

文章编号: 1009-6094(2003)03-0013-04

镉对鲫鱼鳃和肝脏超氧化物歧化酶活性的影响*

杨丽华, 方展强, 郑文彪, 伍育源, 马广智

(华南师范大学生命科学学院, 广州 510631)

摘要: 使用浸浴法以 0 mg/L、0.73 mg/L、1.46 mg/L、2.95 mg/L 4 个镉(CdCl₂ · 2.5H₂O) 浓度为丰产鲫(*Carassius auratus* of Penze) × *Cyprinus acutidorsalis* () 幼鱼染毒, 测定了 144 h 内鳃及肝组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性的变化。结果表明, 低浓度组 Cd 暴露时, 鲫鱼鳃和肝组织中 SOD 活性的变化短时间内不明显, 但随着处理时间的延长, Cd 提高了鳃和肝组织中 SOD 的活性, 导致“毒物兴奋效应”。高浓度组 Cd 暴露时均抑制了肝和鳃中的 SOD 活性, 其作用随着暴露时间的延长和浓度的升高而增强, SOD 酶活性降低所造成的活性氧伤害是引起鲫鱼幼鱼死亡的重要原因。肝组织中的 SOD 酶活性和敏感性高于鳃, 这与其执行的生理功能有关。

关键词: 生物化学; 镉; 超氧化物歧化酶; 鳃; 肝脏; 鲫鱼

中图分类号: Q55 **文献标识码:** A

0 引言

当重金属在生物体内积累到一定浓度时, 对生物的生理生化反应会造成一定的影响, 因此, 可用特定生化反应中的关键酶的变化来证实污染物的影响。镉(Cd)是环境优先污染物, 关于其对生物生理生化作用的影响, 国内外已有许多研究和报道^[1-3]。Cd 对转氨酶、过氧化氢酶、磷酸酶等分子生态毒理指标酶类的活性均有不同程度的抑制。但迄今为止, 未见有关其对鱼类抗氧化酶系统影响的报道。超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)是水生生物抗氧化酶系统的重要组成部分之一, 可用其作为氧化胁迫的生物指标^[4-6]。目前证明 SOD 与生物耐毒性、抗病性、抗衰老和抗污染胁迫等密切相关。本研究 Cd 对鲫鱼 SOD 活性的影响, 这对于阐明 Cd 对鱼类的致毒机理、选择灵敏的生物学指标指示 Cd 污染有重要意义。

1 材料与方法

1.1 实验动物

从广州市白云区神山镇东明鱼苗场购买的丰产鲫(*Carassius auratus* of Penze) × *Cyprinus acutidorsalis* () 幼鱼, 平均体长为(5.91 ± 0.32) cm, 体重(2.58 ± 0.27) g, 鱼在水族箱中驯养 7 d 以上, 暂养期间均活动正常, 无病, 死亡率低于 5%; 投试前 1 d 停止投饵, 随机取鱼分组, 选择身体健康、反应灵敏、大小基本一致的鱼类。实验前, 各材料均在实验室水箱中暂养。

1.2 实验毒物和条件

CdCl₂ · 2.5H₂O (AR) 为广州化学试剂厂生产。配制成浓度为 3 000 mg/L 的母液, 再根据需要稀释。用长 44.5 cm、宽 55.5 cm、高 34.0 cm 的聚乙烯塑料水族箱装水 60 L, 曝气 3 d 的自来水。水质标准: pH 为 7.2~7.4; DO 为 6 mg/L; 总硬度(均值) 3.0 mc/L; 总碱度(均值) 2.5 mg 当量/L; 水温(20 ± 3)。

1.3 实验方法

毒物对鲫鱼采用静态染毒法, Cd 对鲫鱼的 96 h LC₅₀ 值为

5.85 mg/L^[7], 取其 96 h LC₅₀ 的 1/2、1/4 和 1/8 浓度, 即分别为 2.95 mg/L、1.46 mg/L、0.73 mg/L。每组各放 60 尾鱼染毒, 每一浓度各设平行组和对照组。在实验的 12 h、24 h、48 h、96 h 和 144 h 时, 分别从各水箱中取出 10 条鲫鱼鱼苗, 迅速取出鳃、肝组织分别装入 1.5 mL 塑料离心管中, 作好标记后迅速放入 -20 的超低温冰箱中, 以备测量鳃、肝组织的 SOD 酶活性。

1.4 组织 SOD 酶液的制备

将各组织样品分别加预冷() 的双蒸水 1.0 mL。在冰浴条件下, 用电动匀浆棒进行匀浆, 上下移动 60 次, 每次间隔 1 s。将匀浆液用冷冻离心机于 4、10 000 rpm 离心 10 min, 取上清液用于测定 SOD 活性。

1.5 SOD 活性测定

SOD 活性的测定方法参考文献[8]进行。1) 邻苯三酚自氧化。取 100 mmol/L 的 Tris-HCl(pH=8.2) 缓冲液 4.5 mL, 4.2 mL 双蒸水, 25 水浴中保温 20 min, 取出立即加入 25 预热过的 3 mmol/L 邻苯三酚 0.1 mL (以 10 mmol/L 的 HCl 配制, 空白管用 10 mmol/L 的 HCl 来代替邻苯三酚 HCl 溶液), 迅速摇匀倒入比色杯(光径 1 cm), 在 λ=325 nm 下测量吸光度值 A。等数字变化均匀后开始计数, 测定其 3 min 内的反应速率, 每 30 s 读一次 A 值, 调整邻苯三酚的量及双蒸水的量, 使总反应体积保持在 9.0 mL, 使自氧化速率为 0.070_{0.0.325}/min。2) 测定 SOD 活性的方法同测邻苯三酚自氧化速率, 在加入邻苯三酚前加入待测 SOD 样液, 肝组织 0.02 mL, 鳃 0.2 mL。加入的邻苯三酚的量与自氧化速率为 0.070_{0.0.325}/min 的邻苯三酚的量一致。

1.6 酶蛋白含量的测定

蛋白质用 Folin-Phenol 试剂中的 Lowry 基本法测定^[9], 方法略有改变。标准牛血清蛋白浓度为 2 mg/L, 在 7 只试管中分别加入 0 mL、0.013 mL、0.025 mL、0.05 mL、0.075 mL、0.10 mL、0.125 mL 的标准液, 加双蒸水至 0.20 mL, 加反应 C 液(即 A 液和 B 液 50:1(V:V)), 临用前混匀, A 液为 4% Na₂CO₃ 与 0.2 mol/L NaOH 等体积混合; B 液为 1% CuSO₄ ·

* 收稿日期: 2002-12-05

作者简介: 杨丽华(1978-), 女, 硕士研究生, 从事环境科学研究; 方展强(1953-), 男, 教授, 硕士, 从事环境科学研究。

基金项目: 广东省科委科技攻关项目(编号: 2KB05402N)

© 1995-2004 Tsinghua Tongfang Optical Disc Co., Ltd. All rights reserved.

5H₂O 与 2% 酒石酸钾钠等体积混合) 2.2 mL, 室温反应 10 min, 加稀释的 Folin 试剂 0.1 mL, 室温反应 30 min, 在 650 nm 处比色测定。酶蛋白标准曲线见图 1。

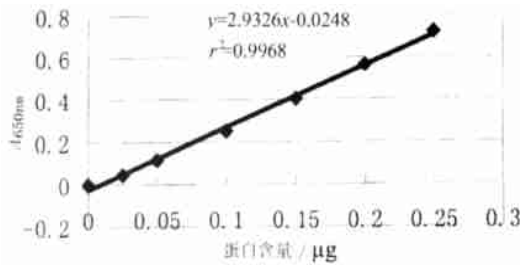


图 1 标准牛血清蛋白曲线

Fig 1 Calibration curve of bovine serum albumin

酶活性单位定义为: 每毫升反应液中, 每分钟抑制邻苯三酚自氧化速率达 50% 的酶量定义为一个酶活性单位。酶活性单位的计算公式为

$$\text{SOD 活性单位 (U)} = \frac{0.07 - \text{O. D.}_{325}/\text{min}}{0.070} \times 100\% \times \text{反应液总体积} / 50\%$$

表 1 Cd 对鲫鱼幼鱼肝组织 SOD 活力的影响

Table 1 Effect of cadmium on the SOD activity of fingerling liver tissues

Cd 浓度/(mg · L ⁻¹)	酶活力/(U · mg pr ⁻¹)				
	12 h	24 h	48 h	96 h	144 h
对照组	35.49 ± 2.08	37.58 ± 1.67	37.27 ± 1.06	36.97 ± 1.95	35.44 ± 1.63
0.73	37.53 ± 1.72	38.89 ± 2.08	39.02 ± 1.93	¹⁾ 42.64 ± 2.60	¹⁾ 43.68 ± 2.45
1.46	32.24 ± 3.04	¹⁾ 30.27 ± 2.78	¹⁾ 29.08 ± 2.61	²⁾ 27.31 ± 1.76	²⁾ 25.40 ± 2.03
2.95	¹⁾ 29.59 ± 3.42	²⁾ 28.25 ± 2.91	²⁾ 26.57 ± 1.97	²⁾ 19.87 ± 1.86	

注: 表中数据为平均值 ± 标准误差, 实验重复次数 $n = 10$; SOD 活性单位为 U/(mg protein);

1) 表示对该含量组数据与对照组数据进行单因素方差分析的结果表明差异显著 ($p < 0.05$);

2) 表示对该含量组数据与对照组数据进行单因素方差分析的结果表明差异极显著 ($p < 0.01$)。

SOD 主要分布于胞浆和线粒体的基质中, 是催化超氧阴离子自由基 ($O_2^{\cdot -}$) 发生歧化反应的一类金属酶, 是机体防御过氧化损伤系统的关键酶之一。其基本功能是清除生物体内过高浓度的超氧阴离子自由基, 保持体内自由基的代谢平衡, 从而保持细胞正常的代谢不受破坏。在生理状态下, 当某些污染物在体内进行生物转化时, 会产生氧化还原循环生成大量活性氧如 $O_2^{\cdot -}$ 、OH、 H_2O_2 等, 这些活性氧又可使 DNA 断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等, 从而引起机体氧化应激反应, 在这些活性氧产生及转化中, SOD 等起着非常重要的作用^[10]。

SOD 清除 $O_2^{\cdot -}$ 的能力与其含量和活性有关, 许多研究表明, 当生物体受到轻度逆境胁迫时, SOD 活性往往升高; 而当受到重度逆境胁迫时, SOD 活性通常降低, 使生物体内积累过量的活性氧, 从而导致生物体的伤害^[11, 12]。本实验结果同样发现, 低浓度镉胁迫下, 鲫鱼幼鱼肝组织内的 SOD 活性显著升高, 这种现象与 Beaumont 等^[13]的研究结果类似, Stebbing^[14]认为毒物在低浓度下出现的这种现象, 是在无毒情况下的刺激反应, 他把这一现象称为“毒物兴奋效应”。到目前为止, 许多研究证明, “毒物兴奋效应”具有普遍性; 高浓度 Cd 胁迫下, 鲫鱼幼鱼肝组织内的 SOD 活性极其显著性下降, 因此, Cd 胁迫下 SOD 活性的降低, 造成鲫鱼幼鱼的活性氧伤害很可能是 Cd 对鲫鱼

$$\text{SOD 酶比活力 (U/mg protein)} = \frac{\text{SOD 酶活性单位 (U)}}{\text{蛋白质含量 (mg)}}$$

1.7 数据分析

实验数据用统计学方法进行处理。结果均为“平均数 ± 标准误差”, 用 ANOVA 单因素方差分析法分析镉暴露引起的 SOD 平均值的差异; 组间数据的两两比较采用 t 检验法, 认为 $p < 0.05$ 是差异显著, $p < 0.01$ 是差异极显著, 统计分析应用 Excel 2000 软件。

2 结果与讨论

2.1 Cd 对肝脏 SOD 活性的影响

表 1 为 Cd 对鲫鱼幼鱼肝组织 SOD 活性影响的实验结果。可以看出, 与对照组相比, 低浓度组 Cd 暴露鲫鱼幼鱼肝组织 SOD 活性在短时间内变化不明显, 但随着处理时间的延长, Cd 提高了肝组织 SOD 的活性, 在 96 h 时显著高于对照组 ($p < 0.05$)。高浓度组 Cd 暴露时抑制了 SOD 活性, 且这种抑制作用有随着暴露时间延长和浓度升高而增强的趋势, 最高浓度组 SOD 活性一直显著低于对照组 ($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$), 在实验末期, 肝中 SOD 活性达到最低水平, 而后出现部分鲫鱼死亡。

幼鱼形成毒害的重要原因之一。

2.2 Cd 对鳃 SOD 活性的影响

表 2 为 Cd 暴露对鲫鱼幼鱼鳃组织 SOD 酶活性影响实验结果。可以看出, Cd 对鳃组织 SOD 活性的影响与对肝组织 SOD 活性的影响相似, 低浓度 Cd 暴露鲫鱼幼鱼鳃组织 SOD 活性的变化不明显, 但随着处理时间的延长, Cd 又提高了鳃组织的 SOD 活性, 在 144 h 时显著高于对照组。高浓度 Cd 暴露时, 鲫鱼鳃组织 SOD 活性显著降低, 而且这种降低作用有随着暴露时间延长和浓度升高而增强的趋势。

由表 1、2 可以看出, 鲫鱼的鳃与肝组织细胞中 SOD 活性差别很大, 肝比鳃的 SOD 活性高 10 倍左右, Cd 暴露引起 SOD 活性的变化, 肝比鳃更敏感。低浓度 Cd 引起肝组织 SOD 活性升高在 96 h 即表现出来, 而鳃组织在 144 h 才表现出来; 高浓度 Cd 引起肝组织 SOD 活性降低, 在 12 h 已有显著差异, 而鳃在 24 h 时才表现出来。鳃和肝中 SOD 活性和敏感性的不同, 可能与它们的不同生理功能有关。肝脏是体内主要的解毒器官, 肝巨噬细胞有活跃的吞噬能力, 毒物在肝脏内氧化、还原或水解过程中会产生大量的 $O_2^{\cdot -}$, 从而使肝组织 SOD 活性较高; 另外, Cd 处理鲫鱼时, Cd 由鳃进入血液作用到很多靶组织细胞, 这些被伤害的组织细胞产生的代谢紊乱产物又汇集到肝脏; 而鳃是呼吸器

官,几乎没有解毒功能,因此SOD的活性和敏感性比肝脏要低得多。

表2 Cd对鲫鱼幼鱼鳃组织SOD活力的影响

Table 2 Effect of cadmium on the SOD activity of fingerling gill tissues

Cd 浓度/(mg · L ⁻¹)	酶活力/(U · mg pr ⁻¹)				
	12 h	24 h	48 h	96 h	144 h
对照组	3.22 ± 0.62	3.20 ± 0.41	3.13 ± 0.27	3.27 ± 0.51	3.25 ± 0.35
0.73	3.21 ± 0.24	3.16 ± 0.32	3.32 ± 0.33	3.53 ± 0.44	¹⁾ 3.79 ± 0.26
1.46	3.13 ± 0.43	3.07 ± 0.57	2.96 ± 0.40	¹⁾ 2.82 ± 0.21	¹⁾ 2.78 ± 0.18
2.95	3.05 ± 0.60	¹⁾ 2.93 ± 0.29	²⁾ 2.64 ± 0.24	²⁾ 2.46 ± 0.32	

注:表中数据为平均值 ± 标准误差,实验重复次数 n=10;SOD 活性单位为 U/(mg protein);

1)表示对该含量组数据与对照组数据进行单因素方差分析的结果表明差异显著 (p < 0.05);

2)表示对该含量组数据与对照组数据进行单因素方差分析的结果表明差异极显著 (p < 0.01)。

3 结论

低浓度组Cd暴露时,鲫鱼幼鱼的肝和鳃组织中SOD活性的变化短时间内不明显,但随处理时间的延长,Cd提高了肝和鳃组织中SOD的活性,导致“毒物兴奋效应”。高浓度组Cd暴露时均抑制了肝和鳃中的SOD活性,其作用随着暴露时间延长和浓度升高而增强,这种SOD酶活性降低造成的活性氧伤害可能是引起鲫鱼幼鱼死亡的原因之一。肝组织中的SOD酶活性和敏感性均高于鳃,这可能与鳃和肝脏所执行的不同生理功能有关。

References(参考文献):

[1] Jia Xiuying(贾秀英) and Chen Zhiwei(陈志伟). Effects of cadmium on the activities of transaminase and catalase in tissues of *Carassius auratus*[J]. *Environmental Pollution and Control*(环境污染与防治), 1997, 19(6): 4~5

[2] Jia Xiuying(贾秀英) and Chen Zhiwei(陈志伟). Effects of cadmium on activity of common carp phosphatases[J]. *Shanghai Environmental Science*(上海环境科学), 1998, 17(6): 40~41

[3] Vaglio A and Landriscina C. Changes in liver enzyme activity in the teleost *Sparus aurata* in response to cadmium intoxication[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1999, 43(1): 111~116

[4] Feng Tao(冯涛), Zheng Weiyun(郑微云), Guo Xiangqun(郭祥群), et al. 2001. Effects of benzo(a)pyrene on superoxide dismutase activity in liver of *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. *Journal of Oceanography in Taiwan Strait*(台湾海峡), 2001, 20(2): 182~186

[5] Yu Qun(余群), Zheng Weiyun(郑微云), Weng Yan(翁妍), et al. Effect of petroleum pollutant on SOD and Cat enzyme in viscera tissue of *Pagrosomus Major*[J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*(厦门大学学报自然科学版), 1999, 38(3): 429~434

[6] Zikic R V, Stain A, Saicic Z S, et al. The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch) exposed to cadmium[J]. *Physiol Res*, 1996, 45(6): 479~481

[7] Yang Lihua(杨丽华), Fang Zhanqiang(方展强) and Zheng Wenbiao(郑文彪). Safety assessment and acute toxicity of heavy metals to crucian *Carassius auratus*[J]. *Journal of South China Normal University (Natural Science)*(华南师范大学学报自然科学版), 2003, (2): 100~106

[8] Zou Guolin(邹国林), Chen Dongming(陈东明), Cheng Lin(程林), et al. Studies on the linearization method for the quantitation of activity of superoxide dismutase[J]. *J Wuhan Univ (Natural Science Edition)*(武汉大学学报自然科学版), 1996, 42(6): 779~782

[9] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. *J Biol Chem*, 1951, 193: 265~275

[10] Xu Lihong(徐立红), Zhang Yongyuan(张甬元) and Chen Yiyu(陈宜瑜). The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*(水生生物学报), 1995, 19(2): 171~185

[11] Tang Xuexi(唐学玺) and Zhang Peiyu(张培玉). Effects of anthracene on activity of superoxide dismutase in *Sebastes fuscens*[J]. *Journal of Fisheries of China*(水产学报), 2000, 24(3): 217~220

[12] Jin Minghong(金明红), Feng Zongwei(冯宗炜) and Zhang Fuzhu(张福珠). Effects of ozone on membrane lipid peroxidation and antioxidant system of rice leaves[J]. *Environmental Science*(环境科学), 2000, 21(3): 1~5

[13] Beaumont A R and Newman P B. Low levels of tributyltin reduce growth of marine microalgae[J]. *Mar Pollut Bull*, 1986, 17(10): 457~461

[14] Stebbing A R D. Homesis the stimulation of growth by low levels of inhibitions[J]. *Sci Tot Envir*, 1982, 22(1): 213~234

《安全与环境学报》刊登有安全、环境相关专业方向硕士、博士研究生招生及博士后信息,欢迎查询,详情请查阅2001年2、3、4、6期,2002年1、2、3、4、6期及2003年1期。

EXPERIMENT WITH EFFECT OF CADMIUM ON ACTIVITY OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN GILL AND LIVER TISSUE OF CRUCIAN

YANG Lihua, FANG Zhan-qiang, ZHENG Wen-biao, WU Yu-yuan, MA Guang-zhi
(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract This paper presents an experiment the author has done with the crucian when it was exposed to cadmium to test the influence of the cadmium polluted sludge on the fish activities. With crucian exposed to cadmium ($CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$) with $0 mg/L$, $0.73 mg/L$, $1.46 mg/L$, $2.95 mg/L$ for 6 days, the authors intend to determine the activities of superoxide dismutase (SOD) of gill and liver tissues in 144 h by means of improved pyrogallol autoxidation. The results of the experiment indicate that the activities of SOD in gill and liver haven't made any obvious change at low Cd concentrations in a short time. The activities of SOD, however, would increase with the exposure time going on, which may probably come about as a result of the "Toxic excitement effect." With the high concentration Cd inhibiting the activities of SOD in gill and liver, the inhibiting strength will increase with the prolonging of the exposure time and the concentration enhancing. Thus, it suggests that the harm caused by active oxygen due to the decrease of the activities of SOD is an important reason that leads to the mass death of crucian exposed to Cd. The experiment also indicates that the activities and sensitivities to Cd of SOD in liver are higher than those in gill, which may be associated with their physiological functions.

Key words: biochemistry; cadmium; superoxide dismutase; gill; liver; crucian

CLC number: Q 55 **Document code:** A

Article ID: 1009-6094(2003)03-0013-04

(Journal of Safety and Environment 2003, Vol 3, No 3)

征 稿 启 事

《安全与环境学报》2001年创刊,是安全与环境学科的学术性双月刊,国内外公开发行。

《安全与环境学报》主要刊载安全与环境各个领域科学研究新成果、新进展、新方法、新技术等(更详细内容请参看本刊2001年第1期封2~封4)。本刊鼓励科学研究的交流,论文涉及的研究课题不论其规模大小、等级高低,本刊均予以考虑。本刊一般只考虑少量特别典型的综述文章。本刊不发表经验总结、管理总结和议论性论文。

本刊对稿件要求如下(更详细内容请参看本刊2001年第1期封2~封4)。

- (1) 研究对象明确,针对性清楚,逻辑性强,数据可靠,情况详实。
- (2) 文字简练、易懂。每篇论文不超过6000字,包括图、表、公式和参考文献所占篇幅。(3) 稿件须用打印稿,一式3份。请同时寄来软盘或采用E-mail传递。
- (4) 稿件如属基金项目,请注明基金名称和编号。
- (5) 插图需用计算机打印,图线清楚、准确。黑白照片要求一式两份,黑白对比清晰。图和表需用中、英文两种文字表示。
- (6) 引用的参考文献必须在文中有标注,文后有著录。著录格式为:(1) 期刊:作者 论文名 期刊名,年,卷(期):起页-止页
- (2) 书:作者 书名 出版地:出版社,出版年 多作者时 取前3名 中文参考文献须同时提供英文稿,本刊发表时采用英文稿。
- (7) 一稿不得多投。来稿如在会议上或在内部刊物上发表过,请给予注明。
- (8) 来稿请一律附上论文名、作者及详细地址、摘要及关键词的英文稿。中文摘要不超过300字,但必须包含四要素(目的、方法、结果、结论),英文摘要应尽量详细,要求在300个实词以上或者10个英语句子以上。英文摘要要反映作者的工作内容,不要写成相同题目的小论文或压缩论文。请参阅本刊已发表论文的英文摘要。
- (9) 来稿请附第一作者简况(姓名,出生年,性别,民族,学历(位),职称,研究方向)及联系人通信地址、电话和E-mail。
- (10) 文中一律使用法定计量单位(SI单位)。
- (11) 请您自己保留原稿,恕不退原稿。
- (12) 涉及保密问题由作者自负。
- (13) 来稿一经发表,酌致稿酬,并赠该期期刊二本。
- (14) 本刊暂不收取版面费。

请特别注意:本刊对录用稿件免收版面费,并给予稿酬。