

# 水生动物体内超氧化物歧化酶的研究进展

## PROGRESS OF STUDIES ON SUPEROXIDE DISMUTASE IN THE BODY OF AQUATIC ANIMALS

姚翠鸾 王维娜 王安利

(河北大学生命科学学院 保定 071002)

中图分类号 Q81 文献标识码 A 文章编号 1000-3096(2003)10-0018-04

超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1) 是一种重要的抗氧化酶,在许多生物学事件中具有重要作用,如神经存活<sup>[1]</sup>和信号传递<sup>[2]</sup>,作为氧的清除剂参与清除体内自由基,在防御机体衰老及生物分子损伤等方面有极为重要的作用。而且最近发现, SOD的活性与水生生物的免疫水平密切相关,对于增强吞噬细胞防御能力和整个机体的免疫功能有重要作用<sup>[3]</sup>。由于 SOD具有消除自由基的功能,因此健康的生物体内环境中自由基的产生与消除处于动态平衡。但是当 SOD活性降低时,生物体内自由基量会过多,势必扰乱破坏体内重要的生化过程,导致代谢紊乱,正常生理功能失调,体内免疫水平下降,潜在的病原体被激活,许多疾病也逐步产生和形成<sup>[4]</sup>。水生动物生活在水体环境中,其抗病力与环境因素密切相关,如养殖密度过高,溶解氧、pH、温度急剧变化,金属污染,有毒物质的产生,药物使用不当等,都会使水生动物体内 SOD活性变化,机体防御能力下降<sup>[5]</sup>。

### 1 水生动物体内 SOD作用机理的研究

Yukichi 等<sup>[6]</sup>从海腺 (*Halocynthia roretzi*) 的原生质体中分离到了 CuZnSOD, 并发现它具有提高吞噬细胞活性的功能,认为它可能在生理条件下起作用。其机制可能是:通过它连接血细胞,然后通过血细胞来提高吞噬细胞活性。另外还发现,海腺血细胞产生的超氧阴离子可以与外加的酵母聚糖应答,并且超氧阴离子的产生是被外面的原生质激活,认为原生质 SOD 作为有毒氧的清除剂还有另外的作用。Söderhäll 等<sup>[7]</sup>研究发现,在螯虾的免疫反应中, $\beta$ -1,3 葡聚糖结合蛋白 ( $\beta$ -GBP) 与过氧化丙蛋白都与一个 90ku 的亚基结合,随后证实这个 90ku 的亚基与它的多聚体有 SOD

活性,内部两条肽链序列与 CuZnSOD 结构类似。对于血细胞 cDNA 库的筛选分析证实了这个 90ku 的蛋白可能由一个或更多的 23ku 的 CuZnSOD 亚基组成。并认为其在防御过程中的机制可能是通过胞外 SOD (EGSOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 的参与,体内异物的包裹体、抗菌肽和溶菌酶等可能被活化,最终将异物分解。随着证实过氧化丙蛋白具有氧化酶的活性,并已证实它是一个细胞调理素,对过氧化丙蛋白与 EGSOD 的结合可能具有重要的意义, SOD 能够催化超氧阴离子生成  $H_2O_2$ , 然后过氧化丙蛋白用它入侵异物的表面产生杀菌剂。

### 2 SOD在水生动物体内的分布

Bell 等<sup>[8]</sup>用生化与免疫细胞化学的方法测定了滨蟹 (*Carcinus menas*) 血淋巴与细胞间游离血淋巴中的抗氧化酶 CAT、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH Px) 和 SOD。这 3 种酶都在血淋巴中存在,但分布不同: CAT 主要存在于有吞噬作用的透明细胞与粒细胞中,半颗粒细胞中缺少 CAT 与 GSH Px, 虽然在某些样品中测到了 SOD 活性,但不同的个体之间差异很大。相反,游离的血淋巴中有 GSH Px 和 SOD 活性,但缺少 CAT 活性。通过免疫化学法进一步分析表明,仅有 2% ~ 16% 的细胞染色说明存在这些酶,并且这些酶通过血浆伴随粒细胞分布,但是,仍有一些 GSH Px 与 SOD 围绕颗粒细胞定位。由于蟹的血淋巴产生超氧阴离子自

第一作者:姚翠鸾,出生于 1971 年,硕士。通信地址:河北大学生命科学学院, E-mail: yaoc2000@Yahoo.com.cn

收稿日期:2001-09-11;修回日期:2002-05-06

由基、 $H_2O_2$  与其他的活性氧种类, 伴随着乙酸肉蔻佛波醇、脂多糖或体外的其他刺激, 血淋巴中的 CAT、GSH Px 与 SOD 可能帮助动物体抵御活性氧的伤害。

SOD 催化超氧自由基歧化反应, 存在于所有有氧呼吸的真核生物的细胞质和线粒体中。一般情况下, 细胞质形式包括 CuZnSOD 而线粒体形式包括 MnSOD。CuZnSOD 对  $CN^-$  与  $H_2O_2$  敏感, 但 MnSOD 不敏感。而从蟹的肝胰腺中提取出的 SOD, 显示对  $CN^-/H_2O_2$  不敏感。没有发现对  $CN^-/H_2O_2$  敏感的 CuZnSOD。这种意外的现象在所有实验的甲壳动物中的十足类(蟹、螯虾和虾)中均出现。通过离子交换、排阻层析与反向高效液相层析纯化的胞质 SOD 与线粒体 SOD, 经一系列的分析与鉴定证实这个胞质 SOD 为 MnSOD, 它与线粒体 MnSOD 是由不同的基因编码的<sup>[9]</sup>。Filho 等<sup>[10]</sup> 比较研究了 37 种鱼, 其中有 15 种来自比利时东南沿岸的海产鱼, 22 种来自亚马逊中部盆地的淡水鱼, 发现海产种类肝脏与血液中 SOD 与 CAT 活性比其他种类要高, 认为海产鱼中抗氧化防御的地位可能是与环境的物理与化学因素有关而不是与生物自身的酶活性水平有关。

### 3 环境因素对水生动物体内 SOD 活性的影响

#### 3.1 氧对 SOD 活性的影响

Pannuzio 等<sup>[11]</sup> 研究了滨螺 (*Littorina littorea*) 在缺氧的条件下体内抗氧化酶的防御情况, 滨螺在 5 °C 由氮气替代氧气的水体中缺氧 6 d 后又放入 5 °C 有氧的环境中, 然后测定其肝胰腺和斧足肌肉的抗氧化防御机制。缺氧时肝胰腺中 SOD、CAT、总谷胱甘肽过氧化物酶 (GPOx)、谷胱甘肽还原酶 (GR) 与谷胱甘肽 S-转移酶 (GST) 活性均下降, 只有对照组的 44% ~ 70%, 恢复有氧环境后, 所有与谷胱甘肽 (GSH) 有关的酶活性都增加, 而 SOD 与 CAT 活性仍然较低, 直至 24 h 后才恢复; 在斧足肌肉中缺氧时只有 SOD 活性下降, 其活性仅为对照组的 56%, 恢复供氧后, 活性上升。实验表明, 滨螺自身能通过降低氧的利用率来适应外界氧的变化。在 5 °C 时将龟放入缺氧环境中 20 h, 随后又将其放入有氧环境中 24 h, 测试其 6 种器官中抗氧化系统的变化。结果表明, 24 h 后 CAT 与 SOD 活性变化不大, 自由基没有对机体造成明显损伤。缺氧时肝脏中 SOD 活性下降 30%, 脑中 SOD 下降 15% ~ 80%, 绝大多数在缺氧时活性下降的酶随着氧的恢复活性也恢复, 但脑中的酶活性仍然很低; 在恢复有氧的过程中也发生了一些特殊的变化: 心脏中 SOD 比对照组高出 40%, 说明由于抗氧化酶的协同防御

降低了活性氧对机体的伤害使龟能忍受自然水体中的缺氧状况<sup>[12]</sup>。

#### 3.2 氨对 SOD 活性的影响

一项氨对淡水双壳类动物外套膜与斧足中 SOD 的影响的研究表明, 暴露在  $(NH_4)_2SO_4$  溶液中, SOD 的活性提高, 这会增加它们对氨、超氧阴离子及过氧化物的解毒作用, 而且可能会提高双壳类对受污的生态系统的忍耐性<sup>[13]</sup>。

#### 3.3 有机物对 SOD 活性的影响

白洁等<sup>[14]</sup> 研究了久效磷对中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 体内 SOD 活力的影响。结果表明, 久效磷胁迫可降低中国对虾体内 SOD 活力, 且随着效物浓度的增加和胁迫时间的延长其降低作用不断增强。几种组织的 SOD 活力对久效磷胁迫的敏感性, 以肝胰腺最高, 血淋巴次之, 肌肉组织相对较低。另一项对受污的黄海水域中木叶鲷 (*Pleuronichthys comutus*) 的研究表明: 污染水域中木叶鲷的脑与肌肉中的蛋白含量分别比对照组低 15% ~ 45% 与 35% ~ 45%, 血清 SOD 活性明显降低, 其降低幅度为 20% ~ 40%, 血清中氧自由基比对照组高约 15% ~ 90%。说明以上这些参数可以作为水污染的指示参数<sup>[15]</sup>。

#### 3.4 重金属离子对 SOD 活性的影响

Zikic 等<sup>[16]</sup> 研究了暴露在浓度为 20 mg/L 的含镉水体中的鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 血液中总 SOD 与 CAT 等酶的活性变化。结果显示, 暴露 12, 18, 24 h 后, 血细胞中 SOD 总活性显著下降, CAT 活性上升。同时, 血红蛋白与血细胞比容值明显降低, 说明水体中的镉会引起缺氧及鱼体的组织损伤。另一项对暴露在有毒污染水体中的淡水贝类 (*Unio tumidus*) 抗氧化酶作为指示水体毒性的参数的研究结果表明: 在 30  $\mu g/L$  铜与 100  $\mu g/L$  福美双中暴露 3 d 后, 与对照组相比 GSH 活性明显下降, 而 SOD 活性变化不大<sup>[17]</sup>, 说明在对抗外界环境中的有毒物质时, 这些抗氧化酶可能协同作用。将蟹 (*Callinectes sapidus*) 长时间暴露在含铜离子水体中, MnSOD 活性增加, 没有发现 CuZnSOD 的活性变化, 说明蟹的防御体系不能完全阻止铜所导致的伤害<sup>[18]</sup>。Okamoto 等<sup>[19]</sup> 研究了海生的腰鞭毛虫 (*Gonyaulax polyedra*) 分别慢性暴露于含  $5.0 \times 10^{-9}$  汞、 $0.5 \times 10^{-6}$  镉、 $2.0 \times 10^{-6}$  铅、与  $0.1 \times 10^{-6}$  铜的水体中 30 d, 急性暴露于上述水体中 48 h。慢性暴露在与含汞、镉、铅、铜的水体中 SOD 总活性在第一天分别为对照组的 134%, 148%, 127% 与 139%; 急性暴露也出现了相同的趋势, 上升幅度大小相当, 只是在几小时内就升高。非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳显示这主要是 FeSOD 与 MnSOD 的诱导效应, 而不是 SOD 同工酶的

诱导效应。结果说明在腰鞭毛虫体内,活性氧可能是金属毒性的一个重要递质, SOD 提供了抗氧化的保护。Regodi 等<sup>[20]</sup>研究了痕量金属浓度季节性变化对地中海贝类 (*Mytilus galloprovincialis*) 鳃与消化腺中抗氧化酶的影响,发现痕量金属季节性变化对贝类 SOD 活性影响不大。在夏天,痕量金属含量低时 SOD 等抗氧化酶活性较高,而非污染水域的对照组 SOD 等酶活力变化不大,说明贝类对慢性污染的环境有生化上的适应。Reddy 等<sup>[21]</sup>研究了将食用蟹 (*Scylla serrata*) 暴露在亚致死量的镉与铜 (10%) 的环境中 24 h,食用蟹的鳃与肝胰腺暴露在亚致死量的铜中 SOD 活性上升,而在镉中 SOD 活性变化不大,提示镉与铜对食用蟹的致毒机理可能不同。

### 3.5 温度对 SOD 活性的影响

Parihar 等<sup>[22]</sup>研究了鲶鱼 (*Heteropneustes fossilis*) 在短期升温期间 (1~4 h) 鳃中抗氧化酶的活性变化。结果表明,与对照组相比,在温度从 25 °C 升至 37 °C 期间 SOD 活性升高,而 GSH Px 活性降低, GSH 含量下降; GSH Px 活性在 32 °C 时活性较高,而 SOD 活性在 32~37 °C 增加较明显。总之,升温会引起鲶鱼鳃中 SOD 与 GSH Px 活性的变化和 GSH 含量的变化。与温血动物鸟类和哺乳类相比,鱼类的抗氧化防御水平相当高,说明水生有机体的抗氧化体系或许能保护机体抵御温度变化对其带来的不利影响<sup>[10]</sup>。

### 3.6 疾病对 SOD 活性的影响

蔡完其<sup>[23]</sup>研究了感染莫格球拟酵母病的罗氏沼虾生化病理方面的变化,发现病虾肝胰腺 SOD 活性显著降低,表明病虾代谢功能和免疫功能明显衰退和紊乱。

## 4 提高水生动物体内 SOD 活性物质的研究

### 4.1 免疫多糖

牟海津等<sup>[3]</sup>研究发现,经虫草多糖与海藻多糖对栉孔扇贝注射刺激后,其血清中的 SOD 活性会有不同程度的提高,分别于 48 h 与 72 h 达到最大值,随后便开始降低,但直到 120 h 时活性仍比对照组高出许多,血细胞中 SOD 活性也有一定提高,并且最高值也是分别出现在 48 h 与 72 h,与血清 SOD 的变化规律基本一致;肝脏提取液 SOD 活性则变化不大。由此可见,虫草多糖与海藻多糖不仅可以提高栉孔扇贝体液免疫因子的活性,而且也有可能促进机体的抗氧化能力。刘恒<sup>[24]</sup>等利用海藻中提取的与微生物多糖有

类似结构与性质的免疫多糖作为饵料添加剂,以口服形式对南美白对虾进行免疫,刺激其免疫系统,免疫多糖对对虾机体的 SOD 实验结果在实验开始 10 d 时与对照组的无显著差别,而此时实验组的酚氧化酶活力、溶菌与抗菌活力均高于对照组,推测这是免疫多糖对对虾机体 SOD 的活性作用的间接性而带来的时滞,即它首先影响虾体的免疫水平,而免疫水平的提高又增强了 SOD 活力。

### 4.2 硒

Javanovic 等<sup>[25]</sup>研究硒对鲤鱼血细胞与肝脏抗氧化系统的影响,食物中提供  $0.15 \times 10^{-6}$  的硒 (硒酸钠与富硒酵母),测定了血液与肝脏的 SOD, CAT, GSH Px 的活性变化,添加硒酸钠时肝脏与血细胞中上述酶活性未发生明显改变,而添加富硒酵母的食物中,血细胞中 GSH Px, CAT, SOD 等活性显著增加,肝脏中 SOD 与 GST 也比对照组增加。结果显示,富硒酵母在提高鲤鱼的抗氧化能力方面比硒盐更有效。

### 4.3 益生菌

用益生菌喂养中国对虾的实验表明,它能提高中国对虾的增长速度,通过对其抗菌、溶菌活力,酚氧化酶 (PO) 与 SOD 活性的测定表明,益生菌可以提高中国对虾的机体免疫水平<sup>[26]</sup>。

### 4.4 谷胱甘肽

Otto 等<sup>[27]</sup>将注射 GSH 的虹鳟 (*Salmo irideus*) 放入含 3,3',4,4'-四氯联苯 (TCB) 的水体中,发现注射 GSH 组比不注射组肌肉内  $\alpha$ -生育酚水平及各种组织内 SOD 活性均提高。因此,认为 GSH 会提高暴露在含 TCB 水体中虹鳟抗氧化酶的作用。

目前,对水生动物 SOD 的研究较少,而且其中大部分仍然停留在 SOD 的活性研究上,对其较为深层次的结构研究几乎微乎其微,特别是其在免疫应答中的具体作用机理我们仍然了解的极少。尤其是无脊椎动物,它们没有像高等动物那样完善的免疫防御体系包括免疫球蛋白抗体可以用获得性记忆来保护它们防御致病微生物,只拥有区域蛋白,但它们抵御疾病的能力也是相当可观的,研究这些生物如何对付外来的微生物已经开始引起科学界的普遍兴趣,获得这方面的知识不仅可以用于人们非常关心的养殖种类,如,虾类和贝类等,而且还可以获得优于普通药物治疗的新的抗体类似物。现在我们已经从日本沼虾体内纯化出了 SOD,并对其部分理化性质做了研究,结果提示日本沼虾体内的 SOD 与其他陆生动物有所差异,但对于其免疫应答机理还有待于进一步研究。

参考文献

- 1 Nakano N, Frodl E M, Widner H, et al. Overexpressing Cu/Zn superoxide dismutase enhances survival of transplanted neurons in a rat model of Parkinson's disease. *Nat Med*, 1995, 1:266-271
- 2 Wang X, Culotta V C, Klee C B. Superoxide dismutase protects calcineurin from inactivation. *Nature*, 1996, 383: 434-437
- 3 牟海津, 江晓路, 刘树清, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响. *青岛海洋大学学报*, 1999, 29(3): 463-468
- 4 丁美丽, 林林, 李光友, 等. 有机污染对中国对虾体内外环境影响的研究. *海洋与湖沼*, 1997, 28:17-21
- 5 李光友. 中国对虾疾病与免疫机制. *海洋科学*, 1995, 4:1-3
- 6 Yukichi A, Ishikawa G, Hisanori S, et al. Primary structure and function of superoxide dismutase from the ascidian *Halocynthia roretzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology Part B*, 1999, 122:321-326
- 7 Holmblad T, Söderhäll T. Cell adhesion molecules and antioxidative enzymes in a crustacean, possible role in immunity. *Aquaculture*, 1999, 172:111-123
- 8 Bell K L, Smith V J. Occurrence and distribution of antioxidant enzymes in the hemolymph of the shore crab *Carcinus maenas*. *Marine Biology (Berlin)*, 1995, 123(4):829-836
- 9 Brouwer M, Bronwer T H, Grater W, et al. The paradigm that all oxygen respiring eukaryotes have cytosolic CuZnSOD and that MnSOD is localized to the mitochondria does not apply to a large group of marine arthropods. *Biochemistry*, 1997, 36(43):13381-13388
- 10 Filho D, Wilhelm I. Fish antioxidant defense - a comparative approach. *Braz J Med Biol Res*, 1996, 29(12):1735-1742
- 11 Pannunzio T M, Storey K B. Antioxidant defense and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in marine gastropod *Littorina littorea*. *Journal Experimental Marine Biology and Ecology*, 1998, 221(2):277-292
- 12 Willmore W G, Storey K B. Antioxidant systems and anoxia in a fresh water turtle *Trachemys scripta elegans*. *Mol Cell Biochemistry*, 1997, 170(1 & 2):177-185
- 13 Chetty A, Nadamuni I K. Protection against free radical toxicity in mantle and foot of a fresh water bivalve exposed to ambient ammonia. *Proc Natl Acad Sci India Sect B*, 1994, 64(1):35-40
- 14 白洁, 李岩然, 唐学玺. 久效磷对中国对虾体内 SOD 活力影响的初步研究. *海洋通报*, 1998, 17(4):41-45
- 15 Choi J H, Kim D W, Park C K, et al. Biochemical pollutant markers for diagnosis of marine pollution V. Changes in oxygen radicals and their scavenger enzymes of the flounder (*Pleuronichthys cornutus*) in the Yellow Sea. *Han's guk Susan Hakhoechi*, 1997, 30(4):608-613
- 16 Zikic V, Stajin A S, Ognjanovic B Z, et al. Activities of superoxide dismutase and catalase in erythrocytes and transaminase in the plasma of carps (*Cyprinus carpio* L.) exposed to cadmium. *Physiol Res (Prague)*, 1997, 46(5):391-396
- 17 Doyotte A, Cossu C, Jacquin M, et al. Antioxidant enzymes, glutathione and lipid peroxidation as relevant biomarkers of experimented of field exposure in the gills and the digestive gland of the fresh water bivalve *Unio tumidus*. *Aquatic Toxicology*, 1997, 39(2):93-110
- 18 Brouwer M, Bronwer T H. Biochemical defense mechanisms against copper include oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Arch Biochem Biophys*, 1998, 351(2):257-264
- 19 Okamoto O K, Colepicolo P. Response of superoxide dismutase to pollutant metal stress in the marine dinoflagellate *Gonyaulax polyedra*. *Comp Biochem Physiol Part C: Pharmacol, Toxicol, Endocrinol*, 1998, 119C(1):67-73
- 20 Regoli F. Trace metals and antioxidant enzymes in gills and digestive gland of the mediterranean mussels *Mytilus galloprovincialis*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1998, 34:48-63
- 21 Reddy P, Sreenivasula G. Modulations in antioxidant enzymes in the gill and hepatopancreas of the edible crab *Scylla serrata* during exposure to cadmium and copper. *Fresenius Environ Bull*, 1997, 6(9 & 10):589-597
- 22 Parihar M S, Javeri T, Hemnani T, et al. Responses of superoxide dismutase, glutathione peroxidase and reduced glutathione antioxidant defense in gills of the fresh water catfish (*Heteropneustes fossilis*) to short term elevated temperature. *J Therm Biol*, 1997, 22(2):151-156
- 23 蔡完其. 罗氏沼虾莫格球拟酵母病的病理研究. *水产学报*, 1996, 20(1):14-16
- 24 刘恒, 李光友. 免疫多糖对养殖南美白对虾作用的研究. *海洋与湖沼*, 1998, 29(2):113-118
- 25 Javanovic A, Grubor Lajsic G, Djukic G, et al. The effect of selenium on antioxidative system in erythrocytes and liver of the carp (*Cyprinus carpio*). *Crit Rev Food Sci Nutr*, 1997, 37(5):443-448
- 26 孟繁伦, 马桂容, 孔建. 养殖中国对虾益生菌制品的研究. *山东大学学报*, 1998, 33(1):101-105
- 27 Otto D M E, Sen C K, Hiddiroglou N, et al. Role of exogenous glutathione in teleost fish and exposed to 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl. *Fish Physiol Biochem*, 1997, 16(6):449-457

(本文编辑:刘珊珊)