

氟对家蚕血液及中肠磷酸酶活性的影响

陈志伟, 贾秀英

(杭州师范学院生物系, 浙江 杭州 310036)

摘要:运用人工饲料中定量添加氟化物的方法,探讨了氟对家蚕中肠碱性磷酸酶(AKP)、血液酸性磷酸酶(ACP)活性的影响。结果表明,氟对家蚕中肠 AKP、血液 ACP 的活性有明显的抑制作用,并随着添氟浓度的增加而增强,间隔添氟、停止添氟不能减轻这种抑制作用。添食石灰能减轻氟对中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响。

关键词:家蚕; 氟中毒; 碱性磷酸酶; 酸性磷酸酶

中图分类号:X503. 2 **文献标识码:**A **文章编号:**1000 – 0267(2002)02 –

Effects of Fluoride on Activities of Phosphatase in Hemolymph and Midgut Tissues of Silkworm

CHEN Zhi-wei, JIA Xiu-ying

(Biology Department, Hangzhou Normal College, Hangzhou 310036, P. R. China)

Abstract: Activities of alkaline phosphatase (AKP) in midgut tissue and acid phosphatase (ACP) in hemolymph, respectively, of silkworm (*Bombyx mori*) were evaluated by adding NaF in artificial diets. Excessive ingestion of fluoride could inhibit activities of ACP in the hemolymph and AKP in the midgut tissue, respectively. Oral administration of different dosages of fluoride exhibited different effects on ACP in the hemolymph and that in the midgut tissues of silkworm larvae. After fluoride poisoning silkworm larvae were fed with diets containing no – fluoride, neither the activity of ACP in the hemolymph, nor that of AKP in the midgut tissues could be recovered. Interval oral administration of fluoride to the larvae had not evident attenuation on ACP in the hemolymph and AKP in the midgut tissues of fluoride poisoning silkworm larvae. The oral administration of $\text{Ca}(\text{OH})_2$ to the larvae had evident attenuation on ACP in the hemolymph and AKP in the midgut tissues of fluoride poisoning silkworm larvae, suggesting that Ca^{2+} could relieve partly toxicity fluorine to silkworm.

Keywords: bombyx mori; fluoride poisoning ; AKP; ACP

由于大气氟污染日趋严重而引发的家蚕氟中毒问题已引起政府部门、蚕业专家和环保等专家的高度重视^[1,2]。家蚕吸收的氟主要积累在中肠组织^[3],氟可抑制中肠组织糖的分解代谢^[4],引起血淋巴钙、镁离子含量及中肠(钙,镁) – 三磷酸腺苷酶活性的下降^[5,6],但家蚕氟中毒的机制还不明了。本试验通过人工饲料中定量添加氟化钠的方法,探讨了氟对家蚕中肠碱性磷酸酶、血液酸性磷酸酶活性的影响,以期从一个侧面了解家蚕氟中毒的机制。

1 材料与方法

1.1 试验用蚕及其饲养

供试蚕品种为东肥 × 华合,采用含桑叶粉的人工饲料,按人工饲料清淨育常规方法饲养。采用氟化钠

(NaF)作为向蚕饲料中添加的氟化物。

1.2 氟化物添食方法

连续添氟是给家蚕连续喂饲含氟的有毒饲料;间隔添氟是给家蚕 12 h 吃含 50 mg · kg⁻¹ 氟的有毒饲料,12 h 吃不含氟的无毒饲料,依次轮换;停止添氟是指家蚕第一天吃含 80 mg · kg⁻¹ 氟的有毒饲料,以后停止添氟改食不添氟的无毒饲料。解毒处理是在含 25 mg · kg⁻¹ 氟的有毒饲料中,添加 0.1% 的新鲜石灰粉。以上处理都以不添氟的饲料作为对照。

1.3 酶活性的测定方法

取中肠洗净后,在玻璃匀浆器中匀浆 3 min,2 000 r · min⁻¹,离心 5 min,取上清液稀释 800 倍,供测定 AKP 活性用;取血液稀释至 30 倍,供测定 ACP 活性用;AKP、ACP 活性的测定参照上海医学化验所的方法^[7]。

2 结果

收稿日期: 2001 – 05 – 06

作者简介: 陈志伟(1955—),男,现任杭州师范学院环境科学系副教授。

2.1 连续添氟后中肠 AKP、血液 ACP 活性的变化

5 龄家蚕中肠碱性磷酸酶的活性以龄初较低, 以后逐渐上升, 至 70 h 时达到最高峰, 此后又下降, 但仍维持在一个较高的水平上。当连续添食 $80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟 (氟的形态为 NaF, 下同) 后两天内, 该酶活性下降幅

度不大, 且基本保持对照蚕该酶活性变化的特征, 此后该酶活性就明显低于对照蚕。见图 1。

4 龄家蚕血液 ACP 的活性, 在龄初较低, 此后就维持在一个较高的水平上。当连续添食 $60 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟后, 该酶活性就明显低于对照蚕。见图 1。

图 1 氟对家蚕中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响

Figure 1 Effects of fluoride on activities of AKP in midgut. and ACP in hemolymph of silkworm

2.2 间隔添氟对中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响

图 2 是间隔添氟后中肠 AKP、血液 ACP 活性的变化情况。由图可知, 间隔添氟后中肠 AKP 的活性与连续添氟蚕相比虽互有高低, 但无明显差异, 两者都明显低于对照蚕。间隔添氟后血液 ACP 的活性也同

样明显低于对照蚕, 这说明间隔添氟不能减轻氟对中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响。从蚕体外表中毒症状来看, 间隔添氟与连续添氟也无明显的差别, 都表现出相似的中毒症状。

2.3 停止添氟对中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响

图 2 间隔添氟后中肠 AKP、血液 ACP 活性的变化

Figure 2 Change of AKP in midgut and ACP in hemolymph in interval oral administration of fluoride to the larvae

5 龄家蚕停止添氟后中肠 AKP 的活性变化基本上与连续添氟蚕一样, 都明显低于对照蚕, 无逐渐恢复的趋势。见图 3。4 龄家蚕停止添氟后血液 ACP 的

活性虽也低于对照蚕, 但从第 4 天开始, 该酶活性就明显高于连续添氟蚕, 并一直持续到就眠, 而连续添氟蚕始终不能入眠并陆续死亡。见图 3。

图 3 停止添氟后中肠 AKP、血液 ACP 活性的变化

Figure 3 Change of AKP in midgut and ACP in hemolymph after stopping being fed with non-fluorine diets

2.4 不同浓度氟对家蚕中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响

添食不同浓度氟后家蚕中肠 AKP、血液 ACP 的活性变化如图 4 所示。添食 $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟时,这二种酶的活性与对照蚕一样,无任何异常变化;添食 $8\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $16\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $32\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 、 $70\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以

上氟时,该酶活性就明显低于对照蚕,并随着添氟日数的增加,酶活性也呈现逐渐下降的趋势。此外,从图中还可看出,在同一测定时间内,随着饲料中含氟量的增加,该酶活性下降的幅度也随之增大,但其变化不是与含氟量成正比的。

2.5 石灰的解毒效果

图 4 不同浓度氟对中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响

Figure 4 Effects of different concentrations of fluoride on the activities of AKP in midgut and ACP in hemolymph

在有毒饲料中添加 0.1% 的新鲜石灰粉后喂饲 4 龄家蚕,其中肠 AKP、血液 ACP 的活性变化如图 5 所示。由图可知,解毒蚕这两种酶的活性虽低于对照蚕,

但明显高于连续添氟蚕,说明石灰能减轻氟对这两种酶活性的影响。这可能与石灰中的 Ca^{2+} 能与 F^{-} 结合生成难溶性的 CaF_2 有关。

图 5 钙氟同时添食对中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响

Figure 5 Effects of the activities of AKP in midgut and ACP in hemolymph by oral administration with $\text{Ca}(\text{OH})_2$ and fluoride simultaneously

3 讨论

磷酸酶是一类能分解磷酸酯的水解酶,它与家蚕丝蛋白的合成以及磷酸物质的转移、消化、吸收等有关。磷酸酶根据它们的最适 pH 又可分为 ACP 和 AKP 两种。许多学者在他们的试验中,都肯定了碱性磷酸酶在代谢物的吸收和转运等方面的功能以及与蚕体抗病性有关^[8]。酸性磷酸酶也与家蚕某些重要经济性状(如茧层量)呈中等程度的相关^[9]。因此,探讨氟对磷酸酶活性的影响,有助于了解氟对营养物质消化吸收、转运等过程的影响以及家蚕氟中毒的机制。

3.1 氟对磷酸酶活性的抑制作用

从本试验的结果来看,氟对家蚕中肠 AKP、血液

ACP 的活性有明显的抑制作用,但添氟浓度在 $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下时,无论是蚕体外表还是血液 ACP 及中肠 AKP 的活性都无异常变化,这说明蚕体本身具有一定的耐氟能力。这符合毒理学上公认的原则:即任何化合物到在某一临界剂量以下时,机体可以耐受而不显示受损害症状。

当添食 $8\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的氟时,蚕体外表也与对照一样,不出现任何中毒症状,但中肠 AKP、血液 ACP 的活性已发生异常变化,蚕体重也稍微减轻,这就表明人工饲料中 $8\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的含氟量已稍微超过了蚕体自身所能耐受的能力,因而对蚕体生理生化产生不良影响,但这种不良影响还不致于严重到蚕体表现出明显的中毒症状这种程度,故外表仍与对照蚕一样,无

任何异常变化;

当添食 $16 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟时, 家蚕中肠 AKP、血液 ACP 的活性明显下降, 蚕体重也明显减轻, 但也未出现典型的氟中毒症状, 只是龄期稍为延长而已; 当添食 $32 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氟时, 除中肠 AKP、血液 ACP 的活性发生明显的异常变化外, 还出现“不食、不动、不大、不眠”等明显的中毒症状。因此, 仅仅依据蚕体外表中毒症状及几种数量性状来确定对蚕有害的桑叶临界含氟量是不够全面的, 还需要考虑蚕体生理生化的异常变化。

从本试验的结果来看, 饲料中 $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的含氟量为“无反应”浓度(即不引起机体发生所观察的应的最大浓度, 它的高一档浓度就是阈浓度), $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的含氟量为阈浓度(即引起机体发生某些反应的最小浓度), 若折合成干重计则为 $26.4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ (包括桑叶本底)。这个阈浓度稍低于看法比较一致的春蚕桑叶含氟量应在 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下这个指标。因此认为, 若从蚕体生理生化角度考虑, $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 这个指标还是高了一点。当然, 人工饲料中定量添加 NaF 的试验结果, 不一定能完全反映桑叶自然含氟对蚕产生危害的普遍性规律, 但生产上作为参考还是有一定意义的。

在实际生产当中, 桑叶含氟量往往超过 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 这个浓度, 甚至高达 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以上, 蚕食后并未发生氟中毒现象, 究其原因认为: 一是由于添食的 NaF 对蚕的毒性较大, 而桑叶中的氟化物形态复杂, 并不是所有的氟都能对蚕产生毒害作用; 二是由于氟对蚕体的轻度不良影响, 不易被人们所发觉。实验室的试验表明, 若没有不添氟区作对照, 就根本看不出 $8 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 的含氟量对蚕体产生的不良影响。因此, 一般生产上认为对蚕基本无害的桑叶含氟量, 实际上对蚕已有不良影响, 只是由于这种不良影响很小, 未能造成蚕茧的较大损失, 不易被发觉罢了。

3.2 石灰的解毒效果

含氟饲料中定量添加石灰后, 减轻了氟对家蚕中肠 AKP、血液 ACP 活性的影响, 推测这与石灰中的 Ca^{++} 易与 F^{-} 结合生成 CaF_2 有关。藤井(1972)^[10]曾进行了各种氟化物的添食试验, 证明 AlF_3 、 CaF_2 、 MgF_2 对蚕无害, BaF_2 、 $(\text{NH}_4)_2\text{SiF}_6$ 的半致死浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下, NaF 、 NH_4F 、 Na_2SiF_6 、 KF 、 K_2SiF_6 的半致死浓度为 $15 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下, BaSiF_6 、 $\text{Al}_2(\text{SiF}_6)_3$ 、 CaSiF_6 、 MgSiF_6 的半致死浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 以下, 但没有从

生理生化角度加以阐明。

NaF 和 CaF_2 是二种不同形态的氟化物。 NaF 易溶于水 (25°C 时溶解度为 4.05%), 离解生成的 F^{-} 与 Na^{+} 又极易通过细胞膜被中肠吸收, 故能对蚕产生毒害作用。 CaF_2 难溶于水, 在 25°C 时溶解度仅为 $1.7/10$ 万, 溶度积仅为 2.7×10^{-11} , 故 CaF_2 中的氟不易被中肠吸收而无毒。正是依据这一点, 生产上常用石灰浆浸渍桑叶来减轻氟对蚕的毒害作用。石灰浆浸渍污染桑叶能够减毒的原因有:

(1) 给氟污染叶浸或喷石灰浆, 起到了对附着在桑叶表面的氟化物的洗刷作用, 降低了桑叶含氟量;

(2) 当家蚕食下经石灰浆处理的氟污染叶后, 在消化道内 Ca^{++} 易与 F^{-} 结合生成 CaF_2 。一般认为, 氟被沉淀为难溶性和具有较高化学稳定性的 CaF_2 后, 其毒性已基本解除;

(3) 进入体内的 Ca^{++} 可与蚕体组织中的氟结合, 使氟处于沉淀状态而不能发挥毒性作用;

(4) 进入体内的 Ca^{++} 还可弥补因氟的沉淀作用而引起的 Ca^{++} 的不足, 使各组织器官中的 Ca^{++} 保持一定的适宜浓度, 从而有利于某些生化反应的进行;

(5) 进入体内的 Ca^{++} 还可促进体内积累氟的排出, 这是由于 Ca^{++} 能与叶面、叶内及蚕体内的氟结合生成钙盐随蚕粪排出之故。

参考文献:

- [1] 马德和, 李荣琪. 氟化物对蚕桑的影响试验[J]. 蚕业科学, 1982, **8**(4): 209 - 212.
- [2] 张耀民. 我国大气氟污染对农业环境的影响及其经济损失的估算[J]. 环境科学, 1986, **7**(6): 82 - 86.
- [3] Chen Y Y, Wu Y C. Effects of fluoride on changes of calcium, copper and iron level in the important organs of silkworm larvae (*Bombyx mori*) [J]. *Sericologia*, 1988, **38**(1): 69 - 77.
- [4] 吕顺林, 等. 氟中毒对家蚕幼虫组织糖原分解代谢调节的影响[J]. 蚕业科学, 1994, **20**(2): 110 - 114.
- [5] 林健荣, 等. 氟素对家蚕幼虫血淋巴中酶活性及钙镁离子含量的影响. 蚕业科学, 1994, **20**(2): 115 - 118.
- [6] 臧策春, 等. 氟化物对家蚕幼虫中肠(钙, 镁) - 三磷酸腺苷酶活性的影响[J]. 1993, **19**(3): 156 - 161.
- [7] 上海医学化验所. 临床生化检验[M]. 上海: 上海科学出版社, 1979. 352 - 354.
- [8] 吕鸿声. 昆虫病毒与昆虫病毒病[M]. 北京: 科学出版社, 1982. 215.
- [9] 吴载德, 等. 家蚕遗传育种学[M]. 北京: 科学出版社, 1981. 147.
- [10] 藤井实. 氟化物对蚕的经口毒性[J]. 日本蚕丝学杂志, 1972, **41**(2): 104 - 110.