

研究简报

雌雄及性畸变疣荔枝螺 P450 芳香化酶差异的研究

邓瑞鹏¹, 韩雅莉^{1, 2}, 周小朋¹, 李张伟¹

(1. 汕头大学生物系, 汕头 515063; 2. 广东工业大学轻工化工学院, 广州 510000)

A STUDY ON THE DIFFERENCES OF CYTOCHROME P450 AROMATASE IN FEMALE, MALE AND IMPOSEX SAMPLES OF *THAIS CLAVIGERA*

DENG Rui-Peng¹, HAN Ya-Li^{1, 2}, ZHOU Xiao-Peng¹ and LI Zhang-Wei¹

(1. Department of Biology, Shantou University, Shantou 515063;

2. Chemical Engineering College, Guangdong University of Technology, Guangzhou, 510000 China)

关键词: 疣荔枝螺; 性畸变; 微粒体; 细胞色素 P450 酶系

Key words: *Thais clavigera*; imposex; microsome; cytochrome P450 aromatase

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2005)01-0110-03

有机锡(Organotin)是至少含有一个 Sn-C 共价键的金属有机化合物, 由于其对水生生物具有显著的杀生作用, 20世纪 70 年代就被作为新型防污涂料而广泛用于船坞事业, 目前世界已超过 60% 深海船只均使用含有有机锡的防污漆涂料。有机锡的半衰期较长, 在天然水体中半衰期可达几个月, 当与悬浮颗粒物结合转移到沉积物以后则更加稳定, 半衰期高达 2 至 10 年以上。显然有机锡已成为人为引入海洋环境中毒性最大的物质之一。江桂斌在大连、天津、青岛等 13 个区域调查结果表明, 所有采集点毫无例外地存在有机锡污染, 其中海水中 TBT 浓度为 93.8 ng/L^[1]。海洋生物对有机锡有很强的富集能力, 大部分生物的富集或积累因子为 10^2 — 10^4 ^[2]。现已发现多种底栖软体动物由此而产生了不同程度的畸变现象, 其中以螺类的性畸变(Imposex)现象最为引人注目, 即雌性螺体内出现了不应有的雄性生殖器官, 包括阴茎、输精管等^[3]。国外学者推测有机锡对甾类激素代谢途径中的关键酶系——细胞色素 P450 芳香化酶(Cytochrome P450 aromatase, P450arom, 简称 P450 酶系)产生抑制作用, 致使雌性动物体内雄激素水平异常升高, 而产生雄性特征等异常现象^[4—5]。

疣荔枝螺(*Thais clavigera*), 俗称辣螺, 属软体动物门,

腹足纲, 新腹足目, 骨螺科。该螺喜栖于底质为泥沙石砾的沿海浅滩及港湾水域中, 因其味鲜可与荔枝媲美而得名, 为我国沿海居民经常捕食的贝类之一。疣荔枝螺的性畸变现象具有高敏性和广布性, 大量调查已经证明其性畸变程度随着污染程度的加重而加重^[3]。本文以正常雌性、雄性和性畸变疣荔枝螺为研究材料, 分别从其内脏团分离得到微粒体, 对 P450 酶系的三个主要组分, 细胞色素 P450, 细胞色素 b5 和 NADPH—细胞色素 P450 还原酶^[7]进行测定, 旨在验证正常和性畸变变螺体内这 3 种酶系的差异, 为揭示腹足类软体动物性畸变机理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 疣荔枝螺分别采自有机锡污染严重的汕头市北山湾(主要为性畸变雌螺和正常雄螺), 水样 TBT 含量为 2.03 ng/L 和污染轻微的粤东南澳岛海区(主要为正常雌螺), 水样 TBT 含量为 0.44 ng/L, 平均个体重 6.5 g, 活体运回实验室, 暂养于水箱。每次制备酶液用成螺 60—90 只(包括雌雄和性畸变个体)。

1.2 鉴定 种类鉴定参照施华宏的方法^[3], 敲破螺壳取出内部结构, 剪开外套膜, 在解剖镜下对标本进行雌、雄和性畸

收稿日期: 2004-02-16; 修订日期: 2004-04-15

基金项目: 国家自然科学基金(批准号 30271033); 广东省科技兴海重大项目(批准号 A200005F02)资助

作者简介: 邓瑞鹏(1980—), 男, 广东省人, 硕士生, 从事软体动物环境分子毒理研究

通讯作者: 韩雅莉, 博士, 教授, E-mail: yhan@stu.edu.cn

变鉴定。雌性螺的右触角稍后有形似雄性阴茎结构, 阴茎基部朝生殖孔方向形成输精管一端, 并在生殖孔周围的外套膜上皮内折形成输精管的另一端, 或阴茎基部和生殖孔两处的输精管已经连成一条完整的输精管, 均为性畸变个体。

1.3 微粒体和酶源的制备 分别取雌、雄和性畸变螺内脏团 7—10.5g(每个内脏团平均重 350mg), 剪成小块放入小烧杯, 按 1:2(W/V)加入匀浆缓冲液(0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 pH7.5, 含 1mmol/L EDTA、0.1mmol/L DTT、1mmol/L PTU、1mmol/L PMSF 和 10% 甘油)^[9], 匀浆, 在 10kg 离心 20min, 上清液经 4 层纱布过滤, 再于 100kg 超速离心 1h, 弃上清液, 得到微粒体沉淀, 将其悬浮于上述匀浆缓冲液(不含 PTU)^[9]中。置-80℃冰箱储存。以上操作均在 4℃下完成。

1.4 细胞色素 P450 含量测定 参考 Omura 等的方法^[7], 并结合沈钧^[6]的改进, 按以下步骤进行。将稀释至 1mg/mL 的微粒体悬浮液置 10mL 小试管后加入 5mg 连二亚硫酸钠, 混匀等分到参比杯和样品杯。参比杯作空白, 在紫外/可见光分光光度仪校基线。样品杯通入 CO 1min, 在波长 400—500nm 处扫描, 得到还原型细胞色素 P450-CO 复合物吸收光谱, 记录 CO 差光谱, 以 $\Delta OD_{450-490} = 91$ 为 mmol 消光系数及酶液的蛋白浓度计算细胞色素 P450 的含量。

1.5 细胞色素 b5 含量测定 参考 Omura 等的方法^[7], 结合邱星辉等^[8]的改进。将微粒体悬浮液稀释至 1mg/mL 加入 10mL 小试管中, 等分到参比杯和样品杯中, 参比杯在校基线, 样品杯中加入 5mg 连二亚硫酸钠, 混匀, 在波长 400—500nm 处扫描, 记录吸收值。以 $\Delta OD_{426-409} = 185$ 为 mmol 消光系数及酶液的蛋白浓度计算 b5 含量。

1.6 细胞色素 P450 还原酶活性测定 参照 Capdevila^[9]的方法。取 1.5mL 0.1mol/L pH7.5 的磷酸钠缓冲液, 加入 50μL 5mg/mL 细胞色素 C、0.5mL 微粒体粗酶液和 50μL 1.5mg/mL NADPH, 连续 3min 用紫外分光光度仪测定在 550nm 光吸收 (OD550) 值, 以毫摩尔消光系数 21.1 及酶液的蛋白浓度计算细胞色素 C 被还原的量。

1.7 SDS PAGE 电泳 采用垂直板电泳, 4% 浓缩胶, 12% 的分离胶, 恒流 20mA。上样量为 100μg 总蛋白。

表 1 雌、雄和性畸变疣荔枝螺内脏团微粒体细胞色素 P450、b5 含量和 P450 还原酶活性

Tab. 1 The components of P450 monooxygenase electron transport systems of visceral mass microsomes from

Female male and imposex samples of *T. clavigeras*

疣荔枝螺 <i>T. clavigeras</i>	细胞色素 P450 Cytochrome P450 (nmol/g protein)	细胞色素 b5 Cytochrome b5 (nmol/g protein)	细胞色素 P450 还原酶 Cytochrome P450 reductase (nmol cytochrome C reduced/mg protein/min)
female	21.7±11.0	49.0±13.0	0.490±0.163
male	39.1±15.0	49.1±12.0	0.286±0.100
imposex	35.7±14.8	26.6±3.5	0.266±0.111

注: 数据为 3 或 4 次实验的平均数±标准差 (Data are Mean±SD of three or four replicates)

3 讨论

3.1 微粒体细胞色素 P450 酶系及其防护性生化反应

1.8 蛋白质含量测定 采用考马斯亮蓝染色法, 以 BSA 分子量参照物。

2 结果

2.1 雌、雄性和性畸变疣荔枝螺内脏团微粒体蛋白 SDS-PAGE 电泳 细胞色素 P450 酶系为微粒体中分子量在 40—60kDa 的一类蛋白质^[10], 由图 1 可以看出, 雌、雄及性畸变疣荔枝螺内脏团微粒体均含有 P450 酶系(箭头所示), 三者在此范围内的蛋白电泳图谱基本相同, 但各个组分的含量方面有一定差异。

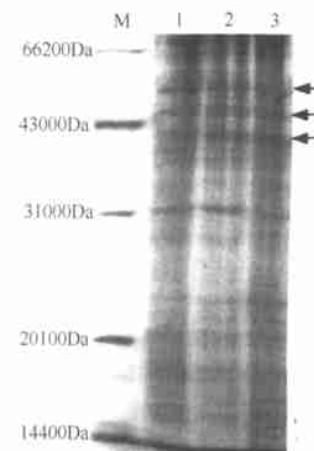


图 1 雌、雄和性畸变疣荔枝螺微粒体 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of female, male and imposex samples of *T. clavigeras*
M: Marker 1: Female 2: Male 3: Imposex

2.2 雌、雄和性畸变疣荔枝螺 P450 酶系三种组分比较 从表 1 结果可以看出, 性畸变螺内脏团微粒体的三个主要成分: 细胞色素 P450 b5 和细胞色素 P450 还原酶与正常雌性螺有较为显著的差异, 而与雄性螺更为接近(图 1)。性畸变螺细胞色素 b5 含量约为雌性和雄性螺的 1/2, 与雌和雄螺均存在显著差异(*t* 检验, *t*>0.05), 而雌性和雄性个体之间则没有差异。

污染物排入环境后经过环境迁移、分布、扩散和转化, 并通过不同途径进入生物机体, 大量研究表明, 进入机体后污染物首先导致机体一系列的生物化学变化, 包括防护性生化

反应, 即通过降低细胞中游离污染物的浓度, 从而防止或限制细胞组分发生可能的有害反应, 消除对机体的影响, 例如, 有机污染物常常导致一些酶的生成, 使新陈代谢发生变化。在机体酶系统中最重要的是细胞微粒体酶系统, 如微粒体细胞色素 P450 酶系(又称混合功能氧化酶系), 其组成包括: 细胞色素 P450、NADPH 细胞色素还原酶和细胞色素 b5 还原酶。该酶系的主要作用为代谢非极性的亲脂性有机化合物, 包括内源性和外源性化合物, 从生理作用来看, 它参与体内的胆固醇、激素等的生物合成和代谢, 从解毒作用来看, 许多外源性化合物都经该酶系统代谢, 形成极性较大的产物而易于从体内排出, 许多外源性化合物进入体内, 经混合功能氧化酶作用后发生各种变化, 大多数被转化成低毒易溶的代谢产物排出体外。然而有些则变成高毒甚至变成致癌物, 进而对动物机体造成损害。

3.2 微粒体细胞色素 P450 酶系在性激素合成和转化过程的功能以及性畸变现象

在脊椎动物体内, 性激素合成和转化途径为胆固醇先转化为雄烯二酮, 后者再转化为睾酮和雌酮, 其中细胞色素 P450 可以催化雄烯二酮转化为睾酮和雌酮或转化为 17β -雌二醇^[5]。雌激素和雄激素的化学结构非常相近, 其生化合成途径也相同, 在雄性或雌性体内均含有这两类激素, 只是两者比例上有所不同, 在它们的生物合成过程中任何一步被阻断均会导致另一类激素水平的升高或降低, 致使生物个体产生副性征的改变, 在某些鱼类中甚至会出现性的逆转现象^[5]。目前已知软体动物和脊椎动物含有同样的类固醇类激素, 而且软体动物类固醇类激素形成途径也和脊椎动物相似^[11]。已有人提出^[5], 腹足类性畸变现象的产生很可能是由于 TBT 抑制了类固醇激素生物合成过程中的限速酶——细胞色素 P450 酶系的作用, 使雄烯二酮或睾酮不能转化成雌酮或雌二醇, 导致雌性螺体内雄激素水平异常升高, 最终导致软体动物性畸变和间性现象。另外, 由于性激素是通过靶器官组织内相应的性激素受体而发挥作用的, TBT 也可能竞争性与雌激素受体结合, 而使得雌激素无法发挥作用, 从而出现雄性特征, 有关这部分机理尚需要进一步的研究证明。

致谢 感谢暨南大学水生生物研究所施华宏博士对鉴定疣荔枝螺标本给予的指导, 及汕头大学孙长勇老师和孙健同学对本实验提供的帮助。

参考文献:

- [1] Jiang G B. Current status of organotin studied in China and abroad [J]. *Journal of Hygiene Research*. 2001, **30**(1): 1—3[江桂斌. 国内外有机锡污染研究现状. 卫生研究. 2001, **30**(1): 1—3]
- [2] Quan X, Xue D M, Zhao Y Z, et al. Bioconcentration of organotins and their effects on marine organisms [J]. *Marine Environment Science*, 1997, **4**(16): 64—70[全燮, 薛大明, 赵雅芝, 等. 有机锡的生物富集作用与生物效应. 海洋环境科学, 1997, **4**(16): 64—70]
- [3] Shi H H, Huang C J. Tributyltin(TBT) pollution and imposex in marine gastropod [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2001, **21**(10): 1711—1717[施华宏, 黄长江. 有机锡污染与海产腹足类性畸变. 生态学报, 2001, **21**(10): 1711—1717]
- [4] Han Y L, Zhou X P, Li X N. The Mechanism for Tributyltin-mediated Imposex in Mollusca [J]. *Jurnal of shanghai Fisheries University*, 2003, **12**(2): 174—178[韩雅莉, 周小朋, 李兴暖. 三丁基锡致软体动物性畸变机制. 上海水产大学学报, 2003, **12**(2): 174—178]
- [5] Bettin C, Oehlmann J, Stroben E, et al. TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen level [J]. *Helgol Meeresunters*, 1996, **50**: 299—317
- [6] Shen J, Xu P P, Jin X P. New determination method of cytochrome P450 from liver [J]. *Industrial Hygiene and Occupational Disease*, 1997, **23**(4): 236—238[沈 钧, 徐佩佩, 金锡鹏. 肝脏中细胞色素 P450 测定方法的改进. 工业卫生与职业病, 1997, **23**(4): 236—238]
- [7] Tsuneo Omura, Ryo Sato. The carbon monoxide-binding pigment of liver microsomes. I. Evidence for its hemoprotein nature [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1964, **239**(7): 2370—2378
- [8] Qiu X H, Li W, Leng X F. Comparison of microsomal P450 monooxygenases in midgut and fat body tissues of 6th instar larvae of cotton bollworm (*Helicoverpa armigera*) [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2002, **48**(2): 208—212[邱星辉, 李 薇, 冷欣夫. 棉铃虫 6 龄幼虫中肠与脂肪体微粒体 P450 酶系的比较. 动物学报, 2002, **48**(2): 208—212]
- [9] Jorge Capdevila, Antonio Morell, Albert S. Perry, Moises Agosin. Effect of Phenobarbital and Naphthalene on some of the components of the electron transport system and the hydroxylating activity of house fly microsomes [J]. *Biochemistry*, 1973, **12**(7): 1445—1451
- [10] Qiu X H, Leng X F. Diversity of cytochrome P450. *Life Chemistry*, 1997, **17**(6): 13—16[邱星辉, 冷欣夫. 细胞色素 P450 的多样性. 生命的化学, 1997, **17**(6): 13—16]
- [11] Harada N, Yamada K, Saito K, et al. Structural characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene [J]. *Biophys Res Commun*, 1990, **166**: 365—372