

全氟辛烷磺酸对斑马鱼 AchE 及 LDH 的影响研究

潘伟^{1,2}, 韩菊¹, 沈洪艳^{1,2*}

(1. 河北科技大学环境科学与工程学院, 河北石家庄 050018; 2. 河北省药用分子化学重点实验室, 河北石家庄 050018)

摘要 [目的]探究 PFOS 对斑马鱼神经和能量代谢的影响。[方法]该研究采用室内暴露试验方法,将斑马鱼暴露于 0、0.56、1.67、5.00、15.00 mg/L 浓度的 PFOS 试验液中,测定斑马鱼体内 AchE 活性和 LDH 活性,试验周期为 15 d。[结果]PFOS 对斑马鱼头部 AchE 活性有诱导作用,0.56、1.67 mg/L 低浓度暴露组对 AchE 活性表现为诱导作用,而 5.00、15.00 mg/L 高浓度暴露组与低浓度暴露组相比,PFOS 对 AchE 活性有抑制作用。PFOS 对斑马鱼肌肉组织 LDH 活性表现为先诱导后抑制的作用,与对照组相比,在暴露前 6 d PFOS 诱导斑马鱼体内 LDH 活性,促进了斑马鱼能量代谢,从暴露第 9 天到试验结束,斑马鱼体内 LDH 活性受到抑制,能量代谢减弱,且随着暴露浓度的升高,抑制作用越明显,呈现剂量-效应关系。[结论]在整个试验周期内,与对照组相比 PFOS 可以诱导 AchE 活性,抑制兴奋的传递从而破坏神经递质系统,暴露 9 d 后,PFOS 对 AchE 活性的诱导作用随着暴露浓度的升高而减弱。PFOS 短期暴露可促进斑马鱼能量代谢能力,长期暴露抑制斑马鱼无氧代谢。

关键词 全氟辛烷磺酸;斑马鱼;神经系统;能量代谢;AchE;LDH

中图分类号 X 171.5 **文献标识码** A

文章编号 0517-6611(2020)08-0089-03

doi: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.08.022



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effect of PFOS on AchE and LDH in Zebrafish

PAN Wei-yi^{1,2}, HAN Ju¹, SHEN Hong-yan^{1,2} (1. School of Environmental Science and Engineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang, Hebei 050018; 2. Key Laboratory of Medicinal Molecular Chemistry in Hebei Province, Shijiazhuang, Hebei 050018)

Abstract [Objective] To have a better understanding of the toxicity effect of PFOS to zebrafish nerve and energy metabolism. [Method] Indoor exposure test was conducted. Zebrafish was exposed to PFOS at different concentrations of 0, 0.56, 1.67, 5.00, 15.00 mg/L, respectively. [Result] After 15 days, the results showed that the AchE was induced by PFOS, the 0.56, 1.67 mg/L lower concentration groups induced the AchE, but compared with lower concentration groups, 5.00, 15.00 mg/L groups inhibited the activity of AchE. The activity of LDH was increased firstly and then decreased. After exposure for 6 days, the LDH was induced by PFOS, and promoted zebrafish energy metabolism. Until the end of the experiment, the activity of LDH is subjected, and reduced energy metabolism. There is a concentration-effect relationship between PFOS and the zebrafish energy metabolism. [Conclusion] All the results indicated that throughout the experimental cycle, compared with the control group, PFOS can induce AchE activity and damage nervous system. After exposure for 9 days, the induction of AchE activity by PFOS decreased with the increase of exposure concentration. Short-term exposure to PFOS can promote zebrafish energy metabolism, and long-term exposure can inhibit zebrafish anaerobic metabolism.

Key words PFOS; Zebrafish; Nerve; Energy metabolism; AchE; LDH

全氟辛烷磺酸(perfluorooctane sulfonate, PFOS)是一种应用广泛的新型持久性有机污染物^[1]。PFOS 化学结构中含有 C-F 化学键,使其具有较强的热、化学稳定性以及疏水、疏脂等特性^[2],被广泛用于纺织品、地毯、皮革制品和家具等表面防污处理剂的生产中,同时可作为中间体用于生产涂料、泡沫灭火剂、地板上光剂、农药和灭白蚁药剂等^[3],所以 PFOS 在世界各大水系及我国长江、珠江、黄浦江、嘉陵江以及三峡库区等水体中均有检出^[4-5],PFOS 在北大西洋中的浓度范围是 8.6 ~ 36 pg/L^[6],在我国东江流域浓度为 0.97 ng/L^[7],在黄浦江浓度达 20.5 ng/L^[5,8],PFOS 可以通过呼吸作用和进食被生物体摄取,并具有毒性作用^[9],其毒性作用在食物链传递中被放大,易在生物体内富集并难以分解^[10-11]。

PFOS 具有免疫毒性,可降低小鼠淋巴细胞增殖功能和 NK 细胞活性^[12],PFOS 早期低剂量慢性暴露可引起大鼠成

年后学习记忆力减退,海马神经发育不足,组织的形态结构发生变化,引起海马环路的损伤^[13],还能改变中华倒刺鲃幼鱼能量代谢水平的下限^[14]。但 PFOS 对生物神经毒性效应和能量代谢的影响还有待进一步研究,因此该研究选取斑马鱼为受试生物,研究水体中 PFOS 对乙酰胆碱酯酶(AchE)、乳酸脱氢酶(LDH)的影响,为 PFOS 对水生生物亚急性毒性提供毒理学数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器 所用斑马鱼购自某生物研究所,AchE、LDH 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所,PFOS 试剂购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,其余试剂均为分析纯。

试验仪器包括移液枪(Pipet-Lite, TopPette Pipettor)、温度计、玻璃匀浆器、量筒、烧杯、5 L 玻璃烧杯、低温冰箱(BBC-226STV)、曝气泵、恒温水浴锅(HH-4)、精密电子天平(JJ323BC)、台式高速冷冻离心机(2-16PK)、酶标仪(Spectramax190)。

1.2 方法

1.2.1 毒性试验。试验用鱼试验前在充分曝气的自来水中驯养 15 d,以充分适应实验室环境,驯养期间斑马鱼自然死亡率低于 2%,并在试验前 24 h 停止喂养。为保证受试生物

基金项目 国家自然科学基金项目(41601547);国家环保公益性行业科研专项课题(201509041-05);河北省自然科学基金项目(B2014208068);河北省高等学校科学技术研究项目(BJ2017013)。

作者简介 潘伟(1993—),女,河北承德人,硕士研究生,研究方向:生态毒理学研究。*通信作者,教授,博士,从事污染物环境行为及效应、环境影响评价及规划研究。

收稿日期 2019-10-09;修回日期 2019-10-25

在试验过程中不死亡,设置试验最高暴露组浓度为 96 h 半致死浓度的 1/5,根据急性毒性试验结果,PFOS 96 h LC_{50} 为 75.864 mg/L,所以设置该试验暴露组浓度为 0、0.56、1.67、5.00、15.00 mg/L,并设置溶剂对照组,每个暴露组设 3 个平行,重复 3 次试验,采用静态试验的方法,试验期间,在玻璃鱼缸中分别加入 4 L 对应浓度的试验液体,将驯养后的斑马鱼投放至各暴露组,每组 25 条,于暴露后的第 3、6、9、12、15 天,将斑马鱼头部剪掉保留,内脏等内部器官取出保留肌肉组织,并分别对斑马鱼头部和肌肉组织进行称重,加入组织重量 9 倍的生理盐水进行研磨、离心,按照试剂盒要求将样品稀释至相应倍数后测定斑马鱼头部 AchE 活力、肌肉组织中 LDH 活性。

1.2.2 数据处理。试验数据采用 Microsoft Excel 2010 进行处理;作图使用 Origin 8.6;使用 GraphPad Prism 5 对数据进行单因素方差分析,与对照组相比, $P<0.05$ 表示差异显著,标记为*, $P<0.01$ 表示差异极显著,标记为**。

2 结果与分析

2.1 PFOS 对斑马鱼头部 AchE 活力的影响 乙酰胆碱酯酶(AchE)是生物神经传导的关键酶,目前已成为反映水生生物受到污染物胁迫危害程度的经典毒理学指标^[15],AchE 广泛存在于各种动物组织中,在神经突触间隙中,通过催化水解乙酰胆碱来终止其对胆碱受体的兴奋作用,维持神经冲动的正常传递,AchE 活性升高则抑制兴奋的传递,活性降低则使生物体表现为过度兴奋^[16-17]。各暴露组 PFOS 对斑马鱼头部 AchE 活性的影响见图 1。

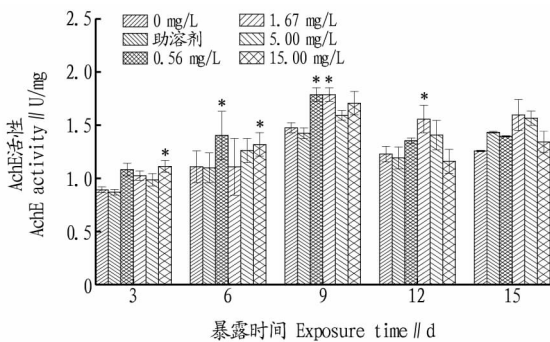


图 1 各暴露组 PFOS 对斑马鱼头部 AchE 活性的影响

Fig.1 Effects of PFOS in each exposed group on AchE activity in zebrafish head

由图 1 可知,在整个试验周期内溶剂对照组与空白组斑马鱼头部 AchE 活性无显著差异,且趋于一致,由此判定助溶剂对斑马鱼毒性可忽略不计,不影响 PFOS 对 AchE 活性的毒性效应。在整个试验周期内,与对照组相比,PFOS 对斑马鱼头部 AchE 活性均表现为诱导作用。暴露第 3 天,各暴露组 AchE 活性均显著高于对照组,其中 15.00 mg/L 暴露组 AchE 活性出现显著差异($P<0.05$),AchE 活性值为 1.11 U/mg,且随着暴露浓度的升高,PFOS 对斑马鱼 AchE 活性诱导作用越明显,有明显的剂量—效应关系。AchE 活性高于对照组,表明 PFOS 对斑马鱼头部 AchE 有诱导作用,致使神经突触间隙中乙酰胆碱数量减少,从而抑制了兴奋的传

递。暴露第 6 天,1.67、5.00 mg/L 暴露组 AchE 活性高于对照组但无显著差异,但 0.56、15.00 暴露组 AchE 活性显著高于对照组($P<0.05$)。暴露至第 9 天,各暴露组 AchE 活性均高于对照组,但 15.00 mg/L 的高浓度暴露组 AchE 活性低于 0.56、1.67 mg/L 的低浓度暴露组。暴露至第 12 和 15 天,除 15.00 mg/L 暴露组外,其余各暴露组 AchE 活性均高于对照组。其中 5.00、15.00 暴露组 AchE 活性均低于 1.67 mg/L 暴露组,这表明虽然 PFOS 对 AchE 活性有诱导作用,但当暴露浓度高于 1.67 mg/L 时,与其余低浓度暴露组相比,PFOS 对 AchE 活性表现为抑制作用,证明暴露一定时间后,PFOS 对 AchE 活性的诱导作用随着暴露浓度的升高而减弱。Xiao-chun Guo 等^[18]研究发现,全氟化合物可破坏斑马鱼神经递质系统、抑制神经元发育,余向阳等^[19]研究发现,毒死蜱和三唑磷对斑马鱼头部 AchE 活性均有抑制作用,且随着暴露浓度的增加、暴露时间的延长,对 AchE 活性抑制作用越明显,与该文中暴露前 6 d PFOS 对 AchE 活性作用结果及 PFOS 通过诱导 AchE 活性,间接影响神经递质乙酰胆碱的数量,破坏神经递质系统的结论一致。

2.2 PFOS 对斑马鱼肌肉组织 LDH 活性的影响 乳酸脱氢酶(LDH)在肌体能量代谢过程中起重要作用,其活性的改变可以间接反映肌体能量代谢情况^[20-21]。生物体正常条件下,LDH 含量较低,当细胞出现能量代谢障碍或者细胞损伤时,LDH 的含量会升高^[22-23]。各暴露组 PFOS 对斑马鱼肌肉组织 LDH 含量的影响见图 2。

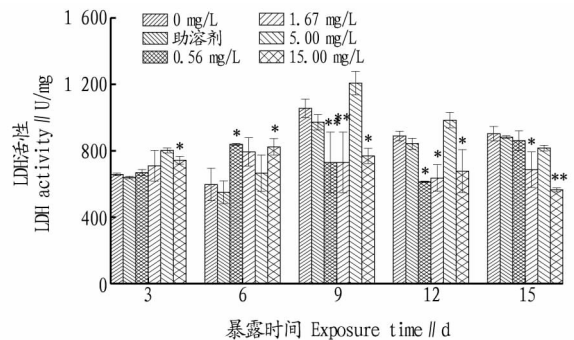


图 2 不同浓度 PFOS 对斑马鱼肌肉组织 LDH 活性的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of PFOS on LDH activity in zebrafish muscle tissue

由图 2 可知,在整个暴露周期内,PFOS 对斑马鱼体内 LDH 活性表现为先诱导后抑制的作用。在暴露第 3 天,各暴露组 LDH 活性均高于对照组,其中 15.00 mg/L 暴露组 LDH 活性与对照组相比表现显著差异($P<0.05$),这表明斑马鱼肌体为了应对 PFOS 刺激,以增加 LDH 活性的方式来增加肌体能量代谢^[17],同时斑马鱼细胞可能受到损伤。暴露至第 6 天,各暴露组 LDH 活性变化同第 3 天类似,其中 0.56 和 15.00 mg/L 暴露组 LDH 活性显著高于对照组($P<0.05$)。暴露至第 9 天,0.56、1.67、5.00 mg/L 暴露组 LDH 活性显著低于对照组,其中 0.56、1.67 mg/L 暴露组与对照组间差异极显著($P<0.01$),5.00 mg/L 暴露组与对照组间差异显著($P<0.05$),此时 PFOS 对斑马鱼体内 LDH 活性表现为抑制作用,原因可

能是斑马鱼持续受到 PFOS 胁迫,导致斑马鱼肌体无氧代谢能力减弱。暴露至第 12 天,0.56、1.67、5.00 mg/L 暴露组 LDH 活性依然显著低于对照组 ($P<0.05$)。暴露至第 15 天,15.00 mg/L 暴露组与空白组相比出现了显著差异 ($P<0.01$),各暴露组斑马鱼肌体内 LDH 活性均低于空白组,且随着暴露组浓度的升高,LDH 活性显著降低 ($P<0.01$),呈现剂量—效应关系。分析原因可能是受到 PFOS 胁迫后,斑马鱼肌体能量代谢增强以应对 PFOS 对肌体造成的损伤,但随着暴露时间的延长,增加能量代谢并不能消除 PFOS 带来的不利效应,且这种效应对斑马鱼肌体造成损伤,致使斑马鱼肌体能量代谢减慢。谢松等^[21]发现,三硝基甲苯对 LDH 活性有抑制作用,与该研究中暴露 9 d 后 LDH 活性变化趋势相近。

3 结论

(1) 在整个试验周期内,PFOS 通过诱导斑马鱼头部 AchE 活性,使乙酰胆碱的数量减少,抑制兴奋的传递从而破坏神经递质系统。与对照组相比,PFOS 对斑马鱼头部 AchE 活性均表现为诱导作用。暴露 9 d 以后,PFOS 对 AchE 活性的诱导作用随着暴露浓度的升高而减弱。

(2) 在暴露前 6 d,PFOS 对斑马鱼体内 LDH 活性表现为诱导作用,从暴露第 9 天到暴露结束,PFOS 对斑马鱼体内 LDH 活性表现为抑制作用,且随着暴露组浓度的升高,抑制作用越明显,呈现剂量—效应关系。PFOS 短时间(暴露前 6 d)暴露可促进斑马鱼能量代谢能力,长时间(暴露第 6 天到试验结束)暴露使斑马鱼无氧代谢能力减弱。

参考文献

- [1] 孙诗博,李武,潘小元,等.PFOS 对斑马鱼胚胎发育及 SOD、MDA 和 GSH 含量的影响[J].实用预防医学,2015,22(6):648-651.
- [2] 曹金玲,席北斗,许其功,等.水环境中 PFOA 和 PFOS 的质量浓度分布及其生态毒性[J].环境科学,2011,32(10):2817-2826.
- [3] 陈晓旭,姜声扬.全氟辛烷磺酸神经毒性研究进展[J].环境与职业医学,2017(9):847-851.
- [4] 夏继刚,牛翠娟,孙麓垠.PFOS 对斑马鱼胚胎及仔鱼的生态毒理效应[J].生态学报,2013,33(23):7408-7416.

- [5] 黄楚珊,张丽娟,胡国成,等.全氟辛烷磺酸盐和全氟辛酸在水环境及水生生物体内积累的研究进展[J].环境科技,2014,27(5):66-71.
- [6] YAMASHITA N,TANIYASU S,PETRICK G,et al.Perfluorinated acids as novel chemical tracers of global circulation of ocean waters [J].Chemosphere,2008,70(7):1247-1255.
- [7] 郑海,胡国成,许振成,等.东江流域表层沉积物中全氟辛酸和全氟辛烷磺酸含量水平研究[J].农业环境科学学报,2013,32(4):778-782.
- [8] WEI S,CHEN L Q,TANIYASU S,et al.Distribution of perfluorinated compounds in surface seawaters between Asia and Antarctica [J].Marine pollution bulletin,2007,54(11):1813-1838.
- [9] 程艳,崔媛,党志超,等.全氟辛烷磺酸(PFOS)对斑马鱼卵黄蛋白原 mRNA 水平的影响[J].环境科学,2012,33(6):1865-1870.
- [10] 刘小燕,屈文,胡方方,等.全氟辛烷磺酸钾对小鼠肾脏功能的损伤[J].江苏师范大学学报(自然科学版),2016,34(2):60-63.
- [11] 杨海,令狐文生.PFOA 和 PFOS 去除技术的研究进展[J].化学试剂,2017,39(6):602-606,670.
- [12] 董光辉,张颖花,何钦成,等.全氟辛烷磺酸(PFOS)对小鼠 T、B 淋巴细胞增殖功能和 NK 细胞活性的干扰效应研究[J].生态毒理学报,2009,4(5):641-646.
- [13] 杨生森,郭若冰,杨维才,等.新生鼠 PFOS 低剂量慢暴露对成年后神经行为的影响[J].生态毒理学报,2016,11(2):307-314.
- [14] 夏继刚,李秀明,付世建.PFOS 对中华倒刺鲃幼鱼爆发游泳及运动后代代谢恢复的影响[J].水生生物学,2019,43(2):356-361.
- [15] 李世凯,张健龙,江敏,等.伊维菌素对斑马鱼(*Danio rerio*)生理生化特性的影响[J].安全与环境学报,2014,14(1):300-305.
- [16] 叶东平,陈斌,何正波.乙酰胆碱酯酶的分离纯化及生物学研究进展[J].安徽农业科学,2011,39(7):3811-3814.
- [17] 岳鑫,杨爱江,徐鹏,等.锦胁迫对斑马鱼酶活性的影响研究[J].生物技术通报,2019,35(6):107-113.
- [18] GUO X C,ZHANG S N,LU S Y,et al.Perfluorododecanoic acid exposure induced developmental neurotoxicity in zebrafish embryos [J].Environmental pollution,2018,241:1018-1026.
- [19] 余向阳,赵于丁,王冬兰,等.毒死蜱和三唑磷对斑马鱼头部 AchE 活性影响及在鱼体内的富集[J].农业环境科学学报,2008,27(6):2452-2455.
- [20] 何理平,吴相勇.重金属铅对实验红鲫生理生化指标影响的研究[J].南华大学学报(自然科学版),2019,33(1):11-15.
- [21] 谢松,付兴亮,曲瑾,等.三硝基甲苯对斑马鱼组织 ATP 酶·乳酸脱氢酶和谷胱甘肽活性的影响[J].安徽农业科学,2013,41(3):1121-1122,1125.
- [22] 王凤华,杨江辉,沙丽娜,等.乳酸脱氢酶联合免疫细胞化学检测在恶性胸腔积液诊断中的价值[J].标记免疫分析与临床,2018,25(9):1335-1338.
- [23] 王健琨.骨髓增生异常综合征和巨幼细胞性贫血患者检测乳酸脱氢酶的临床意义[J].临床合理用药杂志,2017,10(36):127-128.

(上接第 88 页)

- [11] 张贞,魏朝富,尚慧.丘陵山区耕地质量的空间格局分析[J].长江流域资源与环境,2010,19(8):901-907.
- [12] 张超,张海峰,杨建宇,等.耕地自然质量空间分布及其影响因子分析:以北京市大兴区为例[J].测绘学报,2015,44(S1):75-81.
- [13] 韦仕川,熊昌盛,栾乔林,等.基于耕地质量指数局部空间自相关的耕地保护分区[J].农业工程学报,2014,30(18):249-256.
- [14] 张景华,张建龙,欧阳渊.遥感技术在汉源县地质灾害调查中的应用[J].遥感信息,2010(5):87-92.
- [15] 韩鑫峰.浅析 GIS 在土地管理中的应用[J].科技风,2014(18):78.
- [16] 杨永侠,孙婷,张丽红,等.京津冀地区耕地质量空间分布分形机制研究[J].农业机械学报,2017,48(2):165-171.

- [17] 施冰臣,文杰,李建华,等.云南省澜沧江流域耕地自然质量等空间分布特征研究[J].西南农业学报,2015,28(2):696-699.
- [18] 陈兰康,段正松,罗崇连,等.田东县耕地质量空间分布特征研究[J].安徽农业科学,2014,42(5):1432-1434.
- [19] 任平,吴涛,周介铭.基于 GIS 和空间自相关模型的耕地空间分布格局及变化特征分析:以成都市龙泉驿区为例[J].中国生态农业学报,2016,24(3):325-334.
- [20] 李黎,王会豪,王玉贵.四川省县域耕地空间分布与变化研究[J].乐山师范学院学报,2015,30(8):70-75.
- [21] 钱梦茹,梁栋栋,吴旭.基于空间自相关的耕地质量空间分布特征研究:以芜湖市 4 区为例[J].安徽农业科学,2015,43(35):315-317,342.
- [22] 周岩.基于局域空间自相关的吉林省耕地质量空间分布分析[J].安徽农业科学,2017,45(32):200-203,208.