孙建梅,郑桂红,刘缠民,等. 硫酸镍对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2015,43(1):239-241.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.01.081

硫酸镍对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响

孙建梅, 郑桂红, 刘缠民, 张宏亮, 黄 璁, 冯照军
(江苏师范大学生命科学学院,江苏徐州 221116)

摘要:为了评价水环境中 Ni^{2+} 对鱼类的影响,并为预防和治理淡水渔业水质资源的镍污染提供一定的理论依据,采用静水生物测试法,研究 0、10、25、50、100 mg/L $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响。结果表明:低浓度的 $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 对肝胰脏中脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶有激活作用,在高浓度时呈抑制作用;而对碱性磷酸酶一直表现为抑制作用。低浓度的 $NiSO_4 \cdot 6H_2O$ 对肠中胰蛋白酶、脂肪酶、ACP 和 AKP 有激活作用,高浓度时呈现出抑制作用。

关键词:硫酸镍;鲫鱼;肝胰脏;肠;酶活性
中图分类号: S965.117;S917.4 **文献标志码**: A **文章编号**:1002-1302(2015)01-0239-03

随着工业的迅速发展,大量的铅、镉、镍、汞等重金属随污水流入江海湖泊,严重破坏了水域生态环境,影响鱼类的正常生长繁殖[1]。目前,关于镍和其他重金属毒理学的研究多集中在致死浓度与水生动物体内镍的积累量等方面,而重金属离子对鱼类消化酶活性影响的研究较少[2]。因此,本研究以野生鲫鱼肝胰脏和肠中脂肪酶、胰蛋白酶、AKP 和 ACP 为指标,研究不同浓度的 $NiSO_4$ 对鲫鱼肝胰脏和肠中酶活性的影响,旨在研究 Ni^{2+} 对鱼类消化酶的影响机制,为保证鱼类的健康和防治环境污染提供一定的理论参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物 野生鲫鱼,购自江苏徐州文沃市场,选择健康活泼、体表完好的鲫鱼 100 尾,体长(9±2) cm、体质量(20±2) g/尾,随机分为 5 组,分别为 0、10、25、50、100 mg/L $NiSO_4$[3]。放养于室内水族箱中,每箱 88 L 水,以充分曝气 3 d 的自来水作为静水水源,24 h 持续充氧,溶氧量为 6 mg/L,保持水温(23±1) ℃、pH 值 6.8。采用静水法将鲫鱼预饲养 1 周,预试验期间死亡率低于 5%,试验前 24 h 停止饲喂,试验期间不换水。

1.1.2 药品和试剂 蛋白定量测试盒(100T/96 样)、脂肪酶测试盒(50T/48 样)、胰蛋白酶测试盒(50T/48 样)、酸性磷酸酶(ACP)测试盒(50T/48 样),以上均为南京建成生物工程研究所产品;碱性磷酸酶(AKP)测试盒(50T/48 样),0.9%生理盐水,$NiSO_4 \cdot 6H_2O$。

1.1.3 试验仪器 YV-7504 单光束紫外-可见分光光度计(上海欣茂仪器有限公司)、电热恒温水浴锅(上海精宏实验设备有限公司)、BS 124S 型电子天平[0.1 mg~120 g,赛多利斯科学仪器(北京)有限公司]、玻璃匀浆器、微量移液枪(1、0.1 mL)等。

1.2 试验方法

随机抽取毒性试验 96 h 之后的鲫鱼(至少 3 尾),解剖取样,对肝胰脏中各指标进行测定,评价 $NiSO_4$ 对鲫鱼的影响。

1.3 数据处理

试验数据用 IBM SPSS Statistics 19.0 软件进行处理。组间数据的两两比较采用配对样本进行 t 检验,$P<0.05$、$P<0.01$ 表示差异显著、极显著。

收稿日期:2014-03-07
基金项目:江苏省徐州市科技计划(编号:XF11C051);江苏省化学生物学优势学科基金(编号:PAPD)。
作者简介:孙建梅(1962—),女,江苏徐州人,副教授,从事动物学的教学和科研工作。
通信作者:郑桂红,女,山东郓城人,博士研究生,讲师,从事动物生理学的教学和科研工作。E-mail:ghzhenghf@163.com。

[13]李 丽,肖永庆,于定荣,等. HPLC 测定五味子中 3 种有机酸的含量[J]. 中国中药杂志,2011,36(23):3286-3289.
[14]吴 夏,景 浩. 随机质心映射法优化五味子鲜果花色苷提取工艺及其稳定性研究与结构的鉴定[C]//中国食品科学技术学会第七届年会论文摘要集,2010:59-60.
[15]Zhang X M,Chan C C,Stamp D,et al. Initiation and promotion of colonic aberrant crypt foci in rats by 5-hydroxymethyl-2-furaldehyde in thermolyzed sucrose[J]. Carcinogenesis,1993,14(4):773-775.
[16]Surh Y J,Tannenbaum S R. Activation of the maillard reaction product 5-(hydroxymethyl)furfural to strong mutagens via allylic sulfonation and chlorination[J]. Chemical Research in Toxicology,1994,7(3):313-318.
[17]Durling L J,Busk L,Hellman B E. Evaluation of the DNA damaging effect of the heat-induced food toxicant 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in various cell lines with different activities of sulfotransferases[J]. Food and Chemical Toxicology,2009,47(4):880-884.
[18]迟 文,张昌斌,曹永红,等. 限制 5-羟甲基糠醛生成条件的探讨[J]. 人民军医药学专刊,1998,14(2):101-104.
[19]何嘉凝,单提昆,吴文君,等. 五味子多糖的研究进展[J]. 吉林医药学院学报,2012,11(1):38-42.
[20]汤喜兰,刘建勋,李 磊. 中药有机酸类成分的药理作用及在心血管疾病的应用[J]. 中国实验方剂学杂志,2012,18(5):243-246.

2 结果与分析

2.1 $NiSO_4$ 对鲫鱼肝胰脏中胰蛋白酶活性的影响

由表 1 可知,随着 $NiSO_4$ 浓度的升高,蛋白浓度呈上升趋势,且 $NiSO_4$ 浓度越高,蛋白浓度上升越明显。在 $NiSO_4$ 浓度为 50 mg/L 时,蛋白浓度显著上升;在 $NiSO_4$ 浓度为 100 mg/L 时,蛋白浓度极显著上升($P<0.01$)。当 $NiSO_4$ 浓度≤25 mg/L 时,胰蛋白酶活性增强;但当 $NiSO_4$ 浓度≥50 mg/L 时,胰蛋白酶活性减弱。可见,低浓度 $NiSO_4$ 对胰蛋白酶活性有促进作用,高浓度 $NiSO_4$ 对其有抑制作用,其中 10、100 mg/L $NiSO_4$ 处理的胰蛋白酶活性与对照差异显著($P<0.05$),25 mg/L $NiSO_4$ 处理的胰蛋白酶活性与对照差异极显著($P<0.01$)。当 $NiSO_4$ 浓度≤25 mg/L 时,脂肪酶活性缓慢增强;但当 $NiSO_4$ 浓度≥50 mg/L 时,脂肪酶活性急剧减弱。可见,低浓度 $NiSO_4$ 对脂肪酶活性有细微的促进作用,高浓度 $NiSO_4$ 对其具有明显的抑制作用,其中 25 mg/L $NiSO_4$ 处理的脂肪酶活性与对照差异显著($P<0.05$),100 mg/L $NiSO_4$处理的脂肪酶活性与对照差异极显著($P<0.01$)。当 $NiSO_4$ 浓度≤25 mg/L 时,酸性磷酸酶活性呈增强趋势,但在 50 mg/L 之后,酶活性减弱。可见,低浓度 $NiSO_4$ 对酸性磷酸酶活性有促进作用,高浓度 $NiSO_4$ 对其有抑制作用,其中 25、100 mg/L $NiSO_4$ 与对照差异显著($P<0.05$)。碱性磷酸酶活性在 $NiSO_4$ 浓度为 10 mg/L 时就表现出减弱的趋势,且随着 $NiSO_4$ 浓度的升高而减弱得更明显,在 $NiSO_4$ 浓度为 10 ~ 50 mg/L 之间时,碱性磷酸酶活性减弱最明显,其中 25、50、100 mg/L $NiSO_4$ 与对照差异显著($P<0.05$)。

表 1 镍对鲫鱼肝胰脏中胰蛋白酶活性的影响

$NiSO_4$ 的浓度(mg/L)	样本数(份)	蛋白浓度(mg/mL)	胰蛋白酶活性(U/mg)	脂肪酶活性(U/g)	酸性磷酸酶活性(U/g)	碱性磷酸酶活性(U/g)
对照	5	0.762 ±0.059	3 155.664 ±333.740	205.746 ±16.285	1.862 ±0.146	0.292 ±0.029
10	5	0.779 ±0.012	3 797.072 ±201.902 *	222.095 ±15.562	2.045 ±0.058	0.278 ±0.021
25	5	0.812 ±0.048	5 745.159 ±320.527 **	272.499 ±21.982 *	2.374 ±0.140 *	0.229 ±0.023 *
50	5	1.079 ±0.021 *	2 826.352 ±88.395	179.430 ±2.249	1.762 ±0.071	0.195 ±0.004 *
100	5	1.299 ±0.068 **	2 016.545 ±66.752 *	92.778 ±5.865 **	1.160 ±0.086 *	0.187 ±0.006 *

注:*、** 表示与对照相比差异显著($P<0.05$)、极显著($P<0.01$)。下同。

2.2 $NiSO_4$ 对鲫鱼肠中酶活性的影响

由表 2 可知,随着 $NiSO_4$ 浓度的升高,蛋白浓度呈上升趋势,而且浓度越高,蛋白浓度上升越明显,其中 25、50、100 mg/L $NiSO_4$ 处理的蛋白浓度与对照差异显著($P<0.05$)。当 $NiSO_4$浓度≤50 mg/L 时,胰蛋白酶活性增强;但当 $NiSO_4$浓度>50 mg/L 时,胰蛋白酶活性反而会减弱,可见低浓度 $NiSO_4$对胰蛋白酶活性有促进作用,高浓度 $NiSO_4$对其有抑制作用,其中 25、100 mg/L $NiSO_4$ 处理与对照差异显著($P<0.05$),50 mg/L $NiSO_4$ 处理与对照差异极显著($P<0.01$)。当 $NiSO_4$浓度>50 mg/L 时,脂肪酶活性呈缓慢增强的趋势,但当 $NiSO_4$浓度达到 100 mg/L 时,脂肪酶活性急剧减弱,可见低浓度 $NiSO_4$对脂肪酶活性具有细微的促进作用,高浓度 $NiSO_4$对其具有明显的抑制作用,其中 10、25 mg/L $NiSO_4$ 处理与对照差异极显著($P<0.01$),50、100 mg/L $NiSO_4$ 处理与对照差异显著($P<0.05$)。当 $NiSO_4$ 浓度≤50 mg/L 时,酸性磷酸酶活性呈增强的趋势,但当其浓度达到 100 mg/L 时,酸性磷酸酶活性减弱,可见低浓度 $NiSO_4$ 对酸性磷酸酶活性有促进作用,高浓度 $NiSO_4$对其具有抑制作用,其中 50 mg/L $NiSO_4$ 处理与对照差异显著($P<0.05$)。当$NiSO_4$ 浓度在 10 ~50 mg/L 之间时,碱性磷酸酶活性逐渐增强,但当其浓度达到 100 mg/L 时,其活性反而减弱了。酶活性的增强,说明前期对酶有促进作用;后期酶活性开始减弱,表示其对酶出现了抑制作用($P<0.01$)。

表 2 镍对鲫鱼肠中酶活性的影响

$NiSO_4$ 浓度(mg/L)	样本数(份)	蛋白浓度(mg/mL)	胰蛋白酶活性(U/mg)	脂肪酶活性(U/mg)	酸性磷酸酶活性(U/mg)	碱性磷酸酶活性(U/mg)
对照	5	0.310 ±0.012	33 012.452 ±1 315.119	309.361 ±7.305	2.383 ±0.137	0.323 ±0.043
10	5	0.356 ±0.024	40 523.078 ±2 718.002	385.964 ±10.449 **	2.690 ±0.268	0.857 ±0.042 **
25	5	0.367 ±0.023 *	46 687.030 ±2 074.574 *	408.760 ±9.351 **	3.108 ±0.642	0.896 ±0.069 **
50	5	0.419 ±0.035 *	55 586.158 ±2 645.991 **	509.613 ±34.873 *	4.093 ±0.400 *	1.454 ±0.130 *
100	5	0.596 ±0.075 *	39 860.200 ±1 393.031 *	182.191 ±53.406 *	2.692 ±0.109	1.129 ±0.032 **

3 结论与讨论

研究结果表明,鲫鱼肝胰脏中脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶活性在低浓度 $NiSO_4$ 中有所增强,但随着 $NiSO_4$ 浓度的增加,几种酶的活性明显减弱;碱性磷酸酶则一直呈减弱趋势。可见,在长时间的高浓度 $NiSO_4$胁迫下,鲫鱼与植物、哺乳动物[4]类似,其脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶活性受到了抑制,而碱性磷酸酶活性对 $NiSO_4$ 的影响具有不同的反应,其生理机制还有待于从酶活性调控的分子水平上进行更深入的研究。本研究中的各种酶活性与 $NiSO_4$ 浓度升高的关系同贾秀英进行的铅对鲤鱼的研究结果[5]一致,脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶活性随时间变化规律与黄雪琴等的结果[6]一致,随着中毒时间的延长,酶活性有所减弱。

鱼类肝胰脏是重要的解毒器官,也是主要蓄积重金属的部位,重金属离子可以诱导肝胰脏产生金属硫蛋白[7],从而降低重金属的毒性,减少对肝胰脏的损害,但是随重金属离子浓度的增加和时间的延长,这种损害会超过金属硫蛋白解毒的能力,从而抑制肝胰脏的代谢酶活性。本研究结果表明,肝

胰脏中脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶活性在高浓度 $NiSO_4$ 胁迫下明显减弱，说明高浓度 $NiSO_4$ 超出了肝胰脏本身的解毒能力，极大地抑制了脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶的活性。Glzar 等研究发现，高浓度铅会明显抑制罗非鱼碱性磷酸酶活性[8]，本试验结果与其相似；孔祥会等研究发现，高浓度汞会明显抑制肝胰脏碱性磷酸酶活性[4]。

肠为鱼类重要的消化器官，肠道的健康、酶的工作状态都关系到鱼的正常生长和发育。肠道是鱼类疾病传染的重要途径之一，肠道功能的下降会导致整个机体的健康水平下降，对营养物质的吸收能力也会下降，使大量营养物质流入水体，造成整个水体的健康水平下降，使鱼类的传染病经常发生，严重影响鱼类的生存，对整个鱼类养殖具有严重的破坏作用。

脂肪酶和胰蛋白酶为肠中重要的消化酶，脂肪酶活性的减弱对整个机体的影响是巨大的。脂肪酶是鱼肠中重要的消化酶，对鱼类营养物质的吸收有至关重要的作用[9-11]。ACP 和 AKP 在蛋白(酶)的去磷化过程中起了很大的作用，在生物对营养物质的吸收消化和运输[12]中也起重要作用，此外还是生物体内重要的解毒体系[13]。研究 Ni^{2+} 对脂肪酶、胰蛋白酶、酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的影响，有助于了解 Ni^{2+} 对鲫鱼肠中酶以及鲫鱼生长发育的影响，可作为水源镍污染监测的一种生物学指标。

本试验结果表明，鲫鱼肠中胰蛋白酶、脂肪酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶的活性都随着 $NiSO_4$ 浓度的增加而呈先增强后减弱的趋势。当 $NiSO_4$ 浓度为 0～50 mg/L 时，胰蛋白酶、脂肪酶、碱性和酸性磷酸酶均呈增强趋势，说明该浓度的 $NiSO_4$ 对酶具有激活作用；但当 $NiSO_4$ 浓度为 50～100 mg/L 时，各酶的活性则呈减弱的趋势，表明对各酶的活性产生了抑制作用。还有其他类似的试验均得出了“酶活性随着浓度的增加呈先增强后减弱”的结论，例如，$NiSO_4$ 对大鼠心肝肾 ATPase 毒性的试验研究[14]、铅对鲫鱼酸性磷酸酶、碱性磷酸酶的影响[7]、镍及其化合物对人和动物的毒性作用[15]、重金属 Cd 胁迫对红树蚬的抗氧化酶、消化酶活性和 MDA 含量影响[16]等。由此可见，低浓度 $NiSO_4$ 对胰蛋白酶、脂肪酶、ACP 和 AKP 具有不同程度的激活作用，高浓度 $NiSO_4$ 对其具有抑制作用。结合相关文献可知，可能是因为低浓度 $NiSO_4$ 会改变酶的分子结构，使酶活性增强；高浓度 $NiSO_4$ 会破坏酶的结构，使酶的活性受到抑制。其中，$NiSO_4$ 对脂肪酶、胰蛋白酶和 AKP 的影响极显著($P<0.01$)，对其的毒性作用很大；对酸性磷酸酶的影响较小。目前还没有人研究过镍对鲫鱼肠胰蛋白酶、脂肪酶、ACP 和 AKP 的影响，因此笔者通过研究 $NiSO_4$ 对鲫鱼肠酶的影响，以期为鲫鱼的养殖和保护以及水域的污染状况提供更多的资料。

参考文献：

[1] 刚葆琪，庄志雄. 我国镍毒理学研究进展[J]. 卫生毒理学杂志，2000，14(3)：129－135.

[2] 田宏杰，庄　平，高露姣. 生态因子对鱼类消化酶活力影响的研究进展[J]. 海洋渔业，2006，28(2)：158－162.

[3] Zheng G H，Liu C M，Sun J M，et al. Nickel－induced oxidative stress and apoptosis in *Carassius auratusliver* by JNK pathway[J]. Aquatic Toxicology，2014，147：105－111.

[4] 孔祥会，刘占才，郭彦玲，等. 汞暴露对草鱼器官组织中碱性磷酸酶活性的影响[J]. 中国水产科学，2007，14(2)：270－274.

[5] 贾秀英，陈志伟. 镉对鲤鱼磷酸酶活性的影响[J]. 上海环境科学，1998，17(6)：40－41.

[6] 黄雪琴，龙玉博. 镉对江蚬 *Corbicula fluminalis*（Muller）碱性磷酸酶的影响[J]. 福建师范大学学报：自然科学版，1995，11(2)：74－78.

[7] 高　举，赵欣平，詹付凤，等. 铅对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响[J]. 四川动物，2008，27(2)：201－204.

[8] Glzar A，Mustafa C. Enzymatic responses to metal exposures in a freshwater fish *Oreochromis niloticus*[J]. Comp Biochem PhysiolC，2007，145(2)：282－287.

[9] 高　贵，韩四平，王　智，等. 脂肪酶活力检测方法的比较[J]. 药物生物技术，2002，9(5)：281－284.

[10] 宋波澜，陈　刚，叶富良，等. 军曹鱼幼鱼脂肪酶的活力与环境因子的关系[J]. 暨南大学学报：自然科学与医学版，2007，28(5)：531－536.

[11] 洪法水，王　玲，吴　康，等. Pb^{2+} 对胰蛋白酶活性影响的作用机理研究[J]. 无机化学学报，2003，19(2)：129－132.

[12] 何海琪，孙　凤. 中国对虾酸性和碱性磷酸酶的特性研究[J]. 海洋与湖沼，1992，23(5)：555－560.

[13] 詹付凤，赵欣平. 重金属镉对鲫鱼碱性磷酸酶和酸性磷酸酶活性的影响[J]. 四川动物，2007，26(3)：641－643.

[14] 孙应彪，朱玉真. 硫酸镍对大鼠心肝肾 ATPase 毒性的实验研究[J]. 中国职业医学，2001，28(3)：27－28.

[15] 蔡跃华. 镍及其化合物对人和动物的毒性作用[J]. 食品研究与开发，2005，26(4)：192－193，174.

[16] 赖廷和，何斌源，范航清，等. 重金属 Cd 胁迫对红树蚬的抗氧化酶、消化酶活性和 MDA 含量的影响[J]. 生态学报，2011，31(11)：3044－3053.

（上接第 233 页）

[29] Johnson M C，Simon B E，Kim C H，et al. Production of recombinant snakehead rhabdovirus：the NV protein is not required for viral replication[J]. Journal of Virology，2000，74(5)：2343－2350.

[30] Biacchesi S，Thoulouze M I，Béarzotti M，et al. Recovery of NV knockout infectious hematopoietic necrosis virus expressing foreign genes[J]. Journal of Virology，2000，74(23)：11247－11253.

[31] Eerick R P，Batts W N，Yun S，et al. Host and geographic range extensions of the North American strain of viral hemorrhagic septicemia virus[J]. Diseases of Aquatic Organisms，2003，55(3)：211－220.

[32] Chiou P P，Kim C H，Ormonde P，et al. Infectious hematopoietic necrosis virus matrix protein inhibits host－directed gene expression and induces morphological changes of apoptosis in cell cultures[J]. Journal of Virology，2000，74(16)：7619－7627.

[33] Thoulouze M I，Bouguyon E，Carpentier C，et al. Essential role of the NV protein of Novirhabdovirus for pathogenicity in rainbow trout[J]. Journal of Virology，2004，78(8)：4098－4107.

[34] 孙颖杰，岳志芹，刘　荭，等. 牙鲆弹状病毒环介导的等温扩增技术的建立与应用[J]. 华中农业大学学报，2010，29(2)：203－207.