

鲫鱼肝脏微粒体 CYP450 同工酶对 多溴联苯醚胁迫的应答

瞿建宏¹, 陈家长^{1,2}, 孟顺龙¹, 聂凤琴², 吴 伟^{1,2}

(1.中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081;
2.南京农业大学渔业学院, 江苏 无锡 214081)

摘 要:以鲫鱼(*Carassius auratus* Linn.)为试验鱼类,研究了其暴露于不同浓度的 2,2',4,4'-四溴联苯醚(PBDE-47)和十溴联苯醚(PBDE-209)后鱼肝微粒体中 CYP450 同工酶活性的动态变化。结果表明,鲫鱼在 0.10~5.00 mg·L⁻¹ 的 PBDE-47 和 5.00~50.0 mg·L⁻¹ 的 PBDE-209 中暴露 15 d 后,其肝脏微粒体中 CYP450 系的同工酶 CYP1A1 被诱导,呈显著的剂量-效应关系。CYP1A1 的活性随着作用时间的延续而上升,到试验第 15 d 时达到最高,但上升速率最快的阶段为试验后的 0~5 d。而 CYP450 系的同工酶 CYP1A2 则表现出不同的特点,即低浓度 PBDEs 试验组对 CYP1A2 无显著影响($P>0.05$),但 5.00 mg·L⁻¹ PBDE-47、30.0 和 50.0 mg·L⁻¹ PBDE-209 浓度组的鱼肝微粒体 CYP1A2 活性受到了轻微的抑制,最大抑制率分别为 6.48%、3.48%和 7.23%。研究表明,鱼类肝脏微粒体中 CYP450 的同工酶可作为污染生物标志物来评价 PBDEs 的早期污染毒理效应。

关键词:多溴联苯醚;鲫鱼;肝脏;微粒体;细胞色素氧化酶 P450;同工酶

中图分类号:X503.225 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-2043(2009)10-2023-06

Responses of CYP450 Isoenzyme in Liver Microsome of *Carassius auratus* Linn. Under Polybrominated Diphenyl Ethers Stress

QU Jian-hong¹, CHEN Jia-zhang^{1,2}, MENG Shun-long¹, NIE Feng-qin², WU Wei^{1,2}

(1.Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences; Key Laboratory of Inland Fishery Eco-environment and Resource, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2.Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

Abstract: This article takes *Carassius auratus* Linn as an experimental subject and researches on its dynamic change of isoenzyme activity existing in CYP450 of liver microsome when *Carassius auratus* Linn is exposed under the different consistency of tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) and decabromodiphenyl ether (PBDE-209). The results show that the isoenzyme (CYP1A1) of CYP450 existing in the liver microsome is induced and has obvious dosage-effect relationship when *Carassius auratus* Linn is exposed under the PBDE-47 (0.10~5.00 mg·L⁻¹) and PBDE-209 (5.00~50.0 mg·L⁻¹) 15 days. The activity of CYP1A1 will rise with the perdurability, and this rise will reach apogee in the 15th day. However, the fastest rise speed will happen in 0~5 days after the experiment. Compared with this, the isoenzyme (CYP1A2) of CYP450 has different character that is experimental group named PBDEs with light concentration has no obvious influence on CYP1A2 ($P>0.05$), but the activity of CYP1A2 is inhibited gently under 5.00 mg·L⁻¹ PBDE-47, 30.0 mg·L⁻¹ and 50.0 mg·L⁻¹ PBDE-209. The maximum suppression ratio are 6.48%, 3.48% and 7.23%. The research result is that the isoenzyme of CYP450 existing in fish liver microsome can be taken as the better pollution-biomarkers to evaluate the toxicity effect of precontamination of PBDEs.

Keywords: polybrominated diphenyl ethers; *Carassius auratus*; liver; microsome; CYP450; isoenzyme

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PB-

DEs)属于溴系阻燃剂的一种,广泛地应用于电子、电器、化工、交通、建材、纺织、石油、采矿等领域^[1]。PBDEs 具有一定的挥发性,可随大气长距离迁移,且亲脂性强、化学性质稳定,可随食物链生物富集和放大,是一种新型的持久性有机污染物^[2]。自 1981 年首次在瑞典的梭鱼、鳎鲷和海鲢中检出后, PBDEs 已被发现在多种环境介质、人体和生物材料中存在,且含量呈逐年

收稿日期:2009-03-21

基金项目:中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金项目(2007JBFB02); 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室开放课题(YM2007-10)

作者简介:瞿建宏(1963—),女,副研究员,主要从事生态毒理学方面的研究。

通讯作者:吴 伟 E-mail:wuw@ffrc.cn; wuwhz@263.net

增加的趋势^[3]。PBDEs 已被认为是普遍存在的环境污染物,对其环境问题的研究成为当前环境科学的一大热点。迄今的研究结果发现,PBDEs 对生物体的神经系统、甲状腺、肝和肾的影响较为明显^[4-5]。在 PBDEs 中,2,2',4,4'-四溴联苯醚(PBDE-47)是分布最广、生物材料中含量最高、对生物和人体毒性最强的多溴联苯醚同系物之一^[6];而十溴联苯醚(PBDE-209)是国内产量最大的含溴阻燃剂。目前国内外学术界对不同分子量的多溴联苯醚的毒性研究主要集中在哺乳动物上^[2,4],且存在争议^[7-10],对鱼类的影响仅局限在组织残留方面^[3],对水生动物的生化影响研究较少,因此有必要进行这方面的研究。

细胞色素 P450(CYP450)同工酶是混合功能氧化酶系统的末端氧化酶,以铁原卟啉为辅基,是一种单链的 b 族细胞色素蛋白。因其具有血色素类似的结构,且其还原态与 CO 作用后,在 450 nm 处有一个吸收高峰而得名。CYP450 同工酶已存在了 350 万年,在细菌、真菌及动、植物中均可发现其存在^[11]。CYP450 以膜结合和可溶性 2 种形态存在于生物体内,主要分布于内质网、微粒体、线粒体上,也有的存在于液泡膜和质膜上。其反应活性严格地依赖于 NADPH-CYP450 还原酶这一电子供体,而 CYP450 还原酶通过 2 个辅基 FAD 和 FMN,从 NADPH 转移 2 个电子给不同的 CYP450 酶系。由 CYP450 与 NADPH-CYP450 还原酶组成的单加氧酶系能够催化多种内源、外源物在体内的氧化反应,使化学物质的活性或毒性发生变化^[12]。CYP450 对许多内源性和外源性的化学物质尤其是对环境有害化学物质存在氧化代谢作用,其种类、催化反应类型的多样性及底物的广谱性使其成为自然界中最具催化多样性的生物催化剂^[13]。在动物中,CYP450 主要参与大部分外源化学物的生物氧化作用,以及固醇类的生物合成、脂肪酸和类固醇激素等内源性底物的氧化代谢作用。它使进入机体的外源化学物经代谢后向代谢解毒和代谢活化两个方向发展。因此本研究通过水质接触染毒的方式考察了 PBDE-47 和 PBDE-209 对鲫鱼肝脏微粒体 CYP450 同工酶的影响,初步探讨了不同分子量的 PBDEs 对鱼类的生化毒理效应,为评价 PBDEs 的生态影响提供依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鲫鱼(*Carassius auratus* Linn.)由中国水产

科学研究院淡水渔业研究中心试验场提供,平均体长为(15.32±0.63)cm,平均体重为(310.60±5.69)g。试验前经筛选并在水族箱中驯养 10 d 以上,自然死亡率低于 1%,驯养期间每日定时投自制的颗粒饵料。试验用水为曝气 3 d 后除氯的自来水,pH 值为 7.02~7.25,总硬度为 8.02~8.15(德国度),水质溶氧量保持在 5 mg·L⁻¹ 以上,含 Zn 0.02 mg·L⁻¹,Fe 0.05 mg·L⁻¹,Pb、Cu 和 Cd 未检出。水质 COD 含量为 2.20~2.54 mg·L⁻¹,水温为(22±1)℃。试验前 1 d 开始禁食,选择活动性强的健康鲫鱼作为试验用鱼。

1.2 仪器与试剂

2,2',4,4'-四溴联苯醚(PBDE-47,分子式为 C₁₂H₆Br₄O)、十溴联苯醚(PBDE-209,分子式为 C₁₂Br₁₀O),SIGMA-ALDRICH 公司产品;CYP450 同工酶 CYP1A1 和 CYP1A2 活性荧光定量检测试剂盒为美国 GENMED SCIENTIFICS INC. 产品;考马斯亮蓝总蛋白试剂盒和标准蛋白为南京建成生物工程研究所产品;二甲亚砜(DMSO)、丙三醇等试剂为分析纯,均为上海化学试剂厂产品。

所用仪器为 EN61010-1 荧光分光光度计(VAR-1AN)、2-16 K 低温冷冻离心机(SIGMA)、HH.W21. Cu600 电热恒温水温箱(上海医疗器械七厂)、冰箱及冰槽、玻璃组织匀浆器、水族箱等。

1.3 试验设计

1.3.1 PBDE-47 和 PBDE-209 染毒浓度的选择

根据文献[14]的方法进行了 PBDE-47 和 PBDE-209 对鲫鱼的 96 h 急性毒性试验,得到 PBDE-47 和 PBDE-209 对鲫鱼 96 h LC₅₀ 值分别为 10.0 和 100.0 mg·L⁻¹。选择 1/2 96 h LC₅₀ 值及以下的浓度为染毒浓度(以保证试验期间鱼类基本存活),即 PBDE-47 分别为 0.10、0.50、1.00、2.00、5.00 mg·L⁻¹;PBDE-209 分别为 5.00、10.0、20.0、30.0、50.0 mg·L⁻¹。

1.3.2 鱼类的染毒方式

鱼类的染毒方式采用静态水质接触染毒。在水族箱中放入试验液 250 L,选择体质健壮的受试鱼 20 尾放入。试验分设空白对照组 1 个、试验浓度组 5 个,每组设 2 个平行。因 PBDE-47 和 PBDE-209 为疏水性物质,故采用 DMSO:丙三醇=70:30(W:W)的有机溶液作为溶剂^[15]。试验同时设溶剂对照组 1 个。试验期间每日吸污并更换试验液 10%。分别在染毒后的 0、5、10、15 d 取样,分析鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP450 同工酶的变化。

1.3.3 鱼类肝脏微粒体样品的获取

随机抽取健康试验鱼 3 条,用纱布擦干其体表

后,解剖取鱼类的肝脏并混合。取肝组织样(约 6 g)在 4 ℃ 的生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干后称重,放入 5~10 mL 的烧杯中。先向烧杯中用移液管取总量 2/3 并预冷(4 ℃)的匀浆介质(内含 0.01 mol·L⁻¹ 蔗糖,0.01 mol·L⁻¹ Tris-HCl,0.000 1 mol·L⁻¹ Na₂EDTA,0.14 mol·L⁻¹ NaCl,pH7.4)。其体积总量应是组织重量的 9 倍,用眼科剪刀尽快剪碎组织,倒入匀浆器中,再将剩余的 1/3 匀浆介质冲洗残留在烧杯中的组织,一并倒入匀浆器。在冰水浴中充分转动研磨,制成 10% 的组织匀浆液。匀浆悬液在 4 ℃ 用 13 500 r·min⁻¹ 离心 20~25 min,得到鲫鱼肝脏微粒体上清液。取上清液测定其 CYP450 同工酶的活性。

1.3.4 CYP450 同工酶活性的分析

采用活性荧光定量检测试剂盒测定鲫鱼肝脏微粒体中 CYP450 同工酶的活性,并用考马斯亮蓝总蛋白试剂盒和标准蛋白测定蛋白质含量,测试方法为比色法(操作按试剂盒说明书进行)。试验结果使用 SPSS 软件进行差异显著性分析, $P<0.05$ 表明差异显著, $P<0.01$ 表明差异极显著。

2 结果与讨论

2.1 PBDE-47 和 PBDE-209 胁迫下鲫鱼肝脏微粒体中 CYP1A1 的动态变化

采用不同浓度的 PBDE-47 和 PBDE-209 分别对鲫鱼进行水质接触连续暴露,在不同的试验时间采集试验鱼的肝脏提取微粒体,测定其 CYP450 酶系中的 CYP1A1 同工酶的活性,了解在不同浓度不同分子量的 PBDEs 作用下鲫鱼肝脏微粒体中 CYP1A1 的动态变化规律,结果见表 1。

由表 1 可见,在试验的 15 d 内,空白对照组和溶剂对照组鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性维持在 0.85~0.87 pmol·min⁻¹·mg⁻¹ prot 范围内,表明在一定的试验条件下鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性基本稳定,试验所用的溶剂对 CYP1A1 无影响。表 1 数据显示,除了 0.10 mg·L⁻¹ PBDE-47 试验组和 5.00 mg·L⁻¹ PBDE-209 试验组与空白对照无差异($P>0.05$)外,其他各试验组鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性呈明显的上升趋势。在 PBDE-47 作用下,鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性随着作用时间的延续而递增,第 15 d 时的活性最高,此时鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性分别上升了 83.72%~211.63%,呈现显著的剂量-效应关系。不同作用时间下 PBDE-47 的浓度与受试鲫鱼肝脏微粒体中的

表 1 PBDEs 胁迫下鲫鱼肝脏微粒体中 CYP1A1 酶的动态变化
Table 1 Dynamic changes of CYP1A1 in liver microsome of *Carassius auratus* Linn. under the stress of PBDEs

受试物	浓度/ mg·L ⁻¹	CYP1A1 酶的活性/pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ prot			
		0 d	5 d	10 d	15 d
PBDE-47	0.10	0.85±0.02	0.87±0.06	0.86±0.03	0.87±0.06
	0.50	0.85±0.03	1.25±0.12 ^a	1.46±0.13 ^b	1.58±0.16 ^b
	1.00	0.86±0.03	1.42±0.09 ^b	1.60±0.15 ^b	1.80±0.18 ^b
	2.00	0.86±0.03	1.58±0.14 ^b	1.92±0.11 ^b	2.12±0.17 ^b
	5.00	0.85±0.03	1.90±0.11 ^b	2.45±0.07 ^b	2.68±0.16 ^b
PBDE-209	5.00	0.87±0.06	0.88±0.05	0.87±0.06	0.87±0.06
	10.0	0.86±0.03	0.89±0.08	1.10±0.04 ^a	1.15±0.02 ^a
	20.0	0.85±0.02	1.18±0.09 ^a	1.36±0.16 ^b	1.43±0.16 ^b
	30.0	0.86±0.02	1.32±0.10 ^a	1.57±0.15 ^b	1.66±0.14 ^b
	50.0	0.87±0.06	1.44±0.15 ^b	1.75±0.13 ^b	1.87±0.13 ^b
空白对照 CK ₀	0	0.85±0.02	0.86±0.03	0.85±0.02	0.86±0.03
溶剂对照 CK ₁	10 000	0.87±0.04	0.87±0.04	0.86±0.03	0.87±0.04

注:与对照组相比,a: $P<0.05$,b: $P<0.01$ 。

CYP1A1 的活性呈显著正相关,相关方程分别为:

$$y_{(5d)}=0.175\ 7x+1.102, r_{(5d)}=0.902\ 6$$

$$y_{(10d)}=0.274\ 6x+1.186, r_{(10d)}=0.920\ 9$$

$$y_{(15d)}=0.308\ 2x+1.278, r_{(15d)}=0.901\ 3$$

式中: y 为鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性,pmol·min⁻¹·mg⁻¹ prot; x 为水中 PBDE-47 的浓度,mg·L⁻¹; r 为相关系数,样本数 $n=10$ 。

表 1 数据同时显示,在 PBDE-209 作用下,鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 活性的动态变化与 PBDE-47 作用下相似,即随着作用时间的延续而渐增,到 15 d 时鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性分别上升了 33.72%~117.44%,呈现显著的剂量-效应关系。不同作用时间下 PBDE-209 的浓度与受试鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性呈显著正相关,相关方程分别为:

$$y'_{(5d)}=0.013\ 5x'+0.829\ 5, r'_{(5d)}=0.951\ 3$$

$$y'_{(10d)}=0.019\ 0x'+0.890\ 6, r'_{(10d)}=0.954\ 2$$

$$y'_{(15d)}=0.021\ 4x'+0.902\ 0, r'_{(15d)}=0.953\ 0$$

式中: y' 为鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 的活性,pmol·min⁻¹·mg⁻¹ prot; x' 为水中 PBDE-209 的浓度,mg·L⁻¹; r' 为相关系数,样本数 $n=10$ 。

相比而言,PBDE-47 对 CYP1A1 的诱导程度较 PBDE-209 更高,这可能与分子量有关,分子量小的 PBDEs 更易弥散进入细胞。

CYP1A1 是 CYP450 亚酶 1A1, 又称芳香族碳氢化合物加羟基酶 (aryl hydrocarbon hydroxylase, AHH)

是肝细胞微粒体复合功能氧化酶系统的成员之一。CYP1A1 有 3 个亚型 M1、M2、M3,其作用在于体内外源化合物,包括药物、致癌剂、化学污染物的氧化代谢,即单加氧化作用和羟化作用。芳香族碳氢化合物诱导 CYP1A1 的表达。乙氧基异酚噻唑脱乙基酶(7-ethoxyresorufin O-deacylase;EROD)的活性是 CYP1A1 的诊断标记,CYP1A1 的活性是基于 EROD 的选择性催化活力来表现的。乙氧基异酚噻唑(7-ethoxyresorufin)在乙氧基异酚噻唑脱乙基酶的催化下,转化为羟基异酚噻唑酮后荧光峰值发生了变化(激发波长 530 nm,散发波长 590 nm),由此来定量测定 CYP1A1 的活性。乙氧基异酚噻唑脱乙基酶反应系统为:

7-ethoxyresorufin + NADPH $\xrightarrow{\text{乙氧基异酚噻唑脱乙基酶}}$ 羟基异酚噻唑酮(resorufin) + NADP⁺

CYP1A1 属 CYP450 系同工酶中的一族。CYP450 是一类参与内/外源性化合物代谢的酶,属于混合功能氧化酶系统中的一种。肝脏 CYP450 酶系统的主要作用是催化外源性化合物的代谢,经过此酶的作用,大部分化合物发生生物转化,可由疏水性强的形式转变成成为亲水性和极性更强的化合物,易被排泄。不同类型的 CYP450 同工酶对不同种类的外源性化合物有明显的特异性代谢作用。CYP1A1 是一种芳香基碳氢化合物羟化酶,在正常肝、肺组织内浓度很低,但其可被外源性化合物诱导,其诱导机制主要是诱导剂弥散进入肝细胞内并与细胞内的载体蛋白结合,然后再进入细胞核内影响 DNA,刺激 mRNA 的转录,从而使粗面内质网内 CYP450 增强^[16]。表 1 的结果表明,不同分子量的 PBDEs 均可诱导鱼肝脏 CYP1A1 的产生。

但这种诱导作用并非是无休止的。由表 1 可见,当鲫鱼暴露于 PBDEs 的 15 d 试验内,鲫鱼肝脏微粒体 CYP1A1 的活性是随着时间而上升。虽然在试验 15 d 时 CYP1A1 的活性最高,但其上升速率最快的阶段是在试验后的 0~5 d 间。以 5.00 mg·L⁻¹ PBDE-47 试验组为例,在 0~5 d、5~10 d 和 10~15 d 间,鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A1 活性的上升速率分别为 0.206、0.110 和 0.046 pmol·min⁻¹·mg⁻¹ prot·d⁻¹。由此可见,PBDEs 对鲫鱼肝脏微粒体 CYP1A1 的影响主要在接触后的 0~5 d 内,属于急性毒理效应,这可视为鱼类机体对抗外源性化学污染物的一种应激代偿机制。CYP1A1 的诱导,可加速 PBDEs 的代谢。但长时间的暴露试验,会损伤鱼类的 CYP1A1 系统的诱导性。随着暴露时间的推移,PBDEs 在鱼体中的累积量增加,

其对鱼类肝细胞和各种酶的毒性开始表现,从而影响了 CYP1A1 的诱导。

2.2 PBDE-47 和 PBDE-209 胁迫下鲫鱼肝脏微粒体中 CYP1A2 的动态变化

采用不同浓度的 PBDE-47 和 PBDE-209 分别对鲫鱼进行水质接触连续暴露,在不同的试验时间采集试验鱼的肝脏提取微粒体,测定其 CYP450 酶系中的 CYP1A2 同工酶的活性,了解在不同浓度不同分子量的 PBDEs 作用下鲫鱼肝脏微粒体中 CYP1A2 的动态变化规律,结果见表 2。

由表 2 可见,在试验的 15 d 内,空白对照组和溶剂对照组鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A2 的活性维持在 4.01~4.08 pmol·min⁻¹·mg⁻¹ prot 范围内,表明在一定的试验条件下鲫鱼肝脏微粒体中的 CYP1A2 的活性基本稳定,试验所用的溶剂对 CYP1A2 无影响。表 2 数据显示,在 15 d 的试验中,在不同浓度的 PBDE-47 试验组中,0.10~2.00 mg·L⁻¹ 各浓度处理组与对照组相比差异不显著($P>0.05$),表明其对 CYP1A2 酶的活性无影响。在 5.00 mg·L⁻¹ 浓度组 PBDE-47 中暴露后,鲫鱼肝脏微粒体 CYP1A2 的活力与对照组相比有一定的变化,第 5 d 时下降了 3.70%,第 10 d 时下降了 5.21%,第 15 d 时下降了 6.48%。试验结果表明,只有在较高染毒浓度下,PBDE-47 才对 CYP1A2 有一些轻微的抑制作用,且这种抑制作用随着作用时间的推移而略有增强。同样,5.00~20.0 mg·L⁻¹ 的 PBDE-209

表 2 PBDEs 胁迫下鲫鱼肝脏微粒体中 CYP1A2 酶的动态变化

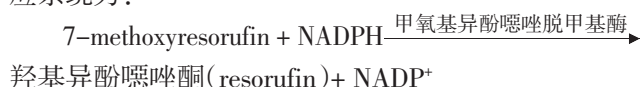
Table 2 Dynamic changes of CYP1A2 in liver microsome of *Carassius auratus* Linn. under the stress of PBDEs

处理	浓度/ mg·L ⁻¹	CYP1A2 酶的活性/(pmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹ prot)			
		0 d	5 d	10 d	15 d
PBDE-47	0.10	4.02±0.05	4.08±0.12	4.09±0.09	4.08±0.02
	0.50	4.04±0.03	4.06±0.10	4.08±0.11	4.10±0.09
	1.00	4.05±0.09	4.08±0.12	4.05±0.10	4.06±0.10
	2.00	4.02±0.11	4.08±0.12	4.12±0.09	4.10±0.12
	5.00	4.06±0.10	3.90±0.10	3.82±0.10	3.75±0.12a
PBDE-209	5.00	4.08±0.09	4.06±0.11	4.07±0.11	4.02±0.06
	10.0	4.02±0.05	4.08±0.10	4.02±0.06	4.00±0.03
	20.0	4.08±0.08	4.05±0.08	4.03±0.08	4.02±0.09
	30.0	4.05±0.10	4.02±0.10	3.98±0.11	3.87±0.08
	50.0	4.03±0.09	3.98±0.06	3.85±0.15	3.72±0.09a
空白对照 CK ₀	0	4.02±0.11	4.05±0.09	4.03±0.08	4.01±0.05
溶剂对照 CK ₁	10 000	4.08±0.02	4.03±0.03	4.08±0.02	4.08±0.02

注:与对照组相比,a: $P<0.05$;b: $P<0.01$ 。

试验组与对照组相比差异不显著($P>0.05$),表明其对 CYP1A2 酶的活性无影响。而 30.0 和 50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-209 试验组在 15 d 内对 CYP1A2 也有轻微的抑制作用,抑制率分别为 1.23%~3.48% 和 1.73%~7.23%。

CYP1A2 是 CYP450 亚酶 1A2,是肝细胞微粒体复合功能氧化酶系统的成员之一,也是芳香族碳氢化合物加羟基酶(AHH)的成员之一。CYP1A2 为单氧化酶,主要在动物的肝脏中表达,在肝脏中占 P450 的 15%左右^[16]。在动物的肝脏中,CYP1A2 与 CYP1A1 高度同源,特别是在外显子 2、4、5 和 6。但表达量比 CYP1A1 高,且几乎不存在于肝脏以外的其他组织中。CYP1A2 有多个多态性变体,最常见的是 1A 与 1F,与咖啡因代谢和迟发性皮肤卟啉症有关。CYP1A2 的作用在于体内外源化合物,包括药物、致癌剂、化学污染物的氧化代谢,即单加氧化作用和羟化作用,以及脂类合成包括胆固醇和类固醇。芳香族碳氢化合物诱导 CYP1A2 的表达。CYP1A2 能够选择性地使 7-甲氧基异酚噻唑(7-methoxyresorufin, 7-MR)脱甲基,故甲氧基异酚噻唑脱甲基酶(7-methoxyresorufin O-demethylase, MROD)的活性是 CYP1A2 的诊断标记, CYP1A2 的活性是基于 MROD 的选择性催化活力来表现的。甲氧基异酚噻唑在甲氧基异酚噻唑脱甲基酶的催化下,转化为羟基异酚噻唑酮后荧光峰值发生了变化(激发波长 530 nm, 散发波长 590 nm),由此来定量测定 CYP1A2 的活性。甲氧基异酚噻唑脱甲基酶反应系统为:



CYP1A2 的生物标志还有乙酰替苯胺-4-羟化酶和雌二醇羟化酶^[4]。CYP1A2 是肝细胞中多种 POP_s 污染物的结合蛋白,故研究 PBDEs 与 CYP1A2 的相互作用倾向具有潜在的毒理学意义,因为这种结合可能会阻碍 CYP1A2 对外来化学物的代谢,使得某些进入机体的外来污染物毒性增强或减弱,并可能导致一些激素代谢的紊乱。这一切还有待于进一步研究探讨。

通过试验可以发现,2 种不同分子量的 PBDEs (低分子量的 PBDE-47 和高分子量的 PBDE-209)均可诱导鲫鱼肝脏微粒体 CYP450 酶系的 CYP1A1 同工酶,CYP1A1 是其在鱼体中的氧化代谢的主要通路。但 PBDEs 对鲫鱼肝脏微粒体 CYP450 酶系的 CYP1A2 同工酶的影响较轻微,仅在较高浓度下对酶的活性略有抑制。作者对 PBDEs 的持续研究发现,

PBDEs 对试验鱼类具有氧化损伤作用,包括细胞脂质过氧化和 DNA 氧化,如可引起细胞 SOD、CAT、GST 等抗氧化酶活力的下降,导致氧化损伤产物 MDA 等在细胞中累积,并引起 DNA 损伤产物 8-OHdG 和 P53 表达的增加等(另文报导)。因此,PBDEs 胁迫下鱼类所表现出的氧化应激、DNA 损伤和环境激素效应可能与经 CYP1A 酶代谢活化有关,但本文仅为初步探讨,对其代谢机制有待进一步研究。

3 结论

(1)鲫鱼在 0.10~5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 和 5.00~50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBDE-209 中暴露 15 d 后,其肝脏微粒体中 CYP450 系的同工酶 CYP1A1 被诱导,呈显著的剂量-效应关系。CYP1A1 的活性随着作用时间的延续而上升,到试验第 15 d 时达到最高,但上升速率最快在试验后的 0~5 d 内。鱼类肝脏微粒体中 CYP1A1 可作为污染生物标志物来评价 PBDEs 的早期污染毒理效应。

(2)鲫鱼在 0.10~5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBDE-47 和 5.00~50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PBDE-209 中暴露 15 d 后,其肝脏微粒体中 CYP450 系的同工酶 CYP1A2 表现出不同的特点,即低浓度 PBDEs 试验组与对照组无明显差异($P>0.05$)。但 5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-47、30.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 50.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ PBDE-209 浓度组的鱼肝微粒体 CYP1A2 活性受到了轻微的抑制,最大抑制率分别为 6.48%、3.48% 和 7.23%。

参考文献:

- [1] 刘汉霞,张庆华,江桂斌,等.多溴联苯醚及其环境问题[J].化学进展,2005,17(3):554-562.
LIU Han-xia, ZHANG Qing-hua, JIANG Gui-bin, et al. Polybrominated diphenyl ethers and its related environmental problems[J]. *Progress in Chemistry*, 2005, 17(3):554-562.
- [2] 魏爱雪,王学彤,徐晓白.环境中多溴联苯醚 PDBES 类化合物污染研究[J].化学进展,2006,18(9):1227-1233.
WEI Ai-xue, WANG Xue-tong, XU Xiao-bai. The pollution research aspect on poly-brominated diphenyl esters(PBDEs) compounds in environment[J]. *Progress in Chemistry*, 2006, 18(9):1227-1233.
- [3] Hites R A. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: a meta-analysis of concentration[J]. *Environmental Science Technology*, 2004, 38(4):945-956.
- [4] 聂芳红,陈进军, Bunce Nigel. 多溴联苯醚对大鼠肝细胞 CYP1A2 依赖性 MROD 活性的影响[J].中国农学通报,2005,21(12):11-13.
NIE Fang-hong, CHEN Jin-jun, Nigel B. MROD analysis of competitive inhibition from polybrominated diphenyl ethers to CYP1A2 in rat hepatocytic microsomes [J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2005, 21

- (12):11-13.
- [5] 何平, 何卫红, 王爱国, 等. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚对 SH-SY5Y 细胞氧化应激与 DNA 损伤的影响[J]. 卫生研究, 2007, 36(3):266-268.
- HE Ping, HE Wei-hong, WANG Ai-guo, et al. Effects of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ethers on oxidative stress and DNA damage in SH-SY5Y cells[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2007, 36(3):266-268.
- [6] 孙福红, 周启星. 多溴二苯醚的环境暴露与生态毒理研究进展[J]. 应用生态学报, 2005, 16(2):379-384.
- SUN Fu-hong, ZHOU Qi-xing. Research advance on environmental exposure and ecotoxicological effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs)[J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2005, 16(2):379-384.
- [7] Fair P, Mitchum G, Hulseley T, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in blubber of free-ranging bottlenose dolphins (*Tursiops Truncatus*) from two Southeast Atlantic Estuarine Areas[J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2007, 53(3):483-494.
- [8] Schantz M, Keller J, Leigh S, et al. Certification of SRM 1589a PCBs, pesticides, PBDEs, and dioxins/furans in human serum [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2007, 389(4):1201-1208.
- [9] HU X Z, XU Y, HU D C, et al. Apoptosis induction on human hepatoma cells Hep G2 of decabrominated diphenyl ether (PBDE-209)[J]. *Toxicology Letters*, 2007, 171(1/2):19-28.
- [10] Liu S S. Generating, partitioning, targeting and functioning of superoxide in mitochondria[J]. *Bioscience Reports Review*, 1997, 17(3):259-271.
- [11] 李晓宇, 刘皋林. CYP450 酶特性及其应用研究进展[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2008, 13(8):942-946.
- LI Xiao-yu, LIU Gao-lin. Research advance on the characteristics and application of CYP450 metabolic enzymes[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*, 2008, 13(8):942-946.
- [12] 王国萍, 许敏, 张鹏, 等. 细胞色素 P4501A1 基因多态与肾癌遗传易感性的关系[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29(8):971-974.
- WANG Guo-ping, XU Min, ZHANG Peng, et al. Relationship between CYP1A1 gene single nucleotide polymorphism and genetic susceptibility of renal cancer[J]. *Academic Journal of Second Military Medical University*, 2008, 29(8):971-974.
- [13] 高雅丽. 细胞色素 P450 与肿瘤[J]. 中国癌症杂志, 2009, 19(1):60-64.
- GAO Ya-li. Cytochrome P450 and tumor[J]. *China Oncology*, 2009, 19(1):60-64.
- [14] 程树培. 环境生物技术实验指南[M]. 南京: 南京大学出版社, 1995:177-243.
- CHENG Shu-pei. Laboratory guidances of environmental Biotechnology[M]. Nanjing: Nanjing University Press, 1995:177-243.
- [15] 王连生, 韩朔睽. 有机污染化学进展[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998:96-117.
- WANG Lian-sheng, HAN Shuo-kui. Advances in chemistry of organic pollutants[M]. Beijing: Chemical Industry Press, 1998:96-117.
- [16] Malin Celander, Lars Forlin. Decreased responsiveness of the hepatic cytochrome P4501A1 system in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after prolonged exposure to PCB[J]. *Aquatic Toxicology*, 1995, 33:141-153.