

文章编号: 1004-7271(2004)04-0289-04

急性镉中毒对大弹涂鱼 血细胞同工酶表达的影响

黄福勇, 李凌云, 竺俊全, 钱丽君, 张春丹, 陆孙杰

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳法研究了镉对大弹涂鱼血细胞的乳酸脱氢酶(LDH)、过氧化物酶(POD)和超氧化物歧化酶(SOD)表达的影响。结果表明,在急性中毒条件下,和空白对照组相比,25、50和75mg/L三个处理组均有特异性酶带出现,各种酶活性也有显著变化。探讨了急性镉中毒对大弹涂鱼血细胞同工酶表达的影响,以及大弹涂鱼血细胞的同工酶标记用做海洋环境生态毒理学指标的可行性。

关键词: 镉;大弹涂鱼;血细胞;同工酶;生态毒理学指标

中图分类号: X171.5 S917 文献标识码: A

Influence of cadmium on the expression of isozymes in blood cells of *Boleophthalmus pectinirostris* in the situation of acute toxicosis

HUANG Fu-yong, LI Ming-yun, ZHU Jun-quan, QIAN Li-jun, ZHANG Chun-dan, LU Sun-jie
(Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: By method of polyarylamide gel electrophoresis, effect of cadmium on the patterns of three isozymes (LDH, POD and SOD) in blood cells of *Boleophthalmus pectinirostris* was revealed for the first time. The results showed that all the three concentration groups indicate differential patterns of the LDH, POD and SOD isozymes in the situation of acute toxicosis. And the activities of three isozymes showed significant variety. The influence of cadmium on the expression of isozymes in blood cells of *Boleophthalmus pectinirostris* and the feasibility of using isozymes markers as marine ecotoxicology indicators were discussed.

Key words: cadmium; *Boleophthalmus pectinirostris*; blood cells; isozymes; ecotoxicology indicators

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)隶属于鲈形目、鰕虎鱼亚目、弹涂鱼科、大弹涂鱼属。大弹涂鱼为沿岸暖水两栖鱼类,广泛分布于我国的浙江、江苏、福建、广东以及台湾沿海等地,具有食物链短、易于养活等特点^[1],且体内生理学多项指标对环境污染敏感^[2-4],可以用于海洋环境监测,尤其在近岸养殖水体环境监测方面能够起到重要作用。镉是一种蓄积性元素,对动物可以造成直接中毒和潜在中毒,研究资料表明,海洋环境中重金属镉污染具有逐渐加大的趋势^[5]。本工作就镉对大弹涂鱼血液同工酶表达的影响进行了研究,以探讨应用大弹涂鱼血液同工酶表达作为生态毒理学标记监测海洋环境污染的可行性。

收稿日期: 2004-05-09

作者简介: 黄福勇(1977-),男,山东菏泽人,硕士研究生,专业方向为海洋生态毒理学。

通讯作者: 李凌云(1942-),男,教授,从事水产动物遗传育种学研究。E-mail: limingyun@nhpu.net.cn

1 材料与方法

1.1 实验材料

采用野生大弹涂鱼,捕自浙江宁波镇海沿海,体长 10.8~13.5cm,体重 8.4~11.8g。大弹涂鱼暂养 10d 后进行急性中毒实验。试验在 40cm×30cm×15cm 的塑料箱内进行,分四组,一个对照组,三个处理组。将氯化镉($\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$)分析纯配成 Cd^{2+} 浓度为 25、50 和 75mg/L 的三个浓度级,每天换水一次,水温保持 $20 \pm 2^\circ\text{C}$,pH7.73,盐度为 17.65~18.30,各箱不间断充气,每组放 10 尾大弹涂鱼,试验期间不投饵。待最高浓度组大弹涂鱼死亡达 50%(约处理后 45h)时中止实验,取样。离心管内装 8U/mL 的肝素钠 1mL,断尾取血法取血,每个试验组取 5 条鱼,装入离心管,摇匀,8000r/min 离心 20min,将下沉血细胞置研钵加重蒸水 600 μL ,4 $^\circ\text{C}$ 冰浴匀浆,移入离心管,14 000r/min 离心 15min,取上清液,按 2:1 的比例加入 40%甘油和 0.1%溴酚蓝指示剂,用于电泳分析。

1.2 电泳、染色

同工酶电泳采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳法,分离胶浓度为 6.7%,浓缩胶浓度为 2.5%,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸,IG,pH=8.3;采用 DYY-2C 型稳压稳流电泳仪,DY CZ-24D 型垂直板电泳槽,均产自北京六一仪器厂,用 25 μL 微量进样器点样,每孔点样量为 15 μL ,点样后将电泳槽移至 4 $^\circ\text{C}$ 冰箱中进行电泳。电泳时,指示剂在浓缩胶内时用 150V 电压,当指示剂完全进入分离胶后,将电压升高到 180V,总电泳时间约 4h。

凝胶的制备参照文献 [6],凝胶染色参照文献 [7,8]。

1.3 结果记录与酶谱分析

凝胶用 7%醋酸溶液脱色固定后,利用 FR 复日紫外/可见光分析生物凝胶成像系统观察、拍照,对凝胶测量后按酶带迁移率手工记录。各位点命名以各酶谱的相对 R_f 迁移率由小到大依次命名,即向阳极运动的酶谱带开始依次命名为 1,2,3,……, $R_f = 1/L$,1 为阴极端至各谱带中点的距离, L 为阴极端至指示剂终点的距离。

2 结果

2.1 乳酸脱氢酶(LDH,E.C. 1.1.1.27)

急性镉中毒大弹涂鱼血细胞乳酸脱氢酶表达的电泳图谱如图 1 所示,对照组大弹涂鱼表现为两条酶带,LDH-1 和 LDH-2 活性均较弱,在 25mg/L、50 mg/L 组和 70 mg/L 组(以下分别简称为低浓度组、中浓度组和高浓度组),LDH-1 消失,LDH-2 活性逐渐增强。

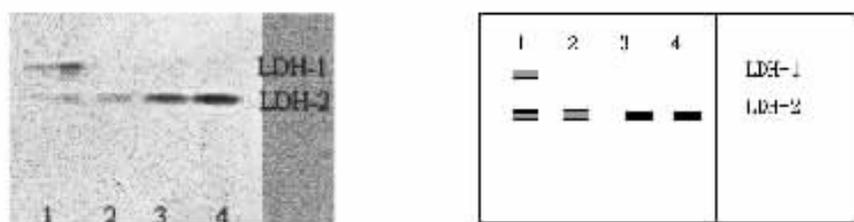


图 1 急性镉中毒大弹涂鱼血细胞乳酸脱氢酶表达的电泳图谱

Fig.1 Patterns of the influence of cadmium on the expression of LDH isozyme in blood cells of

B. pectinirostris in the situation of acute toxicosis

注:1. 对照组;2. 25mg/L 组;3. 50mg/L 组;4. 75mg/L 组

2.2 过氧化物酶(POD, E.C. 1.11.1.7)

急性镉中毒大弹涂鱼血细胞过氧化物酶表达的电泳图谱如图 2 所示,在对照组中,只表达 POD-1 一条酶带,且只能检测到微弱活性,而在低浓度组无法检测到 POD 同工酶,说明酶浓度低于检出值;在中浓度组,检测到 POD-1 和 POD-2 两条酶带;在高浓度组,能同时检测到两条酶带,且两条酶带均为超显性表达。

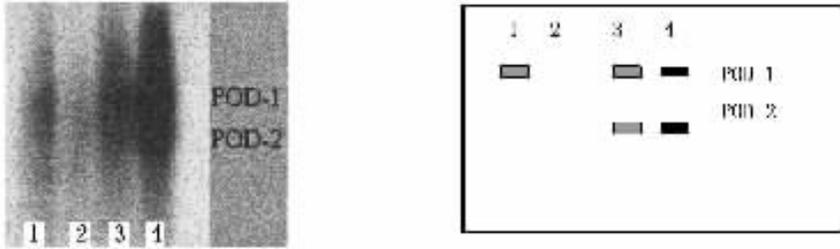


图 2 急性镉中毒大弹涂鱼血细胞过氧化物酶表达的电泳图谱

Fig.2 Patterns of the influence of cadmium on the expression of POD isozyme in blood cells of *B. pectinirostris* in the situation of acute toxicosis

注:1. 对照组 2. 25mg/L 组;3. 50mg/L 组 4. 75mg/L 组

2.3 超氧化物歧化酶(SOD, E.C. 1.15.1.1)

急性镉中毒大弹涂鱼血细胞超氧化物歧化酶表达的电泳图谱如图 3 所示,在对照组中,血细胞 SOD 同工酶表现为 SOD-1、SOD-2 和 SOD-3 三条酶带,活性均较弱,在低浓度组, SOD-1 不表达,活性表现更低,在中浓度组只有 SOD-3 一条酶带,但酶活性显著增强;在高浓度组,又同时表达 SOD-1、SOD-2 和 SOD-3 三条酶带,且三条酶带活性均显著增强。

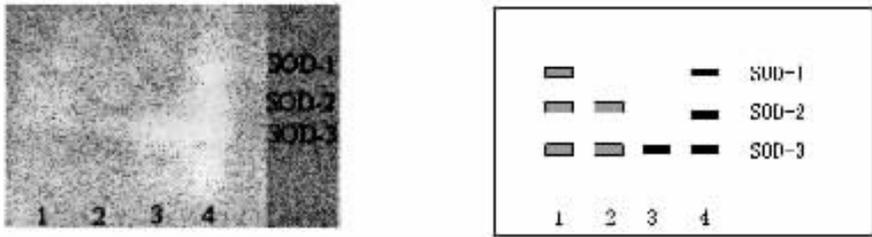


图 3 急性镉中毒大弹涂鱼血细胞超氧化物歧化酶表达的电泳图谱

Fig.3 Patterns of the influence of cadmium on the expression of SOD isozyme in blood cells of *B. pectinirostris* in the situation of acute toxicosis

注:1. 对照组 2. 25mg/L 组;3. 50mg/L 组 4. 75mg/L 组

3 讨论

3.1 对大弹涂鱼血细胞同工酶表达的影响

鱼类在镉中毒后,重金属镉能诱发鱼类外周血细胞产生微核^[9,10],会迅速表现出对血细胞的损伤作用,使红细胞数量急剧变化,进而造成鱼类的缺铁性贫血^[11]。当用不同浓度的镉对大弹涂鱼进行相同时间的急性中毒处理后,三个处理组的同工酶酶带显示出显著不同。

LDH 酶是糖酵解的关键酶,酶活性变化直接影响血液通过糖酵解对能量的获得。大弹涂鱼血细胞在急性镉中毒后,LDH-1 完全丧失活性,但 LDH-2 活性增强,POD 酶能利用 H_2O_2 氧化供氢体,它对 H_2O_2 要求专一而对供氢体要求广泛,能够反映生物体产生和消除自由基的能力以及细胞代谢的强度^[12],对

对照组大弹涂鱼的血细胞中只有 POD-1 同工酶的微弱表达,在低浓度组,POD 酶活性消失,但在中、高浓度组,血液同时有 POD-1 和 POD-2 的超显性表达;SOD 是生物体防御氧化损伤的重要酶类,它能催化 O_2^{-2} 发生歧化反应,生成 H_2O_2 和 $O_2^{[12]}$,急性镉中毒对大弹涂鱼血细胞的 SOD 同工酶表达的影响也和 POD 同工酶表达相似。在对照组中,上述同工酶的活性均较弱,表明在正常情况下,组织细胞内的 LDH、POD 和 SOD 酶只有少量释放在血液中,在低浓度处理组,大弹涂鱼上述同工酶的表达均显著减弱或消失,而在中、高浓度组,上述三种同工酶活性大幅度增强,酶谱也更加复杂,可能是因为在较高浓度毒物处理的情况下,机体内部组织已经丧失了有效的调节能力,发生病变导致细胞膜通透性增加,细胞内部的 LDH、POD 和 SOD 同工酶开始大量释放进血液。这与赵维信等研究镉对罗氏沼虾组织转氨酶活性及组织结构的影响的结果相一致^[14]。

3.2 大弹涂鱼血细胞同工酶标记作为生态毒理学指标

在生态毒理学研究中,经常采用酶活力等作为生态毒理学指标^[15],它们能够对环境中的污染物产生灵敏变化,但是在实际环境污染监测时,如果根据酶活力值的变化来推断环境污染物存在与否,仍然缺乏一个通用的标准,而且温度、pH 值等自然因素也会对酶活力值产生明显影响^[16,17]。相比之下,如果用同工酶技术指示的一些具有特异性的酶带来定性地指示环境中的污染物,从方法上来说更加简单有效。如在本试验中,当大弹涂鱼急性镉中毒时,血细胞的 LDH-1 酶带消失;POD 酶谱先是 POD-1 消失,在中、高浓度组又会多出 POD-2 和 POD-3 酶带;SOD 酶带先是 SOD-1 消失,在中浓度组 SOD-1 和 SOD-2 消失,在高浓度组虽然同时存在三条酶带,但均是超显性表达,和对照组相比,仍然表现出显著差异。因此,应用同工酶标记作为生态毒理学指标监测环境污染,具有深入研究的价值。另一方面,动物的同工酶酶谱也随着个体发育产生变化^[18],在患病状态下,酶谱也会产生变化^[19,20],在实际应用时必须考虑到这些因素的干扰作用。本试验是在 Cd^{2+} 浓度较高的条件下完成的,在水体中 Cd^{2+} 浓度较低时,是否同工酶酶谱仍然显示显著变化或者出现特异性酶带,值得我们深入研究。

参考文献:

- [1] 金春华,钟爱华,张海琪,等. 大弹涂鱼不同组织器官的同工酶研究[J]. 海洋科学, 2004, 28(3): 117-122.
- [2] 冯涛,郑微云,洪万树,等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化防御系统影响的初步研究[J]. 海洋科学, 2000, 24(5): 27-30.
- [3] 冯涛,郑微云,洪万树,等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏芳烃羟化酶活性的影响[J]. 水产学报, 2001, 25(2): 156-160.
- [4] 冯涛,郑微云,洪万树,等. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化酶活性影响的初步研究[J]. 应用生态学报, 2001, 12(3): 422-424.
- [5] 贺广凯,黄渤海沿岸经济贝类体中重金属残留量水平[J]. 中国环境科学, 1996, 16(2): 96-100.
- [6] 周宗汉,林金榜,朱婉华. 介绍鱼类组织中蛋白质及同工酶的电泳方法[J]. 淡水渔业, 1983, (2): 35-40.
- [7] 相建海. 海洋动物细胞和种群生化遗传学[M]. 济南: 山东科学技术出版社, 1999. 70-80.
- [8] 王中仁. 植物等位酶分析[M]. 北京: 科学技术出版社, 1996. 140-163.
- [9] 余文斌,李谷,王学会. 镉对几种淡水鱼类外周血红细胞微核率的影响[J]. 湖北农学院学报, 2000, 20(4): 354-357.
- [10] Hooftman R N, Raat W K. Induction of nuclear anomalies (micronuclei) in the peripheral blood erythrocytes of the eastern mudminnow *Umbra pygmaea* by ethyl methanesulphonate[J]. Mutation Research, 1982, 104: 147-152.
- [11] 丁磊,蔡春芳,吴萍,等. 镉对鲫鱼血红蛋白的影响[J]. 水利渔业, 2002, 22(3): 10-11.
- [12] 罗曼,蒋立科,刘颖,等. 野生与养殖长吻鮠血液及不同器官同工酶的比较[J]. 应用与环境生物学报, 2000, 6(5): 447-451.
- [13] 方允中,李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 111-133.
- [14] 赵维信,魏华,贾江,等. 镉对罗氏沼虾组织转氨酶活性及组织结构的影响[J]. 水产学报, 1995, 19(1): 21-27.
- [15] Hayashi M, Ueda T, Uyeno K, et al. Development of genotoxicity assay systems that use aquatic organism[J]. Mutation Research, 1998, 399: 125-133.
- [16] 宋林生,季延宾,蔡中华,等. 温度骤升对中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)几种免疫化学指标的影响[J]. 海洋与湖沼, 2004, 35(1): 74-77.
- [17] 马广智,唐玫,徐军. 低 pH 对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 中国水产科学, 2001, 8(1): 23-25.
- [18] 李纯厚,钟振如,陈敏. 斑节对虾个体发育早期的同工酶变化[J]. 水产学报, 1994, 18(1): 62-64.
- [19] 曹伯平,陈昌福,纪国良. 草鱼病理学研究. III. 草鱼出血病苹果酸脱氢酶(MDH)同工酶相对活性的变化[J]. 中山大学学报(自然科学版), 1995, 34(1): 76-81.
- [20] 黄灿华,陈隼华. 中国对虾病虾体内同工酶表型变化的初步研究[J]. 中国水产科学, 1999, 1(1): 45-49.