

龙须菜对邻苯二甲酸二甲酯 (DMP) 毒性的响应^{*}

余江^{1,2}, 杨宇峰¹

(1 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632)

(2 广东药学院公共卫生学院, 广东 广州 510006)

摘要: 在实验条件下, 研究邻苯二甲酸二甲酯 (DMP) 暴露对龙须菜生理生化指标的影响。结果显示, 在低质量浓度 DMP ($\leq 0.1 \text{ mg L}^{-1}$) 下暴露时, 叶绿素 a (Chl a) 质量分数随暴露时间的延长呈明显上升趋势, 暴露 20 d 时 Chl a 质量分数 (以鲜质量计) 为 0.193 mg g^{-1} , 较之对照组上升了 27.81%, 短时间内 ($\leq 5 \text{ d}$) DMP 可促进可溶性蛋白质量分数增加 (最大值为 1.51%), 诱导过氧化氢酶 (CAT) 活性 (以鲜质量计) 上升 (最大值为 $205.822 \mu\text{g}^{-1} \text{ min}^{-1}$) 和丙二醛 (MDA) 含量下降 (最小值为 $16.54 \mu\text{mol g}^{-1}$), 促进龙须菜生长; 当 DMP 质量浓度 $\geq 0.3 \text{ mg L}^{-1}$ 时, Chl a 质量分数随着 DMP 质量浓度的升高和暴露时间的延长呈明显下降趋势, 高质量浓度 DMP 组暴露 20 d 时, Chl a 质量分数降至 0.118 mg g^{-1} , 较之对照组下降了 21.85%, DMP 引起可溶性蛋白质量分数逐渐降低, 抑制 CAT 活性, 并使 MDA 明显增加, 抑制龙须菜生长。DMP 暴露 20 d 内, 过氧化物酶 (POD) 活性随 DMP 质量浓度的升高和暴露时间的延长持续受到抑制, 而谷胱甘肽氧化酶 (GSH-PX) 活性与暴露时间呈抛物线型时间-效应关系。

关键词: 龙须菜; 邻苯二甲酸二甲酯; 过氧化氢酶; 抗氧化

中图分类号: Q89 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2007) 05-0088-05

邻苯二甲酸酯类 (Phthalic Acid Esters PAEs), 俗称酞酸酯, 是世界上广泛使用的人工合成有机物, 已成为全球性污染物之一。其中邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP) 等被美国、日本以及中国等许多国家列为重点控制的环境污染物^[1]。研究表明, PAEs 除具有一般毒物的毒性外, 还具有内分泌干扰毒性、生殖发育毒性和致癌、致畸、致突变等毒性^[2]。

有关 PAEs 对水生生物毒性的研究, 国内外已有比较多的报道, 主要集中于 PAEs 对浮游动物、鱼类等敏感生物的生长、繁殖等生理功能的影响^[3-4]。关于 PAEs 对生态系统初级生产者——微藻的毒性及其生态毒理学的研究在国内外也已有报道^[5], 但对于大型藻类, 尤其对龙须菜, 关于环境因素以及各种化学污染物对它的生理生化效应的影响研究甚少。龙须菜 (*Gracilaria lemaneiformis*) 是红藻门江蓠属中一种重要的大型经济海藻。随着海洋环境污染的日益严重, 龙须菜也不可避免的遭到环境污染。本试验选取以 DMP 为代表, 研究龙须菜对 DMP 的毒性响应, 以探讨酞酸酯类化合物对大型藻类生理生化特性的影响, 为海洋资源保护和环境生物监测提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源及预培养

实验用龙须菜取自广东省南澳养殖区。选择健康藻体, 用过滤海水冲洗材料, 放在室内水族箱内暂养。适应期水温 (20 ± 1) $^{\circ}\text{C}$, 光照强度 2 000 lx, 盐度 30‰, 光周期 12L:12D, pH 为 8.0。

1.2 实验方法

以过滤天然海水 + DMP 为培养基质, DMP 设置低质量浓度组 (0.1 mg L^{-1})、中质量浓度组 (0.3 mg L^{-1})、高质量浓度组 (1.0 mg L^{-1}) 3 个梯度, 另设一组空白对照 (等量丙酮 + 天然海水), 设置 3 组平行组。实验用 2 000 mL 烧杯, 装 1 000 mL 培养液, 加入龙须菜约 3 g 左右 (用高温灭菌海水洗净, 挑选健康藻体) 持续培养, 为保证营养盐的供应, 按 3 g/L 标准每隔 1 d 更换培养液, 实验周期为 20 d。于 1、5、10、20 d 取样测定龙须菜生长速率、叶绿素 a (Chl a)、可溶性蛋白质量分数、过氧化物酶 (POD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽氧化酶 (GSH-PX)、丙二醛 (MDA) 等指标。

* 收稿日期: 2007-03-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U0633006 40473046); 广东省科技攻关资助项目 (2004B50301010)

作者简介: 余江 (1974 年生), 女, 博士生, 讲师; 通讯联系人: 杨宇峰; E-mail: tyf@jnu.edu.cn

1.3 生理生化指标测定

生长速率由公式 $SGR (\% / d) = [(W_t / W_0)^{1/t} - 1] \times 100\%$ 求得, 其中: W_0 为初始时间龙须菜鲜质量 (g), W_t 为 t 天后龙须菜鲜质量 (g)。

Chla测定方法参考 Moran方法^[6]; 可溶性蛋白质量分数采用考马斯亮蓝法测定^[7]; POD活性采用愈创木酚法测定^[7]; CAT活性采用紫外吸收法测定^[7]; MDA采用硫代巴比妥酸法测定^[7]; GSH-PX采用试剂盒法, 试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

2 实验结果

2.1 DMP对龙须菜生长速率的影响

不同质量浓度 DMP对龙须菜生长的影响存在差异 (图 1)。低质量浓度 DMP组龙须菜生长速率较之对照组上升了 2.58%, 但无显著性差异 ($P > 0.05$); 中、高质量浓度 DMP介质中龙须菜的生长均呈负增长 ($P < 0.01$), 生长速率较之对照组分别下降了 300%、453.78%。由图 1 还可看出, 20 d 内, 生长速率与 DMP 质量浓度总体呈明显的负相关性 ($R^2 = 0.9416$ $P < 0.001$)。

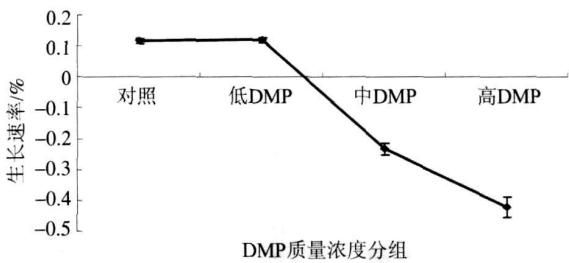


图 1 DMP对龙须菜生长速率的影响

Fig. 1 The effects of DMP on the special growth rate (SGR) of *G. lananeiformis*

2.2 DMP对龙须菜叶绿素 a 及可溶性蛋白质量分数的影响

不同质量浓度 DMP对龙须菜叶绿素 a 的影响存在差异 (图 2)。低质量浓度 DMP组的叶绿素 a 质量分数 (以鲜质量计, 下同) 随着暴露时间的延长而逐渐上升, 暴露 20 d 时, 叶绿素 a 质量分数达到 $0.193 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$, 较之对照组上升了 27.81%, 呈明显的正相关性 ($R^2 = 0.9932$ $P < 0.01$)。中、高质量浓度 DMP的叶绿素 a 质量分数则随着培养时间推移呈下降趋势, 呈明显的负相关性 (中质量浓度: $R^2 = 0.9569$ $P < 0.05$; 高质量浓度: $R^2 = 0.9768$ $P < 0.05$)。当培养时间 ≥ 10 d 中, 高质量浓度 DMP的叶绿素 a 质量分数较之

对照组均有明显下降 ($P < 0.05$), 其中高质量浓度 DMP组暴露 20 d 时, 叶绿素 a 质量分数较之对照组下降了 21.85%。

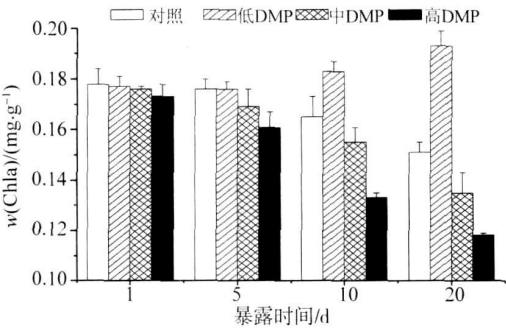


图 2 DMP对龙须菜叶绿素 a 质量分数的影响

Fig. 2 The effects of DMP concentration changes on chlorophyll a content of *G. lananeiformis*

低质量浓度 DMP组, 龙须菜可溶性蛋白质量分数随着暴露时间的延长呈先上升后下降趋势 (暴露 5 d 时达到最大值 1.516%), 与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$)。中、高质量浓度 DMP的可溶性蛋白质量分数随着暴露时间的延长呈下降趋势, 呈显明的负相关性 (中质量浓度: $R^2 = 0.8421$ $P < 0.05$; 高质量浓度: $R^2 = 0.9487$ $P < 0.05$)。当培养时间 20 d 中、高质量浓度 DMP条件下的可溶性蛋白质量分数较之对照组分别下降了 22.98%、24.52% (图 3)。

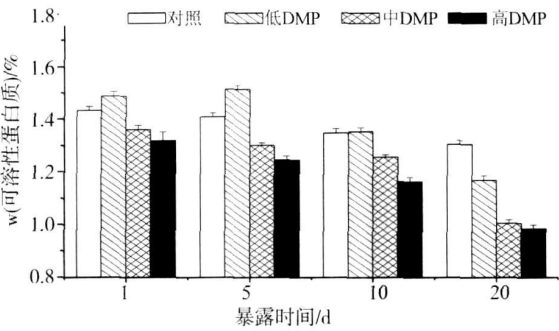


图 3 DMP对龙须菜可溶性蛋白质量分数的影响

Fig. 3 The effects of DMP concentration changes on soluble protein content of *G. lananeiformis*

2.3 DMP对龙须菜抗氧化防御指标的影响

低、中质量浓度 DMP组, 龙须菜的 POD 活性, 在培养至中期 (≤ 10 d), 随着暴露时间的延长呈缓慢下降趋势, 但与对照组比较差异不显著 ($P > 0.05$), 当培养时间 ≥ 20 d 尤其是中质量浓度 DMP下 POD 活性则明显下降 ($P < 0.05$)。高质

量浓度 DMP 条件下的 POD 活性随着暴露时间的延长呈明显下降趋势且呈明显的负相关性 ($R^2 = 0.963\ 9\ P < 0.05$) (图 4)。

随着暴露时间的延长, 各质量浓度 DMP 处理条件下龙须菜 CAT 活性大体均呈现先上升后下降的趋势 (图 5)。低质量浓度 DMP 组 CAT 活性, 在第 5 天时达到最大值 ($205.822\ \mu \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$), 但与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。而中、高质量浓度 DMP 处理下龙须菜 CAT 活性在培养初期 ($\leq 1\ d$) 均达到最大值 (分别为 $234.658\ 230.467\ \mu \cdot g^{-1} \cdot min^{-1}$, 较之对照组分别上升了 $23.93\%、21.72\%$), 而后逐渐下降尤其在培养到 $20\ d$ 时较之对照组分别下降了 $12.23\%、15.16\%$ 。

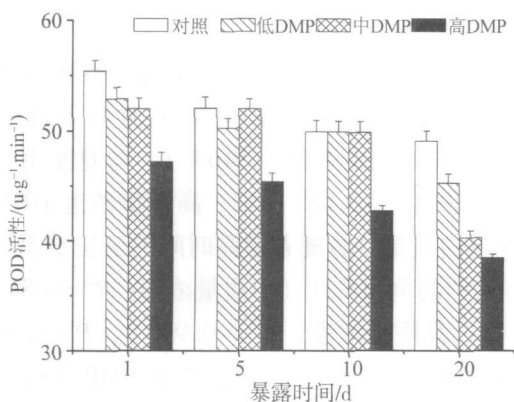


图 4 DMP 对龙须菜 POD 活性的影响
Fig. 4 The effects of DMP concentration changes on POD activity of *G. lemaneiformis*

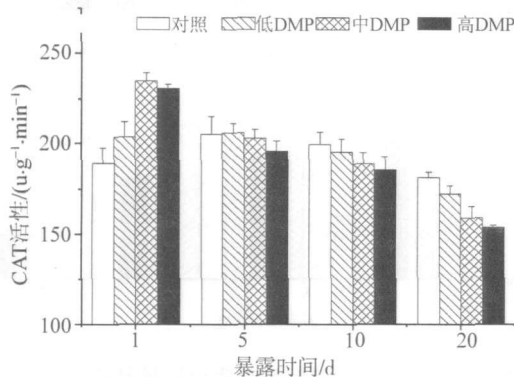


图 5 DMP 对龙须菜 CAT 活性的影响
Fig. 5 The effects of DMP concentration changes on CAT activity of *G. lemaneiformis*

各质量浓度 DMP 处理条件下的 GSH -PX 活性与对照组比较总体呈现先下降再上升后下降的趋势 (图 6)。GSH -PX 活性与暴露时间呈明显的抛物线型时间 -效应关系 (低、中、高质量浓度 DMP 组的时间 -效应关系式分别为 $y = -127.81x^2 +$

$659.49x + 255.82\ R^2 = 0.836\ 3\ P < 0.05$, $y = -124.53x^2 + 654.84x + 179.83\ R^2 = 0.985\ 1\ P < 0.01$; $y = -181.07x^2 + 923.59x - 164.45\ R^2 = 0.973\ 9\ P < 0.05$)。暴露初期 ($\leq 1\ d$), 各质量浓度组 GSH -PX 活性较之对照组分别下降了 $29.53\%、34.97\%、47.76\%$; 暴露中期 ($10\ d$), 各实验组 GSH -PX 活性均又明显上升, 但较之对照组差异不显著 ($P > 0.05$); 到暴露后期 ($\geq 20\ d$), 各 DMP 质量浓度组尤其是高质量浓度 DMP 的 GSH -PX 活性明显下降 ($P < 0.05$)。

低质量浓度 DMP 组 MDA 呈先下降后缓慢上升趋势, 与对照组比较无显著性差异 ($P > 0.05$)。中、高质量浓度 DMP 下的 MDA 含量大体均呈现上升趋势, 培养前期 ($\leq 5\ d$) 上升幅度不大, 分别为对照组的 $2.23\%、5.75\%$, 但到中后期 ($\geq 10\ d$), MDA 含量明显上升 (与对照组比较均有极显著差异, $P < 0.001$)。整个培养周期, 中、高质量浓度 DMP 条件下的 DMA 含量与培养时间呈明显的正相关性 (中质量浓度: $R^2 = 0.989\ 3\ P < 0.05$, 高质量浓度: $R^2 = 0.997\ 2\ P < 0.01$) (图 7)。各质量浓度 DMP 处理下的龙须菜 DMA 含量的变化情况刚好与生长速率, 叶绿素的变化趋势相反。

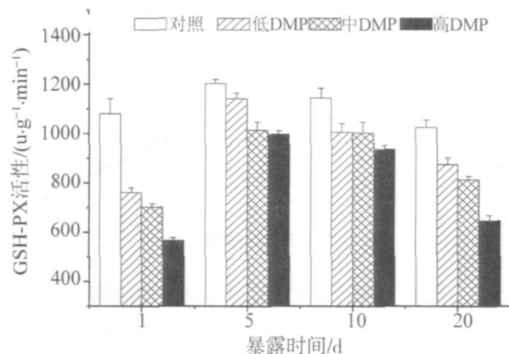


图 6 DMP 对龙须菜 GSH -PX 活性的影响
Fig. 6 The effects of DMP concentration changes on GSH-PX activity of *G. lemaneiformis*

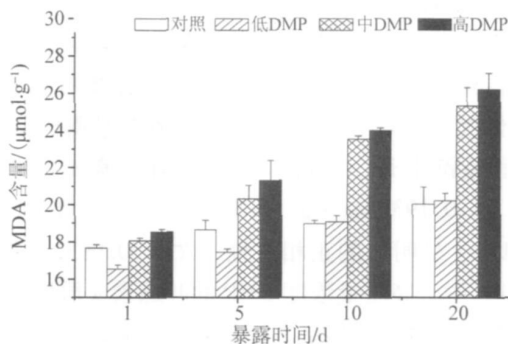


图 7 DMP 对龙须菜丙二醛含量的影响
Fig. 7 The effects of DMP concentration changes on propyldialdehyde content of *G. lemaneiformis*

3 讨 论

3.1 DMP对龙须菜生长状况的影响

本研究结果表明, 在环境因子相同条件下, 龙须菜生长受 DMP 质量浓度和暴露时间的影响。低质量浓度 DMP 在一定程度上促进龙须菜生长, 这与许多研究者^[8-9]发现低浓度有机污染物对藻类不但没有毒害, 反而有促进作用的结论一致。Stebbing^[10]认为这种增益现象是生物的一种“毒物的兴奋效应”, 是自我保护的一种机制。当污染物超过其耐受限度, 对藻类都有致毒效应, 其主要表现在抑制光合作用、呼吸作用和固氮作用, 使藻类生长受到抑制, 本研究发现当 DMP 质量浓度超过 0.3 mg/L 时龙须菜生长速率明显下降也证实了这一观点。

3.2 DMP对龙须菜叶绿素 a 及可溶性蛋白质量分数的影响

以 Chla 质量分数作为污染的生物指标, 这在有机污染物对微藻的毒理学研究中很常见, 有机污染物能改变藻类的 Chla 质量分数, 同时也意味着影响光合作用^[9]。本实验龙须菜暴露于 0.1 mg/L DMP 20 d 内使 Chla 质量分数逐渐上升, 而当 DMP 质量浓度大于 0.1 mg/L 时则引起 Chla 质量分数的降低, 并随 DMP 浓度的增加和暴露时间的延长, Chla 质量分数越来越低, 其原因可能有 3 个方面, 一是过高质量浓度 DMP 干扰了色素的合成, 二是引起了已有色素的降解, 三是高质量浓度 DMP 诱发了藻体的颜色突变体的出现^[11], 但相关机制还有待进一步研究。海藻内可溶性蛋白是藻类代谢的一个重要指标, 其含量的升高有助于维持藻体细胞的正常代谢, 提高海藻的抗逆性。但一定浓度的有机污染物却会改变蛋白质的合成模式, 减少藻类蛋白质的合成, 如诱导藻核酸酶和蛋白酶的活性, 使蛋白含量下降^[9]。本研究中, 低 DMP 质量浓度组可溶性蛋白质量分数在暴露第 5 天时达到一个峰值, 其原因在于龙须菜启动了自身保护机制, 通过提高可溶性蛋白来增加细胞渗透浓度和功能蛋白的数量, 从而有助于维持藻细胞的正常代谢。但当污染暴露达 10 d 后, 可溶性蛋白质量分数又开始下降, 这是由于细胞损害已经达到严重水平, 蛋白质的合成受到破坏^[9]。而在中、高质量浓度 DMP 组可溶性蛋白质量分数随暴露时间的延长而持续下降, 表明 DMP 质量浓度超过 0.1 mg/L 后, 藻细胞在较短时间内就会遭到损害。

3.3 DMP对龙须菜抗氧化能力指标的影响

植物抗氧化系统能够保护细胞在逆境条件下不

受氧化胁迫的伤害, 这种保护能力的大小取决于生物体内抗氧化系统的活性^[12]。

POD 是一种含 Fe 的蛋白质, 它能催化过氧化氢氧化酚类的反应, 在植物的呼吸代谢和抗性生理中起到重要的作用, 而 CAT 可有效地催化 H_2O_2 分解, 使其失去活性氧作用, 保护机体不受损害。以 POD、CAT 作为污染监测生物标志物已进行了一些研究^[13]。但有关污染物对海藻, 特别是大型藻类 POD、CAT 指标的报道还甚少^[14]。本研究发现在暴露时间低于 10 d 低、中质量浓度 DMP 下龙须菜 POD 活性均有所下降, 但下降幅度很小, 而当暴露时间大于 10 d 后, POD 活性明显下降, 且随暴露时间的延长, 下降幅度越大。而不同浓度组的 DMP 均会使龙须菜 CAT 活性随着污染时间的延长先升高后下降, 表现为低浓度短时间内诱导 CAT 活性和较长时间暴露抑制 CAT 活性。其原因在于海藻对环境胁迫有一定的耐受能力, 当污染胁迫较轻时, 抗氧化系统产生适应性诱导反应, 以减缓或消除污染引起的氧化胁迫, 但严重的污染胁迫则会对抗氧化系统起抑制作用, 导致 POD、CAT 等活性下降。

GSH - PX 既可清除 H_2O_2 又能清除脂类氢过氧化物, 广泛分布于机体各组织器官内, 能激活多种酶, 促进糖、脂肪及蛋白质代谢, 并可通过巯基与体内的自由基结合, 加速自由基的排泄, 有效地防御自由基和其它氧化物对机体的氧化损伤作用^[15]。本研究结果显示不同质量浓度 DMP 组, GSH - PX 活性与暴露时间呈抛物线型的时间 - 效应关系。

逆境条件下, 植物体内活性氧代谢失衡, 过多的活性氧能够使植物细胞膜脂发生过氧化作用, 损伤和破坏细胞膜, 丙二醛 (MDA) 是细胞脂质过氧化的产物, 以其含量大小来衡量膜过氧化的程度^[12]。本实验结果也证实了这一点, 当 DMP 质量浓度低于 0.1 mg/L 时 MDA 含量在培养初期有所下降, 而后随暴露时间的延长和 DMP 质量浓度的增加出现明显的上升趋势, 这刚好与生长速率的变化趋势相反, 即当 DMP 质量浓度超过 0.1 mg/L 时, 对龙须菜的生长由促进作用变为抑制作用, 龙须菜表现出发黄发白等死亡性状。

4 结 论

(1) 在低质量浓度 DMP (≤ 0.1 mg/L) 暴露下, 龙须菜生长良好, 叶绿素 a 质量分数随着暴露时间的延长呈明显的上升趋势, 而 MDA 则呈下降趋势; 但当 DMP 浓度 > 0.1 mg/L 时, 叶绿素 a 质量分数随着 DMP 浓度的升高和暴露时间的延长呈

明显的下降趋势, 相反 MDA 则呈明显上升趋势, 龙须菜生长受到明显抑制, 藻体表现出发黄发白等死亡性状。

(2) 低质量浓度 DMP ($\leq 0.1 \text{ mg/L}$) 可以在短时间内促进龙须菜可溶性蛋白质质量分数的增加, 随后转变为抑制; 而较高质量浓度 DMP ($\geq 0.3 \text{ mg/L}$) 导致可溶性蛋白质质量分数随暴露时间的延长而下降。

(3) POD 活性随 DMP 质量浓度的升高和暴露时间的延长几乎持续受到抑制; 而低质量浓度 DMP ($\leq 0.1 \text{ mg/L}$) 可以在短时间内诱导 CAT 的产生, 长时间暴露和高质量浓度 DMP 则抑制 CAT 活性; 无论是低质量浓度还是高质量浓度 DMP 组, GSH-PX 活性与暴露时间均呈抛物线型时间-效应关系, 即先被诱导后逐渐受到抑制。

参考文献:

- [1] 张征, 吴振斌. 酞酸酯对水生生物的生物效应[J]. 淡水渔业, 2006 36(11): 57-59.
- [2] EM KO K, EISUKE F. Role of oxidative stress in gem cell apoptosis by di (2-ethylhexyl) phthalate [J]. Biochem J 2002 365: 849-856.
- [3] 况琪军, 赵文玉, 邓萍. DBP 对斜生栅藻及天然混合藻类致毒效应研究[J]. 水生生物学报, 2003 27(1): 103-105.
- [4] CHEN W L, SUNG H. The toxic effect of phthalate esters on immune responses of giant freshwater prawn (*Macrobrachium rosenbergii*) via oral treatment [J]. Aquatic Toxicology 2004 74: 160-171.
- [5] 邱海源, 王宪. 邻苯二甲酸酯对海洋藻类的致毒效应

- [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005 44(2): 294-296.
- [6] MORAN R. Formulae for determination of chlorophyllous pigments extracted with N,N-dimethylformamide [J]. Plant Physiol 1982 69: 1376-1381.
- [7] 郝再彬, 苍晶, 徐仲. 植物生理实验[M]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学出版社, 2004.
- [8] 冯琛, 路新枝, 于文功. 逆境胁迫对条斑紫菜生理生化指标的影响[J]. 海洋湖泊通报, 2004 3: 22-26.
- [9] 李钦, 魏凤琴, 陈纪新, 等. 甲胺磷、辛硫磷对坛紫菜叶状体的生理效应[J]. 水产学报, 2004 2: 110-113.
- [10] STEBBING A R D. Hormesis: the stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. Sci Tot Environ 1982 22: 213-234.
- [11] 林光恒, 张小庆, 吴超元. 苯并(a)芘对紫菜 (*Porphyra*) 的致突变效应[J]. 海洋科学, 1990 2(2): 57-59.
- [12] FUJITA S, NAZAM D S. Purification and properties of polyphenol oxidase from cabbage (*Brassica oleracea* L) [J]. J Agric Food Chem 1995 43(5): 1138-1142.
- [13] 李钦, 郑微云, 王重刚, 等. 有机磷农药对坛紫菜对氧化物酶 (POD) 活性影响的研究 [J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2005 42(2): 201-210.
- [14] 余江, 杨宇峰, 聂湘平. 大型海藻龙须菜对重金属镉胁迫的响应 [J]. 四川大学学报: 工程科学版, 2007 39(3): 83-90.
- [15] ETUSHOK N, GABRYELAK T, PALECZ D et al. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments [J]. Aquat Toxicol 2002 61: 65-72.

Response of *Gracilaria lemaneiformis* to Dimethyl Phthalate

YU Jiang^{1,2}, YANG Yufeng¹

(1. Institute of Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

2. School of Public Health, Guangdong Pharmaceutical University, Guangzhou 510006, China)

Abstract Physiological and biochemical effects of dimethyl phthalate (DMP) on *Gracilaria lemaneiformis* were explored under indoor experimental conditions. The results showed that the content of Chlorophyll a (Chl a) increased obviously with the prolonging of exposed time, the two index reached $0.193 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and increased 27.81%, compared with the control group at the end of 20th days. Soluble protein content and catalase (CAT) activity increased but propylidialdehyde (MDA) content decreased in short time under low DMP concentration ($\leq 0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), *G. lemaneiformis* grew well. The content of Chl a decreased obviously with the increase of DMP concentration and the prolonging of exposed time, the index dropped to $0.118 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$ and decreased 21.85% compared with the control group at the end of 20th days. Soluble protein content and CAT activity decreased but MDA content increased distinctly. *G. lemaneiformis* grew badly under high DMP concentration ($\geq 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). During the exposure of 20 days, peroxidase (POD) activity was inhibited continually, and there was time effect relationship between glutathione peroxidase (GSH-PX) activity and the exposed time.

Key words *Gracilaria lemaneiformis*, dimethyl phthalate, catalase, antioxidant