

镉诱导金属硫蛋白在华溪蟹组织中的表达

何永吉 马文丽 王兰* 王茜 张晓博

(山西大学生命科学与技术学院 太原 030006)

摘要:采用体外暴露染毒法,研究了不同浓度与时间条件下,镉诱导河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*)金属硫蛋白(metallothionein, MT)在肝胰腺、肌肉、鳃和卵巢中的表达差异。镉浓度分别为 0、14.5 mg/L、29 mg/L 和 58 mg/L;处理时间依次为 1 d、3 d 和 5 d。利用镉血红蛋白饱和法和火焰原子吸收分光光度法(AAS)测定 MT 的蛋白含量。结果显示,用不同的染毒浓度和处理时间,镉在组织中诱导产生 MT 的含量有较大差异,其中肝胰腺 MT 的诱导量最大,变化规律也最明显,肌肉中也有较大量 MT 的表达,而鳃和卵巢 MT 的诱导量均较低。此外,本文分析了镉的浓度与时间梯度对诱导 MT 表达的影响与毒性效应机制。结论:组织不同,染毒浓度及时间不同,镉诱导 MT 的表达也不同,具有一定的组织差异性和规律性。

关键词:河南华溪蟹;金属硫蛋白;镉

中图分类号:Q956 文献标识码:A 文章编号:0250-3263(2007)03-48-06

Metallothionein in Different Tissues of Freshwater Crab Exposed to Cadmium

HE Yong-Ji MA Wen-Li WANG Lan* WANG Qian ZHANG Xiao-Bo

(School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: In order to investigate the impact of waterborne cadmium on the content of metallothionein (MT) in hepatopancreas, muscle, gill and ovary of Freshwater Crab *Sinopotamon henanense*, the individuals with similar size and weight were exposed to different concentrations of cadmium (0, 14.5, 29 and 58 mg/L) for a duration of 1, 3 or 5 days. The content of MT in the four tissues was measured by Cd-Hb Saturation and AAS. The results showed that there was a great variation in MT expressed in the tissues of *S. henanense* after exposing the crabs to different concentrations of cadmium and for different times. The MT content in hepatopancreas was the highest in the four tissues, and the MT expressed in the muscle was more than that in the gill and ovary. This research indicates that the content of MT may be affected by cadmium exposure and that MT contents are different in various tissues after cadmium exposure.

Key words: *Sinopotamon henanense*; Metallothionein; Cadmium

水污染是当今人类社会面临的最为紧迫的问题之一,其中尤以镉污染最为突出。镉是一种人体非必需微量元素,对机体的毒性作用表现在多个方面,毒性作用机制也非常复杂^[1]。王兰等系统研究和报道了镉在华溪蟹组织中的积累及对组织器官的毒性作用、生殖系统超微结构改变和酯酶同工酶的影响^[2~8],基本阐明了镉对淡水蟹的毒性作用途径与可能机理。动

物实验表明,对水环境造成污染的重金属多数能诱导水生动物肝、肾、脑等组织中 MT 生物合

基金项目 国家自然科学基金项目(No. 30470254),山西省自然科学基金项目(No. 20041082);

* 通讯作者, E-mail: lanwang@sxu.edu.cn;

第一作者介绍 何永吉,男,硕士研究生;从事动物毒理学和生物化学研究, E-mail: heyongji-919@eyou.com。

收稿日期 2006-09-27, 修回日期 2007-03-23

成的增加。MT 是一类广泛存在于生物体内、低分子量、富含半胱氨酸、能被多种金属诱导的金属结合蛋白,对重金属具有解毒作用。MT 参与微量元素的贮存、运输和代谢,参与激素和发育的调节,增强机体对各种刺激的适应,消除体内自由基^[9]。已有资料表明,MT 是影响镉毒性作用的重要因素之一^[10]。由于水生动物体内 MT 与水环境和体内组织中的重金属之间有显著的相关性,因而 MT 可作为一种指示水环境重金属污染物暴露和毒性效应早期警报的主要标识物^[11]。对 MT 的深入系统研究,不但有利于水环境污染的监测,而且有利于阐明其诱导机理和对重金属的解毒机制。溪蟹终生栖息于淡水中,作为甲壳纲、十足目的一个特殊分支,其 MT 的研究目前尚属空白^[12,13]。溪蟹作为水体基层层的代表物种,是极好的指示生物。

本文通过体外暴露镉染毒诱导,研究了不同浓度和诱导时间,MT 在河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) 组织器官中表达含量的差异,旨在为综合客观地评价水体质量与安全、确定水环境重金属污染程度提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料 河南华溪蟹于 2005 年 3 月购自太原市五龙口水产批发市场,置实验室水族缸中暂养 7 d 以上,实验前 24 h 停止投饵。实验时随机选取活动正常、反应灵敏、体重基本一致的个体 (19.33 ± 3.32 g) 随机分组。

1.2 实验方法

1.2.1 染毒与处理 实验采用体外暴露镉的方法,对河南华溪蟹进行染毒^[14,15]。实验分对照组和处理组,对照组用去离子水培养,处理组用镉浓度分别为 14.5 mg/L、29 mg/L 和 58 mg/L (以 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 配制) 的溶液处理,每组 20 只个体,且均设平行。分别在镉染毒 1 d、3 d 和 5 d,取各浓度组个体,用去离子水冲洗干净,每组解剖 5 只,分别取鳃、肝胰腺、卵巢和肌肉,称重后测定 MT 含量。

1.2.2 MT 含量测定 采用镉血红蛋白饱和法^[16,17]并略加改进。每克湿组织加 4 ml Tris-

HCl 缓冲液 (pH 8.60, 0.01 mol/L),冰浴匀浆。匀浆后于 12 000 g 4℃ 离心 15 min。取上清液 0.5 ml,加入 0.5 ml 20 mg/L 的 CdCl_2 溶液,混合后室温放置 5 min,加入 0.2 ml 新配制的 2% (w/v) 牛血红蛋白充分混匀,冰浴 5 min 后于沸水浴加热 2 min,冷却后于 10 000 g, 4℃ 离心 10 min。重复加血红蛋白以后的步骤 2 次。上清液消化后,通过火焰原子吸收法测定镉含量,再按照每分子 MT 结合 6 个镉原子换算成 MT 的含量。

MT 含量计算: $\text{MT 含量} (\mu\text{mol/g}) = \text{Cd 含量} (\mu\text{g/g}) / 112.4/6$

以上公式中 Cd 的含量 ($\mu\text{g/g}$) = 上清液中 Cd 浓度 ($\mu\text{g/ml}$) \times 5 (ml) \div 组织质量 (g)

1.3 试剂与仪器 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.60, 0.01 mol/L); 硝酸 (优级纯,北京化工厂); 高氯酸 (优级纯,天津东方化工厂); 牛血红蛋白 (SIGMA 公司); 标准镉溶液 100 mg/L (国家环境保护总局标准样品研究所); 高速冷冻离心机 (EPPENDORF 5804R); 火焰原子吸收分光光度计 AA-6300 (日本 SHIMADZU)。

1.4 数据分析 实验所得数据用统计学方法处理。数据结果均以平均值 \pm 标准误表示。各浓度组与对照组用双尾 t -检验进行比较, $P < 0.05$ 被认为有显著差异; $P < 0.01$ 被认为有极显著差异。统计分析应用 Excel 2002 软件。

2 结果

2.1 镉诱导河南华溪蟹 MT 表达的时间-效应关系 由图 1 可见,低剂量镉 (14.5 mg/L) 诱导 3 d 和 5 d 后,河南华溪蟹肝胰腺 MT 蛋白含量明显高于对照组 ($P < 0.05$, $P < 0.05$); 3 d 时达到最大值,5 d 时又有所降低,表现出先升高后又略有降低的变化趋势。肌肉、鳃中 MT 蛋白变化趋势在 1 d、3 d 同肝胰腺的大致相同,且肌肉 1 d 和 5 d 组与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$, $P < 0.05$),鳃 3 d 组与对照组相比有极显著差异 ($P < 0.01$),5 d 组与对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。卵巢 MT 蛋白含量未见明显变化。

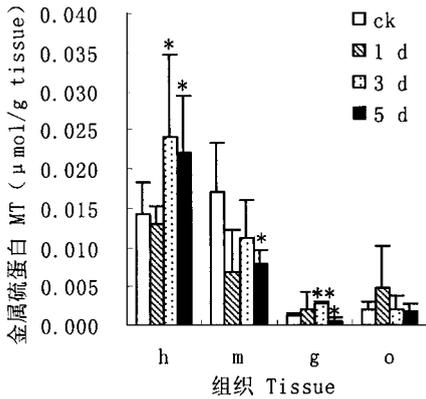


图 1 低剂量(14.5 mg/L)镉诱导河南华溪蟹 MT 含量的时间-效应关系

Fig.1 The exposure time effect of Cd (14.5 mg/L) on MT contents in *S. henanense*

与对照组相比** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;

h 肝胰腺; m 肌肉; g 鳃; o 卵巢; 下同。

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. Compared to control group;

h hepatopancreas; m muscle; g gill; o ovary;

The same below.

图 2 显示,中剂量镉(29 mg/L)诱导 1 d、5 d 后,河南华溪蟹肝胰腺 MT 蛋白含量随染毒时间的延长而逐渐增加,5 d 时达到最高(0.022 087 $\mu\text{mol/g}$,为对照组肝胰腺 MT 的 1.57 倍, $P < 0.05$)。肌肉和鳃 MT 含量大体上保持

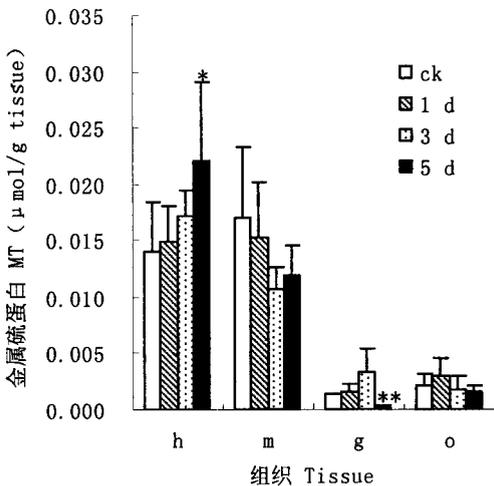


图 2 中剂量(29 mg/L)镉诱导河南华溪蟹 MT 含量的时间-效应关系

Fig.2 The exposure time effect of

Cd (29 mg/L) on MT contents in *S. henanense*

逐渐降低的趋势,但变化不甚明显。卵巢 MT 蛋白含量未见明显变化。

观察图 3 发现,高剂量镉(58 mg/L)诱导 1 d、3 d、5 d 后,河南华溪蟹肝胰腺 MT 含量明显高于对照组($P < 0.01$, $P < 0.05$, $P < 0.01$),1 d 即达到最大值(为对照组肝胰腺 MT 的 1.99 倍, $P < 0.01$),3 d 有所降低,5 d 又升高。肌肉和鳃 MT 含量变化趋势在 1 d、3 d 与肝胰腺基本一致。但卵巢 MT 含量没有明显变化。

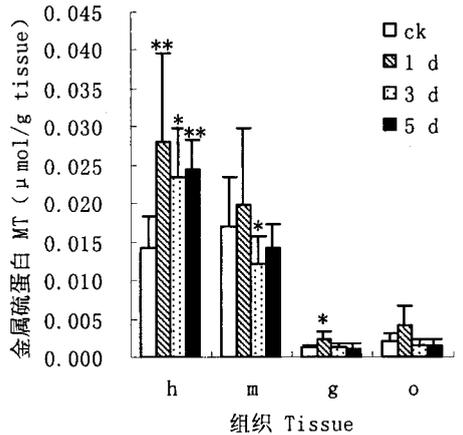


图 3 高剂量(58 mg/L)镉诱导河南华溪蟹 MT 含量的时间-效应关系

Fig.3 The exposure time effect of Cd (58 mg/L) on MT contents in *S. henanense*

2.2 镉诱导河南华溪蟹 MT 表达的剂量-效应关系 由图 4 可见,肝胰腺 MT 蛋白含量随镉浓度的增加而逐渐升高。当浓度为 58 mg/L 时,肝胰腺 MT 含量达到最大且明显高于对照组($P < 0.01$)。肌肉和鳃中 MT 蛋白水平变化趋势与肝胰腺基本一致。卵巢 MT 蛋白含量在镉诱导 1 d 内各染毒浓度组均未见明显变化。

图 5 显示,肝胰腺 MT 含量随染毒浓度的加大出现先升高后降低,最后又升高的趋势。当浓度为 29 mg/L 时,MT 含量虽有降低但依然比对照组高。肌肉 MT 含量变化与肝胰腺的相似,而鳃 MT 含量变化不规律。卵巢 MT 与对照组相比无明显的差异。

观察图 6 发现,肝胰腺 MT 蛋白含量随镉浓度的加大而升高(3 个处理浓度分别为对照组肝胰腺 MT 的 1.57 倍、1.57 倍和 1.74 倍, P

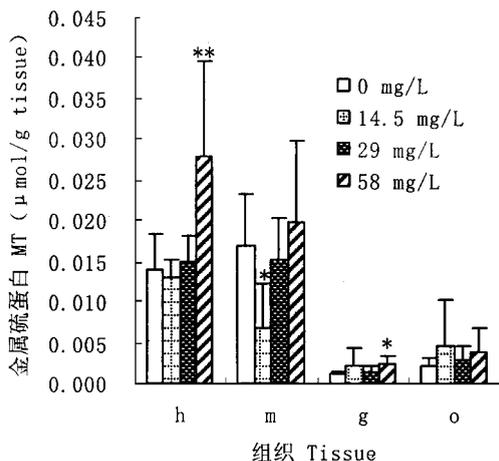


图 4 镉诱导河南华溪蟹 1 d MT 含量的剂量-效应关系

Fig.4 The dose effect of one-day Cd treatment on MT contents in *S. henanense*

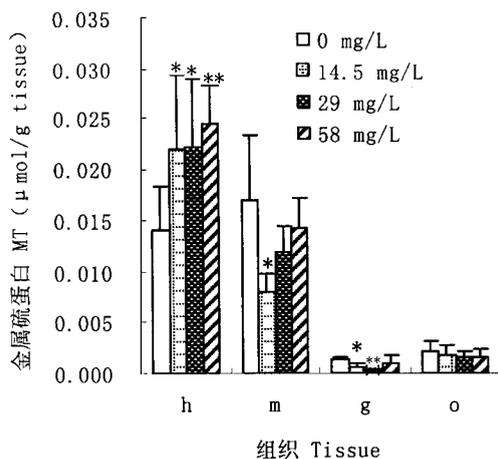


图 6 镉诱导河南华溪蟹 5 d MT 含量的剂量-效应关系

Fig.6 The dose effects of five-day Cd treatment on MT contents in *S. henanense*

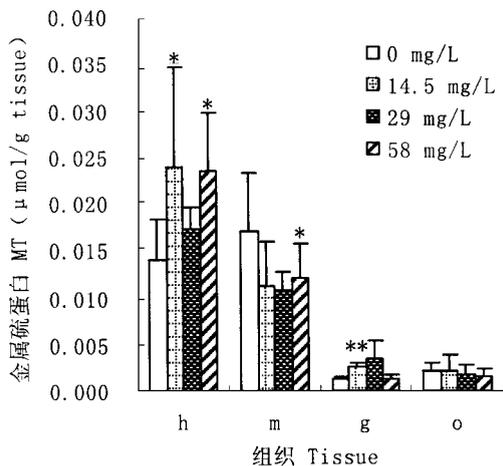


图 5 镉诱导河南华溪蟹 3 d MT 含量的剂量-效应关系

Fig.5 The dose effect of three-day Cd treatment on MT contents in *S. henanense*

< 0.05、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$),但不同染毒浓度组之间增幅并不大。肌肉和鳃中 MT 含量变化与肝胰腺的大体一致。卵巢 MT 含量与对照组比较无明显的差异。

2.3 镉诱导河南华溪蟹 MT 表达的组织差异性 由实验结果可知,镉诱导河南华溪蟹 MT 在各组织中表达含量不同,其中肝胰腺 MT 表达水平最高(0.027 97 $\mu\text{mol/g}$,为对照组肝胰腺

MT的1.99倍, $P < 0.05$);肌肉组织中 MT 蛋白水平也较高;而鳃和卵巢中 MT 蛋白水平较低。在镉诱导下,组织中 MT 水平的变化也不相同,肝胰腺 MT 的含量变化较为明显和规律;卵巢中 MT 含量未见明显变化,而肌肉和鳃中 MT 含量变化不及肝胰腺明显。

3 讨论

3.1 镉诱导河南华溪蟹 MT 表达的时间与剂量效应 镉的摄入可以引起机体发生一系列毒理学变化,产生不可逆转的生物损伤^[18]。MT 作为一种重金属中毒后诱导产生的解毒蛋白,可以在生物组织胞浆内与镉结合,降低镉与细胞内其他重要细胞器亲合的能力,从而起到缓解镉毒性效应的作用^[19]。研究表明,在镉摄入与 MT 之间存在着某些联系,MT 在重金属中毒后的代谢、毒效应发挥与解毒过程中起着极为重要的作用^[20]。本实验结果表明,在同一染毒剂量下,河南华溪蟹四种组织 MT 表达的时间-效应关系变化不尽相同。低剂量镉(14.5 mg/L)诱导时,随着染毒时间的延长,肝胰腺中 MT 含量逐渐增加,3 d 时,MT 含量达到最大;5 d 时,由于肝胰腺组织内镉离子蓄积已达到饱和,本身诱导的 MT 不再增加;同时,MT 在组织内

与镉结合不稳定且自身代谢速度快,所以 MT 含量有所降低。中剂量镉(29 mg/L)诱导时,由于 MT 的产生与肝胰腺内镉离子的富集在一定范围内呈现平行关系,所以中剂量镉诱导随着染毒时间的延长肝胰腺内的镉含量也随之增大,MT 含量也在增加;与此同时存在其他组织向肝胰腺内转移 Cd-MT 的过程,因此 MT 的含量表现为一个逐渐增加的过程。高剂量镉(58 mg/L)诱导时,由于染毒浓度加大,肝胰腺在染毒 1 d 后 MT 含量即达到最大值,之后随着 MT 诱导达到最大且 MT 代谢速度加快,MT 含量逐渐降低。另外,在同一染毒时间内,河南华溪蟹组织中 MT 蛋白表达的剂量-效应关系也各不相同。染毒 1 d 后,肝胰腺 MT 含量呈明显的剂量-效应关系:随着染毒剂量的加大,肝胰腺中富集的镉离子逐渐增加,同时 MT 的含量也逐渐升高。染毒 3 d 后,肝胰腺 MT 含量出现先升高后降低,最后又上升的趋势,这主要是由于以下三个过程综合作用所导致:第一,自身 MT 诱导量随剂量加大而升高;第二,MT 与 Cd 结合不稳定且自身代谢快;第三,其他组织 MT 向肝胰腺组织转运。染毒 5 d 后,由于其他组织向肝胰腺组织转运 MT 过程的减弱,剂量-效应作用成为主导因素,所以肝胰腺 MT 含量随着剂量的加大而增加,而增幅较小主要是 MT 含量已经基本达到它自身诱导量的域值且 MT 自身代谢所导致。

3.2 镉诱导河南华溪蟹 MT 表达的组织差异性 镉诱导河南华溪蟹 MT 的含量存在明显的组织差异性。经镉处理后,河南华溪蟹组织中 MT 蛋白水平都有不同程度的升高,其中肝胰腺 MT 含量最高,变化也最明显。这主要是由于肝胰腺是重金属蓄积的主要组织,是 MT 合成的重要场所。在肝胰腺内,MT 通过与镉结合从而起到解毒的作用。卵巢 MT 含量未发生明显变化的原因主要是由于镉蓄积量较少,说明卵巢并不是重金属作用和 MT 合成的重要器官,这与哺乳动物的研究结果一致^[21-23]。肌肉和鳃组织中 MT 含量介于肝胰腺和卵巢组织之间,与已报道的北大西洋 63 种食用蟹的 MT 分布

基本一致^[13]。研究资料显示,海蟹中鳃组织 MT 的含量较肌肉组织的低^[13],而在本实验中,作为纯淡水蟹的河南华溪蟹,肌肉组织中 MT 含量略高于鳃组织中,这可能是纯淡水蟹与海蟹本身的差异所导致,也可能是其他因素所导致。但其确切机制仍有待于进一步探讨。总之,在一定条件下镉可以引起河南华溪蟹机体 MT 含量的变化,并且这种变化存在着明显的组织差异性。

水生无脊椎动物常常被作为生物指示物,被广泛用于重金属污染的生态毒理学检测中。蟹类生活在水体基底层,对外界环境的变化非常敏感且容易富集金属离子,因此必然需要特定的生理机制来应对,MT 可能在其中起重要的作用^[24]。利用溪蟹作为淡水环境污染的生物指示物,不但能够综合反映污染因素对水体污染的总体效应,而且能够准确反应水体污染的程度。

参 考 文 献

- [1] 常秀丽. 金属硫蛋白及其在镉接触评价中的应用. 国外医学卫生学杂志, 2004, 31(1): 32~36.
- [2] 王兰, 孙海峰, 李春源. 镉对长江华溪蟹精子发生的影响. 动物学报, 2002, 48(5): 677~684.
- [3] 王兰, 杨秀清, 王茜等. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响. 动物学报, 2001, 47(专刊): 96~100.
- [4] 王兰, 王定星. 镉对长江华溪蟹肝胰腺细胞超微结构的影响. 解剖学报, 2003, 34(5): 527~531.
- [5] 郭禹, 王兰, 王茜等. 镉对长江华溪蟹鳃组织细胞超微结构的影响. 见: 中国甲壳动物学会编辑. 甲壳动物学论文集(第四辑). 北京: 科学出版社, 2003, 485~490.
- [6] 韩小铮, 王兰, 王茜等. 体外暴露镉对长江华溪蟹肌肉组织细胞超微结构的影响. 见: 中国甲壳动物学会编辑. 甲壳动物学论文集(第四辑). 北京: 科学出版社, 2003, 491~496.
- [7] 张彰, 王茜. 镉对长江华溪蟹精子发生过程中细胞核超微结构的影响. 中国水产, 2003, 2: 58~60.
- [8] 王兰, 王茜, 王定星等. 镉在长江华溪蟹主要组织器官的积累. 山西大学学报(自然科学版), 2003, 26(2): 176~178.
- [9] Cousins R J, Lee-Ambrose L M. Nuclear zinc uptake and interactions and metallothionein gene expression are influenced by dietary zinc in rats. *J Nutr*, 1992, 122(1): 56~64.

- [10] 林 任宏伟,茹炳根. 鱼体内金属硫蛋白与水环境关系的研究. 北京大学学报(自然科学版),2001,37(6): 779 ~ 784.
- [11] 林 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. 环境污染与防治,2001,23(5):265 ~ 267.
- [12] 叶属峰,陆健健. 无脊椎动物金属硫蛋白多样性及其生态服务功能. 生物多样性,2000,8(3):317 ~ 324.
- [13] 牛长纓,姜勇,雷朝亮等. 无脊椎动物金属硫蛋白的研究. 动物学杂志,2002,37(1):72 ~ 76.
- [14] Bebianno M J, Langston W J. Cadmium and metallothionein turnover in different tissues of the gastropod *Littorina littorea*. *Talanta*, 1998, 46 : 301 ~ 313.
- [15] Wu J P, Chen H C. Metallothionein induction and heavy metal accumulation in white shrimp *Litopenaeus vannamei* exposed to cadmium and zinc. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2005, 140 : 383 ~ 394.
- [16] Onasaka S, Cherian M G. Toxicological significance of metallothionein. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1982, 63 : 270.
- [17] Martín-Díaz M L, Villena-Lincoln A, Bamber S, et al. An integrated approach using bioaccumulation and biomarker measurements in female shore crab, *Carcinus maenas*. *Chemosphere*, 2005, 58 : 615 ~ 656.
- [18] Michele J, Hein H, Preez D, et al. The freshwater river crab *Potamonautes warreni* as a bioaccumulative indicator of iron and manganese pollution in two aquatic systems. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1998, 41 : 203 ~ 214.
- [19] Liu Y P, Liu J, Marcus B, et al. Transgenic mice that overexpress metallothionein I are protected from cadmium lethality and hepatotoxicity. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1995, 135 : 222 ~ 225.
- [20] Käji J H R, Nordberg M Eds. Metallothionein. Basel : Birkhäuser Verlag, 1979, 31 ~ 74.
- [21] 任绪义,周雍,张建鹏等. 镉中毒大鼠睾丸与肝脏金属硫蛋白表达的时相研究. 生物化学与生物物理进展, 2002, 29(5) : 811 ~ 815.
- [22] 任绪义,周雍,张建鹏等. 镉暴露大鼠睾丸支持细胞金属硫蛋白表达的时相研究. 生物化学与生物物理进展, 2003, 30(6) : 965 ~ 968.
- [23] 张建鹏,仲燕,任绪义等. 镉诱导大鼠睾丸三种类型细胞和肝脏金属硫蛋白基因表达的研究. 第二军医大学学报, 2003, 24(2) : 184 ~ 187.
- [24] 李冰,付欣,刘启才等. 4 种不同生境的蟹类金属硫蛋白 cDNA 的克隆与比较. 应用与环境生物学报, 2002, 8(6) : 627 ~ 631.