

镉、铅对蟾蜍精巢毒作用的酶学研究

贾秀英,董爱华

(杭州师范学院生命科学院,浙江杭州 310036)

摘要:为研究镉、铅对精巢的生化毒作用机理,应用氯化镉、硝酸铅溶液对成年雄性蟾蜍进行腹腔染毒(按镉计 0.1、0.2、0.4、0.8mg/kg 体重;按铅计 1、2、4、8 mg/kg 体重),连续染毒 7d 后活体解剖,测定分析精巢中各种酶的活性。结果显示,在镉染毒下,精巢乳酸脱氢酶(LDH)和酸性磷酸酶(ACP)的活性随镉染毒剂量的增加而降低,而碱性磷酸酶(ALP)未发现明显变化;在铅染毒下,乳酸脱氢酶(LDH)和碱性磷酸酶(ALP)的活性随铅染毒剂量的增加而降低,而酸性磷酸酶(ACP)未发现明显变化;乳酸脱氢酶(LDH)同工酶在镉、铅染毒下则主要表现为酶带 LDH₁、LDH₂ 的抑制或缺失和 LDH₅ 活性的增强。因此,镉、铅对蟾蜍的雄性生殖毒性机理可能与酶的活性存在着一定的关系,LDH 可以考虑作为反映镉、铅中毒对精巢功能影响程度的一种有价值的生化指标。

关键词:镉; 铅; 酸性磷酸酶; 碱性磷酸酶; 乳酸脱氢酶; 精巢; 毒作用; 蟾蜍

Effects of cadmium and lead on testicular enzymes of *Bufo bufo gargarizans*

JIA Xiu -Ying,DONG Ai- Hua (School of Life Sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China). *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(10): 2329~2333.

Abstract:For three decades, the heavy metals cadmium (Cd) and lead (Pb) have been important causes of soil and water pollution in industrial and developing countries. Testicular tissue is a primary target organ for toxic effects of heavy metals. We used the Asian toad *Bufo bufo gargarizans* as a test subject to evaluate the toxic effect of Cd and Pb on activity of several key testicular enzymes: acid phosphatases (ACP); alkaline phosphatases (ALP); lactate dehydrogenase (LDH); and different LDH isoenzymes. Adult male toads were given daily intraperitoneal injections of either Cd (as CdCl₂ at 0.1, 0.2, 0.4, or 0.8 mg Cd/kg BW or Pb (as Pb(NO₃)₂ 1, 2, 4, or 8 mgPb/kg BW) for 7 days. Testicular enzyme activities were measured on the 8th day. Testicular ACP activity was decreased ($p<0.01$) at the dosage 0.1 to 0.2 mg Cd/kg while LDH activity was decreased ($p<0.01$) at the dosage of 0.4 to 0.8 mg Cd/kg. ALP activity was not changed by Cd treatment. Testicular ALP decreased ($p<0.01$) at the dosage of 8 mg/kg Pb while the activities of LDH decreased significantly at the dosage of 4~8 mg/kg. Pb did not modify ACP activity. LDH₁ and LDH₂ were inhibited by Cd and Pb while activities of LDH₅ were increased by Cd and Pb. These results suggest that toxic effects of cadmium and lead on the male reproductive system may be associated with decreased activities of certain testicular enzymes. Testicular LDH isoenzymes are a sensitive biochemical indicator reflecting toxic effect of Cd and Pb on the male reproductive system.

Key words:cadmium; lead; acid phosphatases (ACP); alkaline phosphatases (ALP); lactate dehydrogenase isozyme (LDH); testis; toxicology; *Bufo bufo gargarizans*

文章编号:1000-0933(2004)10-2329-05 中图分类号:Q494,X171.5 文献标识码:A

全球范围内生物多样性的减少已引发巨大的负面效应,特别是对生态系统带来的影响。由于两栖类动物种群分布广泛,是湿地和陆地生物群落的重要组成部分,因此,它们的消亡和灭绝对生物多样性的威胁尤为明显。近年来,根据对全球范围内两栖类动物数量的一项调查发现,世界各地的青蛙、蟾蜍和其他两栖类动物的数量在日渐减少^[1~3],而关于这些动物种群衰减的原

基金项目:浙江省自然科学基金资助项目(302056)

收稿日期:2003-06-31;修订日期:2004-01-21

作者简介:贾秀英(1966~),女,浙江义乌人,副教授,主要从事环境毒理学研究。E-mail:XY_jia@163.com

Foundation item:Natural Science Foundation of Zhejiang Province(No. 302056)

Received date:2003-06-31;Accepted date:2004-01-21

Biography:JIA Xiu-Ying, Associate professor, mainly engaged in environmental toxicology. E-mail:XY_jia@163.com

因还不甚明了。据有关野外调查和实验研究表明,环境污染物对两栖动物生存造成很大影响,其中环境激素对所有两栖动物的繁殖具有重要的影响^[4,5]。环境中的重金属污染物镉(Cd)、铅(Pb)是世界野生动物基金会(WWF)确认的近 70 种环境激素中最重要的无机污染物^[6~8]。Carey 等报道许多蛙类种群数量的下降和灭绝与环境中的重金属污染有关^[9]。近几年国内外关于重金属镉、铅等对两栖类动物的影响开展了一些研究^[10~12],但大多集中在胚胎毒性、生物积累等方面^[12~14],对两栖类动物生理生化方面的影响研究尚不多见。

镉、铅对多种器官和组织具有毒性,有关重金属对动物肝、肾、脑等器官和组织酶活性的影响研究十分丰富^[15~17],酶活性可以作为反映重金属毒性的生物标志物。精巢是镉、铅作用的重要靶器官^[18~20],关于镉、铅对两栖类动物精巢中酶活性的变化国内外尚未见报道。本试验以常见的蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)为试验对象,应用生物化学方法观察了不同镉、铅染毒浓度下蟾蜍精巢中一些酶的变化,为探讨镉、铅对蟾蜍雄性生殖系统的毒性及其机理积累丰富的资料,也为探索重金属对两栖类动物种群的影响及作用机理提供一定的参考依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物染毒

健康成年雄性蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)90 只,平均体重 45~50g,购自杭州市萧山,随机均分为对照组和染毒组,每组 10 只,每个处理各有 3 个重复。染毒组分别腹腔注射用生理盐水配制的 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 溶液和 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 溶液(按镉计 0.1、0.2、0.4、0.8mg/kg 体重;按铅计 1、2、4、8 mg/kg 体重),对照组注射等量的生理盐水,每天注射 1 次,7d 后活体解剖取材。

1.2 样品处理

活体解剖蟾蜍,取一侧精巢,用蒸馏水冲洗,吸干,称重,4℃下按 1:4(g:ml)加生理盐水,冰浴中匀浆,并于 4℃,12000 r/min 离心 20 min,将上清液保存于-20℃冰箱中待测定各酶活性。

取另一侧精巢,清洗,称重,4℃下按 1:4(g:ml)加样品提取液(Tris-甘氨酸电极缓冲液,pH8.3,含 12%蔗糖),用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆,12000r/min(4℃)离心 10min,取上清液加入 20μl 0.1%溴酚兰,保存于冰箱中用于测定乳酸脱氢酶同工酶(LDH)。

1.3 检测指标

1.3.1 酶活性的测定 (1)样品上清液中蛋白质含量的测定:采用考马斯亮兰比色法。(2)酸性磷酸酶(ACP)和碱性磷酸酶(ALP):应用南京建成生物工程研究所试剂盒。ACP 以每 g 组织蛋白在 37℃作用 30 min 产生 1mg 酚为 1 活力单位(U)表示;ALP 以每 g 组织蛋白在 37℃作用 15 min 产生 1mg 酚为 1 活力单位(U)表示。(3)乳酸脱氢酶(LDH):应用比色法测定样品中 LDH 总活性^[21]。LDH 活力以每 g 组织蛋白在 37℃作用 15 min 产生 1μmol 丙酮酸为 1 活力单位(U)表示。

1.3.2 乳酸脱氢酶同工酶 用 0.37mol/L Tris HCl(pH8.9)为凝胶缓冲系统,电泳缓冲液为 0.05mol/L Tris-甘氨酸(pH8.3),用前稀释 10 倍。浓缩胶 3%,分离胶 6.5%,每点样孔加样量为 20μl,采用北京六一仪器厂生产的 DYY-III2 型稳压稳流电泳仪进行电泳,稳流 9~15mA,8℃电泳 2.5h 左右,待指示剂移到距凝胶板前 1cm 处时停止电泳。电泳完毕后,LDH 同工酶显色参照 Clark 法^[22],20min 显色,显色后的凝胶板用凝胶成像系统进行扫描。

1.4 统计方法

本试验数据处理均采用 SAS 统计软件进行 *t* 检验。

2 结果与分析

2.1 Cd、Pb 染毒后对蟾蜍精巢酶活性的影响

2.1.1 Cd 染毒后对蟾蜍精巢酶活性的影响 由表 1 可见,随着重金属 Cd 染毒剂量的增加,蟾蜍精巢中酸性磷酸酶(ACP)活性都呈下降趋势,且在 0.4 mg/kg、0.8 mg/kg 染毒组与对照组具有显著性差异($P<0.01$);各染镉处理组中的碱性磷酸酶(ALP)未发现有明显变化;乳酸脱氢酶活性在 0.1mg/kg、0.2mg/kg 染毒组就呈明显下降趋势($P<0.01$)。

2.1.2 Pb 染毒后对蟾蜍精巢酶活性的影响 由表 2 可见,随着重金属 Pb 染毒浓度的增加,蟾蜍精巢中的酸性磷酸酶(ACP)活性呈逐渐下降的趋势,但各染毒组与对照组比较未发现明显变化;而碱性磷酸酶(ALP)在 8 mg/kg 染毒组与对照组具有显著性差异($P<0.01$),乳酸脱氢酶(LDH)活性在 4 mg/kg 染毒组与对照组具有显著性差异($P<0.05$),在 8 mg/kg 染毒组与对照组具有极显著性差异($P<0.01$)。

表 1 Cd 染毒后对蟾蜍精巢各种酶活性的影响($\bar{x}\pm s$)
Table 1 Effects of Cadmium on enzymes in testes of *Bufo bufo Gargarizans*

处理组 Experimental group(mg/kg)	ACP (U/g protein)	ALP (U/g protein)	LDH (U/g protein)
对照 Control	263.81±18.67	8.78±0.24	1120.02±62.50
0.1	201.62±17.11	8.42±0.21	660.48±62.78**
0.2	177.01±15.34	7.07±0.33	586.06±58.12**
0.4	141.37±15.03**	7.02±0.36	802.15±58.87
0.8	128.61±12.74**	8.24±0.48	864.61±62.28

与对照比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ * $P<0.05$, ** $P<0.01$ Compared to control group

与对照比较 * $P<0.05$, ** $P<0.01$ * $P<0.05$, ** $P<0.01$ Compared to control group

2.2 Cd、Pb 染毒后对蟾蜍精巢 LDH 同工酶的影响

2.2.1 Cd 对蟾蜍精巢 LDH 同工酶的影响 本实验结果表明,在正常条件下,蟾蜍精巢 LDH 同工酶酶谱(图 1A)从正极到负极有 LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄ 和 LDH₅ (5 带和 6 带) 5 条酶谱。实验组与对照组相比,在 0.1mg/kg 剂量时,各酶带活性均下降(图 1B);在 0.2mg/kg 剂量时,各酶带活性继续呈下降趋势,LDH₁、LDH₂ 有缺失的趋势,LDH₅ 新增较强的 a、b 带,但亚带 6 则下降非常明显(图 1C);在 0.4mg/kg、0.8mg/kg 剂量时,各酶带活性有逐渐恢复的趋势,尤其是 LDH₅ 新增较强的 a、b 带,亚带 6 又明显增强(图 1D、E)。表明重金属镉对精巢具有一定的毒害作用,能引起 LDH 同工酶活性的下降,其中以 LDH₁、LDH₂ 和 LDH₅ 酶带的变化最明显。

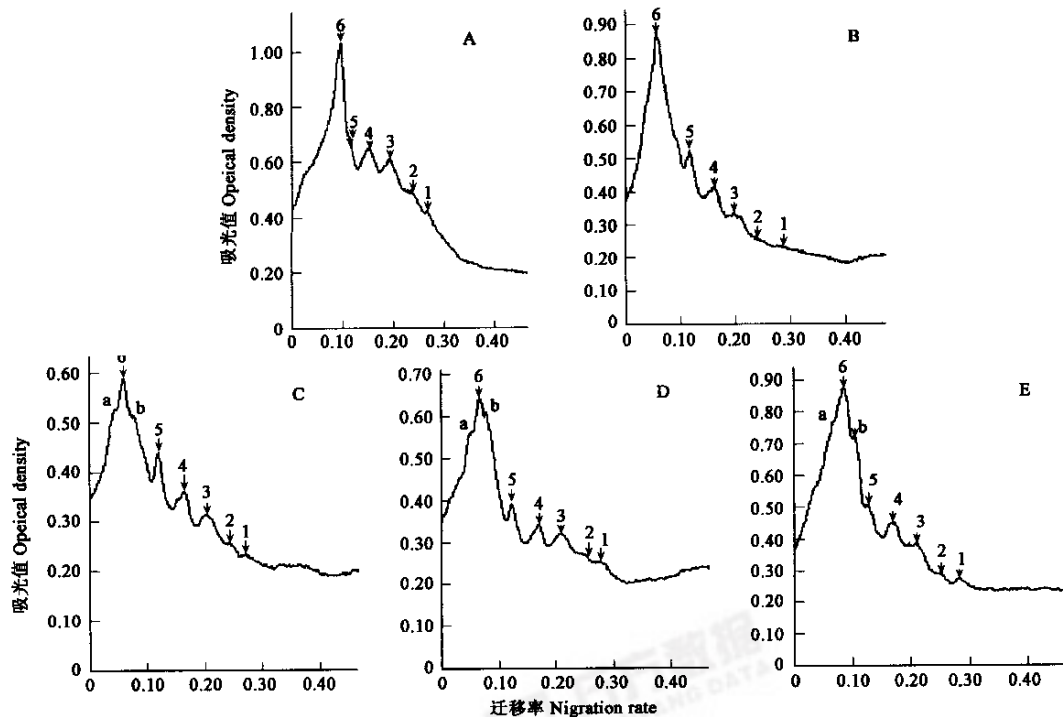


图 1 镉对蟾蜍精巢乳酸脱氢酶同工酶的影响

Fig. 1 The effect of Cd²⁺ on LDH of testis in *Bufo bufo* Gargarizans
A, Control; B, 0.1mg/kgCd; C, 0.2mg/kgCd; D, 0.4mg/kgCd; E, 0.8mg/kgCd

2.2.2 Pb 对蟾蜍精巢 LDH 同工酶的影响 本实验条件下,正常蟾蜍精巢 LDH 同工酶酶谱(图 2A)从正极到负极有 5 条酶带:LDH₁、LDH₂、LDH₃、LDH₄ 和 LDH₅ (有 2 条亚带)。实验组与对照组比较,在 1 mg/kg 剂量时,各酶带活性变化不明显(图 2B);在 2 mg/kg、4 mg/kg 剂量时,LDH₁ (1 带)、LDH₂ (2 带)酶活性下降(图 2C、D);在 8 mg/kg 剂量时,LDH₅ (5、6 带)酶活性明显升高,而 LDH₁ (1 带)、LDH₂ (2 带)基本缺失(图 2E)。由此可见,经 Pb 作用后,精巢 LDH 酶活性的下降以 LDH₁、LDH₂ 的变化最明显。

3 讨论

精子发生是一个多时相的复杂过程,常经历精原细胞增殖阶段、精母细胞成熟分裂阶段和精子形成阶段。这一过程与精巢中多种酶的活性存在着相关关系。研究表明^[21,23],精巢中存在的酸性磷酸酶(ACP)主要分布于精巢支持细胞的胞浆内,ACP 活性可能与其分泌功能有关,可作为衡量是否有生精障碍的指标;碱性磷酸酶(ALP)的活性在精原细胞和早期发育时期的初级精母细胞较强,与精巢生精细胞的分裂活动及葡萄糖向各级生精细胞的转运有关;乳酸脱氢酶(LDH)广泛存在于生精小管内,参

表 2 Pb 染毒后对蟾蜍精巢各种酶活性的影响(x±s)

Table 2 Effects of Lead on enzymes in testes of *Bufo bufo* Gargarizans

处理组 Experimental group(mg/kg)	ACP (U/g protein)	ALP (U/g protein)	LDH (U/g protein)
对照 Control	263.81±18.67	8.78±0.24	1024.12±72.50
1	220.33±16.82	8.70±0.22	846.82±60.12
2	217.64±16.34	7.79±0.29	845.65±58.86
4	199.15±15.23	8.08±0.33	679.80±42.44*
8	175.12±15.12	4.65±0.26**	567.41±40.12**

与对照比较 * P<0.05, ** P<0.01 * P<0.05, ** P<0.01 Compared to control group

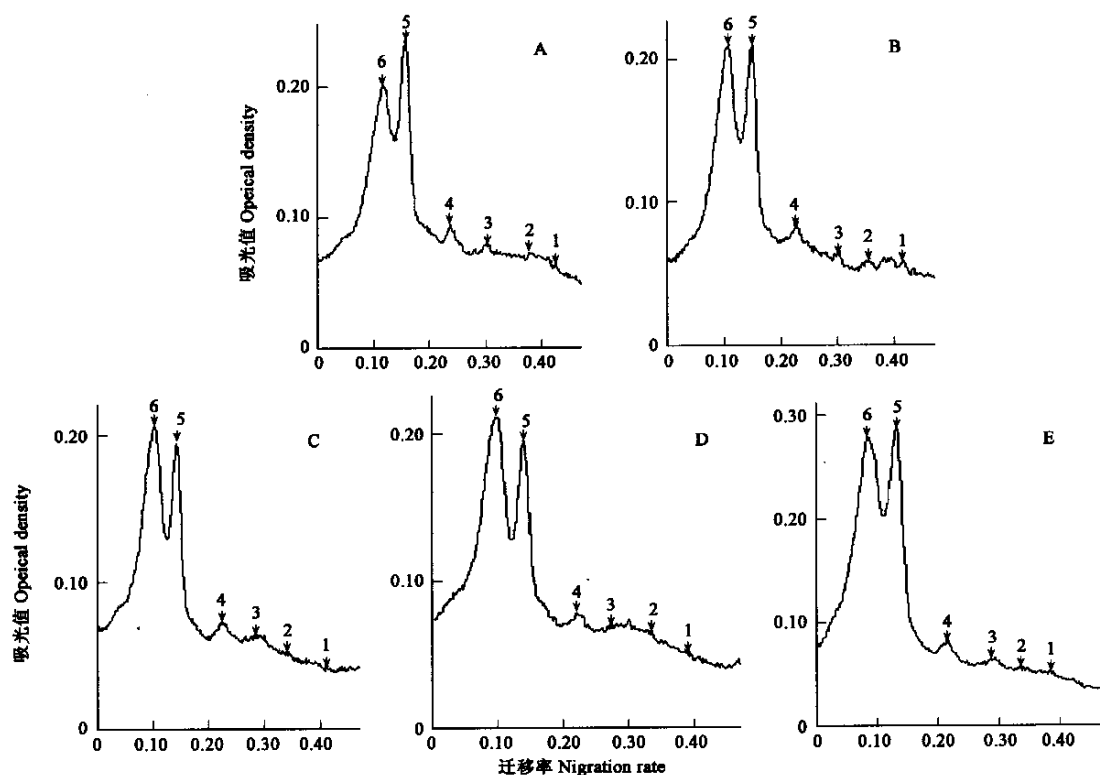


图2 Pb对蟾蜍精巢LDH同工酶的影响

Fig. 2 The effect of Pb^{2+} on LDH of testis in *Bufo bufo gargarizans*

A, Control; B, 1mg/kg Pb; C, 2mg/kg Pb; D, 4mg/kg Pb; E, 8mg/kg Pb

与能量代谢并与生精上皮的成熟有关。李湘鸣等^[24]的研究发现,随着镉染毒剂量的增加,大鼠睾丸 ACP 的活性受到了明显的抑制,而 ALP 未发现明显的变化。本实验结果显示,镉染毒下蟾蜍精巢 ACP 和 ALP 活性的变化基本与李湘鸣等的研究结果相似。在铅染毒下,蟾蜍精巢 ACP 活性随染毒剂量的增加而逐渐下降,但各处理之间没有显著的差异,而 ALP 的活性则随染毒剂量的增加而显著下降。ACP 主要分布在细胞的溶酶体内,镉导致蟾蜍精巢 ACP 活性降低一般认为是镉的直接抑制作用。ALP 是一种含锌酶,锌参与该酶的催化作用,是维持酶的活性不可缺少的重要因素,研究表明缺锌可导致雄性动物睾丸中的 ALP 活性降低^[25]。故镉、铅对蟾蜍精巢 ALP 活性的影响结果,可能是因为本实验条件下镉未能影响含锌酶中的锌,而铅则减少了含锌酶中的锌,从而影响酶的生物活性。其影响机制还有待于作进一步深入的研究。

本实验结果表明,蟾蜍精巢中 LDH 总活性随着镉、铅染毒剂量的增加,其活性均受到明显抑制。LDH 是糖酵解的一个关键酶,精巢组织除了可利用糖的有氧氧化获取能量外,还可通过糖酵解获得能量。因此,酶活性的变化直接影响精巢组织通过糖酵解对能量的获得,进而影响精子的形成和激素的分泌等功能。LDH 同工酶的分析进一步表明,随着镉、铅染毒剂量的增加,LDH₁ 和 LDH₂ 同工酶带活性被明显抑制或接近缺失,LDH₅ 同工酶带活性被增强。LDH 同工酶是参与糖代谢的重要的酶,其中 LDH₁ 和 LDH₂ 催化乳酸脱氢形成丙酮酸,后者氧化放出能量供组织利用,是与糖有氧代谢有关的酶。进入机体的镉、铅可能首先使 LDH₁ 和 LDH₂ 同工酶的活性下降,使精巢组织的糖酵解途径受到影响。LDH₅ 主要催化丙酮酸还原成乳酸,对乳酸的亲合力较强,在一定剂量的镉、铅染毒下,可能通过机体的代偿作用,LDH₅ 同工酶活性增加,精巢组织可利用乳酸而获取能量。

从本实验研究结果可以看出,镉、铅对蟾蜍精巢的酶活性能产生一定的影响,其中 LDH 同工酶可以考虑作为镉、铅中毒对精巢功能影响程度的一种有价值的生化指标。镉、铅作为环境中重要的重金属污染物,能影响人和动物机体雄性生殖系统的功能。以往的研究表明^[26~28],镉、铅对精子的发育和成熟有干扰和阻碍作用,可使精子数量减少,精子的活性下降,精子畸形等。由此可知,精巢组织酶活性的降低与精子的生成、发育和活化有一定的关系,其相关性有待进一步研究。

References 万方数据

[1] Blaustein A R, Wake D B. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 1995, **272**:56~61.

- [2] Alford R A, Dixon, Pechmann J H. Ecology Global amphibian population declines. *Nature*, 2001, **412**(6848):499~500.
- [3] Kiesecker J M, Blaustein A R, Belden L K. Complex caused of amphibian population declines. *Nature*, 2001, **410**(6829):681~684.
- [4] Sharpe R M, Skakkebaek N E. Are oestrogens involved in falling sperm counts and disorders of the male reproductive tract? *Lancet*, 1993, **341**:1392~1395.
- [5] 香山不二雄. Currint State of Studt on Environmental Hormone. *Word Environment*, 1999, **17**(2):34~35.
- [6] Colbom T. Developmental effects of endocrine-disrupting chemical in wildlife and humans. *Environ Health Perspect*, 1993, **101**:378~384.
- [7] Hutchinson T H, Matthiessen P. Endocrine disruption in wildlife: identification and ecological relevance. *The Science of the Total Environment*, 1999, **233**:1~3.
- [8] Kavlock R J, Daston G P, Derosa C, *et al.* Research needs for risk assessment of health and environment effects of endocrine disrupters: A reptor of the U. S. EPT-sponsored workshop. *Environ Health Perspect*, 1996, **104**:715~740.
- [9] Carey C, Bryant C J. Possible interrelations among environmental toxicants, amphibian development and decline of amphibian populations. *Environ Health Perspect*, 1995, **103**:13~17.
- [10] Pan D Y. The toxicity of herbicide to larvae of *Rana limnocharis*. *Chinese Journal of zoology*, 1990, **25**(1):32~34.
- [11] Loubourdis N S, Kyriakopoulou-Sklavounou D, Zachariadis G. Effects of cadmium exposure on bioaccumulation and larval growth in the frog *Rana ridibunda*. *Environ Pollut*. 1999, **104**:429~433.
- [12] Vogiazis A K, Loubourdis N S. Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionin and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*, 1998, **34**:64~68.
- [13] Jorge Herkovits. Cadmium uptake and bioaccumulation in *Xenopus laevis* embryos at different development stages. *Ecotoxicol. Environ. Safety*. 1998, **39**(1):21~26.
- [14] Schuytemp G S. Comparative toxicity of diuron on survival and growth of pacific freefrog, bullfrog, red-legged frog and African clawed frog embryos and tadpoles. *Arch. Environ. Contum. Toxicol*, 1998, **34**(4):370~376.
- [15] Antonio M T, Corredor L, Leret M L. Study of the activity of several brain enzymes like markers of the neurotoxicity induced by perinatal exposure to lead and/or cadmium. *Toxicology Letters*, 2003, **143**:331~340.
- [16] Oehlschlager K, Hutt R, Wolf G. Thermal investigations of enzyme-catalyzed reactions for detection of heavy metals in the case of cadmium. *Thermochimica Acta*, 1996, **271**:41~48.
- [17] Zhou X W, Zhu G N, Shun J H. Effects of mixture metals on the fish (*Carassius auratus*) ATPase activity and its genotoxicity. *Journal of Zhejiang University (Agriculture & Life Sciences)*, 2001, **27**(6):665~669.
- [18] Ma Y. The effects of low lead on male reproduction and sex function. *Occup science*, 1996, **23**(4):12.
- [19] Gennart J P, Buchet J P, Roels H, *et al.* Fertility of male workers exposed to cadmium, lead or manganese. *Am. J. Epidemiol*, 1992, **135**:1208~1219.
- [20] Stevens A, Lowe J. In:Zabel, M. ed., *Histologia*. PZWL, Warsaw, 2000.
- [21] Jiang Q G, Yu Y Q. *The theory and method of male reproduction toxicity*. Beijin Medical University and Chinese Xiehe Medical University Press, 1994. 225.
- [22] Clark J M, Switzer R L. *Experimental Biochemistry 2-ed.* San Francisco: Freeman W H and Company, 1997. 119~122.
- [23] Li X-M, Ju Z-H, Sun R, *et al.* The effects of cadmium on some enzymes activity and tissue form of testis in rats. *Health and toxicity magazine*, 1999, **13**(1):31~33.
- [24] Eltohamy M M, Younis M. Response of testes, epididymis and seminal vesicle of rabbits to zinc deficiency. *Arch. Exp. Veterinar.*, 1991, **45**(1):155.
- [25] Goering P L. Lead-protein interactions as a basis for lead toxicity. *Neurotoxicology*, 1993, **14**:45~60.
- [26] Shinozaki T, Pritzker K P H. Regulation of alkaline phosphatase; implications for calcium pyrophosphate dehydrate crystal dissolution and other alkaline phosphatase functions. *J. Rheumatol*, 1996, **23**(4):677~683.
- [27] Hew K W, Ericson W A, Welsh M J. A single low cadmium dose causes failure of spermiation in the rat. *Appl. Pharmacol.*, 1993, **121**:15~21.
- [28] Bjorge C, Brunborg G, Wiger R, *et al.* A comparative study of chemically induced DNA damage in isolated human and rat testicular cells. *Reprod Toxicol*, 1996, **10**:509~519.

参考文献:

- [5] 香山不二雄. 桂兰润、尚彦军译. 环境激素问题研究现状. 世界环境, 1999, **17**(2):34~35.
- [10] 潘道一. 除草剂对泽蛙蝌蚪的毒性. 动物学杂志, 1990, **25**(1):32~34.
- [13] 周新文, 朱国念, 孙锦荷. 混合重金属离子对鲫鱼 Na/KATPase 活性的影响及基因毒性作用研究. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 2001, **27**(6):665~669.
- [18] 马勇. 低水平铅接触对男工性功能及生殖结局的影响. 职业学, 1996, **23**(4):12.
- [21] 江泉观, 于永强. 雄(男)性生殖毒理学理论与方法. 北京:北京医科大学和中国协和医科大学联合出版社, 1994. 225.
- [23] 李湘鸣, 居中华, 孙蓉, 等. 镉对大鼠睾丸中某些酶活性及组织形态的影响. 卫生毒理学杂志, 1999, **13**(1):31~33.