

# 镉对蟾蜍的 4 种器官乳酸脱氢酶同工酶的影响\*

董爱华 贾秀英\*\* 马小梅

(杭州师范学院生命科学学院 杭州 310036)

**摘要:**以腹腔注射法对蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)给镉,处理一周后,观察了 4 种镉中毒浓度(0.1、0.2、0.4、0.8 mg/kg)条件下的蟾蜍心、肝、肾和睾丸中乳酸脱氢酶(LDH)同工酶的变化。结果表明:随着镉中毒浓度的升高,心脏 LDH 同工酶的活性明显升高,睾丸 LDH 同工酶的活性明显下降,肝中的 LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 在 0.4、0.8 mg/kg 浓度组酶活性明显增加,而 LDH<sub>4</sub> 则明显减弱,肾中 LDH<sub>1</sub> 的活性随镉浓度的升高而明显升高,其它各酶带活性出现先增强而后又逐渐减弱的现象。结果提示了镉对蟾蜍主要器官 LDH 同工酶的影响具有组织差异性。

**关键词:** 镉;LDH 同工酶;器官;蟾蜍

**中图分类号:** Q494 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2003)06-24-04

## Effects of Cadmium on LDH Isozymes in Four Organs of *Bufo bufo gargarizans*

DONG Ai-Hua JIA Xiu-Ying MA Xiao-Mei

(School of Life Sciences, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, China)

**Abstract:** The activities of LDH isozymes were analyzed in the hearts, livers, kidneys and testes of *Bufo bufo gargarizans* exposed to four different concentrations (0.1, 0.2, 0.4, 0.8 mg/kg) of cadmium (Cd) with polyacrylamide gel electrophoresis. Results: with the rise of the Cd concentrations, the activities of all the LDH isozymes significantly increased in the hearts, while all the LDH isozymes activities significantly decreased in the testes. The activities of LDH<sub>1</sub>, LDH<sub>2</sub>, LDH<sub>3</sub> and LDH<sub>4</sub> increased significantly, but the activities of LDH<sub>4</sub> decreased significantly in livers when Cd concentration as 0.4 to 0.8 mg/kg Cd. The activities of LDH<sub>1</sub> in kidneys increased significantly, while activities of other isozymes increased when 0 to 0.2 mg/kg Cd was used, but decreased gradually when 0.4 to 0.8 mg/kg Cd was used. The results indicate that the effects of Cd on LDH isozymes vary with organs.

**Key words:** Cadmium; LDH isozyme; Organ; *Bufo bufo gargarizans*

近年来,随着工业生产的迅猛发展,污水灌溉、肥料的施用及污泥农用等使环境中的重金属特别是镉的含量越来越高,造成整个生物圈的污染,严重威胁着人类和生物的生存,因此,有关镉与人类健康的关系及其镉的毒性作用机理日益受到重视。镉是一种半衰期很长的有毒

重金属元素,在有机体中有累积作用,具有多器

\* 浙江省自然科学基金资助项目(302056);

\*\* 通讯作者;

第一作者介绍 董爱华,女,讲师;主要从事动物生态毒理方面的研究。

收稿日期:2003-01-30,修回日期:2003-07-20

官和组织毒性,有关镉组织器官损伤的研究正在深入<sup>[1,2]</sup>,而乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)同工酶是反映组织损伤程度的一种有价值的生化指标<sup>[3]</sup>,目前已用于临床一些疾病(如心、肝疾病)的诊断。

据资料显示,两栖类动物作为一种有效的环境标志物,目前环境污染物的排放对两栖类动物的生存造成了很大的影响,对这方面的研究较为广泛。但有关重金属镉对两栖类动物的毒性效应研究尚不多见<sup>[4]</sup>,尤其是镉对两栖类动物同工酶的影响更是少见。作者以常见的蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)为实验对象,就镉对蟾蜍主要组织器官乳酸脱氢酶同工酶的影响进行了研究,以揭示镉对两栖类动物组织器官损伤的有关生化机理,为探讨当前两栖类种群的衰退问题提供一定的参考依据。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物染毒** 健康成年蟾蜍 50 只,平均体重 45~50 g,购自杭州市萧山,随机均分为对照组和染毒组(雌雄各半),每组 10 只。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(按镉计 0.1、0.2、0.4、0.8 mg/kg 体重),对照组注射等量的生理盐水,每天注射 1 次,7 d 后活体解剖取材。

**1.2 电泳样品制备** 活体解剖蟾蜍,取肝、肾、心和精巢,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, pH 8.3, 含

12%蔗糖),用玻璃匀浆器在冰浴中匀浆,12 000 r/min (4℃)离心 10 min,取上清液加入 20  $\mu\text{L}$  0.1% 溴酚兰,保存于冰箱中用于测定乳酸脱氢酶同工酶(LDH)。各处理组各组织的电泳样品数均为 4。

**1.3 电泳和染色** 用 0.37 mol/L Tris-HCl (pH 8.9) 为凝胶缓冲系统,电泳缓冲液为 0.05 mol/L Tris-甘氨酸 (pH 8.3),用前稀释 10 倍。浓缩胶 3%,分离胶 6.5%,每点样孔加样量为 20  $\mu\text{L}$ ,采用北京六一仪器厂生产的 DYY-III 2 型稳压稳流电泳仪进行电泳,稳流 9~15 mA, 8℃电泳 2.5 h 左右,待指示剂移到距凝胶板前 1 cm 处时停止电泳。电泳完毕后,LDH 同工酶显色参照 Clark 法<sup>[5]</sup>, 20 min 显色,显色后的凝胶板用 2% 的醋酸固定保存以待拍照。

## 2 结果

**2.1 镉对蟾蜍心脏 LDH 同工酶的影响** 从图 1 可见,在正常条件下,蟾蜍心脏 LDH 同工酶从正极到负极有 5 条酶带,其中以  $\text{LDH}_3$ 、 $\text{LDH}_4$ 、 $\text{LDH}_5$  酶带活性较强(图 1:A)。镉能明显激活心脏 LDH 同工酶的表达,且随着镉中毒浓度的增高,LDH 各同工酶带活性逐渐升高。在镉浓度为 0.1、0.2 mg/kg 组中,各同工酶带活性略有升高,但与对照组比较变化不明显(图 1:B, C); 0.4、0.8 mg/kg 组中,  $\text{LDH}_1$ 、 $\text{LDH}_2$ 、 $\text{LDH}_3$ 、 $\text{LDH}_4$ 、 $\text{LDH}_5$  酶带活性显著增强,以  $\text{LDH}_2$ 、 $\text{LDH}_3$ 、 $\text{LDH}_4$ 、 $\text{LDH}_5$  酶带活性增强最明显(图 1:D, E)。

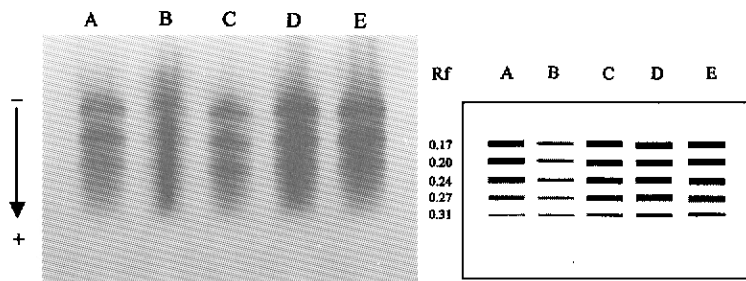


图 1 镉对蟾蜍心脏 LDH 同工酶的影响

A: 对照组; B: 0.1 mg/kg Cd 剂量; C: 0.2 mg/kg Cd; D: 0.4 mg/kg Cd 剂量; E: 0.8 mg/kg Cd 剂量

(下图同)

**2.2 镉对蟾蜍肝脏 LDH 同工酶的影响** 电泳结果表明,在正常条件下,蟾蜍肝脏 LDH 同工酶从正极到负极有 LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub>、LDH<sub>5</sub> 三条酶带,其中以 LDH<sub>5</sub> 酶带活性最强(图 2:A)。随着镉中毒浓度的增高,肝脏 LDH 同工酶带总活性

呈升高的趋势。在镉浓度为 0.1、0.2 mg/kg 组中,酶带活性变化不明显(图 2:B);在 0.4、0.8 mg/kg 组中,LDH<sub>5</sub> 酶带活性显著增强,LDH<sub>4</sub> 酶带活性被减弱,LDH<sub>3</sub> 酶带活性增强,并新增了 LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub> 两条酶带(图 2:D,E)。

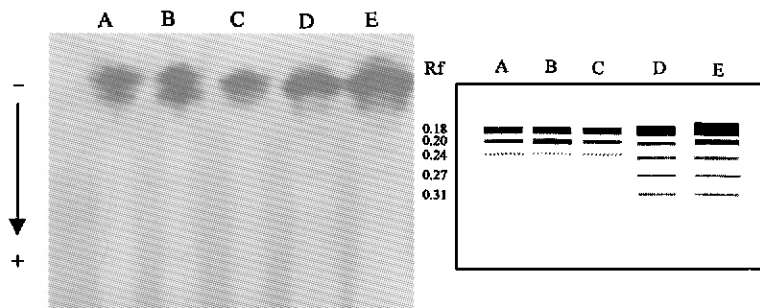


图 2 镉对蟾蜍肝脏 LDH 同工酶的影响

**2.3 镉对蟾蜍肾脏 LDH 同工酶的影响** 电泳结果表明,镉对蟾蜍肾脏 LDH 各同工酶活性的影响不一。LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>5</sub> 酶带活性在各染毒组均随着镉中毒浓度的升高而逐渐增强(图 3:B, C,D,E)。LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 的活性随着镉中毒浓度的升高出现先升高后又逐渐下降的现象(图 3:B, C, D, E)。在 0.1 mg/kg 浓度组中,

LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 的活性略有升高(图 3:B),在 0.2 mg/kg 组中,LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 的活性明显增加(图 3:C),而在 0.4、0.8 mg/kg 组中,LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 的活性又逐渐减弱(图 3:D, E),说明低浓度的镉对肾脏 LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 的活性具有诱导作用,而随着镉浓度的升高酶活性又被抑制。

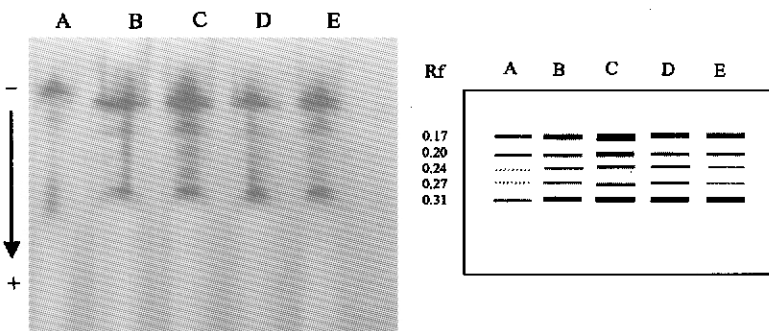


图 3 镉对蟾蜍肾脏 LDH 同工酶的影响

**2.4 镉对蟾蜍精巢 LDH 同工酶的影响** 从图 4 可见,正常情况下蟾蜍精巢 LDH 同工酶从正极到负极有 5 条酶带: LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub>、LDH<sub>5</sub>, 其中, LDH<sub>5</sub> 有 2 条亚带(图 4:A)。随着 Cd 染毒剂量的增加, LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 酶活性逐渐降低,到最高剂量组(0.8 mg/kg)酶活性明显被抑制(图 4:E),而 LDH<sub>2</sub> 在 0.4

mg/kg、0.8 mg/kg 剂量组缺失(图 4:D, E); LDH<sub>5</sub> 酶带在 0.1 mg/kg 浓度组中,酶带活性明显增强(图 4:B),随后又随着镉染毒剂量的升高而逐渐下降,在 0.8 mg/kg 浓度组中,酶带活性被明显抑制(图 4:E)。由此可见,经 Cd 作用后,精巢 LDH 酶活性的下降以 LDH<sub>2</sub> 的变化最明显。

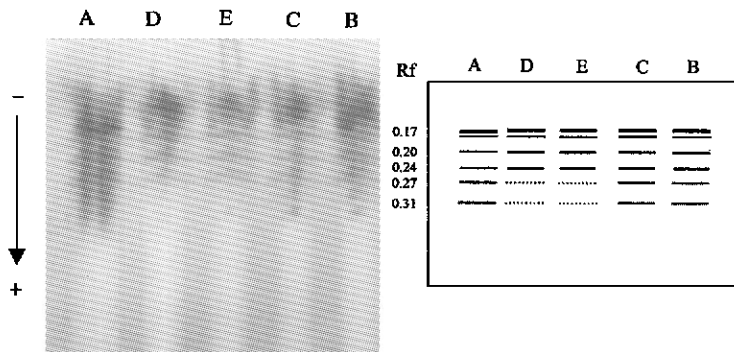


图4 镉对蟾蜍精巢 LDH 同工酶的影响

### 3 讨论

乳酸脱氢酶是一种参与糖代谢的重要酶<sup>[6]</sup>,催化丙酮酸与乳酸之间的转换,酶活性的变化直接影响组织器官通过糖酵解对能量的获得,进而影响组织器官的功能。关于 LDH 同工酶在动物体内的生理功能,一般公认人体心脏、肝脏 LDH 同工酶升高是受损伤的结果<sup>[7]</sup>。研究结果表明,镉对蟾蜍不同组织器官 LDH 同工酶的影响不一。在镉中毒浓度 0~0.8 mg/kg 范围内,心脏中的 LDH 各同工酶活性随着镉浓度的升高而显著升高;肝脏中的 LDH 各同工酶除了 LDH<sub>2</sub> 活性略有减弱外,其它酶活性随镉浓度的增高而升高,肾脏中 LDH<sub>1</sub>、LDH<sub>2</sub>、LDH<sub>3</sub>、LDH<sub>4</sub> 的活性随镉浓度升高呈先上升又逐渐减弱的现象,LDH<sub>5</sub> 活性则随着镉中毒浓度的升高而逐渐增强,精巢中的 LDH 各同工酶活性随镉浓度的升高反而明显下降。对不同组织器官 LDH 同工酶产生不同影响的原因可能是重金属镉对不同器官损伤的方式有差异,因而对 LDH 同工酶 M 和 H 亚基的基因 ldha 和 ldhb 表达的影响不一,导致 LDH 各同工酶活性产生不同的变化。

镉对不同的器官损伤程度不同,比较而言,

镉对肾脏、睾丸、心脏的毒性较大<sup>[2,8]</sup>,实验中镉对蟾蜍各主要器官 LDH 同工酶的影响也有类似的反映。从各器官电泳图谱中可以看出,精巢和肾脏中的 LDH 同工酶在 0.2 mg/kg 时就出现较明显的变化,心脏 LDH 同工酶在 0.4 mg/kg 时出现明显变化,肝脏在 0.8 mg/kg 时出现明显变化。此实验结果表明,可以考虑将 LDH 同工酶作为反映镉引起蟾蜍器官损伤程度的一项生化指标。

### 参考文献

- [1] 吴训伟. 镉对肾脏毒作用的研究近况. 国外医学卫生学分册, 1997, 34(3): 137.
- [2] Domingo J L. A study of cadmium toxicity on mice's tissues. *Toxicol Environ Health*, 1994, 42: 123.
- [3] 袁大伟. 临床实验诊断手册. 长沙: 湖南科技出版社, 1984. 137.
- [4] 潘道一. 除草剂对泽蛙蝌蚪的毒性. 动物学杂志, 1990, 25(1): 32~34.
- [5] Clark J M, Switer R L. *Experimental biochemistry* 2-ed. 1997. 119.
- [6] 吴鹤龄. 遗传学实验方法和技术. 北京: 高等教育出版社, 1985. 147.
- [7] 中山大学生物系生化微生物教研室. 生化技术导论. 北京: 人民教育出版社, 1978.
- [8] 赵春燕. 镉性腺睾丸毒性及其作用机理. 国外医学卫生学分册, 1995, 22(2): 77.