

间甲酚对瓯江彩鲤早期发育总 ATP 酶活性的影响

朱俊华¹, 梁 琍², 姚俊杰¹, 冯亚楠¹

(1. 贵州大学动物科学学院水产科学系, 贵州 贵阳 550025; 2. 铜仁学院生化系, 贵州 铜仁 554300)

摘要:在水温(20±2)℃条件下, 设置 7 mg/L、13 mg/L、19 mg/L 的间甲酚(m-cresol)浓度梯度, 研究了瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)早期发育过程中总 ATP 酶活性变化及间甲酚对总 ATP 酶影响。结果表明, 瓯江彩鲤总 ATP 酶活性在成熟卵和受精卵中无显著差异($P>0.05$); 各浓度组总 ATP 酶活性表现为良好的剂量-效应和发育时期-效应关系; 总体上看, 瓯江彩鲤早期发育从原肠胚期开始, 总 ATP 酶活性随着发育时间的延长和暴露浓度的增加而降低。

关键词:间甲酚; 瓯江彩鲤; 早期发育; 总 ATP 酶

中图分类号:Q556 **文献标志码:**A **文章编号:**1674-3075(2014)03-0052-04

间甲酚(m-cresol)又名间甲基苯酚, 是一种环境激素类化合物, 对皮肤、黏膜有强烈刺激和腐蚀作用, 能引起多脏器损害。大量的环境雌激素废水流入江河湖泊, 使水生态系统遭到破坏, 严重影响鱼类的生长繁殖。鱼类早期是对污染物比较敏感的阶段, 受到学者广泛的关注和重视。腺苷三磷酸酶(adenosine triphosphatase, ATPase)是一族水解酶, 它在生物体内的作用是水解高能化合物 ATP 而释放出供生命活动所用的能量, 因而有着重要的生物学意义。在动物胚胎发育阶段代谢较活跃, 胚胎能量消耗与发育期显著正相关等(王桂忠等, 1995)。机体在缺氧或损伤下, 总 ATP 酶活性受到损伤, 活力下降(李爽等, 2010)。总 ATP 酶可以准确反映细胞新陈代谢活性, 其活力大小是各种细胞能量代谢及功能有无损伤的重要指标。环境毒物对总 ATP 酶的影响近来受到重视, 现已发现有机氯农药、多氯联苯、重金属汞等污染物对总 ATP 酶均有影响(刘洁生等, 1997; 方展强等, 2004; 2006); 但有关环境雌激素对鱼类早期发育总 ATP 酶的影响报道还很少。本研究以瓯江彩鲤(*Cyprinus carpio* var. *color*)为材料, 从总 ATP 酶活性变化情况了解鱼类早期发育过程中的能量变化, 探究间甲酚的毒性作用对鱼类各发育时期总 ATP 酶活性的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料

瓯江彩鲤亲鱼来自浙江丽水市龙泉瓯江彩鲤良种场, 健壮无伤, 性腺发育成熟度较好。采用干法受精获得受精卵, 将消除粘性的受精卵置于室内水族箱(50 cm×40 cm×25 cm)中, 每 1 个水族箱大约放置 25 000 粒卵。试验用水为曝气充氧、除氯 24 h 以上自来水, 间甲酚为分析纯, 助溶剂为化学纯丙酮, 作为助溶剂用量体积为 0.1%, 对瓯江彩鲤早期发育无任何影响。

1.2 试验方法

间甲酚设置 3 个试验浓度, 分别为 7 mg/L(A 组)、13 mg/L(B 组)和 19 mg/L(C 组), 每个浓度设 3 个平行; 以曝气自来水为空白对照组(刘在平等, 2011)。将瓯江彩鲤受精卵置于 3 个不同浓度梯度的间甲酚中培育。在(20±2)℃的室温条件下静水孵化, 每天换对应浓度液 2 次。胚胎各发育阶段划分参照刘筠(1993)胚胎发育的观察方法。显微观察对照组和试验组, 记录正常发育和畸形胚胎数量并计算孵化率及成活率; 及时清除未受精卵和异常胚胎。

对成熟卵(I)、受精卵(II)、卵裂期(III)、原肠胚期(IV)、神经胚期(V)、尾芽期(VI)、出膜期(VII)、内源营养期(1~3 日龄仔鱼, VIII)、混合营养期(4~5 日龄仔鱼, IX)、外源营养期(6~8 日龄仔鱼, X)共 10 个发育时期分别取样, 用于酶活力测定的样本都取样 100 粒(尾), 用滤纸吸干水分后, 在电子天平上称湿重(精确至 0.0001 g), 保存于-80℃的低温冰箱中备用。

收稿日期: 2013-12-05

基金项目: 国家自然科学基金(31160527); 贵州大学研究生创新基金(研农 2013018)。

通讯作者: 姚俊杰, 1968 年生, 男, 博士, 教授, 硕士生导师。E-mail: junjiyao@163.com

作者简介: 朱俊华, 1983 年生, 女, 硕士研究生, 研究方向为水生动物繁殖与发育生物学。E-mail: zhujunhua33@163.com

1.3 指标测定

酶液蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝法测定,总ATP酶活性采用南京建成生物技术有限公司生产的试剂盒测定,酶活单位为U/mg或U/g,抑制率计算公式如下:

$$\text{抑制率} = \frac{\text{对照酶活力} - \text{样品酶活力}}{\text{对照酶活力}} \times 100\%$$

1.4 数据分析

采用SPSS17.0统计软件对数据进行统计分析,统计值用平均值±标准差(Mean±SD)表示,以α=0.05为统计检验水平,通过单因素方差分析进行差异显著性检验($P<0.05$ 表示有显著差异, $P>0.05$ 为差异不显著),运用Duncan多重比较检验差异。

2 结果

2.1 瓯江彩鲤成熟卵和受精卵总ATP酶活性变化

瓯江彩鲤成熟卵细胞中总ATP酶的活性为 (1.91 ± 0.04) U/mg。经人工受精后,受精卵中的总ATP酶的活性与成熟卵基本相当,为 (1.93 ± 0.02) U/mg,差异不显著($P>0.05$)。

2.2 瓯江彩鲤胚胎发育期总ATP酶活性变化

2.2.1 胚胎发育期总ATP酶活性变化 瓯江彩鲤胚胎发育过程中总ATP酶活性变化见图1。

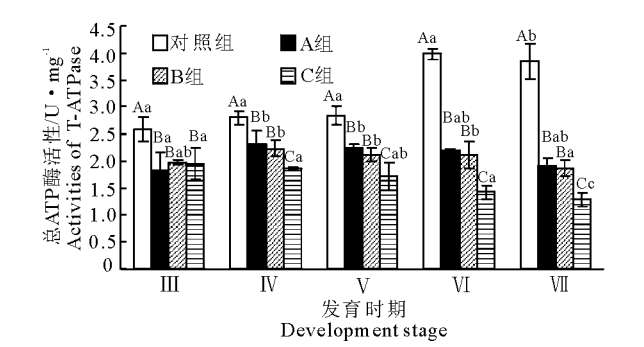
胚胎发育至卵裂期,总ATP酶活性为 (2.58 ± 0.22) U/mg;当发育至尾芽期,酶活性达到最大值,为 (3.98 ± 0.11) U/mg,在出膜期总ATP酶活性又降至 (3.84 ± 0.34) U/mg,这2个时期酶活性与其他发育时期相比差异显著($P<0.05$)。

2.2.2 间甲酚对总ATP酶活性的影响 在间甲酚胁迫下,瓯江彩鲤胚胎发育过程中总ATP酶活性变化见图2。无论发育至哪个时期,与对照组相比,3个浓度组的总ATP酶均受到抑制作用,且差异显著($P<0.05$);除卵裂期,与7mg/L和13mg/L浓度组相比,19mg/L浓度组均有显著差异($P<0.05$)。总体上来看,酶抑制率随暴露时间的延长和间甲酚浓度的增加而增高,19mg/L浓度组暴露,酶抑制率在出膜期已达66.4%。

2.3 瓯江彩鲤胚后发育期总ATP酶活性变化

2.3.1 胚后发育总ATP酶活性的变化 瓯江彩鲤胚后发育总ATP酶活性变化见图3。在内源营养期总ATP酶活性较高,为 (3.79 ± 0.24) U/g;随着个体的发育,总ATP酶活性降低,混合营养期(4~5日龄仔鱼,IX)的酸性磷酸酶活性为 (3.41 ± 0.36) U/g,外源营养期(6~8日龄仔鱼,X)的总

ATP酶活性略微下降,为 (3.33 ± 0.33) U/g;与前面2个取样期相比差异均不显著($P>0.05$)。



(不同大写字母表示同时期在不同浓度组中有显著差异, $P<0.05$;不同小写字母表示同浓度组中不同时期有显著差异, $P<0.05$)

图1 瓯江彩鲤胚胎发育期总ATP酶活性的变化
(Different capital letters mean significant difference in different concentration groups of the same stage, $P<0.05$; small letters mean significant difference at different stages of the same concentration group, $P<0.05$)

Fig.1 Changes of total ATPase activity during the embryonic development of *Cyprinus carpio* var. *color*

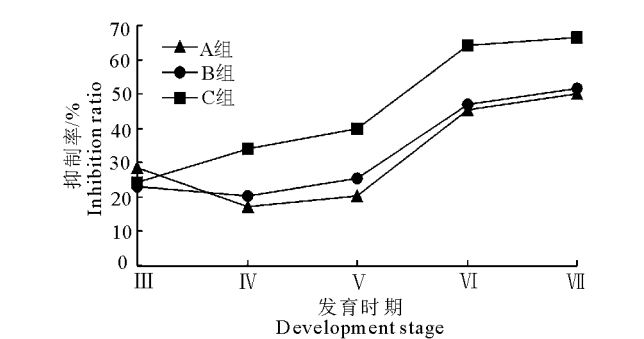
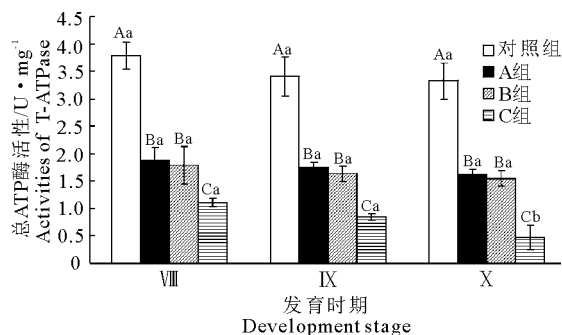


图2 间甲酚对瓯江彩鲤胚胎发育期总ATP酶的抑制率
Fig.2 Inhibition ratio of total ATPase activity caused by m-cresol during the embryonic development of *Cyprinus carpio* var. *color*

2.3.2 间甲酚对总ATP酶活性的影响 经不同浓度的间甲酚暴露,瓯江彩鲤胚胎发育过程中总ATP酶活性变化见图3。各浓度组总ATP酶活性在各发育时期均表现明显的良好抑制剂量-效应和发育时期-效应关系。与其他浓度组相比,空白对照组总ATP酶活性在胚后各发育时期均较高且差异显著($P<0.05$)。间甲酚对总ATP酶活性的抑制变化见图4。总体上来看,酶抑制率随着间甲酚浓度的升高和效应时间的延长而升高。

3 讨论

3.1 早期发育总ATP酶活性的变化特征 总ATP酶广泛分布于细胞膜上,与机体能量代



(不同大写字母表示同时期在不同浓度组中有显著差异, $P < 0.05$; 不同小写字母表示同浓度组中不同时期有显著差异, $P < 0.05$)

图3 瓯江彩鲤胚后发育期总 ATP 酶活性的变化

(Different capital letters mean significant difference in different concentration groups of the same stage, $P < 0.05$; small letters mean significant difference at different stages of the same concentration group, $P < 0.05$)

Fig. 3 Changes of total ATPase activity during the post-embryonic development of *Cyprinus carpio* var. *color*

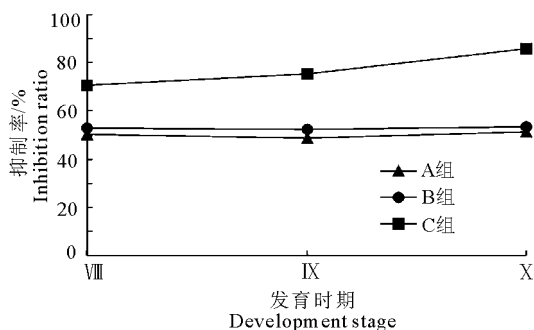


图4 间甲酚对瓯江彩鲤胚后发育期总 ATP 酶的抑制率

Fig. 4 Inhibition ratio of total ATPase activity caused by m-cresol during the post-embryonic development of *Cyprinus carpio* var. *color*

谢、物质转运、渗透调节、神经冲动传递等生理功能密切相关。本研究发现,瓯江彩鲤的受精卵中总 ATP 酶活性略高于成熟卵细胞但差异不显著 ($P > 0.05$),表明成熟卵细胞和受精卵中所需能量变化不大。瓯江彩鲤胚胎期的渗透调节主要依靠卵膜来完成,所以此时总 ATP 酶活性相对较低,但总体来看,总 ATP 酶活性随着发育时间的延长而升高。从胚胎分裂期至原肠胚期,总 ATP 酶活性增加但差异不显著,与条石鲷 (*Oplegnathus fasciatus*) 胚胎期总 ATP 酶活性变化一致 (何滔, 2011); 这可能与胚胎在卵裂期细胞数目增多、相应的总 ATP 酶含量也增加有关。由于受精卵到原肠期是胚胎细胞分裂和原基器官形成的重要时期,所以在空白对照组原肠胚期的 ATP 酶活性显著高于受精卵期; 从原肠期开始到胚胎发育完全是各种组织、器官分化与形

成的关键时期,期间胚胎新陈代谢旺盛,能量大量消耗 (胡先成, 2007); 因此总 ATP 酶活性在尾芽期显著升高,为 (3.98 ± 0.11) U/mg。

3.2 间甲酚对总 ATP 酶活性的影响

本试验结果显示,空白对照组孵化率和成活率是分别为 82% 和 90%; 7、13、19 mg/L 浓度组的孵化率分别为 58%、47% 和 35%,成活率分别为 85%、83% 和 70%; 说明间甲酚对瓯江彩鲤的孵化率和成活率具有抑制作用。

本试验首次研究了间甲酚对瓯江彩鲤早期发育过程中总 ATP 酶的抑制作用,较高浓度的间甲酚浓度组总 ATP 酶活性显著低于对照组,说明间甲酚对总 ATP 酶活性具有较强的抑制作用,且随剂量增大,抑制作用更加明显,呈现剂量-效应关系。瓯江彩鲤在受精卵期 ATP 酶活性为 (1.93 ± 0.02) U/mg,发育至卵裂期,空白对照组 ATP 酶活性明显升高,而暴露组则无明显变化,说明间甲酚阻碍了胚胎的发育。瓯江彩鲤胚胎发育时期,间甲酚对总 ATP 酶抑制率随发育时间的延长而升高,在神经胚期至尾芽期,抑制率上升幅度较大,说明在此时期内总 ATP 酶对间甲酚反应较敏感; 经 19 mg/L 的间甲酚暴露,在外源营养期对总 ATP 酶的抑制率达到 85.9%,说明高浓度的间甲酚对机体产生了极度损伤,致使体内的总 ATP 酶活性降低。刘洁生等 (1997) 通过敌百虫对鲤鱼组织总 ATP 酶活性影响研究发现,敌百虫对其鳃和肾的总 ATP 酶抑制率随暴露时间的延长而升高。总 ATP 酶活性在间甲酚应激下活性降低,表明一定质量浓度间甲酚胁迫会干扰代谢过程。

间甲酚对瓯江彩鲤的早期发育有阻碍作用,可能是由于间甲酚具有高蓄积性和难降解性,对机体有致癌作用,影响胚胎发育和器官分化 (刘在平等, 2011); 一定质量浓度间甲酚胁迫会干扰瓯江彩鲤的生理代谢过程,从而抑制其早期发育总 ATP 酶活性。

参考文献

- 方展强,张凤君,郑文彪,等. 2004. 多氯联苯对剑尾鱼 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响[J]. 水产学报, 28(1): 89-92.
- 方展强,王春风,卫焕荣. 2006. 汞和硒对剑尾鱼 Na^+/K^+ -ATPase 活性的影响[J]. 应用与环境生物学报, 12(2): 220-223.
- 何滔. 2011. 条石鲷早期发育及相关酶活性的研究[D]. 青岛: 中国科学院海洋研究所.
- 胡先成. 2007. 河川沙塘鳢早期发育过程中的器官发育、营

- 养代谢及其能量收支的研究[D]. 上海: 华东师范大学.
- 李爽, 艾英伟, 阿拉木斯, 等. 2010. 黄芪总苷对力竭运动大鼠骨骼肌中 ATP 酶活性的影响[J]. 体育科技文献通报, 18(3): 110–111.
- 刘洁生, 肖丹, 叶丛容, 等. 1997. 敌百虫对鲤鱼组织乙酰胆碱酯酶和腺苷三磷酸酶活力的影响[J]. 环境科学研究, 10(3): 21–25.
- 刘筠. 1993. 中国养殖鱼类繁殖生理学[M]. 北京: 农业出版社: 813.
- 刘在平, 张松林, 杨敬辉, 等. 2011. 间甲酚对斑马鱼胚胎的影响[J]. 环境科技, 24(2): 1–3.
- 王桂忠, 汤鸿, 李少菁, 等. 1995. 锯缘青蟹胚胎发育过程主要生化组成[J]. 台湾海峡, 14(3): 280–283.

(责任编辑 万月华)

Effects of M-cresol on Activity of Total ATPase During the Early Development of *Cyprinus carpio* var. *color*

ZHU Jun-hua¹, LIANG Li², YAO Jun-jie¹, FENG Ya-nan¹

(1. Department of Fisheries Science of College of Animal Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, P. R. China;

2. Department of Biochemistry, Tongren University, Tongren 554300, P. R. China)

Abstract: Activity of total adenosine triphosphatase (ATPase) was determined during the early development of *Cyprinus carpio* var. *color* exposed to 7 mg/L, 13 mg/L and 19 mg/L m-cresol at the temperature of $(20 \pm 2)^\circ\text{C}$. The influence of m-cresol on the total ATPase was analyzed through biochemical and static toxicological methods. The results showed that the activity of total ATPase had no significant difference in the fertilized eggs and the mature eggs of *Cyprinus carpio* var. *color* ($P > 0.05$). However, the activities of total ATPase in all treatment groups demonstrated obvious dose-effect relationship and stage-effect relationship in response to m-cresol during the early development of *Cyprinus carpio* var. *color*. In general, the activity of total ATPase decreased with the extension of developmental time and increasing of m-cresol concentration from gastrula stage of the early development of *Cyprinus carpio* var. *color*.

Key words: m-cresol; *Cyprinus carpio* var. *color*; early development; total ATPase