

梨形环棱螺五种酶分子与大运河底泥重金属含量相关分析

刘缠民^{1,2}, 冯照军¹, 李宗芸^{1,2}, 孙建梅¹, 郑桂红¹

(1. 徐州师范大学生命科学学院, 江苏徐州 221116; 2. 江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室)

摘要:运用样点笼内放养法,研究了京杭大运河不同污染程度环境对梨形环棱螺内脏团中超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和胆碱酯酶(CHE)的影响,进行了酶活性与样点底泥重金属含量的相关分析。结果表明,梨形环棱螺组织抗氧化保护酶系统的SOD、CAT、GSH-PX和GST活性是指示污染的敏感指标,其监测结果与水化学评价结果基本一致。在10 d暴露中,SOD酶活性被激活,CAT、GSH-PX和GST酶活性在污染环境中被抑制,CHE活性变化比较复杂。酶活性变化与底泥重金属的含量相关性很大。

关键词:京杭大运河; 梨形环棱螺; 酶; 重金属含量; 相关分析

中图分类号: Q958.11 文献标识码: A 文章编号: 1000-7083(2009)06-0839-04

Correlation Analysis between Five Enzymes of *Bellamyia purificata* and Heavy Metal Content in Substrate Sludge of the Jing-Hang Canal

LIU Chan-min^{1,2}, FENG Zhao-jun¹, LI Zong-yun^{1,2}, SUN Jian-mei¹, ZHENG Gui-hong¹

(1. School of Life Sciences, Xuzhou Normal University, Xuzhou, Jiangsu Province 221116, China;

2. Jiangsu Key Laboratory of Eco-Agricultural Biotechnology around Hongze Lake)

Abstract: Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione peroxidase (GSH-PX), glutathione S-transferase (GST), and cholinesterase (CHE) were measured in the innards of *Bellamyia purificata* in different plots of the Jing-Hang canal to study the changes of these enzyme parameters under environmental variation. The correlation between these enzyme activities and heavy metal content in substrate sludge was analyzed. The results indicate that SOD, CAT, GSH-PX, and GST in *Bellamyia purificata* are sensitive parameters as biomarkers of exposure to pollutants. The result is accordant with result of using water chemical parameters assessment method. Within 30 days of exposure, SOD is activated, but CAT, GSH-PX and GST are inhibited in all polluted plots. The change of CHE activity is complex. It was correlated between enzyme activity and heavy metal content in substrate sludge.

Key words: Jing-Hang canal; *Bellamyia purificata*; enzyme; heavy metal content; correlation

京杭大运河是我国从南至北沟通钱塘江、太湖、长江、淮河、黄河、海河等流域的大动脉,是南水北调的重要通道,也是工农业生产用水和城市排灌的重要河道,因此对其水质与污染状况的监测具有重要的意义。

超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-PX)、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)和胆碱酯酶(CHE)是生物体内重要的酶类,它们可作为毒物的敏感指示者,能从分子水平提示逆环境因子对生物带来的伤害,其含量及活性的变化可作为生物监测指标(王晓蓉等,2006)。

水体动物在水生态系统中起着多种作用,同时

水质的污染程度也将对其生活产生极大的影响。熊昫青和由文辉(2002)以放养法对苏州河铜锈环棱螺 *Bellamyia aeruginosa* 的 SOD 和 CAT 影响进行了研究。但选用不同动物测定时这些分子标志物变化是否相同,是否适合京杭大运河的水质检测,其他酶类是否可作为监测的生物标志物,酶活性与污染底泥重金属含量如何,尚未见报道。因此,我们选用京杭大运河水体中常见的软体动物梨形环棱螺 *Bellamyia purificata* 作为实验动物,期望通过不同程度的暴污过程,确定其生化参数(SOD、CAT、GSH-PX、GSH 和 CHE 的酶活性)对污染底泥的反应随时间和污染梯度的变化情况,研究该动物毒理指标的敏感性,是否

收稿日期:2008-09-28 修回日期:2009-05-13 基金项目:江苏省高校自然科学基金基础研究面上项目(编号07KJD180210);江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室开放基金资助项目(编号HZHL0811)

作者简介:刘缠民(1968~),男,博士,副教授,主要研究方向:动物生态学及环境科学,E-mail: lcm9009@xzu.edu.cn, lcm9009@126.com

适用于京杭大运河底泥污染监测, 以为大运河水质污染监测和防治提供一些资料。

1 材料与方法

1.1 实验设计

1.1.1 对照实验 为了为后续实验提供材料及与后面实验对比, 从清洁水体中采得大小一致的梨形环棱螺(长约 2.2 cm, 重约 2.7 g), 在以增氧机增氧的曝气水中驯养 2 个月, 用作对照实验和后面的放养实验。为了使两实验温度一致, 对照实验养殖箱放于室外, 实验期间测得水温 20 ~ 27℃, 水深 0.5 m, 设 10 个平行组, 取驯养后 2 个月的螺, 在 5 d 和

10 d 测定其酶活性, 作为对照酶活性值。

1.1.2 放养实验 参照熊昫青和由文辉(2002)的方法, 将清洁水体中驯养 2 个月的 100 只螺分别放于京杭大运河徐州段的从河上游至下游依次分布的蔺家坝、洞山西、红旗新村和解台闸 4 个国控断面(每样点放 25 只螺, 其样点的位置如表 1)样点笼内放养(放养点水温 20 ~ 27℃, 水深 0.5 m)。设 10 个平行组, 在 5 d 和 10 d 测定其酶活性。同时记录各放养点的自然条件, 如温度、溶解氧 DO、高锰酸盐指数 COD_{Mn}、化学需氧量 COD_{Cr}、生化需氧量 BOD₅、总氮含量 TN、总含磷量 TP 及 NH₄-N 等, 并按相关标准对其评价。

表 1 各取样点的位置
Table 1 Sampling sites in the Jing-Hang canal

样点 Sampling point	蔺家坝 Linjiaba dam	洞山西 Dongshanxi	红旗新村 Hongqi new village	解台闸 Xietanzha lock
纬度 Longitude	34°23'57"	34°20'16"	34°18'52"	34°19'02"
经度 Latitude	117°10'23"	117°12'28"	117°17'29"	117°22'57"

1.2 实验方法

1.2.1 底泥的重金属测定 参照文献的方法(熊昫青, 由文辉, 2002)。底泥经研磨, 过 0.149 mm 孔径的尼龙筛。测定滤液中 Cu、Pb、Zn、Cd、Cr 等重金属元素的浓度。

1.2.2 酶活力测定 SOD、CAT、GSH-PX、GSH 和 CHE 的酶活性测定用南京建成生物公司生产的试剂盒进行测定, 以螺内脏作为酶液提取的材料。具体操作按试剂盒说明书进行。各酶的活力用每毫克

蛋白的酶活单位(U)表示。其他试剂为合肥工业大学化学试剂厂生产的分析纯试剂。

1.3 数据处理

以 SPSS 软件包进行数据统计及分析。

2 结果

2.1 样点的生态环境

生态环境对梨形环棱螺的影响很大, 因此实验测定和评价了 4 个样点的生态环境, 结果如表 2。

表 2 样点的生态环境
Table 2 The environment of sampling point in the Jing-Hang canal

采样点 sampling point	温度(°C) temperature	水深(m) depth of water	流速(m/s) flow velocity	水质 Water quality
蔺家坝 Linjiaba dam	19 ~ 28	2.2 ~ 3.8	0.5 ~ 0.8	III
洞山西 Dongshanxi	19 ~ 28	2.5 ~ 3.6	0.2 ~ 0.5	III
红旗新村 Hongqi new village	19 ~ 28	2.3 ~ 2.6	0.2 ~ 0.3	IV
解台闸 Xietanzha lock	19 ~ 28	3.5 ~ 6.2	0.5 ~ 1.2	III

由表 2 可见, 4 样点的水温差异不大, 水深以解台闸为最, 水流速洞山西和红旗新村相对其他两个样点缓慢, 水质综合评价除红旗新村外, 其他均为 III 类。

2.2 样点的酶活性

测定梨形环棱螺内脏 SOD、CAT、GSH-PX、GSH 和 CHE 酶活性, 结果列于表 3。

整个实验过程中, 对照组 5 种酶 5 d 和 10 d 测定值差异不显著($P > 0.05$), 且在整个实验时间内

波动不大。各放养组与对照组相比, SOD 酶被激活, CAT、GSH-PX 和 GST 酶活被抑制, 而 CHE 酶变化较复杂。利用底泥重金属污染评价方法(王晓等, 2004)和底栖动物多样性评价方法(潘立勇, 2002)研究均认为 4 样点中, 蔺家坝和解台闸污染较轻, 洞山西污染居中, 红旗新村污染最重, 而放养组 SOD 活性呈现解台闸 < 蔺家坝 < 洞山西 < 红旗新村, 正好与污染程度一致; CAT、GSH-PX 和 GST 酶活性大小为解台闸 > 蔺家坝 > 洞山西 > 红旗新村, 正与污

表 3 各样点不同时段酶活性的比较 (单位 U/mg, n = 10)
Table 3 Comparison of activity at different sites and stages (U/mg, n = 10)

酶活 Enzyme activity	对照 Control		蔺家坝 Linjiaba dam		洞山西 Dongshanxi		红旗新村 Hongqi new village		解台闸 Xietanzha lock	
	5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d
SOD	8.12	8.06	8.60	8.55	9.76	9.48	9.85	9.77	8.78	8.53
CAT	8.42	8.37	8.28	8.13	7.87	7.51	7.62	7.44	8.06	7.92
GSH-PX	61.42	61.52	49.61	55.35	18.08	18.23	15.26	16.53	18.42	18.56
GST	17.53	17.62	16.83	16.40	6.17	5.05	4.93	4.66	16.63	15.14
CHE	15.32	15.30	14.94	14.89	14.72	14.65	15.36	15.50	12.29	11.81

染程度相反。这些变化反映了不同酶对污染的应激性不同,也显示了它们与污染的相关性。经 t 检验,笼内放养组各数据间差异显著 ($P < 0.05$)。

2.3 酶活性与重金属含量

以底泥重金属含量与酶的活性进行相关分析,结果如表 4。

表 4 5 种酶活性与底泥金属含量的相关系数
Table 4 The correlation coefficient of five enzyme and heavy metal content in substrate sludge

金属含量 Metal content	SOD		CAT		GSH-PX		GST		CHE	
	5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d	5 d	10 d
Cu	0.84	0.82	-0.58	-0.77	-0.26	-0.27	-0.87	-0.67	0.63	0.68
Pb	0.92	0.90	-0.71	-0.86	-0.41	-0.42	-0.94	-0.94	0.64	0.65
Zn	0.86	0.93	-0.91	-0.84	-0.60	-0.60	-0.89	-0.85	0.80	0.68
Cd	0.94	0.93	-0.99*	-0.97*	-0.86	-0.86	-0.92	-0.93	0.50	0.37
Cr	0.92	0.96*	-0.95*	-0.91	-0.67	-0.67	-0.93	-0.91	0.74	0.62

* 表示具有显著相关性 significantly correlation

由表 4 可见,SOD 酶活性与各重金属含量呈正相关,且相关系数均很大。CAT 酶活性与各重金属含量负相关,其中 Zn、Cd、Pb 和 Cr 含量与之相关性大。GSH-PX 酶活性与各重金属负相关,仅 Cd 含量与之相关性大。GST 酶活性与各重金属负相关,且相关系数均较大。CHE 酶活性与各重金属正相关,仅 Zn 含量与之相关性大。

3 分析与讨论

从实验结果可看出,5 种酶均是敏感的生化参数,它们的活性随时间和地点的变化都发生了明显变化。这些变化反映了污染物对细胞损伤及对组织的毒性作用。

SOD、CAT、GSH-PX 和 GST 酶是生物细胞中重要的清除自由基的酶,它们能够清除动物体内过多自由基,以保护自身免受损伤。Livingstone 等 (2005) 在用贻贝类生物 *Mytilus galloprovincialis* 评价有机污染物的影响时,曾指出 SOD 指标并不是监测危险区域的适当指标。本实验表明 SOD 酶活性在实验时间内 (10 d) 均出现诱导现象,且诱导的强度与底泥污染的程度一致。这种一致性表明 SOD 能够反映不同程度的污染状况,因此可以作为指示污染程度指标。

试验结果显示 CAT 活性受到抑制,并且随着时间的延长抑制作用加强。这与余群等 (1999) 和王凡等 (2006) 的试验结果相符,却与 Livingstone 等 (1993)、Dimitrova 等 (1994) 和赵元凤等 (2002) 观察到 CAT 的诱导现象相反。推测污染物对水生生物的亚致死伤害很可能是通过激发活性氧产生。这种氧化胁迫应该有一个阈值,当胁迫严重超过该阈值时,CAT 酶活性就可能因为中毒而受到抑制。

试验结果显示 GSH-PX 和 GST 活性受到抑制,这与陈亮等 (2002) 和刘慧等 (2005) 的实验结果相同,却与李涌泉等 (2008) 的结果有一定的差异。这可能与实验动物的种类及污染的程度具有一定的关系。

CHE 主要存在于动物的神经系统,其中脑组织中的活性最高,其活性易受环境中的重金属或其他污染物的影响 (Devi, 1995)。实验显示 CHE 酶活性在不同污染样点放养的螺体内,均发生了明显的变化,但其变化相对复杂,在解台闸、蔺家坝和洞山西 3 个样点与对照比呈抑制状态,而在污染最重的红旗新村样点却呈诱导现象,其原因是实验条件造成的还是其他因素引起的有待进一步研究。

重金属中,一些种类如 Zn、Cu 和 Mn 等是动物体内某些酶类不可缺少的构成元素,但多量重金属就会对动物产生毒性,一般认为有毒金属与酶间可

能存在两种作用形式,一是有毒金属结合到酶分子中心的咪唑基、巯基、氨基、肽基等功能基团,二是有毒金属置换酶活性中心的必需金属元素而导致酶失活。实验相关分析显示 SOD 酶活性与各金属含量的相关性很大,可能一方面 Zn 和 Cu 等元素是该酶的组成元素,另一方面一定浓度的其他重金属对螺体内的 SOD 酶活性有激活作用。CAT 和 GST 酶活性与各重金属负相关,说明重金属可能对其活性具有抑制作用。GSH-PX 酶活性与 Cd 含量较大的负相关性,可能因镉是一种强细胞毒物元素,可通过改变细胞内 GSH 含量导致氧化应激(Finueiredo-Pereira *et al.*, 1998)而抑制酶的活性。

从实验结果可以看出,SOD、CAT、GSH-PX 和 GST 酶均能快速灵敏地反映污染的胁迫作用,能从分子水平上去提示逆环境因子对生物带来的伤害,是有用的生物监测指标。底泥重金属含量与酶的活性密切相关,说明其对螺体内酶的活性及生活影响较大。

4 参考文献

- 陈亮,郭红岩,沈红,等. 2002. 低浓度铅暴露对鲫鱼肝脏抗氧化系统的影响[J]. 环境化学,21(5):485~489.
- 李涌泉,王兰,刘娜,等. 2008. 镉对长江华溪蟹酶活性及脂质过氧化的影响[J]. 水生生物学报,32(3):373~379.
- 刘慧,王晓蓉,王为木,等. 2005. 不同形态锌离子对鲫鱼谷胱甘肽系统的影响[J]. 中国环境科学,25(2):169~173.
- 潘立勇. 2002. 利用底栖动物对京杭运河铜山段水质的评价[J]. 江苏环境科技,15(4):23~25.
- 王凡,李法松,赵元凤,等. 2006. 铜对扇贝肌肉抗氧化防御系统的影响[J]. 安徽农业科学,34(23):6109~6110.
- 王晓,韩宝平,丁毅,等. 2004. 京杭大运河徐州段底泥重金属污染评价[J]. 能源环境保护,18(3):47~49.
- 王晓蓉,罗义,施华宏,等. 2006. 分子生物标志物在污染环境早期诊断和生态风险评估中的应用[J]. 环境化学,25(3):320~325.
- 熊昉青,由文辉. 2002. 苏州河底泥对铜锈环棱螺(*Bellamyia aeruginosa*)SOD 和 Cat 的影响[J]. 华东师范大学学报(自然科学版),4(12):96~101.
- 余群,郑微云,翁研. 1999. 石油污染对真鲷幼体中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的毒理效应[J]. 厦门大学学报(自然科学版),38(3):429~434.
- 赵元凤,吕景才,宋晓阳,等. 2002. 海洋污染对毛蚶过氧化氢酶影响研究[J]. 环境科学学报,22(4):532~536.
- Devi M, Fingerman M. 1995. Inhibition of acetylcholinesterase activity in the central nervous system of the red swamp crayfish, *Procambarus clarkii*, by mercury, cadmium and lead[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 55(1):746~756.
- Dimitrova MS, Tishinova V, Velcheeva V. 1994. Combined effects of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase-catalase system in carp *Cyprinus carpio*[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 1038(3):43~46.
- Finueiredo-Pereira ME, Yakushin S, Cohen G. 1998. Disruption of the intracellular sulfhydryl homeostasis by cadmium-induced oxidative stress leads to protein thiolation and ubiquitination in neuronal cells[J]. J Biol Chem, 273(21):12703~12709.
- Livingstone DR, Lemaire P, Matthews A, *et al.* 1993. Prooxidant, antioxidant and 7-ethoxyresorufin o-deethylase (EROD) activity responses in liver of dab (*Limanda limanda*) exposed to sediment contaminated with hydrocarbons and other chemicals[J]. Marine Pollution Bulletin, 26(2):602~606.
- Livingstone DR, Lemaire P, Matthews A, *et al.* 1995. Assessment of the impact of organic pollutants on goby *Zosterisessor ophiocephalus* and mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Venice Lagoon[J]. Marine Environment Research, 39(2):235~240.
- 唐云明. 1997. 泥碱碱性磷酸酶的分离纯化及其部分性质[J]. 水产学报, (3):336~339.
- 张洪渊,刘克武,巩由彬. 1996. 金属离子和脲对背角无齿蚌碱性磷酸酶的影响[J]. 四川大学学报(自然科学版),33(1):100~105.
- Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantization of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-Dye binding[J]. Anal biochem, (72):248~254.
- Ernst D Wachsmuth, Kunio Hiwada. 1974. Alkaline Phosphatase from Pig Kidney[J]. Biochem J, (141):273~282.
- Ferley HN. 1972. Mammalian Alkaline phosphatase[J]. The Enzyme (Edited by Boyer. P D), (4):417~444.
- Ferley HN. 1971. The Enzyme. Academic Press, Inc, (2):373.
- Guo QD, J Gregory Zeikus. 1997. Purification and characterization of alkaline phosphatase from *Thermotoga neapolitana*[J]. Enzyme and Microbial Technology, (21):335~340.
- Inge W Kersti, Ragnar L, *et al.* 2001. Thermolabile alkaline phosphatase from Northern shrimp *Pandalus borealis*: protein and cDNA sequence analysis[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part B, (129):853~861.
- Layne E. 1957. Spectrophotometric and turbidimetric methods for measuring proteins[A]. In: Methods in Enzymology[M]. New York: Academic Press.
- Rein TW, Wilson IB. 1971. The Enzymes[M]. Academic Press, Inc, (2):373.
- Wang JZ, Fan M. 2002. The handbook of protein methods[M]. Beijing: Science Press.
- Xiao R, Li PX, Jing Y, *et al.* 2002. Purification and enzymatic characterization of Alkaline phosphatase from *Pinctada funcata*[J]. Mol Catal B: Enzyme, 17(2):65~74.
- Zhao XP, Liu KW, *et al.* 2001. Purification and some properties of alkaline phosphatase from ericerus pela (chavannes)[J]. Journal of Sichuan University (Natural Science), 38(4):602~612.