

唐 瑶, 杜丹丹, 彭东生, 等. 铅胁迫对日本蛭免疫相关指标及组织蓄积的影响[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(8): 336–339.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.08.110

铅胁迫对日本蛭免疫相关指标及组织蓄积的影响

唐 瑶, 杜丹丹, 彭东生, 阙义进, 霍 伟, 孟 霄, 陈友芹, 许星鸿

(淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005)

摘要: 将日本蛭暴露于不同浓度(0、0.025、0.05、0.5、1.0、2.5、5.0 mg/L)醋酸铅中, 于处理后 0、1、3、5、7、10、15、30 d 取血, 测定其血清中超氧化物歧化酶和过氧化氢酶的活性及过氧化代谢产物丙二醛含量; 并于胁迫 30 d 测定鳃、肝胰腺、肌肉、卵巢中的铅含量, 以研究铅胁迫对日本蛭免疫能力及组织蓄积的影响。结果表明, 在铅胁迫下, 日本蛭超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性均呈先增强后减弱趋势, 且中高浓度铅胁迫对抗氧化酶活性的诱导速度比低浓度快。胁迫 30 d, 除 0.025 mg/L 组外, 各试验组 2 种酶活性均显著弱于对照组, 且与铅胁迫质量浓度呈显著负相关($P < 0.05$)。0.025 mg/L 组丙二醛含量无明显变化, 其他各试验组丙二醛含量呈 2 种变化趋势, 即 0.05、0.5、1.0 mg/L 组先升后降再升, 2.5、5.0 mg/L 组持续上升。胁迫 15 d, 除 0.025 mg/L 组外, 各试验组丙二醛含量均显著高于对照组, 且与铅胁迫质量浓度呈显著正相关($P < 0.05$)。铅在日本蛭体内的积累以鳃和肝胰腺较多, 而卵和肌肉在 5.0 mg/L 铅胁迫下仍仅有微量蓄积。鳃和肝胰腺中铅含量与胁迫浓度之间存在显著浓度效应($P < 0.05$)。可将日本蛭血清超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量以及鳃、肝胰腺铅含量的长期变化作为铅污染的生物监测指标。

关键词: 铅胁迫; 日本蛭; 免疫指标; 组织蓄积

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)08-0336-04

近年来, 由于工农业废水的大量排放导致的重金属污染问题日益突出, 对生态环境安全、人类食品安全及水产养殖业构成了较大威胁^[1-3]。铅是常见的重金属污染元素之一, 其

在人和动物体内长期蓄积会引起慢性中毒、神经机能紊乱、贫血甚至诱发癌症^[4]。日本蛭(*Charybdis japonica*)广泛分布于我国各海区, 营底栖生活, 为经济价值较高的海水养殖蟹类^[5]。关于重金属对日本蛭的影响已有少量研究报道, 如张红霞等分析了重金属离子对日本蛭血淋巴超氧化物歧化酶和谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响^[6]; 王春琳等探讨了硫酸铜蓄积对日本蛭保护酶系统的影响^[7]; 苗利军等对秦皇岛海域野生日本蛭等 9 种海产品总汞含量进行了检测^[8]。本试验研究了不同浓度铅胁迫下, 日本蛭血清中超氧化物歧化酶、过氧

收稿日期: 2014-08-24

基金项目: 江苏省高等学校水产类重点专业项目; 国家级大学生创新项目(编号: 5509013)。

作者简介: 唐 瑶(1993—), 女, 江苏徐州人, 研究方向为海洋生物学。

通信作者: 许星鸿, 硕士, 教授, 研究方向为海洋生物学。E-mail: xhxu119@163.com。

[2] 胡 明. 潼关农田土壤重金属污染评价[J]. 中国农学通报, 2013, 29(35): 277–280.

[3] 张 雷, 秦延文, 郑丙辉, 等. 丹江口水库迁建区土壤重金属分布及污染评价[J]. 环境科学, 2013, 34(1): 108–115.

[4] Ma Y, Hu C, Jiang J, et al. Land quality evaluation of Xinjiang river basin of Jiangxi Province[J]. Scientific Journal of Earth Science, 2013, 3(1): 19–28.

[5] 黄碧捷. 土壤重金属生物可利用性研究趋势展望[J]. 江汉大学学报: 自然科学版, 2013, 41(6): 38–43.

[6] 古一帆, 何 明, 李进玲, 等. 上海奉贤区土壤理化性质与重金属含量的关系[J]. 上海交通大学学报: 农业科学版, 2009, 28(6): 601–605, 623.

[7] 牟新利, 郭 佳, 刘少达, 等. 三峡库区农林土壤重金属形态分布与污染评价[J]. 江苏农业科学, 2013, 41(9): 314–317.

[8] 郝 宇, 张艳霞, 刘丽杰, 等. 扎龙湿地土壤重金属含量与土壤理化性质的相关性研究[J]. 北方园艺, 2013(24): 167–171.

[9] Bartoli G, Papa S, Sagnella E, et al. Heavy metal content in sediments along the Calore river: relationships with physical-chemical characteristics[J]. Journal of Environmental Management, 2012, 95(Suppl): S9–14.

[10] 关共凑, 魏兴琥, 陈楠纬. 佛山市郊菜地土壤理化性质与重金属含量及其相关性[J]. 环境科学与管理, 2013, 38(2): 78–82.

[11] Lu Y, Yin W, Huang L B, et al. Assessment of bioaccessibility and exposure risk of arsenic and lead in urban soils of Guangzhou City, China[J]. Environmental Geochemistry and Health, 2011, 33(2): 93–102.

[12] 乔胜英. 土壤理化性质实验指导书[M]. 武汉: 中国地质大学出版社有限责任公司, 2012: 89.

[13] 张芙莱, 蒋晶晶. 三种土壤消解方法的对比研究[J]. 环境科学与管理, 2008, 33(3): 132–134.

[14] 孙 滨. 浅谈土壤消解方法对重金属元素的选择[J]. 环境科学导刊, 2013, 32(4): 130–134.

[15] 张 纯. 土样中铅的硝酸-过氧化氢回流消解[J]. 重庆环境保护, 1985(4): 32–36.

[16] 成斌斌. 土壤 pH 值的测定[J]. 化学教与学, 2014(4): 95–97.

[17] GB 7866—1987 森林土壤交换性钾和钠的测定[S].

[18] GB 7865—1987 森林土壤交换性钙和镁的测定[S].

[19] 夏英辉, 熊黑钢. EM38 在土壤盐分带中的运用研究[J]. 干旱区研究, 2013, 30(4): 628–633.

[20] 李春喜, 姜丽娜, 邵 云, 等. 生物统计学[M]. 3 版. 北京: 科学出版社, 2005: 263–269.

化氢酶活性以及脂质过氧化反应产物——丙二醛含量的变化,并分析了主要器官中铅的蓄积量,旨在探讨铅对日本蛎的毒性作用,为养殖水质调控、海洋环境监测及相关毒理学研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

日本蛎于 2013 年 10 月购自江苏省连云港市高公岛海滨,采用生态闭路循环养殖系统暂养 7 d,暂养条件为:盐度 2.5‰,pH 值 8.0,水温 15 ℃,自然光照,连续充气,日投喂 2 次鲜活贝类。选择附肢完整、活性强者用于试验,甲长为 (5.16 ± 0.28) cm,甲宽为 (6.82 ± 0.41) cm,体质量为 (76.59 ± 17.64) g。

1.2 试验设计

铅源采用醋酸铅,为国产分析纯。根据 GB 11607—1989《渔业 水质标准》(铅浓度 ≤ 0.05 mg/L)以及海水通常的铅污染浓度^[9],醋酸铅浓度设 7 组:对照组(0)、低浓度组(0.025、0.05 mg/L)、中浓度组(0.5、1.0 mg/L)和高浓度组(2.5、5.0 mg/L),每组设 3 个平行,每个平行随机取 27 只蟹,饲养 30 d。水温、投饵、充气等养殖条件与暂养时相同,每天定时换水 2 次,每次更换水体的 50%,并维持各组醋酸铅质量浓度。

1.3 试验方法

于试验后 0、1、3、5、7、10、15、30 d 随机抽取 3 只/缸蟹采集血样。用无菌注射器先吸取 ACD 抗凝剂^[10] 1 mL,再由蟹第三步足基关节处按 1:1 比例抽取血淋巴,充分混匀,5 000 r/min 冷冻离心 10 min,取上清液即为血清,−80 ℃冷

冻保存。30 d 采集血样后,分别将各组标本冰冻麻醉后置冰盘上解剖,取出肝胰腺、肌肉、卵巢、鳃,用预冷重蒸水(0~4 ℃)冲洗,滤纸吸干水分,−80 ℃保存。

超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性、丙二醛含量和酶液蛋白含量采用南京建成生化试剂盒及美国 BioTek Snergy HT 型酶标仪测定。样品中铅含量采用日本岛津 AA6300 型原子吸收分光光度计测定。

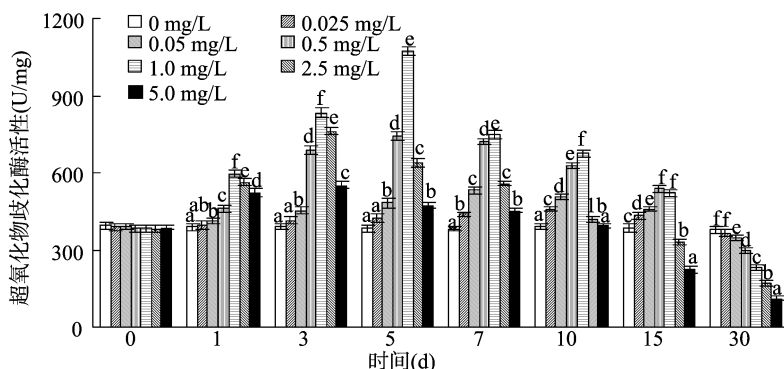
1.4 数据分析

所测数据采用 SPSS 16.0 软件进行统计分析,进行单因子方差分析(One-Way ANOVA),LSD 多重比较和 Duncan's 检验,显著水平设为 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果与分析

2.1 铅胁迫对日本蛎超氧化物歧化酶活性的影响

由图 1 可见,在铅胁迫下,各试验组超氧化物歧化酶活性均呈先增强后减弱趋势。胁迫 1 d 时,除 0.025 mg/L 组外,各试验组超氧化物歧化酶活性均受到显著诱导($P < 0.05$),其中以 1.0、2.5 mg/L 胁迫对超氧化物歧化酶活性的诱导效果较强。在低浓度组(0.025、0.05 mg/L),超氧化物歧化酶活性随胁迫时间延长而增强,分别于处理后 10 d 和 7 d 达到最高,随后呈减弱趋势。中浓度组(0.5、1.0 mg/L)和高浓度组(2.5、5.0 mg/L)超氧化物歧化酶活性最高值分别出现于处理后 5、3 d,其后持续减弱。至胁迫后 15 d,浓度 ≤ 1.0 mg/L 的试验组超氧化物歧化酶活性仍显著强于对照组,而高浓度组活性显著减弱。胁迫 30 d 时,除 0.025 mg/L 组外,各试验组超氧化物歧化酶活性均显著弱于对照组,且与铅胁迫质量浓度呈显著负相关($r = -0.932, P < 0.05$)。



图中不同小写字母表示同一天不同浓度试验组间差异显著 ($P < 0.05$)。下同

图1 铅胁迫对日本蛎超氧化物歧化酶活性的影响

2.2 铅胁迫对日本蛎过氧化氢酶活性的影响

胁迫 1 d 时,除 0.025 mg/L 组外,各试验组过氧化氢酶活性均显著强于对照组($P < 0.05$),胁迫质量浓度 ≥ 1.0 mg/L 各组增强幅度较大(图 2)。 ≥ 1.0 mg/L 各组过氧化氢酶活性于 5 d 时增至最强,随后持续减弱。而低浓度组(0.025、0.05 mg/L)对过氧化氢酶活性诱导较慢,最高值分别出现于胁迫后 10、7 d。胁迫 30 d 时,除 0.025 mg/L 组外,各试验组过氧化氢酶活性均显著弱于对照组,且与铅胁迫质量浓度呈显著负相关($r = -0.920, P < 0.05$)。

2.3 铅胁迫对日本蛎丙二醛含量的影响

如图 3 所示,除 0.025 mg/L 组丙二醛含量无显著变化外,各试验组丙二醛含量呈 2 种变化趋势:0.05、0.5、1.0 mg/L 组

丙二醛含量先增强后减弱再增强,而高浓度 2.5、5.0 mg/L 组丙二醛含量表现为持续上升。胁迫 1 d, ≥ 0.5 mg/L 组丙二醛含量显著高于对照组($P < 0.05$),以 1.0 mg/L 组上升幅度最大。0.05、0.5、1.0 mg/L 组丙二醛含量于胁迫 7 d 时有所下降,随后又持续上升。胁迫 15 d 时,除 0.025 mg/L 组外,各试验组丙二醛含量均显著高于对照组($P < 0.05$),且与铅胁迫质量浓度呈显著正相关($r = 0.918, P < 0.05$)。随着胁迫时间的延长,各试验组间丙二醛含量的差距逐渐增大,但组间规律未变。

2.4 铅胁迫对日本蛎组织蓄积量的影响

从表 1 可以看出,铅在日本蛎体内的积累以鳃最多,肝胰腺次之,而卵和肌肉即使在 5.0 mg/L 铅胁迫下仅有微量的蓄

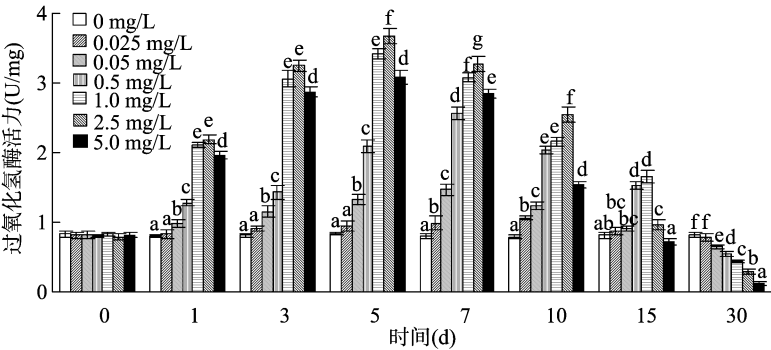


图2 铅胁迫对日本鲷过氧化氢酶活性的影响

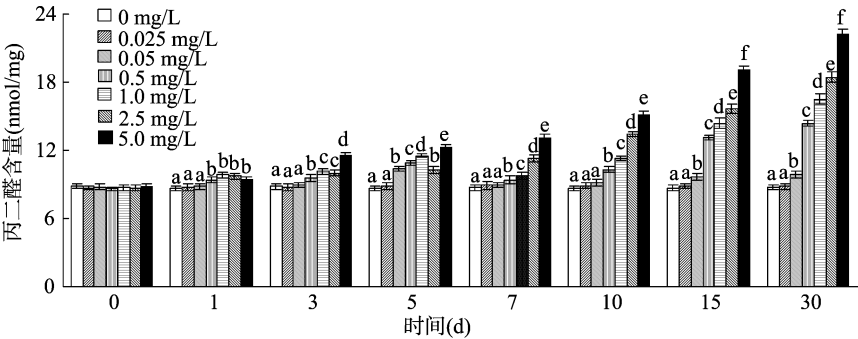


图3 铅胁迫对日本鲷丙二醛含量的影响

表 1 铅胁迫对日本鲷组织蓄积量的影响

铅质量浓度 (mg/L)	不同组织中的铅蓄积量(μg/g)			
	鳃	肝胰腺	肌肉	卵
0	0.93 ± 0.06c	0.49 ± 0.03b	0.19 ± 0.02a	0.14 ± 0.03a
0.025	1.08 ± 0.08c	0.55 ± 0.03b	0.20 ± 0.02a	0.18 ± 0.01a
0.050	1.15 ± 0.03c	0.65 ± 0.10b	0.21 ± 0.02a	0.23 ± 0.02a
0.500	1.26 ± 0.07c	0.84 ± 0.02b	0.25 ± 0.04a	0.26 ± 0.03a
1.000	1.63 ± 0.14c	1.05 ± 0.13b	0.29 ± 0.03a	0.34 ± 0.02a
2.500	2.49 ± 0.06c	1.93 ± 0.04b	0.32 ± 0.02a	0.39 ± 0.08a
5.000	5.41 ± 0.11c	3.36 ± 0.08b	0.38 ± 0.06a	0.47 ± 0.03a

注:同列数据后不同小写字母表示不同组织间铅蓄积量差异显著($P < 0.05$)。

积。对照组在未添加外源性铅胁迫的条件下,仍能检测出微量铅。鳃和肝胰腺中铅含量与胁迫浓度之间均存在显著的浓度效应($P < 0.05$)。

3 结论与讨论

3.1 铅胁迫对日本鲷免疫指标的影响

铅是一种不能降解且广泛存在的重金属污染物,其在生物体内的富集会严重损害机体的免疫防御系统,导致抗病力下降甚至死亡^[11-12]。当生物体受到铅等重金属污染物时,体内会产生大量的活性氧($O_2^{\cdot-}$),造成机体的氧化损伤如酶蛋白失活、DNA 断裂等^[13]。超氧化物歧化酶和过氧化氢酶是防御系统的关键酶,可联合清除活性氧自由基,防止过多的活性氧积存对机体造成氧化损伤^[14]。目前对抗氧化酶作为生物体氧化胁迫和损伤的标志物已进行了大量研究,但大多集中于铜、锌、镉等重金属^[15-16],而关于铅对海洋动物免疫相关酶影响的报道相对较少。任虹等研究发现 $5.0 \times 10^{-17} \sim 5.0 \times 10^{-10}$ mol/L 铅对扁玉螺(*Neverita didyma*) 过氧化氢酶有微弱的激活作用^[17]。王凡等报道铅胁迫下,牙鲆(*Parali-*

chthys olivaceus) 过氧化氢酶活性变化表现为先抑制后增强再抑制^[18]。张红霞等研究表明,铅胁迫 0.25 d 时,日本鲷血淋巴超氧化物歧化酶活性呈显著激活状态,随着胁迫时间的延长逐渐减弱,铅浓度 ≥ 2.5 mg/L 试验组 9 d 后超氧化物歧化酶活性均显著弱于对照组,但未检出过氧化氢酶活性^[6]。本试验结果表明,铅胁迫对日本鲷血清超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性呈现出明显的“短期诱导、长期抑制”的效应,且高浓度(≥ 2.5 mg/L) 铅的诱导作用在胁迫早期迅速出现,低浓度(≤ 0.05 mg/L) 铅的诱导则需要相对较长的暴露时间。铅胁迫 30 d,铅浓度 ≥ 0.05 mg/L 组 2 种酶活性均显著弱于对照组,表明铅的长期胁迫使日本鲷抗氧化能力下降。

丙二醛是机体内脂质过氧化反应的重要产物,可与蛋白质的游离氨基作用,引起蛋白质分子内与分子间交联而导致细胞损伤^[19]。Company 等研究发现,贻贝(*Bathymodiolus azoricus*) 暴露在 $0.9 \mu\text{mol/L}$ 镉溶液里 24 h 后,鳃中丙二醛含量显著升高^[15]。本试验中,铅浓度 ≤ 1.0 mg/L 组丙二醛含量先升后降再升,而高浓度胁迫组丙二醛含量持续上升,表明一定程度的铅胁迫可使日本鲷抗氧化能力提高,减少丙二醛

的产生,而低浓度铅长期胁迫或高浓度短期胁迫会破坏抗氧化系统,导致机体清除自由基能力降低,过多的活性氧使脂质过氧化程度加剧,丙二醛含量随之增加。

本研究中,铅胁迫 30 d 的日本蛭超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性均与铅胁迫质量浓度呈显著负相关,以前者相关系数较大,且过氧化氢酶活性对铅胁迫的响应比超氧化物歧化酶活性略有滞后,而胁迫 15 d 的丙二醛含量即与铅胁迫质量浓度呈显著正相关,可将日本蛭超氧化物歧化酶活性和丙二醛含量的长期变化作为铅污染的生物监测指标。

3.2 铅胁迫对日本蛭组织蓄积的影响

与铜、镉等重金属相比,铅更易被某些海洋生物所累积,成为当前威胁海洋食品安全的主要因素之一^[20]。本研究中的对照组在未添加外源性铅胁迫的条件下,仍检测出微量铅,其中鳃和肝胰腺中的铅含量超过或接近 GB 2762—2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》标准(0.5 mg/kg)。

赵元凤等将牙鲆暴露于铅环境中,其体内铅的蓄积量从多到少依次为内脏>鳃>肌肉^[21];而王凡等发现,经过铅胁迫处理后的栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)体内的铅蓄积量从多到少依次为鳃>内脏>肌肉^[22]。本试验中,铅在日本蛭体内的积累规律与栉孔扇贝一致。鳃作为呼吸器官,与水体直接接触,铅较易进入鳃上皮中,造成鳃中铅含量迅速上升;而肝胰腺为重要的消化腺,积极地进行营养物质的分解代谢,同时也较易蓄积外源性重金属。王兰等以体腔注射法对中华绒螯蟹(*Eriocheir siensis*)给予镉胁迫,1 周后镉主要积累在肝胰腺和鳃中,而卵巢与肌肉几乎没有积累。其所采用的体腔注射法,使鳃未与镉直接接触,所以试验结果中肝胰腺的镉含量多于鳃^[23]。本研究发现,即使在高浓度铅胁迫下,日本蛭卵和肌肉中仍仅有微量的蓄积,与前者报道规律相近。

从本试验结果综合来看,在 GB 11607—1989《国家渔业水质标准》上限水体(铅浓度 0.05 mg/L)中,日本蛭超氧化物歧化酶和过氧化氢酶活性明显减弱,且鳃和肝胰腺铅含量超过了 GB 2762—2012《食品安全国家标准 食品中污染物限量》标准,这在养殖生产及水产品食用安全中不容忽视。高浓度铅胁迫会造成日本蛭免疫酶活性大幅减弱,可能会导致养殖蟹的疾病暴发。可将日本蛭血清超氧化物歧化酶活性、丙二醛含量以及鳃、肝胰腺铅含量的长期变化作为铅污染的生物监测指标。

参考文献:

- [1] 王长友,王修林,李克强,等. 东海陆扰海域铜、铅、锌、镉重金属排海通量及海洋环境容量估算[J]. 海洋学报,2010,32(4): 62—76.
- [2] 杨晓云,温勇,陈晓燕,等. 重金属在北江鱼类和底栖动物体内的富集及污染评价[J]. 环境科学与技术,2010,33(6): 194—198.
- [3] Vijayavel K, Gopalakrishnan S, Thiagarajan R, et al. Immunotoxic effects of Nickel in the mud crab *Scylla serrata*[J]. Fish & Shellfish Immunology,2009,26(1): 133—139.

- [4] 张铄,刘毓谷. 毒理学[M]. 北京:北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社,1997:348—359.
- [5] 梁象秋,方纪祖,杨和荃. 水生生物学[M]. 北京:中国农业出版社,1996:360.
- [6] 张红霞,潘鲁青,刘静. 重金属离子对日本蛭血淋巴抗氧化酶(SOD、CAT、GPx)活性的影响[J]. 中国海洋大学学报:自然科学版,2006,36(增刊1):49—53.
- [7] 王春琳,丁爱侠. 硫酸铜蓄积对日本蛭体内保护酶系统的影响[J]. 大连水产学院学报,2005,20(4):278—282.
- [8] 苗利军,王静,李志芬. 秦皇岛海域海产品汞污染状况及安全性评价[J]. 湖北农业科学,2013,52(11):2547—2549.
- [9] 张才学,孙省利,陈春亮. 湛江港附近海域潮间带海水、沉积物和贝类体内的重金属[J]. 广东海洋大学学报,2011,31(1): 67—72.
- [10] 周凯,房文红,乔振国. 锯缘青蟹血细胞的形态及分类[J]. 中国水产科学,2006,13(2):211—216.
- [11] 江天久,牛涛. 重金属 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 胁迫对近江牡蛎(*Crassostrea rivularis*)SOD 活性影响研究[J]. 生态环境,2006,15(2):289—294.
- [12] 王凡,赵元凤,吕景才,等. 铅污染对牙鲆 GSH—PX 酶活性的影响[J]. 海洋水产研究,2008,29(1):20—23.
- [13] Winston G W. Oxidants and antioxidants in aquatic animals[J]. Comparative Biochemistry and Physiology,1991,100(1/2):173—176.
- [14] Halliwell B, Gutteridge J C. Free radicals in biology and medicine[M]. Oxford:Clarendon Press,1989.
- [15] Company R, Serafim A, Bebianno M J, et al. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus*[J]. Marine Environmental Research,2004,58(2/3/4/5):377—381.
- [16] 吴众望,潘鲁青,张红霞. 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏、鳃丝和血液 SOD 活性的影响[J]. 应用生态学报,2005,16(10): 1962—1966.
- [17] 任虹,杨洪,宁黔冀,等. 重金属对扁玉螺过氧化氢酶活性的影响研究[J]. 海洋科学,2000,24(2):54—55,41.
- [18] 王凡,赵元凤,吕景才,等. 铅对牙鲆过氧化氢酶活性的影响[J]. 湖北农业科学,2007,46(5):810—812.
- [19] Papadimitriou E, Loumbourdis N S. Exposure of the frog *Rana ridibunda* to copper: impact on two biomarkers, lipid peroxidation, and glutathione[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology,2002,69(6): 885—891.
- [20] 崔毅,陈碧鹃,宋云利,等. 胶州湾海水、海洋生物体中重金属含量的研究[J]. 应用生态学报,1997,8(6):650—654.
- [21] 赵元凤,吕景才,吴益春,等. 牙鲆对海水中铅积累排放规律研究[J]. 海洋学报,2004,26(3):109—114.
- [22] 王凡,赵元凤,吴益春,等. 栉孔扇贝对海水中 Pb 积累排放规律研究[J]. 水产养殖,2005,26(2):1—6.
- [23] 王兰,杨秀清,王茜,等. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响[J]. 动物学报,2001,47(增刊1): 96—100.