

环境因子对栉孔扇贝血淋巴中谷胱甘肽转硫酶活性的影响

王宜艳, 孙虎山, 周彦菊, 闫冬春, 王 磊

(鲁东大学 生命科学学院, 山东 烟台 264025)

摘要: 采用分光光度法研究了环境因子对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)血淋巴中谷胱甘肽转硫酶(GST)活性的影响。结果表明, 血清和血细胞中都存在 GST, 且血细胞中酶活力高于血清。血细胞中 GST 的适宜温度范围是 20~35℃, 最适温度为 30℃, 在 60℃时酶活力完全丧失。该酶的最适 pH 为 7~8, 最适 pH 为 7.5。将血细胞裂解液在不同温度水浴中放置 30 min 后, GST 的热稳定性随温度的升高而降低, 35℃时的酶活力为 20℃的 22%, 显示该酶的热稳定性较差; 低温下该酶的稳定性也较差, 4℃存 12 h 后酶活力丧失了 51%。 Cu^{2+} 和 Pb^{2+} 对 GST 活力有显著抑制作用, 在 0~2.5 mg/L 质量浓度范围内, GST 活力随 Cu^{2+} 质量浓度的升高而降低; 在 0~5 mg/L 质量浓度范围内, GST 活力随 Pb^{2+} 质量浓度的增大而下降。

关键词: 栉孔扇贝(*Chlamys farreri*); 血淋巴; 谷胱甘肽转硫酶; 酶活力

中图分类号: Q959.215

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)10-0052-05

谷胱甘肽转硫酶(Glutathione S-transferases, GST, EC2.5.1.18), 也称为不含硒谷胱甘肽过氧化物酶(nonSeGPx), 是一组多功能同功酶, 其主要功能是催化谷胱甘肽(GSH)与各种内源性和外源性有害的亲电子化合物反应, 生成无毒性或毒性小的 GSH 硫结合物; 同时能催化有机过氧化物还原成相应的醇, 与硒谷胱甘肽过氧化物酶(SeGPx)协同作用起抗氧化作用^[1]。软体动物的双壳类、腹足类和头足类的鳃、足、外套膜和消化腺等组织中都广泛存在着 GSH 及其相关酶(SeGPx、GST 和谷胱甘肽还原酶等), 并在其抗氧化和解毒中起重要作用^[2-5]。近 10 年来, 国外有关贝类体内 GST 的研究报道较多, 多集中在重金属、杀虫剂和石油污染物等对 GST 等抗氧化因子和生物异源物质代谢系统的影响^[2,6-13], 对 GST 等抗氧化因子的季节变化也有研究报道^[14-16], 研究的主要热点是探讨 GST 等抗氧化因子在应激状态下的作用及作为环境污染的生物标志物的可行性; 国内有关贝类 GSH 及其相关酶的研究报道极少^[17-18]。对贝类体内 GST 性质的研究国内外均未见研究报道。作者以人工养殖的栉孔扇贝(*C. farreri*)为材料, 采用生化测定的方法对其血淋巴中 GST 活性及部分性质进行了初步研究, 以期对贝类防御机理的研究积累资料, 也为贝类体内 GST 的功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

栉孔扇贝购自烟台水产市场, 壳长 40~50 mm, 暂养于室内充气的砂滤海水水族箱内。还原型谷胱甘肽、1-氯-2,4-二硝基苯(CDNB)等试剂均为国产分析纯产品。

1.2 血清和血细胞的制备

用 5 mL 注射器和 5 号针头从栉孔扇贝闭壳肌血窦中抽取血淋巴, 每次实验取 5 只扇贝的血淋巴混合作为样品, 4℃、3500 r/min 离心 10 min, 取上清即血清用于血清中 GST 活力的测定。下层沉淀即血细胞中加入与血清等量的双蒸水低渗溶血后, 4℃、6000 r/min 离心 10 min, 取上清液即血细胞裂解液用于血细胞中 GST 活力的测定。样品制备后立即用于酶活测定, 未用完的血样品置于 4℃冰箱中保存不超过 12 h。

1.3 GST 活力测定

GST 活力测定采用 CDNB 比色法^[8], 略有改进。对照管中依次加入 0.1 mol/L、pH 6.5 的磷酸缓冲液

收稿日期: 2011-07-10; 修回日期: 2011-08-22

基金项目: 山东省自然科学基金项目(ZR2010CM017)

作者简介: 王宜艳(1964-), 女, 山东威海人, 教授, 主要从事无脊椎动物免疫学研究, E-mail: yiyanyang@163.com

(PBS)0.1 mL、10 mmol/L 的 GSH 0.1 mL 及 1.25 mmol/L 的 CDNB 0.8 mL, 测定管中以等量血样品取代 PBS, 25℃恒温下准确反应 5 min; 然后在对照管中依次加入 10%的盐酸 0.1 mL、血样品 0.1 mL、蒸馏水 1.8 mL, 测定管中用等量 PBS 取代血样品; 1 cm 石英比色皿、340 nm 下以对照管作空白, 读取测定管的吸光度。测定管设 5 个平行组。采用 Lowry 等^[10] 的福林-酚试剂法测定样品中的蛋白质含量。酶活力单位的定义: 每毫克蛋白每分钟催化生成 1 μmol 产物所需要的酶量为 1 个酶活力单位(U)。数据处理采用 *T* 检验。

1.4 GST 性质的研究

1.4.1 温度及 pH 对血细胞中 GST 活力的影响

以 0.1 mol/L、pH 6.5 的 PSB 为缓冲液, 分别在 5、10、15、20、25、30、35、40、60℃的反应条件下测定酶活力, 以测定温度对血细胞中 GST 活力的影响。

以 25℃为测定温度, 分别以 pH 5、5.5、6、7、7.5 和 8 的 0.1 mol/L 的 PBS 为缓冲液, 测定 pH 对血细胞中 GST 活力的影响。

1.4.2 血细胞中 GST 的热稳定性

将血细胞裂解液分别在 20、25、30、35℃恒温中放置 30 min 后; 在 4℃中分别保存 12、24 h 后, 以 0.1 mol/L、pH 6.5 的 PBS 为缓冲液, 25℃测该酶的反应速率, 以测定该酶的热稳定性。

1.4.3 金属离子铜、铅对血细胞中 GST 活力的影响

分别以硫酸铜和硝酸铅为抑制剂, 以 0.1 mol/L、pH 6.5 的柠檬酸-柠檬酸钠为缓冲液, 分别配制铜、铅离子终质量浓度为: 0、0.05、0.25、0.5、2.5、5 mg/L 的反应液, 在 25℃测得该酶的反应速率。

2 结果

2.1 血清和血细胞中 GST 活力

栉孔扇血清和血细胞中 GST 活力的测定结果见表 1。由表 1 可见, 栉孔扇贝血清和血细胞中均存在

表 1 栉孔扇贝血清和血细胞中 GST 活力

Tab 1 Activity of Glutathione S-transferases in the haemolymph of *C. farreri*

样品	血细胞	血清
酶活力 (U)	193.12 $\pm$ 6.81	15.91 $\pm$ 2.62

注: *n*=5, pH 6.5 的 PBS 为缓冲液, 25℃, 酶活力值为平均值 $\pm$ 标准差

GST, 血细胞中 GST 活力远高于血清中的, 是血清中的 12 倍。

2.2 温度对血细胞中 GST 活力的影响

温度对血细胞中 GST 活力影响的测定结果见图 1。结果表明: 随温度的升高酶活力出现先升后降的趋势, 该酶的最适温度范围为 20~35℃。GST 在 5℃的低温下活力很低, 仅为 48.14 U, 10℃时活力有所升高, 15℃时活力快速升高, 为 5℃时的 3 倍多; 30℃时酶活力达最高值, 后随温度的继续升高而下降, 35℃时活力较 30℃下降了 20%, 40℃时其活力只有 30℃时的 23%, 60℃时该酶已完全丧失活力。

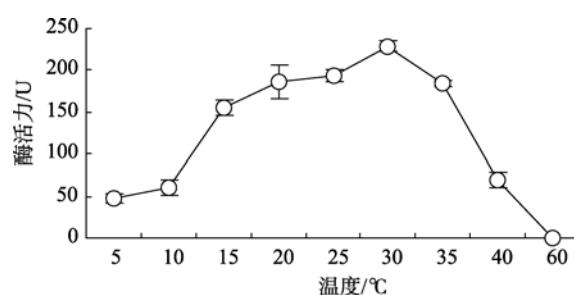


图 1 温度对栉孔扇贝血细胞中 GST 活力的影响

Fig. 1 Effects of temperature on GST activity in haemocytes of *C. farreri*

2.3 pH 对血细胞中 GST 活力的影响

pH 对血细胞中 GST 活力影响的测定结果见图 2。结果表明: pH 为 5 时 GST 活力较低仅为 62.31 U, pH 为 5.5 和 6 时, 酶活力有所升高, 但变化不明显; pH 为 7.5 时酶活力达最高值, 为 240.06 U。pH 为 7 和 8 时酶活力分别达到最高值的 61%和 76%。该酶的适宜 pH 为 7~8, 最适 pH 为 7.5。

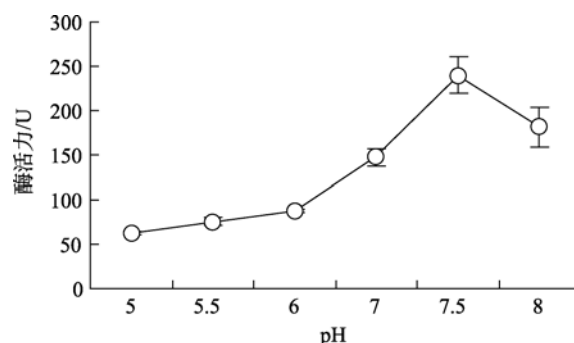


图 2 pH 对栉孔扇贝血细胞中 GST 活力的影响

Fig. 2 Effects of pH on GST activity in haemocytes of *C. farreri*

2.4 血细胞中 GST 的热稳定性

4℃时血细胞中 GST 稳定性的测定结果见图 3。结果表明: 4℃时 GST 活力随保存时间的延长而下降。4℃保存 12 h 后 GST 活力已下降了 51%, 4℃保存 24 h 后酶活力仅有原活力的 32%。说明此酶在低温中保存也易失活, 低温保存时间最好不要超过 12 h。

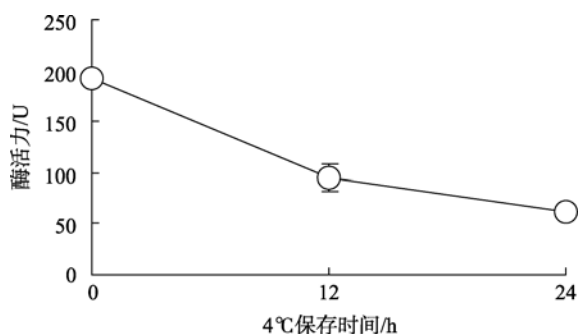


图 3 4℃时栉孔扇贝血细胞中 GST 的稳定性

Fig. 3 Stabilities of GST in haemocytes of *C. farreri* in 4℃

血细胞中 GST 热稳定性的测定结果见图 4。结果表明: 血细胞裂解液在不同温度下保温 30 min 后, 该酶随温度的升高活力逐渐降低, 35℃时酶的活力显著降低, 为 20℃时的 22%, 为 30℃的 29%。因此, 该酶热稳定性较差。

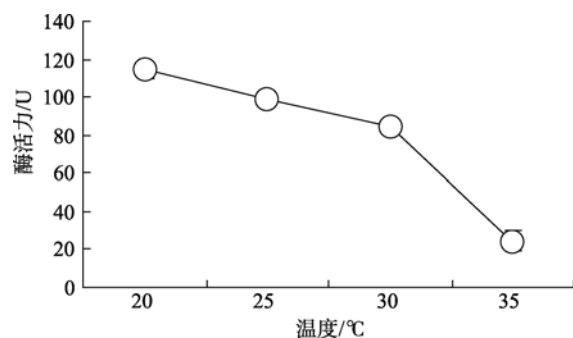


图 4 栉孔扇贝血细胞中 GST 的热稳定性

Fig. 4 Heat stabilities of GST in haemocytes of *C. farreri*

2.5 铜和铅离子对血细胞中 GST 活力的影响

Cu^{2+} 对血细胞 GST 活力影响的测定结果见图 5。结果表明: Cu^{2+} 对该酶活力有明显抑制作用, 随着 Cu^{2+} 质量浓度的升高抑制作用增强。 Cu^{2+} 质量浓度为 0.25 mg/L 该酶活力较对照组已下降了近 40%; 当 Cu^{2+} 质量浓度升高到 0.5 mg/L 时其活力较对照组下降了 78%; 当 Cu^{2+} 质量浓度升高到 2.5 mg/L 时酶活

力已接近 0。

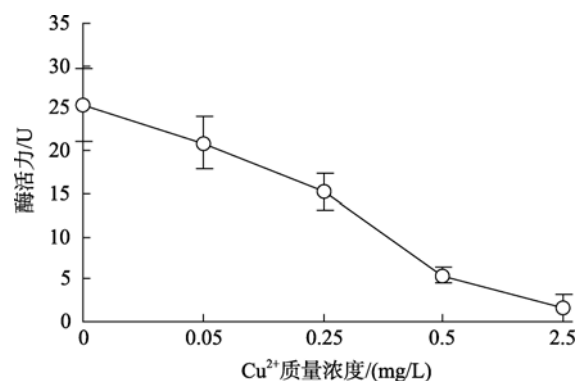


图 5 Cu^{2+} 对栉孔扇贝血细胞中 GST 活力的影响

Fig. 5 Effects of Cu^{2+} on GST activity in haemocytes of *C. farreri*

Pb 离子对血细胞 GST 活力影响的测定结果见图 6。结果表明: Pb^{2+} 对 GST 活力也有明显抑制作用, 随着 Pb^{2+} 质量浓度的升高抑制作用增强。 Pb^{2+} 为 0.05mg/L 时酶活力较对照组已下降了 51%; Pb^{2+} 质量浓度升高到 5mg/L 时该酶失活。

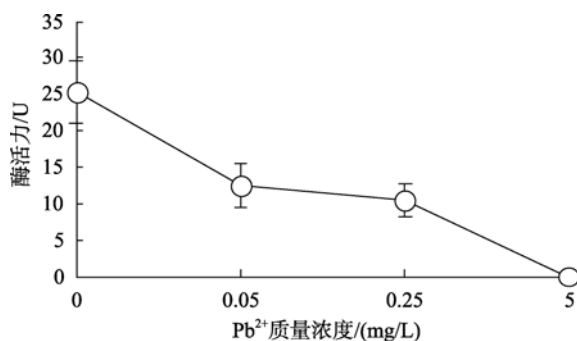


图 6 Pb^{2+} 对栉孔扇贝血细胞中 GST 活力的影响

Fig. 6 Effects of Pb^{2+} on GST activity in haemocytes of *C. farreri*

3 讨论

本实验结果表明, 栉孔扇贝血细胞 GST 的最适温度为 30℃, 较马素永等^[19]CDNB 法测得玉米螟 (*Ostrinia furnacalis*)GST 的最适温度 41℃为低; 尹登科等^[20]利用大肠杆菌表达日本血吸虫 (*Schistosoma japonicum*)GST 后, CDNB 法测得其最适作用温度为 37℃, 也高于本实验结果; 日本血吸虫 GST 对温度的稳定性也高于栉孔扇贝。玉米螟 GST 最适 pH 为 6.3 ~ 6.9, 日本血吸虫 GST 最适 pH 为 7.0, 均稍低于栉孔扇贝。GST 是一组多功能同功酶, 为由多种不同亚基构成的二聚体, 不同物种不同组织中可有不同

种类的 GST^[21], 因此, 在不同物种间可存在 GST 理化性质的差异。栉孔扇贝血细胞 GST 对温度的稳定性较差, 室温下对该酶操作易失活, 用于实验的样品在 4℃ 保存时间最好不要超过 12 h。栉孔扇贝不同组织中 GST 同工酶的分型、分布等有待于进一步的研究。本实验显示, 应用 CDB 法测定 GST 活力时, 缓冲液种类有影响作用, 同为 pH6.5 的缓冲液, 25℃ 为测定温度的条件下, 用 PBS 缓冲液较柠檬酸-柠檬酸钠缓冲液酶活力要高出近 8 倍, 其原因有待进一步研究。

贝类血细胞杀死被吞噬的病原菌等异物的主要机制之一是伴随吞噬引起的呼吸突发产生的具杀菌作用的超氧阴离子和 H₂O₂ 等活性氧, 活性氧对贝类机体也有毒害作用, 须及时清除。GSH 可通过巯基与体内自由基结合转化成容易代谢的酸性物质, 从而加速超氧阴离子、H₂O₂ 和脂质过氧自由基等自由基的排泄, 同时 GSH 又可通过 GST 发挥作用, 抑制脂质过氧化, 保护细胞膜恢复细胞功能, 并可保护细胞内含巯基的酶的活性, 防止因巯基氧化导致蛋白质变性, 减少自由基对 DNA 的攻击, 从而减少 DNA 损伤和突变^[3]。本文结果表明扇贝的血淋巴中含有 GST, 说明扇贝体内也存在 GST 和 GSH 清除自由基的免疫防御机制。

贻贝 (*Mytella guyanensis*) 等滤食性双壳贝类组织中的 GSH、GST、SeGPx 等对水中重金属离子等污染物比较敏感, 污染物含量高的组织中 GST 等的活力也较高^[11,13], 因此, 某些贝类体内的 GST 等可作为污染的生物标志物。但不同污染物对贝组织中 GST 活力的影响不同^[6], 已有报道显示不同质量浓度金属离子暴露实验对贝类 GST 活性影响无一致的规律, 有的显示 GST 活性无改变^[12], 有的显示 GST 活性降低^[10]。Hunaitia 等^[22]用不同质量浓度的氯化铅体外(37℃)孵育人全血 24 h 后, 血液中 GST 活性随 Pb⁺质量浓度升高而下降, 说明铅对 GST 活力抑制作用的存在。本实验结果显示, 金属离子铜和铅对栉孔扇贝血细胞 GST 活性有显著直接抑制作用。对贝类组织中 GST 性质尤其是抑制剂、激活剂的研究对 GST 作为污染的生物标志物的应用有一定的参考价值。

参考文献:

- [1] 陈瑗, 周玫. 自由基医学基础与病理生理[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 126-132.
- [2] Antognelli C, Francesca B, Andrea P, et al. Activity changes of glyoxalase system enzymes and glutathione-S transferase in the bivalve mollusc *Scapharca inaequivalvis* exposed to the organophosphate chlorpyrifos[J]. Pesticide Biochem Physiol, 2006, 86: 72-77.
- [3] Bebianno M J, Company R, Serafim A, et al. Antioxidant systems and lipid peroxidation in *Bathymodiolus azoricus* from Mid-Atlantic Ridge hydrothermal vent fields[J]. Aquat Toxicol, 2005, 75: 354-373.
- [4] Pannunzio T M, Storey K B. Antioxidant defenses and lipid peroxidation during anoxia stress and aerobic recovery in the marine gastropod *Littorina littorea*[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 221: 277-292.
- [5] Zielinski S, Pörtner H O. Oxidative stress and antioxidant defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? [J]. Comp Biochem Physiol, 2000, 125 B: 147-160.
- [6] Petushok N, Gabryelak T, Pałecz D, et al. Comparative study of the xenobiotic metabolising system in the digestive gland of the bivalve molluscs in different aquatic ecosystems and in aquaria experiments[J]. Aquat Toxicol, 2002, 61: 65-72.
- [7] Lau P S, Wong H L. Effect of size, tissue parts and location on six biochemical markers in the green-lipped mussel, *Perna viridis*[J]. Mar Pollut Bull, 2003, 46: 1563-1572.
- [8] Luca-Abbott S B D, Richardson B J, McClellan K E, et al. Field validation of antioxidant enzyme biomarkers in mussels (*Perna viridis*) and clams (*Ruditapes philippinarum*) transplanted in Hong Kong coastal waters[J]. Mar Pollut Bull, 2005, 51: 694-707.
- [9] Looise B A S, Holwerdu D A, Foekema E M. Induction of glutathione S transferase in the freshwater bivalve *Schizotha corneum* as a biomarker for short-term toxicity tests? [J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 113C(1): 103-107.
- [10] Regoli F, Nigro M, Orlando E. Lysosomal and antioxidant responses to metals in the Antarctic scallop *Adamussium colbecki*[J]. Aquat Toxicol, 1998, 40: 375-392.
- [11] Torres M A, Testa C P, Gáspari C, et al. Oxidative stress in the mussel *Mytella guyanensis* from polluted mangroves on Santa Catarina Island, Brazil[J]. Mar Pollut Bull, 2002, 44: 923-932.
- [12] Almeida E A D, Miyamoto S, Bainy A C D, et al. Protective effect of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase (PHGPx) against lipid peroxidation

- in mussels *Perna perna* exposed to different metals[J]. Mar Pollut Bull, 2004, 49: 386-392.
- [13] Cheung C C C, Zheng G J, Lam P K S, et al. Relationships between tissue concentrations of chlorinated hydrocarbons (polychlorinated biphenyls and chlorinated pesticides) and antioxidative responses of marine mussels, *Perna viridis*[J]. Mar Pollut Bull, 2002, 45: 181-191.
- [14] Bocchetti R, Regoli F. Seasonal variability of oxidative biomarkers, lysosomal parameters, metallothioneins and peroxisomal enzymes in the Mediterranean mussel *Mytilus galloprovincialis* from Adriatic Sea[J]. Chemosphere, 2006, 65: 913-921.
- [15] Borkovic S S, Saponjic J S, Pavlovic S Z. The activity of antioxidant defence enzymes in the mussel *Mytilus galloprovincialis* from the Adriatic Sea[J]. Comp Biochem Physiol, 2005, 141C: 366-374.
- [16] Power A, Sheehan D. Seasonal variation in the antioxidant defence systems of gill and digestive gland of the blue mussel, *Mytilus edulis*[J]. Comp Biochem Physiol, 1996, 114C(2): 99-103.
- [17] 陈荣, 郑微云, 余群, 等. 石油污染对僧帽牡蛎谷胱甘肽含量及相关酶活性的影响[J]. 海洋学报. 2003, 25(增 2): 226-230.
- [18] 杨海灵, 高波, 曾庆银, 等. 对生菊蛤谷胱甘肽转移酶的光谱研究[J]. 高等学校化学学报, 2003, 24(8): 1472-1476.
- [19] 马素永, 周先碗, 张廷芳. 玉米螟谷胱甘肽转硫酶的纯化及性质研究[J]. 北京大学学报(自), 1999, 35(4): 474-478.
- [20] 尹登科, 丁虹, 喻昕. 壳聚糖固定化谷胱甘肽转硫酶的研究[J]. 生物技术, 2004, 14(6): 17-19.
- [21] 聂立红, 王声涌, 胡毅玲. 谷胱甘肽硫-转移酶研究进展 [J]. 中国病理生理杂志, 2000, 16(11): 1240-1243.
- [22] Hunaiti A A, Soud M. Effect of lead concentration on the level of glutathione, glutathione S-transferase, reductase and peroxidase in human blood[J]. Sci Total Environ, 2000, 248: 45-50.

The effect of environmental factors on the activities of glutathione S-transferases in haemolymph of scallop *Chlamys farreri*

WANG Yi-yan, SUN Hu-shan, ZHOU Yan-ju, YAN Dong-chun, WANG Lei

(College of Life Science, Ludong University, Yantai 264025, China)

Received: Jul., 10, 2011

Key words: *Chlamys farreri*; haemolymph; glutathione s-transferases; enzyme activities

Abstract: The activities and properties of glutathione S-transferases (GST) in the haemolymph of *Chlamys farreri* were assayed with the spectrophotometric method of 1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (CDNB). Effects of pH, temperature, and heavy metal ions on the activities of GST in the haemocytes were studied. In addition, the thermal stability was also tested. GST activity was found in both serum and haemocytes of *Chlamys farreri*, and GST activity in the haemocytes was higher than that in the serum. The optimum temperature range of GST in the haemocytes was from 20°C to 35°C, with the optimum temperature at 30°C. GST lost its activity completely at the temperature of 60°C. At pH ranging from 7 to 8, the GST in the haemocytes showed higher activities, with the optimum pH at 7.5. After the lysate of haemocytes was incubated at different temperatures for 30 min, the activities of GST in the haemocytes became descending with the increasing of temperature. The activities value of GST at 35°C was only 22% of that at 20°C. Moreover, the activity of GST was very unstable even under low temperature. Being incubated at 4°C for 12h, GST lost 51% of its activities. Cu^{2+} and Pb^{2+} could inhibit the activities of GST. When the concentration of Cu^{2+} was below 2.5mg/L or Pb^{2+} was below 5mg/L, the activities of GST was descending with the increasing of heavy metal ions concentration.

(本文编辑: 梁德海)