

史东杰,梁拥军,饶青,等. 锦鲤胚胎发育过程中几种代谢酶活性及丙二醛含量的变化[J]. 江苏农业科学,2017,45(11):120-122.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.11.033

# 锦鲤胚胎发育过程中几种代谢酶活性 及丙二醛含量的变化

史东杰<sup>1</sup>, 梁拥军<sup>1</sup>, 饶青<sup>2</sup>, 朱莉飞<sup>1</sup>, 张升利<sup>1</sup>

(1. 北京市水产科学研究所暨国家淡水渔业工程技术研究中心/农业部都市农业(北方)重点实验室/渔业生物技术北京市重点实验室,北京 100068; 2. 天津农学院,天津 300384)

**摘要:**以锦鲤胚胎为研究对象,分别在受精初期、卵裂期、囊胚期、原肠期、胚体及器官形成期、出膜前期取样,测定鱼卵受精初期及胚胎发育不同时期超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性及丙二醛含量。结果显示,锦鲤鱼卵受精初期超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性及丙二醛含量均较低,随着胚胎发育,酶活性及丙二醛含量均呈现上升趋势。当发育至原肠期时,酶活性及丙二醛含量均显著升高( $P < 0.05$ );当胚胎发育至出膜前期时,酶活性及丙二醛含量继续上升,且显著高于以前各时期( $P < 0.05$ )。此时期,超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)活性及丙二醛(MDA)含量分别为受精初期的 1.78、3.62、23.41、1.92 倍。

**关键词:**超氧化物歧化酶;磷酸酶;丙二醛;胚胎发育;锦鲤

**中图分类号:** S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)11-0120-03

鱼类在壳内的发育阶段称为胚胎发育,该阶段是鱼类个体发育最为关键的时期。在鱼类早期发育生物学中,通常将鱼类的胚胎发育分为受精期、卵裂期、囊胚期、原肠期、胚体及器官形成期、出膜前期等多个时期。鱼类的细胞分化和组织、

器官发育等均在胚胎发育过程中开始发生,因此鱼类胚胎发育过程中生理代谢十分活跃<sup>[1]</sup>。同时,整个胚胎发育过程中只有卵壳的保护,易受到外界环境的破坏,因此需要较强的抗菌和免疫能力。酶是机体活细胞产生的一种生物催化剂,生命活动中的各类代谢化学反应、免疫反应均为酶促反应,因而特定酶的催化能力代表了机体特定动能的发育情况。超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的抗氧化酶,是机体清除超氧阴离子自由基的首要物质,它可对抗和阻断因氧自由基对细胞造成的损害,并可及时修复和保护细胞。酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(AKP)是非特异性磷酸单酯水解酶,分别在酸性和碱性环境下起催化作用,在动物 DNA、RNA、蛋白质、脂类及机体免疫等代谢过程中起着重要的调控作用。丙二醛(MDA)含量通常被认为可反映机体脂质过氧化程度的指标,并具有毒性。因此,SOD、ACP、AKP 这 3 种酶活性及 MDA 含

收稿日期:2016-02-16

基金项目:现代农业产业技术体系北京市观赏鱼创新团队建设专项(编号:GSY20160201);北京淡水鱼种质资源保存(编号:KJXC20140112);北京市农林科学院观赏鱼与热水性名优鱼类创新团队(编号:BJRKYGSYTD2016)。

作者简介:史东杰(1985—),女,北京人,工程师,主要从事观赏鱼繁育及养殖技术研究。Tel:(010)61786845;E-mail:sdj19850104@163.com。

通信作者:梁拥军,研究员,主要从事观赏鱼繁育及养殖技术研究。Tel:(010)61786845;E-mail:liangyongjun@hotmail.com。

[10] Marsden A, Morris T R. Quantitative review of the effects of environmental temperature on food intake, egg output and energy balance in laying pullets[J]. British Poultry Science, 1987, 28(4): 693-704.

[11] Sahin K, Sahin N, Onderci M. Vitamin E supplementation can alleviate negative effects of heat stress on egg production, egg quality, digestibility of nutrients and egg yolk mineral concentrations of Japanese quails[J]. Research in Veterinary Science, 2002, 73(3): 307-312.

[12] Sahin N, Tuzcu M, Orhan C, et al. The effects of vitamin C and E supplementation on heat shock protein 70 response of ovary and brain in heat-stressed quail[J]. British Poultry Science, 2009, 50(2): 259-265.

[13] 盛清凯, 刘华阳, 赵红波, 等. 维生素 C 对应激蛋鸡血液生化指标的影响[J]. 饲料研究, 2007(1): 40-42.

[14] DHALIWAL A S, NAGRA S S. Effect of vitamin C and E on the laying performance of Japanese quails during heat stress[J]. Indian

Journal of Animal Nutrition, 2007, 24(2): 116-119.

[15] Jahanian R, Mirfendereski E. Effect of high stocking density on performance, egg quality, and plasma and yolk antioxidant capacity in laying hens supplemented with organic Chromium and vitamin C[J]. Livestock Science, 2015, 177: 117-124.

[16] 赵梦莹, 刘雪, 张领先, 等. 鸡蛋货架期的研究进展与展望[J]. 食品工业科技, 2013, 34(5): 376-379.

[17] 安婷婷, 辛世杰, 戴国俊, 等. 日粮中添加迷迭香对高温季节不同存放时间鸡蛋品质及其抗氧化性的影响[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2017, 38(1): 35-39.

[18] 沈国春, 史延平, 罗永成, 等. 论血液生化指标作为家禽育种参数的作用[J]. 辽东学院学报(自然科学版), 2005(12): 9-12.

[19] 赵聘, 赵云焕. 复合抗热应激添加剂对蛋鸡血液生化指标的影响[J]. 河南农业科学, 2005(2): 70-73.

[20] 鲁海军. 蛋氨酸羧基类似物和甜菜碱对肉鸡生产性能及在热应激下对血液指标的影响[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2005.

量的变化可以反映动物机体生理生态变化、免疫机能及健康状况<sup>[2-5]</sup>。本研究以锦鲤(*Cyprinus carpio* L.)为研究对象,旨在通过研究锦鲤胚胎发育过程中 SOD、ACP、AKP 这 3 种酶活性及 MDA 含量的变化规律,探讨鱼类胚胎发育过程和代谢调控机理。

## 1 材料与方法

### 1.1 受精卵采集

通过人工催产、干法受精,获得受精卵,随机分为 3 组,约 1 000 粒/组,置于含有 500 mL 试验用水的培养皿(直径 20 cm,高 3 cm)中孵化。鱼卵刚受精时立即取样,然后用显微镜连续观察受精卵,在以下各取样点进行取样,取样点分别为:受精初期、卵裂期、囊胚期、原肠期、胚体及器官形成期、出膜前期,每个取样点采集鱼卵或胚胎约 100 粒(个)/皿,用滤纸吸干水,置于离心管中,−80 ℃ 保存待测。试验用水为经过曝气的自来水,水温为  $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ ,pH 值 7.4,溶解氧  $\geq 5 \text{ mg/L}$ ,每 24 h 换水约 1/2。胚胎发育过程中,及时清除未受精卵、死卵及异常发育的胚胎。

### 1.2 样品制备与测定

样品制备参照孔祥会等的方法<sup>[6]</sup>进行。粗提液蛋白定量参照 Bradford 的测定方法<sup>[7]</sup>进行,标准蛋白为牛血清白蛋白(BSA,购于 AMRESCO 公司)。超氧化物歧化酶(SOD)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)的活性及丙二醛(MDA)的含量,均采用北京澳联雅实验设备中心的试剂盒进行,具体测定方法参照试剂盒说明书。

### 1.3 数据统计与分析

试验数据用平均值  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )( $n = 6, 3$  个平行,2 个重复)表示。采用 SPSS 17.0 软件进行数据统计和分析,用多重比较法进行组间差异显著性分析,显著水平为 0.05。

## 2 结果与分析

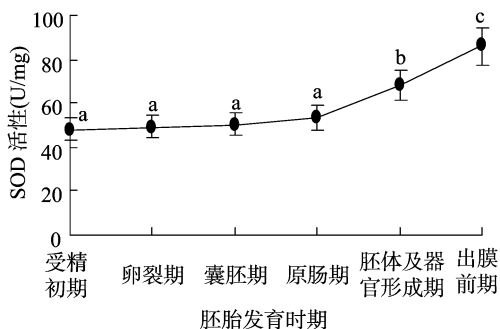
在显微镜下观察,水温为  $(18 \pm 1)^\circ\text{C}$ 、pH 值为 7.4、DO(溶氧量)  $\geq 5 \text{ mg/L}$  等的条件下,受精卵在受精 192 min 发育至 16 胞期,305 min 发育至囊胚晚期,1 263 min 发育至原肠晚期,2 418 min 发育至心跳形成期,3 512 min 发育至出膜前期。试验过程中,各取样点涵盖了胚胎发育从受精至刚孵化出仔鱼整个过程。

### 2.1 超氧化物歧化酶活性的变化

由图 1 可知,锦鲤胚胎发育过程中 SOD 活性变化呈现出上升的趋势。在受精初期,SOD 的活性最低,为  $(48.252 \pm 2.43) \text{ U/mg}$ ;发育至囊胚期、原肠期时分别为  $(50.309 \pm 2.14)$ 、 $(53.251 \pm 2.32) \text{ U/mg}$ ,差异不显著( $P > 0.05$ );由原肠期经胚体及器官形成期,至出膜前期 SOD 活性显著上升( $P < 0.05$ ),在出膜前期达到最高,为  $(85.981 \pm 3.25) \text{ U/mg}$ ,为受精初期的 1.78 倍。

### 2.2 酸性磷酸酶、碱性磷酸酶的活性变化

由图 2 可知,锦鲤胚胎发育过程中 ACP、AKP 活性的变化均呈现出上升趋势,并具有协同性。在受精初期,ACP、AKP 的活性最低,分别为  $(1.158 \pm 0.024)$ 、 $(0.026 \pm 0.013) \text{ U/g}$ ;当发育至原肠期时,酶活性明显增强,分别为  $(2.679 \pm 0.031)$ 、 $(0.042 \pm 0.005) \text{ U/g}$ ,与之前各时期相比差异显著



同一组内不同字母表示各时期差异显著( $P < 0.05$ ),字母相同表示差异不显著( $P > 0.05$ )。下同

图1 锦鲤胚胎发育过程中超氧化物歧化酶活性的变化

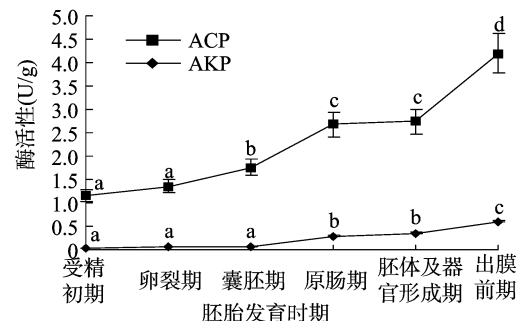


图2 锦鲤胚胎发育过程中酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性的变化

( $P < 0.05$ );当发育至胚体及器官形成期时,ACP、AKP 的活性分别上升至  $(2.738 \pm 0.025)$ 、 $(0.048 \pm 0.008) \text{ U/g}$ ,但与原肠期相比差异不显著( $P > 0.05$ );当发育至出膜前期时,酶活性继续上升,且显著高于以前各个时期( $P < 0.05$ ),此时期 ACP、AKP 的活性分别为受精初期的 3.62、23.41 倍。

### 2.3 丙二醛含量的变化

由图 3 可知,锦鲤胚胎发育过程中 MDA 的含量呈现出逐渐增多的趋势。受精初期 MDA 含量最低,为  $(8.023 \pm 0.42) \text{ nmol/mg}$ ,从受精初期发育至卵裂期、囊胚期 MDA 含量无显著性变化( $P > 0.05$ );当发育至原肠期时 MDA 含量为  $(10.295 \pm 0.56) \text{ nmol/mg}$ ,显著增多( $P < 0.05$ );当发育至出膜前期时,MDA 含量继续上升至  $(15.436 \pm 0.81) \text{ nmol/mg}$ ,且显著高于以前各个时期( $P < 0.05$ ),为受精初期的 1.92 倍。

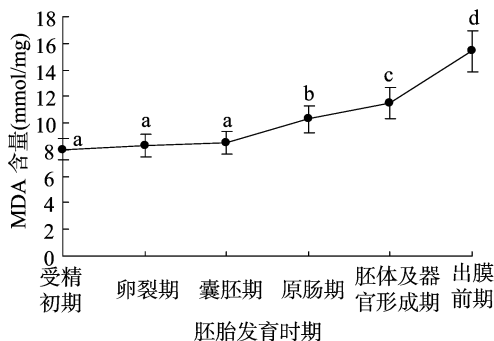


图3 锦鲤胚胎发育过程中 MDA 含量的变化

## 3 讨论

胚胎发育过程中各种酶的作用极为复杂,其活性变化也

受到多种因子的影响,尤其是胚胎发育后期要经历神经管、脊索、肌节、尾芽、心脏等的形成。同时,胚胎运动、胚胎孵化等均需要大量的生理代谢和信息传导。在本研究中,超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性在锦鲤胚胎发育过程中持续协同增加,主要是满足胚胎发育的需要。

Swain 等认为鱼类主要通过卵子母源性抗体传递给子代<sup>[8-9]</sup>。并有研究显示,生命早期发育过程中免疫力也可由自身的合子基因表达<sup>[10]</sup>。熊铎龙等在研究普安银鲫(*Carassius auratus*)胚胎发育中,抗氧化酶活性变化时,发现在普安银鲫早期发育中,超氧化物歧化酶在成熟卵子中就具有活性,说明普安银鲫胚胎发育中超氧化物歧化酶是由母体传递而来,并非胚胎合子基因的合成<sup>[11]</sup>。Kumano 等对海鞘(*Halocynthia roretzi*)胚胎中碱性磷酸酶活性的研究显示,胚胎中虽然含有少量母源性碱性磷酸酶,但是在胚胎内胚层发育时碱性磷酸酶主要来源于碱性磷酸酶基因的表达<sup>[12]</sup>。在本研究中,首次取样点为受精初期,即在鱼卵刚受精时立即取样,可见样品中应含有受精卵和成熟卵子,通过生化测定超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶均具有活性,因为刚受精立即取样,胚胎合子基因还未进行充分的表达、合成,所以初步判断锦鲤胚胎发育过程中超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶可由母体带来,属于母源性酶类。随着锦鲤胚胎的持续发育,以上 3 种酶活性逐渐增加,这种变化趋势与王书平等对金鱼(*Carassius auratus*)胚胎<sup>[13]</sup>、孔祥会等对金鱼胚胎<sup>[14]</sup>、熊铎龙等对普安银鲫的研究<sup>[11]</sup>基本相似。在本研究中,以胚胎发育至原肠期为节点,除超氧化物歧化酶外,其余 2 种酶活性均显著上升( $P < 0.05$ ),是否有合子基因开始表达,还有待进一步研究。当胚胎发育至出膜前期时,酶活性继续上升,且显著高于以前各个时期( $P < 0.05$ ),此时期超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性分别为受精初期的 1.78、3.62、23.41 倍,这时可能是有合子基因表达参与代谢的结果。因为在胚胎发育至出膜前期时,卵黄囊中贮存的蛋白质、脂质等营养物质已经基本耗尽,这时酶活性的增强可能是由于合子基因表达的结果。

在本研究中,锦鲤鱼卵受精初期丙二醛含量最低,说明抗氧化能力较强。但是,随着胚胎发育,丙二醛含量逐渐增多,说明胚胎发育过程中持续发生一定的氧化应激反应。当胚胎发育至原肠期时,丙二醛含量显著增多( $P < 0.05$ ),为激烈的氧化应激反应所致,此时应为胚胎免疫力和抗氧化能力较弱的时期,此时期一定要增强胚胎管理,才可提高胚胎孵化率和成活率。当发育至出膜前期时,卵黄囊内的营养物质基本耗尽,机体需要更为旺盛的生理代谢来满足发育的需要,此时期应为产生活性氧自由基最多的时期,同时出膜过程中仔鱼与水体直接接触,水体环境因子也可刺激其产生一定的氧化应激反应,从而导致丙二醛含量上升,这就可以解释本研究所产生的结果。这与熊铎龙等对普安银鲫胚胎<sup>[11]</sup>、Elena - Díaz 等对鲟鱼(*Acipenser sturio* Linnaeus)胚胎的研究结果<sup>[15]</sup>一致。同时,说明出膜期为受精卵孵化又一关键时期,在此时期一定要强化管理,避免胚胎受到各种因素的干扰,同时要保持适宜的水质条件,以保持胚胎正常的发育进程,切不可延长孵化时间。

## 4 结论

本研究显示,在锦鲤胚胎发育过程中超氧化物歧化酶、酸性磷酸酶、碱性磷酸酶活性逐渐升高,说明锦鲤胚胎生理代谢逐渐旺盛,信息传导增多,酶活性持续协同增加,主要是满足胚胎发育的需要。丙二醛含量逐渐增多,说明胚胎发育过程中持续发生一定的氧化应激反应。当胚胎发育至原肠期、出膜前期时,丙二醛含量均显著上升,所以这 2 个时期是胚胎发育免疫能力较弱的时期,一定要强化管理,避免胚胎受到各种因素的干扰。

## 参考文献:

- [1]何滔. 条石鲷早期发育及相关酶活性的研究[D]. 北京:中国科学院研究生院中国科学院大学,2011:93-94.
- [2]Dimitrova M T, Tishinova V, Velchava V. Combined effect of zinc and lead on the hepatic superoxide dismutase - catalase system in carp (*Cyprinus carpio*) [J]. Comp Biochem Physiol, 1994, 108 (94): 43-46.
- [3]闫海燕, 曾令兵, 罗宇良, 等. 氰戊菊酯对鲤 SOD 活性和 MDA 含量以及肝肾细胞形态的影响[J]. 华中农业大学学报, 2012, 31 (4): 499-505.
- [4]刘丽平, 薛晖, 葛筱琴, 等. 复方中草药对青虾肌肉和肝胰脏中几种非特异性免疫因子的影响[J]. 淡水渔业, 2007, 37 (6): 11-14.
- [5]王卓, 么宗利, 林听听, 等. 碳酸盐碱度对青海湖裸鲤幼鱼肝和肾 SOD、ACP 和 AKP 酶活性的影响[J]. 中国水产科学, 2013, 20 (6): 1212-1218.
- [6]孔祥会, 王书平, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中免疫相关酶活性及丙二醛含量的变化[J]. 中国水产科学, 2011, 18 (6): 1293-1298.
- [7]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: 248-254.
- [8]Swain P, Nayak S K. Role of maternally derived immunity in fish[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2009, 27 (2): 89-99.
- [9]李彩娟, 许郑超, 张振早, 等. 赤眼鲟仔鱼饥饿试验和不可逆点研究[J]. 扬州大学学报(农业与生命科学版), 2016, 37 (3): 65-70.
- [10]赖德 C C, 泰勒 C B. 生物学研究概说(同工酶)[M]. 北京: 科学技术出版社, 1987: 35-54.
- [11]熊铎龙, 姚俊杰, 安苗, 等. 普安银鲫胚胎发育中抗氧化酶活性及外源维生素 C 的作用[J]. 水产科学, 2014 (10): 631-634.
- [12]Kumano G, Nishida H. Maternal and zygotic expression of the endoderm - specific alkaline phosphatase gene in embryos of the ascidian, *Halocynthia roretzi* [J]. Developmental Biology, 1998, 198 (2): 245-252.
- [13]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.
- [14]孔祥会, 王书平, 江红霞, 等. 金鱼胚胎发育过程中免疫相关酶活性及丙二醛含量的变化[J]. 中国水产科学, 2011, 18 (6): 1293-1298.
- [15]Elena - Díaz M, Furne M, Trenzado C E, et al. Antioxidant defences in the first life phases of the sturgeon *Acipenser naccarii* [J]. Aquaculture, 2010, 307 (1/2): 123-129.