

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

李春娣^{1,3}, 颜文^{1*}, 龙爱民², 马福俊^{2,3}, 陈绍勇²

(1. 中国科学院南海海洋研究所边缘海地质重点实验室, 广州 510301; 2. 中国科学院南海海洋研究所热带海洋环境动力学重点实验室, 广州 510301; 3. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:通过室内急性暴露实验研究了翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 消化腺富集 Cu 及其 MTLP (metallothionein like protein) 水平随时间的变化规律。结果表明, 2 种 Cu 浓度暴露条件下 (12.7 $\mu\text{g/L}$ 和 63.5 $\mu\text{g/L}$), 贻贝消化腺内 Cu 的平均吸收速率分别为 2.045 和 7.028 $\mu\text{g}\cdot(\text{g}\cdot\text{d})^{-1}$, 富集系数分别为 2074 和 1619。实验测定了所有样本的溶解态 Cu 与总 Cu 含量, 2 个暴露组二者的比值随时间呈现出不同的变化趋势, 低浓度组先降低随后上升到与对照样本几乎相同的水平, 而高浓度组一直呈下降趋势, 表明不同污染程度生物体内金属消化机制进程存在差异。利用 Brdicka 极谱法测定了贻贝消化腺内 MTLP 的含量, 对照组贻贝消化腺的 MTLP 平均含量为 $(0.551 \pm 0.037)\text{mg/g}$; 12.7 $\mu\text{g/L}$ Cu 暴露组 MTLP 含量随时间的变化范围是 0.407 ~ 0.699 mg/g, 而 63.5 $\mu\text{g/L}$ Cu 暴露组在暴露初始 MTLP 水平就显著增加 ($p < 0.001$), 变化范围由初始 0.942 mg/g 降至 0.826 mg/g。分析结果表明贻贝消化腺内的 MTLP 水平随着水体及生物体内的金属含量升高而增加, 并与体内 Cu 浓度成明显的负指数增长关系 ($p < 0.0001$)。

关键词: 翡翠贻贝; Cu; 类金属硫蛋白; Brdicka 极谱法

中图分类号: X503.2 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2007)08-1788-08

Metal Accumulation and MTLP Induction in the Digestive Glands of *Perna viridis* Exposed to Cu

LI Chun-di^{1,3}, YAN Wen¹, LONG Ai-min², MA Fu-jun^{2,3}, CHEN Shao-yong²

(1. Key Laboratory of Marginal Sea Geology, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 2. Key Laboratory of Tropical Marine Environmental Dynamics, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China; 3. Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Mussels have been proposed as appropriate biomonitors of marine pollution, especially for monitoring metallic pollution based on variations of metallothionein as biomarkers. Under 2 exposure levels (12.7 $\mu\text{g/L}$, 63.5 $\mu\text{g/L}$), Cu accumulation and metallothionein-like protein (MTLP) induction by mussel (*Perna viridis*) digestive glands were investigated and simulated into dynamic models in the present work, and the soluble and total Cu burden of digestive glands were also determined. Calculated mean Cu uptake rates by mussel target organ were 2.045 and 7.028 $\mu\text{g}\cdot(\text{g}\cdot\text{d})^{-1}$ respectively, and the theoretical equilibrium kinetic BCFs of Cu were 2074 and 1619 correspondingly. And within the exposure duration, different changing trends of ratio of soluble Cu to total Cu in digestive glands were observed in the two groups. The MTLP level of control samples was $(0.551 \pm 0.037)\text{mg/g}$, and the counterparts are 0.407 ~ 0.699 mg/g, 0.826 ~ 0.942 mg/g respectively when mussels were exposed to 12.7 $\mu\text{g/L}$ and 63.5 $\mu\text{g/L}$ Cu solutions. Statistically significant MTLP induction ($p < 0.001$) was observed under higher exposure level. MTLP contents in digestive glands increased with the exposure Cu concentration and body accumulation of metal. There is a significantly negative exponential rise relationship ($p < 0.0001$) between MTLP and Cu concentrations accumulated in the digestive glands of mussels.

Key words: *Perna viridis*; Cu; metallothionein like protein; Brdicka reaction

重金属污染是工业生产的伴发现象, 电池废物、皮革制剂、采矿冶炼、工厂突发泄漏事件等都是环境中高致毒性金属的来源^[1,2]。重金属不容易被降解, 能够通过食物链传递富集而危害生态健康。海水中窗体顶端窗体底端重金属能通过水相或者食物相在海洋生物体内富集, 通常生物机体会迅速地发出应激信号, 调整一系列的生理机制来缓解和消除金属胁迫, 如增加金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 的合成。

作为重金属污染的早期预警指标, 海洋生物金属硫蛋白的分析测定及其与重金属污染的关系是目前海洋环境研究的热点领域^[3~7], 国内还鲜见相关

收稿日期: 2006-10-23; 修订日期: 2007-01-23

基金项目: 国家自然科学基金项目 (40646031); 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-227); 广东省科技计划项目 (2006B36601005, 2005B33201007); 广东省自然科学基金项目 (06023662)

作者简介: 李春娣 (1978 ~), 女, 博士研究生, 主要研究方向为海洋生物地球化学, E-mail: Licd@scsio.ac.cn
* 通讯联系人, E-mail: wyan@scsio.ac.cn

的测试报道. MT 是一类低分子量、富含半胱氨酸、能大量结合金属离子的蛋白质, 其二级结构中不含 α -helix, 也不含 β -sheet, 但含有一定量的 β -turn, 这样形成的僵硬结构使 MT 具有很强的热稳定性及抗蛋白酶消化能力^[8~10]. MT 的结构和性质决定了这类蛋白在新陈代谢过程中担当的主要生理作用是均质化生物体内的必需金属元素, 以及络合固定游离金属以完成体内解毒过程. 金属硫蛋白在大部分生物体内都存在, 在一些低等动物和植物体内发现的金属结合蛋白同样富含巯基(—SH), 具有经典的金属硫蛋白性质, 但并不完全符合上述 MT 的定义, 通常被称为类金属硫蛋白 (metallothionein like protein, MTLP) 或金属硫肽 (metallothiopeptide, MP)^[11, 12].

贻贝是营足丝附着生活的滤食性双壳类软体动物, 主要以小型浮游生物、有机碎屑和微生物为食. 因其摄食和附着生活方式, 体内容易富集重金属等污染物, 能反映所在水域的环境变化状况, 被认为是最好的检测 MT 指标的环境监测生物^[3, 12, 13]. 贻贝具有分布广、适应性强等特点, 主要有紫贻贝 (*Mytilus edulis*)、翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 和厚壳贻贝 (*Mytilus coruscus*) 等种类, 其中翡翠贻贝在广东省沿海广泛分布.

Cu 是生命过程必需的一种痕量金属元素, 但若体内浓度超过限值, 对生物具有非常大的毒性, 短期内可致死. 通过野外采集生物样品, 测试相关污染指标来反映环境状况的研究已开展得较多, 测试结果可能受到复杂的环境因素以及生物差异的影响. 通过室内急性暴露实验, 可以控制相对稳定的实验条件, 这对揭示各个指标间潜在的相互关系具有优越性. 本实验以翡翠贻贝 (*Perna viridis*) 为材料, 采用室内急性暴露实验方法研究了贻贝消化腺器官富集 Cu 的规律, 以及 MTLP 的动力学变化, 探讨了 Cu 暴露对贻贝体内 MTLP 变化的影响特征, 以期为海洋环境监测指标体系的完善提供了理论依据.

1 材料与方法

1.1 生物暴露实验

生物暴露实验于 2006-05 中旬在中国科学院大亚湾海洋生物综合实验站进行. 贻贝样品采自大亚湾近海浮筏养殖区, 选取生长健康、体长接近的个体 120 只 ($6.5 \text{ cm} \pm 0.3 \text{ cm}$), 在实验室内驯养 48 h, 待其排空消化道杂物, 将其暴露于不同浓度的金属条件下. 使用经实验室过滤系统处理的新鲜海水作为暴露水体 (其 Cu 浓度在仪器检测限以下), 实验设置

2 组 Cu 暴露浓度, 分别为 $12.7 \mu\text{g/L}$ 和 $63.5 \mu\text{g/L}$. 暴露容器为 20 L 塑料容器, 每个暴露组饲养贻贝 40 只左右, 设置对照组. 为保持海水新鲜和暴露金属浓度恒定, 每日清晨更换含相同浓度 Cu 的海水 (全部). 温度为室温条件, 昼夜水温变化范围 $25 \sim 31^\circ\text{C}$, 盐度 31‰, pH 8.2, 自然光照, 使用充氧泵连续均匀曝气. 换水前喂食适量扁藻, 喂食前取样, 以避免食物残屑影响测定结果. 实验分别在暴露 1、2、4、7 和 10 d 时取 4~6 只贻贝样品, 解剖生物样品取其消化腺部分冰冻待处理. 实验所用贻贝的生物条件参数 (Condition index, CI) 为: $\text{CI} = \text{软组织重量} / \text{全重} \times 100\% = (27.5 \pm 2.8)\% (n = 6)^{[14]}$. 贻贝样品湿重与干重比值为 $5.42 \pm 0.37 (n = 6)$.

1.2 样品分离纯化

取已称湿重的贻贝消化腺样品 (2 个/组), 按 $m:V = 1:3$ 加入 pH 8.6 缓冲溶液 (含 20 mmol/L Tris、150 mmol/L NaCl、0.5 mmol/L PMSF、2.5 mmol/L DTT), 其中 PMSF 为蛋白酶抑制剂, DTT 为还原剂, 以保护样品中—SH 不被氧化和降解, 使用超声波细胞破碎仪 (80% W, 360 s, 宁波) 将样品均质化. 取 1 mL 均质样品利用恒温消解炉消解后测定消化腺吸收的总 Cu 含量 (T-Cu), 剩下样品离心 (5000 r/min) 30 min 取上清液于 75°C 水浴加热 15 min, 以去除样品中可能干扰 MTLP 测定的热不稳定性大分子蛋白, 然后超速离心 (15000 r/min , 4°C) 45 min, 取 S_{30} 组分测定溶解态 Cu 含量 (S-Cu) 和类金属硫蛋白 (MTLP) 含量.

1.3 类金属硫蛋白的测定

因分离的样品中 MTLP 含量较高, 需用 0.9% NaCl 溶液进行稀释, 实验中稀释 21 倍. 实验采用修改的 Brdicka 极谱法测定样品中 MTLP 含量, 测试所用的支持电解质为 0.6 mmol/L $\text{Co}(\text{NH}_3)_6\text{Cl}_3$ 和 1 mol/L ($\text{NH}_4\text{OH} + \text{NH}_4\text{Cl}$), 仪器为 797 VA Computrace 极谱仪 (瑞士万通). 测试采用三电极体系: 工作电极 (HMDE, 0.4 mm^2), 参照电极 (Ag/AgCl , 3 mol/L KCl), 辅助电极 (Pt 电极). 反应体系温度利用生物冰浴控制在 $15 \sim 16^\circ\text{C}$, 取 10 mL 支持电解质加入测试杯中充 N_2 曝气 180 s, 扫描 Co 峰并检查空白, 后加入待测样品继续冲 N_2 曝气 240 s. 测试条件: 微分脉冲模式 (DP), 富集电位 -1.4 V ; 富集时间 90 s; 扫描电位, $-0.90 \sim -1.70 \text{ V}$; 脉冲电位, 50 mV; 脉冲时间, 0.04 s; 扫描速率, 0.011 V/s; 搅拌速度, 2000 r/min. 测试扫描 3 次, 采用标准曲线定量法. 基准 MT

样品来自 Sigma 兔肝 MT(I + II),分子量7 641.

1.4 消化腺总量 Cu 和溶解态 Cu 的测定

贻贝消化腺内总 Cu 和溶解态 Cu 含量在 797 Computrace 型伏安极谱仪上测定. 先将消化腺均质液及离心所得的表层液用体积比 2:1 的 HNO₃ 和 H₂O₂(GR, 65%、30%) 在 70℃ 条件下消解至溶液透明, 用去离子水定容, 同步作试剂空白. 使用 1 mol/L 醋酸支持电解质 (NaAC + KCl), 添加 0.1 mL 50 μmol/L 水杨醛肟 (SA) 以提高测定灵敏度, 用 1 mol/L NaOH 溶液调节反应体系 pH 在 3~5 范围, 充 N₂ 曝气 300 s. 测试条件: 微分脉冲模式 (DP), 富集电位 -1.1 V; 富集时间 60 s; 扫描电位, -0.40 ~ -0.01 V; 扫描速率, 0.059 V/s. 测试扫描 2 次, 采用 2 次标准加入法, 加入标准物质含量被调整到与样品中 Cu 含量相当的范围. 极谱测试 Cu 标准溶液为 1.000 g/L (Merck, Germany) 标准液稀释获得, 含 0.1% Q-HNO₃. 当日测定程序空白, 测试精密度少于 ± 5% RSD.

1.5 质量控制与统计分析

所用试剂为优级纯或分析纯, 暴露实验所用 Cu 由 CuSO₄·7H₂O 试剂制取. 使用容器均经过 10% 盐酸浸泡 48 h, 准备试剂和清洗仪器所需去离子水使用 Arium631UV 水净化系统 (Sartorius, Germany) 制取. 本研究中所示数据为平均值 ± 标准偏差, 数据统计

分析使用 SigmaPlot 7.0 软件完成, 统计显著性水平为 $p < 0.05$.

2 结果与分析

2.1 Brdicka 极谱法测定类金属硫蛋白

Brdicka 极谱法是 1983 年由 Brdicka 提出的在 Co(III)-铵缓冲液中测定含-SH 基团蛋白分子的一种方法^[15], 之后较多地应用于生物化学分析领域. 近年来随着电化学技术和样品提取分离技术的开展, 该方法也得到进一步的完善, 较多地应用于环境中生物样品的 MT 含量的测定^[4, 16~18]. 该方法选择性好、灵敏, 适于测定痕量 MTLP 样品. 实验测试峰图如图 1(a) 所示, 通过测定氢催化波 (Cat) 来定量, 因氢催化波反应是表面接触反应, 应使测试过程在尽可能低的温度下进行.

图 1(b) 为兔肝 MT(I + II) 样品与极谱氢催化波电流的标准回归曲线, 氢催化电流随催化活性物质浓度的增加而升高, 在较低浓度时成线性关系, 当浓度增加到一定量后, 电流不再随浓度成线性增加, 而渐达到极限值. 这是由于电极表面对催化活性物质的吸附达到饱和程度所致, 是具有吸附性质的催化电流的一个特征^[19]. 所以该测试方法只适合检测低含量的 MT, 本实验条件下测得兔肝标准 MT 样品的线性反应范围在 0.005 ~ 0.169 mg/L ($r^2 = 0.999$),

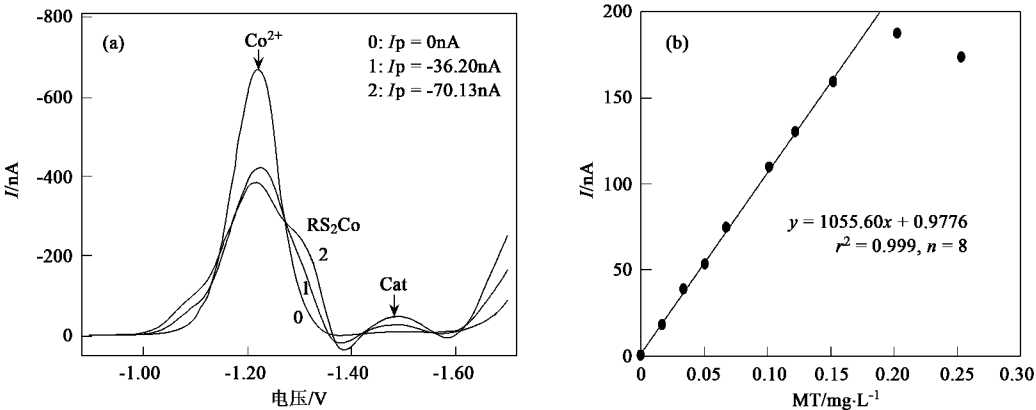


图1 Brdicka 极谱法测定类金属硫蛋白及 MT 浓度-氢催化电流(I)标准曲线
Fig.1 Determination of MTLP concentration by Brdicka reaction and MT concentration-hydrogen catalytic current standard curve

当反应溶液 MT 浓度高于 0.20 mg/L 时, 氢催化电流不再增加. 实验分离的消化腺 S₃₀ 组分通过 0.9% NaCl 稀释使之在线性反应浓度范围.

2.2 贻贝消化腺总量 Cu 和溶解态 Cu 富集动力学过程

图 2 分别为贻贝暴露在 12.7 μg/L 和 63.5 μg/L Cu 条件下, 消化腺内总量 Cu (T-Cu) 和溶解态 Cu (S-Cu) 随暴露时间的变化曲线及拟合方程. 实验测得对照组贻贝消化腺总 Cu 含量为 (3.57 ± 0.51) μg/g, 暴露 10 d 后 2 浓度组贻贝体内 Cu 的浓度分别达到

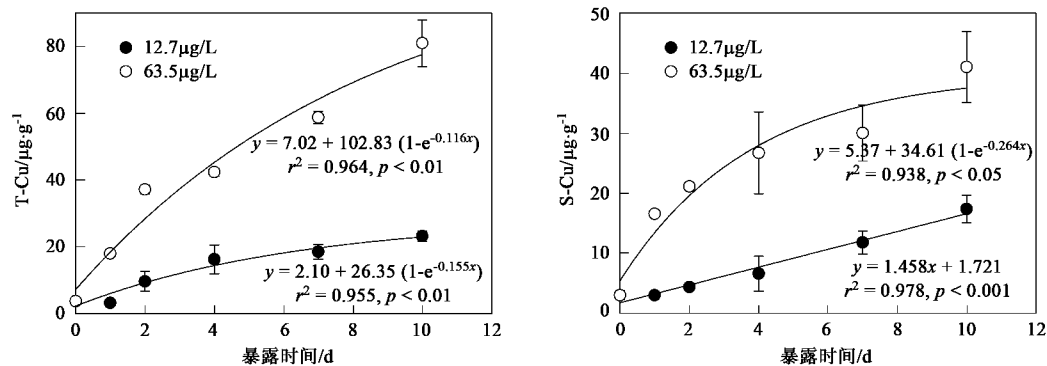


图 2 2 种 Cu 浓度暴露条件下贻贝消化腺内总量 Cu 和溶解态 Cu 含量随时间的变化
Fig.2 Changes of total Cu and soluble Cu of digestive glands of mussels in the two exposure groups with exposure time

(23.10 ± 1.52) µg/g 和 (81.01 ± 7.01) µg/g. 显然当暴露水体中 Cu 浓度高时, 贻贝受到的金属胁迫压力也显著增加, 通过回归曲线斜率法求得贻贝消化腺在 2 种 Cu 浓度条件下平均吸收速率分别为 $2.045 \mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$ 和 $7.028 \mu\text{g} \cdot (\text{g} \cdot \text{d})^{-1}$. 因暴露实验未达到吸收平衡状态, 可根据拟合方程计算 12.7 µg/L 和 63.5 µg/L Cu 条件下的生物富集系数分别为 2 074 和 1 619, 计算方法见文献[20]. 从总量 Cu 富集曲线可看出在暴露实验结束时, 低浓度 Cu 暴露组生物体内的金属吸收几乎达到平衡状态, 而高浓度组却还有上升的趋势. 暴露期间低浓度组体内溶解态 Cu 的含量呈线性增加, 高浓度组呈负自然指数模式, 暴露第 4d 后增加速度减缓.

实验分别测定了贻贝消化腺内总量 Cu 和溶解态 Cu 的含量, 可以了解进入到生物体内的 Cu 在经过一系列新陈代谢过程后其存在形式的相应变化, 对探究生物体可能的金属消化机制具有指示意义. 图 3 即为暴露期内 2 个暴露组贻贝消化腺溶解态

Cu 占总量 Cu 的比率随时间的变化情况, 从图 3 中可知除暴露第 1d 这 2 组的比值参比对照组值 ($r = 0.82$) 升高, 随后高浓度组一直呈下降趋势, 由 0.92 降至 0.40 左右, 而低浓度组则先降低随后又上升到与对照样本几乎相同的水平 (0.78).

2.3 贻贝消化腺 MTLP 的变化

本实验利用 Brdicka 极谱法测定的 MTLP 值是样品中具有—SH 基团的一类金属结合蛋白的含量 (相对于兔肝基准 MT 样品), 测定结果如图 4 所示. 图 4(a) 为不同时间对照组和 2 种 Cu 浓度暴露条件下贻贝消化腺的 MTLP 含量值, 可观察到贻贝消化腺内的 MTLP 水平是随着外界暴露金属浓度升高而呈增加趋势的. 对照组贻贝消化腺 MTLP 平均含量为 (0.551 ± 0.037) mg/g, 随时间变化不是很显著 ($p > 0.05$); 低浓度 12.7 µg/L Cu 暴露组 MTLP 含量随着暴露时间而逐渐增加, 但与对照组相比增加幅度不显著 ($p > 0.05$), 变化范围在 0.407 ~ 0.699 mg/g; 而 63.5 µg/L Cu 暴露组在暴露初始 MTLP 含量就增加到 0.942 mg/g, 然后随着暴露时间表现出微弱的降低的趋势 (组内差异不显著, $p > 0.05$), 变化范围由初始 0.942 mg/g 降至 0.826 mg/g, 总体水平要显著高于对照组 ($p < 0.001$). 图 4(b) 中为 2 个 Cu 暴露组 MTLP 随时间变化的拟合方程, 表明低浓度 Cu 暴露时, 生物体内 MTLP 水平随着时间线性增加 ($p = 0.06$); 而外界 Cu 暴露浓度高时, 则呈线性降低的趋势 ($p = 0.08$).

2.4 贻贝消化腺内富集 Cu 与类金属硫蛋白含量变化的关系

实验中翡翠贻贝消化腺内富集 Cu 与 MTLP 水平的相互关系如图 5 所示, 分别为所有测试样本的总量 Cu 和溶解态 Cu 与相应 MTLP 测定值的曲线关系及拟合方程. 它们之间的关系可以用负指数方程

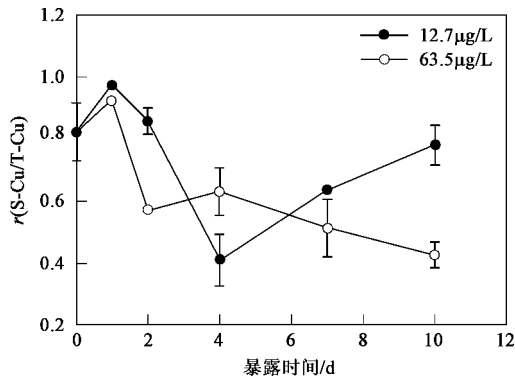


图 3 2 种 Cu 浓度组贻贝消化腺富集溶解态 Cu 与总量 Cu 比值随暴露时间的变化

Fig.3 Changes of the ratio of soluble Cu to total Cu of digestive glands of mussels in the two exposure groups with exposure time

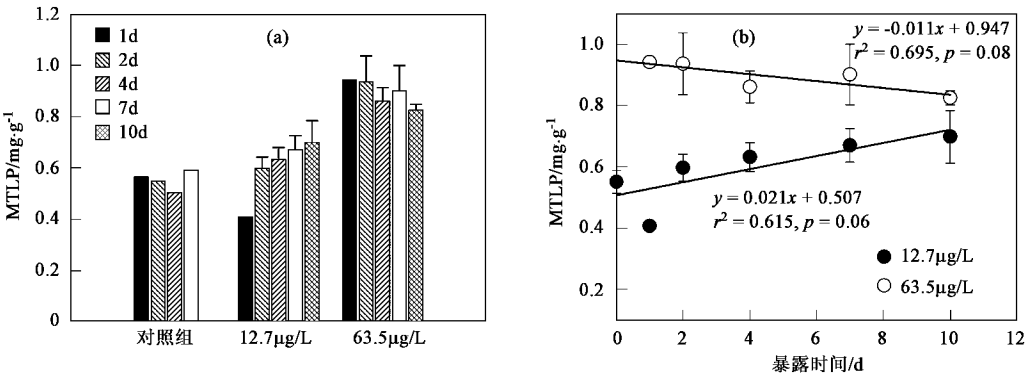


图 4 不同 Cu 暴露条件下贻贝消化腺内类金属硫蛋白随时间的变化
Fig.4 Changes of the MTLP concentration of digestive glands of mussels in different Cu exposure groups with exposure time

表征($r^2 = 0.511、0.565, p < 0.0001$),表明贻贝体内 MTLP 水平会随着体内富集 Cu 含量的升高而增加,只是当体内 Cu 在较低浓度范围时,其含量变化会引起 MTLP 水平发生显著的变化,而当金属浓度累积到一定程度后,其 MTLP 水平几乎不能再增加.

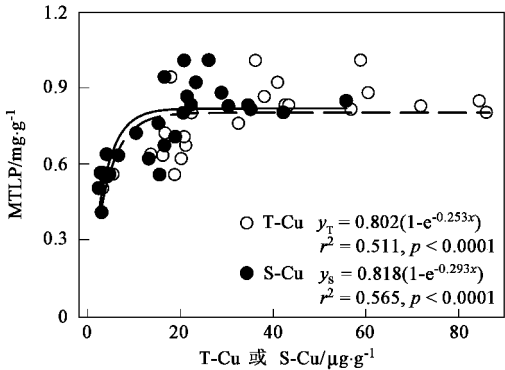


图 5 贻贝消化腺内不同形态 Cu 与类金属硫蛋白的关系
Fig.5 Relationships of total Cu or soluble Cu and MTLP of digestive glands of mussels

3 讨论

海洋贻贝被认为是最好的环境污染预警监测生物,目前应用较多的监测方式是将洁净参照区的贻贝样本分别移养至受到不同程度污染的河口或者海岸带区域,笼养数日后测定它们体内的特征环境指标^[2,21~23].本实验使用从大亚湾抽滤的新鲜海水,实验室天窗光照和通风条件都良好,基本上与自然气候条件相一致.为能在短期内观测到生物体发生的显著生理生态变化,实验设置的 Cu 暴露浓度要显著高于自然海水浓度(实验暴露浓度:12.7、63.5 μg/L,大亚湾海域水体 Cu 浓度 3.2 μg/L^[24]).

实验测定对照组贻贝消化腺 Cu 的含量为(3.57

± 0.51)μg/g,与丘耀文等^[24]测定大亚湾软体动物 Cu 平均值 3.69 μg/g 较为接近(变化范围为 1.04 ~ 5.06 μg/g).重金属容易在生物体内富集,2 种 Cu 暴露浓度条件下,贻贝消化腺对 Cu 的平均累积速率分别为 2.045 μg·(g·d)⁻¹和 7.028 μg·(g·d)⁻¹;Cu 生物富集系数(BCF)随着外部水体金属浓度的增大而减小,分别为 2 074 和 1 619.生命机体组织内 Cu 的浓度高于一定限度时,其生物毒性非常显著,实验中低浓度暴露组(12.7 μg/L)贻贝在实验期间还没有发生致死现象,但高浓度组至暴露第 5 d 时开始出现死亡贻贝,实验结束时致死率达到 14%.Lecoeur 等^[25]研究 Cd/Cu 暴露对双壳类 *D. polymorpha* 的影响,也观察到 Cu 暴露(20 μg/L)导致生物较高的致死现象,他们得出 Cu 生物富集系数相对于本实验结果偏低,认为其实验贝类能有效去除体内吸收的 Cu.

通常认为重金属对生物体的危害是金属离子与体内生物酶的活性中心或活性蛋白的巯基结合,而导致蛋白质构象改变、酶活性丧失,从而干扰细胞的正常生理代谢;另外,重金属在生物体内发生氧化还原反应,产生自由基会导致细胞氧化损伤^[26~28].例如,过量的 Cu 进入生物体内会显著增加活性氧自由基(ROS)的产生^[29],还可以与含硫、氧、氮基团的酶发生化学反应^[30].Bianchini 等^[31]研究认为 Cu 对海洋生物的致毒机理与一些淡水生物(鱼,甲壳类)相似,主要通过限制腮组织上皮细胞中 Na⁺、K⁺-ATP 酶活性而导致生物渗透调节功能失衡.生物机体自身对毒害性物质具有一系列的适应和反馈机制,有报道^[3,32]在脊椎动物体内,金属解毒主要通过与金属硫蛋白络合绑定,使金属从自由态变成无毒状态;而在无脊椎动物体内,解毒过程主要是通过不溶化作用(insolubilization)来实现.如图 3 所示,2 个 Cu 暴

露组都有溶解态 Cu 占总量 Cu 比率下降的时段, 尤其高浓度 Cu 暴露组, 溶解态金属所占的份额随着暴露时间由初始 0.82 一直降至 0.40 左右, 暗示着生物不溶化解毒作用显著. Berthet 等^[33]也发现污染地区采集的生物体内不溶组分 Cu 所占比例比无污染区高. 有研究^[34-36]认为高含量水平的不溶态 Cu 可能是由体内多余的金属配合物的降解形式转移入溶酶体中, 然后转化为不溶形式而被隔离起来, 通过这个过程, 金属在细胞内的新陈代谢过程中就不再具有活性. 重金属在生物软体组织中富集时存在方式可能主要分为以下 2 个阶段: 一是通过与体内金属结合蛋白形成可溶解的配合物形态, 二是转移入可隔离和贮存金属的细胞内微粒组织中, 以不溶形式存在^[37,38]. 本实验中观察到的另外一个现象是, 暴露初始 2 组的溶解态 Cu 与总量 Cu 比值参比对照组值 ($r = 0.82$) 升高, 随后才开始下降, 可能有 2 个阶段的进程: 暴露初始, 金属结合蛋白是最快反应的解毒机制, 随后多余吸收的金属逐渐通过不溶化过程被隔离起来. 当体内金属浓度较低时, 金属结合蛋白解毒机制仍然起着主要的作用, 如低浓度组该比值先降低随后又上升到与对照几乎相同的水平, 表明这样 2 个过程是同时存在的, 生物机体受到严重的金属胁迫时, 会协调所有可能的抵御机制直至失调.

实验利用 Brdicka 极谱法测定 MTLP 含量水平, 由于测试方法及参照基准的差异, 与 Lecoecur 等^[25]和 Shi 等^[39]等用银饱和法测定的结果差异较大, 但与 Dragun^[4]、Raspor^[40]、Geffard^[33]等利用极谱方法测定贻贝样品的 MT 含量较为一致. 叶属峰等^[41]指出不同种贝类干样的基础 MT 水平在 2 ~ 3 mg/g 范围, 本实验所得基础 MTLP 值: $0.551 \text{ mg/g} \times 5.428 = 2.99 \text{ mg/g}$ (5.428 为样品干湿比因子) 位其范围. Dragun 等^[4]测定 Kastela 湾的贻贝 (*M. galloprovincialis*) 腮中 MT 含量为 0.44 ~ 0.54 mg/g. Langston 等^[42]报道 *Mytilus* spp. 消化腺内的 MT 含量比其软体组织和腮等器官更高一些, 测定结果也比本实验结果偏高, 这可能与实验所用贻贝种类, 不同的生存环境及实验室的测试条件差异等因素有关. 贻贝消化腺器官在吸收、贮存和排泄金属等过程中起着重要的作用, 相应生物预警指标的反应也更明显一些^[3].

生物体受到毒性物质危害, 在表现出中毒症状之前, 毒性会在亚细胞水平上首先表现出来, 这些信号可用来做为重金属污染的生物预警标志. 本实验结果表明贻贝消化腺 MTLP 指标对水体中升高的金属浓度非常敏感. 如图 4 所示, Cu 暴露浓度较低时,

贻贝消化腺内 MTLP 水平随着暴露时间会逐渐增加; 而水体中 Cu 浓度较高时, MTLP 含量会迅速升高, 如 63.5 $\mu\text{g/L}$ 暴露组数据所示, 参比对照组在暴露第 1d 的 MTLP 含量就增加了 67%. 实验发现贻贝消化腺内的 MTLP 水平与生物体内金属含量呈负指数增长关系 (图 5), 即体内金属浓度低时, MTLP 含量随着金属浓度升高增长速度较快, 当金属含量较高时, 体内金属硫蛋白合成几乎不再增加. Lecoecur 等^[25]研究 Cd/Cu 暴露对双壳类 *D. polymorpha* 的影响, 发现该生物体的 MT 指标与 Cu 的相关性不是很显著, 认为测定的是生物全部组织样品, 有可能掩盖了特征器官的一些显著反应. Bebianno 等^[43]采集葡萄牙南海岸的 *M. galloprovincialis*, 观测到该贻贝软组织中金属和 MT 之间存在显著的正相关性, 特别是 Cd 和 Cu.

生物机体富集多余的重金属能够被体内的金属结合蛋白络合绑定, 通过限制这些离子在代谢配位点上的可利用性, 可以保护生物体免受毒害, 但若金属浓度过高, 金属结合蛋白的合成过程也会被严重地干扰^[5,44]. 实验结果表明, 贻贝消化腺内的 MTLP 指标对水体中高浓度的金属暴露反应灵敏, 能在较短时间内增加合成以降低重金属对生物体的危害, 且与生物体内富集的金属含量保持一定的线性关系, 但若暴露时间过长或者金属浓度过高, 生物体的金属解毒机能也会受到限制.

4 结论

(1) 2 种 Cu 暴露条件下, 翡翠贻贝消化腺内富集 Cu 及 MTLP 的变化规律表明, 体内金属结合蛋白的合成是贻贝较快反应的解毒机制, 随后多余吸收的金属可能主要通过不溶化作用被隔离起来.

(2) 贻贝消化腺内 MTLP 水平会随着水体和生物体内的 Cu 含量升高而增加, 但若生物体内富集 Cu 过多时, 会限制金属硫蛋白的进一步合成. 实验结果表明, 贻贝消化腺 MTLP 指标与生物体内富集 Cu 的含量具有显著的相关性, 能够反映水体环境的重金属污染变化, 是一种较好的生物预警指标.

参考文献:

[1] 李玉, 俞志明, 宋秀贤. 运用主成分分析 (PCA) 评价海洋沉积物中重金属污染源 [J]. 环境科学, 2006, 27(1): 137 ~ 141.

[2] Da Ros L, Nasci C, Marigomez I, et al. Biomarkers and trace metals in the digestive gland of indigenous and transplanted mussels, *Mytilus galloprovincialis*, in Venice Lagoon, Italy [J]. Marine Environmental Research, 2000, 50: 417 ~ 423.

- [3] Geffard A, Amiard-Triquet C, Amiard J C. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, **61**: 209 ~ 220.
- [4] Dragun Z, Erk M, Raspor B, *et al.* Metal and metallothionein level in the heat-treated cytosol of gills of transplanted mussels *Mytilus galloprovincialis* Lmk [J]. Environment International, 2004, **30**: 1019 ~ 1025.
- [5] Barka S, Pavillon J F, Amiard J C. Influence of different essential and non-essential metals on MTLP levels in the Copepod *Tigriopus brevicornis* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C, 2001, **128**: 479 ~ 493.
- [6] Simes D C, Bebianno M J, Moura J J G. Isolation and Characterisation of metallothionein from the clam *Ruditapes decussates* [J]. Aquatic Toxicology, 2003, **63**: 307 ~ 318.
- [7] Dabrio M, Rodriguez A R, Bordin G, *et al.* Recent developments in quantification methods for metallothionein [J]. Journal of Inorganic Biochemistry, 2002, **88**: 123 ~ 134.
- [8] 陈正佳, 李晓凡, 施定基, 等. 集胞藻类金属硫蛋白的纯化、性质和溶液构象的研究[J]. 植物学报, 1999, **41**(2): 150 ~ 155.
- [9] Kagi J H R. Overview of metallothionein [J]. Method Enzymol, 1991, **205**: 613 ~ 626.
- [10] Kagi J H R, Shaffer A. Biochemistry of metallothionein [J]. Biochemistry, 1988, **27**: 8509 ~ 8515.
- [11] Kojima Y. Definitions and nomenclature of metallothionein [J]. Method Enzymol, 1991, **205**: 8 ~ 10.
- [12] George S G, Olsson P E. Metallothioneins as indicators of trace metal pollution [A]. In: Kramer K J M (Ed.). Biomonitoring of Coastal Waters and Estuaries [C]. Boca Raton: CRC Press, 1994. 151 ~ 178.
- [13] Cosson R P. Bivalve metallothionein as a biomarker of aquatic ecosystem pollution by trace metals: limits and perspectives [J]. Cell and Molecular Biology, 2000, **46**: 295 ~ 309.
- [14] Amiard J C, Geffard A, Amiard-Triquet C. La metallothioneine chez la moule *mytilus edulis* comme biomarqueur de pollution metallique: variabilite entre sites, saisons et organs [J]. Journal de Recherche Oceanographique, 1998, **23**: 25 ~ 30.
- [15] Brdicka A. Polargraphic studies with the dropping mercury method. A new test for proteins in the presence of cobalt salts in ammoniacal solution of ammonium chloride [J]. Collection of Czech Chemistry Communication, 1933, **5**: 112 ~ 128.
- [16] Thompson J A J, Cosson R P. An improved electrochemical method for the quantification of metallothionein in marine organisms [J]. Marine Environmental Research, 1984, **11**: 137 ~ 152.
- [17] Raspor B, Paic M, Erk M. Analysis of metallothioneins by the modified Brdicka procedure [J]. Talanta, 2001, **55**: 109 ~ 115.
- [18] Erk M, Ivankovic D, Raspor B, *et al.* Evaluation of different purification procedures for the electrochemical quantification of mussel metallothioneins [J]. Talata, 2002, **57**: 1211 ~ 1218.
- [19] 赵藻藩, 周性尧, 张悟铭, 等. 仪器分析 [M]. 北京: 高等教育出版社, 1990. 338 ~ 339.
- [20] Clason B, Duquesne S, Liess M, *et al.* Bioaccumulation of trace metals in the Antarctic amphipod *Paramoera walkeri* (Stebbing, 1906): comparison of two compartment and hyperbolic toxicokinetic models [J]. Aquatic Toxicology, 2003, **59**: 115 ~ 135.
- [21] Riveros A, Zuniga M, Hernande A, *et al.* Cellular biomarkers in native and transplanted populations of the mussel *Perumytilus purpuratus* in the intertidal zones of San Jorge Bay, Antofagasta, Chile [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, **31**: 143 ~ 164.
- [22] Romeo M, Hoarau P, Garello G, *et al.* Mussel transplantation and biomarkers as useful tools for assessing water quality in the NW Mediterranean [J]. Environmental Pollution, 2003, **122**: 369 ~ 378.
- [23] Nigro M, Falleni A, Barga I D, *et al.* Cellular biomarkers for monitoring estuarine environments: Transplanted versus native mussels [J]. Aquatic Toxicology, 2006, **77**: 339 ~ 347.
- [24] 丘耀文, 颜文, 王肇鼎, 等. 大亚湾海水、沉积物和生物体中重金属分布及其生态危害[J]. 热带海洋学报, 2005, **24**(5): 69 ~ 76.
- [25] Lecoeur S, Videmann B, Berny P. Evaluation of metallothionein as a biomarker of single and combined Cd/Cu exposure in *Dreissena polymorpha* [J]. Environmental Research, 2004, **94**: 184 ~ 191.
- [26] Van A F, Clijsters H. Effects of metal on enzyme activity in plants [J]. Plant, Cell and Environment, 1990, **13**: 195 ~ 206.
- [27] 娄来清, 沈振国. 金属硫蛋白和植物螯合肽在植物重金属耐性中的应用[J]. 生物学杂志, 2001, **18**(3): 1 ~ 4.
- [28] 李海蓉, 侯少范, 王五一. 不同金属离子对 Vc 引发的小鼠肝匀浆自由基反应的影响[J]. 环境科学, 2003, **24**(2): 139 ~ 142.
- [29] Dietz K J, Bair M, Kramer U. Free radicals and reactive oxygen species as mediators of heavy metals toxicity in plants [A]. In: Prasad M N V, Hagemeyer J (Eds). Heavy Metal Stress in Plants: From Molecules to Ecosystems [C]. Berlin: Springer Verlag, 1999. 73 ~ 97.
- [30] Fernandes J C, Henriques F S. Biochemical, physiological and structural effect of excess copper in plants [J]. Botanical Review, 1991, **57**: 246 ~ 273.
- [31] Bianchini A, Martins S E G, Barcarolli I F. Mechanism of acute copper toxicity in euryhaline crustaceans: implications for the Biotic Ligand Model [J]. International Congress Series, 2004, **1275**: 189 ~ 194.
- [32] Amiard J C. Reponses des organismes marins aux pollutions metaliques [A]. In: Reactions des etres vivants aux changements de environnement. Actes des Journees de Environnement du CNRS [C]. Paris: 1991. 197 ~ 205.
- [33] Berthet B, Mouneyrac C, Amiard J C, *et al.* Accumulation and soluble binding of Cadmium, copper and zinc in the polychaete *Hediste diversicolor* from coastal sites with different trace metal bioavailabilities [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2003, **45**: 468 ~ 478.
- [34] Viarengo A, Canesi L, Pertica M, *et al.* Biochemical characterization of a copper-thionein involved in Cu accumulation in the lysosomes of the digestive gland of mussels exposed to the metal [J]. Marine Environmental Research, 1988, **24**: 163 ~ 166.

[35] Brown B E. The form and function of metal-containing ‘granules’ in invertebrate tissues [J]. Bio Review, 1982, **57**: 321 ~ 667.

[36] Marigomez I, Soto M, Cajaraville M P, *et al.* Cellular and subcellular distribution of metals in mollusks [J]. Microscopy Research and Technique, 2002, **56**: 358 ~ 392.

[37] Mason A Z, Jenkins K D. Metal detoxication in aquatic organisms [A]. In: Tessier A, Turner D R (Eds.). Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems [C]. Chichester: Wiley, 1995. 479 ~ 608.

[38] Nassiri Y, Rainbow P S, Amiard-Triquet C, *et al.* Trace metal detoxification in the ventral caeca of *Orchestia gammarellus* (Crustacea: Amphipoda) [J]. Marine Biology, 2000, **136**: 477 ~ 484.

[39] Shi D, Wang W X. Modification of trace metal accumulation in the green mussel *Perna viridis* by exposure to Ag, Cu and Zn [J]. Environmental Pollution, 2004, **132**: 265 ~ 277.

[40] Raspor B, Dragun Z, Erk M. Is the digestive gland of *Mytilus galloprovincialis* a tissue of choice for estimating cadmium exposure by means of metallothioneins? [J]. Science of the Total Environment, 2004, **333**: 99 ~ 108.

[41] 叶属峰,陆健健.无脊椎动物金属硫蛋白(MTs)多样性及其生态服务功能[J].生物多样性,2000,**8**(3):317 ~ 324.

[42] Langston W J, Bebianno M J, Burt G R. Metal handling strategies in mollusks [A]. In: Langston W J, Bebianno M J, (eds). Metal Metabolism in Aquatic Environments [C]. London: Chapman and Hall, 1998. 219 ~ 283.

[43] Bebianno M J, Machado L M. Concentrations of metalsand metallothioneins in *Mytilus galloprovincialis* along the south coast of Portugal [J]. Marine Pollution Bulletin, 1997, **34**: 666 ~ 671.

[44] George S G, Burgess D, Leaver M, *et al.* Metallothionein induction in cultured fibroblasts and liver of a marine flatfish, the turbot *Scophthalmus maximus* [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 1992, **10**: 43 ~ 54.