

氨基脲胁迫下刺参的组织学和酶学反应

田秀慧¹, 徐英江¹, 郑伟云², 崔艳梅¹, 姜芳¹, 宫向红¹

(1. 山东省海洋资源与环境研究院, 山东烟台 264006) (2. 烟台大学生命科学学院, 山东烟台 264005)

摘要: 根据急性毒性试验, 推导了氨基脲在刺参中的半数致死浓度值(LC₅₀), 96 h LC₅₀ 为 3.72 g/L(以盐酸氨基脲计), 95%置信区间为 3.43 g/L~4.02 g/L。氨基脲能对刺参呼吸树、肠道和肌肉的组织结构产生一定影响。在 1/5 LC₅₀ 组, 呼吸树病变严重, 肠道组织基本解体, 平滑肌病变紊乱; 在 1/25 LC₅₀ 组和 1/50 LC₅₀ 组, 呼吸树、肠道和肌肉组织均呈现病变缓慢且逐步积累的现象。刺参对氨基脲的毒性作用表现为毒物兴奋效应, 抗氧化酶和神经传导关键酶活性均显示先升高后降低的趋势, 即先诱导后抑制, 1/5 LC₅₀ 组刺参中毒反应最为明显。1/25 LC₅₀ 组超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)及乙酰胆碱酯酶(AChE)酶活性最高, 其次是 1/5 LC₅₀ 组和 1/50 LC₅₀ 组。中浓度 1/25 LC₅₀ 组呼吸树、肠道和肌肉最大 SOD 活性值分别是对照组的 1.78 倍、1.67 倍和 2.50 倍。中浓度 1/25 LC₅₀ 组呼吸树、肠道和肌肉最大 CAT 活性是对照组的 1.87 倍、1.96 倍和 2.04 倍。中浓度 1/25 LC₅₀ 组呼吸树、肠道和肌肉最大 AChE 是对照组的 7.86 倍、6.24 倍和 2.86 倍。最终均趋于对照组水平, 推测可能与刺参免疫疲劳有关。

关键词: 氨基脲; 刺参; 组织学; 酶学反应

文章编号: 1673-9078(2020)01-35-42

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2020.1.006

Semicarbazide Exposure Induces Histological Damage and Enzymatic Reactions in *Apostichopus japonicus*

TIAN Xiu-hui¹, XU Ying-jiang¹, ZHENG Wei-yun², CUI Yan-mei¹, JIANG Fang¹, GONG Xiang-hong¹

(1. Shandong Marine Resource and Environment Research Institute, Yantai 264006, China)

(2. College of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264006, China)

Abstract: According to the acute toxicity test, the median lethal concentration (LC₅₀) of semicarbazide at 96 h was 3.72 g/L in *Apostichopus japonicus* (calculated as semicarbazide hydrochloride), with the 95% confidence interval as 3.43 g/L~4.02 g/L. Semicarbazide had an effect on the structure of the respiratory tree, intestines and muscles of *Apostichopus japonicus*. In the 1/5 LC₅₀ group, respiratory tract lesions were severe and intestinal tissue was disintegrated with disordered smooth muscle lesions. In the 1/25 LC₅₀ and 1/50 LC₅₀ groups, pathological changes in respiratory, intestinal, and muscle tissues were slow but progressive and cumulative. *Apostichopus japonicus* was excitotoxicity upon the exposure to the toxicity of semicarbazide, and the activities of antioxidant enzymes and key enzymes associated with neurotransmission increased first and then decreased, that is, induced first and then inhibited, with the 1/5 LC₅₀ group exhibiting the most obvious symptom of poisoning. The 1/25 LC₅₀ group had the highest activities of superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and acetylcholinesterase (AChE), followed by the 1/5 LC₅₀ group and 1/50 LC₅₀ group. At the medium concentration, the maximum SOD activities of respiratory tree, intestinal and muscle for the 1/25 LC₅₀ group were 1.78 times, 1.67 times and 2.50 times of those for the control group, respectively. The maximum CAT activities of respiratory tree, intestinal and muscle for the 1/25 LC₅₀ group were 1.87 times, 1.96 times and 2.04 times of those for the control group, respectively. The maximum AChE activities of respiratory tree, intestinal and muscle for the 1/25 LC₅₀ group were 7.86 times, 6.24 times and 2.86 times of those for the control group, respectively. In the end, all the enzymatic activities tended to reach the levels similar to those of the control group, which might be related to the immunity and fatigue of *Apostichopus japonicus*.

Key words: semicarbazide; *Apostichopus japonicus*; histological damage; enzymatic reactions

收稿日期: 2019-03-10

基金项目: 中央引导地方科技发展专项 (Z135050009017); 山东省现代农业产业技术体系藻类创新团队加工与质量安全控制岗 (SDAIT-26-05); 山东省农业重大应用技术创新项目 (SF1805301301)

作者简介: 田秀慧(1982-), 女, 博士, 副研究员, 研究方向: 食品质量与安全

通讯作者: 宫向红(1968-), 女, 硕士, 研究员, 研究方向: 食品质量与安全

氨基脲 (Semicarbazide), 又名氨基甲酰肼, CAS 号为 57-56-7, 分子式为 $\text{CH}_5\text{N}_3\text{O}$, 分子量为 75.1, 极易溶于水, 水中溶解度为 100.0 g/L ($20 \text{ }^\circ\text{C}$), 不溶于乙醚及乙醇, 用于制备热敏记录纸上的光色染料, 也是重要的医药、农药等有机合成的中间体, 用于生产呋喃西林、呋喃妥因、肾上腺色胺、氯化泼尼松、氯化可的松等药物, 还可用于测定醛和酮等化合物^[1]。氨基脲在水中形成 $[\text{NH}_2\text{CONHNH}_3]^+$, 其与水溶液中 OH^- 离子不仅能够通过正负电荷间的静电引力结合, 同时还可以通过分子内氢键及分子间氢键结合, 延伸为网状结构, 因此化学结构非常稳定, 如图 1 所示^[2]。

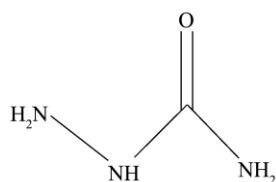


图 1 氨基脲结构式

Fig.1 Structure of Semicarbazide

氨基脲属于致癌化学物联氨中的一种, 国际癌症研究机构在 1987 年将氨基脲归类为“Unclassifiable as to carcinogenicity to humans” (第三组) 中^[3,4]。氨基脲残留会通过食物链传递到人体内, 若长期食用会导致贫血、神经炎、肝坏死等疾病, 也会对眼部甚至 DNA 造成一定损伤^[5,6]。研究表明, 除使用呋喃西林外, 食品加工及处理程序也会给食品中引入氨基脲^[7]。欧盟研究发现, 在婴儿食品和果酱等罐装食品甚至面粉中检出氨基脲, 上述食品均未使用呋喃西林^[8]。由于氨基脲的生物毒性和食物链的传递效应, 氨基脲已成为一种重要的环境和食品的污染物^[9]。

海参是我国重要的经济养殖海珍品, 是水产品中单一经济总量最大的养殖品种, 山东省是我国海参养殖量最大的省份, 占全国的 60% 以上。刺参 (*Apostichopus japonicus*) 是海参的一种, 是 20 多种食用海参中质量最好的, 主要产于山东半岛和辽东半岛。在所检测的水产品中, 刺参中氨基脲的检出率是最高的, 刺参养殖产业曾因氨基脲残留问题遭受了巨大经济损失^[10]。因此本章以刺参为研究生物, 推导了氨基脲对刺参的半数致死浓度 LC_{50} 值, 研究了在 $1/5 \text{ LC}_{50}$ 、 $1/25 \text{ LC}_{50}$ 和 $1/50 \text{ LC}_{50}$ 三个浓度水平下, 氨基脲对刺参呼吸树、肠道和肌肉组织结构的影响。以超氧化物歧化酶 (SOD) 和过氧化氢酶 (CAT) 为参照指标, 研究了氨基脲对刺参不同组织抗氧化能力的影响。鉴于氨基脲具有一定的神经毒性作用, 研究了氨基脲对刺参不同组织乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 药品与试剂

波恩氏液由 75.0 mL 苦味酸饱和溶液、25.0 mL 甲醛溶液 (40%) 和 5.00 mL 冰乙酸混合而成, 现用现配; 苦味酸购自汕头市西陇化工厂; 切片石蜡购自上海市华灵康复器械厂。无水乙醇、二甲苯、甲醛、冰醋酸等为分析纯, 购自国药集团化学试剂有限公司。

1.2 仪器与设备

全自动组织脱水机 (TP1020), 徕卡, 德国; 显微镜 (DM500), 徕卡, 德国; 石蜡包埋机 (Histocentre 2), 珊瑚顿, 英国; 旋转式切片机 (202 型), 上海医疗器械四厂; 全自动染色机 (ST5010), 徕卡, 德国; 展片机 (ZPJ-1), 天津天利航空机电有限公司。超净工作台 (SW-CJ-2FD), 上海苏净实业有限公司; 台式离心机 (Biofuge Strato), Sorvall, 美国; 电子天平 (PL4002), 梅特勒-托利多, 瑞士; 恒温水浴锅 (CHB-100), 杭州博日科技有限公司; 液氮生物容器 (YDS-10), 乐山东亚机电工贸有限公司; 移液枪 (ADJ), Eppendorf, 德国; 酶标仪 (Bio-RAD), 上海美谷分子仪器有限公司; 紫外分光光度计 (TU-1810), 北京普新通用仪器有限公司; 制冰机 (FM40), 上海岩征实验仪器有限公司; 手提式高速分散器匀浆机 (PB100), 苏州华美辰仪器设备有限公司。

1.3 试验设计及采样程序

半数致死浓度试验所用刺参为山东省蓬莱安源水产有限公司人工繁育的刺参, 平均体长 $5.00 \text{ cm} \pm 0.70 \text{ cm}$, 体质量 $12.00 \text{ g} \pm 0.50 \text{ g}$, 选择活性好的刺参于实验室养殖水槽中暂养 3 d, 然后将其分至水盆中, 每盆 3.0 L 海水, 投入 10 个刺参, 水温 $18.0 \text{ }^\circ\text{C} \sim 20.0 \text{ }^\circ\text{C}$, 连续充氧, 海水盐度为 30~32 之间, 日换水一次, 每天换水量为 $1/3 \sim 1/2$, 每个浓度设置 2 个平行。设置 5 个浓度组, 即 0.05 g/L 、 0.50 g/L 、 1.00 g/L 、 2.00 g/L 和 5.00 g/L (以盐酸氨基脲计), 观察 96 h, 1.00 g/L 以下没有死亡, 5.00 g/L 浓度组全部死亡。在预实验中的最高全活浓度和最低全致死浓度之间, 设置 5 个浓度, 最终确定正式试验时氨基脲浓度为 (以盐酸氨基脲计): 2.50 g/L 、 3.00 g/L 、 3.50 g/L 、 4.00 g/L 和 4.50 g/L , 当浓度范围确定后, 此浓度梯度重复 1 次。

氧化应激和神经反应试验用刺参同样为山东省蓬莱安源水产有限公司人工繁育的刺参。选择平均体

长 12.60 cm±0.70 cm, 体重 25.00 g±3.10 g, 活性好的刺参于实验室养殖水槽 (40 L) 中暂养 3 d, 后续试验均在养殖水槽中进行, 水温 16.0 °C~18.0 °C, 盐度为 30~32, 日换水一次, 每天换水量 1/3~1/2, 连续充氧, 试验前 24 h 禁食。采用毒性试验方法, 用氨基脲试液处理刺参, 试验设置三个浓度组, 即高浓度 1/5 LC₅₀、中浓度 1/25 LC₅₀ 和低浓度 1/50 LC₅₀, 每个浓度组设置三个平行, 在试验的第 1 d、2 d、3 d、4 d、7 d、10 d、14 d、21 d 和 28 d 取样。

1.4 样品预处理

将刺参固定、切片, 光学显微镜下观察组织结构变化。具体操作如下: 分别将刺参不同组织直接整体投入 10 倍以上体积的波恩氏液固定 24 h, 后移于 70% 酒精保存备用。固定后的组织全自动脱水机脱水、透明、浸蜡, 包埋机石蜡包埋, 修块后手动切片, 60 °C 烤片, 自动染色机 H-E 染色, 中性树胶封片, 光学显微镜系统观察并拍照^[11]。

测定酶活性的组织样品置于 2.0 mL 冻存管中, 立即放入液氮中保存, 然后放在 -80 °C 冰箱中冷冻保存。取组织 0.20 g, 按照 1:4 (肌肉) 和 1:9 (呼吸树

和消化道) 的比例加入 0.75% 的生理盐水, 手提式高速分散器冰浴匀浆, 并将制备好的匀浆组织液离心 10 min (4 °C, 12000 r/min), 取上清液, 用于测定 SOD、CAT 和 AChE 酶活力。酶活性测定采用南京建成生物工程研究所的试剂盒^[12]。

1.5 数据处理方法

每个时间点的测定值取重复组的平均值, 数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理。

2 结果与讨论

2.1 氨基脲对刺参的急性毒性行为

预实验时低浓度组 (0.05 g/L 和 0.50 g/L) 刺参活动状况、体表表现与对照组基本相似, 附于池壁, 身体拉长, 肉刺尖挺, 体表褐色或绿褐色; 较高浓度组 (1.00 g/L 和 2.00 g/L) 入试液后落于池底, 身体扭动翻滚, 身体及口触手充分拉伸, 表现出焦躁不安症状; 最高浓度组 (5.00 g/L) 身体蜷缩成球, 肉刺变得圆钝, 内脏被吐出, 随时间延长皮肤溃烂, 直至死亡。正式试验死亡率见表 1。

表 1 刺参急性毒性试验死亡率

Table 1 Mortality of each experimental group in *Apostichopus japonicus*

项目	剂量/(g/L)					
	0	2.50	3.00	3.50	4.00	4.50
24 h 死亡率/%	0	0	0	0	0	0
48 h 死亡率/%	0	0	0	0	0	5
72 h 死亡率/%	0	0	0	5.00±5.65	10.00±5.00	20.00±5.00
96 h 死亡率/%	0	5.00±5.65	20.00±5.00	30.00±6.67	50.00±6.00	85.00±7.06

表 2 氨基脲在刺参中概率及置信限度

Table 2 Probability and confidence limit of semicarbazide in *Apostichopus japonicus*

概率	VAR00001 的 95% 置信限度			Log (VAR00001) 95% 置信限度 ^a		
	估计	下限	上限	估计	下限	上限
0.100	2.866	2.369	3.158	0.457	0.374	0.499
0.200	3.135	2.718	3.399	0.496	0.434	0.531
0.300	3.344	2.988	3.601	0.524	0.475	0.556
0.400	3.534	3.223	3.802	0.548	0.508	0.580
0.500	3.721	3.437	4.025	0.570	0.536	0.604
0.600	3.918	3.641	4.291	0.593	0.561	0.632
0.700	4.141	3.847	4.626	0.617	0.585	0.665
0.800	4.417	4.076	5.084	0.645	0.610	0.706
0.900	4.832	4.388	5.832	0.684	0.642	0.765

注: a 表示底数为 10。

数据分析采用 SPSS 17.0 统计软件进行处理, 见表 2。目前计算 LC₅₀ 多采用 Probit 法, 该方法最早由

Bliss 提出, 后经 Finney 改进^[13,14]。LC₅₀ 计算方法是基于质反应的特点设计和推导的。通过数据分析, 发现

氨基脲浓度和刺参死亡率并不呈现明显的直线相关,即死亡率并未随着试验浓度的升高呈现规律性增加,但死亡率与氨基脲浓度的对数值呈现一定直线关系。采用概率单位法,得到 96 h LC₅₀ 为 3.72 g/L (以盐酸氨基脲计),95% 置信区间为 3.44 g/L~4.02 g/L,浓度对数-概率单位直线回归方程为 $y=0.264x+0.438$ (相关系数 R 为 0.9965)。

2.2 氨基脲胁迫对刺参组织形态的影响

2.2.1 氨基脲胁迫对呼吸树组织形态的影响

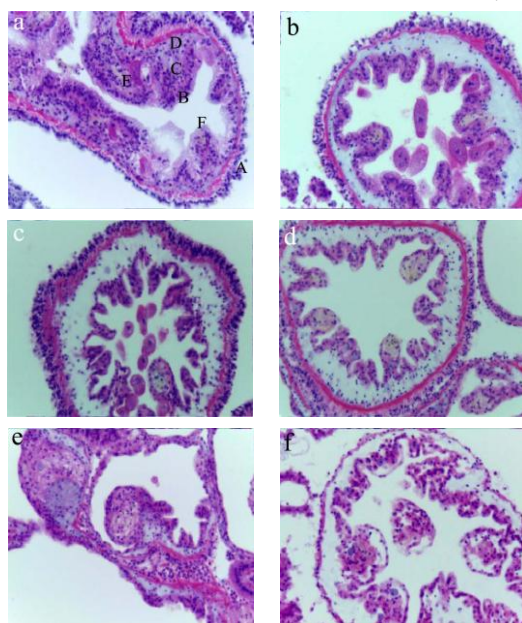


图 2 呼吸树组织学观察

Fig.2 Histological observation of respiratory tree

注: a: 对照组, ×400; b: 1/5 LC₅₀ 组第 4 d, ×400; c: 1/25 LC₅₀ 组第 10 d, ×400; d: 1/25 LC₅₀ 组第 28 d, ×400; e: 1/50 LC₅₀ 组第 14 d, ×400; f: 1/5 LC₅₀ 组第 14 d, ×400; A: 体腔上层; B: 内皮细胞; C: 血管; D: 肌层; E: 细胞分泌物; F: 中央腔。

刺参呼吸树组织学观察见图 2,呼吸树呈树枝状漂浮于体腔中。呼吸树分左右两支,左支比较粗大,延伸到咽部附近,并和上升小肠的背血窦网状结构交织在一起。根部位于排泄腔的上端。呼吸树的细小分枝末端呈小囊状,由数层扁平上皮构成。管壁可分为黏膜层、黏膜下层、肌肉层和上皮层四层。呼吸树除黏膜层表皮细胞外,其余各层结构与肠道相似。对照组上皮细胞排列紧密,肌肉层肌纤维界限清晰,排列紧密;黏膜下层和浆膜层结缔组织胶原纤维排列疏松,条理清晰,中央腔明显(图 2a)。

在氨基脲三个浓度组处理下,1/5 LC₅₀ 组第 4 d 时,呼吸树体腔上层变薄,部分破裂,血管增厚,结缔组织轻微加厚,肌纤维无明显变化(图 2b)。1/25

LC₅₀ 组第 10 d 时,呼吸树血管增厚,内皮细胞变薄,中央腔变小(图 2c),第 28 d 时,肌层纤维依旧无明显变化,内皮细胞空胞化的数量增加,上皮层加厚,细胞分泌物增多(图 2d)。1/50 LC₅₀ 组第 14 d 时,呼吸树肌层纤维未见异常(图 2e),结缔组织加厚程度不变,体腔上皮细胞排列混乱,内皮细胞数量增加,开始明显的空胞化,中央腔无明显变化(图 2f)。

2.2.2 氨基脲胁迫对肠道组织形态的影响

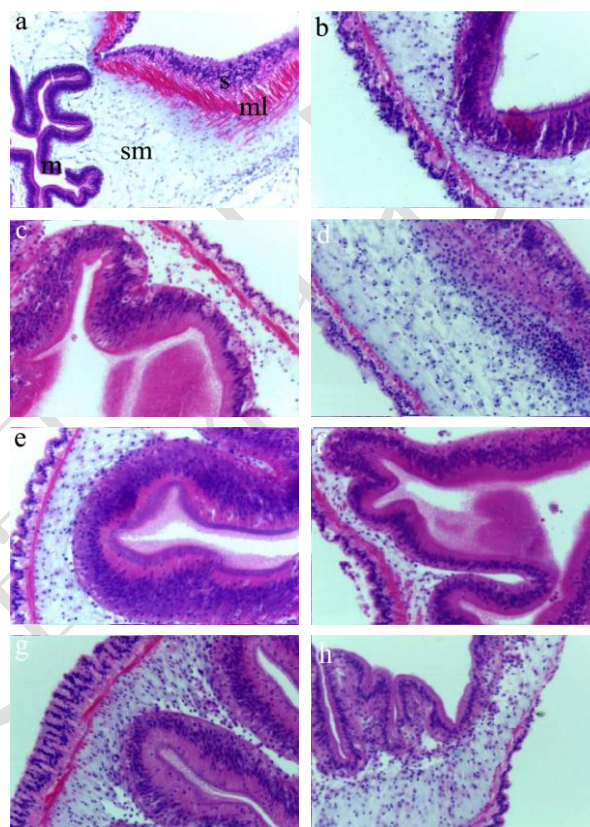


图 3 肠道组织学观察

Fig.3 Histological observation of intestine

注: a: 对照组肠道, ×400; b: 1/5 LC₅₀ 组第 2 d, ×400; c: 1/5 LC₅₀ 组第 14 d, ×400; d: 1/25 LC₅₀ 组第 6 d, ×400; e: 1/25 LC₅₀ 组第 14 d, ×400; f: 1/50 LC₅₀ 组第 6 d, ×400; g: 1/50 LC₅₀ 组第 7 d, ×400; h: 1/50 LC₅₀ 组第 14 d, ×400; s: 浆膜层; ml: 肌层; sm: 内结缔组织层即黏膜下层; m: 肠腔上皮即黏膜层。

刺参肠道组织学观察见图 3,对照组肠壁比较透明,由内向外共分 4 层,分别为黏膜层、黏膜下层,肌肉层和浆膜层。黏膜层为单层或假复层黏膜上皮,由柱状细胞或立方细胞和黏液细胞组成。黏膜下层为疏松的结缔组织组成,肌层分内纵外环两层,外膜由扁平细胞及其下薄层的结缔组织组成,如图 3a。

在氨基脲三个浓度组处理下,1/5 LC₅₀ 组第 2 d,肠道浆膜层结缔组织变薄,部分解体,肌层纤维未见明显扭曲,黏膜下层结缔组织较薄,部分呈空泡状,

间皮细胞轻微肿胀,褶皱仍存在(图3b);第14 d,浆膜层变薄,部分解体,纹状缘呈不规则状,肌纤维部分断裂,黏膜层结缔组织变薄,褶皱不明显,大部分细胞解体(图3c);第28 d肠结构基本解体。1/25 LC₅₀组第6 d,浆膜层结缔组织变薄,上皮细胞肿胀,但未见解体,黏膜层结缔组织变薄,褶皱不明显,未见细胞解体(图3d);第14 d,浆膜层结缔组织变薄或解体,肌层排列紊乱,黏膜层结缔组织变薄,褶皱不明显(图3e)。1/50 LC₅₀组第6 d,黏膜下层结缔组织变薄,部分呈空泡透明状(图3f);第7 d,黏膜层纹状缘肿胀,黏膜下层结缔组织变薄,肌纤维轻微扭曲,部分断裂(图3g);第14 d,部分上皮细胞解体,黏膜下层结缔组织变薄,结缔组织成空泡透明状(图3h)。

2.2.3 氨基脲胁迫对肌肉组织形态的影响

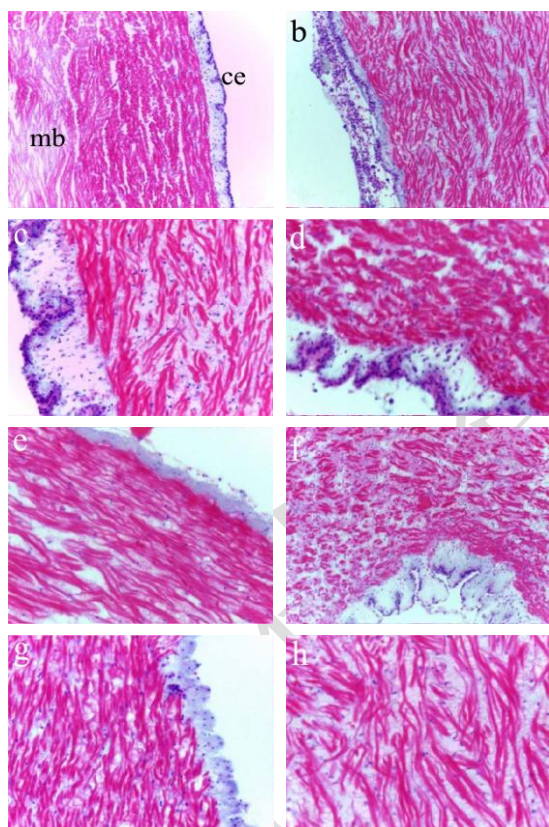


图4 纵肌组织学观察

Fig.4 Histological observation of longitudinalis

注: a: 对照组纵肌, $\times 200$; b: 1/5 LC₅₀组第5 d, $\times 200$; c: 1/5 LC₅₀组第7 d, $\times 200$; d: 1/5 LC₅₀组第14 d, $\times 200$; e: 1/5 LC₅₀组第28 d, $\times 200$; f: 1/25 LC₅₀组第5 d, $\times 200$; g: 1/50 LC₅₀组第7 d, $\times 400$; h: 1/50 LC₅₀组第14 d, $\times 400$; ce: 示体腔上皮; mb: 肌肉束。

刺参纵肌组织学观察见图4,空白组肌肉切片,纵肌最外层上皮细胞排列均匀,边缘较完整,平滑肌细胞排列紧密(图4a)。

在氨基脲三个浓度组处理下,1/5 LC₅₀组第5 d,示体腔上皮细胞排列散乱,出现断裂空斑,平滑肌扭曲变形(图4b);第7 d,肌肉组织切片中示体腔上皮层加厚,平滑肌紊乱程度加剧,出现明显的扭曲,排列趋于无序化(图4c);第14 d,肌肉组织与第7 d相比,未见明显差异(图4d),第28 d,肌肉组织的示体腔上皮细胞层继续变薄(图4e)。1/25 LC₅₀组第5 d,肌肉组织平滑肌开始出现轻微紊乱(图4f)。1/50 LC₅₀组第7 d,肌肉组织平滑肌轻微紊乱,其他与对照组无明显差异(图4g),第14 d,除平滑肌无序化更严重外,未见其他变化(图4h)。

2.3 氨基脲对刺参不同组织的氧化应激反应

2.3.1 氨基脲对刺参不同组织 SOD 活力的影响

图5表示高中低三个不同浓度下氨基脲(1/5 LC₅₀、1/25 LC₅₀和1/50 LC₅₀)对刺参呼吸树、肠道和肌肉SOD活力的影响。总体变化趋势如下:随着时间的延长,刺参各组织中SOD活性均呈现先增加又降低的趋势,10 d时,各组织SOD活性均达到最高。三个浓度组相比,中浓度1/25 LC₅₀组活性最高,其次是高浓度1/5 LC₅₀组,最后是低浓度1/50 LC₅₀组。与对照组相比,1/5 LC₅₀组和1/25 LC₅₀组活性诱导值较大,1/50 LC₅₀组较小,相比对照组略有升高。中浓度1/25 LC₅₀组呼吸树、肠道和肌肉最大SOD活性值分别是对照组的1.78倍、1.67倍和2.50倍,分别诱导了78%、67%和150%。对不同组织来说,在同一取样时间点,SOD活性均呈现呼吸树>肠道>肌肉的变化趋势,呼吸树和肠道SOD酶活力高于肌肉。随着时间延长,最后逐渐与对照组持平,推测可能与刺参免疫疲劳有关。

1/50 LC₅₀组刺参肌肉、呼吸树和肠道中SOD活性与对照组差异不显著($p>0.05$),表明低浓度氨基脲对SOD活性影响不大,但是低浓度水平氨基脲长时间作用,依然可以对刺参产生一定的氧化胁迫,诱导机体产生SOD抗氧化酶。1/25 LC₅₀组刺参呼吸树、肠道和肌肉中SOD活性最高。而最高剂量组即1/5 LC₅₀,SOD活性开始升高,第10 d达到最大值后再降低,但仍高于对照组和低浓度组,低于中浓度组,推测1/5 LC₅₀剂量的氨基脲可能对刺参各组织造成了一定程度的氧化应激损伤,具体表现在第21 d后,1/5 LC₅₀组个别刺参表现出类似中毒现象,部分个体死亡,推测氨基脲被刺参吸收,经过一定时间累积后,对刺参产生毒性作用。

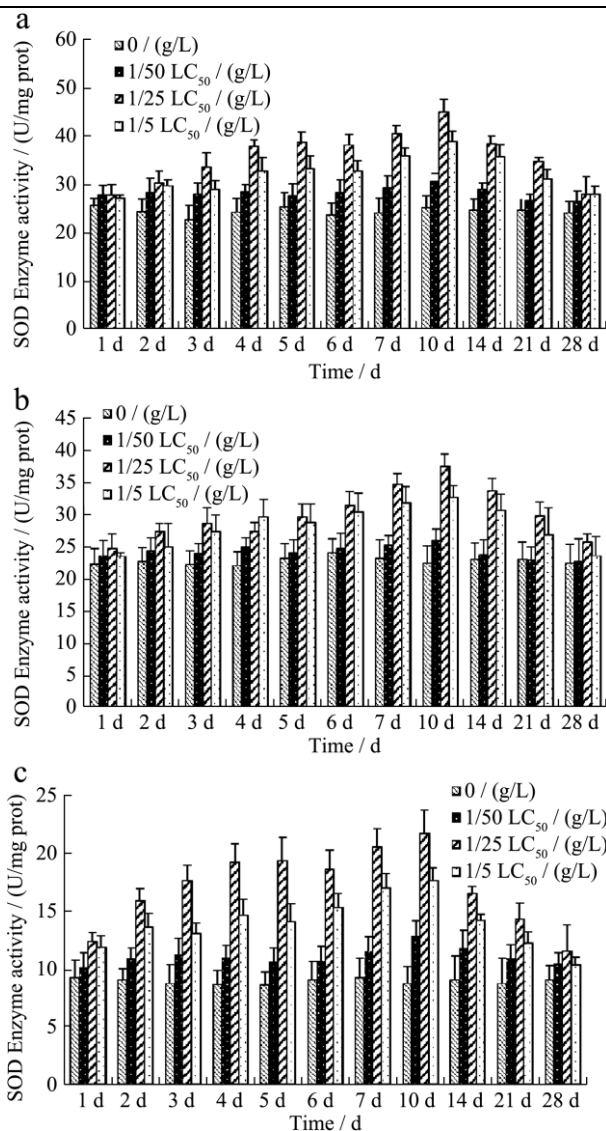


图5 刺参呼吸树、肠道和肌肉 SOD 酶活性

Fig.5 SOD enzyme activity of respiratory tree (a), intestine (b) and muscle(c) in *Apostichopus japonicus*

注: a: 呼吸树; b: 肠道; c: 肌肉。下图同。

2.3.2 氨基脲对刺参不同组织 CAT 活力的影响

图6表示高中低三个不同氨基脲浓度(1/5 LC₅₀、1/25 LC₅₀和1/50 LC₅₀)对刺参呼吸树、肠道和肌肉CAT活性的影响。总体变化趋势如下:随着时间的延长,刺参三种组织中CAT活性均呈现先增加又降低的趋势,7d时,各组织CAT活性均达到最高。中浓度1/25 LC₅₀组活性最高,达到最大诱导,其次是高浓度1/5 LC₅₀组,最后是低浓度1/50 LC₅₀组。中浓度1/25 LC₅₀组呼吸树、肠道和肌肉最大CAT活性是对照组的1.87倍、1.96倍和2.04倍,分别诱导了87%、96%和104%。对于不同组织来说,在同一取样时间点,CAT活性均呈现肠道>呼吸树>肌肉的变化趋势,最高活性在肠道组织中,这一点与SOD酶变化趋势不同。

随着时间延长,最后与对照组持平,推测可能与刺参免疫疲劳有关。

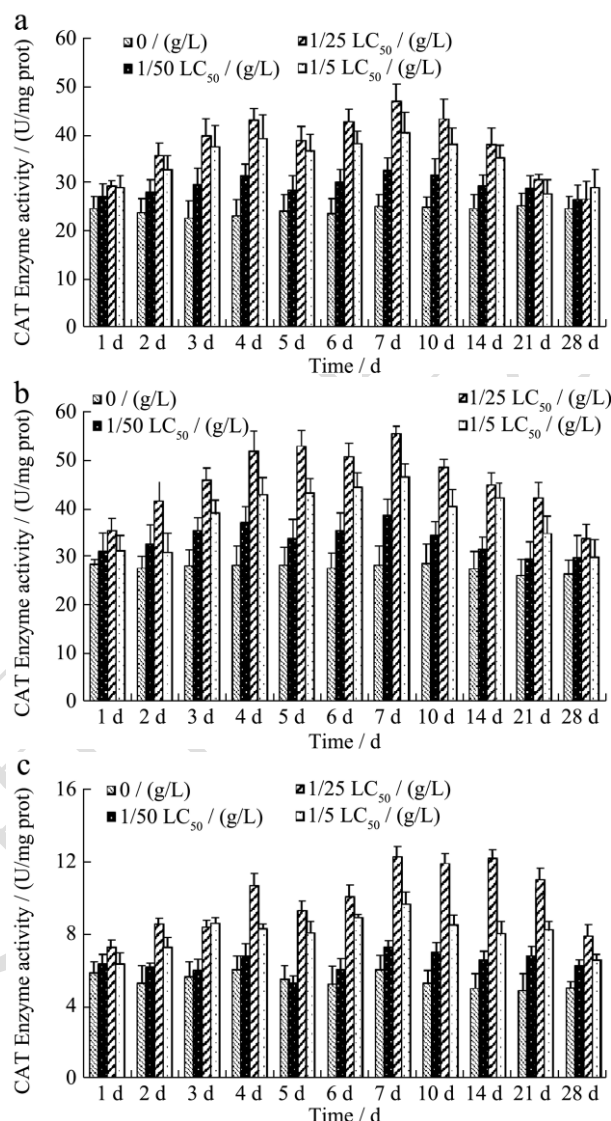


图6 刺参呼吸树、肠道和肌肉 CAT 酶活性

Fig.6 CAT enzyme activity of respiratory tree (a), intestine (b) and muscle (c) in *Apostichopus japonicus*

1/50 LC₅₀组刺参肌肉、呼吸树和肠道中CAT活性与对照组差异不显著($p>0.05$),表明低浓度氨基脲对CAT活性影响不大,但是低浓度水平氨基脲长时间作用依然可以对刺参产生一定的氧化胁迫,诱导机体产生CAT抗氧化酶。最高剂量组1/5 LC₅₀,CAT活性开始升高,第7d达到最大值后再降低,但仍高于对照组和低浓度组,低于中浓度组,推测1/5 LC₅₀剂量的氨基脲可能对刺参各组织造成了一定程度的氧化应激损伤,具体表现在第21d后,1/5 LC₅₀组个别刺参表现出类似中毒现象,甚至有个体死亡,推测原因同SOD一样。

2.4 氨基脲对刺参不同组织的神经反应

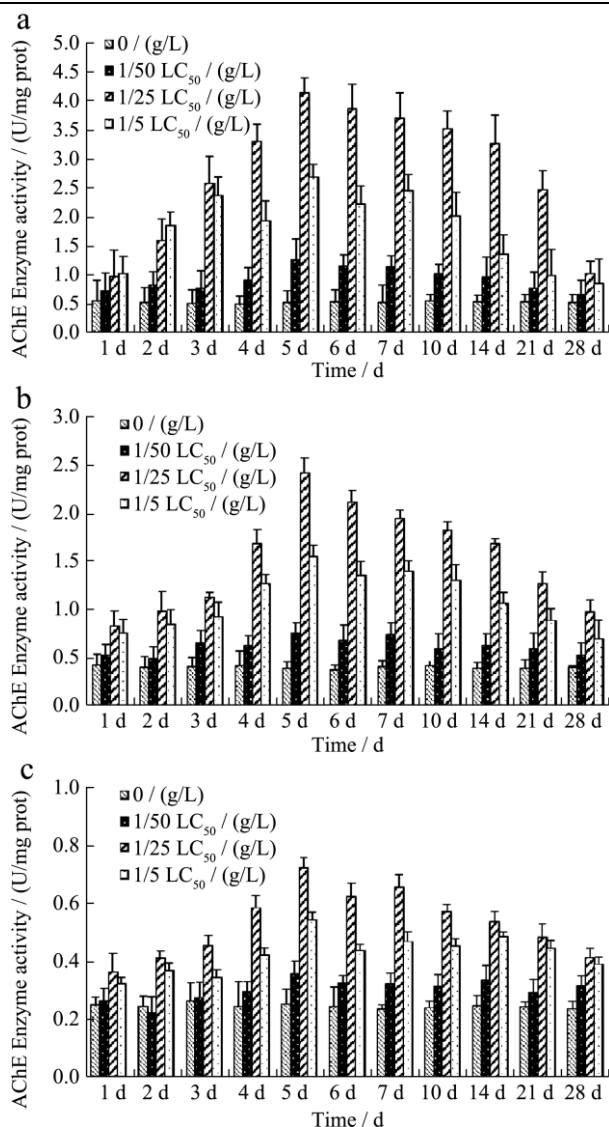


图7 刺参呼吸树、肠道和肌肉AChE酶活性

Fig.7 AChE enzyme activity of respiratory tree (a), intestine (b) and muscle (c) in *Apostichopus japonicus*

图7表示高中低三个不同浓度氨基脲(1/5 LC₅₀、1/25 LC₅₀和1/50 LC₅₀)对刺参呼吸树、肠道和肌肉AChE活性的影响。总体变化趋势如下:随着时间的延长,三种组织中AChE活性均呈现先增加又降低的趋势,5 d时,各组织AChE活性均达到最高。中浓度1/25 LC₅₀组活性最高,其次是高浓度1/5 LC₅₀组,最后是低浓度1/50 LC₅₀组。与对照组相比,1/5 LC₅₀和1/25 LC₅₀组升高幅度较大,1/50 LC₅₀组升高幅度较小,相对对照组略有升高。中浓度1/25 LC₅₀组呼吸树、肠道和肌肉最大AChE是对照组的7.86倍、6.24倍和2.86倍,分别诱导了686%、524%和186%。对不同组织来说,在同一取样点,AChE活性均呈现呼吸树>肠道>肌肉的变化趋势,这一点与抗氧化酶SOD和GSH-Px趋势相同,与CAT不同。随着时间延长,AChE活性逐渐与对照组持平,推测可能与刺参免疫疲劳有

关。

1/50 LC₅₀组刺参呼吸树、肠道和肌肉中AChE活性与对照组差异不显著($p>0.05$),表明低浓度氨基脲对AChE活性影响不大,但低浓度水平氨基脲长时间作用下,依然可以对刺参神经传导产生胁迫,诱导机体产生AChE。最高剂量组1/5 LC₅₀,AChE活性开始升高,第5 d达到最大值后再降低,但仍高于对照组和低浓度组,低于中浓度组,说明1/5 LC₅₀剂量的氨基脲可能对刺参各组织神经传导造成了一定程度的损伤,具体表现在第21 d后,1/5 LC₅₀组个别刺参表现出类似中毒现象,部分个体死亡,推测原因同抗氧化酶一致。

3 结论

3.1 通过急性毒性试验方法,采用概率单位法,得到96 h LC₅₀为3.72 g/L(以盐酸氨基脲计),95%置信区间为3.44 g/L~4.02 g/L。

3.2 氨基脲会对呼吸树、肠道和肌肉的组织结构产生一定影响。在呼吸树组织中,1/5 LC₅₀组病变严重,病变到一定程度会出现平台时期,1/25 LC₅₀组病变缓慢发展,逐步积累未出现停滞现象。在肠道组织中,1/5 LC₅₀组黏膜下层结缔组织变薄,肌肉层细胞排列紊乱,28 d肠道组织基本解体,1/25 LC₅₀组和1/50 LC₅₀组,氨基脲使肠道黏膜下层结缔组织变薄,且毒副作用缓慢,属于逐步积加的过程。在肌肉组织中,1/5 LC₅₀组平滑肌病变紊乱到一定程度后,处于平稳期,示体腔上皮细胞层依次呈现正常、加厚、变薄的不规律变化,1/25 LC₅₀和1/50 LC₅₀组的示体腔细胞无明显变化,平滑肌病变进程缓慢且逐步发展。

3.3 本实验中,氨基脲共胁迫28 d,刺参对氨基脲表现为毒物兴奋效应,随着胁迫时间的延长,SOD、CAT和AChE酶活性表现出先诱导后抑制的变化趋势,最后接近对照组水平。推测酶活性升高是刺参对氨基脲的适应性反应,是一种急性解毒措施;剂量增加或暴露时间延长时,氨基脲会毒害细胞,同时使得酶活性降低,这一现象在1/5 LC₅₀浓度组反应最为明显,在试验后期部分刺参体现中毒症状甚至死亡。活性最高值均在1/25 LC₅₀浓度组,其次是1/5 LC₅₀浓度组和1/50 LC₅₀浓度组,1/50 LC₅₀浓度组与对照组差异不显著。

参考文献

[1] Srinivasan M R, Bhat H L, Narayanan P S. Electrical, thermal and infrared studies on semicarbazide hydrochloride and semicarbazide hydrobromide [J]. Applied Physics A, 1992,

- 54(3): 258-260
- [2] Tian X, Xu Y, Song X, et al. Temporal and spatial distribution of semicarbazide in Western Laizhou bay [J]. Marine Pollution Bulletin, 2016, 112(1-2): 393-398
- [3] Tian X, Xu Y, Gong X, et al. Environmental status and early warning value of the pollutant semicarbazide in Jincheng and Sishili bays, Shandong peninsula, China [J]. Science of the Total Environment, 2017, 576: 868-878
- [4] 徐英江,孙玉增,宋秀凯,等.潮河口邻近海域氨基脒污染现状调查研究[J].海洋与湖沼,2010,41(4):538-542
XU Ying-jiang, SUN Yu-zeng, SONG Xiu-kai, et al. Survey of semicarbazide contamination in coastal waters adjacent to the chaohe river estuary [J]. Oceanologia Et Limnologia Sinica, 2010, 41(4): 538-542
- [5] Toth B. A review of the natural occurrence, synthetic production and use of carcinogenic hydrazines and related chemicals [J]. In Vivo (Athens, Greece), 2000, 14(2): 299-319
- [6] Toth B. Synthetic and naturally occurring hydrazines as possible cancer causative agents [J]. Cancer Research, 1975, 35(12): 3693-3697
- [7] Beatriz de la M C, Anklam E. Semicarbazide: occurrence in food products and state-of-the-art in analytical methods used for its determination [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2005, 382(4): 968-977
- [8] Szilagyi S, Calle M B D L. Semicarbazide in baby food: A European survey [J]. European Food Research and Technology, 2006, 224(1): 141-146
- [9] Gao S, Wang W, Tian H, et al. An emerging water contaminant, semicarbazide, exerts an anti-estrogenic effect in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2014, 93(3): 280-288
- [10] 邢丽红,李兆新,王英姿.呋喃西林在海参体内的代谢消除规律研究[J].中国渔业质量与标准,2012,2(4):44-49
XING Li-hong, LI Zhao-xin, WANG Ying-zi. Metabolism and elimination rules of the metabolite of furazolidone in sea cucumber *apostichopus japonicus* [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2012, 2(4): 44-49
- [11] 宋亮,毕景然,李岩,等.不同盐渍条件下刺参体品质的变化及盐渍动力学研究[J].现代食品科技,2016,10:109-117
SONG Liang, BI Jing-ran, LI Yan, et al. Study on the kinetics during salting process and quality changes of *stichopus japonicus* in different salting conditions [J]. Modern Food Science and Technology, 2016, 10: 109-117
- [12] 李秀梅,徐涛,孙国华,等.外源硒对仿刺参(*Apostichopus japonicus*)重要生理相关酶活性及体内硒含量的影响[J].渔业科学进展,2017,4:157-166
LI Xiu-mei, XU Tao, SUN Guo-hua, et al. Effects of dietary selenium-enriched yeast levels on important physiological enzymes and enrichment of selenium in sea cucumber (*Apostichopus japonicus*) [J]. Progress In Fishery Sciences, 2017, 4: 157-166
- [13] Abu-Elala N M, Attia M M, Abd-Elsalam R M. Chitosan-silver nanocomposites in goldfish aquaria: A new perspective in *Lernaea cyprinacea* control [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2018, 111: 614-622
- [14] Mohammed S I, Vishwakarma K S, Maheshwari V L. Evaluation of larvicidal activity of essential oil from leaves of *Coccinia grandis* against three mosquito species [J]. Journal of Arthropod-Borne Diseases, 2017, 11(2): 226-235

(上接第 268 页)

- [13] Wu Z, Li H, Yang Y, et al. Variation in the components and antioxidant activity of *Citrus medica* L. var. *sarcodactylis* essential oils at different stages of maturity [J]. Industrial Crops and Products, 2013, 46: 311-316
- [14] 段伟丽,刘艳秋,包怡红.艾蒿精油的抑菌活性和稳定性[J].食品与生物技术学报,2015,34(12):1332-1337
DUAN Wei-li, LIU Yan-qiu, BAO Yi-hong, et al. Study on antimicrobial activities and stability of essential oil from *Artemisia argyi* [J]. Food Science and Biotechnology, 2015, 34(12): 1332-1337
- [15] 吴克刚,崔绮嫦,董艳,等.芳香植物精油对食品常见腐败微生物抗菌活性的研究[J].现代食品科技,2017,33(4):120-127
WU Ke-gang, CUI Qi-chang, DONG Yan, et al. Antimicrobial effects of edible plant essential oils on common food spoilage microorganisms [J]. Modern Food Science and Technology, 2017, 33(4): 120-127
- [16] 李芳,王全杰,刘桂林.胶东半岛艾蒿精油化学成分分析及其抗菌活性研究[J].西部皮革,2012,34(2):14-18
LI Fang, WANG Quan-jie, LIU Gui-lin. Study on chemical components and antimicrobial activities of *Artemisia argyllem* oil from Jiaodong peninsula [J]. Westleather, 2012, 34(2): 14-18