

^{14}C 标记 1,2,7,8-TCDD 在鲤体内分布及代谢的初步研究

宋士波¹ 惠 阳¹ 徐旭东¹ 徐 盈¹ 刘 军²

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 西北农林科技大学生命科学院, 杨陵 712100)

摘要:利用 ^{14}C 标记 1,2,7,8-四氯代二苯并二噁英(1,2,7,8-Tetrachloro[^{14}C]dibenzodioxin, ^{14}C -1,2,7,8-TCDD)初步研究了其在鲤体内的分布和代谢规律。 ^{14}C -1,2,7,8-TCDD 溶解于丙酮/植物油中,腹腔暴露。暴露 1、2、4、8、12d 后取样,肝脏、胆汁、腹腔脂肪等消化制样后用液闪仪测量放射性活度。肝脏和胆汁内的放射性活度同步变化,都是第 8d 达到峰值后下降。腹腔脂肪内 1—2d 放射性明显高于随后取样的样品。肝和腹腔脂肪的分布量之比呈现“S”型变化趋势。暴露 4d 后,1,2,7,8-TCDD 在鱼体内分布的大小顺序为:脂肪>肝脏>消化管>性腺>肾脏>脾脏>皮肤>鳃>肌肉>脑>血液,从分布总量上看脂肪、肝脏、性腺、消化管和肌肉组织是鱼体内分布的主要部位。薄层色谱和放射性自显影以及 GC/MS 等方法分析了胆汁内的代谢物,并采用不同的溶剂系统来分离了母化合物其代谢产物。结果表明胆汁内母化合物的含量较少,大部分以代谢物形式存在并且胆汁内至少存在 3 种代谢产物。

关键词:二噁英;鲤鱼;分布;生物转化

中图分类号: X174

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0439-05

举世瞩目的有毒有机污染物二噁英,主要来源于垃圾和废弃物的焚烧,危险化工废料的排放和纸浆的漂白等过程^[1]。由于其化学性质的稳定和高脂溶性,二噁英类化合物能在环境中长期滞留,并通过食物链在生物体内富集,甚至传递进入人体^[2,3]。2,3,7,8-四氯代二苯并二噁英(2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, 2,3,7,8-TCDD)是二噁英同系物中最毒的一种,它与生物体的相互作用一直是国际上研究的热点。国际上关于 2,3,7,8-TCDD 在生物体内生物转化的报道不多,其高毒性(大鼠的 LD_{50} 为 22—45 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 体重)和低代谢率制约了其代谢物分析。本文采用同位素示踪技术,研究自然存在,毒性较低的 ^{14}C 标记 1,2,7,8-TCDD 在国内广泛分布的鲤(*Cyprinus carpio*)体内的分布规律,并分析胆汁内的代谢产物,探讨二噁英在鱼体内的生物转化过程。

1 材料与方法

1.1 材料与药品 柯达医用 X 光胶片, C_{18} SPE 小柱(Agilent, ZORBAX, 500mg), 薄层色谱板(TLC 板, Merck, 硅胶-60 板, 厚度 0.2cm), 甲醇、丙酮、二甲

苯、正己烷、氢氧化钠、双氧水、高氯酸、乙酸、乙腈、乙酸乙酯、植物油及麻醉剂 MS-222。 ^{14}C -1,2,7,8-TCDD 购自美国 Chemsyn 实验室(Lenexa, KS, USA; 纯度 > 97%, 215 $\mu\text{Ci}/\text{mg}$)。非标记 1,2,7,8-TCDD 在实验室内由邻苯二酚和 2,3,4-三氯硝基苯合成得到(合成路线参照文献^[4], 气质色谱鉴定纯度为 95.6%, 通过核磁共振和气质联用鉴定)。

1.2 仪器及分析条件 国营 262 厂 FJ2101 型双道液体闪烁计数器。Agilent 5973 气质联用仪, 离子源为 EI 方式, DB-5 毛细管柱 30m $\times$ 0.25mm, 氦气流速为 1mL/min, 进样口温度 250 $^{\circ}\text{C}$, 气质接口温度 280 $^{\circ}\text{C}$, 柱温程序: 100 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3min, 100—200 $^{\circ}\text{C}$ 之间 10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 200—300 $^{\circ}\text{C}$ 之间 6 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, 300 $^{\circ}\text{C}$ 保持 3min。

1.3 试验动物 鲤(约 220g)购于宝鸡市扶风县银窝渔场, 试验前驯化 10d。自来水经脱氯处理, 每天更换, 自然光照, 定时投喂饲料。

1.4 肝脏、脂肪、胆汁中放射性强度的时间变化趋势

1.2mg ^{14}C -1,2,7,8-TCDD, 0.3mg 非标记 1,2,7,8-TCDD 借助超声溶解于 10mL 丙酮植物油溶液(5/95, 体积比)中。鲤 12 尾, 每尾腹腔注射 1.8mL/kg 体重

收稿日期: 2004-05-13; 修订日期: 2005-02-18

基金项目: 中国科学院知识创新工程重要方向项目(KZCX2-414); 科技部环保 863 课题(2002AA601170)资助

作者简介: 宋士波(1977—), 男, 汉族, 山东惠民人; 博士; 研究方向为水生态毒理学

通讯作者: 徐盈, xuying@ihb.ac.cn

的混合液。暴露 1,2,4,8,和 12d 后随机取鱼 2 尾作为一个 1 试验组,用 MS-222 将鱼麻醉,抽血、解剖,取肝、腹腔脂肪,并用 1mL 注射器抽取胆汁。

1.5 体内各组织的分布 1.2mg ¹⁴C-1,2,7,8-TCDD 和 5.5mg 非标记 TCDD 借助于超声溶解于 10mL 丙酮/植物油(5/95,体积比)中配成放射性混合液。取 8 尾鱼,每尾腹腔注射 1.8mL/kg 体重的混合液。暴露 4d 后,麻醉、抽血、处死,解剖,分别取脑、鳃、皮、肌肉、肝、肾、消化管、腹腔脂肪、性腺等组织并抽取胆汁。

1.6 放射性的测量 各取约 100mg 组织,100μL 血液和 100μL 胆汁于液闪瓶中,每个瓶中加入 0.2mL 高氯酸,0.3mL 双氧水,然后将液闪瓶放置 75 °C 烘箱内 1h,经消化和脱色后加入 10mL 闪烁液,用液闪仪测量放射性强度。剩余的组织和胆汁于 -20 °C 冰箱中冷冻保存。用内标法计算各组织内分布的二噁英含量,总血量按体重 7 % 计算。

1.7 胆汁代谢物的分离 暴露 4d 后的胆汁,汇集后加入 3 倍体积的乙腈除蛋白,上清用蒸馏水稀释 30 倍后过 C₁₈ SPE 小柱,用甲醇收集并浓缩到 1mL 后在 TLC 板上点样。展开体系分别采用 1:2:4 的水/丙酮/乙腈,10:2:0.2 的乙酸乙酯/乙腈/乙酸,10:2:0.1 的乙酸乙酯/丙酮/乙酸,2:1 的正己烷/乙酸乙酯以及 100 % 的二氯甲烷等分离体系。配制 1.4μg/mL 的 ¹⁴C-1,2,7,8-TCDD 的正己烷溶液作为阳性对照,同胆汁样品一起点样,点样量 10μL。

1.8 放射性自显影 在暗室红灯下将点样的 TLC 板和 X 光胶片夹紧放置于在暗盒内,4 °C 环境下曝光 20d。显影、定影后观察结果。

2 结果

2.1 1,2,7,8-TCDD 在鱼体内的分布

如图 1 所示,肝脏内 1,2,7,8-TCDD 在鱼体内的分布是一个先升高后降低的过程,第 8d 达到峰值,胆汁内 1d 内就有放射性物质,其含量变化和肝脏内分布趋势同步而且含量较高,表明胆汁经消化道排泄是机体排出 1,2,7,8-TCDD 的主要途径。脂肪组织中 1—2d 分布着高含量的 1,2,7,8-TCDD,随后含量开始下降。图 2 表示肝和脂肪中分布量的比率不是固定的而是有明显“S”型变化趋势,表示 1,2,7,8-TCDD 有由脂肪组织向肝脏分布转归的趋势。由表 1 可以看出 1,2,7,8-TCDD 在鱼体内各器官浓度的大小顺序为:脂肪 > 肝脏 > 消化管 > 性腺 > 肾脏 > 脾脏 > 皮肤 > 鳃 > 肌肉 > 脑 > 血液,从分布总量

上看脂肪、肝脏、性腺、消化管和肌肉组织是鱼体内分布的主要部位。

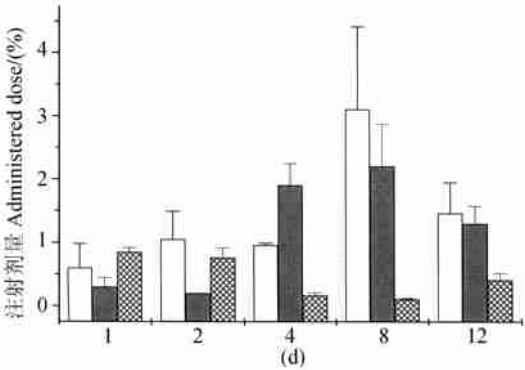


图 1 肝脏、胆汁、腹腔脂肪中放射性残留物含量的时间变化趋势
Fig. 1 Time course of radioactive substances in bile, visceral fat and liver

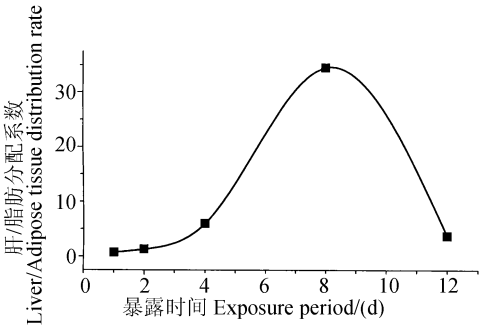


图 2 腹腔注射后肝和腹腔脂肪组织内放射性总量占总注射量百分率比值的时间变化趋势
Fig. 2 Time course of liver to visceral fat ratio of percent of dose

表 1 鲤腹腔注射 TCDD 后体内各组织的分布

Tab. 1 Tissue concentrations of TCDD following administration (i. p) in carp

组织 Tissues	TCDD 浓度 (ng/g) TCDD concentration	注射总量的百分数 (%) Percentage of administered dose
血液 Blood	37 ±5	0.21 ±0.018
脑 Brain	43 ±14	0.007 ±0.002
肌肉 Muscle	55 ±27	2.0 ±0.84
鳃 Gill	67 ±22	0.15 ±0.05
皮 Skin	100 ±39	ND
脾脏 Spleen	442 ±207	0.04 ±0.02
肾脏 Kidney	820 ±563	0.32 ±0.25
性腺 Gonad	1429 ±960	5.00 ±3.6
消化管 Gastrointestinal tract	2149 ±977	2.30 ±0.98
肝脏 Liver	4081 ±2356	3.7 ±2.0
胆汁 Bile	6638 ±3255	0.97 ±0.47
腹腔脂肪 Visceral fat	14924 ±9720	1.6 ±1.0

2.2 薄层色谱分离及放射性自显影分析

图 3 表明胆汁内放射性物质的极性,在水相中溶解度同二噁英母体化合物差异较大,如用二氯甲烷洗脱时,对照中 1,2,7,8-TCDD 分布在薄层板的溶剂前沿,而胆汁内存在的放射性物质绝大部分集中在点样点,说明胆汁内存在代谢产物而且它们的极性较大。展开溶剂中少量水的存在使得胆汁内代谢产物的 R_f 值均大于 0.5,说明存在高水溶性、强极性的代谢产物。胆汁经 10:2:0.2 的乙酸乙酯/乙腈/乙酸展开后,发现 3 种明显不同的放射性组分存在,说明胆汁内至少存在 3 种代谢产物。GC/MS 的结果证明(图 4)胆汁中也含有 1,2,7,8-TCDD 母体化合物,在(A)、(C)、(D)、(E)薄板上同阳性对照相同的位置,胆汁样品也有放射性斑点存在只是小且颜色淡,说明母体化合物所占比例较小。

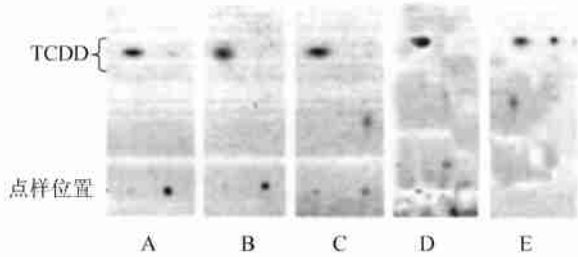


图 3 胆汁代谢物薄层色谱放射性自显影图

Fig.3 The radioactive autograph of bile metabolites after separated with TLC
薄层层析板左侧为对照,右侧为胆汁 SPE 甲醇馏出液 Left spot is TCDD control and right spot is bile SPE methanol elution
A 二氯甲烷 Dichloromethane
B 2:1 正己烷/乙酸乙酯 Hexane/ Ethyl acetate
C 10:2:0.1 乙酸乙酯/丙酮/乙酸 Ethyl acetate/ Acetone/ Acetic acid
D 10:2:0.2 乙酸乙酯/乙腈/乙酸 Ethyl acetate/ Acetonitrile/ Acetic acid
E 4:2:1 丙酮/乙腈/水 Acetone/ Acetonitrile/ Water

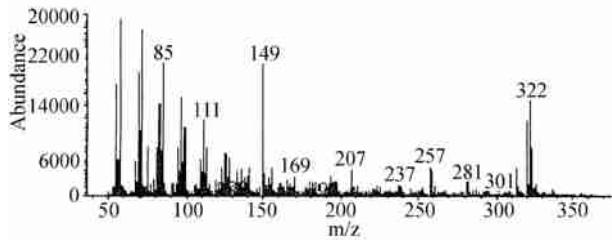


图 4 胆汁中发现 1,2,7,8-TCDD 母体化合物的 GCMS-EI 质谱图
Fig.4 The GCMS-EI mass spectra of 1,2,7,8-TCDD parent compound discovered in bile

3 讨论

鱼体暴露方式包括尾动脉注射、腹腔注射、肌肉

注射、混饲、强饲等,由于二噁英类化合物的在水相中的溶解度很低,高浓度的二噁英暴露不能采用血管注射、肌肉注射的方式,鲤科鱼类因胃部狭小如果强制灌胃容易引起其呕吐,混饲的方法定量不准而且容易污染水体,从文献报道上看,腹腔注射法是常用于二噁英研究的给药方法。单纯采用有机溶剂做溶媒,虽然可能比用植物油体系吸收率高而且迅速,但对机体的毒性也较大。Lakshmanan 等用 1:24 (v/v)的丙酮/植物油溶解 2,3,7,8-TCDD 腹腔注射大鼠后发现 24h 后只有总量的 35 %被吸收^[5]。本文肝脏组织中 1,2,7,8-TCDD 的含量在 8d 达到峰值,吸收缓慢可能是主要原因。

TCDD 脂溶性高,腹腔注射后非常迅速地透过腹腔生物膜吸收而分布于各脏器、组织。对大鼠的研究表明 TCDD 主要分布于脂肪和肝脏内,而肌肉和血液中浓度最低^[6]。本文发现 1,2,7,8-TCDD 在鲤鱼的主要分布部位也是肝脏和脂肪。研究表明影响肝组织中 TCDD 分布的因素主要是特异性受体 CYP1A2 的存在^[1,2]。TCDD 能够和 CYP1A2 特异结合,而结合物又可以诱导 CYP1A2 基因的表达。已有研究表明,肝脏是硬骨鱼类 CYP1A 分布的主要部位^[7]。CYP1A2 受体的活性随着吸收时间的延长、肝中结合物的增多逐渐升高,相应的肝组织内 TCDD 含量也逐渐升高,脂肪组织和血液内的 TCDD 逐渐向肝脏中转移,注射后到 8d,肝脏和脂肪组织 1,2,7,8-TCDD 含量的比值逐渐增大。如果暴露的二噁英含量高,肝脏中 CYP1A2 受体饱和,1,2,7,8-TCDD 又会向脂肪中转移,加上肝脏对二噁英代谢消除的影响,肝、脂肪含量的比值又会减小。从总量上看性腺也是二噁英分布的主要部位,鲤性腺内可能存在特异性结合 1,2,7,8-TCDD 的受体。虽然鲤性腺内 p450 酶受体分布情况未见报道,但某些硬骨鱼类如 *Stenotomus chrysops* 和 *Gadus morhua* 的性腺内存在可以诱导的 CYP1A 受体,同时相关实验表明 2,3,7,8-TCDD 可以引起鲤的性腺的损伤,使性腺体重指数^[7,8] (Gonadal Somatic Index, GSI) 的下降从而影响鲤的繁殖机能,所以鲤的性腺很可能存在高活性的 p450 酶受体。

体内和体外的试验表明,肝脏的细胞色素 P450 系统(尤其是 CYP1A1)是二噁英代谢的主要因素^[9]。二噁英环氯原子的个数及取代位置决定代谢的程度,氯原子个数越多机体越难以代谢,氯原子和二噁英环形成稳定的共平面结构时也难以代谢(如 2,3,7,8 位取代)^[10]。大鼠、狗、犊牛的研究表明 TCDD

的代谢途径包括羟基化(并伴随氯原子的移位)、脱氯、二噁英环断裂等,其形成的极性、小分子代谢产物又可以与葡萄糖醛酸形成结合物成为极性更大的相代谢产物^[9,11,12]。Fisk 等对水体长期暴露 2,3,7,8-TCDD 的虹鳟鱼研究表明胆汁中二噁英的主要以母体化合物形式存在,并有一种和葡萄糖醛酸结合的单羟基代谢物^[13]。本试验中, TLC 板放射性自显影显示胆汁中有至少有 3 种较强的放射性组分存在,说明鲤具有较强代谢 1,2,7,8-TCDD 的能力,有关这些代谢产物的鉴定尚待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] Janet J, Dilberto, Deborah Burgin, Linda S Birnbaum. Role of CYP1A2 in hepatic sequestration of dioxin: studies using CYP1A2 knock-out Mice[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1997, **236**: 431—433
- [2] Banks H T, Musante C J, Tran H T. A dispersion model for hepatic uptake and elimination of 2,3,7,8-tetrabromodibenzo-*p*-dioxin[J]. *Mathl. Comput. Modelling*, 1998, **28**: 9—29
- [3] Christopher H Hurst, Barbra D Abbot, et al. 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in pregant Long Evans Rats: disposition to Maternal and Embryo/ Fetal tissues[J]. *Toxicological Sciences*, 1998, **45**: 129—136
- [4] Allan P Gray, Steven P Cepa, I. J. Solomon O Aniline. Synthesis of specific polychlorinated dibenzo-*p*-dioxins[J]. *Journal of Organic Chemistry*, 1976, **41**: 2435—2437
- [5] Lakshmanan M R, Campbell. Studies on the mechanism of absorption and distribution of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat[J]. *Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics*, 1986, **239**: 673—677
- [6] Dilberto J J, Kerdderis L B, Jackson J A, et al. Effects of Dose and Routes of Exposure on the Disposition of 2,3,7,8-[3H] Tetrabromodibenzo-*p*-dioxin (TBDD) in the Rat[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1993, **120**: 315—326
- [7] Carmen Sarasquete, Helmut Segner Cytochrome p4501A (CYP1A) in teleostean fishes. A review of immunohistochemical studies[J]. *The Science of the Total Environment*. 2000, **247**: 313—332
- [8] Sakamoto K Q, Nakai K, Aoto T, et al. Cytochrome p450 induction and gonadal status alteration in common carp (*Cyprinus carpio*) associated with the discharge of dioxin contaminated effluent to the Hikiji River, Kanagawa Prefecture, Japan[J]. *Chemosphere*, 2003, **51** (6): 491—500
- [9] Raku Shinkyo, Toshiyuke Sakake, et al. Metabolic pathways of dioxin by CYP1A1: species difference between rat and human CYP1A subfamily in the metabolism of dioxins[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 2003, **409**: 180—187
- [10] A Ruth Steward, Robert Maslanka, Subodh Kumar, et al. Metabolism of 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzofuran By Rainbow Trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Chemosphere*, 1992, **25**: 1215—1220
- [11] Heldur Hakk, Gerald Larsen, Vernon Feil. Tissue distribution, excretion, and metabolism of 1,2,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in the rat[J]. *Chemosphere*, 2001, **42**: 975—983
- [12] Hakk H, Larsen G L, Feil V J. Metabolism of [¹⁴C]1,2,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in a ruminating Holstein calf[J]. *Xenobiotica*, 2001, **31**: 443—455
- [13] Aaron T, Fisk Alvin L, Yarechewski, Donald A Metner, et al. Accumulation, depuration and hepatic mixed-function oxidase enzyme induction in juvenile rainbow trout and lake whitefish exposed to dietary 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin[J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, **37**: 201—220

PRELIMINARY STUDIES ON METABOLISM AND DISTRIBUTION OF ¹⁴C LABELLED 1,2,7,8-TETRACHLORODIBENZO-P-DIOXIN IN COMMON CARP

SONG Shi-Bo¹, HUI Yang¹, XU Xu-Dong¹, XU Ying¹ and LIU Jun²

(1. *Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Science, Wuhan 430072*; 2. *College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100*)

Abstract : 2,3,7,8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD), an unwanted contaminant of combustion and chlorine bleaching processes, is the most toxic member of the halogenated aromatic hydrocarbons. The disposition and pharmacokinetics of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) has been investigated in several species and under various exposure conditions but very few studies are about its metabolites because of its high stability. The distribution profile and metabolism fate of 1,2,7,8-Tetrachloro [U-¹⁴C]dibenzodioxin in carp *Cyprinus carpio* were studied in this paper.

1,2,7,8-TCDD was dissolved in acetone/corn oil (8/95, v/v) and administrated by a single intraperitoneal injection (i.p., 46.4 μ Ci kg⁻¹ body weight). Liver, bile and visceral fat were sampled at 1, 2, 4, 8, 12 days after the exposure and the radioactivities in those sample was assayed by liquid scintillation counter. 100mg tissue or 100 μ L bile in little flask was mixed with 0.2mL perchloric acid, 0.3mL hydrogen peroxide and was put into a heating oven 75 °C for an hour. 10mL scintillation liquid was added into the flask immediately after the digest and bleaching procedure. The remanent bile was collected and stored in -80 °C for metabolite studies.

The radioactivity in liver and bile increased in the first 8 days and decrease sequently. The radioactivity in visceral fat was high obviously in the first 2 days and then decreased. Time course of liver to visceral fat ratio of percent of administered dose exhibited an apparent "S" pattern which shows 1,2,7,8-TCDD was transferred from visceral fat to liver in the first 8 days. The concentrations of 1,2,7,8-TCDD in various organs sampled at 4 days have much difference: visceral fat > liver > gastrointestinal tract > gonad > kidney > spleen > skin > gill > muscle > brain > blood. Visceral fat, liver, gonad, gastrointestinal tract and muscle were the main disposition sites of 1,2,7,8-TCDD. The metabolites in bile were studied by thin layer chromatogram, radioautograph and GC/MS. Various solvent systems had been developed to separate the parent compound and its metabolites. The Ethyl acetate/Acetonitrile/Acetic acid (10 : 2 : 0.2) is better to separate the metabolites than other solvent systems such as Dichloromethane, Hexane/ Ethyl acetate (2 : 1), Ethyl acetate/ Acetonitrile/ Acetic acid (10 : 2 : 0.1) and Acetone/ Acetonitrile/ Water (4 : 2 : 1). The results show that it exists at least 3 kinds of metabolite in bile, and the parent compound identified by GC/MS is only a small portion of radioactive materials.

Key words : Dioxin; Common Carp; Distribution; Biotransformation