

低温驯化锯缘青蟹鳃抗氧化防护、ATPase 及膜脂肪酸组成变化

孔祥会^{1,2} 王桂忠¹ 李少菁¹

(1. 厦门大学海洋与环境学院, 近海海洋环境科学国家重点实验室, 厦门 361005;

2. 河南师范大学生命科学学院, 新乡 453007)

摘要:锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 低温环境下生理生化的变化对于理解其低温适应具有重要的意义。本研究中采用生物化学的方法对低温驯化下锯缘青蟹鳃中超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPX) 的活性, 脂质过氧化产物丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量, 4 种 ATPase (Na^+ , K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, Ca^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) 活性及细胞膜脂肪酸组成进行测定。实验结果显示青蟹鳃中抗氧化酶 (SOD、CAT 和 GPX) 活性在 3 个驯化温度下, 随驯化温度的降低而升高。SOD 活性在 5℃ 和 10℃ 驯化下显著高于对照组 (27℃ 组) ($p < 0.01$); CAT 活性在 3 个驯化温度下均显著高于对照组 ($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$); GPX 活性仅 5℃ 驯化下显著高于对照组 ($p < 0.01$)。MDA 含量低温驯化下升高, 但仅 5℃ 驯化下显著高于对照组 ($p < 0.01$)。鳃中 4 种 ATPase 活性均是随驯化温度的降低而升高, 并且 5℃ 和 10℃ 驯化下均显著高于对照组 ($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。低温驯化下 C18:0、C18:1、C18:2、C18:3、C20:5 和 C22:6 等脂肪酸与对照组相比均发生显著性变化 ($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$), 饱和指数 $\Sigma\text{SFA}/\Sigma\text{UFA}$ 显著下降 ($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。低温驯化下锯缘青蟹鳃中抗氧化酶及 ATPase 活性升高, 说明其具有明显的温度补偿效应, 它是对低温适应的一种积极反应。鳃中 MDA 低温驯化下积累是活性氧自由基未能被及时清除而产生氧化应激的结果。低温下细胞膜脂肪酸饱和指数降低是维持细胞膜执行正常生理功能的需要。

关键词: 抗氧化效应; ATPase; 脂肪酸; 鳃; 低温驯化; 锯缘青蟹**中图分类号:** Q507 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2007)01-0059-08

需氧生物在体内进行生理代谢时, 会不断地产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 少量的活性氧自由基是机体本身所必需的, 但过量的自由基将会对机体产生氧化应激, 以损害体内的蛋白质、核酸与膜脂, 这时就需要生物体内抗氧化防护体系对自由基加以清除。超氧化物歧化酶 (Superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)、过氧化氢酶 (Catalase, CAT, EC 1.11.1.6)、谷胱甘肽过氧化物酶 (Glutathione peroxidase, GPX, EC 1.11.1.9) 是机体清除活性氧自由基关键酶类, 而丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 是脂类物质氧化应激的最终产物, 可以衡量机体内活性氧含量高低和氧化应激的程度。正常生理条件下, 自由基的产生和清除处于动态平衡^[1]。水生甲壳动物中抗氧化防护方面的研究已有报道, 如蟹类^[2-4]、

虾类^[5]等, 研究表明环境条件改变时, 机体内抗氧化酶也发生相应的变化。

三磷酸腺苷酶 (adenosine triphosphatase, ATPase, EC 3.6.1.3) 是一类重要的膜结合酶, 它在物质运输、能量转换以及信息传递方面具有重要的作用。生活在海区中的甲壳动物, 环境条件改变时, 需要其采取相应的形态、行为和生理生化对策与之相适应。环境变化与 Na^+ , K^+ -ATPase 活性相关性已有较多研究^[6,7], 结果表明鳃中 Na^+ , K^+ -ATPase 在渗透压调节中起重要作用。锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 不同器官、组织 ATPase 活性也存在较大的差异^[8]。

细胞膜是保护细胞内环境稳定性的一个重要结构。细胞内外的信息传递、物质运输、离子交换、细胞识别、细胞免疫等均是它来完成。环境温度

收稿日期: 2005-10-09; 修订日期: 2006-6-21

基金项目: 国家 863 重大专项 (2002AA603013) 资助

作者简介: 孔祥会 (1968—), 男, 汉族, 河南虞城人; 博士, 教授; 主要从事水生动物环境生理生化适应与分子进化研究。

E-mail: xhkong@henannu.edu.cn

通讯作者: 王桂忠, Tel: +86-0592-2188471。

E-mail: gzwang@xmu.edu.cn

变化对甲壳动物细胞脂类组成有较大影响^[9,10]。锯缘青蟹幼体饥饿下或发育过程中脂肪酸组成也发生较大变化^[11,12]。

锯缘青蟹是生活在近海或河口海区的一种经济甲壳动物。其生活环境经常发生变化,这必然要求其体内的生理生化调节发生相应改变。而低温环境下其体内生理生化研究报道较少。本实验对低温驯化锯缘青蟹鳃抗氧化效应、4 种类型 ATPase 活性及细胞膜脂肪酸组成变化进行研究,探讨其变化规律,以期为低温环境下增强青蟹生理生化调节能力和免疫防护提供理论依据,为青蟹养殖和经营管理提供指导。

1 材料与方 法

1.1 锯缘青蟹低温驯化

1.1.1 青蟹幼蟹采集与分组 采用来自福建诏安国家“863”青蟹育苗基地同一批亲蟹繁殖的幼体,在同一池培育的雄性幼蟹用于实验。选择体色鲜艳,无病无伤,规格整齐的 60 只幼蟹,随机分为 4 组。各组幼蟹低温驯养前,个体基本情况见表 1。

表 1 低温驯化青蟹幼蟹分组基本情况

Tab.1 Grouping status of *S. serrata* juveniles for low temperature acclimation

	A 组(5℃)	B 组(10℃)	C 组(15℃)	D 组(27℃)
头胸甲宽 (cm) Carapace width	3.06 ± 0.27	2.88 ± 0.24	2.95 ± 0.24	2.86 ± 0.18
头胸甲长 (cm) Carapace length	2.16 ± 0.21	2.09 ± 0.18	2.13 ± 0.18	2.08 ± 0.17
体重 (g) Body weight	5.04 ± 1.18	4.60 ± 1.13	4.69 ± 1.07	4.53 ± 0.49

1.1.2 低温驯化 幼蟹单只饲养,养殖容器为体积 2L 的半透明圆柱状塑料皿;控温装置为大容积光照生物培养箱;光周期为 12h:12h。养殖用水为沙滤海水,经充氧曝气 24h 和充分沉淀后使用。盐度为 25‰。每 3 d 换水 1 次。投饵以幼蟹专用配合饲料和菲律宾杂色蛤仔。在适应、降温和驯化期间管理条件一致。

幼蟹适应 1 周后进行降温。降温速度 1℃/12h,降至设定温度后恒温,开始计算驯化时间。实验组驯化期间水温分别为 5 ± 1.5℃,10 ± 1.5℃和 15 ± 1.5℃,正常饲养组为自然水温(27 ± 2.5℃)。驯化期间定期换水,换水前海水要预冷至设置温度后迅速换水。每天早中晚定期观察,并做好记录。

1.2 样品制备 驯化 3 周后取样,低温驯化幼蟹每

组取 10 只,对青蟹逐只处理。从培养箱中取出青蟹,用软布擦干后迅速剪开头胸甲,取出鳃,装于离心管中,置 - 80℃ 冰箱待用。制样时采用电子天平称取鳃 0.2g,按 1:9 加入 0.9% 生理盐水进行冰浴匀浆,然后在 4℃,6000r/min (RCF:3824g) 的条件下离心 15min,取上清液分装,置于 - 20℃ 冰箱待测,每一批样品均在 1 周内完成测定。

1.3 测定方法

1.3.1 SOD、GPX 和 ATPase 活性及 MDA 含量的测定 SOD、GPX 和 ATPase 活性及 MDA 测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒进行测定,具体测定方法按试剂盒的说明进行。SOD 活性单位定义:每毫克组织蛋白在 1mL 反应液中 SOD 抑制率达 50% 时所对应的 SOD 量为一个亚硝酸盐单位(活性单位:U/mg prot); GPX 活性单位定义:规定每毫克蛋白质,每分钟扣除非酶反应的作用,使反应体系中 GSH 浓度降低 1μmol/L 为一个酶活性单位(活性单位:U/mg prot); ATPase 活性单位定义:规定每小时每毫克蛋白的 ATPase 分解 ATP 产生 1μmol 无机磷量为一个 ATPase 活性单位(活性单位:μmol Pi/h mg prot)。

1.3.2 过氧化氢酶活性测定 采用钼酸铵比色法,根据 Cheng 和 Meng (1994) 建立的方法进行测定^[13]。CAT 活性单位定义:反应体系中,每分钟每毫克蛋白分解 1μmol 过氧化氢为 1 个酶活性单位(活性单位:U/mg prot)。

1.3.3 匀浆粗提液蛋白定量 参照 Bradford (1976) 测定方法^[14]。牛血清白蛋白(Bovine serum albumin, BSA) (购于 AMRESCO 公司)作为标准蛋白。

1.3.4 细胞膜脂肪酸测定 鳃细胞膜提取方法参见 Cuculescu 和 Bowler (1993) 方法^[15],所得细胞膜于 60℃ 下烘干 12 h 至恒重,然后密闭于 - 20℃ 冰箱中备用。脂肪酸测定参见 Kong (2004) 方法^[16]。

1.4 数据处理 采用 EXCEL2000 统计分析软件进行 One-way ANOVA 分析和独立性 t 检验。

2 结 果

2.1 低温驯化青蟹幼蟹抗氧化效应变化

低温驯化下青蟹幼蟹鳃中 SOD、CAT、GPX 活性和 MDA 含量变化见图 1。从图中可见,鳃中 SOD 活性随驯化温度的降低而升高。5℃ 驯化时最高,为 155.50 ± 52.83U/mg prot。统计分析显示,鳃中 SOD 活性,5℃ 和 10℃ 驯化组显著高于 27℃ 组 ($p < 0.01$),而 15℃ 驯化组与 27℃ 组之间差异不显著 (p

>0.05)。鳃中 CAT 活性随驯化温度的降低而升高。统计分析显示,5℃驯化组鳃中 CAT 活性显著高于 27℃组($p < 0.01$),而 10℃和 15℃驯化组鳃中 CAT 活性虽有增强,但与 27℃组之间不存在显著差异。鳃中 GPX 活性也是随着驯化温度的降低而升高。统计分析显示,鳃中 GPX 活性,5℃驯化组显著

高于 27℃组($p < 0.01$);而 10℃、15℃驯化组和 27℃组之间差异不显著($p > 0.05$)。鳃中 MDA 含量随驯化温度的降低而升高。统计分析显示,鳃中 MDA 含量,5℃驯化组显著高于 27℃组($p < 0.01$),10℃和 15℃驯化组与 27℃组之间差异不显著($p > 0.05$)。

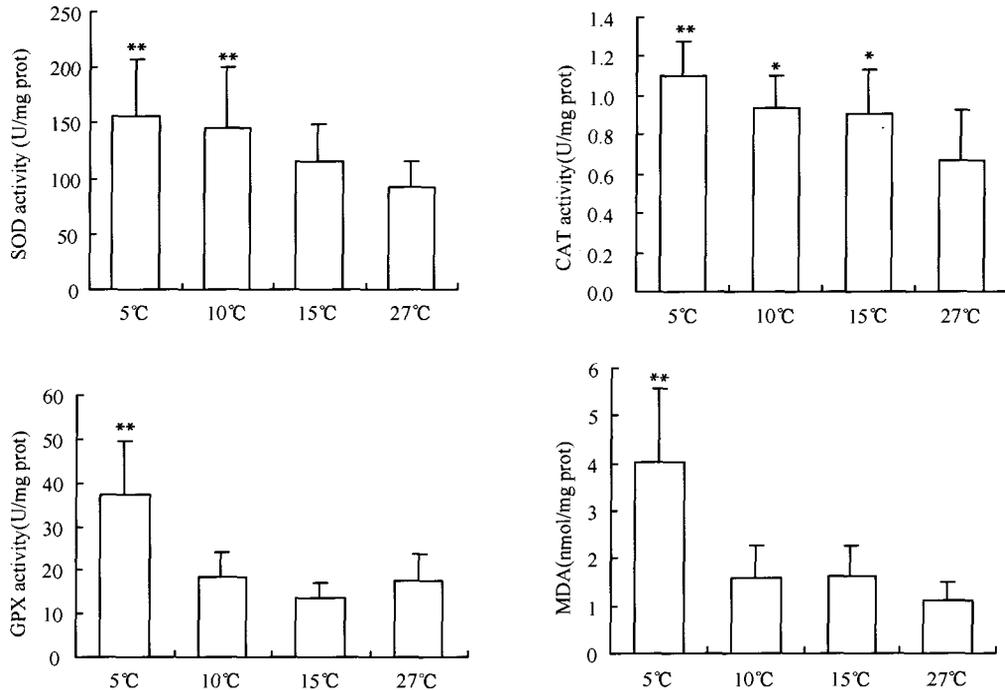


图 1 低温驯化青蟹鳃中 SOD、CAT、GPX 活性和 MDA 含量的变化

Fig. 1 Changes of SOD, CAT, GPX activity and MDA content in gill of *S. serrata* under low temperature acclimation

图中所有数值均是以 $M + SD$ ($n = 10$) 表示。t 检验时,“*”表示与 27℃组相比有显著性差异($p < 0.05$);“**”表示与 27℃组相比有极显著性差异($p < 0.01$)

Note: All values are expressed in $M + SD$ ($n = 10$); “*” represents significant difference ($p < 0.05$) compared with the 27℃; “**” represents very significant difference ($p < 0.01$)

2.2 低温驯化青蟹鳃四种类型 ATPase 活性变化

低温驯化锯缘青蟹鳃中 Na^+ , K^+ -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase、 Ca^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性均是随着驯化温度的降低而升高(图 2)。统计分析显示鳃中 Na^+ , K^+ -ATPase、 Mg^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性在 5℃和 10℃驯化下显著高于 27℃组($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。鳃中 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase 活性仍然是低温驯化下升高,5℃、10℃和 15℃驯化组均显著高于 27℃组($p < 0.01$ 或 $p < 0.05$)。

2.3 低温驯化下锯缘青蟹鳃细胞膜脂肪酸组成变化

低温驯化锯缘青蟹鳃细胞膜中脂肪酸组成见表 2,其主要脂肪酸为 C16:0、C18:2、C18:1 和 C20:5。脂肪酸 C18:1、C18:2 和 C18:3 均是低温驯化组显著高于 27℃组($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$);而 C18:0、C20:

5 和 C22:6 则是显著低于 27℃组($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$)。其他脂肪酸变化不显著($p > 0.05$)。鳃细胞膜中 ΣC18 是低温驯化组显著高于 27℃组($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$); ΣC20 是显著低于 27℃组($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$); ΣC22 仅 5℃驯化组低于 27℃组($p < 0.01$)。 ΣC16 在驯化组与 27℃组之间无显著性差异($p > 0.05$)。 ΣSFA 低温驯化下显著降低($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$); ΣUFA 低温驯化下显著升高($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$),其中主要是 ΣMUFA 和 ΣPUFA - $\omega 6$ 显著升高($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$),因而饱和指数 $\Sigma \text{SFA} / \Sigma \text{UFA}$ 低温驯化下显著下降($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$)。 $\omega 6 / \omega 3$ 驯化组显著高于 27℃组($p < 0.01$, 或 $p < 0.05$);EPA + DHA 显著低于 27℃组($p < 0.01$),但 EPA/DHA 无显著性变化($p > 0.05$)。

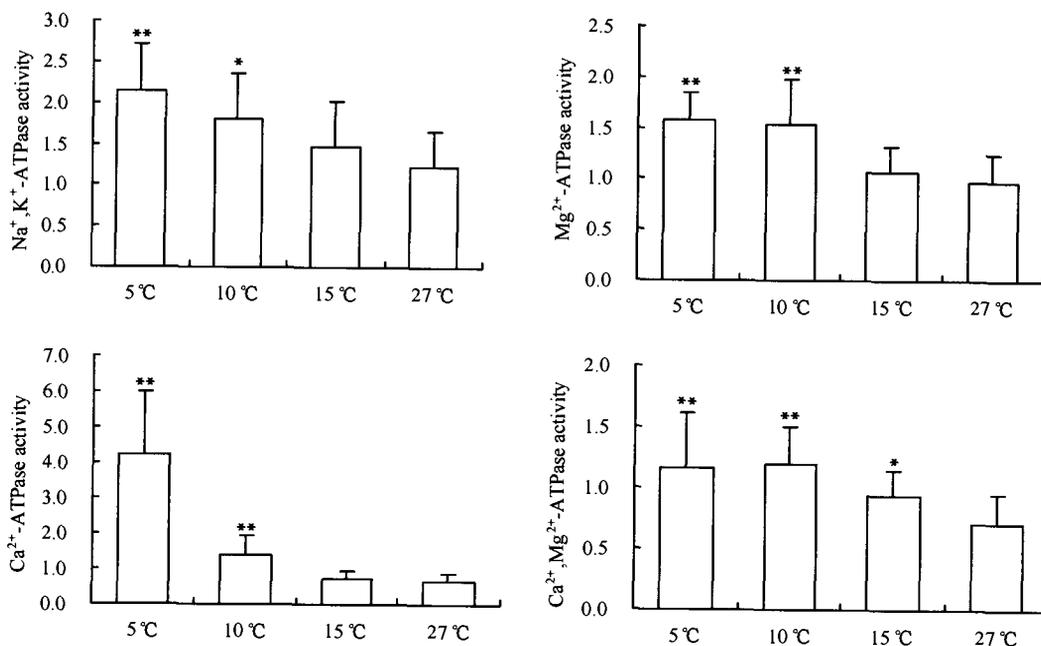


图2 低温驯化锯缘青蟹鳃中4种类型ATPase活性的变化

Fig.2 Activity changes of four ATPase in gill of *S. serrata* under low temperature acclimation

图中所有数值均是以 M + SD 表示,酶活性单位为: $\mu\text{mol Pi/h mg prot.}$ 。与 27°C 组之间统计分析,“**”表示有极显著性差异 ($p < 0.01$); “*”表示有显著性差异 ($p < 0.05$)

Note: All values are expressed in M + SD ($n = 10$); the unit of enzyme activity is $\mu\text{mol Pi/h mg prot.}$; “*” represents significant difference ($p < 0.05$) compared with the 27°C; “**” represents very significant difference ($p < 0.01$)

表2 低温驯化锯缘青蟹鳃细胞膜脂肪酸组成的变化(相对比例,%) ($n = 3$)

Tab.2 Changes of fatty acid composition in gill cell membrane of *S. serrata* under low temperature acclimation (relative proportion, %) (Means \pm Standard deviation) ($n = 3$)

脂肪酸 Fatty Acid	驯化温度 Acclimation temperature			
	5°C	10°C	15°C	27°C
C14:0	1.80 \pm 0.39	1.99 \pm 0.61	2.44 \pm 0.80	2.84 \pm 0.74
C16:1 ω 7	3.70 \pm 0.57	3.75 \pm 0.73	2.71 \pm 0.79	2.89 \pm 0.73
C16:0	10.59 \pm 1.58	11.88 \pm 1.44	11.48 \pm 1.47	11.36 \pm 2.15
C18:2 ω 6	11.60 \pm 1.02 *	12.34 \pm 0.57 **	13.11 \pm 2.09 *	8.76 \pm 0.89
C18:1 ω 9	24.48 \pm 2.03 **	21.43 \pm 2.61 *	22.77 \pm 2.79 *	15.24 \pm 0.96
C18:3 ω 3	7.01 \pm 0.13 **	6.06 \pm 0.93	6.44 \pm 0.16 *	4.31 \pm 0.81
C18:0	9.97 \pm 0.27 *	8.74 \pm 1.00 *	7.48 \pm 1.29 **	13.09 \pm 1.48
C20:4 ω 6	3.18 \pm 0.37	3.73 \pm 0.50	3.62 \pm 0.68	4.33 \pm 0.82
C20:5 ω 3	8.07 \pm 0.93 **	9.90 \pm 1.70 *	9.62 \pm 0.83 *	13.49 \pm 1.36
C20:1 ω 9	0.82 \pm 0.11	0.39 \pm 0.24 *	0.20 \pm 0.09 *	1.16 \pm 0.38
C20:3 ω 3	3.51 \pm 0.27	3.32 \pm 0.76	3.54 \pm 0.87	2.66 \pm 0.84
C20:0	8.31 \pm 0.18	7.90 \pm 0.42	8.93 \pm 1.09	7.98 \pm 1.91
C22:6 ω 3	3.47 \pm 0.18 *	4.53 \pm 0.79	4.09 \pm 0.92	5.34 \pm 0.85
C22:1 ω 3	tr	tr	tr	0.85 \pm 0.22

续表

脂肪酸 Fatty Acid	驯化温度 Acclimation temperature			
	5℃	10℃	15℃	27℃
C22:0	3.48 ± 0.18	4.04 ± 0.27	3.57 ± 0.72	3.85 ± 0.34
C24:1	-	-	-	0.82 ± 0.25
C24:0	tr	tr	-	1.04 ± 0.55
C26:0	-	-	-	-
∑C14	1.80 ± 0.39	1.99 ± 0.61	2.44 ± 0.80	2.84 ± 0.74
∑C16	14.29 ± 1.60	15.63 ± 1.20	14.19 ± 0.74	14.25 ± 1.42
∑C18	53.06 ± 2.96**	48.57 ± 1.29**	49.80 ± 3.47*	41.40 ± 0.59
∑C20	23.89 ± 1.50**	25.24 ± 0.14**	25.92 ± 1.87*	29.62 ± 1.29
∑C22	6.95 ± 0.36**	8.57 ± 0.52	7.66 ± 1.58	10.04 ± 0.84
∑C24	-	-	-	1.86 ± 0.80
∑C26	-	-	-	-
∑SFA	34.15 ± 1.40**	34.55 ± 1.01**	33.90 ± 2.30*	40.17 ± 1.67
∑MUFA	29.00 ± 1.43**	25.57 ± 1.69*	25.67 ± 1.94*	20.96 ± 0.74
∑PUFA-ω6	14.78 ± 0.77*	16.07 ± 0.79**	16.73 ± 1.45*	13.08 ± 0.24
∑PUFA-ω3	22.06 ± 1.26*	23.81 ± 0.75	23.69 ± 1.07	25.79 ± 1.11
∑UFA	65.85 ± 1.40**	65.45 ± 1.01**	66.10 ± 2.30*	59.83 ± 1.67
∑SFA/∑UFA	0.52 ± 0.03**	0.53 ± 0.02**	0.51 ± 0.05*	0.67 ± 0.05
ω6/ω3	0.67 ± 0.05**	0.67 ± 0.02**	0.71 ± 0.09*	0.51 ± 0.03
EPA + DHA	11.54 ± 1.04**	14.43 ± 0.92**	13.71 ± 0.42**	18.83 ± 0.51
EPA/DHA	2.32 ± 0.23	2.28 ± 0.83	2.46 ± 0.73	2.60 ± 0.70

注: ∑SFA = C14:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0 + C26:0; ∑MUFA = C16:1ω7 + C18:1ω9 + C20:1ω9 + C22:1ω + C24:1ω; ∑PUFA-ω6 = C18:2ω6 + C20:4ω6 + C22:4ω6; ∑PUFA-ω3 = C18:3ω3 + C20:3ω3 + C20:5ω3 + C22:1ω3 + C22:6ω3; ∑UFA = MUFA + PUFA. 与 27℃组之间统计分析, “*”表示具有显著性差异($p < 0.05$); “**”表示具有极显著性差异($p < 0.01$)

Note: ∑SFA = C14:0 + C16:0 + C18:0 + C20:0 + C22:0 + C24:0 + C26:0; ∑MUFA = C16:1ω7 + C18:1ω9 + C20:1ω9 + C22:1ω + C24:1ω; ∑PUFA-ω6 = C18:2ω6 + C20:4ω6 + C22:4ω6; ∑PUFA-ω3 = C18:3ω3 + C20:3ω3 + C20:5ω3 + C22:1ω3 + C22:6ω3; ∑UFA = MUFA + PUFA. “*” represents significant difference ($p < 0.05$) compared with the 27℃; “**” represents very significant difference ($p < 0.01$)

3 讨论

3.1 锯缘青蟹低温驯化下抗氧化效应的变化

水生生物在适宜温度范围内,依靠自身生理生化补偿机制对环境温度变化进行适应^[17]。在超出适宜范围时,机体补偿能力下降,同时也是驯化适应的开始。有的生物体通过自身调节和蛋白质调控适应下来,即适应限改变^[18]。

锯缘青蟹幼体最适宜生长水温大约为 25—30℃^[19]。本实验是参照此温度来设定 3 个不同低温(5℃, 10℃和 15℃)进行驯化,3 周后发现幼蟹鳃中抗氧化酶活性均发生了较大的变化, SOD、CAT 和 GPX 活性随驯化温度的降低而升高,而 MDA 含量也是随驯化温度的降低而升高。这可能是由鳃生理功

能的特殊性所决定的。机体组织中 ROS 的增多可诱导抗氧化酶活性的增加^[20]。青蟹低温驯化下鳃呼吸代谢和渗透压调节产生的活性氧不能及时清除,便会诱导 SOD 活性增加以清除超氧阴离子自由基,与之同时 SOD 歧化超氧阴离子成为过氧化氢,过氧化氢的增多诱导 CAT 和 GPX 表达的增加。一般情况下,机体生理代谢是随温度的降低而下降,较低温度下维持最低的基础代谢或进入冬眠状态。鳃是青蟹的呼吸器官,温度降低时呼吸率下降,但仍要维持基本的呼吸代谢,以保证全身对氧的需求;同时鳃又是重要的渗透压调节器官,不论温度高低,渗透压都要进行正常的调节,所以鳃的生理功能决定其代谢率要维持一定的生理水平。生理代谢中产生的活性氧在低温下就需要有更多的 SOD、CAT 和 GPX 来加

以清除,因而其抗氧化酶活性增加,但当抗氧化酶活性的增加不足以及时清除代谢产生的活性氧自由基时,仍可造成机体的氧化应激,从而 MDA 含量增多。

3.2 低温驯化锯缘青蟹鳃中 ATPase 活性变化

Na^+ , K^+ -ATPase 的主要生物学意义在于逆浓度差和电位差转运物质,从而建立起一种势能储备。一旦膜上的离子通道开放, Na^+ 、 K^+ 会迅速顺浓度差跨膜扩散。这种跨膜的电化学梯度就是信号传导和神经、肌肉等可兴奋细胞发生兴奋的基础。 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 在维持细胞正常生理功能中也具有重要的作用,它可控制膜的稳定性和调节神经递质的释放。 Ca^{2+} -ATPase 通过主动转运可将细胞内游离 Ca^{2+} 泵出细胞外,使细胞内 Ca^{2+} 维持在较低的水平,其主要通过质膜上 Ca^{2+} -ATPase 外排和内质网、线粒体等细胞器膜上 Ca^{2+} -ATPase 摄取来完成。线粒体存在着许多 Ca^{2+} 摄取和释放的通道,线粒体 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 活性可能与摄取胞内游离钙有关,其对线粒体基质中 Ca^{2+} 水平维护具有一定的调节作用^[21]。

低温驯化 3 周后青蟹鳃中 Na^+ , K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} -ATPase 活性均是随着驯化温度的降低而升高, Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 也是在低温驯化下活性升高,这一研究结果与对鱼鳃的研究结果相同^[22-24]。酶动力学研究发现 ATPase 是一种温度敏感型的酶,其 $Q_{10} = 2$; 而离子通过鳃膜扩散损失 $Q_{10} = 1.25$ ^[25]。所以在温度降低相同时,酶活性降低幅度大,即离子摄取能力下降快。这样一来机体内离子损失快,离子水平就会下降。为了避免这样的损失,鳃中负责离子摄取和渗透压调节的 ATPase 活性必须升高。低温下鳃代谢酶活性增强主要是为了维持低温下鳃的呼吸和渗透压处于稳定的生理水平,从而保证体内氧的供应和基础代谢的正常进行。

水生动物低温驯化下组织中酶活性上升,这一结论是在同一测定温度下,测定冷驯化鱼类鳃匀浆液酶活性的大量研究中得以证实的,所采用的测定温度一般为 25°C 或 37°C ^[22,24,26,27]。从 37°C 获得的测定结果扩展到低温驯化下机体内的生理状态可能会存在误区,这就是说实验室测定酶活性与自然状态下生理酶活性总会存在差异。但同样条件下在生理温度下测定酶活性可以更接近反映实际生理酶活性。今后在研究温度驯化对水生动物酶活性的影响时,在驯化温度下测定酶活性,并结合酶的反应速率和 K_m 值,以便对低温驯化下水生动物酶活性的变化有更全面的认识。

3.3 低温驯化锯缘青蟹细胞膜脂肪酸组成的变化

本实验结果表明,低温驯化锯缘青蟹鳃细胞膜中脂肪酸发生了不同的变化,如 C18:1、C18:2 和 C18:3 均显著高于 27°C 组,而 C18:0、C20:5 和 C22:6 均显著低于 27°C 组。生物体内脂肪酸处于不断的动态转化和脂肪酸代谢过程中^[28]。低温驯化下鳃细胞膜内脂肪酸组成发生了转化和调整,以使鳃膜能够适应外界环境温度的降低。与 27°C 组相比,鳃细胞膜中 Σ C18 低温驯化下升高; Σ C20 低温驯化下降低。 Σ C22 仅 5°C 驯化组降低。说明脂肪酸链的长短转化主要是在 C18 和 C20 之间。低温驯化下 Σ SFA 降低, Σ UFA 升高,因而饱和指数 Σ SFA/ Σ UFA 显著降低。这一结果与对岸蟹 (*C. maenas*)^[29] 和钩虾 (*Gammarus duebeni*)^[30] 的研究相同。低温驯化下, UFA 主要是 Σ MUFA 和 Σ PUFA- $\omega 6$ 显著升高。 $\omega 6/\omega 3$ 显著上升,而 $\omega 3$ 系列的下降主要是 EPA + DHA 下降,但 EPA/DHA 却无显著变化。青蟹鳃细胞膜脂肪酸的变化可以得出低温驯化下长链不饱和脂肪酸下降,向短链单不饱和脂肪酸转化, $\omega 3$ 系列向 $\omega 6$ 系列转化。

3.4 低温驯化青蟹鳃细胞膜脂肪酸组成,酶活性变化的交互效应

低温驯化 3 周后青蟹鳃细胞膜各个脂肪酸表现出不同的变化,但最终结果是饱和脂肪酸含量下降,不饱和脂肪酸含量增加,从而使其饱和指数 Σ SFA/ Σ UFA 下降,细胞膜流动性增加,从而保证细胞膜执行和完成正常的生理功能。同时为 ATPase 活性的增加及功能发挥提供保障,另一方面 ATPase 活性对细胞内外离子转运和调节的正常维护也有助于维护细胞膜的完整性和生理功能的发挥。

低温驯化下青蟹鳃抗氧化酶和 ATPase 活性随驯化温度的降低而升高,具有明显的温度补偿效应。青蟹鳃对低温效应表现出较强的补偿能力,说明青蟹维护鳃生理功能的重要性。抗氧化酶活性升高,防止活性氧自由基对鳃中细胞膜磷脂的攻击,保持了细胞膜的完整性,从而维护了膜上 Na^+ , K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, Ca^{2+} -ATPase 和 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} -ATPase 完成正常的离子转运,低温下鳃中 ATPase 活性增强可以更好地维护细胞内外离子水平的稳定性,使细胞得以完成自由基清除等正常生理功能。所以抗氧化酶和 ATPase 在温度补偿上也表现出交互作用。青蟹对温度降低时酶活性的交互补偿还有待今后从功能蛋白和调控基因方面进行研究,以揭示其内在的调控机制。

参考文献:

- [1] Fang Y Z, Zheng R L. Theory and application of free radical biology [M]. Beijing: Science press. 2002, 122—161 [方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用. 北京: 科学出版社. 2002, 122—161]
- [2] Orbea A, Ortiz-Zarragoitia M, Sole M, et al. Antioxidant enzymes and peroxisome proliferation in relation to contaminant body burdens of PAHs and PCBs in bivalve molluscs, crabs and fish from the Urdaibai and Plentzia estuaries (Bay of Biscay) [J]. *Aqua Toxicol*, 2002, **58**: 75—98
- [3] Brouwer M, Brouwer T H. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1998, **351** (2): 257—264
- [4] Gamble S C, Goldfarb P S, Porte C, et al. Glutathione peroxidase and other antioxidant enzyme function in marine invertebrates (*Mytilus edulis*, *Pecten maximus*, *Carcinus maenas* and *Asterias rubens*) [J]. *Mar Environ Res*, 1995, **39**: 191—195
- [5] Dandapat J, Chainy G B N, Rao K J. Dietary vitamin-E modulates antioxidant defence system in giant freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, **127** C: 101—115
- [6] Lopez mananes A A, Meligeni C D, Goldemberg A L. Response to environmental salinity of Na⁺, K⁺-ATPase activity in individual gills of the euryhaline crab *Cyrtograpsus angulatus* [J]. *J Exp Mar Biol Ecol*, 2002, **274**: 75—85
- [7] Furriel R P M, McNamara J C, Leone F A. Characterization of Na⁺, K⁺-ATPase in gill microsomes of the freshwater shrimp *Macrobrachium olfersii* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 2000, **126** B: 303—315
- [8] Kong X H, Wang G Z, Li S J, et al. Comparative study on the activities of four ATPases in different organs and tissues of mud crab, *Scylla serrata* [J]. *Journal of Xiamen University (Nature Science)*, 2004, **43**(1): 98—101 [孔祥会, 王桂忠, 李少菁, 等. 锯缘青蟹不同器官组织中 4 种类型 ATPase 活性比较研究. 厦门大学学报 (自然科学版), 2004, **43**(1): 98—101]
- [9] Farkas T, Nevenzel J C. Temperature acclimation in the crayfish: effects on phospholipid fatty acids [J]. *Lipids*, 1981, **16**: 341—346
- [10] Pruitt N L. Adaptation to temperature in the cellular membranes of Crustacea: membrane structure and metabolism [J]. *J Therm Biol*, 1990, **15**: 1—8
- [11] Cheng Y X, Li S J, Wang G Z, et al. Changes in lipid class and fatty acid compositions in the ovaries and hepatopancreas of the mud crab *Scylla serrata* during the vitellogenesis of the second ovarian maturation [J]. *Acta Oceanologica Sinica*, 2001, **23** (3): 66—77 [成永旭, 李少菁, 王桂忠, 等. 锯缘青蟹卵黄发生期卵巢和肝胰腺脂类的变化. 海洋学报, 2001, **23** (3): 66—77]
- [12] Weng Y Z, Li S J, Wang G Z. Effect of starvation on the biochemical composition of *Scylla serrata* larvae [J]. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2002, **41** (1): 84—88 [翁幼竹, 李少菁, 王桂忠. 饥饿对锯缘青蟹幼体生化组成的影响. 厦门大学学报 (自然科学版), 2002, **41** (1): 84—88]
- [13] Cheng L J, Meng Z. Molybdate colorimetric method for determination of catalase in serum [J]. *J Clin Inspec*, 1994, **12** (1): 6—8 [程鲁京, 孟泽. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶. 临床检验杂志, 1994, **12** (1): 6—8]
- [14] 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
- [15] Cuculescu M, Bowler K. The isolation of a plasma membrane-rich fraction from the skeletal muscle of two species of marine crab, *Carcinus maenas* and *Cancer pagurus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1993, **106** B: 263—267
- [16] Kong X H. Physiological and biochemical mechanism of low temperature effects on *Scylla serrata* [D]. Thesis for doctor of science. Xiamen University, 2004, 55—97 [孔祥会. 锯缘青蟹低温效应生理生化机制研究. 博士学位论文, 厦门大学, 2004, 55—97]
- [17] Hochachka P W, Somero G N (editor). *Biochemical Adaptation* [M]. Princeton, New Jersey: Princeton university press. 1984, 356—449
- [18] Hoang T, Lee S Y, Keenan C P, et al. Cold tolerance of the banana prawn *Penaeus merguensis* de Man and its growth at different temperature [J]. *Aquacul Res*, 2002, **33**: 21—26
- [19] Zeng Z S, Li S J. Temperature effects on survival and development of larvae of mud crab, *Scylla serrata* [J]. *J Fish China*, 1992, **16** (3): 213—221 [曾朝曙, 李少菁. 温度对锯缘青蟹幼体存活和发育的影响. 水产学报, 1992, **16** (3): 213—221]
- [20] Li X Y, Liu Y D, Song L R, et al. Responses of antioxidant systems in the hepatocytes of common carp (*Cyprinus carpio* L.) to the toxicity of Microcystin-LR [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, **27** (5): 472—475 [李效宇, 刘永定, 宋立荣, 等. 鲤肝细胞抗氧化系统对微囊藻毒素毒性的反应. 水生生物学报, 2003, **27** (5): 472—475]
- [21] Zylinska L, Legutko B. Neuroactive steroid modulate in vitro the Mg²⁺-dependent Ca²⁺, Mg²⁺-ATPase activity in cultured rat neurons [J]. *Gen Pharmac*, 1998, **30** (4): 533—536
- [22] Gabbianelli R, Falcioni G, Mazzanti L, et al. Seasonal variations of physical and biochemical membrane properties in trout erythrocytes [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1996, **114** B: 275—279
- [23] Gonzalez-Cabrera P J, Dowd F, Pedibhotla V K, et al. Enhanced hypo-osmoregulation induced by warm-acclimation in antarctic fish mediated by increased gill and kidney Na⁺:K⁺ ATPase activities [J]. *J Exp Biol*, 1995, **198**: 2279—2291
- [24] Sun L T, Chen G R, Chang C F. Characteristics of blood parameters and Na⁺, K⁺-ATPase in chilled comatose tilapia cultured in various salinities [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1994, **107** A: 641—646
- [25] Motais R, Isaia J. Temperature-dependence of permeability to water and to sodium of the gill epithelium of the eel *Anguilla anguilla* [J]. *J Exp Biol*, 1972, **56**: 587—600
- [26] Schwarzbaum P J, Niederstatter H, Wieser W. Effects of temperature on the Na⁺, K⁺-ATPase and oxygen consumption in hepatocytes of two species of freshwater fish, roach (*Rutilus rutilus*) and brook trout (*Salvelinus fontinalis*) [J]. *Physiol Zool*, 1992, **65**: 699—711
- [27] Stuenkel E L, Hillyard S D. Effects of temperature and salinity on gill Na⁺-K⁺-ATPase activity in the pupfish *Cyprinodon salinus* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1980, **67** A: 179—182
- [28] Zhu B K, Cao W X. Fatty acid composition and their changes during

- early life stage of silver carp *Hypophthalmichthys molitrix* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2002, 26 (2): 130—135 [朱邦科, 曹文宣. 鲢早期发育阶段鱼体脂肪酸组成变化. 水生生物学报, 2002, 26 (2): 130—135]
- [29] Chapelle S. The influence of acclimation temperature on the fatty acid composition of an aquatic crustacean (*Carcinus maenas*) [J]. *J Exp Zool*, 1978, 204: 337—346
- [30] Dawson M E, Morris R J, Lockwood A P M. Some combined effects of temperature and salinity on water permeability and gill lipid composition in amphipod *Gammarus duebeni* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1984, 78 A: 729—735

CHANGES OF ANTIOXIDANT DEFENSES, ATPase ACTIVITY AND CELL MEMBRANE FATTY ACID COMPOSITION IN GILL OF *SCYLLA SERRATA* UNDER LOW TEMPERATURE ACCLIMATION

KONG Xiang-Hui^{1,2}, WANG Gui-Zhong¹ and LI Shao-Jing¹

(1. College of oceanography and environmental science, state key laboratory of marine environmental science, Xiamen University, Xiamen, 361005; 2. College of life science, Henan Normal University, Xinxiang, 453007)

Abstract: Physiological and biochemical changes of *Scylla serrata* under low temperature condition play an important role in understanding the process of low temperature adaptation. In this study, Superoxi de dismutase (SOD), Catalase (CAT) and Glutathione peroxidase (GPX) activity, malondialdehyde (MDA) content, 4 ATPase (Na^+ , K^+ -ATPase, Mg^{2+} -ATPase, Ca^{2+} -ATPase and Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATPase) activity, as well as fatty acid composition of cell membrane in gill of *S. serrata* under low temperature acclimation, were determined by biochemistry methods. The results showed that, for three acclimation temperatures, the activity of antioxidant enzymes (SOD, CAT and GPX) increased gradually with decrease of acclimation temperature. Compared with the control group (27°C), SOD activity increased significantly at 5°C and 10°C ($p < 0.01$); CAT activity was higher significantly than that at any of acclimation temperature ($p < 0.01$ or $p < 0.05$); GPX activity only increased significantly at 5°C ($p < 0.01$). MDA content increased at low temperature, but increased significantly only at 5°C ($p < 0.01$). 4 ATPase activities in gill also increased gradually with the decrease of the acclimation temperature, and enzyme activity was higher significantly at 5°C and 10°C than that at 27°C. For the content of fatty acids C18:0, C18:1, C18:2, C18:3, C20:5 and C22:6 in gill cell membrane under low temperature acclimation, there was the significant difference ($p < 0.01$ or $p < 0.05$) between the acclimation group and the control. Saturation index $\sum \text{SFA} / \sum \text{UFA}$ in gill under low temperature acclimation significantly decreased ($p < 0.01$, or $p < 0.05$). The increase of enzyme activity under low temperature indicated that there were obvious compensation effects on temperature in gills of *S. serrata*, which were the positive responds to adapt to the low temperature. The increment of MDA was caused by oxidant stress resulted from the accumulation of reactive oxygen species. The decrease of fatty acid saturation index was necessary for gill cell membrane to maintain and perform normal physiological function.

Key words: Antioxidant defenses; ATPase; Fatty acid; Gill; Low temperature acclimation; *Scylla serrata*