

研究简报

低 pH 对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响

卢健民 卢 玲 蔺玉华 夏重志 战培荣
(中国水产科学研究院黑龙江水产研究所, 哈尔滨 150070)

THE EFFECT OF LOW pH ON $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ ACTIVITY OF
GILL TISSUES OF THE COMMON CARP

LU Jiar-min, LU Ling, LIN Yu-hua, XIA Zhong-zhi and ZHAN Pei-rong
(Heilongjiang Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Harbin 150070)

关键词: pH; 鲤; 鳃组织; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$
Key words: pH; Common carp; Gill tissue; $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$
中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000- 3207(2001)01- 003

$\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶几乎存在于所有动物的细胞中, 是组成 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 泵活性的主要部份, 它不仅参与能量代谢、物质运送、氧化磷酸化的重要生化过程, 而且它与膜上磷脂的结合状态, 将影响膜的流动性, 从而还会影响膜的其它功能。从人们发现 DDT 对 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 、 $\text{Mg}^{2+} - \text{ATPase}$ 的抑制作用以来, 广泛开展了多种污染物和生物体 ATPase 之间关系的研究, 并证实了有机农药、多氯联苯、金属、石油废水等污染物对 ATPase 的影响。该研究国外已有不少的报道^[1], 而我国则报道甚少。特别是低 pH 对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响尚未见报道。本文研究了 pH4.0—6.0 共 5 个梯度的酸性水对鲤鳃丝 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活性的影响。并从酶的活性研究探讨鱼类对低 pH 中毒的生化机理。

1 材料与方法

1.1 试验鱼和试验用水 鲤 (*Cyprinus carpio*) 取自本所育种研究室民富试验基地。鱼平均体长为 $12.297 \pm 1.76\text{cm}$, 体重为 $55.575 \pm 12.445\text{g}$ 。实验前在室内驯养两周, 使其适应环境。驯养期间无死亡, 体质健壮。

试验水为曝气的自来水, 溶解氧为 $5-6.0\text{mg/L}$, $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ 20.33mg/L , Ca^{2+} 19.54mg/L , Mg^{2+} 4.59mg/L , Fe^{2+} 0.17mg/L , NH_4O^{+} 0.006mg/L , NO_3^{-} 0.072mg/L , NO_2^{-} 0.006mg/L 。

1.2 方法 试验采用静水法, 用硫酸(分析纯、国产)配成 1mol/L H_2SO_4 母液, 然后配制成 pH 为 6.0、5.5、5.0、4.5、4.0 等 5 个梯度的酸性试验水。配制时充分搅拌。试验过程中, 经常用 pHZ-1 型酸度仪对各试验水族箱中的 pH 进行测定并及时调节, 使其与试验设置的水平保持一致。每日上、下午更换新

收稿日期: 1999- 11- 08; 修订日期: 2000- 03- 20
基金项目: 黑龙江省自然科学基金资助项目。
作者简介: 卢健民(1959—), 男, 江苏省泰兴市人; 助理研究员; 主要从事鱼类生态毒理学研究。承蒙本所沈俊宝研究员审阅, 深致谢忱。

鲜试验液各一次。

无机铝离子由硫酸铝 $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot 18\text{H}_2\text{O}$ (分析纯、国产), 先配成 0.5mg/mL Al^{3+} 母液, 以 0.1mg/L 浓度加入到不同 pH 水平的试验液。实验水温控制在 $24^\circ\text{C} \pm 1$ 。试验用的水族箱体积为 72L , 每箱放鱼 16 尾, 设平行组。试验周期为 30d, 每 7d 取鱼鳃组织测定酶活力。

1.3 提取液 20mmol/L Tris-HCl pH7.6 和 1% 皂碱按 9:1 混合为提取液。将鱼鳃弓去掉, 称取鳃丝加提取液后用电动匀浆器制备 10% 匀浆, 离心 10min (4000r/min), 取上清液按 Lowry^[2] 方法测定蛋白。

1.4 反应液 A 液 ($\mu\text{mol/L}$): MgCl_2 3.6, NaCl 80, KCl 33, L-组氨酸 80, EDTA 0.5, 哇巴因 0.9, ATP 2.5 (临反应前加入)。B 液: 反应液 A 中除去哇巴因。C 液: 0.5mmol/L 标准磷应用液。

1.5 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活力测定 分别取样品液 0.1mL 加入含反应 A、B 各 0.9mL 的试管中, 标准管加标准液 0.1mL , 加 A 液 0.9mL , 然后混匀, 放置 37°C 恒温水浴反应 1h 后加冷的 20% 三氯乙酸终止反应, 离心后上清液用紫外分光光度计 (波长为 340nm) 进行测定, 以钼兰法测定无机磷。

ATPase 活力单位: 分子磷/蛋白质/时间 ($\mu\text{g/mg/h}$)。

数据为 2 次重复实验的平均值和标准差表示, 两个平均值的差异用 t 检验。

2 结果和讨论

2.1 低 pH 水平对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的影响 (表 1)。

表 1 低 pH 水平对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 活力的影响

Tab. 1 The effect of low pH levels on the $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ activity of common carp gill tissues

pH	酶活性 Enzymes activity			
	7d	14d	21d	30d
对照 Control	16.847±0.438	16.102±0.732	17.102±0.369	17.194±0.431
6.0	16.635±0.209	16.328±0.523	15.916±0.804*	15.455±0.462* *
5.5	16.395±0.545	16.033±1.072	14.105±0.565* *	13.345±0.912* *
5.0	16.114±0.739	16.009±0.511	12.713±0.789* *	11.425±0.519
4.5	16.948±0.762	15.294±0.266	12.436±0.489* *	11.069±0.706* *
4.0	16.511±1.155	15.026±0.648	11.718±0.471* *	无

注: * $0.01 < P \leq 0.05$ 显著, * * $p < 0.01$ 极显著。(n = 4)

2.2 低 pH 水平加上铝对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的影响 (表 2)。

在酸性水的环境条件下, 氢离子的毒性靶器官是鱼鳃。鳃的任何部位损伤将立即影响体内离子平衡并加大补偿性渗透调节影响。同时, 氯细胞是鳃外表皮专门负责离子转移的, 它靠主动吸收离子来调解和保持血浆渗透压和体液离子平衡, 氯细胞内的膜管系统含几种离子转移的 ATPase (如 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, $\text{Na}^+ / \text{H}^+ \text{ATPase}$, $\text{Ca}^{2+} - \text{ATPase}$) 和转换站。但报道较多的是 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$, 膜管系统的至关重要性在于它的形态结构和 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 以及 K^+ 转移相关连。同时还涉及到钠泵一线粒体。因线粒体是转换站, 是酶物质组成的场所。试验证明, 当 pH 值远离鲤科鱼类正常生活范围时, 具有致死性或造成机体损伤和组织学病变。从表 1 可知, 随着低 pH 浓度的增加和暴露的时间延长, $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 酶活力明显下降。pH 值为 6.0 时, 21d 起有显著抑制作用 ($p < 0.05$), 历经 30d 有极显著抑制作用 ($p < 0.01$); 当 pH 值为 5.5—4.0 时, 21d 后开始就有极显著抑制 ($p < 0.01$)。由此可看出, 低 pH 确实对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 有不同程度的抑制作用。且与其值高低有关。

低 pH 水平加铝对鲤鳃组织 $\text{Na}^+ - \text{K}^+ - \text{ATPase}$ 的影响试验结果表明 (表 2), pH6.0 加铝时, 14d 有显著抑制作用 ($p < 0.05$), 21d 有极显著抑制 ($p < 0.01$), 抑制作用达到 75%; pH5.5—5.0 加铝时, 7d 有显

表 2 低 pH 水平加铝对鲤鳃组织 Na⁺-K⁺-ATPase 活力的影响

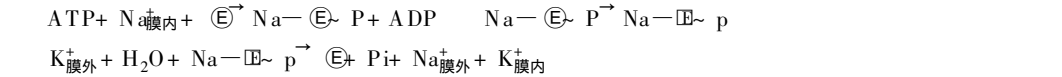
Tab. 2 The effect of low pH levels with aluminium on the Na⁺-K⁺-ATPase activity of common carp gill tissues

pH	酶活性 Enzymes activity			
	7d	14d	21d	30d
对照 Compare	16. 847±0. 438	16. 102±0. 732	17. 102±0. 369	17. 194±0. 431
6. 0+ Al ³⁺	16. 116±0. 566	14. 962±0. 308*	12. 915±0. 648**	11. 940±0. 486**
5. 5+ Al ³⁺	15. 743±0. 336**	14. 627±0. 365**	12. 562±0. 410**	11. 459±0. 642**
5. 0+ Al ³⁺	15. 838±0. 354*	14. 314±0. 459**	11. 964±0. 514**	11. 414±0. 669**
4. 5+ Al ³⁺	15. 606±0. 344**	14. 313±1. 039**	11. 105±0. 439**	11. 072±0. 654**
4. 0+ Al ³⁺	15. 800±0. 617*	14. 099±0. 483**	无	无

注: * 0. 01< P≤0. 05 显著, ** p< 0. 01 极显著。(n= 4)

著抑制($p < 0. 05$), 14d 有极显著抑制($p < 0. 01$), 抑制作用达到 100%; pH4. 5—4. 0 加铝时, 7d 同样有极显著抑制($p < 0. 01$), 抑制作用达到 100%。由于低 pH 值和有关微量元素及机体各种代谢过程之间的相互关系是错综复杂的, 彼此之间存在相互协同或拮抗作用。从上述加铝实验结果看, 在短期内对鲤鳃组织 Na⁺-K⁺-ATPase 活力即产生显著或极为显著抑制作用。这可能是低 pH 水平加铝而增大了毒性效应的缘故。

值得提出的是本实验所测定的主要是膜 ATPase, 它是细胞膜脂质双层上的四聚体的嵌入蛋白质, 其构象的维持依赖于膜上的磷脂, 它具有 ATP 分解酶活性的细胞, 膜蛋白质 Na⁺-K⁺-ATPase 酶, 这种酶必须有 Na、K、Mg 的存在时才有活性。ATPase 作用是在 Na⁺ 的主动转移, K⁺ 穿过细胞膜活动中, 使 K⁺ 泵入细胞内和 Na⁺ 运出细胞。这种观点早已被广泛接受。目前, Na⁺-K⁺-ATPase 催化机制的研究已得出一些结论^[3]: 即, Na⁺-K⁺-ATPase 催化的反应步骤为:



其中: E与E⁻分别代表酶分子的两种构象。在酶的活性中心有门冬氨酸, 其侧链羧基 ATP 的 r-p 进行亲核进攻使酶磷酸化; 在磷酸化反应中Mg²⁺与Na²⁺对活性中心的构象维持起一定作用。因此低 pH 水平影响酶活力的原因可能有以下几个方面: (1) 低 pH 值对酶蛋白的构象、功能及其酶活性均能产生不良影响。并破坏影响氧化磷酸化偶联, 影响线粒体 ATP 合成与释放, 减少了细胞 ATP 的合成来源。(2) 低 pH 加 Al³⁺ 影响分子中一些基团的解离。它可与活性中心的羧基形成不溶性盐, 影响活性中心的亲核催化作用。并导致机体抗自由基系统的防御能力减弱, 而损害生物膜, 使膜的有关脂质过氧化加剧, 从而使生物膜变性、坏死。(3) 低 pH 将会影响 Mg²⁺ 对 ATP 水解为 ADP 及无机磷的催化作用。

参考文献:

[1] Davis P W, Friedhoff J M, Wedemeyer G A. Crganchlorinated, insecticide, herbicide and Polychorinaected biphenyle (PCB) inhibition of NaK- ATPase in rainbow trout[J]. Bull Environ. Contam, Taxied, 1972, 8: 69—72

[2] 库柏. 生物化学工具(M). 北京: 人民出版社. 1977

[3] 徐立红, 张甬元, 王德铭. 用环境毒物对草鱼组织 ATPase 的影响作为生态毒理学指标的初步研究[J]. 水生生物学报, 1987, 11: 193—201