

维生素 C、E 对镉致毒后中华绒螯蟹抗氧化系统酶活性的影响

刘晓玲¹, 周忠良², 陈立侨², 艾春香²

(1. 烟台大学 化学生物理工学院生物化学系, 山东 烟台 264005; 2. 华东师范大学 生命科学系, 上海 200065)

摘要: 通过在饲料中添加不同浓度的维生素 C (V_C), 维生素 E (V_E) 探讨其对镉致毒后中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 肝脏中超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPx) 活性变化的影响。结果表明, 与镉中毒对照组相比, 添加 V_C 组能延缓抗氧化酶活性降低时间, 减小其降低幅度。 V_C 添加量增加 (0.5% 上升到 1%), 抗氧化酶降低的延缓减小作用随之增加。而投喂添加了 V_E 的饲料, 河蟹肝胰腺中 SOD, CAT 和 GPx 的变化与投喂 V_C 组相似, 表现为 SOD、CAT 基础活性下降, GPx 活性上升, 同时也能减慢抗氧化酶活性降低时间, 减小其降低幅度。随 V_E 量增加 (0.02% 增加到 0.06%) 以上变化呈增强趋势。从实验结果看 V_C 、 V_E 都可在镉致毒初期起到抗氧化保护作用。

关键词: 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*); 镉; V_C ; V_E ; 超氧化物歧化酶; 过氧化氢酶; 谷胱甘肽过氧化物酶

中图分类号: Q55 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2006)01-0039-05

镉是一种常见的有毒重金属, 随着工农业的发展, 环境中金属镉的排放量越来越多, 镉进入水体环境中会引起水生生物的急性或慢性中毒, 造成畸变甚至死亡^[1]。而镉中毒主要体现在氧化损伤^[2,3], 因此对机体产生抗氧化保护作用的物质在很大程度上可以缓解甚至解除重金属的毒性。有关研究表明 V_C 与 V_E 对生物的保护作用主要体现在抗氧化方面。维生素可以灭活正常细胞活动或应激产生的有害自由基。其中 V_C 是细胞外液中最重要抗氧化剂, 它可以通过将水相中的过氧化自由基, 在其发动过氧化之前清除, 保护生物膜不受氧化损害, 而 V_E 是一种优良的生理性抗氧化剂, 能降低组织对氧的消耗, 预防饲料和虾蟹类体组织中多种不饱和脂肪酸的氧化, 提高虾蟹类的存活率和生长率。

中华绒螯蟹是我国最具养殖前景的水生经济动物之一, 作者做了大量的前期工作, 研究发现一定浓度的镉离子会使中华绒螯蟹的抗氧化酶活性产生一定规律的变化^[4], 在此基础上依据镉的毒理学机制, 对镉损伤进行预防性的研究, 并探讨了 V_C 、 V_E 对中华绒螯蟹

中毒的保护作用, 力求验证营养物质在保护其免受或少受重金属毒方面的作用。以期综合防止镉污染, 保护环境提供基础研究资料。

1 材料和方法

1.1 实验材料

$CdCl_2$ (AR) 为上海试剂厂生产。酶测定试剂盒购于南京建成生物公司。中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 取自上海市崇明农贸市场, 体质量 20 g 左右, 选择肢体完整, 大小基本一致的用于实验。

1.2 驯养

将中华绒螯蟹按投喂饲料的不同分组于华东师范大学生物系水生动物饲养实验室中驯养, 如表 1 所示。

收稿日期: 2004-10-30; 修回日期: 2005-01-20

基金项目: 教育部跨世纪优秀人才基金资助项目

作者简介: 刘晓玲 (1976-), 女, 山东莱州人, 硕士, 讲师, 主要从事生化与分子生物研究, E-mail: liuxiaoling@sohu.com

1 组对照组(投喂基础饵料组), 4 组强化组(分别投喂添加 V_C 10、5 g/kg; V_E 0.6、0.2 g/kg 的实验饵料)。放养水体为曝气后的地下井水, 自然水温、间歇充气, 每天换水, 保持水体干净, 换水量为 1/3。pH 约为 7.4, 溶解氧为 6.2~6.8 mg/L。每天投喂 2 次, 日投饵量为蟹体质量 5%, 驯养 40 d 以促进 V_C 和 V_E 的强化。

表 1 实验蟹的驯养

Tab.1 The treatments of the experimental crab

组别	V_C 添加量(%)	V_E 添加量(%)
对照组	0	0
V_C 强化组 1	0.5	0
V_C 强化组 2	1	0
V_E 强化组 3	0	0.06
V_E 强化组 4	0	0.02

注: 基础饵料配置及 V_C 、 V_E 添加量参照艾春香的方法

1.3 染毒

将驯养后的中华绒螯蟹按组别分别浸泡在 2 mg/L 镉溶液中染毒^[4], 每组设平行, 各设 30 只蟹。在浸泡后的第 0, 6, 12, 24, 48, 72, 96 小时取河蟹的肝胰腺。

1.4 样品的制备

每次取各组样品 3~5 只缓冲液冲洗后, 用洁净的吸水纸吸去表面水分并称质量, 取组织块 0.2 g, 加其质量 9 倍的预冷 0.86% 生理盐水冰浴匀浆后经冷冻高速离心机离心, 取上清粗酶液待测。

1.5 检测方法

SOD 酶活力用南京建成生物公司试剂盒进行测定, 采用黄嘌呤氧化酶法测酶活性。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 量为一个亚硝酸盐单位。

CAT 活力测定采用紫外分光光度分析法 (UV-method) 测定^[5]。

GPX 活性测定用南京建成生物公司试剂盒进行测定, 具体操作按试剂盒中的说明书进行。规定每毫克蛋白质, 每分钟 (扣除非酶反应的作用) 使反应体系中 GSH 浓度降低 1 $\mu\text{mol} / \text{L}$ 为一个酶活力单位。

2 实验结果

2.1 V_C 对镉氧化毒性的影响

V_C 强化实验组与基础饵料投喂对照组在驯养 40 d

后, 经镉浸泡, 结果显示抗氧化系统酶活性变化有明显不同。

2.1.1 V_C 对 SOD 活性变化的影响

如图 1 所示, 在未受到镉影响时(0 h), 肝胰腺 SOD 酶活性依次为: 对照组 > 0.5% V_C 组 > 1% V_C 组, 即添加 V_C 后 SOD 酶活性较低, 反映出体内自由基较少, 说明 V_C 有抗氧化保护作用。暴露于 2 mg/L 镉溶液后, 河蟹肝胰腺 SOD 酶活性发生相应变化, 镉中毒对照组酶活性前 48 h 降低了 77.78%, 在此之后酶活性应激回升, 72 h 活性升到最高, 之后又有所下降; 0.5% V_C 镉中毒组前 48 h 仅降低 43.26%, 与镉中毒对照组比降低程度明显减小。且 72 h 才降到最低点, 之后酶活性才开始回升; 1% V_C 镉中毒组酶活性前 48 h 降低了 41.14%, 与对照组及 0.5% V_C 实验组比, 降低幅度最小。到 72 h 才降到最低点。之后酶活性回升。

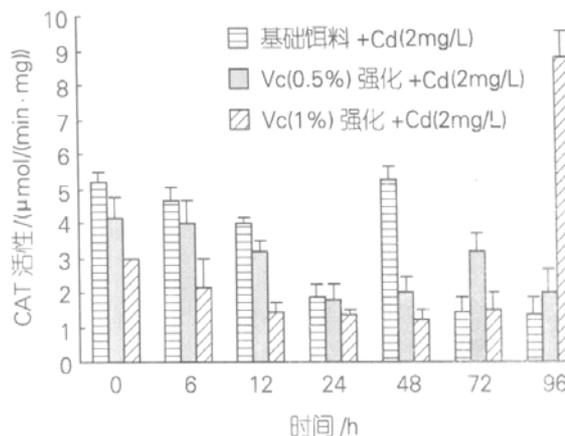


图 1 V_C 对镉中毒后肝胰腺 SOD 酶活性影响

Fig.1 Effect of V_C on the SOD activity in the crabs after Cd immersion

从时间-效应关系看, 受镉作用时对照组较添加 V_C 组酶活性变化快。从酶活性随时间减小幅度看, 镉中毒对照组 > 0.5% V_C 镉中毒组 > 1% V_C 镉中毒组, 1% V_C 镉中毒组的酶活性减小幅度最小且相对稳定。说明 V_C 有抗氧化保护作用。

2.1.2 V_C 对 CAT 活性变化的影响

如图 2 所示, 未受到镉影响时, 河蟹肝胰腺中 CAT 酶活性依次为: 对照组 > 0.5% V_C 组 > 1% V_C 组。即添加 V_C 后 CAT 酶活性较低, 反映出体内 H_2O_2 较少, 表明

V_C有增强抗氧化作用。暴露于 2 mg/L 镉溶液后,酶活性发生相应变化。镉中毒对照组肝胰腺中的 CAT 活力在前 24 h 降低了 64.93%,之后酶活性应激回升,在 48 h 升高到最高,波动幅度最大;0.5% V_C 镉中毒组前 24 h 降低了 57.04%,降低幅度较对照组小。1% V_C 镉中毒组 CAT 活力在前 24 h 降低了 56.47%,48 h 才降低到最低点,之后酶活性逐渐回升,酶活性波动较小,相对稳定。

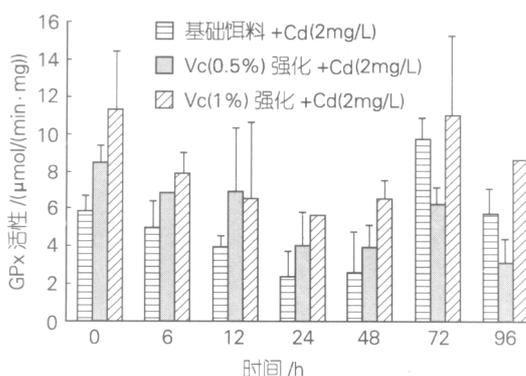


图 2 Vc 对镉中毒后肝胰腺 CAT 酶活性影响

Fig.2 Effect of Vc on the hepatopancreas CAT activity in the crabs after Cd immersion

2.1.3 V_C对 GPx 活性变化的影响

如图 3 显示,未受镉影响时河蟹肝胰腺中 GPx

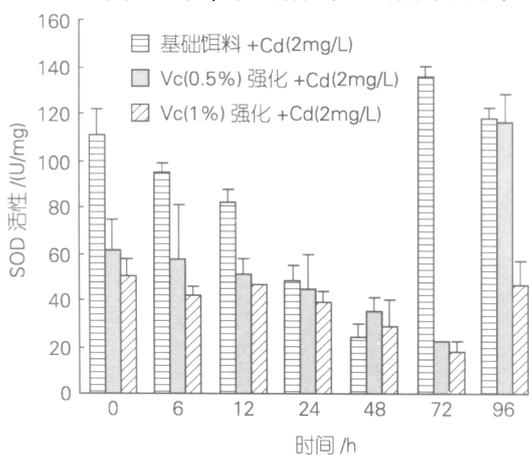


图 3 Vc对镉中毒后河蟹肝胰腺 GPx酶活性的影响

Fig.3 Effect of Vc on the GPX activity in hepatopancreas of the crabs after Cd immersion

酶活性依次为:1% V_C组>0.5% V_C组>对照组。暴露于 2 mg/L 镉溶液后,GPx 酶活性发生变化。镉中毒对照组 GPx 活性在 24 h 降到最低点,降低了 58.97%。酶活性

在 72 h 达到最高,0.5% V_C 镉中毒组 GPx 活性在浸泡镉后 24 h 降到最低点,降低了基础酶活性的 52.67%。1% V_C 镉中毒组前 24 h 酶活性降低了 49.85%;分析结果表明,镉中毒后添加 V_C 组 GPx 酶降低幅度小于对照组,相对稳定。

2.2 V_E对镉氧化毒性的影响

V_E 强化实验组与基础饵料投喂对照组在驯养 40 d 后,经镉浸泡,结果显示抗氧化系统酶活性变化有明显不同。

2.2.1 V_E对 SOD 活性变化的影响

如图 4 所示,未受镉影响时肝胰腺中 SOD 酶基础活性依次为:对照组>0.02% V_E组>0.06% V_E组,即添加 V_E后 SOD 酶降低,反映出河蟹体内自由基较少,说明 V_E有抗氧化保护作用。暴露于 2 mg/L 镉溶液后,酶活性发生相应变化。镉中毒对照组酶活性前 48 h 降低了 77.78%,48 h 酶活性下降到最低点。在此之后酶活性开始应激回升,72 h 活性升高,之后又有所下降;0.02% V_E 镉中毒组前 48 h 降低了 64.022%,比镉中毒对照组减小 13.76%,72 h 才降到最低点。0.06% V_E 镉中毒组酶活性前 48 h 降低了 50.38%,比镉中毒对照组减小 20.4%,到 72 h 才降到最低点。之后酶活性逐渐回升,到达最高点的时间也推迟了。

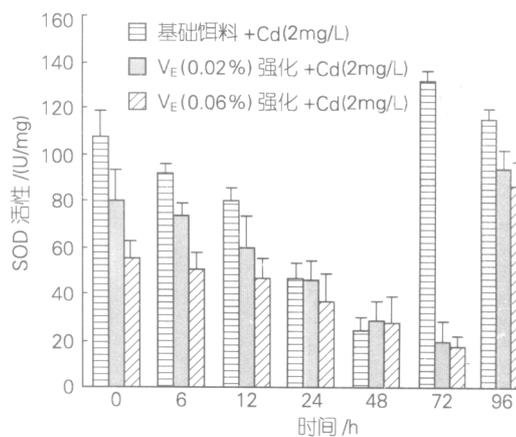


图 4 V_E对镉中毒后肝胰腺中 SOD 酶活性的影响

Fig.4 Effect of V_E on the SOD activity in the crabs after Cd immersion

分析结果表明,添加 V_E 镉中毒组酶活性变化相对缓慢,并且酶活性降低幅度小于镉中毒对照组,说明 V_E 添加组耐受性增强。

2.2.2 V_E对 CAT 活性变化的影响

如图 5 所示, 未受镉影响时, CAT 酶活性依次为: 对照组>0.02% V_E 组>0.06% V_E 组。经 2 mg/L 镉浸泡后, 酶活性发生变化。镉中毒对照组肝胰腺中的 CAT 活力在前 24 h 降低了 64.93%, 之后酶活性有所回升, 在 48 h 升高到最高, 0.02% V_E 镉中毒组前 24 h 降低了 63.2%, 24 h 降到最低; 0.06% V_E 镉中毒组 CAT 活力在前 24 h 降低了 48.1%, 之后酶活性有所回升。从镉浸泡后酶活性波动幅度看, 添加 V_E 组酶活力小于对照组, 相对稳定。说明 V_E 有增强抗氧化作用。

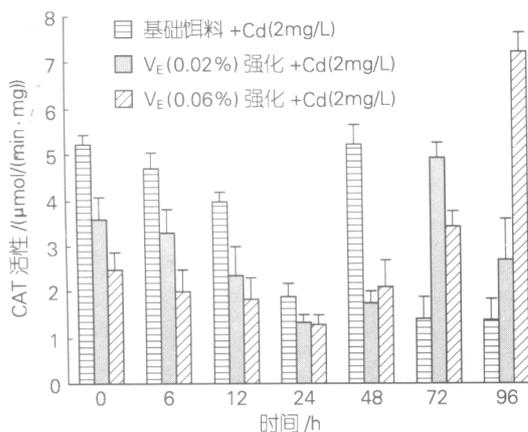


图 5 V_E 对河蟹镉中毒后肝胰腺中 CAT 酶活性影响

Fig.5 Effect of V_E on the CAT activity in hepatopancreas of the crabs after Cd immersion

2.2.3 V_E 对 GPx 活性变化的影响

如图 6 所示, 未受镉影响时, GPx 酶活性依次为: 0.06% V_E 组>0.02% V_E 组>对照组。浸泡于镉溶液后, 镉中毒对照组 GPx 活性在 24 h 降到最低点, 降低了 58.97%; 0.02% V_E 镉中毒组 GPx 活性在 24 h 降到最低点, 降低了 57.46%; 0.06% V_E 镉中毒组前 24 h 酶活性降低了 56.43%。分析结果表明, 添加 V_E 后 GPx 酶活性波动幅度相对较小。

3 讨论

3.1 维生素 C 对河蟹镉氧化毒性作用的影响

V_C 可以通过对生物体内的超氧化物、羟自由基、过氧化氢、过氧自由基和单线态氧的有效清除, 来增强水生动物对环境污染物和刺激物的耐受力。 V_C 尤其与鱼

虾等水生生物的解毒抗病有关, 组织中 V_C 含量高时, 鱼虾等对环境污染的耐受性增加^[6]。

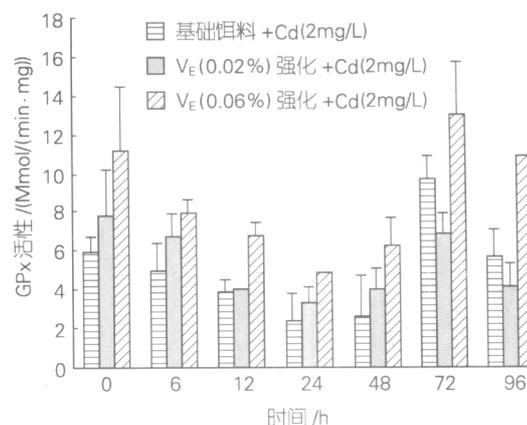


图 6 V_E 对镉中毒后肝胰腺 GPx 酶活性影响

Fig.6 Effect of V_E on the GPx activity in hepatopancreas of the crabs after Cd immersion

研究结果显示, 饵料中添加 V_C 后, 河蟹的 SOD 的活力显著降低了, 并且饵料中含有浓度略高的 V_C 实验组 SOD 酶活力降低幅度也较大。实验组 SOD 酶活力降低说明河蟹体内自由基相对对照组减少, 证明河蟹吸收 V_C 后能调节体内的氧化物质水平。从而起到抗氧化保护作用。SOD 酶活性降低可以推断产物 H_2O_2 也有所减少, 而 CAT 与 GPx 都起到清除 H_2O_2 的作用, 但有关研究表明这两种酶与 H_2O_2 的作用关系是不同的, 其中 H_2O_2 的浓度也决定哪种酶参与反应^[2], GPx 的主要作用是清除氢过氧化物, 并在 CAT 含量较少或 H_2O_2 产量很低时替代 CAT 清除 H_2O_2 ^[7]。由于两种酶发挥的作用机理不同, 所以在添加 V_C 后产生的结果不同, 添加 V_C 后 CAT 酶活性有所降低, 这与 V_C 可以有效地调节河蟹体内的 H_2O_2 水平有直接的关系。而添加 V_C 后 GPx 酶活性有所提高主要因为: 一方面添加 V_C 实验组河蟹体内 H_2O_2 产量减低, CAT 酶活性有所降低, 此时 GPx 作为清除 H_2O_2 的有效酶, 酶活性得到激发。另一方面河蟹肝胰腺中由于自由基的产生常常会伴随脂质过氧化物的发生。而 GPx 有保护脂质过氧化的重要作用, 所以 GPx 活性得到激发。

实验结果表明, 添加 V_C 在镉中毒早期可以影响抗氧化酶活力的变化: 一方面可以降低酶活性的减小幅度; 另一方面可以减缓酶活性的降低, 推迟应激回升的时间。说明 V_C 能有效清除自由基, 增加机体抗氧化能力,

而酶活性的应激回升是机体在初步中毒后细胞内氧自由基积累到一定程度后诱导产生的发应,应激回升时间的推迟说明机体自由基的积累能力相对增强,对同步环境污染的耐受性相对增加,其中 1% V_C 镉中毒组较 0.5% V_C 镉中毒组更能推迟酶活力的降低,降低酶活力减小幅度,推测可能是由于饵料中增加 V_C 的浓度可以增加 V_C 在肝胰腺中积累量。

3.2 V_E 对河蟹镉氧化毒性作用的影响

V_E 主要通过对人体脂质过氧化反应的抑制作用及其对自由基损伤所致膜结构的修复而参与体内自由基代谢。 V_E 可保护体细胞免于自由基破坏并使细胞膜维持正常功能^[8]。随着饵料中 V_E 浓度的升高,机体组织中 V_E 含量增加,引起组织中 SOD 活力与 CAT 活性下降,其中 0.06% V_E 组比 0.02% V_E 组酶活性低。而 GPx 活性产生相反变化。产生这种实验现象的机理与 V_C 作用下酶活性的变化相似。有报道对添加 V_C 后罗氏沼虾体内抗氧化系统酶活性的影响研究表明,添加 V_C 后肝胰腺中 SOD 酶活性下降,并且 V_E 浓度越高酶活性越低,而 CAT 酶活性变化不大,GPx 酶活性随 V_E 浓度增高而升高^[9],这与本实验结论相似。

实验结果还显示,添加 V_E 后可以对镉的氧化毒性造成影响,能减缓酶活性的降低,说明 V_E 对河蟹有一定的保护作用。其中 0.06% V_E 镉中毒组比 0.02% V_E 镉中毒组保护作用更好,认为可能是由于饵料中 V_E 的量增加后肝胰腺中积累量也增加了。

综合研究结果可以得出结论,镉可以对河蟹造成氧

化毒性作用,而 V_C 与 V_E 能保护河蟹,在中毒初期降低镉的这种毒性作用。在满足正常生长发育需要的前提下,提高饲料中 V_C 、 V_E 的含量,将有助于增强机体抗氧化能力。

参考文献:

- [1] Coogan T P, Bare R M, Waalkes M P. Cadmium-induced DNA strand damage in cultured liver cells: reduction in Toxicol[J]. *Appl Pharmacol*, 1992, 113: 227-233.
- [2] 方允中,李文杰. 自由基与酶基础理论及其在生物学和医学上的应用[M]. 北京: 科学出版社, 1989. 129-146.
- [3] 徐立红,张甬元,陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. *水生生物学*, 1995, 19(2): 171-185.
- [4] 刘晓玲,周忠良,陈立侨. 镉对中华绒螯蟹抗氧化酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2003, 8: 59-62.
- [5] 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 改良的连苯三酚字样测定超氧化物歧化酶活性的方法[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1991, 18(2): 163-165.
- [6] 赵文. 维生素 C 与水产养殖[J]. *饲料博览*, 1995, 5: 35-37.
- [7] 张洪斌. 谷胱甘肽和维生素 E、C 与自由基[J]. *新疆师范大学学报(自然科学版)*, 1999, 18(3): 73-76.
- [8] 董晓慧. 杨原志. 自由基与维生素 E 的抗氧化作用[J]. *饲料研究*, 2003, 6: 15-18.
- [9] Jagneshwar D. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2000, 127: 101-115.

Effects of V_C and V_E on hepatopancrea antioxidative enzymes in Chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis*

LIU Xiao-ling¹, ZHOU Zhong-liang², CHEN Li-qiao², Ai Chun-xiang²

(1. Biochemical Department, College of Biology Science and Chemical Engineering, YanTai University, Yantai 264005, China; 2. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai, 200062, China)

Received: Oct., 30, 2004

Key words: *Eriocheir sinensis*; Cd; V_C ; V_E ; SOD; CAT; GPx

Abstract: The effects of V_C and V_E on the activities of SOD, CAT and GPx were studied by supplementing various V_C and V_E contents in the diets. The results showed that the activities of SOD and CAT in hepatopancrea were decreased with supplemented V_C and V_E but the activity of GPx was increased. Enzymes will be decreased by Cd immersion, V_C and V_E can prevent the decrease of enzymes. With increasing V_C and V_E levels, the defense ability was improved. The effect of V_E was the same as that of V_C . However, V_C and V_E have considerable values in preventing and curing Cd toxicosis on crabs.

(本文编辑: 张培新)