

# 新型环境污染物抗生素的分子生态毒理研究进展\*

董璐玺<sup>1</sup> 谢秀杰<sup>1</sup> 周启星<sup>1,2\*\*</sup> 黄盼盼<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071; <sup>2</sup> 中国科学院沈阳应用生态研究所, 中国科学院陆地生态过程重点实验室, 沈阳 110016)

**摘要** 人们在农业畜牧业和治疗人类疾病的过程中大量使用抗生素, 由于抗生素自身独特的代谢特点, 导致了抗生素在包括水体和土壤等环境介质中的残留, 并因此导致对不同生物及生态系统产生广泛而深远的影响。本文概述了目前抗生素分子生态毒理学方面的研究进展, 并阐述了抗生素对生物及生态系统的各分子水平的毒性机理及分子标记物研究情况, 对于一些较新的分子诊断方法也进行了总结。最后, 分析了抗生素分子生态毒理研究存在的不足, 并探讨了今后的研究重点。

**关键词** 抗生素; 分子生态毒理; 生物标记物; 细胞色素 P450; 热休克蛋白; DNA 损伤

**中图分类号** X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-4890(2010)10-2042-07

**Molecular ecotoxicology of antibiotics, an emerging type of environmental contaminants: A review.** DONG Lu-xi<sup>1</sup>, XIE Xiu-jie<sup>1</sup>, ZHOU Qi-xing<sup>1,2</sup>, HUANG Pan-pan<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria (Ministry of Education), College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China; <sup>2</sup>Key Laboratory of Terrestrial Ecological Process, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China). *Chinese Journal of Ecology*, 2010, 29(10): 2042-2048.

**Abstract:** In recent decades, antibiotics have been widely used as the medicines for human and livestock. However, a large percentage of ingested antibiotics in living organisms are not metabolized but excreted and released as toxic contaminants, inducing their incremental residue in soil and aquatic environment, and resulting in adverse effects on living organisms and ecosystems. This paper summarized the research progress in molecular ecotoxicology of antibiotics, molecular mechanisms of antibiotics toxicity to living organisms and ecosystems, and ecotoxicological studies on molecular biomarkers of antibiotics, and summed up the new molecular diagnostic techniques applied in ecotoxicology. Some deficiencies of current molecular ecotoxicological diagnosis were pointed out, and the future study on the ecotoxicology of antibiotics was prospected.

**Key words:** antibiotic; molecular ecotoxicology; biomarker; cytochrome P450; heat shock protein; DNA damage.

抗生素一般是指由细菌、霉菌或其他微生物产生的, 能够杀灭或抑制其他微生物的一类物质及其衍生物, 用于治疗敏感微生物(常为细菌或真菌)所致的感染。近年来, 用以治疗人类和动物疾病的抗生素的使用量迅速增加(王冉等, 2006; Liu *et al.*, 2009)。目前, 全球每年至少一半的抗生素用于畜牧业和水产养殖业, 特别是将亚治疗剂量的抗生素添加到饲料中来预防动物疾病, 并促进其生长(Park

*et al.*, 2009), 或在水产业中用于控制细菌(周启星和黄国宏, 2001; Brain *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2009), 在促进畜牧业、水产业发展方面起了重要作用。然而, 抗生素摄入后并不被动物完全吸收(Sarmah *et al.*, 2006), 除少量抗生素残留在动物体内, 大部分则以原形或代谢物的形式排泄出来。而用动物粪便作为肥料施肥普遍见于很多国家, 这也成为土壤抗生素污染的重要来源。一些抗生素(如四环素类)水溶性较好, 在土壤环境中的部分残留易被雨水冲刷进入地表水, 水产养殖用药的大部分也都随饲料或粪便进入水体或沉入底泥(Park *et al.*, 2009)。虽

\* 国家自然科学基金资助项目(40930739 和 20977053)。

\*\* 通讯作者 E-mail: zhouqx@nankai.edu.cn

收稿日期: 2010-03-26 接受日期: 2010-06-12

然大部分抗生素的半衰期较短,但是由于其持续进入环境中且不易发生生物降解,所以具有假持续性(Brain *et al.*, 2005; 生秀梅等, 2005), 也使其具有富集的可能。而长期以来人们注重的是抗生素的治疗作用,并未考虑其对生态系统的影响(Laville *et al.*, 2004)。这些抗生素作为环境外源性污染物,对土壤、表层水体等环境介质、生物以及生态系统必定会产生广泛而深远的影响。它可通过食物链对生物及生态系统产生毒害作用,影响其中的植物、动物和微生物的正常生命活动并最终可能对人类的健康和生存造成不利影响(马驿和陈杖榴, 2005)。如,一些抗生素的过度使用导致一批抗性细菌和抗性基因的出现,使一些动植物变得更加易感(Liu *et al.*, 2009)。

近年来大量使用这些抗生素,引起了人们对环境中这些物质越来越多的关注(Brain *et al.*, 2005)。抗生素类污染物属于药物与个人防护用品(PPCPs)类物质,其环境污染及其生态毒理效应已成为我国乃至全球亟待解决的重大环境问题之一,现已是国内外科学工作者研究的热点内容。尽管近年来有关抗生素的输入、检测、归趋和影响等方面的研究成果都相继出现,人们仍然缺少对环境介质以及生态系统中抗生素的深入了解(Kümmere, 2009)。

从已有文献来看,国内外大部分环境污染物的毒理效应研究都还处在个体水平,并利用急性毒性试验的生物检测指标来判断污染物的毒性效应。实践表明,急性毒性实验更适用于高污染介质的毒性评价,而对于低水平的环境污染的评价则显得无能为力。例如,一些致畸作用的发生就没有临界值,在远低于可测生态效应产生的剂量条件下,就可能出现不可接受的风险。因此,建立更为精确和敏感的生态毒理指标和方法,进行环境亚致死含量抗生素的生态毒性效应及危害的诊断十分必要(Spurgeon *et al.*, 2003)。

## 1 生物标记物

生物标志物是指通过测定体液、组织或整个生物体,来表征对一种或多种化学污染物的暴露和其生化、细胞、生理、行为以及能量上的效应变化。生物标记物是进行污染环境生态毒理诊断的主要技术手段之一,生物标志物的优点是可以灵敏地检测到环境中低剂量的潜在污染物。其能够在不同水平上指示暴露-效应关系,并可通过多项反应指标提供

有关生态毒性的综合信息,可用作污染的早期预警(Depledge & Fossi, 1994; 刘宛等, 2004)。虽然生态系统各生物组分对污染物能从不同水平上进行响应,但现在研究普遍认为,无论污染物对生态系统的影响多么复杂,结果如何严重,最早的作用必然是从分子水平上开始,然后逐步在细胞、器官、个体、种群、群落、生态系统各个水平上反映出来(赵于丁等, 2009)。人们把那些可遗传的并可检测的蛋白质和核酸水平的标记物称为分子标记物(molecular marker)。分子标记物具有生物标志物的一般特征,但是更加敏感,可探讨并预测更低剂量环境污染对机体的长期影响及可能的潜在危害,从而防止慢性毒作用的发生。很多污染物会导致代谢酶活性大幅变化,基因表达异常, DNA 损伤这些分子毒性机制的发生(Valavanidis *et al.*, 2006)。显然,掌握污染物危害发生前生物标记物的状况,对于及时避免或减轻环境污染的损害具有重要意义。

### 1.1 机体生理生化水平

生物机体的生化过程是构成整个生命活动的基础,酶起着重要的作用。污染物进入机体后,一方面在酶的催化作用下进行代谢转化,另一方面也导致酶活性改变。许多污染物的毒作用就是与酶分子相互作用,影响其表达量和活性,引发体内一系列生化变化,从而引起毒性效应。例如,细胞色素 P450 酶系、生物转化酶如谷胱甘肽硫转移酶(GST)、小分子抗氧化防御系统等各种酶活性的变化,都对污染物的毒理过程发挥重要作用,因此,可以将这些生物分子的响应作为污染物暴露的生物标志物。

资料显示,细胞色素 P450(CYP450)是广泛分布于动物、植物和微生物体内的第一代谢阶段的代谢酶类,属于混合功能氧化酶。细胞色素 P450 酶系在生物体中具有多种催化功能,它能够对许多内源和外源的化学物质,尤其是对环境有害化合物进行有氧氧化代谢以实现机体的解毒作用。细胞色素 P450 酶系可受外源污染物诱导或抑制而使其含量或活性显著增加或降低,利用其与污染物毒性之间的响应关系,可将生物机体内细胞色素 P450 含量或活性作为生物标记物,进行环境污染的早期诊断,并阐明污染物的作用机制、生物可利用性、污染物间的相互作用和生物机体的防御反应等。因此作为生物体内的重要生理生化指标,细胞色素 P450 酶倍受重视。很多环境污染物如多环芳烃、多氯联苯、二噁英等,都是鱼体内细胞色素 P450 的诱导剂。蚯蚓细胞

色素 P450 含量也是适合土壤低剂量污染暴露毒性诊断的指标。可见,细胞色素 P450 作为环境污染暴露的一种生物标志物适用于多种生物,指示多种外来化合物的诱导作用。而细胞色素 P450 对于污染物抗生素的指示方面,Thibaut 和 Porte (2008) 也研究了当青鳉鱼暴露在  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的双氯高灭酸中 4 d,其肝、腮和肠内的细胞色素芳香化酶(CYP450A)活性都呈现强烈的诱导性;而甲氧萘丙酸等在  $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  的水平就会发生 CYP450 家族酶系 CYP1A 的活性诱导;苯扎贝特等抗生素甚至在  $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  就会诱导 CYP1A 活性。磺胺甲二唑等 8 种抗生素作用于虹鳟鱼肝内的 CYP1A,均对其活性产生了诱导或抑制作用(Laville *et al.*, 2004)。某些生物短时间暴露于抗生素后,随着暴露时间的延长,CYP1A 活性则会经历被诱导再恢复到基本水平的过程。这个可能跟该生物对该种诱导物的生物转化速率较快有关。研究表明,鱼类、贝类的 CYP450 对环境诱导的反应具有敏感性,并且有很好的剂量-效应关系,指示的污染水平与诱导反应有很好的相关性(周驰和李纯厚,2007)。蚯蚓是实验室和野外调查土壤环境污染重要的代表生物(龚鹏博等,2007)。而对于环境中抗生素的暴露而引起土壤动物如蚯蚓 CYP450 的诱导效应的研究国内几乎是空白。

一般情况下,抗氧化防御系统可以控制正常代谢所产生的活性氧。当某些污染物在机体内进行生物转化时,会产生大量的活性氧和自由基代谢物而引起机体的氧化应激。暴露在污染中的生物在生长受到影响之前会通过调节其内部生化反应来降低化学物的毒性影响。所以,早期的生化反应是评估环境的潜在危害相当重要的信息。目前,很多研究把过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等作为评价外源化合物产生氧化胁迫的重要生物标志物,国内外关于氧化胁迫下水生动物抗氧化防御系统的研究成为水生生态毒理学研究的热点。

CAT 是去毒作用和细胞抗氧化机制的重要酶系。过氧化氢酶的变化意味着化学物暴露使细胞受到损害。已有研究指出,恩诺沙星能导致鲶鱼的 CAT 活性发生变化(Wang *et al.*, 2009)。Monari 等(2008)用软体动物鸡帘蛤研究得出,使其暴露在青霉素中 8 d,鸡帘蛤的 CAT 均处于较高水平,并随着暴露时间增长而升高,证明有代谢抗生素产生大量活性氧自由基的能力。也有报道称,奥喹多司会导

致土壤代表生物蚯蚓的前半部组织内 CAT 活性下降(Gao *et al.*, 2007)。

SOD 也是生物体内重要的抗氧化酶,广泛分布于各种动物、植物和微生物机体内。SOD 具有特殊的生理活性,是生物体内清除自由基的首要物质。它可对抗与阻断氧自由基,并及时修复受损细胞。SOD 的含量和活性也可指示污染物暴露情况。王轶等(2009)研究表明, $0.25 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  的阿苯哒唑能显著提高蚯蚓的 SOD 活性。也有研究发现,将含有金霉素或喹乙醇的牲畜粪便作为鱼饲料投喂后,可以诱导鲤鱼肝脏内 SOD 活性,但 2 种抗生素在不同剂量下对该酶活性的影响程度不同(魏瑞成等,2009)。喹乙醇还可对土壤中蚯蚓体内的 SOD 酶活性有明显诱导(陈海刚等,2006)。可能是机体对该抗生素早期的适应性反应,以此来减少对机体的损害(Owen *et al.*, 2008)。虽然 SOD 酶活性增高可抵御外源污染物的危害,但是长期处于诱导应激状态,将损害生物体内抗氧化系统,造成机体细胞损伤。

谷胱甘肽转移酶(GST)是非常普遍的一种酶家族。GST 对内源和外源物质的去毒起着重要作用,并参与了胞内运输、生物合成和抗氧化等重要过程。LaCourse 等(2009)发现,当蚯蚓暴露在一定浓度的污染物时,体壁后部和肠组织内的 GST 会显示出较高活性。同时指出,蚯蚓体内的 GST 酶活性也可作为土壤污染物在分子水平的生物标志物。抗生素对于植物的毒性研究非常有限。抗生素对植物的影响根据化合物和植物种类的不同而呈现不同的趋势。种在金霉素处理过的土壤上的玉米,其 GST 和过氧化物酶活性都呈明显增高趋势。但有研究表明,酶活性被诱导可能和很多可变因素有关,把 GST 作为一项可靠的生物指标还存在不确定性(王晓蓉等,2006;赵于丁等,2009)。将其他抗氧化酶类作为生物标志物研究时也出现过类似问题,Oost 等(2003)研究发现,SOD、CAT 在污染胁迫下做出的响应不尽相同。将抗氧化酶用作环境污染的早期预警指标,必须考虑环境因素的影响,微小差异都可能导致酶活性产生变化。另外,生物种属间的个体差异以及年龄、性别、不同生长发育阶段等也可能影响酶活性的检测结果。总之,将抗氧化酶如 SOD、CAT 和 GST 用作生物标志物指示环境污染的早期预警,需考虑多种因素的综合影响,在实验条件的操作上应严格控制,尽量减少各种误差,以确保实验结果的真实可靠。同时,参考多种生物标记物结果,也会提高可靠



性。

乙酰胆碱酯酶(AChE)在神经系统的信息传导中起重要作用。十几年前,就有人发现 AChE 不仅是有机磷农药和氨基甲酸杀虫剂的生物标志物,它对金属、清洁剂和复杂混合污染也很敏感。ThiTu 等(2009)研究表明,对于食物中含有呋喃唑酮的草虾,腮内的 AChE 活性明显下降。草虾体内 AChE 活性的变化可指明抗生素的暴露,并可显示出健康损伤。但是,AChE 作为生物标记物也具有很多缺点,如不能反映低剂量接触水平、特异性不够强、会受温度的影响、存在种属和组织差异性等,这些缺点都制约了 AChE 的应用(周驰和李纯厚,2007)。

某些抗生素可直接对有机体产生有害的氧化应激。氧自由基反应和脂质过氧化反应在机体的新陈代谢过程中起着重要的作用,正常情况下二者处于协调与动态平衡状态,维持着体内许多生化反应和免疫反应。一旦这种协调与动态平衡产生紊乱与失调,就会引起新陈代谢失常和免疫功能降低,损害生物膜及其功能。Wang 等(2009)研究了恩诺沙星对鲶鱼的影响,结果表明,由抗生素引起的脂质过氧化还受到暴露时间及养殖密度的影响,但是不论养殖密度高低,鲶鱼体内不同部位的脂质过氧化反应都会呈现不同倍数的提高或抑制,证实恩诺沙星对鲶鱼产生脂质过氧化损害。一般情况下,脂质过氧化程度通过测定脂质过氧化最终产物丙二醛(MDA)的含量来确定。MDA 可与质膜内的氨基酸、蛋白质、不饱和脂肪酸和巯基等生物大分子发生反应,破坏巯基,并生成具有共轭双键的 Schiff 碱基( $-N=C-C=C-N-$ ),从而阻止新脂类的合成,使膜的一定部位受到损伤,并破坏细胞超微结构。MDA 含量也可作为抗生素污染胁迫的生物标记物。抗生素氯丙噻对水稻幼苗的预处理会引起其丙二醛含量的增加(李婷和周启星,2006)。

### 1.2 机体细胞基因表达产物水平

基因表达产物水平包括酶和一些蛋白质,除了上述的几种代表性酶,目前蛋白质分子标记物的研究热点主要有热休克蛋白和金属硫蛋白等。

热休克蛋白是一种防御蛋白。当遇到环境中诸如活性氧、重金属和有机污染物等因素的影响时,就会高度表达来应对这种压力,是环境中的胁迫因子促使特定基因表达的产物,通常也称作热激蛋白(heat shock protein, HSP)。根据 HSPs 分子量的不同,通常分为 4 个主要家族:HSP90 家族(83 ~ 90

kDa)、HSP70(66 ~ 78 kDa)家族、HSP60 家族和小分子 HSP(15 ~ 30 kDa)家族。在不受胁迫的细胞中它们能够维持蛋白质的稳态,参与细胞内新合成蛋白质的折叠、加工和转运;在有胁迫因子存在的情况下 HSP 都会被诱导合成,保护细胞免受损伤。有研究表明,由于赤霉素的暴露,鳙鱼细胞内的 HSP90 含量明显高于对照组(Wiseman & Vijayan, 2007)。不同的胁迫蛋白对不同污染物的响应是不一样的。有研究以鲫鱼为实验动物,使其长期低浓度暴露在重金属污染中,应激蛋白 HSP70 被不同程度地诱导,并有明显的剂量-效应关系(王晓蓉等,2006)。不过,至今还没有人研究 HSP 含量与抗生素是否存在明显的剂量-效应关系。而热休克蛋白已成为环境污染胁迫与诊断首选的生物标志物之一。

金属硫蛋白(MT)是一种低分子量、高半胱氨酸含量,能大量结合重金属离子的蛋白质(Kägi, 1991)。它能够清除体内自由基,缓解动物应激,参与必需金属的体内平衡与痕量金属的解毒作用。小剂量 Zn、Cu、Hg 或 Cd 都可以诱导 MT 的合成(Conrad *et al.*, 1997)。现已广泛作为评价环境中重金属污染效应的生物标记物,但是至今尚未有关于指示抗生素污染的研究报道。

### 1.3 机体细胞基因表达水平

信使 RNA(mRNA)是携带遗传信息,在蛋白质合成时充当模板的 RNA,是从脱氧核糖核酸(DNA)转录合成的一类单链核糖核酸。它在核糖体上作为蛋白质合成的模板,决定肽链的氨基酸排列顺序,是转录过程的重要载体。基因表达水平的分子标记物是指转录过程中 mRNA 的表达变化(表达的诱导或抑制以及上调或下调)。现在也有许多研究报道,它的表达异常可能与环境污染有关。

摇蚊是美国环保署批准的测试机体,是评价污染沉积物和水体毒性的一种代表动物,常用于水生生态毒理研究。其唾液腺细胞内巨大的染色体为直接用肉眼观察污染物的遗传毒性效应提供了可能。虽然这些研究提供了有价值的资料,但是对于机体内毒物产生的分子遗传水平敏感效应的信息却很少。当摇蚊暴露在 1 ~ 30  $\mu\text{g}$  浓度的芬苯达唑下, CYP450、HSP40 和 HSP90 的基因表达均呈明显上升状态。由于 CYP450 是外源物质去毒作用最重要的酶系之一,它的表达异常说明这种暴露打乱了摇蚊体内系统的平衡(Park *et al.*, 2009)。一些抗生素进入体内代谢后会产生活性氧自由基,而活性氧自由

基正是通过抑制 mRNA 的合成来抑制 CYP 酶的基因表达 (Monari *et al.*, 2008)。CYP 酶的抑制有时也会发生在转录后, 主要因为其促进了 mRNA 退化 (Laville *et al.*, 2004)。当暴露在  $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  的  $\beta$ -萘黄酮中, 鳟鱼肝细胞内的芳香烃受体 (AhR) 的 mRNA 积累量会有上升, 使得 AhR 蛋白含量与对照组相比明显升高, CYP1A 转录水平也显著升高; 相反, 赤霉素则会抑制 CYP1A 的蛋白表达 (Wiseman & Vijayan, 2007)。有研究指出, 甲萘醌可快速对鼠类体内肝细胞的金属硫蛋白 mRNA 产生诱导作用 (Andrews, 2000)。多项研究表明, 青霉素可以作用于抗生素特殊受体, 通过持续的蛋白合成来促进 CYP1A1 基因的表达 (Monari *et al.*, 2008)。暴露于阿特拉津污染胁迫下的蚯蚓大量与 DNA 损伤相关的基因呈现操纵上调现象, 如紫外线切补修复蛋白 RAD23 (Owen *et al.*, 2008)。可见, mRNA 的表达作为分子标记物已开始起步, 它比小分子抗氧化系统和其他酶标记物更加敏感, 在更低的污染物浓度下就会响应, 用它来指示环境中低浓度抗生素污染物也越来越受到重视。

环境的变化会引起细胞基因表达谱的变化, 而 DNA 芯片是高效的监测基因表达谱变化的手段, 因此, 可以利用 DNA 芯片快速检测污染物对人体、动植物的危害。基因微阵列技术逐渐也成为分子毒理学的标准工具。当细胞或组织暴露在毒物中时, 就需要检测其基因表达情况。此时要收集该细胞或组织的 mRNA, 将 mRNA 转化为标记的 DNA 文库, 再将它与 DNA 阵列杂交, 使用染料使其着色, 再通过荧光计用肉眼观察杂交基因。得到的数据可通过软件或数据库分析, 得到相关的基因表达的诱导或抑制水平的模型及生化调控路径等。Waring 等 (2001) 利用微阵列方法分析了大鼠暴露在一种新型化学物质下对细胞粘着蛋白表达抑制的影响, 结果显示, 同类而不同种的化学物质对动物基因表达的抑制作用相似; 而对于用不同类别化学物质处理的动物, 得到的基因表达图谱显著不同。Lettieri (2006) 指出, 基因表达检测目前已经是成熟的技术, 但在分子生态毒理学方面的应用还处在初级阶段。因为, 实际的生态系统中还有许多复杂的可变因素。基因表达的不同与毒物浓度、受试动物性别、基因型、年龄及内在的遗传变异性均有关, 较难控制。Gracey 等 (2001) 发现, 当环境中缺氧时, 一些新型基因也会在鱼体内差异表达。

#### 1.4 机体细胞基因水平

脱氧核糖核酸 (DNA) 是生物体内重要的大分子和遗传物质。在正常条件下, 生物细胞内的基因组是稳定的。在细胞核内, DNA 分子保持着一种稳态的动态平衡。DNA 在细胞分裂过程中通过复制, 把所有的遗传物质传递给子代, 这对确保生物的正常新陈代谢和繁殖非常重要。由于 DNA 结构特点及半保留复制特性, 在环境污染条件下可直接间接地导致生物细胞内的 DNA 分子损伤 (刘宛等, 2005)。DNA 分子的异常变化会导致严重的遗传效应, 一旦损伤发生, 修复能力即被诱导, 各种修复酶增加并被活化; 如果损伤不能被修复, 则产生 DNA 结构和功能损伤, 导致细胞死亡或突变。也有污染物通过体内的酶活化作用产生高亲电性的中间产物, 与高电子密度的脂类、蛋白、RNA 或 DNA 的亲核中心反应, 形成加合物。

污染物及其活性代谢产物与 DNA 作用形成 DNA 加合物是产生 DNA 损伤的最早期作用。DNA 加合物为诊断、分析污染物的暴露提供了有效的信息。一些数据可提供化学物代谢及加合物修复方面的信息。关于 DNA 加合物, 针对对象是人体或替代性动物大鼠的经典毒理学方面的研究相对较多 (Svenberg *et al.*, 2008)。近年来, 我国开展了一些水生生物毒理学的研究, 如鱼类的脑组织和肝组织 DNA 加合物, 但对土壤动物尤其是土壤-植物系统中 DNA 加合物应用的研究甚少, 在总体上无论数量与质量、广度与深度上与国外有较大的差距。现在大量关于烯烃和环氧衍生物的 DNA 加合物的研究正在进行中, 其中包括环氧乙烷、环氧丙烷和乙烯等。这些物质诱导的加合物主要作用在鸟嘌呤的 N-7 位。许多抗生素的中间体具环氧烷基基团, 可能也会导致加合物的产生。内源 DNA 加合物常出现在 DNA 基因组中, 会引发突变危险 (Svenberg *et al.*, 2008)。DNA 加合物的测定方法主要有:  $^{32}\text{P}$ -后标记法、特定加合物的单克隆和多克隆抗体的免疫测定、高效液相色谱法/荧光分光光度法等。

研究发现, 抗生素类污染物能干扰 DNA 的复制、修复等正常活动, 可能会导致遗传变化, 如 DNA 甲基化。Bardini (2003) 利用甲基化敏感扩增多态性分析法 (MSAP), 分析了 DNA 甲基化现象, 结果表明, 暴露在  $60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  卡那霉素下 7 d 的拟南芥, 其愈合组织中的 DNA 会同时发生作用于 CCGG 序列的甲基化和去甲基化作用。许多事实证明, 甲基



化功能障碍往往随着发生性异常出现。通常认为,DNA 甲基化是遗传学变化的指示器,其可能是引起体细胞突变的基本作用。基于这一点,它很可能会引起从单一点突变到染色体断裂或多倍体这样的染色体组突变。

DNA 链断裂也属 DNA 损伤。很多物质能够引起 DNA 链直接断裂,比如污染物代谢生成的自由基和去碱基位点,能够引起 DNA 分子内磷酸二酯键的断裂。当动物细胞遭受持续的氧化应激、脱嘌呤作用和内源亲电子受体如环氧乙烷的作用,就会产生 DNA 损伤(Valavanidis *et al.*, 2006)。青霉素的代谢也可导致 DNA 的损伤和致癌效应。及时测定 DNA 损伤程度,能够反映物质对机体的遗传毒性影响。因此,DNA 损伤检测对于评估污染物的行为与毒性具有重要意义。DNA 链断裂的经典研究方法主要有单细胞凝胶电泳技术、微核测定法等。随着分子生物学技术的飞速发展,出现了一系列以聚合酶链式反应为基础的、在分子水平上检测污染物导致生物体 DNA 损伤的 DNA 指纹技术,如功能基因组学、转录组、蛋白质组学和代谢组学等,这些技术与检测基因突变、染色体畸变和损伤为主的经典研究方法如彗星分析、微核实验等相比,具有简便、快速、灵敏等优点(齐雪梅等,2005)。

## 2 问题与展望

作为环境污染的标记,环境中发生的氧化损伤过程是对生态毒理学的扩展,所有这些研究证明了氧化损伤与其他生物标记物如基因毒性、免疫毒性等都会对大规模环境监测起到重要作用。目前,国内外对水环境体系的抗生素污染已开展很多研究,而土壤体系更为复杂,其中抗生素的分子水平毒性很少有人研究,需要进一步推进土壤-植物系统污染生态学研究向微观方向发展。另外,选用分子标志物对环境中抗生素污染进行早期预警,在操作和应用中还有很多问题亟待解决。分子标志物虽然可探讨低剂量环境污染物对机体有关代谢酶系和 DNA 的长期影响及可能的潜在危害,但是并没有一个标准体系确定达到什么程度可判断为产生损害,更无法判断环境中大量抗生素对生态系统的具体危害程度。如许多酶系为了抵御外源化合物的损伤以增强活性来促进污染物的代谢。实验中某些酶活性短时间增强后随即恢复到正常水平,有些则会长时间处于非正常活性状态,导致细胞损伤;而酶产生活

性诱导或抑制多长时间才算是受到损伤还未有定论。DNA 损伤的类型比较多,但测定 DNA 结构损伤仍存在相当多的困难,DNA 损伤的检测技术尚须进一步完善,灵敏度和专一性需进一步提高。环境污染水平与 DNA 加合物形成的程度以及最终效应(遗传疾病)之间的关系,突变响应剂量的确定等都相当复杂。基因表达的不同与性别、基因型、年龄和内在的遗传变异性有关,较难控制。且关于抗生素污染的分子毒理方面的研究还相当少。所以,如何评判不同抗生素的分子水平的损害程度是需要解决的问题,这也使得分子标志物在环境监测实际操作中的应用很大程度上受到了限制。在将来的研究工作中,需要通过分子标记物检测方法进一步的深入研究和完善,建立统一的评价标准。

在现阶段的研究中,国内工作多集中在单一化合物和单一暴露途径,这显然与实际的生态系统污染状况不同。作为受体的生物种或生态系统,往往暴露于来自多重途径的多种化合物的综合影响。另外,目前的研究多注重室内暴露和效应的关系,考虑到早期诊断作用,还应加强室外环境抗生素与其他污染物的复合污染研究。而且,实验室抗生素对生物分子水平影响的差异会比个体水平的差异大,生态系统中各指标的变化和相互关系复杂,实际环境因素更容易产生不同程度的差异。因此,更要注重实验条件的选择和其稳定性。

总之,从近几年的研究和发展趋势可以看出,随着生物技术的发展,采用现代分子生物学方法与技术研究污染物的代谢及其对细胞内分子的影响,采用分子水平的指示暴露-效应关系,利用污染早期预警系统制定预防性的管理措施,对及时避免或减轻环境污染的损害都具有相当的应用前景和重要意义。

## 参考文献

- 陈海刚,李兆利,徐 韵,等. 2006. 三种兽药添加剂对赤子爱胜蚓体内纤维素酶和 SOD 酶的活性影响. 南京大学学报(自然科学), **42**(4): 435-439.
- 龚鹏博,李健雄,郭明昉,等. 2007. 蚯蚓生态毒理试验现状与发展趋势. 生态学杂志, **26**(8): 1297-1302.
- 马 驿,陈杖榴. 2005. 兽药对生态环境影响的研究进展. 中国兽医科技, **35**(9): 746-751.
- 李 婷,周启星. 2006. 氯丙嗪生态毒理效应与人体健康影响研究与展望. 生态学杂志, **25**(12): 1554-1558.
- 刘 宛,李培军,周启星,等. 2004. 污染土壤的生物标记物研究进展. 生态学杂志, **23**(5): 150-155.
- 刘 宛,李培军,周启星,等. 2005. 环境污染条件下生物

- 体内 DNA 损伤的生物标记物研究进展. 应用与环境生物学报, **11**(2): 251–255.
- 齐雪梅, 李培军, 刘 宛, 等. 2005. DNA 指纹技术在污染土壤生态毒理诊断中的应用. 生态学杂志, **24**(11): 1351–1356.
- 生秀梅, 熊 丽, 唐红枫, 等. 2005. 细胞色素 P450 酶系作为生物标志物在毒理学上的应用. 四川环境, **24**(3): 74–78.
- 王 冉, 刘铁铮, 王 恬. 2006. 抗生素在环境中的转归及其生态毒性. 生态学报, **26**(1): 265–270.
- 王晓蓉, 罗 义, 施华宏. 2006. 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评价中的应用. 环境化学, **25**(3): 320–325.
- 王 轶, 唐 云, 徐凌凌, 等. 2009. 阿苯哒唑对蚯蚓的生态毒理效应. 应用生态学报, **20**(9): 2296–2300.
- 魏瑞成, 包红朵, 郑 勤, 等. 2009. 粪源抗生素金霉素和喹乙醇在养殖水体中的残留及对锦鲤的生态毒理效应研究. 农业环境科学学报, **28**(9): 1800–1805.
- 赵于丁, 徐敦明, 范青海. 2009. 生物标志物在农药水生态毒理学中应用的进展. 江苏农业学报, **25**(1): 203–209.
- 周 驰, 李纯厚. 2007. 生物大分子标记物检测在环境监测中的应用. 中国水产科学, **14**(5): 864–871.
- 周启星, 黄国宏. 2001. 环境生物地球化学和全球环境变化. 北京: 科学出版社.
- Andrews GK. 2000. Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions. *Biochemical Pharmacology*, **59**: 95–104.
- Bardini M, Labra M, Sala MWF. 2003. Antibiotic-induced DNA methylation changes in calluses of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **72**: 157–162.
- Brain RA, Wilson CJ, Johnson DJ, et al. 2005. Effects of a mixture of tetracyclines to *Lemna gibba* and *Myriophyllum sibiricum* evaluated in aquatic microcosms. *Environmental Pollution*, **38**: 425–442.
- Conrad CC, Walter CA, Richardson A, et al. 1997. Cadmium toxicity and distribution in metallothionein- I and II deficient transgenic mice. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, **52**: 527–543.
- Depledge MH, Fossi MC. 1994. The role of biomarkers in environmental assessment invertebrates. *Ecotoxicology*, **3**: 161–172.
- Gao YH, Sun ZJ, Sun XS, et al. 2007. Toxic effect of olaquinoxid antibiotic on *Eisenia fetida*. *European Journal of Soil Biology*, **43**: S252–S255.
- Gracey AY, Troll JV, Somero GN. 2001. Hypoxia-induced gene expression profiling in the euryoxic fish *Gillichthys mirabilis*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**: 1993–1998.
- Kägi JHR. 1991. Overview of metallothionein. *Methods in Enzymology*, **205**: 613–626.
- Kümmere K. 2009. Antibiotics in the aquatic environment: A review. Part I. *Chemosphere*, **75**: 417–434.
- LaCourse EJ, Hernandez-Viadel M, Jefferies JR, et al. 2009. Glutathione transferase (GST) as a candidate molecular-based biomarker for soil toxin exposure in the earthworm *Lumbricus rubellus*. *Environmental Pollution*, **157**: 2459–2469.
- Laville N, Aissa SA, Gomez E. 2004. Effects of human pharmaceuticals on cytotoxicity, EROD activity and ROS production in fish hepatocytes. *Toxicology*, **196**: 41–55.
- Lettieri T. 2006. Recent applications of DNA microarray technology to toxicology and ecotoxicology. *Environmental Health Perspectives*, **114**: 4–9.
- Liu F, Ying GG, Tao R, et al. 2009. Effects of six selected antibiotics on plant growth and soil microbial and enzymatic activities. *Environmental Pollution*, **157**: 1636–1642.
- Monari M, Foschi J, Cortesi P, et al. 2008. Chloramphenicol influence on antioxidant enzymes with preliminary approach on microsomal CYP1A immunopositive-protein in *Chamelea gallina*. *Chemosphere*, **73**: 272–280.
- Oost R, Beyer J, Vermeulen NPE. 2003. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, **13**: 57–149.
- Owen J, Svendsen BAH, Wren J, et al. 2008. Transcriptome profiling of developmental and xenobiotic responses in a keystone soil animal, the oligochaete annelid *Lumbricus rubellus*. *BMC Genomics*, **9**: 266.
- Park K, Bang HW, Park J, et al. 2009. Ecotoxicological multi-level-evaluation of the effects of fenbendazole exposure to *Chironomus riparius* larvae. *Chemosphere*, **77**: 359–367.
- Sarmah AK, Meyer MT, Boxall ABA. 2006. A global perspective on the use, sales, exposure pathways, occurrence, fate and effects of veterinary antibiotics (VAs) in the environment. *Chemosphere*, **65**: 725–759.
- Spurgeon DJ, Weeks JM, Cornelius AM, et al. 2003. A summary of eleven years progress in earthworm ecotoxicology. *Pedobiologia*, **47**: 588–606.
- Swenberg JA, Fryar-Tita E, Jeong YC, et al. 2008. Biomarkers in toxicology and risk assessment: Informing critical dose-response relationships. *Chemical Research in Toxicology*, **21**: 253–265.
- Thibaut R, Porte C. 2008. Effects of fibrates, anti-inflammatory drugs and antidepressants in the fish hepatoma cell line PL-HC-1: Cytotoxicity and interactions with cytochrome P450 1A. *Toxicology in Vitro*, **22**: 1128–1135.
- ThiTu H, Silvestre F, Scippo ML, et al. 2009. Acetylcholinesterase activity as a biomarker of exposure to antibiotics and pesticides in the black tiger shrimp (*Penaeus monodon*). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **72**: 1463–1470.
- Valavanidis A, Vlahogiannina T, Dassenakis M, et al. 2006. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, **64**: 178–189.
- Wang N, Nkejabega N, Hien NN, et al. 2009. Adverse effects of enrofloxacin when associated with environmental stress in Tra catfish (*Pangasianodon hypophthalmus*). *Chemosphere*, **77**: 1577–1584.
- Waring JF, Ciurlionis R, Jolly RA, et al. 2001. Microarray analysis of hepatotoxins in vitro reveals a correlation between gene expression profiles and mechanisms of toxicity. *Toxicology Letters*, **120**: 359–368.
- Wiseman SB, Vijayan MM. 2007. Aryl hydrocarbon receptor signaling in rainbow trout hepatocytes: Role of hsp90 and the proteasome. *Comparative Biochemistry and Physiology*, **146**: 484–491.

