

重金属污染物对文蛤金属酶类的影响

任虹*, 李强, 李婷

(北京工商大学食品学院, 食品添加剂与配料北京高校工程研究中心, 北京市食品风味化学重点实验室, 北京 100048)

摘要:海水中的重金属离子浓度很低,但对海洋生物的影响是深远的。本实验在离体条件下研究了必需微量元素 Fe、Cu、Zn 和非必需微量元素 Pb 对海洋软体动物文蛤肝脏过氧化氢酶(CAT)和细胞色素氧化酶(CCO)两种金属酶类活性的影响。结果表明,文蛤对实验中不同的重金属离子显示不同的积累富集能力,其中,对 Fe^{3+} 有较强的积累能力,对其他重金属也有不同程度的积累。在离体条件下, Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 分别在 2.0 ~ 13.0 mmol/L、 $<5.0 \mu\text{mol/L}$ 、 $<10 \text{ nmol/L}$ 和 0.5 ~ 200 nmol/L 低浓度范围内对 CAT 显示不同程度的激活活性,升高浓度则显示抑制作用; Fe^{3+} 和 Cu^{2+} 分别在 0.05 ~ 0.32 mmol/L 和 9.8 ~ 68.6 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度范围内对 CCO 显示不同程度的激活活性,升高浓度,则显示抑制作用;即使在浓度很低(1.0 nmol/L)的条件下, Zn^{2+} 都明显抑制 CCO 活性。必需微量元素 Fe、Cu 和 Zn 对文蛤金属酶类 CAT 和 CCO 显示不同的作用效果,当超过一定浓度范围时,这些重金属离子可不同程度地抑制 CAT 和 CCO 活性,对文蛤可能产生毒害作用。[中国渔业质量与标准,2014,4(4):7-12]

关键词:文蛤;重金属;过氧化氢酶;细胞色素氧化酶

中图分类号:S94;Q58 **文献标志码:**A **文章编号:**2095-1833(2014)04-0007-06

文蛤(*Meretrix meretrix*)俗称车螺、黄蛤、花蛤、贵妃,属于软体动物门(Mollusca)双壳纲(Bivalvia)帘蛤目(Veneroidea)帘蛤科(Veneridae)文蛤属(*Meretrix*),属于滤食性海洋双壳贝类^[1]。文蛤地理分布广,通常生活在河口附近沿岸的潮间带及浅海区的细沙或泥沙滩中。文蛤是中国、朝鲜、韩国和日本等亚洲国家常见的经济贝类,也是百姓餐桌上常见的美味佳肴。

随着科技进步和工矿企业迅猛发展,海洋环境受到了重金属污染的威胁,虽然海水中的重金属离子浓度相对较低,但对海洋生物的影响是深远的。海洋软体动物种类繁多,它们通过吸附、滤食和吸收等途径,从周围环境中积累重金属,不同重金属在软体动物中的富集程度有差异^[2-4]。有些重金属(必需金属)在生物代谢活动中不可或缺,但超过一定的浓度,无论是必需金属还是非必需金属,都会对生物产生毒害作用。关于重金属引起海洋动物中毒的分子机理,大量研究结果表明^[5-6],当重金属进入动物体后,可以和生物大分子如羧胺酶、碱性磷酸酶、碳酸酐酶、细胞色素 C、血红蛋白以及 Fe 氧还原蛋白等上的活性位点结合,也可以和其他非活性位点结合,导致细胞内物质氧化还原反应产生活性氧,活性氧通过自由基链式反应生成一系列脂质过氧化自由基与具有诱变作用

的醛类和酮类等,自由基的生成过多,体内氧化/抗氧化系统失衡,即可导致细胞损伤,产生毒性作用。研究表明,进入海洋动物体内的重金属主要通过积累达到解毒,而非将重金属直接排出体外^[7]。海洋动物处于重金属污染的水体时,会刺激动物体内某些基因的表达,产生相关的金属酶类或蛋白,如过氧化氢酶、细胞色素氧化酶、铁转运蛋白、谷胱甘肽转移酶和超氧化物歧化酶等,增强体内抗氧化防御系统,从而减轻重金属对细胞的损伤。因此,过氧化氢酶(catalase, CAT)和细胞色素氧化酶(cytochrome oxidase, CCO)等含铁卟啉环的金属酶类在生态药理学和环境监控等领域已成为重要检测指标^[8-9]。目前,有关重金属对海洋软体动物中 CAT 和 CCO 活性影响的报道很少。本研究以文蛤为实验材料,研究了离体条件下,Fe、Cu 和 Zn 等必需微量元素以及非必需微量 Pb 对两种金属酶类的影响,旨在从生理角度探讨海洋软体动物对重金属积累的意义。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

新鲜活文蛤(海蛤)采自山东省烟台芝罘湾,文

收稿日期:2014-04-02;接收日期:2014-05-27

资助项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)课题(2007AA09Z411)

作者简介:任虹(1967-),女,博士,副教授,研究方向为海洋天然活性物质研究,renhong@th.bitbu.edu.cn

蛤体重 15 ~ 20 g, 购回后在人工海水中暂养 10 ~ 14 h。

1.2 试剂

牛血清蛋白和细胞色素 C 为中国医学科学院血酶所科技公司产品; 考马斯亮蓝 G-250 为 Fluka 产品; 脱氧胆酸钠和组氨酸为 Sevra 产品; 其余化学试剂均为国产分析纯。

1.3 酶源制备

CAT 的制备: 文蛤洗净, 称量, 解剖出肝脏, 加入约 4 倍体积的 0.067 mol/L、pH8.67 磷酸缓冲液, 匀浆, 以 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清液作为酶源备用。整个实验操作在 0 ~ 4 °C 下进行(下同)。

CCO 的制备: 取肝脏加入 0.25 mol/L 蔗糖溶液, 匀浆, 以 2 000 r/min 离心 10 min, 取上清液于 4 °C、8 000 r/min 离心 15 min, 得到的沉淀即为线粒体, 向线粒体沉淀中加入 TSH (Tris-HCl: 0.25 mol/L, pH8.0 + 蔗糖: 0.66 mol/L + His: 1.0 mol/L) 制成悬浮液, 使蛋白质浓度为 10.0 mg/mL, 向悬浮液中加入 10% (m/V) 脱氧胆酸钠 (0.3 mg/mg) 和固体 NaCl (0.72 g/mL), 振荡 10 min, 以 15 000 r/min 离心 20 min, 弃去红色上清液, 绿色沉淀即为细胞色素氧化酶粗制品。

1.4 酶活力测定

CAT 活力测定采用 KMnO_4 法^[10]。CAT 的活力

是以单位 U/mL 表示。一个活力单位 (U/mL) 是指: 在 37 °C、pH7 条件下, 每 min 分解 1 μmol 的过氧化氢所需的酶量。

CCO 活力测定参照 Wharton 等方法^[11-12]。CCO 的活力用一级反应速率常数 K 表示。 $K = \ln[\Delta A_{550}/(t_2 - t_1)]$, 一个酶活力单位为 100 K 。

1.5 蛋白质含量的测定

采用 Bradford 法^[13]。

1.6 重金属含量的测定

取新鲜文蛤肝脏, 烘干至恒重, 称得干重, 进行湿法硝化, 用 Shimadzu AA-670 原子吸收分光光度计测定样品中 Fe、Cu、Zn 和 Pb 的含量。湿磨文蛤肝脏, 匀浆, 储存于塑料瓶中备用。称取 1.00 ~ 5.00 g 试样于瓷坩埚中, 加 2 ~ 4 mL 硝酸浸泡 1 h 以上, 先小火炭化, 冷却后加 2.00 ~ 3.00 g 过硫酸铵盖于上面, 继续炭化至不冒烟, 转入马弗炉, 500 °C 恒温 2 h, 再升至 800 °C, 保持 20 min, 冷却, 加 2 ~ 3 mL 硝酸 (1.0 mol/L), 用滴管将试样消化液滤入 (视消化后试样的盐分而定) 10 ~ 25 mL 容量瓶中, 用水少量多次洗涤瓷坩埚, 洗液合并于容量瓶中并定容至刻度, 同时做试剂空白。Pb、Cd、Cu 标准溶液: 浓度为 100 $\mu\text{g/mL}$, 用 1 : 9 的硝酸逐级稀释得标准使用液, 水为二级水 (MilliQ 纯水器制备)。不同离子测定的仪器条件见表 1, 根据元素性质分别调至仪器最佳状态。

表 1 原子吸收分析条件

Tab. 1 The analysis conditions of atomic absorption spectrophotometry

金属元素	波长/nm	狭缝/nm	灯电流/mA	燃烧器高度/mm	空气压力/MPa	乙炔压力/MPa	乙炔流量/(L·min ⁻¹)	空气流量/(L·min ⁻¹)	火焰类型
Metal element	Wave length	Slit	Lamp current	Burner height	Air pressure	Acetylene pressure	Acetylene flow rate	Air flow rate	Flame type
Pb	283.3	0.4	3.0	5.0	0.3	0.09	7.0	1.5	氧化性蓝色焰
Fe	248.3	0.4	3.0	6.5	0.3	0.09	7.0	1.5	氧化性蓝色焰
Cu	324.6	0.4	2.0	6.0	0.3	0.09	7.0	1.5	氧化性蓝色焰
Zn	213.9	0.4	1.5	6.0	0.3	0.09	7.0	1.0	氧化性蓝色焰

1.7 实验数据分析

用 SPSS 13.0 软件进行数据处理, 实验所得数据以平均值 \pm 标准差表示。

2 结果与分析

2.1 pH 对酶活力的影响

在 30 °C 下, CCO 酶源蛋白质含量为 0.10 mg/mL,

pH7.2 处 CCO 活力最大, 为 148.0 U/mg 蛋白质, 见图 1。在室温 25 °C 下, CAT 酶源蛋白质含量为 1.05 mg/mL 时, CAT 的最适 pH 高于 CCO 的最适 pH, 为 8.7。以下实验在上述蛋白含量和最适 pH 下进行。

2.2 重金属离子对 CAT 和 CCO 活力的影响

原子吸收分光光度分析表明, 文蛤肝脏中 Fe 含量最高, Cu 和 Zn 次之, 而 Pb 的含量远远低于上述金

属元素的含量,结果见表 2。

在上述最适 pH 条件下,将不同浓度的重金属离

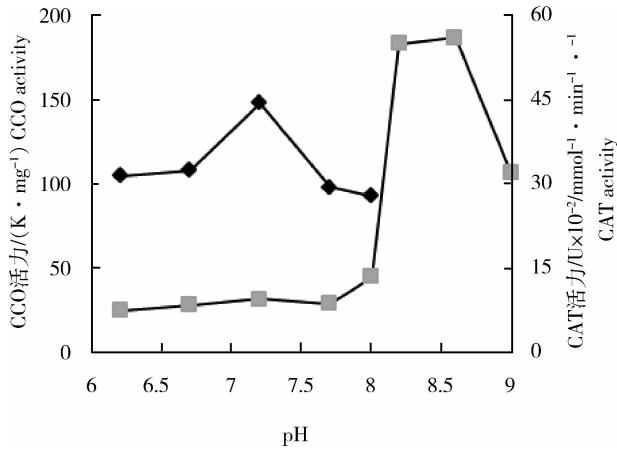


图 1 pH 对 CAT 及 CCO 酶活力的影响

Fig. 1 Effect of pH on catalase and cytochrome oxidase activity

表 2 文蛤肝脏中重金属的含量

Tab. 2 The Concentrations of heavy metals in hepatopancreas of *Meretrix meretrix* $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$

金属元素 Metal element	Fe	Cu	Zn	Pb
含量(以干重计)	328	116	107	5.76

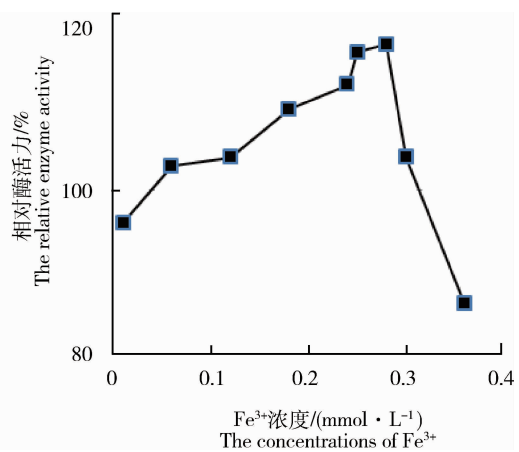
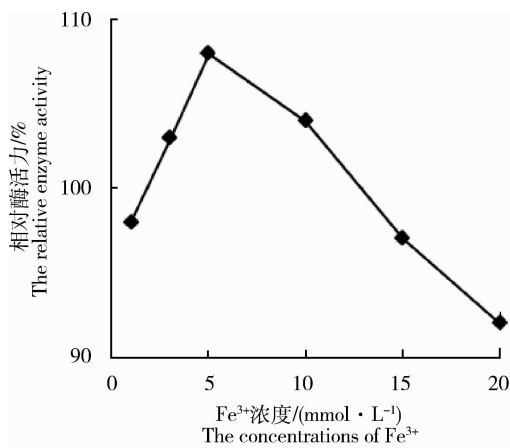


图 2 [Fe³⁺] 对 CAT(A) 和 CCO(B) 酶活力的影响

Fig. 2 Effect of [Fe³⁺] on catalase (A) and cytochrome oxidase (B) activity

2.2.2 Cu²⁺ 对酶活力的影响

当 Cu²⁺ 浓度低于 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,对 CAT 显示微弱的激活作用,而当 Cu²⁺ 浓度高于该浓度时,Cu²⁺ 对 CAT 的抑制效果显著,见图 3,可能由于 Cu²⁺ 干扰酶分子铁卟啉环中 Fe²⁺ 的结合而抑制其活性。图 3 中可见,Cu²⁺ 对 CCO 的影响较明显,当 Cu²⁺ 浓度在

子溶液分别加到无酶反应体系(对照组)中,其中,Fe³⁺ 是在 pH7.75 条件下进行的。结果表明,4 种金属离子对 H₂O₂ 和细胞色素 C 的催化作用很小,可忽略不计。但在酶促反应即酶和金属离子共存的情况下,在一定浓度范围内,4 种金属离子对 CAT 及 CCO 显示不同程度的激活或抑制作用。

2.2.1 Fe³⁺ 对酶活力的影响

FeCl₃ 浓度在 2.0 ~ 13.0 mmol/L 范围内,在 pH7.75 的反应溶液中均有少量沉淀生成,但实验发现,在这个浓度范围内,Fe³⁺ 对 CAT 具有明显激活作用,且浓度为 5.0 mmol/L 时,激活作用最强,相对酶活力为 108.4%,见图 2。FeCl₃ 对 CCO 也表现类似的作用,但有效激活浓度范围偏低,为 0.05 ~ 0.32 mmol/L,当浓度为 0.28 mmol/L 时,激活作用最强,相对酶活力为 118.2%。实验中发现,当 Fe³⁺ 在 2 ~ 13 mmol/L 浓度范围内对 CAT 呈激活作用,Fe³⁺ 在 0.05 ~ 0.3 mmol/L 浓度范围内对 CCO 有激活作用,这可能是由于 CAT 和 CCO 属于金属酶类,其空间结构的维持与酶活力的表现都需要金属离子的存在,这些金属酶类可能含有 Fe³⁺ 卟啉环,Fe³⁺ 作为酶的必需金属离子而使酶活力提高,文蛤体内抗氧化酶 CAT 和 CCO 活性增加,使其自身抗氧化防御系统能力增强,从而减轻过量 Fe³⁺ 对机体的损伤。

9.8 ~ 68.6 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内对 CCO 具有较强的激活作用,且浓度为 19.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,Cu²⁺ 的激活作用最强,相对活力为 116.2%,当浓度大于 68.6 $\mu\text{mol/L}$ 时,Cu²⁺ 对 CCO 显示出抑制作用。细胞色素氧化酶由多个亚基和辅因子组成,酶分子中含有铜,铜可发生 Cu⁺ 和 Cu²⁺ 的互变来传递电子。当反应体系中

Cu^{2+} 浓度较低 ($< 19.6 \mu\text{mol/L}$) 时,能激活 CCO 活性,但随着 Cu^{2+} 浓度的升高, Cu^{2+} 占据了 CCO 上

Cu^+ 或 Cu^{2+} 的结合位点,阻止了正常的生物学效应,表现出 CCO 活性降低。

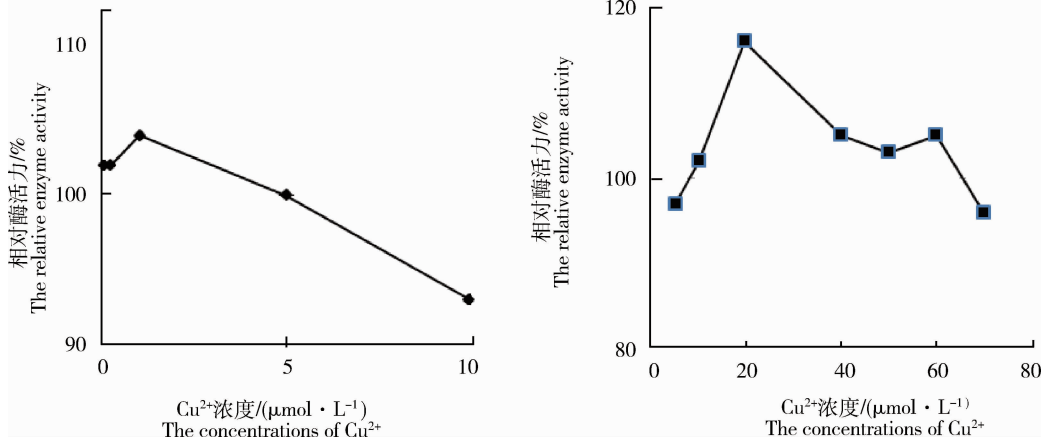


图3 $[\text{Cu}^{2+}]$ 对 CAT(A) 和 CCO(B) 酶活力的影响

Fig. 3 Effect of $[\text{Cu}^{2+}]$ on catalase (A) and cytochrome oxidase (B) activity

2.2.3 Zn^{2+} 对酶活力的影响

Zn^{2+} 对 CAT 的影响与 Cu^{2+} 的作用相似,只是有效激活浓度很低,在 10 nmol/L 以下,见图4,这可能也与 Zn^{2+} 干扰酶分子中 Fe^{2+} 的结合有关。 Zn^{2+} 对 CCO 具有显著抑制作用,即使在较低浓度

(1.0 nmol/L) 下,CCO 的相对酶活力仅为 88%,而且这种抑制效果随着 Zn^{2+} 浓度的增加而明显增强。说明可能低浓度(1.0 nmol/L) 的 Zn^{2+} 可干扰 Cu^{2+} 与酶的结合,阻止了 Cu^+ 和 Cu^{2+} 的互变,从而抑制了 CCO 活性。

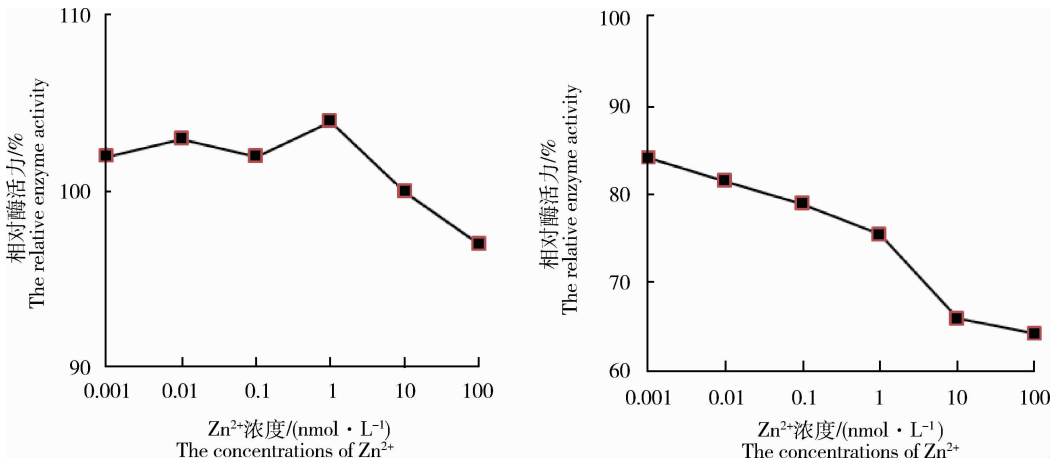


图4 $[\text{Zn}^{2+}]$ 对 CAT(A) 和 CCO(B) 酶活力的影响

Fig. 4 Effect of $[\text{Zn}^{2+}]$ on catalase (A) and cytochrome oxidase (B) activity

2.2.4 Pb^{2+} 对 CAT 活力的影响

Pb^{2+} 浓度在 $0.5 \sim 200 \text{ nmol/L}$ 的较宽范围内对 CAT 显示非常微弱的激活作用,在此浓度范围之外,表现为一定的抑制活性,见图5。 Pb^{2+} 不是机体所必需的,是海水中的污染物,它在低浓度下对 CAT 显示弱的激活作用,这与申勋宇等以鲫和蚌为材料所得到的结果相似^[14-15]。 Pb^{2+} 是如何提高 CAT 的活性还有待于进一步研究。

3 结论

Fe^{3+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 虽是生物代谢所必需的微量元素,但超过一定浓度范围时,对金属酶 CAT 和 CCO 具有不同程度的抑制作用,造成动物体内抗氧化防御体系功能降低,因此,这些金属离子可能是有害的。实验表明,文蛤对不同金属离子的富集作用不同,相

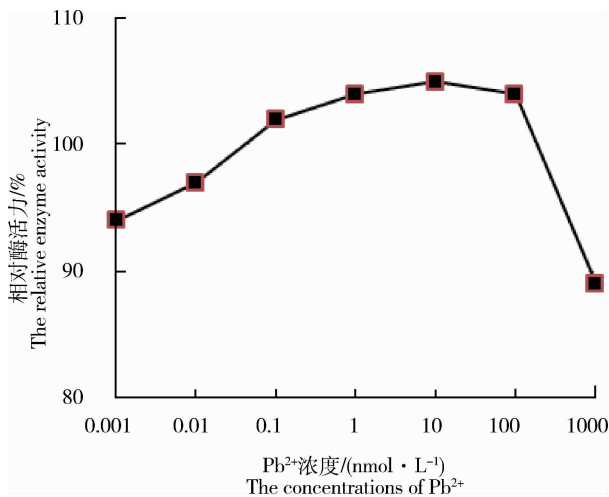


图5 [Pb²⁺] 对 CAT 酶活力的影响

Fig. 5 Effect of [Pb²⁺] on catalase activity

对而言,文蛤对 Fe³⁺ 有较强的积累能力,对其他重金属也显示不同程度的富集;在离体条件下,低浓度 Fe³⁺ 和 Cu²⁺ 对 CAT 及 CCO 具有激活作用,当 Fe³⁺ 浓度在 2.0 ~ 13.0 μmol/L 之间,能激活 CAT 活性,当浓度降低至 0.05 ~ 0.32 μmol/L 之间时,则对 CCO 显示激活作用;对 Cu²⁺ 而言,当浓度低于 5.0 μmol/L 时,对 CAT 激活活性,浓度在 9.8 ~ 68.6 μmol/L 之间时能激活 CCO。即使在浓度很低(1.0 nmol/L)条件下,Zn²⁺ 能显著抑制 CCO 活性。对于 CAT,当 Zn²⁺ 浓度低于 10 nmol/L, Pb²⁺ 浓度在 0.5 ~ 200 nmol/L 之间,对 CAT 有微弱激活作用。

海洋生物种类繁多,不同生物对重金属离子的积累具有明显的选择性,这是长期适应环境的结果。重金属积累的机制是复杂的^[16-17],一方面反映了生物的新陈代谢对重金属积累的调节作用,另一方面,生物体内抗氧化酶类的活性也受环境因素的制约。对有些金属离子而言,在一定浓度范围内,积累并不会对生物体造成危害,有时甚至有益,这种有益可能通过抗氧化酶类的作用来实现。但若海洋环境受到重金属离子过度污染,海洋生物抗氧化酶类的活力势必受到影响,会影响海洋生物的生长和生存。

致谢

烟台大学刘传琳老师在采样、样品准备及酶活测定工作中给予了大力帮助,特此感谢!

参考文献:

[1] 徐凤山. 中国海洋双壳类软体动物[M]. 北京: 科学出版社,1997,50 - 333.

- [2] Shouta M M, Ikenaka Y, Muzandu K, et al. Heavy metal accumulation in lake sediments, fish (*Oreochromis niloticus* and *Serranochromis thumbergi*), and crayfish (*Cherax quadricarinatus*) in lake Itzhi - tezhi and lake Kariba, Zambia [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 2010, 59 (2): 291 - 300.
- [3] Arun K, Achyuthan K, Hema A. Heavy metal accumulation in certain marine animals along the east coast of Chennai, Tamil Nadu, India [J]. J Environ Biol, 2007, 28 (3): 637 - 643.
- [4] 李磊,王云龙,沈新强,等. 文蛤养殖水体中重金属 Cu 的安全限量值研究[J]. 生态毒理学报, 2012, 7 (2): 182 - 188.
- [5] Blackmore G, Wang W X. Uptake and efflux of Cd and Zn by the green mussel *Perna viridis* after metal pre - exposure [J]. Environ Sci Technol, 2002, 36: 989 - 995.
- [6] Selvin J, Shanmugha P S, Seghal K, et al. Sponge - associated marine bacteria as indicators of heavy metal pollution [J]. Microbiol Res, 2009, 164(3), 352 - 363.
- [7] Hans A B, Liam M, Dagmar B S. Metal accumulation and toxicity measured by PAM - Chlorophyll fluorescence in seven species of marine macroalgae [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2009, 72 (4): 1063 - 1075.
- [8] Ni S Q, Ju Y W, Hou Q L, et al. Enrichment of heavy metal elements and their adsorption on iron oxides during carbonate rock weathering process [J]. Prog Nat Sci, 2009, 19(9): 1133 - 1139.
- [9] Giarratano E, Duarte C A, Amin O A. Biomarkers and heavy metal bioaccumulation in mussels transplanted to coastal waters of the Beagle Channel [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2010, 73 (3): 270 - 279.
- [10] 荆家海,丁钟荣. 植物生物化学分析方法[M]. 北京: 科学出版社,1981: 203 - 207.
- [11] Wharton D C, Tzayoloff A. Methods in enzymology[M]. Volume X. New York: Academic Press, 1967: 245 - 250.
- [12] 张志泉. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1994: 195 - 230.
- [13] 张龙翔,张庭芳,李令媛. 生化实验方法和技术[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997: 133 - 140.
- [14] 申勋宇. 重金属铅对鲫鱼血清抗氧化能力的影响[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(2): 758 - 759.
- [15] Einsporn S B, Jana K, Angela K. Cellular localization of lead using an antibody - based detection system and enzyme activity changes in the gills and digestive gland of the blue mussel *Mytilus edulis* [J]. Environ toxicol chem, 2009, 28(2): 402 - 408.

- [16] Andrade L R, Leal R N, Nosedá M, et al. Brown algae overproduce cell wall polysaccharides as a protection mechanism against the heavy metal toxicity [J]. *Mar Polu Bull*, 2010, 60 (9): 1482 – 1487.
- [17] Sharma S. Study on impact of heavy metal accumulation in *Brachytheceium populeum* (Hedw.) B. S. G [J]. *Ecolo Indic*, 2009, 9 (4): 807 – 811.

Effects of heavy metals on metalloenzymes from *Meretrix meretrix*

REN Hong*, LI Qiang, LI Ting

(Beijing Technology & Business University, Beijing Higher Institution Engineering Research Center of Food Additives and Ingredients, Beijing Key Laboratory of Flavor Chemistry, Beijing 100048, China)

Abstract: Heavy metal concentrations in sea water are low, but their impacts on marine organisms are distinct. The effects *in vitro* of iron (Fe), copper (Cu), Zinc (Zn) and lead (Pb) on metalloenzymes (catalase and cytochrome oxidase) derived from *Meretrix meretrix* were measured in the experiment. The results showed that *Meretrix meretrix* accumulated Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Pb^{2+} in various degrees, in which Fe^{3+} was strongly accumulated. The activity of CAT was obviously activated by the following elements within their specific ranges Fe^{3+} (2.0 ~ 13.0 mmol/L), Cu^{2+} (below 5.0 $\mu\text{mol/L}$), Zn^{2+} (below 10 nmol/L), Pb^{2+} (0.5 ~ 200 nmol/L). The activity of CCO was activated by Fe^{3+} and Cu^{2+} within their specific concentrations, Fe^{3+} (0.05 ~ 0.32 mmol/L) and Cu^{2+} (9.8 ~ 68.6 $\mu\text{mol/L}$). Zn^{2+} generally inhibited the activity of CCO even at the concentration as low as 1.0 nmol/L. The effects *in vitro* of iron (Fe), copper (Cu) and Zinc (Zn) on metalloenzymes (catalase and cytochrome oxidase) derived from *Meretrix meretrix* were different. Beyond a certain concentration range, these heavy metal ions could inhibit the activity of CAT and CCO to varying degrees, which probably contaminates the meretrix. [Chinese Fishery Quality and Standards, 2014, 4(4):7 – 12]

Key words: *Meretrix meretrix*, heavy metal, catalase, cytochrome oxidase

Corresponding author: REN Hong, renhong@th. btbu. edu. cn