

文章编号: 1000-0615(2005)04-0496-06

水体铜对中华绒螯蟹体内铜分布和消化酶活性的影响

杨志彪¹, 赵云龙¹, 周忠良¹, 周鑫², 杨健²

(1. 华东师范大学生命科学学院, 上海 200062;

2. 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏无锡 214081)

摘要: 采用生态学单因子梯度试验, 研究在不同铜(Cu^{2+})浓度梯度的水环境中中华绒螯蟹体内 Cu^{2+} 分布的变化及其与生长相关的消化酶活性的影响。在未添加 Cu^{2+} 的对照组中, 中华绒螯蟹中 Cu^{2+} 含量以鳃为最高, 表皮次之, 肝胰腺最低。随着水环境中 Cu^{2+} 浓度的增高, 相应组织中的 Cu^{2+} 含量呈现不同的变化趋势, 肝胰腺增加最快, 鳃次之, 表皮则最慢。显示在高 Cu^{2+} 水环境下, 肝胰腺是 Cu^{2+} 主要的累积场所。不同浓度的 Cu^{2+} 对肝胰腺类胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性均有不同程度的抑制, 且 Cu^{2+} 浓度越高, 抑制作用越明显。对脂肪酶活性则有浓度依存的增强作用。表明随着水环境中添加的 Cu^{2+} 浓度的增加, 肝胰腺将是最主要的 Cu^{2+} 积累和代谢器官, 其代谢酶活性的变化可以灵敏地反映 Cu^{2+} 的胁迫程度和毒性。

关键词: 中华绒螯蟹; 铜; 消化酶; 肝胰腺; 鳃; 表皮

中图分类号: S917 文献标识码: A

Effects of copper in water on distribution of copper and digestive enzymes activities in *Eriocheir sinensis*

YANG Zhi-biao¹, ZHAO Yun-long¹, ZHOU Zhong-liang¹, ZHOU Xin², YANG Jian²

(1. School of Life Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China;

2. Freshwater Fisheries Research Center of Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuxi 214081, China)

Abstract: Effects of different water-borne copper(Cu^{2+}) (0.00, 0.01, 0.10, 1.00, 5.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) on distribution of copper in the body of *Eriocheir sinensis* and activities of some main digestive enzymes were studied by Single Gradient Factor Experiments. Among gill, epidermis and hepatopancreas of the animals in the control group without additive Cu^{2+} , average Cu^{2+} was 0.074, 0.036, 0.023 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ wet weight, respectively, which were determined by ICP-AES. When increasing of water-borne Cu^{2+} except for the hepatopancreas and epidermis in tested group with 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ water-borne Cu^{2+} , Cu^{2+} level increased significantly (analyzed by SPSS software) in all organs studied and especially in the hepatopancreas. In the tested group in which water-borne Cu^{2+} was 5.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, Cu^{2+} level among the gill, epidermis, and hepatopancreas was 0.307, 0.191, 0.341 $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$ wet weight, respectively. Furthermore, in the hepatopancreas the inhibition effect could be noted on activities of some important digestive enzymes, such as the typhase, pepsin, amylase and cellulase in different extents during increase of water-borne Cu^{2+} . It is notable that such effect on the amylase was the most obvious even the level of additive Cu^{2+} was only 0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ that is the level of the National Water Purity Standard for Fisheries. Comparing with the control group, the activity of the amylase dropped sharply from 305.01 ± 32.23 to $36.81 \pm 4.84 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. The maximum inhibition rate of this enzyme could be recorded as high as 89.96% in the tested group with 5.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ of water-borne Cu^{2+} . In contrast, the activity of the lipase enzyme was found increasing in all tested groups between 346.15% to 646.15%. The present study suggests that the different functional characteristics of the gill, epidermis and hepatopancreas may contribute to the change of Cu^{2+} distribution pattern among these organs for *Eriocheir sinensis* when the additive Cu^{2+} level in water was increased. Meanwhile, the hepatopancreas seems to be the main bioaccumulation site, as well as

收稿日期: 2004-04-23

资助项目: 中国水产科学研究院首席科学家资助项目(1-105011)

作者简介: 杨志彪(1973-), 男, 内蒙古赤峰人, 助理研究员, 博士研究生, 从事水生经济甲壳动物发育生物学研究。E-mail: nbuyzb@

163.com

通讯作者: 杨健, E-mail: jiany@ffrc.ac.cn

the metabolic organ for Cu^{2+} . Moreover, the variations on the activity of the typhase, pepsin, amylase and cellulase enzymes can sensitively indicate the inhibition effect of Cu^{2+} as well as its toxicity.

Key words: *Eriocheir sinensis*; copper; digestive enzyme; hepatopancreas; gill; epidermis

Cu^{2+} 是甲壳动物重要的营养元素,也是合成血蓝蛋白的必需成分之一,并对多种生长发育相关的生物酶的组成和功能有着重要作用^[1,2]。过量的 Cu^{2+} 又会对上述蛋白和生物酶产生毒害,且这些危害可以反映在生物体、细胞或分子水平上^[3]。中华绒螯蟹是我国重要的经济甲壳动物,随着其规模化生产的发展,养殖用水的污染也在不断地加剧,其中除了受工业、农业和生活污水的影响之外,生产中大量使用硫酸铜等进行病害防治和清塘灭藻已成为重要的水污染原因之一。因而,研究 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹的影响不仅对水质评价和监测具有一定意义,而且对深入了解中华绒螯蟹的生长生理机制具有重要的参考价值。其中以估算半致死浓度、安全浓度研究为多^[4],着眼于 Cu^{2+} 对甲壳动物生理生化特性的毒性影响的研究较少,中华绒螯蟹中相关工作尚未见报道。因此,通过比较对照组和添加不同 Cu^{2+} 浓度梯度试验组中华绒螯蟹体内 Cu^{2+} 的分布特征和与生长相关的一些重要消化酶活性的变化,本研究期望确定最主要的外源 Cu^{2+} 积累和代谢器官,主要消化酶对 Cu^{2+} 胁迫的应答特征和毒性反应阈值。

1 材料和方法

实验从2003年9月20日至10月30日在上海市青浦区金蟹水产养殖有限公司进行。

1.1 材料

实验所用中华绒螯蟹均属长江水系,个体平均湿重为 $100.00 \pm 20.52\text{g}$ 。实验前,用淀山湖水沉淀一周后,在水泥池中将上述蟹暂养一周。

先用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 配制 $50\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 硫酸铜母液,用淀山湖水稀释成所需各种处理组的 Cu^{2+} 溶液。经测定,湖水中 Cu^{2+} 的本底浓度为 $0.001\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.2 饲养管理

共设5个 Cu^{2+} 浓度处理组:0.00、0.01、0.10、1.00、 $5.00\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。将实验用蟹置于 $80\text{cm} \times 50\text{cm} \times 50\text{cm}$ 的聚乙烯水族箱中,每箱放入10只(5雌5雄),加入50L含有不同浓度 Cu^{2+} 的水。箱底放置一些洗净的蚌壳,供蟹躲藏。每个处理组均另设两个重复平行组。实验期间每天6:00

和18:00按体重的5%投喂两次成蟹饲料,观察记录蟹的死亡情况,及时去除死蟹。下午投饵前吸净残饵,更换少量饲养用水,所换水 Cu^{2+} 浓度与试验组浓度相同。自然水温 $20.2 \sim 25.5^\circ\text{C}$, pH 7.2 ± 0.3 , 溶解氧为 $8.3 \pm 0.4\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 自然光照,连续充气。

1.3 Cu^{2+} 测定

饲养10d后,每处理组取3只蟹,3个平行组相同,共9只蟹。称重后将蟹杀死,迅速取其肝胰腺、鳃和表皮 -70°C 冷冻保存。测定前将冷冻样品约1g融化,浓硝酸、浓盐酸湿法消化, plasma 2000型电感耦合等离子发射光谱仪(美国 Perlin-Elmer 公司)测定不同组织中 Cu^{2+} 含量,结果以每克组织湿重所含 Cu^{2+} 的毫克数表示($\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$)。

1.4 消化酶活性测定

测定方法参考文献[5],略有改进。取上述冷冻的蟹肝胰腺约1g,冰浴融化,加入4mL的预冷生理盐水匀浆。取1mL匀浆液测脂肪酶活力,剩余部分以冷冻离心机在 $0 \sim 1^\circ\text{C}$ $9000\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$, 离心15min,取上清液加生理盐水至6mL测定类胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶、纤维素酶活力。

胃蛋白酶 取上述制备的上清液0.4mL,加入0.5%干酪素溶液2mL(0.5g干酪素溶于100mL柠檬酸缓冲液), $0.04\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA- Na_2 0.1mL, $0.2\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 柠檬酸缓冲液(pH 3.0) 0.4mL,加重蒸水,使总体积为3.5mL,混匀,置于 37°C 水浴中,反应15min。然后加入30%三氯醋酸1mL(30g溶于100mL重蒸水中),离心,取上清液,用福林-酚试剂在540nm处比色测定酪氨酸的生成的含量。在 37°C 下,每分钟水解干酪素所产生1 μg 酪氨酸作为一个酶活力单位U($\mu\text{g} \cdot \text{min}^{-1}$)。

类胰蛋白酶 测定所用缓冲液为 $0.05\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 硼砂-氢氧化钠缓冲液(pH 9.8),其它与胃蛋白酶活力的测定方法相同。

淀粉酶 加入用 $0.067\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液(pH 6.9)配置的1%淀粉溶液0.5mL,酶液0.5mL,摇匀,置于 25°C 水浴中,保温3min,然后加入3,5-二硝基水杨酸指示剂溶液2mL,置于沸水

浴中 5 min 后,取出,流水冷却,定容至 10 mL, 540 nm 处比色测麦芽糖的含量。在 25℃条件下,每分钟催化淀粉生成 1 μg 麦芽糖作为一个酶活力单位 $U(\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$ 。

纤维素酶 加入 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 醋酸缓冲液 (pH 4.5) 4 mL, 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液 1 mL, 酶液 0.5 mL, 重蒸水 1.5 mL, 置 40℃水浴中糖化 30 min; 取出立即于沸水中煮沸 10 min, 取 1 mL 糖化液, 加入 3, 5- 二硝基水杨酸指示剂 3 mL, 于沸水浴煮沸显色 15 min, 流水冷却, 加重蒸水 6 mL, 540 nm 处比色测葡萄糖含量。在 40℃下, 每分钟催化纤维素生成 1 μg 葡萄糖作为一个酶活力单位 $U(\mu\text{g}\cdot\text{min}^{-1})$ 。

脂肪酶 在 37℃水浴中, 将空白瓶和样品瓶分别加入 0.025 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液 (pH 7.5) 5 mL, 聚乙烯醇底物溶液 4 mL, 20% 牛胆酸钠溶液 0.4 mL, 酶液 0.1 mL, 空白瓶先加入 95% 乙醇 15 mL, 混匀, 反应 10 min 后取出, 样品瓶立即加入 95% 乙醇 15 mL, 再加入 1% 的酚酞溶液 0.1 mL, 用 0.05 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 氢氧化钠标准溶液滴定脂肪酸含量(溶液呈粉红色为止)。在 37℃下, 每分钟催化产生 1 μmol 脂肪酸作为一个酶活力单位 $U(\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1})$ 。

可溶性蛋白质 用购于南京建成生物工程研究所的考马斯亮兰试剂盒测定可溶性蛋白含量(mg), 方法参见试剂盒说明书。

酶的比活力 所测以上各种酶的活力单位(U) 除以相应酶液中的可溶性蛋白含量(mg) 即

为酶的比活力, 以 $U\cdot\text{mg}^{-1}$ 表示。

数据处理 所有结果均以 3 个平行组数据的平均值 \pm 标准差 (means \pm SD) 表示, 用 SPSS 软件 Duncan 法进行显著性检验和多重比较。

2 结果

2.1 中华绒螯蟹体内 Cu^{2+} 分布的变化

不同 Cu^{2+} 浓度处理组对中华绒螯蟹不同组织器官中 Cu^{2+} 含量的影响及各试验组的蟹体重和存活率见表 1。统计分析表明各处理组体重和存活率均无显著差异, 且存活率均在 86% 以上。3 种组织中 Cu^{2+} 含量均随着水环境中添加 Cu^{2+} 的浓度的增高而增加。但 3 种组织中 Cu^{2+} 含量增加的幅度则各不相同。在肝胰腺中, 低浓度 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 的处理组与对照组没有显著性差异; 当水环境中添加的 Cu^{2+} 浓度为 0.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 蟹体肝胰腺的 Cu^{2+} 含量迅速增加, 与较低浓度处理组差异显著, 但 Cu^{2+} 浓度达到 1.00 和 5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 蟹体肝胰腺的 Cu^{2+} 含量均有不同程度的增加, 但两组间没有显著性差异。鳃与肝胰腺不同, 随着水环境中 Cu^{2+} 浓度的增高, 各处理组的 Cu^{2+} 含量均有显著性增加。表皮 Cu^{2+} 含量的分布, 0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组与对照组没有显著性差异, 当水环境中添加的 Cu^{2+} 浓度达到 0.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 表皮 Cu^{2+} 含量有显著性增加, 而 Cu^{2+} 浓度为 1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 表皮 Cu^{2+} 含量虽有增加, 但无显著性差异, 当 Cu^{2+} 浓度为 5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, Cu^{2+} 含量又有了显著性增加。

表 1 不同 Cu^{2+} 浓度处理组中华绒螯蟹不同组织器官中 Cu^{2+} 含量

Tab. 1 Effects of different water-borne copper levels on the content of copper in different organs of *E. sinensis* $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$

Cu^{2+} 浓度 ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) copper level	体重(g) weight	存活率(%) survival rate	肝胰腺 hepatopancreas		鳃 gill		表皮 epidermis	
			Cu^{2+} 含量 copper content	增长倍数 multiplication	Cu^{2+} 含量 copper content	增长倍数 multiplication	Cu^{2+} 含量 copper content	增长倍数 multiplication
0.00	99.91 \pm 6.11 ^a	96.67 \pm 5.77 ^a	0.023 \pm 0.02 ^a		0.074 \pm 0.02 ^a		0.036 \pm 0.00 ^a	
0.01	100.49 \pm 10.36 ^a	93.33 \pm 5.77 ^a	0.025 \pm 0.01 ^a	1.1	0.096 \pm 0.03 ^b	1.3	0.043 \pm 0.01 ^a	1.2
0.10	102.00 \pm 9.73 ^a	90.00 \pm 10.00 ^a	0.110 \pm 0.06 ^b	4.8	0.168 \pm 0.03 ^c	2.3	0.056 \pm 0.01 ^b	1.6
1.00	96.83 \pm 5.91 ^a	86.67 \pm 5.77 ^a	0.340 \pm 0.04 ^c	14.8	0.250 \pm 0.05 ^d	3.4	0.060 \pm 0.02 ^b	1.7
5.00	100.80 \pm 5.53 ^a	90.00 \pm 0.00 ^a	0.341 \pm 0.06 ^c	14.8	0.307 \pm 0.03 ^c	4.1	0.191 \pm 0.04 ^c	5.3

注: 1. 同行数值上标相同, 表明组间差异不显著 ($P > 0.05$); 反之表明差异显著 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 2. 表中增长倍数为同一组织中的处理组与对照组 Cu^{2+} 含量的比值

Notes: values in a row with the same letter are not significant difference ($P > 0.05$); whereas are significant difference ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); Multiplication in table is ratio of copper content of test groups and control group in the same tissue

对照组 3 种组织中 Cu^{2+} 含量以鳃为最高, 表皮次之, 肝胰腺最低。随着水环境中 Cu^{2+} 浓度的逐渐增高, 3 种组织中的 Cu^{2+} 含量增加速度呈现不同的变化趋势。当水环境中的 Cu^{2+} 为 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 肝胰腺、鳃和表皮中 Cu^{2+} 含量分别为对照组的 1.1、1.3 和 1.2 倍, 三者差异不明显。当水环境中添加的 Cu^{2+} 为 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 肝胰腺 Cu^{2+} 含量增长最快, 是对照组的 4.8 倍, 鳃和表皮增加较慢, 分别为对照组的 2.3 和 1.6 倍。当添加的 Cu^{2+} 浓度为 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 肝胰腺中的 Cu^{2+} 含量迅速增加到对照组的 14.8 倍, 而鳃只增加到对照组的 3.4 倍, 表皮增加得最慢, 仅为对照组的 1.7 倍。此时, 肝胰腺的 Cu^{2+} 含量超过了鳃, 3 种组织中 Cu^{2+} 含量的高低顺序由最初的鳃 > 表皮 > 肝胰腺变为肝胰腺 > 鳃 > 表皮。当添加的 Cu^{2+} 浓度为 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 肝胰腺 Cu^{2+} 含量虽略有增加, 但没有显著性差异, 表皮中的 Cu^{2+} 含量增加到对照组的 5.3 倍, 鳃最小为对照组的 4.1 倍, 肝胰腺中 Cu^{2+} 含量由对照组的最低变为最高。而鳃和表皮中 Cu^{2+} 含量虽然在对照组时较高, 最终的 Cu^{2+} 含量均低于肝胰腺。

2.2 中华绒螯蟹肝胰腺的消化酶活性的变化

除脂肪酶外的其余 4 种酶各处理组的比活力

均显著 ($P < 0.05$) 低于对照组。在类胰蛋白酶, 总的趋势是各处理组酶的比活力随着 Cu^{2+} 浓度的增高而降低。对照组最高, 为 $3.89 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组最低, 为 $0.78 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。虽然 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组酶的比活力略高于 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组, 但二者之间没有显著性差异。

Cu^{2+} 浓度由 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 增到 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 胃蛋白酶随着 Cu^{2+} 浓度增长, 其比活力先下降后上升, 但三者之间没有显著性差异。当 Cu^{2+} 浓度增加到 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 胃蛋白酶的比活力则显著 ($P < 0.05$) 地下降为 $0.67 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。淀粉酶比活力对照组为 $305.01 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的处理组迅速下降到 $36.81 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, 随着 Cu^{2+} 浓度的继续增长, 各处理组淀粉酶活力没有明显的变化, 维持在 $30.61 \sim 43.62 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 的较低水平。 $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组最低, 为 $30.61 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。纤维素酶变化趋势与类胰蛋白酶类似。虽然 $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组酶的比活力略高于 $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cu^{2+} 浓度组, 但二者之间没有显著性差异。其总的趋势是各处理组酶的比活力随着 Cu^{2+} 浓度的增高而降低。对照组最高, 为 $5.65 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, $5.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理组最低, 为 $3.21 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。

表 2 不同浓度的 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹肝胰腺消化酶比活力的影响

Tab. 2 Effects of different levels of water-borne copper

on the digestive enzyme specific activity in hepatopancreas of *E. sinensis*

$\text{U} \cdot \text{mg}^{-1}$

Cu^{2+} 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) copper level	类胰蛋白酶 tyrase	胃蛋白酶 pepsin	淀粉酶 amylase	纤维素酶 cellulase	脂肪酶 lipase
0.00	3.89 ± 0.51^a	1.50 ± 0.13^a	305.01 ± 32.23^a	5.65 ± 0.68^a	0.13 ± 0.10^b
0.01	2.80 ± 0.36^b	$1.00 \pm 0.06^b^c$	36.81 ± 4.84^{bc}	4.25 ± 0.86^b	0.97 ± 0.24^c
0.10	2.06 ± 0.42^c	1.19 ± 0.01^{ab}	33.62 ± 4.36^{bc}	3.58 ± 0.46^{bc}	0.58 ± 0.11^a
1.00	2.40 ± 0.45^{bc}	1.20 ± 0.10^{ab}	43.62 ± 4.27^b	4.13 ± 0.55^b	0.66 ± 0.15^a
5.00	0.78 ± 0.57^d	0.67 ± 0.01^c	30.61 ± 3.67^c	3.21 ± 0.21^c	0.73 ± 0.13^a

表 3 不同浓度的 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹肝胰腺消化酶比活力的抑制率或增强率

Tab. 3 Inhibition and enhancement of different levels of water-borne copper

on the digestive enzyme specific activity in hepatopancreas of *E. sinensis*

%

Cu^{2+} 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) copper level	类胰蛋白酶 tyrase	胃蛋白酶 pepsin	淀粉酶 amylase	纤维素酶 cellulase	脂肪酶 lipase
0.01	28.02	33.33	87.93	60.17	646.15
0.10	47.04	20.67	88.97	36.63	346.15
1.00	38.30	20.00	85.69	26.90	407.69
5.00	79.95	55.33	89.96	43.18	461.54

注: 表中数字脂肪酶为增强率, 其余 4 种酶为抑制率

Notes: the number of lipase in table is strengthened rate, the other numbers of four enzymes are inhibited rate

脂肪酶的变化趋势与上述4种酶的相反,各处理组酶的比活力均显著性($P < 0.05$)高于对照组。随着 Cu^{2+} 浓度的增长,脂肪酶活力呈先增加,后下降,再增加的变化趋势,0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的脂肪酶的比活力为0.97 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$,0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的脂肪酶比活力显著下降为0.58 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 后,随着 Cu^{2+} 浓度的增长脂肪酶的比活力缓慢增加。0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组脂肪酶活力最高(表2)。

水环境中添加的 Cu^{2+} 高于0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,对肝胰腺胃蛋白酶、类胰蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活性均有不同程度的抑制。其中对淀粉酶的抑制率最为显著($P < 0.01$),平均抑制率为88.14%,最大值竟达89.96%(表3)。对胃蛋白酶的影响最小,平均抑制率为32.33%,最小抑制率为20.00%,最大抑制率也仅为55.33%。四种酶的平均抑制率由大到小依次为:淀粉酶>类胰蛋白酶>纤维素酶>胃蛋白酶。

3 讨论

3.1 水环境中的 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹体内 Cu^{2+} 分布的影响

甲壳动物吸收金属离子主要有两种方式,一是通过鳃,二是通过消化道进入肝胰腺。 Cu^{2+} 作为中华绒螯蟹必需的微量元素,主要通过以上两种方式吸收入血淋巴^[6]。在自然条件下,水环境的 Cu^{2+} 主要分布于鳃^[7],本文的研究结果(对照组的鳃 Cu^{2+} 含量最高)印证了这一点。但当环境中重金属微量元素离子较高时,动物体对重金属吸收速度大于消除速度,积累量将持续增加。肝胰腺是十足目甲壳动物重要的消化器官,它承担着消化酶的合成和分泌以及对营养物质的吸收,同时也与排泄、蜕皮周期、无机物质的贮藏等有关。肝胰腺中脂肪含量较高,与 Cu^{2+} 积累量较高有关^[8]。因此,本研究结果可表明在高 Cu^{2+} 环境下,肝胰腺是 Cu^{2+} 累积的主要场所。而生物体一般都有相应的解毒机制,通过生物氧化和水解等直接排泄出体外或者将毒性重金属转化成非毒性的金属硫蛋白结合物^[3]等形式积存于组织器官中。中华绒螯蟹对 Cu^{2+} 的主要解毒机制可能属于后者。当外界水环境中的 Cu^{2+} 浓度增高时,会在肝胰腺中快速积累,但当水环境中的 Cu^{2+} 浓度达到1.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,肝胰腺中的 Cu^{2+} 含量增加

不显著,这可能是其中能与 Cu^{2+} 结合的配位体基本达到了饱和的程度^[1]。相同的实验结果在中国对虾^[8]和螯虾^[9]中存在。

鳃是蟹的呼吸器官,水生动物呼吸时,氧在鳃进行交换,与 Cu^{2+} 一起进入血淋巴中,另外,鳃的表面有较薄的一层粘液,这层粘液起着一定的吸附金属离子的作用,在自然条件下,鳃中 Cu^{2+} 含量最高。随着水域中添加 Cu^{2+} 浓度的增加,鳃组织中 Cu^{2+} 含量则是一直上升,这是因为它暴露于外环境,直接接触 Cu^{2+} ,环境中 Cu^{2+} 浓度高,它的含量也会相应增高,但鳃吸收后,大部分进入血淋巴,所以 Cu^{2+} 含量增加的速率比肝胰腺慢。表皮是蟹体与外界屏障,有保护作用,所以对 Cu^{2+} 的积累是另一种方式, Cu^{2+} 浓度较低时, Cu^{2+} 含量增加较慢,当 Cu^{2+} 浓度增加到5.00 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,则有快速增加,这可能是 Cu^{2+} 在表皮上附着的结果。所以,我们认为器官或组织的功能不同(鳃是吸收器官,肝胰腺是贮藏和解毒器官,表皮是防护屏障),导致了不同的体内 Cu^{2+} 分布效应。

3.2 水环境的 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹肝胰腺消化酶活性的影响

伴随着肝胰腺中 Cu^{2+} 累积水平发生变化,主要消化酶的活性即能观察到不同程度的应答变化。本研究发现,即使当水域中的 Cu^{2+} 在《国家标准渔业水质标准》(GB11607-89)允许的0.01 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,也会对肝胰腺消化酶活性产生显著性影响,当 Cu^{2+} 在0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 以上时才对幼蟹的生长和蜕皮产生显著性影响,表明消化酶活性的变化能更灵敏地反映 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹生理活动的影响。重金属对生物机体的作用是从生物大分子(如DNA, RNA, 各种酶)开始的,然后逐步在细胞、器官、个体、种群和生态系统各个水平上反映出来^[10]。酶在生物机体的生物化学过程中的作用是构成整个生命活动的基础。重金属进入机体后,一方面在酶的催化下,进行代谢转化;另一方面也导致体内酶活性的改变,许多重金属的毒性作用就是基于与酶的相互作用。重金属对生物机体酶的影响有两种方式,一是对酶活性的诱导,二是对酶活性的抑制。研究发现,中华绒螯蟹肝胰腺脂肪酶比活力随着水域中 Cu^{2+} 浓度的增高而增加,可见 Cu^{2+} 对脂肪酶活性的影响是诱导作用。关于外源化合物对酶的诱导作用的

机理, 有人认为, 外源性化合物诱导酶合成, 主要是操纵基因去阻遏作用(Depression)。外源化合物与调节操纵基因的阻遏物形成复合物, 使阻遏物作用失效, 酶蛋白合成增加^[10]。

Cu^{2+} 对中华绒螯蟹肝胰腺消化酶的影响还体现在对类胰蛋白酶、胃蛋白酶、淀粉酶和纤维素酶活力的抑制作用上。随着水环境中添加 Cu^{2+} 浓度的增高, 4 种酶的活性都受到不同程度的抑制。另据报道, 当水环境中的 Cu^{2+} 浓度高于 $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $0.008 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 日本沼虾肝胰腺中胃蛋白酶、类胰蛋白酶活性受到抑制^[11]; 水域中 Cu^{2+} 含量大于 $10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ (相当于 $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 时, 中华哲水蚤蛋白酶的合成量开始下降^[11]。关于重金属 Cu^{2+} 对酶活性的抑制机制, 一般认为正常情况下, 生物体内金属硫蛋白的含量很低, 但当生物体暴露于 Cu^{2+} 等重金属中时, 动物体内会大量合成金属硫蛋白, 并处于无活性的稳定状态而解毒。但金属硫蛋白贮存重金属和解毒的能力有限, 当它们被重金属饱和之后, 继续合成又赶不上进入细胞的金属结合的需要, 多余的重金属就会与其它生物分子相互作用^[12], 如 Cu^{2+} 能与消化酶活性中心上的半胱氨酸残基的巯基结合, 抑制酶的活性; 或酶的非活性中心部分与 Cu^{2+} 结合, 使结构发生变形, 酶活性减弱^[13]。因此我们推测 Cu^{2+} 正是通过上述机制抑制了中华绒螯蟹 4 种消化酶的活性。

参考文献:

[1] 刘发义, 梁德海, 孙 凤, 等. 饲料中的铜对中国对虾的

影响[J]. 海洋与湖沼, 1990, 21(5): 404- 410.

- [2] Méndez L, Racotta I S, Acosta B, *et al.* Mineral level in tissue during ovarian development of white shrimp *Penaeus vannamei* (Decapoda: Penaeidae) [J]. Marine Biology, 2001, 138: 687- 692.
- [3] Brouwer M, Syring R, Brouwer T H. Role of a copper-specific metallothionein of the blue crab, *Callinectes sapidus*, in copper metabolism associated with degradation and synthesis of hemocyanin[J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, 88: 228- 239.
- [4] Bambang Y, Thuet P, Chamantier-Daures M, *et al.* Effect of copper on survival and osmoregulation of various developmental stages of the shrimp *Penaeus japonicus* Bate (Crustacea, Decapoda) [J]. Aquatic Toxicology, 1995, 33: 125- 139.
- [5] 潘鲁青, 王克行. 中华绒螯蟹幼体消化酶活力与氨基酸组成的研究[J]. 中国水产科学, 1997, 4(2): 13- 20.
- [6] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学[M]. 天津: 天津大学出版社, 1993. 28.
- [7] 刘发义, 吴玉霖, 赵鸿儒, 等. 铜在中国对虾体内的积累和致毒效应[J]. 海洋与湖沼, 1988, 19(2): 133- 138.
- [8] 黄玉瑶. 内陆水域污染生态学原理与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2001. 77.
- [9] Bagotto G, Alikhan M A. Copper, cadmium and nickel accumulation in crayfish populations near coppemickel smelters at Sudbury [J]. Ontario, Canada, Bull Environ Contam Toxicol, 1987, 38: 540- 545.
- [10] 孔繁翔. 环境生物学[M]. 北京: 高教出版社, 2000. 68.
- [11] 王维娜, 王安利, 孙儒泳. 水环境中的铜锌铁钴离子对日本沼虾消化酶和碱性磷酸酶的影响[J]. 动物学报, 2001, 47(专刊): 72- 77.
- [12] Hoekstra W G, Suttie J W, Ganther H E *et al.* Trace Elements Metabolism in Animals[M]. University Park Press, Baltimore, 1973, 2: 500- 501.
- [13] 贺振东, 林绍铭, 李鸿海(译). 环境污染物质与毒性(无机篇)[M]. 成都: 四川人民出版社, 1981.