

文章编号: 1000-0615(2005)05-0715-04

• 研究简报 •

## 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的影响

吴众望, 潘鲁青

(中国海洋大学海水养殖教育部重点实验室, 山东 青岛 266003)

关键词: 重金属离子; 凡纳滨对虾; 肝胰脏; 金属硫蛋白

中图分类号: S917 文献标识码: A

### Effects of heavy metal ions on metallothionein concentration in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei*

WU Zhong-wang, PAN Lu-qing

(The Key Laboratory of Marine Culture of Ministry of Education, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

**Abstract:** The metallothionein (MT) concentration in hepatopancreas of *Litopenaeus vannamei* changed significantly with the increasing of metal ions concentration and prolongation of exposure time ( $P < 0.05$ ), whereas that in the control groups had no marked changes ( $P > 0.05$ ). Exposed to three heavy metal ions, the MT concentration in hepatopancreas changed very significantly in 6 h ( $P < 0.01$ ). The MT concentration inducted by  $\text{Cu}^{2+}$  (0.1, 0.2, 0.5, 1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ),  $\text{Zn}^{2+}$  (1, 2, 5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and  $\text{Cd}^{2+}$  (0.05, 0.1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) increased in 96 h with time and changed stably after 48 h. In addition, the MT concentration inducted by  $\text{Zn}^{2+}$  (10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) and  $\text{Cd}^{2+}$  (0.25, 0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) was up to max. at 48 h, began to decrease with time passing by, and still higher than that in the control groups. Meanwhile the inductive ratio of three heavy metal ions on metallothionein concentration were  $\text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$  in experimental time.

**Key words:** heavy metal ions; *Litopenaeus vannamei*; hepatopancreas; metallothionein(MT)

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类小分子的蛋白质,能螯合金属离子,调节微量元素(主要为 Cu、Zn)贮存、运输和代谢及具有对重金属中毒解毒作用和清除氧自由基的功能<sup>[1-5]</sup>。目前,关于重金属胁迫对甲壳动物 MT 含量的影响国外已有一些研究报道<sup>[6-8]</sup>;国内这方面尚未见报道。本文研究了 3 种重金属离子对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)肝胰脏 MT 含量的影响,探讨了凡纳滨对虾对重金属离子的解毒机理,为甲壳动物养殖环境毒理学研究奠定了理论基础,也为对虾养殖水环境污染监测提供了科学依据。

## 1 材料与实验方法

### 1.1 实验材料

实验所用凡纳滨对虾于 2002 年 9 月购自青岛市营海

对虾养殖场,体色正常,健康活泼,体长  $8.0 \pm 0.5$  cm,体重  $10 \pm 1.5$  g。采用青岛近海的自然海水暂养 8~10 d,海水盐度为 30, pH 为 8.2, 温度为  $24 \pm 0.5$  °C, 连续充气,日换水 2 次,换水量为 1/3~1/2,并适量投喂对虾配合饲料。

### 1.2 实验方法

重金属离子梯度的设置 经检测,用青岛沿海自然海水的  $\text{Cu}^{2+}$ 、 $\text{Zn}^{2+}$ 、 $\text{Cd}^{2+}$  的含量分别为 1.15、47.5、0.46  $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。实验重金属离子的种类和来源为  $\text{Cu}^{2+}$  ( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ )、 $\text{Zn}^{2+}$  ( $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ )、 $\text{Cd}^{2+}$  ( $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ )。3 种重金属离子按《中华人民共和国渔业水质标准》中  $\text{Cu}^{2+} \leq 0.01$   $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Zn}^{2+} \leq 0.1$   $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $\text{Cd}^{2+} \leq 0.005$   $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的 10 倍、20 倍、50 倍、100 倍设置实验梯度。 $\text{Cu}^{2+}$  的实验梯度为 0.1、0.2、0.5、1  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{Zn}^{2+}$  的梯度为 1、2、5、10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ;  $\text{Cd}^{2+}$  的梯度为 0.05、0.1、0.25、0.5  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。所有实验梯度均设

收稿日期: 2004-06-02

资助项目: 山东省科技兴海项目《低盐度地下水凡纳滨对虾养殖技术的开发研究》资助(2001-3-6)

作者简介: 吴众望(1980-),男,安徽安庆人,硕士,从事养殖环境毒理学的研究, E-mail: phy@ouc.edu.cn

通讯作者: 潘鲁青, E-mail: panlq@ouc.edu.cn

3 个重复组, 并不加重金属离子组为对照组。

实验在 50 cm × 40 cm × 30 cm 的塑料水槽内进行, 各梯度分别放健康的凡纳滨对虾各 20 尾, 实验期间的养殖管理与暂养期间完全相同, 换水时分别加入相对应重金属离子浓度的养殖用水, 实验期间对虾无死亡现象。实验开始后于 0、6 h、12 h、24 h、48 h、72 h、96 h 取样, 每个梯度各水槽随机选取 2 尾对虾, 再用纱布擦干对虾的体表, 置冰盘内解剖, 取肝胰脏, 用预冷重蒸水洗净、滤纸吸干后, 称其湿重, 置于 1.5 mL 离心管中。

**MT 含量的测定** MT 的含量采用金属/血红蛋白饱和法测定<sup>[9]</sup>。取其肝胰脏加入 4 倍体积预冷的匀浆液中 (0.25 mol·L<sup>-1</sup> 蔗糖, 0.1 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.6 缓冲液), 冰浴以 10 000 r·min<sup>-1</sup> 匀浆 5 min, 然后在高速冷冻离心机中以 0℃、10 000 r·min<sup>-1</sup>, 离心 10 min, 放入沸水浴中加热 2 min, 再离心 2 min。取上清液 0.2 mL 加入 0.5 mL 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的 Ag<sup>+</sup> (Ag<sup>+</sup> - Hb 饱和法), 充分混合后室温下孵育 10 min, 加入 0.1 mL 2% 牛血红蛋白混合, 放入沸水浴中加热 2 min, 冰水浴冷却后, 以 10 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 2 min, 再加入 0.1 mL 2% 牛血红蛋白混合, 沸水浴 2 min, 经冰水浴冷却和离心 2 min 后, 取上清液加入混合酸溶液 (高氯酸 硝酸为 1: 3) 中消化、定容, 用 VISTA - MPX CCD ICP - OES (VARIAN) 测定 Ag<sup>+</sup> 浓度。

金属硫蛋白 MT 浓度以 MT 分子量为 7000 Da 和 1 mol 的 MT 可结合 18 mol 的 Ag<sup>+</sup> (原子量为 108) 计算。MT 含量: 测定的 Ag<sup>+</sup> 浓度 × 7000 / (18 × 108), 以每克湿组织中所含 MT 的毫克数表示 (mg·g<sup>-1</sup>)。

### 1.3 数据的处理和分析

所有数据以 3 个重复组数据的平均值 (Means ± SD) 表示, 并采用单因素方差分析 (ANOVA) 和 Duncan 检验法统计分析。

## 2 结果

### 2.1 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的影响

由图 1 可知, 随着 3 种重金属离子浓度的升高和作用时间的延长, 凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量均呈显著变化 ( $P < 0.05$ ), 而对照组变化不显著 ( $P > 0.05$ ), 在实验时间内 3 种重金属离子诱导 MT 的能力为高浓度组 > 低浓度组 > 对照组。

在 3 种重金属离子作用下, 凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量在 6 h 时显著升高 ( $P < 0.01$ ), 分别在 Cu<sup>2+</sup> (0.1、0.2、0.5、1 mg·L<sup>-1</sup>), Zn<sup>2+</sup> (1、2、5 mg·L<sup>-1</sup>) 和 Cd<sup>2+</sup> (0.05、0.1 mg·L<sup>-1</sup>) 作用 48 h 后, 各处理组 MT 含量趋于稳定, 而 Zn<sup>2+</sup> (10 mg·L<sup>-1</sup>) 和 Cd<sup>2+</sup> (0.25、0.5 mg·L<sup>-1</sup>) 处理组在 48 h 时 MT 含量达到最大值, 后随着作用时间的延长, MT 含量下降, 呈现一峰值变化趋势。

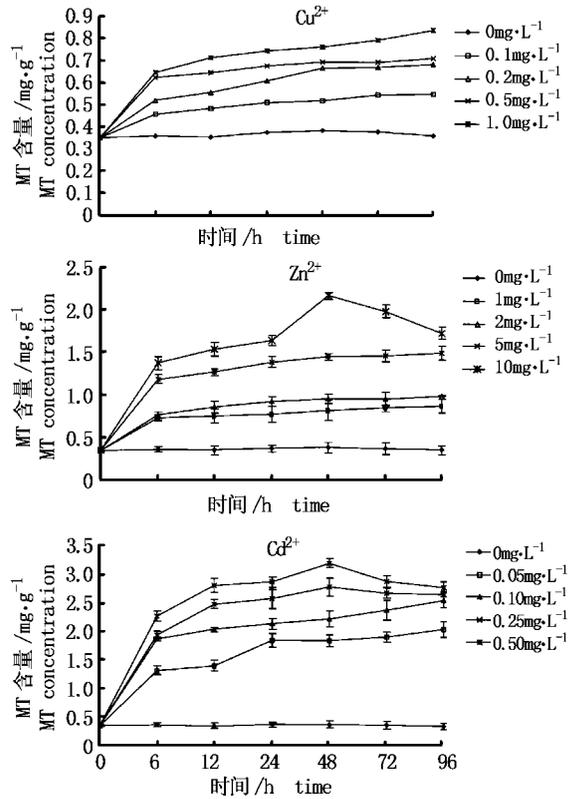


图 1 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的影响

Fig. 1 Effects of heavy metal ions on MT concentration in hepatopancreas of *L. vannamei*

### 2.2 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 的诱导程度

如表 1 所示, 3 种重金属离子在实验时间内对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 的诱导率均表现为 Cd<sup>2+</sup> (0.5 mg·L<sup>-1</sup>) > Zn<sup>2+</sup> (1 mg·L<sup>-1</sup>) > Cu<sup>2+</sup> (1 mg·L<sup>-1</sup>), 如 48 h 的诱导率分别为 825%、220% 和 212%, 由此表明 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的诱导能力为 Cd<sup>2+</sup> > Zn<sup>2+</sup> > Cu<sup>2+</sup>。

## 3 讨论

### 3.1 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的影响

Correia 等<sup>[10]</sup>报道了 4 μg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 作用 2 d 时, 钩虾 (*Gammarus locusta*) 体内 MT 含量是对照组的 136%, 且 6 d 达最高值 (155%); Manuela 等<sup>[7]</sup>研究表明在 10 mg·L<sup>-1</sup> Cd<sup>2+</sup> 和 5 mg·L<sup>-1</sup> Zn<sup>2+</sup> 作用 (24 和 48 h) 下, 卤虫 (*Artemia parthenogenetica*) 机体 MT 含量随作用时间的延长显著增加, 且 Cd<sup>2+</sup> 诱导 MT 含量比 Zn<sup>2+</sup> 的高; 据 Moksnes 等<sup>[11]</sup>报道, 在 Cd<sup>2+</sup> (0~2 mg·L<sup>-1</sup>) 作用 6 d 时, 凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量随浓度的升高而显著升高, 而 Cd<sup>2+</sup> (1.5 mg·L<sup>-1</sup>) 作用 0~9 d 时, 肝胰脏 MT 含量随时间的延长而显著升高。本

研究表明凡纳滨对虾在 3 种重金属离子作用下均可诱导产生 MT, 且 MT 在 0~ 48 h 内随重金属离子浓度和作用时间的增加而升高, 这与上述研究结果基本一致。这说明 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的影响具有一定的时间、剂量效应关系。

张克俭<sup>[12]</sup>研究表明, 在低浓度  $Zn^{2+}$  ( $0.18\sim 0.78\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用下, 中国对虾 (*Penaeus chinensis*) 肝胰脏的肝小管分泌细胞增多, 吸收细胞数量减少, 而高浓度 ( $8.04\sim 125.89\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 导致肝小管内分泌细胞胞体破裂, 部分肝管破坏。作者推测  $Zn^{2+}$  ( $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和  $Cd^{2+}$  ( $0.25, 0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用下, 肝胰脏 MT 含量呈现一峰值变化的原因可能是由于重金属离子的过量侵入使细胞活动紊乱, 肝小管细胞解体, 引起组织的伤害, 造成机体合成 MT 速度及含量的下降。

表 1 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 的诱导程度

Tab. 1 Induced ratio of three heavy metal ions on MT in hepatopancreas of *L. vannamei*

取样时间(h) sampling time	诱导率(%) induced ratio		
	$Cu^{2+}$ ( $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$Zn^{2+}$ ( $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )	$Cd^{2+}$ ( $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
0	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>	100 <sup>a</sup>
6	179 <sup>b</sup>	201 <sup>b</sup>	627 <sup>b</sup>
12	187 <sup>bc</sup>	203 <sup>b</sup>	792 <sup>c</sup>
24	190 <sup>cd</sup>	208 <sup>b</sup>	759 <sup>c</sup>
48	212 <sup>e</sup>	220 <sup>c</sup>	825 <sup>d</sup>
72	216 <sup>e</sup>	223 <sup>c</sup>	758 <sup>c</sup>
96	218 <sup>e</sup>	227 <sup>c</sup>	764 <sup>c</sup>

注: 同一列数据右上角相同字母表示差异不显著 ( $P > 0.05$ ), 不同表示差异显著 ( $P < 0.05$ )

Notes: The same superscript letters in the same rank in the table mean insignificant difference ( $P > 0.05$ ), while the different letters mean significant difference ( $P < 0.05$ ).

### 3.2 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 的影响机制

MT 能与多种重金属结合, 而且当水环境受重金属污染, 或者将重金属注入动物体内, 均能诱导它的产生。重金属主要与体内新合成的 MT 相结合, 但当超过动物合成 MT 的速度和结合的能力时, 重金属即与大分子蛋白相结合, 抑制或使酶失活, 引起中毒症状<sup>[13]</sup>。目前研究证明金属对 MT 的诱导反应是发生在转录水平, 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 迅速增加。钙离子导体能在多种细胞中诱导 MT mRNA 表达, 而钙离子通道阻断剂和钙调素抑制剂则明显抑制上述诱导作用, 由此表明, MT 的诱导可能与钙通道的调节有关<sup>[14]</sup>。本实验中凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量在  $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  作用下被显著诱导升高, 3

种重金属离子  $Cu^{2+}$  ( $0.1, 0.2, 0.5, 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )、 $Zn^{2+}$  ( $1, 2, 5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 和  $Cd^{2+}$  ( $0.05, 0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 作用 48 h 后, MT 含量趋于稳定, 可能是因为金属离子以多种方式进入体内后, 肝胰脏细胞内金属调节因子增加了基因转录的速度而使 MT 合成速度增加, 48 h 后细胞的钙离子通道可能被阻断, 而使 MT 含量维持在一定的水平上。Webb<sup>[15]</sup> 研究表明在生物许多组织内  $Cd^{2+}$  诱导合成 MT 含量的能力较  $Zn^{2+}$  强; 另据 Pedersen 等<sup>[6]</sup> 报道真蟹 (*Carcinus maenas*) 在  $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$   $Cu^{2+}$ 、 $Zn^{2+}$  和  $Cd^{2+}$  作用下, 滨蟹肝胰脏诱导产生 MT 的能力为  $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$ , 并认为  $Cu^{2+}$  主要在氧化应激反应中起作用; 本文的暴露实验证明 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 的诱导率为  $Cd^{2+} > Zn^{2+} > Cu^{2+}$ , 这与上述研究的结果基本一致。作者认为这种差异主要与甲壳动物对 3 种重金属离子吸收、累积和诱导机制的不同有关。

### 3.3 MT 含量作为养殖水环境重金属离子污染指标的可行性

许多金属离子在基因转录水平直接诱导 MT 合成, 这证明 MT 是维持细胞内金属稳态的快速应答和有效的反馈机制的一部分<sup>[13]</sup>。王海葵等<sup>[16]</sup> 认为 MT 含量与水环境和体内组织中的重金属之间有显著的相关性, 并认为 MT 可以作为重金属暴露的生物标志物; Moksnes 等<sup>[11]</sup> 研究表明, 凡纳滨对虾肝胰脏 MT 比常规监测重金属压力的指标(成活率、增重率等) 具有更高的敏感性及早期的预警能力; Legras<sup>[17]</sup> 研究认为甲壳动物受自然因素如蜕皮周期、性别、规格、饥饿等的影响, 均会改变机体对水环境中金属离子的吸收及在体内的累积, 而导致 MT 的改变, 并提出尤其在甲壳动物蜕皮期应用 MT 作为水环境的监测指标应慎重考虑。本研究结果表明, 3 种重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 随浓度的升高和作用时间的延长显著变化, 表现出一定的时间、剂量效应关系, 这说明 MT 可作为凡纳滨对虾对重金属解毒作用的标志物, 但基于 MT 的作用机理, MT 不能作为机体受伤害的指标。因此, 作者认为凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量可以作为养殖水环境中重金属离子污染的监测指标, 同时还应综合考虑重金属离子对机体的伤害指标如抗氧化酶系统等。

### 参考文献:

- [1] Kagi J H R, Schaffer A. Biochemistry of metallothionein[J]. Biochemistry, 1988, 27: 8509- 8515.
- [2] 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- 289.
- [3] 刘安玲, 朱必凤. 金属硫蛋白的研究进展[J]. 韶关学院学报, 2001, 22(3): 86- 91.
- [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.
- [5] 叶寒青, 杨祥良, 周井炎, 等. 环境污染物质毒性作用机理研究进展[J]. 广东微量元素科学, 2001, 8(3): 9- 12.

- [6] Pedersen S N, Lundelbye A K, Depledge M H. Field application of metallothionein and stress protein biomarkers in the shore crab (*Carcinus maenas*) exposed to trace metals [J]. *Aquatic Toxicology*, 1997, 37: 183- 200.
- [7] Marfnez M, José D R, Torreblanca A, *et al.* Effects of cadmium exposure on zinc levels in the brine shrimp *Artemia parthenogenetica* [J]. *Aquac*, 1999, 172: 315- 325.
- [8] Okafson R W, Keams A, Sim R G. Heavy metal induction of metallothionein synthesis in the hepatopancreas of the crab *Scylla serrata* [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1979, 62: 417- 424.
- [9] Scheuhammer A M, Cherian M G. Quantification of metallothioneins by a silver-saturation method [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1986, 82: 417- 425.
- [10] Correia A D, David R L, Costa M H. Effects of water-borne copper on metallothionein and lipid peroxidation in the marine amphipod *Gammarus locusta* [J]. *Marine Environmental Research*, 2002, 54: 357- 360.
- [11] Moksnes P, Lindahl U, Haux C. Metallothionein as a bioindicator of heavy metal exposure in the tropical shrimp, *Penaeus vannamei*: a study of dose-dependent induction [J]. *Marine Environmental Research*, 1995, 39: 143- 146.
- [12] 张克俭. 锌和氮对对虾肝脏的毒性作用 [J]. *水产学报*, 1993, 17(1): 52- 59.
- [13] 李永祺, 丁美丽. 海洋污染生态学 [M]. 北京: 海洋出版社, 1991.
- [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.
- [15] Webb M. Toxicological significance of metallothionein [J]. *Experientia Supplementum*, 1987, 52: 109- 134.
- [16] 王海黎, 陶澍. 生物标志物在水环境研究中的应用 [J]. *中国环境科学*, 1999, 19(5): 421- 426.
- [17] Legas S, Mouneyrac C, Amiard J C, *et al.* Changes in metallothionein concentrations in response to variation in natural factors (salinity, sex, weight) and metal contamination in crabs from a metal-rich estuary [J]. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2000(246): 259- 279.

## 欢迎订阅 2006 年《中国水产科学》

《中国水产科学》是中国水产科学研究院主办的国家级学术期刊, 主要报道水产生物学基础研究、水产生物病害及其防治、水产生物营养及饲料、渔业生态保护及渔业水域环境保护、水产品保鲜与加工综合利用、水产资源、海淡水捕捞、水产养殖与增殖以及渔船、渔业机械与仪器等方面的最新进展、最新成果、最新技术和方法。主要服务对象是科研、教学、科技管理人员以及大专院校师生。是反映水产科研创新成果的窗口和培养人才的园地。它面向水产业, 为水产业的持续发展和水产经济建设服务。

本刊为双月刊, A4 开本, 每期 140 页, 单月出版, 国内外公开发行人。国内定价 20 元/期, 全年 120 元(含邮费)。邮发代号: 18- 250, 国内统一刊号: CN11- 3446/S, 国际标准刊号: ISSN1005- 8737, 国外代号 4639Q。全国各地邮电局(所)办理订阅手续(可破季订阅)。漏订或补订当年和过期刊, 请直接向编辑部订阅。另备有少量合订本, 欢迎购买。

《中国水产科学》1994- 2003 年光盘(ISBN 7- 89995- 232- 8/S·004)已经出版发行, 每套定价 150 元。需要购买光盘的读者, 请将款通过邮局直接寄到编辑部, 款到寄盘, 同时开正式报销发票。欢迎广大读者与编辑部直接联系购买事宜。

编辑部地址: 北京市丰台区青塔村 150 号(邮编: 100039)

电话: 010- 68673921, 传真: 010- 68673931

E-mail: jfishok@publica.bj.cninfo.net