

铜、镉及其复合作用下中华大蟾蜍蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶的变化

邱吉 贾秀英*

(杭州师范学院生命与环境科学学院 杭州 310036)

摘要:采用动物毒理实验法,研究了铜、镉及其复合污染对中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响。结果表明,在 0.029 8 mg/L Cu^{2+} 和 1.14 mg/L Cd^{2+} 作用下,蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性极显著高于对照组 ($P < 0.01$)。随着 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 暴露浓度的增加,蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性又逐渐降低,甚至被抑制。铜、镉复合污染在 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶水平上表现出一定的协同作用。

关键词:铜 镉 复合污染 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶 蝌蚪

中图分类号:Q953 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)02-102-05

Response of the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ Activity of *Bufo gargarizans* Tadpole to Cu^{2+} 、 Cd^{2+} Single and Combined Pollution Exposure

QIU Ji JIA Xiu-Ying*

(School of Life and Environmental Sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China)

Abstract:The effects of Cu^{2+} 、 Cd^{2+} single and combined pollution on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities in *Bufo gargarizans* tadpoles were tested by the method of animal toxicological experiment. The results showed that the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities of tadpoles increased significantly at the group of 0.029 8 mg/L Cu^{2+} and 1.14 mg/L Cd^{2+} comparing to the control group. But with the increasing of Cu^{2+} and Cd^{2+} concentration, the damage of tadpoles became much heavier; the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity was gradually decreased and was even inhibited significantly. The joint effects of the combined pollution on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity were synergistic.

Key words: Cu^{2+} ; Cd^{2+} ; Single and combined pollution ; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity ; Tadpole

近些年来,世界各地的两栖动物种类正在急剧地衰减或消失^[1~3],对湿地和陆地生态系统造成了很大的冲击。关于两栖动物种群动态和生物多样性的保护也逐渐成为研究的热点。研究者对许多常见的两栖类物种不明原因的衰减或消失进行了多次论证,认为两栖动物由于其皮肤的高渗透性、水陆两栖等生物学特性,对环境污染极其敏感,两栖动物种群的变化与环境污染物有密切的关系^[4~5]。重金属是分布范围极广、毒性效应大且难以消除的一类环境污

染物,有关重金属污染对两栖动物的致死效应以及在生长、发育、行为等方面的影响已有不少报道^[6~9],但关于其毒性作用机理目前尚不清楚。

基金项目 浙江省自然科学基金项目(No. 302056);

* 通讯作者, E-mail xy-jia@163.com;

第一作者介绍 邱吉,男,本科;主要从事生态毒理学研究, E-mail: qiuji999@163.com

收稿日期 2006-09-11, 修回日期 2006-12-30

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶几乎存在于所有动物的细胞中,是组成 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵的主要活性部分,是生物重要的功能膜蛋白,在细胞体积的调节、细胞内 pH 的控制、自由 Ca^{2+} 浓度以及膜势的维持等方面起着重要作用^[10]。体外与体内的实验表明水生生物的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶对重金属离子的暴露非常敏感^[11-13],是一项重要的敏感性生物指标。关于重金属对两栖动物 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响尚未见报道。因此,本实验以水域中常见的重金属元素铜、镉为研究对象,以中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 蝌蚪为模式生物,研究了铜、镉及两者复合污染下蟾蜍蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的变化,探讨重金属铜、镉对蝌蚪的致毒机理,了解和揭示重金属污染对两栖类种群数量下降的影响,并进一步探讨两栖动物与外界环境的关系,为两栖类物种的保护和环境监测提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 中华大蟾蜍成体采自杭州市郊。成体被置于本学院动物养殖基地的池塘里,由其自然抱对产卵,孵化出蝌蚪。实验前将发育至早期的蝌蚪(25~27期, Gosner 标准)^[13]带回实验室,在室内玻璃水族箱(60 cm × 40 cm × 35 cm)中暂养 7 d,暂养水为曝气 3 d 以上的

自来水,每天不间断充气,每天投放商品粉状鱼饲料 1 次,实验前一天停止喂食。选择体质健康、大小均一的蝌蚪进行毒性实验。

1.2 毒性实验试剂 Cu 采用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (上海振兴试剂厂);Cd 采用 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (中国亨新化工试剂厂),均为分析纯。用双蒸水配制母液,实验时稀释成所需要的浓度。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物的染毒处理 根据急性毒性实验测定的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 对蝌蚪 96 h 的半致死浓度 LC_{50} 分别为 0.149、6.84 mg/L,对 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的实验浓度各设置了 4 个梯度, Cu^{2+} : 0.029 8、0.037 0、0.047 9、0.075 0 mg/L; Cd^{2+} : 0.855、1.140、1.710、3.420 mg/L;另各设置一个对照组。复合毒性实验浓度据单一毒性实验确定,分别由 3 种浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 作交叉处理(表 1)。以上每个浓度各设 3 个重复。实验容器为 3 L 的聚乙烯塑料桶,实验水体共为 2 L,实验用水为曝气的自来水(实验时水温 18~22℃, pH 6.5~7.0,溶氧为 6~8 mg/L)。采用静水实验法,每天更换实验溶液。每组实验各放蝌蚪 20 尾,实验期间停止喂食。暴露全过程为 7 d。暴露结束时,将每个处理组的蝌蚪称重后迅速置于液氮中冷冻,待测酶活性。

表 1 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 复合污染处理的实验设计

Table 1 The experimental design of combined pollution of Cu^{2+} and Cd^{2+}

污染物 Pollutant (mg/L)	处理序号 Disposal number									
	CK	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Cu^{2+}	0	0.018 6	0.029 8	0.037 0	0.018 6	0.029 8	0.037 0	0.018 6	0.029 8	0.037 0
Cd^{2+}	0	0.428	0.428	0.428	0.570	0.570	0.570	0.855	0.855	0.855

1.3.2 样品制备 从液氮中取出蝌蚪,清洗,称重,4℃下按 1:4(w:v)加预冷的生理盐水,用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆,并于 4℃、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液保存于 -20℃冰箱中待测。

1.3.3 检测方法 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的测定采用钼铵酸显色测磷法,蛋白质含量的测定采用

考马斯亮蓝法。试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性单位为 $\mu\text{mol Pi}(\text{h mg Pr})^{-1}$ 。

1.4 数据处理与分析 实验所得数据采用 SPSS 10.0 统计软件包进行统计分析,所有的结果均以平均值 ± 标准误来表示。各处理组和对照组之间的比较采用 *t*-检验, $P < 0.05$ 为差异

显著, $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果

2.1 Cu^{2+} 对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性影响 不同浓度暴露下, 蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 酶活性变化见图 1。结果显示, 不同浓度 Cu^{2+} 处理 7 d 后, 蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性都被不同程度地激活。当 Cu^{2+} 浓度为 0.029 8 mg/L 时, $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性与对照组比较呈极显著升高 ($P < 0.01$)。随着 Cu^{2+} 浓度的增加, $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性开始下降, 但 0.037 0、0.047 9 mg/L Cu^{2+} 组仍显著高于对照组 ($P < 0.05$)。0.075 0 mg/L Cu^{2+} 组与对照组差异不明显 ($P > 0.05$)。

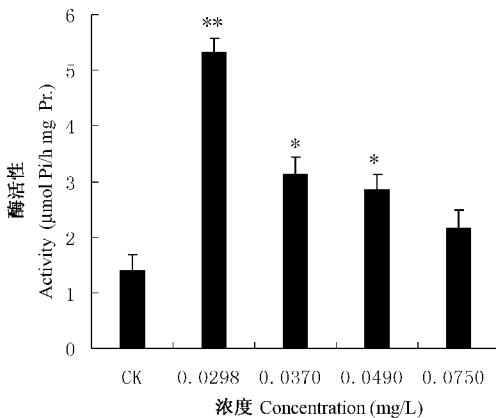


图 1 Cu^{2+} 对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 酶活性的影响

Fig.1 Effects of Cu^{2+} on the $Na^+ - K^+ - ATPase$ activities of *Bufo gargarizans* tadpoles

* 与对照组比较差异显著 ($P < 0.05$); ** 与对照组比较差异极显著 ($P < 0.01$); 下同。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared to control group; The same below.

2.2 Cd^{2+} 对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性影响 Cd^{2+} 对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性的影响见图 2。由图 2 可知, Cd^{2+} 对蟾蜍蝌蚪组织 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性的影响, 随着浓度的不断升高, $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性经历了升高-回落-抑制的过程。当 Cd^{2+} 浓度为 0.855 mg/L 时, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性与对照组比较没有明显差

异 ($P > 0.05$); 当 Cd^{2+} 浓度为 1.140 mg/L 时, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性极显著升高 ($P < 0.01$); 随着 Cd^{2+} 浓度的增加, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性开始回落, 但在 1.710 mg/L 浓度组仍显著高于对照组 ($P < 0.05$), 而在 3.420 mg/L Cd^{2+} 浓度组, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性却被明显抑制 ($P < 0.01$)。

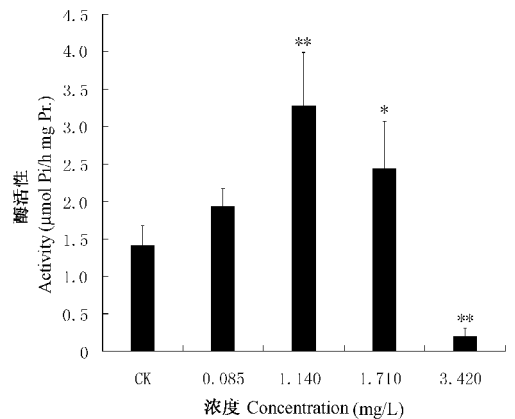


图 2 Cd^{2+} 对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 酶活性的影响

Fig.2 Effects of Cd^{2+} on the $Na^+ - K^+ - ATPase$ activities of *Bufo gargarizans* tadpoles

2.3 铜、镉复合污染对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性影响 铜、镉复合污染对蟾蜍蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性影响见图 3。从图 3 可以看出, 当 Cu^{2+} 浓度为 0.018 6 mg/L 时, 随着 Cd^{2+} 浓度的增加, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性与对照组、单一 Cu^{2+} 浓度组比较, 差异不明显; 当 Cu^{2+} 浓度为 0.029 8 mg/L 时, 随着 Cd^{2+} 浓度的增加, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性均显著低于单一的 Cu^{2+} 浓度组, 说明 Cd^{2+} 增强了 Cu^{2+} 对蝌蚪的毒性; 当 Cu^{2+} 浓度为 0.037 0 mg/L 时, 在 0.428 mg/L Cd^{2+} 浓度组蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性高于单一的 Cu^{2+} 浓度组, 这可能是因毒性增强机体出现代偿所致; 随着 Cd^{2+} 浓度的增加, 毒性进一步增强, 蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性下降甚至被抑制, 且低于单一的 Cu^{2+} 浓度组。由此可见, 在蝌蚪 $Na^+ - K^+ - ATPase$ 活性变化的水平上, Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 之间具有一定的协同作用。

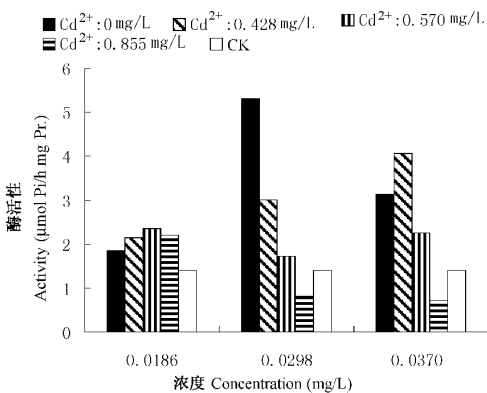


图3 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 复合污染对蟾蜍蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响

Fig.3 Effects of Cu^{2+} and Cd^{2+} combination on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities of *Bufo gargarizans* tadpoles

3 讨论

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是生物体内物质运输、能量转换及信息传递方面具有重要生物学意义的酶。ATPase 至今是一种评价环境污染压力的一个有用的参数,已发现包括鱼在内的多种水生生物组织 ATPase 对不同污染物均有反应,都表明有一定的剂量-效应关系存在^[14,15]。本研究结果表明,在较低浓度的 Cu^{2+} 胁迫下,蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性显著升高,这可能是因为较低浓度下蝌蚪受到了轻微损伤,蝌蚪可以通过自我调节,主要是增强 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性来维持体内的离子平衡。在较高浓度的 Cu^{2+} 处理后,蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性又开始下降回落。作者认为这主要与 Cu^{2+} 对蝌蚪的毒性作用需要一个时间过程有关, Cu^{2+} 暴露初期进入蝌蚪体内的重金属含量较少,引起蝌蚪的应激反应,通过应激反应来增加 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性。但随着 Cu^{2+} 暴露浓度的增加,进入蝌蚪体内的重金属含量越积越多,这些重金属离子可能通过与膜上蛋白质的结合位点(如含巯基结构或氧基结构的基团)结合后,引起蛋白质构象发生变化,这种变化阻止了底物与蛋白质的结合,从而抑制了正常酶的活性^[16]。也可能是由于 Cu^{2+} 能诱导机体金属硫蛋白的合

成,蝌蚪体内游离的重金属离子不断被结合,减轻了 Cu^{2+} 对蝌蚪的毒性,因而蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性开始下降回落。其原因还有待于进一步研究。

据报道,Dhavale 等^[17]研究了亚致死浓度下 Cd^{2+} 对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)的肝胰脏与鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的作用,结果显示在 0.000 3 mg/L 浓度下,酶活力在 10 d 内出现暂时激活现象,时间延长或者浓度再升高则表现出抑制作用。这与本实验 Cd^{2+} 在较低浓度(1.140 mg/L)处理后对蟾蜍蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力表现为激活现象,而高浓度表现为显著性抑制的剂量效应关系基本一致。Stebbing^[18]认为毒物在低浓度下出现的这种增益现象,是其在无毒情况下的刺激反应,并把这一现象称为“毒物兴奋效应”,至今许多研究也证实了这一观点。至于 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性抑制的作用机理,Friedman 等^[19]认为 Cd^{2+} 因其离子半径与 Ca^{2+} 相似,因而可取代 Ca^{2+} 与 Na^+ 进行交换,从而妨碍 Ca^{2+} 的外流。姜悦等^[20]研究发现胞浆内 Ca^{2+} 浓度的升高与 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性下降之间存在着明显的相关关系。因而推测镉的毒性作用与其引起组织细胞 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的下降与钙稳态失调有关。

杨再福等研究发现 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 对泽蛙蝌蚪的急性联合毒性表现为协同作用^[21]。本实验结果显示,蟾蜍蝌蚪 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性在 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 复合污染暴露下,也表现为一定的协同作用。目前还未见关于 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 协同效应机制的研究,可能与它们的化学结构、生化特征有关,其作用机理还有待于进一步研究。

本研究结果显示,蟾蜍蝌蚪在低浓度的铜、镉及其复合污染暴露下,其机体的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性对铜、镉污染均相当敏感。因此,鉴于蟾蜍蝌蚪的可获得性、 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的易检测性等优点,蟾蜍蝌蚪机体 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性可考虑作为水体铜、镉及其复合污染的一个有效的生物学指标。

参 考 文 献

[1] Blaustein A R, Wake D B. The puzzle of declining amphibian

- populations. *Scientific American* ,1995 **272** :56 ~ 61.
- [2] Alford R A ,Dixon P M ,Pechmann J H. Ecology. Global amphibian population declines. *Nature* 2001 **412** (6 848) :499 ~ 500.
- [3] Kiesecker J M ,Blaustein A R ,Belden L K. Complex caused of amphibian population declines. *Nature* 2001 **410** (6 829) :681 ~ 684.
- [4] Sharpe R M ,Skakkebaek N E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract. *Lancet* ,1993 **341** :1 392 ~ 1 395.
- [5] 王山不二雄 (桂兰润 ,尚彦军译). 环境激素问题研究现状. *世界环境* ,1999 **17** (2) :34 ~ 35.
- [6] Lefcort H ,Meguire R A ,Wilson L H , *et al.* Heavy metals alter the survival ,growth ,metamorphosis ,and antipredatory behavior of Columbia spotted frog (*Rana luteiventris*) tadpoles. *Arch Environ. Contam Toxicol* ,1998 **35** :447 ~ 456.
- [7] Dobrovoljc K , *et al.* Uptake and elimination of cadmium in *Rana dalmatina* (Anura ,Amphibia) tadpoles. *Bull Environ Contam Toxicol* 2003 **70** :78 ~ 84
- [8] 王寿兵 ,郭锐 ,屈云芳等. Cu 对中国林蛙蝌蚪的急性毒性. *应用生态学报* ,1998 **9** (3) :309 ~ 312.
- [9] Simmons A M ,Costa L M ,Gerstein H B. Lateral line-mediated rheotactic behavior in tadpoles of the African clawed frog (*Xenopus laevis*). *Comp Physiol A Neuroethol Sens Neural Behav Physiol* 2004 **190** (9) :747 ~ 758.
- [10] Li J ,Lock R A C ,Klaren P H M , *et al.* Kinetics of Cu²⁺ inhibition of Na⁺ /K⁺ -ATPase. *Toxicology Letters* ,1996 **87** :31 ~ 38.
- [11] Thaker J ,Chhaya J ,Nuzhat S , *et al.* Effects of chromium(VI) on some iondependent Atpase in gills ,kidney and intestine of a coastal teleost *periphthalmus dipes*. *Toxicology* ,1996 **112** :237 ~ 244.
- [12] Pinkney A E ,Wright D A ,JePson M A , *et al.* Effects of tributyltin compoundson ionic regulation and gill ATPase activity in estuarine fish. *Comp Biochem Physiol C* ,1989 **92** :125 ~ 129.
- [13] Morgan I J ,Henry R P ,Wood C M. The mechanism of acute silver nitrate toxicity in freshwater fish rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) is inhibition of gill Na⁺ and Cl⁻ transport. *Aqu Toxicol* ,1997 **38** :145 ~ 163.
- [14] 徐立红 ,张甬元 ,陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义. *水生生物学报* ,1995 **19** (2) :171 ~ 185.
- [15] Sancho B ,Ferrando M D ,Andreu E. Inhibition of gill Na⁺ -K⁺ -ATPase activity in the eel , *Anguilla anguilla* by fenitronthion. *Ecotoxicology and Environmental Safty* ,1997 **38** :132 ~ 136.
- [16] Thaker J ,Chhaya J ,Nuzhat S , *et al.* Effects of chromium(VI) on some iondependent ATPase in gills ,kidney and intestine of a coastal teleost. *Periphthalmus Dipes* ,1996 **112** :237 ~ 244.
- [17] Dhavale D M ,Masvrekar V B ,Giridhar B A. Cadmium induced inhibition of Na⁺ -K⁺ -ATPase activity in tissues of crab *Scylla serrata* (Farckal). *Bull Environ Contam Toxicol* ,1987 **40** (5) :759 ~ 763.
- [18] Stebbing A R D. Hormes is the stitulation of growth by low levels of inhibitions. *Sci Tol Envir* ,1982 **22** (1) :213 ~ 234.
- [19] Friedman P A ,Gesek F A. Cadmium uptake by kidney distal convoluted tubule cells. *Toxicol Appl Pharmacol* ,1994 **128** (2) :257 ~ 263.
- [20] 姜悦 ,谭炳德 ,董秀清. 镉致肾小管细胞内 Na⁺ -K⁺ -ATPase 酶与钙稳态的变化. *中华劳动卫生职业病杂志* ,1995 **13** (2) :75 ~ 78.
- [21] 杨再福 ,陈立侨 ,陈华友. 重金属铜、镉对蝌蚪毒性的研究. *中国生态农业学报* 2003 **11** (1) :102 ~ 103.