

重金属对真鲷生理生化作用的研究

I. 铜、锌、铬和硒对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性的综合影响*

蓝伟光 陈霓 杨孙楷

(厦门水产学院水产养殖系) (厦门大学海洋系)

摘要 本文探讨了铜、锌、铬和硒对真鲷肝脏碱性磷酸酶(Alpase)活性的综合影响。重金属铜、锌、铬和硒以不同的浓度混合,用数理统计的方法设计实验,把人工孵化后并养殖10个月的真鲷作为试验材料,暴露(Exposure)于各种混合浓度的实验海水中,以真鲷肝脏Alpase的活性变化作为检测指标,将实验测定的数据进行方差分析,结果表明:适量的铜和锌能激活真鲷肝脏Alpase的活性,过量时真鲷肝脏Alpase的活性又会受到明显的抑制;硒本身的影响很小,但硒和铜之间的交互效应却降低了过量铜对真鲷肝脏Alpase活性的抑制作用,证明硒与铜之间呈现颞颥作用;不同浓度的铬对真鲷肝脏Alpase的活性没有明显的影响;真鲷肝脏Alpase的活性有可能作为真鲷体内铜和锌缺乏或过量引起中毒的生化指标。

关键词 铜 锌 铬 硒 真鲷 碱性磷酸酶 综合影响

前言

铜、锌、铬和硒是大多数水生生物必需的微量元素,但当其浓度超过生物的生态幅度时,则会引起生物中毒。近年来,国内外许多学者进行了有关的研究工作,但目前普遍的研究工作是围绕重金属在受试生物体内的积累与致毒、生理生化效应以及对其生长的影响^[1~6],且以单种重金属的污染实验居多^[7],用酶活性指标的变化来探讨各种生物必需元素对海洋生物的影响(包括营养和生理两方面)的报道尚属少见,国内曾见刘发义用细胞色素氧化酶为指标,报道铜在对虾体内的致毒效应及其营养状态^[8]。

真鲷(*Pagrosomus major*)是名贵的海产经济鱼类,也是近岸颇具代表性的底栖鱼

本文于1991-01-05收到,修改稿于1991-11-20收到。

• 福建省自然科学基金资助项目。

类, 近年来已作为我国不少地区大力推广的海水养殖鱼类。笔者曾探讨了重金属对真鲷仔鱼存活率的影响^[9], 本文则以人工孵化后并养殖10个月的真鲷为材料, 考察铜、锌、铬和硒对其肝脏碱性磷酸酶活性的影响, 以探讨铜、锌、铬和硒及其交互效应对真鲷的营养和毒理学问题。

1 材料与方法

1.1 材料

真鲷1990年10月取自厦门火烧屿网箱养殖场, 鱼体长13~16cm, 重80~120g, 雌雄不拘, 用船运回厦门水产学院海水养殖场, 在8m³的长方形水池中暂养3d后开始实验。

分别用分析纯CuSO₄·5H₂O, ZnSO₄·7H₂O, K₂Cr₂O₇和Na₂SeO₄配成1 000mg/dm³贮备液(以重金属含量计, 下同), 实验时用海水稀释成所需浓度。

1.2 方法

试验是在本院海水养殖场18个方形水池中进行。池体为104cm×85cm×50cm, 每池盛水1.5m³。实验海水是将养殖场附近海边的高潮海水经水泵抽到蓄水池中, 经沉淀, 砂滤后从管道输到各水池中(所有输水管道均为塑料管), 实验海水的本底浓度为Cu 0.4μg/dm³, Zn 6.5μg/dm³, Cr 2.8μg/dm³, Se 0.8μg/dm³, 相对实验浓度可忽略不计。实验海水的盐度26~28, 温度27~29°C。实验期间不充气(因为水体很大可维持足够的溶解氧)。2d完全换水一次, 实验持续4d。为防止饵料影响实验海水的浓度, 整个实验过程不喂食。

用正交试验法设计并安排实验。表1选用L₉(3⁴)正交表, 用来考察铜、锌、铬和硒对试验结果的影响。表2选择L₈(2⁷)正交表, 用来考察铜、锌、硒之间的交互效应以及实验时间对试验结果的影响。两次实验共安排16组, 每组投放4尾真鲷。对实验结果进行方差分析。

表1 正交试验I的因素与水平(μg/dm³)

水平	A (Cu)	B (Zn)	C (Se)	D (Cr)
1	0	0	0	0
2	20	100	100	100
3	100	500	500	500

注1: 重金属3种水平为正常海水, 中等污染与严重污染。

注2: 表中重金属浓度系指不包括本底值的外加重金属浓度, 表2同。

表2 正交试验II的因素与水平(μg/dm³)

表头设计	A	B	A×B	C	A×C	B×C	D
水平	A (Cu)	B (Zn)	C (Se)	D (d)			
	(时间)						
1	20	100	100	2			
2	100	500	500	4			

1.3 酶活性的测定

养殖试验结束后, 将鱼活体取回实验室, 解剖、取出肝脏迅速称重后置-18°C冰箱中贮存待用。实验时将肝脏置冰溶中剪碎, 加10倍体积(V/W)预冷的甘油(30%)-KCl(0.1mol/dm³)溶液匀浆。匀浆置冰箱里抽提2~3h后在TGL-16C型台式高速离心机

于8 000g离心15min, 上清液即为制得的粗酶液。

取0.2cm³粗酶液, 加入0.1mol/dm³ Na₂CO₃-NaHCO₃缓冲液(pH=10.3, 含0.002mol/dm³ MgCl)和0.02mol/dm³苯磷酸二钠各0.4cm³, 于37°C反应30min后, 加入15%TCA1cm³, 终止反应, 静置15min, 过滤或离心。取1cm³滤液, 用Folin酚试剂显色, 以721型分光光度计于680nm测其吸光度。

粗酶液中的蛋白质含量用Lowry法测定, 以牛血清白蛋白作标准。

2 实验结果

2.1 铜、锌、铬和硒对真鲷肝脏Alpase活性的影响

重金属铜、锌、铬和硒对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性影响的正交试验结果如表3。对表3的数据进行方差分析结果如表4。

从表3直观分析, 真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性以第5组最高, 各因素水平为A₂B₂C₃D₁, 其次为第1组, 其条件为A₁B₁C₁D₁。进一步从R值看, 4种因素影响的主次顺序为B→A→C→D。从K值看, 各因素的最好水平在A₂B₂C₃D₁中, 这和试验指标的直观分析结果是基本相一致的。

表4的方差分析结果表明, 重金属铜和锌的影响差异显著, 置信度分别达95%和99%。硒也有一定的影响, 置信度可达90%, 在同一置信度下, 铬浓度的改变对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性变化无明显影响。

表3 正交试验I的结果分析表

No	A	B	C	D	真鲷肝脏Alpase比活性 (U/mg) *				
	(Cu)	(Zn)	(Se)	(Cr)	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	\bar{X}
1	1	1	1	1	3.15	3.21	3.77	3.83	3.49
2	1	2	2	2	2.90	2.81	3.26	3.41	3.10
3	1	3	3	3	2.45	2.37	3.16	3.23	2.80
4	2	1	2	3	2.34	2.46	2.98	2.84	2.66
5	2	2	3	1	4.25	4.34	5.02	5.09	4.68
6	2	3	1	2	3.45	3.62	2.78	2.94	3.20
7	3	1	3	2	1.75	1.79	2.37	2.49	2.10
8	3	2	1	3	3.61	3.86	2.91	3.09	3.37
9	3	3	2	1	1.73	1.79	2.51	2.43	2.11
\bar{K}_1	3.13	2.75	3.35	2.43	符号说明: X ₁ X ₂ X ₃ X ₄ \bar{X} 分别为各次测定的比活性值及平均值, \bar{K}_1 \bar{K}_2 \bar{K}_3 为各次水平比活性平均值, R为极差				
\bar{K}_2	3.51	3.72	2.62	2.80					
\bar{K}_3	2.53	2.70	3.19	2.94					
R	0.98	1.02	0.73	0.63					

* 酶活性单位U以 $\Delta A/0.01 \times \text{min}$ 表示。酶比活性指每mg蛋白中的酶活性。表5同。

2.2 铜、锌、硒之间的交互效应及暴露时间对真鲷肝脏Alpase活性的影响

将对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性影响显著的铜、锌和硒以及暴露时间(指暴露在混合重金属海水中的时间)作为试验因素,按表2设计正交试验,考察铜、锌与硒之间的交互效应以及暴露时间对试验指标的影响,结果如表5,对表5结果进行方差分析,结果如表6.

从表5直观分析,真鲷肝脏碱性磷酸酶活性以第2组最好,各因素水平为A₁B₁C₂D₂,这与正交试验I的实验结果是基本吻合的.从R值看,铜、锌仍为主要的影响因素.其次为铜与硒之间的交互效应.各因素的主次顺序为锌(B)→铜(A)→铜×硒(A×C)→暴露时间(D)→锌×硒(B×C)→铜×锌(A×B)→硒(C).

表5 正交试验II的结果分析表

No	A	B	A×B	C	A×C	B×C	D	真鲷肝脏Alpase比活性		
	(Cu)	(Zn)	(Cu×Zn)	(Se)	(Cu×Se)	(Zn×Se)		X ₁	X ₂	\bar{X}
1	1	1	1	1	1	1	1	3.82	4.43	4.15
2	1	1	2	2	2	2	2	5.16	4.72	4.94
3	1	2	2	1	1	2	2	2.78	3.43	3.10
4	1	2	2	2	2	1	1	3.58	4.16	3.87
5	2	1	2	1	2	1	2	4.32	4.96	4.14
6	2	1	2	2	1	2	1	3.02	2.76	2.89
7	2	2	1	1	2	2	1	1.98	2.56	2.27
8	2	2	1	2	1	1	2	2.53	1.98	2.26
\bar{K}_1	3.82	4.02	3.40	3.41	3.09	3.60	3.29			
\bar{K}_2	2.89	2.87	3.50	3.49	3.81	3.30	3.61			
R	1.12	1.15	0.10	0.08	0.72	0.30	0.32			

表6 正交试验II结果的方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A (Cu)	2.51	1	2.51	17.93	**
B (Zn)	2.64	1	2.64	18.86	**
A×B	0.02	1	0.02	0.14	
C (Se)	0.01	1	0.01	0.07	
A×C	1.04	1	1.04	7.43	*
B×C	0.18	1	0.18	1.28	
D (时间)	0.20	1	0.20	1.43	
误差	1.08	8	0.14		
总和	7.68	15			

** P<0.01; * P<0.05.

表4 正交试验I结果的方差分析

项目	平方和	自由度	均方	F值	显著性
A (Cu)	1.46	2	0.73	4.87	*
B (Zn)	1.98	2	0.99	6.60	**
C (Se)	0.88	2	0.44	2.93	(*)
D (Cr)	0.66	2	0.33	2.20	
误差	4.13	27	0.15		
总和	9.11	35			

** P<0.01; * P<0.05; (*) P<0.10.

表6的方差分析结果表明,铜与锌的影响都极为显著,其置信度均达到99%;铜和硒之间的交互效应影响显著,置信度达95%;当置信度取90%时,暴露时间和锌与硒之间的交互效应影响仍不显著;而铜与锌之间的交互效应极小,硒几乎没有影响。

3 讨论

3.1 铜与锌对真鲷肝脏Alpase活性的影响

碱性磷酸酶是生物体代谢的关键酶,是磷代谢过程中的重要酶类之一,对鱼类骨骼的钙化起着重要的作用,因而它有着重要的生物学意义。正交试验 I 与 II 的实验结果均表明,适量的铜与锌存在可激活真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性,而铜、锌浓度较高时真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性又会受到明显的抑制。在试验的浓度范围内,锌的影响比铜显著,这可能与实验设计的浓度锌高出铜5倍有关。

正交试验 I 中主要因素 A、B 的第3水平与其他水平分别进行多重比较(表7)表明: A_3 与 A_1 , A_3 与 A_2 之间均有显著的差异,说明 A_3 水平(含铜 $100\mu\text{g}/\text{dm}^3$)与 A_1 水平(不含外加铜)比较真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性已受到明显的抑制,此浓度的铜已使真鲷发生中毒;而 B_3 与 B_2 之间虽然差异显著,但 B_3 (含锌 $500\mu\text{g}/\text{dm}^3$)与 B_1 (不含外加锌)之间却无明显差异,说明此浓度的锌虽不能再激活真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性,但尚不致引起真鲷中毒。

表7 主要因素 A、B 的第3水平与其他水平之间的多重比较(Duncan法)

比较因素	<i>df</i>	<i>k</i>	$R_{0.05}$	$R_{0.01}$	\bar{K}	显著性
A_3 与 A_1	27	2	0.55	0.74	0.60	*
A_3 与 A_2	27	3	0.58	0.77	0.98	**
B_3 与 B_1	27	2	0.55	0.74	0.03	
B_3 与 B_2	27	3	0.58	0.77	1.02	**

* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$.

笔者曾报道^[9],真鲷仔鱼对铜的安全浓度为 $7\mu\text{g}/\text{dm}^3$, 锌为 $44\mu\text{g}/\text{dm}^3$ 。但本实验的结果却表明 $20\mu\text{g}/\text{dm}^3$ 的铜和 $100\mu\text{g}/\text{dm}^3$ 的锌的存在对真鲷(10月龄)肝脏的碱性磷酸酶有明显的激活作用,这说明真鲷生长的不同时期对重金属的忍耐阈限有很大区别。真鲷的早期发育阶段对重金属极为敏感,对水质的要求较高,而随着真鲷生长发育的进行,对重金属的忍受性也逐渐增强。生长到一定时期的真鲷,适当的生物必需的微量元素的存在可激活其肝脏碱性磷酸酶的活性,促进其体内的新陈代谢作用,而有利于真鲷的生长发育。

3.2 硒及其与铜、锌之间的交互效应对真鲷肝脏Alpase活性的影响

正交试验 I 的结果表明硒对真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性有一定的影响($P < 0.10$),正交试验 II 的结果却表明硒的影响极小,但铜与硒之间的交互效应却差异显著($P < 0.05$),铜硒之间的交互作用提高了真鲷肝碱性磷酸酶的活性,表明硒本身的影响不明显,但适量硒的存在却降低了铜的毒性,结果使高浓度的铜对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性的抑制有所削弱。正交试验 I 中铜的影响($P < 0.05$)包括了由于硒与铜之间的交互作用而减弱的毒性;正交试

验Ⅱ中则把硒与铜之间的交互作用单独考虑, 因此, 在正交试验Ⅱ中铜的影响 ($P < 0.01$) 比正交试验Ⅰ显著。硒与铜之间呈现拮抗效应而不是协同作用, 这与有关的文献报道是一致的^[10]。而锌与硒之间的交互作用则较为次要, 不同水平没有明显的差别。

3.3 其他因素对真鲷肝脏Alpase活性的影响

在试验的浓度范围内, 铬浓度的变化对真鲷肝脏碱性磷酸酶的活性没有产生明显的影响。刘发义等^[5]的研究结果认为铬因其是以 $\text{Cr}_2\text{O}_7^{2-}$ 形态存在, 难以与细胞中的配位体结合, 因而在梭鱼肝脏中的积累量很低, 这一解释似乎同样适用于本实验得出的结论。

正交试验Ⅱ结果表明真鲷在不同混合浓度的实验海水中暴露的时间对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性没有明显的影响, 但尚不能证明重金属对真鲷肝脏碱性磷酸酶活性的影响与暴露时间无关, 因为上述结果可能是由于试验时间间隔较短的缘故。

铜和锌是同一副族元素, 两者的化学性质有很多相似之处, 这两种元素在生物体内的积累有拮抗作用^[8]。但在本实验中铜与锌的交互效应却很小, 此原因尚有待进一步探讨。

本文在实验过程中得到厦门水产学院水产养殖系余德恭先生的大力支持与帮助, 厦门大学海洋系张其永教授审阅全稿, 特此致谢。

参考文献

- 1 Ariyoshi T *et al.* Profile of metal-binding proteins and heme oxygenase in red carp treated with heavy metals, pesticides and surfactants. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, 44 (4): 643~649
- 2 Gagne F *et al.* Metallothionein induction and metal homeostasis in rainbow trout hepatocytes exposed to mercury. *Toxicol. Lett.*, 1990, 51 (1): 99~107
- 3 Hamilton S J *et al.* Toxicity of organic selenium in the diet of chinook salmon. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1990, 9 (3): 347~358
- 4 Jordan S A and M K Bhatnagar. Hepatic enzyme activity after combined administration of methylmercury, lead and cadmium in the pekin duck. *Bull. Environ. Contam Toxicol.*, 1990, 44 (4): 623~628
- 5 刘发义等. Cu、Cd、Zn和Cr在梭鱼肝脏中的亚细胞分布. *海洋学报*, 1990, 12 (6): 800~807
- 6 柴敏娟等. 次致死浓度 Cu^{2+} 对罗非鱼呼吸生理的影响. *水产学报*, 1990, 14 (1): 50~54
- 7 Grice G D and M R Reeve. *Marine Mesocosms-Biological and Chemical Research in Experimental Ecosystems*. Springer-Verlag, New York, 1982
- 8 刘发义等. 铜在中国对虾体内的积累与致毒效应. *海洋与湖沼*, 1988, 19 (2): 133~139
- 9 蓝伟光等. 汞、铜、镉、锌对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
- 10 王万春. 硒与生物体内微量元素之间的相互作用. *自然杂志*, 1989, 12 (4): 266~269