

Cd²⁺ 对长江华溪蟹谷胱甘肽系统的影响

刘娜, 闫博, 李涌泉, 王茜, 王兰*

(山西大学生命科学与技术学院, 太原 030006)

摘要: 采用急性毒性方法, 研究了 Cd²⁺ 对长江华溪蟹 (*Sinopotamon yangtsekiense*) 肝胰腺和鳃谷胱甘肽系统的影响. Cd²⁺ 浓度设置为 7.25、14.5、29、58 和 116 mg/L, 同时设对照组. 分别在 24、48、72 和 96 h 用分光光度法测定了还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSG)含量, 谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)和谷胱甘肽还原酶(GR)活力以及 GSH/GSSG 比值. 结果显示, 随着 Cd²⁺ 浓度的增加和处理时间的延长, 肝胰腺中 GSH 含量呈现逐渐降低的趋势, 在 96 h、Cd²⁺ 浓度 116 mg/L 时 GSH 含量降至最低值(28.805 ± 2.239) mg/g; GPx 活力先升后降; GSSG 含量和 GST 与 GR 活力均无显著变化. 鳃中 GSH、GSSG 含量和 GPx 活力的变化趋势与肝胰腺基本一致, GST 和 GR 活力则随着 Cd²⁺ 浓度的增大和处理时间的延长逐渐降低, 在 96 h、Cd²⁺ 浓度 116 mg/L 时 GST 和 GR 活力较对照组分别下降了 44% 和 79%. 肝胰腺和鳃中 GSH/GSSG 比值随着 Cd²⁺ 浓度的增大和处理时间的延长逐渐降低. 结果表明, Cd²⁺ 对 GSH 和 GSSG 含量, GPx、GST、GR 活力均产生了不同程度的影响; GSH/GSSG 比值的变化能灵敏反映 Cd²⁺ 对水生动物的胁迫程度及毒性大小, 可作为一种准确敏感的生物学指标用以指示 Cd²⁺ 污染.

关键词: 长江华溪蟹; 肝胰腺; 鳃; 谷胱甘肽系统; Cd²⁺

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2008)08-2302-06

Effects of Cd²⁺ on Glutathione System of Hepatopancreas and Gills in Freshwater Crab *Sinopotamon yangtsekiense*

LIU Na, YAN Bo, LI Yong-quan, WANG Qian, WANG Lan

(College of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Laboratory experiment was carried out to determine the oxidative status in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* exposed to Cd²⁺ (7.25, 14.5, 29, 58 and 116 mg/L) for different treating times (24, 48, 72 and 96 h). The indexes were measured in the hepatopancreas and gills of the crab, which include the levels of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG), the activities of glutathione peroxidase (GPx), glutathione S-transferase (GST) and glutathione reductase (GR), as well as the ratio of GSH/GSSG. In the hepatopancreas, there was a gradual decrease in the level of GSH and it was (28.805 ± 2.239) mg/g at 116 mg/L for 96 h while there was an initial elevation and later decrease in the activity of GPx which associated with no significant differences in the level of GSSG and the activities of GST and GR compared with controls. In the gills, with the increase of concentration of Cd²⁺ and duration in treatment, the level of GSH was decreased gradually while there was no pronounced change of the level of GSSG. The activity of GPx was enhanced notably and then was reduced, and the activities of GST and GR were decreased by 44% and 79% after exposed to Cd²⁺ for 96 h. There were evident reduction in the ratio of GSH/GSSG in both hepatopancreas and gills. The results demonstrated that the changes in the studied indicators of oxidative stress (GSH, GSSG, GPx, GST, GR and GSH/GSSG ratio) may sensibly reflect the oxidative stress to aquatic animal induced by Cd²⁺ and the GSH/GSSG ratio could be considered as a biological monitoring index of the pollution induced by Cd²⁺ in aquatic ecosystems.

Key words: *Sinopotamon yangtsekiense*; hepatopancreas; gills; glutathione system; Cd²⁺

Cd²⁺ 的毒性很强, 对环境危害极大, 可以通过食物链转移^[1], 并在生物体内蓄积, 急性和亚慢性接触会导致人和动物的多系统损害及组织器官损伤, 在生理生化方面产生毒性影响^[2,3]. Cd²⁺ 极易进入组织细胞, 并能够与多种关键性代谢酶活性中心的巯基(—SH)结合, 引起酶空间构象改变, 导致酶活力下降及代谢紊乱^[4]. 许多研究认为, Cd²⁺ 与氧化损伤密切相关, 通过膜脂质过氧化或改变机体的抗氧化系统而诱发不同组织的氧化损伤^[5~7]. 对鱼类和哺乳动物的研究表明, Cd²⁺ 可以改变抗氧化酶的活力, 降低细胞对自由基及其产物的清除能力^[8,9].

谷胱甘肽系统是生物体内主要的抗氧化防御体

系^[10]. 还原型谷胱甘肽(GSH)是重要的抗氧化剂, 在解毒代谢中起重要作用. 谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)和谷胱甘肽硫转移酶(GST)可将过氧化物在 GSH 的作用下转化成毒性较小的羟基衍生物, GSH 则在此过程中被氧化为氧化型谷胱甘肽(GSSG), 而 GSSG 可由谷胱甘肽还原酶(GR)催化重新还原为 GSH^[11]. 这 5 种生理指标密切联系且相互影响, 共同

收稿日期: 2007-08-14; 修订日期: 2007-11-19

基金项目: 国家自然科学基金项目(30570194); 山西省自然科学基金项目(20041082)

作者简介: 刘娜(1982~), 女, 硕士研究生, 主要研究方向为环境污染生物学与基因调控, E-mail: liuna198236@163.com

* 通讯联系人, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

抵御氧化胁迫以防止机体受到氧化损伤.此外, GSH/GSSG 比值作为评价细胞内氧化还原状态和氧化胁迫的生物标志^[12], 其变化可以反映机体受氧化损伤的程度, 因而日益受到研究者的广泛关注. 目前国内外对动植物谷胱甘肽系统已有大量研究^[13~15], 但对甲壳动物的研究报道却比较少.

蟹类栖息于水底, 对污染物的敏感性很高, 是水环境污染监测的理想指示生物^[16, 17]. 本课题组在前期研究中已发现, 长江华溪蟹 (*Sinopotamon yangtsekiense*) 肝胰腺和鳃是 Cd²⁺ 积累的主要器官^[18, 19]. 在此基础上, 本实验就 Cd²⁺ 对肝胰腺和鳃组织谷胱甘肽系统各项指标 (GSH 和 GSSG 含量、GSH/GSSG 比值与 GPx、GST、GR 活力) 的影响进行了全面系统的研究, 并综合分析了各项指标之间的关系, 以避免单一指标的片面性. 目的在于进一步深入了解 Cd²⁺ 对谷胱甘肽系统毒性影响的程度及致毒机制, 以为名特优水产品的安全养殖和水质监测提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

长江华溪蟹(溪蟹), 于 2006 年 9 月购自太原市东安水产批发市场, 置实验室水族缸 (130 cm × 50 cm × 60 cm) 中暂养 2 周后进行毒性实验.

1.1.2 实验试剂

氯化镉 (CdCl₂) 为分析纯. GSH、GSSG、GPx、GST 和 GR 试剂盒均购自于南京建成生物公司.

1.2 实验方法

1.2.1 实验浓度设置与染毒条件

首先, 通过 Cd²⁺ 对溪蟹的急性毒性实验, 用概率单位法求得 96 h 的 LC₅₀ 为 232 mg/L. 其次, 根据 LC₅₀ 的 1/32、1/16、1/8、1/4、1/2 设置 5 个处理组, 同时设对照组. Cd²⁺ 浓度为 7.25、14.5、29、58 和 116 mg/L; 处理时间为 24、48、72 和 96 h. 最后, 随机选取平均体重为 (20.2 ± 2.5) g 的个体, 置处理缸 (50 cm × 30 cm × 20 cm) 中, 每缸 18 只. 分别加入 2.1 L 不同浓度的 Cd²⁺ 溶液于处理组中, 曝气后的自来水加入对照组中, 每组设 3 个重复, 处理期间不喂食. 实验用水为曝气 48 h 的自来水, 水温 16 ~ 20℃, pH 6.8, 溶氧量 6 mg/L 以上.

1.2.2 样品制备

活体解剖溪蟹, 迅速取出肝胰腺和鳃, 称重后按 m:v = 1:3 比例加入预冷的生理盐水匀浆, 匀浆液

冰冻离心 10 min (10 000 r/min), 取上清液 - 20℃ 冷冻保存.

1.2.3 谷胱甘肽含量和酶活力测定

GSH、GSSG 含量和 GPx、GST、GR 活力的测定均使用试剂盒; GSH/GSSG 比值由实验结果 GSH 与 GSSG 的含量相比即得. GSH、GSSG 含量用每 g 蛋白中 mg GSH、GSSG 表示; GPx 和 GST 活力用每 mg 蛋白的酶活单位 (U) 表示, GR 活力用每 g 蛋白的酶活单位 (U) 表示.

1.2.4 蛋白质含量测定

采用 Bradford 方法^[20], 以牛血清白蛋白为标准蛋白.

1.3 数据处理

实验结果用平均值 ± 标准差 (mean ± SD) 表示, 利用 SPSS11.0 软件统计分析, 检验实验数据的正态分布性, 采用单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 并应用 Dunnett 法将处理组与相应对照组进行比较, p < 0.05 为差异显著, p < 0.01 为差异极显著.

2 结果与分析

2.1 Cd²⁺ 对长江华溪蟹肝胰腺谷胱甘肽系统的影响

2.1.1 Cd²⁺ 对肝胰腺 GSH 和 GSSG 含量的影响

如表 1 所示, 随 Cd²⁺ 浓度的增加和处理时间的延长, 肝胰腺 GSSG 含量未发生显著变化, 但 GSH 含量则显著下降, 在 96 h、Cd²⁺ 浓度 116 mg/L 时 GSH 含量降到最低值 (28.805 ± 2.239) mg/g.

2.1.2 Cd²⁺ 对肝胰腺 GSH/GSSG 比值的影响

从表 1 得知, GSH/GSSG 比值随着 Cd²⁺ 浓度的升高和处理时间的延长而逐渐降低, 与对照组相比差异显著或极显著 (p < 0.05 或 p < 0.01).

2.1.3 Cd²⁺ 对肝胰腺 GPx、GST 和 GR 活力的影响

图 1 显示, GPx 活力随着 Cd²⁺ 浓度的增大呈现先升后降的趋势. 当 48 h、Cd²⁺ 浓度 7.25 mg/L 时, GPx 活力升至最大值 (44.312 ± 1.480) U/mg. 96 h 时, 随着 Cd²⁺ 浓度的增加 GPx 活力逐渐下降.

GST 和 GR 活力变化与对照组相比均无显著差异 (见图 2 ~ 3).

2.2 Cd²⁺ 对长江华溪蟹鳃组织谷胱甘肽系统的影响

2.2.1 Cd²⁺ 对鳃组织 GSH 和 GSSG 含量的影响

从表 2 看出, 处理 24 h, 仅 Cd²⁺ 浓度 58 mg/L 中的 GSH 含量有所下降. 在 48、72 和 96 h, GSH 含量随着 Cd²⁺ 浓度的增加显著下降 (p < 0.05). 而 GSSG 含量除在 24 h、Cd²⁺ 浓度 58 mg/L 中有显著下降 (p < 0.05) 之外, 其它时间段均未发生显著变化.

表 1 Cd²⁺ 对长江华溪蟹肝胰腺 GSH 和 GSSG 含量与 GSH/GSSG 比值的影响¹⁾(mean ± SD, n = 3)

Table 1 Effects of Cd ²⁺ on GSH, GSSG levels and GSH/GSSG ratio in hepatopancreas of <i>S. yangtsekiense</i> (mean ± SD, n = 3)				
处理时间/h	Cd ²⁺ 浓度/mg•L ⁻¹	GSH 含量/mg•g ⁻¹	GSSG 含量/mg•g ⁻¹	GSH/GSSG
24	0	45.319 ± 0.695	0.195 ± 0.017	233.498 ± 22.415
	7.25	45.067 ± 0.945	0.197 ± 0.021	230.953 ± 30.781
	14.5	43.290 ± 0.948	0.185 ± 0.009	234.995 ± 16.907
	29	41.450 ± 0.562 *	0.178 ± 0.016	234.024 ± 19.558
	58	37.901 ± 1.749 * *	0.199 ± 0.025	191.687 ± 19.042
	116	33.476 ± 2.365 * *	0.201 ± 0.012	167.609 ± 21.099 *
48	0	45.672 ± 0.917	0.198 ± 0.016	231.385 ± 21.195
	7.25	44.896 ± 1.222	0.195 ± 0.011	230.500 ± 18.203
	14.5	43.228 ± 1.520	0.188 ± 0.027	232.457 ± 27.178
	29	40.874 ± 1.075 * *	0.184 ± 0.031	226.085 ± 40.093
	58	36.120 ± 1.028 * *	0.203 ± 0.010	178.620 ± 12.924
	116	30.536 ± 0.760 * *	0.197 ± 0.022	156.207 ± 20.124 *
72	0	44.427 ± 0.687	0.199 ± 0.027	226.166 ± 36.341
	7.25	44.382 ± 0.572	0.188 ± 0.019	238.080 ± 24.226
	14.5	41.868 ± 0.278 *	0.186 ± 0.013	226.318 ± 17.430
	29	39.640 ± 0.994 * *	0.177 ± 0.025	226.567 ± 33.533
	58	31.393 ± 1.227 * *	0.188 ± 0.010	167.510 ± 15.060 *
	116	29.731 ± 1.193 * *	0.207 ± 0.011	143.815 ± 7.363 * *
96	0	45.479 ± 0.824	0.193 ± 0.020	237.063 ± 26.868
	7.25	43.931 ± 1.122	0.193 ± 0.019	229.476 ± 28.213
	14.5	41.167 ± 0.266 *	0.185 ± 0.017	223.401 ± 20.982
	29	39.219 ± 0.722 * *	0.190 ± 0.028	208.705 ± 27.923
	58	33.485 ± 2.469 * *	0.201 ± 0.014	167.746 ± 24.848 *
	116	28.805 ± 2.239 * *	0.194 ± 0.020	149.557 ± 23.139 * *

1) * 表示差异显著($p < 0.05$); * * 表示差异极显著($p < 0.01$),下同

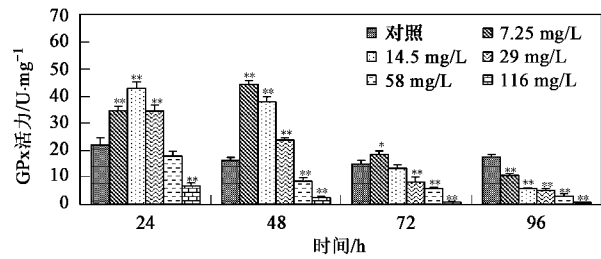


图 1 Cd²⁺ 对长江华溪蟹肝胰腺 GPx 活力的影响
Fig.1 Effect of Cd²⁺ on GPx activity in hepatopancreas of *S. yangtsekiense*

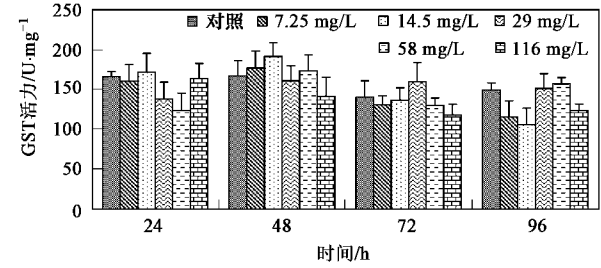


图 2 Cd²⁺ 对长江华溪蟹肝胰腺 GST 活力的影响
Fig.2 Effect of Cd²⁺ on GST activity in hepatopancreas of *S. yangtsekiense*

2.2.2 Cd²⁺ 对鳃组织 GSH/GSSG 比值的影响

如表 2 所示, GSH/GSSG 比值随着 Cd²⁺ 浓度的

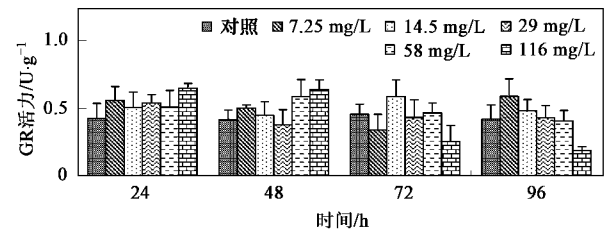


图 3 Cd²⁺ 对长江华溪蟹肝胰腺 GR 活力的影响
Fig.3 Effect of Cd²⁺ on GR activity in hepatopancreas of *S. yangtsekiense*

增大而逐渐降低,与对照组相比差异显著或极显著($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$).

2.2.3 Cd²⁺ 对鳃组织 GPx、GST 和 GR 活力的影响

观察图 4 发现,GPx 活力随着 Cd²⁺ 浓度的增大和时间的延长先升后降.在 24 h、Cd²⁺ 浓度 14.5 mg/L 时,GPx 活力升至最高值(7.684 ± 0.578) U/mg.在 96 h、Cd²⁺ 浓度 116 mg/L 时,GPx 活力降到最低值(0.083 ± 0.001) U/mg.

如图 5 所示,24 和 48 h,鳃中 GST 活力较对照组无显著性差异;72 和 96 h, GST 活力被高浓度的 Cd²⁺ 显著抑制($p < 0.05$).在 96 h、Cd²⁺ 浓度 116 mg/L 时, GST 活力仅为对照组的 56%.

表 2 Cd²⁺ 对长江华溪蟹鳃 GSH 和 GSSG 含量与 GSH/GSSG 比值的影响(mean ± SD, n = 3)

Table 2 Effect of Cd²⁺ on GSH, GSSG levels and GSH/GSSG ratio in gills of *S. yangtsekiense* (mean ± SD, n = 3)

处理时间/h	Cd ²⁺ 浓度/mg•L ⁻¹	GSH 含量/mg•g ⁻¹	GSSG 含量/mg•g ⁻¹	GSH/GSSG
24	0	13.258 ± 2.037	0.227 ± 0.015	58.446 ± 8.234
	7.25	11.455 ± 1.289	0.201 ± 0.015	57.038 ± 3.980
	14.5	10.500 ± 0.752	0.201 ± 0.009	52.366 ± 5.428
	29	9.494 ± 1.111	0.208 ± 0.009	45.854 ± 7.256
	58	6.276 ± 0.434 *	0.200 ± 0.008 *	32.119 ± 27.861
	116	8.135 ± 0.329	0.206 ± 0.009	39.521 ± 3.217
48	0	14.329 ± 0.979	0.223 ± 0.013	64.139 ± 0.684
	7.25	14.096 ± 0.985	0.200 ± 0.018	70.514 ± 3.883
	14.5	11.952 ± 0.061 * *	0.202 ± 0.013	59.405 ± 3.324
	29	9.588 ± 0.444 * *	0.204 ± 0.007	47.055 ± 3.077 * *
	58	8.840 ± 0.230 * *	0.195 ± 0.012	45.405 ± 3.841 * *
	116	8.465 ± 0.464 * *	0.199 ± 0.009	42.461 ± 1.031 * *
72	0	14.239 ± 1.028	0.210 ± 0.012	67.987 ± 6.894
	7.25	13.154 ± 0.983	0.186 ± 0.025	71.202 ± 6.553
	14.5	10.907 ± 0.339 * *	0.188 ± 0.012	58.202 ± 4.859
	29	9.543 ± 0.539 * *	0.200 ± 0.009	47.676 ± 2.996 * *
	58	8.992 ± 0.325 * *	0.192 ± 0.011	46.789 ± 1.007 * *
	116	7.860 ± 0.134 * *	0.196 ± 0.012	40.167 ± 3.227 * *
96	0	13.379 ± 0.907	0.230 ± 0.018	58.126 ± 1.358
	7.25	11.403 ± 0.358 *	0.198 ± 0.013	57.588 ± 2.286
	14.5	9.961 ± 0.161 * *	0.199 ± 0.007	50.027 ± 2.406 *
	29	9.694 ± 0.233 * *	0.203 ± 0.013	47.934 ± 4.121 * *
	58	8.434 ± 0.429 * *	0.201 ± 0.011	42.106 ± 3.078 * *
	116	8.507 ± 1.261 * *	0.201 ± 0.018	42.408 ± 4.852 * *

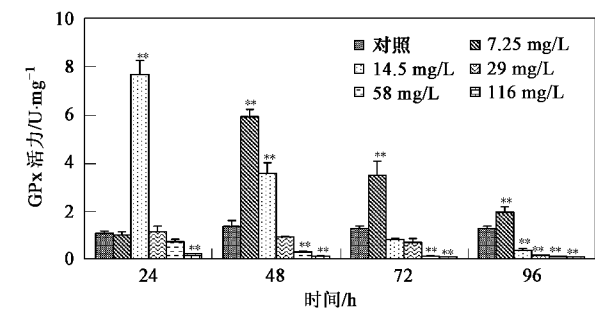


图 4 Cd²⁺ 对长江华溪蟹鳃 GPx 活力的影响

6); 72 和 96 h, GR 活力随 Cd²⁺ 浓度的增大急剧下降. 当 96 h、Cd²⁺ 浓度 116 mg/L 时, GR 活力较对照组下降了 79% .

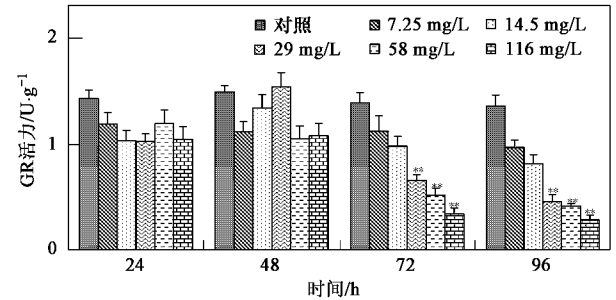


图 6 Cd²⁺ 对长江华溪蟹鳃 GR 活力的影响

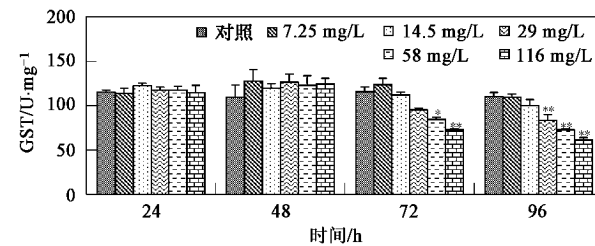


图 5 Cd²⁺ 对长江华溪蟹鳃 GST 活力的影响

Fig.6 Effect of Cd²⁺ on GR activity in gills of *S. yangtsekiense*

3 讨论

肝胰腺是长江华溪蟹重要的消化和解毒器官,是营养物质消化、吸收和储存的主要场所,生理代谢活动的中心,更是重金属积累的主要器官^[14],在消除外来有毒物质对生物机体毒害影响方面起着重要作用^[21]. 鳃是长江华溪蟹的呼吸器官,其表面积大,与外来物质接触最早,是吸收外来异物的主要位点^[15]. 这

24 和 48 h, Cd²⁺ 对 GR 的活力无显著影响(图

Fig.5 Effect of Cd²⁺ on GST activity in gills of *S. yangtsekiense*

2种器官由于其特殊的生理功能而成为受外界污染物影响最为严重的组织器官.本实验发现,在不同浓度 Cd^{2+} 处理下,肝胰腺和鳃均受到了严重的损伤,其谷胱甘肽系统各项指标的变化趋势也基本相似.由此可见,肝胰腺和鳃不但是 Cd^{2+} 积累的主要部位,而且是 Cd^{2+} 急性毒性作用的主要靶器官.

GSH 是细胞内含量最高的非蛋白质巯基物,参与机体的解毒代谢,在清除过氧化物、过氧化氢等氧化剂中起重要作用.本实验中, Cd^{2+} 作为外源性有毒物质处理溪蟹后在其体内造成了一定程度的损伤,因此 GSH 被大量消耗:一方面在 GST 作用下,GSH 与 Cd^{2+} 结合形成 GSH-Cd 复合物以便机体对 Cd^{2+} 的清除;另一方面 GSH 在 GPx 的催化下将 H_2O_2 转化为水从而起到了解毒作用^[22],其自身则被氧化成 GSSG.与此同时,GSH 的生物合成受到 Cd^{2+} 抑制,而由 GSSG 还原形成的 GSH 又不足以弥补机体解毒所大量消耗的 GSH,因此导致肝胰腺和鳃中 GSH 含量显著下降.Deneke 等^[14,23] 研究发现,大多数 GSH 合成于肝脏,肝脏通常是 GSH 含量最高的部位.本实验结果同样也发现无论是对照组还是处理组,肝胰腺内 GSH 的含量均高于鳃.

GSSG 是 GSH 在 GPx 的催化下清除 H_2O_2 过程中产生的氧化产物.在 GR 的作用下,GSSG 可被重新还原为 GSH.本实验结果表明,经 Cd^{2+} 处理后,肝胰腺和鳃中 GSSG 含量并未发生显著变化,说明 GSH 和 GSSG 在 GPx 和 GR 的作用下氧化还原反应基本达到了动态平衡.

大量研究证实,GSH/GSSG 可以综合评价生物组织中氧化胁迫水平,准确灵敏地反映动物体内抗氧化平衡状态^[22,24].在正常生理状态下,细胞内 GSH/GSSG 恒定在一定范围内,当细胞受到过氧化损伤时会导致 GSH/GSSG 降低^[25].本实验发现,随着 Cd^{2+} 浓度的增大和处理时间的延长,肝胰腺和鳃中 GSH/GSSG 均呈现下降趋势.这可能是由于 Cd^{2+} 胁迫增强了脂质过氧化过程,抑制抗氧化损伤所需的酶活力从而造成了氧化损伤,而大量活性氧(ROS)的产生导致了 GSH/GSSG 下降.

GPx 是生物体内主要的抗氧化酶,它可催化 GSH 清除 H_2O_2 ,硒代半胱氨酸(Se-Cys)是其酶活性中心.本实验发现,处理时间较短、染毒浓度较低时,GPx 的合成途径被激活,其活力较对照组显著上升.随着染毒浓度的增大和处理时间的延长,体内 Cd^{2+} 的积累增多毒性增强,大量的 Cd^{2+} 与 Se-Cys 结合导致 GPx 活性中心遭到破坏而使酶失活,GPx 合成途

径受阻,新的 GPx 难以合成,GPx 活力显著下降.Iszard 等^[26,27] 的研究也证实了 Cd^{2+} 对 GPx 活性中心及其合成途径有损伤作用.

GST 是细胞受到氧化胁迫后重要的解毒酶^[13],它以同功酶的形式广泛存在于动植物体内.它能催化 GSH 与许多化学物质及亲电子物质结合,减少这些物质与细胞内生物大分子结合的可能性,从而减少它们对机体的损伤.此外,GST 的一些同功酶具有非 Se-GPx 活性^[28].在本实验中,肝胰腺 GST 活力并未发生显著变化,其活力的稳定在一定程度上可以缓解由于 GPx 活力大幅下降而对机体产生的潜在危害.但处理 72、96 h 后鳃的 GST 活力却随 Cd^{2+} 浓度增大而显著下降,说明此时鳃组织受 Cd^{2+} 胁迫严重,GST 活力被高浓度 Cd^{2+} 所抑制.

GR 是一种黄素蛋白氧化还原酶,它在重金属胁迫下对清除 ROS 起关键作用.通过 NADPH 供氢,GR 催化 GSSG 还原为 GSH.实验结果表明,肝胰腺中 GR 活力并未随处理时间和染毒浓度的变化而有显著改变,说明组织内的 Cd^{2+} 可能并未对 GR 本身造成影响.鳃中 GR 活力随着染毒浓度的增大和处理时间的延长被极显著抑制($p < 0.01$),这与 GSH 含量的变化趋势相一致.由此可以推断,GR 活力降低导致其还原 GSSG 产生的 GSH 水平下降是鳃组织中 GSH 含量下降的原因之一.

谷胱甘肽系统是生物体内主要的抗氧化防御体系,在维持细胞内环境稳态及机体的解毒代谢中起重要作用.GSH 作为一种抗氧化剂,是解毒系统的重要成分,谷胱甘肽系统中的各种酶类均围绕它而起作用.在本实验中,低浓度 Cd^{2+} 处理后溪蟹肝胰腺中积累了一定量的 Cd^{2+} ,经 GST 催化 GSH 被消耗用于 Cd^{2+} 的清除;与此同时,GPx 活力被诱导,使得 GSH 对 H_2O_2 的清除能力大大提高,大量的 GSH 在 GPx 作用下被氧化为 GSSG,加快了 GSH 的消耗.随着 Cd^{2+} 浓度的进一步增大,GPx 活力逐渐被抑制,GSH 清除 H_2O_2 的能力降低,而 Cd^{2+} 的大量积累诱发体内 ROS 增多,GSH 直接与 ROS 结合,参与了自由基的清除,致使 GSH 消耗更加严重.尽管染毒处理前后 GR 活力并未发生显著变化,但是由 GR 催化还原 GSSG 产生的 GSH 远不足以弥补解毒代谢所消耗的 GSH,导致了 GSH 含量随处理时间的延长和 Cd^{2+} 浓度的增大而逐渐降低.鳃组织中 GSH、GSSG 含量和 GPx 活力变化趋势与肝胰腺中基本一致,但 GST 和 GR 活力均被 Cd^{2+} 抑制.GSH 与 Cd^{2+} 的结合能力由于 GST 活力的下降而减弱,导致大量的 Cd^{2+}

无法及时清除, ROS 物质大量产生, 对生物体造成损伤. 而 GR 活力的下降更使得由 GSSG 还原产生的 GSH 含量减少, 无法弥补解毒代谢过程中 GSH 的大量消耗, 因此组织中 GSH 含量总体上呈逐渐下降的趋势. 在 Cd²⁺ 处理前后, 肝胰腺和鳃组织中 GSSG 含量并未发生显著性变化, 但由于 GSH 含量的不断减少导致 GSH/GSSG 逐渐下降. 而 GSH/GSSG 作为衡量机体所受氧化胁迫程度最灵敏的反映参数, 其数值的下降表明机体受到了严重的氧化损伤.

4 结论

Cd²⁺ 对长江华溪蟹肝胰腺和鳃组织谷胱甘肽系统产生了十分显著的影响, Cd²⁺ 不仅可以阻断谷胱甘肽及相关酶类的合成途径, 而且可以使酶活力下降或丧失, 导致谷胱甘肽氧化还原系统被破坏, 使机体处于高度的氧化胁迫状态. 谷胱甘肽系统在保护机体免受氧化胁迫方面起重要作用, GSH/GSSG 作为重要的生理指标可以灵敏反映体内的氧化应激状况.

参考文献:

[1] Corticeiro S C, Lima A I G, Figueira E M. The importance of glutathione in oxidative status of *Rhizobium leguminosarum* biovar viciae under Cd exposure[J]. Enzyme and Microbial Technology, 2006, **40**: 132-137.

[2] Levesgue H M, Dorval J, Hontela A, et al. Hormonal, morphological, and physiological responses of yellow perch (*Perca flavescens*) to chronic environmental metal exposures[J]. Journal of Toxicology & Environmental Health Part A, 2003, **66**(7): 657-676.

[3] Couture P, Kumar P R. Impairment of metabolic capacities in copper and cadmium contaminated wild yellow perch (*Perca flavescens*) [J]. Aquatic Toxicology, 2003, **64**(1): 107-120.

[4] 侯丽萍, 马广智. 镉对草鱼鱼种肝组织超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响[J]. 水利渔业, 2003, **23**(3): 14-15.

[5] Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E A, et al. Cadmium- induced excretion of urinary lipid peroxidation in Sprague-Daw ley rats[J]. Biol Trace Elem Res, 1996, **52**: 143-154.

[6] Karmakar R, Banik S, Bandyopadhyay S, et al. Cadmium-induced alteration of hepatic lipid peroxidation, glutathione S-transferase activity and reduced glutathione level and their possible correlation with chromosomal aberration in mice, a time course study[J]. Mutat Res, 1998, **397**: 183-190.

[7] Pan L Q, Zhang H X. Metallothionein, antioxidant enzymes and DNA strand breaks as biomarkers of Cd exposure in a marine crab, *Charybdis japonica* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2006, **144**: 67-75.

[8] Sivaprasad R, Nagaraj M, Varalakshmi P. Lipoic acid in combination with a chelator ameliorates lead-induced peroxidative damages in rat kidney[J]. Arch Toxicol, 2002, **76**: 437-441.

[9] Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F G. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination[J]. Environment

International, 2002, **7**: 673-679.

[10] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 23-47.

[11] 武冬梅, 孟紫强, 耿红, 等. SO₂ 吸入对小鼠组织谷胱甘肽氧化还原系统的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2003, **9**(2): 163-166.

[12] Silvai L A, Susana L Y, Tuan C, et al. Oxidative stress by acute acetaminophen administration in mouse liver [J]. Free Radical Biolory, 1995, **19**(3): 303-310.

[13] Aravind P, Prasad M N V. Modulation of cadmium-induced oxidative stress in *Ceratophyllum demersum* by zinc involves ascorbate-gluthathione cycle and glutathione metabolism[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, **43**: 107-116.

[14] Świergosz-Kowalewska R, Bednarska A, Kafel A. Glutathione levels and enzyme activity in the tissues of bank vole *Clethrionomys glareolus* chronically exposed to a mixture of metal contaminants [J]. Chemosphere, 2006, **65**: 963-974.

[15] Monteiro D A, Almeida J A D, Rantin F T, et al. Oxidative stress biomarkers in the freshwater characid fish, *Brycon cephalus*, exposed to organophosphorus insecticide Folisuper 600 (methyl parathion) [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2006, **143**: 141-149.

[16] Michele J S, Hein H D, Johan H J. The freshwater river crab, *Potamonautes warreni*, as a bioaccumulative indicator of iron and manganese pollution in two aquatic system[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1998, **41**(2): 203-214.

[17] Schuwerack P M, Lewis J W, Jones P. The potential use of the South African river crab, *Potamonautes warreni*, as a bioindicator species for heavy metal contamination[J]. Ecotoxicology, 2001, **10**(3): 159-166.

[18] 王兰, 王定星, 王茜, 等. 镉在河蟹 5 种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响[J]. 动物学报, 2001, **47**(专刊): 96-100.

[19] 王兰, 王定星, 王茜, 等. 镉对长江华溪蟹肝胰腺细胞超微结构的影响[J]. 解剖学报, 2003, **34**(5): 522-526.

[20] 张龙翔, 张庭芳, 李令媛, 等. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1981. 164-169.

[21] Gibson R, Barker P L. The *Decapoda hepatopancreas*[J]. Oceanogr Mar Biol Annu Rev, 1979, **17**: 285-346.

[22] Schafer F Q, Buettner G R. Redox environment of the cell as viewed through the redox state of the glutathione disulfide/glutathione couple [J]. Free Radic Biol Med, 2001, **30**: 1191-1212.

[23] Deneke S M, Fanburg B L. Regulation of cellular glutathione[J]. Am J Physiol, 1989, **257**: 163-173.

[24] Droge W. Free radicals in the physiological control of cell function [J]. Physiol Rev, 2002, **82**: 47-95.

[25] Jones D P. Redox potential of GSH/GSSG couple: assay and biological significance[J]. Meth Enzymol, 2002, **348**: 93-112.

[26] Iszard M. Effect of several metallothionein inducers on oxidative stress defense mechanisms in rats[J]. Toxicology, 1995, **104**: 25-33.

[27] Hultberg B, Andersson A, Isaksson A. Alterations of thiolmetabolism in human cell lines induced by low amounts of copper, mercury of cadmium ions[J]. Toxicology, 1998, **126**: 530-533.

[28] Chen R, Zheng W Y, Yu A. Effect of Water-soluble Fraction of No.0 Oil on Glutathione S-transferase in *Ostrea cucullata* [J]. Journal of Xiamen University(Natural Science), 2005, **44**: 219-221.