

硝酸盐胁迫对红耳龟和中华条颈龟胚胎的毒性效应

傅丽容, 贺 斌, 王娅玲, 史海涛

(海南师范大学 生命科学学院, 海南 海口 571158)

摘 要: 在孵化基质蛭石中添加不同质量浓度的硝酸铵, 在恒温(30±0.5)℃、相对湿度 85%~90%、基质湿度 5%~10% 的条件下孵化龟卵至出壳, 检测红耳龟和中华条颈龟胚胎中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性和丙二醛的变化, 研究环境胁迫对 2 种龟非特异性免疫的影响。试验结果表明, 在胁迫条件下, 红耳龟肝脏过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性显著高于中华条颈龟($P<0.05$), 并随着硝酸铵质量浓度的增大而降低; 红耳龟和中华条颈龟的丙二醛浓度均低于对照组, 且红耳龟肝脏和肌肉的丙二醛浓度均显著小于中华条颈龟($P<0.05$); 不同器官酶活表现不同, 肝脏的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性高于肌肉($P<0.05$), 肌肉易受氧化损伤。各项指标比较表明, 红耳龟各组织器官抗氧化系统功能强于中华条颈龟, 表明红耳龟胚胎发育期对环境胁迫的抗氧化能力、防御能力和机体免疫功能优于中华条颈龟, 有利于胚胎发育和个体生长。

关键词: 红耳龟; 中华条颈龟; 环境胁迫; 硝酸铵; 胚胎发育

中图分类号: Q959.5

文献标识码: A

文章编号: 1003-1111(2012)11-0683-04

环境污染可影响动物免疫, 抗氧化酶活力是评价生物体免疫能力的重要指标^[1-3]。Geret 等^[4]研究表明, 多数有机污染物在动物体内转化过程中, 会产生过量自由基, 导致机体抗氧化酶活性变化和脂质过氧化水平升高, 对机体造成氧化损伤而表现出毒理症状。

胚胎发育是动物生活史中对生态因子最敏感的时期。龟鳖类无护卵行为, 孵化环境直接影响胚胎发育。据研究, 氨氮胁迫会影响动物的生长发育^[5-6]和免疫功能^[7-8]。傅丽容等^[9]研究了硝酸铵影响红耳龟(*Trachemys scripta elegans*)和中华条颈龟(*Mauremys sinensis*)孵化及血液的生理指标, 发现红耳龟可以通过增加血细胞数量和改变红细胞形态提高免疫力对抗硝酸铵胁迫, 显示对环境的适应性强于中华条颈龟。

红耳龟原产于美国中部, 已被列为世界最危险的 100 个外来入侵物种之一(IUCN)^[10]。与当地土著种欧洲池龟(*Emys orbicularis*)的对比试验发现, 红耳龟的竞争力强于土著种^[11-13]。张杰等^[14]在亚硝酸盐暴露对红耳龟与中华条颈龟幼体的慢性毒性研究表明, 亚硝酸盐在动物肠道和肝脏中均有积存, 而红耳龟肝肠中超氧化物歧化酶活性始终高于中华条颈龟, 丙二醛含量始终低于中华条颈龟, 说明红耳龟的适应力和耐受力更强。

研究硝酸盐胁迫对红耳龟和中华条颈龟胚胎

的毒性效应, 旨在为红耳龟生态入侵机制提供生理学依据, 为保护物种多样性奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用中华条颈龟和红耳龟受精卵(已受精 2~3 d, 胚胎发育处第 II 和 III 期), 于 2009 年 3 月 3 日购自海南文昌龟鳖养殖场, 每种龟卵各 60 枚。胚盘明显、发育正常。

1.2 人工孵化

配制 0 mg/L NH_4NO_3 (对照组)、0.01 mg/L NH_4NO_3 (低质量浓度组)、0.1 mg/L NH_4NO_3 (高质量浓度组) 蛭石作为孵化基质, 蛭石粒径 3~7 mm, 在孵化箱底部铺设厚约 5 cm 调配好的蛭石, 每个质量浓度梯度随机放入受精卵 20 枚, 覆盖 2~3 cm 蛭石, 孵化箱放入恒温恒湿培养箱中, 恒温箱温度(30±0.5)℃。在孵化箱蛭石 2 cm 处插入水银温度计, 控制孵化温度。2 种龟卵孵化条件相同。

1.3 指标测定及数据处理

1.3.1 样品采集及测定

孵化出壳 24 h 稚龟, 冰冻麻醉断颈法处死, 剪开腹甲, 取内脏和肌肉。

肝脏和肌肉匀浆液制备: 取适量肝脏和肌肉(约 0.1 g), 分别加入 1 mL 蒸馏水, 冰浴匀浆, 4℃、4000 r/min 离心 15 min, 取上清液备用。超

收稿日期: 2012-02-09; 修回日期: 2012-04-13。

基金项目: 国家自然科学基金国际地区重大合作项目(30910103916); 海南省自然科学基金资助项目(310040)。

作者简介: 傅丽容(1964—), 女, 教授; 研究方向: 动物繁殖生理。E-mail: flr@hainnu.edu.cn。通讯作者: 史海涛(1963—), 男, 教授, 博士; 研究方向: 两栖爬行动物生态学与保护生物学。E-mail: haitao-shi@263.net。

氧化物歧化酶活性测定采用连苯三酚自氧化法^[15]。酶活单位定义:每毫克蛋白每分钟抑制连苯三酚自氧化速率达50%的酶量定义为1个酶活单位(U/mg)。丙二醛含量的测定采用硫代巴比妥(TBA)法^[16],丙二醛的浓度(nmol/mg) = (f/F) × 10/[Pr]。其中:f和F分别为由样液和标准应用液测得的光密度;[Pr]为组织匀浆液中蛋白浓度。组织匀浆液中蛋白浓度的测定参照Bradford方法^[17],以牛血清蛋白(BSA)为标准蛋白。过氧化氢酶活性采用紫外分光光度法测定,以在25℃下,每克蛋白质每秒分解底物H₂O₂的相对量定义为一个酶活力单位(U)。

1.3.2 数据处理

数据用Excel 2003和SPSS16.0处理,所有试验数据均以X±SD表示。同一物种不同硝酸铵处理组与对照组之间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA);相同处理的两物种间用t检验,差异显著临界值为0.05。

2 结果与分析

2.1 硝酸铵胁迫对红耳龟与中华条颈龟肝脏和肌肉中过氧化氢酶活性的影响

两物种肝脏过氧化氢酶活性经t检验,分别为0 mg/L(t=0.072, P=0.792),0.01 mg/L(t=5.073, P=0.042),0.1 mg/L(t=5.949, P=0.030)(表1),据此可知,与对照组过氧化氢酶活性差异不显著,硝酸铵处理组红耳龟显著高于中华条颈龟;采用单因素方差分析得知,硝酸铵处理组过氧化氢酶活性大于对照组,且胁迫质量浓度增高过

氧化氢酶活性减小。采用相同的统计学方法检验肌肉的过氧化氢酶活性,各处理组间差异不显著[0 mg/L(t=4.042, P=0.067),0.01 mg/L(t=10.28, P=0.058),0.1 mg/L(t=0.007, P=0.097)];两物种肌肉的过氧化氢酶活性随着硝酸铵质量浓度的增加均呈递减趋势。比较可知,不同物种对抗环境胁迫的非特异性免疫表现不同。

2.2 硝酸铵胁迫对2种龟肝脏和肌肉超氧化物歧化酶活性的影响

检验红耳龟和中华条颈龟肝脏SOD活性差异显著性(表2),分别为0 mg/L(t=10.712, P=0.058),0.01 mg/L(t=21.85, P=0.044),0.1 mg/L(t=47.99, P=0.040),变化趋势与过氧化氢酶活性相似,对照组差异不显著,胁迫组红耳龟均显著大于中华条颈龟。t检验表明,高质量浓度胁迫组(0.1 mg/L)红耳龟肌肉超氧化物歧化酶活性显著高于中华条颈龟(t=2.403, P=0.038),对照组和低质量浓度组均差异不显著(P>0.05)。稚龟肌肉的超氧化物歧化酶活性均小于对照组,肝脏的超氧化物歧化酶活性均大于肌肉。

2.3 硝酸铵胁迫对2种龟肝脏和肌肉中丙二醛含量的影响

各处理组间红耳龟和中华条颈龟肝脏的丙二醛含量差异不显著(P>0.05)(表3)。与过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性变化趋势相反,两种稚龟肝脏的丙二醛含量为低浓度胁迫组低于高浓度胁迫组,胁迫组均小于对照组。t值检验表明,各处理组两物种肌肉的丙二醛含量差异显著:0 mg/L(t=5.744,

表1 不同质量浓度下硝酸铵胁迫后两种龟肝脏及肌肉中过氧化氢酶的活性

组织	样本	U/mg		
		0 mg/L组	0.01 mg/L组	0.1 mg/L组
肝脏	红耳龟(n=8)	0.023±0.003 ^a	0.045±0.005 ^a	0.037±0.001 ^a
	中华条颈龟(n=10)	0.026±0.002 ^a	0.039±0.003 ^b	0.028±0.002 ^b
肌肉	红耳龟(n=8)	0.008±0.002 ^a	0.005±0.001 ^a	0.004±0.001 ^a
	中华条颈龟(n=10)	0.006±0.000 ^a	0.004±0.000 ^a	0.003±0.001 ^a

注:同一列角标相同字母的为差异不显著,不同为差异显著(P<0.05),表2、表3余同。

表2 硝酸铵胁迫后两种龟肝脏和肌肉中超氧化物歧化酶活性的变化

组织	样本	U/mg		
		0 mg/L组	0.01 mg/L组	0.1 mg/L组
肝脏	红耳龟(n=8)	24.17±3.79 ^a	29.67±5.13 ^a	29.02±5.76 ^a
	中华条颈龟(n=10)	24.28±1.33 ^a	29.05±0.99 ^b	28.08±2.02 ^b
肌肉	红耳龟(n=8)	21.47±3.99 ^a	16.97±3.40 ^a	18.18±3.70 ^a
	中华条颈龟(n=10)	20.45±1.44 ^a	16.28±1.23 ^a	13.91±1.97 ^b

表3 硝酸铵胁迫红耳龟和中华条颈龟肝脏及肌肉中丙二醛含量的变化

组织	样本	nmol/mg		
		0 mg/L组	0.01 mg/L组	0.1 mg/L组
肝脏	红耳龟(n=8)	1.82±0.05 ^a	0.98±0.05 ^a	1.18±0.02 ^a
	中华条颈龟(n=10)	2.78±0.88 ^a	1.83±1.76 ^a	2.57±0.73 ^a
肌肉	红耳龟(n=8)	2.26±0.13 ^a	3.25±0.28 ^a	3.51±0.37 ^a
	中华条颈龟(n=10)	4.55±0.39 ^b	4.57±0.46 ^b	6.81±0.46 ^b

$P=0.052$); 0.01 mg/L ($t=0.838, P=0.054$); 0.1 mg/L ($t=0.328, P=0.047$), 高质量浓度处理组差异尤其明显, 且丙二醛含量均随硝酸铵质量浓度的升高而逐渐增大。综合比较 2 种组织丙二醛含量, 中华条颈龟肝脏和肌肉的丙二醛含量大于红耳龟。

3 讨论

3.1 硝酸铵胁迫对抗氧化酶系统的影响及分析

氧化损伤是环境污染物引起生物毒性的重要机理之一。氧自由基反应是机体正常生理功能的一种反应, 超氧化物歧化酶的主要功能是转化超氧化阴离子为 H_2O_2 和氧, 消除对机体的直接毒害; 过氧化氢酶将超氧化物歧化酶歧化产生的 H_2O_2 进一步还原为 H_2O 和 O_2 , 使细胞免受 H_2O_2 的毒害。2 种酶活性的变化反映机体清除自由基的能力、增强吞噬细胞的防御能力和机体的免疫功能^[19]。肝脏作为动物体蛋白质、脂类等营养物质的代谢中心, 表现尤为明显。刘洋等^[20]报道, 氨氮胁迫泥鳅 (*Oriental weather fish*) 肝脏等脏器超氧化物歧化酶活性随胁迫浓度的升高和胁迫时间的延长逐渐升高, 然后降低。张迎梅等^[21]证明, 泥鳅在重金属胁迫下肝脏超氧化物歧化酶活性随着胁迫浓度增高而变小。本试验研究硝酸铵胁迫 2 种龟肝脏的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性变化结果与之相似, 低质量浓度硝酸铵胁迫对龟类过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性有诱导作用, 机体活性氧自由基增加, 随着胁迫质量浓度的升高, 机体在清除自由基时, 要消耗能量, 使腺嘌呤核苷三磷酸含量减少, 超氧化物歧化酶合成受阻, 其清除自由基的能力下降^[22]。高质量浓度的硝酸铵胁迫可能会使肝脏细胞出现不可逆的逆转而使损伤更加严重, 这与 Stebbing^[23]提出的“毒物兴奋效应”类似。

红耳龟和中华条颈龟抗氧化酶活力存在组织差异性, 肝脏的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性明显高于肌肉, 这可能与不同组织的功能有关。活性氧随物质代谢过程而产生, 因此代谢强度愈大, 产生的活性氧越多。作为运动器官的肌肉, 在孵化期的代谢机能比较低, 因此抗氧化体系的功能相对较弱。虽然 2 种龟肝脏的过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性变化趋势相似, 但红耳龟过氧化氢酶和超氧化物歧化酶活性皆大于中华条颈龟, 表明红耳龟抗氧化力较强, 这从生理学上说明红耳龟具有更强的耐受力 and 适应力。

3.2 硝酸铵胁迫对丙二醛含量变化的影响及分析

丙二醛是脂质过氧化反应的终产物之一, 是评价氧化应激中细胞膜氧化损伤的指标之一^[24]。丙二醛含量可以反映机体脂质过氧化的速度及氧自

由基存在的水平。本试验中, 随着基质中硝酸铵质量浓度的增加, 丙二醛含量升高, 肝脏的超氧化物歧化酶活性减弱, 表明过强的胁迫可损伤非特异性免疫系统, 导致机体的抗氧化能力减弱。试验中不同组织丙二醛含量各异, 肝脏小于肌肉。这可能是肝脏是外源污染物进行生物转化和代谢的主要场所, 抗氧化酶含量十分丰富, 能够及时有效地清除生物转化过程中产生的活性氧, 防止肝组织的氧化损伤。肌肉是机体的运动器官, 某些污染物经生物转化后, 其代谢产物毒性非但不能降低, 而且增强^[3]。对比研究显示, 中华条颈龟肝脏和肌肉中的丙二醛含量均大于红耳龟的, 表明在污染环境中, 中华条颈龟机体自由基长期维持在较高的水平, 氧化损伤严重, 其抗氧化系统功能失调, 酶活性受到抑制, 而表现出对环境胁迫的不适应性, 因此在硝酸铵胁迫的环境中孵化, 中华条颈龟的孵化成活率明显低于红耳龟^[9]。

综合各项指标可知, 红耳龟肝脏的过氧化氢酶、超氧化物歧化酶活性均高于中华条颈龟, 丙二醛含量则低于中华条颈龟, 表明硝酸铵胁迫对红耳龟的损伤较弱, 红耳龟的生存竞争力强于土著种——中华条颈龟, 对环境有更强的适应能力。

参考文献:

- [1] Fridovich I. Superoxide radical and superoxide dismutases [J]. *Annu Rev Biochem Eng*, 1995(64):97-112.
- [2] Pedrajas J R, Peinado J, Lopez-Barea J. Oxidative stress in fish exposed to model xenobiotics. Oxidatively modified forms of Cu, Zn-superoxide dismutase as potential biomarkers [J]. *Chem Biol Interact*, 1996, 98(3):267-282.
- [3] 宋刚, 张迎梅, 朱丽娜, 等. 黄河上游环境污染对花背蟾蜍抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响 [J]. *四川动物*, 2007, 26(2):434-437.
- [4] Geret F, Serafim A, Joao Bebianno M. Antioxidant enzyme activities, metallothioneins and lipid peroxidation as biomarker in *Ruditapes decussates* [J]. *Ecotoxicology*, 2003, 12 (5):417-426.
- [5] Lemarié G, Dosdat A, Covès D, et al. Effect of chronic ammonia exposure on growth of European seabass (*Dicentrarchus labrax*) juveniles [J]. *Aquaculture*, 2004, 229 (1):479-482.
- [6] Schuytema G S, Nebeker A V. Comparative toxicity of ammonium and nitrate compound to Pacific tree frog and African clawed frog tadpoles [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1999, 18 (10):2251-2256.
- [7] Cheng W, Chen S M, Wang F I, et al. Effects of temperature, pH, salinity and ammonia on the phagocytic activity and clearance efficiency of giant freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* to *Lactococcus garvieae* [J].

- Aquaculture, 2003, 219(1):111-115.
- [8] Cheng W, Shao I S, Chen J C. Effect of ammonia on the immune response of Taiwan abalone *Haliotis diversicolor supertexta* and its susceptibility to *Vibrio parahaemolyticus* [J]. Fish & Shellfish Immunol, 2004, 17(3):193-202.
- [9] 傅丽容, 贺斌, 王雪, 等. 硝酸铵影响红耳龟和中华条颈龟孵化及血液生理指标的研究[J]. 四川动物, 2012, 31(2):173-177.
- [10] IUCN 物种生存委员会. IUCN 物种红色名录濒危等级和标准[M]. 瑞士 格朗德: 世界自然保护联盟, 2001.
- [11] Pleguezuelos J M. Las especies introducidas de Anfibiosy Reptiles[G]//Pleguezuelos J M, Marquez R, Lizana M. Atlasy Li-broRojo de los Anfibiosy Reptiles de Espana. Madrid: AHEMMA, 2002: 501-532.
- [12] Cadi A, Joly P. Competition for basking places between the endangered European pond turtle (*Emys orbicularis galloitalica*) and the introduced reared slider (*Trachemys scripta elegans*) [J]. Can J Zool, 2003, 81(8):1392-1398.
- [13] Cadi A, Joly A. Impact of the introduction of the reared slider (*Trachemys scripta elegans*) on survival rates of the European pond turtle (*Emys orbicularis*) [J]. Biodiversity and Conservation, 2004(13):2511-2518.
- [14] 张杰, 洪美玲, 廖广桥, 等. 亚硝酸盐暴露对红耳龟与中华条颈龟幼体的慢性毒性效应[J]. 四川动物, 2011, 30(2):173-177.
- [15] 丁秀云, 李光友, 翟玉梅, 等. 皱纹盘鲍经诱导后血淋巴中一些因子变化的研究[J]. 海洋与湖沼, 1996, 27(4):362-367.
- [16] Buege J A, Aust S D. Microsomal lipid peroxidation [J]. Methods Enzymo, 1978(52):302-310.
- [17] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein-dye binding [J]. Anal Biochem, 1976(2):248-254.
- [18] 洪美玲. 水中亚硝酸盐和氨氮对中华绒螯蟹幼体的毒性效应及维生素 E 的营养调节 [D]. 上海: 华东师范大学, 2007.
- [19] 牟海津, 江晓路, 刘树清, 等. 免疫多糖对栉孔扇贝酸性磷酸酶、碱性磷酸酶和超氧化物歧化酶活性的影响 [J]. 青岛海洋大学学报, 1999, 29(3):463-468.
- [20] 刘洋, 凌去非, 于连洋, 等. 氨氮胁迫对泥鳅不同组织 SOD 和 GSH-PX 活性的影响 [J]. 安徽农业科学, 2011, 39(2):1069-1072.
- [21] 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属胁迫对泥鳅肝脏 ATPase 和 SOD 活性的影响 [J]. 甘肃科学学报, 2008, 20(3):55-59.
- [22] 方允中, 李文杰. 自由基与酶基础理论及其在生物学和医学中的应用 [M]. 北京: 科学出版社, 1994.
- [23] Stebbing A R D. Hormesis—The stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. Sci Tot Vi, 1982, 22(1):213-234.
- [24] Lepage G, Mnuoz G, Champagne J, et al. Preparative steps for the accurate measurement of malondialdehyde by high performance liquid chromatography [J]. Anal Biochem, 1991, 97(2):277-283.

Toxic Effects of Nitrate on Embryonic Development in Turtles *Trachemys scripta elegans* and *Mauremys sinensis*

FU Li-rong, HE Bin, WANG Ya-ling, SHI Hai-tao

(College of Life Sciences, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

Abstract: Toxic effects of concentration of ammonium nitrate into the incubation substance on embryonic development were studied in turtles *Trachemys scripta elegans* and *Mauremys sinensis* by monitoring changes in activities of catalase (CAT), and superoxide dismutase (SOD) and concentration of malonaldehyde (MDA) during embryonic development period under the condition of $(30 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$, relative humidity of 85%~90% and moisture of 5%~10%. The results showed that the activities of CAT and SOD in liver were significantly higher in *T. scripta elegans* than in *M. sinensis* ($P < 0.05$), and lower as the concentrations of ammonium nitrate were increased. The concentrations of MDA in liver and muscles were found to be lower in *T. scripta elegans* and *M. sinensis* than in the control group, significantly lower in *T. scripta elegans* than in *M. sinensis* ($P < 0.05$). The activities of CAT and SOD were higher in liver than in muscles, indicating that muscles were susceptible to oxidative damage. These findings showed that *T. scripta elegans* had higher anti-oxidant function, defense ability and immunologic competence than *M. sinensis* did, which leads to good embryonic development and growth.

Key words: *Trachemys scripta elegans*; *Mauremys sinensis*; environmental stress; ammonium nitrate; embryonic development