

铜在中国对虾体内的积累和 致毒效应*

刘发义 吴玉霖 赵鸿儒 侯兰英 孙凤

(中国科学院海洋研究所, 青岛)

提要 本文研究了 Cu 在中国对虾 (*Panaeus orientalis*) 体内的累积规律和致毒效应, 探讨了积累机理。实验表明, 对虾的胃、肠、鳃和肝胰脏都能从海水中较快地积累 Cu。肝胰脏的积累速度最快, 是 Cu 在对虾体内贮存的主要场所。进一步分析表明, 累积在肝胰脏中的 Cu 有部分与类金属硫蛋白相结合, 但大部分是与细胞液中的小分子物质结合在一起。从肝胰脏中分离出了一种小分子 Cu 络合物, 随着 Cu 的积累, 这种小分子络合物含量增加, 同时肝胰脏中细胞色素氧化酶的活性也发生变化, 而且这种变化与对虾的中毒反应有相关性。

中国对虾 *Panaeus orientalis* 主要分布在黄、渤海区, 产于山东、河北、辽宁及天津近海^[1]。由于工业的发展, 上述海区的部分河口或海湾已经受到不同程度的污染, 这会影响对虾的生长发育。另外, 近年来对虾养殖业在我国北方沿海迅速发展, 不少养虾塘位于城市近郊或工业区附近, 很容易受到城市和工业污水的影响。有的地方还试验使用城市污水养虾。因此研究包括 Cu 在内的重金属和其它污染物对对虾的影响, 对于海洋环境和养虾塘水质的评价和监测具有一定的意义。另一方面, Cu 和 Zn 等重金属又是对虾生长发育的必需微量元素, Cu 是对虾血液中的氧载体——血蓝蛋白的中心原子, Cu 和 Zn 还是许多金属酶的重要组成部分, 因而研究它们对对虾的影响, 对于对虾养殖也具有一定的参考价值。本文报道了通过室内养殖试验和生化分析等方法, 研究铜在对虾体内的积累及其机制, 以及细胞色素氧化酶的活性与 Cu 的积累和致毒作用之间的相互关系。

一、材料和方法

实验用对虾于 1986 年 9 月上旬取自青岛市黄岛对虾养殖场, 虾体长为 7.6—9.9 cm, 体重 7.2—10.0g。对虾用船运回实验室, 驯养 4 天后, 移入含有 CuSO₄ 的实验海水中, 水体 480L, 养虾 120 尾。海水 Cu 离子浓度为 1.0mg/L, 每天换 1/3 体积的含有相同浓度 Cu 的新鲜海水, 早晚投喂人工配合饵料各一次, 分别于暴露 Cu 1, 3, 7, 11 天后取样分析。另取在未加 Cu 的海水中养殖的虾作为对照。

样品虾取出后, 用滤纸吸干体表海水, 称重, 测量体长。每次取虾 8 尾, 解剖出胃、肠、肉和鳃, 分别称重后用湿法消化, 方法见文献[2]。肝胰脏取出称重后, 加约 3 倍体积 (V/W) 0.02mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.0), 用玻璃匀浆器匀浆, 在 TGL-168 型台式高速

* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第 1387 号。

收稿日期: 1986 年 11 月 30 日。

离心机中于 $16\,000\times g$ 离心 20 分钟,沉淀部分用湿法消化,方法同上。用 WFD-Y₂ 型原子吸收分光光度计(北京第二光学仪器厂)分别测定上述消化后的样品溶液和离心所得上清液中的 Cu 和 Zn。

取 2ml 肝胰脏上清液,加到 Sephadex G-75 柱上进行凝胶层析。柱体积为 $\phi 2\times 70$ cm, 预先用 0.02 mol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.0) 平衡。样品液流完后,用相同的缓冲液洗脱,流速 30ml/h, 分部收集洗脱液,每管 4ml。另取 2ml 上清液,用 0.01 mol/L 磷酸缓冲液 (pH 6.0) 稀释至 6ml, 加到预先用同一缓冲液平衡过的 CM-32 阳离子交换柱 ($\phi 2.5\times 12$ cm) 上,进行离子交换层析。样品流完后,先用上述缓冲液淋洗,然后用 0.01 mol/L (pH 6.0) 和 0.2 mol/L (pH 8.0) 的磷酸缓冲液形成的线性梯度洗脱液洗脱,分部收集,每管 4ml。分别测定上述洗脱液中的 Cu 和 Zn。

另外取 5 尾虾,取出肝胰脏,在 0.2mol/L 的 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-KH}_2\text{PO}_4$ 缓冲液 (pH 7.4) 中匀浆,用高速离心机 (Tomy Seiko Co. LTD) 于 4℃ 条件下,依次用 $1000\times g$ 和 $15\,000\times g$ 差速离心 10 分钟和 20 分钟,取高速离心后的沉淀部分,重新悬浮于磷酸缓冲液中,即得粗酶液,按 Smith^[9] 的方法测定其中细胞色素氧化酶的活性,同时用双缩脲法测定其蛋白质含量^[4],求出酶的比活性。

二、结果和讨论

1. Cu 在不同组织中的积累

表 1 是暴露于 Cu 不同时间,对虾肉、胃、肠、鳃和肝胰脏对 Cu 的积累。为了了解 Cu 的积累对组织中 Zn 的含量有否影响,同时测定了各组织中 Zn 的含量,结果见表 2。

表 1 对虾各组织对 Cu 的积累 ($\mu\text{g/g}$, 湿重)

Tab. 1 Concentration of Cu in prawn tissues

组 织	肉	胃	肠	鳃	肝胰脏
暴露于 Cu 的时间(天)					
对照组	1.76	5.32	5.24	21.90	8.59
1	1.83	10.72	4.94	—	252.31
3	3.05	17.96	31.16	86.29	295.30
7	2.85	20.93	22.47	—	311.43
11	3.76	35.40	24.27	74.54	335.78

从表 1 看出, Cu 在对虾的胃、肠、鳃和肝胰脏中积累的速度相当快,暴露 3 天后,它们的 Cu 含量分别为对照组的 3.4, 5.9, 3.9 和 34.4 倍,其后的时间则增加很少或不再增加,这说明海水中的 Cu 进入对虾体内的途径之一是通过消化道。鳃可能也是一个途径。肉对 Cu 的积累速度比较慢,到实验结束时(暴露于 Cu 11 天后),其 Cu 的含量仅是对照组的 2 倍多一点。肉中的 Cu 可能是由其它组织慢慢传递过去的。

从表 1 的数据还看出,在上述组织中,肝胰脏累积 Cu 的能力最强,暴露于 Cu 11 天后,其中 Cu 的浓度达 $335.78\ \mu\text{g/g}$ (湿重),这与李荷芳¹⁾对外海对虾 Cu 含量的测定结果

1) 李荷芳,中国对虾体内铜的分布。

表 2 对虾各组织中 Zn 的含量($\mu\text{g/g}$, 湿重)

Tab. 2 Concentration of Zn in prawn tissues

暴露于 Cu 的时间(天)	组 织				
	肉	胃	肠	鳃	肝胰脏
对照组	0.15	0.24	0.36	0.37	39.76
1	0.17	0.41	0.45	—	53.34
3	0.25	0.39	0.46	0.40	49.15
7	0.20	0.60	0.82	—	38.38
11	0.18	0.32	0.65	0.09	15.32

是一致的。对虾的肝胰脏相当大,其 Cu 的含量又高,根据我们的测定,体长 7cm 左右的对虾,其肝胰脏重量约占总体重的 4%,其中 Cu 的含量占整体 Cu 含量的 43%,可见肝胰脏是 Cu 在对虾体内的主要贮存场所。

Cu 和 Zn 是同一副族元素,两者的化学性质有很多相似之处。这两种元素在生物体内的积累有拮抗作用,即 Cu 的含量增加,Zn 会降低。但在本实验中,除鳃和肝胰脏中的 Zn 在暴露于 Cu 11 天后有所下降外,其它则无明显的变化,这可能因为实验时间短的缘故。

2. Cu 在肝胰脏细胞内的分布

肝胰脏匀浆经 $16\ 000\times\text{g}$ 离心后,所得的上清液应包含溶酶体、微粒体和细胞液等组分,而细胞核、线粒体和细胞膜碎片等集中在沉淀中。该上清液和沉淀中 Cu 和 Zn 的分布如表 3 所示。

表 3 Cu 和 Zn 在肝胰脏细胞内的分布

Tab. 3 Distribution of Cu and Zn in hepatopancreas cells

暴露于 Cu 的时间 (天)	沉淀(%)		上清液(%)	
	Cu	Zn	Cu	Zn
对照	3.24	0.31	96.76	99.69
1	5.06	0.43	94.95	99.57
3	4.75	0.29	95.25	99.71
7	5.71	0.92	94.29	99.08
11	16.91	2.21	83.09	97.79

由表 3 看出,肝胰脏中的 Cu 和 Zn 绝大部分集中在上清液中,即存在于细胞液、微粒体和溶酶体部分,而细胞核、线粒体和细胞膜碎片中 Cu 和 Zn 的含量很少。

将上述所得的上清液用 Sephadex G-75 层析,所得的层析曲线如图 1 所示。从图中看出,对照组上清液中的 Cu 全部分布在大分子库中(图 1a),而实验组上清液中的 Cu 则主要存在于小分子库中,同时在分子量与金属硫蛋白(metallothionein, MT)相似的位置出现了一个小峰。随着暴露于 Cu 时间的延长,分布在小分子库中的 Cu 的比例有进一步增加的趋势(见图 1b, c, d 和表 4)。

上述结果说明,肝胰脏中 Cu 的含量不多时,其上清液中的 Cu 主要分布在大分子库中。该上清液中虽然也包括溶酶体和微粒体,但根据我们对对虾肝胰脏中 Cu 的亚细胞

表 4 肝胰脏上清液中 Cu 的分子分布

Tab. 4 Molecular distribution of Cu in hepatopancreas

暴露于 Cu 的时间 (天)	大分子库 (%)	MT 库 (%)	小分子库 (%)
对照	100	0	0
3	14	20	66
7	13	21	66
11	14	10	78

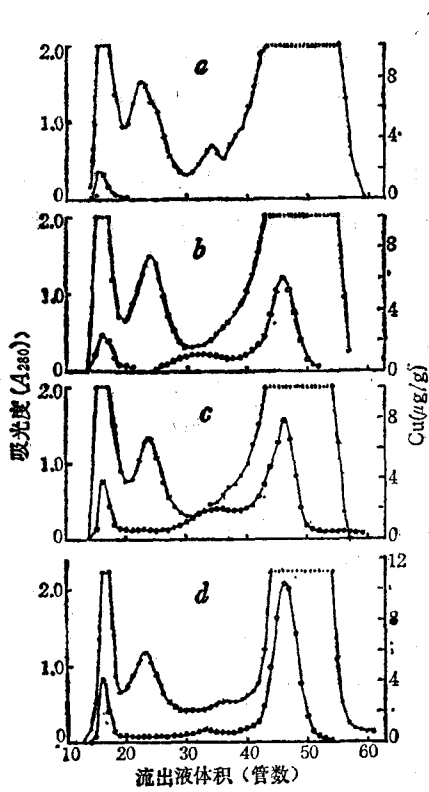


图 1 肝胰脏上清液凝胶层析曲线

Fig. 1 Chromatography of hepatopancreas supernatant of high speed centrifugation on Sephadex G-75

●—● 吸光度; ○—○ Cu。

a 为对照; b, c, d 分别为暴露于 Cu 3, 7, 11 天。

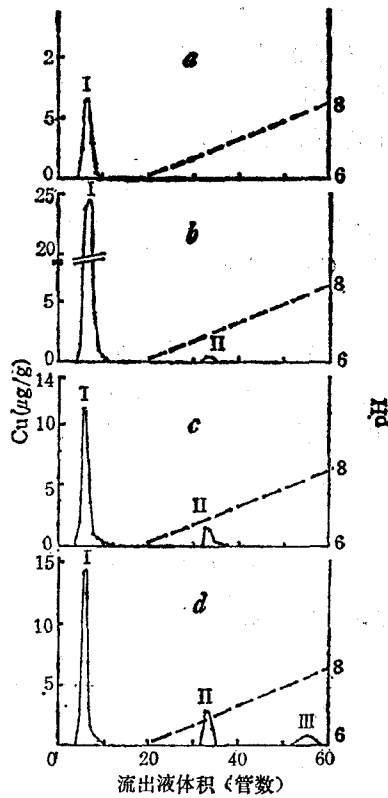


图 2 肝胰脏上清液在 CM-32 上的洗脱曲线

Fig. 2 Chromatography of hepatopancreas supernatant of high speed centrifugation on CM-32 column

(图注同图 1)

分布的研究,发现它主要分布在细胞液中,约占肝胰脏 Cu 的总量的 88%,而溶酶体和微粒体中含量很少,仅占 5% 左右¹⁾。由此可以判断,上述对照组上清液中的 Cu 主要是与细胞液中的大分子物质结合在一起。当对虾暴露于 Cu 3 天后,其肝胰脏上清液中的 Cu 则

1) 刘发义等,对虾肝胰脏中 Cu 的特性。(待发表)

主要分布在小分子库中(约占上清液 Cu 总量的 66% 以上),它们可能是与游离氨基酸、小肽或其它小分子物质结合;也有少量 Cu 出现在 MT 库中,这可能是暴露于 Cu 后诱导产生了类金属硫蛋白(metallothionein-like protein)。上述情况说明,Cu 在对虾肝胰脏中的积累和贮存,主要是依赖与细胞液中的小分子物质结合。Cu 诱导合成金属硫蛋白也可能是其积累和贮存机制之一。显然这些机制同样会起到解毒作用。

为进一步研究肝胰脏上清液中的 Cu,将其用 CM-32 阳离子交换柱进行了分离。在暴露于 Cu 3 天以后的肝胰脏上清液中,发现有部分 Cu 被吸附在阳离子交换柱上,如图 2 中的峰 II 所示,这部分 Cu 在上清液中所占的比例随着暴露 Cu 时间的延长而增加(见图 2),而且到 11 天后,又分离出一个含 Cu 的组分(图 2a 中的峰 III)。这些现象说明,峰 II 和峰 III 中的含 Cu 物质与 Cu 在肝胰脏中的积累有直接关系。

关于金属硫蛋白以及与其类似的蛋白质在重金属积累和解毒中的作用,人们研究得相当多,几乎在所有的动物中都发现了这种蛋白质^[1,5,6]。但关于分子量比 MT 更低的小分子物质对重金属的积累和解毒作用研究得还不多。Frazier 等人^[6]曾在受 Cu, Zn 等重金属严重污染的牡蛎(*Ostrea edulis*)体内发现,Cu, Zn 主要分布在小分子库中,但未发现 Cu 在 MT 库中存在,这与对虾有所不同。牡蛎体内小分子量的 Cu 络合物已经得到了初步纯化,并对其物理化学性质进行了初步研究^[7]。对于对虾肝胰脏内的小分子含铜化合物我们也正在进行分离纯化,并对其性质进行研究。

3. 细胞色素氧化酶与 Cu 的积累和致毒效应之间的关系

细胞色素氧化酶是呼吸链末端的特征酶,起着传递电子的作用,它位于线粒体内膜上,每个分子含有两个 Cu 原子。因此这种酶的活性与细胞内 Cu 的含量会有直接的关系。

暴露于 Cu 不同时间的对虾肝胰脏中细胞色素氧化酶的活性测定结果列于表 5。酶活性单位 U 以 $\log \Delta A_{550nm} = 0.01/\text{分}$ 表示。

表 5 对虾肝胰脏中细胞色素氧化酶活性

Tab. 5 Activity of cytochrome oxidase in hepatopancreas of the prawns

暴露于 Cu 的天数	对照	1	3	7	11
比活性 (U/mg 蛋白)	14.65	15.39	26.00	20.39	15.36

由表 5 看出,开始时细胞色素氧化酶的比活性随着暴露于 Cu 的天数的增加而增加,也即随着 Cu 的积累而增加。3 天以后开始下降,与此相对应,对虾开始出现了大量蜕皮和死亡现象。上述结果说明,这种酶的活性与组织中 Cu 的含量有关,Cu 含量少时,其活性随 Cu 含量的增加而增加,当含量达到一定程度时,过量的 Cu 会对其起到抑制作用,使活性下降,并使对虾中毒。我们在用含有不同浓度 Cu 的饵料喂养对虾时也发现,肝胰脏细胞色素氧化酶的活性随饵料中 Cu 浓度的增加而升高,当 Cu 浓度高到一定程度时,活性开始下降,此时对虾虽未出现诸如大量蜕皮和死亡等明显中毒现象,但对虾的生长减缓,同时在肝胰脏中出现了 Cu 的明显蓄积¹⁾。这些结果说明,细胞色素氧化酶有可能作

1) 刘发义等,饵料中的 Cu 对对虾的影响。(待发表)

为 Cu 在对虾体内的致毒效应以及对虾体内 Cu 的营养状态的生化指标。

参 考 文 献

- [1] 刘发义, 1982. 金属硫蛋白的研究概况及其与环境科学的关系. 中国环境科学 3: 72—74.
- [2] 吴玉霖、赵鸿儒、侯兰英等, 1983. 重金属镉、铅、铜和镍在非洲鲫鱼体内的积累、分布和排出. 海洋与湖沼 14(5): 473—481.
- [3] 张伟权、纪成林编著, 1986. 对虾养殖技术. 上海科学技术出版社, 第 7 页.
- [4] 蔡武城、袁厚积, 1982. 生物物质常用化学分析法. 科学出版社, 第 96 页.
- [5] Engel, D. W., M. Brouwer and F. Thurberg, 1985. Comparison of metal metabolism and metal-binding proteins in blue crab and the American lobster. In: Marine Pollution and Physiology: Recent Advances, ed. by Vernberg, F. J. et al. University of South Carolina Press, pp. 229—246.
- [6] Frazier, J. M. and S. G. George, 1983. Cadmium kinetics in oysters—A comparative study of *Crassostrea gigas* and *Ostrea edulis*. Mar. Biol. 76: 55—61.
- [7] Liu Fayi and S. G. George, 1985. Purification of very low molecular weight Cu-complexes from the European oyster. In: Marine Pollution and Physiology: Recent advances, ed. by Vernberg, F. J. et al. University of South Carolina Press, pp. 145—156.
- [8] Kagi, J. H. R. and M. Nordberg, 1979. Metallothionein. Proceedings of the first international meeting on metallothionein and other low molecular weight metal-binding proteins, 1978. Experientia Suppl. Birkhauser Verlag, Basel. p. 34.
- [9] Smith, L., 1954. Methods in Enzymology, volume LIII, ed. by Fleischer, S. and L. Packer. Academic Press, New York, pp. 45—47.

ACCUMULATION AND TOXICITY OF COPPER IN PRAWN *PANAEUS ORIENTALIS**

Liu Fayi, Wu Yulin, Zhao Hongru, Hou Lanying and Sun Feng

(Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao)

ABSTRACT

Mechanisms of accumulation of Cu and activity of cytochrome oxidase in the prawn hepatopancreas varying with exposure period to Cu were studied in laboratory. The results showed:

(1) When exposed to copper dissolved in sea water, the prawns actively accumulated the metal in the stomach, intestine, gills and hepatopancreas, and the amounts accumulated in the hepatopancreas were the largest.

(2) Sephadex G-75 chromatography showed that after 3 days exposure, more than 66% of Cu in supernatant of high speed centrifugation ($16000 \times g$) were present in very low molecular weight fractions, and about 20% of Cu present in metallothionein pools, indicating that the very low molecular weight ligands are primary factors in the tissue accumulation of Cu, so is the metallothionein-like protein. In addition, cation exchange chromatography with CM-32 showed at least a Cu-complex in the very low molecular weight pool was related to the accumulation of Cu in the tissue.

(3) Specific activity of cytochrome oxidase in hepatopancreas varied with increasing of exposure period. The activity at fourth day of the exposure was highest, then decreased. After 7 day exposure, the prawn molt was seriously affected and mortality occurred. Therefore it is possible to use cytochrome oxidase as a biochemical indicator of copper toxicity to the prawn.

* Contribution No. 1387 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.