

久效磷对单环刺螠体内几种酶活性影响的初步研究

邱旭春, 朱丽岩, 刘光兴

(中国海洋大学 海洋生命学院, 海洋环境与生态教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

摘要: 运用冰冻切片技术和酶组织化学的方法研究了长期暴露于不同质量浓度久效磷(0, 50, 100, 150 ng/L)下的单环刺螠(*Urechis unicinctus*)体内的乙酰胆碱酯酶(AChE)、细胞色素C氧化酶(CCO)、碱性磷酸酶(AKP)的活性变化。实验表明, AChE在单环刺螠的体壁上呈现出较强的酶活性, 活性位点处为红棕色的颗粒沉淀, 并随久效磷胁迫浓度的提高显色越来越深; 消化道切片上基本上没有AChE的活性。CCO在单环刺螠的体壁及肠道上都呈现出较强的酶活性, 活性位点显示为棕色; 肠道上, 不同质量浓度组由低到高其CCO活性位点依次增多、显色也依次加深。低质量浓度久效磷(<150 ng/L)胁迫对单环刺螠体内的AKP活性没有明显的影响。

关键词: 久效磷; 单环刺螠(*Urechis unicinctus*); 乙酰胆碱酯酶(AChE); 细胞色素C氧化酶(CCO); 碱性磷酸酶(AKP); 酶活性

中图分类号: Q55; X5031.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3096(2006)09-0042-06

久效磷(monocrotophos)是中国农业生产中大量使用的一种有机磷农药, 化学名称为0,0-二甲基-0-[1-甲基-3-(甲基氨基甲酰)]乙烯基磷酸酯。久效磷可随地下水或地表水进入海水中, 是近岸海域的主要污染物之一, 1986年在青岛胶州湾曾发生有机磷农药污染使几百公顷对虾死亡的事故。目前, 关于久效磷对海洋生物的毒性效应已有不少报道^[1-3], 但关于久效磷对单环刺螠毒性作用的研究尚未见报道。

单环刺螠(*Urechis unicinctus*), 属螠虫动物门, 螠纲, 无管螠目, 刺螠科, 主要分布在中国、日本、韩国和俄罗斯等沿海, 是泥沙岸潮间带下区及潮下带浅水区常见的种类^[4,5]。单环刺螠个体肥大, 肉味鲜美, 体壁肌富含蛋白质和多种人体必需氨基酸, 有较高的经济价值, 是一种极有养殖开发前景的海洋动物资源。同时, 该动物材料易得, 在实验室内易于培养, 是较好的实验动物。作者运用冰冻切片技术和酶组织化学的方法探讨了低浓度长时间条件下久效磷对单环刺螠的毒性效应, 以期寻找一个可以简便、可靠的检测海洋环境中久效磷污染程度的方法, 并为深入开展有机磷农药对海洋生态系统影响的研究提供基础

资料。

1 材料和方法

1.1 实验用水和饵料培养

实验用水取自青岛沙子口的砂滤海水, 先经300目筛绢过滤, 最后调盐度至20±1。

饵料为三角褐指藻(*Phaeodactylum tricornutum* Bohlin)和亚心形扁藻(*Platymonas subcordiformis*)。藻种均用f/2培养基培养至对数生长期待用。

1.2 实验药品和仪器

实验用久效磷为青岛农药厂生产, 分子式为C₇H₁₄O₅NP。碘化硫代乙酰胆碱为Fluka产品, 细胞

收稿日期: 2005-10-10; 修回日期: 2006-06-21

基金项目: 国家高技术研究发展计划(863计划)资助项目(2001-AA649040); 国家教育部科学技术研究重点项目(02132)

作者简介: 邱旭春(1981-), 男, 山东临沂人, 硕士研究生, 主要从事海洋浮游动物研究, 电话: 0532-82031922, E-mail: xuchun_qiu@yahoo.com.cn; 刘光兴, 通讯作者, 电话: 0532-82032939, E-mail: gxingliu@yahoo.com

色素 C 和过氧化氢酶均为 Sigma 产品。其余药品均为国产分析纯试剂。

1.3 实验动物的采集和培养

实验用单环刺螠于 2004 年 11 月取自莱西, 选取健康个体暂养后备用。体长 4.0~5.0 cm, 体质量 9.29 g±2.14 g。

实验中, 单环刺螠于 20 °C 控温培养, 自然光照, 单胞藻混合饵料(亚心形扁藻:三角褐指藻为 1:1)投喂量为 10×10^4 个/mL。

1.4 实验方法

实验设定久效磷的质量浓度梯度为: 0, 50, 100, 150 ng/L。每组 2 个平行样, 每缸底有不同质量浓度的久效磷海水溶液 4 L (缸底铺 2.0 cm 厚的细沙), 放入单环刺螠 15 只, 隔天换水, 培养 45 d 取出进行冰冻切片实验。

取单环刺螠活体, 解剖出体壁及肠道, 切成 6~7 mm 左右的组织块, 新鲜组织使用 OCT 冰冻切片包埋剂包埋, LEICA-CM1900 冰冻切片机切片, 厚 7 μ m, 进行组织化学研究 (表 1)。

表 1 冰冻切片的组织化学方法

Tab. 1 The histochemical methods on the frozen sections

方法	出处	显示成分	固定液	对照
亚铁氰化铜法	文献[6]	AChE	—	孵育液不加碘化硫代乙酰胆碱
DBA 法	文献[7]	CCO	—	孵育液加入 1 mmol/L 叠氮化钠
钙钴法	文献[8]	AKP	中性福尔马林, 4°C	90 °C 的水处理 10 min

2 结果

2.1 乙酰胆碱酯酶

乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)在单环刺螠的体壁上呈现出较强的酶活性, 活性位点处为红棕色的颗粒沉淀, 同一张切片上, 体壁表皮层、外环肌层和内斜肌层活性位点显色略深, 纵肌层和内环肌层的活性位点显色略浅; 各浓度组活性部位显色由深到浅依次为: 0, 50, 100, 150 ng/L (图 1-1, 1-2, 1-3, 1-4)。肠道上基本上没有 AChE 的活性位点。

2.2 细胞色素 C 氧化酶

在单环刺螠的体壁和肠道的切片上都具有细胞色素 C 氧化酶(Cytochrome C Oxidase, CCO)的显色位点, 阳性产物为棕色沉淀。体壁切片上的显色位点集中在体壁表皮层、外环肌层、内环肌层及纵肌层外侧小部分区域 (图 1-5, 1-6, 1-7, 1-8); 在肠道上, 不同质量浓度组由低到高活性位点依次增多、显色也依次加深 (图 2-1, 2-2, 2-3, 2-4)。

2.3 碱性磷酸酶

碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, AKP)主要在单环刺螠消化道切片上具有较强的活性, 在这些部位显很深的黑色。不同浓度组的显色深浅比较不出明显差异 (图 2-5, 2-6, 2-7, 2-8)。

3 讨论

3.1 AChE

AChE 作为生物神经传导中的一种关键酶, 主要位于突触后膜, 邻近胆碱受体, 能降解乙酰胆碱, 终止神经递质对后膜的刺激作用, 保证神经冲动在突触间正常传导^[9]。本实验中, 久效磷对 AChE 起到了明显的抑制作用, 并随着久效磷胁迫浓度的增加而呈现抑制作用加强的正相关性。表现为肉眼可见的酶活性位点的显色逐渐变浅。

目前, 动物体内 AChE 的活性是衡量有机磷农药中毒程度的重要指标。有机磷农药对 AChE 的抑制机理是通过对 AChE 活性部位的丝氨酸磷酸化, 生成不可逆的磷酸化酶, 从而阻碍对乙酰胆碱的水解作用, 造成神经递质乙酰胆碱在突触中的积累, 随之产生突触后膜去极化, 使神经传导不能进行, 最终导致神经传导功能紊乱^[10,11]。

有关有机磷农药对 AChE 的抑制作用在棉铃虫^[12]、真鲷^[13]和鲈鱼^[14]等的研究中也有关报道。可见, 在动物体内, 通过对其体内 AChE 的抑制作用而导致神经紊乱、最终影响动物的生活和生存是久效磷对动物毒性作用的一个重要机理。

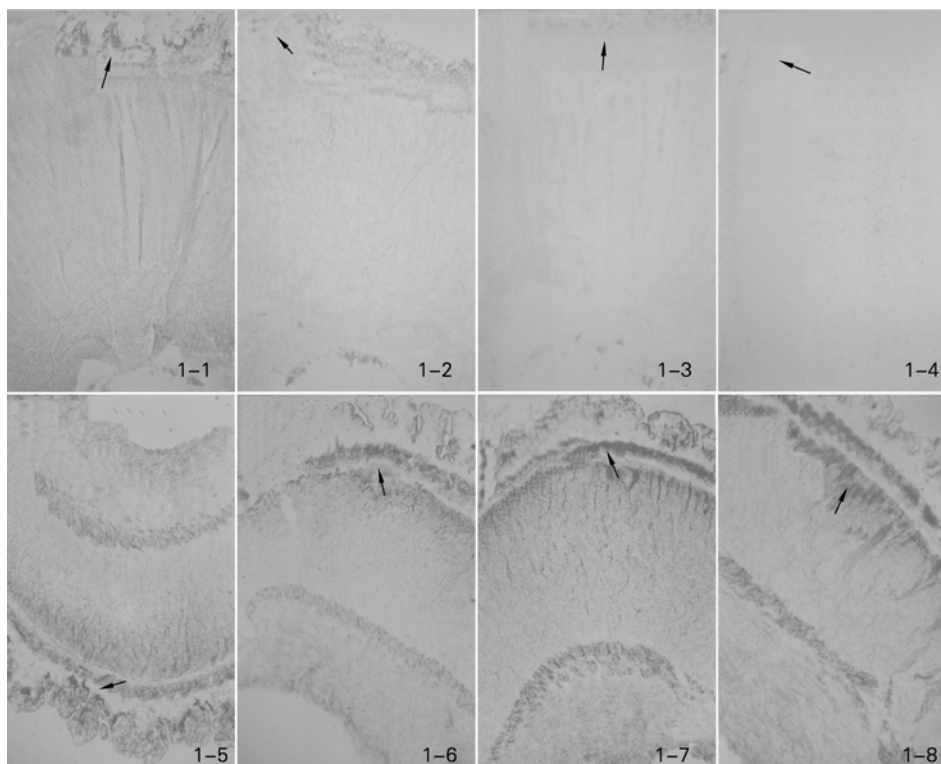


图1 久效磷对单环刺螠体壁 AChE 和 CCO 活性的影响

Fig.1 The effects of monocrotophos on AChE and CCO activities in the muscle

1-1. 对照组体壁切片 AChE 的显色位点[↑]; 1-2. 50 ng/L 久效磷胁迫组体壁 AChE 的显色位点[↑]; 1-3. 100 ng/L 久效磷胁迫组体壁 AChE 的显色位点[↑]; 1-4. 150 ng/L 久效磷胁迫组体壁 AChE 的显色位点[↑]; 1-5. 对照组体壁 CCO 的显色位点[↑]; 1-6. 50 ng/L 久效磷胁迫组体壁 CCO 显色位点[↑]; 1-7. 100 ng/L 久效磷胁迫组体壁 CCO 的显色位点[↑]; 1-8. 150 ng/L 久效磷胁迫组体壁 CCO 的显色位点[↑]; 标尺: 300 μm

1-1. Sections of muscle of control group showing AChE activity[↑]; 1-2. Sections of muscle of 50 ng/L monocrotophos exposed group showing AChE activity[↑]; 1-3. Sections of muscle of 100 ng/L monocrotophos exposed group showing AChE activity[↑]; 1-4. Sections of muscle of 150 ng/L monocrotophos exposed group showing AChE activity[↑]; 1-5. Sections of muscle of control group showing CCO activity[↑]; 1-6. Sections of muscle of 50 ng/L monocrotophos exposed group showing CCO activity[↑]; 1-7. Sections of muscle of 100 ng/L monocrotophos exposed group showing CCO activity[↑]; 1-8. Sections of muscle of 150 ng/L monocrotophos exposed group showing CCO activity [↑]; Bar: 300μm

3.2 CCO

CCO 是真核生物线粒体内膜和需氧菌细胞膜电子传递链上的终端酶。它承担着细胞色素 C 到氧分子的电子传递功能,催化氧分子还原为水分子,并与质子泵功能相偶联。它反映了细胞功能及有氧代谢的水平,多年来一直是生物能学学者研究的对象。在本实验中随着久效磷的浓度的增加,暴露在其中的单环刺螠的组织切片上 CCO 的活性位点增多、显色也逐渐

加深。

有关久效磷对海洋无脊椎动物细胞超微结构的影响已有相关报道。汝少国等^[15]在对中国明对虾鳃细胞超微结构的透射电镜观察中发现:经 0.10 mg/L 久效磷处理的中国明对虾,其鳃丝细胞的线粒体的内嵴膨胀,局部瓦解乃至解体。郝欣等^[16]在研究久效磷对雄性金鱼的生殖毒性时也发现经过 0.1 mg/L 久效磷暴露,金鱼精子头部质膜溶解及颈部线粒体有溶解现

象。白洁等^[17]研究发现久效磷胁迫可降低中国对虾体内超氧化物歧化酶(SOD)活力,且随药物浓度的增加和胁迫时间的延长,降低作用不断增强;SOD活力的降低可引起机体超氧阴离子自由基(O_2^-)的积累,导致机体的自由基损伤。另外,唐学玺等^[18]在研究久效磷对海洋微藻毒性机理时发现,久效磷胁迫下微藻细胞体内的SOD及过氧化物酶(POD)活性受到抑

制并产生过量的活性氧自由基,进而引起膜脂过氧化及细胞膜伤害。根据上述的文献和本实验的结果,推测引起本实验现象的原因可能是由于久效磷由低到高浓度的胁迫作用依次加重,使得单环刺螠体内细胞线粒体受损也越来越严重,线粒体内的CCO外泄增加,使得CCO活性位点增多、显色也逐渐加深。可见,久效磷对单环刺螠的毒性作用不仅表现为对胆碱

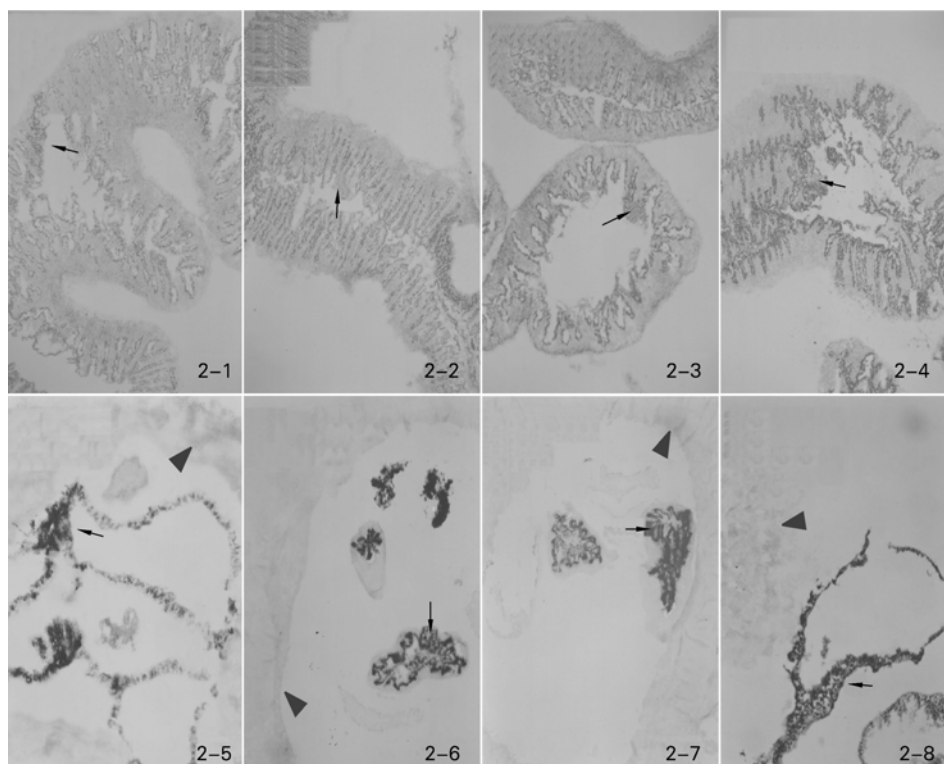


图2 久效磷对单环刺螠消化道CCO和AKP活性的影响

Fig.2 The effects of monocrotophos on CCO and AKP activities in the digestive tract

2-1. 对照组消化道CCO的显色位点[↑]; 2-2. 50 ng/L久效磷胁迫组消化道CCO显色位点[↑]; 2-3. 100 ng/L久效磷胁迫组消化道CCO的显色位点[↑]; 2-4. 150 ng/L久效磷胁迫组消化道CCO的显色位点[↑]; 2-5. 对照组消化道AKP的显色位点[↑]; 2-6. 50 ng/L久效磷胁迫下单环刺螠消化道切片上AKP显色位点[↑]; 2-7. 100 ng/L久效磷胁迫组消化道AKP显色位点[↑]; 2-8. 150 ng/L久效磷胁迫组消化道AKP显色位点[↑]; 标尺: 300 μm; “▲”示伊红复染着色组织的细胞质

2-1. Sections of digestive tract of control group showing CCO activity[↑]; 2-2. Sections of digestive tract of 50 ng/L monocrotophos exposed group showing CCO activity[↑]; 2-3. Sections of digestive tract of 100 ng/L monocrotophos exposed group showing CCO activity[↑]; 2-4. Sections of digestive tract of 150 ng/L monocrotophos exposed group showing CCO activity[↑]; 2-5. Sections of digestive tract of control group showing AKP activity[↑]; 2-6. Sections of digestive tract of 50 ng/L monocrotophos exposed group showing AKP activity[↑]; 2-7. Sections of digestive tract of 100 ng/L monocrotophos exposed group showing AKP activity[↑]; 2-8. Sections of digestive tract of 150 ng/L monocrotophos exposed group showing AKP activity[↑]; Bar: 300 μm; “▲” shows the cytoplasm stained by eosin

酯酶的抑制,还可能通过对其体内的 SOD 等的抑制而引起细胞器质性的损伤,进而影响代谢。关于引起细胞器质性损伤的机理,还有待进一步研究。

3.3 AKP

AKP 是一种膜结合蛋白,在生物体内直接参与磷酸基团的转移和代谢的生理过程,与维持体内适宜的钙磷比相关。AKP 常见于运输活跃的膜上,如毛细血管内皮,肾近曲小管刷状缘和肠上皮的纹状缘等。本实验中也发现 AKP 主要在单环刺螠的肠道中具有较强的活性,在这些部位显很深的黑色。

不同动物的 AKP 活性可受到铜、锌、镉等金属离子^[19]、某些有机物^[20]和三丁基锡^[21]等物质的影响,但关于久效磷是否对水生动物体内的 AKP 有影响,尚未见报道。本实验中 3 个实验组的单环刺螠 AKP 活性位点及显色的深浅与对照组没有明显的差异,说明在所设定的浓度范围内,螠虫体内 AKP 的活性与久效磷胁迫浓度没有明显的相关性。另外,杨远和等^[22]的研究也有类似的结论:在水胺硫磷(有机磷的一种)对人皮肤表皮细胞膜完整性的影响的实验中也发现随着染毒剂量的增加,各组培养基中的 AKP 活性无显著性差异。

3.4 小结

(1) 久效磷对 AChE 有极强的抑制作用,低于 150 ng/L 的久效磷胁迫就会使单环刺螠体内的 AChE 的活性显著降低。(2) 单环刺螠体内的 CCO 的活性在实验浓度(0~150 ng/L)范围内随久效磷浓度的升高有增加的趋势。(3) 实验浓度(0~150 ng/L)范围内久效磷胁迫对单环刺螠体内的 AKP 活性没有明显的影响。

参考文献:

- [1] 邴欣,汝少国,姜明,等.久效磷对真鲷鳃、肝和肾细胞超微结构的影响[J].海洋科学,2002,26(9):42-45.
- [2] 蔡恒江,唐学玺,张培玉,等. UV-B 辐射和久效磷对三角褐指藻 DNA 共同伤害效应[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版),2004,34(6):993-996.
- [3] 马绍赛,曲克明.3 种工业废水对中国对虾幼体及仔虾的急性毒性效应[J]. 中国水产科学,2004,11(3):220-224.
- [4] 李凤鲁,王玮,周红.我国黄渤海螠虫动物(螠虫动物门)的研究[J].青岛海洋大学学报,1994,24(2):203-210.
- [5] 李诺,宋淑莲,唐永政.单环刺螠[J].生物学通报,1998,33(8):12-14.
- [6] 陈啸梅,周文郁,彭俊云,等.组织化学手册[M].北京:人民卫生出版社,1982.172-175.
- [7] 陈啸梅,周文郁.组织化学手册(第一版)[M].北京:人民卫生出版社,1982.409.
- [8] 芮菊生,杜懋琴,陈海明,等.组织切片技术(第一版)[M].北京:高等教育出版社,1980.261.
- [9] Murty A S, Ramani A V. Toxicity of anticholinesterases to aquatic toxicology[A]. Marrs B, Stoneham T C. Clinical and Experimental Toxicology of Organophosphates and Carbamates[C]. Ballantyne, MA, USA: Butterworth-Heinemann, 1992.305-320.
- [10] Forget J, Bocquené G. Partial purification and enzymatic characterization of acetylcholinesterase from the intertidal marine copepod *Tigriopus brevicornis* [J]. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B**, 1999, 123: 345-350.
- [11] Mileson B E, Chambers J E, Chen W L, et al. Common Mechanism of Toxicity: A. Case Study of Organophosphorus Pesticides[J]. **Toxicological Sciences**, 1998, 41: 8-20.
- [12] 任晓霞,韩召军,王荫长.对久效磷抗性棉铃虫品系的选育及其乙酰胆碱酯酶的研究[J].南京农业大学学报,2001,24(1):47-50.
- [13] 朱小山,孟范平,杨正先.5 种海鱼脑 AChE 对 2 种有机磷农药的敏感性比较[J].上海环境科学,2003,22(8):581-525.
- [14] 陈仪取,冯涛,郭祥群.3 种农药对花鲈抗氧化酶和乙酰胆碱酯酶影响的研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版),2004,43(6):828-832.
- [15] 汝少国,李永祺,刘晓云,等.久效磷对中国对虾细胞超微结构的影响Ⅲ:对鳃的毒性效应[J].应用生态学报,1997,8(6):655-658.
- [16] 邴欣,汝少国,姜明,等.久效磷对雄性金鱼的生殖毒性研究[J].中国海洋大学学报,2004,34(1):69-74.
- [17] 白洁,李岩然,唐学玺,等.久效磷对中国对虾体内 SOD 活力影响的初步研究[J]. 海洋通报,1998, 17(4):42-45.
- [18] 唐学玺,李永祺.4 种海洋微藻对久效磷的抗性与其抗氧化能力的相关性[J].海洋与湖沼,2000,18(2): 204-207.
- [19] 汤鸿,李少菁,王桂忠,等.铜、锌、镉对锯缘青蟹仔蟹代谢酶活力影响的实验研究[J]. 厦门大学学报(自然科学版).2000,39(4):521-525.
- [20] 郑文竹,黄璜,刘晓丹,等.乙醇对锯缘青蟹碱性磷酸酶活力与构象的影响[J]. 台湾海峡,2000, 19(4):489-493.
- [21] 郑榕辉,王重刚,李岩,等.三丁基锡暴露对褐苔虫碱性磷酸酶活性的影响[J]. 厦门大学学报(自然科学版)

版),2005,44(增刊):203-206.

性的影响[J].华西医科大学学报,2001, 32(2):286-287,246.

[22] 杨远和,周梅,张恒,等.水胺硫磷对人皮肤表皮细胞膜完整

The effects of monocrotophos on several enzyme activities in *Urechis unicinctus*

QIU Xu-chun, ZHU Li-yan , LIU Guang-xing

(College of Marine Life Sciences, Ocean University of China, Key Lab of Marine Environmental Science and Ecology, Ministry of Education, Qingdao 266003, China)

Received: Oct., 10, 2005

Key words: monocrotophos; *Urechis unicinctus*; acetylcholinesterase(AChE); cytochrome C oxidase(CCO); alkaline phosphatase(AKP); enzyme activity

Abstract: In this paper, *Urechis unicinctus* was exposed to different concentrations of monocrotophos (0, 50, 100, 150 ng/L) for 45 days. The technique of frozen section was used to examine the changes of activities of acetylcholinesterase (AChE) and cytochrome C oxidase (CCO) and alkaline phosphatase (AKP). Results revealed that monocrotophos stress could decrease the AChE activities in the muscle of *U. unicinctus* and it was found that the activity of CCO in digestive tract became more active when the concentration of monocrotophos was higher. No significant effects were observed on the activity of AKP exposed to 50, 100 and 150 ng/L monocrotophos.

(本文编辑:刘珊珊)