

混合重金属离子相互作用诱导的 LPO 与 Cu Pb 在鲫鱼组织中积累

周新文¹, 朱国念², Jilisa Mwalilino², 孙锦荷¹

(1. 浙江大学核农所, 浙江 杭州 310029; 2. 浙江大学农药研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 采用室内暴露实验方法, 研究了混合重金属离子相互作用对 Cu、Pb 在鱼组织中吸收、积累以及其诱导的脂质过氧化作用。结果表明, 混合重金属离子在鱼体内吸收、积累与组织类型有关, Cu、Pb 在鱼鳃中受表面位点竞争理论主导, 使其积累降低; 而在肝脏中受 MT 诱导作用的影响, 积累增高。混合重金属离子诱导的脂质过氧化作用强弱与重金属离子的暴露浓度相关, LPO 的产物 MDA 的含量与混合重金属离子的暴露浓度 (0.00—0.54 mg · L⁻¹) 存在指数关系。用鱼鳃组织的 MDA 变化作为生物指示物指示环境中存在混合重金属离子的污染敏感于肝脏中的 MDA。

关键词: 混合重金属离子; Cu; Pb; 积累; LPO

中图分类号: X503.225 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 - 0267(2002)06 - 0505 - 03

LPO Accumulation of Copper and Lead and Inducement of Lipid Superoxide by Interaction of Mixture of Metals

ZHOU Xin-wen¹, ZHU Guo-nian², Jilisa Mwalilino², SUN Jin-he¹

(1. Institute of Nuclear Agricultural Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China; 2. Institute of Pesticide Sciences of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The present paper has studied accumulation of copper and lead in fish tissues and lipid superoxide by interaction of the mixture - metals. The results demonstrated that accumulation of copper and lead was related to fish tissues. The accumulation of copper and lead reduced in gill affected mainly by the surface competition theory, and increased in liver by the MT induction theory. The LPO induced by the metal mixture was concerned with its exposure concentration, where the exponential relation was found between MDA (LPO product) content and exposure concentration when the exposure concentration was from 0.00 to 0.54mg/L. The MDA content (LPO product) in the gill that was more sensitive than that in the liver, which may be used as biomark to indicate the pollution of mixture - metals

Keywords: Mixture - metals; copper; lead; accumulation; LPO

在自然环境中, 重金属离子污染的发生常常是多组分和低剂量的。而研究发现, 两两污染物之间的确存在着相互作用, 使其在生物体内的吸收、积累改变, 进而影响它们的毒性效应^[1-5]。为进一步明确重金属离子污染的实际环境行为, 在对京杭运河污染水平实际调查的基础上, 选择 Zn、Pb、Cd、Cu 四种主要的污染离子, 研究了在亚致死浓度的混合重金属离子作用下, Cu 和 Pb 在鲫鱼组织中的积累以及对鲫鱼组织的脂质过氧化毒性作用。目的在于探明重金属离子相互作用影响其吸收的机制, 以及明确丙二醛 (MDA) 含量变化是否可以作为混合重金属离子污染的生物指示物。

收稿日期: 2001 - 11 - 02

作者简介: 周新文 (1968—), 男, 湖北人, 副教授, 博士, 主要从事环境毒理学研究。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器设备

浓 HNO₃ 与 HClO₄ 均为优级纯。CuCl₂、ZnSO₄、CdCl₂ 及 Pb(NO₃)₂ 均为分析纯。0.5 mol · L⁻¹ 的 Tris. Cl 缓冲溶液 (pH = 7.4), 0.67% (m/V) 巴比妥酸。原子吸收分光光度计 (Spectra AA220)。分光光度计 (Backman DU530)。冷冻离心机 (Universal 32R)。

1.2 供试鱼的驯养及暴露环境

鲫鱼 (*Carassius auratus*) 从当地花鸟市场购得, 体重 20—25 g, 身长 8.5 ± 1.89 cm。在曝过气的自来水中驯养一周后, 供试验用。

暴露水体的 pH 为 6.95—7.2, 总硬度 (以 CaCO₃ 计) 为 440 mg · L⁻¹, 水中溶解氧 (DO) 为 6.9—

7.5 mg · L⁻¹。在驯养和试验期内的室温控制在(25 ± 1)℃,同时保持12 h的光照与12 h的黑暗。

1.3 暴露试验

1.3.1 混合重金属离子相互作用对Cu、Pb在鲫鱼组织中积累的影响和诱导的脂质过氧化作用

将鲫鱼分别暴露于0.1 mg · L⁻¹的、0.02 mg · L⁻¹的Pb²⁺以及由4种离子构成的混合重金属水体中(Cu²⁺、Zn²⁺、Cd²⁺、Pb²⁺的浓度分别为0.1 mg · L⁻¹、0.05 mg · L⁻¹、0.02 mg · L⁻¹、0.01 mg · L⁻¹)。暴露水体20 L,放养3尾鱼,每处理有3个重复,每一重复中取2个平行样。暴露期为7 d。为避免鱼饲料中的重金属离子成分的干扰,试验期内禁食。

1.3.2 不同浓度混合重金属离子暴露对Cu、Pb积累的影响和诱导的脂质过氧化作用

有关混合重金属离子的混合策略见文献[6]。鲫鱼暴露于0.00、0.03、0.06、0.12、0.18、0.27、0.54 mg · L⁻¹的混合重金属溶液中,每一暴露浓度设置3个重复,每一重复中取2个平行样品。暴露期为28 d。在试验期内按1%体重喂养鱼。整个试验期内未见鱼死亡。

取样后,用去离子水清洗鱼样,分别解剖鱼鳃和肝脏组织,供Cu、Pb离子的测定和丙二醛(MDA)含量分析。

1.4 鱼样品中的Cu、Pb分析

样品在60℃下烘48 h,至干燥。Cu样品的称样量在0.1—0.2 g之间,Pb样品的称样量在0.3—0.4 g之间,置于50 mL烧杯中,加入10 mL混合酸(浓HNO₃:浓HClO₄为1:1)放置过夜,然后在120℃下消解3 h,至溶液澄清为止。冷却后定量转移试液至25 mL容量瓶中,用去离子水稀释至刻度并摇匀。过滤至聚乙烯瓶中,用原子吸收分光光度计测定样品中的Cu、Pb离子含量^[7]。

1.5 脂质过氧化(LPO)分析及结果计算

取0.2 g的鱼组织,加入1 mL Tis. Cl(pH 7.4)缓冲液,研磨成匀浆。在4℃ 3 000 r · min⁻¹下离心5 min,去除组织和细胞碎片,取上清液备用。

脂质过氧化分析方法采用TBA法^[8,9],其简要分析步骤:在5 mL稀释10倍的组织提取液中,加入1 mL 20%的三氯乙酸和2 mL 0.67% (m/V)巴比妥酸,在沸水浴中避光加热10 min,然后3 000 r · min⁻¹离心5 min,在530 nm处读取吸光度值。LPO活性可表达为:

$$\frac{\text{OD}}{1.56 \times 10^5} \times \frac{2}{10^3} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{\text{mg蛋白}} \times 10^9 (\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{蛋白})$$

数据处理采用Excel 7.0版中的数据分析工具库软件进行统计分析。

2 结果与分析

2.1 重金属离子相互作用对Cu、Pb在鲫鱼组织积累的影响

重金属离子相互作用对Cu、Pb在鲫鱼鳃、肝脏组织中积累的影响结果如表1。结果表明,混合重金属离子中的Cu和Pb的积累与单一重金属离子暴露不同,重金属离子间的相互作用改变了Cu和Pb在鱼组织中的积累,使Cu和Pb在鱼鳃中的积累降低,肝脏中的积累增加。

表1 重金属离子相互作用影响Cu、Pb在鲫鱼(*Carassius auratus*)组织中的积累

Table 1 Copper and lead accumulation in the fish (*Carassius auratus*) tissues affected by the interaction of the mixture of the metals

组织	Cu的积累/mg · kg ⁻¹		Pb的积累/mg · kg ⁻¹	
	Cu	Cu + Zn + Pb + Cd	Pb	Pb + Cu + Zn + Cd
鱼鳃*	55.85 ± 3.23 ^a	29.74 ± 4.63 ^b	43.99 ± 6.88 ^c	31.94 ± 4.54 ^d
肝脏*	76.98 ± 9.67 ^e	95.57 ± 7.76 ^d	39.44 ± 6.84 ^e	55.35 ± 7.60 ^b

* 相同的字母表示处理间无显著差异,字母不同者相互间存在显著差异。

2.2 混合重金属离子暴露浓度对Cu、Pb在鲫鱼组织中积累的影响

不同浓度混合重金属离子暴露对Cu、Pb在鲫鱼组织中的积累影响如表2,从表中结果可见Cu、Pb在鱼鳃、肝脏组织中有明显积累,且随着混合重金属离子暴露浓度增高而增高。

2.3 Cu、Pb与混合重金属离子对鲫鱼组织的脂质过氧化作用

表2 混合重金属离子暴露浓度对Cu、Pb在鱼组织中积累的影响

Table 2 Effect of the metal - mixture concentration on Cu and Pb accumulation in the fish tissues

组织	暴露浓度/mg · L ⁻¹				
	0.00	0.03	0.06	0.12	
鱼鳃*	Cu	30.58 ± 1.71	36.30 ± 2.48	39.45 ± 4.76	45.01 ± 0.38
	Pb	ND	25.09 ± 2.06	32.98 ± 4.63	51.13 ± 6.03
肝脏*	Cu	55.11 ± 2.23	71.23 ± 2.23	112.00 ± 0.7	122.68 ± 9.3
	Pb	ND	22.44 ± 4.21	30.72 ± 6.01	61.81 ± 4.98

* 各种浓度暴露积累显著 P < 0.01, ND表示未检测到(P < 0.01)。

鲫鱼分别暴露于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cu 离子, $0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Pb 离子和 $0.18 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合重金属离子中, 鱼鳃、肝脏组织中脂质过氧化产物丙二醛 (MDA) 含量变化如图 1。结果表明, 在鱼鳃中, 混合重金属离子的脂质过氧化作用 (LPO) 小于单独 Cu 离子的作用, 而大于 Pb 离子的作用。在肝脏中, 单一 Cu、Pb 离子的 LPO 小于混合重金属离子的作用。表明了 LPO 的变化与重金属离子相互作用使其在鱼鳃中降低、在肝脏中增加有关。

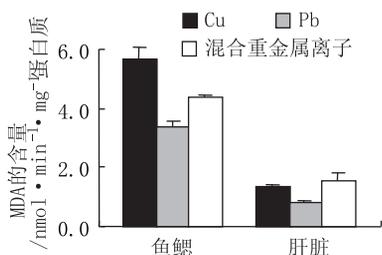


图 1 Cu、Pb 和混合重金属离子对鱼组织的脂质过氧化作用

Figure 1 Lipid superoxide of fish tissues caused by copper, lead and mixture of metals

2.4 混合重金属离子暴露浓度对鲫鱼脂质过氧化作用的影响

混合重金属离子的暴露浓度在 0.00 — $0.54 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 范围内, 鱼体组织中的 MDA 含量与暴露浓度之间存在着剂量效应关系。统计分析表明, 鱼鳃、肝脏组织中的 MDA 含量和暴露浓度间均有指数曲线关系 (见表 3)。且鱼鳃的敏感性 (EC_{50} 为 $0.21 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 高于肝脏 (EC_{50} 为 $1.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

表 3 鲫鱼组织 MDA 含量与混合重金属暴露浓度回归统计结果

Table 3 Statistic analysis to the MDA concentration in the fish (*carassius auratus*) tissues and the mixture - metal exposure concentration

组织	回归方程*	相关系数	F 值	$EC_{50}/\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
鱼鳃	$Y = e^{-2.87X + 0.687}$	0.87	69.8	0.21 (0.125 - 0.294)
肝脏	$Y = e^{-2.19X + 0.115}$	0.91	111.5	1.42 (1.13 - 1.71)

* Y: 组织 MDA 含量 ($\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 蛋白); X: 混合重金属离子暴露浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。

3 结果与讨论

目前, 两种有代表性的假说常被用来解释重金属离子相互作用对重金属离子在生物体内的积累。一种是竞争位点理论, 另一种是金属硫蛋白的诱导结合作用。已往的研究中, 即使相同的两种金属离子相互作用对其中的重金属离子的吸收和积累在不同的生物

体中的作用也是不一样的, 在解释其作用机制时存在着许多自相矛盾的地方。而我们考虑了生物体本身器官的功能和作用, 细致地研究了混合重金属离子相互作用对重金属离子在这些器官和组织中的积累, 首次把这纷乱的理论解释统一了起来。

混合重金属离子相互作用对 Cu、Pb 这两种金属离子在鲫鱼体内的积累, 在鱼鳃组织中, 主要与吸收进入的位点竞争有关, 即受竞争位点理论主导。该理论认为金属离子进入细胞前先与细胞表面的接受点结合, 其结合能力大小会直接影响到进入细胞的速率和量。各种离子相互竞争性地与接受位点结合, 使得每一组分的结合量减少, 因而使 Cu、Pb 在鱼鳃中的积累降低。而在肝脏组织中, 重金属离子的积累主要与金属硫蛋白 (MT) 的诱导作用有关。MT 主要的生物学功能调节鱼体内自由金属离子的浓度, 特别是减少重金属离子 Pb、Cd 这种非生物必需元素的毒害作用。Cd、Cu、Zn 等金属离子能激活肝脏中 MT 基因的转录, MT 基因得到大量的表达, 使鱼的肝脏和肾脏等部位的 MT 含量较高^[10], 进入鱼体内多余的重金属离子将和 MT 结合, 在体内被储存起来。由于重金属离子的诱导作用, 使 Cu、Pb 两种离子在鲫鱼肝脏中的积累增加。

混合重金属离子诱导的 LPO 产物 MDA 在鱼鳃组织中趋于降低和肝脏组织中的增加反映了重金属离子在鱼组织中的积累状况, 在急性联合毒性的作用研究中, 也发现随着组分的增加, 化学物的毒性趋向于加和作用^[11]。并且在一定的浓度范围内, 鲫鱼组织中的 LPO 产物 MDA 的含量与重金属离子的暴露浓度相关, 可以将 MDA 作为混合重金属离子污染的生物指示物。

我们的实验可得到以下结论:

(1) 混合重金属离子相互作用对 Cu、Pb 在鱼体内吸收、积累与组织类型有关, 在鱼鳃中受表面位点竞争理论主导, 使其积累降低; 而在肝脏中受 MT 诱导作用的影响, 积累增高。

(2) 混合重金属离子在鱼组织中的积累与诱导的脂质过氧化作用强弱同重金属离子的暴露浓度相关, 暴露浓度越高, 组织中的积累浓度越高; LPO 产物 MDA 的含量与混合重金属离子的暴露浓度存在指数关系。用鱼鳃组织的 MDA 变化作为生物指示物指示环境中存在混合重金属离子的污染敏感于肝脏中的 MDA。

(下转第 511 页)