

# 硫化物胁迫对日本沼虾呼吸代谢和能量代谢酶的影响

管越强, 王慧春, 李利

河北大学生命科学学院, 河北 保定 071002

**摘要:** 研究了硫化物暴露后日本沼虾细胞色素氧化酶 (CCO)、琥珀酸脱氢酶 (SDH)、延胡索酸还原酶 (FRD) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 4 种呼吸代谢酶及能量代谢酶—精氨酸激酶 (AK) 活性的变化规律。将日本沼虾暴露于  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 2 个硫化物质量浓度组和不含硫化物的对照组水体中, 暴露后 0、2、12、24、48 h 和解除暴露后 48 h 取肝胰腺和肌肉组织进行酶活性分析。结果显示: 肝胰腺和肌肉组织 SDH 和 CCO 活性随硫化物质量浓度升高或暴露时间延长而显著降低 ( $P < 0.05$ )。FRD、LDH 和 AK 活性随硫化物质量浓度升高或暴露时间延长而显著升高 ( $P < 0.05$ )。解除硫化物暴露后 48 h, 各质量浓度组酶活性与对照组无显著差异。上述酶活性还存在组织差异, 肝胰腺呼吸代谢酶活性高于肌肉中相应酶活性, 而 AK 活性与此相反。结果表明, 硫化物胁迫导致日本沼虾有氧呼吸代谢减弱, 无氧呼吸代谢增强, 并动用其能量贮存物质磷酸精氨酸, 产生更多 ATP 以适应外界不良环境。

**关键词:** 硫化物; 日本沼虾; 有氧代谢; 呼吸代谢酶; 精氨酸激酶

**中图分类号:** Q178.1<sup>+1</sup>

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1674-5906 (2009) 06-2017-06

硫化物 (sulphide) 是水体中常见的污染物, 主要由工业废水和养殖水体底质的有机物分解产生, 对水生生物有较强的毒性<sup>[1]</sup>。近年来, 国内外学者就硫化物对甲壳纲十足目动物从个体、生理生化和分子水平等方面的毒性影响进行了研究。在个体水平, 硫化物对印度对虾 (*Penaeus indicus*)、绿尾对虾 (*Metapenaeus dobsoni*)、褐虾 (*Crangon crangon*) 和中华绒螯蟹 (*Eriocheir sinensis*) 的半致死浓度先后被报道<sup>[1-3]</sup>。Kang 等<sup>[4]</sup>研究了日本沼虾 (*Macrobrachium nipponense*) 在硫化物和低氧双重胁迫下的逃避行为; 在生理生化水平, 暴露于硫化物水体中的凡纳滨对虾 (*Fenneropenaeus vannamei*) 对溶藻弧菌 (*Vibrio alginolyticus*) 的吞噬活力和清除效率显著下降<sup>[5]</sup>。急性硫化物胁迫下, 中华绒螯蟹的呼吸和能量代谢受到影响, 鳃组织细胞色素氧化酶 (CCO) 活性下降, 而血糖和乳酸浓度上升<sup>[3]</sup>。但是尚未见到硫化物胁迫对甲壳动物呼吸代谢和能量代谢其他相关酶的影响报道, 对其代谢途径的影响及机制并不明确; 在分子水平方面, 硫化物胁迫导致中华绒螯蟹热应激蛋白 (HSP70) 表达量增加<sup>[3]</sup>。日本沼虾又称青虾, 广泛分布于我国各地淡水水域, 是我国养殖面积最大、产量最高的淡水经济虾类。本实验以细胞色素氧化酶 (CCO) 等呼吸代谢酶和能量代谢酶为指标, 研究硫化物暴露下日本沼虾相关酶活性的变化规律, 探讨其对硫化物的代谢适应机制, 有助于阐明硫化物胁迫对甲壳动物呼吸代谢和能量代谢的影响机制, 同时也可作为虾蟹

类养殖水体的环境调控提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验用虾

实验用虾购于河北省保定市白洋淀, 选择体态正常、体长相近 ( $5.5 \pm 0.2 \text{ cm}$ )、健康无病的个体置于实验室水族箱中暂养一周。水温  $25 \text{ }^\circ\text{C}$ , pH 值  $8.2 \pm 0.2$ , 间歇充气, 溶氧量保持在  $5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上。每天换水 1 次, 换水量为原水量的  $1/3 \sim 1/2$ 。每天早晚各投饵一次, 实验前 2 d 停食。

### 1.2 硫化物暴露实验

实验之前进行硫化物耐受性预实验。根据实验结果设对照组和  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  的 2 个硫化物质量浓度组。每组设 3 个平行缸 ( $35 \text{ cm} \times 16 \text{ cm} \times 20 \text{ cm}$ ), 每缸放 18 尾日本沼虾。以  $1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  的硫化钠溶液为贮存液调节水体硫化物质量浓度, 采用亚甲基蓝分光光度法<sup>[6]</sup>测定硫化物质量浓度。根据水体实测质量浓度, 每隔 4 h 添加 1 次硫化物母液, 以维持各实验组初始质量浓度。48 h 后解除暴露。于 0、2、12、24、48 h 和解除暴露后 48 h 取样, 迅速解剖取肝胰腺和肌肉组织, 保存在  $-80 \text{ }^\circ\text{C}$  冰箱, 用于酶活性分析。

### 1.3 组织样品制备

组织线粒体的提取参考王金发等<sup>[7]</sup>的方法, 有所改动。分别取 0.2 g 肝胰腺和肌肉, 加入 4 倍体积  $4 \text{ }^\circ\text{C}$  预冷的  $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖溶液, 剪碎、超声波匀浆、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下  $600 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min, 取上清、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$  下  $9000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 30 min, 吸取上清液用于精氨

**基金项目:** 农业部公益性行业 (农业) 科研专项经费项目 (200803012); 河北省自然科学基金项目 (C2007000893)

**作者简介:** 管越强 (1973 年生), 男, 副教授, 博士, 主要从事水生动物生理生态及营养免疫方向的研究工作。E-mail: guanyueqiang@hbu.edu.cn

**收稿日期:** 2009-10-19

酸激酶 (AK) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 活性测定。剩余沉淀用预冷的  $0.25 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  蔗糖溶液重悬, 再次超声波匀浆, 匀浆液用于细胞色素氧化酶 (CCO)、琥珀酸脱氢酶 (SDH) 和延胡索酸还原酶 (FRD) 活性测定。

#### 1.4 酶活性测定

CCO 活性测定参考 Affonso 等<sup>[8]</sup>的方法; FRD 活力测定参考 Xiao 等<sup>[9]</sup>的方法; LDH 活性的测定参考张龙翔等<sup>[10]</sup>的方法, 反应体系偏中性, 催化丙酮酸转变为乳酸, 不适合测定肝胰腺 LDH 活性, 仅对肌肉组织进行测定; SDH 活性测定采用 2, 6-二氯酚靛酚还原法测定 (试剂盒购于南京建成生物工程研究所); AK 活性采用三元钼钼磷杂多酸体系定磷法测定<sup>[11]</sup>, 反应体系为  $870 \mu\text{L}$  反应缓冲液,  $30 \mu\text{L}$  待测酶液,  $750 \mu\text{L}$  2.5% 三氯乙酸。采用考马斯亮蓝法测定总蛋白质量浓度<sup>[12]</sup>, 以牛血清白蛋白 (BSA) 为标准蛋白做蛋白含量标准曲线。文中所有酶活力单位为  $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 代表组织匀浆液中每 mg 蛋白质中含有的酶活力单位数。

#### 1.5 数据分析

采用 SPSS13.0 统计软件进行统计分析。 $t$ -检验比较同一质量浓度组各实验时刻的酶活性与 0 h 有无显著性差异; 对同一时刻的不同质量浓度组酶活

性分别进行单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 首先进行 Levene 方差齐性检验, 若具有齐性再采用 LSD 检验进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 日本沼虾组织 CCO 活性变化

由表 1 可见, 对照组在不同时刻酶活性均无显著差异。在硫化物胁迫下日本沼虾肝胰腺和肌肉组织 CCO 活性出现下降趋势。 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺和肌肉组织 48 h 时 CCO 活性分别为  $1.45 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  和  $1.50 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 显著低于该质量浓度组 0 h 时的酶活性 ( $P < 0.05$ )。2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组在 12、24、48 h 时肝胰腺 CCO 活性均显著低于该质量浓度组 0 h 时的酶活性 ( $P < 0.05$ ), 在 2、12、24、48 h 时肌肉酶活性显著低于 0 h ( $P < 0.05$ ), 48 h 时两组活性降到最低, 分别为  $0.94 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  和  $0.80 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 是 0 h 时的 35.3% 和 38.6%。

比较不同质量浓度组间同一时刻的 CCO 活性, 自 12 h 至 48 h, 3 组肝胰腺酶活性差异显著 ( $P < 0.05$ )。肌肉组织 CCO 活性在 2 h、12 h 时, 2  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组与对照组、0.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组差异显著 ( $P < 0.05$ )。24 h、48 h 时, 3 组间酶活性均有显著差异 ( $P < 0.05$ )。解除硫化物暴露后 48 h, 肝胰腺和肌肉各质量浓度组 CCO 活性明显上升, 0.6  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺组织与

表 1 硫化物对日本沼虾肝胰腺和肌肉组织呼吸代谢酶活性的影响

Table 1 Effects of sulphide on respiratory metabolic enzyme activities of hepatopancreas and muscle tissues in *M. nipponense*

酶活性 ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	组织	$\rho$ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	t/h					
			0	2	12	24	48	#48
CCO	肝胰腺	对照组	2.87±0.12 <sup>a</sup>	2.77±0.20 <sup>a</sup>	2.72±0.09 <sup>a</sup>	2.81±0.16 <sup>a</sup>	2.71±0.25 <sup>a</sup>	2.76±0.06 <sup>a</sup>
		0.6	2.74±0.28 <sup>a</sup>	2.66±0.12 <sup>a</sup>	2.60±0.04 <sup>b</sup>	2.53±0.10 <sup>b</sup>	1.45±0.19 <sup>ab</sup>	2.42±0.08 <sup>a</sup>
		2	2.66±0.15 <sup>a</sup>	2.61±0.05 <sup>a</sup>	2.46±0.01 <sup>c</sup>	1.11±0.07 <sup>c</sup>	0.94±0.11 <sup>c</sup>	2.54±0.07 <sup>b</sup>
	肌肉	对照组	2.03±0.07 <sup>a</sup>	2.03±0.06 <sup>a</sup>	2.21±0.19 <sup>a</sup>	2.09±0.04 <sup>a</sup>	2.12±0.18 <sup>a</sup>	1.97±0.12 <sup>a</sup>
		0.6	2.04±0.10 <sup>a</sup>	2.00±0.08 <sup>a</sup>	1.97±0.05 <sup>a</sup>	1.70±0.05 <sup>ab</sup>	1.50±0.05 <sup>ab</sup>	2.03±0.14 <sup>a</sup>
		2	2.07±0.20 <sup>a</sup>	1.82±0.11 <sup>ab</sup>	1.51±0.13 <sup>ab</sup>	0.80±0.08 <sup>c</sup>	0.80±0.08 <sup>c</sup>	2.02±0.03 <sup>a</sup>
SDH	肝胰腺	对照组	4.02±0.12 <sup>a</sup>	4.27±0.11 <sup>a</sup>	4.21±0.33 <sup>a</sup>	4.17±0.10 <sup>a</sup>	4.02±0.43 <sup>a</sup>	4.29±0.18 <sup>a</sup>
		0.6	4.12±0.15 <sup>a</sup>	4.15±0.24 <sup>b</sup>	3.63±0.33 <sup>a</sup>	3.20±0.14 <sup>ab</sup>	3.08±0.19 <sup>ab</sup>	4.12±0.28 <sup>a</sup>
		2	4.16±0.21 <sup>a</sup>	3.73±0.36 <sup>b</sup>	3.71±0.23 <sup>a</sup>	3.06±0.31 <sup>c</sup>	2.95±0.15 <sup>c</sup>	3.89±0.22 <sup>a</sup>
	肌肉	对照组	3.46±0.03 <sup>a</sup>	3.39±0.36 <sup>a</sup>	3.43±0.18 <sup>a</sup>	3.27±0.34 <sup>a</sup>	3.22±0.24 <sup>a</sup>	3.35±0.20 <sup>a</sup>
		0.6	3.29±0.04 <sup>a</sup>	3.22±0.09 <sup>a</sup>	3.16±0.05 <sup>a</sup>	2.66±0.12 <sup>ab</sup>	2.54±0.12 <sup>ab</sup>	3.10±0.05 <sup>a</sup>
		2	3.11±0.06 <sup>a</sup>	3.23±0.06 <sup>a</sup>	2.90±0.06 <sup>ab</sup>	2.82±0.11 <sup>c</sup>	2.35±0.10 <sup>ab</sup>	3.14±0.17 <sup>a</sup>
FRD	肝胰腺	对照组	1.69±0.01 <sup>a</sup>	1.71±0.12 <sup>a</sup>	1.71±0.03 <sup>a</sup>	1.70±0.03 <sup>a</sup>	1.72±0.06 <sup>a</sup>	1.71±0.06 <sup>a</sup>
		0.6	1.68±0.01 <sup>a</sup>	1.78±0.09 <sup>a</sup>	1.93±0.09 <sup>ab</sup>	2.08±0.12 <sup>a</sup>	2.13±0.04 <sup>a</sup>	1.74±0.06 <sup>a</sup>
		2	1.71±0.05 <sup>a</sup>	1.85±0.06 <sup>a</sup>	2.24±0.09 <sup>c</sup>	3.43±0.33 <sup>ab</sup>	3.60±0.23 <sup>ab</sup>	1.71±0.06 <sup>a</sup>
	肌肉	对照组	1.37±0.38 <sup>a</sup>	1.38±0.03 <sup>a</sup>	1.39±0.03 <sup>a</sup>	1.38±0.01 <sup>a</sup>	1.36±0.02 <sup>a</sup>	1.39±0.04 <sup>a</sup>
		0.6	1.38±0.04 <sup>a</sup>	1.58±0.08 <sup>ab</sup>	1.57±0.04 <sup>ab</sup>	1.75±0.09 <sup>ab</sup>	1.65±0.08 <sup>ab</sup>	1.45±0.02 <sup>a</sup>
		2	1.44±0.03 <sup>a</sup>	1.97±0.06 <sup>c</sup>	2.04±0.09 <sup>c</sup>	2.13±0.17 <sup>c</sup>	2.25±0.07 <sup>c</sup>	1.36±0.05 <sup>b</sup>
LDH	肌肉	对照组	3.40±0.08 <sup>a</sup>	3.33±0.07 <sup>a</sup>	3.41±0.24 <sup>a</sup>	3.40±0.09 <sup>a</sup>	3.38±0.43 <sup>a</sup>	3.32±0.16 <sup>a</sup>
		0.6	3.45±0.80 <sup>a</sup>	3.92±0.25 <sup>b</sup>	5.39±0.53 <sup>ab</sup>	5.88±0.18 <sup>ab</sup>	4.21±0.65 <sup>a</sup>	3.50±0.33 <sup>a</sup>
		2	3.50±0.16 <sup>a</sup>	5.33±0.19 <sup>c</sup>	5.71±0.17 <sup>c</sup>	5.93±0.65 <sup>ab</sup>	3.83±0.35 <sup>a</sup>	3.31±0.11 <sup>a</sup>

酶活性值=平均值±标准差,  $n=3$ ; 同一时刻不同质量浓度间的不同字母上标 (a、b、c) 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \* 表示同一质量浓度不同时刻与 0 时刻差异显著 ( $P < 0.05$ ); #48 为解除硫化物暴露后 48 h。

对照组已无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 而  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组与对照组、 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组仍差异显著 ( $P < 0.05$ ), 3 组肌肉组织酶活力无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

## 2.2 日本沼虾组织 SDH 活性变化

由表 1 可看出, 不同时刻的对照组 SDH 活性无显著差异 ( $P > 0.05$ ), 硫化物暴露下, 肝胰腺和肌肉 SDH 活性逐渐降低。 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺组织在 12、24、48 h 时, 肌肉组织在 24、48 h 时, 酶活性均显著低于 0 h ( $P < 0.05$ ); 在 12、24、48 h 时,  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺和肌肉组的活性均显著低于 0 h ( $P < 0.05$ )。

比较不同质量浓度组间同一时刻的 SDH 活性, 2 h 时  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组与  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组、 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组与对照组的肝胰腺组织酶活性无显著差异, 但  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组酶活性显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。到 12 h 时 3 组间无显著差异。24 及 48 h 时, 3 组酶活性差异显著 ( $P < 0.05$ ); 3 组肌肉组织酶活性在 2 h 时均无显著差异, 12 h 时  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组酶活性显著低于  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组和对照组 ( $P < 0.05$ )。24、48 h 时,  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组和  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组显著低于对照组 ( $P < 0.05$ )。解除硫化物暴露后 48 h, 肝胰腺和肌肉组织 SDH 活性明显上升, 与对照组相应组织酶活性无显著差异。

## 2.3 日本沼虾组织 FRD 活性变化

在表 1 中, 对照组各时刻 FRD 活性无显著差异 ( $P > 0.05$ )。实验组 FRD 活性随着硫化物暴露时间延长逐渐增加。 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组沼虾肝胰腺酶活性在 12、24、48 h 显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 肌肉组织酶活性在 2、12、24、48 h 显著高于 0 h ( $P < 0.05$ )。 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺酶活性在 12、24、48 h 时显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 在 2、12、24、48 h 时肌肉酶活性显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 在 48 h 时两组活性达到最大, 分别为  $3.60 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  和  $2.25 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ , 较 0 h 时增加了 110% 和 56%。

硫化物暴露 2 h 时, 3 组肌肉组织酶活性差异显著 ( $P < 0.05$ )。12 h 时, 肝胰腺和肌肉 3 组酶活性差异显著 ( $P < 0.05$ ), 且随硫化物质量浓度的升

高而升高。到硫化物暴露 24、48 h 时,  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺酶活性与对照组、 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组差异显著 ( $P < 0.05$ ), 3 组肌肉组织酶活性也差异显著 ( $P < 0.05$ )。解除硫化物暴露后 48 h 时, 各质量浓度组肝胰腺酶活性降低至对照组水平, 肌肉组酶活性也明显下降。

## 2.4 日本沼虾肌肉 LDH 活性变化

由表 1 可以看出, 硫化物胁迫后 LDH 活性呈现先升高后降低的趋势,  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组在硫化物暴露 12、24 h 时 LDH 活性显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ),  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组酶活性在 2、12、24 h 时显著高于 0 h ( $P < 0.05$ )。比较各组在相同时刻的 LDH 活性可见, 2 h 时 3 组间差异显著 ( $P < 0.05$ ), 12、24 h 时 2 个实验组均显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但实验组间无显著差异。至暴露 48 h 及解除暴露 48 h, 3 组间均无显著差异 ( $P > 0.05$ )。说明暴露解除后 LDH 活性恢复至原有水平。

## 2.5 日本沼虾组织 AK 活性变化

由表 2 可看出, 硫化物暴露后肝胰腺和肌肉组织 AK 活性逐渐升高。 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺组织 AK 活性在 2、12、24、48 h 时显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 48 h 活性最高, 为  $5.21 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。 $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肌肉组织 AK 活性在 24、48 h 时显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 于 48 h 出现峰值, 且远高于肝胰腺组, 为  $8.29 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺和肌肉组织在 12、24、48 h 时的活性均显著高于 0 h ( $P < 0.05$ ), 最高值分别为  $9.78 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  和  $10.11 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。解除硫化物暴露后 48 h, 实验组活性下降, 与对照组酶活性无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

比较同一时刻各组 AK 活性可见, 2 h 时  $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组肝胰腺组织酶活性显著高于对照组和  $0.6 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  组 ( $P < 0.05$ ), 在 12、24、48 h 时 3 组酶活性间均存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。2、12、24、48 h 时, 各质量浓度组肌肉组织的酶活性存在显著差异 ( $P < 0.05$ )。解除硫化物暴露后 48 h, 3 组肝胰腺和肌肉组织 AK 活性无显著差异, 说明解除暴露后能

表 2 硫化物对日本沼虾肝胰腺和肌肉组织精氨酸激酶活性的影响

Table 2 Effects of sulphide on arginine kinase activities of hepatopancreas and muscle tissues in *M. nipponense*

酶活性 ( $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}$ )	组织	$\rho/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	t/h						
			0	2	12	24	48	#48	
AK	肝胰腺	对照组	$3.19\pm 0.04^a$	$3.24\pm 0.07^a$	$3.05\pm 0.06^a$	$3.29\pm 0.08^a$	$3.06\pm 0.14^a$	$3.06\pm 0.18^a$	
		0.6	$3.05\pm 0.11^a$	$3.37\pm 0.34^{*a}$	$4.27\pm 0.18^{*b}$	$4.56\pm 0.27^{*b}$	$5.21\pm 0.10^{*b}$	$3.73\pm 0.18^{*a}$	
		2	$2.97\pm 0.49^a$	$3.68\pm 0.30^b$	$4.38\pm 0.25^{*b}$	$5.84\pm 0.53^{*c}$	$9.78\pm 0.42^{*c}$	$3.82\pm 0.78^a$	
	肌肉	对照组	$3.37\pm 0.01^a$	$3.31\pm 0.06^a$	$3.47\pm 0.08^a$	$3.34\pm 0.19^a$	$3.23\pm 0.07^a$	$3.41\pm 0.50^a$	
		0.6	$3.72\pm 0.58^a$	$4.20\pm 0.11^b$	$4.40\pm 0.34^b$	$6.27\pm 0.33^{*b}$	$8.29\pm 0.32^{*b}$	$3.45\pm 0.83^a$	
		2	$3.39\pm 0.32^a$	$5.00\pm 0.14^{*c}$	$6.99\pm 0.67^{*c}$	$10.11\pm 0.51^{*c}$	$8.91\pm 0.77^{*c}$	$3.47\pm 0.18^a$	

酶活性值=平均值±标准差,  $n=3$ ; 同一时刻不同质量浓度间的不同字母上标 (a、b、c) 表示差异显著 ( $P < 0.05$ ); \*表示同一质量浓度不同时刻与 0 时刻差异显著 ( $P < 0.05$ ); #48 为解除硫化物暴露后 48 h。

量供应基本恢复正常, 能够满足能量需求。

## 2.6 日本沼虾肝胰腺和肌肉组织呼吸代谢酶和精氨酸激酶活性的比较

比较表中相同质量浓度同一时刻两组织各种酶活性发现, 肝胰腺 CCO、SDH 和 FRD 活性均高于肌肉组织相应酶活性 (表 1); 而肝胰腺 AK 活性明显低于肌肉 (表 2)。

## 3 讨论

CCO 位于线粒体内膜, 是呼吸链电子传递系统的最后一环, 能够将以有机碳为底物的有氧呼吸代谢产生的电子传递给氧, 并产生 ATP, 是合成 ATP 的必要组分。它在电子传递和能量产生中起关键作用, 其活性大小能够反映有氧代谢水平, 是有氧呼吸的关键酶<sup>[13]</sup>。硫化物可通过与 CCO 血红素卟啉环上铁离子的可逆结合, 对 CCO 产生可逆性抑制<sup>[14]</sup>。本实验中日本沼虾肝胰腺和肌肉组织 CCO 活性随着硫化物暴露时间的延长而下降, 证明硫化物对其 CCO 活性有较强的抑制作用, 提示硫化物胁迫导致日本沼虾的有氧代谢受阻, 这在其他水生生物中也有类似的报道。例如, 北美底鳉 (*Fundulus parvipinnis*) 暴露在 0.43~0.75  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫化物中, 组织上清液 CCO 活性降低 50%<sup>[15]</sup>。Affonso 等<sup>[8]</sup>将滨岸护胸鲶 (*Hoplosternum littorale*) 暴露于 72  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  硫化物水体中, 6 h 后测其组织 CCO 活性发现, 鳃组织中 CCO 活性显著降低, 仅为对照组的 29%, 而血液中 CCO 活性更低。沙蠋 (*Arenicola marina*) 在水体硫化物浓度达到 10  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  时, CCO 活性即被抑制<sup>[16]</sup>。但是硫化物对 CCO 活性有时也有激活作用, 这可能是由于某些水生动物细胞线粒体存在一定的防御机制, 在  $\text{H}_2\text{S}$  浓度达到抑制 CCO 活性浓度之前能有效地氧化  $\text{H}_2\text{S}$ , 这个过程需要消耗机体体内氧气, 使机体耗氧量上升, 从而激活 CCO 活性<sup>[17,18]</sup>。因此, 实验动物和硫化物暴露的浓度不同, 硫化物对线粒体中 CCO 的毒性作用结果也不尽相同。

SDH 是柠檬酸循环中唯一掺入线粒体内膜的酶, 是呼吸链的第一个酶, 有氧呼吸时 SDH 催化琥珀酸氧化成延胡索酸。FRD 与 SDH 作用相反, 无氧呼吸时催化延胡索酸还原成琥珀酸, 这种代谢方式也可提供 ATP<sup>[19]</sup>。当硫化物抑制 CCO 不能有效将电子传递给氧时, 许多生物机体无氧呼吸水平升高, FRD 活性增高, 引起琥珀酸在体内的积累<sup>[17,20]</sup>。例如, 当单环刺螠 (*Urechis uncinatus*) 暴露于硫化物中 48 h 时, 其体壁和呼吸肠 CCO 活性接近于 0, SDH 活性显著低于对照组, FRD 活性极显著高于对照组, 推测此时虫体有氧代谢几乎被完全抑制<sup>[21]</sup>。LDH 可催化丙酮酸和乳酸之间的相互转

化, 在肌肉组织中由丙酮酸转化为乳酸, 乳酸分解产生 ATP。它是机体无氧代谢的标志酶, 其活性大小在一定程度上反应了无氧代谢能力的高低<sup>[22]</sup>。本实验中随着硫化物暴露时间的延长, 日本沼虾有氧呼吸代谢酶 SDH 活性显著下降, 无氧呼吸代谢酶 FRD 和 LDH 活性显著上升, 这说明日本沼虾在硫化物胁迫下有氧呼吸代谢受阻, 而无氧呼吸代谢水平提高, 以此补充自身所需能量。实验中肌肉组织 LDH 活性在 24 h 时达到最大, 48 h 时酶活性明显降低, 解除硫化物暴露后 48 h, 酶活性更弱, 降低至对照组水平。说明胁迫过程中 24 h 无氧代谢水平达到峰值, 至 48 h 无氧代谢水平有所减弱, 解除暴露后 48 h 无氧代谢降至胁迫前的水平。相似的结果在大盖巨脂鲤 (*Colossoma macropomum*) 暴露于硫化物中也有报道。硫化物胁迫下, 大盖巨脂鲤难以维持有氧呼吸而激活厌氧呼吸途径, 血液中积累大量乳酸, 伴随乳酸产生的 ATP 为机体供能, 暴露 24 h 时有氧代谢恢复, 阻止乳酸中毒和代谢衰竭<sup>[23]</sup>。

由于无氧代谢 (乳酸分解) 在能量需要高峰期只能提供部分能量, 可能还有其他底物充当能量物质产生 ATP 满足机体能量的需求, 如氨基酸、脂类、储能物质等<sup>[8,24]</sup>。磷酸精氨酸是无脊椎动物体内重要的储能物质, 它是由无脊椎动物体内调节能量代谢过程中重要酶类 AK 催化而成的, 当体内能量产生较多时催化形成磷酸精氨酸贮存能量, 在细胞急需能量时则将磷酸精氨酸中的高能磷酸键转移形成 ATP 和精氨酸<sup>[24]</sup>。本实验中随着硫化物暴露时间的延长, 日本沼虾 AK 活性逐渐升高, 肝胰腺组织酶活性在 48 h 时酶活性达到高峰, 肌肉组织酶活性在 24 h 时达到最大, 随后酶活性降低。这说明由于日本沼虾在硫化物暴露下有氧呼吸代谢酶被抑制, 而无氧代谢产生的 ATP 有限, 导致 ATP 供应不足, 于是动用磷酸精氨酸为机体供能。随着磷酸精氨酸的消耗, 生物体内能量贮存物质逐渐减少, AK 活性降低。Gade<sup>[25]</sup>认为机体在受到应激程度较大时, 磷酸精氨酸只能供应一部分 ATP, 而厌氧反应 (糖酵解) 在能量需要高峰期发挥了提供 ATP 的主要作用, 磷酸精氨酸有可能是有氧代谢转向无氧代谢的一个中介点, 只有当代谢加剧而线粒体产生的 ATP 不能满足需要时, 磷酸精氨酸才充当了 ATP 的缓冲库。对此 Speed<sup>[26]</sup>也持相同的观点, 但是磷酸精氨酸和精氨酸激酶 (AK) 在有氧代谢向无氧代谢的转换中所起的作用还需要更多的实验证据来阐明。

本实验中日本沼虾肝胰腺组织和肌肉组织上述酶类活性不同, 肝胰腺中呼吸代谢酶活性高于肌肉, 而 AK 活性与此相反。Affenoso<sup>[8]</sup>报道滨岸护胸

鳃不同组织 CCO 活性: 脑 > 肝胰腺 > 心脏 > 肾脏 > 肌肉 > 脾 > 鳃 > 血液。Arun & Subramanian<sup>[27]</sup>报道了罗氏沼虾 (*Macrobrachium rosenbergi*) 不同组织 SDH 活性: 肝胰腺 > 鳃 > 肌肉。AK 的组织分布的研究表明, 动物的肌肉组织中存在着大量的精氨酸激酶<sup>[28]</sup>, 本实验肝胰腺 AK 活性低于肌肉中的结果支持上述结论。上述报道说明每种酶都有其组织特异性。

#### 4 结论

从以上实验结果可以得出结论, 硫化物对日本沼虾呼吸代谢酶和精氨酸激酶活性均有一定的影响, 不同组织对硫化物胁迫的反应不同。随着暴露时间延长, 日本沼虾呼吸代谢方式发生改变, 由有氧呼吸转换为无氧呼吸, 以此方式为自身供能。而且机体内磷酸精氨酸在 AK 催化下释放 ATP 也为机体供能。但是关于这两种供能方式是怎样相互协调使日本沼虾度过不良环境还需要进一步的研究。解除硫化物暴露后, 日本沼虾呼吸代谢酶和精氨酸激酶活性恢复为胁迫前的水平, 这表明日本沼虾在短期的硫化物暴露后具有自我恢复的能力。

#### 参考文献:

- [1] GOPAKUMAR G, KUTTYAMMA V J. Effect of hydrogen sulphide on two species of penaeid prawns *Penaeus indicus* (H. Milne Edwards) and *Metapenaeus dobsoni* (Miers)[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 1996, 57(5): 824-828.
- [2] VISMANN B. Sulfide species and total sulfide toxicity in the shrimp *Crangon crangon*[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 1996, 204: 41-54.
- [3] 顾顺樟. 硫化物对中华绒螯蟹 *Eriocheir sinensis* 雌性亲体胁迫效应的研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2007, 22-27.  
GU Shunzhang. Studies on the stress effect of sulfide on adult chinese mitten-handed crab, *Eriocheir sinensis* female[D]. Shanghai: East China Normal University, 2007: 22-27.
- [4] KANG J C, MATSUDA O, IMAMURA N. Avoidance and behavior of prawn *Macrobrachium nipponense* by oxygen depletion and hydrogen sulfide[J]. Nippon Suisan Gakkaishi, 1995, 61(6): 827-831.
- [5] HSU S W, CHEN J C. The immune response of white shrimp *Penaeus vannamei* and its susceptibility to *Vibrio alginolyticus* under sulfide stress[J]. Aquaculture, 2007, 271(1-4): 61-69.
- [6] 国家环境保护局, 国家质量技术监督局. GB/T 16489-1996. 水质硫化物的测定 亚甲基蓝分光光度法, 中华人民共和国国家标准[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1996.  
Agency of Environmental Protection of the People's Republic of China, General Administration of Quality Supervision Inspection and Quarantion of the People's Republic of China. GB/T 16489-1996. Water Quality-Determination of Sulfide-Methylene Blue Spectrophotometric Method[M]. Beijing: China Environmental Science Press, 1996.
- [7] 王金发, 何炎明. 细胞生物学实验教程[M]. 北京: 科学出版社, 2004: 47-51.  
WANG Jinfa, HE Yanming. Experimental Course of Cell Biology[M]. Beijing: Science Press, 2004: 47-51.
- [8] AFFONOSO E G, POLCZ V L P, CORREA C F. Physiological responses to sulfide toxicity by the air-breathing catfish *Hoplosternum littorale*(Siluriformes, Callichthyidae)[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2004, 139C(4): 251-257.
- [9] XIAO S H, FENG J J, GUO H F, et al. Effects of mebendazole, al-bendazole, and praziquantel on succinate dehydrogenase, fumarate reductase, and malate dehydrogenase in echinococcus granulosus cysts harbored in mice[J]. Acta Pharmacologica Sinica, 1993, 14(2): 151-154.
- [10] 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: 180-187.  
ZHANG Longxiang, ZHANG Tingfang, LI Lingyuan. Biochemical Experimental Methods and Techniques[M]. Beijing: Higher Education Press, 1997: 180-187.
- [11] CHEN B Y, GUO Q, GUO Z, et al. Improved activity assay method for arginine kinase based on a ternary heteropolyacid system[J]. Tsinghua Science and Technology, 2003, 8(4): 422-427.
- [12] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(7): 248-254.
- [13] SIMON M M, ROBIN E D. Relationship of cytochrome oxidase activity to vertebrate total and organ oxygen consumption[J]. Journal of Biochemistry, 1971, 2: 569-573.
- [14] Subcommittee on Hydrogen Sulfide, Committee on Medical and Biologic Effects of Environmental Pollution, Division of Medical Sciences, Assembly of Life Sciences, National Research Council. Hydrogen Sulfide[M]. Baltimore: University Park Press, 1979, 181-183.
- [15] BAGARINAO T, VETTER R D. Oxidative detoxification of sulfide by mitochondria of the california killifish *Fundulus parvipinnis* and the speckled sanddab *Citharichthys stigmaeus*[J]. Journal of Comparative Physiology, 1990, 160B(5): 519-527.
- [16] SUSANNE V, MANFRED K G. Mitochondrial sulfide oxidation in *Arenicola marina*, Evidence for alternative electron pathways[J]. European Journal of Biochemistry, 2004, 235(1-2): 231-237.
- [17] HAHLEBECK E, AMDT C, SCHIEDEK D. Sulphide detoxification in *Hediste diversicolor* and *Marenzelleria viridis*, two dominant polychaete worms within the shallow coastal waters of the southern baltic sea[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, 2000, 125B(4): 457-471.
- [18] ROBERT P, BOURGEOIS D L. Postexposuer metabolic effects of sulfide and evidence of sulfide-based ATP production in *Callinassid* ghost shrimp(Crustacea: Decapoda: Thalassinidea)[J]. Journal of Experimental Marine Biology and Ecology, 2001, 263(1): 105-121.
- [19] SCHOTTER U, BENNET E M. In Life without Oxygen[M]. London: Chapman and Hall, 1991: 165-185.
- [20] GRIESHABER M K, HARDEWING I, KREUTZER U, et al. Hypoxia and sulfide tolerance in some marine invertebrates[J]. Verh Deutsch Zool Gesell, 1992, 85: 55-76.
- [21] 张志峰, 王思峰, 霍继革, 等. 单环刺螈对硫化物暴露的呼吸代谢适应[J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36(4): 639-644.  
ZHANG Zhifeng, WANG Sifeng, HUO Jige, et al. The oxidative detoxification and metabolic adaptation of *Urechis unicinctus* to sulfide[J]. Journal of Ocean University of China, 2006, 36(4): 639-644.
- [22] VIRU M. Difference in effects of various training regimens on metabolism of skeletal muscles[J]. Journal of Sports Medicine and

- Physical Fitness, 1994, 34(3): 217-227.
- [23] AFFONOSO E G, POLCZ V L P, CORREA C F. Blood parameters and metabolites in the teleost fish *Colossoma macropomum* exposed to sulfide or hypoxia[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2002, 133C(3): 375-382.
- [24] ELLINGTON W R. Phosphocreatine represents a thermodynamic and functional improvement over other muscle phosphagens[J]. *The Journal of Experimental Biology*, 1989, 143(1): 177-194.
- [25] GADE G. Energy metabolism during anoxia and recovery in shell adductor and foot muscle of the gastropod mollusc *Haliotis lamellosa*: formation of the novel anaerobic end product tauropine[J]. *The Biological Bulletin*, 1988, 175: 122-131.
- [26] SPEED S R, BALDWIN J, WONG R J. Metabolic characteristics of muscles in the spiny lobster *Jasus edwardsii* and responses to emersion during simulated live transport[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 2001, 128B(3): 435-444.
- [27] ARUN S, SUBRAMANIAN P. Antioxidant enzymes in freshwater prawn *Macrobrachium malcolmsonii* during embryonic and larval development[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 1998, 121B(3): 273-277.
- [28] PAN J C, YU Z H, HUI E F, et al. Conformational change and inactivation of arginine kinase from shrimp *Fenneropenaeus chinensis* in oxidized dithiothreitol solutions[J]. *Biochemistry and Cell Biology*, 2004, 82(3): 361-367.

## Effects of sulphide on the enzyme of respiratory metabolism and energy metabolism of *Macrobrachium nipponense*

GUAN Yueqiang, WANG Huichun, LI Li

College of Life Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

**Abstract:** In this paper, series of *Macrobrachium nipponense* enzyme activity changing after exposing to different concentrations of sulphide were investigated. The investigated enzymes included respiratory metabolic enzymes\_cytochrome c oxidase (CCO), succinate dehydrogenase (SDH), fumarate reductase (FRD), lactate dehydrogenase (LDH); energy metabolic enzymes\_arginine kinase (AK). The sulphide concentrations were set at 0.6 and 2 mg·L<sup>-1</sup> and the control with no sulphide. Hepatopancreas and muscle tissues were sampled at 0, 2, 12, 24 and 48 h. Enzyme activities were tested after 48 h of sulphide exposure removal. The results indicated that with the duration of sulphide exposure and the increase of concentration, CCO and SDH activities were significantly decreased (with  $P < 0.05$ ), meanwhile FRD, LDH and AK activities were significantly increased (with  $P < 0.05$ ). After 48 h of sulphide exposure removal, enzyme activities of respiratory metabolic enzymes and AK returned to normal level and there was no significant difference between the experimental groups and the control group. The enzymes showed tissue dependent. Respiratory metabolic enzymes in hepatopancreas showed higher enzyme activities than that of muscle's while AK activities of hepatopancreas were lower than that of muscle's. It suggested after exposing to sulphide that aerobic metabolism decreased and anaerobic metabolism increased. Arginine phosphate was consumed and transferred its high-energy phosphate bond to ATP as a response to sulphide environment.

**Key words:** sulphide; *Macrobrachium nipponense*; aerobic metabolism; respiratory metabolism; arginine kinase