

文章编号: 1000-0615(2004)01-0089-04

多氯联苯对剑尾鱼 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

方展强, 张凤君, 郑文彪, 马广智, 伍育源, 肖智

(华南师范大学生命科学学院, 广东 广州 510631)

摘要: 采用毒性实验的方法, 定量地研究了多氯联苯暴露对剑尾鱼肝脏、卵巢及鳃组织中 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响。结果表明: 不同组织其 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的高低存在明显差异。多氯联苯对剑尾鱼肝脏及卵巢的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性有抑制作用但不显著; 对鳃的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性则显示有显著的抑制作用, 并随暴露浓度和时间的增加而提高。3 种组织中鳃 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 对多氯联苯显得更为敏感。

关键词: 剑尾鱼; 多氯联苯; $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性; 肝脏; 卵巢; 鳃

中图分类号: S942 文献标识码: A

Effects of polychlorinated biphenyls on activity of $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ in *Xiphophorus helleri*

FANG Zhan-qiang, ZHANG Feng-jun, ZHENG Wen-biao, MA Guang-zhi, WU Yu-yuan, XIAO Zhi

(College of Life Sciences, South China Normal University, Guangzhou 510631, China)

Abstract: Polychlorinated biphenyls (PCBs) have been studied worldwide in the last twenty years, because of their large production and usage rates, considerable environmental persistency and harmful biological effects. Fish bioaccumulation markers may be applied in order to elucidate the aquatic behavior of environmental contaminants, as bioconcentrators to identify certain substances, such as PCBs, with low water levels and to assess exposure of aquatic organisms. Swordtails (*Xiphophorus helleri*) were obtained from Pearl River Fisheries Research Institute. Short-term (24, 48, 72 and 96 h) median lethal concentration (LC_{50}) toxicity tests were conducted. With swordtail fish exposed to PCBs with $0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ for 7 days, the activities of $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ of liver, gill and ovary tissues in 72 h were quantitatively studied by toxic experimental methods. Aim of this study was to test (1) the influence of the PCBs-polluted sludge on the fish activities; (2) if the gill, ovary or hepatic $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in fish could be considered a valid biomarker for environmental risk assessment. The results indicated that the semi-lethal concentration (LC_{50}) of 96 h for PCBs to swordtails was $2.063 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$. The results also indicated that $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ exhibited different activities in different tissues. The $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities of gill was more susceptible to PCBs among three tissues. The inhibitions to hepatic $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ and ovary $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ were not so remarkable ($P > 0.05$), while gill $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ was inhibited by PCBs very significantly as the extent of exposure time and toxic concentrations ($P < 0.01$). The experiment indicates that the activities and sensitivities to PCBs of $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ in gill are higher than those in liver and ovary, which may be associated with their physiological

收稿日期: 2002-11-20

资助项目: 广东省重点攻关科技项目资助(2KB05402N)

作者简介: 方展强(1953-), 男, 广东普宁人, 教授, 硕士, 从事动物学研究。Tel: 020-85211602, E-mail: fangzqh@sncu.edu.cn

functions. It also indicates that the gill $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity in swordtails could be considered a valid biomarker for environmental risk assessment.

Key words: *Xiphophorus helleri*; polychlorinated biphenyls; $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities; liver; ovary; gill

多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 一类有机氯污染物尽管在水环境中含量低,但由于难降解、毒性大,对水生生物有致畸、致突变和致癌作用,近年来人们日益重视其对水生生物的毒害作用机制的研究,尤其从酶的活性研究去探讨鱼类对 PCBs 中毒的生化机理^[1-3]。 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是广泛存在于生物细胞质膜上,水解 ATP 获得能量、逆电化学梯度转运 Na^+ ,同时反方向转运 K^+ 的一种内膜蛋白,也称钠泵^[4]。许多毒物包括 PCBs 都可影响鱼类 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性^[1]。剑尾鱼 (*Xiphophorus helleri*) 是一种热带淡水小型鱼类,原产南美洲,由于具有体型小、繁殖周期短,易饲养,可在实验室条件下进行纯化培育;并且对某些有机污染物或重金属敏感,已被推荐作为生态毒理学测试的理想实验动物^[5]。剑尾鱼对某些化合物的敏感性试验已有报道^[6]。PCBs 对剑尾鱼 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响尚未见报道。本文使用浸浴法以不同 PCBs 浓度为剑尾鱼染毒,探讨 PCBs 对剑尾鱼不同组织中 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的影响,为我国的鱼类实验动物开发利用研究工作提供有益的资料。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼驯养

实验剑尾鱼种质健康,20 日龄,全长 $12.3 \pm 2.2\text{mm}$,体重 $0.11 \pm 0.05\text{g}$,取自珠江水产研究所。实验前先驯养一周,水温 $16 \pm 2^\circ\text{C}$,pH 为 6.8,水硬度为 2.4 度(德国度)。

1.2 多氯联苯对剑尾鱼(幼鱼)96h LC_{50} 实验

实验分 0、0.08、0.4、2、10 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 6 个 PCBs 浓度组,每组放幼鱼 10 条。实验中记录各组 24、48、72 和 96h 的死亡数。以镊子夹住幼鱼尾柄而无反应为死亡。另设一平行对照组。

1.3 染毒实验及取样

实验分 0、2 和 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 3 个 PCBs 浓度。每箱放鱼 16 条,每隔两天更换一次毒液,每天两次喂食前均彻底吸出水族箱中残留的饵料及废物,每箱均用同样管径的气头昼夜充气。每 12、24、48 和 72h 取 4 条活鱼快速剖取肝脏、鳃及卵巢,编号

放入 1.5mL 离心管中放入 -40°C 冰箱冷冻待测 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性。

1.4 样品处理及 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性测定

样品处理 每个肝样品均加预冷的匀浆介质 4mL,每个鳃样品均加预冷的匀浆介质 6mL,每个卵巢样品加预冷的匀浆介质 6mL,用超声波细胞破碎仪在冰浴条件下匀浆,仪器状态设为每隔 4s 匀浆 2s,共 50 次。将匀浆液用冷冻离心机离心, $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 15min。取上清液用于测定 ATPase 活性。

$\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶比活的测定 取酶样品 1mL,反应介质 I 0.9 mL,在 37°C 的水浴中反应 30min,取出后立即放入冰水混合物中,加入 1.0 mL 10% 三氯醋酸终止反应。反应液经 $3000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10min,取其上清液 0.5 mL 用于测定水解产生的无机磷量。同时设一空白对照管,先加三氯醋酸再加酶样品。ATPase 水解产生的无机磷量等于反应管中无机磷的量减去空白对照管中无机磷的量。测定 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 活性的方法同测总 ATPase 活性的方法,只是反应介质为反应介质 II^[7]。

样品中蛋白质含量的测定 采用 Lowry 法^[8],将测定管吸光度查标准曲线,求得每 mL 匀浆稀释液中蛋白量,再乘以匀浆总毫升数,即得 0.1mL 组织匀浆悬浮液中酶液蛋白含量(mg)。

$\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的定义每毫克蛋白质每小时分解产生每微摩尔的无机磷的量为 1 个酶活性单位。计算公式为:

$$\text{ATPase 酶活性} (\mu\text{molPi}/\text{mgPr} \cdot \text{h}) = \text{水解产生无机磷} \times \frac{4}{31} \times \frac{4}{0.1\text{mL 酶液蛋白量}}$$

$$\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase 酶活性} = \text{总 ATPase 活性} - \text{Mg}^{2+} - \text{ATPase 活性}$$

1.5 数据处理与分析

实验数据用两次重复的平均数及标准差表示,不同处理组数据间的差异应用 SPSS 软件,采用成对样本 T 检验法进行分析, $P < 0.05$ 认为存在显著性差异, $P < 0.01$ 认为存在极显著差异。

2 结果

2.1 多氯联苯对剑尾鱼幼鱼的 LC_{50} (96h)

PCBs 对剑尾鱼幼鱼(20d)的急性毒性实验的结果用概率单位法(Probit method)^[9]求出 PCBs 对剑尾鱼幼鱼的 96h $\text{LC}_{50} = 2.063 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 多氯联苯对剑尾鱼不同器官组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

肝脏组织 表 1 为 PCBs 暴露对剑尾鱼肝脏组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的实验结果。结果显示暴露过程各个染毒组在每一取样时间测得的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性均明显低于同时期

的对照组,且同一浓度 PCBs 暴露组随暴露时间的延长 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性逐渐降低。

卵巢组织 表 2 为 PCBs 暴露对卵巢 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的实验结果。结果显示各个组没有发生显著变化($P > 0.05$)。

鳃组织 表 3 为 PCBs 暴露对鳃 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响。从中可以看出 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCBs 暴露组在暴露 48h 后 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性与对照组相比有极显著的降低($P < 0.01$),且随时间延长逐渐降低。 $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ PCBs 暴露组有着与之相似结果。而在暴露的 24h 内,两个染毒组酶活性与对照组相比无显著变化($P > 0.05$)。

表 1 PCBs 对剑尾鱼肝脏组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

Tab.1 Effect of PCBs on $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of liver in *X. helleri*

PCBs 浓度 PCBs concentration	酶活性 enzymes activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{Pi}/\text{mg}\cdot\text{pr}/\text{h}$)			
	12h	24h	48h	72h
对照 control	0.455 ± 0.008	0.452 ± 0.005	0.456 ± 0.010	0.456 ± 0.005
$2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.454 ± 0.004°	0.450 ± 0.011°	0.449 ± 0.012°	0.443 ± 0.013°
$50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.453 ± 0.011°	0.450 ± 0.006°	0.447 ± 0.013°	0.443 ± 0.024°

注:° $P > 0.05$; $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 8$; Notes: values are expressed as mean ± SD of 8 observations; ° $P > 0.05$

表 2 PCBs 对剑尾鱼卵巢组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

Tab.2 Effect of PCBs on $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of ovary in *X. helleri*

PCBs 浓度 PCBs concentration	酶活性 enzymes activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{Pi}/\text{mg}\cdot\text{pr}/\text{h}$)			
	12h	24h	48h	72h
对照 control	0.323 ± 0.005	0.322 ± 0.001	0.323 ± 0.004	0.322 ± 0.006
$2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.324 ± 0.012°	0.321 ± 0.010°	0.315 ± 0.005°	0.306 ± 0.017°
$50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.321 ± 0.011°	0.320 ± 0.005°	0.308 ± 0.012°	0.300 ± 0.017°

注:° $P > 0.05$; $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 8$; Notes: values are expressed as mean ± SD of 8 observations; ° $P > 0.05$

表 3 PCBs 对剑尾鱼鳃组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响

Tab.3 Effect of PCBs on $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of gill in *X. helleri*

PCBs 浓度 PCBs concentration	酶活性 enzymes activity ($\mu\text{mol}\cdot\text{Pi}/\text{mg}\cdot\text{pr}/\text{h}$)			
	12h	24h	48h	72h
对照 control	0.751 ± 0.003	0.751 ± 0.003	0.751 ± 0.005	0.752 ± 0.006
$2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.761 ± 0.007*	0.739 ± 0.008°	0.681 ± 0.006*	0.617 ± 0.003**
$50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	0.742 ± 0.014°	0.731 ± 0.011°	0.680 ± 0.013*	0.608 ± 0.014**

注:° $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 8$

Notes: values are expressed as mean ± SD of 8 observations; ° $P > 0.05$, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $\bar{X} \pm \text{SD}$, $n = 8$

3 讨论

3.1 多氯联苯对剑尾鱼幼鱼的半致死浓度 (LC_{50})

国际标准化组织 (ISO) 推荐使用斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 和黑头软口鲮 (*Pimephales promelas*) 等小型淡水鱼类为标准鱼类毒性试验动物。戴树柱^[10]报道黑头软口鲮与 PCBs 接触 30d, 半致死剂量为 $3.3 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。本实验表明, PCBs 对剑尾鱼幼鱼 96h 的半致死浓度为 $2.063 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,

说明剑尾鱼对 PCBs 胁迫的敏感性比黑头软口鲮较高。剑尾鱼所具有的生物学特性作为一种较为理想的鱼类实验动物由珠江水产研究所推荐^[5], 本实验证明从水生毒理学的角度将剑尾鱼作为毒性试验材料是较理想的种类。

3.2 多氯联苯对剑尾鱼不同器官组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的差异

肝、卵巢和鳃组织的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性对 PCBs 胁迫的敏感性表现出一定的差异。本实验中发现 $2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 及 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 PCBs 对剑尾鱼

的鳃 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性有明显的抑制作用,且与暴露浓度及暴露时间呈正相关。已经报道,用三氯联苯对草鱼鳃 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性影响的实验也发现了明显的抑制作用^[1]。对肝及卵巢的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的测定结果则表明 PCBs 对肝脏的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性也有抑制的趋势,但结果并不显著。对卵巢 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的实验结果则无明显变化。根据鳃的功能特点,鳃最先接触到水中的 PCBs,其结构特点又使鳃易于吸收 PCBs,所以鳃 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 受 PCBs 的影响较大,因此,与肝脏和卵巢组织相比,鳃组织作为灵敏指示 PCBs 胁迫程度的优先组织。肝脏作为解毒器官,PCBs 等异构体被鱼体吸收后的毒物最终积蓄在肝组织中,故肝 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 受 PCBs 的影响也较大;而对 *Heterandria formosa* 卵的细胞生化研究表明, $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 位于卵母细胞和滤泡细胞微绒毛的部位上^[11],但本实验的暴露时间较短,这可能是造成 PCBs 对肝脏和卵巢的 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响与对照组相比差异不显著的原因。这将有待作进一步的实验加以验证。

3.3 多氯联苯对鱼类的致毒机理

$\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 在鱼类的水盐调节中具有重要作用^[4]。淡水鱼需要不断从低渗环境中吸收无机盐离子,并排出低渗尿,以维持水盐代谢的平衡。许多毒物都可影响 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性,如各种表面活性剂、重金属、多氯联苯等。也有实验表明,机体中过量的超氧阴离子也可使 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 受到损伤^[12]。PCBs 对剑尾鱼鳃 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性有明显抑制作用,PCBs 的毒性靶器官是鱼鳃内的氯细胞,已经证明氯细胞内的膜管系统含有几种离子转移的 ATPase,包括 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 。PCBs 对其损伤的机理可能是活性氧的直接作用,造成酶活性部位某些最基本氨基酸氧化,从而使酶活性降低。PCBs 对剑尾鱼鳃组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活性的抑制作用与其剂量高低和暴露时间长短呈正相关。

衷心感谢珠江水产研究所李凯彬老师提供实验鱼及有关剑尾鱼的资料。

参考文献:

[1] Xu L H, Zhang Y Y, Wang D M. Using the effects of

- environmental toxicants on the ATPase activity of grass carp tissues as an ecotoxicological index - A preliminary study[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1987, 11(3): 193 - 202. [徐立红,张甬元,王德铭.用环境毒物对草鱼组织 ATPase 的影响作为生态毒理学指标的初步研究[J].水生生物学报,1987,11(3):193 - 202.]
- [2] Xu L H, Zhang Y Y, Chen Y Y. The advances of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(2): 171 - 185. [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].水生生物学报,1995,19(2): 171 - 185.]
- [3] Tang X X, Zhang P Y. Effects of anthracene on activity of superoxide dismutase in *Sebastodes fuscus*[J]. J Fish China, 2000, 24(3): 217 - 220. [唐学玺,张培玉.蒽对黑鲷超氧化物歧化酶活性的影响[J].水产学报,2000,24(3): 217 - 220.]
- [4] Lu J M, Lu L, Lin Y H, et al. The effect of low pH on $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of gill tissues of the common carp[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(1): 102 - 104. [卢建民,卢玲,蔺玉华,等.低 pH 值对鲤鱼组织 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响[J].水生生物学报,2001,25(1): 102 - 104.]
- [5] Huang Z B, Wu S Q, Shi C B, et al. Study on biological characteristics of swordtails, *Xiphophorus helleri*[J]. J Fish Sci China, 2000, 7(3): 107 - 109. [黄志斌,吴淑勤,石存斌,等.剑尾鱼的若干生物学特性研究[J].中国水产科学,2000,7(3):107 - 109.]
- [6] Pan H J, Wu S Q, Huang Z B, et al. The sensitive test of potassium dichromate and malathion to different bodily form, specifications and sexual distinction of swordtails, *Xiphophorus helleri*[J]. Freshwater Fisheries, 1996, 26(Suppl): 83 - 87. [潘厚军,吴淑勤,黄志斌,等.不同体征、规格、性别的剑尾鱼对重铬酸钾和马拉硫磷的敏感性试验[J].淡水渔业,1996,26(增刊):83 - 87.]
- [7] Patxon R, Limmiager B L. Altered activities of branchial and renal $\text{Na}^+/\text{K}^+ -$ and $-\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ in cold-acclimated goldfish (*Carassius auratus*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1983, 74B(3): 503 - 506.
- [8] Lowry O H. Protein measurement with the Folin-Phenol reagent [J]. J Biol Chem, 1951, 193: 263 - 265.
- [9] Zhou Y X. Methods of toxicity test to aquatic organisms[M]. Beijing: Beijing Agriculture Press, 1989. 11 - 27. [周永欣.水生生物毒性实验方法[M].北京:北京农业出版社,1989. 11 - 27.]
- [10] Dai S G. Environmental chemistry [M]. Beijing: Higher Education Press, 1987. 269 - 272. [戴树桂.环境化学[M].北京:高等教育出版社,1987. 269 - 272.]
- [11] Cotelli F, Andrmico F, Brivio M, et al. Structure and composition of the fish egg chorion (*Carassius auratus*) [J]. Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research, 1988, 99: 70 - 78.
- [12] Hou L, Xin P, Shi B X. Examination on the activity of $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ and the level of SOD in the patient of brain die [J]. Journal of Qingdao Medical College, 1996, 32(3): 239 - 240. [侯林,辛萍,石秉霞.脑卒中病人 $\text{Na}^+/\text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性及 SOD 水平检测[J].青岛医学院学报,1996, 32(3): 239 - 240.]