

镉对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶活性的影响

曹剑辉,马广智,方展强

(华南师范大学生命科学学院,广东广州 510631)

摘要:在实验室条件下,把草鱼置于镉浓度分别为 0.06 mg/L、0.30 mg/L、1.50 mg/L 水中,分别在处理后第 1、4、7 天取样测定其鳃和肝组织中 SOD 活性变化。结果表明:0.06 mg/L 镉浓度时,鳃组织 SOD 活性无显著变化,而 0.30 mg/L、1.50 mg/L 镉浓度时,鳃组织 SOD 显著降低;对于肝组织,第 1 天的 0.06 mg/L、0.30 mg/L 镉浓度组和第 4 天的 0.06 mg/L 镉浓度组,SOD 活性显著升高,而第 7 天 0.30 mg/L、1.50 mg/L 镉浓度时肝组织的 SOD 显著降低。提高水中的钙浓度,可使所有鳃组织 SOD 活性较软水组适当升高,同样在 0.30 mg/L 镉浓度组的第 7 天和镉浓度为 1.50 mg/L 组的肝组织 SOD 较软水组也适当升高。

关键词: 镉;草鱼;鳃;肝;SOD

中图分类号: S949 **文献标识码:** A **文章编号:** 1003-1278(2004)01-0009-03

镉(Cd)是重要的环境污染物,随着工农业的迅速发展,镉通过工业污水、生活废水的排放,城市雨水的冲刷,大气沉降等各种途径进入地表水,使水环境受到污染,给渔业生产和人类身体健康带来严重危害^[1]。超氧化物歧化酶(SOD)是机体防御过氧化损害系统的关键酶之一,是一类敏感分子生态毒理学指标^[2]。钙是生物体内的必需元素,对维持生物体内的内环境稳定具有重要意义,钙与镉具有相似的离子半径(Ca:0.99Å;Cd:0.97Å),且同为二价阳离子,物理化学性质也相似^[3]。本文报道不同镉浓度下草鱼的鳃和肝组织 SOD 变化情况,并比较了软水和硬水环境下镉对 SOD 活性的影响;以期利用钙、镉的拮抗作用来缓解镉对草鱼的毒害,并为探讨镉的作用机理提供一些实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验用鱼

实验采用草鱼为实验对象。草鱼采自广州市郊的鱼苗场。鱼体健壮,体长 10.0 ± 2.0 cm,体重范围为 10.0 ± 3.0 g。实验鱼自养殖场运回来后驯养 1 周再进行实验。

1.2 实验用水和分组

实验分别使用 2 种不同硬度的水,一种是充分曝气的自来水,硬度为 2.2 度(德国度),pH 值

6.8;另一种水是将上述自来水用 CaCl_2 调配成硬度为 16 度。(总硬度用 Ca^{2+} 经典的 EDTA 滴定法测定)。镉对草鱼的毒害作用采用静态染毒法^[4]。将 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (A. R) 用蒸馏水分别配成含有 Cd^{2+} 为 5000 mg/L 的母液,然后再稀释成实验所需要的各浓度。实验分 3 个浓度梯度,即 Cd^{2+} 分别为 0.06 mg/L、0.30 mg/L、1.50 mg/L;每个梯度又分成软水组和硬水组,同时设软水对照和硬水对照,共 8 个组。配置时进行充分搅拌、曝气,使 Cd^{2+} 和 Ca^{2+} 充分溶解且水质均匀。实验在 58 cm × 38 cm × 52 cm 的水族箱中进行。每一水族箱中加入 50 L 的药液,放入实验草鱼 45 尾。实验期间 24 h 曝气,水温为 18℃,溶氧量为 6 mg/L 以上,每天更换新鲜实验用水,为避免食物影响,整个实验期间停止给鱼喂食。分别在第 1 天、第 4 天、第 7 天每组取出 10 尾鱼,用蒸馏水洗净,分别取试验鱼的鳃和肝组织样品,称重后置于 -20℃ 下冰冻保存。

1.3 样品制备

将组织样品分别加预冷的双蒸水 1.0 mL。在冰浴条件下,用电动匀浆器进行匀浆,匀浆液用冷冻离心机于 4℃,10 000 r/min 离心 30 min,取上清液用于测定 SOD 活性和蛋白质含量。

1.4 测定方法

SOD 活性测定参照邹国林^[5]等改进的邻苯三酚自氧化法;蛋白质含量测定参照 Forlin - Pheal 试剂法^[6]。

1.6 数据分析

收稿日期:2003-05-28

作者简介:曹剑辉,1972 年生,男,湖南郴州人,硕士研究生,主要从事水生动物学研究。

结果分析采用统计学方法进行处理。所得的结果均为平均数 ± 标准差;用 ANOVA 单因素方差分析 SOD 平均值的差异;组间数据比较采用 *t* 检验法, $P < 0.05$ 被认为是差异显著, $P < 0.01$ 被认为是差异极显著, 统计分析应用 Excel2000 软件。

2 结果

2.1 不同镉浓度对草鱼死亡率的影响

在镉浓度为 0.06 mg/L、0.30 mg/L 较低浓度处理时,软水组和硬水组中的草鱼均未表现出明显的中毒症状。但在镉浓度为 1.50 mg/L 较高浓度处理时,软水组的草鱼表现出明显的中毒症状,放入处理液后 2 d 内游动速度加快,随后安静少动,身体失衡侧翻,沉入水底,对刺激反应迟钝,体表分泌的粘液增多,出现死鱼现象,死亡率 33.33%,表明在该浓度时对草鱼有较大毒性影响;而硬水组的草鱼,在放入处理液后 2 d 内也有些游动加快、沉入水底、反应迟钝等现象出现,但

中毒现象不如软水组明显,在实验期间也未发现死鱼现象(见表 1),表明加入适量的钙离子后,钙能对镉起拮抗作用,能适当地缓解镉的毒性作用。这与 Gill and Epple^[7]的实验结果相类似。

表 1 不同镉处理后草鱼死亡率

镉浓度/ mg L ⁻¹	软水组			死亡	硬水组			死亡
	1 d	4 d	7 d	率/ %	1 d	4 d	7 d	率/ %
对照	0	0	0	0	0	0	0	0
0.06	0	0	0	0	0	0	0	0
0.30	0	0	0	0	0	0	0	0
1.50	1	12	2	33.33	0	0	0	0

2.2 不同的镉浓度对草鱼鳃组织的影响

从表 2 可看出,对照组中草鱼鳃组织 SOD 活性在第 1 天和第 4 天软水组和硬水组相比无显著差别,而第 7 天硬水组比软水组 SOD 活性显著降低;在镉浓度 0.06 mg/L 组 SOD 活性均与对照组无显著变化;在镉浓度 0.30 mg/L 组的软水组 SOD 活性均显著低于对照组,而硬水组则与对照组无显著变化;在镉浓度较高组(1.50 mg/L),软水组和硬水组 SOD 活性均显著低于对照组,且软水组在第 7 天时的 SOD 活性降低极为显著。

表 2 不同水硬度下镉对草鱼鳃组织 SOD 活性的影响

(Pr) U/ mg

镉浓度/ mg L ⁻¹	第 1 天		第 4 天		第 7 天	
	软水组	硬水组	软水组	硬水组	软水组	硬水组
对照	3.82 ± 0.31	3.33 ± 0.14	3.81 ± 0.60	3.57 ± 0.42	3.58 ± 0.38	3.04 ± 0.36 *
0.06	3.51 ± 0.29	3.26 ± 0.50	3.38 ± 0.33	3.10 ± 0.19	2.98 ± 0.65	3.27 ± 0.55
0.30	3.11 ± 0.24 *	3.17 ± 0.22	2.97 ± 0.57 *	3.06 ± 0.47	2.91 ± 0.62 *	3.14 ± 0.56
1.50	2.76 ± 0.44 *	2.96 ± 0.63 *	2.27 ± 0.36 *	2.84 ± 0.46 *	2.16 ± 0.36 **	2.77 ± 0.49 *

注:每组数据均为平均值 ± 标准差,*表示差异显著,**表示差异极为显著。

表 3 不同水硬度下镉对草鱼肝组织 SOD 活性的影响

(Pr) U/ mg

镉浓度/ mg L ⁻¹	第 1 天		第 4 天		第 7 天	
	软水组	硬水组	软水组	硬水组	软水组	硬水组
对照	16.43 ± 2.06	15.91 ± 7.41	16.10 ± 2.49	15.09 ± 1.88	14.63 ± 4.03	16.09 ± 5.73
0.06	25.40 ± 7.30 **	20.34 ± 3.29 *	20.48 ± 4.54 *	17.35 ± 4.06	18.22 ± 2.49 *	16.44 ± 5.90
0.30	21.95 ± 6.10 *	21.55 ± 2.69 **	18.38 ± 4.50	17.27 ± 4.80	12.02 ± 2.81 *	12.55 ± 1.98
1.50	17.85 ± 4.34	21.82 ± 3.56 **	17.33 ± 3.54	17.57 ± 4.43	11.79 ± 1.54 *	12.08 ± 4.37

2.3 不同的镉浓度对草鱼肝组织的影响

从表 3 可看出,草鱼肝组织 SOD 活性对照组中的软水组和硬水组无显著差别;在镉浓度较低组(0.06 mg/L)中的软水组 SOD 活性均显著升高,而硬水组仅在第 1 天 SOD 活性显著升高,第 4 天和第 7 天则无显著差别;在镉浓度 0.30 mg/L 组中,第 1 天软水组和硬水组 SOD 活性均显著高于对照组,第 4 天无显著差别,在第 7 天,软水组 SOD 活性与对照相比显著下降,而硬水组变化不显著;在镉浓度较高组(1.50 mg/L)中,第 1 天

硬水组 SOD 活性与对照组相比显著升高,而第 7 天软水组 SOD 活性与对照组相比则显著降低,其它各实验组则无显著变化。

3 讨论

SOD 是超氧阴离子自由基(O₂^{-·})的清除剂,也是机体防御过氧化损害系统的关键酶之一,它主要分布于胞浆和线粒体的基质中。在生理状态下,由代谢产生的活性氧可为抗氧化防御系统所控制,但当某些污染物在体内进行生物转化时,同

时产生氧化还原循环,生成大量的活性氧如 $O_2^{\cdot -}$ 、 $OH\cdot$ 、 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,在这些活性氧的产生和转化中, SOD 起着非常重要的作用^[2]。

镉处理后软水组草鱼的肝组织 SOD 活性,在第 1 天的所有镉处理组,以及 0.06 mg/L 镉浓度组的第 4 天、第 7 天都比对照组显著升高,而在 0.30 mg/L 镉浓度组和 1.50 mg/L 镉浓度组第 7 天则显著降低,这表明在一定的时间内,轻度的镉胁迫时,出现一定的“毒物兴奋效应”^[8]。在低浓度处理时,鱼体内产生过量的 $O_2^{\cdot -}$,诱导鱼体 SOD 活性提高,但当镉处理浓度过大,时间过长时,鱼体内产生大量的 $O_2^{\cdot -}$,超过鱼体的 SOD 清除能力时,就会对组织细胞造成损伤,影响鱼体的正常生理活动,使 SOD 活性降低和丧失,甚至导致细胞死亡。而鳃组织未出现“毒物兴奋效应”,这可能与鳃直接暴露在水体,且鳃为呼吸器官,不具有明显的解毒功能有关。

由表 2、表 3 可以看出,草鱼的鳃和肝组织的 SOD 活性有很大的差别,肝的 SOD 活性比鳃高得多,这是由于鳃、肝组织在生物体具有不同的生理功能引起的。肝脏是鱼体的主要解毒器官,能将进入体内的毒物在肝脏内氧化、还原或水解,将毒物转化成为无毒、低毒易溶的代谢物排出体外。该过程中会产生大量的 $O_2^{\cdot -}$,因而,相应地肝组织的 SOD 活性较高。

Cd^{2+} 是一种有效的 Ca^{2+} 通道阻碍物,能阻碍各种 Ca^{2+} 通道^[9],能干扰生物体的 Ca^{2+} 平衡,造成体内 Ca^{2+} 紊乱,影响细胞内信号传导而导致体内各种酶活性的变化,对生物体产生毒害作用^[10]。在不同的镉处理下,硬水组鳃 SOD 比相应浓度软水组的 SOD 活性高,以及在 0.30 mg/L 镉浓度组的第 7 天,1.50 mg/L 组的各个时期,硬水组肝组织 SOD 比相应浓度的软水组 SOD 活性高,这主要与硬水中的 Ca^{2+} 有关。由于 Ca^{2+} 与 Cd^{2+} 具有很相似的离子半径和理化性质,而 Ca^{2+} 是鱼体所必需的元素,给予足够量 Ca^{2+} ,能有效避免鱼体对 Cd^{2+} 吸收、蓄积和毒性效应^[11]。其作用机理可能是 Ca^{2+} 能直接与 Cd^{2+} 竞争鳃表面和小肠绒毛上皮表面的结合位点,或通过干扰维生素 D_3 的正常代谢来影响钙结合蛋白的合成以

减少 Cd^{2+} 的吸收。而且足够的 Ca^{2+} 能够影响 Cd^{2+} - Ca^{2+} 结合蛋白的亲合力,使其容易脱落,同时充足的 Ca^{2+} 能及时补充由 Cd^{2+} 引起的肾功能损伤而导致大量 Ca^{2+} 流失等。但由于镉对鱼类的毒性作用机理十分复杂,其详细机制有待进一步深入研究。

参考文献:

- [1] 郭笃发. 环境中的铅和镉的来源及其对人和动物的危害[J]. 环境科学进展,1994,2(3):71~76.
- [2] 徐立红,张甬元,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,1995,9(2):171~185.
- [3] Souza V, Bucio L, Jay D, et al. Effect of cadmium on calcium transport in a human fetal hepatic line (WRL-68 cells). [J]. Toxicology 1996,112:97~104.
- [4] 邱郁春,主编. 水污染鱼类毒性实验方法[M]. 北京:中国环境科学出版社,1992. 77~79.
- [5] 邹国林,桂兴芬,钟晓凌. 一种 SOD 的测活方法—邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展,1986,42(6):779~782.
- [6] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L, et al. Protein measurement with the forlin phenol reagent [J]. J Bio Chem, 1951,193:265~275.
- [7] Gill T S, Epple A. Impact of cadmium on the mummichog (*Fundulus heteroclitus*) and the role of calcium in suppressing heavy metal toxicity[J]. Comp Biochem Physiol C,1992,101:519~523.
- [8] Stebbing A R D. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitions. [J]. Sci Tot Environ,1982,22(1):213~234.
- [9] Tsien R W, Hess P, McCleskey E W, et al. Calcium channels: mechanisms of selectivity, permeation and block[J]. Annu Rev Biophys Chem 1987,16:265~290.
- [10] Smith J B, Dwyer S D and Smith L. Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. Evidence for a cell surface receptor that cadmium stimulates and zinc antagonizes[J]. J Biol Chem,1989,264:7115~7118.
- [11] Zohouri M A, Pyle G G, Wood C M. Dietary Ca inhibits waterborne Cd in Cd-exposed rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*[J]. Comparative biochemistry and physiology,2001,130(C):347~356.

(责任编辑 万月华)