

仲崇虎,王梦杰,魏 星,等. 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾抗氧化酶活性的影响[J]. 江苏农业科学,2019,47(15):205–207.
doi:10.15889/j.issn.1002–1302.2019.15.048

磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾抗氧化酶活性的影响

仲崇虎^{1,4}, 王梦杰^{1,4}, 魏 星^{1,4}, 高 煊^{1,4}, 王怀忠², 王海华³, 陈建华^{1,4}

(1. 淮海工学院海洋生命与水产学学院/江苏省海洋生物技术重点实验室, 江苏连云港 222005; 2. 连云港忠玉水产有限公司, 江苏连云港 222100;
3. 江西省水产科学研究所, 江西南昌 330039; 4. 江苏省农业种质资源保护与利用平台, 江苏南京 210014)

摘要:研究不同浓度磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SM2)对脊尾白虾谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量的影响。结果表明,低浓度组(158、500 $\mu\text{g/L}$) CAT 和 GSH-Px 活性先上升后下降;高浓度组(1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$)在 15 d 时被显著抑制。500 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 SOD 活性在 3 d 时显著诱导(3.58 倍);1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组在 3 d 时被显著诱导(2.68、3.22 倍),在 15 d 时被显著抑制。低浓度组(50、158、500 $\mu\text{g/L}$) MDA 含量随暴露时间延长而增加;1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组表现为先上升后下降的变化趋势且均在 3 d 时达到最大值(3.77、3.96 倍)。提示 GSH-Px、CAT、SOD 活性和 MDA 含量对磺胺二甲嘧啶敏感,均可作为磺胺二甲嘧啶暴露的生物标记物。

关键词:脊尾白虾;磺胺二甲嘧啶;SOD;CAT;GSH-Px;MDA

中图分类号: S917 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002–1302(2019)15–0205–03

目前,在水产养殖业向规模化、集约化快速发展的背景下,水产动物病害频繁暴发,导致各种抗生素在水产养殖领域被广泛使用。由于磺胺类抗生素疗效良好、性质稳定、价格低廉等优点,在畜牧和水产养殖的疾病控制中起着不可替代的作用。研究发现,约 60%~90% 磺胺类抗生素会随动物粪便排出体外,通过雨水冲刷进入水体^[1]。在饮用水、污水及地表水抗生素检测中,磺胺类药物的检出率最高^[2],在不同水环境中检出的磺胺类抗生素质量浓度范围一般为 $\text{ng/L} \sim \text{mg/L}$ 水平,如磺胺类抗生素在丹麦垃圾填埋厂淋滤液中检出的质量浓度高达 0.04~6.47 mg/L ^[3]。大量磺胺类抗生素不断排入环境,对生态环境和人类健康均会造成严重危害^[4]。人类在长期受磺胺类抗生素药物污染影响后,也会产生排尿和造血紊乱等问题^[5]。目前,关于环境中磺胺类抗生素的研究主要集中于药物残留检测,而对其在环境中尤其是水环境中的潜在影响研究已逐渐在斑马鱼^[2]、罗非鱼^[6]等鱼类中开展,但

虾蟹类的相关报道较少,缺乏系统的生态毒理学研究,因此有必要开展磺胺类抗生素对虾蟹类毒性作用的研究。

脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*),俗称小白虾,是我国沿海重要的经济虾类之一。脊尾白虾具有环境适应性广(广温、广盐和广食)、繁殖周期短(3~4 个月可繁殖 1 代)、生长速度快(1 年内可多茬养殖)等优点^[7],且脊尾白虾能在室内通过控温促使其繁育不受季节影响,其他甲壳动物 1 年只能繁殖 1 代,相对于三疣梭子蟹可在较短时间内获得不同发育时期的试验材料。因此,脊尾白虾是一种理想的测试生物体,可用于监测和评价海洋水体环境和质量变化及水体污染状况。本研究的脊尾白虾在磺胺二甲嘧啶(sulfadimidine, SM2)暴露胁迫下,观察体内谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)、过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)等酶活性变化及其体内丙二醛(MDA)含量的变化,评价 GSH-Px、CAT、SOD 活性和 MDA 含量作为磺胺二甲嘧啶暴露的生物标志物的适用性,为抗生素对虾类的早期损伤和应急反应筛选出有效的生物标志物。

1 材料与方法

1.1 试验材料

脊尾白虾取自江苏省连云港市忠玉水产养殖场,虾体长(5.34 \pm 0.15) cm,体质量(2.97 \pm 0.13) g。本试验于 2017 年 3 月中旬至 4 月中旬于淮海工学院江苏省海洋生物技术重点实验室进行。试验前选择健康的脊尾白虾放入室内水族箱

境的影响[J]. 饲料研究,2009,2(2):64–67.

[26] 曲 艺,吴志新,杨 丽,等. 饲料中添加芽孢杆菌对草鱼表观消化率及消化酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报,2012,31(1):106–111.

[27] 陈鹏飞,谭 斌. 芽孢杆菌对苗王云鲫淀粉酶活性的影响[C]//三峡地区特色渔业发展论坛,2012:287–292.

[28] 祝 小,耿秀蓉,潘康成,等. 枯草芽孢杆菌 Pab02 产纤维素酶活性的研究[J]. 饲料研究,2007,1(1):61–63.

[29] 宋晓兵. 肉桂醛对肺癌细胞 A549 具有体外抑制作用[J]. 中国卫生标准管理,2014,5(6):30–32.

[30] 梁靖涵,张其中,付耀武,等. 肉桂活性成分肉桂醛杀灭离体多子小瓜虫效果[J]. 水产学报,2014,38(3):457–463.

中驯养 7 d 以上,驯养期间,每日换水 1 次,并在自然死亡率低于 2% 的情况下选择身体健康、大小一致的脊尾白虾进行试验。

抗生素磺胺二甲嘧啶购于 Sigma - Aldrich 公司 (St. Louis, MO, 美国),纯度 $\geq 99\%$; 助溶剂为 0.1 mol/L NaOH。

1.2 毒性试验

对脊尾白虾幼体进行静水养殖,按等对数间距设置 5 个磺胺二甲嘧啶浓度,分别为 50、158、500、1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 和空白对照组,试验容器为 10 L 容量的聚乙烯塑料箱,每组溶液放置 20 尾脊尾白虾和 7 L 海水且每个浓度设置 3 个重复,期间保持不间断充气。在培养期间 1、3、7、15 d 时分别取 3 尾虾,解剖后取肝胰腺置于离心管中,做好标记并在 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中冷冻保存。

1.3 组织匀浆制备

将各时期取样的肝胰腺在冰浴中与 0.86% 生理盐水用玻璃匀浆器制成 10% 匀浆, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 10 000 r/min 离心 15 min, 取上清液用于测定蛋白含量及各种酶活性。

1.4 蛋白含量及酶活性测定

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒并按说明书测定组织蛋白含量及各种酶活性。

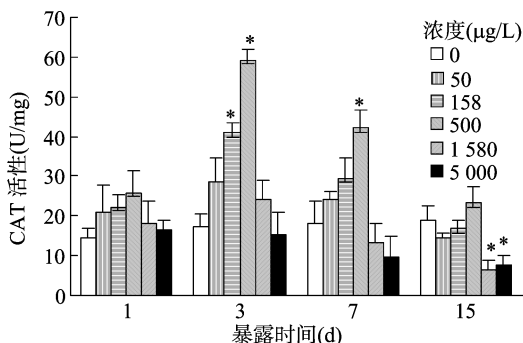
1.5 数据处理

酶活性采用平均数 \pm 标准偏差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 统计软件进行数据分析,用方差分析 (A - NOVA) 法分析试验组与对照组之间的差异,并用 Student - Newman - Keul's 检验法分析组间显著性, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 CAT 活性影响

不同浓度磺胺二甲嘧啶暴露对脊尾白虾肝胰腺 CAT 活性的影响见图 1。暴露于 158、500 $\mu\text{g/L}$ 磺胺二甲嘧啶的脊尾白虾,其 CAT 活性随暴露时间延长表现为先增加后下降的趋势,且在 3 d 时受显著诱导后达到最高值,分别为对照组的 2.36、3.41 倍,随后逐渐下降。5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组则表现为 CAT 活性随暴露时间的增加而下降,且在 15 d 时被显著抑制。1 580 $\mu\text{g/L}$ 浓度磺胺二甲嘧啶浓度组脊尾白虾肝胰腺 CAT 活性也在 15 d 时被显著抑制。50 $\mu\text{g/L}$ 浓度组表现为 CAT 活性与对照组无明显差异。



柱上 * 表示差异显著 ($P < 0.05$)。下图同
图1 不同浓度磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 CAT 活性的影响

2.2 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 SOD 活性影响

暴露于不同浓度磺胺二甲嘧啶 1、3、7、15 d 后,脊尾白虾

肝胰腺 SOD 活性变化见图 2。50、158 $\mu\text{g/L}$ 浓度组脊尾白虾 SOD 活性在 1 d 时被显著诱导且达最高值,随后整体逐渐下降。500 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 SOD 活性在 3 d 时显著上升,为对照组的 3.58 倍,随后下降。1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组在 3 d 时 SOD 活性被显著诱导且达最高值,分别为对照组的 2.68、3.22 倍,随后逐渐下降且在 15 d 时被显著抑制。

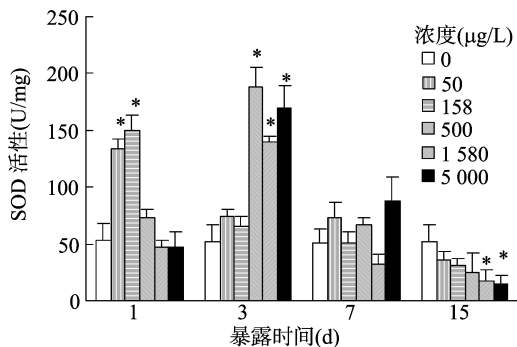


图2 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 SOD 活性的影响

2.3 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 GSH-PX 活性的影响

在不同浓度磺胺二甲嘧啶暴露条件下,脊尾白虾肝胰腺 GSH-PX 活性变化如图 3 所示。暴露于 50、158、500 $\mu\text{g/L}$ 磺胺二甲嘧啶浓度组的脊尾白虾 GSH-PX 活性先上升后下降,且在 3 d 时达到最高值,分别为对照组的 3.05、3.43、3.65 倍。1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 GSH-PX 活性则表现为随着暴露时间的延长先升高后降低,且在 15 d 时被显著抑制。

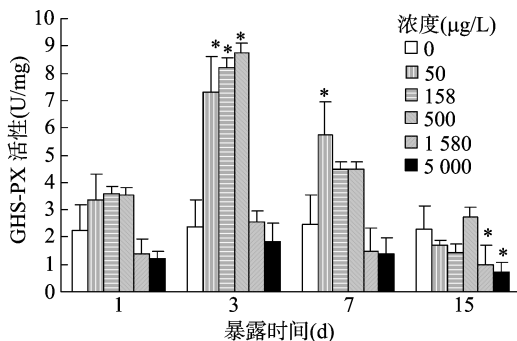


图3 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 GSH-PX 活性的影响

2.4 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 MDA 含量的影响

暴露不同浓度的磺胺二甲嘧啶 1、3、7、15 d 后,脊尾白虾肝胰腺 MDA 含量变化见图 4。暴露于 50、158、500 $\mu\text{g/L}$ 浓度组的脊尾白虾 MDA 含量在 1~3 d 时无显著性变化,从 7 d 开始上升且在 15 d 时被显著诱导且达最高值,分别为对照组的 3.49、4.05、4.22 倍。而 1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 MDA 含量则表现为先增加后下降的变化趋势,且均在 3 d 时达到最高值,分别为对照组的 3.77、3.96 倍。

3 讨论

抗氧化防御系统存在于所有需氧生物细胞内,可清除物质代谢过程中产生的活性中间产物,在正常情况下, SOD、CAT、GPX 等抗氧化酶联合作用清除产生的活性氧自由基^[8]。SOD 是生物体抗氧化防御系统的关键酶。SOD 可催化 O_2^- 发生歧化反应生成 H_2O_2 ,防止过多的活性氧积存对机体造成氧化损伤^[9]。CAT 则与 GPX 一起清除 H_2O_2 ,进而阻断可产

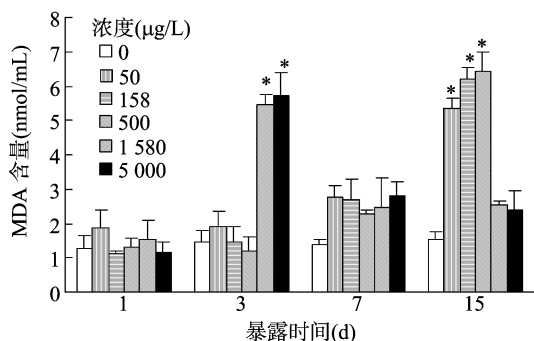


图4 磺胺二甲嘧啶对脊尾白虾 MDA 含量的影响

生活性极高的羟自由基。CAT 通过催化过氧化氢分解为水和氧气,防止过氧化氢与体内的氧气在铁螯合物作用下反应生成有害的 $\cdot\text{OH}$,是生物防御体系的关键酶之一。一些病原体可以通过产生 CAT 来分解生物机体内的过氧化氢,维持细胞内氧化还原的平衡状态,从而保证它在机体内正常生活^[10]。GHS-PX 也是生物机体体内重要的抗氧化酶,能消除机体内的过氧化氢及脂质过氧化物,阻断活性氧自由基对机体的进一步损伤,是生物体内重要的活性氧自由基清除剂。本研究中,158、500 $\mu\text{g/L}$ 组 CAT 和 GHS-PX 活性表现为先增加后降低的趋势,且在 3 d 时受到显著诱导并达到最高值。高浓度(1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$)组的 CAT 和 GHS-PX 活性则表现为在 15 d 时被显著抑制。可能由于磺胺二甲嘧啶胁迫导致脊尾白虾体内产生大量活性氧自由基,CAT 和 GHS-PX 活性迅速增加可保护机体免受自由基的伤害。随暴露时间的延长,CAT 和 GHS-PX 活性的下降可能是由于大量活性氧自由基产生,且超过机体清除活性氧自由基的能力,使细胞受到更严重的损伤,最终导致 CAT 活性受到抑制。此外,本研究中不同浓度组 SOD 活性的基本变化趋势是先增加后降低。500 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 SOD 活性在 3 d 时显著上升随后下降,而 1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组则在 3 d 时 SOD 活性显著被诱导随后逐渐下降且在 15 d 时被显著抑制。这主要是由于磺胺二甲嘧啶胁迫会导致机体内产生大量的活性氧自由基,SOD 活性的迅速增加可以保护机体免受自由基的伤害。随着暴露时间的延长,CAT 活性下降可能导致大量的活性氧自由基产生,且超过机体清除活性氧自由基的能力,使细胞受到更严重的损伤,最终导致 SOD 活性受到抑制。同时,本结果可推测磺胺类药物对脊尾白虾机体造成的氧化损伤可能主要发生在暴露的前 3 d。这与磺胺类药物对罗非鱼的暴露试验^[6]基本一致。

丙二醛是自由基攻击膜不饱和脂肪酸发生脂质过氧化作用的最终分解产物,与蛋白质的游离氨基作用,引起蛋白质分子内和分子间交联,导致细胞损伤^[11-13]。正常生理状态下,体内的 MDA 含量极低,可间接反映机体的活性氧自由基和脂质的过氧化水平,可提示细胞受损伤的程度。本研究中,50、158 和 500 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 MDA 含量表现为随暴露时间的延长而增加,在 15 d 时被显著诱导达最大值,与沼水蛙蝌蚪在有机磷农药的暴露下 MDA 含量也随着时间和浓度的增加而上升^[14]和氨基胁迫下脊尾白虾 MDA 含量随暴露时间的延长而增加^[15]类似。而 1 580、5 000 $\mu\text{g/L}$ 浓度组 MDA 含量则

表现为先上升后下降且在 3 d 时达最大值,与磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中的 MDA 变化^[6]相似。分析原因,可能由于低浓度组在前期暴露过程中虽然活性氧自由基增加,但并未对细胞造成严重的损伤,而随暴露时间延长,活性氧自由基的大量增加,超过机体的清除能力,并对机体细胞造成较为严重的损伤。表明磺胺类药物的长期胁迫会破坏脊尾白虾的抗氧化系统,导致机体清除自由基能力降低,过多的活性氧使机体脂质过氧化程度加剧,MDA 含量随之增加。

参考文献:

- [1] 于森. 养殖业中磺胺类药物残留的危害及现状[J]. 现代畜牧科技,2015,2(2):133.
- [2] 谢美萍,颜勇. 水体中 3 种磺胺类药物对斑马鱼的生态毒性效应[J]. 环境科技,2015,28(2):30-34.
- [3] Holm J V, Ruegge K, Bjerg P L, et al. Occurrence and distribution of pharmaceutical organic compounds in the groundwater down gradient of a landfill[J]. Environmental Science and Technology, 1995, 29(5):1415-1420.
- [4] Sengelov G, Agerso Y, Halling-Sorensen B, et al. Bacteria antibiotic resistance levels in Danish farmland as a result of treatment with pig manure slurry[J]. Environmental International, 2003, 28(7):587-595.
- [5] 徐维海,朱校斌,王新亭. 抗菌药物在鱼、虾体内的残留及代谢动力学研究[J]. 海洋科学,2004,28(9):62-65.
- [6] 王奇,范灿鹏,陈锐慈,等. 三种磺胺类药物对罗非鱼肝脏组织中谷胱甘肽转移酶(GST)和丙二醛(MDA)的影响[J]. 生态环境学报,2010,19(5):1014-1019.
- [7] 高焕,薛蓓,赵莲,等. 脊尾白虾应答温度变化的 5 种因子活性分析[J]. 淮海工学院学报(自然科学版),2014,23(4):72-75.
- [8] 吉红,周继术,曹福余,等. DHA 对鲤抗氧化能力影响的初步研究[J]. 上海海洋大学学报,2009,18(2):2142-2149.
- [9] Halliwell B, Gutteridge J C. Free radicals in biology and medicine, 5th edition[M]. New York:Oxford University Press,2015:77-152.
- [10] 赵大显. 中华绒螯蟹表达序列标签(EST)分析及免疫相关基因的克隆、表达模式研究[D]. 上海:华东师范大学,2009:7-10.
- [11] 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.
- [12] 张成玲,杨冬静,赵永强,等. 镰刀菌胁迫对不同甘薯品种抗氧化酶及 MDA 含量的影响[J]. 江苏农业学报,2017,33(2):263-266.
- [13] 张春云,曹丽萍,杜金梁,等. Nr2 介导姜黄素对四氯化碳诱导鲫鱼肝损伤的保护作用[J]. 江苏农业学报,2018,34(1):114-121.
- [14] 钟碧瑾,姚丹,刘娟娟,等. 两种有机磷农药对沼水蛙蝌蚪抗氧化系统及 MDA 浓度的影响[J]. 福建师范大学学报(自然科学版),2009,25(2):91-96.
- [15] 任海,李健,李吉涛,等. 急性氨氮胁迫对脊尾白虾(*Exopalaemon carinicauda*)抗氧化系统酶活力及 *Gpx* 基因表达的影响[J]. 农业环境科学学报,2014,33(4):647-655.