

浑河野生鲫鱼体内重金属污染水平与金属硫蛋白基因表达

张艳强^{1,2}, 安立会^{2,*}, 郑丙辉², 林进¹, 陈浩², 赵兴茹²

1. 河北师范大学化学与材料科学学院 石家庄 050012

2. 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室 北京 100012

摘要: 为揭示浑河重金属污染的潜在生态风险,分析测定了浑河野生鲫鱼体内重金属的残留水平以及肝和鳃组织中金属硫蛋白基因表达。对鱼体各组织中 Cr、Cd、Pb、Cu 和 Zn 含量的分析结果显示,各组织重金属含量的排序为肠 > 肝 > 鳃 > 肌肉,且 Zn 含量最高(17.49 ~ 176.01 mg·kg⁻¹,以湿体质量计算),Cd 含量最低(N.D. ~ 0.57 mg·kg⁻¹,以湿体质量计算)。均值综合污染指数评价结果显示,浑河野生鲫鱼受到重金属的轻微污染,且从上游至下游呈现逐渐升高的趋势,其中,Cr、Pb 和 Zn 对均值综合污染指数贡献较大。利用实时定量 PCR 方法分析鲫鱼肝组织金属硫蛋白基因表达发现,中、下游鲫鱼肝组织的金属硫蛋白基因表达水平较上游有所升高,且与肌肉组织综合污染指数具有较好相关性($R^2 = 0.71$),这表明金属硫蛋白基因可作为监测环境重金属污染的敏感标志物。

关键词: 浑河; 重金属; 鲫鱼; 综合污染指数; 金属硫蛋白

文章编号: 1673-5897(2012)1-057-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Heavy Metal Levels and Metallothionein mRNA Expressions in Wild Crucian Carp (*Carassius auratus auratus*) from Hun River

Zhang Yanqiang^{1,2}, An Lihui^{2,*}, Zheng Binghui², Lin Jin¹, Chen Hao², Zhao Xingru²

1. College of Chemistry & Material Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050012, China

2. State Key Laboratory of Environmental Criteria and Risk Assessment, Chinese Research Academy of Environmental Sciences, Beijing 100012, China

Received 12 October 2011 accepted 9 November 2011

Abstract: To study the potential ecological risk of heavy metal contamination in Hun River, the contents of heavy metals in different tissues of wild crucian carps from Hun River were analyzed, and the metallothionein mRNA expressions in gill and hepatic tissues were also investigated. Results showed that the accumulation amounts of Cr, Cd, Pb, Cu and Zn in tissues followed the order of intestine > liver > gill > muscle. Zn content was the highest, ranging from 17.49 to 176.01 mg·kg⁻¹ (wet weight), and Cd content was the lowest, ranging from non-detectable level to 0.57 mg·kg⁻¹ (wet weight). The average pollution index assessment results showed that the wild crucian carps in Hun River were slightly contaminated by heavy metals. Furthermore, the pollution level in wild crucian carps increased from upstream to downstream. Among the studied heavy metals, the contents of Cr, Pb and Zn mostly contributed to the pollution index. The metallothionein mRNA expression levels in livers of crucian carps detected with real-time quantitative polymerase chain reaction were found to increase from upstream to downstream. A positive relationship was observed between the metallothionein mRNA expression levels in livers and the average pollution index in muscles ($R^2 = 0.71$), indicating that the

收稿日期: 2011-10-12 录用日期: 2011-11-09

基金项目: 国家水体污染控制与治理科技重大专项(2009ZX07528-03)

作者简介: 张艳强(1987-),男,硕士研究生,研究方向为环境毒理学, E-mail: zhangsir-1987@163.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: anlh@craes.org.cn

metallothionein gene can be used as a promising biomarker for monitoring the heavy metal contamination.

Keywords: Hun River; heavy metal; crucian carp (*Carassius auratus auratus*); average pollution index; metallothionein

近年来,随着流域经济的快速发展,大量工业废水和生活污水被直接或间接排入浑河,造成了浑河的严重污染^[1-2],对浑河的生态系统和社会服务功能产生了很大的负面影响。其中,重金属污染物具有亲脂性、高富集性和难降解等特征,易通过食物链传递到高等生物体内富集^[3-4],对人类健康造成了严重的潜在威胁。目前,针对浑河的重金属污染研究主要以水体^[5]、沉积物^[6]和土壤^[7]为研究对象,而以鱼类等生物样本作为基质进行重金属污染的研究尚未见报道。鱼类直接接触水体中的重金属,并通过食物链富集重金属,鱼类体内的重金属含量和重金属对其的生物效应在一定程度上可以很好地反映水体的重金属污染状况。因此,以鱼类作为研究对象,揭示浑河的重金属污染现状,进而分析人类活动对浑河水环境的影响,并预测其发展趋势,对保护浑河流域的生态环境具有重要的现实意义。

鲫鱼(*Carassius auratus auratus*)属于定居性底层鱼类,在我国河流和湖泊中分布广泛,主要摄食浮游生物和底泥中的有机质,体内污染物水平和污染物对其产生的生物效应能够客观反映水环境的污染状况,非常适合作为研究河流和湖泊水环境污染的指示生物。本研究通过分析浑河野生鲫鱼体内重金属的残留水平以及肝和鳃组织中金属硫蛋白基因表达,对浑河流域内的重金属污染状况进行了初步评价,以为浑河流域的水环境治理工作提供依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 样品采集

本研究调查点以浑河入大伙房水库之前作为起点,以盘锦三岔河作为终点,依次布设7个采样点(图1),采用挂网、电击和垂钓等方式捕获野生鲫鱼(见表1)。现场解剖后,分别取部分肝和鳃组织置于液氮中冻存,用于分析金属硫蛋白基因表达水平;将剩余组织冷冻带回实验室分析重金属水平。

1.2 鱼体重金属分析

分别取冻存的肌肉、鳃、肝和肠组织,研磨成肉糜后,精确称取0.1000 g,加入9 mL HF-HCl-HNO₃ (V(HF):V(HCl):V(HNO₃)=1:2:3)混合酸进行微波消解(120℃ 3 min; 150℃ 5 min; 190℃ 20 min)。消解完成后,将消解液转移至坩埚,加热至消解液近干。加超纯水定容至100 mL,充分摇匀后用ICP-MS(Ag-

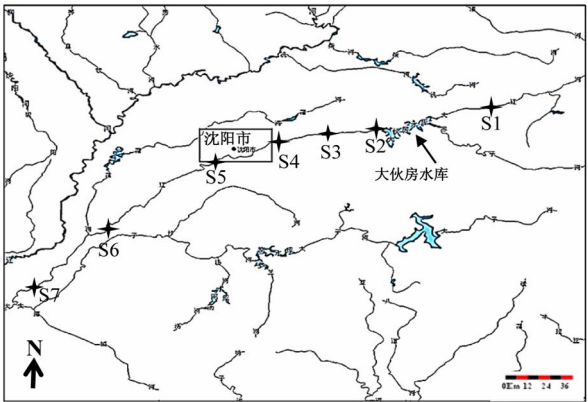


图1 浑河野生鲫鱼的采样点位分布图

注: S1 大伙房水库前; S2 大伙房水库坝下; S3 抚顺段上游; S4 抚顺段下游; S5 沈阳段; S6 辽阳段; S7 鞍山段

Fig. 1 Sampling sites for collecting wild crucian carps from Hun River

表1 浑河野生鲫鱼的基本参数

Table 1 Parameters of wild crucian carps from Hun River

采样点	体长/cm	体质量/g	样本数(n)
S1	11.50 ± 1.48	27.28 ± 10.82	48
S2	14.82 ± 1.33	59.72 ± 16.83	65
S3	14.03 ± 1.03	48.65 ± 10.84	73
S4	16.22 ± 2.06	70.42 ± 26.48	54
S5	11.93 ± 2.71	26.17 ± 15.94	22
S6	14.23 ± 1.67	57.51 ± 21.67	27
S7	15.33 ± 1.07	58.73 ± 14.33	47

ilent 7500 ,Agilent Technologies ,美国) 测定 Cr、Cd、Pb、Cu 和 Zn 的含量。实验所用硝酸(65.0% ,德国 CNW 公司)、氢氟酸(40% ,德国 MERCK 公司) 和盐酸(36% ,北京化学试剂公司) 均为优级纯; 水为自制高纯水($\rho \geq 18.0 \Omega \cdot \text{cm}^{-1}$)。实验过程中每批样品均做全程空白。

1.3 重金属污染评价

采用均值综合污染指数法对鲫鱼受重金属(Cr、Cd、Pb、Cu 和 Zn) 的污染状况进行评价,即取各种重金属在鱼体中的残留指数(I) 的均值作为综合污染指数来评价鱼体内重金属的总体污染程度。I 值大小可反映某种重金属的单一污染程度,综合污染指数的均值大小可反映各种重金属的综合污染程度。I 值计算公式为:

$$I = C_i / C_{s_i}$$

式中, C_i 为鱼体内 i 类重金属的残留量, 为实测值 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$); C_{s_i} 为 i 类重金属的允许残留量 ($\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。其中, Cd、Pb、Cr 和 Cu 的评价标准参考了 NY 5073-2006《无公害食品-水产品中有毒有害物质限量》, 分别按照 0.1、0.5、2.0 和 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 来计算 Zn 按照 $50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 来计算。结合相关研究^[8-9], 污染程度采用以下划分标准: 污染指数 < 0.2 视为正常背景水平, 污染指数在 $0.2 \sim 0.6$ 范围为轻污染水平, 污染指数在 $0.6 \sim 1.0$ 范围为污染水平, 污染指数 ≥ 1.0 则视为重污染水平。

1.4 鲫鱼金属硫蛋白基因扩增与表达定量

取液氮冻存的鲫鱼肝组织约 20 ~ 30 mg (每点雌雄各 6 尾), 利用 Trizol 试剂提取总 RNA^[10]。经紫外和电泳检测分析 RNA 浓度和质量后 ($A_{260/280} > 1.8$) 逆转录合成 cDNA: 取约 100 ng 的总 RNA、 $0.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTPs (Takara Ltd.)、 $2.5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Oligo (dT)₁₈ (Invitrogen Ltd., USA) 和 200 units SuperScript III RT (Invitrogen Ltd., USA), 反应体积为 $5 \mu\text{L}$, 以不加 RNA 的样品作为阴性对照。混合液按照 SuperScript III RT 试剂说明进行逆转录合成 cDNA 第 1 条链。利用 Bioedit 7.0 软件与 NCBI 数据库中已有的其他生物金属硫蛋白基因序列 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) 进行比对, 利用 Primer Premier 5.0 在保守序列部分设计简并引物, 正向引物 (forward primer) 为 5'-CGGGATCCATGGA (c t) CC (c t) TG (c t) GA (a g, t) TGC- (g t) C (c t) AA-3', 逆向引物 (reverse primer) 为 5'-GGAATTCTT (a g) CACAC (a g) CAGCC (a t) C-A (a g) GC (a g) CA-3'。以合成的 cDNA 第 1 链为模板, 利用 My Cycler™ PCR 仪 (BioRad, USA) 在下列条件下扩增鲫鱼金属硫蛋白基因: 95°C 2 min, 1 个循环; 95°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 60 s, 40 个循环; 最后在 72°C 下延伸 6 min, 反应总体积为 $50 \mu\text{L}$ 。所得扩增产物在 $12 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 琼脂糖凝胶进行电泳和 EB 染色, 在紫外照射条件下切下目的条带回收、纯化, 送大连宝生物公司测序。采用同样的方法扩增鲫鱼 β -actin 基因。

利用 BLAST (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 在线比对所得序列, 在证实所得序列即为金属硫蛋白基因序列后, 利用 Primer Express 2.0 软件设计实时定量 PCR 的特异引物 (正向引物为 5'-ACCAAGACTGGAGCTTGCAACT-3'; 反向引物为 5'-GGCAGCAAGAACAGC AACTCT-3')。PCR 反应混合液包括 SYBR Green PCR Master Mix $10 \mu\text{L}$,

正向和反向引物各 $0.2 \mu\text{L}$ ($20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 样品 cDNA 模板 $5 \mu\text{L}$, 加灭菌的蒸馏水至 $20 \mu\text{L}$ 。扩增条件为: 50°C 保持 2 min, 95°C 保持 10 min, 然后 95°C , 15 s, 60°C , 1 min, 40 个循环。使用 ABI Prism 7000 型定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行分析, 在最后 1 个循环结束后做溶解曲线验证引物的特异性, 以纯化的金属硫蛋白普通 PCR 产物作为 cDNA 标准品建立定量标准曲线, 以 β -actin 为内参基因对鲫鱼金属硫蛋白基因的表达式进行定量。

1.5 数据分析

采用 SPSS 11.5 软件的单向方差分析 (one-way ANOVA) 和 Tukey 多重比较来检验相关数据的差异, 设定 $p < 0.05$ 时为差异显著, 所有数据和图表均以平均值 $\pm$ 标准偏差表示。

2 结果 (Results)

2.1 鱼体内重金属水平

浑河野生鲫鱼体内各组织的重金属含量见表 2。可以看出, 肠、鳃、肝和肌肉 4 种组织中 Zn 的含量最高 ($17.49 \sim 176.01 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 而 Cd 的含量最低 ($\text{N.D.} \sim 0.57 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)。从组织器官分布来看, 各种重金属在肠组织中的含量最高, 而在肌肉中的含量最低 (除 Cu 外)。不同采样点的鲫鱼体内的重金属含量也有差异。如果以 S1 (大伙房水库前) 作为参照点, 则下游 S2 和 S3 点处采集的鲫鱼肠组织中 Cr、Cu、Cd 和 Pb 的含量显著高于 S1 点 ($p < 0.05$), S7 点的鲫鱼肠组织中 Zn 的含量显著高于 S1 点 ($p < 0.05$), 其他各采样点的肠组织中 Zn 的含量虽与对照无显著性差异 ($p > 0.05$), 但也均有所升高。下游各采样点的鲫鱼肌肉中 Cr、Cd 和 Pb 的含量有升高的趋势, 但与对照相比差异不显著 ($p > 0.05$)。此外, 下游鲫鱼鳃组织中各种重金属含量未表现出升高趋势 ($p > 0.05$)。

2.2 重金属污染评价

利用均值综合污染指数法评价鲫鱼各组织中重金属污染状况, 结果如表 3 所示。可以看出, 肝、鳃和肠组织中重金属的均值综合污染指数均显著高于肌肉组织 ($p < 0.05$), 并以肠组织的污染指数为最高 (最高达 4.28), 这表明, 鱼体内脏器官的重金属风险远高于肌肉组织。当前水产品质量的评价标准主要是针对鱼体的可食用部分, 即肌肉部分, 并不适用于肝、鳃和肠组织中的重金属污染的评价, 因此, 本研究以肌肉中重金属污染的均值综合污染指数对鱼体的重金属污染进行了评价。可知, 在 S1 (入大伙房

表2 浑河野生鲫鱼重金属含量($n = 6$)

Table 2 Contents of heavy metals in wild crucian carps from Hun River

采样点	Cr	Cd	Pb	Cu	Zn
肠					
S1	1.20 ± 0.33	N. D.	N. D.	2.03 ± 1.34	38.77 ± 30.03
S2	7.52 ± 4.90*	0.57 ± 0.14*	4.60 ± 2.01*	10.46 ± 0.77*	127.52 ± 3.37
S3	7.93 ± 4.20*	0.13 ± 0.04*	2.73 ± 1.39*	8.09 ± 3.23*	95.34 ± 32.33
S4	2.67 ± 1.52	0.04 ± 0.01	0.64 ± 0.44	3.56 ± 1.63	70.84 ± 25.61
S5	2.07 ± 1.68	0.06 ± 0.02	0.31 ± 0.29	5.03 ± 2.49	130.57 ± 5.27
S6	0.84 ± 0.42	0.07 ± 0.02	N. D.	2.00 ± 1.08	80.98 ± 34.35
S7	2.82 ± 2.19	0.35 ± 0.41	1.30 ± 0.21	4.54 ± 2.14	176.01 ± 4.28*
鳃					
S1	1.16 ± 0.84	0.02 ± 0.01	N. D.	0.81 ± 0.53	86.38 ± 29.94
S2	5.08 ± 5.89	0.01 ± 0.01	N. D.	0.69 ± 0.63	62.14 ± 53.90
S3	0.68 ± 0.29	0.01 ± 0.01	N. D.	0.42 ± 0.38	89.17 ± 27.33
S4	1.14 ± 0.93	0.01 ± 0.01	N. D.	0.37 ± 0.28	100.72 ± 39.64
S5	0.96 ± 0.35	N. D.	N. D.	0.65 ± 0.29	58.20 ± 18.32
S6	1.40 ± 1.01	0.03 ± 0.04	1.16 ± 0.91	1.11 ± 0.68	66.07 ± 10.82
S7	1.40 ± 0.78	0.03 ± 0.04	N. D.	1.26 ± 1.33	87.48 ± 24.31
肝					
S2	1.67 ± 2.07	0.29 ± 0.37	0.21 ± 0.17	2.59 ± 2.23	60.0 ± 58.92
S5	2.11 ± 2.72	0.03 ± 0.03	0.82 ± 0.82	3.30 ± 2.45	56.39 ± 27.95
S6	1.02 ± 0.57	0.02 ± 0.01	N. D.	0.90 ± 0.76	34.41 ± 14.68
S7	0.60 ± 0.27	0.01 ± 0.01	N. D.	0.74 ± 0.25	24.78 ± 4.25
肌肉					
S1	0.16 ± 0.10	N. D.	0.12 ± 0.19	0.86 ± 0.35	17.49 ± 2.72
S2	0.22 ± 0.15	0.05 ± 0.01	0.20 ± 0.14	1.00 ± 0.35	19.65 ± 4.90
S3	0.28 ± 0.08	0.01 ± 0.01	0.13 ± 0.06	0.66 ± 0.28	29.05 ± 11.40
S4	0.45 ± 0.25	0.02 ± 0.01	0.29 ± 0.39	0.91 ± 0.26	18.59 ± 5.79
S5	0.27 ± 0.09	0.03 ± 0.02	0.23 ± 0.17	1.02 ± 0.32	21.37 ± 5.53
S6	0.19 ± 0.16	0.01 ± 0.01	N. D.	0.55 ± 0.30	21.06 ± 5.75
S7	0.83 ± 0.35	0.01 ± 0.01	0.30 ± 0.10	1.07 ± 0.52	19.4 ± 6.77

注: N. D. 表示未检出; * 表示显著性差异($p < 0.05$)。

水库前) 和 S6(辽阳段) 处鲫鱼体内重金属处于背景水平, 而 S2(大伙房水库坝下)、S3(抚顺段上游)、S4(抚顺段下游)、S5(沈阳段) 和 S7(鞍山段) 处鲫鱼体内重金属处于轻污染水平($0.2 < I < 0.6$)。其中 Cr、Pb 和 Zn 对均值综合污染指数贡献较大, 尤其是 Cr 和 Pb 的残留指数在 S7(鞍山段) 处都达到污染水平(分别为 0.42 和 0.60), 而 Cu 的残留指数在 7 个采样点均处于背景水平($I < 0.2$)。

2.3 鲫鱼金属硫蛋白基因扩增与表达

利用设计的简并引物, 扩增分离了鲫鱼的金属硫蛋白(MT) 基因片段, 经测序获得 132 个碱基, 根据三联体密码子翻译, 获得对应着的 44 个氨基酸

(图 2)。通过 BLAST(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) 在线比对, 确认为金属硫蛋白基因。经与 NCBI 数据库已发表的其他物种的金属硫蛋白比对可知, 本研究扩增的鲫鱼金属硫蛋白基因属于 MT-A 型, 并分别与斑马鱼(*Danio rerio*, NP571150)、金鱼(*Carassius auratus*, AAB32777)、鲤鱼(*Cyprinus carpio*, AAV52384)、日本鲫(*Carassius cuvieri*, AAN85820)、银大马哈鱼(*Oncorhynchus kisutch*, ABA03252)、鲑鱼(*Oncorhynchus keta*, ABA03254) 和日本青鳉(*Oryzias latipes*, NP001098255) 具有 98%、94%、92%、92%、81%、81% 和 78% 的相似性(图 3)。

根据测序所得的目标基因序列设计特异引物,

表 3 浑河野生鲫鱼重金属残留指数与均值综合污染指数

Table 3 Residue indexes and average pollution indexes of heavy metals of wild crucian carps from Hun River

采样点	重金属残留指数(I)					均值综合
	Cr	Cd	Pb	Cu	Zn	污染指数
肠						
S1	0.60	0.00	0.00	0.04	0.78	0.28
S2	3.76	5.68	9.20	0.21	2.55	4.28 *
S3	3.97	1.26	5.46	0.16	1.91	2.55 *
S4	1.34	0.38	1.28	0.07	1.42	0.90 *
S5	1.04	0.62	0.62	0.10	2.61	1.00 *
S6	0.42	0.70	0.00	0.04	1.62	0.56 *
S7	1.41	3.50	2.60	0.09	3.52	2.22 *
鳃						
S1	0.58	0.20	0.00	0.02	1.73	0.50 *
S2	2.54	0.11	0.00	0.01	1.24	0.78 *
S3	0.34	0.06	0.00	0.01	1.78	0.44
S4	0.57	0.03	0.00	0.01	2.01	0.52
S5	0.48	0.00	0.00	0.01	1.16	0.33
S6	0.70	0.29	2.32	0.02	1.32	0.93 *
S7	0.70	0.33	0.00	0.03	1.75	0.56
肝						
S2	0.84	2.90	0.42	0.05	1.20	1.08 *
S5	1.06	0.30	1.64	0.07	1.13	0.84 *
S6	0.51	0.20	0.00	0.02	0.69	0.28
S7	0.30	0.10	0.00	0.01	0.50	0.18
肌肉						
S1	0.08	0.00	0.24	0.02	0.35	0.14
S2	0.11	0.45	0.40	0.02	0.39	0.27
S3	0.14	0.12	0.26	0.01	0.58	0.22
S4	0.23	0.15	0.58	0.02	0.37	0.27
S5	0.14	0.25	0.46	0.02	0.43	0.26
S6	0.10	0.08	0.00	0.01	0.42	0.12
S7	0.42	0.10	0.60	0.02	0.39	0.30

注: * 表示显著性差异($p < 0.05$)。

通过溶解曲线证实了所设计引物的特异性。以金属硫蛋白简并引物的 PCR 产物作为标准品,建立定量标准曲线, μ DNA 浓度范围为 $10^4 \sim 10^9 \text{ copies} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 拷贝数与 C_t 值之间具有良好的线性关系($R^2 = 0.999$)。将建立的金属硫蛋白实时定量 PCR 方法用于定量野生鲫鱼肝和鳃组织中金属硫蛋白的基因表达水平,所得结果列于表 4 中。可知,在肝组织中, S1、S3 和 S6 处金属硫蛋白表达水平较低,分别为 1.53、1.02 和 0.59; 而其他各点的表达水平相对较高,分别为 2.17、2.01、2.07 和 2.59,均高于 S1、S3 和 S6 点的表达水平。各采样点的鲫鱼鳃组织中的金属硫蛋白表达水平明显低于肝组织中的表达水平,且没有表现出与重金属水平的明显相关性。

3 讨论 (Discussion)

本研究中浑河野生鲫鱼体内重金属的含量水平与松花江鱼体的重金属水平相近^[8],但明显高于三

峡库区巴南上游野生鱼类体内的重金属水平^[11]。造成鲫鱼肠组织中重金属含量最高而肌肉中最低的原因可能是鲫鱼主要摄食浮游生物和底泥中的有机质,肠道作为鱼类消化和吸收的主要器官,食物中未被吸收的重金属残留于肠道和肠壁,导致肠内重金属含量明显高于其他组织器官;而鳃作为鱼类的主要呼吸器官,水环境中的重金属可通过鳃丝表面血管进入鱼体,这也是除肠道吸收外重金属进入鱼体的另一主要途径;肝组织是生物体内主要的代谢器官,鱼体吸收的重金属会通过代谢在肝组织中富集,但含量低于肠组织和鳃组织,这与 Maiti 等^[12]对尼罗罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)的肌肉和肝等组织中重金属(Cu、Zn、Cd、Pb 和 Cr)分布水平的研究结果一致。肌肉组织中的重金属含量最低(除 Cu 外),例如,肌肉组织中的 Cd 含量约为肠组织中含量的 2.85% ~ 40.32%,这可能是因为重金属通过鱼类的肠和鳃进入鱼体,主要在肝等组织内蓄积^[13],转移到

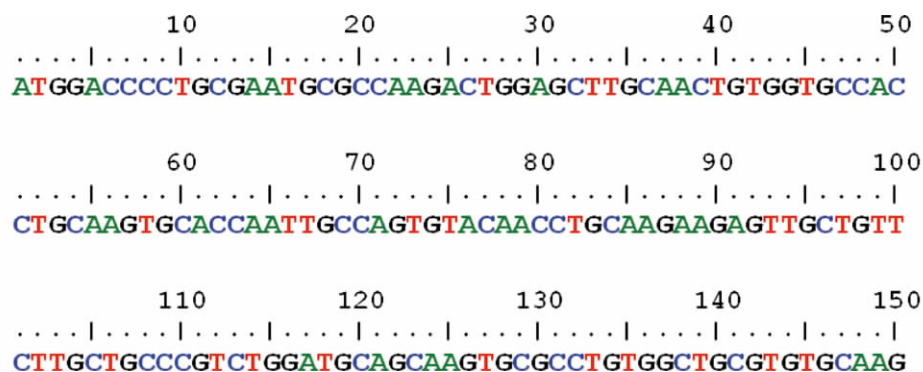


图2 利用简并引物扩增鲫鱼金属硫蛋白基因部分序列(注:图中数字代表碱基)

Fig. 2 Partial DNA sequence of metallothionein (MT) gene of crucian carps using degenerate primers

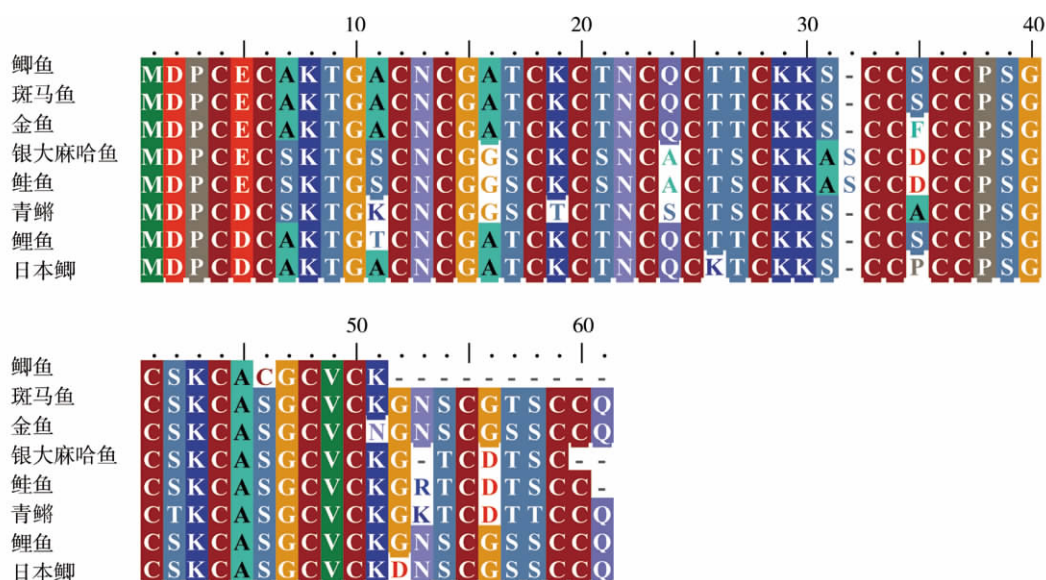


图3 鲫鱼金属硫蛋白基因部分氨基酸序列与斑马鱼、金鱼、银大马哈鱼、鲑鱼、青鲈、鲤鱼和日本鲫氨基酸序列的比对

Fig. 3 Multiple sequence alignment of partial amino acid sequence of MT gene of crucian carps with those of zebrafish, goldfish, coho salmon, chum salmon, Japanese medaka, common carp and Japanese crucian carp

表4 浑河野生鲫鱼金属硫蛋白基因表达水平($n=6$)

Table 4 MT mRNA expression in wild crucian carps from Hun River

	S1	S2	S3	S4	S5	S6	S7
肝	1.53 ± 1.20	2.17 ± 0.74	1.02 ± 0.74	2.01 ± 0.90	2.07 ± 1.18	0.59 ± 0.42	2.59 ± 2.12
鳃	0.04 ± 0.02	0.14 ± 0.11	0.20 ± 0.24	0.12 ± 0.10	0.07 ± 0.04	0.05 ± 0.02	0.30 ± 0.23

肌肉组织中的重金属量较少,这与 Zhang 等^[11]报道的三峡野生鱼类体内重金属的分布情况一致。

近年来,金属硫蛋白作为监测水环境重金属污染的生物标志物,受到广泛关注^[14-15]。金属硫蛋白是一种普遍存在于动物、植物和微生物体内的低分子量、富含半胱氨酸的蛋白质,它能够与重金属结合,调节生物体内必需重金属(如 Zn 和 Cu)的生理

功能,并对非必需重金属(如 Cd 和 Pb)进行脱毒。尽管生物体内金属硫蛋白的表达会受到多种因素的影响,但重金属仍然是其最强的诱导剂^[13,16-17],例如,当鱼体暴露于含非必需重金属如 Cd 的环境中,金属硫蛋白水平会显著增加以结合进入鱼体的外源重金属,从而起到解毒的作用,而当重金属水平超出了金属硫蛋白的结合能力时,过量的重金属就会对

鱼体产生毒害作用^[13],导致金属硫蛋白基因表达水平降低,即金属硫蛋白基因表达水平随重金属浓度的增加通常会呈现典型的倒“U”型关系。本研究中,若以上游(S1)为对照点,S2、S4、S5和S7点的鲫鱼体内金属硫蛋白表达水平均呈升高趋势。结合体内重金属含量水平,说明鲫鱼体内重金属含量没有超出产生毒性的阈值。金属硫蛋白基因表达水平的升高说明了浑河中下游重金属污染对野生鲫鱼产生了轻微影响,这与鱼体重金属综合污染指数升高趋势一致。

野外调查发现,在一些野生鱼类体内金属硫蛋白的水平与重金属水平,尤其是Cd、Zn和Cu3种重金属污染程度,呈一定的相关性^[18-20]。本研究中,下游S2和S3点的鲫鱼肠组织中Cr、Cu、Cd和Pb含量显著高于S1点,下游各采样点的鲫鱼肠组织中Zn以及肌肉组织中Cr、Cd和Pb的含量均有升高的趋势,这可能会对下游各采样点的鲫鱼肝组织中的金属硫蛋白产生一定的诱导作用。此外,本研究中发现,鲫鱼肝和鳃组织中的金属硫蛋白基因表达水平与肌肉的均值综合污染指数存在较好的相关性(相关系数分别为0.71和0.49),但与肝和鳃组织均值综合污染指数没有明显的相关性(见表5)。Bae等^[21]发现,重金属Cd暴露会导致鲫鱼鳃内Cd含量持续升高,但金属硫蛋白基因表达则呈现先短暂升高而后降低的趋势,并且在经过25d的连续暴露后,鳃中金属硫蛋白基因表达水平并没有与Cd含量表现出相关性。类似地,经过注射Cd暴露的鲢鱼^[22]、高眼鲈^[23]和大鼠^[24]的肝组织中金属硫蛋白表达水平与Cd含量也没有表现出明显的线性相关性,这可能因为肠和鳃是外源重金属进入鱼体的首要途径,重金属的含量并不会保持稳定而始终处于动态变化中,而肌肉组织作为重金属在鱼体内代谢

分布的最终归宿,重金属含量会随着暴露时间的延长而升高,能够反映鱼类栖息环境中重金属污染的相对长期的效应。因此,肠和鳃组织中重金属含量反映了鱼类栖息环境中重金属的“短期”污染状况,而肌肉组织中重金属含量则反映了生物栖息环境中重金属的“长期”污染状况。金属硫蛋白作为一个敏感标志物,能够用于指示鱼体和环境中的重金属污染水平。

综上所述,本研究的结果表明,浑河野生鲫鱼受到环境重金属的轻微污染;金属硫蛋白基因表达能够很好地指示鲫鱼受重金属污染的状况,可以作为一个敏感标志物用于指示环境重金属的污染。

通讯作者简介:安立会(1975—),男,环境科学博士,副研究员,主要研究方向为水环境(生态)毒理学和生态风险评价,发表学术论文30余篇。

参考文献:

[1] 张跃进,朱书全,肖汝,等. 浑河沿岸污灌区地下水中PAHs分布特征研究[J]. 环境科学研究,2007,20(1): 7-11
Zhang Y J, Zhu S Q, Xiao R, et al. Study on distribution of PAHs in groundwater in irrigation area along the Hunhe River in Liaoning Province [J]. Research of Environmental Sciences, 2007, 20(1): 7-11 (in Chinese)

[2] 杨钰,王汉东,单中超,等. 浑河抚顺市区段污染趋势分析[J]. 辽宁城乡环境科技,2006,26(3): 15-16

[3] Wang W X, Ke C. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 56(3): 153-165

[4] 毕春娟,陈振楼,许世远,等. 长江口潮滩大型底栖动物对重金属的累积特征[J]. 应用生态学报,2006,17(2): 309-314
Bi C, Chen Z, Xu S, et al. Heavy metals accumulation in macrobenthos in intertidal flat of Yangtze Estuary [J]. Chinese Journal of Applied Ecology, 2006, 17(2): 309-314 (in Chinese)

[5] 吴学丽,杨永亮,汤奇峰,等. 沈阳河水、地下水及沉积物中重金属的生态风险评价及来源辨析[J]. 生态学杂志,2011,30(3): 438-447
Wu X L, Yang Y L, Tang Q F, et al. Ecological risk assessment and source analysis of heavy metals in river waters, groundwater along river banks and river sediments in Shenyang [J]. Chinese Journal of Ecology, 2011, 30(3): 438-447 (in Chinese)

[6] 马力,杨晓波,佟成治,等. 辽宁省浑河流域底质中

表 5 浑河野生鲫鱼的均值综合污染指数与金属硫蛋白基因表达的相关性

Table 5 Relationships between average pollution indexes of heavy metals and MT mRNA expression in livers and gills of wild crucian carps from Hun River

相关性(R ²)	肌肉均值综合污染指数	鳃均值综合污染指数	肠均值综合污染指数	肝均值综合污染指数
肝金属硫蛋白基因表达	0.71	0.13	0.11	0.03
鳃金属硫蛋白基因表达	0.49	0.02	0.32	0.14

- 重金属元素地球化学特征[J]. 岩矿测试, 2008, 27(3): 184–188
- Ma L, Yang X B, Tong Z C, et al. The geochemical characteristics of heavy metal elements in sediments of Hunhe drainage area in Liaoning Province [J]. Rock and Mineral Analysis, 2008, 27(3): 184–188 (in Chinese)
- [7] 吴学丽, 杨永亮, 徐清, 等. 沈阳地区河流灌渠沿岸农田表层土壤中重金属的污染现状评价[J]. 农业环境科学学报, 2011, 30(2): 282–288
- Wu X L, Yang Y L, Xu Q, et al. Evaluations of heavy metal pollution status in surface soils adjacent to the rivers and irrigation channel in Shenyang, China [J]. Journal of Agro-Environment Science, 2011, 30(2): 282–288 (in Chinese)
- [8] 祝惠, 阎百兴, 张凤英. 松花江鱼体中重金属的富集及污染评价[J]. 生态与农村环境学报, 2010, 26(5): 492–496
- Zhu H, Yan B X, Zhang F Y. Enrichment of heavy metals in fishes of Songhua River and its pollution assessment [J]. Journal of Ecology and Rural Environment, 2010, 26(5): 492–496 (in Chinese)
- [9] 贾晓平, 林钦, 李纯厚, 等. 广东沿海牡蛎体 Pb 含量水平及时空变化趋势[J]. 水产学报, 2000, 24(6): 527–532
- Jia X P, Lin Q, Li C H, et al. Concentrations and temporal-spatial variation trend of Pb in the oysters from Guangdong coastal waters [J]. Journal of Fisheries of China, 2000, 24(6): 527–532 (in Chinese)
- [10] 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 L H, Zheng B H, Fu Q, 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 (in Chinese)
- [11] Zhang Z, He L, Li J, et al. Analysis of heavy metals of muscle and intestine tissue in fish in Banan Section of Chongqing from Three Gorges Reservoir, China [J]. Polish Journal of Environmental Studies, 2007, 16(6): 949–958
- [12] Maiti P, Banerjee S. Accumulation of heavy metals in different tissues of the fish *Oreochromis nilotica* exposed to waste water [J]. Environment and Ecology, 1999, 17(4): 895–898
- [13] Hogstrand C, Haux C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology, 1991, 100(1–2): 137–141
- [14] Quirós L, Piná B, Solé M, et al. Environmental monitoring by gene expression biomarkers in *Barbus graellsii*: Laboratory and field studies [J]. Chemosphere, 2007, 67(6): 1144–1154
- [15] Nikpour Y, Zolgharnein H, Sinaei M, et al. Evaluation of metallothionein expression as a biomarker of mercury exposure in *Scatophagus argus* [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2008, 11(18): 2269–2273
- [16] Bonham K, Gedamu L. Induction of metallothionein and metallothionein mRNA in rainbow-trout liver following cadmium treatment [J]. Bioscience Reports, 1984, 4(8): 633–642
- [17] Olsson P E, Larsson Å, Maage A, et al. Induction of metallothionein synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during long-term exposure to waterborne cadmium [J]. Fish Physiological and Biochemistry, 1989, 6(4): 221–229
- [18] Hamza-Chaffai A, Amiard J C, Pellerin J, et al. The potential use of metallothionein in the clam *Ruditapes decussatus* as a biomarker of in situ metal exposure [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology, 2000, 127(2): 185–197
- [19] Roch M, McCarter J A, Matheson A T, et al. Hepatic metallothionein in rainbow trout (*Salmo gairdneri*) as an indicator of metal pollution in the Campbell River system [J]. Canadian Journal of Fisheries and Aquatic Sciences, 1982, 39(12): 1596–1601
- [20] Wong C K C, Yeung H Y, Cheung R Y H, et al. Ecotoxicological assessment of persistent organic and heavy metal contamination in Hong Kong coastal sediment [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 38(4): 486–493
- [21] Bae H, Nam S S, Park H S, et al. Metallothionein mRNA sequencing and induction by cadmium in gills of the crucian carp, *Carassius auratus* [J]. Journal of Health Science, 2005, 51(3): 284–290
- [22] Chatterjee A, Maiti I B. Induction and turnover of catfish (*Heteropneustes fossilis*) metallothionein [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1991, 108(1): 29–38
- [23] George S. Cadmium effect on plaice liver xenobiotic and metal detoxification systems: Dose-response [J]. Aquatic Toxicology, 1989, 15(4): 303–310
- [24] Yoshikawa H, Ohta P E. Biological Role of Metallothionein [M]. New York: Elsevier Science, 1982: 11–23