文章编号:1002-1175(2010)04-0456-07

锌铅暴露条件下菲律宾蛤仔消化腺和鳃内金属和金属硫蛋白的变化*

苏　文[1,2,3],吴惠丰[1],廖春阳[1],薛钦昭[1†],曲　莹[1,2,3]

(1 中国科学院烟台海岸带研究所，烟台 264003；2 中国科学院海洋研究所，青岛 266071；3 中国科学院研究生院，北京 100049)

(2009 年 12 月 14 日收稿；2010 年 3 月 12 日收修改稿)

Su W, Wu H F, Liao C Y, *et al*. Metallothionein in digestive glands and gills of *Ruditapes philippinarum* exposed to zinc and lead [J]. Journal of the Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, 2010, 27(4): 456-462.

摘　要　通过慢性暴露实验研究了菲律宾蛤仔在锌(Zn^{2+})，铅(Pb^{2+})单一胁迫及联合胁迫下，消化腺和鳃内富集 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 及其金属硫蛋白水平随 Zn^{2+}、Pb^{2+} 暴露浓度的变化规律. 结果表明，Zn^{2+} 50μg/L、Pb^{2+} 25μg/L 联合胁迫时，消化腺和鳃内重金属的富集低于 Zn^{2+}、Pb^{2+} 单一胁迫，表现为拮抗作用；MT 含量随着 Zn^{2+}、Pb^{2+} 暴露质量浓度变化而变化，比较发现消化腺中 MT 含量随 Pb^{2+} 暴露质量浓度的变化最显著($p<0.01$).

关键词　重金属，金属硫蛋白，联合作用，拮抗作用

中图分类号　Q178.53

1　引言

近几十年来，由于工农业生产的发展，尤其是沿海地区重工业的快速发展，大量重金属离子污染物通过多种途径释放进入水体，并被动植物吸收富集，进而对水生生物产生毒害作用[1]. 在重金属胁迫下，生物机体内金属硫蛋白(metallothionein，MT)的含量明显增加. MT 是富含半胱氨酸的金属结合蛋白，对二价金属离子有极高的亲和力，能储存机体必须的微量金属，起着调节必需元素在细胞内浓度的作用，同时其巯基(SH)能强烈螯合生物体内有毒金属(如 Pb^{2+})，并将之排出体外，从而实现对有毒金属的解毒作用. 1957 年，哈佛大学的 Margoshes 和 Valee 首次在马的肾脏中分离出该蛋白质. 20 世纪 70 年代中期首次报道了海洋无脊椎动物——美洲牡蛎(*Crassostrea virginica*)的金属硫蛋白[2]，之后掀起了海洋无脊椎动物 MT 的研究热潮. Bebianno[3] 等发现，贻贝的鳃、消化腺和整体软组织等器官中的 Cd 浓度与 MT 诱导水平相关. 在联合国环境规划署开展的“地中海行动计划”中，MT 被选为海洋环境监测生物的标志物之一[4]. Domouhtsidou[5] 等研究表明软体生物内金属硫蛋白在基因水平上通常由 Cu^{2+}、Cd^{2+}、Zn^{2+}、Pb^{2+} 等金属离子诱导合成，可作为金属暴露和毒性效应早期预警的主要生物标志物. 进一步研究表明重金属可以在转录的水平上诱导 MT 产生，而这种诱导作用与金属浓度具有相关性[6]，因而探讨生物体内 MT 含量变化与环境中金属浓度的关系对水生生态毒理的数据积累和理论完善具有重要意义.

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，国内开展了很多研究[7-8]，但多数是研究单一重金属毒性效应，重金属联合作用的报道尚少. 而重金属离子在水体中往往是共存的，它们的作

* 中国科学院知识创新重大项目(KK0710AX-026，KZCX2-YW-Q07-04)、山东省科技发展计划项目(2007GG2QT06020)和烟台市科技发展项目(2007323)联合资助

† 通讯联系人，E-mail：qzxue@yic.ac.cn

用无疑是综合的,单一毒性实验结果往往不能客观地反映重金属共存时对海洋生物的危害程度. 为客观模拟海水环境中的重金属污染情况,本实验野外采集菲律宾蛤仔(*Ruditape philippinarum*),采用室内低浓度慢性暴露实验方法,旨在研究蛤仔消化腺和鳃在 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 单一毒性及复合毒性时对 Zn^{2+}、Pb^{2+} 的富集规律;探讨 MT 含量随重金属离子富集浓度改变的变化规律. 本研究结果为综合客观地评价水体重金属污染提供科学依据,并为海洋环境监测指标体系的完善提供理论支持.

2　材料与方法

2.1　材料

2.1.1　样品

菲律宾蛤仔于 2009 年 4 月采自烟台养马岛后海,选取活动正常、反应灵敏的个体 120 只,平均体长为(38.04 ±2.98)mm,体重为(13.26 ±2.48)g,随机分组. 实验前用过滤海水洗净其表面的淤泥,暂养 2d.

2.1.2　试剂与仪器

$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$、$Pb(NO_3)_2$、蔗糖、甘氨酸、NaOH、$AgNO_3$,均为分析纯;HNO_3、H_2O_2 为优级纯;牛血红蛋白(SIGMA);超声波细胞粉碎机(宁波新芝);超低温冷冻存储箱(中科美菱);Fresco17 高速冷冻离心机(德国);微波消解仪(美国 CEM 公司);Agilent 7500a 型电感耦合等离子体质谱仪(ICP-MS,美国).

2.1.3　理化条件

自然海水采自山东烟台四十里湾,经脱脂棉 2 次过滤作为实验用水,海水盐度(28 ±2) $\times 10^{12}$,pH(8.0 ±0.1),昼夜水温变化范围(26 ±4)℃. 水质符合渔业水质标准[9].

2.2　重金属暴露实验

蛤仔在室温下暂养于室内装有 5L 天然海水的白色塑料桶中,连续充气. 于实验室驯化 5d 后进行暴露实验,实验动物随机分为 1 个对照组和 5 个暴露组,Zn^{2+} 暴露质量浓度为 20μg/L(Zn-L 组)、50μg/L(Zn-H 组);Pb^{2+} 为 10μg/L(Pb-L 组)、25μg/L(Pb-H 组);Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合暴露质量浓度为 Zn^{2+} 50μg/L、Pb^{2+} 25μg/L(Zn-Pb 组),每个质量浓度 20 只蛤仔. 为保持海水新鲜每日 8:00 时全部换水,11:00 时投喂三角褐指藻,滤食 2h 后全部换水,以避免食物残屑影响测定结果. 连续暴露 15d 后,空腹 24h,取各质量浓度组个体用去离子水冲洗干净,每组解剖 11 ~12 只,分别取鳃、消化腺称重后,6 只测定 MT 含量,剩余个体测定其体内 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 的质量浓度. 样品冷冻于 -75℃下,待测定.

2.3　重金属离子质量比测定及质量控制

蛤仔消化腺和鳃解冻后,根据分析需要,各称取 0.1 ~0.2g 样品,每个样品内加入 2mLHNO_3、2mLH_2O_2,放入微波消解系统,按预定的消解程序消化,待消化液变为澄清或淡黄色恒定不变时即为消化完全[10],消化液定容至 50mL,用 0.45μm 水相膜过滤,ICP-MS 进行分析重金属离子含量测定. 蛤仔内重金属质量比以 μg/g 湿重表示,每浓度每组织 3 个重复.

做标准参考物质(IAEA-407),至少 3 个平行,标准物中锌和铅的回收率达 98% ~108%.

2.4　MT 质量比测定

采用银饱和法[11],并略加改进. 加入 1mL 蔗糖溶液,使用超声波细胞破碎仪将样品匀浆. 破碎后于 17kg、4℃条件下离心 25min. 取上清液 0.4mL,加入含质量浓度 20mg/L Ag^+ 的甘氨酸溶液 0.5mL,混合后室温放置 15min,加入 0.1mL 新配制的质量分数为 2% 的牛血红蛋白充分混匀,沸水浴加热 5min,冷却后 1.2kg 离心 5min. 重复加血红蛋白至离心的步骤共 3 次. 上清液消解后,通过 ICP-MS 测定其 Ag^+ 的质量浓度,再按照每分子 MT 结合 17 个 Ag^+ 换算成 MT 的质量比[12]. MT 质量比以 μg/g 湿重表示.

2.5　数据分析

采用 SPSS13.0 软件对数据进行均值、标准差计算,并进行方差分析以及多重比较(LSD);本文中所有数据以平均值(mean ±SE)表示.

3 结果

3.1 Zn^{2+}和 Pb^{2+}在菲律宾蛤仔体内的积累

Zn^{2+}在蛤仔消化腺和鳃中积累的质量比如图 1(a)所示. 消化腺和鳃中都有 Zn^{2+}的积累,且消化腺中 Zn^{2+}的质量比明显高于鳃. Zn-L 组(20μg/L)和 Zn-H 组(50μg/L)诱导 15d 后,蛤仔消化腺内 Zn^{2+}的质量比升高,积累量分别为 49.95μg/g、43.62μg/g,且消化腺内 Zn^{2+}积累的质量比:Zn-L > Zn-H. Zn^{2+}、Pb^{2+}联合(Zn^{2+} 50μg/L,Pb^{2+} 25μg/L)诱导后 Zn^{2+}的质量比高于对照组但低于 Zn-H 组,为 40.47μg/g;鳃内各处理组 Zn^{2+}的质量比与对照组(27.60μg/g)相比基本不变,分别为 28.43μg/g(Zn-L 组)和 28.29μg/g(Zn-H 组),Zn^{2+}、Pb^{2+}联合暴露组中 Zn^{2+}的质量比略有降低(27.31μg/g). 但是,蛤仔消化腺和鳃内 Zn^{2+}的质量比与对照组相比,变化均不明显($p > 0.05$).

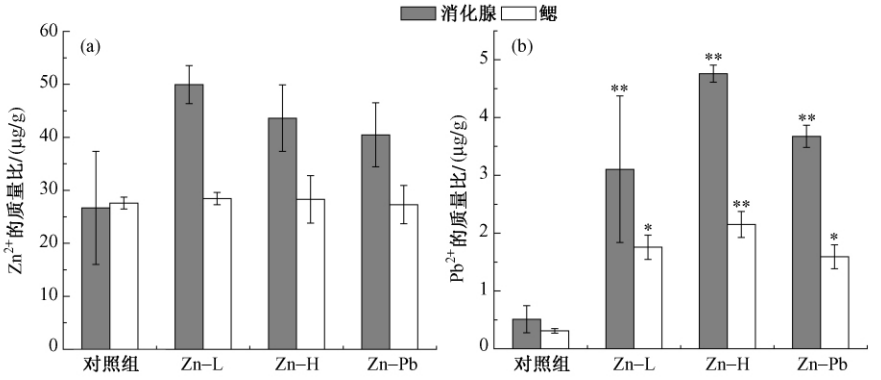

图 1 Zn^{2+}(a)、Pb^{2+}(b)在蛤仔消化腺和鳃中的积累

Pb^{2+}在蛤仔消化腺和鳃中积累的质量比如图 1(b)所示. Pb^{2+}单一毒性时,Pb^{2+}在蛤仔消化腺和鳃中的质量比均随暴露浓度增大而增加,但 Pb^{2+}在消化腺的质量比高于鳃中. Pb-L 组(10μg/L)在消化腺中的积累量为 3.11μg/g,而 Pb-H 组(25μg/L)在消化腺中 Pb^{2+}的质量比增至 4.76μg/g,与对照组相比,都有极明显变化($p < 0.01$);Pb-L 组和 Pb-H 组在鳃内积累量分别为 1.76μg/g 和 2.15μg/g,与对照组相比,具有显著性差异($p < 0.05$;$p < 0.01$). Zn^{2+}、Pb^{2+}联合诱导后蛤仔消化腺和鳃内 Pb^{2+}的质量比明显高于对照组($p < 0.01$;$p < 0.05$),并都低于 Pb-H 组.

3.2 消化腺和鳃内 MT 质量比的变化

图 2(a)给出不同重金属暴露下消化腺内 MT 质量比变化. 总体上说,不同重金属暴露下消化腺内 MT 质量比均呈增加趋势;且随重金属质量比的升高,而不断增加;不同重金属对 MT 的影响表现不同的特征. 从单一重金属暴露下消化腺内 MT 质量比变化看,Zn-L 组、Zn-H 组诱导 15d 后,MT 质量比增加不明显($p = 0.791$;$p = 0.444$). Zn-L 组比对照组只增加了 17.99μg/g,而 Zn-H 组增加了 52.24μg/g. Pb-L 组、Pb-H 组诱导后,消化腺内 MT 质量比分别增加至 211.17μg/g 和 280.06μg/g($p = 0.031$;$p = 0.003$),变化明显,分别是对照组蛤仔体内 MT 质量比的 3.6 倍和 4.8 倍,说明消化腺内 Pb^{2+}比 Zn^{2+}对 MT 的影响大. 从 Zn^{2+}、Pb^{2+}联合暴露下消化腺内 MT 质量比的变化看,联合作用时 MT 的产量大于 Zn-H 组而低于 Pb-L 组,其 MT 质量比为 145.21μg/g.

图 2(b)显示不同重金属暴露下鳃内 MT 质量比的变化. 总体上,不同重金属暴露下鳃内 MT 质量比有增有减,与不同重金属暴露下消化腺内 MT 质量比变化趋势不同. 从单一重金属暴露下鳃内 MT 质量比的变化看,Zn-L 组、Zn-H 组诱导后,MT 质量比变化与对照组相比均不明显,Zn-L 组增加了3.11μg/g,而 Zn-H 组略低于对照组. 与 Zn 暴露下消化腺内 MT 质量比变化趋势相反. 对于 Pb-L 组和 Pb-H 组,蛤仔鳃内 MT 质量比分别增至 18.42μg/g 和 38.11μg/g. Zn^{2+}、Pb^{2+}联合胁迫对鳃内 MT 质量比变化影响很大,MT 质量比为 3.72μg/g,明显低于对照组(9.72μg/g).

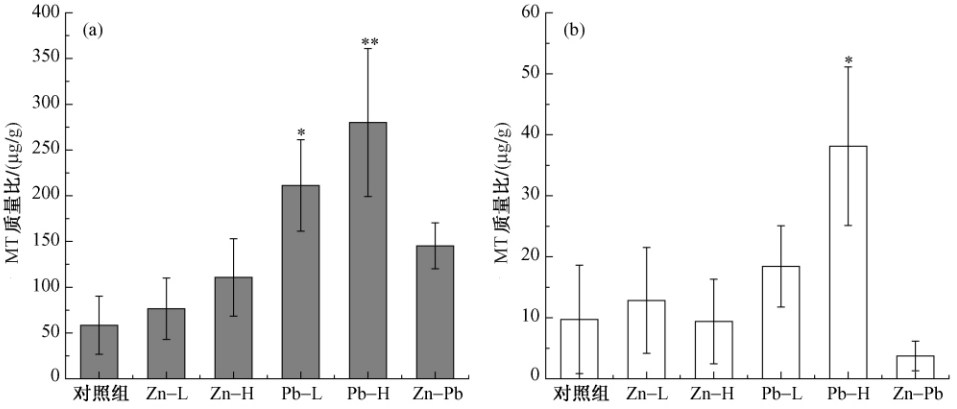

图 2　不同重金属暴露下消化腺(a)和鳃(b)内 MT 质量比的变化

总之,不同重金属暴露下在消化腺和鳃组织中 MT 的质量比均有变化. 对于不同重金属,Pb^{2+} 对蛤仔体内 MT 的质量比变化的影响大于 Zn^{2+},且 Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用下蛤仔消化腺和鳃内 MT 产量低于 Pb^{2+} 单一暴露. 对于不同组织,不同重金属暴露下消化腺内 MT 的质量比都高于鳃中,消化腺内 MT 的最高值(Pb-H 组)为鳃中 MT 最高值(Pb-H 组)的 7.35 倍.

4　讨论

4.1　Zn^{2+}、Pb^{2+} 在菲律宾蛤仔体内的积累

实验测定了蛤仔于 Zn^{2+}、Pb^{2+} 暴露 15d 后消化腺、鳃组织中 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 的质量比. 结果发现,菲律宾蛤仔消化腺 Zn^{2+} 的最大积累质量比为对照组的 187%,而鳃中 Zn^{2+} 的质量比基本保持不变. Pb^{2+} 在消化腺和鳃中的最大质量比分别为对照组的 933% 和 694%,说明 Zn^{2+}、Pb^{2+} 在蛤仔消化腺和鳃内的积累能力为:$Pb^{2+} > Zn^{2+}$,且不同组织对重金属的蓄积能力为:消化腺 > 鳃,进一步证明重金属种类的不同影响蛤仔对重金属离子的累积. Topcuoglu 等[13] 研究表明,重金属在贝类体内累积的浓度依次为:Pb > Co > Cd > Cr > Cu > Mn > Ni > Zn > Fe;陈海刚等[14] 发现菲律宾蛤仔对 Pb^{2+} 具有明显的吸收. 蔡立哲等[15] 研究了菲律宾蛤仔对 Zn^{2+}、Pb^{2+} 的积累特征,结果表明,菲律宾蛤仔在水体 Zn^{2+} 质量浓度为 50μg/L 以下暴露 15d,体内 Zn^{2+} 质量随时间的推移增加缓慢,并且菲律宾蛤仔在水体 Pb^{2+} 质量浓度为 2μg/L(含 2μg/L)以下暴露 15d,Pb^{2+} 积累质量浓度与对照组相比不明显,但 4μg/L 以上,Pb^{2+} 积累质量浓度明显增加.

本研究同时发现 Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用时,表现为拮抗作用. 蔡立哲等[16] 研究发现高浓度的 Zn^{2+}、Pb^{2+} 同时存在时,菲律宾蛤仔的积累会受到抑制;王银秋等[17] 研究了重金属 Cd^{2+}、Pb^{2+}、Zn^{2+} 对鲫鱼和泥鳅的毒性,结果表明 Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 有较强的拮抗作用;陈娜等[18] 发现 Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 联合作用时水螅的死亡率低于它们单一污染时的死亡率. 周新文和朱国念[19] 研究表明,Zn^{2+} 能减少 Pb^{2+} 在鱼鳃中的积累;Zn^{2+} 和 Pb^{2+} 拮抗作用的机理可由竞争点位理论来解释,该理论认为重金属离子在进入细胞前先与细胞表面的接收点结合[20],Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 在与细胞表面活性位点结合时存在竞争,结果降低了重金属离子在体内的积累,导致混合重金属离子的毒性作用下降. 国内外对重金属间拮抗作用及作用机理开展了相关研究,Otitoloju[21] 研究了 Zn^{2+}、Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 两两组合对红树螺的毒性,发现 Zn^{2+} 可降低 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的毒性效应. Morley[22] 等发现用摇尾幼虫做指示生物时,Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 发生拮抗作用. 有研究认为拮抗作用的机理与金属和金属硫蛋白的亲合力或螯合饱和度存在差异相关,但这一机理还有待进一步证实.

4.2　菲律宾蛤仔组织内重金属离子的富集与金属硫蛋白含量变化的关系

4.2.1　单一毒性实验

软体动物解毒机制在于体内 MT 的作用,MT 的诱导效率与金属类型及金属浓度相关. Zn^{2+} 为生物体必须元素,消化腺和鳃的 Zn^{2+} 的浓度较低时,Zn^{2+} 对消化腺和鳃内 MT 的诱导作用并不显著. Pb^{2+} 为

有毒金属,微量即可对蛤仔产生毒性,Pb^{2+} 诱导其体内 MT 的合成主要是通过调节其转录水平来实现[23],研究表明 Pb^{2+} 促使 MT-I mRNA 成百倍地增加,我们推测本实验中 Pb^{2+} 单一胁迫时,消化腺和鳃内 MT 明显增加可能与 Pb^{2+} 转录水平的诱导相关. 本实验表明,蛤仔消化腺内 MT 的质量比很好地指示了贝类体内重金属质量比的变化,尤其是 Pb^{2+} 质量比的变化. 如当消化腺和鳃内 Pb^{2+} 质量比达到最大值(Pb-H 组)时,消化腺和鳃内 MT 的产量分别达到其最高值,比对照组明显增加($p<0.01$;$p<0.05$).

4.2.2 联合毒性试验

在重金属吸收过程中,Zn^{2+}、Pb^{2+} 出现拮抗作用,使得混合重金属离子在蛤仔体内吸收降低,重金属的毒性降低,MT 产量的减少可以灵敏地反映这一现象. 在消化腺中,Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用时,重金属积累显示:Zn^{2+} 质量比低于 Zn-H 组,Pb^{2+} 质量比低于 Pb-H 组;MT 的产量显示:MT 质量比低于 Pb-L 组. 对鳃而言,重金属积累显示:Zn^{2+} 质量比低于 Zn-L 组,Pb^{2+} 质量比低于 Pb-H 组;MT 的产量显示:MT 质量比低于对照组. 由此可知 Zn^{2+}、Pb^{2+} 的拮抗作用可以由 MT 的质量比变化来反应. 同时我们推测,Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用时,Zn^{2+} 对 Pb^{2+} 与 MT 的结合可能存在竞争反应. 消化腺中 Pb-L 组暴露时,MT 质量比与对照组相比明显增加($p<0.05$),而 Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用时,消化腺中 Pb^{2+} 积累质量比高于 Pb-L 组,但 MT 质量比与对照组相比增加不明显;鳃中 Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用时,Pb^{2+} 积累质量比(1.60μg/g)与 Pb-L(1.76μg/g)相当,但鳃中 MT 质量比比对照组低. 虽然 Vasak 等[24]认为重金属结合 MT 的能力顺序依次为:$Hg^{2+}>Cu^{2+}$、Ag^{2+}、$Bi^{3+}\geqslant Cd^{2+}>Pb^{2+}>Zn^{2+}>Co^{2+}$. 但魏欣和茹炳根[25]在研究 Pb^{2+} 与金属硫蛋白相互作用时,表明 Zn^{2+} 是 MT 最常结合的金属,Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 对金属硫蛋白存在竞争反应,只有在自由铅浓度达到 6.52×10^{-6}mol/L 的条件下,Pb^{2+} 才可将 Zn-MT 上的 Zn^{2+} 完全取代. 本实验中 Pb^{2+} 的最高积累浓度为 0.05×10^{-6}mol/L(Pb-H 组)$<6.52\times10^{-6}$mol/L,所以我们推断 Zn^{2+}、Pb^{2+} 联合作用时,虽然 Pb^{2+} 的积累明显高于对照组,但是 Zn^{2+} 对 Pb^{2+} 与 MT 的结合存在竞争,这种竞争一定程度上降低了 MT 的产量.

MT 作为重金属污染的一种早期生物反应,其中最肯定已被确认的生物是贻贝(整体软组织或鳃),其 MT 水平可作为环境中 Cd^{2+}、Hg^{+}、Ag^{+} 及 Cu^{2+} 污染的生物标志物. 王海藜等[26]认为 MT 质量比与水环境和体内组织中的重金属之间有显著的相关性,MT 可以作为重金属暴露的生物标志物;Choi 等[27]研究了 Cd^{2+} 暴露下南极帽贝(*Laternula elliptica*)鳃和消化腺内类金属硫蛋白(MTLP)的变化,表明 MTLP 可以作为快速指示 Cd^{2+} 和其他重金属污染的生物标志物. 本文结果同样表明,菲律宾蛤仔消化腺内 MT 质量比可以作为养殖水环境中重金属(尤其是 Pb)污染的监测指标,用于评价海水中重金属的污染状况.

5 结论

(1)不同重金属在蛤仔不同组织中的积累能力具有差异性,且其积累浓度随重金属暴露浓度增大而增加. Zn^{2+}、Pb^{2+} 在蛤仔消化腺和鳃内的积累能力为:$Pb^{2+}>Zn^{2+}$.

(2)当以 Zn^{2+} 50μg/L、Pb^{2+} 25μg/L 联合暴露时,Zn^{2+}、Pb^{2+} 在消化腺和鳃内的积累浓度低于 Zn^{2+}、Pb^{2+} 单一胁迫,Zn^{2+} 与 Pb^{2+} 表现为拮抗作用.

(3)菲律宾蛤仔不同组织对低浓度的 Zn^{2+}、Pb^{2+} 的蓄积能力有显著差异. 与鳃相比,消化腺是蓄积有害金属的主要组织.

(4)蛤仔消化腺和鳃中 MT 质量比随着 Zn^{2+}、Pb^{2+} 浓度的改变发生变化,消化腺中 MT 质量比的变化最显著,从而可以考虑把其 MT 水平作为水环境中指示重金属铅污染的生物标志物.

在本文的书写中得到了姜广甲同学、周海龙博士的大力协助,谨以致谢!

参考文献

[1] Fargasova A. Comparative acute toxicity of Cu^{2+}, Cu^{+}, Mn^{2+}, Mo^{6+}, Ni^{2+} and V^{5+} to Chironomus plumosus larvae and tubifex worms [J]. Biologia, 1998, 53(3): 315-319.

[2] Ye S F, Lu J J. Metallothionein diversity and its ecological service functions of invertebrates: an overview [J]. Biodiversity Science, 2000, 8(3): 317-324(in Chinese).
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.

[3] Bebianno M J, Serafim M A. Comparison of metallothionein induction in response to cadmium in the gills of the bivalve molluscs Mytilus galloprovincialis and Ruditapes decussates [J]. Science of the Total Environment, 1998, 214(1-3): 123-131.

[4] UNEP/RAMOGE. Manual on the biomarkers recommended for the MED POL biomonitoring programme [R]. UNEP, Athens 1999: 92.

[5] Domouhtsidou G P, Dailianis S, Kaloyianni M, *et al*. Lysosomal membrane stability and metallothionein content in *Mytilus galloprovincialis* (*L*), as biomarkers: combination with trace metal concentrations [J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 48(3): 572-586.

[6] Xu L H, Zhang Y Y. The advance of molecular ecotoxicology and its significance in water environment protection [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 1995, 19(2): 171-185(in Chinese).
徐立红,张甬元. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义 [J]. 水生生物学报, 1995, 19(2): 171-185.

[7] 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 C-Toxicology & Pharmacology, 2001, 128(4): 479-493.

[8] Geffard A, Amiard T C, Amiard J C. Do seasonal changes affect metallothionein induction by metals in mussels, *Mytilus edulis*? [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2005, 61(2): 209-220.

[9] GB11607-89. 渔业水质标准 [S]. 1989.

[10] Karg N F, Cogun H Y. Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish Tilapia nilotica [J]. Bulletin of environmental contamination and toxicology, 1999, 63(4): 511-519.

[11] Scheuhammer A M, Cherian M G. Quantification of metallothionein by silver saturation [J]. Methods in Enzymology, 1991, 205: 78-83.

[12] Zhang B L, Sheng X R. Determination of metallothionein by Silver Saturation Assay [J]. Pharmaceutical Biotechnology, 1996, 3(1): 31-33(in Chinese).
张保林,盛湘蓉. 金属硫蛋白测定方法——银饱和分析法 [J]. 药物生物技术, 1996, 3(1): 31-33.

[13] Topcuoglu S, Kirbasoglu C, Gungor N. Heavy metals in organisms and sediments from Turkish Coast of the Black Sea, 1997-1998 [J]. International Environment, 2002, 27(7): 521-526.

[14] Chen H G, Lin Q, Cai W G, *et al*. Comparisons on the accumulation and elimination characteristic of Hg, IPb and Cd in three kinds of marine [J]. Bivalve MolluscsJournal of Agro-Environment Science, 2008, 27(3): 1163-1167(in Chinese).
陈海刚,林　钦,蔡文贵,等. 3 种常见海洋贝类对重金属 Hg、Pb 和 Cd 的积累与释放特征比较 [J]. 农业环境科学学报, 2008, 27(3): 1163-1167.

[15] Cai L Z, Hong H S. Scientiae circumstantiae accumulation of zinc and lead in Ruditapes philippinarum and its tolerance [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 1999, 19(3): 319-322(in Chinese).
蔡立哲,洪华生. 菲律宾蛤仔对锌、铅的积累特征 [J]. 环境科学学报, 1999, 19(3): 319-322.

[16] Cai L Z, Liu Q Y. Metal accumulation of Ruditapes philippinarum in high zinc and lead experimental waters [J]. Journal of Oceanography in Taiwan Strait, 1998, 17(4): 456-461(in Chinese).
蔡立哲,刘琼玉. 菲律宾蛤仔在高浓度锌铅水体中的金属积累 [J]. 台湾海峡, 1998, 17(4): 456-461.

[17] Wang Y Q, Zhang Y M, Zhao D Q. Heavy metals cadmium, lead and zinc on the survival of carassius auratus and misgurnus anguillicaudatus [J]. Journal of Gansu Sciences, 2003, 15(1): 35-38(in Chinese).
王银秋,张迎梅,赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性 [J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 35-38.

[18] Chen N, Hao J S, Wang Y, *et al*. Single and binary-combined acute toxicity of heavy metal ion Hg^{2+}, Cu^{2+}, Cd^{2+}, Ag^{+}, Zn^{2+} and Pb^{2+} to Hydra [J]. Journal of Biology, 2007, 24(3): 32-35(in Chinese).
陈　娜,郝家胜,王　莹,等. 铜、铅、镉、锌、汞和银离子复合污染对水螅的急性毒性效应 [J]. 生物学杂志, 2007, 24(3): 32-35.

[19] Zhou X W, Zhu G N. Effect of the interaction of copper, zinc, and cadmium on the accumulation of lead in the tissues of the Carassius auratus [J]. Agro-environmental Protection, 2002, 21(1): 23-25(in Chinese).
周新文,朱国念. 重金属离子 Cu Zn Cd 的相互作用对 Pb 在鲫鱼组织中积累的影响 [J]. 农业环境保护, 2002, 21(1): 23-25.

[20] Vranken G, Tire C, Heip C. The toxicity of paired metal mixtures to the nematode Monhystera disjuncta (Bastian, 1865) [J]. Marine Environmental Research. London, 1988, 26(3): 161-179.

[21] Otitoloju A A. Evaluation of the jiont-action toxicity of binary mixtures of heavy metals against the mangrove perriwinkle Tympanotonus fuscatus var radula(L.) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2002, 53(3): 404-415.

[22] Morley N J, Crane M, Lewis J W. Toxicity of cadmium and zinc mixture to diplostomum spathaceum(Trematoda: Diplostomidae) cercarial survival [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2002, 43 (4): 28-33.

[23] Ru B G, Huang B Q. Metallothionein [J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 1991, 18(4): 254-259(in Chinese).

菇炳根，黄秉乾. 金属硫蛋白 [J]. 生物化学与生物物理进展，1991，18(4)：254-259.

[24] Vasak M. Metal removal and substitution in vertebrate and invertebrate metallothioneins [J]. Methods in Enzymology，1991，205：452-458.

[25] Wei X，Ru B G. The interaction of two divalent lead ion with metallothionein [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology，1999，15(2)：289-295(in Chinese).

魏 欣，茹炳根. 二价铅离子与金属硫蛋白相互作用的研究 [J]. 中国生物化学与分子生物学报，1999，15(2)：289-295.

[26] Wang H L，Tao S. Application of biomarkers in aquatic environmental research [J]. China Environmental Science，1999，19(5)：421-426(in Chinese).

王海藜，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.

[27] Choi H J，Ji J，Chung K H，*et al*. Cadmium bioaccumulation and detoxification in the gill and digestive gland of the Antarctic bivalve Laternula elliptica [J]. Comparative Biochemistry and Physiology C-Toxicology & Pharmacology，2007，145(2)：227-235.

Metallothionein in digestive glands and gills of *Ruditapes philippinarum* exposed to zinc and lead

SU Wen[1,2,3]，WU Hui-Feng[1]，LIAO Chun-Yang[1]，XUE Qin-Zhao[1]，QU Ying[1,2,3]

(1 *Yantai Institute of Coastal Zone Research*，*Chinese Academy of Sciences*，*Yantai* 264003，*China*；

2 *Institute of Oceanology*，*Chinese Academy of Sciences*，*Qingdao* 266071，*China*；

3 *Graduate University*，*Chinese Academy of Sciences*，*Beijing* 100049，*China*)

Abstract The paper discussed accumulation of heavy metals in the digestive glands and gills of *Ruditapes philippinarum* with single or combined exposure of zinc and lead and relationship between MT (metallothioneinm) induction and accumulation of heavy metals. Results indicated that the antagonistic effect of znic and lead was obvious in clam jointly exposed to zinc and lead (Zn^{2+} 50μg/L and Pb^{2+} 25μg/L). MT varied with exposure concentrations of zinc and lead and the effect of lead was significant.

Key words heavy metals，metallothioneinm，joint toxicity，antagonistic effect