

铜和锌离子对真鲷幼鱼组织酶活性的影响*

戴家银 郑微云 王淑红

(厦门大学环境科学研究中心国家教委海洋生态环境研究开放实验室, 361005 E-mail: meerl @ jingxian. xmu. edu. cn)

摘要 研究水中 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼组织 CAT、GPT、胃蛋白酶活性的影响. 结果表明: 真鲷幼鱼暴露于不同浓度 Cu^{2+} (0.5, 0.75, 1.5 mg/L)、 Zn^{2+} (1, 2, 4 mg/L) 海水中 4d 后, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对鳃、肝脏 CAT, 胃蛋白酶都有抑制作用. 当 Cu^{2+} 浓度最大时, 对鳃、肝脏 CAT, 胃蛋白酶抑制率分别为 73%、34% 和 42.8%; 当 Zn^{2+} 浓度最大时, 对 3 种酶活性的抑制率分别为 30%、68.5% 和 32.8%. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 尤其可使真鲷肝脏 GPT 活性显著降低, 当 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度最大时, 肝脏 GPT 活性分别是对照组的 24% 和 33%. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼组织中 3 种酶活性的抑制作用均有剂量-效应关系.

关键词 铜, 锌, 真鲷, CAT, GPT, 胃蛋白酶.

Effects of Copper and Zinc Ions on Activities of Enzymes in Tissues of Red Sea Bream *Pagrosomus major* Juvenile

Dai Jiayin Zheng Weiyun Wang Shuhong

(Environ. Sci. Res. Centre, Xiamen University, Xiamen 361005 E-mail: meerl @ jingxian. xmu. edu. cn)

Abstract This paper reported the effects of Cu^{2+} and Zn^{2+} on activities of catalase (CAT), glutamic-pyruvic transaminase (GPT) and pepsin in the tissues of red sea bream *P. major*. Red sea breams were exposed to different concentrations of cupric sulfate solution (0.5, 0.75, 1.5 mg/L) and zinc sulfate solution (1, 2, 4 mg/L) for 4 days. The results showed that the CAT activities in gill and liver and pepsin activities were inhibited by Cu^{2+} and Zn^{2+} . At the highest Cu^{2+} concentration groups, the CAT activities in gill and in liver and pepsin activities decreased 73%, 33% and 42.8% in relation to control, respectively, while at the highest Zn^{2+} concentration groups, the CAT, GPT and pepsin activities decreased 30%, 68.5% and 32.8% in relation to control, respectively. The GPT activities of liver in *P. major* decreased at all exposure groups. The GPT activities of liver decreased 76% and 67% in relation to control at highest Cu^{2+} and Zn^{2+} concentration groups, respectively. The effects of Cu^{2+} and Zn^{2+} on the CAT, GPT and pepsin had concentration-response relationship.

Keywords copper, zinc, *Pagrosomus major*, CAT, GPT, pepsin.

已有研究表明重金属对鲷科鱼类早期发育阶段的存活率有很大影响^[1-4]. 但这类研究多数集中在确定重金属的急性、亚急性致死浓度以及测定鱼类体内重金属积累等方面. 而有关重金属对真鲷幼鱼生化毒理学研究较少. Ryosuke (1993)^[5]曾研究镉离子对真鲷的毒性动力学. 本文研究了海水中铜、锌离子对真鲷 (*Pagrosomus major*) 幼鱼组织中过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷丙转氨酶 (glutamic-pyruvic transaminase, GPT)、胃蛋白酶 (pepsin) 活

性的影响, 可为海洋鱼类环境监测、污染物排放提供参考.

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用鱼 (体长平均 13cm, 体重平均 66g) 由厦门火烧屿养殖场提供, 暂养 3d 后开始实

* 福建省自然科学基金资助项目: (Project Supported by Natural Science Foundation of Fujian Province): C95003
戴家银: 男, 32 岁, 南京大学环境科学与工程系博士生
收稿日期: 1997-12-16

验. 实验用海水经砂滤后从管道输到各水池(池体积为 1m^3). 实验海水铜、锌本底值分别为 $0.4\mu\text{g/L}$ 、 $6.5\mu\text{g/L}$, 其盐度为 26‰ — 28‰ , 水温度 25 — 27 , pH 为 8.01 — 8.04 . 铜、锌 2 种重金属分别设 3 个浓度组, 1 个对照组, 同时进行平行试验. 每池盛海水 600L , 放真鲷幼鱼 6 尾. 实验期间 2d 换 1 次水, 为防止饵料的吸收作用, 实验过程中不喂食, 连续充气. 用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (A. R.), $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (A. R.) 配成含 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 分别为 8mg/ml 的贮备液, 实验时分别用海水稀释成含 Cu^{2+} 为 0.5 、 0.75 、 1.5mg/L 3 个浓度组, 含 Zn^{2+} 为 1 、 2 、 4mg/L 3 个浓度组. 4d 后将鱼取出, 用滤纸吸干体表海水, 分别取鳃、肝脏(分 2 份)、胃, 再用滤纸吸干后称重, 迅速冷冻以备实验用.

1.2 酶活性测定

(1) CAT 活性测定 取鳃、肝脏样品分别加 7ml 预冷的 0.25mol/L 蔗糖在匀浆器内研磨, 然后在 1500r/min 条件下离心 5min . 取上清液, 用 0.25mol/L 蔗糖稀释成一定倍数, 保持在 1 — 4 待用. 酶活性的测定方法按文献 [6]. 酶单位以单位时间酶促分解 H_2O_2 的微克

分子数表示($\mu\text{mol/min}$).

(2) GTP 活性测定 取真鲷肝脏加 7ml 预冷的蒸馏水在匀浆器内研磨, 浆液在 4 下以 6000r/min 离心 30min . 取上清液, 稀释适当倍数后, 放置 4 冰箱待测酶活性. 酶活性的测定方法同文献[7]. 酶活性单位以每 g 组织每 min 分解氨基酸产生丙酮酸的微克分子数($\mu\text{mol/g} \cdot \text{min}$) 表示.

(3) 胃蛋白酶活性的测定 取真鲷胃加 5ml 预冷蒸馏水在匀浆器内研磨, 在 4 下以 6000r/min 离心 20min , 取上清液备用. 酶活性的测定按文献[8]方法进行. 上清液蛋白质含量测定, 以酪蛋白为标准, 用双缩脲法测定. 酶的比活力定义为每 mg 蛋白在 37 下每 min 水解酪蛋白产生 $1\mu\text{g}$ 酪氨酸为一个蛋白酶比活力单位, 即活力单位/ mg 蛋白.

2 结果

2.1 对真鲷幼鱼组织 CAT 活性的影响

真鲷幼鱼分别暴露于不同浓度 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 海水 4d 后, 测定鳃、肝脏 CAT 活性, 结果表明: 各暴露组 CAT 活性显著降低(见表 1).

表 1 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼鳃、肝脏 CAT 活性的影响($\bar{X} \pm S$)

$\text{Cu}^{2+} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	酶活性/ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$		$\text{Zn}^{2+} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	酶活性/ $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1}$	
	鳃	肝脏		鳃	肝脏
对照组	$349 \pm 34(0)$	$3430 \pm 16.1(0)$	对照组	$349 \pm 34(0)$	$3430 \pm 16.1(0)$
0.5	$251 \pm 27(29)$	$2867 \pm 8.9(17)$	1	$301 \pm 9(14)$	$2545 \pm 22.3(25.9)$
0.75	$122 \pm 17(65)$	$2511 \pm 11.8(27)$	2	$248 \pm 17(20)$	$1316 \pm 20.0(60.2)$
1.5	$95 \pm 13(73)$	$2266 \pm 10.7(34)$	4	$245 \pm 18(30)$	$1080 \pm 14.5(68.5)$

1) 样品数 $n=6$, 括号内数字为抑制率(%)

从表 1 中可以看出, 对照组中肝脏 CAT 活性是鳃的 10 倍. 在 Cu^{2+} 暴露组中, Cu^{2+} 对真鲷幼鱼鳃、肝 CAT 均有抑制作用, 并随 Cu^{2+} 浓度增加而增强. 所有浓度组中, Cu^{2+} 对鳃 CAT 的抑制作用大于对肝 CAT 的抑制. 当 Cu^{2+} 浓度为 1.5mg/L 时, 对鳃 CAT 抑制率达 73% , 而此浓度对肝 CAT 抑制率为 34% .

Zn^{2+} 对真鲷幼鱼鳃、肝脏 CAT 也有抑制作用, 并随着 Zn^{2+} 浓度增加而增强. 当 Zn^{2+} 浓度达 4mg/L 时, 对鳃 CAT 抑制率为 30% , 但对肝 CAT 抑制率达 68.5% . 在所有 3 个浓度组中, Zn^{2+} 对鳃 CAT 的抑制作用均小于对肝

CAT 的抑制作用.

2.2 对真鲷幼鱼肝脏 GPT 活性的影响

真鲷暴露于不同浓度 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 溶液 4d 后, 肝脏 GPT 活性都显著下降(见表 2).

表 2 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼肝脏 GPT 活性的影响($\bar{X} \pm S$)¹⁾

Cu^{2+}	GPT 活性		$\text{Zn}^{2+} / \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	GPT 活性	
	$/ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$	$/ \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$		$/ \mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$	
对照组	456.5 ± 18.77		对照组	456.5 ± 18.77	
0.5	335.8 ± 12.89		1	418.2 ± 21.17	
0.75	224 ± 16.8		2	313 ± 15.84	
1.5	109.8 ± 11.3		4	205.8 ± 31.51	

1) 样品数 $n=6$

从表2可以看出,真鲷幼鱼肝脏GPT活性受 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 影响显著降低.当 Cu^{2+} 浓度为1.5mg/L时,GPT活性降到对照组的24%.当 Zn^{2+} 浓度为4mg/L时,GPT下降至对照组的

45%.并均有剂量-效应关系.并且, Cu^{2+} 使真鲷幼鱼肝脏GPT活性降低比 Zn^{2+} 更显著.

2.3 对真鲷幼鱼胃蛋白酶活性影响

胃蛋白酶活性变化的测定结果见表3.

表3 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼胃蛋白酶活性的影响($\bar{X} \pm S$)¹⁾

Cu^{2+} 浓度			Zn^{2+} 浓度		
/mg · L ⁻¹	比活力 /μmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹	抑制率/%	/mg · L ⁻¹	比活力 /μmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹	抑制率/%
对照组	12.8 ± 0.25	0	对照组	12.8 ± 0.25	0
0.5	10.1 ± 0.10	21.1	1	11.4 ± 0.09	11
0.75	9.2 ± 0.23	28.2	2	9.8 ± 0.18	23.4
1.5	7.32 ± 0.12	42.8	4	8.6 ± 0.15	32.8

1)样品数 n= 6

从表3可以看出,随着 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度增加,对胃蛋白酶抑制率也增加.当 Cu^{2+} 浓度为1.5mg/L时,抑制率达42.8%; Zn^{2+} 浓度为4mg/L时,抑制率为33%.2种金属离子相比, Cu^{2+} 抑制作用比 Zn^{2+} 的抑制作用大.

3 讨 论

本实验结果表明:真鲷幼鱼肝脏CAT活性较强,而鳃CAT活性相对较弱. Cu^{2+} 对真鲷幼鱼鳃CAT的抑制大于对肝脏CAT的抑制,而 Zn^{2+} 对鳃CAT的抑制小于对肝脏CAT的抑制.这可能是不同离子在不同器官吸收的差异所造成.铜、锌各暴露浓度中真鲷幼鱼肝脏GPT显著下降, Cu^{2+} 使真鲷幼鱼肝脏GPT活性降低比 Zn^{2+} 更显著.2种离子对真鲷幼鱼胃蛋白酶也具有抑制作用,其中 Cu^{2+} 的抑制作用比 Zn^{2+} 的抑制作用强.蓝伟光^[9]等研究了铜、锌离子对真鲷幼鱼肝脏碱性磷酸酶活性的影响.结果表明当 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 浓度分别为0.1和0.5mg/L时,会抑制碱性磷酸酶活性,其中, Cu^{2+} 抑制作用比 Zn^{2+} 抑制作用大.汤鸿等^{*}实验结果表明, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对锯缘青蟹和斑节对虾蛋白酶均有较强的抑制作用,且 Cu^{2+} 的抑制作用比 Zn^{2+} 大.这些结果都与 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼的96h的半数致死浓度 $\text{Cu}^{2+} < \text{Zn}^{2+}$ 的结果相一致^[10],说明 Cu^{2+} 的毒性比 Zn^{2+} 大.蓝伟光等^[11]还报道,真鲷仔鱼对铜的安全浓度为7μg/ml,锌为44μg/ml.但本实验 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 所

有浓度组均未出现鱼的死亡现象,这说明真鲷在不同生长期对重金属的耐受阈值有很大的差异.真鲷早期发育阶段对重金属极为敏感,对水质的要求较高.随着真鲷生长发育,对重金属的耐受性也逐渐增强.在本实验条件下, Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对真鲷幼鱼组织中CAT、GPT和胃蛋白酶活性均有抑制作用且有剂量-效应关系.据此笔者认为,如果养殖海域中重金属超标,会抑制胃蛋白酶等酶活性,从而会影响真鲷蛋白质的消化作用,使生长迟缓.

本实验 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 暴露浓度均小于96h LC₅₀值.可见当真鲷幼鱼还未出现死亡时,其酶活性已明显受到影响,表明酶活性是一个更能准确反映污染物对生物体造成影响的指标.

参 考 文 献

1 孙耀,陈超.汞、锌、铅对黑鲷胚胎发育的影响.海洋科学,1988,3:54—56

2 孙耀等.盐度对真鲷胚胎发育阶段十二烷基磺酸钠致毒效应的影响.海洋环境科学,1993,12(2):18—21

3 陈聚发,陈民山.盐度影响铬对真鲷毒性的实验研究.海洋环境科学,1992,11(3):60—63

4 Fukuhara O. Functional morphology and behavior of early life stages of reabream. Bull. Jan. Soc. Sci. Fish, 1985, 51: 731—743

5 Ryosuke K, Sekio K et al. Kinetic analysis of cadmium toxicity of red bream, *Pagrosomus major*. Ecotoxicol. Environ. Safety, 1993, 25(3): 300—314

6 丁树荣等.环境生物学实验技术与方法.南京:南京大学出版社,1989:85—89

7 北京大学生物学系生化教研室.生化实验指导.北京:高等教育出版社,1984:179—182

8 刘玉梅等.中国对虾幼体和仔虾消化酶活性及氨基酸组成的研究.海洋与湖泊,1991,22(6):571—575

9 蓝伟光等.重金属对真鲷生理生化作用的研究.海洋学报,1993,15(1):92—97

10 郑微云等.铜、镉、锌等重金属对真鲷仔鱼的急性毒性研究.厦门大学学报.(自然科学版),1995(增刊):45—50

11 蓝伟光等.汞、铜、锌等真鲷仔鱼的急性毒性研究.第三届国际海洋水产专家会议(东中国海学术讨论会)论文集.1990(2—3):31—36

* 汤鸿.锯缘青蟹胚胎和幼鱼消化酶与碱性磷酸酶活性的实验研究(博士论文).厦门大学:1995:65—67