

镉对褶纹冠蚌抗氧化因子的影响

李 琰¹, 吴 丹¹, 文春根^{1,2*}, 陶志英¹, 胡宝庆¹

(1.南昌大学生物科学系, 南昌 330031, 2.南昌大学生命科学研究院, 南昌 330031)

摘 要:研究了不同浓度的镉(Cd^{2+})对褶纹冠蚌血清和肝胰脏中超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)的活力和谷胱甘肽(GSH)、过氧化氢(H_2O_2)、丙二醛(MDA)的含量的影响。结果表明,褶纹冠蚌在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 处理后,肝胰脏 SOD 活性随着暴露时间的延长而升高,且被显著诱导;在 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 处理后,肝胰脏 SOD 活性暴露 48 h 被显著地诱导,其后开始回落,但是依然被显著地诱导。褶纹冠蚌经不同浓度 Cd^{2+} 处理后,肝胰脏的 GPX 活性显著被诱导;血清中的 GSH 含量先显著上升,在 48 h 时达到峰值后显著下降;血清和肝胰脏的 H_2O_2 均被诱导;肝胰脏中 MDA 含量明显升高。褶纹冠蚌肝胰脏中 SOD 活性和血清中 GSH 含量可以用来指示水生生态系统中的镉污染。

关键词:褶纹冠蚌;抗氧化因子;镉

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2012)11-2108-06

Effects of Cadmium on the Antioxidant Factors of *Cristaria plicata*

LI Yan¹, WU Dan¹, WEN Chun-gen^{1,2*}, TAO Zhi-ying¹, HU Bao-qing¹

(1. Department of Bioscience, Nanchang University, Nanchang 330031, China; 2. Institute of Life Science, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The effect of different concentrations of cadmium (Cd^{2+}) on the levels of superoxide dismutase (SOD) and glutathione peroxidase (GSH-PX) and the content of glutathione (GSH), hydrogen peroxide (H_2O_2) and malonaldehyde (MDA) in blood serum and hepatopancreas of *Cristaria plicata* were studied at laboratory condition. In this experiment, the SOD activity from hepatopancreas increased rapidly with the prolonged time at the dosage of $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ while the SOD activity from hepatopancreas was activated in the first 48 hours and then restrained at the dosage of $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$. The GPX activity from hepatopancreas was activated obviously; the content of GSH from blood serum was activated in the first 48 hours and then restrained; the content of H_2O_2 in blood serum and hepatopancreas respectively showed significant differences between the two groups; the content of MDA in hepatopancreas was activated obviously after *C. plicata* exposing to different concentrations of cadmium. The activity of SOD from hepatopancreas and the content of GSH from blood serum might be used as a biological marker of cadmium in the aquatic ecosystem.

Keywords: *Cristaria plicata*; antioxidant factors; cadmium

生物体内氧自由基的产生和清除一般处于一种动态平衡状态,当氧自由基生产过多或清除能力下降时,大量的氧自由基会损伤生物大分子,从而影响细胞的正常结构和功能^[1]。生物体抗氧化系统的酶可以清除体内多余的活性氧,抗氧化酶包括超氧化物歧化

酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、过氧化氢酶(CAT)等,这些酶的活性变化间接地反映环境中氧化污染的存在,可以作为检验环境胁迫的指标^[2-4]。

镉(Cd)是一种可以通过食物链转移的毒性污染物,人类或动物急性或亚慢性接触镉均会使多种系统受到损害^[5]。镉能诱导生物体产生大量的活性氧自由基,从而改变细胞内的氧化状态和增强膜的过氧化脂,并诱导氧化损伤组织,破坏生物体内的氧自由基平衡^[6]。在 Cd^{2+} 亚致死浓度下,河蟹(*Barytelphusa guerinii*)肝胰脏和鳃中的 SOD 活性始终呈上升趋势^[7],

收稿日期:2012-05-09

基金项目:国家自然科学基金(30960296);江西省教育厅科技项目(GJJ12024, GJJ10378);江西省科技攻关项目(2004)

作者简介:李 琰(1987—),男,安徽合肥人,硕士研究生,主要从事水生生物免疫与保护学研究。

* 通信作者:文春根 E-mail:cgwen@ncu.edu.cn

而长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*)肝胰脏中SOD、CAT和GPX活性均呈现出先升高后降低的趋势^[8]。Cd²⁺刺激*Bathymodiolus azoricus*后,总GPX的活性显著被抑制,但硒蛋白GPX的活性却没有变化^[9]。褶纹冠蚌(*Cristaria plicata*)是我国淡水育珠蚌之一,也是淡水底栖贝类的优势种群,具有较重要的经济价值。嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)感染褶纹冠蚌后,其抗氧化酶的活性发生了明显变化^[10]。为探寻重金属对褶纹冠蚌抗氧化酶的影响,本文利用重金属Cd²⁺刺激褶纹冠蚌,分析蚌体内抗氧化酶的变化,以期为淡水贝类抗氧化酶功能的研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

褶纹冠蚌于2010年5月采自鄱阳湖。选择壳长为(9.66±1.07)cm,壳高(6.58±0.85)cm的健康蚌,室温条件下,在水族箱中暂养一周,保持水体连续冲气,每日换水一次。将80只蚌随机分成3个试验组和1个对照组,每组20只,试验组暴露于浓度为0.5、1、2 mg·L⁻¹的镉溶液中,对照组在无镉离子水体中。

1.2 试剂

氯化镉(CdCl₂)购于上海展云化工有限公司。试剂盒均购于南京建成公司。

1.3 样品的制备和酶活力的测定

1.3.1 血清样品的制备

蚌在氯化镉溶液中暴露12、24、48、72、96 h,分别用5号针头的注射器从每只蚌闭壳肌取血1.5 mL,以3600 r·min⁻¹的转速低温(4℃)离心10 min,移出上清液,获得血清样品,置于-20℃冰箱中备用。

1.3.2 肝胰脏提取液的制备

取出适量的蚌肝胰脏,滤纸吸干水分后称重,加入无菌生理盐水于冰浴中匀浆,使浓度达到0.1 g·mL⁻¹,在4℃条件下,以3000 r·min⁻¹离心10 min,除去沉淀后获得蚌的肝胰脏组织提取液,并以其作为酶原液进行酶活性测定,置于-20℃冰箱中备用。

1.3.3 酶活力测定

超氧化物歧化酶(SOD)活力、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)活力、谷胱甘肽(GSH)含量、丙二醛(MDA)含量和过氧化氢(H₂O₂)的测定分别采用南京建成生物工程研究所的SOD测试盒、GSH-PX测试盒、GSH(除蛋白)测定试剂盒、MDA测定试剂盒和H₂O₂测定试剂盒测定。每次实验测定3次酶活,取均值进行数据处理。

1.3.4 可溶性蛋白质含量的测定

采用考马斯亮蓝法测定。取10 mL试管,吸取提取液30 μL,放入具刻度试管中,加入5 mL考马斯亮蓝G-250蛋白试剂和970 μL蒸馏水,充分混合,放置10 min后用1 cm光径比色杯在595 nm下比色,记录光密度OD₅₉₅,并通过标准曲线查得待测样品提取液中蛋白质的含量X(μg)。

1.4 数据处理

数据采用SPSS13.0软件处理,用平均值±标准差(M±SD)表示,实验组与对照组之间的差异用t-检验进行。

2 结果与分析

2.1 不同浓度镉对褶纹冠蚌SOD活力的影响

从图1可以看出,血清中SOD活力的总体变化趋势为先下降后上升。1.0、2.0 mg·L⁻¹浓度组中血清的SOD活力都是在处理后24 h时达到最低,在此之后有所上升,最终低于对照组水平;0.5 mg·L⁻¹组在处理后48 h时最低,之后呈上升趋势(图1A)。2.0 mg·L⁻¹组与对照组间存在显著性差异($P \leq 0.05$)。肝胰脏的SOD活力与血清的SOD活力变化趋势相反,除1.0 mg·L⁻¹浓度组外,其他2个浓度组都是先上升后下降,且都在48 h处达到峰值,之后SOD活力有所下降,但依然高于对照组SOD活力;1.0 mg·L⁻¹浓度组一直呈上升趋势,并在96 h处达到峰值(图1B)。3个浓度组都与对照组存在显著性差异($P \leq 0.05$)。

2.2 不同浓度镉对褶纹冠蚌GSH-PX活力的影响

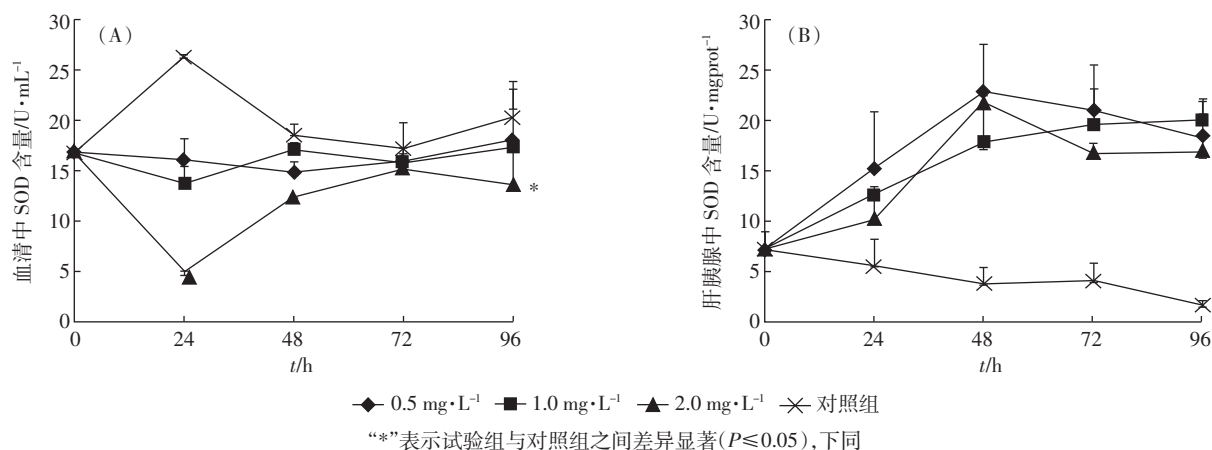
从图2可以看出,血清中GSH-PX活力总体体现出先下降后上升的趋势。3个浓度组中血清的GSH-PX活力都是在处理后24 h时达到最低;1.0 mg·L⁻¹组一直上升,而2.0 mg·L⁻¹组中血清的GSH-PX在48 h时达到峰值后一直保持稳定,0.5 mg·L⁻¹组在48 h时达到峰值之后一直下降(图2A)。3个浓度组与对照组间均不存在显著性差异($P > 0.05$)。肝胰脏的GSH-PX活力在2.0 mg·L⁻¹浓度组中没有明显变化,1.0 mg·L⁻¹浓度组在96 h时达到峰值;0.5 mg·L⁻¹浓度组呈先上升后下降趋势,并在48 h处达到峰值;3个浓度组GSH-PX活力均高于对照组GSH-PX活力(图2B);1.0 mg·L⁻¹和2.0 mg·L⁻¹浓度组与对照组间存在显著性差异($P \leq 0.05$)。

2.3 不同浓度镉对褶纹冠蚌H₂O₂含量的影响

从图3可以看出,血清中H₂O₂含量的变化趋势为先上升后下降,在处理后24 h时达到最高,并在此

后下降,最终低于对照组(图 3A);3 个浓度组与对照组间均无显著性差异($P>0.05$)。肝胰腺的 H_2O_2 含量

与血清的 H_2O_2 含量变化趋势相同,3 个浓度组都是先上升后下降,且在 24 h 处达到峰值,此后下降,并



“*” indicated significant differences between challenged group and control group ($P \leq 0.05$), the same below

图 1 不同浓度镉对褶纹冠蚌血清(A)和肝胰腺(B)中超氧化物歧化酶活力的影响

Figure 1 Effects of different concentrations of Cd on SOD activity in blood serum(panel A) and hepatopancreas(panel B) of *Cristaria plicata*

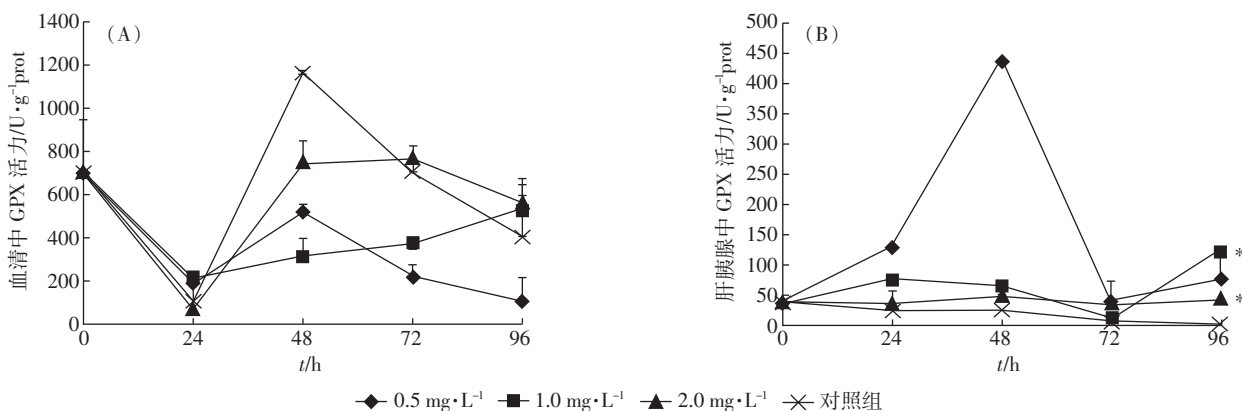


图 2 不同浓度镉对褶纹冠蚌血清(A)和肝胰腺(B)中 GSH-PX 活力的影响

Figure 2 Effects of different concentrations of Cd on GSH-PX activity in blood serum(panel A) and hepatopancreas(panel B) of *Cristaria plicata*

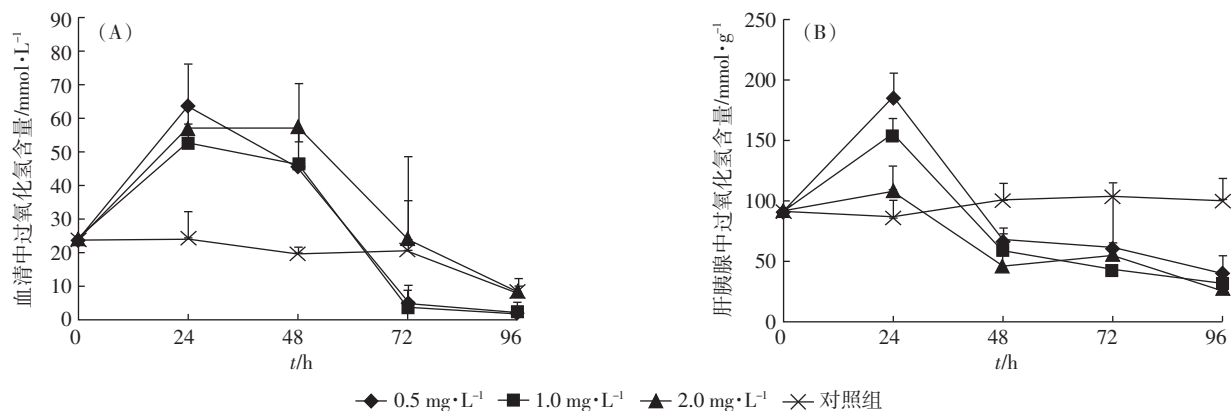


图 3 不同浓度镉对褶纹冠蚌血清(A)和肝胰腺(B)中 H_2O_2 含量的影响

Figure 3 Effects of different concentrations of Cd on the content of H_2O_2 in blood serum(panel A) and hepatopancreas(panel B) of *Cristaria plicata*

都在 48 h 时低于对照组(图 3B)。3 个浓度组与对照组间均不存在显著性差异($P>0.05$)。

2.4 不同浓度镉对褶纹冠蚌 GSH 含量的影响

从图 4 可以看出,血清中 GSH 含量的变化趋势均为先上升后下降,在处理 48 h 时达到峰值,之后下降至低于对照组水平(图 4A)。3 个浓度组与对照组间均存在显著性差异($P\leq 0.05$)。肝胰脏中的 GSH 含量变化趋势和血清中的相反,3 个浓度组都是先下降后上升,且在 48 h 处达到峰值,之后 GSH 含量下降(图 4B)。3 个浓度组与对照组间均不存在显著性差异($P>0.05$)。

2.5 不同浓度镉对褶纹冠蚌 MDA 含量的影响

从图 5 可以看出,血清中 MDA 含量的变化趋势为先下降后上升,在处理 24 h 时达到最低,之后上升,最后低于对照组水平(图 5A)。3 个浓度组与对照组间均不存在显著性差异($P>0.05$)。肝胰脏与血清中

MDA 含量的变化趋势相反,3 个浓度组都是先上升后下降,0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组都在 48 h 处达到峰值,2.0 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组在 24 h 时达到峰值,之后 MDA 含量下降,且一直高于对照组水平(图 5B)。3 个浓度组都与对照组存在显著性差异($P\leq 0.05$)。

3 讨论

SOD 是生物体内重要的保护性酶,它能够通过清除超氧阴离子自由基,避免细胞受到氧自由基的损害。无齿蚌(*Anodonta woodiana*)的肝脏在受到低浓度的 Pb^{2+} 胁迫后,SOD 活性表现为诱导作用;在受到中等浓度的 Pb^{2+} 胁迫后,SOD 的活性变化与对照组相似;在受到高浓度的 Pb^{2+} 胁迫后,SOD 的活性表现出一定的抑制作用^[11]。低浓度的 Cd^{2+} 处理使黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)的肝与肾等组织中的 SOD 活性均被显著诱导;但在高浓度的 Cd^{2+} 处理后,肾中的 SOD 被显

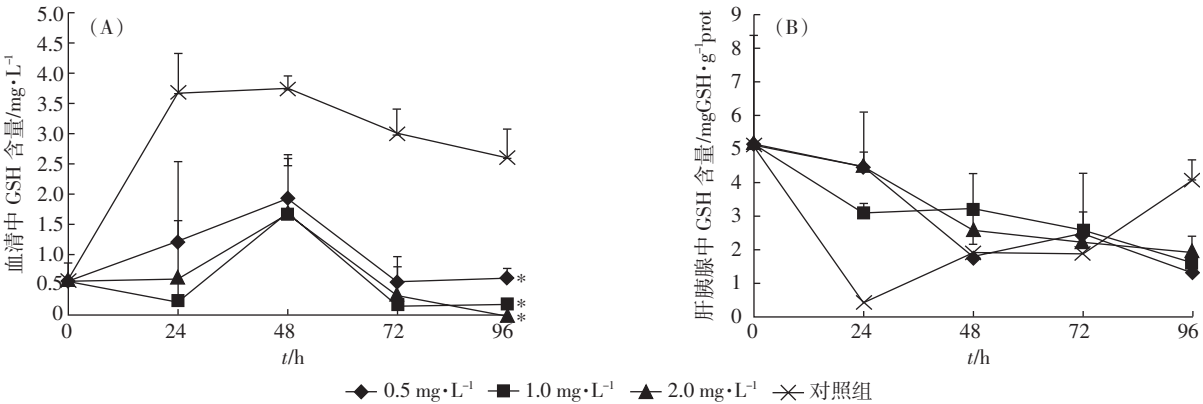


图 4 不同浓度镉对褶纹冠蚌血清(A)和肝胰脏(B)中 GSH 含量的影响

Figure 4 Effects of different concentrations of Cd on the content of GSH in blood serum(panel A) and hepatopancreas(panel B) of *Cristaria plicata*

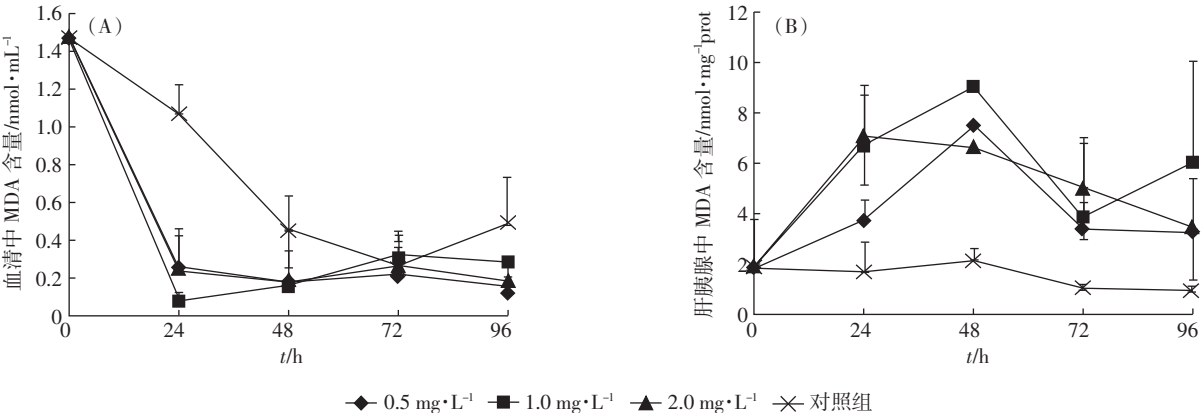


图 5 不同浓度镉对褶纹冠蚌血清(A)和肝胰脏(B)中 MDA 含量的影响

Figure 5 Effects of different concentrations of Cd on the content of MDA in blood serum(panel A) and hepatopancreas(panel B) of *Cristaria plicata*

著地诱导后又被抑制^[12]。褶纹冠蚌在 $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 处理后,肝胰脏 SOD 活性随着暴露时间的延长而升高;在暴露 96 h 后,肝胰脏 SOD 明显高于对照组,显示其被显著诱导;在 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 处理后,肝胰脏 SOD 活性暴露 48 h 被显著地诱导,其后开始回落,但是依然被显著地诱导。这说明褶纹冠蚌在镉的污染下,机体产生适应性诱导效应,SOD 的活性升高以清除氧自由基;但是如果暴露时间过长或浓度过大,则会出现中毒反应,使 SOD 活性降低。另外,褶纹冠蚌血清 SOD 活性除 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 浓度组外,其他浓度组的变化都不显著,而肝胰脏 SOD 活性都显著变化,这可能与肝胰脏是褶纹冠蚌体内最主要的解毒器官有关。

GSH-PX 是生物体内的重要抗氧化酶,它可以清除生物体内的过氧化氢及脂质过氧化物,它与 SOD 和 CAT 一起构成了生物体内的抗氧化酶防御体系。低浓度的 Cd^{2+} 处理太平洋牡蛎 (*Pacific oyster*) 后,GSH-PX 的表达量逐渐升高,呈现一定的毒物兴奋作用,而在高浓度的 Cd^{2+} 处理后,GSH-PX 的表达量则呈现出先升高再降低的趋势^[13]。菲律宾蛤蜊 (*Venerupis philippinarum*) 在受到高浓度的 Cd^{2+} 刺激后,血清中的 GPX 表达量也呈现先上升后下降的趋势^[14]。褶纹冠蚌经 Cd^{2+} 处理后,肝胰脏的 GPX 活性显著被诱导,呈现出一定的毒物兴奋效应。

生物体由于污染的暴露产生适应性诱导反应而使 GSH 含量升高,也可以由于污染的毒性作用产生中毒反应而使 GSH 含量降低^[15]。比萨茶蜗牛 (*Theba pisana*) 受到以 Cu^{2+} 为主要成分的农药刺激后,消化腺中的 GSH 的含量出现了明显的下降,并且刺激的 Cu^{2+} 浓度越高,GSH 含量下降的就越是明显^[16]。在受到 Cd^{2+} 的胁迫后,褶纹冠蚌血清中的 GSH 含量先显著上升,在 48 h 时达到峰值后显著下降,而肝胰脏中 GSH 随着污染暴露时间的延长而下降。表明褶纹冠蚌血清会产生适应性诱导效应,但是随着暴露时间的延长,出现中毒反应,而褶纹冠蚌肝胰脏则表现出一定的毒性效应。

H_2O_2 是一种化学性质比较活泼的活性氧,能够与细胞内的多种有机大分子反应,它的过量存在会严重损伤机体^[17]。太平洋牡蛎在经过低浓度的 Cd^{2+} 处理后,血淋巴中 H_2O_2 的含量随着时间的延长增长幅度不显著,而在高浓度的 Cd^{2+} 处理后,太平洋牡蛎血淋巴中 H_2O_2 的含量随着时间的延长而大量的增长^[13]。褶纹冠蚌在 Cd^{2+} 溶液中暴露后,血清和肝胰脏的 H_2O_2 均被诱导,显示出褶纹冠蚌抗氧化系统清除氧自由基

功能没有受到毒性作用的影响。

MDA 是一种高活性的脂质过氧化物,它能够交联多种生物大分子,从而破坏细胞的膜结构,所以 MDA 含量能反应机体受氧化损失的程度^[18]。小鼠受到 Cr^{6+} 的刺激后,肝脏中 MDA 的含量显著地升高^[19]。褶纹冠蚌在 Cd^{2+} 溶液中暴露后,肝胰脏中 MDA 含量明显升高,表明 Cd^{2+} 对蚌有一定的毒性作用,这可能与肝胰脏是主要的解毒器官有关。

4 结论

本研究发现,镉刺激褶纹冠蚌后,血清和肝胰脏的抗氧化因子都有明显的毒性效应。肝胰脏中 SOD 对镉刺激的响应比血清更敏感,血清中 GSH 对镉刺激的响应比肝胰脏敏感。褶纹冠蚌肝胰脏中 SOD 活性和血清中 GSH 含量可以用来指示生态环境中的镉污染。

参考文献:

- [1] 李媛伶,蓝 昕,司万童,等. 己烯雌酚对染镉草鱼 GSH-PX、SOD 和 MDA 影响的研究[J]. 农业环境科学学报. 2008, 27(1):350-353.
LI Ai-ling, LAN Xin, SI Wan-tong, et al. Effect of diethylstilbestrol on GSH-PX, SOD and MDA of grass carp exposed to cadmium [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2008, 27(1):350-353.
- [2] Pastor A, Medina J, DelRamo J, et al. Determination of lead in treated crayfish *Procambarus clarkii*: Accumulation in different tissues [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1988, 41(3):412-418.
- [3] Winston G W, Di Giulio R T. Prooxidant and antioxidant mechanism in aquatic organism[J]. *Aquatic Toxicology*, 1991, 24:143-152.
- [4] Chen L, Guo H Y, Shen H, et al. Effect of trace lead on the antioxidant system of fish liver[J]. *Environmental Chemistry*, 2002, 21(5):485-489.
- [5] Shore R F, Douben P E. The ecotoxicological significance of cadmium intake and residues in terrestrialsmall mammals[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1994, 29(1):101-112.
- [6] Stohs S J, Bagchi D, Hassoun E, et al. Oxidative mechanisms in the toxicity of chromium and cadmium ions[J]. *Environ Pathol Toxicol Oncol*, 2000, 19(3):201-213.
- [7] Venugopal N B R K, Ramesh T V D D, Reddy D S, et al. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini* [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1997, 59(1):132-138.
- [8] 闫 博,王 兰,李涌泉,等. 镉对长江华溪蟹肝胰脏抗氧化酶活力的影响[J]. 动物学报, 2007, 53(6):1121-1128.
YAN Bo, WANG Lan, LI Yong-quan, et al. Effects of cadmium on hepatopancreatic antioxidant enzyme activity in a freshwater crab *Sinopotamon yangtzensiense*[J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2007, 53(6):1121-1128.
- [9] Company R, Serafim A, Bebianno M J, et al. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in

- the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*[J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58(2-5):377-381.
- [10] 吴 丹, 李 琰, 文春根, 等. 嗜水气单胞菌感染后褶纹冠蚌抗氧化因子的变化[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 2011, 37(5): 531-536.
- WU Dan, LI Yan, WEN Chun-gen, et al. Changes in the levels of the antioxidant facors in *Cristaria plicata* infected with *Aeromonas hydrophila*[J]. *Journal of Hunan Agricultural University (Natural Sciences)*, 2011, 37(5):531-536.
- [11] 蔡 垚. 重金属铅对无齿蚌肝脏和肌肉超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 南京晓庄学院学报, 2009, 11(6):73-75.
- CAI Yao. Effect of plumbum on activities of superoxide dismutase in liver and muscle of the *Anodonta woodiana*[J]. *Journal of Nanjing Xiaozhuang University*, 2009, 11(6):73-75.
- [12] 汪美贞, 贾秀英, 董爱华, 等. 镉长期暴露对黑斑蛙的氧化胁迫和抗氧化能力的影响[J]. 生态学报, 2006, 26(6):1718-1724.
- WANG Mei-zhen, JIA Xiu-ying, DONG Ai-hua, et al. Effects of cadmium on oxidative stress and antioxidative abikity in the *Frog Rana nigromaculata* under a long-term exposure[J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2006, 26(6):1718-1724.
- [13] Pil Gue Jo, Yong Ki Choi, Cheol Young Choi. Cloning and mRNA expression of antioxidant enzymes in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* in response to cadmium exposure[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology and Pharmacology*, 2008, 147 (4):460-469.
- [14] Zhang LB, Liu XL, Chan LL, et al. Transcriptional regulation of seleni-um-dependent glutathione peroxidase from *Venerupis philippinarum* in response to pathogen and contaminants challenge [J]. *Fish and Shellfish Immunology*, 2011(31):831-837.
- [15] Stebbing AR. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. *Science of the Total Environment*, 1982, 22(3):213-234.
- [16] El-Gendy K S, Radwan M A, Gad A F. In vivo evaluation of oxidative stress biomarkers in the land snail, *Theba pisana* exposed to copper-based pesticides[J]. *Chemosphere*, 2009, 77(3):339-344.
- [17] 陈 瑗, 周 玫. 自由基医学[M]. 北京:人民军医出版社, 1991:18-19.
- CHEN Yuan, ZHOU Mei. Free radical medicine [M]. Beijing:People's Military Medical Press, 1991; 18-19.
- [18] Richard T Di Giulio, Peter C Washburn, Richard J Wenning, et al. Biochemical responses in aquatic animals: A review of determinants of oxidative stress[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, 8: 1103-1123.
- [19] Soudani Nejla, Ben Amara Ibtissem, Sefi Mediha, et al. Effects of selenium on chromium(VI)-induced hepatotoxicity in adult rats[J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2011, 63(6):41-548.