

TBBPA 对美洲鳗鲡谷胱甘肽代谢相关指标的影响

冯涛^{1,2}, 李文静^{1,2}, 陈丽娜^{1,2}, 陈融斌^{1,2}

(1. 集美大学水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 集美大学水产生物技术研究所, 福建 厦门 361021)

[摘要] 在实验生态条件下, 研究了 TBBPA 对美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*) 幼鳗体内谷胱甘肽代谢相关指标的影响. 在本实验暴露剂量和时间范围内, GST 活性高浓度组被显著诱导; GPx 活性高浓度组首先在暴露第三天被显著诱导, 其后暴露第七天降低至对照组水平, 中浓度组则在暴露第七天被显著诱导; GR 活性仅低浓度组表现为显著抑制作用; GSH 含量仅中浓度组显著增加. 这些相关指标的变化间接反映了生物体受到不同程度的氧化胁迫时表现出的应激效应, 有可能作为水环境中 TBBPA 污染的生物监测指标. 对照组中除 GPx 活性外, 其余三个指标均随时间的变化显著升高或降低. 表明这些指标易受环境非污染因素扰动的影响, 因此作为生物标记时应充分考虑到各种可能的影响因素.

[关键词] 美洲鳗鲡 (*Anguilla rostrata*); 四溴双酚 A (TBBPA); 谷胱甘肽硫转移酶 (GST); 谷胱甘肽过氧化物酶 (GPx); 谷胱甘肽还原酶 (GR); 还原型谷胱甘肽 (GSH)

[中图分类号] X 52

[文献标志码] A

Effects of Tetrabromobisphenol-A on Glutathione Metabolism in *Anguilla rostrata*

FENG Tao^{1,2}, LI Wen-jing^{1,2}, CHEN Li-na^{1,2}, CHEN Rong-bin^{1,2}

(1. Fisheries College, Jimei University, Xiamen 361021, China;

2. Aquatic Biotechnology Institute, Jimei University, Xiamen 361021, China)

Abstract: Effects of TBBPA on glutathione metabolism in *Anguilla rostrata* were studied in laboratory experiment. In dose and time range of our experiment, GST activities were induced significantly in high concentration exposure groups. GPx activities in high dose groups were induced significantly in 3 d exposure and then deduced to level of the control in 7 d, while GPx activities in middle dose were induced significantly in 7d. GR activities were depressed significantly only in low dose. The contents of GSH increased significantly only in middle dose. The varieties of these GSH related indicators reflected indirectly the oxidative stress of the fishes while they face to oxidized pressure. These indicators can be considered as biomarkers of TBBPA exposure in water environment. In control, the other three indicators except GPx increased or decreased significantly in different time, which show that these indicators are easy to be affected by non pollution environmental factors. Various possible factors should be considered in biomarker studies.

Key words: *Anguilla rostrata*; TBBPA; Glutathione S transferase (GST); glutathione peroxidase (GPx); glutathione reductase (GR); reduced glutathione (GSH)

0 引言

阻燃剂使合成的工业材料具有难燃性、自熄性和消烟性。人们生产和生活中使用的电器产品、纺织品、泡沫家具、绝缘泡沫以及许多建材等都含有阻燃剂。溴化阻燃剂（BFR）具有价格低廉、阻燃效果好的优点，因此应用最为广泛。全球具有一定生产规模的几十种溴化阻燃剂中，使用较多的有四溴双酚 A（TBBPA）、六溴环十二烷、五溴联苯醚、八溴联苯醚和十溴联苯醚等。而在这 5 种溴化阻燃剂中，TBBPA 因其阻燃性能良好，是产量最大、使用最广泛的溴化阻燃剂。随着它的大量使用，土壤、水体、大气和沉积物等生态系统受到严重污染，由于其具有低水溶性、高脂溶性的特点，极易在生物体内富集并产生代谢，进而对机体产生各种危害。

抗氧化系统是生物体内清除活性氧自由基的系统，当体内因各种原因导致的活性氧自由基代谢异常时，相应的抗氧化系统的指标（如抗氧化剂的合成量、抗氧化酶的活性）都会受到影响，据此可以作为机体受到氧化胁迫的指示。关于抗氧化系统的研究目前相关报道主要集中在重金属^[1-3]、有机污染物^[4-6]以及环境中的混合污染物^[7]的影响。在 TBBPA 的大量生态毒理研究^[8-10]中，其被认为作为一种潜在的内分泌干扰物对机体产生危害^[11]，而 TBBPA 在体内的氧化反应是其代谢的必经途径^[12]，因此研究 TBBPA 对抗氧化系统的影响具有一定意义。

当机体遭受氧化胁迫时，还原型谷胱甘肽（GSH）是体内产生的过氧化物的有效清除剂之一。其氧化形式氧化型谷胱甘肽（GSSG）可以转化为 GSH，从而降低环境胁迫对机体的有害影响。此外，GSH 还可作为底物或产物参与细胞多种氧化还原反应，如谷胱甘肽硫转移酶（GST）、谷胱甘肽过氧化物酶（GPx）、谷胱甘肽还原酶（GR）等，进而调节机体的氧化还原水平^[13]。

本文以美洲鳗鲡（*Anguilla rostrata*）幼鳗为材料，通过不同浓度的 TBBPA 暴露来研究 TBBPA 对美洲鳗鲡体内 GST、GPx、GR、GSH 等谷胱甘肽代谢相关指标的影响并探讨其致毒机理，尝试为评价该化合物提供更多的生物监测指标。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

BIOTEK Synergy HT 型酶标仪、SIGMA 3K15 型冷冻离心机。

GPx、GR、Bradford 蛋白浓度测定试剂盒和 GSH 均购自碧云天生物技术研究，5-磺基水杨酸（SSA）、邻苯二甲醛（OPT）、1-氯-2,4-二硝基苯（CDNB）为上海生物化学试剂公司产品，其余试剂为国产市售产品。

1.2 试验鱼和暴露条件

美洲鳗鲡幼鳗购自福建天马公司，暂养在 1.5 m × 0.7 m × 1.0 m 水族箱中。以初始生活盐度为起点，退盐到淡水环境，再逐步加温至 $(25 \pm 0.5)^\circ\text{C}$ ，并充气增氧。投喂专用开口饵料和水蚯蚓，每日换水 1/3 ~ 1/2，饲养周期 20 d。开始试验前停食 1 ~ 2 d。美洲鳗鲡体长 (57.6 ± 2.6) mm，体重 (0.160 ± 0.028) g。

试验使用玻璃钢水槽，规格 50 cm × 25 cm × 25 cm，试验过程中水温保持在 $(22.0 \pm 0.7)^\circ\text{C}$ 。试验设 1 个对照组和 3 个浓度组，TBBPA 浓度分别为 0（对照）、0.001、0.010、0.100 mg/L，每个浓度设 2 个平行组，暴露时间分别为 3 d 和 7 d，每组 8 尾鱼。试验期间不喂食，每天更换一半实验液。驯养及试验期间个体死亡率不超过 3%。

1.3 样品预处理

分别于暴露的第三天和第七天取样，每个浓度组分别取 6 尾鱼，每尾鱼分别用生理盐水洗涤后用滤纸吸干并称重，再加入 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{--NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液（0.1 mol/L，pH = 7.5）（比例为 $m(\text{鱼}) : V(\text{缓冲液}) = 1 \text{ g} : 10 \text{ mL}$ ），冰浴下将鱼研磨成浆，放入冷冻离心机，在 5000 r/min、4 °C 下离心 10 min，取上清液分装存于 -80 °C 的超低温冰箱，以备后续实验使用。

1.4 谷胱甘肽代谢相关指标测定方法

GPx、GR、蛋白质浓度均采用碧云天生物技术研究生产的试剂盒进行测定。

GPx 测定的最终反应体系为 0.05 mol/L Tris - HCl 缓冲液 (pH = 8.0, 含 0.5 mmol/L EDTA) 中: 叔丁基过氧化氢 0.30 mmol/L、还原型辅酶 II (NADPH) 0.25 mmol/L、GSH 2 mmol/L 以及 GR 0.50 U/mL. 以 340 nm 波长检测 NADPH 的减少量来测定 GPx 活性。

GR 测定的最终反应体系为 0.05 mol/L K₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液 (pH = 7.5, 含 EDTA 1 mmol/L) 中: GSSG 0.95 mmol/L、NADPH 0.1 mmol/L. 以 340 nm 波长检测 NADPH 的减少量来测定 GR 活性。

GSH 测定^[14] 前先进行预处理, 在上清液中加入 5% (体积分数) 5 - 磺基水杨酸 (SSA) 沉淀蛋白 (V (SSA) : V (上清液) = 1:1), 离心后再取上清液进行测定, 最终反应体系为 0.1 mol/L Na₂HPO₄ - NaH₂PO₄ 缓冲液 (pH = 8.0, 含 EDTA 0.005 mol/L) 中含邻苯二甲醛 (OPT) 65 mg/L, 于激发波长 340 nm、发射波长 450nm 处测定后再通过标准曲线计算 GSH 含量 (μg/g)。

GST 测定^[15] 的最终反应体系为 0.1 mol/L K₂HPO₄ - KH₂PO₄ 缓冲液 (pH = 6.5, 含 0.1% (体积分数) Triton X - 100) 中: 1-氯-2, 4-二硝基苯 (CDNB) 1 mmol/L、GSH 2 mmol/L, 在 340 nm 波长处测定其反应速率来测定 GST 活性。

蛋白质浓度测定采用 Bradford 蛋白质浓度测定法^[16] 进行测定。

1.5 数据处理

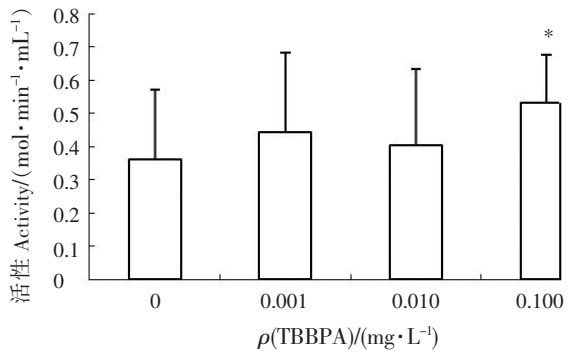
实验结果以平均数 ± 标准误差表示, 实验数据采用 SPSS 统计软件进行方差分析, 并以 *t* 检验进行各组均数的差异性分析, *P* < 0.05 表示有显著性差异。

2 结果

2.1 不同浓度 TBBPA 暴露对美洲鳗鲡谷胱甘肽代谢相关指标的影响

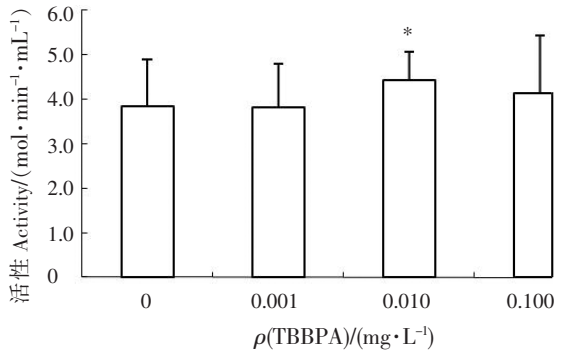
暴露 7 d 时, TBBPA 浓度对美洲鳗鲡谷胱甘肽代谢相关指标的影响如图 1—图 4 所示. 与对照组相比, GST 活性在 0.100 mg/L 浓度组显著升高 (*P* < 0.05), 为对照组的 1.48 倍; GPx 活性在 0.010 mg/L 浓度组显著升高 (*P* < 0.05), 为对照组的 1.15 倍; GR 活性则是在 0.001 mg/L 浓度组显著降低 (*P* < 0.05), 为对照组的 84.4%; GSH 含量在 0.010 mg/L 浓度组显著升高 (*P* < 0.05), 为对照组的 1.05 倍, 而在 0.100 mg/L 浓度组显著降低 (*P* < 0.05), 为对照组的 96.9%。

从以上结果可以看出, 各指标对不同暴露浓度的响应并不一致. GST 和 GPx 分别在高浓度和中浓度组被诱导, GR 是在低浓度组被抑制, GSH 则在中浓度和高浓度表现为先升高后降低的趋势。



说明: * 表示与对照组相比差异显著
Note: * shows significantly difference as compared with control group

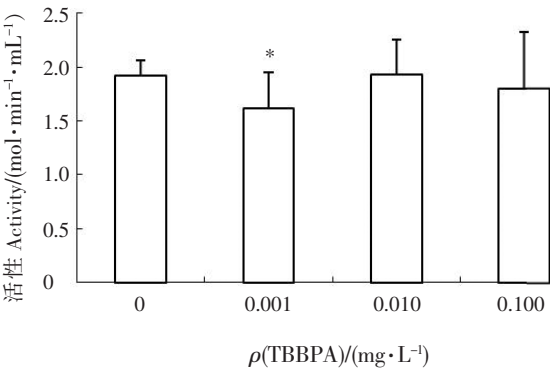
图 1 不同浓度的 TBBPA 暴露 7 d 后对美洲鳗鲡 GST 活性的影响



说明: * 表示与对照组相比差异显著
Note: * shows significantly difference as compared with control group

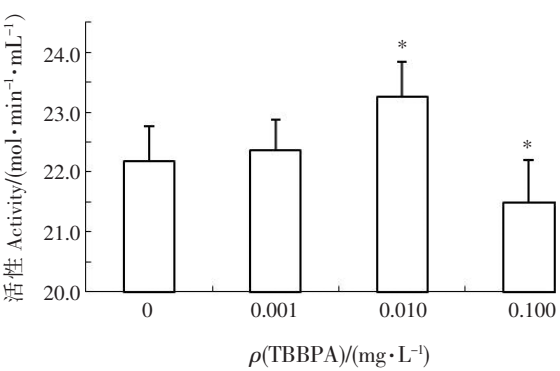
图 2 不同浓度的 TBBPA 暴露 7 d 后对美洲鳗鲡 GPx 活性的影响

Fig.1 Effect of TBBPA exposure in different concentration at 7 d on GST activity of *Anguilla rostrata* Fig.2 Effect of TBBPA exposure in different concentration at 7 d on GPx activity of *Anguilla rostrata*



说明：* 表示与对照组相比差异显著
Note: * shows significantly difference as compared with control group

图 3 不同浓度的 TBBPA 暴露 7 d 后对美洲鳗鲡 GR 活性的影响



说明：* 表示与对照组相比差异显著
Note: * shows significantly difference as compared with control group

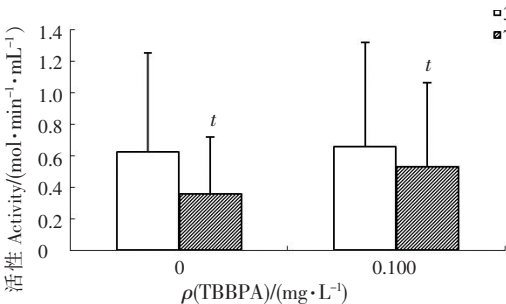
图 4 不同浓度的 TBBPA 暴露 7 d 后对美洲鳗鲡 GSH 含量的影响

Fig.3 Effect of TBBPA exposure in different concentration at 7 d on GR activity of *Anguilla rostrata* Fig.4 Effect of TBBPA exposure in different concentration at 7 d on GSH content of *Anguilla rostrata*

2.2 不同时间 TBBPA 暴露对美洲鳗鲡谷胱甘肽代谢相关指标的影响

对照组和 0.100 mg/L TBBPA 浓度组分别在暴露 3 d 和 7 d 时对美洲鳗鲡谷胱甘肽代谢相关指标的影响如图 5—图 8 所示. 在 0.100 mg/L 浓度组, 暴露 7 d 时与暴露 3 d 时相比, GST 活性显著降低 ($P < 0.05$), 7 d 时为 3 d 时的 80.6%; GPx 活性显著降低 ($P < 0.05$), 7 d 时为 3 d 时的 81.2%; GR 活性和 GSH 含量无显著差异. 暴露 3 d 时, 对照组和 0.100 mg/L TBBPA 浓度组之间各谷胱甘肽代谢相关指标中, GST 含量和 GR 活性无显著差异; GPx 活性显著升高 ($P < 0.05$), 0.100 mg/L 浓度组为对照组的 1.34 倍; GSH 则显著降低 ($P < 0.05$), 0.100 mg/L 浓度组为对照组的 89.6%. 暴露 7 d 时, 对照组和 0.100 mg/L TBBPA 浓度组之间各谷胱甘肽代谢相关指标未表现出显著差异.

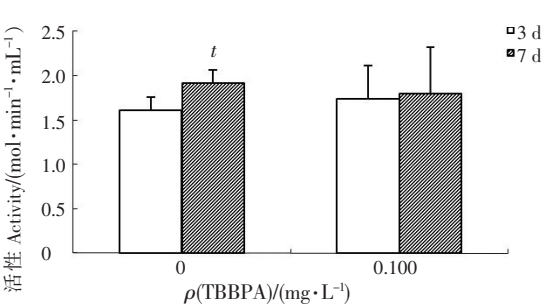
本研究中, 综合分析时间 (3 d 和 7 d) 和浓度 (0.001, 0.010, 0.100 mg/L) 两个因素不同时, TBBPA 暴露对美洲鳗鲡谷胱甘肽代谢相关指标的影响, 结果表明: 与对照组相比, 在 TBBPA 高浓度组暴露 7 d 时 GST 活性被显著诱导; GPx 活性高浓度组在暴露 3 d 时被显著诱导, 且在暴露 7 d 时恢复至对照组水平, 中浓度组则在 7 d 时被显著诱导; GR 活性仅低浓度暴露 7 d 时被显著抑制; GSH 高浓度组在暴露 3 d 时显著降低, 中浓度组则在暴露 7 d 时显著增加. 值得注意的是, 在对照组中, 除 GPx 活性外, 其余 3 个指标均随时间的变化显著升高或降低, 表明这些指标易受环境因素扰动的影响.



说明: t 表示同一浓度不同时间组相比差异显著.
Note: t shows significantly difference as compared with 3d exposure group in the same concentration.

图 5 不同时间的 TBBPA 暴露对美洲鳗鲡 GST 活性的影响

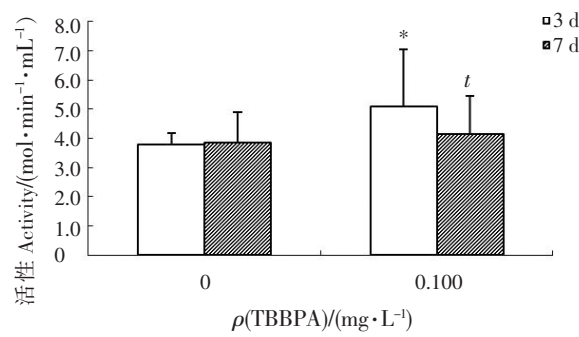
Fig.5 Effect of TBBPA exposure at different time on GST activity of *Anguilla rostrata*



说明: t 表示同一浓度不同时间组相比差异显著.
Note: t shows significantly difference as compared with 3d exposure group in the same concentration.

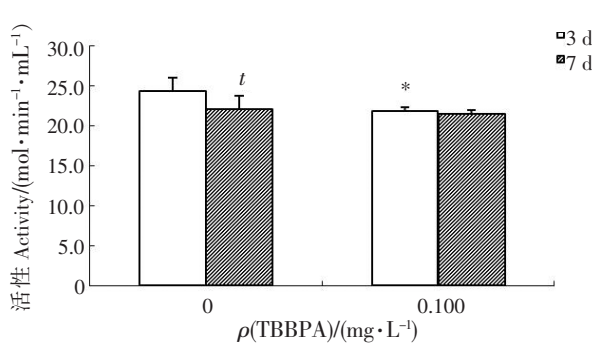
图 6 不同时间的 TBBPA 暴露对美洲鳗鲡 GR 活性的影响

Fig.6 Effect of TBBPA exposure at different time on GR activity of *Anguilla rostrata*



说明: * 表示与对照组相比差异显著; *t* 表示同一浓度不同时间组相比差异显著。

Notes: * shows significantly difference compared with control group; *t* shows significantly difference as compared with 3d exposure group in the same concentration



说明: * 表示与对照组相比差异显著; *t* 表示同一浓度不同时间组相比差异显著。

Notes: * shows significantly difference compared with control group; *t* shows significantly difference as compared with 3d exposure group in the same concentration

图7 不同时间的 TBBPA 暴露对美洲鳗鲡 GPx 活性的影响

Fig.7 Effect of TBBPA exposure at different time on GPx activity of *Anguilla rostrata*

图8 不同时间的TBBPA 暴露对美洲鳗鲡 GSH 含量的影响

Fig.8 Effect of TBBPA exposure at different time on GSH content of *Anguilla rostrata*

3 讨论

谷胱甘肽是生物体内重要的抗氧化损伤防御系统的成分之一，维持机体的氧化还原平衡，不仅参与细胞抗氧化反应，还参与调节细胞增生、机体免疫以及在神经系统中充当神经调质和神经递质的作用^[13]。谷胱甘肽同时还是谷胱甘肽过氧化酶和谷胱甘肽转移酶特有的底物，通过这两种酶来清除细胞内的自由基和过氧化物，从而维持细胞及组织结构的正常功能和代谢。另外，谷胱甘肽还原酶是一种将氧化型谷胱甘肽还原为谷胱甘肽的酶。因此，本研究4个指标均与污染物在体内氧化还原代谢过程中谷胱甘肽转化密切相关，其中GST、GPx、GR3种酶底物或产物均为GSH。

本研究发现，美洲鳗鲡GR活性对TBBPA非常敏感，在0.001 mg/L组暴露7 d时即受到抑制，但在更高浓度组未发生显著变化，显示其仅在低浓度范围内对TBBPA发生响应；GST活性则在0.100 mg/L浓度组暴露7 d时显著诱导，对TBBPA的响应浓度远高于GR；GPx和GSH这两个指标对TBBPA的响应表现出一定的剂量效应关系。GPx在0.100 mg/L组表现为先诱导（3 d时）后恢复，在0.010 mg/L组则表现为在7 d时诱导并且诱导水平低于0.100 mg/L组；GSH含量虽然在0.100 mg/L组（3 d）降低，在0.010 mg/L组（7 d）升高，但其值的改变均在10%以内，这是否与该浓度范围内GR活性的稳定性有关值得探讨。

关于TBBPA对机体抗氧化系统的影响，已有一些相关的研究，如苏燕等^[17]研究表明，在0.001~0.100 mg/L TBBPA浓度范围下培养12~20 d，幼龄鲫鱼（*Carassius auratus*）血清中超氧化物歧化酶（SOD）、GPx及过氧化氢酶（CAT）活性和GSH含量等抗氧化系统指标均发生响应，其中GSH对TBBPA十分敏感，在整个浓度范围内均显著抑制；李亚宁等^[18]研究了在0.005~1.000 mg/L TBBPA下暴露8~10 d对颤蚓（*Uonopylephorus limosus*）的CAT、SOD和GST的活性影响，发现各指标均产生响应，但SOD更为敏感；薛银刚等^[19]研究表明，0.05~10 mg/kg的TBBPA在14 d周期内对赤子爱胜蚓（*Eisenia fetida*）的SOD、CAT、GST活性在0.05~1 mg/kg时产生显著诱导；Yang Suwen等^[20]研究了鲫鱼暴露于0.35~0.71 mg/L TBBPA中32 d，在0.35 mg/L时GST和GR活性从4 d起均显著诱导，其中GR活性剂量效应关系良好，并且在0.50~0.71 mg/L下暴露32 d后，各指标不能恢复至正常水平，说明机体发生不可逆损伤。以上研究^[17-20]以及本研究中抗氧化系统对TBBPA均产生响应，虽然各指标产生的响应并不相同，但考虑到生物体的抗氧化系统本身的复杂性，各指标的变化受到多种因素的影响，在对抗外界不同程度的氧化胁迫时，机体所采用的应激补偿机制也有所不同。

[参 考 文 献]

- [1] ALSALEH I, ALROUQI R, OBSUM C A, et al. Mercury (Hg) and oxidative stress status in healthy mothers and its effect on birth anthropometric measures [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2014, 217(4/5): 567-585.
- [2] LAVRADAS R T, HAUSER-DAVIS R A, LAVANDIER R C, et al. Metal, metallothionein and glutathione levels in blue crab (*Callinectes* sp.) specimens from southeastern Brazil [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 107: 55-60.
- [3] SARKAR S, MUKHERJEE S, CHATTOPADHYAY A, et al. Low dose of arsenic trioxide triggers oxidative stress in zebrafish brain: expression of antioxidant genes [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 107: 1-8.
- [4] GILLIS P L, HIGGINS S K, JORGE M B. Evidence of oxidative stress in wild freshwater mussels (*Lasmigona costata*) exposed to urban-derived contaminants [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2014, 102: 62-69.
- [5] 李进寿, 阮俊峰, 耿宏, 等. 多效唑暴露对褐菖鲉脾脏抗氧化防御系统的影响 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2013, 52(2): 267-272.
- [6] 孟文娜, 刘舒婷, 王晓蓉, 等. 土霉素对日本锦鲤肝脏抗氧化防御系统的影响 [J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(5): 833-838.
- [7] 梅丹, 周少奇. 垃圾渗滤液对斑马鱼的毒性及抗氧化酶活性的影响 [J]. 生态环境学报, 2012, 21(5): 902-906.
- [8] 白承连, 郑易, 李星驰, 等. 四溴双酚 A 对斑马鱼胚胎发育毒性和神经毒性研究 [J]. 中国药事, 2013, 27(3): 292-297.
- [9] 杜苗苗, 张娴, 颜昌宙. 溴系阻燃剂的毒理学研究进展 [J]. 生态毒理学报, 2012, 7(6): 575-584.
- [10] 杜青平, 彭润, 刘伍香, 等. 四溴双酚 A 对斑马鱼胚胎体内发育的毒性效应 [J]. 环境科学学报, 2012, 32(3): 739-744.
- [11] FENG M, QU R, WANG C, et al. Comparative antioxidant status in freshwater fish *Carassius auratus* exposed to six current-use brominated flame retardants: a combined experimental and theoretical study [J]. Aquatic Toxicology, 2013(140/141): 314-323.
- [12] WIT M D, KEIL D, REMMERIE N, et al. Molecular targets of TBBPA in zebrafish analysed through integration of genomic and proteomic approaches [J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 96-105.
- [13] 周婷婷, 曹俊明, 赵红霞, 等. 谷胱甘肽在水产动物中的营养生理作用研究进展 [J]. 水产科学, 2012, 31(10): 630-634.
- [14] COHN V H, LYLE J. A fluorometric assay for glutathione [J]. Analytical Biochemistry, 1966, 14: 434-440.
- [15] HABIG W H, PABST M J, JAKOBY W B. Glutathione S-transferases [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1974, 240(22): 7130-7139.
- [16] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [17] 苏燕, 范涤敏, 罗义, 等. 四溴双酚 A 对鲫鱼血清抗氧化系统的影响 [J]. 南京大学学报: 自然科学版, 2007, 43(2): 164-170.
- [18] 李亚宁, 周启星, 胡献刚, 等. 四溴双酚-A 污染对颤蚓的氧化胁迫及毒性 [J]. 环境科学, 2008, 29(7): 2013-2017.
- [19] 薛银刚, 王晓蓉, 顾雪元, 等. 四溴双酚 A 对赤子爱胜蚓的急性毒性及抗氧化防御系统酶的影响 [J]. 生态毒理学报, 2009, 4(1): 93-100.
- [20] YANG S, XU F, ZHENG B, et al. Multibiomarker responses upon exposure to tetrabromobisphenol A in the freshwater fish *Carassius auratus* [J]. Aquatic Toxicology, 2013 (142/143): 248-256.

(责任编辑 朱雪莲 英文审校 张子平)