

四溴二苯醚与高氯酸盐联合暴露 对成年斑马鱼肝脏抗氧化系统的影响

任 新,赵雪松,段小月,刘 萍,贾晨梦,庞蒙蒙

(吉林师范大学 环境科学与工程学院,吉林 四平 136000)

摘要:实验选择四溴二苯醚(BDE-47)与高氯酸盐(PER)作为研究对象,系统研究了二者联合暴露对成年斑马鱼肝脏抗氧化系统的影响。实验设置(BDE-47 8.5+PER 335)mg/L,(BDE-47 0.85+PER 33.5)mg/L,(BDE-47 0.085+PER 3.35)mg/L 三种联合暴露组及二者各自单一的暴露组。暴露 14 天后,分别测定雌雄斑马鱼肝脏内超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、谷胱甘肽过氧化物酶(Gpx)活性以及脂质过氧化物(MDA)水平。结果显示,与两种物质单一暴露相比,联合暴露致使肝脏内 SOD,CAT 的活性增加,MDA 水平增加,而 GSH 活性降低,实验说明,PER 诱导加剧了 BDE-47 对成年斑马鱼肝脏抗氧化酶的影响,进一步产生了氧化应激。

关键词:四溴二苯醚;高氯酸盐;联合暴露;成年斑马鱼;抗氧化系统

中图分类号:X171.5 **文献标志码:**A **文章编号:**1672-349X(2018)03-0029-06

DOI:10.16160/j.cnki.tsxyxb.2018.03.007

Effects of Combined Exposure of Tetrabromodiphenyl Ether and Perchlorate on Antioxidant System in Adult Zebrafish Liver

REN Xin, ZHAO Xue-song, DUAN Xiao-yue, LIU Ping,
JIA Chen-meng, PANG Meng-meng

(School of Environmental Science and Engineering, Jilin Normal University, Siping 136000, China)

Abstract: The effects of combined exposure of tetrabromodiphenyl ether and perchlorate on the antioxidant system in adult zebrafish liver were studied systematically. In the experiment, the combinations of the two substances were set at (tetrabromodiphenyl ether 8.5+ perchlorate 335) mg/L, (tetrabromodiphenyl ether 0.85+ perchlorate 33.5) mg/L, (tetrabromodiphenyl ether 0.085+ perchlorate 3.35) mg/L, and the zebrafish were exposed to the three combinations respectively, and to each of the two substances. 14 days after the exposure, the activity of superoxide dismutase, catalase, glutathione peroxidase and lipid peroxide in the liver of male and male zebra fish were measured. The results show that compared with the single exposure of the two substances, the activity of superoxide dismutase,

基金项目:国家自然科学基金项目(21507039);吉林省科技厅青年科研基金项目(20170520072JH)

作者简介:任新(1984—),男,吉林敦化人,讲师,博士,主要从事水污染控制技术研究。

catalase increases in the liver, the lipid peroxide level also increases, and the activity of GSH decreases, under the exposure of tetrabromodiphenyl ether and perchlorate. The experiment also indicates that perchlorate aggravates the effect of tetrabromodiphenyl ether on the antioxidant enzymes in the liver of adult zebrafish, thus producing the oxidative stress.

Key Words: tetrabromodiphenyl ether; perchlorate; combined exposure; adult zebrafish; antioxidant system

高氯酸盐(Perchlorate, PER)是一种新型持久性无机污染物,常应用于燃料氧化剂和易燃物,也应用于化肥、皮革加工等生活领域^[1]。PER 极易溶于水,这一特性导致它在自然环境中具有很强的稳定性,易迁移扩散,同时它还具有显著甲状腺毒性、遗传毒性、生殖毒性等,进入生物体内会影响生物体甲状腺功能,对人体新陈代谢造成极大危害^[2-5]。多溴联苯醚(Poly brominated diphenyl ethers, PBDEs)是一组工业化学物,在人类活动中作为阻燃剂被广泛使用^[6]。PBDEs 具有高度疏水亲脂性、生物富集性和难降解性等特点,同时又具有典型的甲状腺毒性、神经毒性以及潜在的生殖毒性^[7-9],致使其成为了一种存在于各类环境介质中甚至存在于人体组织中的环境污染物。PBDEs 有 209 种同系物,其中目前在生物体包括人体组织中检出率最高的是四溴二苯醚(BDE-47)^[10]。

斑马鱼(Danio rerio)是一种热带淡水鱼,身体细长,体型很小,长约 4~6 cm,由于其本身个体小,少量花费便足以支持对其的养殖,而且它繁殖能力强,适合大规模繁育。目前它作为脊椎动物的模型广泛应用于神经发育毒性的研究,同时也是研究胚胎发育分子机制的优良资源。

多溴联苯醚在自然环境中广泛存在,无时无刻不在威胁着各类生物的生命和健康。现在对多溴联苯醚的单一毒性研究较多,但在自然界中,污染物往往不是独立存在的,而是多种污染物同时存在于一个环境体系内影响着环境内的各类生物,所以需要考察联合污染物的复合毒性。本实验选取 BDE-47 与 PER 为研究对象,以成年斑马鱼为受试生物,系统研究两种物质对斑马鱼的联合毒性效应,主要分析对斑马

鱼肝脏抗氧化系统的影响,拟为完善复杂水环境的环境毒理学研究提供基础数据,为进一步进行环境生态风险评价奠定理论基础。

1 实验部分

1.1 斑马鱼的养殖

本实验所用斑马鱼购自中国科学研究院武汉水生所,鱼身长约 3~4 cm。斑马鱼的养殖方法参照 Yu 等^[8]介绍的养殖方法。将性成熟的斑马鱼养殖于自制的循环消毒系统中,如图 1 所示,循环水中加入营养盐(64.75 mg/L NaHCO_3 , 5.75 mg/L KCl , 123.25 mg/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 294 mg/L $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),并维持水温在 $28 \pm 1^\circ\text{C}$, pH 值为 6.85~7.0,光照周期为 12 h 明/12 h 暗。每天两次投喂经紫外消毒的红赤虫,养殖 1 个月后可进行实验。

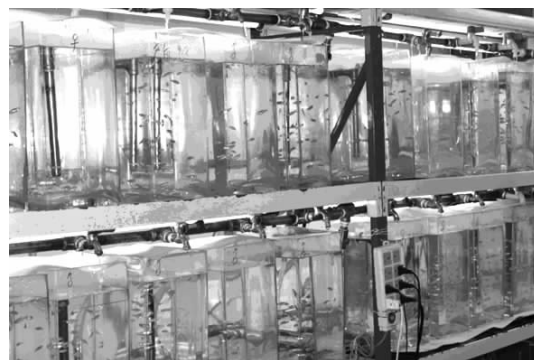


图 1 斑马鱼养殖装置

1.2 暴露溶液的配制

BDE-47(2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether, Wellington, 加拿大,纯度 >99.9%)不溶于水,故选取二甲基亚砜(DMSO)对 BDE-47 粉末进行溶解,配制 1 mg/mL 浓度的 BDE-47 储备液,同时配制 3.35 mg/L, 33.5 mg/L, 335 mg/L 的 PER(Invitrogen, 美国,纯度 99%)溶液。分别在 PER 溶液中加入不同体积的 BDE-

47 储备液,稀释至所需浓度,配制成 3 种不同浓度的 BDE-47 与 PER 的混合液,分别为 (BDE-47 8.5+PER 335)mg/L, (BDE-47 0.85+PER 33.5)mg/L, (BDE-47 0.085+PER 3.35)mg/L。将所得的 3 种浓度的溶液分别装瓶并标注。稀释水均为养殖斑马鱼的循环水。

1.3 暴露方法

将成年斑马鱼以每组雌雄各 20 条的搭配方式置于培养器中进行培养,根据浓度和成分的不同设置 11 组暴露溶液,分别为 3 组不同浓度的 BDE-47 溶液 (8.5 mg/L, 0.85 mg/L, 0.085 mg/L), 3 组不同浓度的 PER 溶液 (335 mg/L, 33.5 mg/L, 3.35 mg/L), 3 组不同浓度的联合暴露溶液 (BDE-47 8.5+PER 335) mg/L, (BDE-47 0.85+PER 33.5) mg/L, (BDE-47 0.085+PER 3.35) mg/L, 实验同时设置空白对照组以及 0.3% 的 DMSO 对照组。暴露 14 天后对雌雄斑马鱼进行取样,取样后提取成年斑马鱼的肝脏,制成 10% 的组织匀浆进行抗氧化系统的检测。

1.4 抗氧化系统指标测定方法

在暴露 14 天后,从各浓度组中分别提取 5 条雌性成年斑马鱼及 5 条雄性成年斑马鱼并将其分别开,用 MS-222 进行麻醉后,提取斑马鱼的肝脏。由于斑马鱼是弥散性肝脏,提取时要注意不能混入脂肪。然后,加入组织块 9 倍重量的冷生理盐水,通过机械匀浆机进行匀浆,取上清液,得到 10% 的组织匀浆。

抗氧化系统的检测主要测定斑马鱼肝脏内的超氧化物歧化酶 (SOD) 活性、过氧化氢酶 (CAT) 活性、谷胱甘肽 (GSH) 活性以及丙二醛 (MDA) 水平。所有抗氧化酶试剂盒均购自南京建成生物有限公司,测定流程按照说明书严格操作。

1.5 数据统计分析

实验数据使用 Kolmogorov-Smirnov 进行检验分析,并应用 Levene's 检验分析方差的同质性。所有统计分析应用 SPSS 17.0 软件 (SPSS, Chicago, USA) 进行操作。当 $p < 0.05$ 时,判定存在显著性差异。实验数据以平均值

±标准差 (SEM) 给出,所有数据采用 Origin 8.0 软件进行数据作图。

2 结果与讨论

2.1 BDE-47 与 PER 复合对成年斑马鱼肝脏 SOD 活性的影响

超氧化物歧化酶 (Orgotein Superoxide Dismutase, SOD) 能够将生物体在新陈代谢中生成的有害物质清除。根据与之结合的金属离子的种类不同可以分为 3 种 SOD: 分别是含铜与锌超氧化物歧化酶 (Cu-ZnSOD)、含铁超氧化物歧化酶 (Fe-SOD) 和含锰超氧化物歧化酶 (Mn-SOD)。这 3 种 SOD 都能起到催化超氧化物阴离子自由基的作用,并将之歧化为 H_2O_2 与 O_2 。当外源物质刺激生物机体,导致生物机体自身的氧化机团增加时, SOD 会最先启动,对氧化机团所造成的损伤进行抵抗^[11]。

BDE-47 与 PER 联合暴露后斑马鱼肝脏 SOD 活性的变化如图 2 所示。对于雌雄斑马鱼而言, PER 单独暴露组 SOD 的活性与对照组相比没有显著的变化,而 BDE-47 单独暴露以及二者联合暴露后雌雄斑马鱼肝脏内的 SOD 活性均随浓度的增加而增加,而且联合暴露组 SOD 的活性高于两种物质单一暴露。由此可见, PER 的加入能够加剧 BDE-47 对 SOD 活性的诱导。同时,雌鱼 SOD 的活性高于雄鱼,说明 BDE-47 与 PER 联合暴露对斑马鱼肝脏 SOD 活性的作用存在性别差异。吉贵祥等^[12]对斑马鱼胚胎及幼鱼的 BDE-47 急性毒性实验也发现,随着 BDE-47 暴露浓度的增加, SOD 的活性也显著增强。Albina 等^[13]研究了 BDE-99 对成年鼠肝脏与肾脏的氧化激,结果显示 BDE-99 能显著地诱导 SOD 的活性。

2.2 BDE-47 与 PER 复合对成年斑马鱼肝脏 CAT 活性的影响

过氧化氢酶 (Catalase, CAT) 以在过氧化体中存在的形式存在于红细胞及某些组织内,主要作用是将 H_2O_2 催化分解为 H_2O 与 O_2 , 使之无法与 O_2 在铁螯合物催化作用下发生反应,从而避免生成有害的 $\cdot OH$ ^[11]。

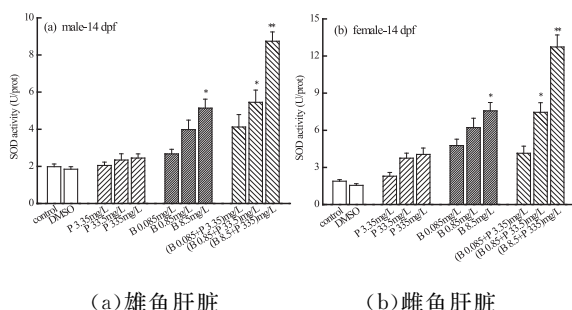


图 2 BDE-47 与 PER 联合暴露后斑马鱼
肝脏 SOD 活性的变化

说明: * $p < 0.05$ 和 * * $p < 0.01$ 表示暴露组与对照组相比差异显著(下同)

图 3 显示了暴露 14 天后雌雄斑马鱼肝脏内 CAT 的活性。由图 3 可知 PER 暴露组 CAT 活性没有显著的变化,而 BDE-47 暴露组 CAT 活性呈现浓度依赖关系,且 8.5 mg/L 处理组 CAT 的活性较对照组显著增加。说明高浓度 BDE-47 暴露后,胚胎受到外源有毒物质的刺激,胚胎细胞内超氧阴离子(O_2^-)和过氧化氢(H_2O_2)等 ROS 显著增加,为了维持机体自由基的产率与抗氧化系统清除自由基的动态平衡,机体自身 CAT 启动。由图 3 还可以看出,联合暴露组也呈现浓度依赖关系,显著上升出现在 0.85 mg/L BDE-47 + 33.5 mg/L PER 暴露组以及 8.5 mg/L BDE-47 + 335 mg/L PER 暴露组($p < 0.05$)。同时,雌性成年斑马鱼与雄性成年斑马鱼的 CAT 活性变化十分相似,初步判断该现象与 SOD 活性同步变化有关,可能是由于 CAT 协同 SOD 抵抗氧化胁迫所造成的结果。与单独暴露组相比,联合暴露组呈现的高活性 CAT 表明二者联合对斑马鱼产生的氧化胁迫程度更强,对 CAT 的诱导更强。

2.3 BDE-47 与 PER 复合对成年斑马鱼肝脏 GSH 活性的影响

谷胱甘肽(glutathione; GSH)是一种有抗氧化和整合解毒的三肽,能够参与生物转化,将侵入生物机体内的有害毒物转化并排出体外^[11]。BDE-47 与 PER 联合暴露后斑马鱼肝脏 GSH 活性的变化如图 4 所示,对于雌性而言,PER 单独暴露肝脏内 GSH 活性没有显著

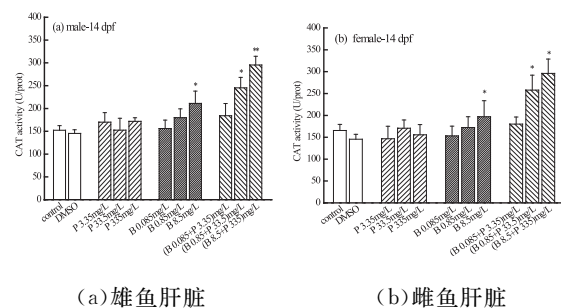


图 3 BDE-47 与 PER 联合暴露后斑马鱼
肝脏 CAT 活性的变化

变化,而 8.5 mg/L BDE-47 处理组中肝脏内 GSH 的活性较对照组显著降低($p < 0.05$)。表明 PER 加入后,机体产生多余的自由基由 GSH 抵消而导致 GSH 含量降低,说明此时雄性斑马鱼氧化胁迫较大。He 等^[14]发现,BDE-47 暴露能够使鼠海马神经元产生氧化应激反应,随着暴露剂量的增加,GSH 浓度也呈现降低趋势。

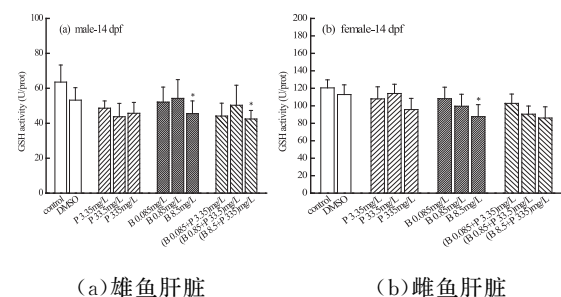


图 4 BDE-47 与 PER 联合暴露后斑马鱼
肝脏 GSH 活性的变化

2.4 BDE-47 与 PER 复合对成年斑马鱼肝脏 MDA 水平的影响

丙二醛(MDA)是膜脂过氧化最重要的产物之一。MDA 的含量变化可以反映出机体内脂质过氧化的程度,从而间接反映出细胞损害的程度,相对于鱼类模型而言,MDA 常作为环境污染物毒性效应的敏感指示物出现在毒理学实验中。

图 5 显示了 BDE-47 与 PER 联合暴露 14 天后雌雄鱼肝脏内 MDA 的水平。由图 5 可知,对于雄性斑马鱼而言,PER 单独暴露肝脏内的 MDA 水平均没有显著差异;而在 BDE-47 单一暴露组中,雌雄鱼肝脏内 MDA 的水平均上升且呈现浓度依赖关系,且在高浓度暴露组

中MDA水平上升显著。在联合暴露组中,MDA均显著上升并存在剂量效应关系,且大于BDE-47单一暴露组。研究结果表明,BDE-47单一暴露组与联合暴露组均能诱导肝脏发生脂质过氧化,且联合暴露组诱导性更强,说明PER能够加剧BDE-47诱导肝脏产生氧化应激反应。在早期的BDE-47与PER对斑马鱼胚胎氧化应激的研究中也得出了类似结果^[15]。吉贵祥等^[12]通过实验也得出了相似结论,MDA含量的变化与BDE-47浓度的变化呈现正相关关系。

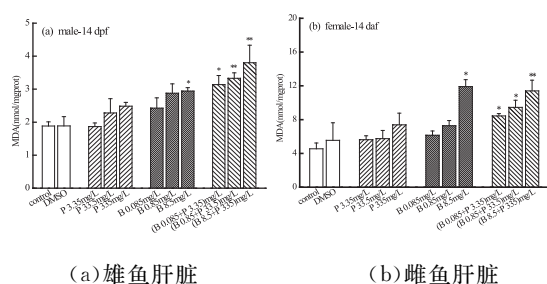


图5 BDE-47与PER联合暴露后斑马鱼肝脏MDA水平的变化

3 结论

通过对BDE-47与PER联合暴露后斑马鱼肝脏SOD,CAT,GSH与MDA抗氧化指标的分析,可见PER加入后的联合暴露组SOD,CAT的活性以及MDA水平显著增加,GSH显著降低,表明PER能加剧BDE-47对抗氧化系统的影响,产生氧化应激反应,加大氧化损伤。

参考文献:

[1] ORTIZ-SANTALIESTRA M E, SPARLING D W. Alteration of larval development and metamorphosis by nitrate and perchlorate in southern leopard frogs (*Rana sphenoccephala*) [J]. Archives of environmental contamination and toxicology, 2007, 53(4): 639 - 646.

[2] 于佳, 宋建平, 唐玄乐, 等. 高氯酸盐的急性毒性和遗传毒性研究 [J]. 毒理学杂志, 2007 (4): 267 - 269.

[3] WU F H, CHEN H X, ZHOU X Z, et al. Pulmonary fibrosis effect of ammonium perchlorate exposure in rabbit [J]. Archives of environmental & occupational health, 2013, 68(3): 161 - 165.

[4] MAVIS R D, DESESSO J M. Developmental perchlorate exposure and synaptic transmission in hippocampus [J]. Environmental health perspectives, 2009, 117 (6): A236 - A237.

[5] MENDEZ W, DEDERICK E, COHEN J. Drinking water contribution to aggregate perchlorate intake of reproductive-age women in the United States estimated by dietary intake simulation and analysis of urinary excretion data [J]. Journal of exposure science and environmental epidemiology, 2010, 20(3): 288 - 297.

[6] VERNER M A, BOUCHARD M, FRITSCH E, et al. In vitro neurotoxicity data in human risk assessment of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs): Overview and perspectives [J]. Toxicology in vitro, 2011, 25(8): 1509 - 1515.

[7] ERRATICO C A, MOFFATT S C, BANDIERA S M. Comparative oxidative metabolism of BDE-47 and BDE-99 by rat hepatic microsomes [J]. Toxicological sciences, 2011, 123(1): 37 - 47.

[8] YU L, DENG J, SHI X, et al. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae [J]. Aquatic toxicology, 2010, 97: 226 - 233.

[9] BEN HASSINE S, BEN AMEUR W, GANDOURA N, et al. Determination of chlorinated pesticides, polychlorinated biphenyls, and polybrominated diphenyl ethers in human milk from Bizerte (Tunisia) in 2010 [J]. Chemosphere, 2012, 89 (4): 369 - 377.

- [10] CUI C, TIAN Y, ZHANG L, et al. Polychlorinated biphenyls exposure in breast milk in Shanghai, China: Levels, influencing factors and potential health risk for infants[J]. Science of the total environment, 2012, 433: 331 - 335.
- [11] CHOI J E, KIM S, AHN J H, et al. Induction of oxidative stress and apoptosis by silver nanoparticles in the liver of adult zebrafish[J]. Aquatic toxicology, 2010, 100(2): 151 - 159.
- [12] 吉贵祥, 石利利, 刘济宁, 等. BDE-47 对斑马鱼胚胎—幼鱼的急性毒性及氧化应激作用[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(5): 731 - 736.
- [13] ALBINA M L, ALONSO V, LINARES V, et al. Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats[J]. Toxicology, 2010, 271(1-2): 51 - 56.
- [14] HE P, HE W H, WANG A G, et al. PBDE-47-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons[J]. Neurotoxicology, 2008, 29(1): 124 - 129.
- [15] 赵雪松, 任新, 杨春维, 等. BDE-47 对斑马鱼胚胎氧化应激与 DNA 损伤的毒性研究[J]. 农业环境科学学报, 2015, 34(12): 2280 - 2286.

(责任编辑: 李秀荣)

(上接第 13 页)

提取的焊缝图像中心线细化效果如图 5 所示。



图 5 焊缝图像中心线细化效果图

观察图 5 可以看出, 运用 bwmorph 函数可以很好地提取出焊缝图像的中心线的位置。

3 结论

图像特征提取中的边缘检测技术可以使焊缝与背景进行有效区分, 之后利用细化算法提

取出焊缝图像的中心线, 通过焊缝图像细化效果图找到焊缝的特征点及焊缝像素点, 将焊缝像素点与焊缝实际坐标进行比较, 计算偏差, 为调节机器人焊枪姿势提供必要的位置信息, 从而提高焊接精度。

参考文献:

- [1] 田进华, 张韧志. 基于 MapReduce 数字图像处理研究[J]. 电子设计工程, 2014, 22(15): 93 - 95.
- [2] 戚文婷. 面向线目标提取的多源信息融合技术研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2010.
- [3] 王磊. 机器视觉在铜条缺陷在线高速检测中的应用[D]. 上海: 上海理工大学, 2010.

(责任编辑: 夏玉玲)