

铜对梨形环棱螺抗氧化酶活性和金属硫蛋白含量的影响

张清顺 侯建军 刘香江 罗洁璇 熊邦喜

(华中农业大学水产学院,武汉 430070)

摘要:本实验采用暴露重金属的方法,研究了不同浓度硫酸铜 (Cu^{2+} 分别为 0、0.005、0.01、0.02、0.05 mg/L)在不同暴露时间 (0—14d)下对梨形环棱螺 (*Bellamy purificata*)过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD)、谷胱甘肽硫转移酶 (GST)的活性、还原性谷胱甘肽 (GSH)和金属硫蛋白 (MT)含量的影响,以探讨 Cu^{2+} 对梨形环棱螺的氧化损伤及其防御作用的机理,并为水环境 Cu^{2+} 污染的早期诊断及生态风险评价提供科学的依据。结果表明: Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏和鳃中 CAT、SOD、GST、GSH 和 MT 均有明显影响,表现出时间剂量效应。SOD 在前 4 天、CAT 在前 3 天酶活性总体上表现出诱导趋势, GST 在前 4 天酶活性处于诱导状态,随着暴露时间的延长,酶活性下降,到第 5 天时表现出抑制趋势;随着时间的进一步增长,至 14d 时,0.005 mg/L 剂量组酶活性维持在正常值附近波动,0.01 mg/L 剂量组酶活性被诱导,0.02 mg/L 剂量组酶活性在肝脏中表现为诱导而在鳃中则被抑制,0.05 mg/L 剂量组酶活性被抑制。肝脏和鳃 GSH 含量的变化与 GST 相似,在短时间内表现出诱导效应,肝脏 GSH 在暴露的前 5 天、鳃 GSH 在暴露的前 4 天均处于诱导状态,随着暴露时间的延长,0.005 mg/L 剂量组表现出诱导,0.05 mg/L 剂量组则受到抑制。MT 在整个实验期间均处于诱导状态,各剂量组在 0.5d 被极显著诱导,随后 MT 含量出现起伏波动,有上升和下降,至第 14 天时达到一稳定水平。其中,0.01 mg/L 剂量组肝脏的 MT 在整个实验期间均被极显著地诱导 ($p < 0.01$),0.01 mg/L 剂量组的鳃组织 MT 除第 10 天外也被极显著诱导 ($p < 0.01$)。在暴露 14d 时,除 0.05 mg/L 剂量组的肝脏 MT 外,其余处于极显著诱导状态 ($p < 0.01$)。

关键词: Cu^{2+} ;超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;谷胱甘肽硫转移酶;谷胱甘肽;金属硫蛋白;梨形环棱螺

中图分类号: Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2009)04-0717-09

铜 (Copper, Cu) 是生物体内代谢的必需微量元素之一,是细胞色素 c 氧化酶、超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 等酶或蛋白中的重要金属离子,在机体代谢中有着重要的作用。同时,铜又是有毒重金属元素,其浓度超过一定限度时,就会对水生生物产生一定的毒害作用^[1,2]。重金属离子污染对水生生物的毒性作用机制之一是其造成生物体内的过氧化胁迫,过量的重金属离子能导致体内产生大量的活性氧自由基 (Reactive oxygen species, ROS),这些活性氧又可使 DNA 断裂、酶蛋白失活等,从而引起机体的氧化应激,造成生物大分子和膜脂质过氧化,对机体诱发多种损害^[3,4]。在长期进化中,需氧生物发展了防御过氧化损害的酶系统。在生理状态下,由代谢产生的活性氧可为抗氧化防御系统所控制,机

体抗氧化防御系统中的一些成分会改变,如 SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化酶 (GPx) 等可被诱导,从而使机体免受氧化伤害^[2,5]。因而,这些生物标志物的活性变化间接反映了环境中氧化应激的存在,可作为环境污染胁迫的指标^[3]。

目前关于重金属对软体动物毒理效应的研究以贝类为多^[6,7],就重金属对腹足动物毒理效应的研究主要集中在重金属的蓄积方面^[8-12]。关于腹足动物重金属毒理效应生物标志物的相关研究则鲜有报道。环棱螺在我国分布广泛,它们多生活在河流、池塘、湖泊等水体,是大型底栖生物的重要组成部分,在水生态系统中起着重要的作用^[13]。我们在预实验中发现梨形环棱螺 (*Bellamy purificata* Heude) 对 Cu^{2+} 敏感,因此选用梨形环棱螺为材料,采用暴露实验方法,研究了不同浓度 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝

收稿日期: 2007-11-12; 修订日期: 2009-02-26

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30470342)

作者简介: 张清顺 (1982—), 男, 湖北省咸宁市人; 硕士研究生; 从事养殖环境和水生毒理学研究

通讯作者: 熊邦喜, 教授, 博士生导师; Tel: 027-87283018; E-mail: bangxix8@mail.hzau.edu.cn

脏、鳃中抗氧化指标 (SOD、CAT、GST和 GSH)的影响和 MT的解毒效应,进一步探讨重金属对腹足动物的氧化损伤及其防御作用的机理,并为水环境重金属污染的早期诊断及生态风险评价提供科学的依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 实验动物梨形环棱螺采集于武汉市南湖,在实验室进行培养。养殖池温度保持在 20—25℃, pH控制在 7.5左右。每天交替投喂新鲜的植物叶子和配合饲料。

1.2 主要仪器和试剂 主要实验仪器设备包括: TAS-990型原子吸收分光光度计(北京普析)、紫外可见分光光度计(美国 Thermo公司)、高速冷冻离心机(美国 Sigma公司)、D IAX900微量匀浆机(德国 Heidolph公司)等。CuSO₄·5H₂O (AR)、GSH、NBT、EDTA、Tris、巯基乙醇、蔗糖(Amresco公司生产)、L-Met D TNB、核黄素(Sigma公司生产)、Cd标准储备液(购自国标中心)外,其余均为国产分析纯。

1.3 实验方法

1.3.1 试验质量浓度的设置及分组 首先对梨形环棱螺进行了 96h的急性毒性实验,用寇氏(Korbor)法计算出 Cu²⁺对梨形环棱螺在 96h的 LC₅₀及其 95%置信区间分别为 0.382(0.314—0.464)mg/L,其安全浓度为 0.038 mg/L。因本研究旨在探讨低剂量 Cu²⁺在较长时间暴露时对梨形环棱螺的影响,在预实验的基础上,保证试验中受试动物不死亡的前提条件,并结合渔业水质标准,来确定本实验中的 Cu²⁺浓度,实验组设置如下:对照组,铜暴露组分别为 0.005、0.01、0.02、0.05 mg/L 4个组,以下简称 0.005、0.01、0.02、0.05剂量组。挑选比较活跃、体重在 1.5 g左右的动物进行实验。

1.3.2 毒性暴露实验 实验在 38cm × 28cm × 15cm的水箱内进行。温度为(24 ± 1)℃,自然光照,各梯度分别放 1.4—1.6 g健康、活动性强的梨形环棱螺 50只,将实验螺进行不同离子浓度不同时间的毒性暴露,每个浓度梯度分别设置 3个平行的水族箱。实验期间的管理与饲养期间一致,隔天换水一次,每次换水一半,换水时分别加入含有与毒性暴露重金属离子浓度一致的曝气自来水。实验开始后分别于 0.5、1、2、3、4、5、7、10、14d取样,每个梯度各水族箱随机选取 5只实验螺,用纱布擦干螺的体表,置冰盘内进行解剖,取其肝脏和鳃,用滤纸吸干,

置于 2.0 mL离心管内,液氮速冻后于 -80℃冰箱中保存备测。

1.3.3 酶样的制备 取肝、鳃组织约 0.1—0.2 g,以 1:20 (w/v)的比例加入预冷的 0.01 mol/L pH 7.2磷酸盐缓冲液,冰水浴中低速匀浆,4℃下离心(16000r/min, 10 min),取上清液,即为组织酶提取液。

1.3.4 抗氧化酶活性的测定 SOD活性的测定采用 NBT法^[14],酶活力单位定义为:每毫克组织蛋白在 1 mL反应液中 SOD抑制率达 50%时所对应的 SOD量为 1个活性单位(U)。CAT活性的测定采用紫外分光光度法^[15],酶活力单位定义为:每毫克组织蛋白在 1 mL反应液中每分钟分解 1μmol的 H₂O₂的量为 1个活性单位(U)。GST活性的测定采用 CDNB法^[16],酶活力单位定义为:在 25℃, pH 6.5,基质 CDNB与 GSH终浓度均为 1 mmol/L的条件下,1min催化 1 μmol/L CDNB与 GSH结合的 GST酶量为 1U。

1.3.5 GSH的测定 GSH采用 DTNB法测定^[17]。

1.3.6 MT的测定 MT采用隔血红蛋白饱和法测定^[18];上述蛋白质含量均采用考马斯亮蓝试剂盒测定(南京建成)。

1.4 数据处理方法 实验结果采用平均数 ± 标准误差(x ± s.d)表示,全部实验数据均采用 SPSS 15.0软件进行统计分析,各组间的显著性检验采用单因素方差分析,对照组与各剂量组的两两比较采用 LSD法,抗氧化指标间的相关分析采用偏相关分析,绘图软件采用 Sigmaplot10.0。

2 结果

2.1 不同浓度的 Cu²⁺对梨形环棱螺肝脏和鳃 SOD活性的影响

由图 1A可知,螺肝脏的 SOD活性表现出明显的时间剂量效应。暴露 0.5d后各浓度组的 SOD活性被显著诱导升高($p < 0.05$),之后迅速回落,至 1d时酶活性已降到正常水平附近;第 2天后,酶活性再次被激活,0.005和 0.01剂量组在第 3天活性升至最高,0.02和 0.05剂量组在第 4天活性达到最大($p < 0.01$),经历这次高峰后酶活性均逐步下降,直至受抑制。0.02剂量组在第 5天、0.01和 0.05剂量组在第 7天时,酶活性显著被抑制($p < 0.05$)。然后酶活性又回升(除 0.005组外)到第 10天时高于对照组($p < 0.01$),但 0.05剂量组随着暴露时间的延长,在第 14天时被极显著抑制($p <$

0.01),其他剂量组则继续处于诱导状态。

图 1 B 显示,螺鳃组织中的 SOD 活性变化和肝脏中的 SOD 变化相似,0.005 和 0.01 剂量组在整个暴露实验中均处于诱导状态,0.02 和 0.05 剂量组在暴露的前 4 天处于诱导状态,第 5 天时受到抑制。0.02 剂量组酶活性随后回升,第 7 天和第 10 天时

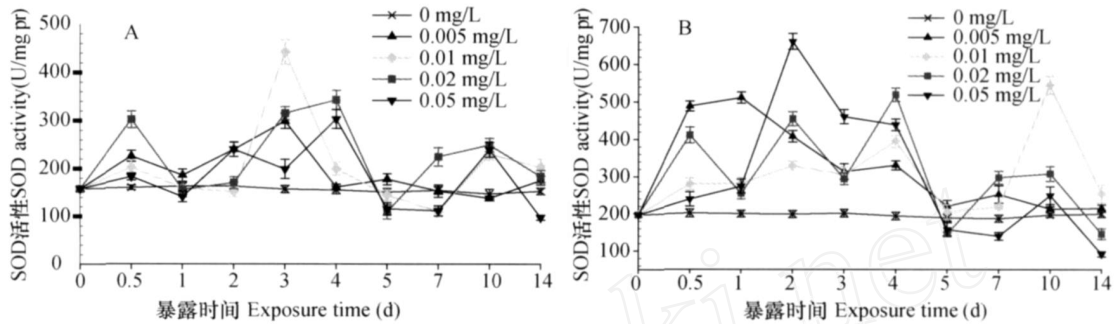


图 1 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏(A)和鳃(B)中 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effects of Cu^{2+} on SOD activities in liver (A) and gill (B) of *B. purificata*

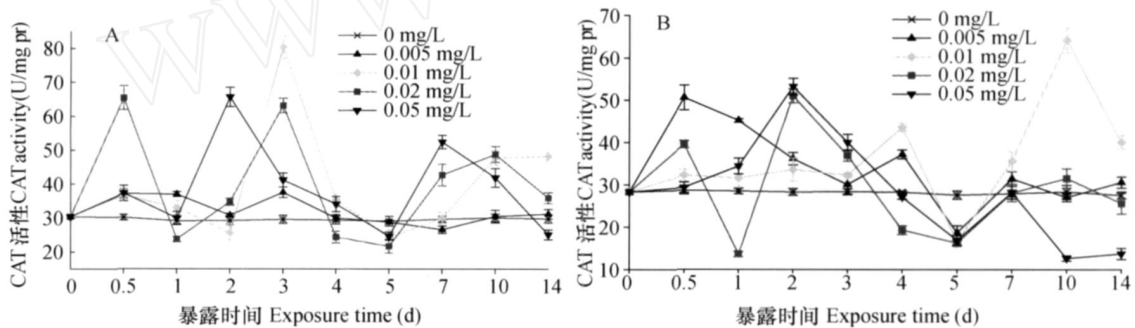


图 2 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏(A)和鳃(B)中 CAT 活性的影响

Fig. 2 Effects of Cu^{2+} on CAT activities in liver (A) and gill (B) of *B. purificata*

2.2 不同浓度 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏和鳃 CAT 酶活性的影响

图 2 A 显示,肝脏 CAT 在暴露 0.5d 时活性被诱导升高,之后下降,在第 1 天时 0.02 剂量组被抑制,随后 0.05 和 0.02 剂量组活性上升,分别于第 2 天和第 3 天时达到最高 ($p < 0.01$),0.005 和 0.01 剂量组活性继续下降,至第 2 天后开始上升,0.01 剂量组在第 3 天达到最高 ($p < 0.01$),0.005 剂量组也在第 3 天处于显著诱导状态 ($p < 0.05$)。随后各组酶活性又下降,除 0.005 剂量组在第 5 天时降至对照组水平附近后一直维持在该水平 ($p > 0.05$) 外,其他各剂量组持续下降,在第 5 天均低于对照组,其中 0.02 剂量组被极显著抑制 ($p < 0.01$)。5d 后又开始经历了一个上升过程,0.01 剂量组到第 10 天时极显著升高 ($p < 0.01$) 并保持这一水平;0.02 剂量组活性持续上升,在第 7 天和第 10 天时极显著

酶活性均表现出极显著诱导效应 ($p < 0.01$),而 0.05 剂量组至第 7 天时已被极显著的抑制 ($p < 0.01$),然后酶活性回升,在第 10 天表现出诱导状态,最后,0.02 和 0.05 剂量组酶活性下降,到 14d 时已被极显著的抑制 ($p < 0.01$)。

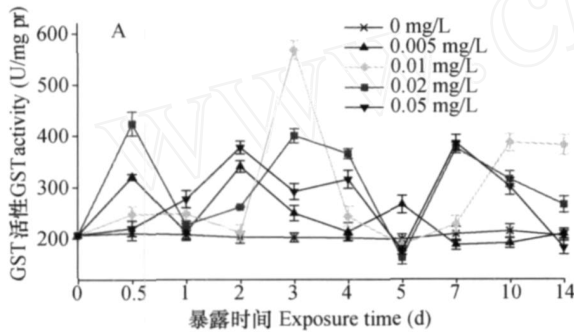
升高 ($p < 0.01$),随后酶活性有所下降,但第 14 天仍显著的高于对照组 ($p < 0.05$);0.05 剂量组在第 7 天时极显著升高 ($p < 0.01$) 后,随之下降,在第 10 天时仍处于诱导状态 ($p < 0.01$),但到第 14 天时则显著地被抑制 ($p < 0.05$)。

在图 2 B 中,鳃组织中的 CAT 在暴露的前 3 天,除 0.02 剂量组在第 1 天活性被极显著抑制 ($p < 0.01$) 外,其余均处于诱导状态。0.02 和 0.05 剂量组在第 2 天时的活性均达到一个高峰后开始下降,直至第 5 天被极显著抑制 ($p < 0.01$);0.01 剂量组一直上升到第 4 天后下降;0.005 剂量组在前 4 天处于诱导状态,到第 5 天时被极显著抑制 ($p < 0.01$)。然后各组的酶活性开始回升,到第 7 天时略高于对照组。0.01 剂量组的酶活力继续攀升,虽然在第 14 天时有所回落,但仍极显著高于对照组 ($p < 0.01$),而 0.05 剂量组在 10—14d 则被极显著

抑制 ($p < 0.01$), 0.005和 0.02剂量组酶活力则维持在对照组水平附近, 且差异不显著 ($p > 0.05$)。

2.3 不同浓度 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏和鳃 GST 酶活性的影响

从图 3 A 可见, 不同剂量组对肝脏组织中的 GST 具有明显的诱导或抑制效应。0.01、0.02 和 0.05 剂量组在暴露的前 4 天, GST 活性均处于诱导状态, 在第 5 天时均受到抑制, 然后酶活性回升。0.01 剂量组至第 10 天时处于极显著的诱导状态并维持这一水平 ($p < 0.01$), 0.02 和 0.05 剂量组至第 7 天时已被极显著地诱导 ($p < 0.01$), 随后虽下降, 但到第 10 天时仍极显著地高于对照组 ($p < 0.01$), 到 14d 时, 0.02 剂量组仍然高于对照组 ($p < 0.05$), 而 0.05 剂量组则被抑制。0.005 剂量组



在前 5 天均处于诱导状态, 从第 7 天开始酶活性在对照组水平附近波动, 但与对照组相比没有显著性差异。

在图 3 B 中, 鳃组织中的 GST 变化趋势与肝脏中的相似。各剂量组在暴露的前 4 天均处于诱导状态。而第 5 天时酶活性被极显著抑制 (除了 0.02 剂量组差异不显著) ($p < 0.01$), 然后酶活性再度回升。至第 7 天时, 0.01、0.02 和 0.05 剂量组已被极显著地诱导 ($p < 0.01$), 0.005 剂量组在第 7 天时仍然显著地被抑制 ($p < 0.05$)。到第 10 天时才恢复到正常水平并维持在这一水平, 0.01 和 0.02 剂量组则在第 14 天时降至正常水平附近, 0.05 剂量组在第 10 天即被极显著抑制并维持这一水平至第 14 天 ($p < 0.01$)。

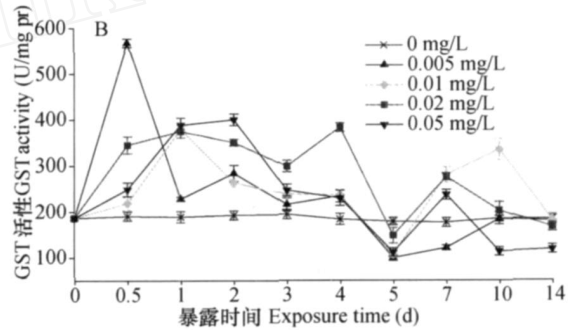


图 3 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏 (A) 和鳃 (B) 中 GST 活性的影响

Fig. 3 Effects of Cu^{2+} on GST activities in liver (A) and gill (B) of *B. purificata*

2.4 不同浓度 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏和鳃 GSH 变化的影响

从图 4 A 可见, 不同剂量组对肝脏组织中的 GSH 具有明显效应。各剂量组在暴露的前 5 天 GSH 均处于诱导状态, 在第 7 天时除 0.02 剂量组外均受到抑制, 然后 GSH 含量回升, 至第 10 天时已高于对照组, 到 14d 时 0.005、0.01 和 0.02 剂量组仍处于诱导状态, 而 0.05 剂量组则表现出抑制。

鳃组织中的 GSH 变化规律与肝脏中的相似 (图 4 B)。各剂量组在暴露的前 4 天均处于诱导状态, 而第 5 天时除 0.02 剂量组外均表现出抑制, 但没有显著性差异, 至第 7 天时, 0.005、0.01 和 0.05 剂量组仍表现出抑制, 而 0.02 剂量组则显著地被诱导 ($p < 0.05$), 到第 10 天时, 各剂量组的 GSH 回到

正常水平或略低于对照组, 0.005 剂量组则在第 14 天时略高于对照组, 而其他剂量组则表现出抑制。

2.5 不同浓度 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏和鳃 MT 的影响

图 5 的结果显示, 肝脏 (图 A) 和鳃 (图 B) 组织中的 MT 在整个实验期间均处于诱导状态, 各剂量组在 0.5d 被极显著地诱导 ($p < 0.01$), 随后 MT 含量出现起伏波动, 有上升和下降, 至第 14 天时达到一稳定水平。其中, 0.01 剂量组肝脏的 MT 在整个实验期间均被极显著地诱导 ($p < 0.01$), 0.01 剂量组鳃组织 MT 除第 10 天外也被极显著诱导 ($p < 0.01$)。在暴露 14d 时, 除 0.05 剂量组的肝脏 MT 外, 其余处于极显著诱导状态 ($p < 0.01$)。

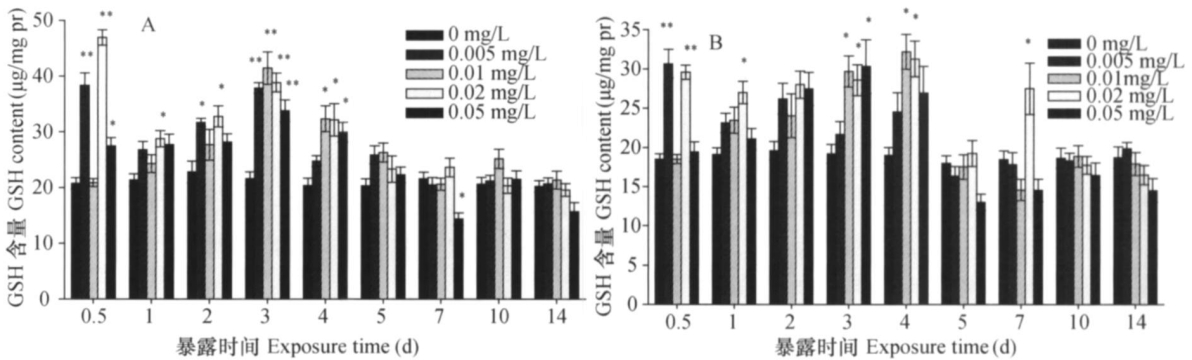


图4 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏(A)和鳃中GSH(B)活性的影响

Fig. 4 Effects of Cu^{2+} on GSH content in liver(A) and gill (B) of *B. purificata*

* 处理组和对照组间差异显著 Refer to significant difference between treatment group and control ($p < 0.05$) ;

** 差异极显著 Refer to extremely significant difference between treatment group and control ($p < 0.01$)

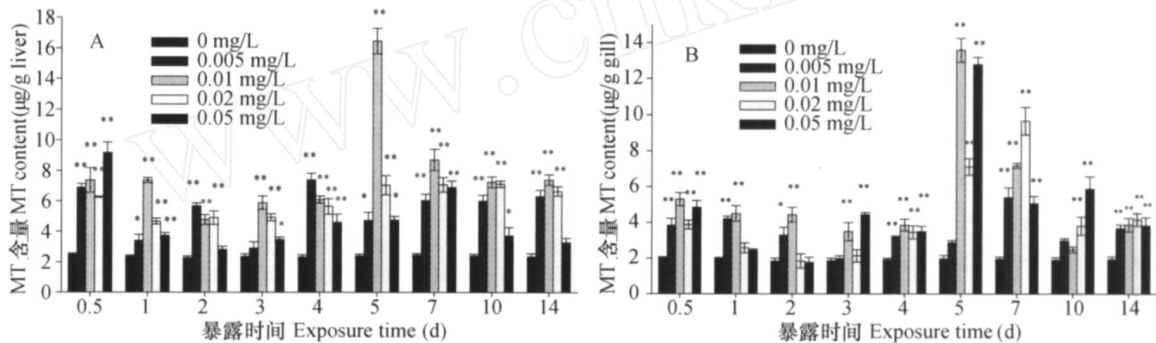


图5 Cu^{2+} 对梨形环棱螺肝脏(A)和鳃中MT(B)活性的影响

Fig. 5 Effects of Cu^{2+} on MT content in liver(A) and gill (B) of *B. purificata*

* 处理组和对照组间差异显著 Refer to significant difference between treatment group and control ($p < 0.05$) ;

** 差异极显著 Refer to extremely significant difference between treatment group and control ($p < 0.01$)

3 讨论

3.1 Cu^{2+} 胁迫对梨形环棱螺肝、鳃 SOD 和 CAT 的协同诱导作用

SOD 是一组金属酶,是生物体内清除活性氧自由基,使细胞免受氧化损伤的关键酶之一。SOD 的生物学作用是催化超氧化物阴离子自由基歧化为 H_2O_2 和 O_2 。CAT 是血色素存在酶,作为生物机体的抗氧化酶,CAT 能迅速分解 H_2O_2 ,产生 H_2O 和 O_2 ,它们的作用都是使机体免受氧自由基的攻击^[19]。在 Cu^{2+} 暴露过程中,在试验开始时,由于刚接触到 Cu^{2+} ,而且时间短,进入机体的 Cu^{2+} 含量极少,且此时的浓度不会产生显著的生物毒性。为了消除 Cu^{2+} 胁迫的影响,机体应急诱导 SOD 和 CAT 的表达或其活力上升,以抵御外界氧化基团的入侵,因此表现为机体组织中的 SOD 和 CAT 活性的显著增

长,随着氧自由基的清除,其又迅速降至正常水平或略低于正常值。随着进入体内的 Cu^{2+} 增多,产生大量的活性氧自由基,诱导 SOD 活性不断上升,从而导致 H_2O_2 升高。而 CAT 作为 H_2O_2 浓度的调节器, H_2O_2 的升高,刺激体内 CAT 的表达释放和活力升高^[20],加速分解 H_2O_2 。但随着暴露时间的进一步延长,机体产生的大量氧自由基不能及时被清除,从而发生氧化损伤,在第 5 天时 SOD 和 CAT 活性开始下降甚至低于正常值以下。随后 SOD 和 CAT 活性的活性开始回升,此时可能是由于 MT 大量表达对自由基清除后所引起的变化。因 MT 富含巯基,具有清除自由基,抗脂质过氧化作用。Thomauey 和 Vasak^[21] 用电子自旋共振 (ESR) 自旋标记技术证实了 MT 可直接清除 $\cdot\text{OH}$ 与 $\text{O}_2\cdot^-$,特别是清除 $\cdot\text{OH}$ 的作用。另外,MT 具有调节 Cu 储存、运输和代谢的作用,MT 大量结合 Cu^{2+} ,防止 Cu^{2+} 与细胞内其他

结构结合而产生自由基^[22]。于是 SOD 和 CAT 被修复或乃至重新合成,活性回升。基于上述分析,说明本实验中的 0.005 剂量组 SOD 和 CAT 酶活性增加不明显,0.01 剂量组表现为显著的诱导效应,0.02 mg/L 剂量组酶活性在肝脏中表现为诱导而在鳃中则被抑制,0.05 剂量组产生的自由基,因不能及时被清除,故而造成活性氧引起的氧化损伤。

3.2 Cu²⁺胁迫对梨形环棱螺肝、鳃 GSH 系统的影响

GSH 是一种低分子氧自由基清除剂,它可清除 O₂·、H₂O₂、ROOH,是组织中重要的巯基短肽非蛋白质化合物,在解毒代谢中起着重要的作用^[23,24]。GSH 作为细胞抵抗氧化应激的主要抗氧化剂之一,不仅与 GST 催化功能的发挥直接有关,并且可清除氧自由基,对调节细胞内的氧化还原水平起着重要作用,所以细胞内 GSH 的含量调控 GST 的表达^[25]。GST 是生物体解毒系统 阶段重要的酶。GST 的主要作用是催化 GSH 的巯基攻击亲电子性物质的亲电子中心,产生一种硫醚连接的谷胱甘肽结合物,以高亲和力结合胆红素、甾醇和其他亲脂性的物质;另外,某些 GST 具有 GPx 的活性,具有抑制脂质过氧化的作用^[26]。在活性氧的作用下,机体产生氧化应激,GST 与其他抗氧化酶如 SOD、GPx 等在组织中协同表达而产生抗氧化效应^[27]。在本实验中,GST 的变化与 SOD 的变化趋势总体上是一致的,这可能与这种协同表达有关。另外,GST 的活性变化还可能与 GSH 密切相关。本实验中,GSH 和 GST 的变化趋势十分相似。通常认为,GSH 含量的增加可能代表了机体对污染物暴露的适应性反应^[28],而 GSH 含量的降低则可能与细胞对污染物及其代谢物解毒能力的饱和效应有关,也可能是污染物暴露毒性效应的反应^[29]。

3.3 Cu²⁺在梨形环棱螺体内分布的变化及对肝、鳃 MT 的诱导作用

MT 是一些低相对分子质量的、富含半胱氨酸和巯基、能够结合金属的蛋白或多肽。研究表明,MT 具有调节微量元素(主要是 Cu、Zn)储存、运输和代谢的作用,对重金属具有解毒作用^[22]。MT 具有很强的诱导性,当细胞内的 Cu²⁺浓度增高时,可诱导 MT 合成。其诱导发生在转录水平,通过位于 MT 5 端的金属调节因子实现。接触金属后,由于 MT 基因转录水平增加而引起 MT mRNA 迅速增加^[22]。本研究中,由于试验开始时的 Cu²⁺暴露时间很短,进入螺体的含量虽少,但却使 MT 在 0.5d

内被极显著的诱导 ($p < 0.01$)。由于 CuMT 半衰期比较短,于是 MT 的含量迅速下降,但机体仍处于诱导状态;随着暴露时间再度延长,进入体内的 Cu²⁺继续增多,MT 持续被诱导,其含量升高并出现一个峰值后,MT 含量下降并保持稳定。MT 在受到诱导后出现含量升高、降低的现象可能与 Cu²⁺的储存、运输和代谢有关。Cu²⁺在体内各部位的分布不一样,进入体内的铜能在螺的体内重新分布。Dallinger, *et al.*^[30]发现 Cu²⁺在陆生蜗牛的软体组织中能大量累积,这与外套膜 MT 的 Cu²⁺调节功能分不开。对本实验中的梨形环棱螺,其可能也有类似的调节机制,进入体内的 Cu²⁺大量累积在除肝脏和鳃的其他组织中,因此,肝脏和鳃的 MT 含量受到一定的诱导后,其含量维持在较高水平而没有进一步增长。

3.4 梨形环棱螺肝、鳃各抗氧化指标对 Cu²⁺胁迫的动态响应过程及其相互影响

Cu²⁺胁迫对梨形环棱螺抗氧化指标的影响表现为一个动态的变化过程,以往的研究中也出现类似的结果^[4,31]。梨形环棱螺的鳃和肝组织的抗氧化酶活性变化有很大的差别,0.02 剂量组在第 14 天时肝脏中的酶活性高于对照组而鳃中则低于对照组,这可能与 Cu²⁺的储存、运输和代谢有关。研究表明不同浓度的 Cu²⁺在不同组织中的浓缩系数是不一样的^[7,30]。作者认为梨形环棱螺暴露于 Cu²⁺水体中,鳃丝直接同 Cu²⁺接触,对 Cu²⁺的吸收较大,由此说明 0.02 剂量组 Cu²⁺对鳃丝抗氧化酶伤害和抑制较大。Cu²⁺可由鳃丝和消化道进入体内,通过循环系统到达肝脏,肝脏能将进入体内的毒物在肝脏内氧化、还原或水解,将毒物转化成为无毒、低毒易溶的代谢物排出体外,但如果高剂量长时间的暴露(0.05 剂量组)导致进入体内的 Cu²⁺超过肝脏的解毒极限时,则肝脏会受到损伤。机体抗氧化系统是一个复杂的系统,由非酶(抗氧化维生素、蛋白和非蛋白巯基)和抗氧化酶组成的抗氧化系统在机体抵抗氧化胁迫和消除自由基损伤时都发挥着非常重要的作用,并且某些抗氧化成分之间还相互影响^[19,32]。本研究中 CAT 活性不仅受到 SOD 活性的影响,还受到 GSH 和 MT 含量的影响。对 SOD、CAT、GSH 和 MT 进行偏相关分析,在控制 GSH 和 MT 时,SOD 和 CAT 之间的偏相关系数在肝脏 ($r = 0.558, p = 0.000$)和鳃 ($r = 0.666, p = 0.000$)中存在密切的相关关系。在控制 MT 时,GSH 和 GST 之间的偏相关系数在肝脏 ($r = 0.542, p = 0.000$)和鳃

($r = 0.655, p = 0.000$)中存在密切的相关关系, SOD和 GST之间的偏相关系数在肝脏 ($r = 0.806, p = 0.000$)和鳃 ($r = 0.646, p = 0.000$)中存在密切的相关关系。Cu²⁺对梨形环棱螺的氧化损伤是一个综合的效应,其产生氧化应激后抗氧化系统启动,经历不同的暴露剂量和时间后产生损伤或修复。研究结果中各个指标反应灵敏而且相互间的相关性比较好,能有效的评价 Cu²⁺对梨形环棱螺氧化损伤并作为 Cu²⁺低浓度长期暴露的一种监测指标。

参考文献:

- [1] Yang Z B, Zhao Y L, Zhou Z L, *et al* Effects of water CuSO₄ concentration on molting growth and survival of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (5): 563—569 [杨志彪,赵云龙,周忠良,等. CuSO₄对中华绒螯蟹蜕皮、生长和存活的影响. 水生生物学报, 2006, **30** (5): 563—569]
- [2] Liu H, Wang X R, Zhang J F, *et al* Effects of copper and complex (Cu-EDTA) on the antioxidant system of *Carassius auratus* liver [J]. *Environmental Chemistry*, 2004, **23** (3): 263—267 [刘慧,王晓蓉,张景飞,等. 铜及其 EDTA 配合物对彭泽鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响. 环境化学, 2004, **23** (3): 263—267]
- [3] Lemaire P, Matthews A, Forlin L, *et al* Stimulation of oxyradical production of hepatic microsomes of flounder (*Platichthys flesus*) and perch (*Perca fluviatilis*) by model and pollutant xenobiotics [J]. *Arch Environ Contour Toxicol*, 1994, **26**: 191—200
- [4] Zhang Y M, Wang Y J, Yu R L, *et al* Effects of heavy metals Cd²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30** (4): 399—403 [张迎梅,王叶菁,虞闰六,等. 重金属 Cd²⁺、Pb²⁺和 Zn²⁺对泥鳅 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 2006, **30** (4): 399—403]
- [5] Lu S Q, Liu S J, Liu H Y, *et al* Effects of Cu²⁺ on activities of protecting enzymes SOD, CAT and GSH2PX in liver tissue of *Monopterus albus* [J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2002, **9** (2): 138—141 [鲁双庆,刘少军,刘红玉,等. Cu²⁺对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX活性的影响. 中国水产科学, 2002, **9** (2): 138—141]
- [6] Wang W G, Wang L Z, Liu Y D, *et al* Accumulation of metals in a clam *Anodonta woodiana elliptica* bred in Dianchi lake water [J]. *Journal of Yunnan University*, 2004, **26** (6): 541—543 [王魏根,王丽珍,刘永定,等. 椭圆背角无齿蚌对重金属元素的积累作用. 云南大学学报, 2004, **26** (6): 541—543]
- [7] Wu Y C, Lü X, Wang F, *et al* Accumulation of copper in *Chlamys farreri* tissues and its effect on catalase activity [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2005, **11** (5): 559—562 [吴益春,吕昕,王凡,等. Cu在扇贝组织中的蓄积及其对酶活性的影响. 应用与环境生物学报, 2005, **11** (5): 559—562]
- [8] Xue M, Ke C H, Zhou S Q, *et al* Toxic effects of heavy metals on early development of *Babylonia formosae habei* and detoxification effects of EDTA [J]. *Journal of Tropical Oceanography*, 2004, **23** (1): 44—50 [薛明,柯才焕,周时强,等. 重金属对波部东风螺早期发育的毒性及 EDTA 的解毒效果. 热带海洋学报, 2004, **23** (1): 44—50]
- [9] Yuan W J, Yu Y H, Gu Y, *et al* Accumulation of Cu, Zn, Cr, Cd and Pb in the Snail *Bellamya* sp [J]. *Journal of Shanghai Teachers University*, 2000, **29** (3): 73—79 [袁维佳,俞膺浩,谷媛,等. 螺蛳对重金属元素的富集作用. 上海师范大学学报(自然科学版), 2000, **29** (3): 73—79]
- [10] Manu Soto, Mike P Ireland, Brian Marigómez Changes in mussel biometry on exposure to metals: implications in estimation of metal bioavailability in 'Mussel Watch' programmes [J]. *The Science of the Total Environment*, 2000, **247** (2—3): 175—187
- [11] Thomas Knigge, Neelam Mann, Zahida Parveen, *et al* Manno-somes: a molluscan intracellular tubular membrane system related to heavy metal stress [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2002, **131** (3): 259—269
- [12] Hans De Wolf, Ulf Mib S A, Backeljau T, *et al* Heavy metal levels in the sediments of four Dares Salaam mangroves Accumulation in, and effect on the morphology of the periwinkle, *Littoraria scabra* (Mollusca: Gastropoda) [J]. *Environment International*, 2001, **26**: 243—249
- [13] Bronmark C, Vermaat J E Complex fish-snail-epiphyton interactions and their effects on submerged freshwater macrophytes [C]. In Jeppesen E, Sondergaard M, Sondergaard M, Christoffersen K (Eds), *The Structuring Role of submerged Macrophytes in Lakes* New York: Springer Verlag 1998, 47—68
- [14] Beauchamp C O, Fridovich I Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gel [J]. *Anal Biochem.*, 1971, **44**: 276—287
- [15] Beers R F Jr, Sizess I W. A spectrophotometric method for measuring the breakdown of hydrogen peroxide by catalase [J]. *J Biol Chem.*, 1952, **195**: 133—140
- [16] Habig W H, Pabst M J, Jakoby W B. Glutathione-S-transferases The first enzymatic step in mercapturic acid formation [J]. *J Biol Chem*, 1974, **249** (22): 7130—7139
- [17] Boyne A F and Elman G L. A methodology for analysis of tissue sulfhydryl components [J]. *Anal Biochem.*, 1972, **46** (2): 639—653
- [18] David L E and Brain F T. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues [J]. *Toxicology and Appl Pharmacology*, 1982, **66**: 134—142
- [19] Xu J, Xu L H, Zheng Y F, *et al* Antioxidant defense system damage in the liver of mouse exposed to lead [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2004, **24** (6): 1142—1144 [徐进,徐立红,郑一凡,等. 铅暴露引起的小鼠肝脏抗氧化系统损伤. 环境科学学报, 2004, **24** (6): 1142—1144]
- [20] Chen T, Furst A, Chien P K. The effects of cadmium and iron on catalase activities in Tubifex [J]. *J Am Coll Toxicol*, 1994, **13**: 112

- [21] Thomauey P J, Vasak M. Possible role for metallothionein in protection against radiation-induced oxidative stress Kinetics and mechanism of its reaction with superoxide and hydroxyl radicals [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1985, **827**: 36—44
- [22] Cheng S, Ge S J. Metallothionein [M]. In: Fang Y Z, Zheng R L (Eds), *Theory and application of free radical biology*. Beijing: Science Press 2002, 233—237 [程时,葛淑君.金属硫蛋白.见方允中,郑蓉梁,主编.自由基生物学的理论与应用.北京:科学出版社.2002,233—237]
- [23] Klaassen C D, Bracken W M, Dudley R E, et al. Role of sulfhydryls in the hepato toxicity of organic and metallic compounds [J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1985, **5**: 806—815
- [24] Reed D J. Glutathione: toxicological implications [J]. *nuu Rev Pharmacol Toxicol*, 1990, **30**: 603—631
- [25] Bergelson S, Pinkus R, Daniel V. Intracellular glutathione levels regulate Fos/Jun induction and activation of glutathione S-transferase gene expression [J]. *Cancer Res*, 1994, **54**: 36—40
- [26] Pang Z J and Chen Y. Glutathione S-transferase [M]. In: Fang Y Z, Zheng R L (Eds), *Theory and application of free radical biology*. Beijing: Science Press 2002, 233—237 [庞战军,陈媛.谷胱甘肽转硫酶.方允中,郑蓉梁,主编.自由基生物学的理论与应用.北京:科学出版社.2002,233—237]
- [27] Hayes J D and Strange R C. Invited commentary: potential contribution of the glutathione S-transferase supergene family to resistance to oxidative stress [J]. *Free Rad Res*, 1995, **22** (3): 193—207
- [28] Kosower N S and E N Kosower. The glutathione status of cells [J]. *Int Rev Cyto*, 1978, **54**: 109—159
- [29] Ketterer B, B Co les, D J Meyer. The role of glutathione in detoxication [J]. *Environ Health Perspect*, 1983, **49**: 59—69
- [30] Dallinger R, Berger B, Hunziker P E, et al. Metallothionein in snail Cd and Cu metabolism [J]. *Nature*, 1997, **388**: 237—238
- [31] Liu W C, Li M Y, Huang F Y, et al. Effects of cadmium stress on xanthine oxidase and antioxidant enzyme activities in *Boleophthalmus pectinirostris* liver [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, **17** (7): 1310—1314 [刘伟成,李明云,黄福勇,等.镉胁迫对大弹涂鱼肝脏黄嘌呤氧化酶和抗氧化酶活性的影响.应用生态学报,2006,17(7):1310—1314]
- [32] Banerjee A K, Mandal A, Chanda D, et al. Oxidant, antioxidant and physical exercise [J]. *Mol Cell Biochem*, 2003, **253**: 307—312

EFFECTS OF COPPER ON ANTIOXIDANT ENZYME ACTIVITIES AND METALLOTHIONEIN CONCENTRATION OF BELLAMYA PURIFICATA

ZHANG Qing-Shun, HOU Jian-Jun, LIU Xiang-Jiang, LUO Jie-Xuan,
and XIONG Bang-Xi

(College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: An experiment was conducted to study the effects of copper (Cu^{2+}) on the antioxidant enzymes activities of the *Bellamyia purificata*, such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione S-transferase (GST), concentrations of glutathione (GSH) and metallothionein (MT) at different concentrations of Cu^{2+} (0, 0.005, 0.01, 0.02 and 0.05 mg/L) and different exposure times (0—14d). In order to evaluate the mechanisms of oxidative stress and damage of Cu^{2+} on *B. purificata*, gills and livers were chosen to analyse the biochemical responses, because these organs were brought into contact with environmental pollutants nearly. The results showed that Cu^{2+} had significant influence on the activities of SOD, CAT, GST and the concentrations of GSH, MT in both gills and livers of *B. purificata*, and such effects are significantly related to increased exposure time and dosage. The antioxidant enzymes activities in gills and livers could be markedly activated at the beginning days of Cu^{2+} exposure, such as SOD in 4d, CAT in 3d, and GST in 4d after exposure. The activities of SOD, CAT and GST decreased with the increase of exposure time, till they were inclined to be inhibited in the 5d. On the last day of exposure, the antioxidant enzymes activities in treatments with 0.005mg/L of Cu^{2+} approached to the normal value, in 0.05 mg/L of Cu^{2+} were inhibited, and in 0.01mg/L of Cu^{2+} were induced. The activities of enzymes in treatments with 0.02 mg/L of Cu^{2+} was activated in liver and reversed in gill. Changes of GSH in livers and gills consisted with that of GST, which was enhanced when Cu^{2+} exposure began in several days. GSH concentrations in livers were induced after 5-day- Cu^{2+} exposure, which in gills were induced after 4-day- Cu^{2+} exposure. GSH contents increased in low dosage (0.005 mg/L) group and decreased in high dosage (0.05 mg/L) group along with continuous Cu^{2+} exposure. The MTs (concentration of metallothionein) in livers and gills of *B. purificata* were induced during the whole exposure process. MTs in all groups increased significantly within 12h Cu^{2+} exposure ($p < 0.01$), decreased

slightly later, then increased again, thereafter, reached to a peak value, and then decreased to a stable level on the 14d at last. MT in livers in treatments with 0.01 mg/L of Cu^{2+} was extremely significantly induced during the whole process ($p < 0.01$), which in gills was also significantly induced ($p < 0.01$) except on the 10d of exposure. On the last day of exposure, the MTs in livers and gills were extremely significant induced ($p < 0.01$) except that of livers in treatments with 0.05 mg/L of Cu^{2+} . These results suggested that all these parameters above were sensitive to the exposure of Cu^{2+} and could be used as biomarkers to evaluate the aquatic environment Cu^{2+} pollution and its ecological risk.

Key words: Cu^{2+} ; Superoxide dismatase; Catalase; Glutathione S-transferase; Glutathione; Metallothionein; *Bellamya purificata*

www.cnki.net