

DOI:10.3969/j.issn.1000-7083.2011.04.014

## 不同生境汞对拟水狼蛛抗氧化系统的影响

张征田<sup>1</sup>, 张虎成<sup>2</sup>, 梁子安<sup>1\*</sup>, 夏敏<sup>1</sup>, 杜瑞卿<sup>1</sup>

(1. 南阳师范学院生命科学与技术学院, 河南南阳 473061; 2. 北京电子科技职业学院生物系, 北京 100029)

**摘要:**以拟水狼蛛为研究对象, 采用原子吸收光谱法测定了不同生境汞在土壤和蜘蛛体内的含量, 研究了不同生境汞对拟水狼蛛抗氧化酶的影响。结果表明: 4 个采集样点(S1、S2、S3 和 S4)拟水狼蛛体内重金属汞的含量差异显著( $P < 0.05$ )。在重金属胁迫下, 重金属汞含量高(S1、S2 和 S3)的拟水狼蛛体内 GSH 含量显著高于对照组(S4), 是对照组的 2.4~3.8 倍。GSH 含量与重金属汞含量显著正相关( $r^2 = 0.9624, P < 0.01$ )。对于 GST、CAT 和 SOD, 重金属汞含量高则酶活性低, GST、CAT 和 SOD 酶活性与重金属汞含量显著负相关。因此检测拟水狼蛛体内的酶活性变化即可知环境中重金属汞的污染程度, 提示拟水狼蛛可以作为重金属污染的重要监测指示生物。

**关键词:** 拟水狼蛛; 重金属污染; 汞; 抗氧化酶

**中图分类号:** Q959.226; R994.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7083(2011)04-0552-04

### Effects of Mercury on Activities of Antioxidant Enzymes in *Pirata subpiraticus* from Different Habitats

ZHANG Zheng-tian<sup>1</sup>, ZHANG Hu-cheng<sup>2</sup>, LIANG Zi-an<sup>1\*</sup>, XIA Min<sup>1</sup>, DU Rui-qing<sup>1</sup>

(1. Department of Life Sciences, Nanyang Normal University, Nanyang, Henan Province 473061, China;

2. Department of Biology, Beijing Vocational College of Electronic Science and technology, Beijing 100029, China)

**Abstract:** In the wolf spider *Pirata subpiraticus* collected from five different habitats in Nanyang city, Henan province, the contents of mercury were measured using atomic absorption spectrometry and the changes in the activities of antioxidant enzymes including GSH level, and GST, CAT and SOD were analyzed. The results showed that the contents of mercury in *P. subpiraticus* were significantly different between three heavy metal polluted habitats (TBTK, NYYT, and NYJG) and the control habitat (BTM, a nature reserve with less heavy metal pollution) ( $P < 0.05$ ). With mercury polluted, the higher the content of mercury, the higher the GSH level. Moreover, the GSH level in the habitats (S1, S2 and S3) was 2.4~3.8 times higher than the control. GSH level was highly positive correlative with mercury content ( $r^2 = 0.9624, P < 0.01$ ). In contrast, the low activities of antioxidant enzymes (GST, CAT and SOD) corresponded to the high contents of mercury. This suggests that the degree of mercury pollution can be known through testing the activity change of antioxidant enzymes of *P. subpiraticus*, and this wolf spider can be used as a very important bio-indicator for heavy metals pollution.

**Key words:** *Pirata subpiraticus*; heavy metal pollution; mercury; antioxidant enzyme

重金属污染已经成为一个全球性的环境问题。人类生产活动是重金属污染的主要来源, 特别是矿产的开采、冶炼厂三废的排放、含重金属农业化学物质的施用加重了环境中重金属的污染 (Warchalowska-Sliwa *et al.*, 2005)。环境中的重金属不能被土壤微生物分解, 易在土壤中积累, 并通过食物链富集到动物以及人体中, 其自然排泄十分缓慢, 从而影响机体健康 (Nummelin *et al.*, 2007)。面对重金属污染, 陆生动物生命活动过程中, 特别是在重金属、致癌物和化学

杀虫剂等有毒物质污染的条件下, 体内会不断产生多种具有对生物功能分子起破坏作用的活性氧自由基。针对这些具强氧化能力的活性氧自由基, 动物在长期进化过程中逐渐形成抵御各种有毒物质的多种生理生化机制, 尤其是形成了清除这些自由基的抗氧化酶系统 (Ahmad, 1995; Pardini, 1995), 主要有过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GST) 和谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR) 等, 它们通过相互协调作用能使自由基

收稿日期: 2010-10-22 接受日期: 2010-12-10 基金项目: 河南省教育厅自然科学研究计划项目资助 (编号: 2011B180042)

作者简介: 张征田 (1978~), 男, 硕士, 主要从事动物学研究, E-mail: ztz0105@yahoo.com.cn

\* 通讯作者 Corresponding author, 教授, 主要从事动物学研究, E-mail: liangzian@163.com

维持在一个低水平,从而防止自由基毒害而起到对机体的保护作用。

拟水狼蛛 *Pirata subpiraticus* 是广布于河流、稻田和潮湿环境的一种游猎性优势蜘蛛(李剑泉等, 2002),是农田和草地中常见肉食性节肢动物,活动范围有限,其食物主要为各种小型节肢动物,生活习性比较特殊,处在食物链的顶端,同样会通过呼吸、摄食、体表接触等遭受生态环境中重金属离子的入侵。有关重金属污染对蜘蛛相近类群昆虫影响的文献已有不少报道,涉及 Cd、Zn、Cu、Pb、Hg、Ni 和 As 等重金属对弹尾目、双翅目、鳞翅目、鞘翅目、膜翅目和半翅目昆虫等的影响(Bongers *et al.*, 2004; Eeva *et al.*, 2004; Cervera *et al.*, 2005; 王慧等, 2006; 孙鸽等, 2009),但对蜘蛛的报道较少(张仲胜等, 2009; 张征田等, 2009, 2010)。本文主要在对河南省南阳市煤矿、石油和铜矿等污染地研究的基础上,以拟水狼蛛为实验材料,就重金属汞对其体内抗氧化剂还原型谷胱甘肽(GSH)含量及抗氧化酶谷胱甘肽 S-转移酶(GST)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶活性的影响作了较系统的分析,旨在探讨重金属对蜘蛛的毒害与抗氧化酶活性变化之间的关系,为研究重金属汞对蜘蛛抗氧化酶系统和蛋白质代谢的影响及其致毒机理提供依据,为重金属污染的生物监测提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 样品采集与处理

2010 年 6 月利用 GPS 定位,在 4 个样点(S1, 桐柏铜矿 TBTK, 32°32'49"N, 113°19'7"E, 黄色粉砂土, 植被少,以蒿草为主;S2, 南阳油田 NYYT, 33°0'58"N, 112°27'10"E, 耕作土, 砂质粘土, 以农作物小麦居多; S3, 南阳军工厂 NYJG, 33°1'24" N, 112°29'52" E, 砂粒粘土, 植被少,以苔草为主;S4, 宝天曼 BTM, 33°2'17" N, 111°56'22"E, 砂质粘土, 植被丰富,以荔枝草为主)采用蛇形布点法在每个采样区采集 0~20 cm 左右的表层土壤,混合均匀后按四分法获取足量的样品装入布袋中,于实验室内自然风干。剔除植物残体和石块,磨碎过 120 目筛,保存于玻璃瓶中,以备重金属元素测定用。在以上样点利用平行线跳跃法手工采集 200 头拟水狼蛛带回实验室,以污染较小的南阳宝天曼国家自然保护区葛条爬采集的标本为对照组。

### 1.2 重金属含量的测定

将蜘蛛称重后,采用  $H_2SO_4-HNO_3-V_2O_5$  方法消解,采用冷原子吸收分光光度法利用 Tekran 2600 测

定,方法的检出限为 0.02 ng/g。所有重金属含量以每 g 蜘蛛干重所含的 ng 数表示,精确到 0.1 ng,每样点重复测量 10 头。土壤样品重金属含量测定方法同上,土壤样品重金属含量以单位样品干重所含的重量表示,精确到 0.1 ng,每样品重复测量 3 次,取平均值。

### 1.3 酶液提取

取拟水狼蛛 30 头,随机分成 3 组,每组各 10 头。将供试蜘蛛置于预冷的玻璃匀浆器中,加入 0.5 mL 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH7.0)和少量苯基硫脲,在冰浴中匀浆。匀浆液置 Beckman 冷冻离心机于 0°C, 6000 r/min 离心 20 min,取上清液作为酶原, -70°C 冰箱保存备用。

### 1.4 GSH 含量及 GST 活性测定

GSH 含量测定参照张宗申等(2001)的方法,采用二硫代硝基苯甲酸(DTNB)染色法。每样品重复测定 3 次,取平均值。

### 1.5 SOD 和 CAT 活性测定

SOD 活性测定参照邓碧玉等(1991)的方法;CAT 活性测定参照雷柏平等(1993)的方法。每样品重复测定 3 次,取平均值。

### 1.6 蛋白含量测定

蛋白含量根据 Smith 等(1985)的方法,用牛血清白蛋白作为标准来测定,用酶标仪在 560 nm 处读取 OD 值。每样品重复测定 3 次,取平均值。

### 1.7 数据处理与分析

所有数据采用 SPSS13.0 软件进行 *t* 检验和线性回归进行分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同样点土壤和拟水狼蛛体内重金属汞的含量

从表 1 可看出 3 个采集样点(TBTK, NYYT, NYJG)土壤重金属 Hg 的含量是对照组的 9.6~15.2 倍,与对照组 BTM 重金属含量相比,差异极显著( $P < 0.01$ ),说明工业活动的增加加剧了土壤的重金属污染。所有样本经简单相关分析表明拟水狼蛛体内重金属 Hg 含量分别与土壤中相应的重金属 Hg 含量显著正相关( $r^2 = 0.8653, P < 0.01$ ),说明拟水狼蛛受工业活动的影响明显。

### 2.2 拟水狼蛛体内 GSH 含量与 GST 活性

表 2 显示不同样点拟水狼蛛体内 GSH 含量为 4.50~16.84。重金属汞含量高(S1, S2 和 S3)的拟水狼蛛体内 GSH 含量显著高于对照组(S4)( $P < 0.01$ ),是对照组的 2.4~3.8 倍。通过简单相关分析表明,拟

表 1 不同样点土壤和拟水狼蛛体内汞含量 (ng/g)  
Table 1 The comparison of heavy metals content (ng/g) in soil and *P. subpiraticus* of different habitats

样点 Sampling site	土壤 Soil	拟水狼蛛 <i>Pirata subpiraticus</i>
S1-TBTK	8.43 ± 1.23 **	4.20 ± 0.54 **
S2-NYYT	6.12 ± 0.84 **	3.76 ± 0.38 **
S3-NYJG	5.42 ± 0.72 **	3.22 ± 0.32 **
S4-BTM	0.56 ± 0.12	0.12 ± 0.04

表中数据为平均值 ± 标准差 (n = 10), \*\* 表示与对照组 BTM 差异极显著 (P < 0.01), 下同

Data (mean ± SD, n = 10) followed by \*\* in the same column show that there are very significant difference (P < 0.01) as compared with control (BTM) by t-test. The same below

水狼蛛体内 GSH 含量与重金属汞含量显著正相关 ( $r^2 = 0.9624, P < 0.01$ ), 即拟水狼蛛体内 GSH 含量随着重金属汞含量升高而升高。

对不同样点拟水狼蛛体内 GST 活性进行分析。从表 2 可以看出, 拟水狼蛛体内 GST 活性为 4.68 ~ 9.86, 重金属汞含量高 (S1, S2 和 S3) 的拟水狼蛛体内 GST 活性显著低于对照组 (S4) (P < 0.01)。通过简单相关分析表明, 拟水狼蛛体内 GST 活性与重金属汞含量显著负相关 ( $r^2 = 0.8980, P < 0.01$ ), 即拟水狼蛛体内 GST 活性随着重金属汞含量升高而受到抑制。

表 2 不同样点拟水狼蛛 GSH 含量和 GST 活性  
Table 2 GSH concentrations and GST activities in *P. subpiraticus* of different habitats

样点 Sampling site	还原型谷胱甘肽 GSH (nmol/mg pro)	谷胱甘肽 S-转移酶 GST (μmol/min · mg pro)
S1-TBTK	16.25 ± 1.12 **	4.20 ± 0.64 **
S2-NYYT	14.46 ± 0.88 **	5.82 ± 0.54 **
S3-NYJG	10.25 ± 0.76 **	7.53 ± 0.66 **
S4-BTM	4.38 ± 0.24	9.12 ± 1.52

### 2.3 拟水狼蛛体内 SOD 和 CAT 活性

表 3 显示不同样点拟水狼蛛体内 SOD 活性为 31.52 ~ 53.82。重金属汞含量高 (S1, S2 和 S3) 的拟水狼蛛体内 SOD 活性显著低于对照组 (S4) (P < 0.01)。通过简单相关分析表明, 拟水狼蛛体内 SOD 活性与重金属汞含量显著负相关 ( $r^2 = 0.9528, P < 0.01$ ), 即拟水狼蛛体内 SOD 活性随着重金属汞含量升高而降低。

对于同样点拟水狼蛛体内 CAT 活性进行分析, 从表 3 可以看出, 拟水狼蛛体内 CAT 活性为 28.12 ~ 48.54, 重金属汞含量高 (S1, S2 和 S3) 的拟水狼蛛体内 CAT 活性显著低于对照组 (S4) (P < 0.01)。通过简单相关分析表明, 拟水狼蛛体内 CAT 活性与重金属汞含量显著负相关 ( $r^2 = 0.9864, P < 0.05$ ), 即拟水

狼蛛体内 CAT 活性随着重金属汞含量升高而受到抑制。

表 3 不同样点拟水狼蛛 SOD 和 CAT 活性  
Table 3 SOD and CAT activities in *P. subpiraticus* of different habitats

样点 Sampling site	超氧化物歧化酶 SOD (U/mg pro)	过氧化氢酶 CAT (mmol/min · mg pro)
S1-TBTK	28.42 ± 3.64 **	26.48 ± 2.24 **
S2-NYYT	32.85 ± 4.10 **	30.66 ± 3.10 **
S3-NYJG	40.32 ± 5.60 **	38.54 ± 4.60 **
S4-BTM	50.45 ± 5.86	46.54 ± 4.82

### 3 讨论

本研究采用拟水狼蛛作为试验对象, 测定了不同生境土壤样本和拟水狼蛛体内汞的含量以及汞对拟水狼蛛体内抗氧化系统的影响。结果表明: 4 个采集样点 (S1, S2, S3 和 S4) 拟水狼蛛体内重金属汞的含量差异显著。说明随着生境的改变尤其是人类农业和工业活动的增强, 环境受到重金属的污染风险性大大增强, 拟水狼蛛作为主要的地表游猎型蜘蛛, 主要捕食蚊蠓等节肢动物, 环境中的汞沿着食物链逐渐传递, 从而在蜘蛛体内富集, 此结果进一步印证了 Nummelin 等 (2007) 和张征田等 (2009, 2010) 报道的蜘蛛作为较高营养级的动物具有较强的富集能力, 这与张仲胜等 (2009) 的研究基本一致, 但不同的是本研究中拟水狼蛛对汞的富集能力远远低于其他重金属污染地区, 也远远低于其他取食植物的东亚飞蝗与中华蚱蜢和捕食昆虫的螳螂 (郑冬梅等, 2007), 说明采集食物的地点和食物的构成对重金属汞的传递规律有着很强的影响, 这与张征田等 (2009, 2010) 报道的拟水狼蛛对其他重金属 (Cd, Pb, Cu 和 Zn) 的富集规律一致, 因此应对生境、食物的构成和天敌昆虫的种类引起的重金属含量差异的深层次原因开展进一步的研究。

重金属对生物体的毒性作用及生物体抗氧化系统对重金属胁迫的应激性均是一个较为复杂的系统, 动物体内抗氧化酶系统是抵抗外界不良环境危害的有效武器, 在保护正常生长发育及生理功能的完成、保持种群增长中具有重要作用。动物体内的自由基可以通过各种抗氧化剂和抗氧化酶的协同作用而清除。本研究结果表明, 抗氧化剂 GSH 的含量与汞含量正相关, 可能是因为 GSH 富含活性基团-SH, 可与过量的重金属结合, 从而减轻或消除重金属的危害, 说明 GSH 在保护细胞免受毒性物质的危害中起重要

作用。这与张征田等(2009, 2010)和 Wilczek 等(2004)的报道基本一致,与吴海花等(2009)报道的昆虫方面不一致,可能是因为长期受重金属污染的拟水狼蛛已经对体内重金属成分颗粒有一定的耐受性。抗氧化酶的活性跟抗氧化剂 GSH 相反, GST、SOD 和 CAT 的活性都受到了重金属的抑制,与重金属的含量显著负相关。GST 活性的降低可能是一方面因为为了相对增加 GSH 的含量,以消除过量重金属的危害,另一方面是因为 GST 的专一性较低,容易受到多种因素的干扰,不同种类和浓度的重金属会对整个 GSTs 家族不同异构酶的活性产生不同的影响。SOD 和 CAT 活性的降低可能是因为拟水狼蛛体内其他种类的重金属离子竞争性的替代了体内的汞,从而抑制了 SOD 和 CAT 酶的活力。这与 Cervera 等(2005)、Migula 等(1997)和孙虹霞等(2008)分别用不同重金属处理昆虫,体内 CAT 活力明显增高的结果不一致。说明汞对动物体内抗氧化酶系统的影响是因动物种类,以及重金属种类而异的。导致此种结果的原因一方面可能是 GSH 含量的增加扰乱了其他酶的活性,另一方面可能是动物体内的抗氧化酶系统是协同作用的,为了保护机体免受伤害,一种酶受到抑制另一种酶迅速起反应,消除或减少重金属的危害作用。因此在今后的工作中,应进一步研究不同重金属交互作用对拟水狼蛛体内抗氧化酶系统协同作用的影响,进一步探讨时间、生境和食物种类重金属浓度与拟水狼蛛累积量之间的相关性,为土壤-昆虫-天敌环境重金属污染研究提供更为充分的资料。

#### 4 参考文献

- 邓碧玉,袁勤生,李文杰. 1991. 改良的连苯三酚自氧化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, 18(2): 163.
- 雷柏平,周伯通,蔡宏伟,等. 1993. 过氧化氢酶活性的比色测定法[J]. 临床检验杂志, 11(2): 73~74.
- 李剑泉,沈佐锐,赵志模,等. 2002. 拟水狼蛛的生物学生态学特性[J]. 生态学报, 22(9): 1478~1484.
- 孙鸽,吴海花,席玉英,等. 2009. 长期取食染镉小麦后中华稻蝗体内镉的累积分布[J]. 农业环境科学学报, 28(9): 1812~1817.
- 孙虹霞,周强,唐文成,等. 2008. 食物中 Ni<sup>2+</sup> 胁迫对斜纹夜蛾幼虫中肠细胞解毒酶的影响[J]. 科学通报, 53(18): 2195~2199.
- 王慧,吴国星,叶恭银,等. 2006. 铜和镉在棕尾别麻蝇体内的累积及其对三种抗氧化酶活性的影响[J]. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 32(1): 77~81.
- 吴海花,闫会平,孙鸽,等. 2009. 中华稻蝗不同体段镉与铅含量及抗氧化酶的比较[J]. 农业环境科学学报, 8(3): 471~475.
- 张征田,庞振凌,梁子安,等. 2010. 重金属在拟水狼蛛体内的分布及其对体内抗氧化酶活性的影响[J]. 昆虫学报, 53(6): 618~625.
- 张征田,夏敏,彭宇,等. 2009. 河南南阳不同生境土壤重金属含量及其对拟水狼蛛生物学特性的影响[J]. 昆虫学报, 52(9): 994~999.
- 张仲胜,吕宪国,王起超,等. 2009. 葫芦岛锌厂周围蜘蛛体内的汞含量及分布[J]. 农业环境科学学报, 28(3): 481~484.
- 张宗申,利容千,王建波. 2001. 外源 Ca<sup>2+</sup> 预处理对高温胁迫下辣椒叶片细胞膜透性和 GSH、AsA 含量及 Ca<sup>2+</sup> 分布的影响[J]. 植物生态学报, 25(2): 230~234.
- 郑冬梅,王起超,张仲胜,等. 2007. 节肢动物体内的总汞和甲基汞含量研究[J]. 环境科学, 28(11): 2586~2590.
- Ahmad S. 1995. Oxidative stress from environmental pollutants[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 29: 135~157.
- Bongers M, Rusch B, van Gestel CAM. 2004. The effect of counterion and percolation on the toxicity of lead for the springtail *Folsomia candida* in soil[J]. Environ Toxicol Chem, 23(1): 195~199.
- Cervera A, Maymó AC, Martínez-Pardo R, et al. 2005. Vitellogenesis inhibition in *Oncopeltus fasciatus* female (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium[J]. J Insect Physiol, 51: 895~911.
- Eeva T, Sorvari J, Koivunen V. 2004. Effects of heavy metal pollution on red wood ant (*Formica* s. str.) populations[J]. Environ Pollut, 132: 533~539.
- Migula P, Glowacka E, Nuorteva SL, et al. 1997. Time-related effects of intoxication with cadmium and mercury in the red wood ant[J]. Ecotoxicology, 6: 307~320.
- Nummelin M, Lodenius M, Tulisalo E, et al. 2007. Predatory insects as bioindicators of heavy metal pollution[J]. Environ Pollut, 145(1): 339~347.
- Pardini RS. 1995. Toxicity of oxygen from naturally occurring redox-active pro-oxidants[J]. Arch Insect Biochem Physiol, 29(2): 101~118.
- Warchalowska-Sliwa E, Niklińska M, G-rllich A, et al. 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas[J]. Environ Pollut, 133: 373~381.
- Wilczek G, Babczyńska A, Augustyniak M, et al. 2004. Relations between metals (Zn, Pb, Cd and Cu) and glutathione-dependent detoxifying enzymes in spiders from a heavy metal pollution gradient[J]. Environ Pollut, 132: 453~461.