

# 水体 $Hg^{2+}$ 对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 血淋巴 抗氧化酶活力和丙二醛含量的影响\*

赵艳民<sup>1, 2, 3</sup> 王新华<sup>3</sup> 秦延文<sup>1, 2</sup> 郑丙辉<sup>1, 2</sup>

(1. 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室 北京 100012; 2. 中国环境科学研究院国家环境保护河口与海岸带环境重点实验室 北京 100012; 3. 南开大学生命科学学院 天津 300071)

**提要** 采用单因子实验设计方法, 进行了水体汞( $Hg^{2+}$ )在不同暴露时间对中华绒螯蟹血淋巴超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)和过氧化氢酶(CAT)活力以及脂质过氧化产物丙二醛(MDA)含量的影响研究。结果表明, 较低浓度  $Hg^{2+}$  (0.01 和 0.05 mg/L) 处理组中华绒螯蟹血淋巴 SOD、GPX、CAT 活力在短时间内上升, 表现出一种“毒物兴奋效应”; 随着暴露时间的延长, 三种酶活力均受到明显的抑制; 高浓度的汞(0.20 和 0.30 mg/L)无论暴露时间长短, 对三种抗氧化酶均产生明显的抑制作用。本研究中不同浓度的  $Hg^{2+}$  处理组中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量均高于对照组, 表现出“剂量-效应”和“时间-效应”关系。双因素方差分析结果表明, 水体  $Hg^{2+}$  的暴露浓度和暴露时间均对中华绒螯蟹血淋巴三种抗氧化酶和 MDA 含量产生显著影响。血淋巴 SOD、GPX、CAT 活力以及 MDA 含量对水环境中的  $Hg^{2+}$  反应灵敏, 可作为中华绒螯蟹毒理学评价指标以及重金属污染监测指标。

**关键词**  $Hg^{2+}$ , 中华绒螯蟹, 血淋巴, SOD, GPX, CAT, MDA

**中图分类号** Q955

汞以  $Hg^{2+}$ 、 $CH_3Hg^+$ 、 $(CH_3)_2Hg$  等形式广泛分布于水体环境之中, 是水环境中常见的剧毒重金属污染物(孙振兴等, 2009)。近年来, 由于工农业的发展, 汞污染问题日趋严重, 2009 年 6 月 7—12 日在中国贵阳举办的第九届汞全球污染物国际学术会议明确指出了“环境汞污染问题是发展中国家和发达国家共同关注的环境问题”(《科学时报》, 4654 期)<sup>1)</sup>。汞作为一种生物非必需金属元素, 无法在生物物质循环和能量交换中分解, 会对水生生物产生很强的毒性作用(Ebdon *et al.*, 2001)。已有研究表明, 水体中的  $Hg^{2+}$  主要通过鳃和消化道途径进入并蓄积在甲壳动物体内(Bianchini *et al.*, 2000), 通过影响甲壳动物细胞膜离子通道的导电性(Franchet, 1999), 破坏甲壳动物的

组织结构(赵艳民等, 2008)等毒理学作用, 最终影响甲壳动物的正常生长和存活(赵艳民等, 2009)。甲壳动物等无脊椎动物体内缺乏特异性免疫机制, 主要依靠血细胞吞噬作用抵御外界污染胁迫(姚翠鸾等, 2006)。血细胞在吞噬外源异物过程中会释放包括超氧阴离子( $O_2^-$ )、羟自由基( $\cdot OH$ )、单线态氧( $^1O_2$ )和中间反应物过氧化氢( $H_2O_2$ )的活性氧(Reactive oxygen species, ROS)。ROS 在抵御外源异物起重要作用, 但过多的 ROS 会对生物机体产生破坏作用。超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)、过氧化氢酶(CAT)被认为是甲壳动物体内去除活性氧的最重要的酶类(Pan *et al.*, 2006)。众多研究表明水体重金属能够影响甲壳动物体内抗氧化酶活力以及脂质过氧

\* 国家水体污染控制与治理科技重大专项资助项目, 2009ZX07528-002 号; 中国环境科学研究院中央级公益性科研院所基本科研业务专项资助, 2007KYYW08 号。赵艳民, 博士, E-mail: yanminzhao@yahoo.com.cn

1) 《科学时报》4654 期, 2009 年 6 月 12 日, A1 版, “46 国科学家贵阳探讨全球汞污染 汞污染仍为我国重大环境问题”, [http://news.sciencenet.cn/dz/dznews\\_photo.aspx?id=6275](http://news.sciencenet.cn/dz/dznews_photo.aspx?id=6275)

通讯作者: 王新华, 教授, E-mail: xhwang@nankai.edu.cn

收稿日期: 2010-03-16, 收修改稿日期: 2010-05-23

化作用(Sridevi *et al.*, 1998; 洪美玲等, 2007; 闫博等, 2007), 然而鲜有关于  $Hg^{2+}$  对甲壳动物抗氧化酶活力及脂质过氧化作用的研究。

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)隶属甲壳纲(Crustacea)、十足目(Decapoda), 俗称河蟹、毛蟹、大闸蟹, 是我国重要的经济水产养殖品种。本研究以中华绒螯蟹作为研究对象, 以血淋巴抗氧化酶和丙二醛含量作为指标研究, 研究  $Hg^{2+}$  的暴露浓度和暴露时间对中华绒螯蟹的毒性影响, 以期为研究汞对中华绒螯蟹的毒性效应机理、评价养殖水环境及中华绒螯蟹的健康养殖提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)于 2007 年 6 月购于天津市宁河县水产养殖场。正式实验前于南开大学水生生物学实验室中暂养 10 天, 实验用水为充分曝气的自来水[pH  $7.5 \pm 0.5$ ; 硬度( $213.5 \pm 5.0$ )mg/L  $CaCO_3$ ; 本底  $Hg^{2+}$  浓度为  $0.0034 \mu g/L$ ], 暂养期间投喂上海大江饲料公司生产的蟹用商品饲料(蛋白质 32%, 粗脂肪 4.0%, 粗纤维 8.0%, 灰分 12%), 饲料中汞含量低于检测限。暂养结束后随机分组, 选取体表清洁有光泽, 健康活泼的个体进行正式实验。实验个体平均湿重( $17.36 \pm 1.23$ )g。

### 1.2 养殖实验

1.354g 氯化汞溶解于 1L 蒸馏水中配制  $Hg^{2+}$  为 1g/L 实验储液。实验储液与曝气自来水混合配制所需实验溶液。

根据急性毒性实验的结果, 设置 0.01、0.05、0.10、0.20 和 0.30mg/L 作为本实验的暴露浓度, 并添加对照组。选取体色正常、健康活泼的蟹置于(40cm $\times$ 30cm $\times$ 20cm)聚乙烯水族箱内, 每箱 5 只, 箱内加入经充分曝气的自来水以及  $Hg^{2+}$  处理溶液, 实验设置三个平行。实验期间水温、pH 值和溶氧保持在( $22 \pm 2$ ) $^{\circ}C$ ,  $7.5 \pm 1.0$ , ( $7.5 \pm 0.5$ )mg/L。暴露时间为 1 天。

实验时间为 7 天、14 天和 30 天的实验处理与 1 天的处理组相同, 但每天于 09:00 和 15:00 按体重的 5% 两次投喂上述蟹用饲料。下午投喂之前清除粪便及残饵, 并更换 50% 的实验溶液。

### 1.3 样品处理

实验结束后取出幼蟹沥干称重, 用 5ml 注射器于中华绒螯蟹第三步足基部血窦抽取血淋巴, 于  $-70^{\circ}C$  冰箱中保存备用。酶活力测定工作在 1 个月之内完成。

### 1.4 酶活力的测定

测定前, 将冷冻的血淋巴融化低速冷冻离心( $4^{\circ}C$ , 5000r/min)收集血清用于测定酶活力。

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD), 以血淋巴每 ml 反应液中 SOD 抑制率达到 50% 时所对应的 SOD 量为一个 SOD 活力单位(U/ml)。

过氧化氢酶(Catalase, CAT)的测定采用 Pinho 的过氧化氢法, 酶活力的单位定义是: 温度  $30^{\circ}C$ , pH 8.0 的条件下每 mg 蛋白每 min 分解  $1 \mu mol$  底物过氧化氢的需要的酶量定义为 1 个酶活力单位(U/mg 蛋白)。

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione peroxidase, GPX), GPX 能够催化还原型谷胱甘酸 GSH 产生氧化型谷胱甘肽 GSSG, 而在 NADPH 存在条件下谷胱甘肽还原酶催化 GSSG 产生 GSH, 通过检测 NADPH 的减少量可以计算出 GPX 的活力水平。酶活力定义为: 1 个酶活力单位为 25 , pH 8.0, GSH、谷胱甘肽还原酶、t-Bu-OOH 存在的条件下, 在 1min 内可以催化  $1 \mu mol$  NADPH 转变成  $NADP^{+}$ 。

丙二醛(Malondialdehyde, MDA)含量采用南京建成测试盒进行测定, 原理是过氧化脂质降解产物中的丙二醛(MDA)可与硫代巴比妥酸(TBA)结合, 形成红色产物, 在 532nm 处有最大吸收峰, 从而推算 MDA 的含量。

可溶性蛋白含量测定利用小牛血清蛋白(Bovine serum albumin, BSA)为标准, 采用 Lowry 法进行测定。

### 1.5 数据处理与分析

实验结果均以平均数  $\pm$  标准误( $X \pm SE$ )表示, 利用 SPSS13.0 软件进行双因素方差分析(Two-ways ANOVA), 差异显著临界值设定为 0.05。

## 2 结果

### 2.1 水体 $Hg^{2+}$ 对中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力的影响

水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力的影响见图 1, 对照组 SOD 活力在本实验设置的时间范围内基本保持平稳。在 0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组中 SOD 活力在本实验设置的时间范围内高于对照组, 并且两浓度组血淋巴 SOD 活力随暴露时间的延长均呈现出“低—高一低”的变化趋势, 最高值分别出现在暴露 14 天的 296.77U/mg 蛋白和暴露 7 天的 306.85 U/mg 蛋白。而 0.10、0.20、0.30mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组血淋巴 SOD 活力则随着暴露时间的延长而不断降低, 并且最低值均出现在暴露 30 天的处理组, 分别为

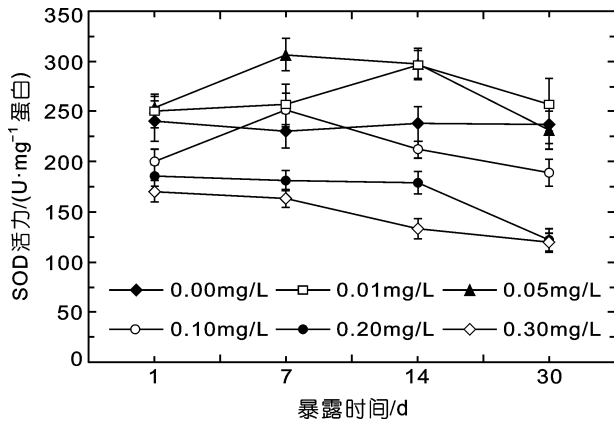


图1 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力的影响  
Fig.1 Effects of  $Hg^{2+}$  on SOD activities in the haemolymph of *E. sinensis*

188.89、121.68 和 119.49U/mg 蛋白。

双因素方差分析结果(表 1)显示, 水体中  $Hg^{2+}$  浓度以及暴露时间均对中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力产

生了显著影响( $P < 0.05$ ), 并且两者之间的交互作用同样对 SOD 活力产生了显著影响。

## 2.2 水体 $Hg^{2+}$ 对中华绒螯蟹血淋巴 GPX 活力的影响

由图 2 可知, 经过 1 天的暴露, 所有  $Hg^{2+}$  处理组中华绒螯蟹血淋巴 GPX 的活力均高于对照组酶活力, 0.10mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组酶活力最高, 为 16.53U/mg 蛋白。实验处理 7 天后, 0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 GPX 活力迅速上升, 不仅高于对照组, 而且高于暴露 1 天的处理组, 其中 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 GPX 酶活力达到 16.75U/mg 蛋白, 为该处理组在不同暴露时间的最大值。暴露 14 天后 0.01mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 GPX 活力继续上升, 达到 17.85U/mg 蛋白, 为本浓度在设定时间的最大值; 而 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组酶活力则开始下降。0.10、0.20、0.30mg/L 的处理组 GPX 的活力随着暴露时间的延长而下降, 暴露 30 天的处理组酶活力最低, 分别为 7.05、5.60 和 3.88U/mg 蛋白, 均低于同时期的对照组。

表 1 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力影响结果方差分析  
Tab.1 ANOVA on the effects of  $Hg^{2+}$  on SOD activities in the haemolymph of *E. sinensis*

方差来源	自由度(df)	均方和	F 值	显著性值(Sig.)
$Hg^{2+}$ 浓度(mg/L)	5	31880.804	138.994	0.000
暴露时间(d)	3	5374.435	23.431	0.000
交互作用	15	1333.179	5.812	0.000
误差	48	224.232		
总和	72			

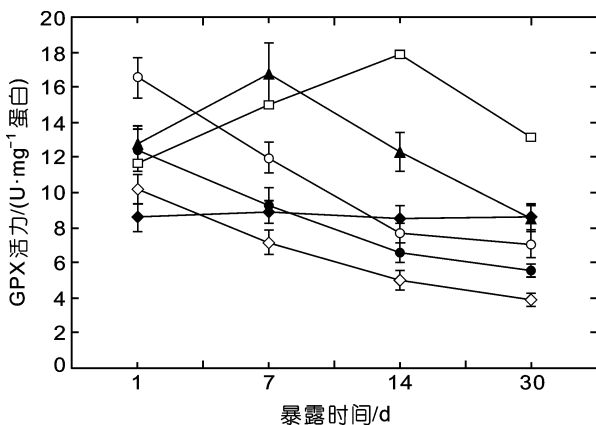


图 2 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 GPX 活力的影响  
Fig.2 Effects of  $Hg^{2+}$  on GPX activities in the haemolymph of *E. sinensis*  
注: 图例同图 1

统计分析表明,  $Hg^{2+}$  的浓度和暴露时间均对中华绒螯蟹 GPX 酶活力产生了显著影响( $P < 0.05$ ), 而且浓度和时间的交互作用同样对该酶活力有显著影响, 见表 2。

## 2.3 水体 $Hg^{2+}$ 对中华绒螯蟹血淋巴 CAT 活力的影响

水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹 CAT 酶活力的影响见图 3。本实验设置的时间范围内, 0.01、0.05 和 0.10mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组中华绒螯蟹血淋巴 CAT 酶活力均高于对照组, 但各自随时间的走势则略有不同。0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 CAT 活力随暴露时间的延长而增加, 都在暴露 30 天后达到最大值, 为 7.62 和 10.06U/mg 蛋白; 而 0.10mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 CAT 活力则随着暴露时间的延长持续下降, 暴露 30 天后达到 6.04U/mg 蛋白的最小值, 但其酶活力仍高于对照组酶活力。而 0.20 和 0.30mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 CAT 活力则自暴露第一天起即低于对照组, 随着暴露时间的延长, 酶活力不断降低, 于暴露 30 天达到各自浓度组酶活力的最低值为 3.51 和 2.38U/mg 蛋白。

由表 3 可知, 水体  $Hg^{2+}$  暴露浓度和暴露时间两种因素对中华绒螯蟹血淋巴 CAT 酶活力影响显著 ( $P < 0.05$ ), 两种因素之间存在交互作用并对酶活力有显著影响。

表 2 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 GPX 活力影响结果方差分析  
Tab.2 ANOVA on the effects of  $Hg^{2+}$  on GPX activities in the haemolymph of *E. sinensis*

方差来源	自由度(df)	均方和	F 值	显著性值(Sig.)
$Hg^{2+}$ 浓度(mg/L)	5	102.122	59.499	0.001
暴露时间(d)	3	66.502	38.746	0.000
交互作用	15	19.667	11.458	0.001
误差	48	1.716		
总和	72			

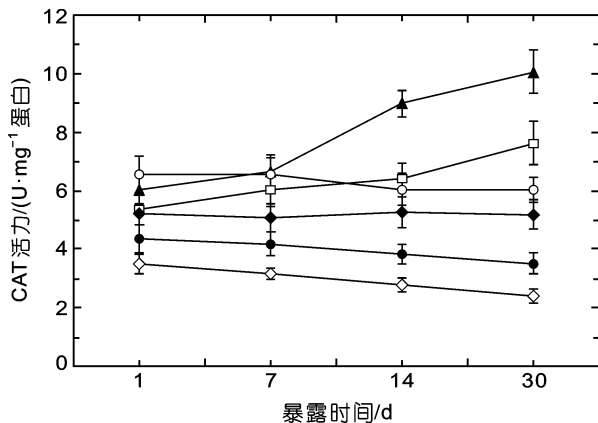


图 3 不同浓度的  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 CAT 活力的影响  
Fig.3 Effects of  $Hg^{2+}$  on CAT activities in the haemolymph of *E. sinensis*

注: 图例同图 1

由图 4 可知, 随着水体  $Hg^{2+}$  处理时间的延长, 各浓度组中华绒螯蟹血淋巴内 MDA 含量均高于对照组, 但不同处理组中华绒螯蟹 MDA 含量变化趋势则不尽相同。0.01 和 0.05mg/L 浓度组 MDA 含量随着暴露时间的延长呈现出先上升后下降的变化趋势, 分别于暴露第 7 天和第 14 天达到各自的最大值, 分别为 18.82 和 17.53nmol/mg 蛋白。而 0.10、0.20 和 0.30mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量随着暴露时间的延长不断上升, 最大值分别为 19.37、24.69 和 27.07nmol/mg 蛋白。

双因素方差分析结果(表 4)表明, 中华绒螯蟹血

淋巴 MDA 含量受水体  $Hg^{2+}$  的暴露浓度以及暴露时间影响显著( $P < 0.05$ ), 而暴露浓度和暴露时间的交互作用同样对其产生了显著的影响。

### 3 讨论

汞作为一种生物非必需重金属元素, 是一种氧化强化剂, 能够诱发生物机体活性氧增加(Zaman *et al.*, 1994), 一方面活性氧的存在增强了机体对外界污染物的防御作用; 另一方面, 过多的活性氧积存在动物体内将会对机体造成损伤(Lygren *et al.*, 1999; 孟紫强, 2000)。为了减轻活性氧对机体造成的损伤, 生物体通过调动体内抗氧化酶活力等一系列生理反应, 清除活性氧, 减缓氧化损伤(姚翠鸾等, 2006)。SOD 是生物体内一种关键的抗氧化酶, 其功能是将体内超氧阴离子( $O_2^-$ )转化为过氧化氢( $H_2O_2$ )。本研究中 0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力在本研究设置的时间范围内, 高于对照组酶活力, 说明水体  $Hg^{2+}$  导致中华绒螯蟹体内活性氧大量产生, 机体为减轻活性氧的氧化损伤诱导 SOD 活力上升, 产生所谓“毒物兴奋效应”(Poison-intoxication effect)(Stebbing, 1982)。而 0.10、0.20 和 0.30mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组, 中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力则随着时间的延长呈下降趋势, 则可能是机体内活性氧自由基大量增加, 超过了蟹机体的清除能力, 组织受到活性氧的攻击而受损, 影响了细胞合成 SOD 的能力, 导致其活力下降。此外, 由于细胞中的 SOD 的活性

表 3 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 CAT 活力影响结果方差分析  
Tab.3 ANOVA on the effects of  $Hg^{2+}$  on CAT activities in the haemolymph of *E. sinensis*

方差来源	自由度(df)	均方和	F 值	显著性值(Sig.)
$Hg^{2+}$ 浓度(mg/L)	5	37.882	149.415	0.001
暴露时间(d)	3	1.465	5.779	0.002
交互作用	15	2.611	10.299	0.001
误差	48	0.254		
总和	72			

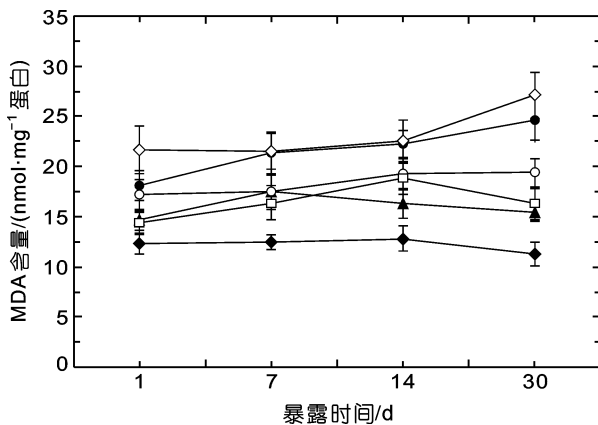


图4 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量的影响

Fig.4 Effects of  $Hg^{2+}$  on MDA content in the haemolymph of *E. sinensis*

注: 图例同图1

表4 水体  $Hg^{2+}$  对中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量影响结果方差分析  
Tab.4 ANOVA on the effects of  $Hg^{2+}$  on MDA content in the haemolymph of *E. sinensis*

方差来源	自由度(df)	均方和	F 值	显著性值(Sig.)
$Hg^{2+}$ 浓度(mg/L)	5	194.035	73.468	0.000
暴露时间(d)	3	25.391	9.614	0.001
交互作用	15	7.423	2.811	0.003
误差	48	2.756		
总和	72			

机体内  $O_2^-$  在 SOD 的催化下转化为  $H_2O_2$ , 对机体造成的氧化损伤的威胁依然存在。因此, 生物体内还要依靠谷胱甘肽过氧化物酶 GPX 和过氧化氢酶 CAT 清除体内过量的  $H_2O_2$ 。本研究中, 中华绒螯蟹血淋巴内两种酶活力均有体现, 但是本研究中 0.01 和 0.05mg/L 处理组中随暴露时间的延长两种酶的变化趋势有所不同。随着处理时间的延长, 0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  浓度组 GPX 活力变动趋势与 SOD 酶活力趋于一致, 呈现“低—高一低”的变化趋势; 而这两个浓度组 CAT 酶活力则随着暴露时间的延长持续升高。GPX 是一种含硒酶, 酶的活性中心为硒代半胱氨酸 (Se-Cys), 主要分布在细胞质中 (闫博等, 2007)。0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  浓度暴露,  $Hg^{2+}$  的毒性被机体解毒机制如金属硫蛋白等所降低 (Pan *et al.*, 2006), 伴随解毒过程, 活性氧自由基出现, 刺激 SOD 活力上升, 大量  $H_2O_2$  生成, 导致机体激活 GPX 合成途径, GPX 活力迅速升高; 而随着  $Hg^{2+}$  逐渐深入到血细胞细胞质中,  $Hg^{2+}$  与 GPX 活性中心半胱氨酸残基的巯基形成牢固的硫汞键 (-SHg-), 破坏酶的结构, 导致 GPX 酶活力持续下降 (孟紫强, 2000)。由于  $Hg^{2+}$

中心为  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$ ,  $Hg^{2+}$  进入细胞后, 可能与  $Cu^{2+}/Zn^{2+}$  发生竞争关系, 结合到 SOD 的活性中心, 改变其空间结构, 从而降低酶活性 (闫博等, 2007)。与本研究类似, 镉、铬、镍和氨氮等污染物在低浓度条件下的刺激, 高浓度条件抑制了甲壳动物 SOD 活力 (Venugopal *et al.*, 1997; Sridevi *et al.*, 1998; Wang *et al.*, 2004; 洪美玲等, 2007)。值得指出的是, 两浓度组中华绒螯蟹血淋巴 SOD 活力分别在处理 14 天和处理 7 天时达到最大值, 随后, 随着暴露时间的延长逐渐降低。降低的原因是由于机体通过各种生理反应, 清除了过量的活性氧自由基, 适应了此浓度  $Hg^{2+}$ , 逐渐恢复到正常生理水平; 还是由于长期的  $Hg^{2+}$  暴露, 导致机体产生永久性损伤, 机体代谢机能下降, SOD 活力降低, 尚需要深入研究才能得出结论。

与生物体内生物大分子巯基结合为牢固的硫汞键, 从而改变其空间结构, 影响生理功能, 因此  $Hg^{2+}$  对日本螯血淋巴 GPX 活力产生了显著的影响 (张红霞等, 2006)。此外, 由于 GPX 催化  $H_2O_2$  的过程中需要还原性谷胱甘肽 (Reduced glutathione, GSH), 而其在重金属解毒过程中大量消耗, 也成为导致 GPX 活力不断下降的原因 (Vijayavel *et al.*, 2004)。本研究中, 对照组中华绒螯蟹血淋巴内 CAT 活力要低于 GPX 活力, 表明在正常条件下, 中华绒螯蟹倾向于用 GPX 解除  $H_2O_2$  的毒性, 这与大型蚤中体现主要依靠 CAT 解除  $H_2O_2$  的毒性不同 (Barata *et al.*, 2005), 但与日本沼虾表现一致 (Wang *et al.*, 2004)。0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组 CAT 活力随着暴露时间的延长, 呈现出不断上升的趋势, 表明 CAT 酶也是一种环节  $H_2O_2$  毒性的主要毒性, 尤其是随着处理时间超过 14 天, GPX 活力降低情况下, 不断提升的 CAT 活力成为机体缓解  $H_2O_2$  的过氧化威胁的有效保证, 表明 GPX 和 CAT 作用上具有互补性。Michels 等 (1988) 研究表明, CAT 具有较高的  $K_m$  值, 因此说明在 0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  浓度组中暴露 14 天以上, 血淋巴内的  $H_2O_2$  浓度较高,

机体的氧化压力较大。而在较高的  $Hg^{2+}$  处理组 GPX 和 CAT 活力受到全面抑制, 细胞内线粒体、内质网等细胞器结构, 影响了酶的分泌(Rikans *et al.*, 1997)。由于 GPX 是氧化压力较小的情况的主导酶, 而 CAT 倾向于在机体氧化压力较大的情况下发挥作用, 因此 GPX/SOD、CAT/SOD 经常被用做评价生物体内抗氧化状态的指标(万敏等, 2004; 闫博等, 2007)。

动物机体内活性氧将导致脂质过氧化(Lipid peroxidation)程度加剧。丙二醛(MDA)是最重要的脂质过氧化产物, 是油脂中多元不饱和脂肪酸的过氧化作用产物, 反映了机体脂质过氧化水平的高低, 因此成为衡量机体脂质过氧化程度的重要指标(Lepage *et al.*, 1991)。本研究中不同  $Hg^{2+}$  浓度组中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量均显著高于对照组 MDA 含量, 但是各浓度组 MDA 含量随时间延长变化趋势有所不同。0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组中华绒螯蟹血淋巴 MDA 含量在本研究设置的时间范围内呈现出“低—高一低”的变化趋势, 表明中华绒螯蟹体内自身抗氧化体系能够在一定程度上调控脂质过氧化。Michels 等(1988)认为 GPX 酶与生物脂质过氧化反应有关, 本研究中中华绒螯蟹血淋巴 GPX 的活力在 0.01 和 0.05mg/L 的  $Hg^{2+}$  处理组呈现出“低—高一低”的变化趋势, 与 MDA 含量变动趋于一致, 表明 GPX 对脂质过氧化水平具有调节作用。然而, 随着  $Hg^{2+}$  浓度升高, 毒性作用加强, 导致中华绒螯蟹机体受到损伤, 抗氧化机制受到抑制, 血淋巴 MDA 含量不断上升。与本研究结果类似, 镉暴露引起了泽蟹 *Barytelphusa guerini* 体内 MDA 含量的增加(Venugopal *et al.*, 1997)。

综上所述, 中华绒螯蟹血淋巴 SOD、GPX、CAT 活力以及 MDA 含量能够灵敏反映水体  $Hg^{2+}$  对其的毒性。中华绒螯蟹在短时间能够通过调动体内的抗氧化酶活力等生理机制, 缓解较低浓度的  $Hg^{2+}$  毒性, 然而随着  $Hg^{2+}$  浓度升高, 暴露时间的延长, 机体各机能受到全面抑制, 必将影响其生长发育乃至存活。本实验结果不仅丰富了重金属对甲壳动物毒理学研究内容, 而且为水产养殖中重金属污染检测提供了借鉴。

### 参 考 文 献

- 万 敏, 麦康森, 马洪明等, 2004. 硒和维生素 E 对皱纹盘鲍血清抗氧化酶活力的影响. 水生生物学报, 28(5): 496—503
- 闫 博, 王 兰, 李涌泉等, 2007. 镉对长江华溪蟹肝胰腺抗氧化酶活力的影响. 动物学报, 53(6): 1121—1128
- 孙振兴, 王慧恩, 王 晶等, 2009. 汞、镉、硒对刺参 (*Apostichopus japonicus*) 幼参的单一毒性与联合毒性. 海洋与湖沼, 40(2): 228—234
- 张红霞, 潘鲁青, 刘 静, 2006. 重金属离子对日本蟳血淋巴抗氧化酶(SOD, CAT, GPX)活力的影响. 中国海洋大学学报, 36: 049—053
- 孟紫强, 2000. 环境毒理学. 北京: 中国环境科学出版社, 121—127
- 赵艳民, 王新华, 于 洋等, 2009. 氯化汞对中华绒螯蟹幼蟹蜕皮、生长和存活的影响. 南开大学学报(自然科学版), 42(3): 53—58
- 赵艳民, 王新华, 孙 慧, 2008.  $Hg^{2+}$  在中华绒螯蟹幼蟹鳃的积累及其对组织结构的影响. 动物学杂志, 43(1): 1—7
- 洪美玲, 陈立侨, 顾顺樟等, 2007. 氨氮胁迫对中华绒螯蟹免疫指标及肝胰腺组织结构的影响. 中国水产科学, 14(3): 412—418
- 姚翠鸾, 王志勇, 相建海, 2006. 甲壳动物血细胞及其在免疫防御中的功能. 动物学研究, 27(5): 549—557
- Barata C, Navarro J C, Varo I *et al.*, 2005. Changes in antioxidant enzyme activities, fatty acid composition and lipid peroxidation in *Daphnia magna* during the aging process. Comparative Biochemistry and Physiology B, 140: 81—90
- Bianchini A, Gilles R, 2000. Is the digestive tract an important access route for mercury in the Chinese crab *Eriocheir sinensis* (Crustacea, Decapoda). Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 64: 412—417
- Ebdon L, Pitts L, Cornelis R *et al.*, 2001. Trace element speciation for environment, food and health. Royal Society of Chemistry, 235—236
- Franchet C, 1999. Mercury chloride induces changes in the  $Mg^{2+}$  stimulated membrane currents in oocytes of the prawn *Palaeomon serratus*. Aquatic Toxicology, 47: 1—8
- Lepage G, Munoz G, Champagne J *et al.*, 1991. Preparative steps necessary for the accurate measurement of malondialdehyde by high-performance liquid chromatography. Analytical Biochemistry, 197(2): 277—283
- Lygren B, Hamre K, Waagbo R, 1999. Effects of dietary pro- and antioxidants on some protective mechanisms and health parameters in Atlantic salmon *Salmo salar* L. Journal of Aquatic Animal Health, 11: 211—221
- Michels C, Remackle J, 1988. Use of the inhibition of enzymatic antioxidant systems in order to evaluate their physiological importance. European Journal of Biochemistry, 177: 435—441
- Pan L Q, Zhang H X, 2006. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology C, 144: 67—75
- Rikans L E, Hornbrook K R, 1997. Lipid peroxidation, antioxidant protection and aging. Biochemica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease, 1362: 116—127
- Sridevi S, Reddy K V, Reddy S L N, 1998. Effect of trivalent and

- hexavalent chromium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 61: 384—389
- Stebbing A R D, 1982. Hormesis the stimulation of growth by low levels of inhibitors. Science of Total Environment, 22(1): 213—234
- Venugopal N B R K, Ramesh T V D D, Reddy D S *et al*, 1997. Effect of cadmium on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in a freshwater field crab, *Barytelphusa guerini*. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 59: 132—138
- Vijayavel K, Gomathi R D, Durgabhavani K *et al*, 2004. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*. Marine Pollution Bulletin, 48: 429—433
- Wang W N, Wang A L, Zhang Y J *et al*, 2004. Effects of nitrite on lethal and immune response of *Macrobrachium nipponense*. Aquaculture, 232: 679—686
- Zaman K, McGill R S, Johnson J E *et al*, 1994. An insect model for assessing mercury toxicity: effect of mercury on antioxidant enzyme activities of the housefly (*Musca domestica*) and the cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). Archive of Environmental Contamination and Toxicology, 26: 114—118

## EFFECTS OF Hg<sup>2+</sup> ON ANTIOXIDANT ENZYMATIC ACTIVITIES AND MALONDIALDEHYDE CONTENT IN THE HAEMOLYMPH OF CHINESE MITTEN CRAB *ERIOCHEIR SINENSIS*

ZHAO Yan-Min<sup>1,2,3</sup>, WANG Xin-Hua<sup>3</sup>, QIN Yan-Wen<sup>1,2</sup>, ZHENG Bing-Hui<sup>1,2</sup>

(1. National Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing, 100012; 2. State Environmental Protection Key Laboratory of Estuary and Coastal Environment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing, 100012; 3. College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin, 300071)

**Abstract** The effects of mercury (Hg<sup>2+</sup>) on antioxidant enzymatic activity and MDA content in haemolymph of juvenile Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*, were investigated. The results showed significantly increased in activities of superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GPX), and catalase (CAT) in the groups treated with 0.01 and 0.05mg/L Hg<sup>2+</sup> in a short period of time, which appeared as “Poison-intoxication effect”; however, these antioxidant enzymes decreased in activities with increasing exposure time. In contrast, we found decreased enzyme activities in the presence of 0.20, and 0.30mg/L Hg<sup>2+</sup> regardless on the length of the exposure time. MDA content in haemolymph of crabs exposed to different Hg<sup>2+</sup> concentrations were significantly higher than controls, which appeared as dose and time dependable. Two ways analysis of variance was determined and results showed that both concentration and exposure time of Hg<sup>2+</sup> to these juvenile Chinese mitten crabs had significant effects on these three antioxidant enzymes activities and MDA content. Based on our study, SOD, GPX, and CAT activities and MDA content in haemolymph of *E. sinensis* were sensitive to ambient Hg<sup>2+</sup> and could be used as biomarkers in evaluating the toxicity of mercury or any other heavy metals contamination to crustacean.

**Key words** Hg<sup>2+</sup>, *Eriocheir sinensis*, Haemolymph, SOD, GPX, CAT, MDA