

行政院國家科學委員會專題計畫研究計畫成果報告

中文題目：烏魚鰓及血小板脂氧合酶的生物功能(三)烏魚鰓及血小板脂氧合酶異構酶與發炎

英文題目：The Biological Effects of Gill and Platelet Lipoygenases in Grey Mullet (3)Role in inflammatory disorder

計畫編號：NSC 88-2313-B-019-013

執行期限：民國 87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日

執行單位：國立台灣海洋大學水產食品科學研究系

主持人：孫寶年

E-mail：bonnie@wfd.ntou.edu.tw

執行人：劉玉茹、陳安嶸

一、中文摘要

在罹病烏魚鰓中 5-脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX) 活性增加，但鰓組織中未檢測出 5-HETE，故探討烏魚受環境緊迫 (stress) 時，5-LOX 活性的變化及作用於花生四烯酸 (arachidonic acid, AA) 後之 5-HPETE 立即代謝為白三烯素 (leukotriene, LT) 之可能性。本年度因烏魚運輸中生理狀況不佳，故改以吳郭魚為試樣，以鎘污染造成吳郭魚之病變，以探討環境緊迫對鰓 LOX 活性及血液特性之影響。在急性鎘中毒試驗中，隨鎘濃度增至 38.2 ppm 及延長曝露時間，吳郭魚紅血球數目、血比容積、血色素濃度及白血球數目均下降，在曝露 19 小時後，降至最低；其鰓 LOX 活性則隨延長鎘曝露時間而上升，在曝露 19 小時後，達到最高。體外試驗中，鎘抑制魚鰓 LOX 活性，但體內試驗中，鎘誘發魚鰓細胞中 LOX 活性，以 5-及 12-LOX 明顯增加，但 15-LOX 則隨延長鎘曝露時間而下降，並有類似 di-HETE 之產物或即為 LTA₄ 產物形成。以化學冷光法偵測 LOX 活性以 0.1 M, Na-borate buffer pH 10.5, luminol 0.1 mM, 及花生四烯酸/亞麻油酸 400 μM 為最適反應條件。

關鍵詞：脂氧合酶、白三烯合成酶、烏魚、吳郭魚、鰓、血液、鎘、發炎、化學冷光法

Abstract

Leukotrienes are biologically active metabolite of arachidonic acid 5-lipoxygenase (LOX). Total LOX activities of diseased cultured grey mullet (*Mugil cephalus*) gill was 5 fold of that of the normal fish, but no 5-HETE was detected in gill tissue of diseased fish. Therefore, it is the objective of this study to confirm that the LOX activities in gill were induced by environmental stress and the metabolite of 5-

LOX, 5-HETE was converted to leukotriene. The adult mullet was under stress during transport action and showed extremely low resistance to additional stress e.g. exposure to cadmium, so *Tilapia zillii* was used as test fish. Blood samples of *Tilapia* exposed to concentrations of cadmium (19.1, 28 and 38.2 ppm) for 14, 19, 38 and 49 hr were analyzed. They showed changes in red blood cell counts (RBC), hematocrit (Hct), hemoglobin (Hgb), white blood cell counts (WBC) decreased apparently during exposure to acute toxicity of cadmium for 19 hr. In-vitro studies, cadmium inhibited the *Tilapia* gill LOX. In-vivo studies, LOX activities of *Tilapia* gill were induced to the highest when the fish were exposed to cadmium for 19 hr, while 5-, and 12-LOX increased in activities and 15-LOX decreased. The di-HETE or leukotriene was detected in both blood and gill tissues of mullet. Using chemiluminescence to measure LOX activity the optimal condition was 0.1 M, Na-borate buffer pH 10.5, luminol 0.1 mM and arachidonic acid/ linoleic acid 400 μM as substrate.

Keywords: lipoxygenase, leukotriene synthase, mullet, tilapia, gill, blood, cadmium, inflammation, chemiluminescence

二、緣由與目的

養殖烏魚中有腹水、鰓蓋出血、鰓絲成粉紅色等發炎病變及致死現象發生，病變者鰓之 LOX 活性高於常態者 (Chiou *et al.*, 1997)。若確定魚鰓 LOX 活性隨環境緊迫而增高，則可作為魚體內生理變化之指標，提早預防養殖魚的大量死亡。

5-LOX 作用於游離花生四烯酸，形成 5-hydroperoxy eicosatetraenoic acid (5-HPETE)，再經白三烯 (LT) 合成酶 (Leukotriene synthase) 形成 LTA₄。

(Samulesson, 1983), 之後分別作用成為 LTB₃, LTC₄, LTD₄ 及 LTE₄ 等代謝物質, 會造成動物組織平滑肌收縮、氣管縮小及黏液增加, 與發炎、疼痛等現象有關 (Henderson, 1994)。15-LOX 亦參與 leukotrienes 及 lipoxins 之合成, 與哺乳動物之過敏與發炎現象有關 (Serhan, 1994), 12-LOX 與 lipoxins 之合成有關 (Serhan, 1994)。目前 LOX 已廣泛被認為與發炎、過敏反應有關 (Samulesson *et al.*, 1987; Samelsson, 1991; Gronert *et al.*, 1995; Macchia *et al.*, 1995; Chavis *et al.*, 1998)。

魚鰓中發現有 LOX 的活性, 罹病烏魚的鰓中 5-LOX 活性為常態烏魚的 1.5 倍, 但鰓組織中未檢測出 5-HETE, 可測得 12-及 15-HETE 含量增加, 顯示 5-HETE 已迅速代謝成其他產物 (Chiou *et al.*, 1997)。本研究以 5-LOX 抑制劑對吳郭魚鰓 5-LOX 與 LTA₄ 合成酶活性之影響, 探討此二酵素是否為同一種蛋白質。在白血鼠嗜鹼細胞 (RBL-1) 中分離出之單一蛋白質具有此兩種酵素活性 (Hogaboom *et al.*, 1986; Maycock *et al.*, 1989)。

由罹病烏魚鰓 LOX 活性高於常態者 (Chiou *et al.*, 1997), 推測當魚類受到環境緊迫因子 (stress), 包括溫度、鹽度、受傷及重金屬污染等, 其體內 LOX 活性會增加。因此本研究以重金屬鎘作為環境緊迫因子, 探討鎘污染對吳郭魚鰓 LOX 活性、及 HETE 和 LTs 等代謝產物形成, 以及血液參數值包括紅血球數目 (RBC)、血比容積 (Hct)、白血球數目 (WBC) 與血色素濃度 (Hgb) 的影響, 並探討以更靈敏的化學冷光法檢測 LOX 活性的最適反應條件, 以更精確得偵測微量的 LOX 產物。

由於近年烏魚產量銳減, 成魚購買不易且運輸過程造成烏魚生理狀況不佳, 所以採用吳郭魚為實驗魚種, 因其對環境適應力與疾病的抵抗力強, 若在吳郭魚中可觀察緊迫因子造成 LOX 及生理變化之差異, 應當可推論至其他魚種。

三、結果與討論

1、化學冷光法檢測 LOX 活性之最適條件

化學冷光法分析 LOX 活性, 是一更為迅速、方便且靈敏度高的分析方法 (Lilius and Laakso, 1982)。利用 luminol 為發光劑, 與 LOX 催化多元不飽和脂肪酸產生的氫過氧化物反應後, 於波長 425 nm 激發出冷光, 其強度代表 LOX 催化之產物量 (Kondo *et al.*, 1994), luminol 濃度以 0.1 mM 為佳。影響偵測之因子包括緩衝液濃度、pH 及脂肪酸濃度等。修飾 Lilius and Laakso (1982) 之方法, 得冷光強度隨 Na-broate buffer 濃度增加而上升 (表

一), 但因 Na-broate buffer 濃度在 0.2 M 時, 易有結晶產生, 且冷光強度與 0.1 M 時差異不大, 故選用 0.1 M Na-broate buffer。以 Luminol 偵測過氧化物於 pH 9.0~10.5 冷光反應較高, 在鹼性環境下 luminol 易解離成激發態的 phthalate amino group 與過氧化物作用, 放出冷光。相同蛋白質含量的 LOX 與基質濃度, Na-broate buffer 以 pH 10.5 時, 冷光強度達最高 (圖一), 在 pH 11 的緩衝液中易有結晶物質產生, 干擾偵測, 故選用 0.1 M Na-broate buffer, pH 10.5。亞麻油酸濃度為 400 μM 時, 經黃豆 LOX (type I) 作用後, 產生之冷光為最強 (表二)。

II、In-Vitro 試驗中鎘對吳郭魚鰓 LOX 活性之影響

吳郭魚鰓 LOX 先分別與 0.08~0.8 mM 鎘溶液於 25°C 作用 5 分鐘後, 再加入花生四烯酸作用, 以氧氣的消耗速率代表 LOX 活性, 隨鎘的濃度增加而下降, 在鎘濃度為 0.08 mM 時, 魚鰓 LOX 活性明顯下降, 約抑制 42 % LOX 活性 (圖二)。以冷光分析法偵測亦得類似的結果, 在鎘濃度 0.08 mM 時, 抑制 87 % LOX 活性, 但高於 0.08 mM 時, LOX 活性被鎘抑制的比例未呈明顯差異, 反應 1 min 和 5 min 之間趨勢相同, 差異不大 (圖三), 但均顯示出 LOX 蛋白質與鎘直接結合, 因產生交互作用, 而失活。

In-vitro 試驗中, 鎘對吳郭魚鰓 LOX 活性有抑制的效果, 可能是因為鎘能與具有 SH 基的蛋白質結合。鱒魚鰓 12-LOX 活性受硫氫基特異試劑抑制, 顯示 LOX 活性部位可能含有硫氫基 (Hsieh *et al.*, 1988), 鎘在 in vitro 中, 直接與酵素之 SH 基作用, 即會抑制 LOX 活性。

III、In-Vivo 試驗中鎘對吳郭魚鰓 LOX 活性之影響

吳郭魚蓄養於含 28 ppm (0.14 mM) 鎘之水族缸中, 經 0~49 小時後取樣, 以氧電極法 (圖四) 和 HPLC 法分析 (圖五), 魚鰓 LOX 活性隨著曝露於鎘時間的增加, 先升後降, 但仍均高於未受鎘污染之控制組 (0 hr), 於曝露 19 小時後, LOX 活性達到最高。

In-vivo 試驗中, 吳郭魚曝露於含鎘的水中, 其鰓 LOX 之活性增加, 與 in-vitro 試驗的結果相反, 顯示活體中, 鎘污染使細胞中 LOX 活性被誘發。水中鎘離子經由吳郭魚鰓及體表氣細胞 (chloride cell) 進入體內 (Lee *et al.*, 1996), 造成肝、腎臟及鰓內鎘蓄積量增加 (Rowe and Massaro, 1974; Smith *et al.*, 1976; Hilmy *et al.*, 1985; Palace *et al.*, 1993), 而魚體中主要解毒之功能在肝、腎臟與鰓中進行, 肝中維生素 C 之蓄積量隨鎘蓄積量而顯著下降

(Thomas *et al.*, 1982), 鱒魚蓄養於含鎘 0~4 ppb 水中 181 天, 以缺乏維生素 C 的飼料投餵後, 肝臟中鎘蓄積量明顯上升 (Palace *et al.*, 1993)。細胞或組織培養的老鼠肝臟, 其脂質氧化程度會隨鎘濃度 (50~400 μM) 上升而增加 (Stacey *et al.*, 1980), 在魚體中亦可能有相同之現象。抗氧化酵素 superoxide dismutase (SOD) 活性會隨鎘濃度增加而上升, Catalase 活性隨鎘濃度增加而下降 (Palace and Klaverkamp, 1993; Palace *et al.*, 1993), SOD 可以去除 superoxide anion (O_2^-), 產生過氧化氫 (H_2O_2), 需要再經 Catalase 作用去除過氧化物 (Palace and Klaverkamp, 1993)。體內脂質氧化作用進行時隨著抗氧化酵素活性的上升, 代謝過多的過氧化物, 但 Catalase 酵素活性被抑制, 影響過氧化物的去除, 導致細胞因過氧化物而受傷害或壞死 (Palace *et al.*, 1993), 顯示鎘污染會使細胞中的氧化與抗氧化酵素改變活性而抑制酵素活性。

吳郭魚曝露於鎘環境中過久, 細胞內 LOX 被誘發造成體內脂質氧化持續產生過氧化物, 但脂氧合酶會因過多的過氧化物而失活, 即自殺性 (suicidal) 不活化, 如老鼠嗜鹼性白血球 12-LOX 活性受後期產物 13 (s)-HPOD 抑制 (Van der Donk *et al.*, 1991); 豬的腹膜嗜中性白血球 5-LOX 活性也會受其產物 5-HPETE 的抑制 (Aharony *et al.*, 1987), 故吳郭魚曝露於鎘 19~49 小時, 以氧電極法 (圖四) 及 HPLC 法 (圖五) 測魚鰓 LOX 活性有下降的趨勢, 但仍高於控制組。

IV、魚鰓脂氧合酶異構酶種類受鎘之影響

吳郭魚鰓 LOX 與花生四烯酸在 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0、25°C 反應 30 分鐘後, 經 diazomethane 甲酯化及固相層析萃取管吸附與分離後, 其逆向高效液層析圖中, 有明顯波峰出現, 經與 5-、12-及 15-HETE 標準品比對後, 發現吳郭魚鰓中有 5-、12-及 15-HETE, 以 12-HETE 為主 (Chuang *et al.*, 1999), 5-及 12-LOX 活性隨曝露於鎘時間延長而增加, 在曝露 19 小時達到最高, 5-LOX 活性升高約 23 倍, 12-LOX 則為 17 倍, 在 19~49 小時, 5-及 12-LOX 活性因酵素液中已經產生的過氧化物抑制而活性下降, 但 15-LOX 活性則隨曝露於鎘時間延長而活性下降 4 倍 (圖六)。

在鎘曝露 19 小時內, 5-LOX 活性增加, 以刺激白三烯素等物質的生成, 12-LOX 活性也被誘發而上升 (圖六), 其具有白血球趨化性及增加細胞的移動性 (Spector *et al.*, 1988), 15-LOX 活性下降 (圖六), 可能是因為 15-及 5-LOX 同時作用之產物 Lipoxins 具有調控、降低白血球的趨化性及因白三烯素所引起的發炎

反應, 但在動物體進行發炎、免疫反應初期需要大量白血球移動至受傷部位, 此時 Lipoxins 的生成量需受到控制, 所以 15-LOX 活性被抑制。

此外烏魚血液組織, 及自 Hydroxyapatite (HPT) 部份純化之烏魚鰓酵素液, 與基質花生四烯酸作用後, 二者 HPLC 分析圖譜中 (圖七), 皆有一 HETE 活性峰, 其滯留時間推測應為 di-HETE, 即 LTA_4 相關產物, 已訂購標準品, 尚待確認, 在鱒魚鰓組織中, 亦發現有 di-HETE 及 LTA_4 相關產物 di-HETE, 即 LTA_4 (Kinght *et al.*, 1995)。

V、鎘對吳郭魚血液之影響

罹病吳郭魚曝露於鎘 12 小時後, 隨鎘濃度增至 38.2 ppm (吳郭魚之鎘 96 小時半致死濃度為 38.2 ppm) (余, 1988), 紅血球數目、血比容積、血色素濃度及白血球數目有下降的趨勢。常態或罹病吳郭魚暴露於 38.2 ppm 鎘濃度中 12 小時後, 其血液值皆下降, 以罹病魚的血液值有明顯降低的趨勢 (表三), 顯示吳郭魚的血液值與體重、體長等因素無直接關係, 主要與罹病及環境中重金屬污染之程度與曝露於其中的時間有關, 罹病對吳郭魚而言是一種緊迫, 鎘的污染則是會再加重其緊迫作用, 所測得的血液數值變化較常態吳郭魚受鎘的影響較顯著。

常態吳郭魚經蓄養鎘濃度 28 ppm (0.14 mM) 水中, WBC (圖八)、RBC、Hct 及 Hgb (圖九) 值, 隨曝露時間延長而下降, 在 19 小時降至最低。吳郭魚曝露鎘 19 小時內, 紅血球數目減少, 可能因鎘和構成細胞膜完整性有關的膜蛋白質結合, 造成紅血球細胞膜不完整 (Benesch and Benesch, 1954), 脂質氧化作用持續進行, 造成細胞膜流動性的改變, 紅血球細胞膜易脆及破裂 (Larsson, 1975; Gill and pant, 1985; Houston *et al.*, 1993), 故導致紅血球數量下降, 因此有時魚鰓顏色會變淡; 相對的 Hct 值也會因為紅血球佔全血中的比率減低而下降, 且鎘會大量破壞紅血球和破壞腸黏膜, 降低腸對鐵離子的吸收或直接與運鐵蛋白的 SH 基結合 (黃, 1994; 余等, 1993; Singhal *et al.*, 1976), 造成鐵離子的吸收降低及抑制血色素生成所需的 Delta-aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) 的活性, 使合成的血色素濃度減少 (Johansson-Sjoberck and Larsson, 1978; Heath, 1995), 導致貧血現象。在 19 至 49 小時, 紅血球增加的現象, 推測是由於紅血球被破壞, 產生氧不足現象, 刺激魚體本身大量製造紅血球來增加氧氣的吸收。

在 19 小時內, 白血球數量下降是因為鎘造成魚體內部份器官 (肝、腎臟) 的病變, 大量白血球進入病變部位作用, 所

以血液中白血球數下降，吳郭魚曝露於鎘環境中，血液內嗜中性白血球及淋巴球數目會隨濃度增加而下降 (Ghazaly, 1991)。19 小時後隨著鎘處理時間增加而上升，是因病變造成魚體的發炎或其他反應，白血球增生需一段時間，所以在 19 小時後，白血球數量有增加的趨勢，不過仍比控制組為低。

四、計畫成果自評

1. 確定以化學冷光法偵測脂氧合酶或氫過氧化物之最適條件，其靈敏度較高，可偵測較低活性的 LOX 或氫過氧化物總產量。
2. 確定重金屬鎘污染時，會造成吳郭魚鰓 LOX 活性上升，其中以 5-LOX 上升最大。
3. 血液中紅血球數目、血比容積、血色素濃度及白血球數目會下降，且皆以初期 19 小時內變化最明顯，故魚類血液值應可作為初期觀測魚隻是否受環境緊迫所影響。
4. 目前以購買標準品，欲鑑定之前所觀察到之 di-HETE 是否為 LTA_4 相關產物，及進行利用 5-LOX 抑制劑來觀測吳郭魚鰓 5-LOX 和 LTA_4 合成酶是否為同一種蛋白質。

五、參考文獻：

- 余樹偉、顧洋、王志偉、吳先琪、蔡美月、柯慶松、蔡文珊，1993。毒性化學物質管理手冊 鎘及其化合物。行政院環境保護署。
- 余廷基、張湧泉，1988。重金屬及農藥對吳郭魚、鯉魚及牡蠣之半致死濃度。台灣省水產試驗所試驗報告。44：187-193。
- 黃琪瑛，1994。水產動物疾病學。280-281。
- Aharony, D., G. D. Redkar-Brown, S.J. Hubbs and R.L. Stein. 1987. Kinetic studies on the inactivation of 5-lipoxygenase by 5(s)-hydroperoxyeicosatetraenoic acid *Prostaglandins*, 33:85-100.
- Chavis, C., I. Vachier, J. Bousquent, P. Godard and P. Chanez. 1998. *Biochem. Pharmacol.*, 56:535-541.
- Chiou, H.M., A.J. Chen and B.S. Pan. 1997. The characteristics of lipoxygenase in diseased cultured grey mullet (*Mugil cephalus*) gill. *Pacific Fisheries Technologists Conference*. Astoria Oregon, USA. April. 20-23, 1997.
- Chuang, W.L., B.S. Pan and J.S. Tsai. 1999. Inhibition of lipoxygenase and blood thinning effects of mackerel protein hydrolysate. *J. Food Biochem.*, unpublished data.
- Ghazaly, K.S. 1991. Hematological and physiological responses to sublethal concentrations of cadmium in a freshwater teleost, *Tilapia zillii*. *Water, Air, and Soil Pollution*, 64:551-559.
- Gill T.S. and J.C. Pant. 1985. Erythrocytic and leukocytic responses to cadmium poisoning in a freshwater fish, *Puntius conchonius* Ham. *Environ. Res.*, 36:327-337
- Gronert, K., S.M. Virk and C.A. Herman. 1995. Endogenous sulfidopeptide leukotriene synthesis and 12-lipoxygenase activity in bullfrog (*Rana catesbeiana*) erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1255:311-319.
- Heath, A.G. 1995. Water pollution and Fish physiology. Lewis Publishers. New York. pp. 67-78.
- Henderson, W.R. 1994. The role of leukotrienes in inflammation. *Annals of Internal Medicine*. 21:684-697.
- Hilmy A.M., M.B. Shabana and A. Y. Daabees. 1985. Bioaccumulation of cadmium: Toxicity in *Mugil cephalus*. *Comp. Biochem. Physiol.* 81:139-143.
- Hogaboom, G.K., M. Cook, V.A. Newton, R.G.L. Shorr, H.M. Sarau and S.T. Cooke. 1986. Purification, characterization and structure properties of a single protein from rat basophilic leukocenia (RBL-1) cells processing 5-lipoxygenase and leukotriene A_4 synthetase activities. *Mol. Pharmacol.*, 30:510-519.
- Houston, A., S. Blahut, A. Munad and P. Amitluarj. 1993. Changes in erythron organization during prolonged cadmium exposure: An indicator of heavy metal stress? *Can. J. Fish. Aquat. Sci.* 50:217-222.
- Hsieh, R.J., J.B. German and J.E. Kinsella. 1988. Lipoxygenase in fish tissue: Some properties of the 12-lipoxygenase from trout gill. *J. Agric. Food Chem.*, 36:680-685.
- Johansson-Sjoberg, M.L. and A. Laroson. 1978. The effect of cadmium on the hematology and on the activity of δ -aminolevulinic acid dehydratase (ALA-D) in the blood and hemopoietic tissues of the flounder, *Pleuronectes flesus* L.. *Environ. Res.*, 17:191-204.
- Knight, J., J.H. Holland, L.A. Bowden, K. Halliday and A.F. Rowley. 1995. Eicosanoid generating capacities of different tissues from the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Lipids*, 30:451-458.
- Kondo, Y., Y. Kawai, T. Miyazawa, H. Matsui and J. Mizutani. 1994. An assay for lipoxygenase activity by chemiluminescence. *BioSci. Biotech. Biochem.*, 58:421-422.
- Larsson, A. 1975. Some biochemical effects of cadmium on fish. In Koeman, J.H. and J.J.T.W.A. Strick (eds.) *Sublethal Effects of Toxic Chemical on Aquatic Animals*. Elsevier Science Publishers, Amsterdam. P. 3-13.
- Lee, T.H., P.P. Hawang and H.C. Lin. 1996. Morphological changes of integumental chloride cells to ambient cadmium during the early development of the teleost, *Oreochromis mossambicus*. *Environ. Biology of Fish.* 45:95-102.
- Lilius, E.M. and S. Laakso. 1982. Sensitive lipoxygenase assay based on chemiluminescence. *Anal. Biochem.*, 119:135-141.

Macchia, L., M. Hamberg, M. Kumlin, J.H. Butterfield and J.Z. Haeggstrom. 1995. Arachidonic acid metabolism in the human mast cell line HMC-1: 5-lipoxygenase gene expression and biosynthesis of thromboxane. *Biochim. Biophys. Acta.*, 1257:58-74.

Maycock, A.L., S.S. Pong, J.F. Evans and D.K. Miller. 1989. Biochemical of the lipoxygenase pathways. In Rokach, J. (Ed.) *Leukotrienes and Lipoxygenase*. Elsevier Science Publishers B. V. New York. pp. 143-195.

Palace, V.P. and J.F. Klaverkamp. 1993. Variation of hepatic enzymes in three species of freshwater fish from Precambrian shield lakes and the effect of cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1040:147-154.

Palace, V.P., S.H. Majewski and J.F. Klaverkamp. 1993. Interaction among antioxidant defenses in liver of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to cadmium. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 50:156-162.

Row D.W. and E.J. Massaro. 1974. Cadmium uptake and time dependent alternations in tissue levels in the white catfish *Ictalurus punctatus* (Pisces: Ictaluridae). *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 11:244-249.

Samelsson, B. 1983. Leukotrienes: Mediators of immediate hypersensitivity reactions and inflammation. *Science*, 220:568-575.

Samelsson, B., S.K. Dahlen, J.A. Lindgren, C.A. Rouzer and C.N. Serhan. 1987. Leukotrienes and lipoxins: Structures, biosynthesis and biological effects. *Science*, 237:1171-1175.

Samelsson, B. 1991. Arachidonic acid metabolism: Role in inflammation. *Z. Rheumatol.*, 50:3-6.

Serhan, C.N. 1994. Lipoxin biosynthesis and its impact in inflammatory and vascular events. *Biochim. Biophys. Acta.* 1212:1-25.

Singhal, R.L., Z. Merali and P.D. Hrdina. 1976. Aspects of the biochemical toxicology of cadmium. *Fed. Proc.*, 35:75-80.

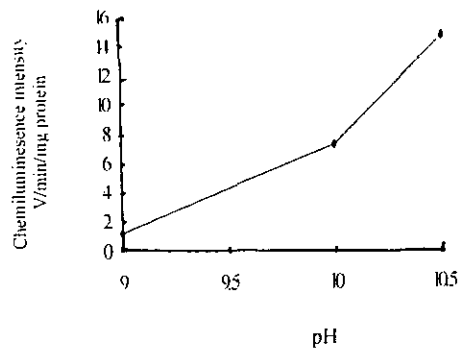
Smith B.P., E. Hejmancik and B.J. Camp. 1976. Acute effects of cadmium on *Ictalurus punctatus* (catfish). *Bull. Envir. Contam. Toxicol.*, 15:271-277.

Spector, A.A., J.A. Gordon and S.A. Moore. 1988. Hydroxycycosa-tetraenoic acid (HETES). *Prog. Lipid Res.*, 27:271-323.

Stacey, N.H., L.R. Cantilena and C.D. Klaassen. 1980. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53:470-480.

Thomas, P., M. Bally and J.M. Neff. 1982. Ascorbic acid status of mullt, *Mugil cephalus* Linn., exposed to cadmium. *J. Fish Biol.*, 20:183-196.

Van der Donk, E.M.M., J. Verhagen, G.A. Veklink and J.F.G. Viegantart. 1991. 12-lipoxygenase and temperature-dependent inactivation by hydroperoxy fatty acid.



圖一、Na-borate 緩衝液 pH 對化學冷光法偵測吳郭魚胞脂氧合酶活性之影響

Fig. 1. Effect of Na-borate buffer pH on chemiluminescence intensity of luminol reacted with hydroperoxy derivatives of arachidonic acid catalyzed by crude lipoxygenase extracted from normal tilapia gill.

表一、Na-borate 緩衝液濃度對化學冷光法偵測黃豆脂氧合酶活性之影響

Table 1. Effect of Na-borate buffer concentration on chemiluminescence intensity of luminol reacted with H₂O₂.

H ₂ O ₂ (mM)	Na-borate buffer (M)	Chemiluminescence intensity (mV/s)
10	0.05	0.8
	0.1	2.6
	0.2	3.1*
100	0.05	4.3
	0.1	29.7
	0.2	33.3*

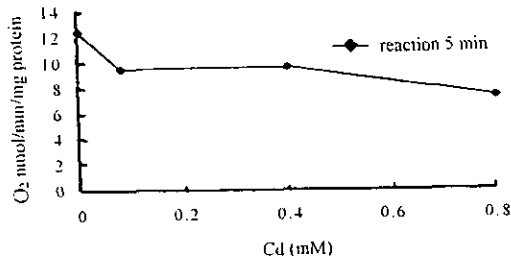
* Precipitant appeared in assay mixture.

表二、亞油酸濃度對化學冷光法偵測黃豆脂氧合酶活性之影響

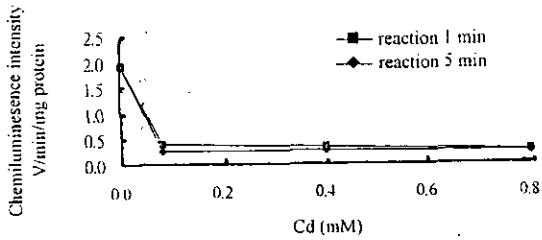
Table 2. Effect of linoleic acid concentration on chemiluminescence intensity of luminol reacted with hydroperoxy derivatives of linoleic acid catalyzed by soybean lipoxygenase (type 1)

C _{18:2} (μM)	Chemiluminescence intensity (mV/s)
200	12.1
300	226.1
400	583.9
500	422.5

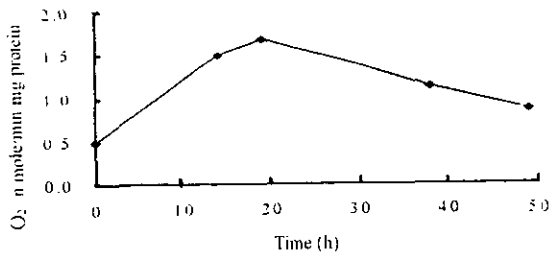
六、圖表



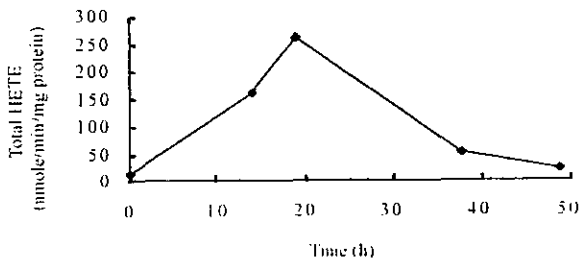
圖二、試管試驗中，錳濃度對吳郭魚鰓脂氧合酶粗酵素活性之影響
Fig. 2. In-Vitro effect of cadmium concentration on lipoxygenase activity measured as oxygen consumption rate assayed using arachidonic acid as substrate. Crude lipoxygenase was extracted with 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0 from normal tilapia gill then incubated with cadmium at 25 °C for 5 minutes, then assayed at 25 °C for 10 minutes



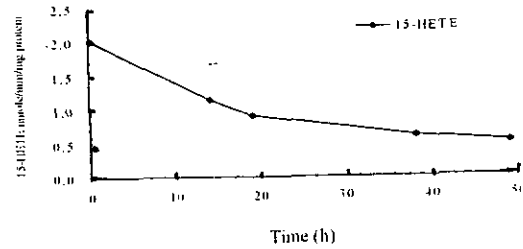
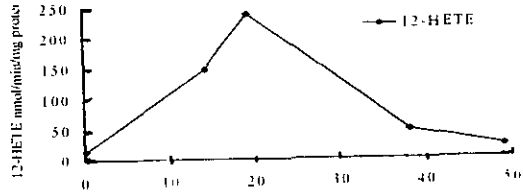
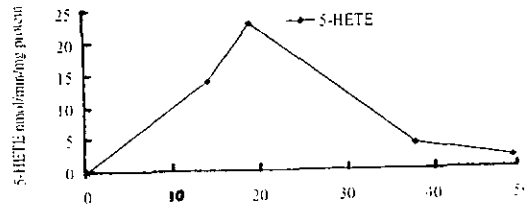
圖三、試管試驗中，錳對吳郭魚鰓脂氧合酶粗酵素活性影響
Fig. 3. In-Vitro effect of cadmium concentration on lipoxygenase activity measured as chemiluminescence intensity. Crude LOX extract was incubated with cadmium at 25 °C for 5 minutes, then added 0.1 M luminol and assayed in 0.05 M Na-borate buffer pH 10.5 at 25 °C for 1 minutes using 400 μ M arachidonic acid as substrate.



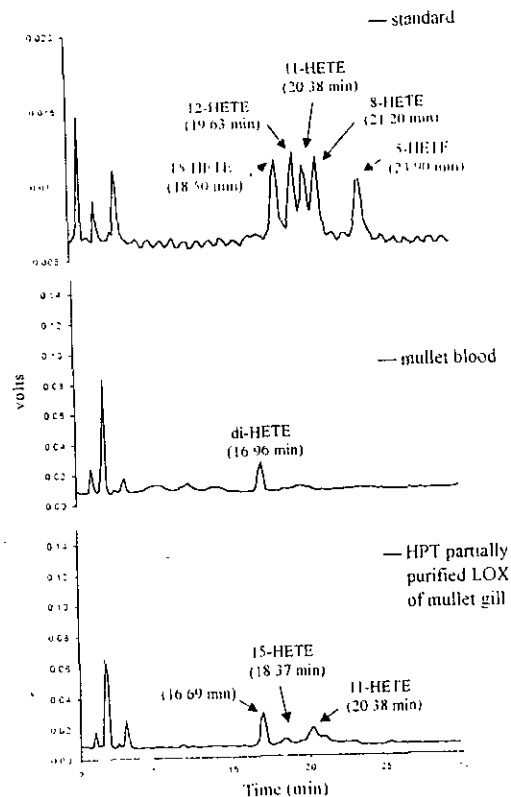
圖四、吳郭魚鰓脂氧合酶粗酵素活性受水中錳 (28 ppm) 作用時間之影響
Fig. 4. In-Vivo effect of exposure time to cadmium at an acute toxicity level of 28 mg/L (0.14 mM) on tilapia gill lipoxygenase activity indicated by O₂ consumption. Crude LOX extract was incubated with cadmium at 25 °C for 5 minutes, then assayed in 0.05 M Tris-HCl buffer pH 7.0 at 25 °C for 10 minutes using 400 μ M arachidonic acid as substrate.



圖五、吳郭魚鰓脂氧合酶粗酵素與花生四烯酸作用總產物量，受水中錳 (28 ppm) 作用時間之影響
Fig. 5. In-Vivo effect of exposure time to cadmium at an acute toxicity level of 28 mg/L (0.14 mM) on total hydroxyeicosatetraenoic acid (HETE) formation from arachidonic acid catalyzed by gill lipoxygenase extracted from normal tilapia.



圖六、吳郭魚蓄食於含錳 28 ppm (0.14 mM) 水中，魚鰓 5-、12-及 15-脂氧合酶活性隨暴露時間之變化
Fig. 6. Effect of exposure to cadmium at an acute toxicity level of 28 mg/L (0.14 mM) on 5-, 12-, and 15-HETE formation from arachidonic acid catalyzed by gill lipoxygenase extracted from normal tilapia.

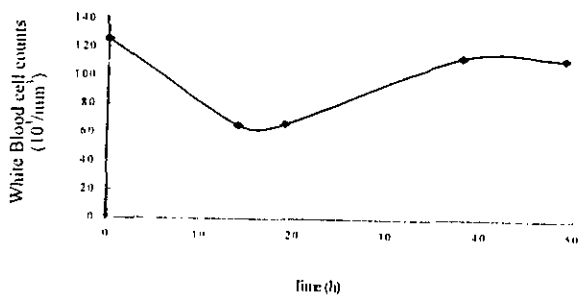


圖七、烏魚血液及烏魚鰓粗酵素液經 HPT 部份純化後，以 C₁₈ 柱所得產物與氫化標準品之高效液相層析圖譜
Fig. 7. HPLC chromatograms of hydroxy fatty acids from blood and gill extracts of grey mullet

表三、常態及罹病吳郭魚⁽¹⁾於含鎘 19.1 ppm 及 38.2 ppm 水中蓄養 12 小時，血液值之變化
 Table 3. Effect of exposure to cadmium for 12 h on hematological alteration in normal and diseased tilapia⁽¹⁾.

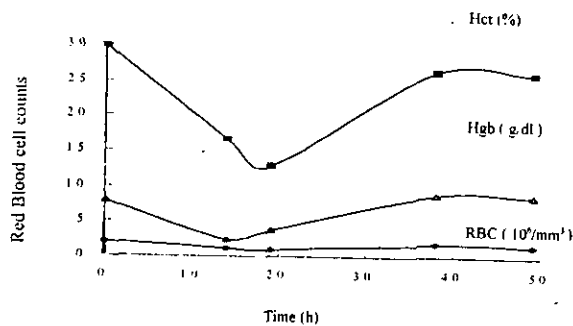
Ex-h	Cd (ppm)	Body Weight (g)	Body Length (cm)	RBC ¹ (10 ⁶ /mm ³)	HCT (%)	HGB (g/dl)	WBC ¹ (10 ³ /mm ³)	Liver coloration
Normal	0	510	31	2.23	40.6	13.8	210	Red
Diseased	19.1	325.5	27.3	1.41	22.3	9.1	122.5	Pink and green on surface
	38.2	465	30	0.95	14.7	6.2	104.6	
Normal	38.2	381	28.8	2.02	30.6	9.5	127.9	Red

⁽¹⁾The diseased tilapia had showed symptom of saprolegniasis, fin rot and lesions of scale.



圖八、常態吳郭魚蓄養於含鎘 28 ppm (0.14 mM) 水中，其白血球總數隨暴露時間之變化

Fig. 8. Effect of exposure to cadmium at an acute toxicity level of 28 mg/L (0.14 mM) on white blood cell counts in normal tilapia.



圖九、常態吳郭魚蓄養於含鎘 28 ppm (0.14 mM) 水中，其血比容積 (Hct)、血色素 (Hgb) 及紅血球總數 (RBC) 隨暴露時間之變化

Fig. 9. Effect of exposure to cadmium at an acute toxicity level of 28 mg/L (0.14 mM) on hematocrit, hemoglobin and red blood cell counts in normal tilapia.