

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20110812001

薛明,柯才焕. 镉在方斑东风螺组织内的蓄积及镉的毒性: 水相暴露与食物相暴露比较[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 395-403

Xue M, Ke C H. Toxicity of cadmium and its bioaccumulation in spotted babylon, *Babylonia areolata*: Comparison between effects of waterborne and dietary exposure [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 395-403 (in Chinese)

## 镉在方斑东风螺组织内的蓄积及镉的毒性: 水相暴露与食物相暴露比较

薛明<sup>1,2</sup>, 柯才焕<sup>2,\*</sup>

1. 广东海洋大学水产学院, 湛江 524025
2. 厦门大学海洋与地球学院, 厦门 361005

**摘要:** 为比较直接经水体与经营养传递的2种镉(cadmium, Cd)暴露方式对方斑东风螺(*Babylonia areolata*)不同组织Cd蓄积和毒性的差异,采用室内模拟法,将螺暴露于含Cd水体( $Cd^{2+}$ :  $100 \mu g \cdot L^{-1}$ )或喂食含Cd饵料(牡蛎  $34.56 \mu g \cdot g^{-1}$ 以干质量计,先经水体  $100 \mu g \cdot L^{-1} Cd^{2+}$  暴露达平衡)30 d后再进行15 d净化。结果显示,暴露期间,除食物相组螺胃肠道Cd浓度在第10天极显著高于对照组,但随后迅速下降外,其他各组织在2种途径及胃肠道在水相暴露时Cd的浓度均逐渐上升,暴露30 d后肝胰脏中Cd浓度最高;净化期,螺鳃中Cd排出率较高,胃肠道与肝胰脏的排出率较低,至净化期末除食物相组螺中Cd浓度与对照组无显著差异外,2种处理中其他各组织Cd浓度仍显著高于对照组。2种暴露途径中金属硫蛋白(metallothionein, MT)浓度仅在螺肝胰脏中逐渐增加,且与Cd的蓄积呈显著线性正相关。与食物相组相比,水相Cd暴露引起螺肝胰脏脂质过氧化水平(lipid peroxidation, LPO)更高,且内脏团中Cd与其亚细胞成分的金属敏感组分结合的百分比也更高。结果表明,Cd通过营养传递对螺产生的毒性较水体直接暴露低,但摄食是螺蓄积Cd的主要途径;净化后除螺鳃外水相暴露组螺各组织Cd的排出率较低;因此为了健康养殖与食用安全,东风螺工厂化养成时对饵料与水体Cd浓度的监测均应引起足够的重视。

**关键词:** 方斑东风螺;水相镉暴露;食物相镉暴露;金属硫蛋白;亚细胞分布

文章编号: 1673-5897(2013)3-395-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Toxicity of Cadmium and Its Bioaccumulation in Spotted Babylon, *Babylonia areolata*: Comparison between Effects of Waterborne and Dietary Exposure

Xue Ming<sup>1,2</sup>, Ke Caihuan<sup>2,\*</sup>

1. College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China
2. College of Ocean and Earth Science, Xiamen University, Xiamen 361005, China

**Received** 12 August 2011 **accepted** 4 November 2011

**Abstract:** The effects of waterborne and dietary cadmium (Cd) exposure on bioaccumulation and toxicity in tissues of the *Babylonia areolata* juveniles were investigated. The snails were exposed to aqueous Cd ( $100 \mu g \cdot L^{-1} Cd^{2+}$ )

收稿日期: 2011-08-12 录用日期: 2011-11-04

基金项目: 广东海洋大学博士启动基金(1112328); 现代农业产业技术体系建设专项资金(CARS-48)

作者简介: 薛明(1975-),女,博士,研究方向为海洋底栖生物养殖与生态毒理学, E-mail: xuemtc@163.com;

\* 通讯作者( Corresponding author) E-mail: chke@xmu.edu.cn;

directly or fed with Cd pre-exposed oysters (*Saccostrea cucullata*) for 30 d. Cd concentration of the oysters was  $34.56 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$  (dry mass) after being exposed to waterborne Cd ( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1} \text{Cd}^{2+}$ ) for 14 d, then the snails of the two treatments were depurated for another 15 d. The results indicated that the concentrations of Cd increased with increasing exposure time in all tissues except for the gastrointestinal tract of the dietary group, which decreased gradually after peaked at the 10<sup>th</sup> day. The maximal values of Cd accumulated of the two treatments were both in hepatopancreas after 30 d exposure. After depuration, the efflux rates in gill were higher than those in gastrointestinal tract and hepatopancreas. Cd concentrations in different tissues were still significantly higher than that of the control group except for that in gill of the dietary group. The metallothionein (MT) concentrations of the two treatments increased gradually only in hepatopancreas, which was positively correlated to the amount of the accumulated Cd. Comparably, the toxicity to the snails after exposure to waterborne Cd was stronger than that after exposure to dietary Cd as more MDA contents produced in hepatopancreas and higher percentages of Cd distribution in metal sensitive fractions of the viscera. The snails accumulated Cd mainly from the diet. The depuration rates of tissues in the aqueous Cd group were lower than those in the dietary Cd group except for that of the gill. Therefore, much attention should be paid to monitor Cd concentrations of the diets and water when the snails were cultured with high-density in factory.

**Keywords:** *Babylonia areolata*; waterborne Cd exposure; dietary Cd exposure; metallothionein; subcellular Cd distribution

镉(cadmium, Cd)作为一种生物体非必需重金属,痕量镉就有可能对生物体产生毒害效应,大部分动物可同时从水体与食物2个途径吸收Cd<sup>[1-2]</sup>,所以水相或食物相均有可能是动物体Cd蓄积的主要来源,这取决于物种种类、金属种类及饵料类型<sup>[3]</sup>。水生动物体常通过鳃组织过滤大量海水,通过这种途径溶解态重金属得以在其体内浓缩;另一方面,动物体也可以通过摄食积累颗粒态重金属,即通过营养传递在生物体内蓄积<sup>[4-6]</sup>,如Pierron等<sup>[7]</sup>报道野外或室内模拟状态下营养传递均是Cd在欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)体内积累的重要途径。过去几十年中,多数学者均是研究水环境中重金属对生物体的毒性效应<sup>[3-4]</sup>,然而越来越多的证据表明,食物相暴露不仅在重金属积累方面有重要贡献,同时在毒性方面也不容忽视<sup>[6]</sup>。如有研究发现,虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)在暴露于食物相Cd后生长速度下降<sup>[8]</sup>。但关于水相与食物相2种Cd暴露途径对不同动物体组织蓄积能力及毒性效应的比较研究还较为少见,而这对水质标准的重新评估有重要意义<sup>[3]</sup>。

较多研究表明,腹足类动物的金属累积能力很强,是水体或沉积物污染重要的指示生物<sup>[9]</sup>,如Kang等<sup>[10]</sup>报道韩国昂山湾短玉黍螺(*Littorina brevicula*)体Cd浓度达 $0.48 \sim 27.11 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (以生物体干质量计),且与海水中Cd浓度成正相关,因此可

作为该海区Cd污染的指示物种;Daka等<sup>[11]</sup>的暴露实验表明,泥螺(*Tympanotonus fuscatus*)可以很好地指示Cd污染。方斑东风螺(*Babylonia areolata*)分布广,活动范围小,生命周期长,易采集,因此适合探索其作为重金属污染的指示种的可行性。同时该螺又是正兴起的优良养殖种类,但近年来养成时大规模死亡时有发生,具体原因尚未探明,但海水污染包括重金属毒性影响螺体正常生理活动无疑是重要诱因之一。因此本实验拟在相同水体Cd浓度下,通过水体直接暴露与饵料预暴露后再摄食2种途径,研究水相与食物相Cd暴露对螺组织Cd积累、MT诱导、肝胰脏脂质过氧化水平、螺内脏团中Cd的亚细胞水平分布及净化后螺组织中Cd排出的影响,以期阐明螺体Cd蓄积的主要途径与毒性效应,为该螺的健康养殖与安全食用提供理论指导,并可丰富海产腹足类的金属毒理学数据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

僧帽牡蛎(*Saccostrea cucullata*),壳长6~7 cm,购自湛江市水产品批发市场,以下简称牡蛎,洗净壳表附着生物后暂养于室内。方斑东风螺购自广东湛江东海岛养殖场,选取同池同批孵化幼体培育而成的个体,先在水簇箱中驯化2周,每天下午4:00投喂1次新鲜牡蛎饵料,驯化摄食以1 h内吃完为宜,将剩余饵料移走,临实验前2 d停止投喂。

## 1.2 主要仪器与试剂

日本岛津 AA6800 原子吸收分光光度计, 美国 OptimaL-100XP 超速离心机, 瑞士 Polytron-PT-2100 组织匀浆机, 德国 Centrifuge5810R 高速冷冻离心机, 美国 Cary50 紫外可见分光光度计。Cd 元素标准物(1 000 mg·L<sup>-1</sup>) 和扇贝成分分析标准物质(GBW10024) 购自国家标准物质研究中心; 氯化镉 纯度 99.9% 购自百灵威科技有限公司; 福林-酚试剂、牛血红蛋白、牛血清白蛋白和 PMSF(苯甲基磺酰氟) 购自生工生物工程(上海)股份有限公司; 质量分数为 10% 的磷酸二氢铵购自美国 PerkinElmer 仪器有限公司。

## 1.3 实验方法

预暴露牡蛎的获得: 在水族箱(0.58 m × 0.45 m × 0.35m) 内将僧帽牡蛎暴露于含 Cd<sup>2+</sup>(100 μg·L<sup>-1</sup>) 的水体中, 期间不投喂, 连续充氧, 自然光照。每隔 2 d 换 1/3 含相同 Cd 浓度的海水, 并随机取 3 只牡蛎测其软体部 Cd 浓度, 第 14 天达到平衡时结束, 除取 3 只牡蛎供 Cd 浓度测定外, 其余保存于 -20℃ 作为饵料。

实验设水体 Cd 暴露(水相组)、饵料 Cd 暴露(食物相组) 2 个处理组, 1 个对照组, 每组 3 个平行, 每个平行 1 个水族箱, 盛 70 L 自然砂滤海水, 箱底铺约 5 cm 厚的细沙。然后每箱放入活力好、规格相近的螺 60 只, 海水温度(27.1 ± 0.5) °C, 盐度 31.3, pH 值 7.9, 溶氧 > 6.5 mg·L<sup>-1</sup>。

水相组是将螺放入 Cd<sup>2+</sup> 浓度为 100 μg·L<sup>-1</sup> 的水体投喂牡蛎; 食物相组是将螺放入清洁水体投喂 Cd 预暴露的牡蛎。每天下午 4:00 按约 6% 螺质量投喂 1 次, 1 h 后将残饵移走并称量质量。30 d 暴露结束后, 分别将水相组换成清洁砂滤海水、食物相组饵料换成天然牡蛎, 进入 15 d 净化期。实验起始随机取螺 30 只供各项指标测定, 然后分别于暴露第 10、20、30 天以及净化第 8、15 天从各组各箱中随机取 9 只, 对照组同时取样。将螺用双蒸水冲洗, 滤纸吸干, 冰上解剖仔细分离出螺体鳃、胃肠道(胃与直肠)、肝胰脏、足肌 4 种组织, 因胃肠道与鳃组织样品量较少, 所以 Cd 与 MT 含量测定是每箱 3 只螺取胃肠道混合作为 1 个样品, 每箱 9 只螺取鳃混合作为 1 个样品; 肝胰脏与足肌 MT 含量、肝胰脏 MDA 水平及螺内脏团中 Cd 的亚细胞分布测定均是每次每箱单只螺取样, 装于聚乙烯样品袋内, 液氮速冻后 -80℃ 保存备用。

## 1.4 样品测定

### 1.4.1 Cd 浓度测定

采用湿法消化法, 螺组织样品置 80℃ 烘干至恒

重, 于三角烧瓶中按 100 g·L<sup>-1</sup> 加入 V(HNO<sub>3</sub>):V(HClO<sub>4</sub>) = 4:1 混合液后, 加盖室温静置 12 h, 之后再加相同体积的混合酸, 放置可控温的电热板上, 在通风橱中温度升至 80℃, 加热 2 h, 然后升温至 110℃, 保持微沸状态, 待棕色气体冒尽, 溶液澄清透明, 继续加热至 HClO<sub>4</sub> 白烟冒尽后, 消煮至近干, 冷却后用少量超纯水淋洗三角瓶内壁若干次, 淋洗液一并移入 50 mL 容量瓶, 并定容至标线; 同时制备样品空白与扇贝成分分析标准物质 GBW10024, 适当稀释后用岛津 AA6800 型原子吸收光谱仪测定, 石墨炉法工作条件: 波长 228.8 nm; 光谱带宽 0.5 nm; 灯电流 8.0 mA; 原子化程序: 干燥 100℃、20 s, 灰化 600℃、20 s, 原子化 1 850℃、3 s; 基体改进剂: 1% 磷酸二氢铵(质量分数)。水样 Cd 浓度测定参照国标 GB17378.4 进行。

### 1.4.2 MT 浓度测定

MT 测定采用镉/血红蛋白饱和法, 参照 David 和 Brain<sup>[12]</sup> 并略加改进。样品解冻后用双蒸水洗净, 滤纸吸干后按 250 g·L<sup>-1</sup> 加入预冷匀浆缓冲液(20 mmol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH = 8; 0.15 mol·L<sup>-1</sup> NaCl; 10 mmol·L<sup>-1</sup> β-巯基乙醇), 剪碎后用组织匀浆机冰浴匀浆, 匀浆后于 12 000 × g、4℃ 离心 15 min, 分离出上清液。取上清液 0.5 mL 加入 0.5 mL 1 mg·mL<sup>-1</sup> 的 Cd 溶液, 充分混合后室温下孵育 10 min, 加入 0.2 mL 20 g·L<sup>-1</sup> 牛血红蛋白混合液, 冰浴 5 min 后放入沸水浴中加热 2 min, 冷却后于 10 000 × g、4℃ 离心 10 min; 重复加牛血红蛋白以后的步骤 2 次。取上清液加体积分数为 70% 硝酸消化、定容, 用石墨炉原子吸收光谱法测定 Cd 浓度。

MT 分子量以 6 500 Da 计, 因 1 mol 的 MT 可结合 7 mol 的 Cd(原子量为 112.4), 所以 MT 浓度(μg·g<sup>-1</sup> 湿质量) 计算如下:

$$\text{MT 浓度}(\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}) = (C_{\text{Cd}} \times S \times 6500 \times V) / (G \times 7 \times 112.4 \times N)$$

式中,  $C_{\text{Cd}}$  为定容液中 Cd 的浓度(μg·mL<sup>-1</sup>),  $S$  为定容体积(mL),  $G$  为螺体软组织湿质量(g),  $V$  为匀浆离心后的上清液体积(mL),  $N$  为匀浆离心后的取样体积(mL)。

### 1.4.3 Cd 的亚细胞分布测定

参照 Wallace 等的方法<sup>[13]</sup>, 先分离出螺内脏团的 5 个亚细胞组分: 富含金属颗粒(metal rich granule, MRG)、细胞碎片(cellular debris)、细胞器(organelles)、热敏感蛋白(heat sensitive protein, HSP)、

类金属硫蛋白(metallothionein like protein, MTLP), 测定各组分含 Cd 量,再计算各组分 Cd 含量占总体 Cd 含量的百分比。具体如下:将解冻后的样品按  $250 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  加入预冷匀浆液( $20 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl,  $2 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  PMSF, pH 8.0),剪碎后用组织匀浆机冰浴匀浆 5 min。然后  $4^\circ\text{C}$ 、 $1\ 500 \times g$  离心 15 min。沉淀 P1 含有细胞碎片和组织碎片,上清液 S1 含有细胞器和可溶性组分。沉淀 P1 用  $4 \text{ mL } 1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaOH 重悬,  $60^\circ\text{C}$  处理 10 min,  $5\ 000 \times g$  离心获得 2 个组分,分别是沉淀 P2(MRG)和上清液 S2。上清液 S1 经  $4^\circ\text{C}$ 、 $100\ 000 \times g$  超速离心 1 h,获得沉淀 P3 和上清液 S3(胞质溶胶)。然后,上清液 S3 经  $80^\circ\text{C}$  热处理 10 min,冰浴 1 h,在  $4^\circ\text{C}$ 、 $64\ 000 \times g$  高速离心 10 min,获得沉淀 P4(HSP)和上清液 S4(MTLP)。操作中除了热处理和离心外,样品须始终处于冰浴中。各分离组分于  $80^\circ\text{C}$  烘干、称量质量,测定 Cd 浓度,方法同上 1.4.1。

#### 1.4.4 MDA 含量测定

MDA(malondialdehyde,丙二醛)含量测定采用 TBA(thiobarbituric acid)法,每实验组测定 3 只螺的肝胰脏组织,解冻后按  $100 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$  加入预冷匀浆缓冲液( $0.154 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  KCl,  $0.01 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.4),玻璃匀浆器冰浴中匀浆,匀浆液在  $4^\circ\text{C}$ 、 $10\ 000 \times g$  离心 20 min,所得上清液根据需要稀释 2~10 倍,采用试剂盒测定(购自南京建成生物工程研究所),单位为  $\text{nmol}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。蛋白质含量用福林-酚法测定,以牛血清白蛋白为标准。

#### 1.5 数据分析

数据均以平均值  $\pm$  标准差(Mean  $\pm$  SD)形式给出;对百分率进行反正弦平方根转换,在进行正态性检验后,数据总体差异性用单因素方差分析(ANOVA),当差异显著时,用 Duncan's 多重比较分析组间差异显著性;用 t-检验分析对照组与处理组间差异;统计分析用 SPSS13.0 软件进行,显著水平为  $P < 0.05$ 。

## 2 结果(Results)

### 2.1 水体与饵料中的 Cd 对螺生长参数的影响

水相组 Cd 浓度实测为( $96.53 \pm 17.41$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,对照组与食物相组的水体 Cd 浓度均很低,分别为( $0.21 \pm 0.08$ )和( $0.25 \pm 0.05$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ;对照组与水相组饵料牡蛎体内的 Cd 浓度为( $0.92 \pm 0.07$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,而食物相组的牡蛎体内 Cd 浓度为( $34.56 \pm 4.29$ )  $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。如表 1 所示,各组螺在暴露与净化实验结束时的平均壳长、湿质量及摄食率间均无显著差异( $P > 0.05$ ),其中食物相组的摄食率略高,说明螺对 Cd 污染的牡蛎饵料没有回避反应。

### 2.2 螺各组织对 Cd 的蓄积

螺鳃、胃肠道、肝胰脏及足肌的 Cd 浓度变化如图 1 所示。可见暴露期间,第 10 天时水相组螺鳃中 Cd 浓度( $1.83 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )即显著高于对照组( $0.62 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )( $P < 0.05$ ),其后迅速升高,第 30 天时为对照组的 12.45 倍;而食物相组 Cd 蓄积缓慢,但第 30 天时也显著升高( $P < 0.05$ ),为对照组的 2.51 倍(图 1A)。食物相组螺胃肠道中 Cd 浓度( $10.45 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )在第 10 天时极显著高于对照组( $1.26 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )( $P < 0.05$ ),但后期则逐渐下降,但第 30 天时仍显著高于对照组( $P < 0.05$ ),为对照组的 7.05 倍;水相组螺胃肠道中 Cd 积累较慢,第 20 天时也显著高于对照组( $P < 0.05$ ),第 30 天时上升为对照组的 4.81 倍(图 1B)。2 个处理组螺的肝胰脏中 Cd 浓度在暴露期间均呈逐渐上升趋势,第 30 天时分别达到  $7.65$  和  $9.37 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ ,为对照组的 6.65 和 8.14 倍(图 1C)。而 2 个处理组螺的足肌 Cd 浓度在实验中与对照组间始终差异不显著( $P > 0.05$ )(图 1D)。进入净化期,除第 8 天时水相组螺的肝胰脏 Cd 浓度较暴露结束时高约 4.71% 外,其他均呈下降趋势;第 15 天时除食物相组螺鳃中 Cd 浓度与对照组差异不明显外( $P > 0.05$ ),其余仍显著高于对照组( $P < 0.05$ )。

表 1 Cd 对方斑东风螺的壳长、体质量及摄食率的影响

Table 1 Effect of Cd on shell length, total wet mass and feeding rates of *B. areolata*

组别	实验起始 壳长/cm	实验起始 湿质量/g	暴露结束 壳长/cm	暴露结束 湿质量/g	净化结束 壳长/cm	净化结束 湿质量/g	摄食率/%
对照组	$3.44 \pm 0.38$	$9.05 \pm 1.75$	$4.06 \pm 0.52$	$10.53 \pm 1.90$	$4.27 \pm 0.43$	$10.86 \pm 2.66$	$3.52 \pm 0.71$
水相组	$3.61 \pm 0.26$	$8.83 \pm 2.34$	$3.98 \pm 0.49$	$9.94 \pm 2.52$	$4.18 \pm 0.51$	$10.43 \pm 1.93$	$3.39 \pm 0.54$
食物相组	$3.39 \pm 0.57$	$9.27 \pm 2.08$	$3.87 \pm 0.65$	$10.22 \pm 2.28$	$4.13 \pm 0.39$	$11.09 \pm 3.24$	$3.67 \pm 0.58$

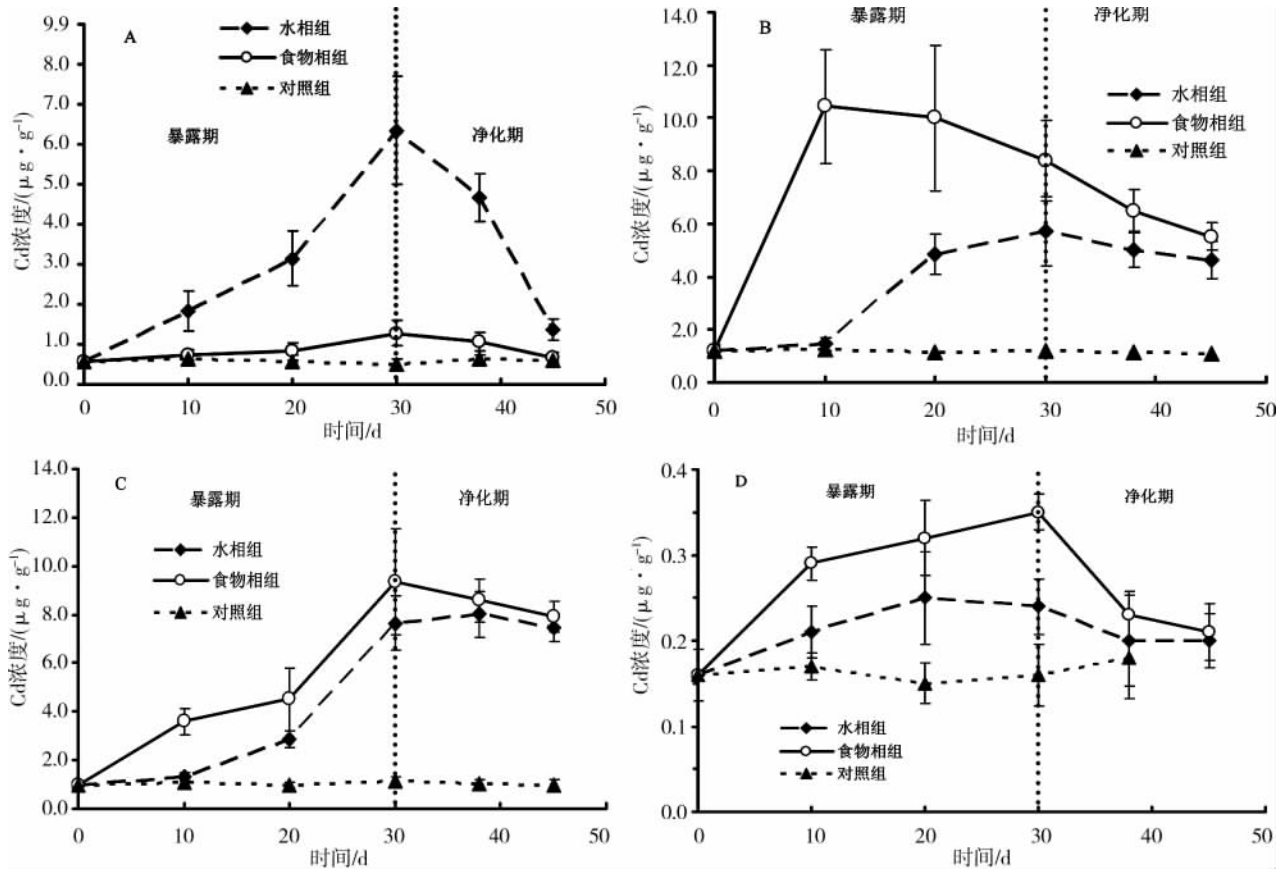


图 1 实验期间方斑东风螺鳃 (A)、胃肠道 (B)、肝胰脏 (C) 和足肌 (D) 中 Cd 浓度变化

Fig. 1 Changes of Cd concentrations in gills (A), gastrointestinal tract (B), hepatopancreas (C) and foot muscle (D) of *B. areolata* during experiment period

2.3 螺各组织 MT 的诱导量

表 2 所示为实验中螺的各组织 MT 含量变化。

可见 10 d 水相暴露后, 鳃中 MT 浓度较对照组显著上升, 第 20 天时进一步升高, 第 30 天时有所回落但

表 2 实验期间方斑东风螺鳃、胃肠道、肝胰脏和足肌中 MT 浓度

Table 2 MT concentrations in tissues of gill, gastrointestinal tract, hepatopancreas and foot muscle of *B. areolata* during experiment period

( $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ )

组织	组别	暴露期			净化期	
		第 10 天	第 20 天	第 30 天	第 38 天	第 45 天
鳃	对照组	43.27 ± 12.56 a	39.69 ± 13.77 a	42.84 ± 15.23 a	44.15 ± 14.28 a	38.46 ± 10.06 a
	水相组	97.34 ± 30.16 ab*	125.09 ± 35.27 a*	70.25 ± 21.19 b*	43.34 ± 12.80 c	44.42 ± 13.55 c
	食物相组	51.91 ± 16.21 b	77.42 ± 24.72 a*	38.77 ± 9.04 b	40.38 ± 12.55 b	39.96 ± 14.79 b
胃肠道	对照组	58.33 ± 15.20 a	55.17 ± 14.43 a	53.92 ± 11.71 a	57.57 ± 14.45 a	54.61 ± 10.90 a
	水相组	62.66 ± 16.88 a	67.93 ± 15.34 a	68.47 ± 17.25 a	54.39 ± 13.67 a	55.87 ± 12.11 a
	食物相组	71.12 ± 16.69 a	65.46 ± 13.31 a	60.69 ± 10.68 a	59.92 ± 13.32 a	50.06 ± 11.35 a
肝胰脏	对照组	72.19 ± 17.16 a	70.66 ± 16.64 a	75.37 ± 19.92 a	74.29 ± 17.57 a	73.44 ± 12.99 a
	水相组	83.35 ± 21.03 c	201.04 ± 45.56 b*	297.98 ± 68.89 a*	83.07 ± 17.78 c	70.64 ± 15.51 c
	食物相组	77.38 ± 16.65 c	135.66 ± 34.42 b*	243.21 ± 56.65 a*	78.36 ± 17.77 c	75.89 ± 16.28 c
足肌	对照组	23.26 ± 2.79 a	25.19 ± 3.57 a	24.38 ± 4.02 a	21.27 ± 3.76 a	25.63 ± 4.11 a
	水相组	24.97 ± 5.56 a	27.58 ± 7.25 a	27.52 ± 6.38 a	25.11 ± 5.24 a	24.63 ± 5.70 a
	食物相组	23.25 ± 3.89 a	24.29 ± 5.55 a	24.76 ± 3.77 a	25.34 ± 6.26 a	24.71 ± 3.82 a

注: 表中同一行数据后的不同字母表示同一组织 Cd 浓度不同时间差异显著, \* 表示该数据与对照组间差异显著, 显著性水平为  $P < 0.05$ , 下同。

仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 食物相组螺鳃中 MT 浓度仅在第 20 天时显著高于对照组 ( $P < 0.05$ )。暴露

后期及净化期内均与对照组间无明显差异 ( $P > 0.05$ )。螺胃肠道中 MT 浓度在 2 个处理组中尽管有波动, 但与对照组间差异不显著 ( $P > 0.05$ )。而暴露期内螺肝胰脏中 MT 浓度均持续上升, 第 20 天时即显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ); 2 种途径相比, 水相组螺的 MT 含量始终高于相应的食物相组; 进入净化期, 各组织 MT 含量均迅速下降至对照组水平 ( $P > 0.05$ )。

因足肌中 Cd 蓄积与 MT 诱导量变化不明显, 故以胃肠道、鳃、肝胰脏组织中 Cd 浓度为自变量  $x$ 、MT 浓度为因变量  $y$ 。综合分析各组织中 Cd 含量与

MT 诱导量之间的相关性, 发现在胃肠道、鳃中两者间无明显相关性, 而肝胰脏中两者间呈显著的线性正相关:  $y = 13.266x + 56.221$ ,  $r^2 = 0.4733$ ,  $P < 0.05$ 。

#### 2.4 螺肝胰脏中 MDA 水平

表 3 所示为实验中螺的肝胰脏 MDA 水平。可见暴露早期食物相组螺肝胰脏中 MDA 含量与对照组无显著差别 ( $P > 0.05$ )。第 30 天时较对照组显著上升 ( $P < 0.05$ ); 而水相组螺的肝胰脏 MDA 含量第 10 天即显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 且随着暴露时间而上升。净化期内, 食物相组第 8 天时 MDA 水平即回落至对照组状态, 而水相组仍显著高于对照组 ( $P < 0.05$ ), 但第 15 天时与对照组间也无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

表 3 实验期间方斑东风螺肝胰脏 MDA 含量

Table 3 MDA concentrations in hepatopancreas of *B. areolata* during experiment period

( $\text{nmol} \cdot \text{mg}^{-1}$ )

组别	暴露期			净化期	
	第 10 天	第 20 天	第 30 天	第 38 天	第 45 天
对照组	10.29 ± 3.18 a	9.95 ± 2.97 a	10.07 ± 3.32 a	10.49 ± 2.27 a	10.32 ± 3.46 a
水相组	17.58 ± 3.64 b*	28.68 ± 4.33 a*	31.77 ± 6.56 a*	19.96 ± 3.09 b*	11.14 ± 3.77 c
食物相组	11.31 ± 2.49 b	11.47 ± 3.75 b	15.45 ± 4.16 a*	9.63 ± 2.87 b	10.17 ± 1.89 b

从图 2 可见, MRG 与细胞碎片亚细胞组分是螺内脏团 Cd 的主要储存库, 因此 Cd 倾向结合在不可溶性组分中。实验中对照组螺各组分 Cd 的百分比保持稳定状态, 相比对照组, 水相暴露 30 d 后螺内脏

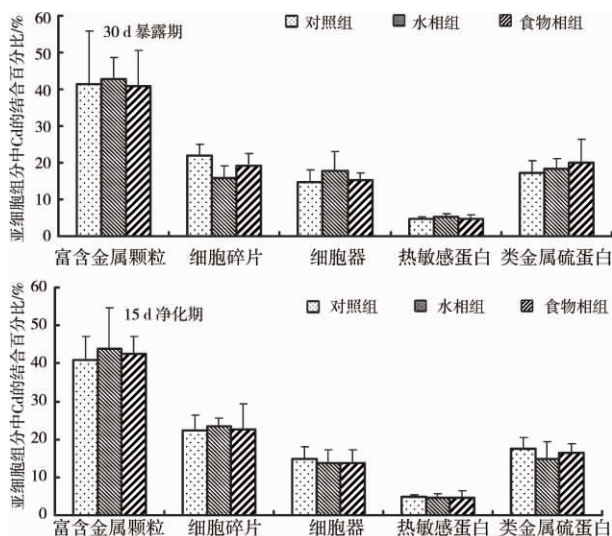


图 2 水相与食物相 2 种途径 Cd 暴露 30 d 后再净化 15 d 过程中方斑东风螺内脏团中 Cd 的亚细胞分布变化

Fig. 2 Changes of subcellular Cd distribution in visceral mass of *B. areolata* during 15 d depuration period after 30 d exposure to aqueous and dietary Cd

团的细胞器、HSP 和 MTLP 组分中 Cd 的百分比均有所上升, 尤其 HSP 组分中 Cd 的百分比明显上升; 而细胞碎片中比例相应下降, 由对照组的 21.9% 减少至 15.7%, 同时 MRG 中 Cd 的百分含量也略有增加; 食物相暴露后除 MRG 中 Cd 的百分比略有减少外, 其余各组分的变化趋势与水相组相似, 但幅度较小, 尤其是 HSP 中的百分比与对照组无明显变化, 但 MTLP 中 Cd 的百分比 (20.1%) 较水相组 (18.4%) 提高。净化后 2 种暴露途径螺内脏团的细胞器与 MTLP 中 Cd 的百分比均有所下降, 而 MRG 与细胞碎片中 Cd 的百分比略有上升; 但 HSP 中 Cd 的百分比在水相组净化后下降, 但食物相组略有增加。

### 3 讨论 (Discussion)

#### 3.1 螺各组织特异性 Cd 积累

本研究表明, Cd 在螺各组织产生了特异性积累, 如第 10 天食物相组螺胃肠道 Cd 浓度即显著增加, 但随后呈下降趋势, 因此这种蓄积是短暂的; 水相组螺胃肠道中 Cd 浓度也缓慢增加, 说明螺为了维持渗透自稳态而摄入海水也能在胃肠道中蓄积一定量的 Cd。鳃是 Cd 进入水生动物体的主要位点与临时贮存部位, 但通过鳃分泌也是动物排出体内 Cd

的重要途径<sup>[3]</sup>, 因此最终鳃中 Cd 浓度取决于 Cd 吸收、分泌和转移等这些过程相互作用的结果, 实验中水相组螺鳃中 Cd 浓度迅速上升, 这可归因于鳃与水体直接接触, 通过顶细胞膜快速吸收溶解态 Cd; 食物相暴露后期(30 d)螺鳃中 Cd 浓度也显著高于对照组, 因食物中 Cd 泄漏至水体的量可忽略不计, 推测可能是其他组织 Cd 通过基侧细胞膜逐渐转运至鳃, 通过鳃分泌而暂时在鳃中储存的原因。螺肝胰腺中 Cd 的积累早期较慢, 但随暴露时间延长逐渐增加, 第30天时2种途径中均高于其他组织, 表明胃肠道、鳃等组织吸收的 Cd 通过再分配转移至肝胰腺<sup>[10]</sup>, 因此肝胰腺是螺贮存 Cd 的主要器官。而 Koyama 等<sup>[14]</sup>也报道莱氏拟乌贼(*Sepioteuthis lessoniana*) 在 Cd 浓度为  $0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  水体中单独暴露 14 d 或经过 15 d 的水体与饵料同时暴露后, 其肝脏中 Cd 浓度与比例均最高。

除螺鳃中 Cd 浓度在水相暴露高于食物相外, 其他3个组织均是从食物摄入高于水体, 但鳃组织所占螺整体的比重极小, 而胃肠道、肝胰腺与足肌所占螺体比重达 80% 以上, 可见食物 Cd 的摄取对方斑东风螺的重要性, 原因可能是 Cd 在饵料牡蛎中以有机结合态存在, 螺摄入后易经消化系统吸收, 而水体中 Cd 主以无机水合态离子存在, 与除螺鳃外其他表皮细胞接触后不易被吸收进入血淋巴; Wang 和 Ke<sup>[15]</sup>用放射性同位素示踪技术也得出摄食是波部东风螺(*Babylonia formosae*) 与小塔织纹螺(*Nassarius teretiusculus*) 蓄积 Cd 的主要途径; 但 Blackmore<sup>[16]</sup>报道疣荔枝螺(*Thais clavigera*) 对污染饵料藤壶或贻贝的摄食量高于同种的无污染饵料, 但 56 d 后个体间 Cd 浓度无显著性差异, 从而摄食不是该螺蓄积 Cd 的主要途径; 可见不同腹足类吸收与同化 Cd 的途径存在差异。

### 3.2 螺组织中 MT 的表达

本研究中螺不同组织 MT 诱导表达量不同, 可能与其不同组织中 MT 执行不同的生理功能也有关, 如 Dallinger 等<sup>[17]</sup>报道陆生蜗牛(*Helix pomatia*) 中肠腺 MT 几乎只含 Cd、Zn 和 Cu 含量甚微, 外套膜 MT 却主要结合 Cu, 表明中肠腺 MT 基本功能是 Cd 解毒, 而外套膜 MT 则主要参与血蓝蛋白生物合成中的 Cu 调节作用。而螺肝胰腺中随着 Cd 的蓄积, MT 浓度也逐渐增加, 与较多动物相似, 与该类蛋白结合是螺解除毒性的重要途径<sup>[2]</sup>。但2种途径相比, 食物相组的螺肝胰腺 MT 表达量低于水相途径, 但 Cd 的蓄积更高, 内脏团亚细胞组分 MTLP 中 Cd

的百分比也更高; Dang 和 Wang<sup>[18]</sup>也报道花身鱼在水相与食物相 Cd 暴露处理后, 亚细胞分布分析发现其肝脏中 MT 结合 11% ~ 41% 的 Cd, 而 MTLP 结合超过 57% 的 Cd; 本研究中螺对食物相 Cd 暴露的响应可能与花身鱼相似, 即除 MT 外, 还有其他类金属硫蛋白担负着 Cd 的螯合。另外, MT 除了参与细胞内 Cd 的螯合解毒外, 在机体抗氧化方面也有重要的作用, 如在哺乳动物中, MT 能够清除因 Cd 暴露胁迫而产生的自由基, 以修复细胞损伤<sup>[19]</sup>; 实验中水相暴露时螺肝胰腺中 MT 浓度较高, 可能也与其中更强的氧化胁迫反应有关。

### 3.3 2种暴露途径对螺毒性差异

实验中未观察到螺的死亡现象, 2个处理组螺的终末壳长、体质量间均无明显差异, 可见不同暴露方式对螺的存活与生长未造成显著影响。但一些生化水平指标比监测重金属压力的常规指标具有更高敏感性, 如脂质过氧化(LPO)终产物丙二醛(MDA)常被用以监测 Cd 对生物体的氧化胁迫状态<sup>[20]</sup>。本研究水相组螺的肝胰腺 MDA 含量第10天即较对照组显著上升, 且始终高于同期的食物相组 MDA 水平, 因此水相 Cd 暴露对螺肝胰腺造成的氧化损伤高于食物相。Company 等<sup>[20]</sup>也报道深海热液喷口的贻贝(*Bathymofolius azoricus*) 当暴露于  $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  水体 Cd 时, 鳃组织出现显著的脂质过氧化, 但当暴露于食物相  $90 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$  的 Cd 时, 则无脂质过氧化作用产生, 这表明相对水体 Cd 来说, 食物相 Cd 毒性较低。因此, 水相组较高的毒性可能是溶解态 Cd 经螺鳃及表皮吸收后直接进入螺血淋巴, 不先经肝胰腺生物转化, 故毒性较明显; 且 Cd 被转运至各器官组织后, 部分被固定下来, 不能全部到达肝胰腺; 而经螺胃肠道吸收的 Cd 可迅速通过门静脉进入肝胰腺, 先经不同程度化后才进入血淋巴, 这种作用机制可能与高等动物相似<sup>[19]</sup>。

亚细胞分布研究是基于重金属对生物体的毒性由蓄积于体内金属含量及在亚细胞水平分布决定的<sup>[21]</sup>, 即进入生物体内的重金属在亚细胞水平上与5个组分结合, 其中 MRG、细胞碎片、细胞器是细胞不可溶组分, HSP、MTLP 是细胞可溶组分; 同时细胞器与 HSP 又是金属敏感组分, MTLP 与 MRG 是金属解毒组分, 而细胞器、HSP 与 MTLP 是能够沿着食物链传递给摄食者组分, 因此 Cd 的亚细胞分布研究有助于深入理解其在生物体细胞积累的具体位置与毒性<sup>[13]</sup>。从 Cd 在螺内脏团亚细胞组分中的分布来



看,水相暴露 30 d 后,金属敏感组分细胞器与 HSP 中 Cd 的结合百分比均有所上升,两者之和由对照组的 19.4% 增加至 23.1%;而食物相组只有细胞器中 Cd 的百分比小幅上升(0.4%),可见水相组与金属敏感组分结合比例较食物相组高,而金属脱毒组分 MTLP 中 Cd 的百分比则是水相组(18.4%) 低于食物相组(20.1%),因此水相组螺肝胰脏细胞受损伤程度相对更大。

净化后 2 种途径螺内脏团不可溶组分中 Cd 的百分比暴露结束时均提高,水相组、食物相组分别由 76.4%、75.3% 升至 80.8%、78.9%,表明 Cd 可能从其生物活性位点转移到生物脱毒位点,因此螺对残留于体内 Cd 的解毒形式主要是与 MRG、细胞碎片组分整合蓄积于体内,这与 Pan 和 Wang<sup>[22]</sup> 报道华贵栉孔扇贝(*Chlamys nobilis*) 对 2 种暴露途径吸收的 Cd 在体内去毒方式相似。而 Choi 等<sup>[23]</sup> 报道南极帽贝(*Laternula elliptica*) 在水体 Cd  $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  暴露 14 d 后鳃中蓄积的 Cd 主要与细胞不可溶组分结合,而消化腺细胞中可溶胞液与不可溶颗粒结合的 Cd 相当,因此两组织采取的 Cd 解毒策略不同,导致不同物种及同一物种不同组织在亚细胞水平去毒机制上的差异。

#### 3.4 净化期螺各组织 Cd 排出率差异

本实验中螺经 15 d 净化后,各组织 Cd 排出率不同,水相暴露后高低顺序为:鳃(78.43%)、胃肠道(19.41%)、足肌(16.67%)、肝胰脏(2.35%),食物相则为:鳃(47.66%)、足肌(40.00%)、胃肠道(34.21%)、肝胰脏(15.37%);可看出螺组织在 Cd 暴露时吸收越快,净化时排出率也更高,如暴露结束时水相组螺鳃中 Cd 浓度是食物相组的 5.74 倍,净化后水相组螺鳃的排出率(78.43%) 远高于食物相组(47.66%);其余 3 组织中蓄积的 Cd 浓度均是食物相组较高,相应的净化时排出率也更高;同时也说明食物相 Cd 在螺净化时易排出体外,而水相 Cd 则更容易蓄积在螺体内,且水相组螺除鳃外各组织的排出率低于相关报道,如王凡等<sup>[24]</sup> 报道染毒 18 d 栉孔扇贝(*C. farreri*) 放入清洁海水中,11 d 净化后,其鳃、肌肉和内脏团中 Cd 的排出率分别为 65.41%、66.18% 和 38.11%;尤其是水相暴露后进入净化期第 8 天时,螺的肝胰脏中 Cd 浓度不但没有降低,反而较暴露结束时上升 4.71%,这说明短期净化过程中,其他组织的 Cd 通过再分配进入肝胰脏,这与 Koyama 等<sup>[14]</sup> 报道的乌贼在水体 Cd 浓度为  $0.2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  中暴露 14 d 后移入

清洁海水中净化时,肝脏中 Cd 浓度在净化第 4 天时反而较暴露结束时高相似。这种较低的排出率可归因于 Cd 诱导螺体产生了大量的 Cd-MT 复合物,使 Cd 被贮存在螺体内,从而增加了营养传递时 Cd 的生物可利用性,因此 Cd 在腹足类体内的高度蓄积必须引起人们的重视,尤其是在螺类等海鲜食物深受人们喜爱的沿海地区<sup>[25]</sup>。

通讯作者简介:柯才焯(1962—),男,博士,教授,主要研究方向为贝类学与贝类养殖技术,海洋生态毒理学,海洋贝类遗传育种技术,海洋底栖无脊椎动物幼体生物学等,发表论文 70 余篇。

#### 参考文献:

- [1] 范文宏,段勇,林爽,等. 水体沉积物结合态镉对大型溞(*Daphnia magna*) 的生物毒性研究[J]. 生态毒理学报,2009,4(4): 544-551  
Fan W H, Duan Y, Lin S, et al. The biotoxicity of cadmium associated with fresh-water sediment to the *Daphnia magna* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(4): 544-551 (in Chinese)
- [2] 张高川,张春华,葛滢. 镉胁迫下蚯蚓金属硫蛋白氧化修饰的研究[J]. 生态毒理学报,2010,5(4): 558-562  
Zhang G C, Zhang C H, Ge Y. Oxidative modification of metallothionein in earthworm under Cd stress [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2010, 5(4): 558-562 (in Chinese)
- [3] Wang W X, Fisher N S. Delineating metal accumulation pathways for marine invertebrates [J]. *Science of the Total Environment*, 1999, 237-238: 459-472
- [4] Baudrimont M, Andres S, Durrieu G, et al. The key role of metallothioneins in the bivalve *Corbicula fluminea* during the depuration phase after in situ exposure to Cd and Zn [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 63(2): 89-102
- [5] Xu Y, Wang W X. Exposure and potential food chain transfer factor of Cd, Se and Zn in marine fish *Lutjanus argentimaculatus* [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 238: 173-186
- [6] Seebaugh D R, Daisuke G, Wallace W G. Bioenhancement of cadmium transfer along a multi-level food chain [J]. *Marine Environmental Research*, 2005, 59(5): 473-491
- [7] Pierron F, Baudrimont M, Lucia M, et al. Cadmium uptake by the European eel: Trophic transfer in field and experimental investigations [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2008, 70(1): 10-19



- [8] Ng T Y T, Wood C M. Trophic transfer and dietary toxicity of Cd from the oligochaete to the rainbow trout [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 87(1): 47-59
- [9] Rainbow P S. Biomonitoring of heavy metal availability in the marine environment [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 31(4-12): 183-192
- [10] Kang S G, Choi M S, Oh I S, et al. Assessment of metal pollution in Onsan Bay, Korea using Asian periwinkle *Littorina brevicula* as a biomonitor [J]. *Science of the Total Environment*, 1999, 234(1-3): 127-137
- [11] Daka E R, Oweisana I I, Braide S A. Accumulation of heavy metals from single and mixed metal solutions by the gastropod mollusc *Tympanotonus fuscatus* linnaeus from a Niger Delta estuary: Implications for biomonitoring [J]. *African Journal of Biotechnology*, 2006, 5(20): 1954-1962
- [12] David L E, Brain F T. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1982, 66(1): 134-142
- [13] Wallace W G, Lee B G, Luoma S N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in two bivalves. I. Significance of metal-sensitive fractions (MSF) and biologically detoxified metal (BDM) [J]. *Marine Ecology Progress Series*, 2003, 249: 183-197
- [14] Koyama J, Nanamori N, Segawa S. Bioaccumulation of waterborne and dietary cadmium by oval squid, *Sepioteuthis iessoniana*, and its distribution among organs [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2000, 40(11): 961-967
- [15] Wang W X, Ke C H. Dominance of dietary intake of cadmium and zinc by two marine predatory gastropods [J]. *Aquatic Toxicology*, 2002, 56(3): 153-165
- [16] Blackmore G. Field evidence of metal transfer from invertebrate prey to an intertidal predator, *Thais clavigera* (Gastropoda: Muricidae) [J]. *Estuarine, Coastal and Shelf Science*, 2000, 51(2): 127-139
- [17] Dallinger R, Berger B, Hunziker P, et al. Structure and Function of Metallothionein Isoforms in Terrestrial Snails [M]. Klaassen C D. *Metallothionein IV*. Basel: Birkhauser Verlag, 1999: 173-178
- [18] Dang F, Wang W X. Assessment of tissue-specific accumulation and effects of cadmium in a marine fish fed contaminated commercially produced diet [J]. *Aquatic Toxicology*, 2009, 95(3): 248-255
- [19] 印木泉. 遗传毒理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 55-70
- [20] Company R, Serafim A, Bebianno M J, et al. Effect of cadmium, copper and mercury on antioxidant activities and lipid peroxidation in the gills of the hydrothermal vent mussel *Bathymodiolus azoricus* [J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58(2-5): 377-381
- [21] Wang W X, Rainbow P S. Subcellular partitioning and the prediction of cadmium toxicity to aquatic organisms [J]. *Environmental Chemistry*, 2006, 3(6): 395-399
- [22] Pan K, Wang W X. The subcellular fate of cadmium and zinc in the scallop *Chlamys nobilis* during waterborne and dietary metal exposure [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 90(4): 253-260
- [23] 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 Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2007, 145(2): 227-235
- [24] 王凡, 赵元凤, 吴益春, 等. 栉孔扇贝对 Cd 的累积和排出 [J]. *湛江海洋大学学报*, 2005, 25(4): 95-98
- [25] 王文雄, 潘进芬. 重金属在海洋食物链中的传递 [J]. *生态学报*, 2004, 24(3): 599-604
- Wang W X, Pan J F. The transfer of metals in marine food chains: A review [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 2004, 24(3): 599-604 (in Chinese) ◆