

# 镉对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 抗氧化酶活性的影响\*

刘晓玲 周忠良 陈立侨\*\*

(华东师范大学生命科学学院 上海 200062)

**摘要** 将中华绒螯蟹(河蟹 *Eriocheir sinensis*)浸泡在 2.0 mg/L 氯化镉( $\text{CdCl}_2$ )溶液中,分别于第 0、6、12、24、48、72、96 小时提取河蟹的肝胰腺,测定抗氧化酶:超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GPx)的活性,探讨了镉( $\text{Cd}^{2+}$ )对河蟹肝胰腺抗氧化酶活性的影响。结果显示,在低浓度  $\text{Cd}^{2+}$  环境下,河蟹肝胰腺的抗氧化酶活性随时间发生规律性变化。暴露于  $\text{Cd}^{2+}$  后,河蟹肝胰腺 SOD 活性降低,随着时间的延长,在暴露 72 h 后,SOD 活性恢复并超过未染毒时 22.3%。表明  $\text{Cd}^{2+}$  中毒导致细胞内氧自由基大量积累从而诱导酶活性升高;CAT 活性先下降后增高,随后减少,最后以低于对照的水平趋于平衡;肝胰腺中 GPx 酶活性的变化规律与 SOD 相似,在解除氧自由基毒性方面有一定的协调性。实验表明河蟹抗氧化系统酶对  $\text{Cd}^{2+}$  很敏感。而酶活性在短时间内的变化规律可以为镉对河蟹早期的毒性研究提供参考。

**关键词** 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*), 镉, 超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶, 谷胱甘肽过氧化物酶

中图分类号 Q55 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)08-0059-05

环境中的重金属镉( $\text{Cd}^{2+}$ )等无机污染物超过一定的生物耐受浓度就会对生物体内生理生化方面产生毒性影响,可以导致细胞 DNA 结构变化以及细胞膜结构和功能的改变<sup>[1,2]</sup>,诱发哺乳动物器官发生癌变。水体中的重金属离子超过一定的浓度同样会导致水生动物中毒,影响水生动物正常的生理生化活动,严重的甚至导致死亡<sup>[3]</sup>。对鱼类和哺乳动物的研究表明,镉可以改变超氧化物歧化酶(SOD),过氧化氢酶(CAT)及谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)等抗氧化酶的活性,降低细胞对自由基及其产物的清除能力<sup>[4,5]</sup>。关于镉对鱼类及哺乳动物的毒理影响已经有相当广泛和深入的研究,但在甲壳动物方面的研究报道较少。蟹类栖息于水底,受环境中重金属污染的机会较大<sup>[6]</sup>。研究表明,蟹类对水体或底质中的重金属有富集作用<sup>[7]</sup>。中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*),俗称河蟹,是一类淡水养殖甲壳动物,具有重要的经济价值,已知环境中高浓度的镉离子会影响河蟹鳃组织,导致线粒体破裂<sup>[8]</sup>。但当环境中的镉离子尚未达到最低致死浓度而以较低浓度形式存在时,对河蟹生理生化影响的研究甚少<sup>[9]</sup>。本文报道了作者对河蟹在低浓度镉致毒后肝胰腺抗氧化酶活性变化的研究结果,以期为防止河蟹中毒的金属毒理学研究和养殖水环境的保护提供

基础资料。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

$\text{CdCl}_2$ (A.R.)为上海试剂厂产品。酶测定试剂盒购于南京建成生物公司。河蟹取自上海市崇明农贸市场,选择附肢完整、大小基本一致的蟹(质量 20 g 左右)用于试验。

### 1.2 实验条件

试验蟹驯养于华东师范大学生物系水生动物饲养实验室中,驯养时间为一周,试验用水为曝气后的城市自来水, pH7.4, 自然水温,间歇充气,溶解氧为 6.2~6.8 mg/L,每天换水 1/3。

\* 教育部跨世纪优秀人才基金资助项目。

第一作者:刘晓玲,出生于 1976 年,硕士,现为烟台大学生化系教师。E-mail: liuxiaoling@sohu.com

\*\* 通讯作者, E-mail: lqchen@bio.ecnu.edu.cn

收稿日期:2003-03-27;修回日期:2003-06-25

### 1.3 预实验

设试验组(分别浸泡在 0.5 mg/L、2.0 mg/L、5.0 mg/L 浓度 Cd 溶液中)和对照组, 每组设平行, 各 20 只蟹。分别在实验开始后的第 0、6、12、24、48、72、96 小时测定河蟹肝胰腺 SOD 酶活性。以期测定镉对河蟹抗氧化酶活性的影响确定合适的镉浓度。

### 1.4 染毒

分为实验组(浸泡在 2.0 mg/L Cd<sup>2+</sup> 溶液中)和对照组, 分养于 0.72 m × 0.50 m × 0.37 m 的玻璃缸中, 各设二个平行组。每天换水 1/3。

### 1.5 样品的制备

实验开始后分别在第 0、6、12、24、48、72、96 小时取样, 每次取河蟹 3~5 只, 蒸馏水冲洗后取肝胰腺。各组样品用预冷的生理盐水冲洗后, 以洁净的吸水纸吸去表面水分, 称取 0.2 g 组织, 加 9 倍体积预冷的 0.86% 生理盐水, 冰浴匀浆后经冷冻高速离心机离心 (4 °C, 12 000 g, 10 min) 取上清粗酶液待测。

### 1.6 检测方法

SOD 酶活力用南京建成生物公司试剂盒进行测定, 采用黄嘌呤氧化酶法测酶活性。每毫克组织蛋白在 1mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位。CAT 活力测定采用紫外分光光度分析法 (UV—method) 测定<sup>[10]</sup>。GPx 活性测定用南京建成生物公司试剂盒进行测定, 具体操作按试剂盒中的说明书进行。规定每毫克蛋白质, 每分钟扣除非酶反应的作用, 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 μmol/L 为一个酶活力单位。

## 2 实验结果

### 2.1 实验浓度的选择

预实验结果如图 1 所示。

研究表明, 镉与肝胰腺 SOD 酶活性之间存在明显的剂量-效应与时间-效应。不同浓度的镉对河蟹肝胰腺 SOD 酶活性的影响不同, 镉浓度越高, 酶活性变化越快, 变化幅度越明显。5.0 mg/L 实验组在实验开始 6 h 酶活性检测显示已升高到 134.17%, 说明 5.0 mg/L 的剂量在 6 h 内大量诱导了河蟹体内自由基的产生, 6 h 内发生了酶活性下降并应激回升的变化, 而 0.5 mg/L 剂量作用下, SOD 酶活性在前 48 h 变化不明显。不能很好反应酶活性的变化规律。2.0 mg/L 浸泡下的河蟹肝胰腺 SOD 酶活性变化规律最明显, 故确定浸泡检测镉对河蟹抗氧化酶系统的影响实验所用泡镉浓度为 2.0 mg/L, 与 Bhagyalakshmi 在研究镉对岩礁锯齿蟹代谢酶活性的影响时采用的镉浓度为 2.5 mg/L 相近<sup>[11]</sup>。

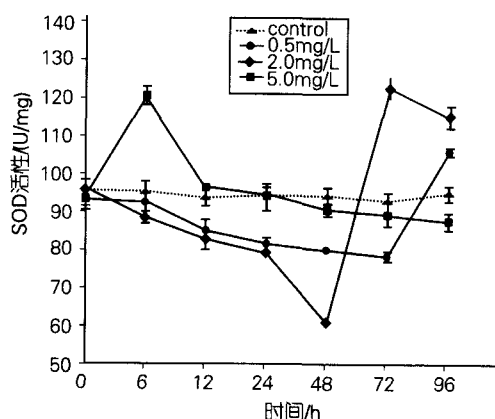


图 1 不同浓度镉对河蟹 SOD 酶活性的影响  
Fig.1 The SOD activity in hepatopancreas of different Cd levels on the crabs

### 2.2 SOD 的活性变化

河蟹暴露于 2 mg/L Cd<sup>2+</sup> 溶液后, 肝胰腺的 SOD 酶活性开始降低(图 2), 第 48 小时酶活性下降到最低点, 比开始时降低了 77.78%。在此之后的 24 h 内, 酶活性回升, 第 72 小时酶活性比开始时还高了 22.3%。以后酶活性回归, 至第 96 小时, 活性基本与开始时接近。

实验结果中 SOD 变化规律与预实验相同, 但预实验中 SOD 活性较低, 并且浸泡镉溶液后酶活性下降幅度较实验时小, 这可能是由于预实验时环境温度较低, 河蟹体内生理代谢相对不旺盛造成的。

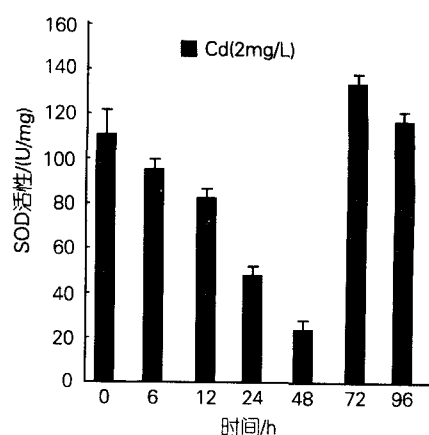


图 2 镉中毒后肝胰腺 SOD 酶活性变化  
Fig.2 Effect on the SOD activity in the crabs after Cd immersion

### 2.3 CAT 活性变化

肝胰腺中的 CAT 活力在镉染毒后最初的 24 h 内降低了 64.93%,第 24 小时降低到最低点。随着时间的延长又开始回升,48 h 之后又继续下降(图 3)最后一直保持在较低的水平。

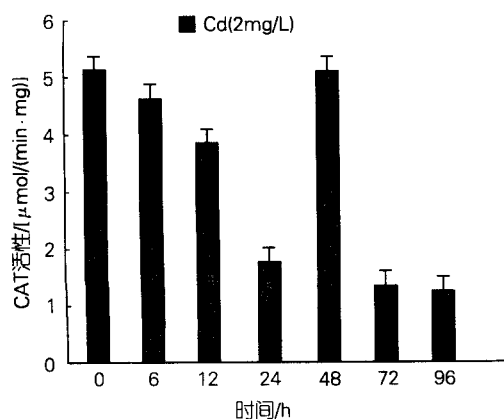


图 3 镉中毒后河蟹肝胰腺 CAT 酶活性  
Fig.3 Effect on the hepatopancreas CAT activity in the crabs after Cd immersion

### 2.4 GPx 的活性变化

GPx 活性在染毒后 24 h 内降低了 58.97%,第 24 小时为最低点。维持一段时间后活性回升,至第 72 小时达到最高,为开始时的 165.33%,此后,回归至与开始时接近的状态(图 4)。

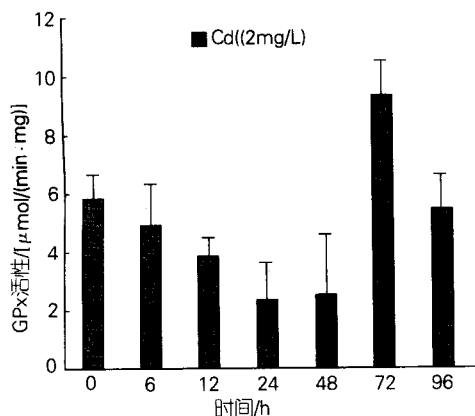


图 4 镉中毒后河蟹肝胰腺 GPx 酶活性  
Fig.4 Effect on the hepatopancreas GPx activity in the crabs after Cd immersion

## 3 讨论

需氧生物细胞内有一套抗氧化的防御系统,主要包括超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶(Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase, GPx)等。这个系统的酶类可以因体内自由基化合物数量的增加而被诱导合成。其中, SOD 可以迅速地将有害的氧自由基转化为过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)或过氧化物, CAT 将 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 转化成 H<sub>2</sub>O 和 O<sub>2</sub>, GPx 则分解过氧化氢和过氧化物。这个系统在一定范围内保护细胞免受自由基的伤害。

有观点认为动物的重金属中毒效应主要体现在自由基介导的氧化损伤<sup>[12-14]</sup>。一方面,镉通过多种途径在体内诱发产生大量的自由基代谢物、活性氧。另一方面,镉也可以作用于细胞的抗氧化酶系统,降低细胞对氧自由基的清除能力。通过两方面的作用使体内产生大量氧自由基。而自由基及其反应产物往往可以通过夺氢、氧化巯基、破坏碳链等反应而使包括 DNA 在内的各种生物大分子结构和性质发生改变,进而导致各种病变,也可使不饱和脂肪酸过氧化,分解成丙二醛等物质,使生物大分子之间发生交联,聚合成异常的大分子,进而造成膜损伤,或降低膜的流动性,从而影响膜上或膜周围的对细胞增殖或凋亡有重要调节作用的酶。

本实验结果显示,低浓度 Cd<sup>2+</sup>首先对河蟹肝胰腺的抗氧化酶系统产生毒性,抑制 SOD、CAT、GPx 的活性。SOD 酶是一种含金属的酶,细胞内有 Mn-SOD、Cu/Zn-SOD,前者位于线粒体内,后者位于细胞质。在对小鼠的研究中发现,低剂量的 Cd<sup>2+</sup>对 SOD 酶活性的影响可能是与其活动中心的金属元素发生了交换,例如镉可以取代 Cu/Zn SOD 中的 Zn 而形成 Cu/Cd SOD,或取代 Mn-SOD 中的 Mn,使 SOD 酶失去活性<sup>[15]</sup>。也可以发生在 SOD 的转录水平上<sup>[16]</sup>,因此,暴露于 Cd<sup>2+</sup>后河蟹肝胰腺 SOD 活性降低是酶本身的活性结构受到损害。然而,不管是哪一种抑制,只要不损伤细胞结构,随着暴露时间的延长,酶的活性可以恢复,这可能是因为肝胰腺内金属硫蛋白(MT)形成后可使相当部分 Cd<sup>2+</sup>被 MT 结合降低了毒性<sup>[17]</sup>。本实验中, Cd<sup>2+</sup>暴露 72 h 后, SOD 活性恢复并超过对照 22.3%。这种反超可能是得到细胞内氧自由基大量积累的诱导而产生。CAT 是一种含 Fe 的金属酶,主要作用是催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解成 H<sub>2</sub>O 与 O<sub>2</sub>。本实验结果表明 CAT 活性先下降后增高,并且增高到比对照组高,随后减少并趋于平

衡,但是,总体水平低于对照,即CAT的活性仍受到 $Cd^{2+}$ 的影响。GPx是Se依赖性酶,活性中心是Se代半胱氨酸,主要清除脂类氢过氧化物和 $H_2O_2$ 。镉在生物体内与Se结合生成复合物,使Se生物活性下降,从而降低GPx酶活性。在 $Cd^{2+}$ 暴露的同时添加Se,可以保护GPx的活性<sup>[18]</sup>。本实验结果显示,河蟹暴露在 $2.0\text{ mg/L } Cd^{2+}$ 溶液中,肝胰腺中GPx酶活性的变化规律与SOD相同,两者之间在解除氧自由基毒性方面有很好的协调性,可防止细胞膜系统的过氧化反应。

镉对某一抗氧化酶的活性是增强还是抑制,各个文献报道有所不同,主要可能与实验动物种类、年龄、季节、镉浓度有关<sup>[19]</sup>。本实验结果显示河蟹镉中毒首先诱发体内自由基代谢物及活性氧的产生从而在很短时间内影响抗氧化系统酶活性,使之发生规律性变化,可为河蟹镉中毒的机理研究提供参考资料。

#### 参考文献

- Coogan T P, Bare R M, Waalkes M P. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in cadmium genotoxicity following zinc pretreatment. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1992, 113: 227-233
- Shukla G S, Hussain T, Chandra S V. Possible role of regional superoxide dismutase activity and lipid peroxide levels in cadmium neurotoxicity: in vivo and in vitro studies in growing rats. *Life Sci*, 1987, 41: 2 215-2 221
- 刘发义,吴玉霖. 重金属污染物在海洋生物体内积累和解毒机理. *海洋科学*, 1988, 5: 63-66
- Zikic R V, Stajin A S, Saicic Z S, et al. The activities of superoxide dismutase, catalase and ascorbic acid content in the liver of goldfish (*Carassius auratus gibelio* Bloch) exposed to cadmium. *Physiol Res*, 1996, 45(6): 479-481
- Almeida J A, Diniz Y S, Marquesa S F G, et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 2002, 7: 673-679
- Schuerack P M, Lewis J W, Jones P. The potential use of the South African river crab, *Potamonautes warreni*, as a bioindicator species for heavy metal contamination. *Ecotoxicology*, 2001, 10(3): 159-166
- McPherson R, Brown K. The bioaccumulation of cadmium by the Blue Swimmer Crab *Portunus pelagicus* L. *Sci Total Environ*, 2001, 279(1-3): 223-230
- 卢敬让,赖伟. 镉对中华绒螯蟹组织及其亚显微结构的影响. *海洋与湖沼*, 1991, 22(6): 566-570
- 王兰,杨秀清,王茜,等. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响. *动物学报*, 2001(专刊): 96-100
- 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 改良的连苯三酚字样化测定超氧化物歧化酶活性的方法. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(2): 163
- Bhagyalakshmi P S R A, Changes in oxidative metabolism in selected tissues of the crab (*Scylla serrata*) in response to cadmium toxicity. *Ecotoxicol and Environmental Safety*, 1994, 29: 255-264
- Rainbow P S. 海洋生物对重金属的积累及意义. *海洋环境科学*, 1992, 11(1): 44-51
- 方允中,李文杰. 自由基与酶基础理论及其在生物学和医学上的应用. 北京,科学出版社,1989. 129-146
- 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. *水生生物学*, 1995, 19(2): 171-185
- Casalino E, Calzavetti G, Sblano C, et al. Molecular inhibitory mechanisms of antioxidant enzymes in rat liver and kidney by cadmium. *Toxicology*, 2002, 179: 37-50
- 项翠琴,梅兵,吴自荣,等. 低剂量镉对肾脏SOD基因表达及其活力的影响. *中华劳动卫生职业病杂志*, 2001, 19(2): 91-94
- Pedersen K L, Pedersen S N, Hojrup P, et al. Purification and characterization of a cadmium-induced metallothionein from the shore crab *Carcinus maenas* (L.). *Biochem J*, 1994, 297: 609-614
- Xiao P, Jia X D, Zhong W J, et al. Restorative effects of zinc and selenium on cadmium-induced kidney oxidative damage in rats. *Biomed Environ Sci*, 2002, 15(1): 67-74
- Venugopal N B, Ramesh T V. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab *Barytelphusa guerini*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 1997, 59: 132-138

# EFFECT OF CADMIUM ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES OF THE JUVENILE *Eniocheir sinensis*

LIU Xiao-Ling    ZHOU Zhong-Liang    CHEN Li-Qiao  
(School of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062)

Received: Mar., 27, 2003

Key Words: Juvenile crab (*Eniocheir sinensis*), Cadmium, SOD, CAT, GPx

## Abstract

Immersing the juvenile crabs (*Eniocheir sinensis*) in 2.0 mg/ L CdCl<sub>2</sub> water, antioxidant enzyme activities of hepatopancrea were assayed at 6, 12, 24, 48, 72 and 96 h. The results showed that the enzyme activities were all decreased at first. The activity of SOD was increased 22.3% compared with control group at 72 h; The activity of CAT was increased at 48 h, then it was decreased again, at last it got the horizontality. The change of the activity of GPx was just the same as the SOD. It is concluded that the antioxidant enzyme activities of hepatopancrea were highly sensitive to Cd<sup>2+</sup>. So they have indicating values for Cd water pollution in early stages.

(本文编辑:张培新)