

金属蛋白酶对大菱鲆血清抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响

李杜文^{1,2}, 华智杰¹, 张文香¹, 任海¹, 张玉², 靳晓敏¹, 高桂生¹, 李佩国¹

(1. 河北科技师范学院 动物科技学院, 河北 秦皇岛 066600; 2. 内蒙古农业大学 动物科学学院, 内蒙古 呼和浩特 010000)

摘要: 为了研究金属蛋白酶对大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)抗氧化系统的影响, 作者分别对大菱鲆肌肉注射不同浓度的金属蛋白酶, 并于 3、6、12、24、48、72 h 测定血清中谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、总抗氧化活力(T-AOC)以及丙二醛(MDA)含量变化。结果显示, 低质量浓度组(0.037 mg/mL)金属蛋白酶处理后, CAT 和 T-SOD 活力除 3 h 显著高于对照组外($P<0.05$), 其余时间点均与对照组无显著差异($P>0.05$), 而低浓度组 GSH-Px 和 T-AOC 在整个试验过程中均与对照组无显著性差异($P>0.05$)。中质量浓度组(0.073 mg/mL)金属蛋白酶胁迫后血清中 CAT、GSH-Px、T-SOD 和 T-AOC 在 3 h~72 h 均呈现波浪形的变化趋势。高质量浓度组(0.147 mg/mL)金属蛋白酶对上述 4 种抗氧化酶产生不同程度的抑制, 且在 6 h~72 h 均显著低于对照组($P<0.05$)。金属蛋白酶低质量浓度和中质量浓度组 MDA 含量呈现较为平稳的变化趋势, 且与对照组无显著性差异($P>0.05$), 而高质量浓度组 MDA 含量在 3 h~72 h 均显著高于对照组($P<0.05$)。

关键词: 金属蛋白酶; 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*); 血清; 抗氧化指标; 丙二醛

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)04-0052-09

DOI: 10.11759/hyxx20180928006

大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)是自然分布于大西洋东北部欧洲沿岸的一种大型底栖鱼类, 具有生长速度快及耐低温等优点^[1]。自 1992 年被引入中国以来, 随着养殖业迅猛发展和集约化程度不断提高, 使得大菱鲆病害频发, 其中以细菌性疾病最为严重^[2-3]。弧菌病是养殖大菱鲆的主要病原菌之一, 其中鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)是危害最大的弧菌, 常给水产养殖业造成巨大的经济损失^[4-5]。

大量研究证实鳃弧菌的致病性与其本身含有多种毒力因子(胞外蛋白酶、脂多糖、鞭毛和溶血素等)有关^[6], 在上述诸多毒力因子中胞外蛋白酶具有很强的致病性^[7], 且已经发现多种动物病原菌中均存在该蛋白酶(霍乱弧菌(*Vibrio cholerae*)、创伤弧菌(*Vibrio vulnificus*)、嗜水气单胞菌(*Aeromonas hydrophila*)以及哈维氏弧菌(*Vibrio harveyi*)等), 鳃弧菌中的金属蛋白酶被证实是一种含锌离子的胞外蛋白酶^[8-10]。池政豪^[11]研究证实鳃弧菌胞外金属蛋白酶对牙鲆鳃细胞具有明显的毒性作用, 透射电镜观察发现鳃细胞内出现凋亡小体并出现崩解现象。陈吉祥等^[12]从花鲈(*Lateolabrax japonicus*)体内分离获得的鳃弧菌, 纯化后的金属蛋白酶能够引起鲈鱼组织损伤和死亡。Inamura 等^[13]从鳃弧菌胞外产物中分离纯化的金

属蛋白酶对小鼠(*Mus musculus*)也具有致死作用。Lee 等^[14]从溶血弧菌(*Vibrio parahaemolyticus*)中粗提的胞外蛋白酶 A 对 HeLa、Vero 及 Caco-2 等细胞都有很强的抑制效果, 纯化后腹腔注射小鼠能够引起小鼠死亡。由上可见, 病原菌的胞外蛋白酶作为细菌毒性因子, 能够对机体产生毒性和致病性, 该蛋白酶通过攻克宿主的防御系统, 引起组织损伤, 给病原菌的入侵及感染提供条件^[15-16]。

鱼类与其他有氧生物一样具有完善的抗氧化系统, 该系统是需氧生物体内非常重要的活性氧清除系统, 主要用于抵御外界氧化胁迫因子产生的活性氧自由基^[17]。当体内活性氧自由基增加时, 机体的抗氧化系统依靠相应的抗氧化酶的活性和抗氧化剂的

收稿日期: 2018-09-28; 修回日期: 2018-12-08

基金项目: 国家自然科学基金项目(31502187); 河北省自然科学基金项目(C2018407049); 河北科技师范学院博士基金项目(2015YB003)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No.31502187; National Natural Science Foundation of Hebei Province, No.C2018407049; Doctoral Foundation of Hebei Normal University of Science & Technology, No.2015YB003]

作者简介: 李杜文(1991-), 女, 河北邢台人, 在读硕士研究生, 主要从事细胞毒理学及免疫学研究, E-mail: 1334643792@qq.com; 任海, 通信作者, E-mail: hairen1982@163.com; 张玉, 通信作者, E-mail: 07210@163.com

合成量会受到影响^[18]。在鱼类抗氧化系统中,抗氧化酶对氧化胁迫的清除起着决定性作用,抗氧化酶活力的变化在一定程度上能反映鱼类在不同环境条件下的生理状况,可作为衡量鱼类是否受到外界环境胁迫的一个重要生理指标,具体表现为总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)等抗氧化酶类在免疫调节中发挥的重要作用^[19-21]。其中,T-AOC主要分解和清除体内代谢过程中产生多余的活性氧,保护机体免受损伤,是衡量机体抗氧化防御系统功能状况的综合性指标。而体内的SOD、CAT和GSH-Px能够相互协同清除各种氧自由基,当超氧自由基增加时,可以诱导增加生物体内SOD的活性,催化超氧自由基发生歧化反应,生成H₂O₂,进而被CAT与GSH-Px联合还原成H₂O与O₂,最终达到保护机体的目的^[22]。丙二醛(MDA)作为机体脂质过氧化作用的终产物,其含量可间接反映机体的脂质过氧化水平以及生物细胞受活性氧自由基攻击的程度^[23]。本实验通过分析上述指标在体内的变化,探讨大菱鲆抗氧化系统抗金属蛋白酶的能力,本研究结果将有助于阐明金属蛋白酶的致病机制,为防治大菱鲆弧菌病提供基础理论数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

实验用大菱鲆购自秦皇岛昌黎县某养殖场,挑选健康活泼、平均体长为14.6 cm±0.4 cm,平均体质量为42.8 g±3.6 g的大菱鲆暂养于80 cm×40 cm×50 cm的玻璃缸中,每3 d换水1次,每次换水量为总水量的一半,养殖过程中盐度为19,温度16±1℃,试验期间不投饵。

1.2 实验设计

实验用大菱鲆随机分为4组,即对照组(0 mg/mL)、低质量浓度组(0.037 mg/mL)、中质量浓度组(0.073 mg/mL)和高浓度组(0.147 mg/mL)。对照组肌肉注射100 μL无菌生理盐水,实验组分别注射等体积不同浓度的金属蛋白酶,该蛋白酶制备方法参考文献[24, 25],具体方法略作修改。每组3个平行,每个平行10尾鱼,每个时间点随机取3尾鱼,分别于注射后3、6、12、24、48、72 h于尾静脉用1 mL一次性注射器取血并转移至1.5 mL离心管中(不加任何抗凝剂),4℃冷箱内放置3 h后4 000 rpm离心

10 min,将血清转移至新的离心管内,-20℃冰箱保存备用。

1.3 样品测定

过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、总超氧化物歧化酶(T-SOD)、总抗氧化能力(T-AOC)以及丙二醛(MDA)均按照南京建成生物工程研究所试剂盒附带的说明书进行,其中规定每分钟分解1 μmol的过氧化氢即为1个酶活力单位(U)。0.1 mL血清在37℃反应5 min,排除非酶促反应作用,使反应体系中使GSH反应浓度降低1 μmol/L,定义为1个GSH-Px活力单位。每毫克组织蛋白在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);每分钟每毫克组织蛋白在37℃,使反应体系的吸光度值(OD)每增加0.01时,定义为1个T-AOC活力单位(U);MDA含量测定采用TBA法。

1.4 数据统计分析

实验数据用“平均值±标准差”表示,利用SPSS 20.0进行单因素方差(One-Way ANOVA)分析各组间差异, $P<0.05$ 表示差异显著。

2 结果分析

2.1 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清CAT活力的影响

由图1可以看出,低浓度组的CAT活力在3 h~72 h呈现先下降再上升再下降的波浪式变化趋势,并在3 h时出现最大值且显著高于对照组($P<0.05$),其余时间点均与对照组无显著性差异($P>0.05$)。中浓度组CAT活力在3 h~72 h呈现先下降再上升再下降的

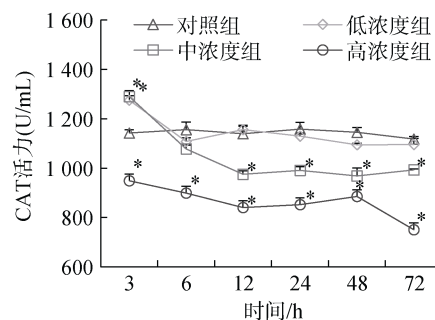


图1 金属蛋白酶对大菱鲆血清CAT活力的影响

Fig. 1 Effects of metalloproteinases on the activity of CAT in the serum of *S. maximus*

*. 与对照组相比,差异显著($P<0.05$),下同

* denotes significant differences compared with the control group ($P<0.05$), same as Figs. 2-5

波浪式变化趋势,且在 12 h~72 h 均显著低于对照组 ($P<0.05$)。而金属蛋白酶高浓度组在整个试验期间也呈现波浪式的变化趋势, CAT 活力在 3 h~72 h 内受到不同程度的抑制,均显著低于对照组 ($P<0.05$),且在 72 h 活力迅速下降,出现最低值。

2.2 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清 GSH-Px 活力的影响

由图 2 可见,低浓度组的 GSH-Px 活力在 3 h~72 h 内呈现相对平稳的变化趋势且与对照组相比无显著性差异 ($P>0.05$)。而中浓度组 GSH-Px 活力在整个试验阶段呈波浪形变化趋势,除 6 h 和 72 h 外,其余时间点均与对照组差异显著 ($P<0.05$)。金属蛋白酶高浓度组 GSH-Px 活力在 3 h~72 h 呈现先下降后上升再下降的变化趋势,除 3 h 略低于对照组外 ($P>0.05$),其余时间点均显著低于对照组 ($P<0.05$)。

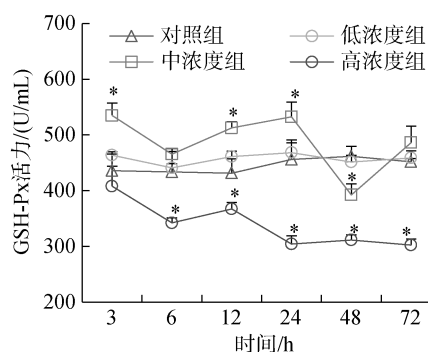


图 2 金属蛋白酶对大菱鲆血清 GSH-Px 活力的影响

Fig. 2 Effects of metalloproteinases on the activity of GSH-Px in the serum of *S. maximus*

2.3 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清 T-SOD 活力的影响

由图 3 可见,在整个试验过程中,金属蛋白酶低浓度组和中浓度组血清的 T-SOD 活力均呈现波浪形变化趋势,且在 3 h 显著高于对照组 ($P<0.05$),之后逐渐下降,在 48 h 时恢复到对照组水平,在 72 h 时略高于对照组,但无显著性差异 ($P>0.05$)。高浓度组 T-SOD 活力在 3 h~48 h 呈现逐渐下降的变化趋势,而在 48 h~72 h 有上升的趋势,且整个试验过程中均与对照组差异显著 ($P<0.05$)。

2.4 不同浓度的金属蛋白酶对大菱鲆血清 T-AOC 活力的影响

如图 4 所示,金属蛋白酶低浓度组 T-AOC 活力

在 3 h~48 h 趋于平稳,但在 72 h 有上升的趋势,整个试验过程中与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。中浓度组 T-AOC 活力在整个试验过程中呈波浪式变化,在 12 h 和 72 h 出现低值,且均显著低于对照组 ($P<0.05$)。而高浓度组 T-AOC 活力在 3 h~72 h 均显著低于对照组 ($P<0.05$)且在 12 h 后呈现逐渐下降的变化趋势。

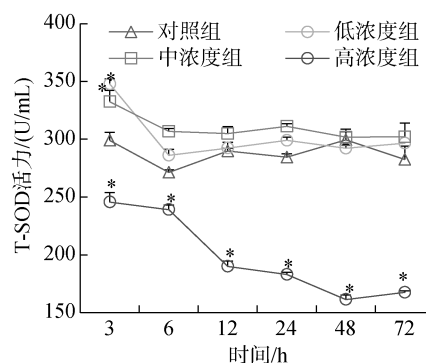


图 3 金属蛋白酶对大菱鲆血清 T-SOD 活力的影响

Fig. 3 Effects of metalloproteinases on the activity of T-SOD in the serum of *S. maximus*

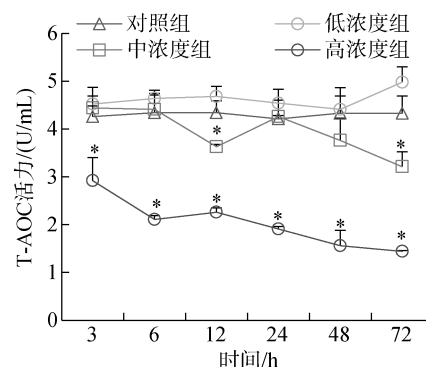


图 4 金属蛋白酶对大菱鲆血清 T-AOC 活力的影响

Fig. 4 Effects of metalloproteinases on the activity of T-AOC in the serum of *S. maximus*

2.5 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清 MDA 含量的影响

从图 5 可以看出,低、中浓度组 MDA 含量在 3 h~72 h 内总体呈现平稳的变化趋势,略高于对照组,与对照组无显著性差异 ($P>0.05$)。但是整个试验过程中高浓度组 MDA 含量均显著高于对照组 ($P<0.05$),且在 24 h~72 h 内 MDA 含量大致呈现缓慢上升的趋势。

3 讨论

研究证实将鳗弧菌中的金属蛋白酶进行灭活处理后,其致病性会大幅度降低,因此认为金属蛋白

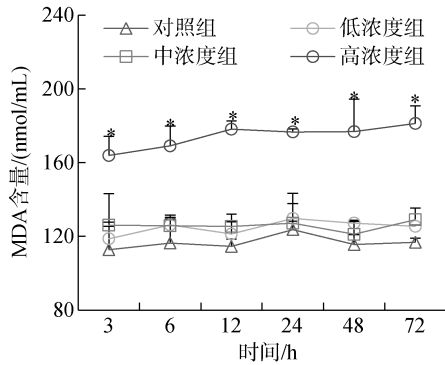


图5 金属蛋白酶对大菱鲆血清MDA含量的影响

Fig. 5 Effects of metalloproteinases on the activity of MDA content in the serum of *S. maximus*

酶是鳗弧菌重要的致病因子^[15-16]。有研究发现,外界胁迫因子(水体温度、毒素、氨氮等)变化能够诱导机体产生多余的氧自由基。在一定范围内,氧自由基的产生与机体抗氧化防御过程处于动态平衡中,当外界胁迫因子浓度的增加和胁迫时间的延长,活性氧自由基在体内不断积累进而引起细胞结构和功能的破坏。为了避免细胞损伤,机体的抗氧化防御系统在清除组织细胞内过多的活性氧自由基以及保证机体正常生理功能方面发挥了重要的作用^[26]。体内有许多清除自由基的抗氧化酶,如SOD、CAT、GSH-Px及T-AOC等是机体抗氧化系统中主要的酶,上述酶指标的活性和含量的变化将最终影响体内活性氧水平。而当体内蓄积的自由基超过了机体的清除能力时,过多的自由基会攻击生物细胞膜,生成脂质过氧化物(LPO),并最终分解为MDA,而MDA可改变生物膜结构,降低细胞膜的流动性,造成对细胞膜的脂质过氧化损伤,通过检测MDA的含量能够间接反应出机体脂质过氧化的程度^[27-28]。基于此,本试验通过分析上述指标在大菱鲆血清中的变化来反映其抗金属蛋白酶的能力。

3.1 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清的CAT和GSH-Px活力的影响

CAT是生物体内酶系统防御体系中的关键酶之一,其主要功能是清除体内的 H_2O_2 ,保护生物体防止氧化损伤毒害作用,保护机体细胞内环境的稳定^[29]。本试验中,在整个试验期间低、中浓度组仅在3h与对照组有显著性差异($P < 0.05$),而其他时间点无显著差异。分析原因可能是由于金属蛋白酶的毒性诱导大菱鲆体内活性氧增加,其免疫系统反馈性增强抗氧化酶活力以清除体内多余的活性氧,这可能与低

浓度下毒物短暂的增益效应作用相关,Stebbing等^[30]把该效应称之为“毒物的兴奋效应”。与对照组相比,随着胁迫时间的延长,中浓度组CAT活性呈现逐渐下降的趋势且在12h~72h有显著性差异($P < 0.05$),而高浓度组CAT活力在3h~72h内均受到不同程度的抑制且显著低于对照组水平($P < 0.05$)。出现上述结果的原因可能是随着金属蛋白酶浓度的升高以及胁迫时间的延长,CAT酶活性逐渐被抑制,使得过氧化氢逐渐累积,对组织损伤增加,导致体内的CAT活力下降。牟海津等^[31]研究发现副溶血弧菌胞外产物可以破坏对虾血淋巴中凝血系统的酶活性,影响对虾的体质。本试验中也发现金属蛋白酶对大菱鲆血清CAT活力具有一定抑制作用,这可能与该蛋白酶能够破坏大菱鲆体内的酶活力有关。呼光富^[32]等研究了 Cu^{2+} 对克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)急性毒性作用,结果发现较低浓度 Cu^{2+} 对对虾组织CAT活力具有一定的激活作用,而高浓度具有明显的抑制作用。

GSH-Px是体内普遍存在的一种过氧化物分解酶,能催化GSH生成氧化型谷胱甘肽(GSSG),使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,对各种外源(重金属)和内源性物质(活性氧)对细胞的损害都有保护作用,该酶具有保护细胞膜的结构、功能以及防止过氧化物的损害^[33]。本试验中金属蛋白酶中浓度组GSH-Px在3h~72h内呈现波浪形变化趋势,且在72h恢复到对照组水平。韩春艳等^[34]认为低浓度胁迫因子短时间内能诱导GSH-Px活性增强来消除过多的自由基,但是随着时间推移,其活力恢复到正常组水平。但是随着金属蛋白酶浓度的增加,高浓度组GSH-Px在6h~72h均受到显著抑制($P < 0.05$),分析原因可能是由于高浓度刺激导致机体产生的活性氧超出了抗氧化系统所能调节的范围,造成组织器官的氧化损伤,导致不可逆的结果。有研究认为鱼类在长时间受到胁迫的过程中,一些组织会一直处于氧化应激状态,产生的自由基会持续聚集,轻则是细胞生物膜脂质过氧化,酶失活和DNA损伤,重则引起病变^[35]。

3.2 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清的T-SOD和T-AOC活力的影响

SOD能够清除机体内产生的活性氧自由基,保护细胞免受氧化损伤,是最先与活性氧自由基作用的酶,一直被认为是生物体内最重要的抗氧化酶,

属于需氧生物体内的防御系统酶类^[36]。本试验结果显示,低、中浓度组的 T-SOD 活力在 3 h 均显著高于对照组($P<0.05$),之后逐渐下降至对照组水平,原因可能是由于外界毒性因子胁迫导致体内活性氧增加,提高 T-SOD 活力以清除自由基,维持组织的抗氧化水平,表现出机体应对外界胁迫的生理性调节,短时间内表现出积极的作用^[37],进一步说明低浓度金属蛋白酶可能对机体并没有产生不可逆的毒害作用。姚志峰等^[38]认为造成这种变化趋势的原因可能是低浓度胁迫对机体的影响相当于其在无毒作用下的应激反应,刺激增强血清中的 T-SOD 活力,清除过量的活性氧自由基,随着作用时间的延长,活力逐渐恢复至对照组水平。本试验中金属蛋白酶高浓度组 T-SOD 活力在 3 h~72 h 均显著低于对照组($P<0.05$),原因可能是由于高浓度长时间胁迫下体内产生的活性氧过多,超出了机体清除的能力,因此 T-SOD 活性呈下降的变化趋势。潘鲁青等^[39]研究也发现 Cu^{2+} 对鱼体的伤害与铜离子的浓度和作用时间密切相关。

T-AOC 表示各种抗氧化大分子、抗氧化小分子和酶促体系的抗氧化能力总和,是衡量生物体内抗氧化防御系统功能状况的综合性评价指标,能够反映出机体抗氧化防御系统的状态^[40]。本试验结果发现,金属蛋白酶中浓度组的 T-AOC 活力在整个胁迫过程中呈现波浪式变化趋势,在 12 h 和 72 h 出现低值,且均显著低于对照组($P<0.05$)。分析可能是由于金属蛋白酶毒性作用诱导机体产生过多的活性氧对体内抗氧化系统产生短暂的抑制作用,反馈性地激活了体内各种抗氧化酶,使其恢复到正常水平。但是随着金属蛋白酶作用时间的延长,机体积累大量的活性氧导致体内 T-AOC 活性受到抑制。高浓度组 T-AOC 在 3 h~72 h 均显著低于对照组($P<0.05$),同前面几种抗氧化酶变化趋势相似,可能是由于金属蛋白酶浓度过高导致体内活性氧产生太多,使得抗氧化酶完全被抑制,形成不可逆的结果。有研究发现,活性氧在体内大量积累时,除了破坏细胞电子传递链、影响线粒体膜电位以及能量 ATP 的产生外,还会导致细胞呼吸障碍,进一步会导致细胞凋亡甚至坏死^[41]。本试验中长时间金属蛋白酶胁迫是否导致大菱鲆组织细胞凋亡或坏死,将在后续试验中给予证实。

3.3 不同浓度金属蛋白酶对大菱鲆血清 MDA 含量的影响

MDA 是机体脂质过氧化反应的最终产物之一,

可引起生物膜结构和功能异常,因此检测其含量既可以衡量机体的抗氧化状态和脂质过氧化损伤的程度,也可间接反映自由基产生侵害的程度、生物活性及其抗氧化能力的强弱^[27-28]。本试验结果表明,金属蛋白酶低、中浓度组的 MDA 含量均与对照组变化趋势相似,无显著性差异($P>0.05$),分析原因可能是由于上述浓度的金属蛋白酶并没有超过机体自身抗氧化系统的调节能力,机体通过诱导大菱鲆血清中抗氧化酶消除体内产生过多的活性氧自由基,从而减少了过氧化脂质产生,表现为机体 MDA 含量变化差异不显著($P>0.05$)。顾海龙等^[42]研究发现 $1\text{ }\mu\text{g/L}$ 的 Cd^{2+} 胁迫泥蚶在短期内 MDA 含量变化不显著,强俊等^[43]用氨氮胁迫尼罗罗非鱼(*Oreochromis niloticus*)也发现较低浓度的氨氮不会影响 MDA 含量的变化,与本试验得到的结果相类似。而金属蛋白酶高浓度组在 3 h~72 h 均显著高于对照组,推测可能是高浓度金属蛋白酶引起机体产生氧化应激,产生大量活性氧,导致大菱鲆脂质过氧化作用增强和 DNA 的氧化损伤,严重时会引起机体死亡。苏秀梅^[44]研究结果显示鱼源嗜麦芽寡养单胞菌(*Stenotrophomonas maltophilia*)胞外蛋白酶对小鼠及斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)具有明显的致死作用,病理组织学检查发现该蛋白酶对小白鼠和斑点叉尾鲷多器官均造成明显的损伤作用,导致多器官功能衰竭,最终引起动物死亡。进一步提示金属蛋白酶胁迫下丙二醛的积累导致的氧化损伤可能是金属蛋白酶对大菱鲆产生毒害作用的主要原因。

4 结论

本研究结果表明,不同浓度组金属蛋白酶能够影响大菱鲆抗氧化酶活性,并且高浓度组可以导致血清脂质过氧化产物 MDA 含量的增加,表现出一定的时间量效关系。低、中浓度组金属蛋白酶胁迫初期能够诱导机体抗氧化酶系统酶活力增加,机体可以通过自身的抗氧化系统中的各种酶进行调节,消除机体过多的活性氧自由基,表现出积极的作用。而高浓度组金属蛋白酶对机体抗氧化酶活性产生不同程度的抑制作用,并且造成脂质过氧化程度加剧,表现为 MDA 含量的增加。金属蛋白酶作为鳃弧菌主要致病因子对机体造成的损伤可能是通过抑制抗氧化酶活性和增加脂质过氧化作用来实现的。本试验结果可为大菱鲆应答鳃弧菌感染的免疫机制研究提供一定的理论参考。

参考文献:

- [1] 秦蕾, 王印庚, 阎斌伦. 大菱鲆微生物性疾病研究进展[J]. 水产科学, 2008, 27(11): 598-602.
Qin Lei, Wang Yingeng, Yan Binlun. Advances in research on diseases of turbot *Scophthalmus maximus* affected by microorganisms[J]. Fisheries Science, 2008, 27(11): 598-602.
- [2] 张正, 王印庚, 杨官品, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)细菌性疾病的研究现状[J]. 海洋湖沼通报, 2004, 3: 83-89.
Zhang Zheng, Wang Yingeng, Yang Guanpin, et al. The present status of research on bacterial diseases of turbot *Scophthalmus maximus*[J]. Transactions of Oceanology and Limnology, 2004, 3: 83-89.
- [3] Toranzo A E, Magarinos B, Romalde J L. A review of the main bacterial fish diseases in mariculture systems[J]. Aquaculture, 2005, 246(1-4): 37-61.
- [4] Novoa B, Nuñez S, Fernández-Puentes C, et al. Epizootic study in a turbot farm: bacteriology, virology, parasitology and histology[J]. Aquaculture, 1992, 107(2-3): 253-258.
- [5] Rock J L, Nelson D R. Identification and characterization of a hemolysin gene cluster in *Vibrio anguillarum*[J]. Infection and Immunity, 2006, 74(5): 2777-2786.
- [6] 葛慕湘, 靳晓敏, 房海, 等. 大菱鲆源鳃弧菌毒力基因的检测及序列分析[J]. 中国兽医学报, 2014, 34(8): 1267-1277.
Ge Muxiang, Jin Xiaomin, Fang Hai, et al. Detection and sequence analysis of virulence genes of *Vibrio anguillarum* isolated from turbot (*Scophthalmus maximus*)[J]. Chinese Journal of Veterinary Science, 2014, 34(8): 1267-1277.
- [7] Denkin S M, Nelson D R. Regulation of *Vibrio anguillarum* empA metalloprotease expression and its role in virulence[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2004, 70(7): 4193-4204.
- [8] Lee C Y, Cheng M F, Yu M S, et al. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 31-37.
- [9] Chen F R, Liu P C, Lee K K. An evaluation of chromogenic substrates for characterization of serine protease produced by pathogenic *Vibrio alginolyticus*[J]. Microbios, 1999, 98(389): 27-34.
- [10] Miyoshi S, Nakazawa H, Kawata K, et al. Characterization of the hemorrhagic reaction caused by *Vibrio vulnificus* metalloprotease, a member of the thermolysin family[J]. Infection and Immunity, 1998, 66(10): 4851-4855.
- [11] 池政豪. 鳃弧菌胞外金属蛋白酶的纯化、修饰及毒性研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
Chi Zhenghao. Studies on purification, modification and cytotoxicity of the extracellular metalloprotease of the pathogenic *Vibrio anguillarum*[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006.
- [12] 陈吉祥, 刘斌, 池政豪, 等. 环境因子对鳃弧菌生长和胞外蛋白酶表达的影响[J]. 海洋科学, 2009, 33(1): 54-57.
Chen Jixiang, Liu Bin, Chi Zhenghao, et al. Effect of culture conditions on the growth and extracellular protease expression of *Vibrio anguillarum* W1[J]. Marine Sciences, 2009, 33(1): 54-57.
- [13] Inamura H, Nakai T, Muroga K. An extracellular protease produced by *Vibrio anguillarum*[J]. Bulletin of the Japanese Society of Scientific Fisheries, 1985, 51(12): 1915-1920.
- [14] Lee C Y, Cheng M F, Yu M S, et al. Purification and characterization of a putative virulence factor, serine protease, from *Vibrio parahaemolyticus*[J]. FEMS Microbiology Letters, 2002, 209(1): 30-36.
- [15] 魏玉西, 汪靖超, 程殿林, 等. 鳃弧菌(*Vibrio anguillarum*)胞外产物中蛋白酶的纯化及其性质[J]. 应用与环境生物学报, 2002, 8(4): 414-418.
Wei Yuxi, Wang Jingchao, Cheng Dianlin, et al. Purification and property of extracellular proteases from *Vibrio anguillarum*[J]. Chinese Journal of Applied and Environmental Biology, 2002, 8(4): 414-418.
- [16] 陈师勇. 鳃弧菌主要致病因子的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所, 2003.
Chen Shiyong. The study of major virulent factor of *Vibrio anguillarum*[D]. Qingdao: The Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, 2003.
- [17] Martinez-Alvarez R M, Hidalgo M C, Domezain A, et al. Physiological changes of sturgeon *Acipenser naccarii* caused by increasing environmental salinity[J]. The Journal of Experimental Biology, 2002, 205(23): 3699-3706.
- [18] 郭红岩, 陈亮, 王晓蓉, 等. 低浓度镱暴露对鲫鱼肝脏多种酶活性的影响[J]. 南京大学学报, 2001, 37(6): 665-670.
Guo Hongyan, Chen Liang, Wang Xiaorong, et al. The effects of ytterbium on the enzymes activities of Crucian (*Carassius auratus*) liver[J]. Journal of Nanjing University, 2001, 37(6): 665-670.
- [19] 王好, 庄平, 章龙珍, 等. 盐度对点篮子鱼的存活、生长及抗氧化防御系统的影响[J]. 水产学报, 2011, 35(1): 66-73.
Wang Yu, Zhuang Ping, Zhang Longzhen, et al. Effects of salinity on survival, growth and antioxidant defense system of *Siganus guttatus*[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(1): 66-73.
- [20] 赵峰, 庄平, 章龙珍, 等. 施氏鲟不同组织抗氧化酶

- 对水体盐度升高的响应[J]. 海洋水产研究, 2008, 29(5): 65-69.
- Zhao Feng, Zhuang Ping, Zhuang Longzhen, et al. Responses of antioxidases in different tissues of *Acipenser schrenckii* to increased salinity in water[J]. Marine Fisheries Research, 2008, 29(5): 65-69.
- [21] 刘亚娟, 胡静, 周胜杰, 等. 急性氨氮胁迫对尖吻鲈稚鱼消化酶及抗氧化酶活性的影响[J]. 南方农业学报, 2018, 49(10): 2087-2095.
- Liu Yajuan, Hu Jing, Zhou Shengjie, et al. Effects of acute ammonia nitrogen stress on antioxidant enzymes activity and digestive enzymes activity in larval *Lates calcarifer*[J]. Journal of Southern Agriculture, 2018, 49(10): 2087-2095.
- [22] Yildirim O, Büyükbıngöl Z. Effects of supplementation with a combination of cobalt and ascorbic acid on antioxidant enzymes and lipid peroxidation levels in streptozocin-diabetic rat liver[J]. Biological Trace Element Research, 2002, 90(1-3): 143-154.
- [23] 陈汉, 王慧君, 李学峰, 等. 甲基苯丙胺对大鼠脑组织中 NO、SOD 和 MDA 的影响[J]. 中国药物依赖性杂志, 2007, 16(2): 102-104.
- Chen Han, Wang Huijun, Li Xuefeng, et al. Change of NO, SOD and MDA in methamphetamine-treated rat brain and their correlation[J]. Chinese Journal of Drug Dependence, 2007, 16(2): 102-104.
- [24] 杨慧. 鳃弧菌金属蛋白酶基因在大肠杆菌中的表达、纯化、定点突变及其 DNA 疫苗的研制[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2007.
- Yang Hui. Expression, purification, site-directed mutagenesis of *Vibrio anguillarum* EmpA metalloprotease in *Escherichia coli* and development of its DNA vaccine[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2007.
- [25] 张凤丽. 鳃弧菌金属蛋白酶在大肠杆菌中表达、加工与转运及重组蛋白酶的纯化与性质研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2006.
- Zhang Fengli. Expression, processing and export of *Vibrio anguillarum* metalloprotease in *Escherichia coli*, purification and characterization of recombinant metalloprotease[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2006.
- [26] 郭勤单, 王有基, 吕为群, 等. 温度和盐度对褐牙鲆幼鱼渗透生理及抗氧化水平的影响[J]. 水生生物学报, 2014, 38(1): 58-67.
- Guo Qindan, Wang Youji, Lü Weiqun, et al. Combined effects of temperature and salinity on the physiological osmotic induction and antioxidant responses in the juvenile japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*)[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2014, 38(1): 58-67.
- [27] Viarengo A, Canesi L, Martinez P G, et al. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1995, 111(1): 119-126.
- [28] 陈海刚, 马胜伟, 林钦, 等. 氯化三丁基锡对黑鲷鳃和肝组织 SOD、MDA 和 GPx 的影响[J]. 南方水产, 2009, 5(2): 23-27.
- Chen Haigang, Ma Shengwei, Lin Qin, et al. Effects of tributyltin chloride (TBTCI) on SOD activities, MDA contents and GPx activities in gill and liver of the black porgy (*Sparus macrocephalus*)[J]. South China Fisheries Science, 2009, 5(2): 23-27.
- [29] 吴海一. 重金属对匾额细首纽虫抗氧化防御系统及脂质过氧化作用的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2008.
- Wu Haiyi. Effects on antioxidant defense system and lipid peroxidation of nemertean, *Cephalothrix simula* by heavy metals[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2008.
- [30] Stebbing A R D. Hormes is the stimulation of growth by low levels of inhibitors[J]. Science of the Total Environment, 1982, 22(1): 213-234.
- [31] 牟海津, 李筠, 包振民, 等. 副溶血弧菌胞外产物对中国对虾的致病性分析[J]. 海洋与湖沼, 2000, 31(3): 273-280.
- Mou Haijin, Li Yun, Bao Zhenmin, et al. Pathogenicity of extracellular products of *vibrio parahaemolyticus* to *penaeus chinensis*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2000, 31(2): 273-280.
- [32] 呼光富, 李忠, 梁宏伟, 等. 镉对克氏原螯虾肝胰腺触角腺及鳃中 SOD 和 CAT 活性的影响[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(9): 1806-1811.
- Hu Guangfu, Li Zhong, Liang Hongwei, et al. Effects of cadmium on SOD and CAT in hepatopancreas, antennary gland and gill of *Procambarus clarkii*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(9): 1806-1811.
- [33] 王学锋, 陈海刚, 蔡文贵, 等. 汞离子胁迫对红鳍笛鲷抗氧化酶及乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(12): 1829-1836.
- Wang Xuefeng, Chen Haigang, Cai Wengui, et al. Effects of mercury exposure on the antioxidant enzymes and acetylcholinesterase activities in the young crimson snapper (*Lutjanus erythropterus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(12): 1829-1836.
- [34] 韩春艳, 郑清梅, 陈桂丹, 等. 氨氮胁迫对奥尼罗非鱼非特异性免疫的影响[J]. 南方水产科学, 2014, 10(3): 47-52.
- Han Chunyan, Zheng Qingmei, Chen Guidan, et al. Effect of ammonia-N stress on non-specific immunity of tilapia (*Oreochromis niloticus* × *O. aureus*)[J]. South China Fisheries Science, 2014, 10(3): 47-52.

- [35] 刘洋, 凌去非, 于连洋, 等. 氨氮胁迫对泥鳅不同组织 SOD 和 GSH-PX 活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2): 1069-1072.
Liu Yang, Ling Qufei, Yu Lianyang, et al. Effect of ammonia-N stress on activity of SOD and GSH-PX in different tissues of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2011, 39(2): 1069-1072.
- [36] 王燕. 用多项生物标志物评价三丁基锡对大鼠的早期影响[D]. 杭州: 浙江大学, 2005.
Wang Yan. An assessment of early toxic effects of TBT on rats by multi-biomarkers[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2005.
- [37] 任海, 李健, 李吉涛, 等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾 (*Exopalaemon carinicauda*) 抗氧化系统酶活力及 GPx 基因表达的影响[J]. 农业环境科学学报, 2014, 33(4): 647-655.
Ren Hai, Li Jian, Li Jitao, et al. Effects of acute ammonia stresses on antioxidant enzyme activities and GPx gene expression in *Exopalaemon carinicauda*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2014, 33(4): 647-655.
- [38] 姚志峰, 章龙珍, 庄平, 等. 铜对中华鲟幼鱼的急性毒性及对肝脏抗氧化酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2010, 17(4): 731-738.
Yao Zhifeng, Zhang Longzhen, Zhuang Ping, et al. Effects of antioxidant enzyme in liver and acute toxicity of Cu^{2+} on juvenile Chinese sturgeon[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 731-738.
- [39] 潘鲁青, 吴众望, 张红霞. 重金属离子对凡纳滨对虾组织转氨酶活力的影响[J]. 中国海洋大学学报, 2005, 35(2): 195-198.
Pan Luqing, Wu Zhongwang, Zhang Hongxia. Effects of heavy metal ions on transaminases activities of *Litopenaeus vannamei*[J]. Periodical of Ocean University of China, 2005, 35(2): 195-198.
- [40] 段亚飞, 董宏标, 王芸, 等. 鳃弧菌感染对斑节对虾免疫相关指标的影响[J]. 海洋科学, 2015, 39(9): 44-50.
Duan Yafei, Dong Hongbiao, Wang Yun, et al. The non-specific immune related indexes response of *Penaeus monodon* to *Vibrio anguillarum* challenge[J]. Marine Sciences, 2015, 39(9): 44-50.
- [41] Ott M, Gogvadze V, Orrenius S, et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death[J]. Apoptosis, 2007, 12(5): 913-922.
- [42] 顾海龙, 沈伟良, 孙长森, 等. 低浓度 Cd^{2+} 长期胁迫对泥蚶抗氧化防御系统及 MDA 含量的影响[J]. 海洋环境科学, 2013, 32(5): 741-745.
Gu Hailong, Shen Weiliang, Sun Changsen, et al. Effect of long-term stress of low concentrations of Cd^{2+} on antioxidant defense system and the content of MDA in bloody clam (*Tegillarca granosa*)[J]. Marine Environmental Science, 2013, 32(5): 741-745.
- [43] 强俊, 徐跑, 何杰, 等. 氨氮与拥挤胁迫对吉富品系尼罗罗非鱼幼鱼生长和肝脏抗氧化指标的联合影响[J]. 水产学报, 2011, 35(12): 1837-1848.
Qiang Jun, Xu Pao, He Jie, et al. The combined effects of external ammonia and crowding stress on growth and biochemical activities in liver of Nile tilapia juvenile (*Oreochromis niloticus*)[J]. Journal of Fisheries of China, 2011, 35(12): 1837-1848.
- [44] 苏秀梅. 鱼源嗜麦芽寡养单胞菌胞外蛋白酶的纯化与致病性研究[D]. 雅安: 四川农业大学, 2007.
Su Xiumei. The study of purification and pathogenicity of *Stenotrophomonas maltophilia* extracellular protease from fish[D]. Yaan: Sichuan Agricultural University, 2007.

Effects of metalloprotease on antioxidant system enzyme activities and malondialdehyde content in the serum of *Scophthalmus maximus*

LI Du-wen^{1, 2}, HUA Zhi-jie¹, ZHANG Wen-xiang¹, REN Hai¹, ZHANG Yu², JIN Xiao-min¹, GAO Gui-sheng¹, LI Pei-guo¹

(1. The College of Animal Science and Technology, Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China; 2. The College of Animal Science, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010000, China)

Received: Sept., 28, 2018

Key words: metalloprotease; *Scophthalmus maximus*; serum; antioxidant indexes; malondialdehyde

Abstract: A metalloprotease was purified from the extracellular products (ECP) of *Vibrio anguillarum*. It was lethal to *S. maximus* when injected intramuscularly. However, there is little information about the effects of metalloprotease on the antioxidant system and lipid peroxidation in *S. maximus*. In this study, we measured catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-Px), total antioxidation activity (T-AOC), total superoxide dismutase (T-SOD) activity, and malondialdehyde (MDA) content in the serum of *S. maximus* exposed to 0.037 mg/mL, 0.073 mg/mL, or 0.147 mg/mL metalloprotease, respectively, at 3, 6, 12, 24, 48, and 72 hours. The results showed that compared with the control group, the activities of CAT and T-SOD were not significantly different at any of the tested time points, except for 3 h ($P > 0.05$). The variation in GSH-Px and T-AOC was not obvious in the serum of the low-concentration group. The changes in CAT, GSH-Px, T-SOD, and T-AOC in the serum of the medium-concentration group after metalloproteinase stress undulated between 3 h and 72 h. Metalloproteinase in the high-concentration group was inhibited by the above four antioxidant enzymes and was significantly lower than in the control group from 6 h to 72 h. The MDA content of the low- and medium-concentration groups was not significantly different between 3 h and 72 h ($P > 0.05$), while the MDA content of the high-concentration group was significantly higher than that of the control group from 3 h to 72 h ($P < 0.05$).

(本文编辑: 谭雪静)