

# 利用固定波长荧光分光光度法研究苯并(a)芘暴露下罗非鱼胆汁代谢物的动态变化

宋超<sup>1</sup>, 裘丽萍<sup>1</sup>, 范立民<sup>1</sup>, 孟顺龙<sup>1</sup>, 贾旭淑<sup>2</sup>, 胡庚东<sup>1</sup>, 陈家长<sup>1,2\*</sup>

(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和资源重点开放实验室, 江苏 无锡 214081; 2. 南京农业大学无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081)

**摘要:**利用固定波长荧光分光光度法(Fixed-wavelength fluorescence, 简称FF法)研究了苯并(a)芘暴露下罗非鱼胆汁代谢物的动态变化。在试验中首先优化了FF法测定罗非鱼胆汁代谢物的稀释倍数, 将罗非鱼胆汁分别稀释1000、2000、4000、8000倍, 在激发/散发波长380 nm/430 nm测定荧光强度。结果显示2000倍左右的稀释较为合理, 结合其他研究, 试验最终采用1600倍的稀释倍数。在此基础上利用优化后的FF法研究了不同浓度的BaP(0.1、1、10、50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )暴露下罗非鱼胆汁代谢物的动态变化。结果显示: 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组的BaP代谢物随时间变化无明显波动, 与对照组无显著差异( $P>0.05$ ); 其他3个剂量组从2 h起就与对照组差异显著( $P<0.05$ ), 3个试验组均呈现先上升后下降的趋势。胆汁中BaP代谢物随浓度升高不断升高, 呈现明显的剂量-效应关系, 表明鱼体内胆汁代谢物可用来反映周围水环境中BaP的污染情况。这为将FF法应用于环境中BaP的生物监测, 使胆汁代谢物成为BaP环境监测的有效生物标志物提供了理论依据。

**关键词:** 苯并(a)芘; 胆汁代谢物; 固定波长荧光分光光度法; 生物标志物

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)04-0783-05 doi:10.11654/jaes.2014.04.024

## Dynamics of Benzo(a) Pyrene Metabolites in Tilapia Bile by Fixed Wavelength Fluorescence to: A Lab Experiment

SONG Chao<sup>1</sup>, QIU Li-ping<sup>1</sup>, FAN Li-min<sup>1</sup>, MENG Shun-long<sup>1</sup>, JIA Xu-shu<sup>2</sup>, HU Geng-dong<sup>1</sup>, CHEN Jia-zhang<sup>1,2\*</sup>

(1. Key Open Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China; 2. Wuxi Fishery College, Nanjing Agriculture University, Wuxi 214081, China)

**Abstract:** Biomarker plays an important role in environmental pollution monitoring. Here dynamics of benzo(a)pyrene (BaP) metabolites in tilapia bile were monitored under artificial exposure using fixed-wavelength fluorescence method (FF). Dilution rate of tilapia bile for the FF method was first developed by diluting bile at 1:1000, 1:2000, 1:4000, and 1:8000 and setting excitation/emission wavelength of spectrofluorophotometer at 380 nm/430 nm. Dilution rate at 2000-fold was found to be reasonable. Combined with other studies, 1600-fold dilution was selected in the present experiment to examine the dose and time effects on dynamics of BaP metabolites in bile (0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ). At 0.1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , BaP metabolites neither showed obvious fluctuation nor had significantly differences from the control group ( $P>0.05$ ). However, significant differences were observed between BaP metabolites at the other three doses and the control, beginning from 2 h ( $P<0.05$ ). The fluorescence intensity showed "rise then fall" trend at concentrations of 1  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , 10  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , and 50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . The metabolites of BaP in bile had a significant dose-response relationship. These results demonstrate that BaP dynamics in tilapia bile are certainly sensitive biomarkers to assess fish exposure to BaP and FF method can be widely used in the environment monitoring.

**Keywords:** benzo(a)pyrene; bile metabolite; fixed-wavelength fluorescence; biomarker

收稿日期: 2013-08-06

基金项目: 国家现代农业产业技术体系项目(CARS-49); 中央级公益性科研院所基本科研业务费专项资金(2011JBFA16)

作者简介: 宋超(1985—), 男, 助理研究员, 博士研究生, 从事渔业生态环境方面的研究工作。E-mail: songc@ffrc.cn

\* 通信作者: 陈家长 E-mail: chenjz@ffrc.cn

多环芳烃 (Polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs) 是指由 2 个或 2 个以上苯环以稠环方式相连的化合物, 具有致癌、致突变作用<sup>[1]</sup>, 可通过工业废水的排放、大气沉降、表面径流、土壤浸析等方式进入水环境<sup>[2]</sup>。PAHs 主要在鱼类肝脏中经由多功能氧化酶 (如细胞色素 P450) 催化的 I 相反应和由谷胱甘肽转移酶 (Glutathione S-transferase, GST) 等酶催化的 II 相反应后, 其代谢产物储存在胆囊的胆汁中, 胆汁在鱼类进食后被排入肠道, 由于肠道内特殊的 pH 环境, 多环芳烃代谢物水解为更加疏水的物质, 从而被肠道再次吸收, 并通过门静脉直接运输到肝脏, 至此肝肠循环形成<sup>[3]</sup>。多环芳烃代谢物由于肝肠循环作用可在鱼类胆囊内停留较长时间, 因此胆汁中多环芳烃代谢物成为多环芳烃监测中广泛使用的生物标志物。苯并(a)芘 [Benzo(a)pyrene, 简称 BaP] 是一种含有 5 个苯环的多环芳烃, 随着我国工业化和城市化的发展, 越来越多的苯并(a)芘进入水体中, 部分水体苯并(a)芘污染严重, 已经引起广泛重视<sup>[7-8]</sup>, 水环境中苯并(a)芘的监测也成为人们普遍关注的问题。

芳烃类物质的荧光特性使得利用固定波长荧光分光光度法 (Fixed wavelength fluorescence, 简称 FF 法) 测定胆汁中的 PAHs 代谢物成为可能<sup>[4]</sup>。该方法由 Lin 等<sup>[5]</sup>首先提出并加以完善, 与传统的 HPLC-F 法相比, FF 法具有速度快、成本低等优点, 并且两个方法所测结果之间的相关性很好, 得到的均值也相似。此法作为一种半定量的检测方法, 可成为环境评估终点常规检测方法, 也可作为鱼类 PAHs 生物监测的生物标志物之一<sup>[5-6]</sup>。

本研究通过生态毒理学试验, 利用 FF 法研究罗非鱼暴露苯并(a)芘后胆汁中 BaP 代谢物随暴露时间和暴露浓度的变化, 为 BaP 在罗非鱼体内转化机制及 FF 法在 BaP 环境监测中的应用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

试验所用的试剂有苯并(a)芘 (纯度 ≥ 96%), 购自 Sigma-Aldrich 公司; 甲醇 (色谱级), 购自上海科丰化学试剂有限公司。试验所用到的仪器主要有荧光分光光度计 (型号 Varian Cary Eclipse)。

### 1.2 试验鱼类及饲养条件

试验鱼类为罗非鱼 (GIFT *Oreochromis niloticus*), 购自中国水产科学研究院淡水渔业研究中心宜兴养殖基地, 体长为 (14.05 ± 1.25) cm, 体重为 (46.3 ± 3.2) g。

罗非鱼在实验室暂养两周以上, 暂养期间, 每日定时、定量投喂商品化饲料。在正式试验开始前一周, 停止喂食, 选取规格一致、健康活泼的鱼类进行试验。

试验用水为曝气一周的自来水, 水温 (24 ± 1) °C, pH 6.85~7.05, 总硬度为 7.85~8.10 (德国度), 水质溶解氧保持在 5 mg · L<sup>-1</sup> 以上, COD 含量为 2.25~2.45 mg · L<sup>-1</sup>。水中含有 Fe 0.05 mg · L<sup>-1</sup>、Zn 0.02 mg · L<sup>-1</sup>、Pb、Cu 和 Cd 均未检出, 符合渔业水质标准 (GB 11607—1989)。

### 1.3 染毒方案

BaP 先用丙酮按 1:1 (mg:cm<sup>3</sup>) 比例配成储备液, 避光保存。4 个浓度组分别为 0.1、1、10、50 μg · L<sup>-1</sup>, 同时设置空白对照组及丙酮溶剂对照组, 每组设两个平行。试验进行 14 d, 每日换水 1/2, 并将 BaP 浓度组及丙酮对照组补充至原浓度, 各浓度处理组及对照组分别在染毒后的 2 h、6 h、12 h、48 h、4 d、7 d、14 d 采集鱼的胆汁, 每次每个浓度组取鱼 5 条。

### 1.4 FF 法测定胆汁中 BaP 代谢物

#### 1.4.1 FF 法的建立

选择未经暴露的 15 尾罗非鱼, 分别用 50% 的甲醇将其胆汁稀释 1000、2000、4000、8000 倍, 将荧光分光光度计的激发波长/散发波长设置为 380 nm/430 nm, 用来检测胆汁代谢物中五环 PAH 代谢物 (BaP 为五环的多环芳烃) 的荧光强度<sup>[5]</sup>, 并计算荧光比率 (Fluorescence ratio, FR), 以稀释 2000 倍为例。若荧光比率为 1, 则可假定没有内滤效应的影响。

$$FR_{2000} = \frac{FF_{2000} \times 2}{FF_{1000}}$$

#### 1.4.2 FF 法测定胆汁代谢物

调整荧光分光光度计激发波长/散发波长为 380 nm/430 nm。50% 的甲醇将胆汁样品稀释 1600 倍后用荧光分光光度计进行检测。

### 1.5 统计分析

数据以平均值 ± 标准差的形式表示, 变异系数 = 标准差/平均值。数据统计分析用 SPSS 13.0。显著性水平取 α = 0.05。

## 2 结果

### 2.1 FF 法的优化

图 1、图 2 分别为不同稀释倍数的荧光比率及 4 个稀释倍数中荧光强度的变异系数。FR<sub>2000</sub>、FR<sub>4000</sub>、FR<sub>8000</sub> 分别为 0.993、0.989 及 1.102, 与 1 相比没有显著性差异 (P > 0.05); 变异系数分别为 0.37、0.34、0.40

及0.45。随稀释倍数增大,荧光比率和荧光强度的变异系数均增加。综合荧光比率和变异系数这两方面的因素,胆汁的稀释倍数不宜超过2000倍。

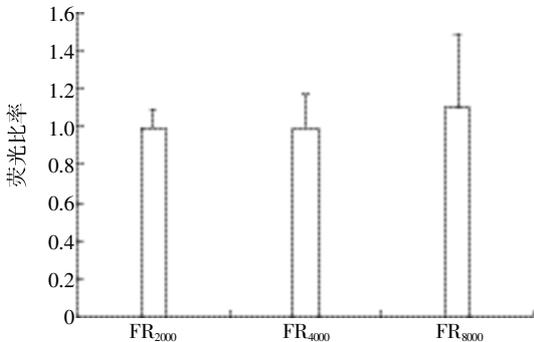


图1 不同稀释倍数的荧光比率

Figure 1 Fluorescence ratios at different dilution rates

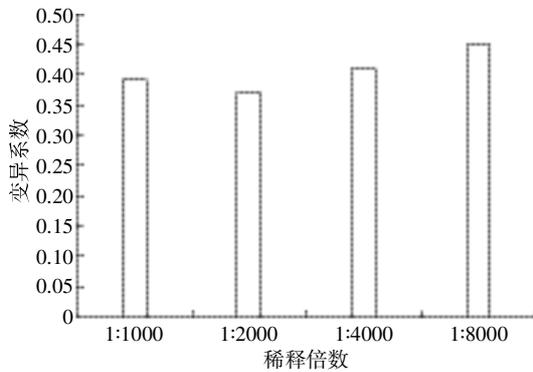
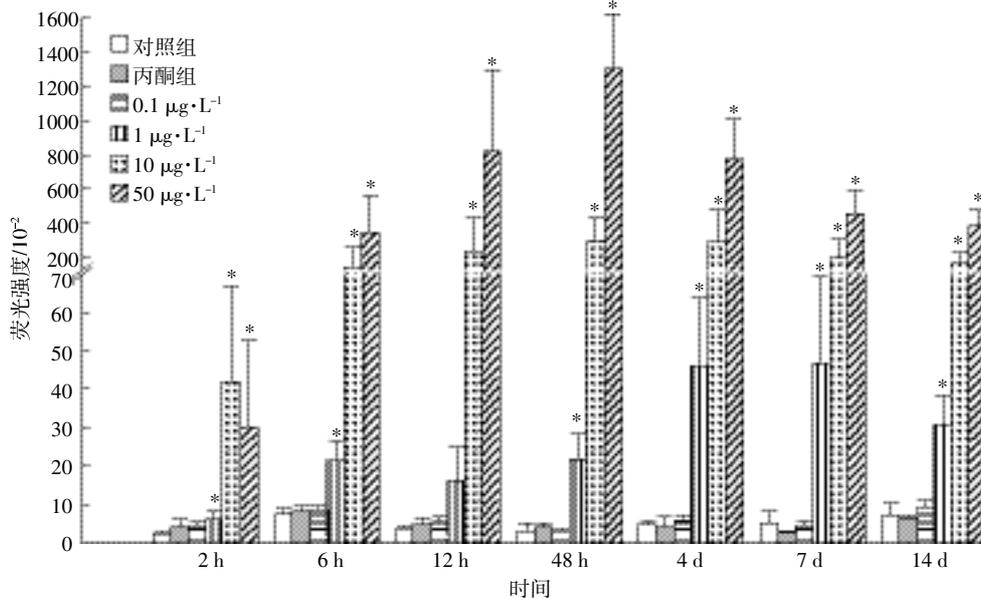


图2 不同稀释倍数的变异系数

Figure 2 Variation at different dilution rates



\*表示与对照组在  $P < 0.05$  水平上差异显著

图3 罗非鱼胆汁中 BaP 代谢物的荧光强度随时间的变化

Figure 3 Time-responses of  $FF_{380/430}$  levels of BaP metabolites in tilapia bile exposed to benzo(a) pyrene

## 2.2 罗非鱼胆汁 BaP 代谢物荧光强度与 BaP 暴露浓度的时间-效应及剂量-效应关系

图3为4个浓度组罗非鱼胆汁中 BaP 代谢物随时间的变化。对照组、丙酮对照组及  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组胆汁中 BaP 代谢物的荧光强度随暴露时间的延长没有明显波动。其他3个剂量组则在2 h 起就与对照组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 这3个浓度组均呈现先上升后下降的趋势, 但各组开始下降的时间不同。  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组在48 h 后开始下降, 而  $1, 10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组并未出现一个明显的峰值, 也分别在7 d 和4 d 后下降。  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组上升和下降的速度最快,  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组上升和下降速度较为缓慢。

胆汁中 BaP 代谢物的荧光强度随暴露浓度的增加而增加, 且在各个采样时间均具有显著相关性。表1为在各采样时间 BaP 代谢物与暴露浓度的相关系数。

## 3 讨论

### 3.1 内滤效应

使用 FF 检测胆汁中 PAHs 代谢物有其限制因

表1 胆汁中 BaP 代谢物荧光强度与暴露浓度的相关系数  
Table 1 Correlation coefficients of fluorescence intensity of BaP metabolites with exposure concentrations

采样时间	2 h	6 h	12 h	48 h	4 d	7 d	14 d
相关系数	0.495*	0.797*	0.827*	0.952*	0.920*	0.950*	0.941*

注: \*表示在0.05水平下显著相关。

素,内滤效应是其中之一。所谓内滤效应是指在浓度较高的胆汁中,一些物质对激发光或者散发的吸收而造成荧光信号的降低<sup>[9]</sup>。Aas 等<sup>[10]</sup>对鳕鱼胆汁进行不同浓度的稀释后用 FF 法检测以研究胆汁浓度和荧光强度之间的关系,结果显示浓度最高的胆汁样品内滤效应最大,且荧光强度曲线的线性部分在 1000~2000 倍之间。虽然高稀释倍数可降低内滤效应的影响,但稀释倍数过高反而会增加试验结果的变异系数,影响检测的灵敏度<sup>[11]</sup>。综合这两方面的因素,本试验采用 1600 倍的稀释倍数。

此外,胆汁浓度与试验动物的品种、喂养条件等有很大关系。Brumley 等<sup>[12]</sup>以 Sand flathead 为试验动物,研究不同喂食条件下胆汁中 2-氯丁香醛代谢物 2-CB-OH 的变化,结果发现喂食条件对胆汁中 2-CB-OH 的浓度影响很大。本试验在鱼类禁食状态下完成,并未考虑喂食条件这一因素对 BaP 在胆汁中代谢的影响,因此喂食与否对胆汁中 BaP 的代谢产生何种影响不得而知,但从试验结果可以看出,BaP 的代谢具有明显的时间、剂量与效应之间的关系。因此,将胆汁代谢物应用到实际的环境生物监测中具有可行性,但喂食条件与胆汁代谢物在实际的环境监测中的应用结合还有待研究。

### 3.2 胆汁中 BaP 代谢物与 BaP 暴露的时间-效应和剂量-效应关系

剂量-效应关系是 FF 法应用于环境监测的前提。数据显示 BaP 代谢物与 BaP 浓度之间存在很好的剂量-效应关系。本试验结果显示  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组 BaP 代谢物试验期间无明显波动,并与对照组无显著差异,说明低剂量的 BaP 可能并不引起机体的生化反应。 $1, 10, 50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  这 3 个浓度组在时间上均表现出先升高后降低的趋势,可能是因为暴露的前期,鱼体内的代谢酶不断被诱导,BaP 代谢产物生成较快,而到了暴露后期,代谢酶不再被诱导,胆囊内的 BaP 代谢产物排出量大于其生成量。但不同暴露浓度下 BaP 代谢物开始下降的时间不同, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组在第 7 d 后开始下降, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  组则在第 48 h 后开始下降, $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  无明显峰值出现,但参考其 48 h 和 4 d 的荧光强度推断其峰值可能出现在这两个时间段之间。Gravato 等<sup>[13]</sup>对海鲈的研究显示在  $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 BaP 暴露下,胆汁中 BaP 代谢产物从 4 h 开始上升,到 16 h 后开始下降;Aas 等<sup>[10]</sup>用  $0.2 \text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$  的 BaP 对大西洋鳕鱼染毒,结果显示 BaP 代谢物在试验第 3 d 开始下降;穆景利等<sup>[14]</sup>的研究结果表明,在  $0.5、$

$1, 2, 5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  4 个 BaP 浓度组黑鲟胆汁中 3-OH BaP 均在第 7 d 后开始下降。但是在 Beyer 等<sup>[15]</sup>的试验中,BaP 代谢产物则在 16 d 的时间里并没有下降,而处于一直上升的状态,Aas 等<sup>[10]</sup>也有过类似结果。这意味着胆汁中 PAHs 代谢物变化虽然存在很好的剂量-效应关系,但这种关系的具体表现形式可能因试验动物的种类、染毒剂量、染毒方式等的不同而存在差异。

## 4 结论

与其他分析方法相比,利用固定波长荧光分光光度法研究苯并(a)芘暴露下罗非鱼胆汁代谢物的动态变化,仪器操作简单,所用时间较短,是一种有效、快速的多环芳烃含量的生物监测方法。

BaP 暴露下,罗非鱼胆汁中 BaP 代谢物水平在暴露短期内明显上升,但随着暴露时间的延长,BaP 代谢物水平逐渐回落。在本试验观察的时间和浓度范围内,胆汁中 BaP 代谢物与暴露浓度和暴露时间之间存在一定的剂量-效应和时间-效应关系。

### 参考文献:

- [1] Varanasi U. Metabolism of polycyclic aromatic hydrocarbons in the aquatic environment[J]. *CRC Press, Boca Raton, FL*. 1989.
- [2] 赵云英, 马永安. 天然环境中多环芳烃的迁移转化及其对生态环境的影响[J]. *海洋环境科学*, 1998, 17(2): 68-72.  
ZHAO Yun-ying, MA Yong-an. Transport process and ecological impact of polycyclic aromatic hydrocarbons in the natural environment[J]. *Marine Environmental Science*, 1998, 17(2): 68-72.
- [3] Beyer J, Jonsson G, Porte C, et al. Analytical methods for determining metabolites of polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) pollutants in fish bile: A review[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2010, 30(3): 224-244.
- [4] Beyer J, Aas E, Borgenvik H K, et al. Bioavailability of PAH in effluent water from an aluminium works evaluated by transplant caging and biliary fluorescence measurements of Atlantic cod (*Gadus morhua* L.)[J]. *Marine Environmental Research*, 1998, 46(1-5): 233-236.
- [5] Lin E L C, Cormier S M, Torsella J A. Fish biliary polycyclic aromatic hydrocarbon metabolites estimated by fixed-wavelength fluorescence: Comparison with HPLC-fluorescent detection[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1996, 35(1): 16-23.
- [6] Bilbao E, Raingard D, de Cerio O D, et al. Effects of exposure to Prestige-like heavy fuel oil and to perfluorooctane sulfonate on conventional biomarkers and target gene transcription in the thicklip grey mullet *Chelon labrosus*[J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 98(3): 282-296.
- [7] 段小丽, 魏复盛. 苯并(a)芘的环境污染、健康危害及研究热点问题[J]. *世界科技研究与发展*, 2002, 24(1): 11-17.  
DUAN Xiao-li, WEI Fu-sheng. The environmental pollution caused by benzo(a) pyrene, its harm to health and the research focuses on it[J].

- World Sci-Tech R&D*, 2002, 24(1): 11-17.
- [8] 陈宇云, 朱利中. 地表水体中多环芳烃污染的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2010(15): 8148-8153.  
CHEN Yu-yun, ZHU Li-zhong. Research progress of polycyclic aromatic hydrocarbons pollution in surface water body[J]. *Journal of Anhui Agriculture and Science*, 2010(15): 8148-8153.
- [9] Bashford C L, Harris D A. Spectrophotometry and Spectrofluorimetry[J]. *A Practical Approach (Oxford: IRL Press)*, 1987.
- [10] Aas E, Beyer J. Fixed wavelength fluorescence (FF) of bile as a monitoring tool for polyaromatic hydrocarbon exposure in fish: An evaluation of compound specificity, inner filter effect and signal interpretation[J]. *Biomarkers*, 2000, 5(1): 9-23.
- [11] Hanson N, Larsson Å. Fixed wavelength fluorescence to detect PAH metabolites in fish bile: Increased statistical power with an alternative dilution method[J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2008, 144(1): 221.
- [12] Brumley C M, Haritos V S, Ahokas J T, et al. The effects of exposure duration and feeding status on fish bile metabolites: Implications for biomonitoring[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1998, 39(2): 147-153.
- [13] Gravato C, Santos M A. Genotoxicity biomarkers' association with B(a)P biotransformation in *Dicentrarchus labrax* L.[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 55(3): 352-358.
- [14] 穆景利, 王新红, 林建清. 黑鲟 (*Sparus macrocephalus*) 暴露苯并(a)芘后胆汁中代谢产物 3-羟基-苯并(a)芘的剂量与时间-效应关系研究[J]. *环境化学*, 2007, 26(4): 487-490.  
MU Jing-li, WANG Xin-hong, LIN Jian-qing. Dose- and time- dependent formation of 3-hydroxy-benzo(a)pyrene in the bile of black porgy (*Sparus macrocephalus*) exposed to benzo(a)pyrene[J]. *Environmental Chemistry*, 2007, 26(4): 487-490.
- [15] Beyer J, Sandvik M, Skåre J U. Time and dose-dependent biomarker responses in ounder (*Platichthys esus* L.) exposed to benzo[a]pyrene, 2, 3, 3', 4, 4', 5-hexachlorobiphenyl (pcb-156) and cadmium[J]. *Biomarkers*, 1997, 2: 35-44.
- [16] Aas E, Baussant T, Balk L, et al. PAH metabolites in bile, cytochrome P4501A and DNA adducts as environmental risk parameters for chronic oil exposure: A laboratory experiment with Atlantic cod[J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 51(2): 241-258.