

汞、镉离子急性污染对紫红笛鲷肝脏金属硫蛋白的胁迫效应

陈春亮¹, 马胜伟², 王学锋^{3*}

(1. 广东海洋大学海洋资源与环境监测中心, 广东 湛江 524088; 2. 中国水产科学研究院南海水产研究所 广东省渔业生态环境重点实验室, 广州 510300; 3. 广东海洋大学水产学院, 广东 湛江 524088)

摘要:为分析水体中 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 急性污染对鱼体肝脏金属硫蛋白(MT)的胁迫效应, 筛选其适宜的生物标志物, 通过 Hg^{2+} (0.5、1、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、 Cd^{2+} (5、10、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 单一、混合暴露 96 h 半静水实验, 采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法测定了 3、12、24、48、96 h 时紫红笛鲷肝组织 MT 的含量。结果表明, 96 h 内紫红笛鲷肝脏中 MT 含量变化为: (1) 单一暴露下, 汞浓度组 (0.5、1、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+}) 受诱导率分别为 17.9%、43.7%、51.8%; 镉浓度组 (5、10、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+}) 受诱导率分别为 4.3%、54.7%、84.9%。(2) Hg^{2+} - Cd^{2+} 混合暴露下, Hg1Cd (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} +10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+})、 Hg2Cd (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} +10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+})、 Hg3Cd (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} +10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+}) 三个浓度组对鱼肝脏 MT 的诱导率均值依次为 22.8%、26.3%、51.7%; Cd1Hg (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} +1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+})、 Cd2Hg (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} +1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+})、 Cd3Hg (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} +1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+}) 的平均诱导率分别为 30.1%、26.4%、58.3%。单一、混合暴露下皆具有明显的时间-效应关系和剂量-效应关系, 汞、镉离子污染物浓度的升高和暴露时间的延长, 都导致鱼体肝脏 MT 含量显著增加; 混合暴露浓度组的诱导率总体上低于单一暴露下的诱导率, 反映出 Hg^{2+} - Cd^{2+} 混合状态下的拮抗作用。

关键词: 紫红笛鲷; 生物标志物; 金属硫蛋白; 汞; 镉

中图分类号: X503.225 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2014)08-1493-07 doi:10.11654/jaes.2014.08.005

Acute Effects of Hg^{2+} and Cd^{2+} Pollution on Metallothionein in Hepatic Tissues of *Lutjanus argentimaculatus*

CHEN Chun-liang¹, MA Sheng-wei², WANG Xue-feng^{3*}

(1. Monitoring Center for Ocean Resources and Environments, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China; 2. Key Lab of Fishery Ecology and Environment, South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Science, Guangzhou 510300, China; 3. Fisheries College, Guangdong Ocean University; Zhanjiang 524088, China)

Abstract: Metallothionein (MT) plays important roles in binding and detoxifying heavy metals. However, the responses of MT to acute pollution of Hg^{2+} and Cd^{2+} in water have not been clear yet. In a semi-static experiment, the levels of MT in the hepatic tissues of *Lutjanus argentimaculatus* were determined with enzyme-linked binding assay (ELBA) under single and combined exposure to different concentrations of Hg^{2+} and Cd^{2+} at 3, 12, 24, 48, 96 h. Under exposure to single metal, the levels of MT were increased by 17.9%, 43.7% and 51.8% at 0.5, 1, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} , and by 4.3%, 54.7%, 84.9% at 5, 10, 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} , respectively. Mixed exposure of Hg - Cd promoted MT levels by 22.8%, 26.3%, 51.7% for Hg1Cd (0.5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} +10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+}), Hg2Cd (1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} +10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+}), Hg3Cd (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+} +10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+}), and by 30.1%, 26.4%, 58.3% for Cd1Hg (5 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} +1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+}), Cd2Hg (10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} +1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+}), Cd3Hg (100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} +1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Hg^{2+}), respectively. In conclusion, both single and mixed exposure of Hg^{2+} and Cd^{2+} increase MT levels in the hepatic tissues, with obvious time-response and dose-response. The induction of MT is lower in the mixed treatments than in their corresponding single ones, indicating the antagonism of Hg^{2+} and Cd^{2+} .

Keywords: *Lutjanus argentimaculatus*; biomarker; metallothionein (MT); mercury; cadmium

收稿日期: 2014-03-22

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项(201403008); 国家海洋公益项目(200905005-05); 广东省海洋渔业科技推广专项(A201208H01); 水产优青项目(SCYQ201305); 校引进人才启动项目(1312033)

作者简介: 陈春亮(1977—), 男, 高级工程师, 硕士, 从事渔业资源与环境保护方向研究。E-mail: f2362900@126.com

* 通信作者: 王学锋 E-mail: xuefeng1999@126.com

重金属通过径流、降水、大气沉降、陆源污染等渠道进入河口与近岸水域^[1-2],而且其毒性持久、易被水生生物富集放大。因此,在沿海区域工业经济的迅猛发展过程中,重金属污染是近岸海洋生态环境质量下降的重要诱因之一^[3],且威胁到公众健康^[4]。常规的生物质量监测主要是针对生物体或某一器官在某一特定观测点的重金属含量的静态、定量监测,仅能反映其累积效应或蓄积浓度,而在低剂量、连续的重金属污染对亚细胞水平的毒性效应方面未能提供足够的信息^[3-5]。因此,筛选相关的生物标志物并分析其适用性有助于评价水体中不同重金属种类、含量、暴露条件对水生生物的潜在毒害效应,并能为渔业水域污染的早期预警和水产品的健康养殖提供参考依据。

金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一类低分子量、富含半胱氨酸、能被金属诱导并能结合多个金属原子的功能蛋白^[6-7],具有很强的热稳定性及抗蛋白酶消化能力^[8]。MT在生物体内对缓解重金属的毒性,参与微量元素的储存、运输,以及增强机体免疫与应激能力、清除自由基^[9]等方面担负着重要的生理功能。自20世纪70年代末,即有学者提出以生物组织中的MT含量作为水环境监测重金属暴露的一个分子生态毒理学指标^[10-11]。海洋生物MT的分析测定及其与重金属污染的关系更是海洋环境与生态毒理学研究热点之一^[8, 11-12]。

紫红笛鲷(*Lutjanus argentimaculatus*)是一种优质食用鱼类,近年来在我国南海网箱养殖和海洋增殖放流中的重要性日益突出。近岸水域的污染对紫红笛鲷的生理、生态产生不同程度的影响,而其体内的污染物含量及相关生理生化指标亦能反映养殖水域的生态环境质量。重金属对鱼类的毒性效应已多有报道,多集中于单一重金属方面^[13-16],而有关海水鱼类在单一、混合重金属离子急性污染方面MT含量的比较研究报告较少^[16-17]。本文通过受控实验研究水体中Hg²⁺、

Cd²⁺单一暴露及Hg²⁺-Cd²⁺混合暴露对紫红笛鲷肝脏MT含量的胁迫效应,明确紫红笛鲷肝脏MT含量与暴露时间、剂量的关系,为其作为生物标志物的适用性提供参考依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

实验用紫红笛鲷购自深圳南澳养殖基地,体色正常,健康活泼,在实验室养殖水槽中暂养10 d后进行正式实验。鱼体长(5.61±0.62)cm,质量(5.11±1.67)g(n=86);暂养期间水温(22.9±0.8)℃,盐度32.8, pH为8.2~8.4,持续充氧,换水前1 h适当投喂专用人工饲料,用虹吸漏斗吸去残饵、粪便,换水频率为每日1次,换水量为每次1/2水体。实验期间的养殖管理与暂养期间相同,采用半静水实验法,换水时分别加入预先配置好对应离子浓度的海水,实验期间受试鱼无死亡。暂养过程的养殖废水采用双重砂滤法处理后排放,含重金属的废水、实验完成后的受试生物按照实验室废液、废水处理办法分别标注、收集,交由专业环保公司处理,防止二次污染。

1.2 实验设计

为分析水体Hg²⁺、Cd²⁺及Hg²⁺-Cd²⁺混合污染胁迫对紫红笛鲷肝组织MT的诱导,分别以渔业水质标准^[18]中Hg²⁺、Cd²⁺最高允许值和最高允许值的2倍、20倍按表1、表2设置处理浓度,实验在0.05 m³养殖用玻璃钢水槽内进行,各浓度组内分别养殖40尾。

1.3 样品采集与处理

分别于暴露3、6、12、24、48、96 h时采样,每处理组各随机取4~5条受试鱼,用纱布擦干鱼体,于冰盘内迅速解剖取肝脏组织,称重,用4℃预冷0.86%生理盐水淋洗,滤纸吸干后,置于1.5 mL离心管中,-70℃保存,待测。

取冷冻待测样,室温解冻,按1:4(M/V)加入预冷

表1 Hg²⁺及Hg²⁺-Cd²⁺急性污染胁迫的浓度设置

Table 1 Acute exposure concentrations of Hg²⁺ and Hg²⁺-Cd²⁺

处理 Treatments	CK	Hg1	Hg2	Hg3	Hg1Cd	Hg2Cd	Hg3Cd
离子种类 Ions	0	Hg ²⁺	Hg ²⁺	Hg ²⁺	Hg ²⁺ -Cd ²⁺	Hg ²⁺ -Cd ²⁺	Hg ²⁺ -Cd ²⁺
浓度 Concentrations/μg·L ⁻¹	0	0.5	1	10	0.5-10	1-10	10-10

表2 Cd²⁺及Cd²⁺-Hg²⁺急性污染胁迫的浓度设置

Table 2 Acute exposure concentrations of Cd²⁺ and Cd²⁺-Hg²⁺

处理 Treatments	CK	Cd1	Cd2	Cd3	Cd1Hg	Cd2Hg	Cd3Hg
离子种类 Ions	0	Cd ²⁺	Cd ²⁺	Cd ²⁺	Cd ²⁺ -Hg ²⁺	Cd ²⁺ -Hg ²⁺	Cd ²⁺ -Hg ²⁺
浓度 Concentrations/μg·L ⁻¹	0	5	10	100	5-1	10-1	100-1

的 Tris-HCl 缓冲液($0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris, $0.25 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, $0.1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA, pH7.5), 用 FSH-2A 型可调高速匀浆机匀浆, 将匀浆液用高速冷冻离心机 4°C 离心 15 min (离心力 $4\ 024\ g$), 冷藏于 4°C 的冰箱内待测。每样品均设 3 个平行, 于 5 h 内完成 MT 的测定。

金属硫蛋白的测定采用生物素双抗体夹心酶联免疫吸附法(南京建成生物工程研究所鱼用 MT Elisa 试剂盒, 检测限 $0.05 \sim 20 \text{ ng} \cdot \text{mL}^{-1}$)。操作步骤按照试剂盒说明书, 试剂盒在室温放置 30 min 后打开, 首先用标准品稀释液稀释标准品, 测定吸光值, 绘制 MT 标准曲线; 然后向酶标板依次加入待测样品、生物素标记的抗-MT 抗体、链霉亲和素-HRP; 酶标板经洗板机洗板后, 加显色剂, 振荡混匀后, 避光显色 10 min ; 加终止剂 $50 \mu\text{L}$ 终止反应; 10 min 内用 Biorad xMark 酶标仪在 450 nm 波长测定吸光值。

1.4 数据分析方法

所得数据均以均值 $\pm$ 标准差表示。数据分析用 SPSS 15.0 的单因素方差分析中的最小方差显著法 (Least significant difference, LSD) 检验差异性, 显著性水平为 $P < 0.05$ 。数据绘图用 Sigmaplot 11.0 完成。

2 结果与分析

按照试剂盒鱼体 MT 工作曲线的测定方法, 将定容后各浓度标准品的吸光值与对应的 MT 含量作标准曲线, 得

$$Y = -2.328 + 2.201X, R^2 = 0.946 (n=10)$$

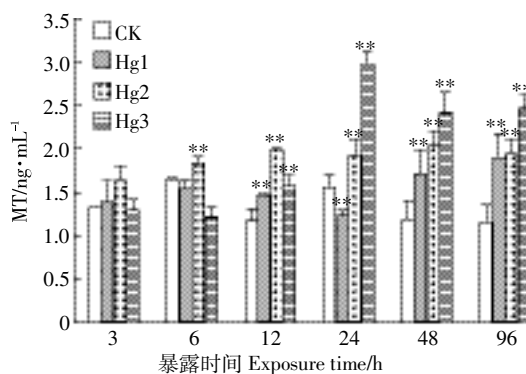
经单因素方差分析, 空白组 MT 含量在各监测点 (3、6、12、24、48、96 h) 差异不显著 ($n=18, P > 0.05$)。

2.1 紫红笛鲷肝脏 MT 对 Hg^{2+} 胁迫的响应

紫红笛鲷肝脏 MT 含量对单一 Hg^{2+} 污染胁迫的响应见图 1。按暴露时间分析, 3 h 时各浓度组 MT 含量变化不显著 ($P > 0.05$), 其中低、中浓度组 (Hg1、Hg2) 的 MT 含量分别被诱导 4.5% 、 23.1% , 高浓度组 (Hg3) 略受抑制 (2.1%); 暴露 6 h 时, Hg1、Hg3 的 MT 含量受到不同程度地抑制 (6.4% 、 26.2%), 而 Hg2 组 MT 则受到显著诱导 ($P < 0.05$); 暴露 12 h 时, 各浓度组 MT 含量显著升高, 诱导率为 $25.1\% \sim 69.6\%$; 暴露 24 h 时, Hg1 组 MT 含量的抑制率为 20.9% , Hg2、Hg3 组均受到显著诱导; 暴露 48 h 、 96 h 时, 各浓度组鱼肝脏 MT 含量均显著高于对照组 (诱导率达 $44.8\% \sim 109.4\%$)。

从不同 Hg^{2+} 浓度的急性胁迫响应来看, 96 h 内, Hg1、Hg2 和 Hg3 浓度组受诱导率分别为 17.9% 、 43.8% 和 51.8% 。可见, 紫红笛鲷肝脏 MT 含量的变化

对 Hg^{2+} 具有明显的剂量-效应关系。总体上 MT 含量呈增加趋势, 反映了鱼体肝脏 MT 对水体中 Hg^{2+} 胁迫的响应和解毒作用。此外, 各浓度组随暴露时间的增加, MT 含量的变化幅度 (诱导或抑制率) 亦存在一定程度的差异, 如 Hg1 组在暴露 6 、 24 h 时及高浓度在暴露 3 、 6 h 时受抑制。



** 表示存在显著差异 ($P < 0.05$)。下同

** indicate significant differences at $P < 0.05$. The same below

图 1 紫红笛鲷肝脏 MT 含量对 Hg^{2+} 污染胁迫的响应

Figure 1 Responses of MT contents in liver of *L. argentimaculatus* to Hg^{2+} pollution

2.2 紫红笛鲷肝脏 MT 对 Cd^{2+} 胁迫的响应

图 2 为紫红笛鲷肝脏 MT 含量对 Cd^{2+} 污染胁迫的响应。从暴露时间来看, 3 h 时, 低浓度组 (Cd1) 略受抑制 ($P > 0.05$), 中、高浓度组 (Cd2、Cd3) 受到显著诱导, 诱导率分别为 33.0% 、 41.3% ; 暴露 6 h 时, MT 含量均受到不同程度地诱导, Cd1、Cd2 组的变化不显著, 高浓度组 Cd3 受显著诱导, 诱导率为 55.4% ; 暴露 12 h 时, Cd2、Cd3 浓度组肝脏 MT 含量较对照组有显著升高, 诱导率为 $22.4\% \sim 103.6\%$; 暴露 24 、 48 h 时, MT 持续被诱导并显著高于对照组 ($P < 0.05$), 诱导率 ($14.8\% \sim 97.3\%$), 较 12 h 时略有下降, 而低浓度组 Cd1 则与对照组无显著性差异 ($P > 0.05$); 暴露 96 h 时, 各浓度组鱼体肝脏 MT 均被诱导, 其中 Cd2 和 Cd3 显著高于对照组 ($P < 0.05$)。

总体上, 96 h Cd^{2+} 胁迫对紫红笛鲷肝脏 MT 含量变化具有较明显的剂量-效应关系: Cd1、Cd2、Cd3 浓度组的诱导率平均为 4.3% 、 54.7% 和 84.9% ; 而 Cd1 组则无显著变化 ($P > 0.05$), 仅表现出诱导趋势, 表明紫红笛鲷肝脏 MT 含量对水体低浓度 Cd^{2+} ($5 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$) 污染需要更长时间暴露才能表现出胁迫响应。

2.3 紫红笛鲷肝脏 MT 对 Hg^{2+} - Cd^{2+} 混合胁迫的响应

Hg^{2+} - Cd^{2+} 混合暴露下, 紫红笛鲷肝脏 MT 含量的

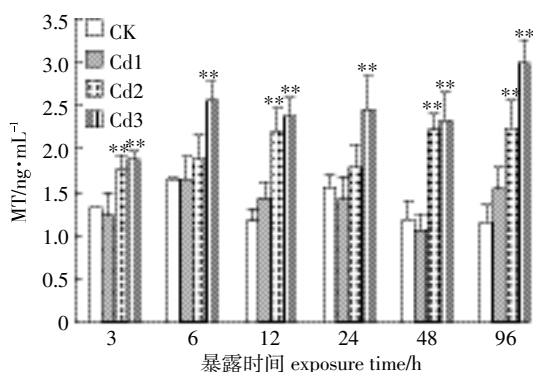


图2 紫红笛鲷肝脏 MT 含量对 Cd^{2+} 污染胁迫的响应

Figure 2 Responses of MT contents in liver of *L. argentimaculatus* to Cd^{2+} pollution

变化见图3。在暴露3、6 h时,除 Hg_2Cd 组受抑制35.0%以外,其余 $\text{Hg}^{2+}-\text{Cd}^{2+}$ 联合浓度组无显著变化 ($P>0.05$);暴露12 h时,各浓度组 MT 均有不同程度增加,诱导率31.3%~68%;暴露24 h时,低、中浓度组 (Hg_1Cd 、 Hg_2Cd) 鱼体肝脏 MT 的含量与对照组无显著性差异 ($P>0.05$),高浓度组 (Hg_3Cd) 受诱导显著,诱导率为24.3%;暴露48 h时,中、高浓度联合暴露下,MT 含量皆显著增加,诱导率分别为58.4%、82.8%;暴露96 h时,各处理组鱼体肝脏 MT 含量均较对照组有不同程度的上升 ($P<0.05$,诱导率为67.6%~108.7%)。

综合分析可知, $\text{Hg}^{2+}-\text{Cd}^{2+}$ 联合污染胁迫下,MT 含量的变化较单一 Hg^{2+} 污染下表现出“迟滞”效应,对污染胁迫的响应没有单一 Hg^{2+} 污染灵敏,在一定程度上反映了水体 $\text{Hg}^{2+}-\text{Cd}^{2+}$ 混合污染条件下的拮抗作用;而在较长时间的污染胁迫(48,96 h)下,鱼体肝脏 MT 含量受诱导程度不断增加,逐渐发挥其解毒作用。在

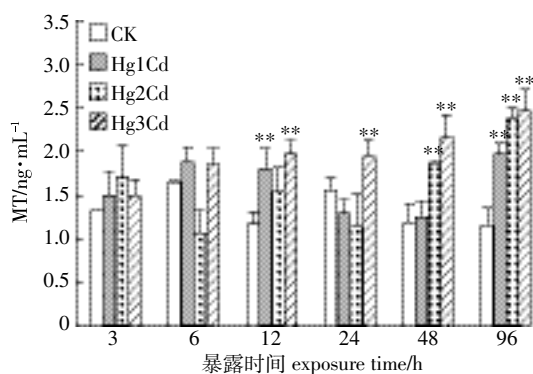


图3 紫红笛鲷肝脏 MT 含量对 $\text{Hg}^{2+}-\text{Cd}^{2+}$ 联合污染胁迫的响应

Figure 3 Responses of MT contents in liver of *L. argentimaculatus* to Hg^{2+} and Cd^{2+} combined pollution

96 h 暴露时间内, Hg_1Cd 、 Hg_2Cd 、 Hg_3Cd 三个浓度组对鱼肝脏 MT 的诱导率均值依次为22.8%、26.3%、51.7%,表明鱼肝脏 MT 含量作为 $\text{Hg}^{2+}-\text{Cd}^{2+}$ 污染胁迫的生物标志物具有较好的应用价值。

2.4 紫红笛鲷肝脏 MT 对 $\text{Cd}^{2+}-\text{Hg}^{2+}$ 混合胁迫的响应

紫红笛鲷肝组织 MT 含量对 $\text{Cd}^{2+}-\text{Hg}^{2+}$ 混合污染胁迫的响应见图4。暴露3 h时, $\text{Cd}^{2+}-\text{Hg}^{2+}$ 联合处理组 MT 含量略受诱导 ($P>0.05$);暴露6 h时,低、中浓度组 (Cd_1Hg 、 Cd_2Hg) MT 含量受抑制,其中 Cd_2Hg 组受抑制率达35% ($P<0.01$);暴露12 h时,各浓度组受到不同程度地诱导, Cd_1Hg 、 Cd_3Hg 诱导率分别为52.4%、81.5%, Cd_2Hg 组 MT 含量变化不显著;暴露24 h时,各处理组与对照组无显著差异 ($P>0.05$);暴露48、96 h时各处理组的 MT 含量受到显著诱导,诱导率58.4%~107.5%。

在96 h 暴露过程中,紫红笛鲷肝脏 MT 含量的变化表明:暴露3 h时,各处理组 MT 含量略呈升高 ($P>0.05$);随暴露时间的增加, Cd_1Hg 在暴露12、48、96 h 时受显著诱导; Cd_2Hg 在暴露6 h 受显著抑制,在暴露48、96 h 时受显著诱导; Cd_3Hg 在暴露12、48、96 h 时受显著诱导。混合胁迫下, Cd_1Hg 、 Cd_2Hg 、 Cd_3Hg 的平均诱导率分别为30.1%、26.4%、58.3%;混合暴露条件下,紫红笛鲷肝脏 MT 的含量随暴露时间的增加和 Cd^{2+} 浓度的增加而升高,各混合浓度组低于其对应的单一 Cd^{2+} 浓度组。

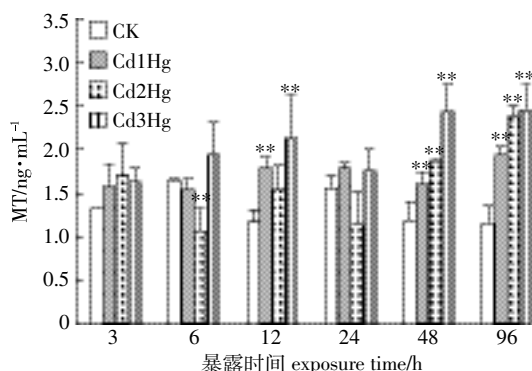


图4 紫红笛鲷肝脏 MT 含量对 $\text{Cd}^{2+}-\text{Hg}^{2+}$ 复合污染胁迫的响应

Figure 4 Responses of MT contents in liver of *L. argentimaculatus* to Cd^{2+} and Hg^{2+} combined pollution

3 讨论

水体污染物的毒性研究主要包括低浓度污染物的毒性机理和对水生生物所可能产生的毒性效应两方面^[12]。重金属污染物引起过氧化损伤是其对生物机

体产生毒害的一个重要原因^[12,19-24]。

在生物体内,重金属水平与金属硫蛋白的蛋白和基因表达水平之间存在典型的倒“U”型关系,即当重金属低于某一浓度阈值时,金属硫蛋白会随着重金属剂量增加而上升;而一旦超出浓度阈值,重金属就会对生物产生不可逆毒性,金属硫蛋白水平就会随着重金属水平增加而降低^[11]。本文监测结果表明,96 h内,紫红笛鲷肝脏 MT 含量的变化趋势处于倒“U”型的左侧区域,总体上处于上升阶段;在各监测点,MT 含量与暴露时间、重金属 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 的浓度并非呈单纯、严格的线性关系,作为生物标志物之一,MT 含量的变化是受试生物种类、暴露时间、污染物浓度三者相互作用的综合表征。

3.1 MT 对 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 污染胁迫的响应

即使同一种重金属污染物在鱼体不同组织和器官中的蓄积量亦存在较大差异,在鳃、肝、肾中的蓄积量及波动幅度均大于肌肉^[25]。由于肝的解毒作用和肾的排泄作用,该组织可诱导产生大量 MT,而鳃的滤水和呼吸作用使其成为水体中重金属离子进入鱼体的重要通道,但并非靶器官^[26]。但在低浓度、长期暴露(30 d)下,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)鳃组织的镉蓄积量达到其急性致死剂量(96 h LC_{50})的 20~40 倍,慢性蓄积于鳃组织的镉在 EDTA 处理下仍不能有效去除^[27]。当有机体受重金属胁迫时,金属硫蛋白 MT 将在各种组织中合成,而 Hg、Zn、Cd、Cu 等由于与硫蛋白具有较强的结合力会被氧化为难溶性的多聚体复合物,先以一种不溶状态贮存在 2 级和 3 级溶酶体中,最后通过胞吐作用以不溶物的形式排出体外,从而表现出 MT 对 Hg、Cd、Cu 等重金属的解毒作用^[28]。MT 含量的升高,是机体对重金属暴露的一种适应性调节,通过与抗氧化免疫系统以协同的方式共同发挥抗氧化功能^[29]。但在重金属胁迫下会造成鱼体的抗氧化损伤,从而产生大量的氧自由基,MT 在机体受到大量的氧自由基胁迫时会被活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS)氧化,MT 含量相应下降。

贾秀英等^[29]对 Cd^{2+} 的研究也认为黑斑蛙肝脏内的 GSH 与 MT 含量变化可能是机体抗氧化损伤的机理之一。但目前 ROS 诱导 MT 产生的机制还未清楚,有待进一步的研究。本研究表明,随暴露时间和 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 浓度的增加,紫红笛鲷肝脏 MT 含量表现出明显的时间-效应和剂量-效应关系。在暴露 6 h 时 Hg_2 浓度组鱼体肝脏 MT 含量受到显著诱导,而 Cd_2 浓度组暴露 12 h 才受到显著诱导,而 96 h 水体暴露下 Cd_2 、

Hg_2 浓度组鱼体肝脏 MT 含量的变化表明 Cd^{2+} 对 MT 的诱导大于 Hg^{2+} ,且总体上诱导率皆随污染物浓度的升高和暴露时间的增加而呈上升趋势。这与水体中 Cd、Hg 离子浓度有关。 Hg^{2+} - Cd^{2+} 、 Cd^{2+} - Hg^{2+} 联合胁迫下紫红笛鲷肝脏内的 MT 含量在 12 h 时均开始逐渐受诱导升高,其中 Hg_1Cd 、 Hg_3Cd 、 Cd_1Hg 、 Cd_3Hg 处理组均显著增加,且 96 h 内 Hg^{2+} - Cd^{2+} 各处理组的平均诱导率分别略低于 Cd^{2+} - Hg^{2+} 对应组。这表明紫红笛鲷肝脏抗氧化防御系统发挥其清除 ROS 的功能后 MT 被显著诱导,与重金属离子结合消减重金属对肝脏的毒性作用,而混合胁迫下的 MT 诱导率较单一胁迫下低则反映了一定程度上水体中 Hg^{2+} - Cd^{2+} 混合状态下的拮抗作用。

3.2 MT 作为生物标志物的应用及影响因素

近年来,MT 作为水环境重金属污染的生物标志物研究已引起广泛关注,其监测方法亦处于不断丰富和完善中。与镉-血红蛋白亲和法^[29]相比,Elisa 法具有特异、简便及灵敏的特点^[30]。鱼体内的 MT 与水体环境和体内组织中的重金属之间有显著的相关性。林芃等^[17,30]采用 Elisa 法对不同水域、不同鱼种的组织器官 MT 含量研究发现其与水体中重金属有一定的相关性。此外,分子生物学技术在环境科学方面的应用,促进了水生生物金属硫蛋白基因序列克隆的发展,实时荧光定量 PCR 方面的研究亦多有报道^[11,31-32]。

今后的研究应量化水体-组织中重金属含量及其与 MT 含量的关系,同时,实验过程中应分析多种因素(如生物种类、大小、饵料丰歉、水温、污染物相互作用)的影响,从而提高生物标志物在渔业水域环境监测和污染预警方面的实际应用价值。

4 结论

(1)96 h 的半静水实验结果表明,水体汞、镉离子单一污染胁迫下,汞浓度组(0.5、1、10 $\mu g \cdot L^{-1}$ Hg^{2+})受诱导率分别为 17.9%、43.7%、51.8%;镉浓度组(5、10、100 $\mu g \cdot L^{-1}$ Cd^{2+})受诱导率分别为 4.3%、54.7%、84.9%。

(2) Hg^{2+} - Cd^{2+} 混合暴露下, Hg_1Cd 、 Hg_2Cd 、 Hg_3Cd 三个浓度组对鱼肝脏 MT 的诱导率均值依次为 22.8%、26.3%、51.7%; Cd_1Hg 、 Cd_2Hg 、 Cd_3Hg 的平均诱导率分别为 30.1%、26.4%、58.3%。单一、混合暴露下皆具有明显的时间-效应关系和剂量-效应关系,随着污染物浓度的升高和暴露时间的延长,鱼体肝脏 MT 的含量亦显著增加;混合暴露处理组的诱导率总

体上分别低于其单一暴露下的诱导率,反映出 Hg^{2+} - Cd^{2+} 离子混合状态下的拮抗作用。

参考文献:

- [1] Zhang W, Liu X, Cheng H, et al. Heavy metal pollution in sediments of a typical mariculture zone in South China[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2012, 64(4):712-720.
- [2] Zhang W, Feng H, Chang J, et al. Heavy metal contamination in surface sediments of Yangtze River intertidal zone: An assessment from different indexes[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(5):1533-1543.
- [3] Shariati F, Shariati S. Review on methods for determination of methallothioneins in aquatic organisms[J]. *Biological Trace Element Research*, 2010, 141(1-3):340-366.
- [4] Zhang L, Feng H, Li X, et al. Heavy metal contaminant remediation study of western Xiamen Bay sediment, China: Laboratory bench scale testing results[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2009, 172(1):108-116.
- [5] 蔡文超, 黄 韧, 李建军, 等. 生物标志物在海洋环境污染监测中的应用及特点[J]. 水生生态学杂志, 2012, 33(2):137-146.
CAI Wen-chao, Huang Ren, Li Jian-jun, et al. Applications and characteristics of biomarkers on monitoring of marine environmental pollution[J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(2):137-146.
- [6] 郑军恒, 李海洋, 茹 刚, 等. 金属硫蛋白清除羟自由基功能的研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 1999, 35(4):573-576.
ZHENG Jun-heng, LI Hai-yang, RU Gang, et al. Studies on the function of metallothionein to scavenge hydroxyl radical[J]. *Universitatis Pekinensis (Acta Scientiarum Naturalium)*, 1999, 35(4):573-576.
- [7] 马文丽, 王 兰, 何永吉, 等. 镉诱导华溪蟹不同组织金属硫蛋白表达及镉蓄积的研究[J]. 环境科学学报, 2008, 28(6):1192-1197.
MA Wen-li, WANG Lan, HE Yong-ji, et al. Cadmium accumulation and metallothionein in biosynthesis in the fresh-water crab *Sinopotamon henanense*[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(6):1192-1197.
- [8] 李春娣, 颜 文, 龙爱民, 等. Cu 暴露条件下翡翠贻贝(*Perna viridis*)消化腺内金属和类金属硫蛋白的变化[J]. 环境科学, 2007, 28(8):1788-1795.
LI Chun-di, YAN Wen, LONG Ai-min, et al. Metal accumulation and MTLTP induction in the digestive glands of *Perna viridis* exposed to Cu[J]. *Environmental Science*, 2007, 29(8):1788-1795.
- [9] 张保林, 卢景雾, 王文清, 等. 金属硫蛋白与红细胞的相互作用[J]. 生物化学与生物物理进展, 1994, 21(5):439-443, 476.
ZHANG Bao-lin, LU Jing-fen, WANG Wen-qing, et al. *In vitro* and *in vivo* interaction of metallothionein with erythrocyte[J]. *Prog Biochem Biophys*, 1994, 21(5):439-443.
- [10] Livingstone D R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment[J]. *Journal of Chemical Technology & Biotechnology*, 1993, 57(3):195-211.
- [11] 安立会, 郑丙辉, 付 青, 等. 以梭鱼金属硫蛋白基因表达监测海洋重金属污染[J]. 中国环境科学, 2011, 31(8):1383-1389.
AN Li-hui, ZHENG Bing-hui, FU Qing, et al. Metallothionein mRNA expression in wild redeye mullet(*Liza Haematocheila*) for monitoring marine heavy metal pollution[J]. *China Environmental Science*, 2011, 31(8):1383-1389.
- [12] Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F G, et al. The use of the oxidative stress responses as biomarkers in Nile tilapia(*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination[J]. *Environment International*, 2002, 27(8):673-679.
- [13] 关海红, 蔺玉华, 刘 伟. 汞在松浦鲤体内的转化及对鳃组织的损伤[J]. 大连水产学院学报, 2004, 19(1):58-61.
GUAN Hai-hong, LIN YU-hua, LIU Wei. Mercury distribution in body and damage to gill tissues in common carp[J]. *Journal of Dalian Fisheries University*, 2004, 19(1):58-61.
- [14] 王学锋, 陈海刚, 蔡文贵, 等. 汞离子胁迫对红鳍笛鲷抗氧化酶及乙酰胆碱酯酶活性的影响[J]. 水产学报, 2010, 34(12):1829-1836.
WANG Xue-feng, CHEN Hai-gang, CAI Wen-gui, et al. Effects of mercury exposure on the antioxidant enzymes and acetylcholinesterase activities in the young crimson snapper(*Lutjanus erythropterus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2010, 34(12):1829-1836.
- [15] 温茹淑, 郑清梅, 方展强, 等. 汞、铅对草鱼的急性毒性及安全浓度评价[J]. 安徽农业科学, 2007, 35(16):4863-4864, 4914.
WEN Ru-shu, ZHENG Qing-mei, FANG Zhan-qiang, et al. Acute toxicity of mercury and lead to grasscarps and safety assessment[J]. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 2007, 35(16):4863-4864, 4914.
- [16] 吴婷婷, 魏 华, 郭 敏, 等. 镉诱导鲤肝细胞内 Ca^{2+} -ATP 酶与金属硫蛋白的表达[J]. 水产学报, 2011, 35(6):824-830.
WU Ting-ting, WEI Hua, GUO Min, et al. Ca^{2+} -ATPase and metallothionein expressing induced by cadmium in the primary cultured hepatocytes of crucian carp(*Carassius auratus*)[J]. *Journal of Fisheries of China*, 2011, 35(6):824-830.
- [17] 林 芃, 任宏伟, 茹炳根. 鱼体内金属硫蛋白与水环境关系的研究[J]. 北京大学学报(自然科学版), 2001, 37(6):779-784.
LIN Peng, REN Hong-wei, RU Bing-gen. Study of metallothionein in fishes for Donghu aquatic environment[J]. *Universitatis Pekinensis (Acta Scientiarum Naturalium)*, 2001, 37(6):779-784.
- [18] 农业部渔政渔港监督管理局. GB 11607—1989 渔业水质标准[S]. 北京: 国家环境保护总局, 1989.
Bureau of Fishery Administration and Fishing Port Superintendence. GB 11607—1989 Water quality standard for fisheries[S]. Beijing: State Environmental Protection Administration, 1989.
- [19] Zhou Q, Zhang J, Fu J, et al. Biomonitoring: An appealing tool for assessment of metal pollution in the aquatic ecosystem[J]. *Analytica Chimica Acta*, 2008, 606(2):135-150.
- [20] Vega-López A, Jiménez-Orozco F A, García-Latorre E, et al. Oxidative stress response in an endangered goodeid fish(*Girardinichthys viviparus*) by exposure to water from its extant localities[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 71(1):94-103.
- [21] Valavanidis A, Vlahogianni T, Dassenakis M, et al. Molecular biomarkers of oxidative stress in aquatic organisms in relation to toxic environmental pollutants[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, 64(2):178-189.
- [22] Trudel M, Rasmussen J B. Bioenergetics and mercury dynamics in fish: A modelling perspective[J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2004, 61(1):1-11.

- Aquatic Sciences*, 2006, 63(8):1890-1902.
- [23] Reinfelder J R, Fisher N S, Luoma S N, et al. Trace element tropic transfer in aquatic organisms: A critique of the kinetic model approach [J]. *The Science of The Total Environment*, 1998, 219(2-3):117-135.
- [24] Pipe R K, Coles J A. Environmental contaminants influencing immune function in marine bivalve molluscs[J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 1995, 5(8):581-595.
- [25] 阮晓, 郑春霞, 王强, 等. 重金属在罗非鱼淡水白鲳和鲤鱼体内的蓄积[J]. 农业环境保护, 2001, 20(5):357-359.
RUAN Xiao, ZHENG Chun-xia, WANG Qiang, et al. Accumulation of heavy metal in *Tilapia nilotica*, *Colossoma brachypomum* and *Cyprinus carpio*[J]. *Agro-environmental Protection*, 2001, 20(5):357-359.
- [26] Reid S D, McDonald D G. Metal binding activity of the gills of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 1991, 48(6):1061-1068.
- [27] Hollis L, McGeer J C, McDonald D G, et al. Cadmium accumulation, gill Cd binding, acclimation, and physiological effects during long term sublethal Cd exposure in rainbow trout[J]. *Aquatic Toxicology*, 1999, 46(2):101-119.
- [28] Viarengo A, Moore M N, Mancinelli G, et al. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and accumulation in marine mussels: The effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene[J]. *Marine Biology*, 1987, 94(2):251-257.
- [29] 贾秀英, 施蔡雷, 刘晓旭. 镉致黑斑蛙肝脏氧化损伤与金属硫蛋白含量的变化[J]. 生态学报, 2010(2):416-420.
JIA Xiu-ying, SHI Cai-lei, LIU Xiao-xu. Effects of Cadmium on oxidative stress and metallothionein of liver in frog *Rana nigromaculata* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2010(2):416-420.
- [30] 林芑, 任宏伟, 茹炳根. 用酶联免疫吸附法测定鱼类体内金属硫蛋白[J]. 环境污染与防治, 2001, 23(5):265-267.
LIN Peng, REN Hong-wei, RU Bing-gen. Study for quantitative determination of metallothionein with enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) [J]. *Environmental Pollution & Control*, 2001, 23(5):265-267.
- [31] Evans C W, Wilson D, Mills G. Quantitative competitive RT-PCR as a tool in biomarker analysis[J]. *Biomarkers*, 2001, 6(1):7-14.
- [32] An L, Hu J, Zhang Z, et al. Quantitative real-time RT-PCR for determination of vitellogenin mRNA in soy mullet (*Mugil soiuy*) [J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2006, 386(7-8):1995-2001.