

锯缘青蟹不同器官组织中ROS与ASAFR含量的研究

孔祥会, 王桂忠, 艾春香, 李少菁

(厦门大学 海洋学系, 亚热带海洋研究所, 福建 厦门 361005)

摘要:采用生化测定的方法,对锯缘青蟹(*Scylla serrata*)鳃、肝胰腺和肌肉等不同器官组织中活性氧(ROS)与抗超氧阴离子自由基(ASAFR)含量进行了测定。结果表明,不同器官组织中活性氧与抗超氧阴离子自由基含量各异。各器官组织中活性氧含量由高到低依次为:肝胰腺>肌肉>鳃,分别为 $195.04 \text{ U/mg} \pm 33.46 \text{ U/mg}$, $64.03 \text{ U/mg} \pm 12.77 \text{ U/mg}$ 和 $44.84 \text{ U/mg} \pm 10.44 \text{ U/mg}$ 。而抗超氧阴离子自由基含量则是鳃>肝胰腺>肌肉,大小分别为 $439.62 \text{ U/g} \pm 64.73 \text{ U/g}$, $297.89 \text{ U/g} \pm 39.75 \text{ U/g}$ 和 $84.24 \text{ U/g} \pm 18.03 \text{ U/g}$ 。统计分析显示,锯缘青蟹各器官组织间的活性氧与抗超氧阴离子自由基含量均存在极显著性差异($P < 0.01$)。这是由于不同器官组织所执行的生理功能不同造成的。

关键词:锯缘青蟹(*Scylla serrata*); 鳃; 肝胰腺; 肌肉; 活性氧; 抗超氧阴离子自由基
中图分类号: Q495 **文献标识码:** B **文章编号:** 1000-3096(2004)04-0001-04

活性氧(Reactive oxygen species, ROS)是需氧生物在代谢过程中产生的比氧活泼的含氧活性物质,如 $\cdot\text{O}_2^-$, HO_2^\cdot , OH^\cdot , H_2O_2 等^[1]。ROS高度活跃,可攻击细胞膜,导致蛋白修饰和脂质过氧化(lipid peroxidation),有时可造成细胞内DNA链断裂或者细胞凋亡。在正常生理状态下,生物体内较为完善的抗氧化体系,可以有效地分解和清除体内产生的过多的ROS,使ROS的产生和清除处于动态平衡之中,从而保护机体免受损害。超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)作为一种重要的活性氧,产生后由抗超氧阴离子自由基(antisuperoxide anion free radical, ASAFR)(主要是超氧化物歧化酶和相应的抗氧化物质)加以清除。

关于活性氧产生与毒害及抗超氧阴离子自由基含量的研究在人、高等动物和植物中已有较多报道^[2-4],而对无脊椎动物报道较少。Sheehan等对2种软体动物 *Mytilus edulis* 和 *M. galloprovincialis* 外源性物质和体内抗氧化保护的季节变化进行了研究^[5]。Zielinski等对头足类动物氧化应激和抗氧化防护机制进行了研究^[6]。这些研究表明,生物体内抗氧化防护与季节变化和环境应激关系密切。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用锯缘青蟹(*Scylla serrata*)来自厦门海区,

选择体色鲜艳,无病无伤,附肢齐全 壳宽 $7.05 \text{ cm} \pm 0.52 \text{ cm}$,壳长 $4.96 \text{ cm} \pm 0.44 \text{ cm}$,体质量 $130 \text{ g} \pm 20 \text{ g}$ 的蟹用于实验。

1.2 样品制备

1.2.1 取材

取12只蟹,每只蟹取样时剪开背壳分别取鳃、肝胰腺、肌肉,置于 -80°C 冰箱保存备用。

1.2.2 器官组织匀浆

用电子天平准确称取器官组织 0.2 g ,按1:9加入0.9%生理盐水进行冰浴匀浆,在 4°C , 6000 r/min 的条件下离心 15 min ,取上清液分装待测。

1.3 测定方法

1.3.1 活性氧测定

采用南京建成生物工程研究所生产的试剂盒,按

收稿日期:2002-12-27;修回日期:2003-03-26
基金项目:国家863重大专项(2002AA603013);国家自然科学基金(39870563);福建省重中之重“福建省海洋生物优良种质及生物活性物质应用基础研究”部分资助项目
作者简介:孔祥会(1968-),男,河南虞城人,讲师,河南师范大学在职博士生,主要研究方向是水产动物生理生化 通讯地址:厦门大学海洋系海洋生物组 电话:0592-2188471, E-mail: kxh68@163.com

其提供的方法测定。其测定原理是根据Feten反应, gress 试剂显色。 Fenton 反应消耗 H_2O_2 , 产生 $OH\cdot$, H_2O_2 量与反应中产生 $OH\cdot$ 的量成正比, $OH\cdot$ 当给予电子受体后, 用 gress 试剂显色, 形成红色的物质, 其呈色深浅与 $OH\cdot$ 含量多少呈正比关系。所以该方法测定的活性氧实际上就是器官组织中 H_2O_2 含量, 并不是所有活性氧的含量。但从 H_2O_2 含量可反应出器官组织中活性氧含量的高低。

1.3.2 抗超氧阴离子自由基测定

试剂盒购于南京建成生成工程研究所, 按其提供方法测定。测定原理是模拟生物体中黄嘌呤与黄嘌呤氧化酶反应系统, 产生超氧阴离子自由基, 加入电子传递物质与 gress 氏显色剂, 使反应体系呈现紫红色, 可用分光光度计测其吸光度, 当被样品中含有超氧阴离子自由基的抑制剂时, 则比色时测定管吸光度低于对照管吸光度。

1.3.3 器官组织匀浆粗提液蛋白定量

参照 Bradford 的测定方法^[7]。牛血清白蛋白 (Bovine serum albumin, BSA) 购于 AMRESCO 公司, 作为标准蛋白。

1.3.4 器官组织中活性氧含量定义

每毫克器官组织蛋白在 37 条件下反应 1 min, 使反应系统中 H_2O_2 的浓度降低 1 mmol/L 为一个活性

氧单位 (U/mg)。

1.3.5 器官组织中抗超氧阴离子自由基含量定义

在反应系统中, 每克器官组织蛋白在 37 , 40 min 所产生的相当于 1 mg 维生素 C 所产生的超氧阴离子自由基的变化值为一个单位。

1.4 数据处理

采用 one-way ANOVA 分析和独立性 t-检验的方法进行数据分析处理。

2 结果

锯缘青蟹各器官组织中活性氧和抗超氧阴离子自由基含量的测定结果见表 1、图 1。从表 1 和图 1 中可以看出, 锯缘青蟹同一个体的不同器官组织中活性氧含量各异, 以肝胰腺为最高, 达 $195.04 U/mg \pm 33.46 U/mg$, 其次是肌肉, 为 $64.03 U/mg \pm 12.77 U/mg$, 最低的是鳃, 仅为 $44.84 U/mg \pm 10.44 U/mg$ 。而抗超氧阴离子自由基含量则是以鳃为最高, 其次是肝胰腺, 肌肉最低, 分别为 $439.62 U/g \pm 64.73 U/g$, $297.89 U/g \pm 39.75 U/g$ 和 $84.24 U/g \pm 18.03 U/g$ 。

统计学分析表明, 同一个体的 3 种器官组织间活性氧与抗超氧阴离子自由基含量均存在极显著性差异 ($P < 0.01$)。

表 1 锯缘青蟹不同器官组织中活性氧及抗超氧阴离子自由基含量测定

Tab. 1 Content of ROS and ASAFR in different organs and tissues of Scylla serrata

样品 及统计	活性氧含量 (U/mg)			抗超氧阴离子自由基 (U/g)		
	鳃	肝胰腺	肌肉	鳃	肝胰腺	肌肉
1	50.11	172.04	88.06	441.46	238.39	62.37
2	59.30	201.10	55.34	517.67	370.77	76.90
3	30.58	162.93	47.12	365.12	272.48	80.68
4	35.47	263.57	63.21	372.47	256.61	78.17
5	40.39	196.96	78.11	477.21	318.69	66.54
6	41.26	234.12	59.63	470.84	283.66	66.81
7	34.13	146.83	72.66	358.52	289.33	115.61
8	62.51	184.03	49.30	393.04	356.85	113.42
9	55.28	165.33	76.25	563.14	305.29	100.78
10	36.12	187.40	58.66	479.55	298.53	87.35
11	43.25	228.12	68.22	440.87	261.48	70.22
12	49.70	198.11	51.78	395.56	322.63	92.05
$\bar{x} \pm s$	44.84 ± 10.44	195.04 ± 33.46	64.03 ± 12.77	439.62 ± 64.73	297.89 ± 39.75	84.24 ± 18.03
S_e	3.01	9.66	3.67	18.68	11.47	5.20
$C_v(\%)$	23.28	17.15	19.95	14.72	13.34	21.4
95% C_i	38.21-51.47	173.78-216.30	55.91-72.14	398.50-480.75	272.64-323.15	72.79-95.70

注: \bar{x} 表示平均值, s 表示标准差, S_e 表示标准误差, C_v 表示变异系数, C_i 表示可信区间。

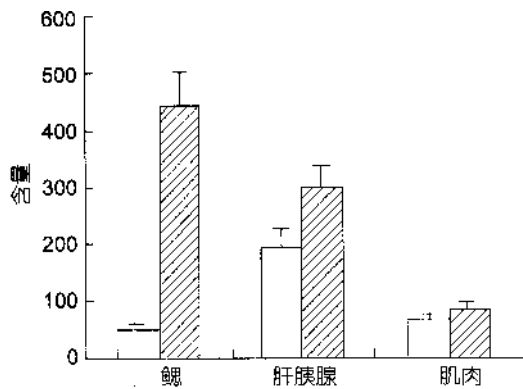


图1 锯缘青蟹不同器官组织中 ROS 与 ASAFR 含量的比较
Fig.1 Comparison of contents of ROS and ASAFR in different organs and tissues of *Scylla serrata*
□ 活性氧(U/mg); ▨ 抗超氧阴离子(U/mg)

此外,表1中还可以看出,不同个体同一器官组织中的活性氧和抗超氧阴离子自由基含量各异,这说明各器官组织中活性氧和抗超氧阴离子自由基含量个体间也存在差异。

3 讨论

生物体内活性氧是通过酶促反应和非酶反应体系产生的,特别是在病理、低温和其它环境应激情况下会过量生成,过量的活性氧自由基会对细胞、器官组织产生毒害和损伤。主要表现为:(1)直接与核酸、核苷酸、多糖、蛋白质及非蛋白巯基反应,引起DNA损伤,导致基因突变,使蛋白质变性,酶失活。(2)与生物膜成分(膜脂及蛋白如酶,受体及运输蛋白等)共价结合,损伤膜功能。(3)启动脂质过氧化反应^[1]。

本实验结果表明,同一个体锯缘青蟹各器官组织中的活性氧含量肝胰腺最高,其次是肌肉和鳃。各器官组织间呈现出极显著的差异($P < 0.01$)。而抗超氧阴离子自由基则是以鳃为最高,肝胰腺次之,最低是肌肉。说明各器官组织中活性氧含量与抗超氧阴离子自由基的差异与器官组织所执行的功能具有相关性。肝胰腺作为锯缘青蟹消化系统的重要组成部分,是营养物质消化、吸收和储存的主要场所,是生理代谢活动的中心,尤其是脂类代谢在肝胰腺中最为旺盛。脂类代谢过程中,在分子氧存在的情况下很容易产生活性氧,所以活性氧含量较高。同时与之相适应的是肝胰腺也有较高的抗氧化保护能力加以清除过量的活性氧。肌肉中含有大量的ATPase以产生能量供应机体运动的需要。能量产生过程中伴随着糖酵解和氧化

磷酸化^[1],在此过程中也将产生相当量的活性氧。鳃是外源性器官,主要功能是呼吸,其呼吸上皮细胞内,含有很多线粒体,在呼吸链电子传递过程中也会产生活性氧。而抗超氧阴离子含量则是鳃最高,这是因为超氧阴离子自由基主要是在呼吸链电子传递过程中大量产生,致使鳃中超氧阴离子自由基含量较高,相应地,鳃中的抗超氧阴离子自由基作用的酶及物质含量也较高。肝胰腺和肌肉活性氧含量均高于鳃,但抗超氧阴离子自由基含量则均低于鳃,这是由于鳃中超氧阴离子自由基含量比肝胰腺和肌肉中高。这说明各器官组织由于生理功能各异,代谢过程中产生的活性氧种类和数量不同。

Livingtone研究发现,环境中外源性物质含量与体内抗氧化水平存在正相关^[8],说明外源性物质增多,体内抗氧化水平提高。抗氧化水平提高的原因主要是体内活性氧产生增多。因此,环境污染时,生物体内活性氧含量会增多。研究锯缘青蟹体内活性氧的变化规律,可以为环境污染监测提供重要的数据。也有学者研究发现活性氧,抗氧化防护与个体发生之间具有密切的相关性^[9],在胚胎发育,苗种培育与养成过程中体内活性氧产生与抗氧化水平均发生相应的变化。而抗超氧阴离子是机体抗氧化的一个重要组成部分。因此研究活性氧及抗超氧阴离子自由基含量与苗种成活率之间的相关性对养殖生产具有重要的意义。

生物体内活性氧与抗超氧阴离子自由基含量在不同的季节、环境及发育阶段各异。作者仅对夏季的锯缘青蟹不同器官组织中活性氧含量与抗超氧阴离子自由基进行了研究,今后有必要探明不同的季节、环境条件下和发育阶段的锯缘青蟹各器官组织中活性氧与抗超氧阴离子自由基的变化规律,以期对锯缘青蟹健康养殖,苗种培育和环境污染监测积累基础资料。

参考文献:

- [1] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002. 122-161.
- [2] Shull S, Heintz NH, periasmy M, et al. Differential regulation of antioxidant enzyme in response to oxidants[J]. J Biol Chem, 1991, 266: 24398-24403.
- [3] Squadrito GL, Pyror WA. Oxidative chemistry of nitric oxide: the role of superoxide, peroxynitrite and carbon dioxide[J]. Free Radic Biol Med, 1998, 25: 292-403.
- [4] Lee DH, Lee CB. Chilling stress-induced changes of antioxidant enzymes in the leaves of cucumber: in gel enzyme activity assays[J]. plant science, 2000, 159: 78-85.

- [5] Sheehan D, Power A. Effects of seasonality on xenobiotic and antioxidant defence mechanism of bivalve mollusks [J]. *Comp Biochem Physiol (C)*, 1999, 123: 193-199.
- [6] Zielinski S, Portner HO. Oxidative stress and antioxidative defense in cephalopods: a function of metabolic rate or age? [J]. *Comp Biochem Physiol (B)*, 2000, 125: 147-160.
- [7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [8] Livingstone DR. Recent developments in marine invertebrate organic xenobiotic metabolism [J]. *Toxicol Eco toxicol News*, 1994, 1 (3): 88-94.
- [9] Rudneva I I. Antioxidant system of Black Sea animals in early development [J]. *Comp Biochem Physiol (C)*, 1999, 122: 265-271.

Comparative study on content of reactive oxygen species and activity of antiperoxide anion free radical in different organs and tissues of mud crab, *Scylla serrata*

KONG Xiang-hui, WANG Gui-zhong, AI Chun-xiang, LI Shao-jing

(Department of Oceanography & Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Received: Dec., 27, 2002

Key words: mud crab *Scylla serrata*; gill; hepatopancreas; muscle; reactive oxygen species (ROS); antiperoxide anion free radical (ASAFR)

Abstract: This study determined content of reactive oxygen species (ROS) and antiperoxide anion free radical (ASAFR) in the gill, hepatopancreas and muscle of mud crab, *Scylla serrata* using biochemical methods. Results showed that content of ROS and ASAFR vary between different organs and tissues. ROS content is hepatopancreas>muscle>gill, with values of $195.04 \text{ U/mg} \pm 33.46 \text{ U/mg}$, $64.03 \text{ U/mg} \pm 2.77 \text{ U/mg}$ and $44.84 \text{ U/mg} \pm 0.44 \text{ U/mg}$, respectively. ASAFR content is gill>hepatopancreas>muscle, the values are $439.62 \text{ U/g} \pm 4.73 \text{ U/g}$, $297.89 \text{ U/g} \pm 9.75 \text{ U/g}$ and $84.24 \text{ U/g} \pm 8.03 \text{ U/g}$, respectively. Statistical analysis indicates that content of ROS or ASAFR between the various organs and tissues vary significantly ($P < 0.01$) due to their different physiological functions.

(本文编辑:刘珊珊)