

4 种鱼类肝脏细胞色素 P450 对毒死蜱、对硫磷及马拉硫磷的脱硫代谢

边文杰, 徐 燕, 李少南*, 朱国念

(浙江大学 农药与环境毒理研究所, 杭州 310029)

摘 要: 以毒死蜱、对硫磷及马拉硫磷为供试农药, 以斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼及太阳鱼为供试生物, 研究了 3 种农药对 4 种鱼的急性毒性, 4 种鱼肝细胞色素 P450 对 3 种农药的脱硫代谢作用及两者之间的相关性。结果表明, 毒死蜱对于上述 4 种鱼的 96 h LC_{50} 分别为 1.94、0.171、0.027 3、0.068 1 $mg \cdot L^{-1}$; 对硫磷为 2.6、0.055 9、1.78、1.02 $mg \cdot L^{-1}$; 马拉硫磷为 7.07、0.907、6.03、0.172 $mg \cdot L^{-1}$ 。4 种鱼肝脏 P450 对于毒死蜱代谢的 V_{max}/K_m 值分别为 1.67×10^4 、 2×10^4 、 5×10^4 、 $2 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$; 对于对硫磷代谢的 V_{max}/K_m 值分别为 2×10^4 、 5×10^5 、 1.11×10^5 、 $1.43 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$; 对于马拉硫磷的值分别为 5×10^3 、 5×10^4 、 2.5×10^3 、 $1.67 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ 。96 h LC_{50} 值与 V_{max}/K_m 值大体呈负相关, 其中毒死蜱的相关性较弱, 对硫磷及马拉硫磷的相关性较强 (R^2 值分别为 0.218 1、0.849 0、0.510 2)。研究结果说明 P450 在鱼类耐药性形成过程中发挥了阻碍作用。

关键词: 毒死蜱; 对硫磷; 马拉硫磷; 鱼; 细胞色素 P450

中图分类号: X592 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2011)07-1282-07

Desulfuration of Chlorpyrifos, Parathion, and Malathion by Hepatic Cytochrome P450 in Four Species of Fish

BIAN Wen-jie, XU Yan, LI Shao-nan*, ZHU Guo-nian

(The Institution of Pesticide and Environmental Toxicology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract Fish is common in water and is suitable for identifying the presence of chemical pollutants in water bodies. For evaluating efficiency of oxidative metabolism in determination of sensitivity of fish to organothiophosphorus insecticides, *in vitro* desulfuration of three insecticides, i.e. chlorpyrifos, parathion, and malathion, by hepatic cytochrome P450 was measured using four species of fish, i.e. *Danio rerio*, *Xiphophorus helleri*, *Pseudorasbora parva*, and *Lepomis gibbosus* as surrogates, and the activity was compared with sensitivity of corresponding fish towards the insecticides. Result of the study indicated that 96 h LC_{50} of chlorpyrifos for the *Danio rerio*, the *Xiphophorus helleri*, the *Pseudorasbora parva*, and the *Lepomis gibbosus* was estimated to be 1.94, 0.171, 0.027 3 $mg \cdot L^{-1}$ and 0.068 1 $mg \cdot L^{-1}$, respectively, and 96 h LC_{50} of parathion for the four species of fish was estimated to be 2.6, 0.055 9, 1.78 $mg \cdot L^{-1}$ and 1.02 $mg \cdot L^{-1}$, respectively. As for malathion, the 96 h LC_{50} for the four species of fish was estimated to be 7.07, 0.907, 6.03 $mg \cdot L^{-1}$ and 0.172 $mg \cdot L^{-1}$ respectively. Desulfuration activity of hepatic cytochrome P450, as scaled with V_{max}/K_m , was estimated to be 1.67×10^4 , 2×10^4 , $5 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$ and $2 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, respectively, for chlorpyrifos, and the activity was estimated to be 2×10^4 , 5×10^5 , $1.11 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$ and $1.43 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$, respectively, for parathion. For malathion the activity was estimated to be 5×10^3 , 5×10^4 , $2.5 \times 10^3 \text{ min}^{-1}$ and $1.67 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, respectively. A negative correlation was found between LC_{50} and V_{max}/K_m . The value of R^2 was estimated to be 0.218 1, 0.894 0 and 0.510 1, respectively for chlorpyrifos, parathion, and malathion. Result of the study suggested that cytochrome P450 played a negative role in creating tolerance of fish to organothiophosphorus insecticides.

Keywords chlorpyrifos; parathion; malathion; fish; cytochrome P450

收稿日期 2010-12-31

基金项目 浙江省自然科学基金(Y307448)

作者简介 边文杰(1987—) 男 湖北仙桃人 硕士 主要从事农药环境毒理方面的研究。E-mail bianwenjie231@yahoo.cn

* 通讯作者 李少南 E-mail snli@zju.edu.cn

毒死蜱、对硫磷和马拉硫磷是高效、广谱的有机磷类杀虫剂,具有触杀、胃毒和熏蒸作用,在我国曾经或正在被广泛用于各种作物害虫的防治。这些有机磷杀虫剂在带给人们巨大经济利益的同时,也对水体造成污染并对水生生物产生毒性^[1]。

细胞色素 P450 是重要的代谢酶,广泛分布于陆生或水生的微生物及脊椎动物体内^[2-3]。它不仅能够催化一些具有重要生理功能的内源性物质如激素、脂肪酸、萜类化合物等的生物合成代谢,而且参与许多外源性物质如农药、医药、环境污染物等的生物氧化^[4]。

本研究以斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼为对象,比较了 4 种鱼肝脏 P450 酶系对于毒死蜱、对硫磷和马拉硫磷的 3 种硫代磷酸酯类杀虫剂脱硫代谢率差异。结合杀虫剂的急性毒性测定结果,分析了 P450 介导的脱硫代谢在鱼类耐药性形成过程中所发挥的作用。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

毒性测定所需的 97.6% 毒死蜱原药,98% 对硫磷原药和 90.0% 马拉硫磷原药均由杭州浙大新农农药科技有限公司提供;代谢研究所需的 99.0% 对硫磷标准品和 99.0% 马拉硫磷标准品均为 Dr. Ehrenstorfer GmbH 产品,99.5% 毒死蜱标准品、98.0% 马拉氧磷标准品和 99.0% 对氧磷标准品均购于美国 Sigma 公司,99.0% 氯吡硫磷一氧标准品购于西域 EHSY 公司;99.9% 色谱甲醇购于天津四友生物医学技术有限公司,99.5% 乙酸乙酯分析纯购于杭州双林化工试剂厂;99.9% 色谱乙腈购于美国 TEDIA 公司,99.9% 三羟甲基氨基甲烷分析纯购于北京鼎国生物技术有限责任公司,36.5% 盐酸购于浙江中星化工试剂有限公司。其他未经说明的试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

Anke GL-20G-II 型冷冻离心机,上海安亭科学仪器厂;日立 CP-70MX 冷冻超速离心机;UV-7504 PC 紫外可见分光光度计,上海欣茂仪器有限公司;Agilent 6890-SPD 气相色谱,HP1100 高效液相色谱仪等。

1.3 供试鱼类

斑马鱼 (*Danio rerio*)、剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 购于杭州明红水族馆,麦穗鱼 (*Pseudorasbora parva*)、太阳鱼 (*Lepomis gibbosus*) 购于杭州市农业科学研究院水产研究所。斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼的平均体长(连尾)分别为 3.0、4.1、5.4、4.4 cm,平均

体重分别为 0.180、0.828、1.460、0.904 g。试验开始之前,鱼在(22±1)℃的曝气自来水中至少驯养 1 周。选取体形正常、体色发亮、鱼鳞和鱼鳍无破损,游动灵活,捕食敏捷,无任何病态和异常行为的个体进行试验。

1.4 3 种农药对 4 种鱼的急性毒性

采用蔡道基^[5]的研究方法,即静态鱼类急性毒性试验方法进行暴露,将上述毒死蜱等 3 种原药,设置 6 个浓度处理,每个处理 3 个重复,分为 3 组,每个重复投放试验鱼 10 尾,并设一个不加农药的溶剂(5 g 吐温-80,50 mL 丙酮)对照。

对硫磷原药对斑马鱼的浓度设置为 0.150、0.300、0.600、1.20、2.40、4.80 mg·L⁻¹;对剑尾鱼的浓度设置为 0.005 00、0.010 0、0.020 0、0.040 0、0.080 0、0.160 mg·L⁻¹;对麦穗鱼和太阳鱼均为 0.100、0.200、0.400、0.800、1.60、3.20 mg·L⁻¹。毒死蜱原药对斑马鱼的浓度设置为 0.100、0.283、0.801、2.27、6.41、18.2 mg·L⁻¹;对剑尾鱼和太阳鱼的浓度设置为 0.020 0、0.059 2、0.175、0.519、1.54、4.54 mg·L⁻¹;对麦穗鱼为 0.012 5、0.025 0、0.050 0、0.100、0.200、0.400 mg·L⁻¹。马拉硫磷原药对斑马鱼的浓度设置为 1.00、1.97、3.88、7.65、15.1、29.7 mg·L⁻¹;对剑尾鱼的浓度设置为 0.500、0.985、1.94、3.82、7.53、14.8 mg·L⁻¹;对麦穗鱼为 1.59、2.70、4.59、7.80、13.3、22.6 mg·L⁻¹;对太阳鱼为 0.0169、0.033 2、0.065、0.129、0.254、0.501 mg·L⁻¹。

试验开始的前 1 d 鱼停止喂食。试验期间不喂食,每 24 h 更换一半实验溶液,并于试验开始后的第 24、48、72、96 h 记录鱼的死亡数,同时及时清除死鱼。

1.5 肝脏细胞色素 P450 酶液的制备^[6-7]

制备前 1 d 停止喂食,颈静脉放血处死,迅速取出鱼的肝脏剪成小块,用含 KCl(0.15 mol·L⁻¹)的磷酸缓冲液(0.1 mol·L⁻¹,pH 7.4)反复冲洗数次,在 10 000 g、4℃下离心 15 min,取上清液作为酶原。

1.6 微粒体蛋白含量的测定

肝微粒体蛋白含量的测定采用 Bradford 法,以牛血清白蛋白作为标准^[8]。

1.7 蛋白标准曲线

数据用 Microsoft Excel 2003 软件进行统计分析。白蛋白标准曲线的线性回归方程为

$$Y=7.197 9X+0.023 1(R^2=0.992 8)$$

该方法的检测范围为 0.01~0.1 mg·mL⁻¹,最低检测限为 0.01 mg·mL⁻¹。

1.8 P450 酶对 3 种农药的脱硫代谢作用^[9-11]

取 0.1 mL 酶液,再加入 0.5 mL 的 0.05 mol·L⁻¹

Tris-HCl 缓冲液,分别加入不同量有机磷杀虫剂(对硫磷、毒死蜱、马拉硫磷),使最终浓度为 5、10、20、50、80、100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (总溶液体积按 1 mL 算),在恒温恒湿培养箱中(25 $^{\circ}\text{C}$)预热 3 min,然后加入 0.1 mL 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NADPH,用缓冲液将混合液补至 1 mL,25 $^{\circ}\text{C}$ 培养 30 min 后取出,加对硫磷的试管中加 0.5 mL 高氯酸(6% V/V)终止反应,加毒死蜱的试管中加 0.5 mL 的乙腈终止反应;加马拉硫磷的试管中加 0.5 mL 在冰箱中冷冻过的 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl 缓冲液终止反应。然后,分别加入 2 mL 乙酸乙酯和 1 mL NaCl(3% W/W),提取脱硫代谢产物,室温下在振荡器上剧烈振荡 3 min,在 3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 、4 $^{\circ}\text{C}$ 下离心 10 min。对硫磷、毒死蜱和马拉硫磷的脱硫产物分别为对氧磷、氯吡硫磷一氧和马拉氧磷。取出有机相,再加 3 mL 乙酸乙酯于水相进行提取,离心,合并有机相,用氮气吹干。对硫磷和毒死蜱用色谱甲醇定容 1 mL,用高效液相色谱检测,马拉硫磷用乙酸乙酯定容至 1 mL,气相色谱检测。

1.9 色谱条件

对氧磷色谱条件:二极管阵列检测器(DAD),依利特色谱柱(Hypersil ODS₂ 5 μm)4.6 mm \times 250 mm(柱号 E1922368),流动相甲醇/水=70/30,波长 280 nm;流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 20 μL ,室温。

氯吡硫磷一氧色谱条件:二极管阵列检测器(DAD),依利特色谱柱(Hypersil ODS₂ 5 μm)4.6 mm \times 250 mm(柱号 E1922691),流动相甲醇/0.1%乙酸(W/W)=90/10,波长 290 nm,流速 1 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$,进样量 20 μL ,室温。

马拉氧磷色谱条件:火焰光度检测器(FPD),色谱柱 Supelco spb-1701 30 m \times 0.32 mm \times 0.25 μm ,进样口温度 240 $^{\circ}\text{C}$;起始温度 100 $^{\circ}\text{C}$;程序升温(40 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 到 250 $^{\circ}\text{C}$,保留 0 min,20 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 到 280 $^{\circ}\text{C}$,保留 8 min),检测器温度 280 $^{\circ}\text{C}$,进样量 1 μL 。

1.10 检测方法的线性相关性

准确称取 99%对氧磷(对硫磷脱硫代谢产物)标准品 0.002 8 g,用甲醇溶解并定容至 10 mL,制得 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准品母液,用甲醇逐级稀释母液,得到 50、20、10、5、1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列浓度标样。准确称取 99%氯吡硫磷一氧(毒死蜱脱硫代谢产物)标准品 0.003 4 g,用甲醇溶解并定容至 10 mL,制得 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准品母液,用甲醇逐级稀释母液,得到 100、10、2、1、0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列浓度标样。准确称取 98%马拉氧磷(马拉硫磷脱硫代谢产物)标准品

0.003 2 g,用石油醚溶解并定容至 10 mL,制得 1 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 标准品母液,用石油醚逐级稀释母液,得到 20、10、5、1、0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的系列浓度标样。在上述色谱条件下,测量各浓度相应的峰面积,其进样浓度和对应的峰面积均呈现良好的线性关系,其回归方程分别为:

$$\text{对氧磷: } Y=5\ 259.2X+17.49 (R^2=0.999\ 9)$$

$$\text{氯吡硫磷一氧: } Y=1\ 815.9X+487.92 (R^2=0.999\ 9)$$

$$\text{马拉氧磷: } Y=32\ 555X+2\ 207.1 (R^2=0.999\ 8)$$

1.11 数据处理

用 Microsoft Excel 2003 软件及 DPS V3.01 专业版对实验数据进行统计分析,结果以均值 \pm 标准差(mean \pm SD)表示。

2 结果与分析

2.1 毒死蜱、对硫磷及马拉硫磷对 3 种鱼的急性毒性

不同浓度毒死蜱处理斑马鱼 24、48、72、96 h 后的 LC_{50} 分别为 2.94、2.22、2.22、1.94 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;剑尾鱼 24、48、72、96 h 后的 LC_{50} 分别为 0.179、0.175、0.175、0.171 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;麦穗鱼为 0.072 0、0.037 5、0.029 1、0.027 3 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;太阳鱼为 0.098 0、0.068 1、0.068 1、0.068 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

不同浓度对硫磷处理斑马鱼 24、48、72、96 h 后的 LC_{50} 分别为 2.78、2.63、2.63、2.60 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;剑尾鱼 24、48、72、96 h 后的 LC_{50} 分别为 0.062 5、0.058 3、0.057 2、0.055 9 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;麦穗鱼为 2.25、1.86、1.83、1.78 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;太阳鱼为 1.74、1.14、1.02、1.02 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

不同浓度马拉硫磷处理斑马鱼 24、48、72、96 h 后的 LC_{50} 分别为 11.5、10.4、8.45、7.07 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;剑尾鱼 24、48、72、96 h 后的 LC_{50} 分别为 2.04、1.97、0.945、0.907 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;麦穗鱼为 14.8、8.86、7.00、6.03 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$;太阳鱼为 0.281、0.193、0.172、0.172 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

不同浓度毒死蜱、对硫磷及马拉硫磷处理斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼及太阳鱼 96 h 后的毒力方程和 LC_{50} (半致死浓度)如表 1 所示。可见 3 种农药对 4 种鱼 96 h LC_{50} 均存在显著性差异($P<0.05$)。毒死蜱对斑马鱼的 LC_{50} 显著高于其他 3 种鱼,对麦穗鱼的 LC_{50} 最小;对硫磷对斑马鱼的 LC_{50} 最高,对剑尾鱼的最低;马拉硫磷对斑马鱼的 LC_{50} 最高,依次是麦穗鱼、剑尾鱼、太阳鱼。

2.2 鱼肝细胞色素 P450 对农药的代谢

2.2.1 鱼肝细胞色素 P450 对毒死蜱的代谢

斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼及太阳鱼肝微粒体脱硫

代谢毒死蜱生成氯吡硫磷一氧的浓度见图 1。

图 1 显示,除 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时斑马鱼和剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼及 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时剑尾鱼和太阳鱼所对应的产物生成量没有显著差异外,4 种鱼肝细胞色素 P450 在催化不同浓度毒死蜱转化为氯吡硫磷一氧的过程中,氯吡硫磷一氧的生成量差异显著,即酶促反应速度差异显著($P<0.05$),并且在试验浓度范围内,随着底物毒死蜱浓度的增加,产物氯吡硫磷一氧的浓度也相应增加。

由单位量的酶速度公式:酶促反应速度 ($\text{nmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$)=产物生产量/(反应时间 \times 酶浓度),可知在本研究中 P450 酶催化底物生成产物时的酶促反应速度 V =对氧磷或氯吡硫磷一氧或马拉氧磷生成量/(30 min \times 微粒体的浓度)。对反应速度 V 和底物浓度 S 作双倒数,可以得到酶反应米氏方程的转换形式

Lineweaver-Burk 方程。根据斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼的肝细胞色素 P450 对不同浓度的毒死蜱的催化反应,以 Lineweaver-Burk 形式作图,如图 2 所示。斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼肝细胞色素 P450 催化毒死蜱的拟线性回归方程分别为:

$$Y=6\times 10^{-5}X+0.2124 (R^2=0.9472)$$

$$Y=5\times 10^{-5}X+0.0390 (R^2=0.9805)$$

$$Y=2\times 10^{-5}X+0.1777 (R^2=0.9811)$$

$$Y=5\times 10^{-5}X+0.6504 (R^2=0.9562)$$

由于直线在 Y 轴上截距的绝对值为 $1/V_{\text{max}}$,在 X 轴上截距的绝对值为 $1/K_m$,从而可知 V_{max}/K_m =直线斜率的倒数。不同的鱼所对应的直线斜率分别为 6×10^{-5} 、 5×10^{-5} 、 2×10^{-5} 、 5×10^{-5} ,则 V_{max}/K_m 值的大小分别为 1.67×10^4 、 2×10^4 、 5×10^4 、 $2\times 10^4 \text{ min}^{-1}$,即麦穗鱼>太阳鱼=剑尾鱼>斑马鱼。

表 1 毒死蜱、对硫磷和马拉硫磷毒力方程和半致死浓度

Table 1 Regression equations and median lethal concentrations after 96 h exposure duration to chlorpyrifos, parathion and malathion respectively

农药/鱼类	毒力方程式	相关系数	半致死浓度 $\text{LC}_{50}/\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	95%置信限/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
毒死蜱/斑马鱼	$Y=3.8987+3.8354X$	0.9819	1.94a	1.56~2.61
毒死蜱/剑尾鱼	$Y=11.9592+9.0832X$	0.9999	0.171b	-
毒死蜱/麦穗鱼	$Y=8.8923+2.4894X$	0.9508	0.0273d	0.0174~0.0366
毒死蜱/太阳鱼	$Y=16.6451+9.9807X$	0.9966	0.0681c	-
对硫磷/斑马鱼	$Y=-1.3555+15.3368X$	0.9975	2.60a	~
对硫磷/剑尾鱼	$Y=11.1394+4.9025X$	0.9648	0.0559d	0.0455~0.0784
对硫磷/麦穗鱼	$Y=1.0089+15.9878X$	0.9952	1.78b	~
对硫磷/太阳鱼	$Y=4.9374+5.8893X$	0.9862	1.02c	0.854~1.45
马拉硫磷/斑马鱼	$Y=0.4786+6.4511X$	0.9839	7.07a	6.16~8.66
马拉硫磷/剑尾鱼	$Y=5.2729+6.4585X$	0.9689	0.907b	0.778~1.04
马拉硫磷/麦穗鱼	$Y=2.0644+3.7618X$	0.9218	6.03ab	5.15~7.06
马拉硫磷/太阳鱼	$Y=6.8444+2.4100X$	0.9854	0.172c	0.132~0.271

注:生成物数据为平均值 \pm 标准误($n=3$);同一组数据后小写字母相同表示在 0.05 水平差异不显著,采用Duncan 多重比较。下同。

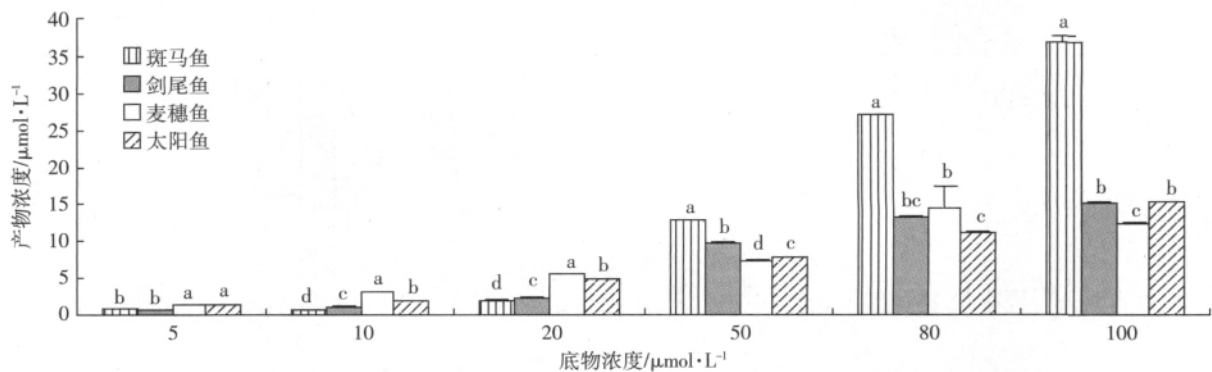


图 1 不同鱼肝细胞色素 P450 对毒死蜱的脱硫代谢

Figure 1 Chlorpyrifos desulfuration catalyzed by hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in different fish

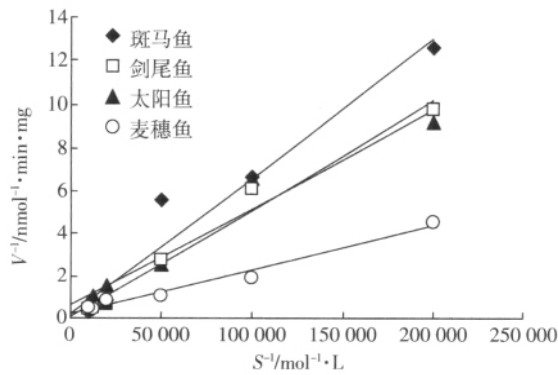


图 2 斑马鱼、麦穗鱼、太阳鱼及剑尾鱼肝 P450 催化毒死蜱 Lineweaver-Burk 方程

Figure 2 Lineweaver-Burk equation of chlorpyrifos desulfuration catalyzed by hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in *Danio rerio*, *Xiphophorus helleri*, *Pseudorasbora parva* and *Lepomis gibbosus*

2.2.2 鱼肝细胞色素 P450 对对硫磷的代谢

斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼及太阳鱼肝微粒体脱硫代谢对硫磷生成对氧磷的浓度见图 3。

图 3 显示 4 种鱼肝细胞色素 P450 在催化不同浓度对硫磷转化为对氧磷的过程中,对氧磷的生成量差异显著,即酶促反应速度差异显著($P < 0.05$),并且在低浓度时($5 \sim 50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)随着底物对硫磷浓度的增加,产物对氧磷的浓度也相应增加,在高浓度时($80 \sim 100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$),产物对氧磷的浓度增加缓慢,有的甚至下降,如 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,剑尾鱼肝所对应的产物浓度下降非常明显。

根据斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼的肝细胞色素 P450 对不同浓度的对硫磷的催化反应,以 Lineweaver-Burk 形式作图,如图 4 所示。斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼肝细胞色素 P450 催化对硫磷

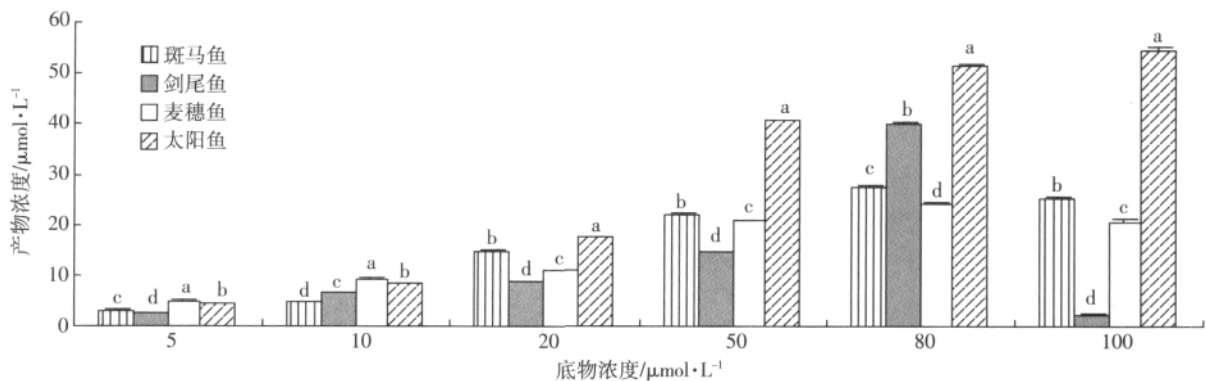


图 3 不同鱼肝细胞色素 P450 对对硫磷的脱硫代谢

Figure 3 Parathion desulfuration catalyzed by hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in different fish

的拟线性回归方程分别为：

$$Y = 5 \times 10^{-5} X + 0.3491 \quad (R^2 = 0.9721)$$

$$Y = 2 \times 10^{-6} X + 0.0171 \quad (R^2 = 0.9651)$$

$$Y = 9 \times 10^{-6} X + 0.3797 \quad (R^2 = 0.9818)$$

$$Y = 7 \times 10^{-6} X + 0.0237 \quad (R^2 = 0.9992)$$

由图 4 可知,不同的鱼所对应的直线斜率分别为 5×10^{-5} 、 2×10^{-6} 、 9×10^{-6} 、 7×10^{-6} ,则不同的鱼所对应的 V_{max}/K_m 值的大小分别为 2×10^4 、 5×10^5 、 1.11×10^5 、 $1.43 \times 10^5 \text{ min}^{-1}$,即剑尾鱼 > 太阳鱼 > 麦穗鱼 > 斑马鱼。

2.2.3 鱼肝细胞色素 P450 对马拉硫磷的代谢

斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼及太阳鱼肝微粒体脱硫代谢马拉硫磷生成马拉氧磷的浓度见图 5。

图 5 显示 4 种鱼肝细胞色素 P450 在催化不同浓度马拉硫磷转化为马拉氧磷的过程中,马拉氧磷的生成量差异显著,即酶促反应速度差异显著 ($P <$

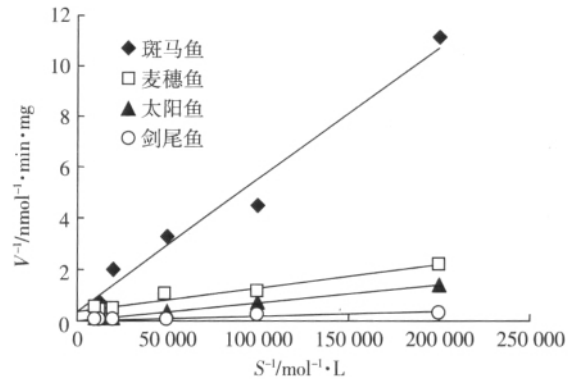


图 4 斑马鱼、麦穗鱼、太阳鱼及剑尾鱼肝 P450 催化对硫磷 Lineweaver-Burk 方程

Figure 4 Lineweaver-Burk equation of parathion desulfuration catalyzed by hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in *Danio rerio*, *Xiphophorus helleri*, *Pseudorasbora parva* and *Lepomis gibbosus*

0.05), 并且在试验浓度范围内, 随着底物浓度的增加, 产物的浓度也相应增加。

根据斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼的肝细胞色素 P450 对不同浓度的马拉硫磷的催化反应, 以 Lineweaver-Burk 形式作图, 如图 6 所示。斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼和太阳鱼肝细胞色素 P450 催化马拉硫磷的拟线性回归方程分别为:

$$Y=2 \times 10^{-4} X + 0.860 2 \quad (R^2=0.996 4)$$

$$Y=2 \times 10^{-5} X + 0.041 2 \quad (R^2=0.994 6)$$

$$Y=4 \times 10^{-4} X + 0.024 1 \quad (R^2=0.977 1)$$

$$Y=6 \times 10^{-5} X + 0.024 1 \quad (R^2=0.987 1)$$

不同的鱼所对应的直线斜率分别为 2×10^{-4} 、 2×10^{-5} 、 4×10^{-4} 、 6×10^{-5} 。因此, 不同的鱼所对应的 V_{max}/K_m 值的大小分别为 5×10^3 、 5×10^4 、 2.5×10^3 、 $1.67 \times 10^4 \text{ min}^{-1}$, 即太阳鱼 > 剑尾鱼 > 斑马鱼 > 麦穗鱼。

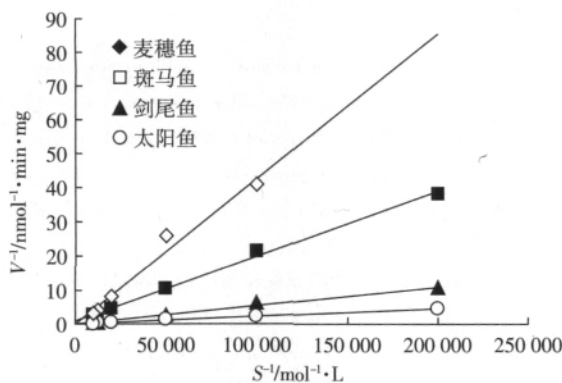


图 6 斑马鱼、麦穗鱼、太阳鱼及剑尾鱼肝 P450 催化马拉硫磷 Lineweaver-Burk 方程

Figure 6 Lineweaver-Burk Equation of malathion desulfuration catalyzed by hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in *Danio rerio*, *Xiphophorus helleri*, *Pseudorasbora parva* and *Lepomis gibbosus*

3 讨论

细胞色素 P450 因其在内外源化学物代谢中的作用而得到广泛的研究。许华夏等^[12]研究了真菌细胞色素 P450 与多环芳烃浓度及降解率的关系, 结果表明在一定的浓度范围内, 芳烃浓度与真菌 P450 含量呈明显正相关, 且真菌降解芳烃的能力与真菌 P450 含量间也表现出明显的剂量-效应关系。王磊等^[13]在研究蚯蚓细胞色素 P450 及抗氧化酶系对环境浓度苯并芘的响应时发现, 指标敏感性总体表现为 P450 > SOD > CAT/POD > GST。本文研究了斑马鱼、剑尾鱼、麦穗鱼及太阳鱼肝细胞色素 P450 对毒死蜱、对硫磷及马拉硫磷的脱硫代谢能力。以前人们研究 P450 对环境污染物的代谢时常采用米氏常数 K_m 或最大反应速度 V_{max} 来反应 P450 对环境污染物的代谢情况^[14-15]。本文参照 Johannes 等^[16]的研究方法, 采用 V_{max}/K_m 的形式来比较不同鱼细胞色素 P450 对毒死蜱等农药代谢差异。因为 V_{max} 反映的是酶催化反应的最大速度, 而 K_m 则反映了酶与底物的亲和能力, 并且 K_m 值与底物的亲和能力成反比, 将二者结合起来更能反应酶对底物的代谢能力。

4 种鱼肝细胞色素 P450 酶系对毒死蜱脱硫代谢的 V_{max}/K_m 的大小为麦穗鱼 > 太阳鱼 > 剑尾鱼 > 斑马鱼。所以 4 种鱼肝细胞色素 P450 酶系对毒死蜱脱硫代谢能力, 麦穗鱼最大, 斑马鱼最低。因为 4 种鱼对毒死蜱的脱硫代谢产物毒性显著高于底物, 所以对毒死蜱的代谢能力越强则对毒死蜱的耐受能力应越弱, 相应的 LC_{50} 则越小。这与本文研究的毒死蜱对麦穗鱼的 LC_{50} 最小, 对斑马鱼的 LC_{50} 最大一致且两者的线性相关方程为

$$Y=-7 868.8 X+31 015 \quad R^2=(0.218 1)$$

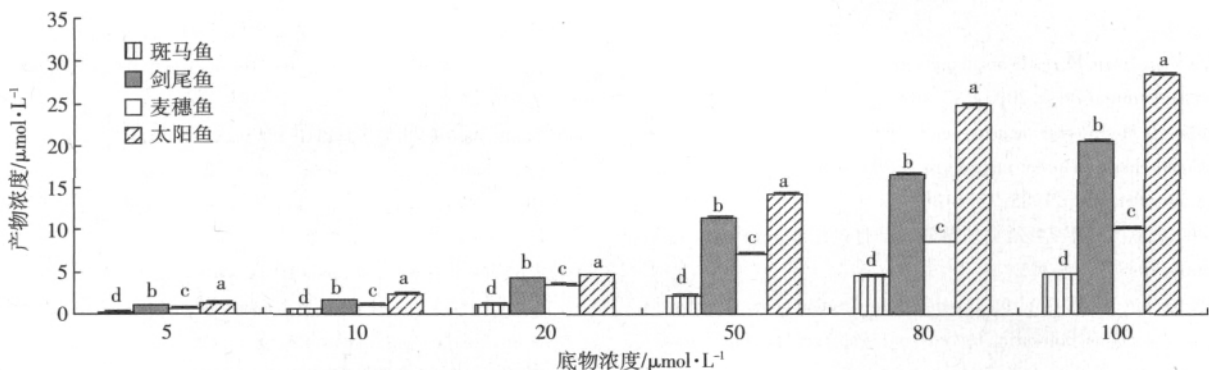


图 5 不同鱼肝细胞色素 P450 对马拉硫磷的脱硫代谢

Figure 5 Malathion desulfuration catalyzed by hepatic microsomal cytochrome P450 enzyme system in different fish

由此可知,毒死蜱对鱼类之间的毒性差异与鱼类肝细胞色素 P450 的代谢能力相关,但相关性较弱。

4 种鱼肝细胞色素 P450 酶系对对硫磷脱硫代谢的 V_{\max}/K_m 的大小为剑尾鱼>太阳鱼>麦穗鱼>斑马鱼。所以 4 种鱼肝细胞色素 P450 酶系对对硫磷脱硫代谢能力,剑尾鱼最大,斑马鱼最低。因为 4 种鱼对对硫磷的脱硫代谢产物毒性显著高于底物,所以对对硫磷的代谢能力越强则对对硫磷的耐受能力应越弱,相应的 LC_{50} 则越小。这与本文的急性毒性结果一致,两者的线性相关方程为

$$Y = -179.119X + 437.813 (R^2 = 0.8490)$$

由此可知,对硫磷对鱼类之间的毒性差异与鱼类肝细胞色素 P450 的代谢能力呈明显负相关。

4 种鱼肝细胞色素 P450 酶系对马拉硫磷脱硫代谢的 V_{\max}/K_m 的大小为太阳鱼>剑尾鱼>斑马鱼>麦穗鱼。所以 4 种鱼肝细胞色素 P450 酶系对马拉硫磷脱硫代谢能力,太阳鱼最大,麦穗鱼最低,与急性毒性结果相一致,线性相关方程为

$$Y = -4450.1X + 34324 (R^2 = 0.5102)$$

由此可知,马拉硫磷对鱼类之间的毒性差异与鱼类肝细胞色素 P450 的代谢能力呈负相关。

4 结论

不同鱼 CYP450 酶系对毒死蜱、对硫磷及马拉硫磷的代谢能力与农药对鱼的毒性呈负相关,其中毒死蜱的相关性较弱,对硫磷及马拉硫磷的相关性较强,从而得出 CYP450 酶系代谢活性差异是造成鱼类种间耐药性差异形成的一个重要原因。P450 酶系与农药作用的相关分子机理有待进一步研究。

参考文献:

- [1] 赵善欢. 植物化学保护[M]. (第三版). 北京:中国农业出版社, 2000: 287-289.
ZHAO Shan-huan. Phytochemical protection[M]. (3rd Edition). Beijing: China Agricultural Press, 2000: 287-289.
- [2] Hodgson E. Microsomal monooxygenase[C]//Kurkurt GA, Gillbert LI, eds. Comprehensive insect physiology, biochemistry and pharmacology, 11. Oxford: Pergamon, 1985: 225-321.
- [3] 邱星辉, 冷欣夫. 棉铃虫幼虫加单氧酶活性的组织分布[J]. 生态学报, 2000, 20(2): 299-303.
QIU Xing-hui, LENG Xin-fu. The tissue distribution of monooxygenase activities of cotton bollworm, *Helicoverpa armigera*[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2000, 20(2): 299-303.
- [4] Werck-Reichhart D, Hehn A, Didierjean L. Cytochromes P450 for engineering herbicide tolerance[J]. *Trends in Plant Science*, 2000, 5(3): 116-123.
- [5] 蔡道基. 农药环境毒理学研究[M]. 北京:中国环境科学出版社, 1999: 210.
CAI Dao-ji. Study on pesticide and environmental toxicology [M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1999: 210.
- [6] Perkins E J, Schlenk D. Immunochemical characterization of hepatic cytochrome P450 isozymes in the channel catfish: assessment of sexual, developmental and treatment-related effects [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 1998, 121: 305-310.
- [7] Schlenk D, Buhler D R. Role of flavin-containing monooxygenase in vitro biotransformation of aldicarb in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Xenobiotica*, 1991, 21(12): 1583-1589.
- [8] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术[M]. 北京:科学出版社, 2002: 96.
CHEN Yu-quan. Biochemistry experiment method and technology[M]. Beijing: Science Press, 2002: 96.
- [9] Ellman G L, Courtney D K, Andres V, et al. A new rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J]. *Biochemical Pharmacology*, 1961, 7: 88-95.
- [10] Buratti F M, Volpe M T, Meneguz A, et al. CYP-specific bioactivation of four organophosphorothioate pesticides by human liver microsomes [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2003, 186: 143-154.
- [11] Mutch E, Williams F M. Diazinon, chlorpyrifos and parathion are metabolised by multiple cytochromes P450 in human liver[J]. *Elsevier Toxicology*, 2006, 224: 22-32.
- [12] 许华夏, 李培军, 刘宛, 等. 真菌细胞色素 P450 与多环芳烃浓度及降解率的相互关系[J]. 农业环境科学学报, 2004, 23(5): 972-976.
XU Hua-xia, LI Pei-jun, LIU Wan, et al. Interrelationship between cytochrome P450 in fungi and contents and degradation rates of PAHs [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2004, 23(5): 972-976.
- [13] 王磊, 宋玉芳, 张薇, 等. 蚯蚓(*Eisenia fetida*)细胞色素 P450 及抗氧化酶系对环境浓度苯并(a)芘的响应[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(2): 337-342.
WANG Lei, SONG Yu-fang, ZHANG Wei, et al. Influence of Benzo(a) Pyrene on cytochrome P450 and antioxidant enzymes in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(2): 337-342.
- [14] Buratti F A, Testai E. Evidence for CYP3A4 autoactivation in the desulfuration of dimethoate by the human liver[J]. *Toxicology*, 2007, 241: 33-46.
- [15] Cunha Bastos V L F, Silva Filho M V, Rossini A, et al. The activation of parathion by brain and liver of a Brazilian suckermouth benthic fish shows comparable in vitro kinetics[J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1999, 64: 149-156.
- [16] Johannes Keizer, Giuseppina D'Agostino, Nagel R, et al. Enzymological differences of AChE and diazinon hepatic metabolism: correlation of in vitro data with the selective toxicity of diazinon to fish species[J]. *The Science of the Total Environment*, 1995, 171: 213-220.