

Cd²⁺ 对缙蛭谷胱甘肽硫 转移酶、磷酸酶活性的影响

陆慧贤 徐永健*

(宁波大学海洋学院 应用海洋生物技术教育部重点实验室, 315211)

摘 要 通过重金属暴露法,研究了不同质量浓度 Cd²⁺ (0.005、0.025、0.05、0.1 mg/L) 在 168 h 内对缙蛭消化腺和鳃组织谷胱甘肽硫转移酶(GST)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)活性的影响。结果显示, Cd²⁺ 对两种组织 GST 活性均有激活作用,且高浓度比低浓度更易快速诱导其活性,但在暴露的后期(>96 h),两个较高浓度组(0.05、0.1 mg/L) GST 活性均出现下降;两种组织的 ACP 活性(鳃组织 0.005 mg/L 组除外)在暴露的 6h 即被显著诱导,并表现出剂效关系,但高浓度组更快达到峰值后就持续下降,于暴露中后期(>72 h)被不同程度抑制;消化腺(0.005 mg/L 浓度组除外)和鳃 AKP 活性在暴露 168 h 内均表现出“抑制-诱导-抑制”的规律,并且较高浓度组活性反而比低浓度组更易被激活,各组 AKP 活性被诱导达到最高值后就持续下降直至被再次抑制。Cd²⁺ 在低浓度水平下即能引起缙蛭两种组织的 GST、ACP、AKP 活性变化,表明 Cd²⁺ 的胁迫可对缙蛭机体的解毒体系和新陈代谢产生影响。

关键词 Cd²⁺ 缙蛭 谷胱甘肽硫转移酶 磷酸酶

中图分类号 S968.3 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)02-0119-06

Impact of Cd²⁺ on glutathione S-transferase and phosphatase activity in *Sinonovacula constricta*

LU Hui-xian XU Yong-jian*

(Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education,
School of Marine Sciences, Ningbo University, 315211)

ABSTRACT Effect of waterborne Cd²⁺ at different concentrations (0.005mg/L, 0.025mg/L, 0.05mg/L, and 0.1mg/L) on activities of glutathione S-transferase (GST), acid phosphatase(ACP) and alkaline phosphatase (AKP) in digestive glands and gills of *Sinonovacula constricta* were studied. It was found that the GST activity in the two tissues was stimulated by Cd²⁺ during the exposure time in all treatments, however, those in higher-dose treatments (0.05 mg/L, 0.1 mg/L) decreased with the prolonged exposure. The activation of ACP by Cd²⁺ in the two tissues began at the 6h time-point, and the activity increased with the increasing concentration of Cd²⁺. For ACP activity, the higher-dose group reached the peak value earlier

国家科技支撑计划(2009BADB7B02)和浙江省自然科学基金项目(Y3110476)共同资助

* 通讯作者。E-mail: xuyongjian@nbu.edu.cn

收稿日期: 2012-03-28; 接受日期: 2012-04-17

作者简介: 陆慧贤(1987-), 女, 硕士研究生, 主要从事海洋生态学研究。E-mail: luhuixian35@163.com, Tel: 15869365602

than the lower-dose group, and was inhibited after 72h. Except 0.005mg/L dose-treatment in digestive glands, the AKP activities in the two tissues showed a “decrease-increase-decrease” trend during the 168h exposure time in the experiment, and those in higher-dose treatments were stimulated earlier than those in lower ones. AKP activity in each treatment decreased constantly after reaching the peak value respectively. The fluctuations in GST, ACP, and AKP activities in the experiment indicated that exposure to lower concentrations of Cd^{2+} could have affected the metabolism and detoxification system of the organism.

KEY WORDS Cd^{2+} *Sinonovacula constricta* Glutathione S-transferase
Phosphatase

探索可以反映低浓度污染物对生物早期影响的参数,是水域生态毒理学研究的重要内容。酶可以作为指示性标记来反映污染物的影响(徐立红等 1995)。酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)广泛存在于动植物及微生物体内,参与机体的各种代谢过程,如分子渗透性、细胞分化和发育,同时也是动植物体内解毒体系的重要组成部分。因此,它们可以作为被污染物污染致毒的生物指示剂(Cajaraville *et al.* 2000)。目前国内外已经开展了一些以磷酸酶为参数探讨重金属对生物体的影响(蒋云霞等 2010; Rajalakshmi *et al.* 2005; Tsvetkov *et al.* 2003)。谷胱甘肽硫转移酶(GST)是解毒系统第二阶段的解毒酶,对污染物敏感,其活性的高低能很好地表示污染程度,而且活性较稳定,在评价重金属对水生生物造成的毒性效应时同样得到广泛应用(张春丹等 2006; Moreira *et al.* 2005; Tang *et al.* 1996)。

缢蛏 *Sinonovacula constricta* (Lamarck) 俗称蛏子,广泛分布于我国四个海区,是重要的经济贝类之一。但随着养殖面积和养殖容量的不断扩大,水域生态环境日趋恶化,养殖水体极有可能受到重金属的污染,缢蛏受到重金属(包括 Cd)的胁迫的可能性充分存在。而目前关于重金属对缢蛏的毒理学研究主要集中在急性毒性方面,涉及 Cd 对缢蛏生理生化效应的研究鲜有报道。因此,本研究以与污染物直接接触的鳃和具有解毒功能的消化腺作为靶器官,以 GST、ACP、AKP 3 种酶为生物指标,通过研究水环境的 Cd^{2+} 对其活性影响的变化,探讨 Cd^{2+} 对缢蛏的致毒机制及可能的解毒途径,同时为海洋重金属的污染监测及其风险评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

$\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,国药集团化学试剂有限公司);GST、ACP、AKP 酶试剂盒,考马斯亮蓝总蛋白试剂盒,标准蛋白(南京建成生物工程研究所);冷冻离心机(Thermo Fish Scientific,德国),匀浆机、漩涡混合器(IKA,德国),722 可见分光光度计(上海菁华科技仪器有限公司),数控恒温浴锅(上海申胜生物技术有限公司)。

1.2 实验生物及饲养

实验缢蛏于 2009 年 7 月采自浙江宁波象山海域,为 1 龄个体,平均体长 5.85 ± 0.29 cm,平均体重(湿重) 10.95 ± 1.10 g,挑选个体完好的饲养于 $48 \text{ cm} \times 36 \text{ cm} \times 30 \text{ cm}$ 的塑料水族箱中,每个箱子放 30 个缢蛏,盛 8 L 海水。实验海水是宁波近海经砂滤后的自然海水,水温 $18 \pm 2^\circ\text{C}$,pH 7.96 ± 0.1 ,盐度 26.5 ± 0.3 。用增氧机 24h 连续充氧,海水中的溶氧达 6.35 mg/L 以上。每天定时换一次海水,在每次换水前 30 min 投喂 100 ml 的扁藻(扁藻细胞数为 $1.2 \times 10^5 \text{ cell/ml}$)。暂养 7d 后,挑选生长良好、有活力的个体开始实验。

1.3 染毒及样品处理

实验 Cd^{2+} 的暴露浓度参照国家海水第二类水质标准(GB 3097-1997, Cd^{2+} 浓度 $\leq 0.005 \text{ mg/L}$),并依其 1、

5、10、20 倍设 4 个浓度梯度: 0.005、0.025、0.05、0.1 mg/L, 另设一个未添加 Cd 的空白对照组(实验海水 Cd²⁺ 的本底值为 0.08 μg/L, 石墨炉原子吸收法检测)。每个处理及对照设置 3 个重复。实验期间除了每次换水时应向海水中分别加入相对应的重金属剂量, 以保持水体中重金属浓度恒定外, 缢蛏的养殖条件及管理与暂养期间完全相同。实验期间, 未出现缢蛏死亡现象。实验开始后, 于 6、12、24、36、48、72、96、120、144、168 h 取样, 每个平行各取两只, 即每组分别取 6 只。

用纯水将缢蛏表面冲洗 2~3 遍, 后置於冰盘中, 快速解剖, 取出消化腺和鳃组织, 并用冷生理盐水冲洗干净, 于滤纸上吸干, 随后置于 2 ml 离心管内, 液氮速冻后移入 -70℃ 以下超低温冰箱中保存, 并在 30 d 内完成酶活性测定。

1.4 GST、ACP、AKP 活力的测定

将组织从超低温冰箱中取出, 置冰上解冻。由于缢蛏的消化腺和鳃组织较小, 因此将平行样中两只缢蛏的消化腺和鳃进行合并, 然后准确称取组织质量, 匀浆, 离心取上清液。GST、ACP、AKP 活力以及总蛋白含量的测定步骤均严格按照试剂盒上的说明书进行操作。

GST 活性单位定义: 每毫克组织蛋白, 在 37℃ 反应 1 min 扣除非酶促反应, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位(U/mg prot)。ACP 活性单位定义: 每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用 30 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位(U/g prot)。AKP 活性单位定义: 每克组织蛋白在 37℃ 与基质作用 15 min 产生 1 mg 酚为 1 个活力单位(U/g prot)。

1.5 数据统计

实验数据用平均值±标准误差表示, 应用 SPSS 17.0 软件进行统计分析。采用单因素方差分析法(One-Way ANOVA), 应用 LSD 法分析暴露组与对照组之间的统计学差异, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著, 并应用 Excel 2003 进行作图。

2 结果

2.1 Cd²⁺ 对缢蛏消化腺和鳃组织 GST 活性的影响

由图 1A 和图 1B 看出, 在 168 h 暴露时间内, 4 个剂量组消化腺和鳃组织 GST 活性均出现不同程度的诱导。高浓度组相较于低浓度组其 GST 活性更易被激活。其中 0.05、0.1 mg/L 浓度组酶活性在暴露的前 24 h 均开始显著上升($P < 0.05$), 被持续诱导一段时间后开始出现下降, 至暴露的 168 h, 除消化腺 0.05 mg/L 浓度组降至对照组水平($P > 0.05$)外, 其余均被极显著抑制($P < 0.01$)。两种组织 0.005、0.025 mg/L 浓度组在暴露的前期酶活性变化不显著($P > 0.05$), 但于暴露的中后期(>96 h)被显著激活($P < 0.05$), 至暴露的 168 h 均极显著高于对照组($P < 0.01$)。

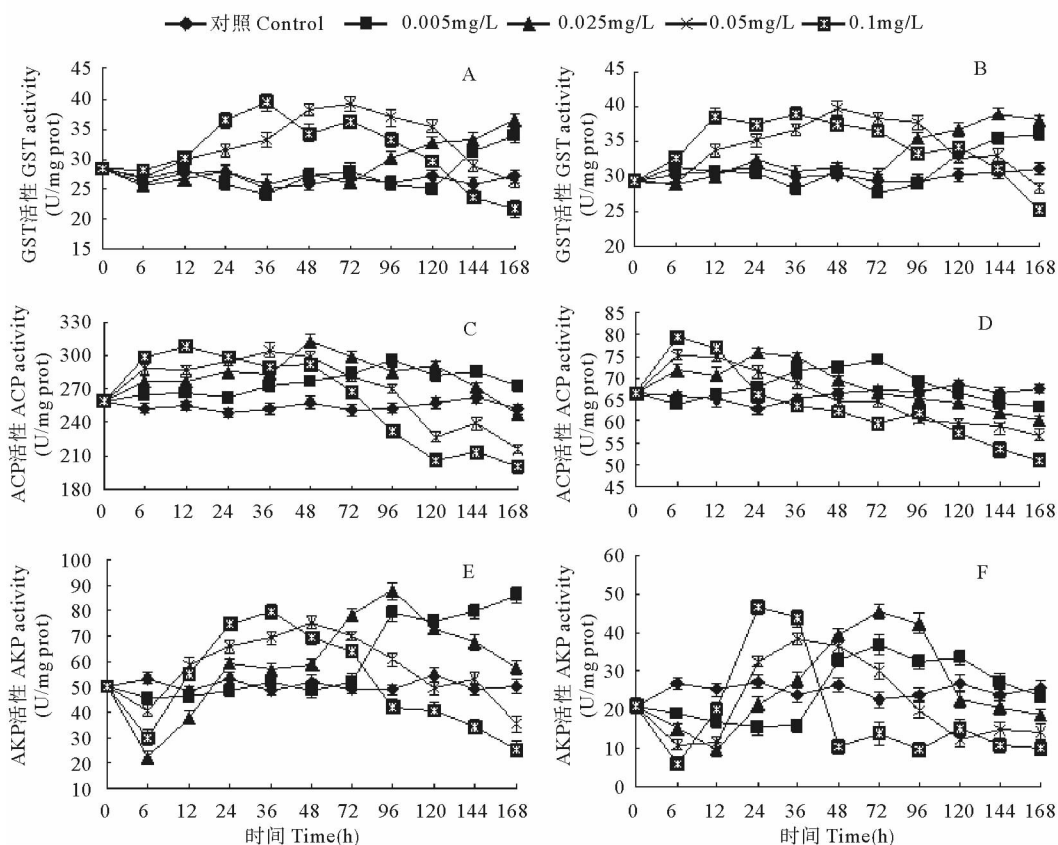
2.2 Cd²⁺ 对缢蛏消化腺和鳃组织 ACP 活性影响

由图 1C 和图 1D 可见, 在 Cd²⁺ 的作用下, 4 个剂量组消化腺和鳃组织 ACP 活性在 168 h 暴露时间内均表现出先升高后降低的变化趋势。在暴露的 6 h, 除鳃组织 0.005 mg/L 浓度组外, 两种组织各处理组 ACP 活性即被显著或极显著激活, 且激活程度与 Cd²⁺ 浓度呈正相关。之后, 高浓度组比低浓度组更快达到峰值后就持续下降, 至暴露的 168 h, 除消化腺 0.005 mg/L 浓度组 ACP 活性仍显著高于对照组($P < 0.05$)外, 其余各处理组酶活性均被极显著抑制($P < 0.01$)。

2.3 Cd²⁺ 对缢蛏消化腺和鳃 AKP 活性影响

由图 1E 和图 1F 所示, 在 Cd²⁺ 暴露的 168 h 时间内, 4 个处理组消化腺(除 0.005 mg/L 浓度组)和鳃组织 AKP 活性均表现出“抑制-诱导-抑制”的规律。在暴露的 6 h, 消化腺 0.005 mg/L 浓度组 AKP 活性略低于对

对照组($P>0.05$),其余3个剂量组酶活性则显著或极显著低于对照组;鳃组织4个剂量组酶活性的抑制程度则表现出了剂量效应关系。之后,各处理组酶活性开始上升,较高浓度组活性比低浓度组更快达到最高值后就持续下降。至暴露的168h,鳃组织4个处理组酶活性均被显著或极显著抑制;消化腺组织0.05、0.1mg/L浓度组 AKP 活性分别被显著($P<0.05$)和极显著($P<0.01$)抑制,0.025mg/L 浓度组酶活性已降至对照组水平($P>0.05$),而0.005mg/L 浓度组活性则处于极显著诱导状态($P<0.01$)。



A、C、E 分别表示消化腺组织 GST、ACP、AKP 的活性;B、D、F 分别表示鳃组织 GST、ACP、AKP 的活性

A, C and E represent the activity of GST, ACP and AKP of digestive glands, respectively;

B, D and F represent the activity of GST, ACP and AKP of gills, respectively

图1 Cd^{2+} 对缙蛭消化腺和鳃组织 GST、ACP 和 AKP 活性的影响

Fig. 1 The activities of three antioxidant enzymes (GST, ACP and AKP) in digestive glands and gills of *S. constricta* exposed to Cd^{2+} for 168h

3 讨论

GST 是生物体解毒系统第二阶段的代谢酶,它主要催化 GSH 与各种内源性和外源性亲电子物质结合,生成无毒或毒性小的 GSH 硫结合物,产生易排出体外的水溶性化合物(Andersson *et al.* 1992),从而起到脱毒作用。本研究显示,受 Cd^{2+} 胁迫的 168 h 内,缙蛭各处理组消化腺和鳃组织的 GST 活性均出现不同程度的诱导,并表现出诱导速度与暴露剂量成正比的关系。GST 活性升高可以促进 GSH 与污染物结合,有利于生物体解毒,是生物体对化学胁迫的适应性反应(Gadagjui *et al.* 2000)。另外,GST 具有不依赖 Se 的 GSH-Px 的功能,Pickett 等(1989)同样强调脂质过氧化物为该酶天生的酶作用物。本研究中,结合暴露实验下缙蛭两种组织抗氧化酶(SOD、CAT、GSH-Px)活性的变化(陆慧贤等 2011),发现在各处理组的抗氧化酶被显著诱导时,GST 活性并没有明显上升;而当抗氧化酶活性下降到一定程度或被抑制时,GST 出现激活的状态。作者认

为,这种补偿型的机制可以在一定程度上缓解由于抗氧化酶活力下降而对机体产生的潜在危害,尤其在缙蛭鳃组织中,被诱导的 GST 可以替代活性被抑制的 GSH-Px 来清除氧化胁迫下机体所产生的过氧化物。但是随着暴露时间的延长,两种组织中两个较高浓度组的 GST 活性均出现下降甚至被抑制,造成 GST 活性下降的原因一方面可能是作为底物的 GSH 被大量消耗(刘娜等 2008);另一方面可能是体内过多积累的活性氧造成了细胞损伤,导致酶合成受到影响;再者可能与 Cd²⁺ 抑制了 GST 基因的表达有关(Shumilla *et al.* 1998)。

ACP 是一类酸性水解酶,主要定位于细胞的溶酶体中,它在生物体磷酸基团的转移和代谢过程中发挥着重要作用,同时参与机体的免疫反应,是生物体重要的解毒体系(孙静秋等 2007)。牟海津等(1999)认为,ACP 是一种“保护性”的体液因子,其活性可被外源物质所诱导。本研究发现,实验期间除鳃组织最低浓度组(0.005 mg/L) ACP 活性于暴露的 24 h 被显著诱导外,两种组织其余各处理组的 ACP 活性在暴露的 6 h 即被显著或极显著激活,并表现出剂效关系。ACP 活性的升高说明缙蛭抗应激水平提升,是免疫能力增强的表现之一,俞亚东等(2009)认为,这可能是重金属离子刺激机体产生更多溶酶体来及时消除细胞中的异物。但是这种诱导并不持续,随着暴露时间的延长,各处理组下两种组织中的 ACP 活性均出现下降,其原因一方面可能与 Cd²⁺ 直接作用于酶分子有关,因为许多体外实验证明 Cd²⁺ 能直接抑制该酶的活性(杨立红等 2008; 陆珊等 2007; Mazorra *et al.* 2002),另一方面可能是因为 Cd²⁺ 诱导产生的活性氧对细胞产生了损伤,间接引起酶活性的降低。ACP 活性的下降暗示 Cd²⁺ 可对缙蛭的免疫功能产生一定程度的干扰,表现了对其毒性作用。另外在本研究中,通过对比图 1C 和图 1D,发现缙蛭鳃组织 ACP 活性要远远低于消化腺,并且受诱导的时间较消化腺短,出现这种差异可能与鳃作为主要的呼吸器官不具备相应的解毒功能有关。

AKP 是一种含 Zn 和 Mg 的金属酶,主要定位于细胞膜上(孙静秋等 2007),它在碱性条件下催化磷酸单酯水解,并参与生物体核酸、蛋白质以及脂类等物质的代谢,同时作为软体动物溶酶体酶的重要组成部分,在机体免疫反应中发挥作用,是生物体重要的解毒体系(陈竞春等 1996; 周永灿等 1997)。本实验结果显示,在 Cd²⁺ 暴露的 168 h 内,缙蛭消化腺(除最低浓度组外)和鳃组织的 AKP 活性均呈现出“抑制-诱导-抑制”的规律,类似于 Jing 等(2006)研究合浦珠母贝 *Pinctada fucata* 在 Cu²⁺ 胁迫下其消化腺和鳃组织 AKP 活性所呈现出的变化。AKP 活性在暴露初期被抑制,可能是因为 Cd²⁺ 直接取代 AKP 活性中心的 Zn²⁺ (Renella *et al.* 2003),改变了酶分子的结构,从而导致其活性的下降。但同时,不断进入的 Cd²⁺ 刺激了机体启动相应的应激保护,AKP 反而被大量诱导合成,酶活性上升,甚至显著或极显著高于对照组。Alti 等(2007)在研究 Cd²⁺ 对尼罗罗非鱼 *Oreochromis niloticus* AKP 活性影响时同样发现在暴露 14d 后低浓度 Cd 可诱导其肝脏和肠组织 AKP 活性。AKP 活性的诱导暗示机体对外界干扰的抵抗力提高,从而间接增强机体的非特异性免疫能力,另外,俞亚东等(2009)分析认为,AKP 活性的增高表明细胞内膜合成活动加强,有利于细胞将溶酶体消化后的残余物质通过分泌小泡向外运输。但是随着暴露时间的延长,Cd²⁺ 的胁迫已经超过了机体的适应能力,因而表现出酶活性又再次下降直至被抑制,而其在暴露后期出现这种不可恢复的抑制,暗示了 Cd²⁺ 可对缙蛭正常的代谢及其免疫功能产生一定的干扰。本研究中,消化腺组织最低浓度组(0.005 mg/L) AKP 活性在暴露的 168 h 虽然仍极显著高于对照组,但根据其他处理组酶活性变化情况可以推测出,随着暴露时间的继续延长,其活性可能会出现下降。

由以上结果及分析表明,在 Cd²⁺ 胁迫下,缙蛭两种组织的 GST、ACP、AKP 活性均表现出动态的变化。3 种酶活性的诱导表明机体发挥解毒/免疫能力的增强,而在后期的抑制则说明长时间的 Cd²⁺ 胁迫可对缙蛭的新陈代谢、解毒体系产生负面的影响。

参 考 文 献

- 刘娜, 闫博, 李涌泉, 王茜, 王兰. 2008. Cd²⁺ 对长江华溪蟹谷胱甘肽系统的影响. 环境科学, 29(8): 2302-2307
- 牟海津, 江晓路, 刘树青, 管华诗. 1999. 免疫多糖对带孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活力的影响. 青岛海洋大学学报, 29(3): 463-468
- 孙静秋, 许燕, 张慧慧, 叶军强. 2007. 凡纳滨对虾体内 ACP、AKP 酶的细胞化学定位. 复旦学报(自然科学版), 46(6): 947-951
- 杨立红, 孙振兴, 王晓洁, 冯培勇, 王莹莹. 2008. 刺参酸性磷酸酯酶的分离纯化及部分性质研究. 食品科学, 29(10): 440-443

- 陆 珊, 胡 源, 苏 波, 刘 鑫, 李 佳, 刘克武. 2007. 几种金属离子对麦芽酸性磷酸酶活性及构象的影响. 化学研究与应用, 19(4): 386-389
- 张春丹, 黄福勇, 李明月, 陆孙杰, 竺俊全, 邬 勇. 2006. 镉胁迫条件下大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)外周血微核标记及肝脏过氧化物酶标记的变化. 海洋与湖沼, 37(1): 7-13
- 陈竞春, 石安静. 1996. 贝类免疫生物学研究概况. 水生生物学报, 20(1): 74-78
- 陆慧贤, 徐永健. 2011. 镉胁迫下缢蛏(*Sinonovacula constricta*)抗氧化酶活性及 DNA 损伤的研究. 海洋环境科学, 30(1): 96-101
- 周永灿, 潘金培. 1997. 贝类细胞和体液的防御机制研究进展. 水产学报, 21(4): 449-454
- 俞亚东. 2009. Cu^{2+} 对罗氏沼虾几种同工酶的影响. 见: 上海师范大学硕士研究生学位论文
- 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
- 蒋云霞, 徐 华, 艾春香. 2010. 铬胁迫对拟穴青蟹体内磷酸酶活性的影响. 厦门大学学报(自然科学版), 49(4): 574-578
- Andersson T, Forlin L. 1992. Regulation of the cytochrome P450 enzyme system in fish. Aquat Toxicol 24: 1-20
- Atli G, Canli M. 2007. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*. Comp Biochem Physiol 145(2): 282-287
- Cajaraville MP, Bebianno MJ, Blasco J and 3 others. 2000. The use of biomarkers to assess the impact of pollution in coastal environments of the Iberian Peninsula: a practical approach. Sci Total Environ 247(2-3): 295-311
- Gadagbui B KM, James MO. 2000. Activities of affinity-isolated glutathione S-transferase (GST) from channel catfish whole intestine. Aquat Toxicol 49(1-2): 27-37
- Jing G, Li Y, Xie L, Zhang R. 2006. Metal accumulation and enzyme activities in gills and digestive gland of pearl oyster (*Pinctada fucata*) exposed to copper. Comp Biochem Physiol 144(2): 184-190
- Mazorra MT, Rubio JA, Blasco J. 2002. Acid and alkaline phosphatase activities in the clam *Scrobicularia plana*: kinetic characteristics and effects of heavy metals. Comp. Biochem. Physiol 131(2): 241-249
- Moreira SM, Guilhermino L. 2005. The use of *Mytilus galloprovincialis* acetylcholinesterase and glutathione S-transferase activities as biomarkers of environmental contamination along the northwest Portuguese coast. Environ Monit Assess 105(1-3): 309-325
- Pickett CB, Lu AY. 1989. Glutathione transferases: gene structure, regulation and biological function. Ann Rev Biochem 58: 743-764
- Rajalakshmi S, Mohandas A. 2005. Copper-induced changes in tissue enzyme activity in a freshwater mussel. Ecotoxicol Environ Saf 62(1): 140-143
- Renella G, Ortigoza ALR, Landi L, Nannipieri P. 2003. Additive effects of copper and zinc on cadmium toxicity on phosphatase activities and ATP content of soil as estimated by the ecological dose (ED50). Soil Biol Biochem 35(9): 1203-1210
- Shumilla J, Wetterhahan K, Barchowsky A. 1998. Inhibition of NF- κ B binding to DNA by chromium, cadmium, mercury, zinc and arsenite in vitro: evidence of a thiol mechanism. Arch Biochem Biophys 349(2): 356-362
- Tang SS, Lin CC, Chang GG. 1996. Metal-catalyzed oxidation and cleavage of octopus glutathione transferase by the Cu(II)-ascorbate system. Free Radic Biol Med 21(7): 955-964
- Tsvetkov IL, Popo AP, Konichev AS. 2003. Acid phosphatase complex from the freshwater snail *Viviparus viviparus* L. under standard conditions and intoxication by cadmium ions. Biochemistry 68(12): 1327-1334