得到的酶反应速度为最大反应速度。为了了解底物浓度与 EROD 活性的相互关系, 在上述实验取得的最适条件下, 测定了 0.1、0.3、0.5、0.7 μmol/L 和 0.9 μmol/L 底物浓度时褐菖鲉肝 EROD 活性, 具体结果如图 5 和表 1 所示。

从图 5 可以看出, 当底物 7-乙氧基异吩噻嗪量较低时, EROD 活性与底物量呈正相关关系, 随着底物量的增加, EROD 活性也相应升高。但当反应体系中底物量大于 0.5 μmol/L 以后, EROD 活性变化十分缓慢, 说明酶的底物浓度已经处于饱和状态。

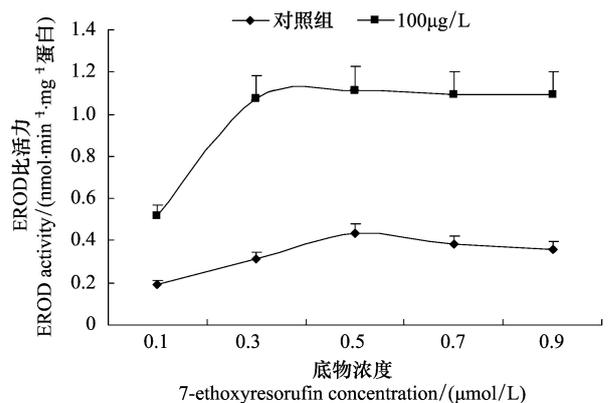


图5 不同底物浓度对褐菖鲉肝 EROD 活性的影响

Fig.5 Effect of 7-ethoxyresorufin concentration on hepatic EROD activity in *Sebastiscus marmoratus*

根据表 1 的数据, 使用双倒数作图法获得褐菖鲉肝微粒体 EROD 酶的动力学参数值见表 2。

与对照组相比, 100 μg/L 诱导组鱼肝 EROD 米氏常数 (K_m) 从 0.144 μmol/L 增加到 0.357 μmol/L, 提高了 1.48 倍; 相应的最大反应速度 (V_{max}) 从 0.466 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 蛋白升高到 2.360 nmol min⁻¹ mg⁻¹ 蛋白, 提高了 4.0 倍。

综上所述, 通过对诱导组和对照组的褐菖鲉肝微粒体 EROD 活性动力学反应系统的测定条件——缓冲液 pH 值, 温度, 蛋白量, NADPH 浓度和底物浓度的全面摸索, 确定了该酶反应体系的最适测定条件为 pH 值 7.60、温度为 15 °C、底物 7-乙氧基异吩噻嗪浓度为 0.5 μmol/L、样品蛋白量为 100—800 μg、还原型辅酶 II NADPH 为 70 nmol/mL; 而且诱导组和对对照组的最适反应条件相当一致, 但是诱导组的酶活性比对照组的高; 对照组和诱导组的 EROD 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 0.144 μmol/L, 0.357 μmol/L 和

0.466 nmol min⁻¹ mg⁻¹蛋白, 2.360 nmol min⁻¹ mg⁻¹蛋白;从而建立了褐菖鲉肝微粒体 EROD 活性检测技术。

表 1 底物浓度对褐菖鲉肝 7-Ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) 活性的影响

底物浓度/($\mu\text{mol/L}$) 7-ethoxyresorufin concentration	0.1	0.3	0.5	0.7	0.9
对照组 Control group	0.191 \pm 0.02	0.315 \pm 0.03	0.435 \pm 0.04	0.384 \pm 0.04	0.360 \pm 0.04
100 $\mu\text{g/L}$ 组 100 $\mu\text{g/L}$ group	0.516 \pm 0.05	1.077 \pm 0.11	1.114 \pm 0.11	1.092 \pm 0.11	1.090 \pm 0.11

表 2 对照组和诱导组褐菖鲉肝 EROD 动力学参数的比较

Table 2 Comparison of kinetic constants for hepatic EROD in controlled and induced groups of *Sebastes marmoratus*

组别 Group	米氏常数 K_m / ($\mu\text{mol/L}$)	最大反应速度 V_{max} / (nmol min ⁻¹ mg ⁻¹ 蛋白)
对照组 Control group	0.144	0.466
100 $\mu\text{g/L}$ 诱导组 100 $\mu\text{g/L}$ group	0.357	2.360

2.2 黄鳍鲷肝微粒体 EROD 反应系统最适 pH 值和最适温度

在前人建立的鱼肝 EROD 反应系统中,通常底物和 NADPH 的浓度是过量的,样品蛋白的使用量范围也相应较广,但是反应体系中的最适 pH 值和温度往往随着实验生物的种类不同而变化,所以在摸索不同鱼类的酶反应条件时,被认为是两种主要的影响因素。由于诱导组和对照组褐菖鲉肝微粒体 EROD 活性测定的最适条件基本上没有差异,因此在黄鳍鲷和黑鲷的酶活性最适条件的实验中,只测定酶活性较高的诱导组样品。以本研究基于 Andersson 等^[13] 和 Burke 和 Mayer^[14] 的方法改进建立的褐菖鲉肝 EROD 测定体系为基本反应体系,开展对黄鳍鲷肝微粒体 EROD 反应系统的最适 pH 值和最适温度的摸索。

2.2.1 最适 pH 值

在与褐菖鲉肝微粒体 EROD 活性测定相同的 pH 值范围条件下,测定了诱导组黄鳍鲷肝 EROD 活性,结果如图 6 所示。从图 6 可明显看出,在 pH 值 7.20—7.60 期间,黄鳍鲷肝微粒体 EROD 活性迅速升高,而从 pH 值 7.60—7.80,上升比较缓慢,在 pH 值 7.80 时,活性达到最大值。其后随着缓冲液 pH 值的升高,酶活性迅速降低。而且缓冲液的 pH 值对黄鳍鲷的 EROD 活性的影响大于褐菖鲉(图 1)和黑

鲷(图 8)。

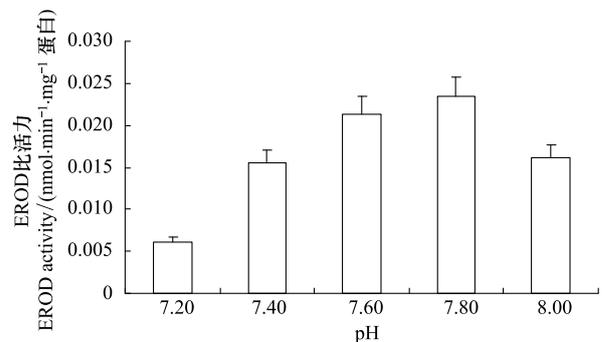


图 6 不同 pH 值对黄鳍鲷肝 EROD 活性的影响

Fig.6 Effect of pH on hepatic EROD activity in *Sparus latus*

2.2.2 最适温度

实验以相同的基本反应体系和最适 pH 值 7.80 为反应条件,采用了与褐菖鲉基本相同的温度范围,测定了 10 °C、15 °C、20 °C、25 °C、30 °C 和 35 °C 条件下诱导组黄鳍鲷肝微粒体 EROD 活性,结果如图 7 所示。

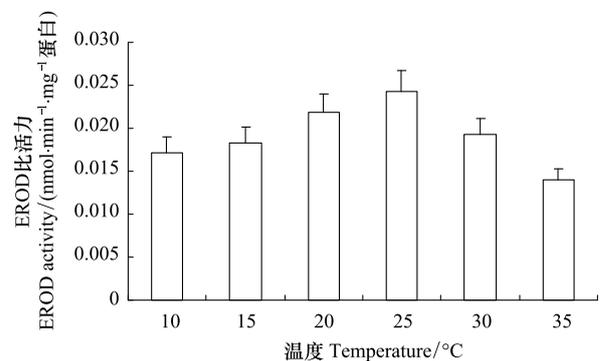


图 7 不同温度对黄鳍鲷肝 EROD 活性的影响

Fig.7 Effect of temperature on hepatic EROD activity in *Sparus latus*

从图 7 可以清楚的看出,从 10 °C 到 25 °C,黄鳍鲷肝 EROD 活性随着温度的升高而缓慢上升;在 25 °C 时酶活性达到最高值。其后随着温度的继续上

升,酶活性快速降低。因此黄鳍鲷肝 EROD 反应的最适温度为 25 ℃。

2.3 黑鲷肝微粒体 EROD 反应系统最适 pH 值和最适温度

2.3.1 最适 pH 值

与黄鳍鲷一样,以本研究建立的褐菖鲷肝 EROD 测定体系为基本反应体系,进行诱导组的黑鲷肝微粒体 EROD 反应系统的最适 pH 值和最适温度的摸索。

在与褐菖鲷和黄鳍鲷肝微粒体 EROD 活性测定相同的 pH 值范围条件下,测定了黑鲷的酶活性,结果如图 8 所示。在 pH 值 7.20—7.80 期间,黑鲷肝微粒体 EROD 活性呈逐渐的升高趋势,其后呈较快速的下降。黑鲷肝微粒体 EROD 酶活性最适 pH 值不同于褐菖鲷的 pH 值 7.60,但与黄鳍鲷的一样都是 7.80,然而 pH 值对黑鲷酶活性影响变化不如黄鳍鲷的大。

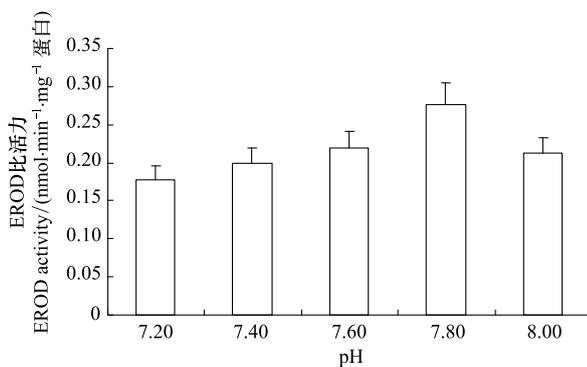


图 8 不同 pH 值对黑鲷肝 EROD 活性的影响

Fig.8 Effect of pH on hepatic EROD activity in *Sparus macrocephalus*

2.3.2 最适温度

同样,实验以 2.3.1 相同的基本反应体系和最适 pH 值 7.80 为反应条件,采用了与黄鳍鲷相同的温度范围,测定了 6 个不同温度条件下诱导组黑鲷肝微粒体 EROD 活性。从图 9 可以清楚的看出,与黄鳍鲷的相似,从 10 ℃到 25 ℃期间,黑鲷肝 EROD 活性随着温度的升高而缓慢上升;到 25 ℃时酶活性同样达到最高值。其后随着温度的继续上升,酶活性呈较快速的降低。因此,黑鲷肝 EROD 反应的最适温度与黄鳍鲷的一样都是 25 ℃。

2.4 3 种鱼类肝微粒体 EROD 最适 pH 值和最适温度的比较

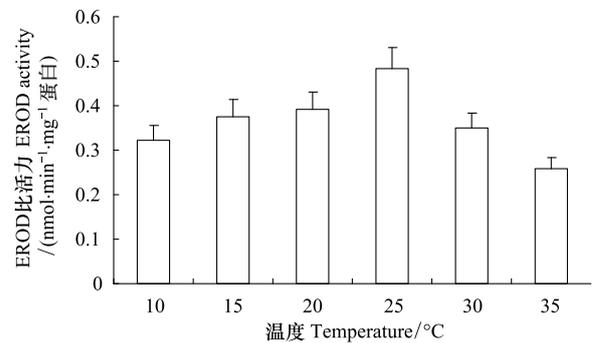


图 9 不同温度对黑鲷肝 EROD 活性的影响

Fig.9 Effect of temperature on hepatic EROD activity in *Sparus macrocephalus*

褐菖鲷、黄鳍鲷和黑鲷肝微粒体 EROD 反应体系的最适 pH 值和最适温度的测定结果见表 3。褐菖鲷肝 EROD 的最适 pH 值 7.60,最适温度 15 ℃,而黄鳍鲷和黑鲷的一样,最适 pH 值和最适温度都分别是 7.80 和 25 ℃。其原因很可能是在进化上黄鳍鲷和黑鲷同属于硬骨鱼纲 (Osteichthyes), 鲈形目 (Perciformes), 鲷科 (Sparidae)^[16], 二者进化上差异比较小;而褐菖鲷虽然也属于硬骨鱼纲,但属于鲈形目 (Scorpaenoidei), 鲷科 (Scorpaenidae)^[16], 进化上差别较大的缘故。

表 3 3 种鱼类肝微粒体 EROD 反应系统最适 pH 和最适温度的比较

Table 3 Comparison of optimal pH and temperature of hepatic microsomal EROD activities from *Sebastes marmoratus*, *Sparus latus* and *Sparus macrocephalus*

鱼类名称 Fish	最适 pH 值 Optimal pH	最适温度 Optimal temperature/°C
褐菖鲷 <i>Sebastes marmoratus</i>	7.60	15.0
黄鳍鲷 <i>Sparus latus</i>	7.80	25.0
黑鲷 <i>Sparus macrocephalus</i>	7.80	25.0

王菊英等人^[17]报道牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 肝 EROD 在 pH 值 7.60, 温度 22 ℃时酶活性最高, 其最适的 pH 值与本文研究的褐菖鲷的结果相一致, 而最适的温度与黄鳍鲷和黑鲷的相接近。另外, Lange 报道比目鱼 (*Limanda limanda*) EROD 活性在 30 ℃时是 20 ℃时的两倍^[18]。

2.5 3 种鱼类的习性及其作为监测生物的可能性

褐菖鲉:综合文献报道表明,褐菖鲉属于暖温性、近岸底层鱼类,主要栖息于岩礁海域,广泛分布于我国沿海和北太平洋西部,从韩国到菲律宾都有分布^[19-20]。该鱼类不作远距离洄游,活动范围基本在离岸 1000 m 以内,一般不超过 2000 m;而且是一种广食性的肉食性鱼类,营养和经济价值高^[21]。褐菖鲉具有鲜明的种群隔离性,喜集群穴居。其种群一旦形成,稳定性极强。该鱼类属于广温广盐性种类,其适温范围为 7—28 ℃,最适为 14—22 ℃,适盐范围为 10—33‰,最适为 25—30‰;成鱼对暗光照比较适应,一般为 300—700 lx 为宜等^[22]。从本实验室多年来的实验结果表明,该鱼类也可进行实验室人工颗粒性饵料投喂,易于暂养,抗病力较强,存活率高,是一种对于石油类污染物比较敏感鱼类,既可作为室内实验室研究的实验鱼类,又可作为现场海区污染监测的监测生物^[23-24];也已经被其他实验室选择作为生态毒理学研究的实验动物^[25-26]。

黄鳍鲷和黑鲷:黄鳍鲷为浅海底层鱼类,喜栖于岩礁海区,一般不做长距离洄游,杂食性,经济价值较高。分布于黄海、东海和南海,以及朝鲜、日本、菲律宾、印尼、印度和红海等^[19]。黑鲷为浅海底层鱼类,喜栖于沙泥底质或多岩礁海区,肉食性,分布于我国沿海,朝鲜和日本等^[19]。由于这两种鱼类同属于底栖鱼类,分布广,在厦门地区也容易获得,易于饲养,肝较大,具有作为实验动物的优点,也已被一些实验室选择作为生态毒理学研究的实验动物^[27-29],因此也被选择作为本实验的受试生物,进行鱼类肝微粒体 EROD 活性测定的最适条件的研究和比较。这两种鱼类如何作为野外悬挂的监测动物还有待于进一步研究。

3 结论

(1) 对照组和 0 号柴油 WSF 诱导组的褐菖鲉肝微粒体 EROD 反应体系的最适条件是一致的,尽管诱导组的酶活性明显高于对照组。

(2) 对照组和 0 号柴油 WSF 诱导组的褐菖鲉肝微粒体 EROD 的 K_m 和 V_{max} 值分别为 0.144 $\mu\text{mol/L}$, 0.357 $\mu\text{mol/L}$ 和 0.466 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白, 2.360 $\text{nmol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ 蛋白。

(3) 本研究建立了褐菖鲉、黄鳍鲷和黑鲷的鱼肝

微粒体 EROD 活性检测技术。

(4) 褐菖鲉肝微粒体 EROD 反应体系的最适 pH 值 7.60,最适温度 15 ℃;而黄鳍鲷和黑鲷的一样,最适 pH 值和最适温度都分别是 7.80 和 25 ℃。

(5) 从 3 种鱼类的生态习性比较,作为监测生物褐菖鲉比黄鳍鲷和黑鲷具有更多优点。

致谢:承蒙海洋监测技术中心的陈金民高工帮助测定海水中的石油类含量,薄军副研究员对本文写作的帮助,特此致谢。

References:

- [1] Goksøyr A, Forlin L. The cytochrome P-450 system in fish, aquatic toxicology and environmental monitoring. *Aquatic Toxicology*, 1992, 22(4): 287-312.
- [2] Stegeman J J, Hahn M E. Biochemistry and molecular biology of monooxygenases: current perspective on forms, functions, and regulation of cytochrome P450 in aquatic species // Malins D C, Ostrander G K, eds. *Aquatic toxicology; Molecular, Biochemical and Cellular Perspectives*. Boca Raton: Lewis Publishers, CRC Press, 1994: 87-206.
- [3] Payne J F, Bauld C, Dey A C, Kiceniuk J W, Williams U. Selectivity of mixed-function oxygenase enzyme induction in flounder (*Pseudopleuronectes americanus*) collected at the site of the baie verte, Newfoundland oil spill. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1984, 79(1): 15-19.
- [4] Payne J F. Field evaluation of benzopyrene hydroxylase induction as a monitor for marine petroleum pollution. *Science*, 1976, 191(4230): 945-946.
- [5] Payne J F, Fancey L L, Rahimtula A D, Porter E L. Review and perspective on the use of mixed-function oxygenase enzymes in biological monitoring. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1987, 86(2): 233-245.
- [6] Livingstone D R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1993, 57(3): 195-211.
- [7] Fent K. Ecotoxicological effects at contaminated sites. *Toxicology*, 2004, 205(3): 223-240
- [8] GESAMP. Long-Term Consequences of Low-level Marine Contamination: Reports and Studies. GESAMP: FAO No 40, 1989.
- [9] van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environment risk assessment: a review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 57-149.
- [10] Yu M E. Study on the Hepatic microsomal EROD in *Sebastes marmoratus*-kinetic study, induction and monitoring [D]. Xiamen: Third Institute Oceanography, State Oceanic Administration of the People's Republic of China, 2003.
- [11] Forlin L. Effects of clophen A50, 3-methylcholanthrene, pregnenolone-16 α -carbonitril and phenobarbital on the hepatic

- microsomal cytochrome P-450-dependen monoxygenase system in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, of different age and sex. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1980, 54(3): 420-430.
- [12] Stegeman J J, Binder R L. High benzo[a] pyrene hydroxylase activity in the marine fish *stenotomus versicolor*. *Biochemical Pharmacology*, 1979, 28(10): 1686-1688
- [13] Andersson T, Pesonen M, Johansson C. Differential induction of cytochrome P-450-dependent monoxygenase, epoxide hydrolase, glutathione transferase and UDP glucuronosyl transferase activities in the liver of the rainbow trout by β -naphthoflavone on clophen A50. *Biochemical Pharmacology*, 1985, 34: 3309-3314.
- [14] Burke M D, Mayer R T. Ethoxyresorufin; direct fluorimetric assay of a microsomal O-dealkylation which is preferentially inducible by 3- methylcholanthrene. *Drug Metabolism and Disposition*, 1974, 2(6): 583-588.
- [15] Guo M L, Jiang Y M. Effect of ingredients of coomassie brilliant blue color-developing reagent on protein assay. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1996, 23(6): 558-561.
- [16] Huang Z G. *Marine Species and Their Distribution in China*. Beijing: Ocean press, 2008.
- [17] Wang J Y, Huo C L, Han G C, Li Y Q, Yan Q L. Induction of EROD activity in *Paralichthys olivaceus* by polychlorinated biphenyl CB- 28. *Acta Oceanologica Sinica*, 2003, 25(2): 35-40.
- [18] Lange U. Natürliche Variabilität des schadstoffinduzierbaren Cytochroms P450 1A in der Leber von Klieschen (*Limanda limanda* [L.]) aus der Nordsee [D]. Hamburg Reihe E: Berichte Zentr. Meeres- u. Klimaforsch, 1996.
- [19] Shanghai Ocean University, Xiamen University, Fisheries Research Institute of Fujian. *Marine Commercial Fishes in Fujian*. Fuzhou: Fujian Science and Technology Publishing House, 1980.
- [20] Du J Y. Ecological character and advance for cultivation and proliferation in *Sebastiscus marmoratus*. *Journal of Beijing Fisheries*, 2005, (6): 54-58.
- [21] Wu C W. Biological studies on *Sebastiscus marmoratus* off Zhoushan. *Journal of Zhejiang Ocean University: Natural Science*, 1999, 18(3): 185-190.
- [22] Wu C W, Wang Z Z, Wang W H, Lü Y L. Study on propagation-culture technique of scorpion fish *Sebastiscus marmoratus*. *Journal of Zhejiang Ocean University*, 1997, 16(3): 169-174.
- [23] Zheng R H, Zhang Y S, Chen Q F. A comparison of the hepatic microsomal EROD activity in three species of marine fish exposed to crude oil WSF. *Acta Oceanologica Sinica*, 2010, 32(5): 60-66.
- [24] Zhang Y S, Zheng R H, Chen Q F. A study on application of hepatic microsomal CYP1A biomarkers from *Sebastiscus marmoratus* to monitoring oil pollution in Xiamen waters. *Acta Ecologica Sinica*, 2011, 31(19): 5851-5859.
- [25] Yang F, Chen R Z, Xu X. Purification and enzyme-linked immunosorbent assay for red scorponifish (*Sebastiscus marmoratus*) metallothionein. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1996, 16(4): 469-474.
- [26] Liu R Z, Li R X, Zuo Z H, Chen Y X, Wang C G. Effect of water soluble fraction of 0# diesel oil on vitellogenin level in serum of female *Sebastiscus marmoratus*. *Journal of Xiamen University: Natural Science*, 2007, 46(6): 827-830.
- [27] Jia X P, Lin Q, Cai W G, Gan J L. Toxicity of crude oil and fuel oils to important mariculture and multiplication organisms of South China Sea. *Journal of Fisheries of China*, 2000, 24(1): 32-36.
- [28] Mu J L, Wang X H, Lin J Q, Lin X L, Hong H S. Effects of Benzo[a]pyrene exposure on hepatic GST activity in black porgy (*Sparus macrocephalus*) and variation relationships with hepatic metabolic enzymes and biliary metabolites. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, (4): 516-523.
- [29] Chen H G, Ma S W, Lin Q, Gan J L, Cai W G, Jia X P. Effects of tributyltin chloride (TBTCI) on SOD activities, MDA contents and GPx activities in gill and liver of the black porgy (*Sparus macrocephalus*). *South China Fisheries Science*, 2009, 5(2): 23-27.

参考文献:

- [10] 余铭恩. 褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) 肝微粒体细胞色素 P-450 加单氧酶的研究——动力学反应条件、诱导和监测 [D]. 厦门: 国家海洋局第三海洋研究所, 2003.
- [15] 郭敏亮, 姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响. *生物化学与生物物理进展*, 1996, 23(6): 558-561.
- [16] 黄宗国. *中国海洋生物种类于分布* (增订版). 北京: 海洋出版社, 2008.
- [17] 王菊英, 霍传林, 韩庚辰, 李月秋, 闫启仑. 多氯联苯 CB-28 对牙鲆肝脏中 EROD 活性的诱导作用研究. *海洋学报*, 2003, 25(2): 35-40.
- [19] 上海水产大学, 厦门大学, 福建水产研究所. *福建海洋经济鱼类*. 福州: 福建科学技术出版社, 1980.
- [20] 杜佳垠. 褐菖鲉生态学特点与增殖养殖进展. *北京水产*, 2005, (6): 54-58.
- [21] 吴常文. 浙江舟山近海褐菖鲉 *Sebastiscus marmoratus* 生物学研究. *浙江海洋学院学报: 自然科学版*, 1999, 18(3): 185-190.
- [22] 吴常文, 王志铮, 王伟洪, 吕永林. 褐菖鲉 *Sebastiscus marmoratus* 增殖养殖技术研究. *浙江水产学报*, 1997, 16(3): 169-174.
- [23] 郑榕辉, 张玉生, 陈清福. 原油 WSF 对三种海洋鱼类肝微粒体 EROD 活性的诱导和恢复的比较. *海洋学报*, 2010, 32(5): 60-66.
- [24] 张玉生, 郑榕辉, 陈清福. 褐菖鲉肝 CYP1A 作为生物标志物监测厦门海域石油污染状况. *生态学报*, 2011, 31(19): 5851-5859.
- [25] 杨丰, 陈荣忠, 徐洵. 褐菖鲉 (*Sebastiscus marmoratus*) 金属硫蛋白的分离提纯及免疫测定. *环境科学学报*, 1996, 16(4): 469-474.
- [26] 刘睿智, 李瑞霞, 左正宏, 陈奕欣, 王重刚. 0#柴油水溶性成分暴露对雌性褐菖鲉血浆卵黄蛋白原水平的影响. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2007, 46(6): 827-830.
- [27] 贾晓平, 林钦, 蔡文贵, 甘居利. 原油和燃油对南海重要海水增殖生物的急性毒性试验. *水产学报*, 2000, 24(1): 32-36.
- [28] 穆景利, 王新红, 林建清, 林小龙, 洪华生. 苯并[a]芘对黑鲷肝脏 GST 活性的影响及其与肝脏代谢酶和胆汁代谢产物之间的变化关系. *生态毒理学报*, 2009, (4): 516-523.
- [29] 陈海刚, 马胜伟, 林钦, 甘居利, 蔡文贵, 贾晓平. 氯化三丁基锡对黑鲷和肝组织 SOD、MDA 和 GPx 的影响. *南方水产*, 2009, 5(2): 23-27.