

塔玛亚历山大藻对罗非鱼肝及鳃组织 ATP 酶活性的影响 *

周立红 陈学豪

(集美大学水产学院,水产生物技术研究所 厦门 361021)

提要 研究了罗非鱼 (*Tilapia mossambica*) 腹腔注射塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 毒素粗提液对鳃及肝组织的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性的影响,结果显示低浓度毒素粗提液对罗非鱼鳃及肝组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 有激活作用,高浓度则有抑制作用。

关键词 塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*), 麻痹性贝毒, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

中图分类号 X171.5 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3096(2003)12-0075-04

水产养殖业在沿海国家中通常占据重要地位。近几十年来,作为对捕捞业的重要补充,水产养殖业的发展十分迅速。但有害赤潮的发生使养殖业受到严重的威胁。其中麻痹性贝毒是一个重要因素。在亚太地区,从1934年到1994年间发生的赤潮对养殖业的危害事件中,麻痹性贝毒(PSP)事件占了41.7%,导致这些事件的主要是 *Pyrodinium bahamense* var. *compressum*, *Alexandrium tamarense*, *Gymnodinium catenatum* 等甲藻^[1]。其中又以塔玛亚历山大藻 (*Alexandrium tamarense*) 分布最广^[2]。

麻痹性贝毒是一类四氢嘌呤的衍生物。现在已经发现的毒素有20多种,根据R₄基团的不同可以分为4类,分别是氨基甲酸酯类毒素(Carbamate toxin),包括石房蛤毒素(STX),新石房蛤毒素(neoSTX),膝沟藻毒素1-4(GTX1-4);N-磺酰氨基类毒素(N-sulfcarbamoyl toxins),包括BI-2, CI-4;脱氨基类毒素(decarbamoyl toxin),包括dcSTX, dcneoSTX, dcGTX1-4;脱氧脱氨基类毒素(deoxydecarbamoyl toxins),包括doSTX, doGTX2, 3,最近又在一种蟹 *Zostera aeneus* 中检出了石房蛤毒素和新石房蛤毒素的N-羟基衍生物(N-hydroxycarbamoyl derivatives) hySTX和 hyneoSTX,可能是一类新的麻痹性贝毒毒素^[2]。由于 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 在低等、高等生物体内普遍存在,具有广泛的生态意义,在机体中起到至关重要的作用,并且是多种毒物攻击的靶点^[3]。因此在本次实验中作者采用检测染毒生物体兴奋性和分泌性组织中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的方法,对塔玛亚历山大藻对该酶的影响及机理进行分析。

1 材料与方法

1.1 塔玛亚历山大藻毒素粗提液

塔玛亚历山大藻由本实验室培养,培养条件为非无菌培养,f/2培养基;温度20℃±1℃;光照3000 lx;光暗比为12 h:12 h。取培养8 d的藻液离心10 min(4000 r/min)弃去上清液,加入等量0.05 mol/L醋酸与藻细胞沉淀混匀后,冻融多次,再以15000 r/min离心20 min去除藻壳,得到毒素粗提液。

1.2 仪器设备及试剂

1.2.1 仪器 (1) DU520型紫外分光光度计;(2)高速冷冻离心机;(3)玻璃匀浆器;(4)电子天平;(5)解剖器。

1.2.2 试剂 (1)甘露醇(0.35 mol/L);(2)牛血清蛋白(1 mg/L);(3)蔗糖(0.25 mol/L);(4)EDTA(0.001 mol/L);(5)Tris-HCl缓冲液(pH=7.2, pH=7.5);(6)ATP(3 mmol/L);(7)NaCl(110 mmol/L);(8)MgCl₂(3 mmol/L);(9)KCl(10 mmol/L);(10)Na₂HPO₄(0.001 mol/L);(11)三氯醋酸TCA(20%);(12)硫酸亚铁-钼酸铵[5 g硫酸亚铁+10%硫酸钼酸铵10 mL(硫酸钼酸铵用10 mol/L的溶液配制)+水稀释成70

* 福建省教委B类科研项目JB99119号。

第一作者:周立红,出生于1964年,硕士,副教授。目前在研课题有“塔玛亚历山大藻对海洋生态系统能量传递的影响”、“养殖污水处理”等。E-mail:lhzhou@jmu.edu.cn

收稿日期:2002-01-17;修回日期:2003-05-01

mL]; (13) 考马斯亮蓝 (100 mg 考马斯亮蓝溶于 50 mL 95% 乙醇, 加入 100 mL 磷酸定容于 1 L 容量瓶, 过滤, 4℃ 保存)。

1.3 实验方法

1.3.1 罗非鱼 (*Tilapia mossambica*) 的染毒处理 罗非鱼体质量 50 g/尾左右, 采自集美大学淡水养殖场。在染毒前于曝气自来水中暂养 48 h 以上, 挑选健壮、活跃的个体随机分配到各个实验组中, 每一浓度梯度组选取 4 尾罗非鱼。实验分为 4 个浓度梯度组和一个对照组, 对照组每尾鱼注射 0.4 mL 0.05 mol/L 的醋酸, 染毒组分别注射 0.4 mL 不同浓度的毒素粗提液。浓度设置为 50%, 33.3%, 25%, 16.7% 组, 以毒素粗提液为 100% 浓度, 其余百分比为毒素粗提液以蒸馏水稀释后的浓度。注射后暂养 12 h。解剖取其鳃及肝脏并测定其中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力。

1.3.2 样品蛋白质含量的测定^[4] (1) 分别在两组试管中, 各加入 0.5 g/L 牛血清蛋白 (50, 100, 150, 200 μL) 以 0.15 mol/L NaCl 补足至 500 μL , 同时以两管 500 μL 的 0.15 mol/L NaCl 作空白对照。(2) 每管加入 5 mL 考马斯亮蓝染料溶液, 振荡混匀, 室温放置 2 min 后进行比色测定 (波长 595 nm), 以消光值为纵坐标, 蛋白质含量为横坐标, 绘制标准曲线。(3) 取 100 μL 的样品加入 1 mL 考马斯亮蓝染料, 振荡混匀, 室温放置 2 min 后, 于 660 nm 处测吸光度 A , 在标准曲线上查得相应蛋白质浓度。

1.3.3 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的测定^[5]

(1) 制作磷标准曲线: 分别在两组试管中各加入 0.001 mol/L Na_2HPO_4 (0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5 mL), 加双蒸水使各管体积均为 2.9 mL, 依次加入三氯醋酸 0.1 mL, 硫酸亚铁 - 钼酸铵 2.0 mL, 2 min 后, 于波长 660 nm 处测 A 值, 以消光值为纵坐标, 磷的含量为横坐标, 绘制标准曲线。(2) 样品 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的测定: 取 0.9 mL 样品加入 1.8 mL 酶反应液, 37℃ 保温 15 min, 加入 0.1 mL 20% 三氯醋酸终止反应, 加入 1.7 mL 硫酸亚铁 - 钼酸铵试液, 2 min 后, 于波长 660 nm 处测光密度。在标准曲线上查得相应磷浓度。(3) $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 比活的计算: 酶活力以每小时每毫克蛋白水解 ATP 释放出的无机磷微摩尔数 [$\mu\text{mol}/(\text{mg} \cdot \text{h})$] 表示。

$$\text{酶活力} = \frac{\text{无机磷释放浓度}}{\text{蛋白质浓度}} \times \frac{\text{反应体积}}{\text{取样体积}} \times \frac{60}{\text{反应时间}}$$

2 结果

根据小白鼠法测得本实验塔玛亚历山大藻毒素

粗提液原液的毒性为 6.44 鼠单位/mL, 由此算出每尾鱼注射液相应的毒性大小并列于各浓度下。从表 1 可见, 在注射毒素浓度为 16.7% 的情况下, 肝脏的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 比活性最高, 平均值达 1.914。当毒素的浓度继续增加时, 活性反而降低。而鳃中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的比活也有类似现象, 见表 1 及图 1。经统计分析, 染毒组个体肝脏 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 比活与对照组差异显著 ($P < 0.05$), 而鳃的比活差异不显著 ($P > 0.05$)。

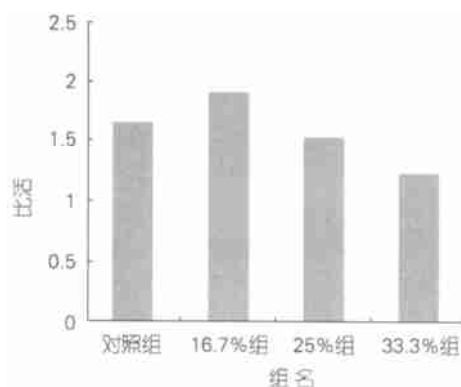


图 1 罗非鱼肝组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力比较

Fig.1 Activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in livers of *Tilapia mossambica* in different groups

3 讨论

实验罗非鱼经注射 16.7% 毒素粗提液, 其肝脏、鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性高于对照组。而注射 25% ~ 50% 浓度则酶活性均低于对照组。这说明塔玛亚历山大藻毒素粗提液可造成实验罗非鱼鳃、肝脏等组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性改变。而且, 在较低的浓度下往往是增加酶活性, 较高浓度则能抑制酶活性。我们认为这是因为毒素进入动物体与钠离子通道结合, 阻断钠离子内流^[6], 而生物的应激反应促使酶超常活动以抵消危害, 因此使得低浓度组鱼组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的活力增加。这种生物在不良环境下的应激反应在不少研究中已被证实^[7], 如某些藻类在低浓度石油影响下会增加光合作用强度和分裂速度, 但随着石油浓度的加大, 二者均被抑制而降低; 低剂量的 DDT 引起蟹的神经兴奋, 激素分泌增多, 因而促进其蜕皮和附肢的再生。但随着注射毒素浓度的增加, 塔玛亚历山大藻的毒性使得动物 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 受到抑制, 活性越来越低, 动物的生理机能最终受到破坏。

表 1 塔玛亚历山大藻对罗非鱼鳃及肝脏 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响Tab.1 Effects of *Alexandrium tamarense* on activity of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ in gills and livers of *Tilapia mossambica*

组别及毒性	实验鱼号	鳃的比活	鳃比活平均值 $\pm$ SD	肝的比活	肝比活平均值 $\pm$ SD
50 % (1.288 鼠单位)	1	1.826	1.826	1.287	1.287
	1	1.654		1.215	
33.3 % (0.858 鼠单位)	2	1.834	1.981 $\pm$ 0.394	0.757	1.238 $\pm$ 0.413
	3	2.553		1.217	
	4	1.882		1.766	
	1	2.735		1.311	
25 % (0.644 鼠单位)	2	1.877	2.146 $\pm$ 0.425	1.725	1.540 $\pm$ 0.171
	3	2.173		1.557	
	4	1.797		1.567	
	1	1.649		1.826	
16.7 % (0.430 鼠单位)	2	2.689	2.297 $\pm$ 0.520	1.643	1.914 $\pm$ 0.223
	3	2.746		2.134	
	4	2.104		2.054	
	1	2.353		1.317	
对照组 (0 鼠单位)	2	2.187	2.075 $\pm$ 0.239	1.796	1.663 $\pm$ 0.232
	3	1.937		1.796	
	4	1.826		1.743	

注:50 %组罗非鱼死亡较多,数据结果仅供参考。

在本实验中各组罗非鱼鳃中 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的比活差异不显著,这可能因为实验采取腹腔注射毒素的方法,毒素未经过鳃而直接侵入肝脏组织中。也有可能因为麻痹性贝毒在鱼体内的不同组织含量各有差异,通常在消化器官中的含量最高,而其他组织中的含量相对较低^[8],因此 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 所受影响可能也不同。

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 是一组在细胞内离子转运和能量代谢过程中起重要作用的酶系统。它从水解 ATP 分子中获得能量,逆电化学梯度转运 Na^+ 和 K^+ ,也称钠泵^[6]。 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 广泛分布于各类细胞质膜上,其活性在不同的组织内差异很大,在兴奋性和分泌性组织中酶活性很高。麻痹性贝毒的毒理机制是在分子层级上,阻断钠离子内流,其对钠离子通道具有特殊亲和性。当毒素与钠离子通道结合后,将会使神经传导发生困难^[8]。使细胞不能提供正常活动所需要的能量,严重情况下,可导致生物死亡。目前国内外在塔玛亚历山大藻对海洋动物的影响方面进行了较多研究^[9-10],而本文就毒素引起生物生化参数变化的研究则将有助于阐明其作用的分子机制,并且已有的研究表明毒物对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 抑制的浓度、时间具有依赖性^[3]。本实验证明塔玛亚历山大藻对养殖动物重要的 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活性有明显影响,这对研究其对水生动物的亚致死研究十分重要,也显示该酶作为检测塔玛亚历山大

藻的指标有一定前景。

4 结论

塔玛亚历山大藻毒素粗提液对罗非鱼鳃及肝脏组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力有一定影响,低浓度使酶活性增加,高浓度使酶活性降低。

用动物肝、鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的变化作为监测塔玛亚历山大藻的亚致死研究将具有一定价值。

参考文献

- 1 Juan M. Vieites, Francisco Leira Sanmartin. Incidence of marine toxins in industrial activity. Seafood and Freshwater Toxins, 2000, 17: 741 - 760
- 2 于仁诚, 周名江. 麻痹性贝毒研究进展. 海洋与湖沼, 1998, 29(3): 330 - 338
- 3 袁锦芳, 陈叙龙. 环境因素对海洋动物 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶的影响概述. 海洋环境科学, 1999, 18(3): 75 - 79
- 4 奥斯伯 F, 金斯顿 RE, 塞德曼 JG. 精编分子生物学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999. 332
- 5 南京大学环境生物学教研室. 环境生物学实验技术与方法. 南京: 南京大学出版社, 1989. 81 - 85
- 6 刘安西. 细胞膜离子通道. 北京: 中央民族学院出版社, 1990. 43 - 45
- 7 李永琪, 丁美丽. 海洋污染生物学. 北京: 海洋出版社,

- 1991 .234 - 244 ,394 - 395
- 8 周宏农 . 水产品藻源毒素检测操作手册 . 台湾 :水产出版社 ,1999 . 27 - 28 ,31 - 32
- 9 傅萌 ,颜天 ,李钧 ,等 . 塔玛亚历山大藻对墨西哥湾扇贝幼体发育的影响 . 海洋科学 ,2000 ,24(3) :8 - 11
- 10 Yan T ,Zhou MJ ,Fu M ,et al . Inhibition of egg hatching success and larva survival of the scallop , *Chlamys farreri* , associated with exposure to cells and cell fragments of the dinoflagellate *Alexandrium tamarense* . Toxicon ,2001 ;39 :1 239 - 1 244

EFFECT OF *Alexandrium tamarense* ON ATPase ACTIVITY IN THE LIVER AND GILL OF *Tilapia mossambica*

ZHOU Li - Hong CHEN Xue - Hao

(Fisheries College & Institute of Aquaculture Biotechnology , Ji mei University , Xia men , 361021)

Received : Jan . ,17 ,2002

Key Words : *Alexandrium tamarense* , Paralytic shellfish poisoning , $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$

Abstract

The $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities in the livers and gills of *Tilapia mossambica* were measured after host fish had the crude toxin extracted from *Alexandrium tamarense* injected into their abdominal cavity . The intention was to research the effect of toxins on animal' s $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activities . The result demonstrated that the enzyme activities of $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ increased in lower concentrations , and decreased in higher concentrations .