

钩虾胆碱酯酶(ChE)和谷胱甘肽转硫酶(GST)的敏感性和特异性比较研究*

尹大强** 金洪钧 于红霞 陈良燕
(南京大学环境学院污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093)

【摘要】 研究了有机磷农药甲基嘧啶硫磷、有机氯农药林丹、菊酯类农药氯菊酯、表面活性剂直链苯磺酸钠和重金属 Zn 对钩虾(*Gammarus pulex* L.)胆碱酯酶(ChE)和谷胱甘肽转硫酶(GST)活性变化以及毒性影响。结果表明,在暴露 24h 和 48h 后,仅有机磷农药甲基嘧啶硫磷显著抑制胆碱酯酶的活性;在暴露 48h 后,有机氯农药林丹和菊酯类农药氯菊酯能显著提高谷胱甘肽转硫酶活性,在暴露 24h 后,仅林丹导致谷胱甘肽转硫酶明显升高。作为生物标志物,胆碱酯酶比谷胱甘肽转硫酶具有更高的特异性;这两种生物标志物较毒性试验方法具有更高的敏感性。

关键词 生物标志物 胆碱酯酶(ChE) 谷胱甘肽转硫酶(GST) 钩虾
文章编号 1001- 9332(2001)04- 0615- 04 中图分类号 X172 文献标识码 A

A comparative study on the sensitivity and specificity of cholinesterase and glutathione s transferase in *Gammarus pulex* L. YIN Daqiang, JIN Hongjun, YU Hongxia, CHEN Liangyan (The State Lab of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093). - Chin. J. Appl. Ecol., 2001, 12(4): 615~ 618.

Studies on the influences of lindane, pirimiphos methyl, permethrin, zinc and dodecyl linear alkybenzene sulfonate (LAS) on the activity and toxicity of cholinesterase (ChE) and glutathione s transferase (GST) in *Gammarus pulex* L. showed that only pirimiphos methyl caused a change in ChE activity in *Gammarus*, with a significant reduction in enzyme activity after 24h and 48h exposure. Both lindane and permethrin caused a change in GST activity in *Gammarus*, with a significant increase in enzyme activity after 48h exposure. Lindane also caused a significant increase in GST activity after 24h exposure. Biomarkers ChE and GST were demonstrated a high degree of specificity and sensitivity in comparison to the lethality assay, but GST activity was less specific than ChE activity.

Key words Biomarkers, ChE, GST, *Gammarus pulex* L.

1 引言

大量复杂的微量有毒有害化合物如环境雌激素排入水生生态系已对系统和人体健康产生了严重危害。监测和评价它们对水生生态的影响以及控制其排放是当前面临的挑战之一。多种生物测试方法如单物种毒性试验和微宇宙试验已广泛应用于评价和预测有毒有害化合物对水生生态系统的影响^[7]。尽管这些方法具有很高的生态相关性,但在监测和评价微量有毒有害化合物时却常常受到限制,如敏感性较低,不能阐明毒作用机制等^[8]。近年来,生物标志物(Biomarkers)由于具有对微量有毒有害化合物快速反应(< 48h),并且可被精确地测定的优点,因此得以迅速发展^[6]。它既可用于测定和预报微量有毒有害化合物对生态系统的影响,也可用来阐明微量有毒有害化合物的毒作用机制。然而,生物标志物对微量有毒有害化合物的敏感性和特异性还不十分清楚。仍需在环境监测中进一步研究应用,钩虾(*Gammarus pulex* L.)是水生生态系统中的重要类群,在水生态系统能量传递和物质循环

中起重要作用^[9]。钩虾对污染物具有较高的敏感性,已被广泛地运用于毒性试验^[1]。

本项研究选择钩虾作为模式生物^[8],应用胆碱酯酶(Cholinesterase, ChE)和谷胱甘肽转硫酶(Glutathione s transferase, GST)作为生物标志物,测定钩虾暴露于有机 P 农药、有机氯农药、菊酯类农药、重金属和表面活性剂 5 类化合物后这两种生物标志物的反应和变化,并与生物测试(单物种毒性试验)结果比较,试图阐明这两种生物标志物的敏感性和特异性,为其在环境监测和生态风险评价中的应用提供科学依据。

2 材料与方法

2.1 供试材料

2.1.1 试验生物 采自野外未受污染溪流的雄性钩虾,体长在 5~ 12mm 之间。在实验室驯养 1 周后用于试验。驯养温度 15± 1℃,光暗比为 12: 12。采集赤杨树叶,按 Naylor 方法制成食物^[9],每天喂 1 次。

* 国家自然科学基金(39770153)和中英合作资助项目。

** 通讯联系人。

2000- 06- 05 收稿,2000- 09- 11 接受。

2.1.2 受试化合物 选择有机磷农药甲基嘧啶硫磷($O[2(2$ 乙氨基)-6 甲基-4 嘧啶基]-O, O' -二甲基硫代磷酸酯, Pirimiphos methyl)、有机氯农药林丹(γ -六六六, Lindane)、菊酯类农药氯菊酯(3 苯氧基苯基)甲基 2, 2-二甲基 3-(2, 2-二氯-2-稀基)环丙烷羧酸酯, Permethrin)、表面活性剂直链烷基苯磺酸钠(LAS)和重金属 Zn($ZnSO_4$) 作为 5 类不同的受试化合物。甲基嘧啶硫磷、林丹和氯菊酯由英国 ZENeca 农业化学品公司提供, 直链烷基苯磺酸钠由英国 BRH 公司提供, $ZnSO_4$ 购自 BDH 实验化学品公司。5 种化合物纯度均大于 99%。

2.1.3 生化分析特殊试剂 5, 5'-二硫代二(2 硝基苯甲酸)(DTNB)、乙酰硫代胆碱碘化物(ATCI)、胆碱酯酶(ChE)、苯基甲基硫酰氟化物(PMSF)、1-氯-2, 4-二硝基苯(CDNB)、还原型谷胱甘肽(GSH)、谷胱甘肽转硫酶(GST)和标准牛血清蛋白(BSA)均购自 Sigma 公司, 纯度均大于 99%。蛋白质测定显色剂(Bio Rad protein assay dye reagent)购自德国 GmGH 公司。

2.2 研究方法

2.2.1 毒性试验 在 4L 玻璃水族箱中分别放入 3L 不同浓度的 5 种受试化合物, 每个化合物设置 5 个浓度组和一个稀释水对照组。梯度浓度分别为: 甲基嘧啶硫磷 1、2.5、5、10 和 $15\mu g \cdot L^{-1}$; 林丹 1、3、6、12 和 $24\mu g \cdot L^{-1}$; 氯菊酯 0.04、0.08、0.16、0.30 和 $0.60\mu g \cdot L^{-1}$; Zn^{2+} 1、2、4、6 和 $8mg \cdot L^{-1}$; 直链烷基苯磺酸钠 1、2、4、8 和 $12mg \cdot L^{-1}$ 。每个浓度组和对照组放置 10 只钩虾, 设 3 个平行。试验溶液每天全部更换 1 次, 同时测定 DO、pH 和电导率。试验温度 $15 \pm 1^\circ C$, 光暗比 12: 12, 试验期间不喂食。观察 24、48、72、96、120 和 144h 钩虾死亡数。用毒性分析软件(Microsoft Visual Basic)计算不同暴露时间每种化合物的半致死浓度(LC₅₀)值。

2.2.2 生物标志物试验 钩虾暴露于 5 种受试化合物中, 每种化合物的暴露浓度、方法和试验设计均同于上述毒性试验。试验分 2 套, 1 套暴露 24h, 另一套暴露 48h。在 24 和 48h 暴露后, 分别取所有活体钩虾, 用吸水纸吸去钩虾体表试验溶液后放入干净的 Eppendorf 管中, 将 Eppendorf 管浸入液氮($-196^\circ C$)20s 后, 放入低温冰箱($-70^\circ C$)保存备用。每只钩虾头组织用于 ChE 活性测定, 而躯体组织用于 GST 活性测定。

2.2.3 ChE 活性测定 ChE 活性测定按 Ellman 的方法并进行修正^[4], 以 ATCI 作为酶反应底物。取低温保存的钩虾头 1 只, 放入干净的 Eppendorf 管中, 加入 30 μ l 0.02M 磷酸缓冲液(pH 8.0), 碾碎后加入相同的磷酸缓冲液 270 μ l, 离心 3min($14000 \times g$)。取 200 μ l 离心上清液, 用 0.02M 磷酸缓冲液(pH 8.0)稀释到 1ml, 稀释后样品用于 ChE 活性和蛋白质含量测定。所有过程在 $4^\circ C$ 下进行。

取 1 个 96 井酶标仪平板, 每井按次序分别加入 100 μ l 8mM DTNB、50 μ l 待测样品和 50 μ l 16mM ATCI。每个待测样品进行 4 个平行。用 Anthos Lab tech HT III 型酶标仪在 405nm 处测定 OD 值。测试温度为 $30^\circ C$, 在 30s 内测定 10 个重复。每只钩虾头组织 ChE 活性被分别计算。

另取 1 个 96 井酶标仪平板, 每井按次序分别加入 200 μ l Bio Rad 蛋白质测定显色剂、80 μ l 待测样品和 720 μ l 0.02M 磷

酸缓冲液(pH 8.0)在 $20^\circ C$ 下反应 5min 后, 用酶标仪在 620nm 处测定 OD 值。用相同方法, 以标准牛血清蛋白(BSA)绘制成蛋白质含量标准曲线。查标准曲线得出待测样品的蛋白质含量。

由下式计算 ChE 活性, 表达为 $nmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ 蛋白质。

$$ChE \text{ 活性} = (OD \times R \times 1000) / (\varepsilon \times S \times W \times P)$$

式中, OD 为平均吸光度, $OD_{405 nm} \cdot min^{-1}$; ε 为消光系数, $13600 mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; S 为待测样品体积, μ l; R 为反应总体积, μ l; W 为蛋白质含量, μ g; P 为光穿透长度, 0.6cm。

2.2.4 GST 活性测定 GST 活性测定按 Habig 的方法进行并进行修正^[5], 以 CDNB 作为酶反应底物。取低温保存钩虾躯体 1 只, 放入干净 Eppendorf 管中, 加入 100 μ l 0.02mol L^{-1} 磷酸缓冲液(pH 6.5, 含有 1.0% PMSF), 碾碎后加入相同的磷酸缓冲液 900 μ l, 离心 3min($14000 \times g$)。取 100 μ l 离心上清液, 用 0.02mol L^{-1} 磷酸缓冲液(pH 6.5, 含有 1.0% PMSF)稀释到 1ml, 稀释后的样品用于 GST 活性和蛋白质含量测定。所有过程在 $4^\circ C$ 下进行。

取 1 个 96 井酶标仪平板, 每井分别加入 50 μ l 待测样品和 150 μ l 混合测定试剂。该混合试剂由 5 份 20mM GSH 溶液、9 份 0.02mol L^{-1} 磷酸缓冲液(pH 6.5)和 1 份 40mM CDNB 溶液配制而成。用 Anthos Lab tech HT III 型酶标仪在 340nm 处测定 OD 值, 测试温度为 $30^\circ C$, 在 30s 内测定 10 个重复。每只钩虾躯体组织 GST 活性被分别计算。

待测样品蛋白质含量测定与上述蛋白质含量测定相同。GST 活性表达为 $nmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ 蛋白质, 由下式计算:

$$GST \text{ 活性} = (OD \times R \times 1000) / (\varepsilon \times S \times W \times P)$$

式中, OD 为平均吸光度, $OD_{340 nm} \cdot min^{-1}$; ε 为消光系数, $19600 mol^{-1} \cdot cm^{-1}$; S 为待测样品体积, μ l; R 为反应总体积, μ l; W 为蛋白质含量, μ g; P 为光穿透长度, 0.6cm。

2.2.5 统计学方法 采用计算机统计软件(Minitab for Windows)进行统计分析。所有酶活性数据首先进行正态分布分析, 然后进行方差分析和组间显著性比较。组间显著性比较采用 Tukey 多组间比较方法。

3 结果与分析

3.1 毒性试验

不同暴露时间 5 种化合物对钩虾的半致死浓度(LC₅₀)列入表 1。从表 1 可知, 在 96、120 和 144h, 5 种化合物对钩虾毒性的顺序均为: 氯菊酯 > 甲基嘧啶硫磷 > 林丹 > Zn > 直链烷基苯磺酸钠。所有试验组溶解氧为 $7.75 \pm 0.4 mg \cdot L^{-1}$, pH 7.3 ± 0.2 , 电导率为 $571 \pm 11 \mu S \cdot cm^{-1}$ 。

3.2 ChE 活性

钩虾分别暴露于 5 种化合物 24 和 48h 后, 在不同浓度组钩虾头组织的 ChE 活性变化见图 1。经统计分析, 所有对照 ChE 活性为 $0.25 nmol \cdot min^{-1} \cdot \mu g^{-1}$ 蛋白质, 各对照组间无显著差异($F_{4,109} = 0.623, \alpha = 0.65$)。统计分析表明, 仅有甲基嘧啶硫磷对钩虾 ChE 活性产

表 1 不同暴露时间 5 种化合物对钩虾的半致死浓度(LC₅₀)
Table 1 Median lethal concentration (LC₅₀) and exposure time of *G. pulex* for five test chemicals

化合物 Chemicals	暴露时间 Exposure time(h)					
	24	48	72	96	120	144
甲基嘧啶硫磷	23.91*	7.17	4.99	3.63	2.79	1.90
Pirimiphos methyl($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	(10.58~ 37.25)	(6.77~ 7.57)	(4.48~ 5.49)	(2.58~ 4.67)	(2.48~ 3.11)	(1.70~ 2.99)
氯菊酯						
Permethrin($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	> 0.6	> 0.6	> 0.6	0.58 (0.42~ 0.75)	0.34 (0.29~ 0.37)	0.23 (0.22~ 0.24)
林丹						
Lindane($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	> 24	> 24	> 24	16.99 (16.29~ 17.71)	11.88 (11.63~ 12.13)	10.07 (9.71~ 10.44)
Zn ²⁺						
($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	> 8.0	4.92 (4.30~ 5.55)	2.63 (2.45~ 2.81)	2.15 (2.07~ 2.22)	1.60 (1.55~ 1.66)	1.38 (1.32~ 1.43)
LAS						
($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	> 12	11.25 (10.17~ 12.32)	8.27 (7.06~ 9.49)	6.31 (4.96~ 7.66)	4.61 (4.29~ 4.95)	3.85 (3.06~ 4.64)

* 平均值 Averg values (95% 可信限 95% C. I.). 下同 T he same below .

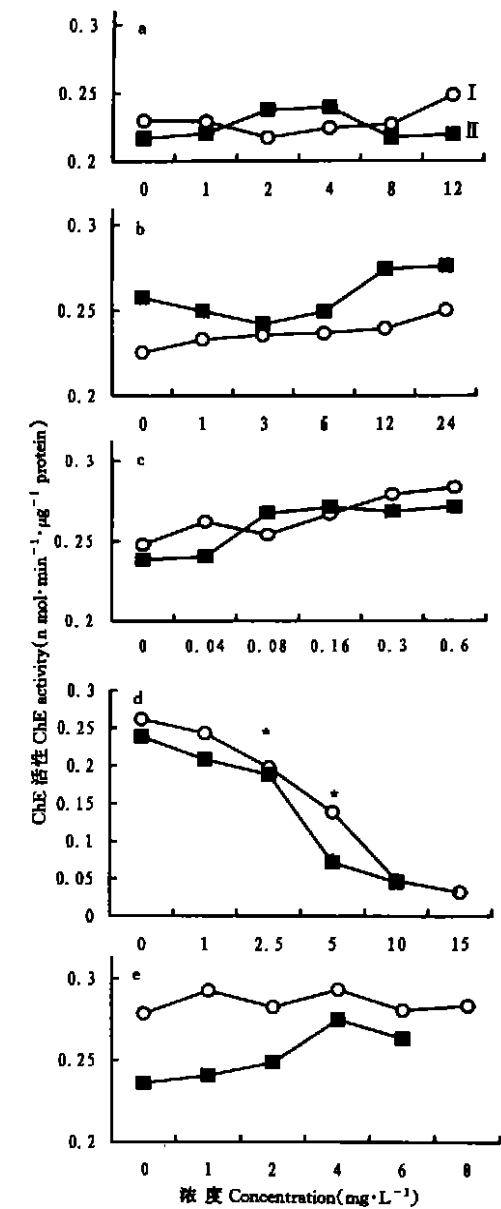


图 1 5 种化合物对钩虾 ChE 活性的影响
Fig. 1 Effects of 5 chemicals on ChE activity of *G. pulex*.
I . 48h 暴露 48h exposure; II. 24h 暴露 24h exposure; * 差异显著 Signif
icantly different from the control. 下同 T he same below .

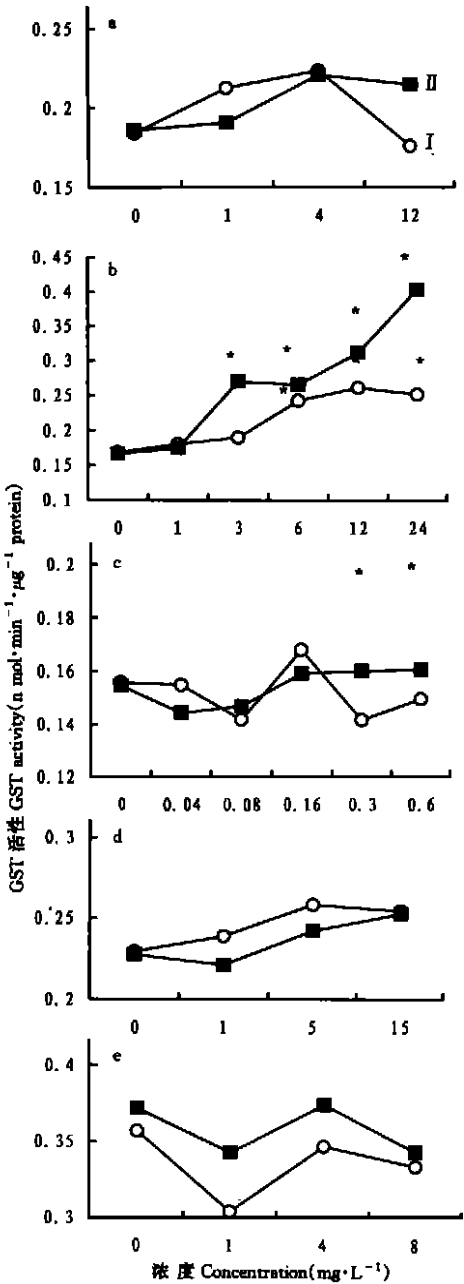


图 2 5 种化合物对钩虾 GST 活性的影响
Fig. 2 Effect of 5 chemicals on GST activity of *G. pulex*.

生显著影响($\alpha < 0.01$), 暴露 24 和 48h 后均导致 ChE 活性显著下降(图 1d), 而其余 4 种化合物对钩虾 ChE 活性无明显影响. 钩虾暴露于 $2.5\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基嘧啶硫磷 24h 后, 与对照相比, 其 ChE 活性显著下降($F_{4,103} > 117.6, \alpha < 0.001$), 而暴露 48h 后, $1\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基嘧啶硫磷就导致了 ChE 活性显著下降($F_{4,104} > 117.6, \alpha < 0.001$). 在最高浓度组($15\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), 其 ChE 活性比对照下降了 87%. 当钩虾暴露于甲基嘧啶硫磷和 Zn 48h 后, 最高浓度组($15\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基嘧啶硫磷和 $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn) 钩虾已全部死亡, 未能测定 ChE 活性(图 1d, e).

3.3 GST 活性

钩虾分别暴露于 5 种化合物 24 和 48h 后, 不同浓度组钩虾躯体组织的 GST 活性变化见图 2. 由图 2 可知, 所有对照组 GST 活性为 $0.20\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\mu\text{g}^{-1}$ 蛋白质, 各对照组间无显著差异($F_{4,89} = 1.468, \alpha = 0.21$). 统计分析表明, 在 48h 暴露后, $3\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 林丹和 $0.30\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯菊酯能导致钩虾 GST 活性显著升高($F_{5,120} > 4.70, \alpha < 0.001$), 并随着化合物浓度增加, 酶活性不断升高, 在最高浓度组($24\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 林丹和 $0.60\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 氯菊酯), 其 GST 活性分别比对照组升高 127.3% (林丹) 和 39.1% (氯菊酯) (图 2b, c). 在 24h 暴露后, 仅有林丹能导致钩虾 GST 活性显著升高, $6\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组与对照组间存在显著差异($F_{5,124} = 13.36, \alpha < 0.001$) (图 2b). 然而, 通过对甲基嘧啶硫磷、Zn 和 LAS 高、中、低 3 个暴露浓度钩虾 GST 分析, 即 $1, 5$ 和 $15\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 甲基嘧啶硫磷, $1, 4$ 和 $8\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Zn, $1, 4$ 和 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LAS, 甲基嘧啶硫磷、Zn 和 LAS 在 24 和 48h 均不能产生对钩虾 GST 活性影响(图 2a, d, e).

4 讨 论

研究表明, 在 5 类化合物中, 有机磷农药甲基嘧啶硫磷能抑制钩虾 ChE 的活性, 有机氯农药林丹和菊酯类农药氯菊酯能导致钩虾 GST 活性升高. ChE 比 GST 具有较高的特异性. 已有报道^[3], ChE 的抑制能产生生物机体的神经毒作用, ChE 活性仅能被有机磷和氨基甲酸酯农药抑制, 具有很高的特异性. GST 是污染物在体内代谢相 II 的重要酶之一, 是一种高诱导性酶, 具有广泛的作用底物. 农药、多环芳烃、多氯联苯等均可诱导 GST, 使其活性升高^[6,8].

经统计分析, 甲基嘧啶硫磷对钩虾 ChE 活性抑制

以及林丹和氯菊酯对钩虾 GST 活性诱导均具较高的剂量-效应关系. 运用美国环保局亚急性毒性效应浓度计算软件(USEPA: The Inhibition Concentration (ICp) Approach), 计算获得 3 种化合物对 2 种酶活性影响的效应浓度(EC_{25} 和 EC_{50}) (表 2). 比较表 1、2 可知, ChE 和 GST 作为生物标志物, 其敏感性显著高于半致死浓度(LC_{50}), 而且具有快速反应性($< 48\text{h}$).

表 2 3 种化合物对钩虾 ChE 和 GST 活性影响的效应浓度
Table 2 EC_{50} and EC_{25} of biomarkers (ChE and GST) for *G. pulex* exposed to three test chemicals for 24 and 48 hours($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)

化合物 Chemicals	生物标志物 Biomarkers	24h		48h	
		EC_{25}	EC_{50}	EC_{25}	EC_{50}
甲基嘧啶硫磷 Pirimiphos methyl	ChE	2.1 ^a (1.6~2.8)	4.7 (4.3~5.2)	2.1 (1.6~2.5)	3.4 (3.2~3.6)
林丹 Lindane	GST	9.7 (7.4~15.1)	> 38.5	4.4 (3.2~5.3)	25.8 (10.5~34.3)
氯菊酯 Permethrin	GST	-	-	0.11 (0.08~0.26)	> 0.45

本研究表明, 钩虾作为模式生物, 可运用于生物标志物的研究. 而其 2 种生物标志物(ChE 和 GST) 在真实环境中应用还需做进一步的野外研究.

致谢 研究工作在英国 Sheffield 大学完成.

参考文献

1 Blockwell SJ, Pascoe D, Taylor EJ. 1996. Effects of Lindane on the growth of the freshwater amphipod *Gammarus pulex*. *Chemosphere*, **32**: 1795~1803

2 Crane M, Delaney P, Watson S *et al*. 1995. The effect of malathion 60 on *Gammarus pulex* (L.) below watercress beds. *Environ Toxicol Chem*, **14**(7): 1181~1188

3 Day K, Scott IM. 1990. Use of acetylcholinesterase activity to detect sub lethal toxicity in stream invertebrates exposed to low concentration of organophosphate insecticide. *Aqua Toxicol*, **18**: 101~114

4 Ellman LG, Dime Courtney K, Valentino Anders JR. 1961. A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity. *Biochem Pharmacol*, **7**: 88~95

5 Habig WH, Pabst JM, Jakoby BW. 1974. Glutathione S transferase: The first enzymatic step in mercapturic acid formation. *J Biol Chem*, **249**: 7130~7139

6 Huggett JR, Kimerle AR, Mehrle MP Jr. 1992. Biomarkers: Biochemical, Physiological and Histological Markers of Anthropogenic Stress, Lewis Publishers. 121 South Main Street, Chelsea, MI 48118, USA. 1~3

7 Maltby L, Calow P. 1989. The application of bioassay in the resolution of environmental problems: Past, present and future. *Hydrobiologia*, **188/189**: 65~76

8 McCarthy FJ, Shugart RL. 1990. Biological Markers of Environmental Contamination, Lewis Publishers. 121 South Main Street, Chelsea, MI 48118, USA. 3~14

9 Naylor C, Maltby L, Calow P. 1989. Scope for growth in *Gammarus pulex*, a freshwater benthic detritivore. *Hydrobiologia*, **188/189**: 517~523

作者简介 尹大强, 男, 1962 年生, 教授, 主要从事生态毒理学方面的教学与研究工作, 发表论文 30 余篇. Tel: 025-3593262, E-mail: yindq@nju.edu.cn