

Hg(II)、Pb(II)、Cd(II)对中华哲水蚤 总超氧化物歧化酶活性的影响

陈志鑫 朱丽岩* 周 浩 戚本金 刘 晨

(中国海洋大学海洋生命学院, 青岛 266003)

摘 要 采用体外亚致死毒性实验,研究了 3 种重金属离子 Hg(II)、Pb(II)、Cd(II)对中华哲水蚤 *Calanus sinicus* 总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性的影响。实验结果表明,随着 3 种重金属暴露时间的延长,中华哲水蚤 T-SOD 活性发生显著变化。Hg(II)浓度为 0.001 3~0.005 3 mg/L 时,T-SOD 的活性在 12 h 时达到最大;Pb(II)浓度为 0.468 0、0.936 0、1.872 0 mg/L 时,T-SOD 的活性分别在 36、24、12 h 时达到最大。Hg(II)和 Pb(II)对中华哲水蚤 T-SOD 活性的影响均表现为随着暴露时间的延长,呈先上升、后下降的变化趋势。Cd(II)对中华哲水蚤 T-SOD 活性影响呈先上升、后下降、再上升、再下降的变化趋势,12 h 时 3 个浓度组 T-SOD 值均达到最大。

关键词 中华哲水蚤 Hg(II) Pb(II) Cd(II) 总超氧化物歧化酶(T-SOD)

中图分类号 Q959.223+.38;X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2011)01-0099-05

Effect of heavy metals, Hg(II), Pb(II), and Cd(II) on the activity of total superoxide dismutase in *Calanus sinicus*

CHEN Zhi-xin ZHU Li-yan* ZHOU Hao QI Ben-jin LIU Chen

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Qingdao 266003)

ABSTRACT Research on the influence of heavy metals and other environmental pollutants on the antioxidant defense system has become one of the hotspots of ecological toxicology in recent years. Effects of three heavy metal ions, Hg(II), Pb(II), and Cd(II) on the activity of total superoxide dismutase (T-SOD) in the tissue of *Calanus sinicus* were examined through outside body sublethal toxicity testing. The results showed that the T-SOD activity changed markedly under prolonged exposure to these ions. The activity of T-SOD reached the maximum at 12 hours, when Hg(II) concentrations were 0.001 3~0.005 3 mg/L. When the concentrations of Pb(II) were 0.468 0, 0.936 0, and 1.872 0 mg/L, the activity of T-SOD reached the maximum at 36 h, 24 h, and 12 h, respectively. Effects of Hg(II) and Pb(II) on the SOD activity increased first and then decreased during the prolonged exposure. The activities of SOD underwent a course of increase-decrease-increase-decrease in the presence of Cd(II). At all the three concentrations of Cd(II), the activity of T-SOD reached the maximum at 12 hours.

山东省 908 专项(SD-908-01-01-05.06)资助

* 通讯作者。E-mail:lyzhu@ouc.edu.cn, Tel: (0532)82031922

收稿日期:2010-04-05;接受日期:2010-07-19

作者简介:陈志鑫(1985-),男,硕士,主要从事生态动力学和生态毒理学研究。E-mail:change_f3@126.com, Tel:15966852027

KEY WORDS *Calanus sinicus* Hg(II) Pb(II) Cd(II)
Total superoxide dismutase(T-SOD)

超氧化物歧化酶(SOD)是广泛存在于生物体内的抗氧化防御系统关键酶之一,在信号传递和神经存活等许多生物学事件中也具有重要作用(Nakao *et al.* 1995; Wang *et al.* 1996)。SOD能催化超氧阴离子自由基($O_2^{\cdot-}$)发生歧化反应,从而与过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)一起达到清除 O_2 、 H_2O_2 和 OH^- 等活性氧的作用,使机体免受氧化伤害。重金属离子的毒性作用会导致生物体内SOD活性的变化,SOD作为判断重金属对生物污染程度的一类敏感的生态毒理学指标,近年来在水生动物的毒理学研究中受到了人们的普遍重视(Xu *et al.* 1995;姚翠鸾等 2003;赵峰等 2008;余燕等 2009;郝林华等 2009)。桡足类作为次级生产力中的重要组成部分,在初级生产和更高营养级之间起着承上启下的重要作用,在海洋生态系统中占着很重要的位置。中华哲水蚤作为海洋桡足类中的关键种类,数量大、分布广,是我国近海及日本沿岸海域的浮游动物优势种之一,是中、上层经济鱼类的主要摄食对象及养殖鱼、虾类幼体的重要饵料,具有重要经济意义。目前,重金属毒性作用对海洋生物特别是水产养殖生物抗氧化酶影响的研究较多(徐立红等 1995;孙虎山等 2000;赵元凤等 2003;孙振兴等 2009),但对桡足类T-SOD的影响鲜见报道。本文用反应敏感、生态地位重要的中华哲水蚤作为研究对象,以T-SOD活性为指标,研究了在Hg(II)、Pb(II)、Cd(II)3种重金属离子的毒性作用下中华哲水蚤的抗氧化酶系统变化,以探讨重金属污染对中华哲水蚤的毒理效应及机制,为中华哲水蚤的环境毒理学研究积累资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

中华哲水蚤采集于山东青岛前海码头,使用浅水II型浮游生物网拖取,样品暂存于10 L塑料桶中,于1 h内返回实验室。用大口滴管挑取一批活泼、形态完整的中华哲水蚤成体, 10 ± 0.5 °C下驯化,光照周期为12 h L:12 h D,其间饲以三角褐指藻和青岛大扁藻。

1.1.2 实验用重金属与海水

实验用 $Pb(NO_3)_2$ 、 $HgCl_2$ 、 $CdSO_4 \cdot 8H_2O$ 均为国产分析纯,用双蒸水配制成一定质量浓度的母液,使用时用移液枪加入膜滤海水中稀释至所需质量浓度。实验用海水pH 7.8 ± 0.1 ,盐度 31.5 ± 0.1 。

1.2 实验方法

1.2.1 重金属暴露实验

1.2.1.1 急性毒性实验

经预实验,分别设定Hg(II)浓度为0、0.002 5、0.00 5、0.01、0.02、0.04 mg/L,Pb(II)浓度为0、1、2、4、8、16 mg/L,Cd(II)浓度为0、0.02、0.04、0.08、0.16、0.32 mg/L,每组各设3个平行,每个平行12只中华哲水蚤。实验期间每隔24 h换水50%,换水后添加重金属以保持设定的质量浓度,其他管理与驯化期间相同。

每隔24 h观察记录中华哲水蚤死亡情况,统计实验数据计算3种重金属对中华哲水蚤的96 h半致死浓度(96 h-LC₅₀),分别为Hg(II) 0.010 6 mg/L,Pb(II) 3.743 9 mg/L,Cd²⁺ 0.055 1 mg/L。

1.2.1.2 亚致死毒性实验

分别以上述LC₅₀值的1/8、1/4和1/2设定重金属暴露实验的质量浓度梯度(表1)。每个实验梯度均设双样平行,对照组不添加重金属离子。

各实验组和对照组分别用两个100 ml的烧杯,每个烧杯中放30只经驯化的健康中华哲水蚤成体。实验期间,每隔24 h换水50%,换水后添加重金属以保持设定的质量浓度,其他管理与驯化期间相同。

1.2.2 中华哲水蚤组织取样及匀浆制备

实验开始后的 12、24、36、48、72 h 从各实验组中随机取出两只成活的中华哲水蚤(平均湿重 0.3 mg),置于加入 10 倍体积生理盐水的 Eppendorf 管中,编号后 4 °C 保存备用。样品在冰浴条件下超声波破碎 10 min,3 000 r/min 离心 10 min,取上清液,制备成 1% 的组织匀浆用于蛋白含量和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性的测定。

1.2.3 总蛋白含量的测定方法

采用总蛋白含量测试盒在 96 孔酶标板中进行。反应原理:凡分子中含有两个氨基甲酰基(-CONH₂)的化合物都能与碱性酮溶液作用,形成紫色复合物,称为双缩脲反应。蛋白质分子中有许多肽键(-CONH-)都能起此反应,各种蛋白显色程度基本相同。

$$\text{计算公式: 蛋白含量(mg/ml)} = \frac{\text{测定管 OD 值} - \text{空白 OD 值}}{\text{标准管 OD 值} - \text{空白管 OD 值}} \times \text{蛋白标准浓度(mg/ml)}$$

1.2.4 总超氧化物歧化酶(T-SOD)的测定方法

采用黄嘌呤氧化酶法(羟胺法)SOD 测定试剂盒(南京建成生物工程研究所)测定。测定的原理:通过黄嘌呤及黄嘌呤氧化酶反应系统产生超氧阴离子自由基(O₂·-),后者氧化羟胺形成亚硝酸盐,在显色剂作用下呈现紫红色,测其 OD 值,当样品中有 SOD 时,则对超氧阴离子自由基有专一性的抑制作用,使形成的亚硝酸盐减少,比色时测定管的吸光值低于对照管的值,通过测定 O₂⁻ 被抑制的量来确定 SOD 值大小。

组织匀浆中 T-SOD 单位定义:每 mg 组织蛋白在 1 ml 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为 1 个 SOD 活力单位(U)。

$$\text{计算公式: 组织匀浆中 T-SOD 活力(U/mg prot)} = \frac{\text{对照孔光度} - \text{测定孔吸光度}}{\text{对照孔吸光度}} \div 50\% \times \frac{\text{反应总体积}}{\text{取样量}} \div \text{组织中蛋白含量(mg prot/ml)}$$

1.2.5 数据统计分析

采用 SPSS 13.0 软件对实验数据进行单因素方差分析(ANOVA),若差异显著,则采用 LSD 法作多重比较。

2 结果

2.1 Hg(II) 对中华哲水蚤组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力的影响

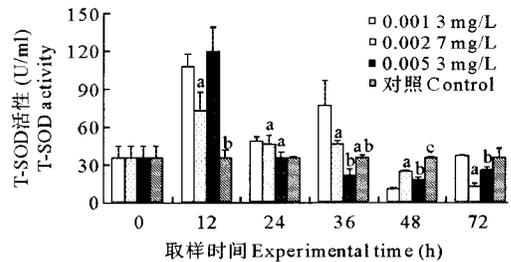
各浓度组 T-SOD 活力总体呈先上升、后下降的变化趋势(图 1),12 h 达到最大值;36 h 时低浓度组 [Hg(II) 浓度 0.001 3 mg/L] 骤然上升,显著高于对照组和其他浓度组(P<0.05)。实验期间各浓度组 T-SOD 活力与对照组相比差异显著(P<0.05)。

2.2 Pb(II) 对中华哲水蚤组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力的影响

如图 2 所示,各浓度组 T-SOD 活力总体呈先上升、后下降的变化趋势,其中高浓度组 [Pb(II) 浓度 1.872 0 mg/L] 在 12h 显著升高,达到 105.98 U/mg,随后迅速降低,72 h 时降至 11.46 U/mg,与中间浓度组 [Pb(II) 浓度 0.936 0 mg/L] 无显著差异。实验期间各浓度组 T-SOD 活力与对照组相比差异显著(P<0.05)。

表 1 实验设定的 Hg(II)、Pb(II)、Cd(II) 浓度
Table 1 Concentrations of Hg(II), Pb(II) and Cd(II) in the experiment

重金属离子 Heavy metal ion	质量浓度梯度 Concentration gradient (mg/L)			
	0	1/8	1/4	1/2
Hg(II)	0	0.001 3	0.002 7	0.005 3
Pb(II)	0	0.468 0	0.936 0	1.872 0
Cd(II)	0	0.006 9	0.013 8	0.027 6



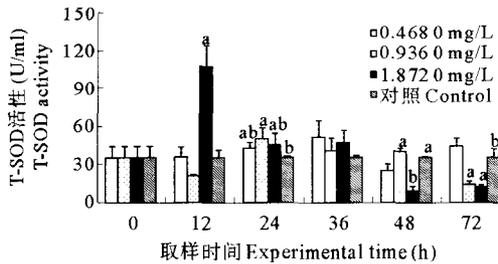
注:图 1 中字母标示不同者之间表示差异显著 (P<0.05)

Note: Different letters within each block indicate significant difference (P<0.05)

图 1 Hg(II) 对中华哲水蚤组织中 T-SOD 活力的影响
Fig. 1 Effect of Hg(II) on the activity of total superoxide dismutase in *C. sinicus*

2.3 Cd(II)对中华哲水蚤组织中总超氧化物歧化酶(T-SOD)活力的影响

各浓度组 T-SOD 活力呈先上升、后下降、再上升、再下降的变化趋势(图 3),中间浓度组[Cd(II)浓度 0.013 8 mg/L]在 12h 显著升高,达到 81.80 U/mg;3 个浓度组在 72 h 时无显著差异,与对照组相比差异显著($P < 0.05$),实验期间各浓度组 T-SOD 活力与对照组相比差异显著($P < 0.05$)。

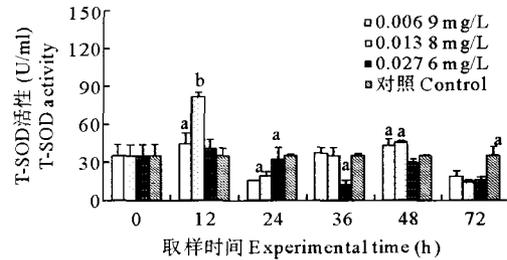


注:图 2 中字母标示不同者之间表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different letters within each block indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 2 Pb(II)对中华哲水蚤组织中 T-SOD 活力的影响

Fig. 2 Effect of Pb(II) on the activity of total superoxide dismutase in *C. sinicus*



注:图 3 中字母标示不同者之间表示差异显著($P < 0.05$)

Note: Different letters within each block indicate significant difference ($P < 0.05$)

图 3 Cd(II)对中华哲水蚤组织中 T-SOD 活力的影响

Fig. 3 Effect of Cd(II) on the activity of total superoxide dismutase in *C. sinicus*

3 讨论

从牛红血细胞中发现 SOD 以来(McCord *et al.*, 1969),SOD 的研究就成为了生物学的前沿课题之一。SOD 是一切需氧有机体清除自由基、保护机体免受其伤害的一种关键性酶,健康的生物体内环境中自由基的产生与消除处于动态平衡。各种重金属的性质及生物体对重金属的需求不同,它们对生物体的毒性作用方式及机制也不尽相同,但自由基代谢失衡引起组织细胞发生氧化损伤,是许多重金属产生毒性效应的一种共同机制。

低剂量毒性物质对生物所引起的刺激生长或诱导生理活性的现象,称为毒物兴奋效应(Murado *et al.*, 2007)。不同种类、浓度的重金属对各种水生动物的毒物兴奋效应有所差异。据报道,Cu(II)、Zn(II)、Cd(II)和 Pb(II)对鲫肝脏、鳃和肌肉组织中 SOD 活性的影响相似,随着重金属离子浓度的增加,SOD 活性整体上有先升高、后下降的趋势(刘亮等 2008)。凡纳滨对虾 *Litopenaeus vannamei* 的实验表明,Zn(II)(< 10 mg/L)、Cd(II)(< 0.25 mg/L)对凡纳滨对虾各组织器官 SOD 活力的影响随时间延长均呈现先升高、后下降的趋势(吴众望等 2005)。有研究认为,Pb(II)、Zn(II)诱导近江牡蛎 *Crassostrea rivularis* 鳃和消化腺组织 SOD 活性变化的剂量-效应均为抛物线型;Cu(II)对消化腺组织 SOD 活性诱导的剂量-效应呈抛物线型(江天久等 2006)。这些研究表明,重金属离子对机体组织的 SOD 活性一般表现为先诱导、后抑制的作用。

本实验中,Hg(II)和 Pb(II)对中华哲水蚤 SOD 活性的效应与上述研究结果相类似,在实验设计的浓度和时间范围内,中华哲水蚤对 Hg(II)、Pb(II)的毒性作用均表现出毒物兴奋效应,在 12 h 时达到最大值,中华哲水蚤 T-SOD 活性变化总体显示出先上升、后下降的趋势(图 1、图 2)。可以认为,重金属离子在短时间内使中华哲水蚤 T-SOD 活力受到刺激升高但未造成伤害,而后随着实验时间延长,高浓度组 T-SOD 活力受到抑制,从而使 SOD 活力下降,SOD 不能及时清除产生的自由基,造成活性氧伤害;低浓度重金属离子组 T-SOD 活力在短时间内受到刺激升高,最后与高浓度组一致,T-SOD 活力下降并受到抑制和伤害。

本实验中,Cd(II)对中华哲水蚤 T-SOD 活性影响呈先上升、后下降、再上升、再下降的变化趋势(图 3)。12h 时 T-SOD 活性上升,分析认为这与 Hg(II)、Pb(II)在 12 h 时 T-SOD 活性大幅升高的原因相同,为毒物兴奋效应。Cd 是生物体的非必需元素,对生物体的毒性作用机制较为复杂。有研究表明,在 Cd(II)等二价离子存在时,CuZn-SOD 中的 Zn 会被竞争性取代,形成新的 CuCd-SOD(Huang *et al.*, 2006),SOD 活性因酶蛋白分子结构和金属辅基及其配位结构的变化而不同程度地下降。另外,Cd(II)对诱导体内金属硫蛋白(Metallothionein, MT)合成具有高度专一性(孙虎山等 2000)。本实验中 Cd(II)暴露后期,中华哲水蚤的 T-SOD 活性上升,则可能与 Cd 诱导

MT 合成有关。随着暴露时间的持续, MT 的合成增加, 而 MT 的合成可促进与 Cd 的结合, 减少了游离 Cd 对 SOD 的抑制作用。同时, MT 自身又有清除自由基的作用, MT 的巯基是自由基结合的靶位点, 也间接地减少了自由基对 SOD 的抑制(金慧英等 1999), 在一定程度上缓解了 Cd(II) 的毒害作用。这很可能是后期(36、48 h) SOD 活性仍高于对照组的原因。这与莫桑比克罗非鱼 *Oreochromis mossambicus* 在 5 mg/L 的 Cd(II) 中持续暴露 7、15 d 时, 其肝脏和肾脏的 SOD 活性仍显著高于对照组的研究结果相类似(Basha *et al.*, 2003)。

表 2 实验用低浓度与海水水质标准(GB 3097-1997)的比较

Table 2 Comparison of the minimum concentrations of the ions used in the experiment with sea water quality standards

重金属 Heavy metal	本实验所用最低浓度 Minimum concentration (mg/L)	一类海水水质标准 First class sea water quality standard (mg/L)	二类海水水质标准 Second class sea water quality standard (mg/L)	三类海水水质标准 Third class sea water quality standard (mg/L)	四类海水水质标准 Fourth class sea water quality standard (mg/L)
Hg	0.001 3	0.000 05	0.000 2	0.000 5	N/A
Pb	0.486 0	0.001	0.005	0.010	0.050
Cd	0.006 9	0.001	0.005	0.010	N/A

Cd、Pb 和 Cu 3 种元素在海水中主要以二价态存在。如表 2 所示, 除 Pb 外, Hg 和 Cd 浓度在接近国家三类海水水质标准时, 对中华哲水蚤的 T-SOD 活性影响就很大, 表现出毒性作用。这表明中华哲水蚤作为我国近海浮游动物优势种和指示生物之一, 对重金属暴露非常敏感, 低浓度的 Hg、Cd 就会引起 SOD 活力大幅度变化, 这就为将 SOD 活性的变化作为水体污染监测指标提供了可能性。但是引起 SOD 活性变化的因素有很多, 如生理的、病理的因素等等, 而水体重金属污染只是其中之一, 所以将 SOD 活性变化作为污染监测指标的可行性还有待于进一步研究证实。另外, 重金属离子作用对中华哲水蚤过氧化氢酶(CAT)等其他关键酶的影响, 有待于进一步研究, 以期为重金属对桡足类的生态毒理学提供研究资料和数据。

参 考 文 献

- 孙虎山, 李光友. 2000. 栉孔扇贝血淋巴中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性及其性质的研究. 海洋与湖沼, 31(3): 259~265
- 孙振兴, 张梅珍, 徐炳庆, 刘 阳, 唐玉霞, 宋志乐. 2009. 重金属毒性对刺参幼参 SOD 活性的影响. 海洋科学, 33(2): 27~31
- 江天久, 牛 涛. 2006. 重金属 Cu, Pb 和 Zn 胁迫对近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*) SOD 活性影响研究. 生态环境, 15(2): 289~294
- 刘 亮, 董绪燕, 孙智达. 2008. Cu(II)、Zn(II)、Cd(II) 和 Pb(II) 对鲢体内超氧化物歧化酶活性的影响. 大连水产学院学报, 23(6): 462~465
- 吴众望, 潘鲁青, 张红霞. 2005. 重金属离子对凡纳滨对虾肝脏、鳃丝和血液 SOD 活力的影响. 应用生态学报, 16(10): 1 962~1 966
- 余 燕, 徐维娜, 刘兆普, 刘文斌. 2009. 低盐度胁迫对点带石斑鱼幼鱼消化酶、抗应激酶和存活率的影响. 渔业科学进展, 30(4): 21~26
- 金慧英, 李法脚, 李素芹, 谭维国, 陈华标. 1999. 金属硫蛋白对急性镉中毒后抗氧化酶的保护作用. 中国病理生理杂志, 15(7): 631~632
- 赵元凤, 吕景才, 李丹彤, 刘长发, 常亚青, 侯美艳. 2003. 海洋污染对毛蚶超氧化物歧化酶影响的研究. 海洋学报, 25(3): 77~82
- 郝林华, 孙丕喜, 王能飞, 沈继红. 2009. 南极冰藻 *Chlorophyceae* L4 抗氧化酶活性对温度升高的响应. 渔业科学进展, 30(3): 97~102
- 赵 峰, 庄 平, 章龙珍, 黄晓荣, 张 涛, 冯广朋. 2008. 施氏鲟不同组织抗氧化酶对水体盐度升高的响应. 海洋水产研究, 29(5): 65~69
- 姚翠鸾, 王维娜, 王安利. 2003. 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展. 海洋科学, 27(10): 18~21
- 徐立红, 张甬元, 陈宜瑜. 1995. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义. 水生生物学报, 19(2): 171~185
- Basha, P. S., and Rani, A. U. 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 56: 218~221
- Huang, Y. H., Shih, C. M., and Huang, C. J. 2006. Effects of cadmium on structure and enzymatic activity of Cu, Zn-SOD and oxidative status in neural cells. *J. Cell. Biochem.* 98: 577~589
- McCord, J. M., and Fridovich, I. 1969. Superoxide dismutase. *J. Biol. Chem.* 244(22): 6 094~6 095
- Murado, M. A., and Vazquez, J. A. 2007. The notion of hormesis and the dose-response theory: A unified approach. *J. Theor. Biol.* 244: 489~499
- Nakao, N., Frodl, E. M., and Widner, H. 1995. Overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase enhances survival of transplanted neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Nat. Med.* 1: 266~271
- Xu, L. H., Zhang, Y. Y., and Chen, Y. Y. 1995. The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 19(2): 171~185
- Wang, X., Culotta, V. C., and Klee, C. B. 1996. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature*, 383: 434~437