

# 三丁基锡对文蛤鳃酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响\*

黄周英<sup>1,2</sup>, 陈奕欣<sup>1</sup>, 赵扬<sup>1</sup>, 左正宏<sup>1</sup>, 陈美<sup>1</sup>, 王重刚<sup>1</sup>

(1. 厦门大学 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005; 2. 泉州师范学院 生物系, 福建 泉州 362000)

**摘要:** 在实验生态条件下, 观察浓度分别为 0.1、1.0 和 10 ng/L 的三丁基锡 (TBT) 暴露 2、8、20 d 以及恢复 7 d 和 20 d 后对文蛤鳃酸性磷酸酶 (aacidphosphatase, ACP)、碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 以及  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性的影响。结果显示在暴露早期 TBT 不影响 ACP、AKP 活性, 暴露时间延长则主要表现出诱导作用。TBT 具有抑制  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性作用, 可观察效应浓度为 0.1 ng/L。  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 可作为一种潜在的有机锡污染监测的生物标志物。

**关键词:** 三丁基锡; 文蛤; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase

中图分类号: Q55; S944.3; X503.2 文献标识码: A 文章编号: 1007-6336(2005)03-0056-04

## Effects of tributyltin on alkaline phosphatase, aacidphosphatase and adenosine triphosphatase gill activity of digestive gland in clam *Meretrix meretrix*

HUANG Zhou-ying<sup>1,2</sup>, CHEN Yi-xin<sup>1</sup>, ZHAO Yang<sup>1</sup>, ZUO Zheng-hong<sup>1</sup>, CHEN Mei<sup>1</sup>, WANG Chong-gang<sup>1</sup>

(1. Key Lab for Cell Biology and Tumor Cell Engineering of Education Ministry, Xiamen Univ., Xiamen 361005, China; 2. Department of Biology, Quanzhou Normal University, Quanzhou 362000, China)

**Abstract:** The effects on alkaline phosphatase, aacidphosphatase and  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase activities in the gill of *Meretrix meretrix*, which was exposed to tributyltin (TBT) at the environmental levels (0.1 ng/L, 1.0 ng/L, 10 ng/L as Sn) for 2, 8, 20 days and recovered for 7, 20 days, were evaluated. The results showed that the activities of alkaline phosphatase, aacidphosphatase were no effect at earlier exposure period, and were principally induced with prolonged exposure time. The activities of  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase in *Meretrix meretrix* were inhibited after exposure to TBT. The lowest observable effect concentration for  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP were 0.1 ng/L.  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase could be a potential biomarkers to monitor the organotins pollution.

**Key words:** tributyltin; *Meretrix meretrix*; alkaline phosphatase; aacidphosphatase;  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase

三丁基锡 (tributyltin, TBT) 作为海洋船舶的防污油漆从 1960 年开始就在世界范围内应用, 尽管有的国家已开始禁止使用, 但在海洋的许多水体和沉积物及海产品中仍能检测出 TBT 的存在, TBT 在双壳类的高富积有可能通过食物链给人类的健康带来危害<sup>[1]</sup>。有机锡已成为迄今为止海洋环境中最有害的化学物之一<sup>[2]</sup>, 对海洋生物造成不利影响, 如导致腹足类动物性别畸形、牡蛎壳异形等<sup>[3,4]</sup>, 因此, 有机锡被作为主要的污染物进行监测。有机锡对海洋生物的生态毒理效应及

对海洋生态系统的影响在国内已有一些报道<sup>[5~7]</sup>。

碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, AKP) 和酸性磷酸酶 (aacidphosphatase, ACP) 广泛存在于动植物及微生物体内, 是一种对底物专一性较低的磷酸单酯水解酶, 在生物体内直接参与磷酸基团转移和代谢过程, 在生物体内的物质代谢中具有重要的作用。同时它们作为软体动物溶酶体酶的重要组成部分, 在免疫反应中发挥作用。但是

\* 收稿日期: 2004-11-09, 修订日期: 2005-02-03

基金项目: 厦门大学细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室开放基金资助 (2004109)

作者简介: 黄周英 (1965 - ) 女, 福建泉州人, 副教授, 主要从事细胞遗传学和生态毒理学研究, E-mail: hzyng@publ.qz.fj.cn

通讯作者: 王重刚, Email: cgwang@xmu.edu.cn

目前有关 TBT 对贝类水解酶的影响报道甚少。三磷酸腺苷酶(ATPase)是生物体内重要的酶,能改变细胞的渗透性,干扰正常的水盐代谢,中断氧化磷酸化的偶联过程,使细胞不能提供正常活动所需要的能量,多种类型的污染物对 ATPase 有显著的影响<sup>[8,9]</sup>,从分子生态毒理学的角度来看,ATPase 是一项广泛用于评价污染压力的参数,是具有通用性和直接性的指标<sup>[10,11]</sup>。本文以文蛤鳃组织为实验材料,研究 TBT 胁迫对其 AKP、ACP 以及  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性的影响。以期了解有机锡对海洋双壳类的毒性效应机制,同时也为有机锡污染的生物监测寻找有效的生物标志物。

## 1 材料与方法

### 1.1 仪器与试剂

Thermo GENESY™ 2 型可见-紫外分光光度计,Beckman Coulter 型冷冻离心机。TBT 购自 Fluka AG (Switzerland),纯度大于 97%。用 98% 的酒精溶解为内含 0.02~2.0 mg/L Sn 的储备液。其余试剂为国产市售分析纯。

### 1.2 实验动物和暴露条件

实验用文蛤 (*Meretrix meretrix*) 捕捞于厦门海域,体重为 28~48 g。实验文蛤先在 60 L 清洁沙滤海水中暂养 7 d,然后将文蛤分别移入 TBT 含量为 0.1、1.0 和 10 ng/L Sn 以及溶剂体积分数 0.05 为对照的水体中。饲养水体为 1 只/L,温度为 13~15.5℃,盐度为 22~23,用冲气机连续冲气,每组设两个平行样。每天更换一半相同

污染浓度的海水,投喂小球藻 (*Chlorella sp.*)。

### 1.3 取样和样品预处理及酶活性测定

分别于暴露后的 2、8 和 20 d 及移入干净海水进行恢复 7 d 及 20 d 取样,每组取 6 个文蛤,取出鳃组织保存于 -80℃ 中,测定用酶液按 Livingstone<sup>[12]</sup> 的方法进行制备。

AKP 活性采用对硝基苯磷酸二钠法测定<sup>[13]</sup>。ACP 活性参照 Linhardt 的测定方法<sup>[14]</sup>。AKP 和 ACP 比活力单位定义为每毫克蛋白每分钟产生 1 μmol 产物为 1 个 AKP 或 ACP 比活力单位(用 U 表示)。

$\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性采用岑小波<sup>[15]</sup> 等 1998 年报道的孔雀绿比色法进行酶促反应,测定反应产物中 P 的量。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 酶活性定义为 37℃ 条件下,1 h 每毫克蛋白释放 P 的 μmol 数。以 μmolpi/h·mgpr 表示。

上清液中的蛋白含量用考马斯亮蓝法<sup>[16]</sup> 测定。

### 1.4 数据分析

实验数据用统计学方法进行处理。结果用平均值 ± 标准误差 (mean ± SDE) 表示,组间数据用单尾 T-检验法进行比较,  $p < 0.05$  被认为有显著差异;  $p < 0.01$  被认为有极显著差异。

## 2 结果与讨论

### 2.1 TBT 对文蛤鳃组织 AKP 活性的影响

图 1 所示,文蛤 AKP 活性在 TBT 暴露 20 d 后,高浓度组 (1.0 ng/L、10 ng/L) 与对照组比较出现显著诱导。恢复 7 d 后,各浓度组与对照组

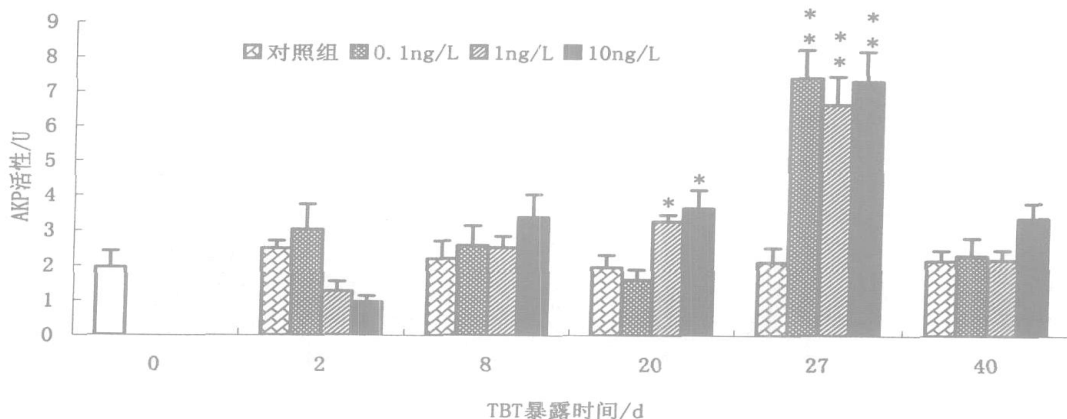


图 1 TBT 对文蛤鳃组织 AKP 活性的影响  
(27、40 分别为恢复 7d 和 20d)

Fig. 1 Effect of TBT on AKP activity of the gill in *Meretrix meretrix* exposed to TBT (27, 40 days represent recovered for 7, 20 days respectively),  $n = 4 \sim 6$ , \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$

比较 AKP 活性出现诱导,且差异极显著,恢复 20 d 后,所有实验组 AKP 活性回落,与对照组相似。

## 2.2 TBT 对文蛤鳃组织 ACP 活性的影响

图 2 表明, TBT 对文蛤鳃组织 ACP 作用呈现出先抑制后诱导效应,高浓度组(10 ng/L)在暴露 2 d 后与对照组比较出现抑制现象,随着处理时间的延长,抑制效应消失呈现适应过程,在 8 d 和 20 d 三个浓度组的 ACP 活性均略高于对照组但未见显著差异。恢复 7 d 三组均呈现出极显著差异,低浓度组(0.1 ng/L)是抑制效应,而两个高浓度组则为诱导效应,恢复 20 d 后,各处理组 ACP 活性均接近

对照组。本实验中, TBT 暴露 2 d, AKP 和 ACP 活性有所下降,可能是在暴露过程,一方面由于个体对外界的胁迫产生应激性 AKP 被诱导,另一方面由于 TBT 与酶蛋白结合抑制 AKP 活性,这样导致 AKP 和 ACP 活性与对照组比较无显著差异。随着 TBT 暴露时间延长,酶活性占优势。TBT 在体内代谢为二丁基锡(dibutyltin)和单丁基锡(monobutyltin),在恢复实验 7 d 后,酶活性显著诱导,原因可能是酶蛋白的诱导仍然存在,而二丁基锡和单丁基锡比 TBT 对酶活性的结合抑制效应弱,从而导致酶活性显著升高。

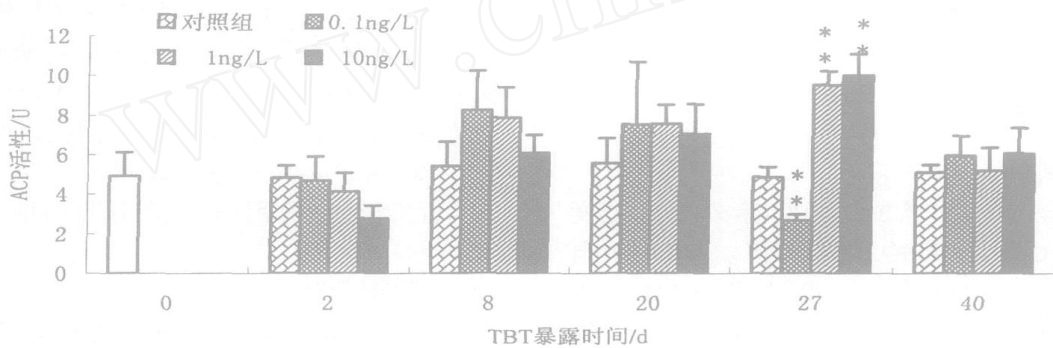


图 2 TBT 对文蛤鳃组织 ACP 活性的影响

(27,40 分别为恢复 7d 和 20d)

Fig. 2 Effect of TBT on ACP activity in the gill of *Meretrix meretrix* exposed to TBT

(27,40 days represent recovered 7,20 days),  $n=4\sim6$ , \*\*,  $p<0.01$

## 2.3 TBT 对文蛤鳃组织 $\text{Na}^+$ , $\text{K}^+$ -ATPase 活性的影响

图 3 所示,用 TBT 处理文蛤 2d 后,处理组与对照组比较, $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性呈现出剂量依赖性下降,暴露 8d 后,10 ng/L 组与对照组之间表现出显著抑制。随着作用时间的延长,20 d

后所有处理组与对照组比较, $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性均呈现显著抑制现象。恢复 7 d 与 20 d, TBT 处理组的  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性略高于对照组但无显著差异。本实验中, TBT 对  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性显示出抑制效应,特别是高浓度组在暴露 8d 后就显示出显著差异,使细胞不能

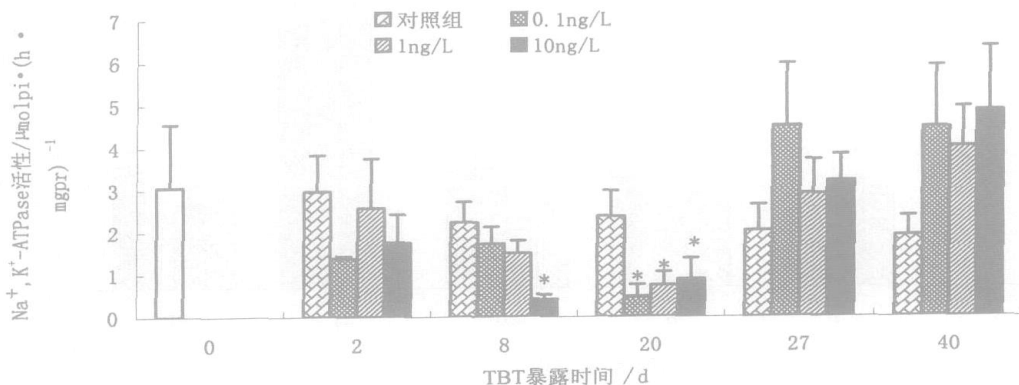


图 3 TBT 对文蛤  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性的影响

(27,40 分别为恢复 7d 和 20d)

Fig. 3 Effect of TBT on  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP activity in the gill of *Meretrix meretrix* exposed to TBT

(27,40 days represent recovered 7,20 days),  $n=4\sim6$ , \*,  $p<0.05$

提供正常活动所需要的能量,这将使生物体对海水渗透压变化的适应能力降低。解除 TB T 的暴露胁迫,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性可以得到恢复。从 TB T 影响文蛤鳃  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性的剂量效应和时间效应来看,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性是一种潜在的有机锡污染监测的生物标志物。并且其可观察效应浓度为  $0.1 \text{ ng/L}$ , 低于标准检测限 ( $>1.0 \text{ ng/L}$ )。

### 3 结 论

(1) 本实验结果显示,文蛤鳃组织 AKP 活性在较长时间的 TB T 暴露下出现显著诱导, ACP 活性主要呈现诱导趋势。说明环境水平的 TB T 已经使文蛤的物质代谢产生紊乱,这可能是 TB T 对生物产生毒性效应的原因之一。

(2) 环境水平的 TB T 暴露对文蛤鳃  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性则产生抑制作用,这将使生物体对海水渗透压变化的适应能力降低。 $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase 活性的可观察效应浓度为  $0.1 \text{ ng/L}$ , 低于标准检测限,是一种潜在的有机锡污染监测的生物标志物。

### 参考文献:

- [1] LAUGHLIN R B, FRENCH W. Tributyltin concentration dependence of bis (tributyltin) oxide accumulation in mussel, *M. edulis* Envir toxicol[J]. Chem, 1988, 7:1021-1026.
- [2] CHEMP M A. A review of organotin regulatory strategies, pending actions, related costs and benefits[J]. The Science of the Total Environment, 2000, 258:443-447.
- [3] ELLIS D, PATTISINA L A. Worldwide neogastropod imposex: a biological indication of global TB T contamination[J]. Mar Pollut Bull, 1990, 21:248-253.
- [4] BATL Y G E, FUHUA C, BROCKBANK C I, et al. Accumulation of tributyltin by the Sydney rock oyster, *Saccostrea commercialis*[J]. Aut J Mar Freshwat Res, 1989, 40:49-54.
- [5] 周名江, 李正炎, 颜天, 等. 海洋环境中的有机锡及其对海洋生物的影响[J]. 环境科学进展, 1994, 2(4):67-76.
- [6] 徐晓白, 戴树桂, 黄玉瑶. 典型化学污染物在环境中的变化及生态效应[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [7] 徐立红, 张甬元, 陈宜瑜. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义[J]. 水生生物学报, 1995, 19(2):171-184.
- [8] RODRIGUEZ P A, SCHWARZBAUM P J, RODRIGUEZ E M. Effects of cadmium on gill  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATPase of the estuarine crab *Chasmagnathus granulata* (Decapoda, Grapsidae) during postmolt: In vivo and in vitro studies[J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1998, 61:629-636.
- [9] CHA YA J, THAKER J, MITTAL R, et al. Influence of textile dyeing and printing industry effluent on ATPases in liver, brain, and muscle of Mudskipper, *Periophthalmus dips* [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1997, 58:793-800.
- [10] MACHERA K, COTOU E, ANASTASSIADOU P. Fenbutatin acute toxicity on *Artemia nauplii*: Effects of sublethal concentrations on ATPase activity [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1996, 56:159-164.
- [11] MACHERA K, COTOU E, LAKSHMI R, et al. Effects of Cr (VI) on ATPases in the brain and muscle of mudskipper, *Boleophthalmus dentatus* [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 1995, 55:723-29.
- [12] LIVINGSTONE D R. Responses of microsomal NADPH-cytochrome c reductase activity and cytochrom P-450 in digestive glands of *Mytilus edulis* and *Littorea* to environmental and experimental exposure to pollutants[J]. Marine Ecology Progress Series, 1988, 46:7-43.
- [13] 李兴暖, 韩雅莉, 肖湘, 等. 长牡蛎碱性磷酸酶的分离纯化及部分性质研究[J]. 台湾海峡, 2003, 22(4):482-485.
- [14] LINHARDT K, WALTER K. Phosphatase: determination in serum with P-nitroenvl phosphate [A]. BERGMAYER H. Methods of enzymtor analysis [C]. New York: Academic Press, 1963.
- [15] 岑小波, 黄永光, 王端淑, 等. 孔雀绿比色法同步测定大鼠成骨细胞膜  $\text{Ca}^{2+}$ -ATP 酶和  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ -ATP 酶活性[J]. 华西医科大学学报, 1998, 29:427-430.
- [16] 郭敏亮, 姜涌明. 考马斯亮蓝显色液组分对蛋白质测定的影响[J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(6):558-561.