

汞暴露对草鱼器官组织中碱性磷酸酶活性的影响

孔祥会¹, 刘占才^{1,2}, 郭彦玲¹, 郭春丽¹

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 焦作师范高等专科学校生物系, 河南 焦作 454001)

摘要:测定暴露于不同汞离子质量浓度 (0 mg/L、0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.15 mg/L、0.20 mg/L、0.25 mg/L) 下草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 血清、鳃、肝胰脏、脾、肾脏和肌肉等组织器官中碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 活性。研究目的在于评价汞离子对草鱼生理代谢的影响。暴露周期为 21 d。结果显示, 与对照组相比, 血清 AKP 活性在 0.05 mg/L、0.10 mg/L 和 0.15 mg/L 汞暴露组无显著性变化 ($P > 0.05$), 而在 0.20 mg/L、0.25 mg/L 组显著下降 ($P < 0.01$); 鳃 AKP 活性在 0.10 mg/L 和 0.15 mg/L 汞暴露组显著上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 而 0.05 mg/L、0.20 mg/L 和 0.25 mg/L 组无显著变化 ($P > 0.05$); 肝胰脏和脾脏 AKP 活性在所有实验组均显著下降 ($P < 0.01$); 肾脏 AKP 活性在 0.05 mg/L 组无显著变化, 其他实验组均显著升高 ($P < 0.01$); 肌肉 AKP 活性在所有实验组均无显著性变化 ($P > 0.05$)。本研究说明草鱼暴露于不同汞离子浓度下, 具有不同生理功能的器官组织的 AKP 活性变化存在较大差异。[中国水产科学, 2007, 14 (2): 270–274]

关键词: 汞离子; 碱性磷酸酶; 草鱼

中图分类号: Q55

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2007)02–0270–05

碱性磷酸酶 (Alkaline phosphatase, AKP, EC 3.1.3.1) 是一种非特异性的磷酸水解酶, 在调节动物体内钙磷吸收, 维持钙磷平衡方面起着重要作用, 是水产动物赖以生存、生长的重要调控酶类之一。AKP 是一种结合在膜上的金属酶^[1], 其结构和活性与环境密切相关, 在受到重金属离子的污染的环境中, AKP 的构象及活性将会受到影响^[2–4], 从而影响水产动物的生理代谢。因此, 研究重金属对 AKP 活性的影响显得尤为重要。

目前, 国内外在水产动物 AKP 的理化性质、结构功能及催化机理方面作了大量的研究工作^[5–7]。水环境中的重金属对水产动物有各种毒副作用^[8–10], 关于重金属与 AKP 活性之间的相关性已有报道^[11–13], 研究表明重金属对机体 AKP 活性及生理功能具有重要影响。但汞离子对鱼类 AKP 活性影响的报道较少。草鱼 (*Ctenopharyngodon idella*) 是中国重要的淡水养殖经济鱼种, 随着近年来养殖水体重金属含量增多, 研究重金属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。本实验以草鱼为研究对象, 使其暴露于汞离子不同质量浓度下, 研究不同组织器官中 AKP 活性的变

化, 探索其变化规律, 旨在评价汞离子对草鱼生理代谢的影响, 为渔业生产管理提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验用草鱼及其饲养管理

本实验所用草鱼来源于同批繁殖、同池培育、体色正常的健康草鱼。体质量 (50 ± 5) g, 体长 (10 ± 1) cm。实验容器为 200 L (100 cm × 50 cm × 40 cm) 的塑料水箱, 养殖用水为充氧曝气的自来水, 每箱放水 100 L, 用来配制不同汞离子浓度 (以 HgCl_2 配制) 的水体。草鱼运回后, 适应性驯养 1 周后开始实验。整个实验期间小型增氧机增氧, 不投饵, 光周期为 12L:12D, 各组管理方法相同。

1.2 草鱼的汞暴露处理

采用常规急性毒性实验方法^[14], 测定汞离子对草鱼 96 h 的半数致死浓度 (LC_{50}) 为 0.42 mg/L, 安全浓度为 0.042 mg/L。以此为依据, 设置 0.05 mg/L、0.10 mg/L、0.15 mg/L、0.20 mg/L 和 0.25 mg/L 5 个汞暴露质量浓度。草鱼随机分为 6 组 (5 个实验组和 1 个对照组), 每组 10 尾, 分别暴露于相应汞离子浓度中。对照组不添加汞离子, 汞离子质量浓度

收稿日期: 2006–07–05; 修订日期: 2006–11–06。

基金项目: 河南省科技攻关项目 (0624030022); 河南省动物学重点学科资助项目。

作者简介: 孔祥会 (1968–), 男, 博士, 教授, 主要从事环境适应与分子进化研究。E-mail: xhkong@henannu.edu.cn

视为 0 mg/L。暴露 21 d 后取样。

1.3 血清和组织粗提液制备

草鱼采用尾动脉取血,每尾鱼取血 1 mL,分别存于 2.5 mL 离心管,4 ℃ 下放置 24 h 吸取血清。取血后迅速解剖鱼体,取出鳃、肝胰脏、脾、肾和肌肉,生理盐水冲洗后,滤纸吸干,称取 0.1 g,按 1:9(质量体积比)加入生理盐水,冰浴匀浆,4 ℃,10 000 r/min 离心 10 min,取上清液。血清及粗提液均存于 4 ℃ 待测。

1.4 AKP 活性测定

AKP 活性测定采用陈清西等^[15]的方法。酶活单位定义:37 ℃ 下,反应体系中 1 mL 血清或 1 g 蛋白,15 min 内催化对硝基苯磷酸二钠(pNPP,购于 BBI 公司)生成 1 mg 对硝基酚的酶量(U)。组织或血清 AKP 活性定义:1 mL 血清或 1 g 蛋白中含有的酶活性单位数。

蛋白浓度测定:参照 Bradford 的测定方法^[16],以牛血清白蛋白(BSA,购于 AMRESCO 公司)为标准蛋白。

1.5 数据处理

结果以平均值±标准差($\bar{X} \pm SD$)表示。采用 Excel 2003 统计分析软件提供的分析工具进行 One-way ANOVA 分析和独立性 t 检验。显著性水平设为 $P=0.05$,当 $P<0.01$ 认为差异极显著。

2 结果与分析

不同汞离子浓度下,草鱼血清、鳃、肝胰脏、脾、肾和肌肉等器官组织 AKP 活性存在较大差异(图 1)。血清 AKP 活性低浓度组(0.05 mg/L, 0.10 mg/L, 0.15 mg/L)与对照组相比无显著性变化($P>0.05$)。高浓度组(0.20 mg/L, 0.25 mg/L) AKP 活性与对照组相比显著降低($P<0.01$),0.20 mg/L 和 0.25 mg/L 组的酶活性较对照组分别下降 27% 和 57%,说明在这 2 个浓度下 AKP 活性受到抑制。鳃 AKP 活性随着汞离子浓度的增加,其变化趋势先增加而后下降。0.10 mg/L 组 AKP 活性较对照组显著增加($P<0.05$),0.15 mg/L 组 AKP 活性达到最高,显著高于对照组($P<0.01$),较对照组相比分别增加 36% 和 133%;0.20 mg/L 和 0.25 mg/L 组酶活性下降,与对照组相比无显著性变化($P>0.05$)。肝胰脏和脾脏中 AKP 活性随汞离子浓度增加而下降,并且各浓度汞离子暴露组均显著低于对照组($P<0.01$),二者在 0.25 mg/L 组酶活性达到最低,分别较对照组下降 56% 和 57%,说明汞离子对肝胰

脏和脾脏中 AKP 活性有较大的抑制作用。肾脏 AKP 活性随着汞离子浓度的增大先增高后降低,0.05 mg/L 组活性高于对照组,但无显著性差异($P>0.05$),0.10 mg/L 和 0.15 mg/L 组显著高于对照组($P<0.01$),0.20 mg/L 和 0.25 mg/L 组 AKP 活性低于 0.15 mg/L 浓度组,但仍显著高于对照组($P<0.01$)。说明在本实验浓度范围内,汞离子对肾脏 AKP 活性有促进作用,但浓度不同,其影响也存在差异。肌肉 AKP 活性在不同汞离子浓度下没有呈现出显著性变化($P>0.05$),说明在本实验浓度范围内,汞离子对肌肉 AKP 活性影响不显著。

3 讨论

汞是鱼类的非必需元素,无机汞盐和有机汞化合物(如甲基汞)对生物体均有较大危害^[17-18]。周立红等^[19]研究发现重金属离子对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)胚胎毒性强弱顺序由大到小依次为汞、铜、铅、锌,对仔鱼的毒性顺序由大到小依次为铜、汞、锌、铅。吴鼎勋等^[20]研究显示,重金属离子对黑斑黄姑鱼(*Nibea miichioi*)仔鱼的毒性由大到小依次为汞、铜、锌、镉^[20]。

汞离子主要是通过巯基、氨基、羧基、磷酸基等酶活性基团结合而影响酶的活性,从而阻碍细胞的正常代谢,导致细胞凋亡或坏死^[21]。颜思旭等^[22]研究发现文昌鱼(*Branchiostoma belcheri*) AKP 的咪唑基、吡啶基及氨基都是维持酶活性所必需的基团。陈清西等^[23]提出体外条件下汞离子能够使锯缘青蟹(*Scylla serrata*) AKP 的分子构象和活性中心微环境发生变化,从而抑制 AKP 的活性。廖金花等^[24]的研究也发现汞离子对杂色鲍(*Haliotis diversicolor*) AKP 活性有着极强的抑制作用。

本研究中,血清 AKP 活性在低浓度组与对照组相比无显著性变化,说明血液中的 AKP 对低浓度汞离子在一定时间内具有耐受能力。这一结果可以从孟紫强^[21]关于汞离子在血液中转运理论得以阐释。当一定浓度二价汞离子进入血液后大部分与血浆蛋白巯基结合形成结合型汞,也可与含巯基的低分子化合物如半胱氨酸、还原型谷胱甘肽等结合形成扩散型汞,从而降低汞离子的毒性。但随着汞离子浓度的增大,超出了血液的结合能力,汞离子即会对血液产生较大毒性作用。本研究中高浓度汞离子显著抑制血清中 AKP 活性,就是高浓度汞离子对血清产生较大毒性的结果,这一点与 Sastry 等^[25]的研究结果一致。

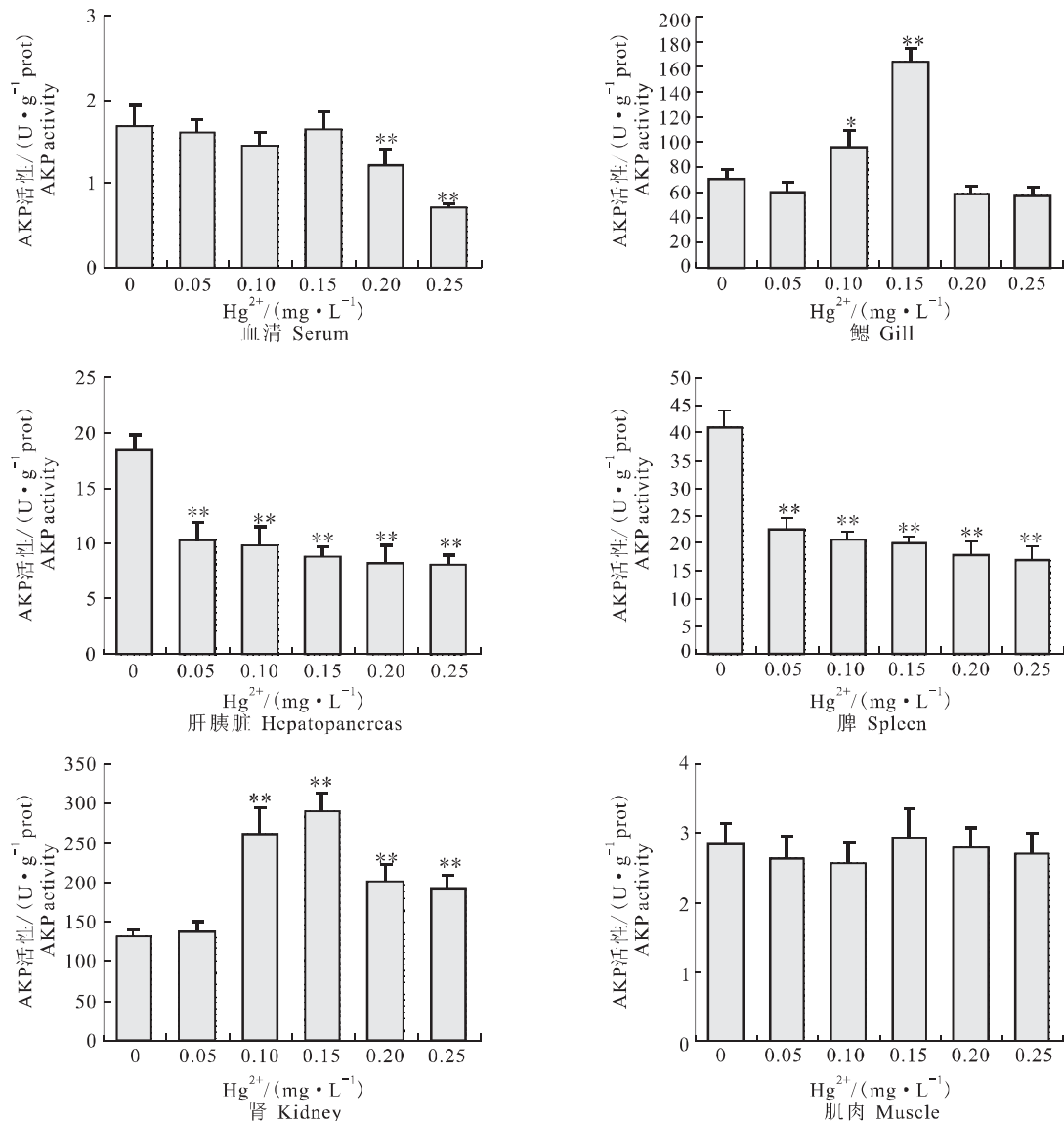


图1 不同汞离子浓度暴露下草鱼各器官组织 AKP 活性 ($n=10, 37^{\circ}\text{C}$)

注：“*”表示与对照组相比有显著性差异 ($P<0.05$)；“**”表示与对照组相比有极显著性差异 ($P<0.01$)。

Fig.1 AKP activity in different organs and tissues of *C. idella* under various Hg^{2+} concentration exposure ($n=10, 37^{\circ}\text{C}$)

Note: Compared with the control, “*” represents significant difference ($P<0.05$); “**” represents extremely significant difference ($P<0.01$).

鱼鳃与外界环境直接接触,是鱼体吸收水中重金属的主要部位^[26],对汞具有一定的富集能力^[27]。本研究草鱼暴露于不同汞离子浓度下 21 d,鳃中 AKP 活性没有受到抑制,并且在 0.10 mg/L 和 0.15 mg/L 汞离子浓度下 AKP 活性显著增加,这可能是不同汞离子浓度对鳃 AKP 活性的影响存在动态变化,本实验对此尚不能给出解释,有待进一步研究。

鱼类的肝胰脏是重要的解毒器官,同时也是蓄积重金属的主要部位^[28]。重金属能诱导肝胰脏产生金属硫蛋白,从而降低重金属的毒性,减少对肝胰脏的损害。但随着汞离子浓度增加或暴露时间延长,将会超出金属硫蛋白的解毒能力,进而抑制肝胰脏代谢酶活性。本研究中肝胰脏 AKP 活性在不同汞离子浓度下均显著下降,说明各浓度组汞离子对

AKP活性均有较大的抑制作用。这一结果与Rana等^[29]的研究结果一致。脾作为鱼类的主要免疫器官,对汞离子比较敏感。不同汞离子浓度下脾脏AKP活性和肝胰脏一样,也均受到显著的抑制,表明汞离子对脾脏AKP活性也有着较大的影响。草鱼肾脏是重要的排泄器官,也是排除汞离子至体外的重要通道。本研究发现,在汞离子浓度大于0.10 mg/L时草鱼肾脏AKP活性显著增加。在汞离子暴露下,组织内的汞离子和金属硫蛋白均增加^[21],此时组织代谢旺盛,磷酸化和去磷酸作用增强,从而AKP活性增加。同时本研究也发现肾脏AKP活性明显高于肝胰脏等其他器官组织,这一结果与Cvancara等^[30]的研究结果一致。

汞离子对草鱼不同器官组织AKP的影响,一方面与器官组织的生理代谢功能有关,另一方面也与组织对汞离子的亲和性和蓄积水平有关。阮晓等^[31]对罗非鱼(*Tilapia nilotica*)、淡水白鲳(*Colossoma brachypomum*)和鲤(*Cyprinus carpio*)的研究表明,重金属主要蓄积在鱼体的鳃、肝和肾,肌肉中蓄积量最低;孟晓红等^[32]研究发现,鲤鱼肌肉对汞离子的富集能力最小。本研究发现汞离子对肌肉AKP活性的影响较小,与对照组之间没有显著性变化,可能与肌肉中蓄积汞较少有关。Gupto等^[33]将鲶(*Heteropneustes fossilis*)暴露于0.3 mg/L HgCl₂下,其肌肉中AKP活性显著下降,这可能是鱼的种类不同,其肌肉对汞离子蓄积具有差异所致,这一点在Fardas^[34]对不同种鱼体内汞离子含量分布的研究中也得以证实。

汞离子对草鱼不同器官组织AKP活性的影响有很大差异,这可能与各种器官对不同汞离子浓度的生理反应差异有关。肝胰脏和脾对汞离子比较敏感,可以作为对汞离子污染的环境指示。汞离子对草鱼肌肉AKP活性影响较小,说明肌肉对汞离子影响的生理应答不明显。不同器官组织AKP活性对不同汞离子浓度暴露具有不同反应,其生理机制还有待于从AKP活性调控的分子水平上进行更深入的研究。

参考文献:

- [1] Asgerisson B, Hartemink R, Chlebowski J F. Alkaline phosphatase from Atlantic cod (*Gadus morhua*): Kinetic and structural properties which indicate adaptation to low temperatures [J]. *Comp Biochem Physiol*. 1995; 110 (B): 315–329.
- [2] Anan Y, Kunito T, Ikemoto T, et al. Elevated concentrations of trace elements in Caspian seals (*Phoca caspica*) found stranded during the mass mortality events in 2000 [J]. *Arch Environ metal Contam Toxicol*. 2002; 42: 354–362.
- [3] Covelli S, Faganeli J, Horvat M, et al. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea) [J]. *Appl Geochem*. 2001; 16: 541–558.
- [4] Mora S D, Sheikholeslami M R, Wyse E, et al. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea [J]. *Mar Pollut Bull*. 2004; 48: 61–77.
- [5] 陈定福, 长吻. 碱性磷酸酶的动力学研究 [J]. *水生生物学报*, 1995, 19 (4): 338–343.
- [6] 张洪渊, 刘克武, 石安静, 等. 背角无齿蚌碱性磷酸酶分离纯化及其动力学研究 [J]. *水生生物学报*, 1996, 20 (1): 57–61.
- [7] 张继平, 林建成, 谢进金, 等. 草鱼碱性磷酸酶的分离纯化与部分性质研究 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 2005, 44 (5): 684–687.
- [8] Kotsanis N, Iliopoulou-Georgoudaki J, Kapata-Zoumbos K. Changes in selected haematological parameters at early stages of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, subjected to metal toxicants: arsenic, cadmium and mercury [J]. *J Appl Ichthyol*. 2000; 16 (6): 276–278.
- [9] 项黎新, 邵健忠, 孟真. 6种重金属离子胁迫诱导鱼类细胞凋亡的研究 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28 (6): 866–869.
- [10] Pinto E. Heavy metal-induced oxidative stress in algae [J]. *J Phycol*. 2003; 39 (6): 1 008–1 018.
- [11] Chen Q X, Zhang W Z, Lin J Y, et al. Effect of metal ions on the activity of green crab (*Scylla serata*) alkaline phosphatase [J]. *Int J Biochem Cell Biol*. 2000; 32: 879–885.
- [12] 刘存岐, 王安利, 王维娜, 等. 海水中几种金属离子对中国对虾幼体体内碱性磷酸酶和ATPase影响 [J]. *水产学报*, 2001, 25 (4): 298–303.
- [13] 黄周英, 陈奕欣, 赵扬, 等. 三丁基锡对文蛤鳃酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和Na⁺, K⁺-ATP酶活性的影响 [J]. *海洋环境科学*, 2005, 24 (3): 56–59.
- [14] 孟紫强. 环境毒理学基础 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2003: 361–363.
- [15] 陈清西, 颜思旭. 文昌鱼碱性磷酸酶的必需基因研究 [J]. *厦门大学学报: 自然科学版*, 1986, 25 (5): 568–573.
- [16] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*. 1976; 72: 248–254.
- [17] Ram R N, Sathyanesan N. Histopathological and biochemical changes in the liver of a teleost fish, *Channa unctatus* (Bloch) induced by a mercurial fungicide [J]. *Environ Pollut*. 1987; 47 (2): 135–145.
- [18] Farmanian A, Pagliese A K, Sun L Z. Mercury inhibits the transport of glucose by the intestinal brush border membrane vesicles of fish [J]. *Mar Environ Res*. 1989; 28: 247–251.
- [19] 周立红, 陈学豪. 四种重金属对泥鳅胚胎和仔鱼毒性的研究 [J]. *厦门水产学院学报*, 1994, 16 (1): 11–19.

- [20] 吴鼎勋,洪万树.四种重金属对 Δ 状黄姑鱼胚胎和幼鱼的毒性[J].台湾海峡,1999,18(2):186-190.
- [21] 孟紫强.环境毒理学[M].北京:中国环境科学出版社,2000:123-126.
- [22] 颜思旭,陈素丽,蔡红玉.文昌鱼碱性磷酸酶动力学初步研究[J].厦门大学学报:自然科学版,1980,19(3):12-15.
- [23] 陈清西,张 Δ ,庄总来,等.锯缘青蟹碱性磷酸酶分离纯化及部分理化性质研究[J].海洋与湖沼,1998,29(4):362-367.
- [24] 廖金花,陈清西.金属离子对鲍鱼碱性磷酸酶活力的影响[J].厦门大学学报:自然科学版,2004,43:12-15.
- [25] Sastry K V, Sharma K. Mercury induced haematological and biochemical anomalies in *Ophiocephalus* (*Channa*) *Punctatus* [J]. *Toxicol Lett*, 1980, 5: 245-249.
- [26] Reid S D, McDonald D G. Metal binding activity of gills of rainbow trout (*Dnocrhynchus mykiss*) [J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 1991, 48: 1 061-1 068.
- [27] 蔺玉华,张冰艳,卢健民.鱼体汞的甲基化及其甲基汞的吸收与代谢[J].水产学报,1994,18(4):327-328.
- [28] Allen P. Soft tissue accumulation of lead in the blue tilapia, *Rodochromis aureus* (Steindachner), and the modifying effects of cadmium and mercury [J]. *Biol Trace Elem Res*, 1995, 50(3):193-208.
- [29] Rana S V, Sharma K. Mercurial toxicity in the liver of a freshwater teleost *Channa punctatus* [J]. *Toxicol Lett*, 1982, 11: 7-10.
- [30] Cvcara V A, Huang W W. Tissue alkaline phosphatase activity in selected freshwater teleosts [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1978, 60(B): 221-224.
- [31] 阮晓,郑春霞.重金属在罗非鱼、淡水白鲢和鲤体内的蓄积[J].农业环境保护,2001,20(5):357-359.
- [32] 孟晓红,徐斌,霍永刚,等.汞在鱼体内的生物富集规律初探[J].广东微量元素科学,1998,5(8):17-19.
- [33] Gupto P K, Sastry K V. Effect of mercuric chloride on enzyme activities in the digestive system and chemical composition of liver and muscle of catfish, *Heteropneustes fossilis* [J]. *Ecotox Environ Safe*, 1981, 5(4):389-400.
- [34] Fardas A. Heavy metal concentrations in fish of Lake Balaton [J]. *Lake Reserv Res Manage*, 2000, 5(4): 271-276.

Effects of Hg^{2+} on alkaline phosphatase activity in different organs and tissues of grass carp (*Ctenopharyngodon idella*)

KONG Xiang-hui¹, LIU Zhan-cai^{1,2}, GUO Yan-ling¹, GUO Chun-li¹

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China; 2. Department of Biology, Jiaozuo Normal College, Jiaozuo 454001, China)

Abstract: Grass carp *Ctenopharyngodon idella* is sensitive to environmental changes in water. As environmental factors fluctuate, physiological metabolism will change correspondingly. Alkaline phosphatase is a kind of important regulating enzyme for metabolism. To study the change of alkaline phosphatase (AKP) activity can help understand the effects of environmental factors on physiological metabolism of fish. In this study, grass carp were randomly divided into 6 groups (5 experimental groups and one control group, each group with 10 fish). Experimental groups were exposed to different Hg^{2+} concentrations (0.05 mg/L, 0.10 mg/L, 0.15 mg/L, 0.20 mg/L, 0.25 mg/L). On day 21, serum, gill, liver, spleen, kidney and muscle were sampled to analyse. Compared with the control, AKP activity in serum showed no significant change at Hg^{2+} concentrations of 0.05 mg/L, 0.10 mg/L and 0.15 mg/L ($P > 0.05$), while it decreased significantly at 0.20 mg/L and 0.25 mg/L ($P < 0.01$). For gill, AKP activity increased significantly only at 0.10 mg/L ($P < 0.05$) and 0.15 mg/L ($P < 0.01$), and did not change obviously in the other groups ($P > 0.05$). AKP activities in liver and spleen gradually decreased with the increment of Hg^{2+} concentration, and were significantly lower than that in control ($P < 0.01$). The activity of AKP in kidney showed no obvious change in 0.05 mg/L group ($P > 0.05$), while enzyme activities in the other experimental groups were significantly higher than that in control ($P < 0.01$). For muscle, AKP activity showed no significant changes at various experimental concentration ($P > 0.05$). In summary, when grass carp was exposed to various Hg^{2+} concentrations, AKP activities in different organs and tissues, which perform different physiological functions, appear to be different. AKP activity in liver and spleen can be used as potential indicators to evaluate Hg^{2+} exposure effects. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(2): 270-274]

Key words: Hg^{2+} ; alkaline phosphatase; *Ctenopharyngodon idella*