

# 汞對貢德氏蛙蝌蚪變態的影響

李桂楨 林秋梅 史金燾

## 摘要

本實驗是取貢德氏蛙變態期之蝌蚪，以氯化汞（25, 50, 100 $\mu\text{g}/\ell$ ）處理四天後，測定尾部長度及 cathepsin activity 的變化。經氯化汞處理後，尾顯著地縮短。對照組蝌蚪尾的 cathepsin activity 為 50 O.D. units/mg of protein/min，經氯化汞處理後，尾內 cathepsin activity 均降低。當氯化汞的濃度為 100 $\mu\text{g}/\ell$  時，cathepsin activity 是對照組的 39%。

## 緒言

晚近由於工業發達及各類農藥廣泛使用，使生態系受到嚴重的影響，甚至生物體內也受到污染。如鄭森雄、孫藍天(1)對台灣各地魚塢及淺海養殖場的養殖魚、牡蠣與文蛤等作分析，結果顯示所有的魚、貝類皆含有靈丹類及微量的 DDT 及其代謝物、類似的研究報告亦顯示重金屬污染水體的嚴重性(2)。此外也有報導稱台灣中部地區大肚溪、洋厝溪等河川，由於工業廢水的污染(3)，不但溪中經年不見魚跡，亦使養殖於河口的貝類大量死亡(4)，而在西南地區淺海養殖魚貝類，亦有因朴子溪、北港溪之工業污染，而大量死亡(5)，由於農藥、重金屬及有機毒物不易為生物分解，遂經由食物鏈之關係累積在生物體內，Jan 及 Weiking(6)的雞胚實驗證明鉛、汞會導致腦、肝等器官發育不正常。

Cathepsins 是一種蛋白質水解酶 (proteases)，常見於動物肝、腎等器官細胞的 Lysosome 內。當蝌蚪變態時，尾內細胞 Lysosome 的膜破裂，釋出蛋白質水解酶和其他的水解酶，分解尾部組織，故尾部縮短。在最後殘餘的尾部組織內幾乎只含有水解酶，而後消失(7)。本實驗取貢德氏蛙之蝌蚪，以汞處理後，測定蝌蚪尾部組織中蛋白質水解酶活性的變化。

## 材料及方法

### 一、材料

蝌蚪，是貢德氏蛙 (*Rana güntheri*: Boulenger) 之幼體，來自台北縣樹林鎮山佳石灰坑附近的稻田中。根據 Mathens 氏分期法(8)實驗時之蝌蚪屬於 Stage 30，選取之蝌蚪已有後肢，且將要冒出前肢者。採回之蝌蚪先在實驗室 ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 以池水養一天，逢機取樣分組，每組六隻。

### 二、處理方法

#### A. 汞對蝌蚪尾長變化的影響：

以濃度分別為 25 $\mu\text{g}/\ell$ ，50 $\mu\text{g}/\ell$ ，100 $\mu\text{g}/\ell$  之氯化汞 ( $\text{HgCl}_2$ ) 在室溫下 ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ ) 處理四天，每天更換溶液，觀察並記下尾長。以處理前的尾長平均值減去處理後的尾長平均值即為尾縮短長度。

#### B. 汞對尾部組織 Cathepsin activity 之影響：

實驗共分五組，第一組在飼養之水中不加任何藥品，當對照組。第二組加  $\text{T}_3$  ( $\text{triiodothyronine}$ ,  $3 \times 10^{-7} \text{M}$ )；第三組加  $\text{T}_3$  ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) 及氯化汞 (25 $\mu\text{g}/\ell$ )；第四組加  $\text{T}_3$  ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) 及氯化汞 (50 $\mu\text{g}/\ell$ )；第五組加  $\text{T}_3$  ( $3 \times 10^{-7} \text{M}$ ) 及氯化汞 (100 $\mu\text{g}/\ell$ )。各處理三天後，每組各取二隻，以冰水麻醉後，切尾，稱重，加 3.5 ml

Triton X-100 溶液 (使 lysosome 破裂) 磨勻, 分爲二組: (a) 測定 Cathepsin activity (b) 測定蛋白質的含量。

(a) Cathepsin activity 之測定

根據 Anson 法(9), 取 3 ml 之上述(a)研磨液加以離心 (2000 rpm) 10 分鐘, 各取澄清液 1 ml 放入二支試管, 另取二支試管加入 1 ml Triton X-100, 各試管均放 3.5 ml 血紅素 (hemoglobin, 20 mg/ml), 儘速的將以上各項試管之一置於冰浴中, 並加入 0.5 ml 50% 冷藏的 TCA, 將各項餘下之試管置於 37°C 的水浴中, 30 分鐘後取出置於另一冰浴中, 加入 0.5 ml 50% 冷藏的 TCA, 混合均勻後取出所有試管加以離心 (2000 rpm), 10 分鐘後取上層液倒入已先放入 0.5 ml 6N NaOH 之試管中, 待步驟(b)完成後一起測定蛋白質之含量。

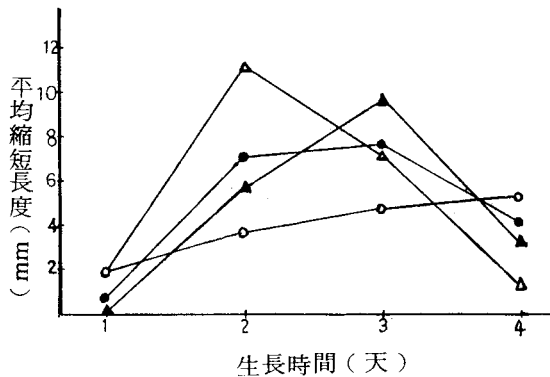
(b) 蛋白質的測定

取 0.5 ml 研磨液加入 4 ml 去離子水, 於冰浴中混勻, 加 0.5 ml 冷的 (5°C) 50% TCA, 攪拌, 離心 (2000 rpm) 10 分鐘後, 取沉澱物, 再加 1.0 ml 1N NaOH, 於 37°C 中攪拌, 10 分鐘後加 4 ml 去離子水研磨之, 並依照 Lowry 等(10)方法進行蛋白質量之測定。

## 結 果

### 一、汞對尾長的影響

如圖一, 對照組尾長縮短的變化是漸進的, 以氯化汞處理後尾長縮短的變化比較顯著, 尤以經過 50  $\mu\text{g}/\ell$  處理者在第二天變化量最大, 其縮短長度約爲對照組的 3 倍, 第三天其縮短長度約爲對照組的 2 倍, 至第四天, 實驗組即不顯著。對照組的蝌蚪在正常的變態過程中, 故其變化量是漸漸而上升



圖一 汞對尾長的影響: 縮短長度爲處理前的尾長減去處理後之平均值。

(○—○) 對照組; (●—●) T<sub>3</sub> (3×10<sup>-7</sup> M) 和 HgCl<sub>2</sub> (100  $\mu\text{g}/\ell$ ); (△—△) T<sub>3</sub> (3×10<sup>-7</sup> M) 和 HgCl<sub>2</sub> (50  $\mu\text{g}/\ell$ ); (▲—▲) T<sub>3</sub> (3×10<sup>-7</sup> M) 和 HgCl<sub>2</sub> (25  $\mu\text{g}/\ell$ )。

表一 汞對蛋白水解酶活性的影響 \*

處理因子	Control	T <sub>3</sub> (3×10 <sup>-7</sup> M)	T <sub>3</sub> (3×10 <sup>-7</sup> M) + HgCl <sub>2</sub> (25 $\mu\text{g}/\ell$ )	T <sub>3</sub> (3×10 <sup>-7</sup> M) + HgCl <sub>2</sub> (50 $\mu\text{g}/\ell$ )	T <sub>3</sub> (3×10 <sup>-7</sup> M) + HgCl <sub>2</sub> (100 $\mu\text{g}/\ell$ )
Total protein in the tail (mg)	7.469	9.919	6.923	6.454	6.146
O.D. Units Cathepsin activity /mg protein/ min	50.070	46.044	27.996	23.622	19.572
Ratio	1	0.92	0.56	0.47	0.39

註: \* 每組取試管二支同時測定, 取平均值。

的，於第四天縮短長度比實驗組大。

## 二、汞對 Cathepsin activity 的影響

如表一所示，對照組和甲狀腺素處理組的 Ca-thepsin activity (O.D. Units cathepsin activity/mg/min) 很相似，但是蝌蚪經過汞處理後，Cathepsin activity 都顯著的降低。濃度愈高，抑制效應愈明顯。當氯化汞之濃度為  $25\mu\text{g}/\ell$  時，其 Cathepsin activity 約為對照組的 0.56 倍，濃度為  $50\mu\text{g}/\ell$  時約為 0.47 倍，而以濃度為  $100\mu\text{g}/\ell$  的影響最巨，約為 0.39 倍。

## 討 論

汞是一般常見的重金屬污染源，不僅對水域中的生物毒害很大，更因食物鏈的關係而威脅到人類的安全。由於各種生物對汞的忍耐力不同，在實驗之前，先測定汞對蝌蚪的半致死 ( $LD_{50}$ ) 濃度，以決定實驗所需的濃度。為了使蝌蚪的生理狀況近於一致，所以各組均以  $T_3$  ( $3 \times 10^{-7} M$ ) 處理。

在尾長的實驗結果中，發現對照組之尾縮短是漸進的。實驗組在第二天、第三天的變化量較大，但是蛋白質水解酶的活性並未增加。換言之，酶的活性反而降低，這可能是尾末端的鰭 (fin) 由於藥物的處理萎縮 (disintegrated)，因尾部肌肉質部分並無顯著的變化。圖一雖顯示尾縮短變快，但不像是由於汞導致蛋白水解酶活性增加的結果。

由表一所示，對照組和甲狀腺素組的蛋白質水解酶活性相近。甲狀腺素可促進變態的發生，及蛋白質水解酶的釋放(1)。但經  $T_3$  處理後，Cathepsin activity 並未增加。可能是蝌蚪在變態晚期時，對甲狀腺素的處理沒有顯著的反應。蝌蚪經甲狀腺素及氯化汞 ( $25, 50, 100\mu\text{g}/\ell$ ) 處理後，則可見汞抑制酶活性的效果。氯化汞的濃度為  $50\mu\text{g}/\ell$  時，Cathepsin activity 降至 47%，且濃度愈高，酶的活性愈低。

在鄭森雄的報告中指出，大肚溪橋以下河段中捕獲之吳郭魚，全魚含汞濃度為  $200\mu\text{g}/\ell$ ，捕獲之蝦其整體含汞濃度為  $500\mu\text{g}/\ell$ (4)。台灣各地養殖魚其肌肉及內臟之平均汞含量均為  $80\mu\text{g}/\ell$ ，牡蠣可食部分平均汞含量為  $30\mu\text{g}/\ell$ (2)。由此可知台灣河川、沿海地區養殖的魚蝦牡蠣等動物，體內均已累積了相當多的汞。本實驗所使用之濃度為 25-

$100\mu\text{g}/\ell$ ，在此種濃度下，蝌蚪變態期間尾部 Cathepsin activity 即受到顯著的抑制，當亦會影響尾之變態以及其他生理現象。

重金屬如汞、鉛等極易與某些酶上的 -SH 基結合而阻礙其功能，亦能與核酸結合，影響其組態 (conformation)。又能與紫質 (porphyrins) 結合而中斷氧化磷酸化作用的途徑(2)。故知汞、鉛對生物的危害，可能是干擾受質與酶的結合，而使許多生理生化反應不能進行。

Seshimo 等人(3)的離體尾培養實驗，顯示 DNase, RNase, Collagenase 等水解酶之受質 (substrates) 容易和其他蛋白質結合，須經 Cathepsin 將受質與其結合之蛋白質水解後，受質才能和以上各水解酶作用。Cathepsin 雖未直接參與組織的水解作用，但如無其存在，蝌蚪尾變態之水解作用則無法進行。故以蝌蚪尾之 Cathepsin activity 受重金屬影響的程度，或可作為水中重金屬污染生物的一種指標。

除了在活體內進行實驗外，用離體尾培養技術(2)也可研究各種因子對蝌蚪變態的影響。此種技術可能較在活體內進行理想，不會因活體本身的代謝、解毒而導致偏差。我們將以這種技術，以其他重金屬處理離體之蝌蚪尾，以觀察其對 Cathepsin 的影響。

## 參考資料

1. 鄭森雄、孫藍天 (1977)，農藥對魚貝類之污染，科學月刊，7(7):28-32。
2. 鄭森雄、黃耀文 (1973)，重金屬對魚貝類之影響，科學月刊，5(6):19-23。
3. 李錦地、郭錦洛、王松賓 (1977)，以底棲大型無脊椎動物及魚類之群落變異指數和指標生物評估台灣河川水質，台灣省水污染防治所研究報告，1:1-17。
4. 鄭森雄 (1976)，台灣中部地區水質及其對魚貝類之影響，農復會，Fisheries Series, 22:3-43。
5. 鄭森雄 (1975)，台灣西南沿海養殖貝類大量死亡原因之研究，農復會，Fisheries Series, 18:47。
6. Jan, C.K. and D.W. King (1966)。

- Effects of methylmercury chloride on alkaline phosphatase activity of the liver and muscle of chick embryos. 生命學刊(台大), 8:2-6。
7. Weber, R. (1957). On the biological function of cathepsin in tail tissues of *Xenopus laevis*, *Experientia* 13:153-155.
  8. Willis W. Mathews. (1976) Atlas of Descriptive Embryology. 2nd ed. Macmillan Publishing CO., Inc. New York.
  9. Anson M. (1956). The estimation of cathepsin with hemoglobin and the partial purification of cathepsin. *J. Gen. Physiol.*, 20:565-574.
  10. Lowry, O.H., N.J. Rosebrough., A.L. Farr, and R.J. Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193:265-275.
  11. Derby, A. (1968). An *in vitro* quantitative analysis of the response of tadpole tissue to thyroxine, *J. Exp. Zool.* 168:147-156.
  12. Tata, J.R. (1969). The action of thyroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol., Suppl.* 2:385.
  13. Seshimo, H., M. Ryuzaki and K. Yoshizato. (1977). Specific inhibition of triiodothyronine-induced tadpole tail-fin regression by cathepsin D-inhibitor pepstatin. *Dev. Biol.* 59:96-100.

#### Abstract

Tadpoles, *Rana güntheri* Boulenger, at metamorphosis were raised in spring water with addition of mercury chloride ( $\text{HgCl}_2$ , 25, 50,  $100\mu\text{g}/\text{l}$ ). Changes of tail length and the cathepsin activity of the tail were measured. The tail became shorter after the treatment of  $\text{HgCl}_2$  for 4 days with comparison of the control. The cathepsin activity of normal tadpole was 50 O.D. units/mg of protein/min. After treatment of  $\text{HgCl}_2$ , the cathepsin activity dropped to substantial degree. The cathepsin activity was 39% of that of the control when tadpoles were raised in spring water with addition of  $\text{HgCl}_2$  ( $100\mu\text{g}/\text{l}$ ) for 4 days.