

骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍不同组织中 MDA 含量和 SOD 活性的影响及比较

胡艺珂¹, 李斌², 王宇^{1,3}, 邵晨^{1,3*} (1. 浙江师范大学化学与生命科学学院, 浙江金华 321004; 2. 浙江省兰溪市食品药品检验检测中心, 浙江兰溪 321100; 3. 浙江师范大学, 野生动物生物技术与保护利用浙江省重点实验室, 浙江金华 321004)

摘要 [目的]探讨骤冷对虎纹蛙(*Hoplobatrachus chinensis*)和中华大蟾蜍(*Bufo gargarizans*)不同组织中丙二醛(Malonaldehy, MDA)含量和超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)活性的影响。[方法]采用低温恒温培养箱进行冷暴露试验,研究了骤冷 6 h 分别对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏 MDA 含量及 SOD 活性的影响,并比较骤冷 6 h 对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏 MDA 含量及 SOD 活性的影响。[结果]骤冷刺激后虎纹蛙肝脏、肠和肾脏中 MDA 含量不变, SOD 活性均降低。骤冷刺激后中华大蟾蜍肝脏中 MDA 含量不变, 肠和肾脏中 MDA 含量增加; 肝脏中 SOD 活性下降, 肠组织中 SOD 活性增大, 肾脏中 SOD 活性不变。对比骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏中 MDA 含量和 SOD 活性的影响,发现中华大蟾蜍的肝脏、肠和肾脏中 MDA 的相对含量和 SOD 的相对活性均高于虎纹蛙的肝脏、肠和肾脏中 MDA 的相对含量和 SOD 的相对活性。[结论]在遇到骤冷刺激时虎纹蛙的氧化压力和抗氧化能力均低于中华大蟾蜍。

关键词 虎纹蛙; 中华大蟾蜍; 丙二醛; 超氧化物歧化酶
中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 0517 - 6611(2018)14 - 0097 - 03

Effects of Shock Chilling on Malonaldehyhy Content and Superoxide Dismutase Activity in Different Tissues of *Hoplobatrachus chinensis* and *Bufo gargarizans* and Their Comparison

HU Yi-ke¹, LI Bin², WANG Yu^{1,3} et al (1. School of Chemistry and Life Sciences, Zhejiang Normal University, Jinhua, Zhejiang 321004; 2. Lanxi Food and Drug Inspection and Testing Center, Lanxi, Zhejiang 321100; 3. Zhejiang Key Laboratory of Wild Animal Biotechnology and Conservation Utilization, Jinhua, Zhejiang 321004)

Abstract [Objective] To explore the effects of shock chilling on malonaldehyhy (MDA) content and superoxide dismutase (SOD) activity in different tissues of *Hoplobatrachus chinensis* and *Bufo gargarizans*. [Method] Cold exposure experiment was conducted by using low temperature incubators to study the effects of shock chilling 6 h on content of MDA and the activity of SOD in the liver, intestine and kidney of *H. chinensis* and *B. gargarizans*. And the effects of shock chilling in 6 h on the MDA and the activity of SOD in the liver, intestine and kidney between *H. chinensis* and *B. gargarizans* were compared. [Result] After shock chilling, MDA content in the liver, intestine and kidney of *H. chinensis* had no change, and SOD activity decreased. After shock chilling, MDA content in the liver of *B. gargarizans* had no change, but that in the intestine and kidney increased; SOD activity in the liver decreased, SOD activity in the intestine increased, and SOD activity in the kidney of *B. gargarizans* remained unchanged. The effects of shock chilling on MDA content and SOD activity in the liver, intestine and kidney between *H. chinensis* and *B. gargarizans* were compared, it was found that the relative content of MDA and relative activity of SOD in the liver, intestine and kidney of *B. gargarizans* were higher than that in *H. chinensis*. [Conclusion] Under shock chilling, the oxidative stress and antioxidant capacity of *H. chinensis* were lower than those in *B. gargarizans*.

Key words *Hoplobatrachus chinensis*; *Bufo gargarizans*; MDA; SOD

虎纹蛙是我国二级保护动物, 隶属脊索动物门(Chordata)两栖纲(Amphibia)无尾目(Anura)叉舌蛙科(Dicroglossidae)虎纹蛙属(*Hoplobatrachus*)^[1], 野生虎纹蛙由于受到人类过度捕捉^[2]、气候变化^[3]、环境污染^[4]、生境丧失^[5-6]、物种入侵^[7]和疾病感染^[8]等因素的影响, 虎纹蛙种群数量急剧下降。

中华大蟾蜍隶属无尾目(Anura)蟾蜍科(Bufonidae)蟾蜍属(*Bufo*), 在我国广泛分布于华东、华中、东北、华北、西北、西南省份, 可生活在塘边、河岸、沟沿、菜园、草丛或房屋周围等多种环境中, 以蚊子、孑孓、蜗牛、蛞蝓、蝗虫、蝼蛄、土蚕、蛾蝶和金龟子等多种生物为食^[9]。笔者探讨了骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍的影响, 分析了虎纹蛙种群数量下降的可能原因, 旨在为野生虎纹蛙的保护和养殖虎纹蛙的温度条件控制提供理论支持。

1 材料与方法

1.1 试验动物及其驯化

虎纹蛙和中华大蟾蜍均采自浙江

省金华市某养殖场。将虎纹蛙和中华大蟾蜍分别置于水族箱(120 cm × 40 cm × 40 cm)内驯化饲养, 提供充足的水陆环境和遮蔽物, 自然光照, 驯化温度为(24 ± 1)℃, 饲养密度为 15 只/缸, 每日以黄粉虫(*Tenebrio molitor*)活体投食 1 次, 每日定时用经曝气脱氯自来水换水 2 次, 清除死亡个体并记录死亡率, 驯化时间为 7 d。

1.2 骤冷刺激试验 选择 20 只体表无伤、体质量 100 g 左右的健康虎纹蛙, 随机平均分配到 2 个玻璃槽内(30 cm × 20 cm × 15 cm, 保持水深 1 cm), 然后将一个玻璃槽置入低温恒温培养箱(MIR - 253, SANYO, Japan), 箱内温度预降至(12.0 ± 0.5)℃(处理组); 另一个玻璃槽置入低温恒温培养箱, 箱内温度预设置为(24 ± 0.5)℃(对照组)。分别在预设温度下处理 6 h 后, 每组取 6 只蛙用于 MDA 含量和 SOD 活性的测定。中华大蟾蜍处理方法同上。

1.3 样品制备 将经骤冷刺激试验后的蛙从低温恒温箱内取出, 毁髓后迅速于冰上解剖, 分别取肝脏、肠、肾脏, 置于 -20℃冰箱中待测, 每批样品在 7 d 内完成测定。

1.4 MDA 含量和 SOD 活性的测定 虎纹蛙和中华大蟾蜍的肝脏、肠和肾脏组织中脂质过氧化产物 MDA 含量的测定

基金项目 金华市科学技术项目(2015 - 2 - 032)。
作者简介 胡艺珂(1988—), 女, 湖南常德人, 硕士研究生, 研究方向: 动物生态学。* 通讯作者, 教授, 硕士生导师, 从事生态学研究。
收稿日期 2018 - 03 - 14; **修回日期** 2018 - 03 - 22

方法参照试剂盒说明书(南京建成生物技术研究所);虎纹蛙和中华大蟾蜍的肝脏、肠和肾脏组织中 SOD 活性的测定采用氮蓝四唑(NBT)法,参照 Beauchamp 等^[10]的方法。

1.5 数据分析 试验数据使用 SPSS 21.0 统计软件进行统计与分析。相关数据进行 Kolmogorov-Smirnov 正态分布检验,均符合正态分布,进行独立样本 t 检验。试验结果均以平均值 $\pm$ 标准误差表示, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 骤冷刺激对虎纹蛙 MDA 含量和 SOD 活性的影响 骤冷刺激后虎纹蛙肝脏 ($t = 0.042, df = 10, P > 0.05$)、肠 ($t = -0.172, df = 10, P > 0.05$) 和肾脏 ($t = -0.767, df = 10, P > 0.05$) MDA 含量与对照组无明显差异(图 1);肝脏 ($t = -26.18, df = 10, P < 0.01$)、肠 ($t = -5.171, df = 10, P < 0.01$) 和肾脏 ($t = -3.394, df = 10, P < 0.01$) 组织中 SOD 的活性较对照组极显著降低(图 2)。这表明虎纹蛙采用减少耗氧量,降低有氧呼吸强度,抵御骤冷刺激。

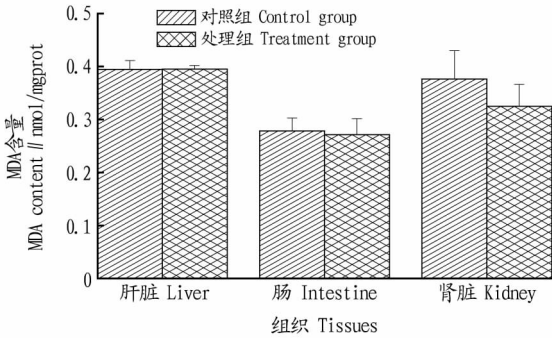
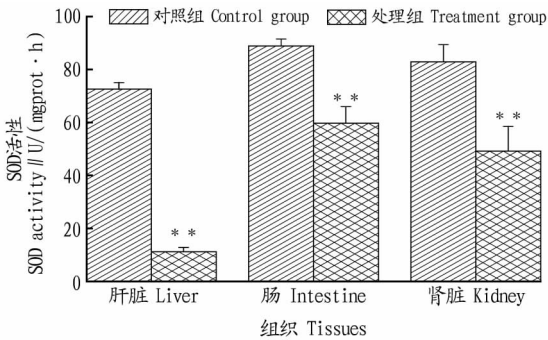


图 1 骤冷对虎纹蛙肝脏、肠和肾脏丙二醛(MDA)含量的影响

Fig.1 The effects of shock chilling on malonaldehyde (MDA) content in the liver, intestine and kidney of *H. chinensis*



注: ** 表示处理组与对照组存在极显著差异 ($P < 0.01$)

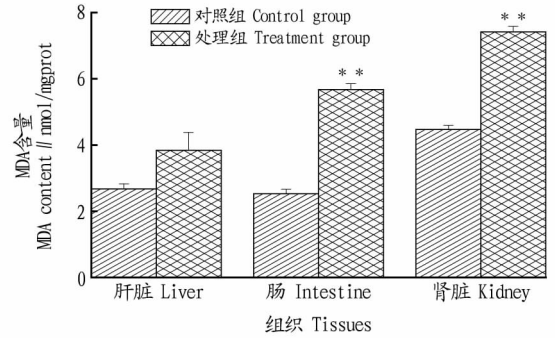
Note: ** indicated highly significant differences between treatment group and control group ($P < 0.01$)

图 2 骤冷对虎纹蛙肝脏、肠和肾脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Fig.2 The effects of shock chilling on superoxide dismutase (SOD) activity in the liver, intestine and kidney of *H. chinensis*

2.2 骤冷刺激对中华大蟾蜍 MDA 含量和 SOD 活性的影响 骤冷刺激后中华大蟾蜍肝脏组织脂质过氧化物 MDA 含

量与对照组无明显差异 ($t = 2.084, df = 5.793, P > 0.05$), 而肠 ($t = 13.868, df = 10, P < 0.01$) 和肾脏 ($t = 14.095, df = 10, P < 0.01$) 组织中 MDA 含量较对照组极显著增加(图 3);肝脏组织中 SOD 的活性较对照组均极显著降低 ($t = -6.235, df = 10, P < 0.01$), 而肠组织中 SOD 活性较对照组极显著增加 ($t = 10.972, df = 6.606, P < 0.01$), 肾脏组织中 SOD 活性基本不变 ($t = -1.904, df = 10, P > 0.05$) (图 4)。这表明中华大蟾蜍主要采用增加耗氧量, 增加有氧呼吸强度抵御骤冷刺激。

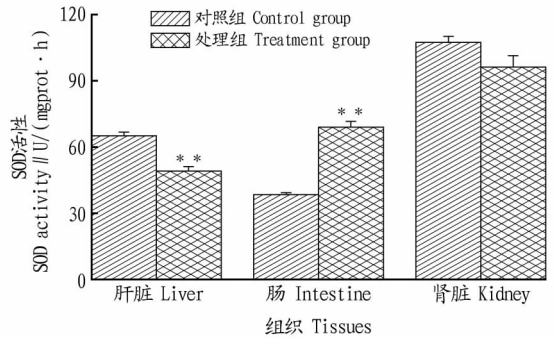


注: ** 表示处理组与对照组存在极显著差异 ($P < 0.01$)

Note: ** indicated highly significant differences between treatment group and control group ($P < 0.01$)

图 3 骤冷对中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏丙二醛(MDA)含量的影响

Fig.3 The effects of shock chilling on malonaldehyde (MDA) content in the liver, intestine and kidney of *B. gargarizans*



注: ** 表示处理组与对照组存在极显著差异 ($P < 0.01$)

Note: ** indicated highly significant differences between treatment group and control group ($P < 0.01$)

图 4 骤冷对中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响

Fig.4 The effects of shock chilling on superoxide dismutase (SOD) activity in the liver, intestine and kidney of *B. gargarizans*

2.3 比较骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏中 MDA 含量和 SOD 活性的影响 将对照组 24 ℃、6 h 和处理组 12 ℃、6 h 处理后同一组织中的 MDA 含量求百分比后, 结果如图 5 所示。从图 5 可知, 中华大蟾蜍的肝脏、肠和肾脏中 MDA 的相对含量均高于虎纹蛙。同样, 将对照组和处理组 6 h 处理后同一组织中的 SOD 活性求百分比, 结果如图 6 所示。从图 6 可知, 中华大蟾蜍的肝脏、肠和肾脏中 SOD 的相对活性均高于虎纹蛙。

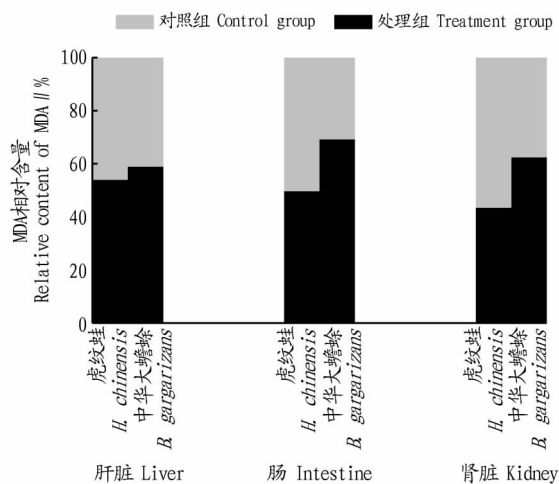


图5 骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏中丙二醛(MDA)含量的影响比较

Fig. 5 Comparison of the effects caused by shock chilling on malonaldehyde (MDA) content in the liver, intestine and kidney between *H. chinensis* and *B. gargarizans*

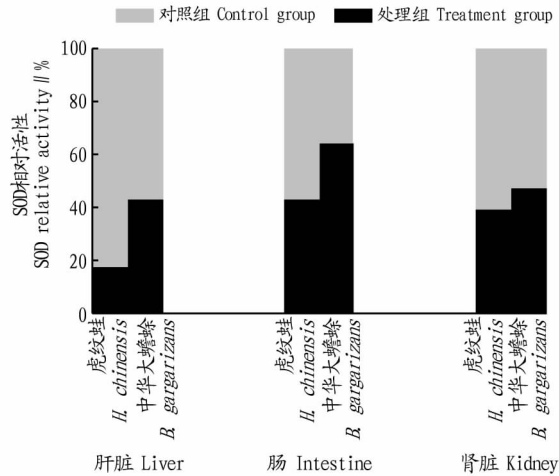


图6 骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏中超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响比较

Fig. 6 Comparison of the effects caused by shock chilling on superoxide dismutase (SOD) activity in the liver, intestine and kidney between *H. chinensis* and *B. gargarizans*

3 讨论与结论

肝脏、肠和肾脏是两栖类重要的内脏器官,在糖原的合成与分解、脂质的吸收与利用以及机体的排毒与解毒等方面有着重要的作用。MDA 是膜脂在机体中过氧化最重要的产物之一,是体现生物体抗氧化能力的常用指标,其含量反映生物体受氧化损伤程度^[11]。SOD 是一种生物酶,催化氧自

由基发生歧化反应,减少氧自由基对机体的伤害,能清除机体在新陈代谢过程中产生的一些有害物质^[12]。MDA 含量高间接反映生物体受自由基攻击的严重程度,而 SOD 活性又间接反映生物体清除氧自由基的能力。同时测量 MDA 含量和 SOD 活性,可分析生物体内氧化压力和抗氧化能力的大小。

该研究结果表明,骤冷刺激后虎纹蛙肝脏、肠和肾脏中 MDA 含量不变,而其 SOD 活性均降低,说明虎纹蛙在遇到骤冷环境时降低呼吸强度,减少体内能量消耗来抵御低温环境。在骤冷刺激对中华大蟾蜍 MDA 含量和 SOD 活性的影响试验中,骤冷刺激后中华大蟾蜍肝脏中 MDA 含量不变,肠和肾脏中 MDA 含量增加,说明肠和肾脏增加代谢强度应对骤冷刺激。肝脏中 SOD 活性下降,肠组织中 SOD 活性增大,肾脏中 SOD 活性不变,说明肝脏组织中氧自由基含量下降,表明肝脏组织中代谢速率减小。肠组织中的氧自由基含量增加,表明肠组织中代谢速率增加。综合比较骤冷对虎纹蛙和中华大蟾蜍肝脏、肠和肾脏中 MDA 含量和 SOD 活性影响,发现中华大蟾蜍的肝脏、肠和肾脏中 MDA 的相对含量和 SOD 的相对活性均高于虎纹蛙的肝脏、肠和肾脏中 MDA 的相对含量和 SOD 的相对活性。这说明在遇到骤冷刺激时,虎纹蛙的氧化压力和抗氧化能力均低于中华大蟾蜍,这可能是野生虎纹蛙野外种群数量减少的原因之一。

参考文献

[1] 田永斌,夏明明,邵晨. 中国虎纹蛙种质资源研究进展[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版),2011,34(4):464-468.

[2] 符史杭. 虎纹蛙在海南的濒危状况及其保护措施[D]. 南京:南京农业大学,2010.

[3] 徐剑,邹佩贞,温彩燕,等. 广东北部亚热带雨林两栖动物物种多样性及其保护[J]. 动物学杂志,2001,36(4):30-33.

[4] 李斌,黄艳,邵晨,等. 铜离子急性胁迫对虎纹蛙肝脏中三羧酸循环及自由代谢的影响[J]. 水生生物学报,2015,39(6):1160-1168.

[5] CUSHMAN S A. Effects of habitat loss and fragmentation on amphibians: A review and prospectus[J]. Biological conservation,2006,128(2):231-240.

[6] 李世森,王宇,邵晨,等. 虎纹蛙(*Hoplobatrachus chinensis*)繁殖后期的生境特征及生境选择[J]. 生态学杂志,2014,33(11):3018-3025.

[7] FISHER R N, SHAFFER H B. The decline of amphibians in California's Great Central Valley[J]. Conservation biology,1996,10(5):1387-1397.

[8] KELLEY J, WALTER L, TROWSDALE J. Comparative genomics of major histocompatibility complexes[J]. Immunogenetics,2005,56(10):683-695.

[9] 王超. 铜对中华大蟾蜍蝌蚪生长发育与抗氧化系统、内分泌系统的影响[D]. 西安:陕西师范大学,2016.

[10] BEAUCHAMP C, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analytical biochemistry, 1971,44(1):276-287.

[11] MITTLER R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance[J]. Trends in plant science,2002,7(9):405-410.

[12] 王好,庄平,章龙珍,等. 盐度对点篮子鱼的存活、生长及抗氧化防御系统的影响[J]. 水产学报,2011,35(1):66-73.

(上接第 89 页)

[4] 黄晶晶,林超文,陈一兵,等. 中国农业面源污染的现状与对策[J]. 安徽农学通报,2006,12(12):47-48.

[5] 朱红波. 我国耕地资源生态安全的特征与影响因素分析[J]. 农业现代化研究,2008,29(2):194-197.

[6] 张艳,于汶加,陈其慎,等. 化肥消费规律及中国化肥矿产需求趋势预

测[J]. 资源科学,2015,37(5):977-987.

[7] 王五一,杨林生,李海蓉. 我国的环境变化与健康风险[J]. 科学对社会的影响,2007(4):22-28.

[8] 杨青林,桑利民,孙吉茹,等. 我国肥料利用现状及提高化肥利用率的方法[J]. 山西农业科学,2011,39(7):690-692.