

宋玉芳, 王磊, 李昕馨, 等. 2009 植物 CYP450 和抗氧化酶对土壤菲、芘暴露的生态毒理响应 [J]. 环境科学学报, 29(2): 381-388  
Song Y F, Wang L, Li X X, et al. 2009 Ecotoxic responses of CYP450 and antioxidant enzymes in maize due to exposures to Phenanthrene and Pyrene in soil [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 29(2): 381-388

# 植物 CYP450 和抗氧化酶对土壤菲、芘暴露的生态毒理响应

宋玉芳<sup>1\*</sup>, 王磊<sup>1,2</sup>, 李昕馨<sup>1</sup>, 张薇<sup>3</sup>, 陈朗<sup>1,2</sup>, Freestone David<sup>4</sup>, 吉普辉<sup>1,2</sup>, Ackland M Leigh<sup>4</sup>

1 中国科学院沈阳应用生态研究所, 沈阳 110016

2 中国科学院研究生院, 北京 100039

3 沈阳农业大学, 土地与环境学院, 沈阳 110161

4 Deakin 大学, 墨尔本, 3125 澳大利亚

收稿日期: 2007-02-25 修回日期: 2008-09-22 录用日期: 2008-12-10

**摘要:** 以玉米 (*Zea mays L.*) 为供试植物, 草甸棕壤为供试土壤, 以微粒体细胞色素 P450 含量、超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和过氧化物酶 (POD) 活性为指标, 进行了土壤菲、芘暴露的生态毒理响应研究。结果表明, 菲、芘暴露均能引起植物代谢解毒和抗氧化防御系统的胁迫响应, 不同程度引发植物代谢解毒及抗氧化能力的改变。P450 酶活性与低浓度菲、芘单一暴露浓度具有相关性 ( $r = 0.834, p < 0.01$ ), 与菲、芘复合暴露浓度负相关, 说明菲、芘复合暴露导致代谢解毒能力下降, 对植物的代谢解毒具有协同毒性效应; SOD 酶活性与菲、芘单一暴露浓度负相关, CAT 酶活性与菲、芘单一暴露浓度正相关, POD 酶活性与菲的水溶解度正相关, 而与芘的总浓度负相关。SOD、CAT 和 POD 酶活性与菲、芘复合暴露浓度均呈正相关, 说明菲、芘复合暴露导致氧化损伤程度减弱, 对植物的氧化损伤具有拮抗作用。

**关键词:** 土壤; 玉米 (*Zea mays L.*); CYP450 抗氧化酶系; 菲; 芘

文章编号: 0253-2468(2009)02-381-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Ecotoxic responses of CYP450 and antioxidant enzymes in maize due to exposures to Phenanthrene and Pyrene in soil

SONG Yufang<sup>1\*</sup>, WANG Lei<sup>1,2</sup>, LI Xinxin<sup>1</sup>, ZHANG Wei<sup>3</sup>, CHEN Lang<sup>1,2</sup>, FREESTONE David<sup>4</sup>, JI Puhui<sup>1,2</sup>, ACKLAND M Leigh<sup>4</sup>

1 Institute of Applied Ecology Chinese Academy of Sciences Shenyang 110016

2 Graduated School Chinese Academy of Sciences Beijing 100039

3 College of Land and Environment Science Shenyang Agricultural University Shenyang 110161

4 Centre for Cellular & Molecular Biology School of Life and Environmental Sciences Deakin University 221 Burwood Highway Melbourne 3125, Australia

Received 25 February 2008; received in revised form 22 September 2008; accepted 10 December 2008

**Abstract** Maize (*Zea mays L.*) was chosen to study the ecotoxic-responses of cytochrome P450 and antioxidant enzymes superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) upon exposure to two Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAH's), phenanthrene (PHE) and pyrene (PY), in brown meadow soil. Results indicated that phenanthrene and pyrene exposure caused a stress response and therefore changes in the antioxidant recovery and metabolic detoxification systems in plants. CYP450 content had a positive correlation with the low concentrations of PHE and PY individually ( $r = 0.834, p < 0.01$ ), and a negative correlation with a mixture of PHE and PY at the same concentration indicating that the combination of PHE and PY

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (No 2004CB418503); 国家自然科学基金项目 (No 20577056); 国家高技术研究发展 (863) 项目 (2006AA06Z386) 资助

Supported by the National Basic Research Program of China (No 2004CB418503), the National Natural Science Foundation of China (No 20577056), and the High-Tech Research and Development Program of China (No 2006AA06Z386)

作者简介: 宋玉芳 (1954-), 女, 教授 (博士); \* 通讯作者 (责任作者), E-mail Songyufang@iae.ac.cn

Biography: SONG Yufang (1954-), female, professor (Ph.D.); \* Corresponding author E-mail Songyufang@iae.ac.cn

resulted in a synergistic ecotoxic effect and decreased the plant's metabolic detoxification ability. PHE and PY both had a negative correlation to SOD activities and a positive correlation to CAT activities in individual exposures. POD activities were influenced by the water solubility of PHE, but affected by the total concentration of PY. SOD, CAT and POD all showed a positive correlation when exposed to PHE and PY combined, which illustrated an antagonistic effect and resulted in lowered ability to prevent oxidant damage. Our study can form the basis of ecological evaluation of PAHs exposure in soil providing early diagnosis of ecotoxicity.

**Keywords** soil maize CytP450 antioxidant enzymes phenanthrene pyrene

## 1 引言 (Introduction)

细胞色素 P450 是广泛分布于生物体内的一类代谢酶。自 1962 年首次出现在文献中以来,在国际医药学领域得到广泛研究。直至 20 世纪 90 年代,有关 P450 的研究内容和对象才得到多元化发展(冷欣夫等, 2001)。近 10 年来,以细胞色素 P450 作为环境污染生物标志物的研究得到开展(生秀梅等, 2005),其主要原因是水体、土壤和沉积物等环境介质中污染物大多为低剂量暴露。以往以生物生长、致死率等为指标的急性毒性试验不能反映污染物低浓度暴露的生态毒性,由此产生的生态毒性及风险无法确定(Tamar Bemar-Shimovich *et al.*, 2006)。

细胞色素 P450 是外来物质生物转化相 I 过程的重要代谢解毒酶,它可将脂溶性的外源物质转化为水溶性化合物排出生物体外,起到代谢解毒作用。在这一过程中, P450 酶活性显著增加或降低。利用生物体 P450 酶活性(或含量)与污染物之间的浓度剂量-效应关系,或利用毒物接触暴露引起的生物体的相关生化、生理、免疫和遗传等改变为试验终点,在一定程度上可弥补常规急性毒性对环境低浓度污染物,尤其是持久性有毒有害有机污染物毒性效应无法响应的不足(Sylvie Chaty *et al.*, 2008),从而对环境污染物毒性进行早期预警与诊断(冷欣夫等, 2001; Haasch *et al.*, 1993; 张薇等, 2006; 2007)。

选择土壤中不同营养级中有代表性生物体,通过检测它们体内细胞色素 P450 (Cytochrome P450, CYP)含量的变化,进行土壤污染早期诊断是一种有效的方法(张薇等, 2006)。但是,以植物细胞色素 P450 为生物标记物的土壤生态毒理研究少见报道(于彩虹等, 2005; 李昕馨等, 2006; 曹会聪等, 2007),植物体内的叶绿素及某些血红素蛋白会干扰 P450 测定是其主要原因之一。本研究组前期对植物 P450 测定的前处理方法进行了实验摸索,发现黄化处理后可削弱叶绿素等的干扰,提高了 P450 光谱测定的准确性,为其作为土壤污染生态毒理诊断的

方法提供了可能(李昕馨等, 2006)。

众所周知,土壤生态系统较为复杂。任何单一指标不可能对污染物的生态毒性做出全面诊断,多指标联用更为有效和准确,在一定程度上可弥补单一指标诊断片面性的缺点。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)同属抗氧化酶系,在防御细胞膜脂质过氧化损伤方面发挥着重要作用。利用 SOD、POD 和 CAT 酶活性为指标,通过检测土壤污染物暴露引起的酶活性响应变化,可起到生态毒性诊断的作用(Mandouh *et al.*, 2007)。以抗氧化酶系为指标的污染物毒性响应研究主要集中在两方面,一是逆境环境胁迫的影响研究;二是水体和土壤重金属污染胁迫的生态毒理研究。有关土壤中有毒有害持久性有机污染物的生态毒理效应研究少见报道(王重刚等, 2002; 宋玉芳等, 2001; Roos, 2002; 卜元卿等, 2007)。多环芳烃(Polycyclic aromatic hydrocarbons, 简称 PAHs)属持久性有机污染物,在土壤中普遍存在,由于具有三致(致癌、致畸和致突变)效应,一直受到研究者的广泛关注(Fernandez *et al.*, 2000; 肖汝等, 2006)。

本研究以筛选出的敏感高等植物玉米为供试体,以菲、芘为供试多环芳烃,将 CYP450 含量与抗氧化酶系中的 SOD、POD 和 CAT 活性指标相结合,进行土壤低浓度多环芳烃污染暴露的生态毒理响应研究,旨在为土壤污染生态毒理指标体系的建立和完善提供新的实验手段和依据。

## 2 材料与方法 (Materials and methods)

### 2.1 材料

菲、芘 ( $C_{16}H_{10}$ , 分子量 202.26) 为分析纯,购自 Fluka 公司; Tris 和 DTT 为分析纯,购自美国 Amresco 公司; 牛血清白蛋白 (BSA) 与考马斯亮蓝 G-250 (CBG) 为分析纯,均购于上海生工; 其它药品均为分析纯,购自沈阳市化学试剂公司; CO 购于沈阳市气体站,纯度 99.99%。

玉米 (*Zea mays L.*) 品种为东单 57, 购自沈阳市富友种子公司, 供试草甸棕壤采自中国科学院沈阳

## 应用生态所实验站, 理化性质见表 1

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of test soils

土壤类型	TP	TK	KN	有机质	CEC/ ( $\text{mol g}^{-1}$ )	pH
草甸棕壤	0.04%	0.18%	0.09%	1.65%	12.26	6.22

## 2.2 主要仪器设备

CP-80MX 低温超速离心机 (日本, 日立); 紫外双光束分光光度计 UV-2550 (日本, 岛津); 内切式组织匀浆器 (宁波, 新芝); 手动玻璃匀浆器; 光照培养箱; 硬质玻璃培养皿。

## 2.3 试验设计

土壤菲 芘投加试验: 称取 50 g 风干土壤于 90 mm 直径的玻璃培养皿中, 分别将一定浓度的菲或芘或等量配比的菲、芘混合溶液 (丙酮) 均匀的加入培养皿中, 使污染物含量分别为 1、2、4、8  $\text{mg kg}^{-1}$  和一个空白对照 CK。置于暗处待丙酮挥发至干, 搅拌。调节土壤含水量至最大持水量的 60%, 称重, 避光平衡 48 h 同时, 取一定量的土壤样品用于进行菲、芘的提取与测定。

种子发芽预试验: 于 90 mm 直径玻璃培养皿中放置 2 层滤纸, 先将滤纸用蒸馏水浸湿后, 将玉米种子均匀放入培养皿中, 盖好玻璃培养皿, 置于恒温培养箱中 25°C 暗处培养。对照种子发芽率大于 90%, 确定根伸长诱导率 5% ~ 20% 的浓度区间后, 开始植物培养试验。

植物培养试验: 供试玉米种子经 2% 的双氧水表面消毒 5 min, 蒸馏水反复冲洗 5 遍, 用滤纸洗干水分后, 均匀将 20 粒种子播种于土壤中, 播种时保持种子的胚向上且方向一致; 于光照培养箱中 (25 ± 1) °C 下完全避光培养, 定时喷水以保持土壤湿度。每个处理设 5 个重复。实验周期为 7 d。

## 2.4 生化测定

## 2.4.1 微粒体细胞色素 P450 含量的测定方法

微粒体制备: 将 1 g 左右植物鲜叶样品剪碎后转移到装有 5 mL 冰冷的匀浆缓冲液 (250  $\text{mmol L}^{-1}$  蔗糖, 50  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris (pH = 7.5), 1  $\text{mmol L}^{-1}$  DTT, 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA) 的 25 mL 离心管中, 用内切式组织匀浆器以 8000  $\text{r min}^{-1}$  匀浆 40 s 匀浆物通过双层纱布过滤, 将滤液装入 10 mL 的离心管中, 在低温 (4°C) 超速离心机 12000  $\text{r min}^{-1}$  离心 30 min。离心后所得上清液于 4°C 下、46500  $\text{r min}^{-1}$  再次离心 90 min 所得沉淀即为微粒体, 用保存缓冲液 (250

$\text{mmol L}^{-1}$  蔗糖, 50  $\text{mmol L}^{-1}$  Tris (pH = 7.5), 1  $\text{mmol L}^{-1}$  DTT, 1  $\text{mmol L}^{-1}$  EDTA, 20% 甘油) 溶解, 留 1 mL 待测蛋白含量, 其余部分待测 P450 总量。

CyP450 总量测定: 植物 P450 含量测定参照 Omura 和 Sato 的方法进行适当改进 (李昕馨等, 2006)。微粒体蛋白悬液 6 mL, 加入适量 (约 5 mg) 的连二亚硫酸钠将其还原。混匀后, 分装于 2 个 3 mL 的样品和参比比色杯中, 于样品杯中通入一氧化碳至反应完全后, 静置片刻后, 于紫外双光束分光光度计上 400 ~ 500 nm 处扫描光谱, 分别记录 450 nm 和 490 nm 处的吸光值。根据公式 (1) 计算 P450 含量 (Omura *et al.*, 1964):

$$A_{P450} = \frac{OD_{450} - OD_{490}}{0.091C} \quad (1)$$

式中,  $A_{P450}$  的单位为  $\text{nmol mg}^{-1}$ ;  $OD_{450}$ 、 $OD_{490}$  为 450、490 nm 下的吸光度;  $C$  为微粒体悬液蛋白浓度 ( $\text{mg mL}^{-1}$ ); 0.091 为消光系数。

2.4.2 抗氧化酶系活性测定 取 1 g 左右鲜叶, 加入 5 mL 浓度为 0.1  $\text{mol L}^{-1}$  的磷酸盐缓冲液 (pH = 7.8), 冰浴中匀浆后双层纱布过滤, 12000  $\text{r min}^{-1}$ 、低温 (4°C) 下离心 20 min, 上清液即为粗酶提取液, 于 0 ~ 4°C 冰箱中保存。

超氧化物歧化酶 (SOD) 活性测定采用氮蓝四唑法 (Luo *et al.*, 1999), 以 560 nm 下的吸光值计算酶活性, 单位为  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$ , 以 50% 抑制率的酶量为一个酶活力单位 (U)。

过氧化物酶 (POD) 活性测定采用愈创木酚法 (张志良等, 2003), 单位为  $\Delta OD_{470} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 以每分钟吸光度变化值表示酶活力的大小。

过氧化氢酶 (CAT) 活性测定采用紫外吸收法 (徐镜波等, 1997), 以 240 nm 处吸光度变化速度计算活性, 单位  $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$ , 以 25 °C、100 s 内使  $\text{H}_2\text{O}_2$  分解 1/2 时的酶蛋白量表示酶活力的大小。

数据均采用相对活性表示, 即处理组酶活性与同批次测定的对照组酶活性的比值。

2.4.3 其它测试项目及方法 蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝法 (Bradford, 1976)。土壤中菲、芘的提取与测定采用超声震荡-液相色谱法 (Song *et al.*, 2002)。

## 2.5 数据分析

数据处理均采用统计软件 SPSS 12.0 进行。样品与对照进行了单因素方差分析 (One-way ANOVA, Dunnett's *t* test (2-sides), 对多环芳烃浓度与测定指标值进行相关性检验 (Pearson Correlation

(2-tailed)和回归分析.

### 3 结果 (Results)

#### 3.1 土壤菲和芘的含量测定

采集了投加菲和芘的试验土壤样品,进行菲和芘的提取与测定,结果见表2土壤菲和芘的回收率分别为69.5%~76.5%和79.6%~85.3%.试验未对菲和芘投加浓度进行校正.

表2 土壤中菲和芘的回收率

Table 2 Recovery of an ended phenanthrene and pyrene from soil (n = 3)

投加含量 / (mg kg <sup>-1</sup> )	回收率	
	菲	芘
1	69.5% ± 3.1%	79.6% ± 2.7%
2	71.4% ± 3.3%	85.3% ± 2.5%
4	76.5% ± 4.6%	84.1% ± 2.9%
8	70.3% ± 5.2%	86.1% ± 4.3%

#### 3.2 玉米 CyP450对土壤菲、芘暴露的响应

由图1a可见,0~4 mg·kg<sup>-1</sup>菲单一暴露下,玉米 CyP450含量随暴露含量增加而升高,分别为对照的1.08~1.21倍,表现出P450含量升高的诱导效应;当菲含量由4 mg·kg<sup>-1</sup>增至8 mg·kg<sup>-1</sup>时,CyP450含量由1.15 nmol·mg<sup>-1</sup>下降至0.9 nmol·mg<sup>-1</sup>,表现为抑制效应.

CyP450与芘含量之间存在剂量-效应响应关系(图1b).与菲相比,高含量的芘并未对CyP450明显抑制.这说明,试验含量范围(0~8 mg·kg<sup>-1</sup>)的芘仅引发了植物体内代谢酶水平和酶蛋白抗降解能力的改变,未能造成酶功能的明显损伤.从图1b可见,0~4 mg·kg<sup>-1</sup>范围内,CyP450含量逐渐上升,最高为对照的1.2倍;8 mg·kg<sup>-1</sup>时,CyP450含量略有下降,但仍高于对照.

由图1c可见,植物P450含量与菲、芘复合暴露呈明显剂量-效应负相关关系.菲、芘4 mg·kg<sup>-1</sup>时CyP450含量为0.47 nmol·mg<sup>-1</sup>,比对照下降113%;此后P450含量略有升高,但仍比对照低67%.这说明,菲、芘复合污染对植物代谢解毒系统具有毒性增强的协同效应.

将菲、芘单一及复合暴露含量与CyP450含量进行统计回归,菲、芘单一和复合暴露与植物P450含量之间的可决系数分别为 $R^2_{phe} = 0.8707$ ,  $R^2_{py} = 0.8034$ 和 $R^2_{phe+py} = 0.9276$ ,暴露剂量与P450含量的拟合效果较好,这表明P450含量对供试污染物毒性具有指示作用.

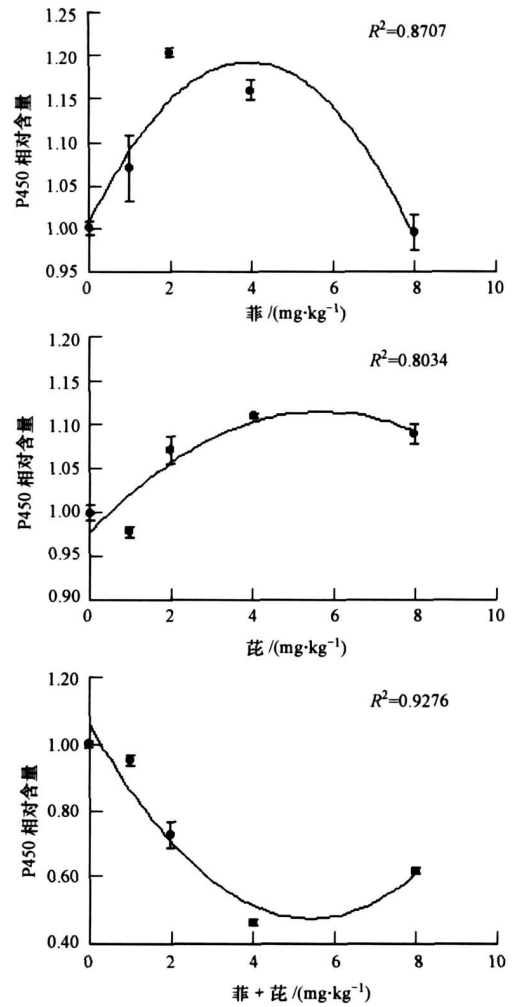


图1 土壤中菲、芘单一与复合污染暴露下玉米 CyP450 含量响应 (a 菲单一暴露, b 芘单一暴露, c 复合暴露)

Fig 1 CyP450 contents of maize after exposure to phenanthrene and/or pyrene in soils (a PHE, b PY, c PHE and PY)

#### 3.3 玉米抗氧化酶对土壤菲、芘暴露的响应

##### 3.3.1 SOD 活性对菲、芘单一/复合暴露的响应

图2为菲、芘单一与复合暴露下的SOD活性变化.首先,由菲与SOD酶活性关系可见,随菲含量的升高SOD酶活性从对照的1.0降至0.6,最大降幅为40%,与对照差异显著( $p < 0.01$ ).其次,芘的响应趋势与菲相似,即随菲含量的升高SOD活性从对照的1.0降至0.4后反弹至0.64,最大降幅60% ( $p < 0.01$ ).显然,试验浓度范围内,土壤中菲、芘单一暴露引起植物SOD酶活性明显减弱.

菲、芘复合暴露下,植物SOD酶活性由对照的1.0上升至1.44 nmol·mg<sup>-1</sup>,最大升幅44%(图2).由于菲、芘单一处理中,SOD活性随菲、芘含量增加显著被抑制,说明菲、芘复合污染产生拮抗作用,减

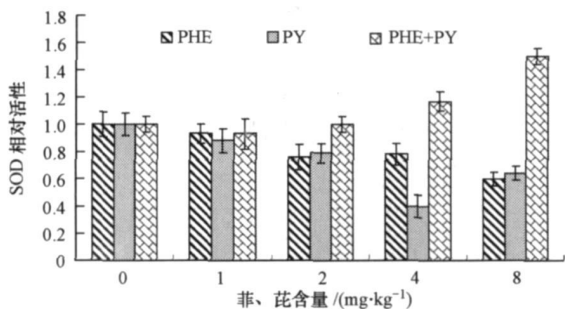


图2 土壤中菲、芘单一与复合污染暴露下玉米 SOD 酶活性响应

Fig 2 Activities of SOD enzymes in maize after exposure to phenanthrene and/or pyrene in soil

弱了菲、芘复合暴露的毒性效应, 菲、芘复合暴露对抗氧化酶和植物细胞的毒性损伤减少。

3.3.2 CAT活性对菲、土壤芘单一|复合暴露的响应 图3为菲、芘单一与复合暴露下CAT活性变化关系图。首先, 由菲与CAT活性的响应关系可见, 菲含量为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时未引起CAT活性的变化, 菲含量为 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时CAT活性由对照的1.0提高至1.35( $p < 0.01$ ); 此后, CAT活性未受菲含量升高的影响而保持稳定不变。其次, 芘的响应趋势与菲相似, 均在 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 未引起CAT酶活性的变化, 芘含量为 $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时CAT酶活性由对照的1.0提高至1.3 此后, CAT活性未随含量的升高而变化。

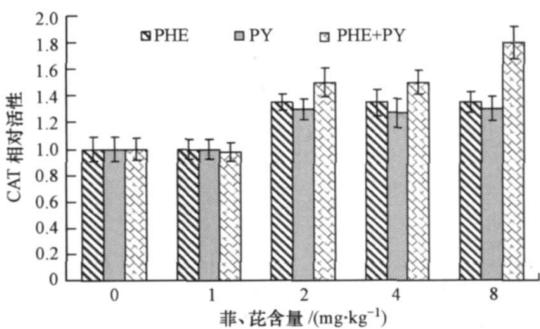


图3 土壤中菲、芘单一与复合污染暴露下玉米 CAT 酶活性的响应

Fig 3 Activities of maize CAT enzyme after exposure to phenanthrene and/or pyrene in soil

CAT酶活性与菲、芘复合暴露的响应趋势与单一暴露下相似(图3), 但响应程度增强。除含量为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组外, CAT酶活性随菲、芘含量的增加由1.0(对照和 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ )提高1.5和1.8 说明CAT酶对菲、芘暴露产生抗氧化能力增强的应激性反应, CAT酶活性升高。复合暴露的CAT酶活性略高

于单一暴露值, 说明菲、芘复合暴露产生拮抗毒性效应。

3.3.3 POD活性对菲、土壤芘单一|复合暴露的响应 由图4可见, 菲浓度为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时POD酶活性明显升高, 增至对照的1.4 此后, 菲含量增加未引起POD酶活性的明显改变。由这一结果可见, POD酶活性似乎受菲水溶态含量的影响。芘的响应趋势与菲相反(图4)。芘含量为 $1\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, POD酶活性略有下降, 但与对照无明显差别; 芘含量为 $2\sim 4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, POD酶活性分别降至0.70和0.49 比对照减少0.30和0.51 这表明, 芘诱发的氧化损伤已经对POD酶造成了影响( $p < 0.01$ )。从这一响应趋势显示, POD酶活性似乎与芘的总含量相关。相比较而言, 芘对植物的氧化损伤强于菲。

菲、芘复合暴露下的POD酶活性变化趋势与单一暴露不同, 总体为先被诱导而后被抑制。复合含量为 $1\sim 2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时, POD酶活性分别增至对照的1.3和1.8倍, 菲、芘联合诱导使植物体内的抗氧化能力增强。复合含量超过 $4\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 后POD酶活性下降, 分别为1.2和0.9 但是, 与芘单一暴露相比, POD酶活性仍略高, 表明菲、芘复合产生拮抗作用。

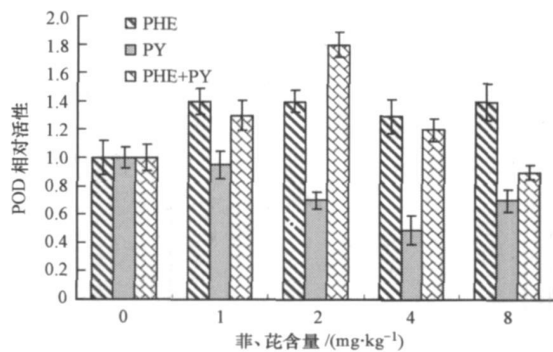


图4 土壤中菲、芘单一与复合污染暴露下玉米 POD 酶活性的响应

Fig 4 Activities of POD enzyme of maize after exposure to phenanthrene and/or pyrene in soil

## 4 讨论 (Discussion)

### 4.1 土壤中菲、芘回收率

由表2可知, 土壤菲和芘的回收率分别为69.5%~76.5%和79.6%~85.3%。回收率偏低与菲(芘)的自然挥发及土壤颗粒的吸附作用有关, 这与先前试验及有关报道一致(Song et al., 2002)。

### 4.2 CYP450对土壤菲、芘暴露的响应

由图1a玉米CYP450含量与菲暴露浓度的响

应关系可知,菲暴露引发了植物体内代谢酶水平和酶蛋白抗降解能力的改变,低浓度的菲使植物体内代谢酶水平应激性提高,酶蛋白抗降解能力增强;而高浓度下部分菲或其可能的降解产物会与P450中的血红素结合,导致一定程度的酶功能损伤及毒性代谢能力的动态性减弱.有研究结果显示,在菲、芘低浓度( $10^{-6} \sim 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )暴露下蚯蚓体内CytP450含量显著升高,高浓度( $1 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ )时下降,其变化趋势与本研究结果一致(张薇等, 2006, 2007).

菲的溶解度为  $1.29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  (Sims *et al.*, 1983),由此可见,实验中菲可能以2种形态存在,即水溶态和吸附态.土壤中的菲可通过颗粒表面的吸附、解吸等作用由不可溶性态转换为可溶态,其生物可利用性总量得到提高,并作用于CytP450代谢解毒系统.

芘暴露含量为  $0 \sim 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  时, CytP450含量随其含量的增加而增加,具有较好的相关关系 ( $r = 0.834, p < 0.01$ ) (图 1b). 但是, 芘的溶解度仅为  $0.013 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 几乎不溶于水 (Sims *et al.*, 1983), 可见土壤中芘主要以固态吸附于土壤颗粒表面. 图 1b 中 CytP450 对芘的响应幅度与菲基本相当, 因此, 可以推论芘对 CytP450 的毒性作用更强. 这一结果与张薇等发现的芘对蚯蚓的 P450 诱导活性强于菲的结果一致 (张薇等, 2006).

#### 4.3 玉米抗氧化酶对土壤菲、芘暴露的响应

SOD 酶是惟一以  $\text{O}_2^-$  自由基为底物的抗氧化酶. 土壤中菲、芘单一暴露植物 SOD 酶活性明显减弱表明 SOD 酶功能受到影响, 造成了植物体抗氧化损伤 (图 2).

由于菲、芘单一处理中 SOD 活性随菲、芘浓度增加显著被抑制, 而菲、芘复合暴露下植物 SOD 酶活性上升 (图 2), 这说明, 菲、芘复合污染产生拮抗作用, 减弱了菲、芘暴露的毒性效应. 这与重金属胁迫下植物抗氧化酶的响应明显不同. 朱宇林等发现,  $50 \sim 150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cd 胁迫 30d 和 50 d 银杏叶 SOD 活性均呈上升的趋势 (朱宇林等, 2007); 原海燕等发现,  $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cd 胁迫下, 草本宿根植物马蔺 (*Iris lactea var. chinensis*) 体内 SOD 活性明显增加 (原海燕等, 2007). 植物体内 SOD 活性的提高说明, Cd 胁迫浓度下植物细胞内的活性物质包括酶尚未受到损伤, 仍能保持自我调节能力. 比较上述结果可知, 相对于重金属元素 Cd 而言, 菲、芘对植物的

抗氧化酶系统的作用浓度更低, 从抗氧化胁迫的角度其生态毒性效应更强.

土壤菲、芘单一暴露含量与 CAT 酶活性的响应趋势与复合暴露相似 (图 3), 但响应程度增强. 这说明, 菲、芘暴露产生氧化胁迫. CAT 活性略高于单一暴露值, 说明菲、芘复合暴露可产生拮抗毒性效应. 从 CAT 酶活性指标上, 也佐证了多环芳烃对抗氧化酶系统的影响显著高于重金属 (朱宇林等, 2007). 与重金属比较可见, 多环芳烃 (菲、芘) 诱发植物 CAT 的防御反应的作用浓度更低, 时间更短, 生态毒性效应更强.

菲、芘复合暴露下 POD 酶活性比单一暴露略高, 表明菲、芘复合可产生拮抗作用. 这与 SOD、CAT 酶对菲、芘复合暴露的响应一致. 朱宇林等指出,  $150 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  Cd 胁迫 106 d 后, 植物 POD 活性仍保持在较高的水平 (朱宇林等, 2007). 这与 SOD 和 CAT 的响应相似, 说明多环芳烃对植物抗氧化酶系的影响明显大于重金属.

#### 4.4 土壤菲、芘的复合暴露毒性效应

生物有效性与生物毒性密切相关. 菲、芘复合暴露对 CytP450 代谢解毒酶产生了明显的协同毒性效应, 表明 2 种组分共存时生物响应性提高, 对系统的毒性作用增大; 而对抗氧化酶 (SOD、CAT 和 POD) 产生明显的拮抗作用, 表明 2 组分的共存生物响应性下降, 对系统的毒性作用减小. 显然, 菲、芘对生物体中 2 种酶系的作用方式、途径和机制截然不同. 目前, 对重金属复合污染作用位点竞争吸附学说的解释较为流行. 而多环芳烃属难降解类有机污染物, 在种类、结构和性质上与重金属完全不同. 因此, 位点学说不能很好解释有机污染物复合效应机理. 目前对有机复合污染效应机理缺少研究 (周东美等, 2004).

## 5 结论 (Conclusions)

1)  $1 \sim 8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  范围内 P450、SOD、CAT 和 POD 均对菲、芘暴露产生诱导或抑制响应. 这表明, 菲、芘暴露引起植物代谢解毒和抗氧化防御系统的应激变化和损伤状况. 与重金属胁迫抗氧化酶系响应结果相比, 多环芳烃 (菲、芘) 引起的抗氧化损伤的含量较低, 时间较短, 因此, 对植物的抗氧化防御系统的损伤更大, 抗氧化胁迫的生态毒性更强.

2) 由于 P450 含量、SOD、POD 和 CAT 酶活性均能在不同程度上对较低含量多环芳烃胁迫产生响

应, 各指标的响应具有趋同性。因此, P450和 SOD、POD和 CAT酶可作为备选生态毒理指标, 从植物代谢解毒和抗氧化防御水平上确定多环芳烃污染物的生态毒性; 可考虑将由酶活性被诱导到被抑制的折点视为生物体功能受损的风险预警值, 进行污染物生态毒性诊断预警。

3) 从菲、芘单一暴露下的胁迫响应及复合暴露的协同效应看, 细胞色素 P450对菲、芘暴露的响应更敏感。从抗氧化酶系 3个指标比较, SOD酶比CAT和 POD酶更敏感。

责任作者简介: 宋玉芳 (1954—), 女, 博士, 研究员, 主要从事陆地生态系统污染生态学研究, 发表论文 60余篇。

#### 参考文献 (References):

- Bernar-Shlomo T, Womser U, Brudsky B. 2006 Toxic serum factor long after single exposure to organophosphate: a new approach for biomonitoring [J]. *Arch Toxicol* 80: 269—274
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem* 72: 248—254
- 卜元卿, 骆永明, 滕应, 等. 2007. 铜暴露对赤子爱胜 (*Eisenia fetida*) 抗氧化酶活力的影响 [J]. *环境化学*, 26(5): 593—597
- Bu Y Q, Luo Y M, Teng Y, et al. 2007. Effect of copper on antioxidant enzyme activities of earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Environment Chemistry*, 26(5): 593—597 (in Chinese)
- 曹会聪, 王金达, 任慧敏, 等. 2007. 土壤镉暴露对玉米和大豆的生态毒性评估 [J]. *环境科学学报*, 27(2): 298—303
- Cao H C, Wang J D, Ren H M, et al. 2007. Ecotoxicity assessment of cadmium in soil to maize (*Zea mays*) and soybean (*Glycine max*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae* 27(2): 298—303 (in Chinese)
- Chaty S, Rodius F, Lanhers M C, et al. 2008. Induction of CYP1A1 in rat liver after ingestion of mussels contaminated by *Erika* fuel oils [J]. *Arch Toxicol* 82: 75—80
- Fernandez P, Vilanova R M, Martinez C, et al. 2000. The historical record of atmospheric pyrolytic pollution over Europe registered in the sedimentary PAH from remote mountain lakes [J]. *Environ Sci Technol* 34: 1906—1913
- Haasch M L, Prince R. 1993. Caged and wild fish: induction of hepatic cytochrome P450 as an environmental biomonitor [J]. *Environ Toxicol Chem*, 12: 885—889
- 冷欣夫, 邱星辉. 2001. 细胞色素 P450酶系的结构、功能与应用前景 [M]. 北京: 科学出版社, 1—2
- Leng X F, Qiu X F. 2001. The structure, function and application prospect of cytochrome P450 [M]. Beijing: Science Press, 1—2 (in Chinese)
- 李昕馨, 宋玉芳, 杨道丽, 等. 2006. 小麦细胞色素 P450为土壤污染生物标记物的研究 [J]. *环境化学*, 25(3): 283—287
- Li X X, Song Y F, Yang D L, et al. 2006. Cytochrome P450 in wheat as a biomarker for diagnosing pollution in soil [J]. *Environmental Chemistry*, 25(3): 283—287 (in Chinese)
- Luo Y, Zang Y, Zhong Y, et al. 1999. Toxicological study of two novel pesticides on earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Chemosphere*, 39(13): 2347—2356
- Nemat Allah M, Hassan N M. 2007. Changes of antioxidants and GSH-associated enzymes in isoproturon-treated maize [J]. *Acta Physiologica Plant* 29: 247—258
- Omura T, Sato R. 1964. The Carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes [J]. *J Biol Chem*, 239(7): 2370—2378
- Ostby L, Sundby E, Krokje A. 2006. Evaluation of CYP1A protein induction, biotransformation capacity and DNA adduct formation in a rat hepatoma cell line (FaO), as biomarkers of organic contamination in environmental soil samples [J]. *Water, Air, and Soil Pollution* 173: 289—313
- Roos P H. 2002. Differential induction of CYP1A1 in duodenum, liver and kidney of rats after oral intake of soil containing polycyclic aromatic hydrocarbons [J]. *Arch Toxicol* 76(2): 75—82
- 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 [J]. *四川环境*, 2(3): 74—78
- Sheng X M, Xiong L, Tang H F, et al. 2005. Cytochrome P450 enzyme family and its application as biomarker [J]. *Sichuan Environment* 2(3): 74—78 (in Chinese)
- Sims R C, Overcash M R. 1983. Fate of polynuclear aromatic compounds (PNAs) in soil-plant systems [J]. *Residue Review*, 88: 1—68
- Song Y F, Jing X, Fleischmann S, et al. 2002. Comparative Study of Extraction Methods for the Determination of PAHs from Contaminated Soils and Sediments [J]. *Chemosphere*, 48(9): 993—1001
- 宋玉芳, 周启星, 许华夏, 等. 2002. 菲、芘、1, 2, 4-三氯苯对土壤高等植物根伸长抑制的生态毒性效应 [J]. *生态学报*, 22(11): 1945—1950
- Song Y F, Zhou Q X, Xu H X, et al. 2002. Ecotoxicological effects of Phenanthrene, Pyrene and 1, 2, 4-Trichlorobenzene in soils on the inhibition of root elongation of higher plants [J]. *Acta Ecologica Sinica* 22(11): 1945—1950 (in Chinese)
- 王重刚, 郑微云, 余群, 等. 2002. 苯并(a)芘和芘的混合物暴露对梭鱼肝脏抗氧化酶活性的影响 [J]. *环境科学学报*, 22(4): 529—533
- Wang C G, Zheng W Y, Yu Q, et al. 2002. Effects of mixture of benzo(a)pyrene and pyrene exposure on hepatic antioxidant enzymes activities in *Mugil soleyi* [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 22(4): 529—533 (in Chinese)
- 肖汝, 汪群慧, 杜晓明, 等. 2006. 典型污灌区土壤中多环芳烃的垂直分布特征 [J]. *环境科学研究*, 19(6): 49—53
- Xiao R, Wang Q H, Du X M, et al. 2006. Vertical distribution characteristics of polycyclic aromatic hydrocarbon in typical wastewater irrigated soils [J]. *Research of Environmental Sciences* 19(6): 49—53 (in Chinese)
- 徐镜波, 袁晓凡, 郎佩珍. 1997. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫

- 外分光光度测定 [ J ]. 环境化学, 16(1): 73—76
- Xu J B, Yuan X X, Lang P Z. 1997. The determination of enzymic activity and its inhibition on catalase by ultraviolet spectrophotometry [ J ]. Environmental Chemistry, 16(1): 73—76( in Chinese)
- 于彩虹, 高焱武. 2005 棉铃虫细胞色素 P450CO 差光谱的测定 [ J ]. 昆虫学报, 48(2): 301—304
- Yu C H, Gao X W. 2005. Cytochrome P450 CO difference spectra in *Helicoverpa armigera* [ J ]. Acta Entomologica Sinica 48(2): 301—304( in Chinese)
- 原海燕, 黄苏珍, 郭智, 等. 2007. 锌对镉胁迫下马蔺生长、镉积累及生理抗性的影响 [ J ]. 应用生态学报, 18(9): 2111—2116
- Yuan H Y, Huang S Z, Guo Z, *et al*. 2007. Effects of Zn on the growth, Cd accumulation and physiological resistance of *Iris lactea var chinensis* under Cd stress [ J ]. Chinese Journal of Applied Ecology, 18(9): 2111—2116( in Chinese)
- 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 2006. 蚯蚓细胞色素 P450 生物标记物方法研究 [ J ]. 环境科学, 27(8): 1636—1642
- Zhang W, Song Y F, Sun T H, *et al*. 2006. Establishment of method for cytochrome P450 of earthworms (*Eisenia fetida*) as a biomarker [ J ]. Chinese Journal of Environmental Science, 27(8): 1636—1642( in Chinese)
- 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 2007. 菲和芘对蚯蚓 (*Eisenia fetida*) 细胞色素 P450 和抗氧化酶系的影响 [ J ]. 环境化学, 26(2): 202—206
- Zhang W, Song Y F, Sun T H, *et al*. 2007. Influence of Phenanthrene and Pyrene on cytochrome P450 and antioxidant enzymes in earthworms (*Eisenia fetida*) [ J ]. Environmental Chemistry, 26(2): 202—206( in Chinese)
- 张志良, 瞿伟菁. 2003 植物生理学试验指导 [ M ]. 北京: 高等教育出版社, 123—124
- Zhang Z L, Qu W Q. 2003. Test Guidance of Phytophysiology [ M ]. Beijing Higher Education Press 123—124( in Chinese)
- 朱宇林, 曹福亮, 谭萍. 2007. Cd 单一及其与 Pb 复合胁迫对银杏叶抗氧化保护酶活性的影响 [ J ]. 西北林学院学报, 22(5): 7—11
- Zhu Y L, Cao F L, Tan P. 2007. Effects of Cd single and Pb combined stress on the antioxidant enzymes activities of ginkgo leaves [ J ]. Journal of Northwest Forestry University, 22(5): 7—11( in Chinese)
- 周东美, 王玉军, 仓龙, 等. 2004. 土壤及土壤—植物系统中复合污染的研究进展 [ J ]. 环境污染治理技术与设备, 5(10): 2—7
- Zhou D M, Wang Y J, Cang L, *et al*. 2004. Advances in the research of combined pollution in soil and soil—plant systems [ J ]. Techniques and Equipment for Environmental Pollution Control 5(10): 2—7( in Chinese)