

邹立军,庄远红,龚婧,等.翘嘴鲌胚胎发育期间酸性和碱性磷酸酶活性的变化[J].江苏农业科学,2015,43(10):287-289.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.10.095

翘嘴鲌胚胎发育期间酸性和碱性磷酸酶活性的变化

邹立军,庄远红,龚婧,吉璐,黄美玲

(湖南第一师范学院基础生物学实验室,湖南长沙 410205)

摘要:酸性磷酸酶和碱性磷酸酶作为一种磷酸单酯水解酶,在蛋白(酶)的去磷酸化过程中起着非常重要的作用,研究发现磷酸酶是动物发育过程中物质代谢的重要调控酶。采用磷酸苯二钠比色法检测翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)胚胎发育期间酸性磷酸酶和碱性磷酸酶的活性变化。结果显示,胚胎受精后进行细胞分裂时的酸性和碱性磷酸酶活性较低,分别为 (0.436 ± 0.051) U/g 和 (0.061 ± 0.009) U/g,发育至囊胚期时酶活性均有微量下降;而从原肠胚时期开始,酸性和碱性磷酸酶的活性随胚胎发育的进行呈现上升趋势,在出膜时期达到最高,分别为 (1.076 ± 0.063) U/g 和 (0.335 ± 0.021) U/g,酶活性显著增强($P < 0.05$)。这一结果表明,翘嘴鲌胚胎在原肠胚期合成了磷酸酶,且磷酸酶在胚胎发育期间的细胞增殖、信号传导和物质代谢等方面可能发挥重要作用。

关键词:翘嘴鲌;胚胎发育;酸性磷酸酶;碱性磷酸酶

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)10-0287-03

酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)和碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, AKP)广泛存在于动物各种组织,是非特异性的磷酸单酯水解酶。它们分别在酸性和碱性条件下起催化作用,直接参与磷酸基团的转移与代谢,有众多的催化底物和复杂的生理学功能^[1]。其活性与生命活动密切相关,在蛋白(酶)的去磷酸化、调节跨膜运输及生物体内DNA、蛋白质和脂类等物质代谢中起着重要作用^[2,3]。

胚胎期是鱼类整个生活史中的一个重要时期,这个时期内鱼类依赖其母体提供的营养物质存活,出膜以后则实现了其形态、代谢和生理上的巨大变化,而作为物质代谢过程中的重要调控酶,ACP和AKP在鱼类的生长和发育过程中发挥了重要作用。迄今为止,关于水生生物发育过程中磷酸酶的活性变化及表达模式等已开展了相关研究^[4-7],而有关翘嘴鲌(*Siniperca chuatsi*)胚胎发育过程中磷酸酶活性变化的研究还

未见报道。本研究采用磷酸苯二钠比色法对翘嘴鲌胚胎发育期间ACP和AKP活性变化进行了定量研究,以期阐明这2种酶在翘嘴鲌发育早期的活性变化规律,进一步掌握翘嘴鲌胚胎发育过程中生理生化的动态变化,为翘嘴鲌的生物学研究积累原始数据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

考马斯亮蓝G-250、牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)、柠檬酸缓冲液、磷酸苯二钠、碳酸氢钠、氢氧化钠、4-氨基安替吡林、铁氰化钾、硼酸等试剂购于湖南汇虹生物公司。

1.2 主要设备

Nikon Eclipse E200生物显微镜,购于日本尼康公司;Biophotometer核酸蛋白测定仪和Centrifuge 5904离心机,购于德国Eppendorf公司;台式pH计,购于上海精科公司;岛津UV2401型紫外可见光分光光度计,购于日本岛津公司。

1.3 试验材料

用于繁殖的性成熟亲鱼健康无伤,来自湖南省益阳市水产养殖场。人工授精后,获取翘嘴鲌受精卵,随机分组,每组大约500粒,置于含曝气水的培养皿中。每组设3个平行,试

收稿日期:2014-10-10

项目基金:湖南省教育厅科学研究项目(编号:14C0252)。

作者简介:邹立军(1983—)男,湖南双峰人,硕士,讲师,主要从事动物发育过程中的信号传导机制研究。Tel: (0731) 82841012; E-mail: zouljun123@163.com。

[7] Hoffman G L, Lom J. Observations on *Tripartiella bursiformis*, *Trichodina nigra* and a pathogenic Trichodinid, *Trichodina fultoni* [J]. Journal of Wildlife Diseases, 1967, 3(4): 156-159.

[8] Martins M L, Marchiori N, Nunes G, et al. First record of *Trichodina heterodontata* (Ciliophora: Trichodinidae) from channel catfish, *Ictalurus punctatus* cultivated in Brazil [J]. Brazilian Journal of Biology, 2010, 70(3): 637-644.

[9] Lom J, Hoffman G L. Geographic distribution of some species of Trichodinids (Ciliata: Peritricha) parasitic on fishes [J]. J Parasitol, 1964, 50: 30-35.

[10] Klein B M. The "dry" silver method and its proper use [J]. J Protozool, 1958, 5(2): 99-103.

[11] Lom J. A contribution to the systematics and morphology of endoparasitic Trichodinids from amphibians, with a proposal of uniform specific characteristics [J]. J Protozool, 1958, 5(4): 251-263.

[12] Basson L, van As J G. *Trichodinid ectoparasites* (Ciliophora: Peritrichia) of freshwater fishes of the family Anabantidae from the Okavango River and Delta (Botswana) [J]. Folia Parasitologica, 2002, 49(3): 169-181.

[13] 胡银亨. 用CorelDraw标注工具测量显微标本[J]. 四川师范大学学报:自然科学版, 2011, 34(增刊1): 198-200.

[14] Hu Y H. Description of *Paratrichodina yangtzeus* sp. n. (Ciliophora: Trichodinidae) from the freshwater fishes in the Yangtze river, China [J]. Wiadomości Parazytologiczne, 2009, 55(1): 53-57.

验期间水温控制在 $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$,静水孵化,换水1次/h以保证溶氧充足。胚胎各发育阶段划分参照刘筠的胚胎发育观察方法^[8],即所有鱼卵必须半数以上达到某个时期才能确定为到达该时期。胚胎发育过程中,及时清除未受精卵和异常胚胎。对受精卵、桑椹胚期、囊胚期、原肠胚期、神经胚期、视泡出现期、肌肉效应期、心跳期、耳石出现期、出膜前期、出膜期共11个发育时期分别取样。

1.4 样品制备

每组分别取受精卵120粒,用滤纸吸干水分,在电子天平上称质量后置于干燥的离心管中,贮存于 -80°C 冰箱备用。制样时,按质量体积比1:4(g/mL)加入生理盐水,冰浴匀浆; 4°C 12 000 r/min离心10 min,取上清液,分装储存于冰箱 -20°C 保存待测,用于测定酶活性的样本在 4°C 下存放不超过1 h。

1.5 匀浆粗提液蛋白定量

酶液中可溶性蛋白含量测定采用Bradford(考马斯亮蓝)方法^[9],样本于595 nm下测定吸光度,以牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白。

1.6 ACP和AKP活性测定

ACP和AKP活性测定采用磷酸苯二钠比色法^[10],510 nm下测定吸光度。ACP和AKP活性测定缓冲液pH值分别为4.9和10。酶比活力单位的定义为: 37°C 下,反应体系中1 mg/min蛋白酶产生1 μg 酚所需的酶量作为1个酶活力单位(U)。

1.7 数据处理

采用Excel 2003和SPSS 13.0统计软件对数据进行统计分析,采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验组间差异显著性,以 $P < 0.05$ 作为显著性差异的标准。试验数据以平均值 \pm 标准差($\bar{x} \pm s, n = 11$)表示。

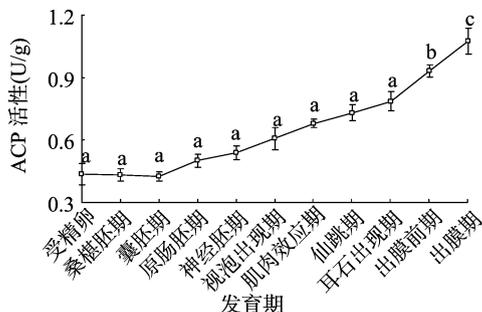
2 结果与分析

2.1 ACP活性变化

翘嘴鲮胚胎从受精卵发育至囊胚期,酶活性变化不显著($P > 0.05$),其中受精卵时期的酶活性为 (0.436 ± 0.051) U/g(图1);原肠胚期ACP活性开始增强,发育至出膜前期的时候,酶活性明显增强,数值为 (0.931 ± 0.030) U/g,与前面各发育时期相比差异显著($P < 0.05$)。出膜期的酶活性继续上升至 (1.076 ± 0.063) U/g,显著高于胚胎其余各个发育时期($P < 0.05$)。从受精卵发育开始至耳石出现期ACP活性的变化不明显($P > 0.05$);继续发育至出膜前期后ACP活性显著性升高($P < 0.05$);到出膜期,ACP活性已是受精卵时期酶活性的2.5倍。可见,翘嘴鲮胚胎从原肠胚发育开始ACP活性随着发育的进行而升高。

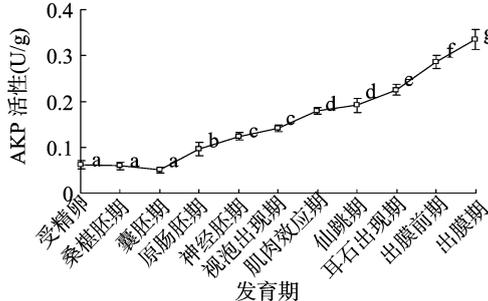
2.2 AKP活性变化

在受精卵阶段AKP活性较低,仅为 (0.061 ± 0.009) U/g(图2);胚胎继续发育至囊胚期,ACP维持一定活性且有微弱降低的趋势,但酶活性变化不显著($P > 0.05$),随着胚胎的进一步发育,AKP活性逐渐增高,原肠胚期AKP活性为 (0.096 ± 0.014) U/g,显著高于前面各发育时期($P < 0.05$);肌肉效应期的AKP活性为 (0.179 ± 0.008) U/g,显著高于原肠胚期($P < 0.05$);心跳期后AKP活性增加幅度更大。耳石出现期、出膜前期、出膜期的酶活性,与前面各发育时期相比,显著提高



图中所有数值均是以 $\bar{x} \pm s$ 表示($n = 11$)。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),图2同

图1 翘嘴鲮胚胎发育期间酸性磷酸酶活性变化



图中所有数值均是以 $\bar{x} \pm s$ 表示($n = 11$)。不同小写字母表示差异显著($P < 0.05$)

图2 翘嘴鲮胚胎发育期间碱性磷酸酶活性变化

($P < 0.05$);出膜期AKP活性达到 (0.335 ± 0.021) U/g,约为受精卵时期AKP活性的5.5倍。

3 讨论

3.1 翘嘴鲮胚胎发育期间ACP特性及活性变化

ACP定位于溶酶体和内膜系统,在酸性条件下催化磷酸单脂水解,在代谢调节、能量转化及信号转导上起重要作用,同时作为溶酶体标志酶,参与生物大分子消化、凋亡或坏死细胞的清除,在免疫功能和维持细胞的正常代谢活动方面发挥着重要作用^[11-13]。本研究发现,翘嘴鲮受精卵分裂开始时ACP活性为 (0.436 ± 0.051) U/g,发育至囊胚期时为 (0.425 ± 0.021) U/g,呈现微量下降的现象,但活性变化不显著($P > 0.05$),表明了受精卵在发育早期具有一定的ACP活性,但为受精卵中的母源性酶类,并非合子基因表达的产物;且胚胎早期细胞分裂对磷酸酶的需求无显著变化。贾玉东等研究发现,大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)繁殖期卵子中含有一定活性的ACP和AKP^[14],说明这2种酶来自母体,在胚胎发育过程中起重要作用。因此,受精卵中储存的相关酶或mRNA对胚胎发育的启动具有重要作用,进而为胚胎早期发育中细胞的快速增长及迁移提供保障^[15]。而翘嘴鲮胚胎发育到原肠期开始ACP活性为 (0.502 ± 0.031) U/g,与之前相比活性有了较大的提高,说明在原肠期合成了ACP,胚胎内酶基因表达开始逐渐增强,合成水解酶,为胚胎的继续发育提供了保证。朱俊华等研究瓯江彩鲤(*Diplodus sargus*)早期发育过程中的ACP活性时,也发现出膜期的酶活性显著增加^[16]。王书平等研究金鱼胚胎发育中ACP的变化也有类似发现^[7]。在本研究过程中翘嘴鲮胚胎在出膜前期已有少量的胚胎孵出,而在出膜期几乎所有胚胎均已孵出,这2个时期ACP活性分别为 (0.931 ± 0.030) U/g和 (1.076 ± 0.063) U/g,且酶

活性显著增强($P < 0.05$)。推测出膜以后的仔鱼可能由于失去了卵膜的保护而直接与外界环境接触,需要较高的 ACP 活性参与生理代谢调控和免疫防护有关,因此诱导了酸性酯酶活性大幅增加。

3.2 翘嘴鲮胚胎发育期间 AKP 特性及活性变化

AKP 是一类膜结合蛋白,在碱性条件下催化磷酸基团的移除,通过跨膜运输参与核酸、蛋白质与脂类物质代谢,从而调控细胞的增殖、凋亡和分化,在动物的早期发育时期发挥重要作用^[17-18]。本研究中,翘嘴鲮受精卵时期的 AKP 活性为(0.061 ± 0.009) U/g,且活力处于一个较低的水平,随着胚胎的发育,母源性 mRNA 的消耗,AKP 在桑椹胚期与囊胚期酶的活性呈下降趋势,但活性变化不显著($P > 0.05$)。而发育至原肠胚期的酶活性为(0.096 ± 0.014) U/g,较前面的发育时期有了显著增强($P < 0.05$);达到出膜期时,AKP 活性达到最高,且酶活性显著增加($P < 0.05$)。试验结果表明,AKP 活性呈现先减后增的变化可能是因为母源性酶的存在,且胚胎发育初期对 AKP 的需求量较低,而随着胚胎继续发育到达原肠胚时期,基因转录活动逐步增强,合子基因在发育过程中起调控作用,代谢酶活力上升以满足胚胎继续发育所需求的物质与能量,到出膜期时,胚胎向仔鱼进行转变,其生理机能各方面逐渐趋于完善需要大量 AKP 的参与,从而导致酶活性增强至最高。由此可见,原肠胚时期是由母型调控向合子型调控转变的关键时期,开始合成自身的 mRNA。有意思的是,在翘嘴鲮胚胎的整个发育过程中 AKP 活性的变化倍数明显高于 ACP,推测 AKP 可能大量参与了胚胎发育过程中的细胞分裂和组织分化。朱俊华等研究发现,瓯江彩鲤受精卵至孵化出仔鱼,AKP 活性持续显著增加,推测可能是伴随胚胎发育的进程,生理代谢中磷酸化/去磷酸化的调控增多,需要较多的 AKP 参与代谢调控,以满足胚胎发育的生理需求^[16]。关于 AKP 在鱼类发育中的基因表达及功能已有报道^[6,19],通过克隆牙鲆(*Paralichthys olivaceus*)的 AKP 基因,并检测了早期发育过程中该基因的分布及表达情况,表明该基因在牙鲆发育过程中具有时间表达的特异性。陈慕雁等研究发现,大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)仔稚鱼发育过程中 AKP 的活性在总体上保持持续增长的趋势^[20]。这些研究表明,鱼类在早期发育过程中,为了调控细胞增殖与分化、信号传递等过程及完善生物体机能,AKP 活性相应提高。

鱼类胚胎发育过程中 ACP 和 AKP 的作用较为复杂,其活性变化也受外源性激素、重金属元素和温度等多种因素影响,不同种间也存在一定的差异。本试验发现,翘嘴鲮胚胎从受精卵开始发育至囊胚期磷酸酶降至较低水平后,于原肠胚期有了较大的提高,说明在原肠胚期合成了磷酸酶,胚胎内酶基因开始表达并合成水解酶,随着胚胎的进一步发育,磷酸酶活性显著增强,这标志着翘嘴鲮由胚胎期向仔鱼期的转变及生理机能的完善。同时,研究发现受精卵时期的母源性 ACP 的活性要显著高于 AKP,因此推测 ACP 很可能参与了调控卵母细胞的成熟。这些工作为进一步确定磷酸酶在鱼类受精过程和胚胎发育中的功能提供了新的理论依据。

参考文献:

[1] Beck I M, van den Berghe W, Vermeulen L, et al. Crosstalk in inflam-

mation; the interplay of glucocorticoid receptor - based mechanisms and kinases and phosphatases[J]. Endocrine Reviews, 2009, 30(7): 830 - 882.

- [2] Bruce D L, Sapkota G P. Phosphatases in SMAD regulation[J]. FEBS Letters, 2012, 586(14): 1897 - 1905.
- [3] Barr F A, Elliott P R, Gruneberg U. Protein phosphatases and the regulation of mitosis[J]. Journal of Cell Science, 2011, 124(Pt 14): 2323 - 2334.
- [4] Kumano G N H, Zygotic Expression of the endoderm - specific alkaline phosphatase gene in embryos of the ascidian; *Halocynthia roretzi*[J]. Developmental Biology, 1998, 198(2): 245 - 252.
- [5] 孙虎山, 王宜艳, 梁建光, 等. 贻贝(*Mytilus edulis*)发育早期酸性和碱性磷酸酶活性[J]. 海洋与湖沼, 2008, 39(1): 42 - 48.
- [6] 陈晓武, 施志仪, 顾一峰. 牙鲆发育中 ALP 基因表达图式及功能分析[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2007, 37(6): 894 - 898.
- [7] 王书平, 孔祥会, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中磷酸酶活性的变化[J]. 水产科学, 2011, 30(7): 405 - 408.
- [8] 刘 筠. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社, 1993: 81 - 93.
- [9] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein - dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(72): 248 - 254.
- [10] 王继贵, 邓宝爱, 周衍权, 等. 临床生化检验[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1996: 391 - 400.
- [11] 刘志鸿, 牟海津, 王清印. 软体动物免疫相关酶研究进展[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(3): 86 - 90.
- [12] Pipe R K. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*[J]. The Histochemical Journal, 1990, 22(11): 595 - 603.
- [13] Kong X, Wang S, Jiang H, et al. Responses of acid/alkaline phosphatase, lysozyme, and catalase activities and lipid peroxidation to mercury exposure during the embryonic development of goldfish *Carassius auratus*[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 120/121: 119 - 125.
- [14] 贾玉东, 孟 振, 刘新富, 等. 大菱鲆(*Scophthalmus maximus*)繁殖期卵子和卵巢液中磷酸酶活性变化及其与受精率相关性[J]. 海洋与湖沼, 2013, 44(6): 1530 - 1535.
- [15] Briggs R, Cassens G. Accumulation in the oocyte nucleus of a gene product essential for embryonic development beyond gastrulation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1966, 55(5): 1103 - 1109.
- [16] 朱俊华, 姚俊杰, 冯亚楠, 等. 瓯江彩鲤早期发育过程中磷酸酶活性及间甲酚对其活性的影响[J]. 水产科学, 2014, 33(2): 92 - 96.
- [17] Ali A T, Penny C B, Paiker J E, et al. Alkaline phosphatase is involved in the control of adipogenesis in the murine preadipocyte cell line, 3T3 - L1[J]. Chimica Acta, 2005, 354(1/2): 101 - 109.
- [18] Low M G, Saltiel A R. Structural and functional roles of glycosyl - phosphatidylinositol in membranes[J]. Science, 1988, 239(4837): 268 - 275.
- [19] Shi Z Y, Chen X W, Gu Y F. Cloning and expression pattern of alkaline phosphatase during the development of *Paralichthys olivaceus*[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37(3): 411 - 424.
- [20] 陈慕雁, 张秀梅, 连建华. 大菱鲆仔稚鱼期消化酶及碱性磷酸酶活性的变化[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2005, 35(3): 483 - 486.