

·研究简报·

铜、锌对褐牙鲆鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响

苗晶晶, 潘鲁青, 刘 志

(中国海洋大学 海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要:以幼体褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为研究对象。 Cu^{2+} 浓度梯度设置为 0.10 mg/L、0.20 mg/L、0.50 mg/L 和 1.00 mg/L; Zn^{2+} 浓度梯度为 1.00 mg/L、2.00 mg/L、5.00 mg/L 和 10.00 mg/L。实验周期为 20 d。结果表明, 在 6 d 内 Cu^{2+} (除 1 mg/L 处理组外)、 Zn^{2+} 各处理组褐牙鲆鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力随取样时间变化显著 ($P < 0.05$), 且呈峰值变化, 在 24 h 时达到最大值, 然后缓慢下降; 6~15 d, 各处理组酶活力趋于稳定; 而 1 mg/L Cu^{2+} 处理组在 12 h 时酶活力达到最大值, 3~15 d 酶活力趋于稳定。2 种重金属离子各处理组对鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响在同一取样时间差异显著 ($P < 0.05$), 其影响程度与重金属离子浓度呈负相关, 且 1 mg/L Cu^{2+} 和 10 mg/L Zn^{2+} 处理组在 6~15 d 酶活力与对照组差异不显著 ($P > 0.05$)。同时 2 种重金属离子在 1~15 d 内对褐牙鲆鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的诱导率表现为 Zn^{2+} (1 mg/L) $>$ Cu^{2+} (1 mg/L)。

关键词: Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; 褐牙鲆; 鳃丝; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

中图分类号: Q959.486 **文献标识码:** A **文章编号:** 1005-8737-(2005)03-0340-04

目前, 重金属污染已成为养殖水环境中的一类主要污染物, 并对养殖动物造成严重危害^[1]。已有研究表明, 长期暴露于重金属离子污染水体中可以引起鱼体生理和行为的改变, 如食欲减退、生长减慢、对溶氧耐受范围缩小和离子损失等^[2-4]。水产动物的鳃丝具有重要的生理功能如呼吸、渗透调节和排泄等, 而且与水环境直接接触, 是养殖水环境中毒性污染物的主要靶器官^[5]。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是鳃丝细胞重要的功能膜蛋白, 能维持细胞内外的离子梯度和膜电位, 这对于细胞的渗透调节、物质吸收(葡萄糖、氨基酸等)和跨细胞离子运动都至关重要, 在整个机体离子调节方面起到核心作用。鲆鲽鱼类是中国近年来的集约化养殖的主要种类, 目前主要以海水、地下井水进行养殖, 而有关重金属离子对鲆鲽鱼类毒性效应的研究很少, 尤其是对渗透调节的影响尚未见报道。本实验以褐牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)为研究对象, 研究 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对其鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响, 旨在了解重金属离子对褐牙鲆渗透调节的影响机理。

1 材料与方法

1.1 材料

实验所用褐牙鲆幼鱼于 2003 年 4 月购于威海华信海珍品养殖公司, 体色正常, 健康活泼, 全长 (10.98 ± 0.85) cm, 体重 (11.90 ± 3.38) g。实验前暂养驯化 20 d, 实验用水为青岛沿海的自然海水, 盐度 30, pH 8.2, 温度 (18 ± 0.5) °C, 连

续充气, 日换水 2 次, 换水量为 1/3~1/2, 并投喂专用颗粒配合饲料, 日投喂量为幼鱼体重的 3%~4%。

1.2 实验设计

1.2.1 试剂 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (分析纯), 实验海水为青岛沿海自然海水。经检测实验用青岛沿海自然海水的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的质量浓度分别为 1.15 $\mu\text{g/L}$ 和 47.5 $\mu\text{g/L}$ 。

1.2.2 梯度设置 Cu^{2+} ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$)、 Zn^{2+} ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$) 分别按《中华人民共和国渔业水质标准》($[\text{Cu}^{2+}] \leq 0.01$ mg/L, $[\text{Zn}^{2+}] \leq 0.1$ mg/L) 的 10 倍、20 倍、50 倍、100 倍设置实验梯度。 Cu^{2+} 的实验梯度为: 0.10 mg/L、0.20 mg/L、0.50 mg/L、1.00 mg/L; Zn^{2+} 的梯度为 1.00 mg/L、2.00 mg/L、5.00 mg/L、10.00 mg/L。所有实验梯度均设 3 个平行组, 并以不加重金属离子组为对照组。

1.2.3 样品管理 实验在 50 cm $\times$ 40 cm $\times$ 30 cm 的塑料水槽内进行, 各梯度设 3 个平行, 每个平行分别放健康褐牙鲆各 15 尾, 实验期间的养殖管理与暂养期间完全相同, 换水时分别加入相对应重金属离子的养殖用水。实验期间褐牙鲆无死亡现象。实验的取样时间为 0 h、12 h、24 h、3 d、6 d、15 d, 每个梯度各水槽随机选取 2 尾幼鱼, 置冰盘中解剖, 取两侧鳃丝, 用预冷蒸馏水洗净, 滤纸吸干后, 置于 1.5 mL 离心管中。所有样品均保存于 -20 °C 下冰箱内待测。

收稿日期: 2004-08-06; 修订日期: 2004-11-10。

基金项目: 国家自然科学基金面上基金(30271039); NSFC-KOSEF 国际合作项目资助。

作者简介: 苗晶晶(1982-)女, 硕士, 从事养殖环境毒理学研究。E-mail: phy@ouc.edu.cn

通讯作者: 潘鲁青。E-mail: panlq@ouc.edu.cn

1.3 褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的测定

1.3.1 酶液的提取 取褐牙鲈幼鱼的两侧鳃丝,用预冷蒸馏水($0\sim4^\circ\text{C}$)洗净,滤纸吸干后置于 10 mL 冰冷酶提取液(0.25 mmol/L 蔗糖, 6 mmol/L EDTA- Na_2 , 10 mmol/L Tris-HCl, 0.1% 脱氧胆酸钠, pH 为 7.5)中,用高速匀浆器在冰水浴中以 $20\,000\text{ r/min}$ 转速匀浆 5 min,匀浆液在高速冷冻离心机($0\sim1^\circ\text{C}$, $10\,000\text{ r/min}$)中离心 30 min,取上清液再离心 10 min,将所得上清液保存于 -4°C 冰箱中,8 h 内测定 Na^+/K^+ -ATPase 活力。

1.3.2 Na^+/K^+ -ATPase 活力的测定 酶蛋白含量用 Bradford(1976)方法^[8]测定。 Na^+/K^+ -ATPase 活力的测定参考 Whenty 的方法^[7],主要通过测定 K^+ 存在与不存在(乌本苷存在)时底物 ATP- Na_2 释放出无机磷(IP)量的差值来计算,活力单位用微摩尔无机磷/(mg 蛋白 $\cdot$ h)($\mu\text{mol}\cdot\text{IP}\cdot\text{mg}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$)表示。

全酶反应体系为 0.1 mL 酶液 + 0.2 mL A 液(180 mmol/L NaCl, 30 mmol/L KCl, 6 mmol/L MgCl_2 , 40 mmol/L Tris-HCl, pH 为 7.8); Na^+/K^+ -ATPase 活力被抑制反应体系为 0.1 mL 酶液 + 0.2 mL B 液(210 mmol/L NaCl, 2.5 mmol/L 乌本苷, 6 mmol/L MgCl_2 , 40 mmol/L Tris-HCl, pH 为 7.8)。将上述两反应体系置于 30°C 水浴中培养 5 min 后,分别加入 0.1 mL 底物溶液(6 mmol/L ATP- Na_2 , 50 mmol/L Tris-HCl, pH 7.8)并继续培养 30 min 后,立即加入 0.1 mL 的 30% 预冷三氯乙酸(TCA)终止反应,用钼蓝法测定两反应体系的 IP 释放量。

1.4 数据处理与分析

所有数据均以 3 个平行组数据的平均值 $\pm$ 标准差($\bar{X}\pm\text{SE}$)表示,并采用单因素方差分析(one-factor analysis of variance)和 Duncan 检验法。

2 结果与分析

2.1 Cu^{2+} 对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响

图 1 表明,除 1 mg/L 处理组外, Cu^{2+} 各处理组在 6 d 内褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力与对照组相比变化显著($P<0.05$),且呈峰值变化,在 24 h 时达到最大值,然后缓慢下降;6~15 d 内,各处理组酶活力趋于稳定。 1 mg/L Cu^{2+} 处理组在 12 h 时酶活力达到最大值;3~15 d,酶活力趋于稳定。

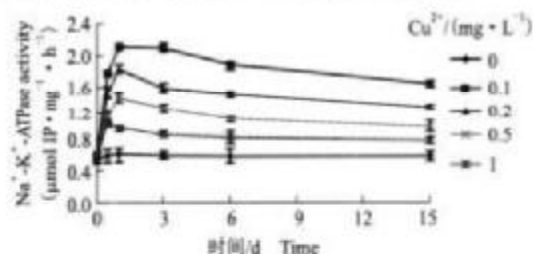


图 1 Cu^{2+} 对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响
Fig.1 Effects of Cu^{2+} on gill Na^+/K^+ -ATPase activity of *Paralichthys olivaceus*

2.2 Zn^{2+} 对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响

如图 2 所示, Zn^{2+} 各处理组褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力在 6 d 内与对照组相比变化显著($P<0.05$),且明显的峰值变化,在 24 h 时达到最大值;6~15 d 内,各处理组酶活力趋于稳定。

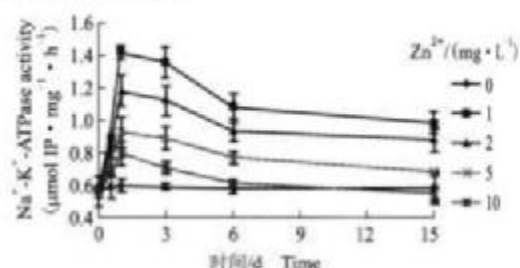


图 2 Zn^{2+} 对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响
Fig.2 Effects of Zn^{2+} on gill Na^+/K^+ -ATPase activity of *Paralichthys olivaceus*

从图 1 和图 2 可知,2 种重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响在同一取样时间各处理组之间差异显著($P<0.05$),其影响程度与重金属离子浓度呈负相关,且 1 mg/L Cu^{2+} 处理组、 10 mg/L Zn^{2+} 处理组在 6~15 d 酶活力与对照组差异不显著($P>0.05$)。

2.3 两种重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的诱导程度

由表 1 可见,2 种重金属离子在 1~15 d 对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的诱导率表现在 Zn^{2+} 质量浓度(1 mg/L)高于 Cu^{2+} (1 mg/L)时,如 3 d 的诱导率分别为 143% 和 230%,由此表明 2 种重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的诱导能力为 Zn^{2+} 高于 Cu^{2+} 。

表 1 2 种重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 的诱导程度

Tab.1 Induced ratio of Cu^{2+} and Zn^{2+} on Na^+/K^+ -ATPase in gills of *Paralichthys olivaceus*

取样时间/d Sampling time	诱导率/% Induced ratio	
	Cu^{2+} ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	Zn^{2+} ($1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
0	100 ^a	100 ^a
0.5	170 ^b	152 ^{ab}
1	160 ^b	237 ^c
3	143 ^b	230 ^c
6	140 ^b	185 ^{bc}
15	133 ^b	169 ^b

注:表中同一列数据右上角相同字母表示差异不显著($P>0.05$),不同表示差异显著($P<0.05$)。

Note: The same superscript letters in the same rank in the table mean insignificant difference ($P>0.05$), while the different letters mean significant difference ($P<0.05$).

3 讨论

3.1 重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响

贾秀英等^[9]报道,鲫鱼(*Carassius auratus*)在1~4 mg/L Cu^{2+} 染毒10 h,鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力被显著性抑制,表现出一定的剂量效应关系;Collins 等^[9]研究表明,在0.005~0.016 mg/L Cu^{2+} 质量浓度下虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)染毒35 d,鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力无显著变化,并认为这与鳃丝不累积重金属离子相一致。在McGeer 等^[4]的研究中,虹鳟暴露于0.075 mg/L Cu^{2+} 中,至60 d时鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力显著升高。Watson 等^[10]研究发现,在 $(0.29-1.98) \times 10^{-3}$ mg/L Zn^{2+} 作用30 d后,鲑鱼(*Salmo gairdneri*)鳃丝 ATPase 被激活。本研究表明,2种重金属离子各处理组褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力在6 d内呈峰值变化;6~15 d各处理组酶活力趋于稳定,除 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 最高浓度处理组酶活力与对照组差异不显著外,其他均表现为显著促进作用,其影响程度与重金属离子浓度呈负相关,这与上述研究结果基本一致。这说明 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力影响具有明显的剂量、时间效应关系,同时也显示出重金属离子对不同种类鱼的鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力影响存在差异。

在McGeer 等^[4]的研究中,虹鳟最初暴露于亚致死浓度的 Cu^{2+} 中会造成短暂的体内 Na^+ 、 Ca^{2+} 流失,然后恢复并趋于稳定, Zn^{2+} 引起的 Na^+ 流失不显著并且短暂。这与本实验结果相符,因为鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 作为渗透调节 Na^+ 、 K^+ 的主要酶类,突然受到重金属离子刺激酶活力升高,导致体内 Na^+ 流失,随后经应激适应,酶活力趋于稳定,体内外离子也逐渐达到稳定平衡状态。McDonald 将重金属离子对鱼体生理反应的影响过程描述为“损伤—修复”机制,包括3个时期:突然损伤期(初期)、恢复期、适应期。在最后这一期中,耐受性增强^[11]。认为在重金属离子突然刺激下,由于鱼类的鳃丝与水环境直接接触,鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 立即受到影响,导致鱼体的离子平衡被扰乱。研究表明重金属离子能引起鱼体去毒生理反应,如鱼鳃黏液分泌量相应增加在一定程度上改变鱼鳃微环境中金属离子的形态分布^[12],还有金属硫蛋白浓度相应增加起到络合金属离子的作用^[13]等,因此随着鱼体去毒生理反应的进行,鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力逐渐达到适应平衡状态。

3.2 重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响机制

重金属离子可以同 Na^+/K^+ -ATPase 的许多位点结合,或者与膜上其他蛋白、磷脂等成分结合,能改变 Na^+/K^+ -ATPase 的构象,从而影响其活性,同时 Na^+/K^+ -ATPase 与膜上磷脂结合的状态还能影响膜的流动性和通透性等功能^[14-17]。根据 Na^+/K^+ -ATPase 的作用机理,重金属离子与

褐牙鲈鳃丝直接接触使鳃上皮 Na^+/K^+ -ATPase 的构象发生变化,使酶活性中心的构型和低介电区域发生变化,最终影响 Na^+/K^+ -ATPase 活力,导致鳃上皮细胞膜的结构和功能受到损伤,从而影响鳃丝的渗透调节和呼吸等生理功能。实验中2种重金属离子对褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 活力的诱导程度为 Zn^{2+} (1 mg/L) 高于 Cu^{2+} (1 mg/L),这种差异主要与2种重金属离子与褐牙鲈鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 结合位点以及数量不同有关,还与2种重金属离子对鳃上皮细胞膜结构的影响程度有关^[18]。由于鱼体在重金属离子作用下具有复杂的生理反应,目前有关重金属离子对鱼类鳃丝 Na^+/K^+ -ATPase 的毒性机制尚无定论,还有待于进一步的研究。

参考文献:

- [1] 孔繁翔. 环境生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2000: 68-93.
- [2] Sprey D J, Hodson P V, Wood C M. Relative contributions of dietary and waterborne zinc in the rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1988, 45: 32-41.
- [3] Alsop D H, McGeer J C, McDonald D G, et al. Assessing the costs and consequences of chronic waterborne zinc exposure to juvenile rainbow trout in hard and soft water [J]. Environ Toxicol Chem, 18, 1014-1025.
- [4] McGeer J C, Cheryl Seebodinsky, McDonald D, et al. Effects of chronic sublethal exposure to waterborne Cu, Cd or Zn in rainbow trout [J]. Aquat Toxicol, 2000(5): 231-243.
- [5] Mallatt J. Fish gill structural changes induced by toxins and other irritants: A statistical review [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1985, 42: 630-648.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding [J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [7] Whealby M G, Hentley R P. Branchial and antennal Na^+/K^+ -dependent ATPase and carbonic anhydrase activity during salinity acclimation of the euryhaline crayfish *Pacifastacus lenisulus* [J]. J Exp Biol, 1987, 133: 73-86.
- [8] 贾秀英, 陈志伟. 铜、镉对鲫鱼组织 Na^+/K^+ -ATPase 活力的影响[J]. 科技通报, 2003, 19, 1: 50-53.
- [9] Collins Kamunde, Wood M. The influence of ration size on copper homeostasis during sublethal dietary copper exposure in juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Aquat Toxicol, 2003, 62: 235-254.
- [10] Watson T A, Beumish F W H. The effects of zinc on branchial adenosine triphosphatase enzymes in vitro from rainbow trout, *Salmo gairdneri* [J]. Comp Biochem Physiol, 1981, 68C: 170-173.
- [11] McDonald D G, Wood C M. Branchial mechanisms of acclimation to metals in freshwater fish [A]. Fish Ecophysiology [M]. London: Chapman & Hall, 1993: 297-321.
- [12] 龙爱民, 陶 雷, 刘长发. 铜在鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 鳃微环境中的形态分布 [J]. 环境科学, 2000, 7: 6-10.

- [13] 王海蕻,陶 澍. 生物标志物在水环境研究中的应用[J]. 中国环境科学, 1999, 19(5): 421 - 426.
- [14] Chen J C, Nan F H. Effect of ambient ammonia on ammonia-N excretion and ATPase activity of *Penaeus chinensis* [J]. Aquat Toxicol, 1992, 23(2): 1 - 10.
- [15] 沈 同,王镜岩. 生物化学[M]. 北京:高等教育出版社, 1990. 293 - 294.
- [16] Towel D W. Role of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in ionic regulation by marine and estuarine animals [J]. Mar Biol Lett, 1981, 2(1): 107 - 122.
- [17] 袁锦芳,陈叙龙. 环境因素对海洋动物 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的影响概述[J]. 海洋环境科学, 1999, 18(3): 75 - 79.
- [18] 郁建松. 浅谈重金属对生物毒性效应的分子机理[J]. 环境行染与防治, 1996, 18(4): 28 - 31.

Effects of Cu^{2+} and Zn^{2+} on $\text{Na}^+ , \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of gills in Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*

MIAO Jing-jing, PAN Lu-qing, LIU Zhi

(The Key Laboratory of Mariculture, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The juvenile Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* were used with body weight (11.90 ± 3.38)g and total length (10.98 ± 0.85)cm. The experiment was conducted after 20 days domestication of the fish. The results indicated that the effects of Cu^{2+} (0.1 mg/L, 0.2 mg/L, 0.5 mg/L, 1 mg/L) and Zn^{2+} (1 mg/L, 2 mg/L, 5 mg/L, 10 mg/L) on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity were significant ($P < 0.05$) during the first 6 d, and the change curve of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity had a marked peak on 24th hour. The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in each group except 1 mg/L Cu^{2+} group reached the maximum at the 24th hour, then decreased gradually, and became stable from the 6th day to the 15th day. While the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of 1 mg/L Cu^{2+} group reached the maximum on the 12th hour, and became stable from 3rd day to 15th day. At the same time the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in each group of the two kinds of metal ions were significantly different ($P < 0.05$), and had negative relationships with their concentrations. From 6th day to 15th day the 1 mg/L Cu^{2+} group and the 10 mg/L Zn^{2+} group had an indistinctive differentiation with the control group. Meanwhile, the inductive ratio of the two heavy metal ions on $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity were Zn^{2+} (1 mg/L) $>$ Cu^{2+} (1 mg/L) from the first day to the 15th day.

Key words: Cu^{2+} ; Zn^{2+} ; *Paralichthys olivaceus*; gill; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

Corresponding author: PAN Lu-qing, E-mail: panlq@ouc.edu.cn