

敌敌畏对草鱼谷丙转氨酶和谷草转氨酶活性的影响

柴菁, 冯福所, 卢婷婷, 胡雪莲

(遂宁市产品质量监督检验所, 四川遂宁 629000)

摘要: 敌敌畏 (DDVP) 是养殖水体的常见污染物, 为了评估敌敌畏对鱼类谷丙转氨酶 (GTP) 和谷草转氨酶 (GOP) 的影响, 将草鱼暴露于含 5~20 mg/L 敌敌畏的水体中饲养 10 d, 测定肝脏和肾脏中 GTP 及 GOP 活性的变化。实验结果表明, DDVP 对草鱼的 96 h LC₅₀ 为 22.9 mg/L。亚致死浓度 DDVP 暴露可导致草鱼 GTP 和 GOP 活性发生变化。在所有受检组织中, GTP 和 GOP 活性在暴露初期均受到不同程度的诱导, 但随着 DDVP 浓度升高和暴露时间延长, 酶活性呈下降趋势, 提示 DDVP 暴露所引起的酶活性变化与暴露浓度和暴露时间有一定的相关性。此外, GTP 和 GOP 在肝脏中胁迫明显, 可以作为 DDVP 污染的生物标记。

关键词: 敌敌畏; 草鱼; 谷丙转氨酶; 谷草转氨酶

文章编号: 1673-9078(2012)10-1319-1322

Effects of DDVP on the Activity of GTP and GOP in Grass Crap

CHAI Jing, FENG Fu-suo, LU Ting-ting, HU Xue-lian

(Suining City Product Quality Supervision & Inspection Institute, Suining 629000, China)

Abstract: Grass craps was exposed to an aquatic environment with DDVP concentration of 5~10 mg/L for 10 days. GTP and GOP activities in the kidney and liver of the fish were determined. The results showed that the LC₅₀ of DDVP (96 h) to grass cap was 22.9 mg/L. The activities of GTP and GOP were determined in grass cap after exposure. The two enzymes in all tested tissues were induced in the initial exposure days, and then the enzyme activities decreased with increase of DDVP concentration and extension of exposure time, suggesting that the enzyme activities correlated to the DDVP concentration and the exposure time. GTP and GOP were sensitive to DDVP exposure in liver, which could be used as a more suitable biomarker for DDVP pollution.

Key word: DDVP; Grass carps; GTP; GOP

敌敌畏(2,2-二氯乙烯基二甲基磷酸酯)是一种广泛应用于农业生产的有机磷类农药广谱杀虫剂, 由于其大量应用, 使其环境效应日益受到人们的关注, 因此, 研究其在水环境中的存在、迁移和转化规律有重要意义。近年来, 有机磷对鱼类的中毒机理和防治研究已有很大进展, 研究中发现 DDVP 属于高度农药^[1-3], 可以有效治愈体外寄生虫^[4]。鱼类有机磷中毒的病例报告屡见不鲜, 但有关 DDVP 对草鱼转氨酶活性定量变化的动态研究报道不多, 这方面的研究有助于进一步揭示 DDVP 的毒理机制。草鱼是中国重要的淡水养殖经济鱼种, 随着近年来养殖水体有机磷农药含量增多, 研究有机磷农药污染对草鱼代谢酶的影响, 对水产养殖业有着重要的实践意义。

转氨酶广泛存在于生物机体内, 它们的作用是催化 α -氨基酸的 α -氨基与 α -酮基互换, 这是机体内中间代谢的重要酶反应。转氨酶有多种, 其中以谷丙转氨酶 (GPT) 和谷草转氨酶 (GOT) 的活力最强。在正常情况下, 组织中转氨酶活性值较小^[5]。当组织中毒发生病变, 或者受损伤的组织范围较大, 可引起 GPT 和 GOT

浓度上升或活性突然持续性增强^[6]。本文分析比较了敌敌畏对草鱼肝脏和肾脏 GTP 及 GOP 活性的变化, 旨在得出敌敌畏对草鱼的半致死浓度和安全浓度, 及其对草鱼生理代谢的影响, 为制定我国渔业水体敌敌畏的水质标准提供依据, 为渔业生产管理提供依据。

1 试验材料

1.1 供试草鱼及饲养条件

草鱼购于农贸市场, 体质健康, 体重 20~35 g, 10 cm 左右, 养殖用水为曝气 3 d 的自来水, 水温约为 26 ± 2 °C, 每日以普通商品饲料喂食一次。驯养一周后用于实验。

1.2 供试试剂及主要仪器

敌敌畏 (河北新丰农药化工股份有限公司)。

仪器: 分光光度计、水浴箱、匀浆器、高速离心机
仪器: 752型紫外光栅分光光度计、电热恒温水浴锅、移液枪等。

2 试验方法

2.1 测定有机磷的半致死浓度

收稿日期: 2012-07-31

选定几个浓度范围进行预试验, 观察24 h及48 h的鱼类反应, 找出试验的正确浓度范围。根据预试验的结果与半致死浓度配制要求, 选择适当的试验浓度。每个浓度随机挑选10尾草鱼, 记录24、48、96 h各浓度组内鱼的死亡数。每24 h更换1次刚配制的同浓度试验液。对照组、染毒组同时进行试验。

2.2 组织处理

解剖草鱼其肝脏和肾脏, 在生理盐水中漂洗, 除去血液, 滤纸拭干, 称重小烧杯内。尽快剪碎组织块, 将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中, 加入预冷的三蒸水(使其体积比为1:5)进行匀浆, 上下转动研磨数十次(6~8 min), 充分研碎, 使组织匀浆化。将制备好的匀浆用普通离心机12000 r/min左右离心10 min, 收集上清液在-40 °C下保存, 用于酶活性测定。

2.3 测定4种酶活性

酶活性用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒, 按说明书进行测定。比活力单位用每g蛋白样品所含的酶量, 即U/mg蛋白质表示。

2.4 数据处理

所获的结果均为3次重复的平均值, 试验数据采用Microsoft Excel XP进行处理, 采用t检验法进行组间差异显著性分析。

3 结果与分析

3.1 DDVP对草鱼的急性毒性试验

表1 DDVP对草鱼的急性毒性实验

Table 1 Acute toxicity of DDVP on grass carp

浓度/(mg/L)	0	10	15	20	25	30
1 d	0	0	0	0	0	0
2 d	0	0	0	0	1	3
3 d	0	0	0	1	2	5
4 d	0	0	1	2	3	2
死亡率/%	0	0	10	30	60	100

DDVP对草鱼种的急性毒性结果见表1, 实验鱼在中毒后鳃盖停止活动, 用玻璃棒或小镊子轻轻刺激尾柄部位, 仍无反应即可确定为个体死。根据DDVP暴露浓度及其对应的死鱼数, 利用Bliss统计法进行处理, 得出DDVP对草鱼的96 h LC₅₀为22.9 mg/L, 以此为依据设置5 mg/L、10 mg/L、15 mg/L、20 mg/L四个DDVP暴露质量浓度。

3.2 DDVP对草鱼GTP活性的影响

测定结果显示, 较低浓度的DDVP(5 mg/L和10 mg/L)暴露对草鱼肝脏GTP的活性有抑制作用。在暴露的第1、2、3、5 d, 肝脏GTP活性均低于对照组, 对处理时间延长逐渐下降, 第3 d后则出现逐渐上升的趋

势。较高浓度的DDVP(15 mg/L)在暴露初期受到显著诱导($P<0.01$), 第3 d后酶活性下降。20 mg/L处理组中肝脏GTP活性在暴露第1 d显著高于对照组($P<0.01$), 2 d后出现逐渐下降趋势, 第10 d高于对照组, 抑制率高达68.03%。

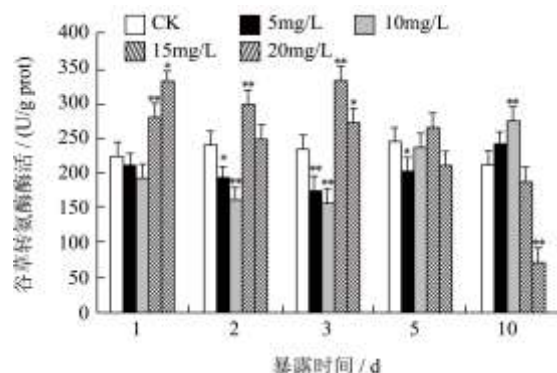


图1 不同浓度 DDVP 对草鱼肝脏 GPT 活性影响

Fig.1 Effects of DDVP on GPT activity in liver of Grass carps

注: *与对照组的差异显著 ($P<0.05$); **与对照组的差异极显著 ($P<0.01$)。下同。

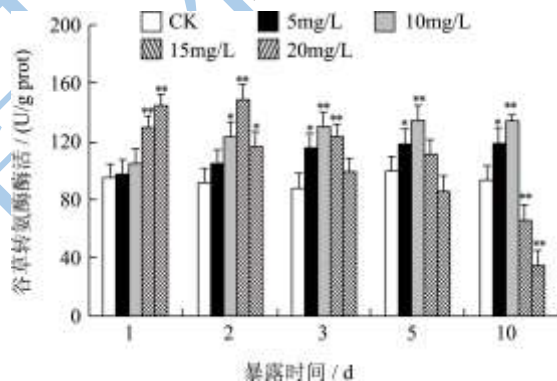


图2 不同浓度 DDVP 对草鱼肾脏 GPT 活性影响

Fig.2 Effects of DDVP on GPT activity of in kidney of Grass carps

图2显示, DDVP暴露对草鱼肾脏GTP活性也有显著影响。在暴露的第1 d, 处理后的各组GTP活性都有所升高, 且高暴露浓度组涨幅比低暴露浓度组大, 最高涨幅达148.69%。DDVP浓度较低时(5 mg/L和10 mg/L), 随着暴露时间的增加, GTP活性逐渐上升, 并在一定活性下基本保持恒定, 这两组均有显著升高($P<0.01$)。当DDVP浓度为15 mg/L和20 mg/L时在第2、3 d后出现逐渐下降趋势, 第10 d后显著低于对照组($P<0.01$), 最高抑制率达61.83%。

3.3 DDVP对草鱼GTP活性的影响

DDVP暴露同样引起草鱼肝脏GTP活性出现明显的变化(图3)。在5 mg/L实验组中, 肝脏GTP在第1、2、3 d受到显著抑制($P<0.05$), 在第3 d逐渐升高, 并随之高于对照组。其他实验组在暴露初期均有显著升高($P<0.01$), 15 mg/L实验组在第5 d诱导率达到最高

(173.46%)，5 d后随暴露时间的延长，肝脏GOT活性出现下降趋势，逐渐接近对照组并低于其浓度。到了第10 d，较高浓度的DDVP（15 mg/L和20 mg/L）暴露对草鱼肝脏GOT的活性有显著抑制作用（ $P<0.01$ ），最高抑制率达59.09%。

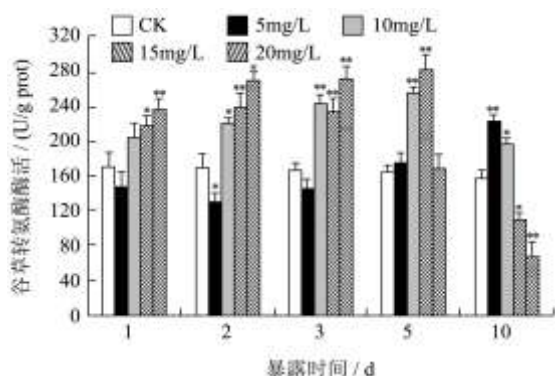


图3 不同浓度 DDVP 对草鱼肝脏 GOT 活性影响

Fig.3 Effects of DDVP on GOT activity of in liver of Grass carps

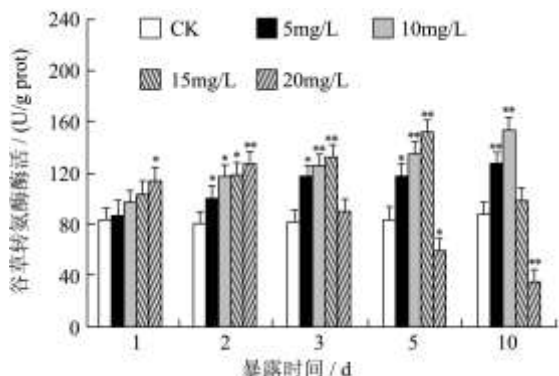


图4 不同浓度 DDVP 对草鱼肾脏 GOT 活性影响

Fig.4 Effects of DDVP on GOT activity of in kidney of Grass carps

草鱼在DDVP暴露期间,肾脏GOT活性也有明显的规律性变化,而对对照组的酶活性则基本保持恒定(图4)。在5 mg/L和10 mg/L DDVP暴露饲养中, GOT活性的趋势是随暴露时间的延长而又显著升高（ $P<0.01$ ）。其中10 mg/L的实验组在第10 d的诱导率达到184.51%。DDVP的浓度为15 mg/L时, 肾脏GOT活性在第5 d后逐渐下降并接近对照组浓度, 与对照组无显著差异。高浓度的DDVP（20 mg/L）暴露在第1 d后出现下降趋势, 5 d后与对照组差异显著（ $P<0.01$ ），第10 d达到最高抑制率（60.48%）。

4 结论

4.1 试验结果显示, DDVP污染对草鱼有明显的毒性。由表1可知, 随着敌敌畏浓度增大, 死亡率增大; 染毒时间延长, 死亡率增大, DDVP对草鱼的96h-LC₅₀为22.9 mg/L, 与金鱼^[1]乌颊鱼^[7]以及大马哈鱼^[8]比较偏低, 原因可能在于所用实验鱼个体存在差异, 以及实验环境

不同。中毒症状表现为急躁不安, 急剧螺旋式游动, 与其他报道的有机磷类农药对草鱼的中毒症状一致^[9]。根据国家环保局制订的《环境监测技术规范(水环境部分)》, 将化学物质对鱼类的毒性分为5个等级, 按照此毒性标准, DDVP对草鱼属高毒农药。一般情况下, 96 hLC₅₀的值的1/10即为安全浓度, 即2.29 mg/L。草鱼对毒物反应敏感, 有良好的剂量-效应关系, 是一种理想的毒性实验材料。在致毒机理方面, 黄辨非等^[10]认为DDVP是通过掌管神经正常冲动传递的胆碱酯酶结合, 将胆碱酯酶的活力点磷酸化, 使胆碱酯酶活力受抑, 失去水解破坏乙酰胆碱的能力。当浓度过高时, 组织中除了乙酰胆碱酯酶, 丁酰胆碱酯酶和丙酰胆碱酯酶也会受到抑制^[11], 从而使动物体神经失常, 中毒死亡。

4.2 DDVP的暴露对草鱼肝脏和肾脏的GPT及GOT有明显的影 响。肝和胰脏有较强的解毒作用^[12], 这与试验初期肝和胰脏的GPT及GOT活性随DDVP浓度升高而呈上升趋势是相符合的。此结果也表明了DDVP在短期内对肝和胰脏的GPT及GOT有激活作用, DDVP浓度越高, GPT和GOT活性上升的持续时间越短; DDVP浓度越低, GPT和GOT活性上升的持续时间越长。GPT和GOT活性受DDVP的诱导现象也见于大马哈鱼^[8]。此外, 一些重金属污染物在染毒初期也会引起鱼类组织的GPT和GOT活力的升高^[13~15]。但是随着浓度的增加及作用时间的延长草鱼肝脏和肾脏的GPT, GOT活力逐渐降低, 提示草鱼受到DDVP的高浓度胁迫或长期暴露时, 组织中的胆碱酯酶受到强烈抑制, 导致GPT和GOT活力的下降, 同时也会导致其他机能的降低^[16]。但至今对这一现象的发生机制尚不清楚, 有些研究者认为可能与氧自由基、肝脏微循环障碍、肠肝循环、缺血缺氧、能量供应不足, 细胞膜通透性增高所造成的肝损伤有关^[17]。

4.3 从试验结果来看, DDVP对草鱼肝脏和肾脏的GPT及GOT活性均出现明显的影响, 且变化趋势基本相似, 尤其是肝脏GPT和GOT活性与DDVP的暴露时间和暴露浓度差异显著, 说明他们之间具有明显的时间、剂量效应关系, 也可反映出DDVP对草鱼组织结构的伤害程度。提示肝脏的GPT和GOT均对DDVP胁迫敏感, 可以作为DDVP污染的生物标记。总之, 把草鱼作为水体环境汞污染的监测指示生物和建立酶学在水体污染研究中的应用是有希望的, 但对于在生物生长季节、性别、其他污染物共存等情况下, DDVP对草鱼酶活性的效应, 以及草鱼对DDVP的富集因子, DDVP进入草鱼体后的行为和代谢过程问题, 还有待于进一步的研究。

参考文献

- [1] 黄周英,谢进金,陈琳钦,等.敌敌畏对金鱼的急性毒性研究[J].毒理学杂志,2005,19(4):311-312
- [2] Bocquené G, Bellanger C, Cadiou Y. Joint action of combinations of pollutants on the acetyl cholinesterase activity of several marine species [J]. *Ecotoxicology*, 1995, 4: 226-279
- [3] Sievers G, Palacios P, Inostroza R. Evaluation of the toxicity of 8 insecticides in *Salmo salar* and the in vitro effects against the isopode parasite [J]. *Aquaculture*, 1995, 134: 9-16
- [4] Mladineo I, Marsic-Lucic J, Buzancic M. Toxicity and gross pathology of ivermectin bath treatment in sea bream [J]. *Environ. Safe.*, 2006, 63: 438-442
- [5] Uner N, Ozcan E, Oruc M, et al. Effects of Cypermethrin on Antioxidant Enzyme Activities and Lipid Peroxidation in Liver and Kidney of the Fresh water Fish [J]. *Oreochromis niloticus and Cyprinus Carpio.*, 2001, 67: 657-664
- [6] 郑永华,蒲富永.汞对鲤鲫鱼组织转氨酶活性的影响[J].西南农业大学学报,1997,19(1):41-45
- [7] Varó JC, Navarro B, Nunes L. Effects of dichlorvos aquaculture treatments on selected biomarkers of gilthead sea bream [J]. *Aquaculture*, 2007, 266: 87-96
- [8] McHenry JG, McHenry DK, Saward DD. Lethal and sub-lethal effects of the salmon delousing agent dichlorvos on the larvae of the lobster [J]. *Aquacultur*, 1991, 266: 331-347
- [9] 谢文平,马广智,赖子尼.氯氰菊酯和有机磷农药对草鱼鱼种急性及联合毒性[J].水利渔业,2006,26(1):98-103
- [10] 黄辨非.敌百虫对沼泽绿牛蛙蝌蚪的急性毒性研究[J].湖北农学院学报,1999,19:154-156
- [11] Varó I, Navarro JC, Amat F, et al. Effect of dichlorvos on cholinesterase activity of the European sea bass [J]. *Pestic. Biochem. Physiol.*, 2003, 75: 61-72
- [12] Li Lin, Xiao-Li Zeng, Jing Zhang. Effect of profenofos poisoning on liver lipid peroxidation and liver function in rabbits [J]. *Chinese Journal of Clinic Rehabilitation*, 2004, 8(21): 4380-4381
- [13] 汤鸿,李少普,王桂忠,等.铜、锌、锡对锯缘青蟹仔蟹代谢酶活力影响的实验研究[J].厦门大学学报,2000,39(4):521-525
- [14] 赵维信,魏华,贾江,等.铜对罗氏沼虾组织转氨酶活力及组织结构的影响[J].水产学报,1995,19(1):21-27
- [15] 卢敬让,赖伟,堵南山.锡对中华绒螯蟹肝R-细胞亚显微结构及血清谷丙转氨酶活力的影响[J].青岛海洋大学学报,1989, 19(2):61-67
- [16] Galgani F, Bocquené G. In vitro inhibition of acetylcholinesterase from four marine species by organophosphates and carbamates [J]. *Bull. Environ*, 1990, 45: 243-249
- [17] 李跃汉,杨素珍,王东浩,等.疏肝利胆中药与胆汁引流相结合对犬有机磷农药中毒肝损伤保护作用的研究[J].中国危重病急救医学,1999,11(5):281