

几种重金属离子对中华绒螯蟹 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶活力的影响

黄小红 陈宏惠 刘建昌 金艳冬 肖其韬

(福建农林大学动物科学学院动物保健研究所, 福州 350002)

摘要: 本文研究了 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ag^+ 等重金属离子对中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase) 活力的影响。其结果表明: Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶活力有不同程度的抑制作用, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶的抑制作用均表现为非竞争性抑制类型, Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶的抑制常数 (K_i) 分别为 1.25 mmol/L 和 8.10 mmol/L; Pb^{2+} 对酶的抑制作用表现为混合型抑制类型, 其对酶的抑制常数 K_i 与 K_s 分别为 10.44 mmol/L 和 2.18 mmol/L。 Ag^+ 对酶的效应为先激活后抑制, 其抑制作用表现为反竞争性抑制, Ag^+ 对结合酶 (ES) 的抑制常数 K_s 为 204.5 mmol/L。

关键词: 中华绒螯蟹; N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶; 酶活力; 重金属离子; 作用机理

中图分类号: Q176 X503.225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2008)06-0850-06

中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 属甲壳纲, 十足目, 方蟹科, 绒螯蟹属, 自古以来是我国特有的名优水产品, 其肉味鲜美、营养价值高、风味独特, 享誉海内外, 是我国出口创汇的重要水产品。但近几年, 我国工农业发展迅速, 大量工农业污水排入水体环境中, 特别是含重金属的污染物的排入, 严重危害了中华绒螯蟹的生长发育和生存, 影响了中华绒螯蟹养殖业的健康可持续发展。有学者研究了汞 (Hg^{2+})、铅 (Pb^{2+}) 和镉 (Cd^{2+}) 等重金属离子可以在中华绒螯蟹体内不同程度地富集并引起的蟹体内相关指标 (生长、酶、超微结构、MT、遗传毒性) 的变化, 并探讨了中华绒螯蟹的重金属中毒机制^[1, 2]。但是国内外还未见从分子酶学的角度研究这些重金属离子与中华绒螯蟹 N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶 (NAGase, EC3.2.1.52) 相互作用的分子机理的报道。

属甲壳动物的中华绒螯蟹, 其生长、形态变化、生殖器官的发育和断肢再生等, 都要通过蜕皮和蜕壳来完成^[3]。N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷酶与其他几丁质酶系的成员共同参与了甲壳类动物蜕壳过程中的几丁质分解, 在协助甲壳类动物顺利完成生理周期性蜕壳的过程中起了重要作用^[4]。本文以中华绒螯蟹内脏分离纯化得到的 NAGase 为材料^[5],

以 CuSO_4 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 ZnCl_2 和 AgNO_3 等重金属盐溶液为效应物, 研究它们对酶活力的影响, 探讨酶活力变化与这些效应物之间的相关性以及它们互作的分子机理, 为人工养殖中华绒螯蟹食品安全性的监控提供科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料 中华绒螯蟹购自福州某养殖场。研究所用的主要试剂 NAGase 由本实验室从中华绒螯蟹内脏分离纯化得到, 酶制剂为 PAGE 单一纯, 比活力为 4490.79 U/mg。酶催化反应的底物邻氯对硝基苯-N-乙酰- β -D-氨基葡萄糖苷 (CNP-NAG) 为上海医药工业研究院产品; ZnCl_2 、 CuSO_4 、 AgNO_3 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 等金属盐药品及其余试剂均为国产 AR 试剂, 所有溶液均以重蒸水配制。

1.2 方法

1.2.1 酶活力的测定 酶活力的测定参照文献 [6] 的方法。酶活力单位 (U) 定义: 在 pH 5.63 醋酸缓冲液, 37℃ 条件下, 每 L 溶液中每 min 催化产生 1 μ mol CNP 所需的酶量。

1.2.2 重金属盐溶液对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响 选择 ZnCl_2 、 CuSO_4 、 AgNO_3 和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 等金属盐溶液为效应物, 在 2 mL 的测活体系中 (含终

收稿日期: 2007-08-24 修订日期: 2008-05-12

基金项目: 福建省自然科学基金项目 (B0710001); 2006 年福建省高等学校新世纪优秀人才支持计划资助

通讯作者: 黄小红 (1966—), 女, 汉族, 福建建瓯人; 教授, 博士; 主要从事动物生物化学方面的研究。E-mail: xhluang@vip.sina.com

浓度为 0.2mol/L pH5.63 醋酸缓冲液, 0.2mmol/L 的底物), 加入不同效应物, 测定酶的相对活力, 分析研究效应物对酶活力的影响。

在含不同浓度的 CuSO_4 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 ZnCl_2 和 AgNO_3 等金属盐溶液的测活体系中, 固定底物浓度为 0.2mmol/L, 改变加入的酶量, 测定酶促反应的初速度, 判断抑制作用类型。

酶在 CuSO_4 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 ZnCl_2 和 AgNO_3 等金属盐溶液中的抑制作用动力学研究是在醋酸缓冲液 (pH 5.63) 中测定。在含不同浓度的 CuSO_4 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 ZnCl_2 和 AgNO_3 的测活体系中, 改变底物浓度, 测定酶促反应的初速度, 以 Lineweaver-Burk 双倒数法作图, 判断其抑制机理。并根据酶的动力学参数的变化进行二次作图, 求其抑制常数 (K_i)。

2 结果与分析

2.1 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 的影响

Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 的浓度效应 Cu^{2+} 在 0—1.0mmol/L 浓度范围内对中华绒螯蟹 NAGase 活力有抑制作用, 当 Cu^{2+} 浓度为 1.0mmol/L 时, 酶的剩余活力为 57.0% (图 1)。

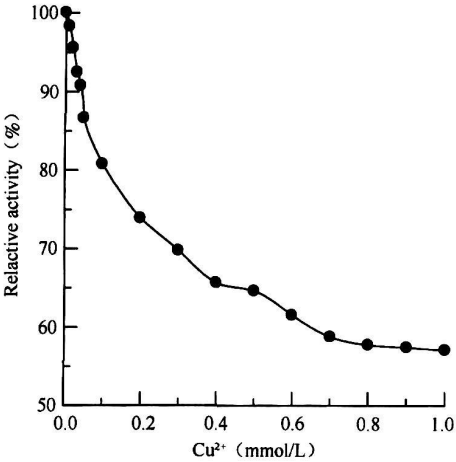


图 1 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响
Fig 1 Effect of Cu^{2+} on the activity of NAGase

Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制类型 以 CuSO_4 为效应物, 探讨其对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制类型。结果表明 (图 2): 酶活力对酶浓度作图为一组通过原点的直线, 随着 CuSO_4 浓度的增高, 直线的斜率降低。这说明 CuSO_4 对酶的抑制作用属于可逆过程。

Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 抑制机理 CuSO_4 对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制机理表明 (图 3): 随

CuSO_4 浓度的增加, 得到一组直线交于横轴一点。这说明 CuSO_4 对酶的抑制作用表现为非竞争性抑制。测定其抑制常数 K_i 为 1.25mmol/L。

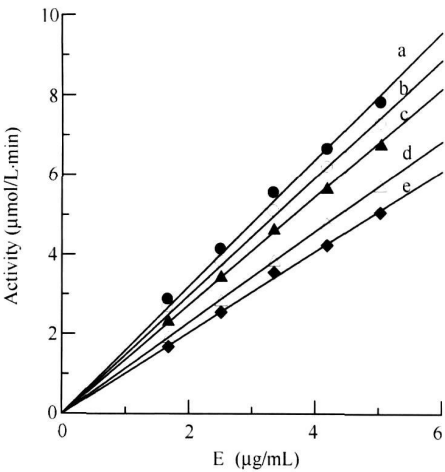


图 2 Cu^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 抑制类型
Fig. 2 Determination of the inhibition mechanism of Cu^{2+} on NAGase
a-e. Cu^{2+} 浓度分别 0, 0.03, 0.1, 0.4, 0.8mmol/L; 图 3 同
a-e. The concentration of Cu^{2+} is 0, 0.03, 0.1, 0.4, 0.8mmol/L, respectively; The same as Fig. 3

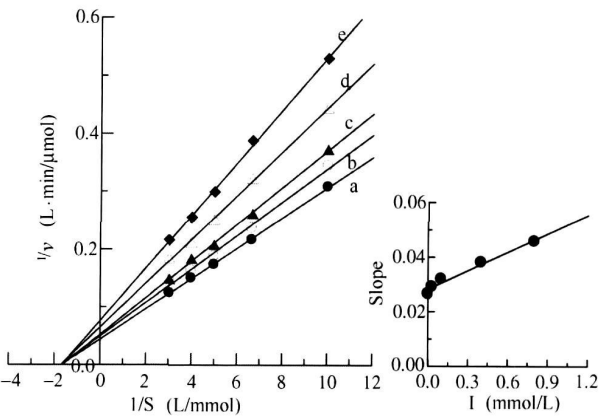


图 3 Cu^{2+} 对酶抑制效应的 Lineweaver-Burk 关系图
Fig. 3 Lineweaver-Burk polts for NAGase inhibited by Cu^{2+}

2.2 Pb^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 的影响

Pb^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 的浓度效应 Pb^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响呈现浓度效应, Pb^{2+} 使酶活力下降 50% 的浓度 (IC_{50}) 为 8.0mmol/L, 当 Pb^{2+} 浓度为 25mmol/L 时, 酶的剩余活力为 27% (图 4)。

Pb^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制类型 以 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 为效应物, 探讨其对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制类型。结果表明 (图 5): 酶活力对酶浓度作图为一组通过原点的直线, 随着 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 浓度的增高, 直线的斜率降低。这说明 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 对酶的

抑制作用属于可逆过程。

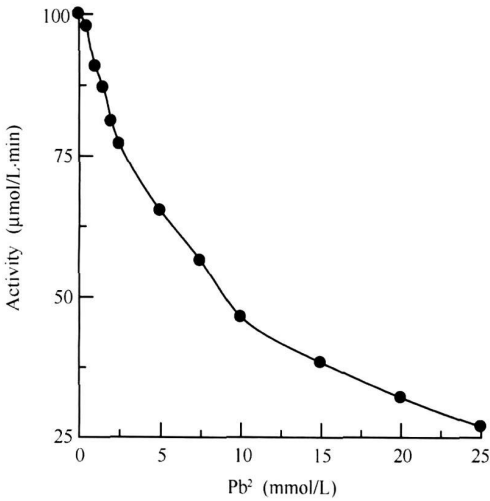


图4 Pb²⁺对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响
Fig. 4 Effect of Pb²⁺ on the activity of NAGase

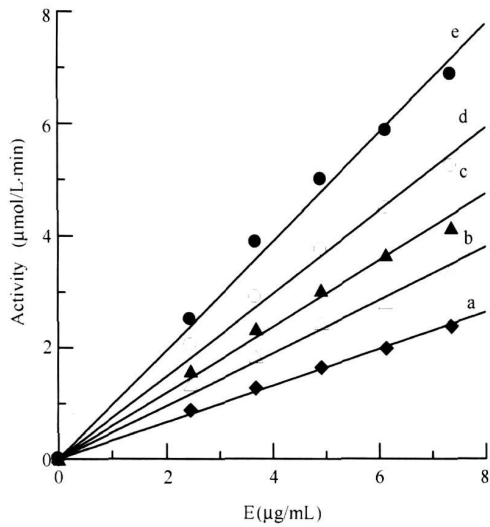


图5 Pb²⁺对中华绒螯蟹 NAGase 抑制类型
Fig. 5 Determination of the inhibition mechanism of Pb²⁺ on NAGase
a-e. Pb²⁺ 浓度分别为 0、2、4、6、8 mmol/L; 图 6 同
a-e. The concentration of Pb²⁺ is 0, 2, 4, 6, 8 mmol/L; the same as Fig. 6

Pb²⁺对中华绒螯蟹 NAGase抑制机理 Pb(NO₃)₂对中华绒螯蟹 NAGase的抑制结果表明(图 6):随 Pb(NO₃)₂浓度的增加,得到的一组直线斜率增加,各直线交于第三象限一点。Pb(NO₃)₂对 NAGase的抑制作用表现为混合型抑制。以双倒数图的各直线斜率及纵轴截距分别对 Pb(NO₃)₂浓度作图(图 6),均为一直线,测定其抑制常数 K_i 与 K_s 分别为 10.44 mmol/L 和 2.18 mmol/L。

2.3 Zn²⁺对中华绒螯蟹 NAGase的影响

Zn²⁺对中华绒螯蟹 NAGase的浓度效应 Zn²⁺对中华绒螯蟹 NAGase 活力有抑制作用(图

7), Zn²⁺ 浓度在 20 mmol/L 时,可使酶活力下降 50.2%。

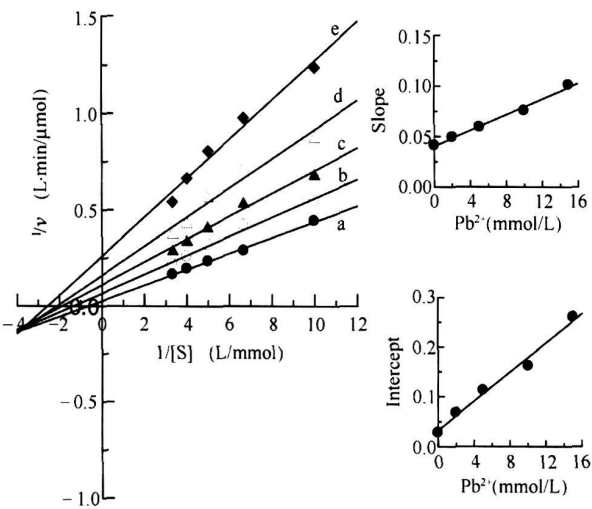


图6 Pb²⁺对酶抑制效应的 Lineweaver-Burk 关系图
Fig. 6 Lineweaver-Burk plots for NAGase inhibited by Pb²⁺

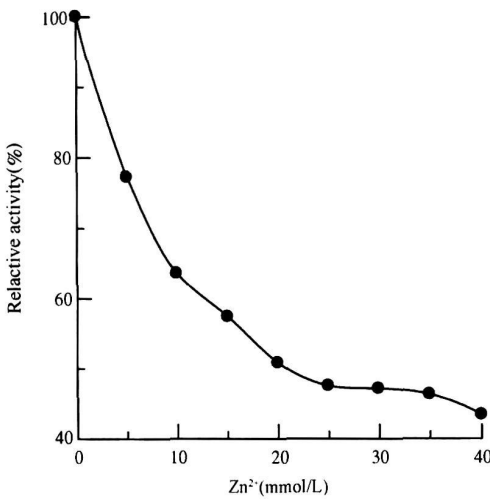


图7 Zn²⁺对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响
Fig. 7 Effect of Zn²⁺ on the activity of NAGase

Zn²⁺对中华绒螯蟹 NAGase的抑制类型 以 ZnCl₂为效应物,探讨其对中华绒螯蟹 NAGase的抑制类型。结果表明(图 8):酶活力对酶浓度作图为一组通过原点的直线,随着 ZnCl₂浓度的增高,直线的斜率降低。这说明 ZnCl₂对酶的抑制作用属于可逆过程。

Zn²⁺对中华绒螯蟹 NAGase抑制机理 ZnCl₂对中华绒螯蟹 NAGase的抑制机理表明(图 9):随 ZnCl₂浓度的增加,得到的一组直线交于横轴一点,ZnCl₂对中华绒螯蟹 NAGase抑制作用表现为非竞争性机制。测定其抑制常数 K_i 为 8.10 mmol/L。

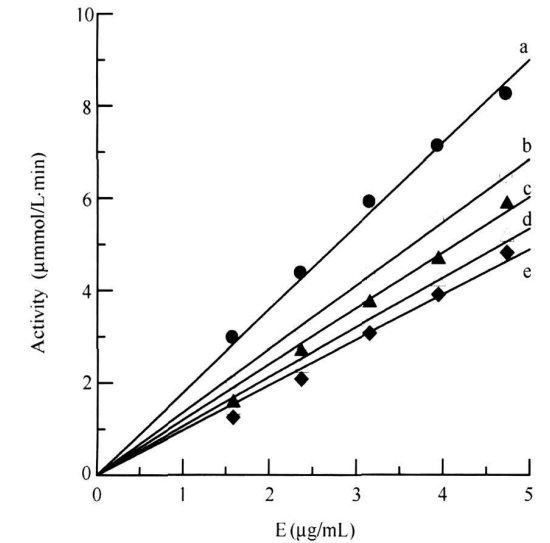


图 8 Zn^{2+} 对中华绒螯蟹 NAGase 抑制类型

Fig. 8 Determination of the inhibition mechanism of Zn^{2+} on NAGase

a-e. Zn^{2+} 浓度分别 0、2、4、6、8mmol/L

a-e. The concentration of Zn^{2+} is 0, 2, 4, 6, 8mmol/L, respectively;

the same as Fig. 9

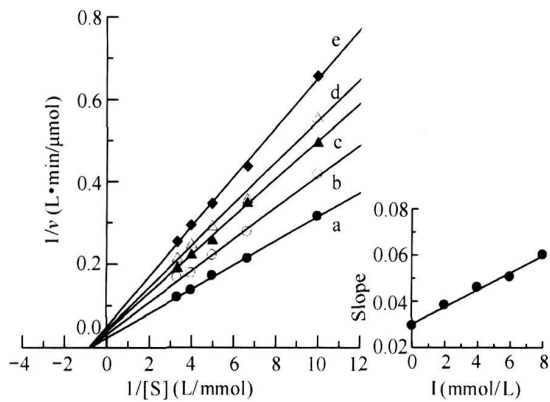


图 9 Zn^{2+} 对酶抑制效应的 Lineweaver-Burk 关系图

Fig. 9 Lineweaver-Burk polts for NAGase inhibited by Zn^{2+}

2.4 Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase的影响

Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase的浓度效应 研究 Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase活力的影响, 结果表明 (图 10), Ag^+ 在 0—900μmol/L 范围内对酶活力有先扬后抑作用, 当 Ag^+ 浓度达 120μmol/L 时, 酶活力升高 47%, 浓度超过 270μmol/L 时, 酶活力被抑制, Ag^+ 使酶活力下降 50% 的浓度 (IC_{50}) 为 800μmol/L。

Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase的抑制类型 选择 AgNO_3 为效应物, 探讨其在 0.5—5mmol/L 的浓度范围内对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制作用类型。结果表明 (图 11): 酶活力对酶浓度作图为一组通过原点

的直线, 随着 AgNO_3 浓度的增高, 直线的斜率降低。这说明 AgNO_3 对酶的抑制作用属于可逆过程。

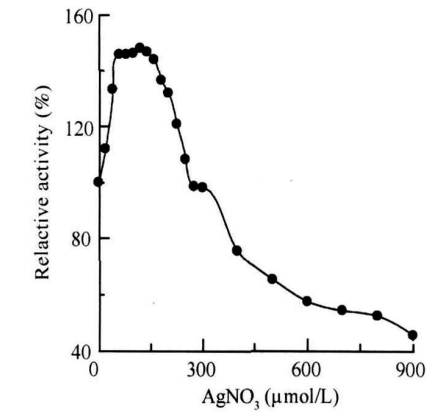


图 10 Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响

Fig. 10 Effect of Ag^+ on the activity of NAGase

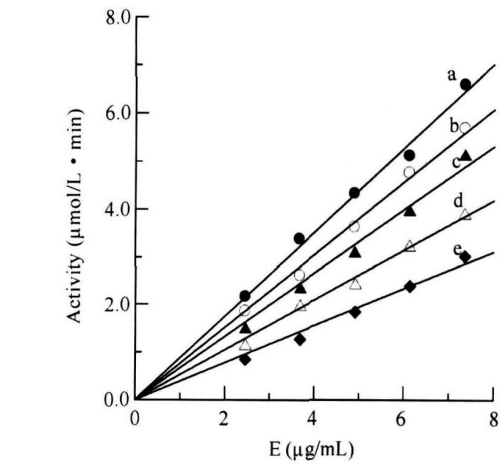


图 11 Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase 抑制类型

Fig. 11 Determination of the inhibition mechanism of Ag^+ on NAGase

a-e. Ag^+ 浓度分别为 0、0.5、0.6、1.5mmol/L

a-e. The concentration of Ag^+ is 0, 0.5, 0.6, 1.5mmol/L, respectively;

the same as Fig. 12

Ag^+ 对中华绒螯蟹 NAGase抑制机理 AgNO_3 对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制机理研究表明 (图 12): 随着 AgNO_3 浓度的增加, 得到的相交于纵轴的一组斜率不变、横轴截距减小、纵轴截距增大的平行直线, 其抑制机理表现为反竞争性类型, 即 AgNO_3 只能与结合酶 (ES) 结合, 使反应平衡趋向于 ES 的形成, 故 AgNO_3 的存在反而增加了酶和底物的亲和力。以不同浓度 AgNO_3 下测定 $1/V_m$ 对 AgNO_3 浓度作图 (图 12) 为一条直线, 从直线的斜率可以求得 AgNO_3 对结合酶 (ES) 抑制常数 K_{is} 为 204.51mmol/L。

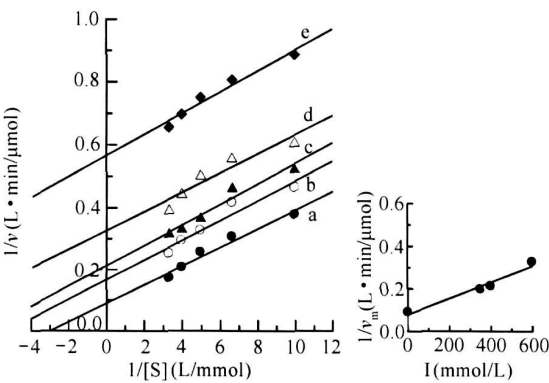


图 12 Ag^+ 对酶抑制效应的 Lineweaver-Burk 关系图
Fig 12 Lineweaver-Burk plots for NAGase inhibited by Ag^+

3 讨论

重金属离子存在于养殖水体会对中华绒螯蟹体内的酶活力造成影响。王兰等^[7]发现镉对蟹体主要组织器官酯酶同工酶有显著影响。本试验也发现, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Zn^{2+} 和 Ag^+ 等重金属离子对中华绒螯蟹 NAGase 有显著影响。 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶活力均有不同程度的抑制作用, 它们使酶活力下降 50% 的浓度大约分别为 1.0mmol/L、8.0mmol/L 和 20mmol/L。 Ag^+ 在 0—900μmol/L 范围内对酶活力有先激活后抑制作用, 当 Ag^+ 浓度达 120μmol/L 时, 酶活力升高 47%, 浓度超过 270μmol/L 时, 酶活力被抑制, Ag^+ 使酶活力下降 50% 的浓度 (IC_{50}) 为 800μmol/L。 Ag^+ 是一把双面刃, 低浓度的激活和高浓度的抑制作用是有别于其他三种重金属离子的特征。

比较这几种重金属离子对酶活力的抑制程度发现: $\text{Ag}^+ > \text{Cu}^{2+} > \text{Pb}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$ 。这四种金属离子对酶的抑制均属于可逆过程, 它们与中华绒螯蟹 NAGase 以非共价键结合而引起 NAGase 活力的降低。它们是通过抑制 NAGase 活力而导致催化效率的降低, 并不是通过降低有效的酶量导致活力的下降。 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对酶的抑制作用均为非竞争性抑制, 说明 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 、底物相互独立地与酶的结合, 两者既无相互排斥, 亦无相互促进。 Cu^{2+} 或 Zn^{2+} 可与游离的酶结合, 也可与酶与底物的复合物结合, 但它们形成的产物无活性, 不能释放出产物。 Pb^{2+} 对酶的抑制表现为混合型抑制类型, 是非竞争性与反竞争性抑制的混合。即随 Pb^{2+} 离子浓度的增大, K_m 减少, V_m 减少。 Ag^+ 对酶的抑制作用为反竞争性抑制, Ag^+ 只能与酶与底物的复合物结合, 但不能与游离

的酶结合, 只有当底物结合到酶分子上导致酶构象发生变化, 暴露出酶与 Ag^+ 结合的部位, 形成酶-底物- Ag^+ 三元复合物, 不能释放出产物。可见, 不同的金属离子会使酶表现出不同的催化活性, 即使同一种金属离子在不同的浓度范围对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制程度也存在差异, 它们对酶抑制机理也不尽相同。

CuSO_4 是常用水产消毒药, 其水溶液具有较好的杀灭病原体的能力, 可以用于药浴水产动物, 消毒渔具、防治疾病。但 CuSO_4 过量会引起水产动物内脏组织坏死, 同时还可能残留在水产动物体内, 影响水产动物的摄食和生长。本试验中, CuSO_4 对中华绒螯蟹 NAGase 的抑制作用说明, 在使用 CuSO_4 过程中, 要准确测量水体量, 精确 CuSO_4 用量, 减小其对动物体内酶活性的影响及其对水产动物的毒副作用。

目前, 水体重金属污染问题越来越受到全世界的关注。这些重金属不仅对水产动物有毒害作用, 影响了水产动物的正常生长, 造成水产养殖业的经济损失, 还会蓄积于水产动物体内, 引起水产食品的安全性问题, 对人类健康构成了威胁。本试验研究各种重金属离子对中华绒螯蟹 NAGase 活力的影响, 对中华绒螯蟹及其他甲壳类动物的养殖生产实践具有重要的指导意义, 即应该严格监控养殖水体中重金属的含量, 同时应加强对含金属的渔用饲料添加剂、药物的使用和管理, 防止滥用。

参考文献:

[1] Xi Y Y, Wang L, Yang X Q *et al* The accumulation of Hg^{2+} in major tissues and organs of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, 47(sup): 92—95 [席玉英, 王兰, 杨秀清, 等. 汞在中华绒螯蟹主要组织器官中的积累. 动物学报, 2001, 47 (sup): 92—95]
[2] Yu F J Study toxic effects of two heavy metals of Pb and Cd on *Eriocheir sinensis* [D]. Shanghai East China Normal University 2005 [于丰军. 铅和镉两种重金属对中华绒螯蟹的毒性效应研究. 上海: 华东师范大学. 2005]
[3] Xu Z K, He Q Y. The emphases, keystones and examples of *Eriocheir sinensis* nuisance-free breed [M]. Scientific and Technical Documents Publishing House 2005 [徐在宽, 何群益. 中华绒螯蟹无公害养殖重点、难点与实例. 科学技术文献出版社. 2005]
[4] Funke B, Spindler K D. Characterization of chitinase from Brine Shrimp *Artemia* [J]. *Comp Biochem Physiol* 1989 94B (4): 691—695
[5] Huang X H, Chen H H, Huang Y F. Preliminary studies on isolation, purification and some properties of the β -N-Acetyl-D-gluc-

cosaminidase from *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(4): 563—569 [黄小红, 陈宏惠, 黄一帆. 中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究. 水生生物学报, 2007, **31**(4): 563—569]

[6] Huang X H, Chen Q X, You M S, *et al*. Isolation, purification and partial characterization of the β-N-Acetyl-D-glucosaminidase from the pupae of *Helicoverpa armigera* [J], *Acta Entomologica Sinica*, 2005, **48**(4): 498—502 [黄小红, 陈清西, 尤民生, 等. 棉铃虫 N-乙酰-β-D-氨基葡萄糖苷酶的分离纯化及性质的初步研究. 昆虫学报, 2005, **48**(4): 498—502]

[7] Wang L, Yang X Q, Wang Q, *et al*. The accumulation of Cd²⁺ and the effect on est in five tissues and organs of *Eriocheir sinensis* [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 2001, **47**(sup): 96—100 [王兰, 杨秀清, 王茜, 等. 镉在中华绒螯蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响. 动物学报, 2001, **47**(sup): 96—100]

EFFECTS OF SOME HEAVY METAL ON THE N-ACETYL-β-D-GLUCOSAMINIDASE FROM *ERIOCHEIR SINENSIS*

HUANG Xiao-Hong CHEN Hong-Hui LIU Jian-Chang JIN Yan-Dong and XIAO Qitao
(Institute of Animal Health, College of Animal Science, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

Abstract The effects of heavy metal ions (Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺ and Ag⁺) on N-Acetyl-β-D-glucosaminidase from *Eriocheir sinensis* were studied. The results showed that Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ inhibited the activity of enzyme in vary degree. Cu²⁺ and Zn²⁺ were both reversible non-competitive inhibitors. The inhibition constants of free enzyme (*K_i*) of Cu²⁺ and Zn²⁺ were 1.25 mmol/L and 8.10 mmol/L, respectively. Pb²⁺ was reversible mixed-type inhibition. The inhibition constants of free enzyme (*K_i*) and enzyme-substrate complex (*K_s*) of Pb²⁺ were determined to be 10.44 mmol/L and 2.18 mmol/L, respectively. Ag⁺ activated the enzyme at low concentrations but it inhibited the enzyme at higher concentrations as a reversible uncompetitive inhibitor. The inhibition constants (*K_{is}*) was 204.51 mmol/L.

Key words *Eriocheir sinensis*; N-Acetyl-β-D-glucosaminidase; Activity; Metal ions; Mechanism of action