

不同水温下重金属镉诱导金属硫蛋白在鲫鱼组织中的表达

周彦锋, 吴 伟, 胡庚东, 尤 洋, 范立民, 孟顺龙, 陈家长

(农业部长江下游渔业资源环境重点野外科学观测试验站, 中国水产科学研究院内陆渔业生态环境和资源重点开放实验室, 中国水产科学研究院淡水渔业研究中心, 江苏 无锡 214081)

摘 要:以鲫鱼(*Carassius auratus*)为试验材料,研究了在一定环境条件下重金属镉的胁迫对鲫鱼不同组织中金属硫蛋白(MT)含量的影响。结果表明,平均体长为 (15.32 ± 0.63) cm、平均体重为 (310.6 ± 5.69) g的鲫鱼不同组织中的 MT 本底值存在着明显的差异($P < 0.01$),含量顺序为肝脏>肾脏;不同水温条件下鲫鱼相同组织中的 MT 本底值差异显著($P < 0.01$),鲫鱼肝脏中的 MT 本底值平均含量在水温 $(26.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 和 $(16.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ 时分别为 3.50 和 $3.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;肾脏中的 MT 平均含量分别为 3.20 和 $2.72 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$;不同水温下,经不同的暴露时间、不同暴露浓度的 Cd^{2+} 胁迫下 MT 在鲫鱼肝脏和肾脏中的表达趋势较为一致,都是呈先升高后稳定的状态,在试验后的 6 h 内的增加速率最大,MT 的含量在 12 h 时达到峰值。鲫鱼的肝脏和肾脏组织在 12 h 内 MT 的增加量与 Cd^{2+} 的浓度呈较好的相关性,表现出一定的剂量-效应关系,表明水体中的 Cd^{2+} 可诱导鲫鱼组织中 MT 的合成与表达,且主要诱导时间在 12 h 之内。相同 Cd^{2+} 质量浓度胁迫下,水温的改变不影响 Cd^{2+} 胁迫 MT 在鲫鱼组织中的表达趋势,但影响 MT 表达的量和速率,相同 Cd^{2+} 质量浓度下 MT 在鲫鱼组织中的表达含量和速率均随水温的升高而增加。

关键词:水温;重金属;镉;金属硫蛋白;鲫鱼;组织

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2009)11-2395-06

Metallothionein in Different Tissues of *Carassius auratus* Exposing to Cadmium Under Different Temperatures

ZHOU Yan-feng, WU Wei, HU Geng-dong, YOU Yang, FAN Li-min, MENG Shun-long, CHEN Jia-zhang

(Key Field Station of Observation and Research for Fishery Resources and Environment of the Lower Reaches of Yangtze River, Ministry of Agriculture. Key Laboratory of Ecological Environment and Resources of Inland Fisheries, Freshwater Fisheries Research Center, CAFS, Wuxi 214081, China)

Abstract: This research investigated the impact of waterborne cadmium on the content of metallothionein (MT) in liver and kidney of *Carassius auratus* in experimental condition. The result indicated that there was a significant differences of the background MT value in *Carassius auratus* tissues ($P < 0.01$). The MT concentration in liver was higher than that of kidney. The background MT average value in liver is $3.50 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and $3.25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ respectively under water temperature was $(26.5 \pm 1)^\circ\text{C}$ and $(16.5 \pm 1)^\circ\text{C}$, in kidney was $3.20 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ and $2.72 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$; The expression of MT in liver and kidney reached a peak at 12 h and then differently decreased at 24 to 48 h and kept stable, and the increasing rate was the highest in 6 h. The analysis relevant indicated there was a better positive correlation between the MT contents and the concentration of Cd^{2+} in 12 h. The change of water temperature cannot change the expression tendency of MT in *Carassius auratus* tissue, but influence the expression rate and contention of MT. The MT contents and expression rates in *Carassius auratus* tissue increased with the increasing of temperature at the same content of exposing to cadmium.

Keywords: water temperature; heavy metal; cadmium; metallothionein; *Carassius auratus*; tissue

收稿日期:2009-04-16

基金项目:中国水产科学研究院内陆渔业生态环境与资源重点开放实验室开放课题(YM2007-9)

作者简介:周彦锋(1979—),男,江苏无锡人,助研,主要从事水生生物研究。E-mail:zhouyf@ffrc.cn

通讯作者:陈家长 E-mail:chenjz@ffrc.cn

水污染是当今人类社会面临的最为紧迫的问题之一,其中尤以镉(Cd)污染最为突出。Cd具有在环境中存留时间长、不易消除、可在生物体内富集等特点,对生物体的影响比较严重。Cd主要是通过水及食品的途径进入生物机体,与生物体内的巯基蛋白结合,使多种酶的活性抑制或灭活,引起肝、肾功能损伤、骨质变异导致骨质疏松,神经病变造成疼痛等^[1]。基于水产动物是水环境-水产品-人体这一食物链中的重要环节,因此有必要对水产品的Cd污染加以深入研究和监控。

已有资料表明,金属硫蛋白(metallothionein, MT)是影响Cd毒性作用的重要因素之一^[2]。MT是一类相对低分子量(6~7 kDa)、富含半胱氨酸、能够结合金属的蛋白或多肽^[3]。已有的研究表明,重金属铜、镉等能诱导生物机体中MT的合成^[4],由于水生生物体内的MT与水环境和体内组织中的重金属之间有显著的相关性,20世纪70年代末即有人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,以期确定水环境污染程度提供综合和客观的指标^[5]。目前国内外对MT的研究已涉及环境科学、毒理学、食品科学等多个领域。但研究主要是集中在MT的结构、控制基因和单一的影响因子诱导等方面^[6-7]。鲫鱼(*Carassius auratus*)是淡水中广泛分布的鲤科经济鱼类,常见于中国的各大水系。鲫鱼分布广,数量大,适应性强,容易在实验室内饲养,对毒物的敏感性较强,是比较理想的水生毒理学试验材料^[8]。因此,本文研究了在不同水温下,经不同的暴露时间,不同暴露浓度的Cd²⁺诱导MT在鲫鱼肝脏和肾脏中的表达,以期评价重金属Cd对鱼类的安全性提供相应的毒理学资料,为我国淡水生态系统的保护和水产品质量控制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 仪器和试剂

2-16K低温冷冻离心机(SIGMA),7530型原子吸收分光光度计(Agilent),10 mL玻璃匀浆器,水族箱,充氧机,电子分析天平,恒温烘箱等。

氯化镉(CdCl₂·2.5H₂O,分析纯,AR.)、盐酸(HCl,分析纯,AR.)(上海化学试剂厂产品);红细胞溶血素(浙江省玉环县南方试剂厂产品);三羟甲基氨基甲烷(Tris,分析纯,AR.)(上海生工生物工程公司产品);其他试剂均为分析纯,为上海化学试剂厂产品。

1.2 试验用鱼

试验用鱼为健康的鲫鱼,由淡水渔业研究中心鱼类试验场提供,平均体长为(15.32±0.63)cm,平均体重为(310.6±5.69)g。试验前经筛选并在水族箱中驯养14 d以上,采用电磁式空气压缩机不间断地充氧,以保证养殖水体中的溶氧水平。驯养期间的光暗比为14 h:10 h,鱼类的自然死亡率低于1%。选择活动性强的健康鲫鱼作为试验用鱼。驯养期间每日定时投自制的颗粒饵料。为防止饵料与试验物质反应,试验前1 d开始禁食。试验在250 L玻璃水族箱中进行,水体的有效体积为100 L,载鱼量为30尾。

1.3 试验用水

试验用水为曝气3 d后除氯的自来水,pH值为7.0~7.2,总硬度为1.38~1.40 mmol·L⁻¹,溶解氧量保持在5 mg·L⁻¹以上。水中含0.05 mg·L⁻¹的Fe³⁺,而Zn、Pb、Cu和Cd未检出;水质COD为1.56~1.78 mg·L⁻¹。所有水质指标均符合GB 11607-89渔业水质标准的要求。

1.4 鱼类染毒方法

鱼类的染毒方式采用静态水质接触染毒。在水族箱中放入试验液100 L,选择体质健壮的受试鱼30尾放入。试验设空白对照组1个,水温为(26.5±1)℃和(16.5±1)℃,分别设置试验浓度组5个,同时做2个平行。试验期间每天换水50%,并补足Cd²⁺至原有的质量浓度。

试验浓度的选择以GB 11607-89渔业水质标准中Cd²⁺的标准值(0.005 mg·L⁻¹)为基准,分别选择该标准及其2倍、10倍、20倍、100倍的浓度为试验浓度梯度,即0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 mg·L⁻¹。通过添加CdCl₂·2.5H₂O获得Cd²⁺。

1.5 样品组织的预处理

分别在染毒后的6、12、24、48、72和96 h对试验组进行取样,分析不同温度和质量浓度Cd²⁺暴露下MT在鲫鱼不同组织中的表达。自每个浓度组的2个平行样中随机抽取试验鱼3条,用纱布擦干其表面并解剖;肝脏取约0.4 g,肾脏全部取出。用预冷至4℃的生理盐水洗净组织上的血液,用吸水纸吸干并称重。

1.6 样品中MT的分析测定

MT含量的测定采用金属/血红蛋白饱和法,具体参照文献[9]。将取出的组织样品按照1:4的重量(g)体积(mL)比加入pH值为8.3的Tris-HCl缓冲液,冰浴匀浆,然后将匀浆液在0℃、10 000 r·min⁻¹下离心30 min。取0.2 mL上清液加入1 mg·mL⁻¹的Cd²⁺充分混合,室温下放置15 min,再加入0.2 mL红细胞溶血素^[9]。充

分混合后放入 80 ℃水浴中 3 min,然后在 0 ℃、10 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,取出上清液。重复 2 次加红细胞溶血素的步骤,最后将上清液全部取出,用火焰原子吸收分光光度法测定上清液中 Cd²⁺的含量。

因 1 mol MT 可结合 7 mol Cd²⁺(原子量为 112.4),MT 的分子量按 9799 计^[10],故鲫鱼每克组织中 MT 含量的计算公式为:

$$MT(\mu g \cdot g^{-1}) = C_{Cd} \times V \times 9799 \times S / G \times (7 \times 112.4 \times N)$$

式中: C_{Cd} 为上清液中 Cd 的浓度, $\mu g \cdot mL^{-1}$; S 为测定体积, mL; G 为组织取样质量, g; V 为组织匀浆体积, mL; N 为匀浆后的取样体积, mL。

1.7 数据处理

试验数据采用平均数±标准差的形式表示,采用 t -test 进行差异性和显著性检验。

2 结果与讨论

2.1 不同温度和质量浓度 Cd²⁺暴露下金属硫蛋白在鲫鱼肝脏中的表达

在整个试验期间,水温(16.5±1)℃时对照组鲫鱼肝脏中 MT 的含量为(3.02±0.22)~(3.47±0.38) $\mu g \cdot g^{-1}$,水温(26.5±1)℃时对照组鲫鱼肝脏中 MT 的含量为(3.40±0.33)~(3.56±0.14) $\mu g \cdot g^{-1}$,在同一水温条件下,鲫鱼肝脏中 MT 的本底值变化不显著($P>0.05$),相对比较稳定;水温(16.5±1)℃鲫鱼肝脏中 MT 本底值的

平均含量为 3.25 $\mu g \cdot g^{-1}$, 低于 (26.5±1)℃时的 3.49 $\mu g \cdot g^{-1}$, 表明随着水温的升高鲫鱼肝脏 MT 的本底值也逐渐增加,不同水温条件,鲫鱼肝脏中 MT 的本底值差异显著($P<0.05$)。

不同水温下,经不同的暴露时间,不同暴露浓度的 Cd²⁺胁迫下 MT 在鲫鱼肝脏中的表达(表 1)呈现相同的趋势,即在受试后开始增高,6 h 时为(3.56±0.14)~(6.87±0.42) $\mu g \cdot g^{-1}$,与对照组有明显差异($P<0.01$);12 h 时达到高峰,达(3.98±0.42)~(9.50±0.11) $\mu g \cdot g^{-1}$,随后略有下降并保持稳态,但与对照组相比仍有差异($P<0.01$)。试验同时发现,在试验开始后的 12 h 内,鲫鱼肝脏中 MT 含量的增加与重金属 Cd²⁺的浓度呈正相关,12 h 时,(16.5±1)℃和(26.5±1)℃温度下肝脏中 MT 的增加量与 Cd²⁺浓度回归方程分别为:

$$Y_1(\Delta MT, \mu g \cdot g^{-1}) = 5.185X(C_{Cd}, mg \cdot L^{-1}) + 1.351 \text{ (相关系数 } r_1 = 0.9336, n = 6)$$

$$Y_2(\Delta MT, \mu g \cdot g^{-1}) = 1.1007X(C_{Cd}, mg \cdot L^{-1}) - 0.9261 \text{ (相关系数 } r_2 = 0.9678, n = 6)$$

试验结果表明,在一定浓度的重金属 Cd²⁺胁迫下,鲫鱼肝脏中 MT 的含量会发生动态变化,这种变化在试验后的 12 h 内呈一定的剂量-效应关系。

从 MT 增加量来看,(16.5±1)℃时鲫鱼肝脏中 MT 的最大诱导量 3.71 $\mu g \cdot g^{-1}$ 低于(26.5±1)℃时肝脏 MT 的最大诱导量 5.96 $\mu g \cdot g^{-1}$;从 MT 的增加速率来看,

表 1 不同温度和质量浓度 Cd²⁺诱导下 MT 在鲫鱼肝脏的含量

Table 1 Contents of MT in liver of *Carassius auratus* under different concentrations of cadmium and different temperatures

镉浓度/mg·L ⁻¹	温度/℃	肝脏中 MT 含量/ $\mu g \cdot g^{-1}$						
		0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0**	16.5*	3.02±0.22	3.18±0.24	3.32±0.37	3.02±0.22	3.41±0.12	3.32±0.34	3.47±0.38
	26.5*	3.54±0.33	3.56±0.14	3.40±0.33	3.53±0.26	3.56±0.16	3.45±0.12	3.40±0.33
0.005***	16.5	3.02±0.22	3.47±0.22	3.98±0.42	3.98±0.14	3.77±0.22	3.76±0.28	3.86±0.24
	26.5	3.54±0.33	4.33±0.37	5.26±0.35	4.72±0.29	4.75±0.34	4.78±0.42	4.82±0.27
0.01***	16.5	3.02±0.22	3.77±0.34	4.44±0.51	4.27±0.34	4.42±0.36	4.40±0.62	4.37±0.42
	26.5	3.54±0.33	5.55±0.12	6.22±0.21	5.76±0.22	5.95±0.23	5.90±0.32	5.72±0.37
0.05***	16.5	3.02±0.22	4.37±0.42	5.43±0.28	5.33±0.54	5.28±0.32	5.36±0.24	5.31±0.44
	26.5	3.54±0.33	5.96±0.35	6.64±0.44	6.35±0.47	6.43±0.31	6.25±0.29	6.36±0.34
0.1***	16.5	3.02±0.22	4.69±0.42	5.95±0.32	5.87±0.24	5.35±0.56	5.79±0.34	5.87±0.24
	26.5	3.54±0.33	6.60±0.56	7.81±0.37	6.82±0.26	6.71±0.21	6.80±0.27	6.87±0.45
0.5***	16.5	3.02±0.22	5.86±0.24	6.73±0.32	6.45±0.62	6.54±0.42	6.33±0.44	6.64±0.42
	26.5	3.54±0.33	6.87±0.42	9.50±0.11	7.60±0.47	6.98±0.37	6.94±0.22	7.69±0.41

注:* 表示同一水温条件下,肝脏中 MT 的本底值变化不显著($P>0.05$);** 表示不同水温条件下,肝脏中 MT 的本底值差异显著($P<0.05$);*** 表示镉诱导肝脏中 MT 的含量与对照组差异极显著($P<0.01$)。

Note:* Significant background value of MT in liver no significant change in the same temperature($P>0.05$); ** Significant differences background value of MT in liver in the different temperature($P<0.05$); *** Significant differences contents of MT in liver of *Carassius auratus* under different concentrations of cadmium between the two groups in the same temperature($P<0.01$).

(16.5±1)℃时各试验组 6 h 的 MT 增加速率为 0.08~0.47 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 在整个试验周期中为最大;(26.5±1)℃时各试验组 6 h 的 MT 增加速率为 0.130~0.554 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{h}^{-1}$, 同样在整个试验周期中为最大。试验结果表明水温的改变并不影响 Cd^{2+} 对鲫鱼肝脏 MT 诱导趋势, 但是影响 Cd^{2+} 诱导 MT 的速率和含量, 水温越高诱导肝脏 MT 的速率和含量越大。

2.2 不同温度和质量浓度 Cd^{2+} 暴露下金属硫蛋白在鲫鱼肾脏中的表达

由表 2 可见, 在整个试验期间, 水温 (16.5±1)℃ 时对照组鲫鱼肾脏中 MT 的含量为 (2.66±0.24)~(2.85±0.16) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 水温 (26.5±1)℃ 时对照组鲫鱼肾脏中 MT 的含量为 (3.09±0.19)~(3.32±0.06) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 在同一水温条件下, 鲫鱼肾脏中 MT 的本底值变化不显著 ($P>0.05$), 表明在没有外源重金属污染物的作用下, 鲫鱼肾脏组织中的 MT 在一定的时间内 (96 h) 稳定在一个相对较小的范围内, 因此可用其作为生物标志来评价外源重金属的污染; 水温 (16.5±1)℃ 时鲫鱼肾脏中 MT 本底值的平均含量为 2.72 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 低于 (26.5±1)℃ 时的 3.20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 差异极显著 ($P<0.01$), 表明水温影响鲫鱼组织中 MT 的本底值。因此, 以鱼类组织中 MT 的变化来评价水体重金属污染时必须设立对照组, 以此作为评价的参比。

不同水温条件下, 不同暴露浓度的 Cd^{2+} 胁迫下

MT 在鲫鱼肾脏中的表达 (表 2) 呈现相同的趋势, 即在受试后开始增高, 6 h 时为 (2.96±0.21)~(6.46±0.19) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 与对照组有明显差异 ($P<0.01$); 12 h 时达到高峰, 达 (3.63±0.28)~(8.28±0.36) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 随后略有下降并保持稳态, 但与对照组相比仍有极显著差异 ($P<0.01$)。从时间-效应关系可以看出, 鲫鱼接触 Cd^{2+} 6 h 时已有 MT 产生, 12 h 时 MT 含量达到峰值, 24 h 后 MT 含量开始下降并在试验时间内趋于稳定。目前研究表明, 金属对 MT 的诱导反应是发生在转录水平上, 通过位于 MT 基因 5'-端的金属调节因子实现, 接触金属后, 由于 MT 基因转录速度增加而引起 MT-mRNA 表达^[11], 所以接触染毒 6 h 内鲫鱼组织中已有 MT 合成; 同时 MT 作为应激蛋白, 其诱导表达是有一定限度的, 在一定的重金属暴露浓度及时间范围内, 其表达量随重金属浓度增加而升高, 但是当重金属浓度持续增加, 暴露时间持续延长, MT 转而呈下降趋势, 这与 Silvestre^[12] 的研究相符。48 h 后 MT 含量维持在一定的水平上, 是由于各组织中 Cd 离子蓄积已经达到饱和, MT 含量已经基本达到它自身诱导量的域值, 同时 MT 在组织中与 Cd 结合不稳定且自身代谢速度加快^[13]; 另外有研究表明 MT 的诱导可能与钙通道的调节有关^[14], 48 h 后细胞的钙离子通道可能被阻断。试验同时发现, 在试验开始后的 12 h 内, 鲫鱼肾脏中 MT 含量的增加与重金属 Cd^{2+} 的浓度呈正相关,

表 2 不同温度和质量浓度 Cd^{2+} 诱导下 MT 在鲫鱼肾脏的含量

Table 2 Contents of MT in kidney of *Carassius auratus* under different concentrations of cadmium and different temperatures

镉浓度/ $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	温度/℃	肾脏中 MT 含量/ $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$						
		0 h	6 h	12 h	24 h	48 h	72 h	96 h
0**	16.5*	2.66±0.24	2.79±0.38	2.58±0.24	2.66±0.25	2.76±0.14	2.85±0.16	2.74±0.16
	26.5*	3.32±0.06	3.26±0.12	3.15±0.06	3.23±0.04	3.13±0.12	3.09±0.19	3.21±0.13
0.005***	16.5	2.66±0.24	2.96±0.21	3.63±0.28	3.59±0.24	3.16±0.34	3.36±0.14	3.21±0.08
	26.5	3.47±0.06	4.42±0.18	4.78±0.12	4.47±0.34	4.62±0.11	4.59±0.26	4.70±0.05
0.01***	16.5	2.66±0.24	3.26±0.24	3.96±0.14	3.95±0.24	3.88±0.34	3.90±0.14	3.90±0.14
	26.5	3.47±0.06	4.87±0.03	5.14±0.36	5.10±0.07	4.87±0.06	4.96±0.27	4.94±0.17
0.05***	16.5	2.66±0.24	4.05±0.24	4.46±0.21	4.37±0.34	4.29±0.11	4.33±0.12	4.36±0.24
	26.5	3.47±0.06	5.12±0.29	6.06±0.33	5.69±0.42	5.81±0.01	5.77±0.16	5.76±0.22
0.1***	16.5	2.66±0.24	4.24±0.38	4.69±0.24	4.24±0.24	4.55±0.28	4.25±0.25	4.36±0.24
	26.5	3.47±0.06	5.98±0.26	6.71±0.14	6.43±0.31	6.34±0.13	6.42±0.37	6.38±0.12
0.5***	16.5	2.66±0.24	4.80±0.14	5.33±0.24	5.00±0.34	5.20±0.18	4.99±0.24	4.86±0.21
	26.5	3.47±0.06	6.46±0.19	8.28±0.36	7.69±0.31	7.59±0.33	7.72±0.27	7.52±0.33

注: * 表示同一水温条件下, 肾脏中 MT 的本底值变化不显著 ($P>0.05$); ** 表示不同水温条件下, 肾脏中 MT 的本底值差异显著 ($P<0.05$); *** 表示同一水温条件下, 不同质量浓度镉诱导鲫鱼肾脏中 MT 的含量与对照组差异极显著 ($P<0.01$)。

Note: * Significant background value of MT in kidney no significant change in the same temperature ($P>0.05$); ** Significant differences background value of MT in kidney in the different temperature ($P<0.05$); *** Significant differences contents of MT in kidney of *Carassius auratus* under different concentrations of cadmium between the two groups in the same temperature ($P<0.01$).

(16.5±1)℃和(26.5±1)℃时,12 h时肝脏中MT的增加量与Cd²⁺的回归方程分别为:

$Y_3(\Delta MT, \mu g \cdot g^{-1}) = 3.138X(C_{Cd}, mg \cdot L^{-1}) + 1.183$ (相关系数 $r_3 = 0.9543, n = 6$)

$Y_4(\Delta MT, \mu g \cdot g^{-1}) = 3.0588X(C_{Cd}, mg \cdot L^{-1}) + 0.3477$ (相关系数 $r_4 = 0.9170, n = 6$)

2.3 鲫鱼肝脏和肾脏中金属硫蛋白表达的差异

从MT增加量来看,(16.5±1)℃时鲫鱼肝脏中MT的最大诱导量为3.71 $\mu g \cdot g^{-1}$,是对照组的1.39倍;(26.5±1)℃时肝脏MT的最大诱导量为5.96 $\mu g \cdot g^{-1}$,是对照组的1.80倍;从MT的增加速率来看,(16.5±1)℃和(26.5±1)℃时各试验组6 h的MT增加速率分别为0.05~0.36 $\mu g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$ 和0.18~0.52 $\mu g \cdot g^{-1} \cdot h^{-1}$,分别在整个试验周期中为最大。试验结果表明,在一定浓度的重金属Cd²⁺胁迫下,鲫鱼肾脏中MT的含量会发生动态变化,这种变化在试验后的12 h内呈一定的剂量-效应关系;试验结果表明,水温的改变虽然不影响Cd²⁺对鲫鱼组织MT的诱导规律,但是影响Cd²⁺诱导MT的速率和含量,相同质量浓度Cd²⁺胁迫下,(26.5±1)℃时鲫鱼组织中MT的含量高于(16.5±1)℃时鲫鱼组织MT含量,差异极显著($P < 0.01$)。这是因为(26.5±1)℃时水体中Cd²⁺的毒性强于(16.5±1)℃时Cd²⁺的毒性^[15],同时(26.5±1)℃时鲫鱼的活动能力增强,从而导致了鲫鱼组织MT诱导效果随着水温的升高而增强。

本次试验结果显示,Cd²⁺对鲫鱼肝脏和肾脏两种组织MT含量诱导能力为肝脏>肾脏,导致这一结果的原因可能与鱼体不同组织对重金属的蓄积和富集能力不同有关。曾有研究指出^[16],鱼体组织对重金属Zn²⁺的蓄积和富集能力为肝脏>肾脏。肝脏中存留MT量较高,这是因为肝脏是体内各种物质合成的重要器官^[17],同时肝脏作为机体对外源物质的代谢解毒组织,其与外源毒物的接触程度最高,其可保持较长时间的作用能力^[18],肝脏中MT含量高的特点也表明了肝脏在鱼类代谢上的重要性。

3 结论

(1)平均体长为(15.32±0.63)cm、平均体重为(310.6±5.69)g的鲫鱼不同组织中的MT本底值存在着明显的差异,含量顺序为肝脏>肾脏。在同一水温条件下,鲫鱼相同组织中的MT本底值差异不显著,相对比较稳定。不同水温条件下鲫鱼相同组织中的MT本底值差异显著,鲫鱼组织中的MT本底值随水温的

升高而增加。

(2)不同水温下,经不同的暴露时间,不同暴露浓度的Cd²⁺胁迫下MT在鲫鱼肝脏和肾脏中的表达趋势较为一致,都是呈先升高后稳定的状态,在试验后的6 h内的增加速率最大。鲫鱼的肝脏和肾脏组织在12 h内MT的增加量与Cd²⁺的浓度呈较好的相关性,表现出一定的剂量-效应关系,表明水体中的Cd²⁺可诱导鲫鱼组织中MT的合成与表达,且主要诱导时间在12 h之内。

(3)相同Cd²⁺质量浓度胁迫下,水温的改变不影响Cd²⁺胁迫MT在鲫鱼组织中的表达趋势,但是影响MT表达的量和速率,相同Cd²⁺质量浓度下MT在鲫鱼组织中的表达含量和速率随水温的升高而增加。

(4)鲫鱼肝脏和肾脏组织中的MT可用来作为评价外源重金属污染的生物标志物指标,对于Cd来讲,首选的靶组织是肝脏。

参考文献:

- [1] 周启星,孔繁翔,朱琳.生态毒理学[M].北京:科学出版社,2004:4-182,334-343.
ZHOU Qi-xing, KONG Fan-xiang, ZHU Lin. Ecotoxicology: principles and methods[M]. Beijing: Science Press, 2004: 4-182, 334-343.
- [2] 林芃,茹炳根,任宏伟.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, RU Bing-gen, REN Hong-wei. Study of metallothionein in fishes for donghu aquatic environment[J]. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis*, 2001, 37(6): 779-784.
- [3] Kagi J H R, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein[J]. *Biochemistry*, 1988, 27: 8509-8515.
- [4] 牛长缨,姜勇,雷朝亮,等.无脊椎动物金属硫蛋白的研究[J]. 动物学杂志, 2002, 37(1): 72-76.
NIU Chang-ying, JIANG Yong, LEI Chao-liang, et al. Studies of invertebrate metallothionein[J]. *Chinese Journal of Zoology*, 2002, 37(1): 72-76.
- [5] Livingstone D R. Biotechnology and pollution monitoring: Use of molecular biomarkers in the aquatic environment[J]. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, 1993, 58: 195-211.
- [6] 常秀丽.金属硫蛋白及其在镉接触评价中的应用[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 35(1): 32-36.
CHANG Xiu-li. Metallothionein and its application in toxicological assessment of cadmium exposure[J]. *Foreign Medical Sciences (Section Hygiene)*, 2004, 35(1): 32-36.
- [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): 1192-1198.
MA Wen-li, WANG Lan, HE Yong-ji, et al. Cadmium accumulation and metallothionein biosynthesis in the freshwater crab sinopotamon henanense[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2008, 28(6): 1192-1198.

- [8] 吴端生, 王宗保. 鱼类试验动物开发与应用研究的现状及展望[J]. 中国试验动物学杂志, 2000, 10(2): 103-109.
WU Duan-sheng, WANG Zong-bao. Current state and prospects of application and exploitation of fish as laboratory animal [J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2000, 10(2): 103-109.
- [9] 戴建国, 陈景衡, 杨森. 镉饱和法测定小白鼠肝中金属硫蛋白[J]. 南京医科大学学报, 1995, 15(3): 722-724.
DAI Jian-guo, CHEN Jing-heng, YANG Sen. Cadmium-Saturation method for determination of mousehepatic metallothionein[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Nanjing*, 1995, 15(3): 722-724.
- [10] 任宏伟, 王文清, 茹炳根, 等. 鲫鱼金属硫蛋白的提纯及性质研究[J]. 生物化学与生物物理进展, 1993, 20(4): 281-285.
REN Hong-wei, WANG Wen-qing, RU Bing-gen, et al. Purification and identification of metallothionein from carassius auratu liver induced by cadmium chloride[J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1993, 20(4): 281-285.
- [11] Unger M E, Roesi jadi G. Increase in metallothionein mRNA accumulation during Cd challenge in oyster exposed to Cd[J]. *Aquatic Toxicology*, 1996, 34: 185-193.
- [12] Silvestre F, Duchene C, Trausch G, et al. Tissue-specific cadmium accumulation and metallothionein-like protein levels during acclimation process in the Chinese crab[J]. *Eriocheir Sinensis Comparative Biochemistry and Physiology (Part C)*, 2005, 140: 39-45.
- [13] 茹炳根, 潘爱华, 黄秉乾, 等. 金属硫蛋白[J]. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(4): 254-259.
RU Bing-gen, PAN Ai-hua, HUANG Bing-qian, et al. Metallothionein [J]. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 1991, 18(4): 254-259.
- [14] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 110-115.
FANG Yun-zhong, ZHENG Rong-liang. Theory and application of free radical[M]. Beijing: Science Press, 2002: 110-115.
- [15] 党秀丽, 陈彬, 虞娜, 等. 温度对外源性重金属镉在土-水界面间形态转化的影响[J]. 生态环境, 2007, 16(3): 794-798.
DANG Xiu-li, CHEN Bin, YU Na, et al. Effect of temperature on the transformation of cadmium fractionation in soil[J]. *Ecology and Environment*, 2007, 16(3): 794-798.
- [16] Chowdhury M J, Baldisserotto B, Wood C M. Tissue-specific cadmium and metallothionein levels in rainbow trout chronically acclimated to waterborne or dietary cadmium [J]. *Archives Environmental Contamination and Toxicology*, 2005, 48: 381-390.
- [17] 常晋娜, 瞿建国. 水体中重金属污染的生态效应及生物监测 [J]. 四川环境, 2005, 25(4): 29-33.
CHANG Jin-na, QU Jian-guo. Heavy metal pollution in water body: Ecological effects and biological monitoring[J]. *Sichuan Environment*, 2005, 25(4): 29-33.
- [18] AI-Yousuf M H, EI-shahawi M S. Trace metal in the liver, skin and muscle of lethrinus lentijan fish species in relation to body length and sex[J]. *the Science of Total Environmental*, 2000, 256(2-3): 87-94.