

Cu²⁺对黄鳝肝脏和性腺组织及其线粒体中 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性的影响

鲁双庆^{1,2}, 刘少军², 刘 筠², 刘红玉³

(1. 湖南师范大学生命科学学院, 湖南 长沙 410006; E – mail: lulu@public.cs.hn.cn; 2. 长沙大学应用化学与环境科学系, 湖南 长沙 410003; 3. 湖南农业大学环境科学系, 湖南 长沙 410128)

摘 要:采用人工饲养实验方法,将黄鳝暴露于亚致死浓度的 Cu²⁺污染环境(0.7—4.5 mg · L⁻¹)120 h 后,每隔 24 h 对黄鳝肝脏、性腺组织及其线粒体中 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性进行了检测。结果显示,黄鳝 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性随着 Cu²⁺污染浓度升高而降低。0.7 mg · L⁻¹ 的 Cu²⁺污染对黄鳝 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性影响小; Cu²⁺浓度大于 3.0 mg · L⁻¹ 时,黄鳝 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性受到较强的抑制。受 Cu²⁺的污染,黄鳝 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性随处理时间的变化在不同的组织表现出相类似的规律,即抑制 – 恢复 – 抑制过程。

关键词:Cu²⁺; 黄鳝; (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性

中图分类号:X503.225 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 – 0267(2002)06 – 0508 – 04

Effect of Cu²⁺ on (Na⁺ + K⁺) – ATPase Activities in Liver or Gonad Tissue and Their Mitochondria of Monopterus Albus

LU Shuang-qing^{1,2}, LIU Shao-jun², LIU Yun², LIU Hong-yu³

(1. College of Life Science, Hunan Normal University, Changsha 410006, China, Email: lulu@public.cs.hn.cn; 2. Department of Applied Chemistry & Environmental Science, Changsha University, Changsha 410003, China; 3. Department of Environmental Science, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Monopterus albus were exposed to sublethal Cu²⁺ concentrations (0.7 to 4.5 mg · L⁻¹) for 120 h. The (Na⁺ + K⁺) – ATPase activities in the liver or gonad tissue and their mitochondria were evaluated every 24 h after Cu²⁺ exposure. The results indicated that (Na⁺ + K⁺) – ATPase activity decreased as Cu²⁺ concentration increased. At the concentration of 0.7 mg · L⁻¹, (Na⁺ + K⁺) – ATPase activity was affected lightly, while Cu²⁺ concentration exceeded 3.0 mg · L⁻¹, (Na⁺ + K⁺) – ATPase activities were inhibited greatly. And in Cu²⁺ polluted environment, the same tendency could be found that (Na⁺ + K⁺) – ATPase activities undergo inhibited – recovered – inhibited course with time.

Keywords: Cu²⁺; monopterus albus; (Na⁺ + K⁺) – ATPase activity

黄鳝是我国重要的淡水经济鱼类,备受生产者和消费者青睐,其人工养殖正方兴未艾,对黄鳝养殖生物学研究也越来越多^[1,2],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。Cu²⁺是在渔业生产上使用十分广泛的一种化学物质,它的杀菌、杀藻效能好,因此常用于清塘及治疗鱼病。但残留在环境中的

Cu²⁺必将通过食物链影响人、畜健康。据报道我国杭州湾、长江口及厦门等一些虾、鱼样品体内 Cu²⁺含量分别为 10.5 mg · kg⁻¹ 和 5.20 mg · kg⁻¹^[3]。本文以水生底栖动物黄鳝为材料,以黄鳝肝脏、性腺组织及其线粒体中 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性的影响为指标,研究了 Cu²⁺对黄鳝的损伤作用,为有效保护黄鳝自然资源 and 充实分子毒理生态学内容,提供一些资料。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用黄鳝购自长沙集贸市场。鱼体长为 20—30 cm,雌性。预先在室内暂养 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,水温为 23 ℃ ± 1.5 ℃。

1.2 实验试剂

Cu²⁺溶液采用 CuSO₄(分析纯),用去离子水配制。

1.3 实验方法

1.3.1 LC₅₀ 的测定

按 0、1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 mg · L⁻¹ 浓度梯度配制 Cu²⁺溶液,将实验黄鳝暴露于各浓度梯度的 Cu²⁺溶液中,每浓度放 10 尾。详细观察记录 24 h、48 h、96 h 黄鳝中毒症状、出现的时间及死亡情况。根据直线内插法求得 LC₅₀ 为 5.0 mg · L⁻¹。

1.3.2 实验浓度设计

根据 LC₅₀ 浓度设计实验浓度梯度为 0、0.7、1.5、3.0、4.5 mg · L⁻¹。每一实验桶放雌鳝 25 尾。实验期间不投食,每 24 h 换处理液一次。

1.3.3 组织匀浆液的制备

将试验鱼解剖,迅速取肝脏、性腺组织,用预冷的生理盐水漂洗,去血液,用滤纸吸去外附水分。称取肝脏组织 0.3 g、性腺组织 0.2 g 左右,分别置研钵中,加预冷的生理盐水 1 mL,少量石英砂,充分研磨,匀浆后用生理盐水定容到 8 mL。然后 4 ℃ 下离心 (3 500 r · min⁻¹)15 min,取上清液,4 ℃ 保存。

1.3.4 线粒体匀浆液的制备

取肝、性腺组织匀浆、离心后的上清液 5 mL,4 ℃ 下离心 (9 500 r · min⁻¹) 15 min,弃上清液,加预冷的生理盐水 0.5 mL,超声波破线粒体膜,每次 5 s,间隔 10 s,反复 5—8 次,即得线粒体悬浮液,再加生理盐水 1 mL,混匀,4 ℃ 保存。

1.3.5 蛋白质浓度测定

采用考马斯亮蓝法^[4]。

1.3.6 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性测定

采用钼铵酸显色定磷法。测定试剂盒由南京建成生物工程研究所生产。(Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性单位定义为:每小时每毫克蛋白分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷量为一个 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性单位,即: μmol Pi · mg Pro⁻¹ · h⁻¹。

1.3.7 数据分析

所有测试均重复 3 次,按下列公式计算相对活性,经方差分析和 *F* 检验得处理组与对照组差异显著性。

(Na⁺ + K⁺) - ATPase 相对活性 =

$$\frac{\text{处理组}(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+}) - \text{ATPase活性}}{\text{对照组}(\text{Na}^{+} + \text{K}^{+}) - \text{ATPase活性}} \times 100\%$$

2 结果与分析

2.1 Cu²⁺对黄鳝肝脏组织 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性的影响

肝脏是黄鳝的主要解毒器官,当黄鳝处于 Cu²⁺污染环境中时,Cu²⁺随着血液循环被送入肝脏,与肝脏中某些重要酶的活性基团相结合,对肝脏的生理活动产生影响。

图 1 显示,在 Cu²⁺污染环境中,黄鳝肝脏 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性受处理液中 Cu²⁺的浓度影响较大。当 Cu²⁺浓度为 0.7 mg · L⁻¹ 时,肝脏 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 相对活性与对照组十分接近。说明此时肝脏 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性受影响小,肝脏受伤程度低;1.5 mg · L⁻¹ 时,肝脏 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性在处理 72 h 后受抑制程度较明显,抑制率最高为 16.7%; Cu²⁺浓度为 3.0—4.5 mg · L⁻¹ 时,(Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性受到显著抑制 (*P* < 0.05),抑制率最高达 29.3%,说明肝脏受损伤程度较严重。

图 1 Cu²⁺对肝脏 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性的影响
Figure 1 Effects of Cu²⁺ on the (Na⁺ + K⁺) - ATPase of liver of Monopterus albus

从 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性随各浓度 Cu²⁺处理的时间进程变化来看,与对照组相比,处理 24 h 时 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性受到了抑制,其抑制程度随处理液中 Cu²⁺浓度呈负相关关系 (*r* = -0.976);随着处理时间的延长,肝脏的生理活动进行了某些调节,(Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性的抑制程度有些缓解(处理 48—72 h 时,(Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性回升)。但随着处理时间继续延长,损伤程度进一步加重,(Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性受抑制程度升高,黄鳝的生理活动受影响较大。

2.2 Cu²⁺对黄鳝性腺组织 (Na⁺ + K⁺) - ATPase 活性的影响

黄鳝是一种具有性逆转特性的鱼类,雌性黄鳝排卵后退化,雄性器官发育,因此黄鳝的性腺是一种代

谢十分活跃的器官,对环境污染也将比较敏感。

在 Cu^{2+} 污染的环境中,黄鳝性腺组织 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性变化情况如图 2 所示。在低浓度组 ($0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性与对照组接近,抑制率为 $1.5\% - 6.0\%$,与对照组差异不显著 ($P > 0.05$);在中等浓度处理液 ($1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 中, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性受抑制程度较明显,抑制率为 $2.4\% - 14.8\%$;在较高浓度处理组 (Cu^{2+} 浓度为 3.0 、 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性变化显著,经历了抑制—激活—抑制的变化过程,抑制率最高达 36.4% ,与对照组酶活性差异极显著 ($P < 0.01$)。因此,黄鳝生理活动由于缺少能量的供应而受影响,代谢减慢,对环境污染的抵抗力降低,加速死亡。

性腺的生理活动都需要能量的供应, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 酶活性受到抑制后,必将影响性腺的发育,因此可以说 3.0 、 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 污染对黄鳝性腺的发育有较大的影响。

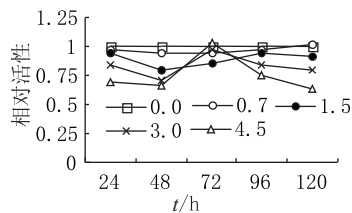


图 2 Cu^{2+} 对性腺 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性影响

Figure 2 Effect of Cu^{2+} on the relative activity of $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ of the gonad tissue of *Monopterus albus*

2.3 Cu^{2+} 对黄鳝肝脏线粒体 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性的影响

线粒体是能量的供应中心,是氧化磷酸化反应进行的主要场所,因此研究线粒体中 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性变化具有重要意义。图 3 显示,在 Cu^{2+} 浓度小于 $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,肝脏组织中线粒体的 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性变化具有重要意义。

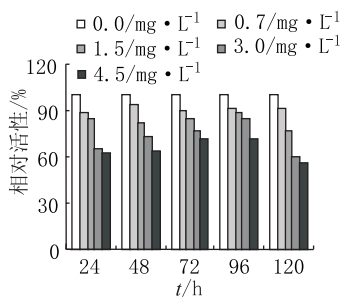


图 3 Cu^{2+} 污染对黄鳝肝脏组织线粒体 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性的影响

Figure 3 Effects of Cu^{2+} pollution on the $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ relative activity in mitochondria of liver tissue of *Monopterus albus*

$(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性变化程度小,与对照组差异不显著; Cu^{2+} 浓度大于 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性变化幅度增加,处理 24 h 时酶活性受到较明显抑制 ($P < 0.05$);随着处理时间的延长, $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性逐渐升高,可能是因为黄鳝肝脏组织内发生了应急反应,代谢途径发生改变所致。随后酶活性又逐渐被抑制,处理 120 h 时,仅为对照组的 59.5% 、 56.3% ,与对照组差异显著 ($P < 0.05$),说明肝脏组织线粒体的供能作用受到了较大影响。

2.4 Cu^{2+} 对雌鳃性腺组织线粒体 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性的影响

在 Cu^{2+} 污染的环境中,黄鳝性腺组织线粒体 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性随处理时间的变化情况见图 4。经 Cu^{2+} 处理 24 h 时,黄鳝性腺组织线粒体 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性随处理液中 Cu^{2+} 浓度呈负相关关系,拟合直线回归方程为

$$Y = -9.28X + 109.12 (R^2 = 0.978)$$

以后酶活性出现了一些波动。说明在 Cu^{2+} 污染环境中,黄鳝抵抗污染的机理十分复杂。

比较图 3 和图 4 还可得出,黄鳝肝脏组织中的线粒体对 Cu^{2+} 污染的反应比性腺组织中线粒体敏感性略高。

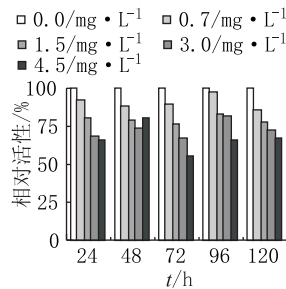


图 4 Cu^{2+} 对性腺组织线粒体 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 相对活性的影响

Figure 4 Effect of Cu^{2+} on $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ relative activity in gonad tissue of *Monopterus albus*

3 讨论

本实验 Cu^{2+} 对黄鳝肝脏、性腺组织及其线粒体中 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性的影响显示:污染环境中 Cu^{2+} 对黄鳝组织 $(\text{Na}^+ + \text{K}^+) - \text{ATPase}$ 活性有影响,其影响程度与环境中 Cu^{2+} 浓度的关系很大。 $0.7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu^{2+} 浓度时,这种影响较小,随着处理浓度的增加,这种影响增大; Cu^{2+} 浓度大于 $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$

¹ 时, 黄鳝 (Na⁺ + K⁺) – ATPase 活性受到较强的抑制, 能量得不到充足的供应, 代谢活动受到干扰, 抵抗力降低, 加速组织的衰老及死亡。

(Na⁺, K⁺) – ATPase 活性受 Cu²⁺ 的影响在不同的组织表现出相类似的变化规律, 在最初 24 h 左右 (Na⁺, K⁺) – ATPase 活性受抑制程度较高, 随后酶活性慢慢恢复, 72 h 时受抑制程度明显降低, 即 (Na⁺, K⁺) – ATPase 活性明显升高甚至超过 CK, 推断可能由于 Cu²⁺ 诱导有机体产生一种适应性生化反应, ATPase 基因大量扩增产生大量 ATPase 所致^[7]。随着处理时间的延长, Cu²⁺ 的毒性作用进一步累积, (Na⁺, K⁺) – ATPase 活性逐渐降低。

(Na⁺, K⁺) – ATPase 是生物体内物质运输、能量转换及信息传递方面具有重要生物学意义的酶。ATPase 至今是一种评价环境污染压力的一个有用的参数, 已发现包括鱼在内的多种水生生物组织 ATPase 对不同污染物均有反应, 都表明有一定的剂量 – 效应关系存在^[15、91]。本实验结果也证实, (Na⁺, K⁺) – ATPase 活性可作为一种有用的分子生态毒理学指标。

参考文献:

[1] 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.

[2] 陶亚雄, 林浩然. 外源激素对雄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.

[3] 姜礼燾. 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.

[4] 李建武, 萧能赓, 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.

[5] 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, **19**(2): 171 – 185.

[6] Davis P W, Friedhoff J M, G A Wedemeyer. Organochlorinated insecticide, herbicide and polychlorinated biphenyls. (PCB) inhibition of Na⁺, K⁺ – ATPase in rainbow trout[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1972, **8**: 69 – 72.

[7] Kulkarni B G. ATPase activity in the gill and hepatopancreas of the intertidal clam *Meretrix casta* var. *ovum* (Hanley) exposed to naphthalenes[J]. *J Environ Biol*, 1990, **11**: 275 – 278.

[8] Piovavrova N B, et al. Effect of cadmium on ciliary and ATPase activity in the gill of freshwater mussel *Anodonta cygnea*[J]. *Comp Biochem Physiol*, 1992, **103c**: 27 – 30.

[9] 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.

(上接第 507 页)

参考文献:

[1] Shu Tao, Tao Liang, Jun Cao, et al. Synergistic Effect of Copper and Lead Uptake by Fish[J]. *Ecotoxicology and Enviromental Safety*, 1999, **44**: 190 – 195.

[2] Anderson S, Sadinski W, Shugart. Genetic and molecular toxicology: A research framework[J]. *Environ Hlth Perspec*, 1994, **102**: 3 – 8.

[3] Rajan M R, Balasubramanian S, Raj S P. Accumulation of heavy metals in sewage – grown fishes. *Bioresour – technol*. Oxford, U. K. : Elsevier Science Limited. 1995, **52**(1) 41 – 43.

[4] Kargin F, Cogun H Y. Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish *Tilapia nilotica*[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, **63**(4): 511 – 519.

[5] Casine S, Depledge M H. Influence of Copper, Zinic and Iron on Cadmium Accumulation in the Taltitrid Amphipod, *Platorchestia Platensis*

[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, **59**: 500 – 506.

[6] 周新文, 孙锦荷. 应用 ³H – TdR 研究混合重金属对鲫鱼(*carassius aruatus*) DNA 合成的影响[J]. 核农学报, 2001, **15**(2).

[7] 穆家鹏. 原子吸收分析方法手册[M]. 北京: 原子能出版社, 1989. 117 – 118.

[8] 毛德寿, 同宗灿, 等. 环境生化毒理学[M]. 沈阳: 辽宁大学出版社, 1986. 250 – 253.

[9] K Snell & B Mullock. Biochemical toxicology: a practical approach. IRL Press limited Oxford Washington DC. 1987.

[10] 王海黎, 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.

[11] 刘 清, 马 梅, 等. Cu, Zn, Cd, Hg 对青海弧菌(Q67 菌株)联合毒性作用的研究[J]. 中国环境科学, 1997, **17**(4): 303.