

低浓度锌及其 EDTA 配合物长期暴露对鲫鱼肝脏锌富集及抗氧化系统的影响

刘慧¹, 王晓蓉^{1*}, 王为木², 沈骅¹

(1. 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京大学环境学院, 南京 210093; 2. 河海大学现代农业工程系, 南京 210098)

摘要:选择幼龄鲫鱼为材料, 研究锌(Zn^{2+})及其配合物($Zn-EDTA$)低浓度长期暴露(40d)对鲫鱼(*Carassius auratus*)肝脏锌富集和抗氧化防御系统的影响。结果表明, 鲫鱼肝脏中锌的积累量随锌暴露浓度的升高而增加, 且 Zn^{2+} 处理明显高于 $Zn-EDTA$ 处理。2 种形态锌对鲫鱼肝脏超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)均表现出抑制作用, 其中 Zn^{2+} 暴露浓度与酶活性之间存在着良好的剂量效应关系; Zn^{2+} 在低浓度时对谷胱甘肽转硫酶(GST)有诱导作用, 高浓度时为抑制作用。 $Zn-EDTA$ 对 GST 活性始终产生抑制作用。CAT 与 GPx 对锌暴露比 GST 和 SOD 更为敏感, 适合作为水环境锌污染的早期监测指标。

关键词: Zn^{2+} ; $Zn-EDTA$; 鲫鱼; 抗氧化系统

中图分类号: X18, R994.6 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2005)01-0173-04

Effects of Long Term Exposure of Low Level Zinc and Zn-EDTA Complex on Zinc Accumulation and Antioxidant Defense System in Liver of *Carassius auratus*

LIU Hui¹, WANG Xiao-rong¹, WANG Wei-mu², SHEN Hua¹

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resources Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Department of Agricultural Engineering, Hohai University, Nanjing 210098, China)

Abstract: The effects of low level zinc (Zn^{2+}) and its EDTA complex on zinc accumulation and antioxidant enzymes, such as catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), glutathione S-transferase (GST), glutathione peroxidase (GPx) in the liver of *Carassius auratus* are studied after 40 day exposure. The results show that zinc accumulation is significantly increased with higher zinc concentration. When fish are exposed to Zn-EDTA, the zinc accumulation in the liver of fish increased slightly according to the control. SOD, GST, CAT and GPx activity all decrease with adding to Zn^{2+} and Zn-EDTA in waters. However, the decrease of CAT and GPx activities of fish liver are alleviated with the addition of EDTA. The GST activities increased at lower concentration solutions ($< 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$), however its activities were inhibited at higher Zn^{2+} solution ($> 0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). These results suggest that CAT and GPx are more sensitive to low zinc exposure than SOD and GST, and they can be served as biomarkers of low concentration zinc exposure in aquatic ecosystem.

Key words: Zn^{2+} ; Zn-EDTA; *Carassius auratus*; antioxidant system

抗氧化防御系统的成分可因氧化污染的胁迫而发生改变, 以这些抗氧化防御系统成分变化作为氧化胁迫生化指标的研究正成为毒理学研究的新热点^[1]。SOD、CAT、GPx、GST 等是生物体内的主要保护酶系统。在正常情况下, 几种酶联合清除活性氧自由基, 保护生物免受自由基伤害。重金属化合物的污染是环境污染中较为重要的一类, 可通过食物链影响人类的健康与生命安全。国内外关于锌污染对水生生物的毒性效应以及对植物及哺乳动物抗氧化系统影响的研究报道较多^[2~7], 而对水生生物抗氧化防御系统影响的研究很少。本研究采用在太湖流域广泛养殖的鱼类——鲫鱼(*Carassius auratus*)作为试验对象, 通过室内模拟, 研究低浓度锌及其 EDTA

配合物长期暴露后鲫鱼肝脏抗氧化酶活性的变化, 探讨不同形态锌对鲫鱼抗氧化系统的可能作用机制, 寻求抗氧化指标作为锌污染早期暴露的生物标记的可能性。

1 材料与方法

1.1 仪器与试剂

UV-1600 紫外可见分光光度计(北京瑞利)、Microfuge22 R 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公

收稿日期: 2004-03-04; 修订日期: 2004-07-29

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目(20237010)

作者简介: 刘慧(1972~), 山东龙口人, 博士研究生, 主要从事水生生态毒理学研究。

E-mail: liuhui97@sohu.com

* 通讯联系人

司)、HITACHI Z-8100 原子吸收分光光度计。

氯化锌、Na₂EDTA·2H₂O 购自 Amerco 公司,其余试剂均为国产分析纯或工艺超纯。

1.2 试验材料

以太湖区域重要的养殖鱼类鲫鱼(*Carassius auratus*) 幼体为试验材料,捕自南京市水产研究所禄口养殖基地,体长 9.98cm ± 0.91cm,体重 23.74g ± 6.27g。驯养采用除氯自来水,水温 22.0℃ ± 3.0℃。试验前将鲫鱼驯养 14d,死亡率小于 5%。随机选取个体差异不大、健康活泼的鲫鱼用于暴露试验。

1.3 暴露试验

Zn²⁺和 ZnEDTA 暴露浓度设 5 个水平,分别为 0.05、0.10、0.50、1.00、2.00 mg·L⁻¹,同时设对照组。ZnEDTA 处理运用 MINTEQA 程序^[8],使溶液中有有机配体 EDTA 存在时,ZnEDTA 配合物占总锌浓度 99%以上,用 Na₂EDTA·2H₂O 和氯化锌配制 ZnEDTA 溶液。

在 40L 水族箱中分别加入 20L 试验溶液,每组投鲫鱼 5 尾,暴露时间为 40d。采用静态置换法每天更新溶液 50%,每天投颗粒状饵料一次。

1.4 酶的提取及活性测定

暴露 40d 后,将鲫鱼从水族箱中取出,迅速解剖,将肝脏分离出来,用冰生理盐水漂洗,滤纸吸干,称重后备用。取适量鲫鱼肝脏于玻璃匀浆器内,加入冰冷的 Tris-蔗糖缓冲液(0.01 mol·L⁻¹ Tris,0.25 mol·L⁻¹蔗糖,0.1 mmol·L⁻¹ EDTA, pH7.5),体积为 10:1 (V/W),冰浴下匀浆,匀浆液于 4℃,10 000r·min⁻¹ 冷冻离心 10 min,上清液于 -80℃保存。

表 1 暴露 40d 后鲫鱼肝脏 Zn 的富集量/ mg·kg⁻¹

Table 1 Contents of Zn in fish liver after 40 daies exposure/ mg·kg⁻¹

浓度/ mg·L ⁻¹	0	0.05	0.10	0.50	1.00	2.00
Zn ²⁺	0.15 ± 0.021	0.16 ± 0.015	0.21 ± 0.053 ¹⁾	0.37 ± 0.061 ¹⁾	0.50 ± 0.107 ¹⁾	0.69 ± 0.081 ¹⁾
ZnEDTA	0.15 ± 0.021	0.19 ± 0.075	0.17 ± 0.069	0.18 ± 0.025	0.23 ± 0.054 ¹⁾	0.25 ± 0.067 ¹⁾

1) 与对照组相比较, $p < 0.05$ 。

2.2 Zn²⁺ 及 ZnEDTA 对鲫鱼肝脏 SOD 活性的影响

SOD 是生物体内唯一一种以自由基为底物的酶,其作用底物为 O₂^{-·},可以催化 O₂^{-·} 发生歧化反应生成 H₂O₂,是鱼体内重要的抗氧化酶。鲫鱼暴露于不同浓度、不同形态 Zn 溶液 40d 后,其肝脏中 SOD 活性的变化见图 1。Zn²⁺ 与 ZnEDTA 在试验剂量范围内,对鱼肝中的 SOD 均有抑制,0.10 mg·L⁻¹ 以上浓度组与对照组相比,SOD 活性均有显著降低($p < 0.05$),各暴露组之间的差异不明显。

虽然 SOD 活性受到 Zn²⁺ 及 ZnEDTA 的抑制,

分别测定上清液蛋白质浓度^[9],CAT 活性^[10],SOD 活性^[11],GST 活性^[12],GPx 活力^[13]。

1.5 Zn 的富集量测定

采用硝酸与高氯酸双酸法消化,原子吸收分光光度计测定。

1.6 数据处理

实验所获的结果表示为平均数 ± 标准误差 (Mean ± SD),并用单因素方差分析方法和单边 t 检验法对组间数据进行差异显著性检验, $p < 0.05$,被认为是差异显著。

2 结果与讨论

2.1 Zn²⁺ 及 ZnEDTA 对鲫鱼肝脏中锌富集量的影响

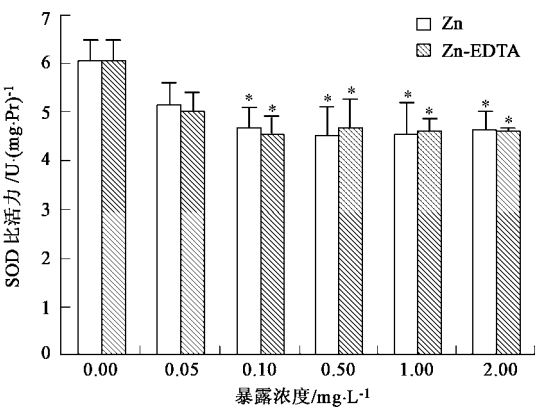
由表 1 可以看出,锌离子暴露 40d 后,鲫鱼肝脏内 Zn 的积累量随着暴露浓度的增加而逐渐升高,其中 0.10 ~ 2.00 mol·L⁻¹ 处理的积累量与对照差异显著,分别为对照组的 1.4 ~ 4.6 倍。暴露浓度(x)与富集量(y)之间存在极显著的直线相关性: $y = 0.2724x + 0.181$, $R^2 = 0.9641$ 。ZnEDTA 溶液暴露 40d 后,鲫鱼肝脏锌的富集量有升高的趋势,与对照相比,分别在 1.00 和 2.00 mg·L⁻¹ 处理时有显著增加,为对照的 1.53 和 1.66 倍。除 0.05 mg·L⁻¹ 浓度组外,ZnEDTA 暴露后鲫鱼肝脏锌的富集量要低于相同浓度的 Zn²⁺ 暴露,暴露浓度(x)与富集量(y)之间存在极显著的直线相关性: $y = 0.0443x + 0.1681$, $R^2 = 0.8348$ 。由以上结果可以看出,EDTA 的加入明显限制鲫鱼肝脏中 Zn 的积累。

但抑制率均在 20% 左右,且在 0.10 mg·L⁻¹ 处理时基本达到平衡,随浓度增加,SOD 活性不再降低。2 种形态锌对 SOD 的影响无显著差异,这可能是由于 Zn 是 SOD 酶的重要组成部分,对 SOD 结构起稳定作用。高锌摄入能使兔子体内环境锌含量提高,SOD 活性持续降低,抑制抗氧化功能^[14]。当体内处于高锌状态时抑制 SOD 活性,导致机体清除 O₂^{-·} 功能降低,机体抗氧化功能减弱。

2.3 Zn²⁺ 及 ZnEDTA 对鲫鱼肝脏 CAT 活性的影响

图 2 显示了 2 种形态锌对鲫鱼肝脏中抗氧化防

御系统 CAT 活性的影响.暴露于 Zn^{2+} 溶液 40d 后, CAT 活性持续受到抑制,且抑制率随浓度的增加而升高; $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上浓度组的 CAT 活性与对照组相比差异显著($p < 0.05$),表明 H_2O_2 在鱼体内的积累足以使 CAT 产生中毒性反应. Zn-EDTA 对鱼肝 CAT 的影响则表现出与 Zn^{2+} 不同的趋势,各 Zn-EDTA 处理 CAT 活性都比对照低. 浓度低于 $0.10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CAT 活性均低于 Zn^{2+} 处理; 浓度高于 $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时均高于 Zn^{2+} 处理. Zn^{2+} 对真鲷幼鱼组织中 CAT 酶活性有抑制作用且有剂量-效应关系^[15], 本文结果与其一致.



* 与对照组相比较, $p < 0.05$, 下同.

图 1 锌及 Zn-EDTA 对鲫鱼肝脏 SOD 活性的影响

Fig. 1 The effects of Zn^{2+} and Zn-EDTA on the activity of SOD

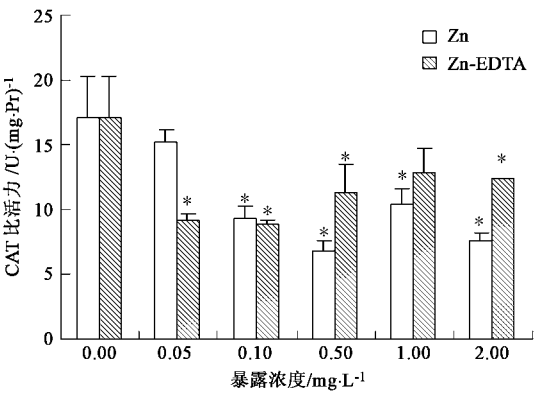


图 2 锌及 Zn-EDTA 对鲫鱼肝脏 CAT 活性的影响

Fig. 2 The effects of Zn^{2+} and Zn-EDTA on the activity of CAT

CAT 在抗氧化系统中的作用是分解清除细胞器中产生的 H_2O_2 . 锌是生物必需元素,但在高浓度时亦能产生毒害作用,而 Zn-EDTA 在低浓度时对 CAT 酶产生抑制作用,可能是因为 CAT 对 Zn-EDTA 更敏感. 当暴露浓度达到 $0.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, CAT 酶活性又开始回升,这可能是由于过量的 EDTA 加入有效地预防锌对 CAT 酶的伤害. 可以看出, CAT 对低浓度的不同形态锌污染反应灵敏,适

合作为一项早期监测指标.

2.4 Zn^{2+} 及 Zn-EDTA 对鲫鱼肝脏 GST 活性的影响

如图 3 所示, Zn^{2+} 对鲫鱼肝脏中的 GST 产生双向效应,在 $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理时为诱导效应,随浓度增大,诱导效应逐渐转为抑制效应,且抑制率逐渐增加,到 $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理时基本达到平衡. $1.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $2.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 GST 活性比对照显著降低. Zn-EDTA 暴露的鲫鱼肝脏中 GST 活性在试验浓度范围内均被抑制. $0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理的抑制率最高,随处理浓度的增加, GST 活性逐渐回升.

GST 主要催化谷胱甘肽与亲电子性物质之间的反应. 当环境中锌离子浓度较低时,鱼体内的 GST 水平可以保证清除脂质过氧化产物. 随着污染胁迫的加重, GST 活性受到短暂激活,以消除更多的氧化产物,随着污染的加重,谷胱甘肽严重耗竭, GST 活性下降. 有研究表明,长期暴露后,金属污染对鱼体肝脏中的生物转化酶 GST 产生显著诱导^[16]. 已有研究表明^[17], EDTA 降低 Zn^{2+} 离子毒性的作用,是通过与其形成络合物,使 Zn^{2+} 离子从可被生物利用的游离态变成不被利用的络合态而产生的.

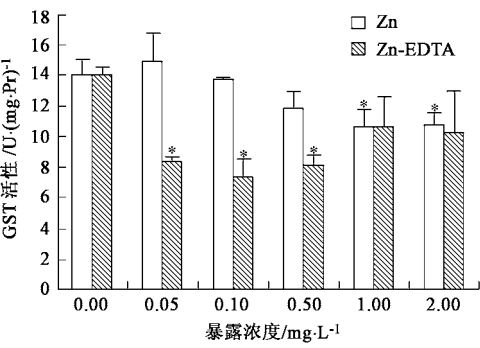


图 3 锌及 Zn-EDTA 对鲫鱼肝脏 GST 活性的影响

Fig. 3 The effects of Zn and Zn-EDTA on the activity of GST

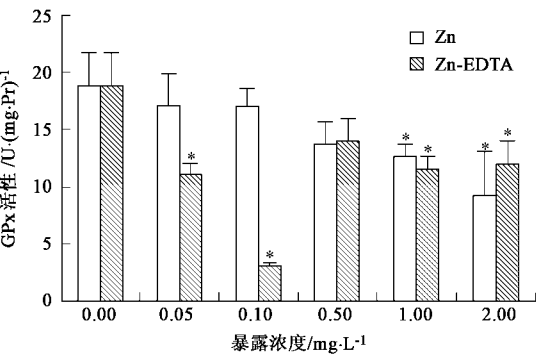
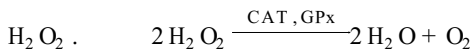


图 4 锌及 Zn-EDTA 对鲫鱼肝脏 GPx 活性的影响

Fig. 4 The effects of Zn^{2+} and Zn-EDTA on the activity of GPx

2.5 Zn^{2+} 及 Zn -EDTA 对鲫鱼肝脏 GPx 活性的影响

与对照组相比,2 种形态的锌暴露均能抑制 GPx 的活性(图 4)。 Zn^{2+} 暴露使 GPx 活性持续受到抑制,且抑制率随处理浓度的升高而增大。GPx 活性(y)与锌离子暴露浓度(x)之间存在极显著的线性负相关: $y = -4.324x + 17.36$, $R^2 = 0.9233$ 。 Zn -EDTA 对 GPx 的抑制作用更强,除 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 外,各处理组均与对照差异显著($p < 0.05$),这与 CAT 的变化一致。在 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露浓度时,抑制率达到最大,为 83.67%。鱼肝中的 GPx 在抗氧化系统中的作用与 CAT 相似,即分解清除细胞器中所产生的



GPx 作为生物体内主要的抗氧化酶之一,在保护细胞膜免受过氧化损伤中有着特殊意义,其功能水平的下降可能造成活性氧的累积,从而对酶蛋白产生破坏或消耗。 Zn^{2+} 在暴露浓度大于 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 GPx 表现出比 Zn -EDTA 更强的抑制作用,鱼体解毒能力随污染程度的增加而降低。而低浓度的 Zn -EDTA 对 GPx 的活性抑制大于 Zn^{2+} ,其原因需进一步深入研究。

3 结论

(1) Zn 暴露 40d 后,鲫鱼肝脏 Zn 的积累量随着暴露浓度的增加而逐渐升高,其中 $0.10 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Zn^{2+} 处理的积累量均高于 Zn -EDTA 处理,且与对照相比,均显著增加($p < 0.05$)。 Zn -EDTA 暴露浓度为 $1.00 \sim 2.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,肝脏内 Zn 的积累量显著增加。EDTA 的加入抑制了锌在鲫鱼肝脏中的积累。

(2) 鲫鱼肝脏内超氧化物歧化酶(SOD)的活性受到锌暴露的抑制,酶活抑制率均在 20% 左右,且 2 种形态锌对 SOD 的影响无显著差异。

(3) 2 种形态锌对 CAT 均产生抑制作用。暴露于 Zn^{2+} 溶液 40d 后,CAT 活性持续受到抑制。浓度低于 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, Zn -EDTA 处理的鱼肝中 CAT 活性均小于 Zn^{2+} 处理;浓度升高至 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上时, Zn -EDTA 处理的鱼肝中 CAT 活性均高于 Zn^{2+} 处理。

(4) Zn^{2+} 对鲫鱼肝脏中的 GST 产生双向效应, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时即有诱导,随处理浓度的升高,诱导转为抑制,且抑制率逐渐增大。 Zn -EDTA 暴露的鲫鱼肝脏中 GST 活性在试验浓度范围内均被抑制,但

随着处理浓度的升高,GST 活性呈回升的趋势。

(5) Zn^{2+} 暴露使 GPx 活性持续受到抑制,且抑制率随处理浓度的升高而增大,这与 CAT 的变化趋势一致。 Zn^{2+} 在暴露浓度大于 $0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对 GPx 表现出比 Zn -EDTA 更强的抑制作用。在浓度低于 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,GPx 对 Zn -EDTA 更敏感。

(6) 抗氧化酶从分子水平上反映了污染物对鱼肝脏细胞的损伤,CAT 和 GPx 活性与 Zn^{2+} 暴露浓度之间存在良好的剂量-效应关系,可以考虑作为锌对水生生物早期伤害的预警指标。上述 4 种抗氧化酶能否作为重金属暴露的生物标记物,还需同时考虑污染物的种类、形态、浓度以及试验动物等因素的综合影响。

参考文献:

- [1] Burgeot T, Bocquene G, Porte C, et al. Bioindicators of pollutant exposure in the north western mediterranean sea [J]. Marine Ecology Progress Series, 1996, 131: 125 ~ 141.
- [2] Gail M, Dethloff, Daniel Schlenk. Alterations in physiological parameters of rainbow trout (*oncorhynchus mykiss*) with exposure to copper and copper/zinc mixtures [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1999, 42: 253 ~ 264.
- [3] Clearwater, Susan J, Farag AM, Meyer JS. Bioavailability and toxicity of dietborne copper and zinc to fish [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2002, 132 (3): 269 ~ 313.
- [4] 周新文, 朱国念, 孙锦荷. Cu, Zn, Pb, Cd 及其混合重金属离子对鲫鱼 DNA 甲基化水平的影响 [J]. 中国环境科学, 2001, 21 (6): 549 ~ 552.
- [5] 徐勤松, 施国新, 杜开和, 等. Zn 诱导的苜蓿叶抗氧化酶活性的变化和超微结构损伤 [J]. 植物研究, 2001, 21 (4): 569 ~ 573.
- [6] Madhava Rao KV, Sresty TV. Antioxidative parameters in the seedlings of pigeonpea (*cajanus cajan* L. Millspaugh) in response to Zn and Ni stresses [J]. Plant Science, 2000, 157: 113 ~ 128.
- [7] Buzadzie B, Korac B, Lazic T, et al. Effect of supplementation with Cu and Zn on antioxidant enzyme activity in the rat tissues [J]. Food Research International, 2002, 35: 217 ~ 220.
- [8] Everett AJ. Chemical modeling in aqueous systems [M]. Washington DC: Oxford University Press, 1979.
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 ~ 254.
- [10] 徐镜波, 袁小凡, 郎佩贞. 过氧化氢酶活性及活性抑制的紫外分光光度法测定 [J]. 环境化学, 1997, 16 (1): 73 ~ 76.
- [11] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌, 等. 一种 SOD 的测定方法——邻苯三酚自氧化法的改进 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, 4: 71 ~ 73.
- [12] Habig WH, Pabst MJ, Jacoby WB. Glutathione S-transferases, the first enzymatic step in the mercapturic acid formation [J]. J Biol. Chem., 1974, 249: 7130 ~ 7139.
- [13] 夏奕明. 血和组织中谷胱甘肽过氧化物酶活力测定-DTNB 直接法 [J]. 卫生研究, 1987, 16 (4): 29 ~ 31.
- [14] 相有章, 杨晓霞, 边建朝, 等. 葡萄糖酸锌对铜代谢及氧化功能的试验研究 [J]. 微量元素与健康研究, 2001, 18 (2): 1 ~ 3.
- [15] 戴家银, 郑微云, 王淑红. 铜和锌离子对真鲷幼鱼组织酶活性的影响 [J]. 环境科学, 1998, 19 (5): 60 ~ 62.
- [16] Chen Guosheng, Xu Ying, Xu Lihong, et al. Influence of dioxin and metal-contaminated sediment on phase I and II biotransformation enzymes in silver crucian carp [J]. Ecotoxicology Environmental Safety, 1998, 40: 234 ~ 238.
- [17] 柴敏娟, 陈荣, 顾勇, 等. EDTA 对罗非鱼嗅觉的影响及其解毒作用 [J]. 台湾海峡, 1998, 17 (4): 462 ~ 267.