

Cu^{2+} 对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响

鲁双庆^{1,2}, 刘少军¹, 刘红玉³, 刘 筠¹

(1. 湖南师范大学 生命科学学院, 湖南 长沙 410081; 2. 长沙大学 应用化学与环境保护系, 湖南 长沙 410003; 3. 湖南农业大学 环境科学系, 湖南 长沙 410128)

摘 要:以肝脏组织保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性为指标研究了 CuSO_4 污染对黄鳝的损伤作用。实验测得 CuSO_4 对黄鳝的 LC_{50} 为 5.5 mg/L, 据此设定 CuSO_4 浓度梯度。结果表明, 0.7、1.5 mg/L 的 CuSO_4 处理液对黄鳝的损伤较小, 3.0、4.5 mg/L 的 CuSO_4 处理液对黄鳝损伤较大, 保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 的活性在黄鳝暴露 24 h 时被显著抑制, 在处理 48 h 后酶活性逐渐恢复并超过对照组水平, 之后又回落到低于对照组水平, 其变化幅度与 CuSO_4 质量浓度呈正相关。可以证实, SOD、CAT、GSH-PX 活性变化可以反映黄鳝的伤害程度。

关键词:黄鳝; 肝脏; SOD; CAT; GSH-PX; CuSO_4

中图分类号: Q959.465

文献标识码: A

文章编号: 1005-8737(2002)02-0138-04

黄鳝是我国重要的淡水经济鱼类。有关黄鳝养殖的生物学研究越来越多^[1~3], 但迄今为止对黄鳝生态毒理学研究还未见报道。随着养殖水体环境的恶化, 黄鳝自然资源越来越少, 为有效保护自然资源, 对黄鳝进行生态毒理学研究十分必要。

CuSO_4 是水产养殖中常用的杀菌、杀藻剂, 残留于水体中的 Cu^{2+} 对水体生态系统, 尤其是对水体生态环境中的底栖种群如黄鳝产生一定的影响。本文就养殖水体中常见的重金属化合物 CuSO_4 对黄鳝肝脏 SOD(超氧化物歧化酶)、CAT(过氧化氢酶)、GSH-PX(谷胱甘肽过氧化物酶)活性的影响进行研究, 为有效保护黄鳝自然资源和充实分子毒理生态学内容提供可鉴资料。

1 材料与方法

1.1 材料

收稿日期: 2001-08-06。

基金项目: 湖南省自然科学基金重点课题(99JJY1003)。

作者简介: 鲁双庆(1963-), 男, 副教授, 博士生, 硕士生导师, 从事水产养殖和环境保护方面的教学和科研工作。

通讯作者: 刘少军。

黄鳝购自湘阴东湖养殖场, 体长(25±3.0) cm。预先在室内用经曝气的自来水暂养 5 d 后挑选健壮、规格整齐的黄鳝进行实验。实验容器采用 13 L 聚乙烯塑料桶, 内盛 3 L 经曝气的自来水, 水温(23±1.5)℃。

1.2 试剂

CuSO_4 为分析纯, 用蒸馏水配成 10.0 mg/ml 母液, 实验时稀释成所需浓度。

1.3 方法

1.3.1 LC_{50} 的测定 按 0、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mg/L 质量浓度梯度配制 CuSO_4 处理液, 将实验鱼暴露于各浓度梯度的 CuSO_4 溶液中 96 h。详细观察记录实验鱼中毒症状与出现的时间及死亡情况, 获得 LC_{50} 为 5.5 mg/L。

1.3.2 实验浓度设计 根据 LC_{50} 设计实验质量浓度梯度为 0、0.7、1.5、3.0、4.5 mg/L, 同时设计 1 个平行组, 每实验桶放黄鳝 25 尾。实验期间不投食, 每 24 h 换水 1 次并适当充氧。

1.3.3 组织匀浆液的制备 在暴露开始后 24、48、72、96 和 120 h 时, 每个处理组分别取鱼样 4 尾, 迅速解剖取出肝脏组织, 用预冷的生理盐水漂洗去血液, 剪去肝脏表面附着的结缔组织, 再用滤纸吸去表

面水分,称取肝脏组织 0.3 g 置研钵中,加预冷的生理盐水 1 ml,少量石英砂,充分研磨,用生理盐水定容到 8.0 ml。然后于 4 ℃ 下离心(3 500 r/min)15 min,取上清液,4 ℃ 保存备用。

1.3.4 保护酶活性测定 SOD、GSH-PX 均采用试剂盒(购自南京建成生物工程研究所),测试步骤按试剂盒说明进行。SOD 活性单位定义为:每 mg 组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个活性单位(U)。GSH-PX 活性单位定义为:每 mg 组织蛋白质,每 min 扣除非酶反应的作用,使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol/L}$ 为 1 个酶活性单位(U)。

酶的相对活性定义为:将某浓度下黄鳝组织的各种氧化酶活性除以各对照组的氧化酶活性,即得该浓度下该氧化酶的相对活性。

CAT 采用硫代硫酸钠滴定法^[4]。测试步骤为:取 1.3.3 中制备的组织匀浆 5.0 ml 于 150 ml 三角瓶中,用蒸馏水稀释至 20 ml,将三角瓶置 20 ℃ 水浴中。当三角瓶中的溶液温度达到 20 ℃ 时,用移液管向各瓶中加 0.1 mol/L 的 H_2O_2 5.0 ml,摇匀,停放 5 min(从加入 H_2O_2 时起用秒表计算时间)。经过 5 min 后加入 5 ml H_2SO_4 (1:9)终止反应。此后便可着手滴定 H_2O_2 的残留量。为此,先加入 20% 的 KI 溶液 1 ml,再加入 10% 的钼酸铵溶液 3 滴作为催化剂,在 1 ml 0.5% 的淀粉存在下,用 0.01 mol/L 的硫代硫酸钠滴定至蓝色不消失为止。同时重复进行对照滴定。为此,取与试验同量的悬浮液于 150 ml 三角瓶中,加入 1:9 的 H_2SO_4 5 ml,摇匀,使酶受到抑制。向混合液中加入 0.1 mol/L 的 H_2O_2 5 ml,20% 的 KI 溶液 1 ml,3 滴钼酸铵(10%),用 0.1 mol/L 的硫代硫酸钠滴定。

CAT 活性单位定义为:每 mg 组织蛋白每 min 分解 1 μmol 的 H_2O_2 的量为 1 个活性单位(U)。

1.3.4 蛋白质浓度测定 采用考马斯亮蓝 G-250 法^[5]。

1.3.5 数据处理 每个样品进行 2 次平行测试取平均值,再将 2 次重复试验的实验数据的平均值进行 t 检验,分析各浓度处理组与对照组的差异显著性。

2 结果与分析

2.1 CuSO_4 对黄鳝肝脏组织 SOD 相对活性的影响

在 CuSO_4 处理液中处理 24 h 时,与对照组相

比,各试验浓度组黄鳝肝组织 SOD 相对活性被显著抑制,其抑制程度与 CuSO_4 处理浓度呈正相关($r = 0.998$)。随后肝组织 SOD 活性逐渐恢复,并超过对照组活性,到处理 72 h 时,达到最高点,以后又逐渐下降。处理 96 h 时基本恢复到正常水平,以后又有些降低(图 1)。

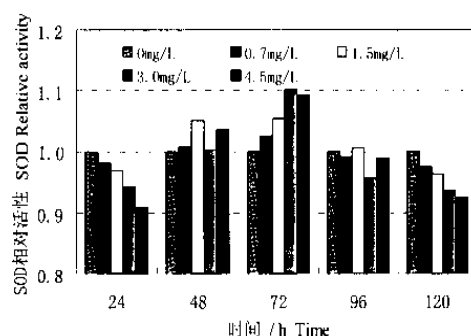


图 1 黄鳝肝组织 SOD 相对活性随处理时间的变化

Fig.1 Changes of SOD relative activity in liver tissue of *Monopterus albus*

2.2 CuSO_4 对雌鳝肝脏 CAT 活性的影响

在 CuSO_4 污染的环境中,黄鳝肝脏组织 CAT 活性在处理 24 h 时被抑制,其抑制程度随 CuSO_4 处理浓度的增加而增加且呈显著相关性($r = 0.998$) (图 2)。处理 48~72 h 时,CAT 活性逐渐恢复,并超过对照组,处理 96 h 后又逐渐回落,0.7、1.5 mg/L 的质量浓度组中,黄鳝肝组织 CAT 活性回落到对照组附近,而 3.0、4.5 mg/L 的质量浓度组中,黄鳝肝组织 CAT 活性降低幅度大,分别为对照组的 50.23% 和 31.14%。

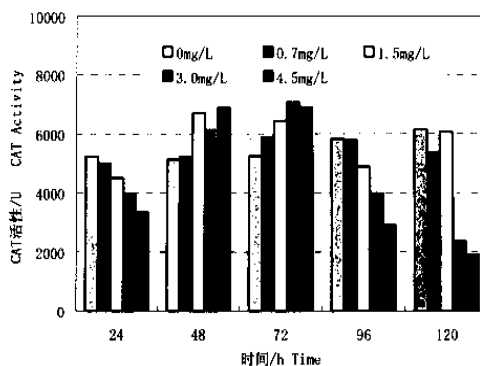


图 2 黄鳝肝组织 CAT 活性随处理时间的变化

Fig.2 Changes of CAT activity in liver tissue of *Monopterus albus*

2.3 CuSO_4 对黄鳝肝组织 GSH-PX 活性的影响

在 CuSO_4 污染环境中, 黄鳝肝脏组织 GSH-PX 活性都经历了抑制—促进—抑制的过程(图 3)。在处理 48 h 内, GSH-PX 活性被抑制, 以后逐渐恢复, 处理 96 h 时, GSH-PX 活性达最大值, 120 h 时又有些下降。

肝组织 GSH-PX 活性变化与 CuSO_4 处理浓度有关。0.7 mg/L 的 CuSO_4 对黄鳝肝组织 GSH-PX 活性影响较小, 无显著差异; 随着处理浓度的升高, 变化幅度增大, 4.5 mg/L 的 CuSO_4 处理 48 h 时, GSH-PX 活性达最低值(2.135 U), 96 h 时升到最高值(26.849 U), 以后很快回落到低于对照水平。

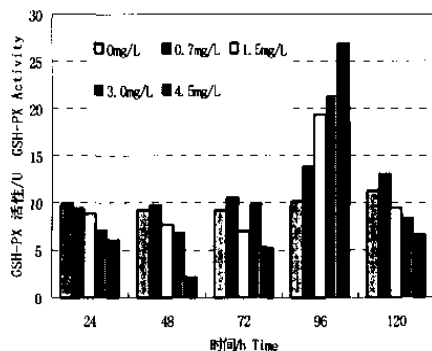


图3 黄鳝肝组织 GSH-PX 活性随处理时间的变化

Fig. 3 Changes of GSH-PX activity in liver tissue of *Monopterus albus*

3 讨论

3.1 CuSO_4 对肝脏组织保护酶活性的影响

SOD、CAT、GSH-PX 是脊椎动物体内的主要保护酶系统, 在正常情况下, 3 种保护酶联合清除活性氧自由基, 保护动物免受自由基伤害^[6]。当黄鳝处于 CuSO_4 污染环境中时, 在 24 h 内肝脏组织 SOD、CAT、GSH-PX 活性都被抑制, 其抑制程度与 CuSO_4 质量浓度呈正相关。说明细胞受到了一定程度的伤害, 其伤害程度随 CuSO_4 质量浓度的增加而加强。随后在 CuSO_4 的诱导下产生大量的自由基, 保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性也在自由基的诱导下随之升高, 以清除过量的自由基, 因此出现了酶活性在处理 48 h 后逐渐升高并超出对照组水平的现象(图 1~3)。但自由基反应速度非常快, 有些未得到及时清除的自由基对细胞产生了伤害, 细胞结构受到一定程度的损伤(另文发表), 细胞的衰老加速, 因

此酶活性又逐渐回落。

在 3 种保护酶中, SOD、CAT 对黄鳝伤害程度反应较灵敏, 在 CuSO_4 处理 24 h 时活性急剧下降, 以后逐渐回升, 到 72 h 时达峰值; GSH-PX 反应相对较慢, 经 CuSO_4 处理 96 h 时才有较大幅度的升高, 也说明了随着处理时间的延长, 黄鳝所受的伤害逐渐加剧, 衰老加速。

3.2 CuSO_4 对黄鳝的损伤

结果表明, 质量浓度为 0.7、1.5 mg/L 的 CuSO_4 处理液对黄鳝的损伤较小, 但在 3.0、4.5 mg/L 的 CuSO_4 污染环境中, 黄鳝虽然在 5 d 内只出现个别的死亡, 但都表现出中毒症状; 黄鳝放入处理液的后 3 d 内有些烦躁不安, 随后就比较安静少动, 对刺激反应迟钝, SOD、CAT、GSH-PX 活性也出现了高度抑制—促进—高度抑制的过程(图 1~3), 说明 3.0、4.5 mg/L 的 CuSO_4 对黄鳝有较大影响。

环境中残留的 CuSO_4 较稳定, 因此在水产养殖中, 用 CuSO_4 进行病害防治及清池时, 应尽量少用。

3.3 分子生态毒理学研究状况

CuSO_4 是水体中常见的污染物, 在水产养殖中, CuSO_4 常被用于清池、杀菌消毒等, 因此在水体, 尤其是底泥中的残留量比较大, 残留的 CuSO_4 对生活底泥环境中的生物—黄鳝有影响, 对水体生态平衡有一定的破坏作用。

以往在评价污染物对生物的毒性效应时, 常用半致死浓度 (LC_{50}) 作为评价指标^[7,8], 而存在于环境中的污染物经常是以低浓度(低于 LC_{50})、长时间作用于生物体, 因此需要寻求更灵敏的毒理学评价指标, 为此广大学者展开了大量的研究^[9~12]。本研究发现, 当黄鳝处于低浓度 CuSO_4 (< 4.5 mg/L) 污染环境中时, 虽然不会死亡, 但体内保护酶活性随处理时间延长出现了一系列变化, 首先被抑制, 然后逐渐恢复并超过对照组活性, 以后又回落, 且变化幅度与处理液中 CuSO_4 质量浓度呈正相关。由此可以证实, 保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的变化情况可以指示黄鳝受损伤的程度。

参考文献:

- [1] 姜礼耀. 生态环境污染对水产的影响及其控制[J]. 环境污染与防治, 1996, 18(4): 31-34.
- [2] 肖亚梅, 刘 筠. 黄鳝由间性发育转变为雄性发育的细胞生物学研究[J]. 水产学报, 1995, 19(4): 297-301.
- [3] 陶亚雄, 林浩然. 外源激素对雌性黄鳝性类固醇激素分泌的影

- 响[J]. 水生生物学报, 1994, 18(2): 189 - 191.
- [4] 波钦诺克 X H. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社, 1981.
- [5] 李建武, 萧能广, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1997. 174 - 176.
- [6] 孙存善, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科学技术大学出版社, 1999.
- [7] 王国祥. 浅谈我国水生生物监测技术规范的修订[J]. 环境监测管理与技术, 1998, 10(3): 21 - 25.
- [8] 国家环保局. 环境监测技术规范[M]. 北京: 环境科学出版社, 1986.
- [9] Bouquegneau J M. ATPase activity in mercury intoxicated eels [J]. Experimentia, 1977, 33(7): 941 - 946.
- [10] 徐立红, 张雨元, 陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 171 - 185.
- [11] Sancho B, Ferrando M D, Andreu E. Inhibition of gill Na^+ , K^+ -ATPase activity in the eel, *Anguilla anguilla* by fenitrothion [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1997, 38: 132 - 136.
- [12] 刘红玉, 周朴华, 杨仁斌, 等. 非离子型表面活性剂 AE 对鳃脉浮萍的损伤作用 [J]. 应用与环境生物学报, 2001, 7(3): 224 - 227.

Effects of Cu^{2+} on activities of protecting enzymes SOD, CAT and GSH-PX in liver tissue of *Monopterus albus*

LU Shuang-qing^{1,2}, LIU Shao-jun¹, LIU Hong-yu³, LIU Yun¹

(1. College of Life Sciences, Hunan Normal University, Changsha 410081, China;

2. Department of Applied Chemical & Environmental Protection, Changsha University, Changsha 410003, China;

3. Department of Environmental Sciences, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The concentrations of CuSO_4 were set at 0, 1.0, 3.0, 5.0, 7.0 and 9.0 mg/L, and the LC_{50} of Cu^{2+} for *Monopterus albus* was determined at 5.5 mg/L. According to this LC_{50} , the experiment concentrations of CuSO_4 were set up at 0, 0.7, 1.5, 3.0 and 4.5 mg/L and the exposure periods were set up at 24, 48, 72, 96 and 120 h. The results show that the injury is low at 0.7 and 1.5 mg/L CuSO_4 , but high at 3.0 and 4.5 mg/L. The activities of protecting enzymes SOD, CAT and GSH-PX in the liver tissues of *M. albus* are restrained obviously during 24 h treatment from 0.7 to 4.5 mg/L CuSO_4 , but recover gradually and exceed the control level slowly during 48 to 72 h, and finally get down again, lower than that of the control. The changes of the activities of SOD, CAT and GSH-PX can indicate the injured degree of *M. albus* by CuSO_4 .

Key words: *Monopterus albus*; liver tissue; SOD; CAT; GSH-PX; CuSO_4

Corresponding author: Liu Shao-jun