

重金属铜、镉对鲫肝脏基因表达的影响

刘迪秋¹, 葛锋¹, 陈朝银¹, 李忠², 梁宏伟², 邹桂伟²

(1. 昆明理工大学 生命科学与技术学院, 云南 昆明 650224; 2. 中国水产科学研究院 长江水产研究所, 湖北 荆州 434000)

摘要: 采用半定量 RT-PCR 分析重金属 Cu、Cd 在不同剂量以及不同处理时间下对鲫(*Carassius auratus*)肝脏组织基因表达的影响。共检测了过氧化氢酶、热激蛋白、金属硫蛋白等 17 个逆境胁迫相关基因。9 个 Cu 处理中, *GST α*、*GST π*、*CAT* 在鲫肝脏中诱导表达, 其余基因的表达特性属于中间型, 即在一些处理中表达上调, 另一些处理中表达下调。Cd 处理中, 只有 *GST α* 属于完全的诱导表达型基因。*HSP30*、*GR* 以及 *GPx 4a* 在 Cd 胁迫的鲫肝脏中表达受抑制, 其余基因的表达属于中间型。虽然 Cu、Cd 胁迫对各基因转录水平的影响不尽相同, 多数处理中 Cu 诱导基因表达的程度略高于 Cd。实验结果还显示, 本研究设置的 Cu、Cd 处理剂量以及处理时间与鲫肝脏基因的表达变化之间没有明显的相关性。逆境胁迫相关基因在 Cu、Cd 处理鲫的肝脏中表达水平变化多样。本研究旨在深入研究鱼类基因表达与重金属解毒分子机制间的关系以及重金属毒理奠定了基础。[中国水产科学, 2010, 17(6): 1243–1249]

关键词: 鲫; 肝脏; 基因表达; RT-PCR; 铜; 镉

中图分类号: S94

文献标识码: A

文章编号: 1005–8737–(2010)06–1243–07

重金属是一类危害严重的水体污染物, 可对淡水渔业的发展带来毁灭性的影响。重金属污染问题已经受到人们的广泛关注, 关于各种重金属对鱼类的毒性研究国内外报道较多^[1]。在众多的重金属元素中, Cu、Zn、Fe、Mn 为必需元素, 其他如 Hg、Pb、Cd 等元素为非必需元素。无论是必需元素还是非必需元素均对水生生物有一定毒性, 尤其是鱼类的早期发育阶段对重金属污染最为敏感^[2]。

水体环境的重金属污染给水生生物的生存带来了极大的威胁。Cu 作为鱼类必需的微量元素之一以及水产养殖中的常用药物, 过量时会损伤鱼类的神经生理功能, 破坏嗅觉器官的结构以及内分泌等^[3]。Cd 的毒性表现有以下几方面: 干扰必需金属元素如 Zn、Fe 的运输和代谢, 进而干扰金属酶所调控的许多生物化学过程^[4]; 具有突变和

致癌效应^[5–6], 诱导脂质过氧化以及 DNA 断裂^[7]; 破坏有机体的代谢, 导致组织机能障碍和器官损伤^[8]。鱼类的肝脏和胰脏对重金属有较强的富集和解毒作用, 肝脏组织可诱导产生大量束缚重金属的金属硫蛋白(Metallothionein, MT)^[9]。此外, 一些参与解毒的抗氧化酶类, 如超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathion peroxidase, GPx)、谷胱甘肽 S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST)等也在重金属胁迫的鱼类肝脏中增强表达^[10–11]。

鲫(*Carassius auratus*)属于鲤科(Cyprinidae)鱼类, 是中国主要的淡水经济鱼类之一。鲫生活在水体底层, 属于典型的杂食鱼类, 摄食能力强, 消化系统发达, 内脏组织如肝脏、肠等富集重金属的含量高^[12–13]。研究重金属污染过程中鱼类肝脏基因的表达特性, 有助于深入认识鱼类在受到

收稿日期: 2009–11–19; 修订日期: 2010–01–06.

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划项目(2006BAD01A1205); 现代农业产业技术体系建设专项资金资助(NYCYTX-49).

作者简介: 刘迪秋(1979–), 女, 博士, 副教授, 研究方向为分子生物学. E-mail: diqiuliu@gmail.com

通讯作者: 邹桂伟, 研究员. E-mail: zougw@yfi.ac.cn

重金属胁迫时产生的分子应激反应以及解毒机理。作为国家大宗淡水鱼类养殖对象之一, 鲫生长快、性成熟时间短, 是研究大宗鱼类的优良模式的代表品种。为此, 本研究以鲫为实验对象, 分析重金属 Cu 和 Cd 胁迫下 17 个逆境相关基因在肝脏中的表达特性, 为研究其他大宗淡水鱼类建立良好技术平台。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验所用鲫来自中国水产科学研究院长江水产研究所, 体质量 20~30 g, 体长 8.2~11.7 cm。在充分曝气的自来水中驯养 1 周后供实验用。实验用自来水水温 16~18℃、pH 6.8~7.2, 总硬度(以碳酸钙计)为 122~130 mg/L。

1.2 重金属处理

将分析纯 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 用去离子水配制成 1 g/L 的母液。按照国家渔业水质标准中铜浓度 ≤ 0.01 mg/L 以及镉的浓度 ≤ 0.005 mg/L, 重金属 Cu 和 Cd 分别设置了 3 个浓度梯度。Cu 的质量浓度梯度分别 0.1 mg/L、1 mg/L、5 mg/L (依次为国家渔业水质标准允许浓度的 10 倍、100 倍、500 倍); Cd 处理的质量浓度梯度分别为 0.05 mg/L、0.5 mg/L、2.5 mg/L (依次为国家渔业水质标准允许浓度的 10 倍、100 倍、500 倍)。每个处理梯度又分为 3 个处理时间, 即分别处理 12 h、24 h、36 h。处理容器为塑料大盆, 10 L 充分曝气的自来水中放养 5 尾健康的鲫用于 1 个处理。处理期间, 每 24 h 换水 1 次, 使用小功率增氧机增氧。处理过程中观察鲫的生长情况, 未出现鲫死亡的处理最终用于取样。采集每个处理中 5 尾鲫的肝脏并等量混合, 不同处理的混合肝脏组织置于不同的取样袋中, 液氮速冻后置于 -80°C 保存。

1.3 RNA 提取

各处理鲫肝脏组织 RNA 的提取按照 Trizol 总 RNA 提取试剂盒(Invitrogen, 美国)操作指南进行。提取的总 RNA 先用适量无 RNase 的 ddH₂O

溶解, 然后依次用 Tris 平衡酚和氯仿抽提, 最后用 3 mol/L 醋酸钠和无水乙醇沉淀 RNA。

1.4 半定量 RT-PCR

用于半定量 RT-PCR 分析的鲫肝脏 RNA 样品共有 19 个, 包括 Cu 处理 9 个、Cd 处理 9 个(分别为 3 个处理浓度和 3 个处理时间的组合)以及 1 个对照(5 尾自来水驯养的鲫, 取等量肝脏组织混合后提取总 RNA)。各样品总 RNA 经 DNase (Promega, 美国)处理后, 用紫外分光光度仪测定其浓度。cDNA 第一链合成所用逆转录酶为 M-MLV Reverse Transcriptase (M-MLV RT, Promega)。取各样品总 RNA 3 μg , 加入 50 ng Oligo (dT) 15 primer (promega), 用无 RNase 的 ddH₂O 补足至 15 μL 。70℃变性 5 min, 立即置于冰上, 冰浴 10 min 之后依次加入 5 μL M-MLV 5 $\times$ reaction buffer, 1.25 μL dNTP (10 mmol/L), 40 U RNasin[®] Ribonuclease Inhibitor (Promega), 200 U M-MLV RT (Promega), 加入适量无 RNase 的 ddH₂O 至反应体系为 25 μL 。将上述混合物混匀, 42℃反应 1.5 h, 最后 70℃加热 5 min 使逆转录酶失活。再加入 75 μL TE buffer, 将第一链 cDNA 稀释 4 倍, 置于 -20°C 保存。

RT-PCR 共检测了 17 个基因的表达特性, 各基因的引物序列以及来源见表 1。取 1 μL 第一链 cDNA 为 PCR 反应的模板, PCR 参数为: 95℃ 3 min; 94℃ 30 s, 60℃ 30 s, 72℃ 30 s, 32 个循环; 72℃ 5 min。PCR 反应体系(20 μL)如下: 14.7 μL ddH₂O, 1 μL 第一链 cDNA, 基因特异引物(5 $\mu\text{mol/L}$)各 0.1 μL , 2 μL 10 $\times$ Taq buffer, 1.5 μL MgCl₂ (25 mmol/L), 0.4 μL dNTP (10 mmol/L each), 0.2 μL Taq DNA Polymerase (5 U/ μL , MBI Fermentas, 立陶宛)。PCR 结束之后, 取 6 μL 产物在 1.5%TAE 琼脂糖凝胶中进行电泳, 分析扩增产物的有无以及片段大小是否正确。以一对扩增肌动蛋白(β actin)基因的引物进行平行 PCR 反应。用凝胶成像系统(Bio-rad, 美国)的软件分析 PCR 条带的光密度值, 各处理中基因的相对表达水平为相应处理基因的光密度值与 β -actin 光密度值的比值。

2 结果与分析

Cu 和 Cd 是 2 种常见的重金属污染物,也是主要的渔业水体污染物之一。鲫肝脏是重金属富集和解毒的主要场所,重金属胁迫过程中鲫肝脏基因表达的动态变化与重金属对鲫的毒害以及鲫对重金属的解毒机制密切相关。为此本研究采用半定量 RT-PCR 分析 17 个逆境胁迫相关基因在 Cu 和 Cd 分别处理的鲫肝脏中的表达变化。各基

因的相对表达水平见表 2 及图 1 至图 5。根据各基因的表达特性,将 17 个基因的表达划分为 3 种类型,诱导型、抑制型和中间型。在 Cu、Cd 的所有处理中,诱导型基因的表达量始终高于对照,而抑制型基因的表达量始终低于对照,中间型基因的表达量则有的处理高于对照,有的处理低于对照。整体上,本研究设置的 Cu、Cd 剂量以及处理时间与鲫肝脏基因的表达变化之间没有明显的相关性。

表 1 RT-PCR 检测的基因以及引物序列
Tab. 1 Genes and primer sequences used for RT-PCR

基因登录号 Accession number	基因 Gene	引物序列 Primer sequence	产物长度/bp Length of product
EF139093.1	<i>Catalase</i> (CAT)	Forward:5'GGTATTCTGATGGCTTCCGTC 3' Reverse:5'CATTTGGAGATGGCATTGTAAAGGT3'	205
DQ517445.1	<i>cytochrome P450 1A</i> (CYP 1A)	Forward:5'GCTGTTACTTCTGATTCTGGTTCG3' Reverse:5'CACATGCAGACTCTTGGTTATGAG3'	166
EF116921.1	<i>glutathione peroxidase 4a</i> (GPx 4a)	Forward: 5'CCAAGTTCCTCATTGACCGTGAA3' Reverse: 5'ACCATCATAAGTCCATAAGAGGACA3'	209
DQ983598.1	<i>glutathione peroxidase</i> (GPx)	Forward: 5'AGTGACGACTCCGTGTCTTGAT3' Reverse: 5'AGGAGAATGCCAGGTTTATTTG3'	210
EF139092.1	<i>glutathione reductase</i> (GR)	Forward: 5'ACATCCATCATCATACGGCAAGG3' Reverse: 5'AATAGCCCAGAGCAGACAGTCCA3'	240
EU527005.1	<i>glutathione S-transferase rho (GST ρ)</i>	Forward: 5'TGATGCTGTACTGGTGCTCTGGT3' Reverse: 5'ACGATTTCGTTACGACGATGTC3'	198
EU183359.1	<i>glutathione S-transferase theta (GST θ)</i>	Forward: 5'ACAACATCCAGTTCGACCACAAG3' Reverse: 5'AGGTACAGCATGATCGCAACAC3'	151
EU183358.1	<i>glutathione S-transferase pi (GST π)</i>	Forward: 5'CCTGGTCCTGTATCAGTCCAATG3' Reverse: 5'TGTTTGGGCAGATCTTTGCAGT3'	198
EU182590.1	<i>glutathione S-transferase alpha (GST α)</i>	Forward: 5'CGTGCTGACGTTTCATCTTCTCG3' Reverse: 5'TCATCTAATGCGTTTGCTGTGG3'	237
AY165048.1	<i>metallothionein B(MT-B)</i>	Forward: 5'GCCTCTGGATGCGTGTGTAAG3' Reverse: 5'GTTAAGACTTGAGAACAGGAGCCAT3'	180
AB092839.1	<i>HSP70</i>	Forward: 5'GAAGCACTGGTCTTTCCAAGTCATC3' Reverse: 5'CAGGAAGTGTGATAACTGCATTTGT3'	182
DQ872653.2	<i>HSP60</i>	Forward: 5'GGATGCTTACCTGCTTCTGAGTGAG3' Reverse: 5'GACTGCAACGACCTGAAGTCC3'	181
AB239443.1	<i>HSP27</i>	Forward: 5'TCCTGTCTGTCTCCTGAGGGTGT3' Reverse: 5'ATGTCATAGTGCTTCAGGGGTTTC3'	150
DQ872652.2	<i>HSP47</i>	Forward: 5'GCTGACCATCCCTTCATCTTCCT3' Reverse: 5'CCACACAGACTCATTAACCAGGTAC3'	154
AB177389.1	<i>HSP30</i>	Forward :5'AGTGAGAAGAAGCAGGAGGATGG3' Reverse: 5'CGTTGTCTTCACAGTTTGACAGTC3'	210
DQ872650.1	<i>HSP90</i>	Forward: 5'CCAAACACAACGATGACGAGCA3' Reverse: 5'GGAGTGTTCCTTGACCACTTCCTTC3'	179
AY487806.2	<i>14-3-3</i>	Forward: 5'AACCAGGGTGATGAAGCGGAT 3' Reverse: 5'GTAGGTCAGGTACAATTTCATGCTGC 3'	182
AB039726.2	<i>beta actin</i>	Forward: 5'CCATGCAGTAGGATTCAAACGA3' Reverse: 5'TGTGAGGGCAGAGTGGTAGACG3'	209

表 2 Cu、Cd 胁迫过程中 7 个基因在鲫肝脏组织中的相对表达水平
Tab. 2 Relative expression levels of seven genes in liver of *C. auratus* exposed to Cu and Cd

基因 Gene	0.1 mg/L Cu			1 mg/L Cu			5 mg/L Cu			0.05 mg/L Cd			0.5 mg/L Cd			2.5 mg/L Cd			对照 Control
	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	12h	24h	36h	
<i>GPx</i>	0.67	0.99	0.64	1.20	0.72	0.97	1.07	1.33	0.61	0.52	0.75	0.73	0.50	1.15	0.38	0.61	0.80	0.56	1.11
<i>GPx 4a</i>	0.28	0.46	0.24	0.34	0.59	0.56	0.78	0.60	0.43	0.46	0.35	0.41	0.28	0.50	0.46	0.39	0.41	0.20	0.62
<i>GST ρ</i>	0.43	0.72	0.86	0.93	1.81	1.38	1.96	1.40	0.43	0.24	0.83	0.41	0.29	1.09	1.73	0.61	1.18	0.76	0.45
<i>HSP 27</i>	0.10	0.20	0.18	0.28	0.34	0.39	0.13	0.54	0.33	0.24	0.26	0.29	0.24	0.37	0.24	0.34	0.22	0.17	0.32
<i>HSP 47</i>	0.47	0.72	0.43	0.42	0.68	0.56	1.76	1.80	0.50	0.40	0.32	0.41	0.34	0.53	0.54	0.80	1.31	0.32	0.56
<i>HSP 60</i>	0.38	0.93	0.40	0.50	0.59	0.74	0.80	1.11	0.41	0.26	0.39	0.36	0.27	0.42	0.40	0.27	0.49	0.36	0.42
<i>HSP 90</i>	1.33	1.28	0.78	1.46	0.85	1.42	0.38	1.14	0.55	0.79	0.81	1.20	0.64	1.38	1.06	0.64	0.68	0.47	0.90

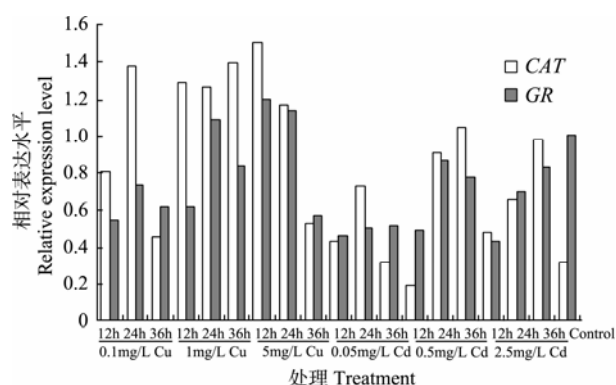


图 1 鲫肝脏组织中 *CAT* 以及 *GR* 在 Cu、Cd 处理过程中的表达水平

Fig. 1 Expression of *CAT* and *GR* mRNA in liver tissue of *C. auratus* exposed to Cu and Cd

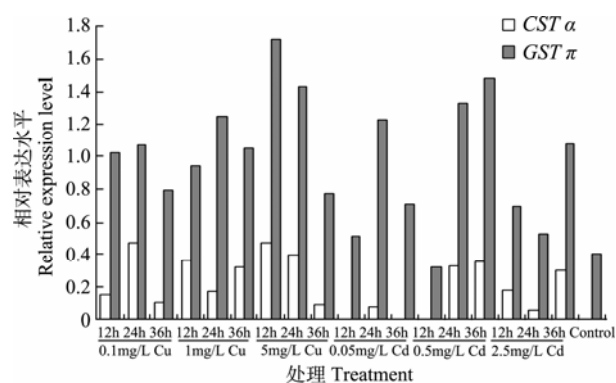


图 2 鲫肝脏组织中 *GST alpha* 以及 *GST pi* 在 Cu、Cd 处理过程中的表达水平

Fig. 2 Expression of *GST alpha* and *GST pi* mRNA in liver tissue of *C. auratus* exposed to Cu and Cd

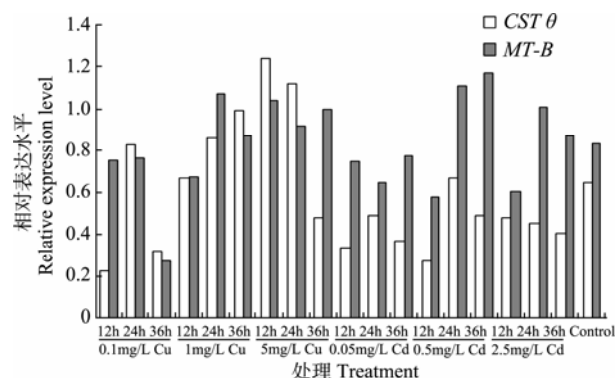


图 3 鲫肝脏组织中 *GST theta* 以及 *MT-B* 在 Cu、Cd 处理过程中的表达水平

Fig. 3 Expression of *GST alpha* and *MT-B* mRNA in liver tissue of *C. auratus* exposed to Cu and Cd

在 Cu 处理的鲫肝脏中, *GST alpha*、*GST pi* 以及过氧化物酶(catalase, *CAT*)基因的表达属于诱导型。*GPx*、*GPx 4a*、谷胱甘肽还原酶(glutathione re-

ductase, *GR*)基因、*GST rho*、*GST theta*、热激蛋白 27(heat shock protein 27, *HSP 27*)基因、*HSP 30*、*HSP 47*、*HSP 60*、*HSP 70*、*HSP 90*、细胞色素 P450 1A (cytochrome P450 1A, *CYP 1A*)基因、金属硫蛋白 B (metallothionein B, *MT-B*)基因、*14-3-3* 等 14 个基因在 Cu 胁迫的鲫肝组织中表达类型属于中间型。这些基因在不同浓度和不同时间的处理中表达不尽一致, 有些处理基因表达增强, 有些处理基因表达受抑制。而 17 个逆境胁迫相关基因中, 没有一个基因的表达在 9 个 Cu 处理中均受抑制。

在 Cd 处理的鲫肝脏中, 只有 *GST alpha* 属于完全的诱导表达型基因。与 Cu 胁迫相比, 有更多的基因在 Cd 胁迫的鲫肝脏中表达受抑制。其中, *HSP 30*、*GR* 以及 *GPx 4a* 的表达属于完全的抑制型, Cd 处理的鲫肝脏组织中两者的表达明显下降。*CAT*、

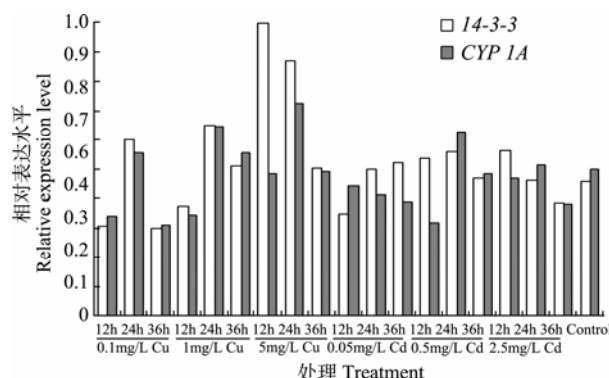


图 4 鲫肝脏组织中 *14-3-3* 以及 *CYP 1A* 在 Cu、Cd 处理过程中的表达水平

Fig. 4 Expression of *14-3-3* and *CYP 1A* mRNA in liver tissue of *C. auratus* exposed to Cu and Cd

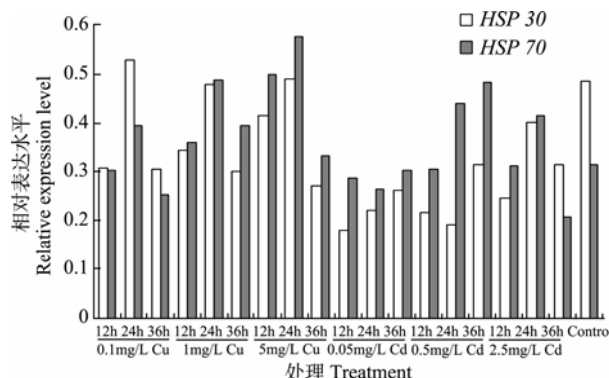


图 5 鲫肝脏组织中 *HSP 30* 以及 *HSP 70* 在 Cu、Cd 处理过程中的表达水平

Fig. 5 Expression of *HSP 30* and *HSP 70* mRNA in liver tissue of *C. auratus* exposed to Cu and Cd

GPx、*GST* θ 、*GST* ρ 、*GST* π 、*HSP* 27、*HSP* 47、*HSP* 60、*HSP* 70、*HSP* 90、*CYP* 1A、*MT-B*、*14-3-3* 在 Cd 胁迫过程中的表达类型属于中间型。

本实验中 *CAT*、*GPx*、*GR*、*GPx* 4a 编码抗氧化酶类中, *CAT* 在 Cu 以及 Cd 胁迫过程中表达上调, 只是在 0.5 mg/L Cd 处理 12 h 的鲫肝脏组织中 *CAT* 的表达量低于对照(图 1)。从表达程度上看, 低剂量以及高剂量 Cu 均强烈诱导 *CAT* 的表达; Cd 的各处理中 *CAT* 的表达强度明显低于 Cu 处理。*GPx*、*GPx* 4a 以及 *GR* 在 Cu 以及 Cd 处理的多数样品中表达下调, 而在少数样品中表达有所上升(表 2、图 1)。*GR* 在 1 mg/L Cu 处理 24 h 以及 5 mg/L Cu 处理 12 h、24 h 的鲫肝脏中表达有适量增加, 而在 Cd 处理的各样品中完全处于表达下调状态。

本研究合成了 4 个鲫 *GSTs* 的特异引物, 这 4 个基因分别编码 *GST* α 、*GST* θ 、*GST* π 、*GST* ρ 。从图 2 可见 *GST* α 在 Cu、Cd 胁迫的鲫肝脏中特异表达, 并且 *GST* α 在 Cu 处理的各样品中均能检测到较强的表达, 而在 0.05 mg/L Cd 处理 12 h、36 h 以及 0.5 mg/L Cd 处理 12 h 的鲫肝脏组织中几乎检测不到 *GST* α 转录水平的表达。*GST* π 以及 *GST* ρ 的表达受 Cu 胁迫的诱导, 表达量明显上调(表 2、图 2)。Cd 胁迫过程中, *GST* π 以及 *GST* ρ 在多数样品中属诱导表达类型, 表达量较对照升高, 而在个别处理中表达受抑制。*GST* θ 的表达受 Cd 胁迫抑制, 在 8 个 Cd 处理中表达水平均不同程度下降, 只在 0.5 mg/L Cd 处理 24 h 时表达量有一定增强(图 3)。

从图 3 可见, 本实验设置的 Cu 和 Cd 处理中 *MT-B* 在肝脏中的表达量与重金属浓度以及胁迫时间的长短无明显相关性。在 1 mg/L、5 mg/L Cu 以及 0.5 mg/L、2.5 mg/L Cd 的多数处理中, *MT-B* 呈现诱导表达特征, 尤其在 0.5 mg/L Cd 处理 24 h、36 h 的鲫肝脏中强烈诱导表达, 其表达量高于内参基因 β -actin 的表达。整体上, 在 Cd 处理的各样品中 *MT-B* 的表达强度略高于在 Cu 处理样品中的表达。*14-3-3* 也是有机体中参与逆境胁迫反应的重要基因之一。重金属 Cu、Cd 处理的 18 个鲫

样品中, *14-3-3* 主要呈诱导表达趋势, 少数样品中表达受轻微的抑制(图 4)。Cu 胁迫诱导 *14-3-3* 表达的强度高于 Cd 对 *14-3-3* 的影响, 在 5 mg/L Cu 处理 12 h 的鲫肝脏组织中, *14-3-3* 的转录水平达到最大。在重金属 Cu 和 Cd 胁迫过程中 *CYP* 1A 表达的动态变化如图 4 所示。18 个处理样品中, *CYP* 1A 的表达普遍受到抑制, 少数样品中表达受诱导, 如在 0.5 mg/L Cd 处理 24 h、5 mg/L Cu 处理 24 h 以及 1 mg/L Cu 处理 24 h 的鲫肝脏组织中, *CYP* 1A 表达急剧增强。

至于 6 个 *HSPs* 的表达特性, 除 *HSP* 30 以外的其他基因均属于中间型。*HSP* 30 在 Cd 胁迫的 9 个处理中表达受强烈抑制, 并且低浓度 Cd 抑制 *HSP* 30 表达的程度远高于高浓度 Cd 对 *HSP* 30 表达的影响(图 5)。0.1 mg/L Cu 处理 24 h 以及 5 mg/L Cu 处理 24 h 的鲫中, *HSP* 30 在肝脏中的表达较对照有轻微的上调, 其余的 Cu 处理中, *HSP* 30 的表达水平均表现一定程度的下调。*HSP* 70 在多数 Cu 处理的鲫肝脏中表达增强, 只是低剂量 Cu 处理 12 h 和 36 h 时 *HSP* 70 表达量低于对照(图 5)。不同浓度以及不同处理时间的 Cd 处理中, *HSP* 70 在少数处理中表达上调, 而在多数处理中表达量略低于对照。*HSP* 27、*HSP* 47、*HSP* 60、*HSP* 90 的表达属于中间型, 前 3 者在 5 mg/L Cu 处理 24 h 转录水平达到最大值, *HSP* 90 在 1 mg/L Cu 处理 12 h 时表达至最大值(表 2)。

3 讨论

除线粒体呼吸作用产生活性氧(Rreactive oxygen species, ROS)以外, 重金属胁迫也会产出活性氧, 并对有机体形成氧化损伤^[14]。内源和外源因素所产生活性氧的解毒依赖一系列抗氧化酶类的作用, 从而保护机体内的蛋白、脂类以及核酸等生物大分子不受损伤。本研究中, *CAT* 在转录水平的表达明显受 Cu 和 Cd 处理的诱导, 而 *GPx*、*GPx* 4a 以及 *GR* 的表达明显受抑制。*CAT* 活跃的表达特性暗示其可能是 Cu、Cd 胁迫过程中鲫肝脏表达的重要抗氧化酶基因。

GSTs 是一类通过催化疏水以及亲电子化合物与还原型谷胱甘肽结合从而解除有毒化合物对有机体毒害的酶家族,同时也是一种抗氧化胁迫的酶类。根据其生物化学、免疫以及结构特性,哺乳动物胞质 GSTs 划分为 6 大类,即 α 、 μ 、 κ 、 θ 、 π 、 ω 、 ζ ^[15-16]。本研究的结果(表 2、图 2、图 3)表明,Cu、Cd 胁迫过程中多种 GSTs 在鲫的肝脏中表达活跃。转录水平上,GST α 、GST ρ 、GST π 、GST θ 在不同剂量以及不同时间的 Cu、Cd 处理中表达类型各不相同,但是重金属 Cu 能更高强度地诱导各 GSTs 在鲫肝脏中表达。每种 GST 由单基因或基因家族编码,同种 GSTs 的成员间序列相似性大于 60%,然而 GSTs 种内成员间的底物特异性相差很大^[17]。各 GSTs 的表达特性暗示鲫 GSTs 对 Cu 的亲合力可能高于对 Cd 的亲合力。GSTs 在鲫对重金属解毒机制中的功能还需要进一步深入研究,可以肯定的是 GSTs 基因家族的成员在鲫应对重金属胁迫的过程中起重要作用。

水生生物的生活环境容易受到重金属以及其他一些有毒化合物的污染。为了应对重金属的毒害,包括鱼在内的动物进化产生了多种保护机制,MTs 在解毒器官肝脏中的大量表达及其与重金属离子的作用即是机制之一。MTs 是可溶性小分子胞质蛋白,含有较多半胱氨酸残基,因此能选择性结合 Cd、Cu、Zn 等金属离子。MTs 参与维持必需金属元素 Cu 和 Zn 在体内的平衡,具有胞内抗氧化作用、对非必需金属元素 Cd 等的解毒作用以及提高机体内的必需金属元素含量^[18]。不论实验室的研究还是室外调查研究都显示 MTs 蛋白含量在重金属胁迫的水生生物中显著提高,肝脏中 MTs 的高含量也表明肝脏在鱼类对重金属代谢和解毒方面的重要性。在本研究设置的重金属处理中,MT-B 在鲫肝脏中的表达量与 Cd、Cu 的浓度以及胁迫时间的长短无明显相关性。周彦锋等分别用 0.005 mg/L、0.05 mg/L、0.1 mg/L、0.25 mg/L 和 0.5 mg/L Cd 处理鲫,12 h 之内鲫鳃丝、肌肉、肝脏、肾脏组织中 MT 含量的增加量与 Cd 的质量浓度呈正相关,12 h 之后则不相关^[19]。由此可见重金属 Cd、Cu 对鲫体内 MTs 的诱导主要

发生在处理的早期(12 h 前)。

当生物体遭遇冻害、高温、过量 CO₂、重金属、化学药品等胁迫因子时会合成一系列抗逆相关蛋白,这些蛋白以及相应基因可以作为生物化学标记以检测有机体是否处于不利环境。水生生物遭遇重金属污染的生物标记分子主要是 HSPs、抗氧化酶类以及 MTs 等^[20-22]。目前,已从多个鱼类中克隆了编码 MTs、HSPs、GSTs 的基因序列,据此可设计 PCR 的特异引物以分析不同重金属胁迫过程中各标记基因的表达水平。然而,基因在蛋白水平与 mRNA 水平的表达并不总是表现正相关,在环境研究中同时对各标记基因进行转录和蛋白水平的检测显得尤为重要。此外,重金属作用浓度以及作用时间也会影响生物标记物的基因和蛋白表达水平,环境监测过程中应同时分析多个标记物基因的表达变化,方能得到准确可靠的结果。本研究采用半定量 RT-PCR 初步分析了鲫分别受重金属 Cu、Cd 胁迫过程中一些逆境胁迫相关基因在肝脏中的表达变化,为后期深入研究大宗淡水鱼类基因表达与重金属解毒分子机制间的关系以及重金属毒理奠定了基础。

参考文献:

- [1] 徐永江,柳学周,马爱军. 重金属对鱼类毒性效应及其分子机理的研究概况[J]. 海洋科学, 2004, 28(10): 67-70.
- [2] 蔡文超,区义君. 重金属离子铜对鱼类早期发育阶段的毒性[J]. 南方水产, 2009, 5(5): 75-79.
- [3] 刘福军,张饮江,王明学. 铜对鱼类慢性毒性研究进展[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 302-307.
- [4] Wright D A, Welbourn P M. Cadmium in the aquatic environment: a review of ecological, physiological, and toxicological effects on biota[J]. Environ Rev, 1994, 2: 187-214.
- [5] Mandel R, Ryser H J-P. Mutagenicity of cadmium in *Salmonella typhimurium* and its synergism with two nitrosamines[J]. Mutat Res, 1984, 138: 9-16.
- [6] Degraeve N. Carcinogenic, teratogenic and mutagenic effects of cadmium[J]. Mutat Res, 1981, 86: 115-135.
- [7] Ochi T, Ohsawa M. Induction of 6-thioguanine-resistant mutants and single strand scission of DNA by cadmium chloride in cultured Chinese hamster cells[J]. Mutat Res, 1983, 111: 69-78.
- [8] Jones I, Kille P, Sweeney G. Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development[J]. J Fish Biol, 2001, 59: 1015-1022.

- [9] Filipović V, Raspor B. Metallothionein and metal levels in cytosol of liver, kidney and brain in relation to growth parameters of *Mullus surmuletus* and *Liza aurata* from the Eastern Adriatic Sea[J]. Water Res, 2003, 37(13): 3253–3262.
- [10] Lenartova V, Holovska K, Pedrajas J R, et al. Antioxidant and detoxifying fish enzymes as biomarkers of river pollution[J]. Biomarkers, 1997, 2(4):247–252.
- [11] Hamed R R, Farid N M, Elowa S E, et al. Glutathione related enzyme levels of freshwater fish as bioindicators of pollution[J]. Environmentalist, 2003, 23(4): 313–322.
- [12] 周新文, 朱国念, 孙锦荷. 重金属离子相互作用对 Cu 在鲫鱼组织中积累的影响[J]. 浙江大学学报, 2002, 28(4): 427–430.
- [13] 贺亮, 范必威. 铜在鱼体中的积累规律研究[J]. 广东微量元素科学, 2007, 14(4): 16–19.
- [14] Hansen B H, Rømma S, Garmo Ø A, et al. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during water-borne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*) [J]. Chemosphere, 2007, 67(11): 2241–2249.
- [15] Board P G, Coggan M, Chelvanayagam G, et al. Identification, characterization, and crystal structure of the Omega class glutathione transferases [J]. J Biol Chem, 2000, 275(32): 24798–24806.
- [16] Hayes J D, Flanagan J U, Jowsey I R. Glutathione transferases [J]. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005, 45: 51–88.
- [17] Suzuki T, Takagi Y, Osanai H, et al. Pi-class glutathione S-transferase genes are regulated by Nrf2 through an evolutionarily conserved regulatory element in zebrafish [J]. Biochem J, 2005, 388(Pt 1): 65–73.
- [18] Knapen D, Reynders H, Bervoets L, et al. Metallothionein gene and protein expression as a biomarker for metal pollution in natural gudgeon populations [J]. Aquat Toxicol, 2007, 82(3): 163–172.
- [19] 周彦锋, 陈家长, 杨光, 等. 重金属镉胁迫下鲫鱼不同组织中金属硫蛋白的动态变化[J]. 安全与环境学报, 2008, 8(3): 18–21.
- [20] 沈骅, 王晓蓉, 张景飞. 应用应激蛋白 HSP70 作为生物标志物研究锌、铜及其联合毒性对鲫鱼肝脏的影响[J]. 环境科学学报, 2004, 24(5): 895–899.
- [21] Woo S, Yum S, Park H S, et al. Effects of heavy metals on antioxidants and stress-responsive gene expression in Japanese medaka (*Oryzias javanicus*) [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 2009, 149(3): 289–299.
- [22] George S, Gubbins M, MacIntosh A, et al. A comparison of pollutant biomarker responses with transcriptional responses in European flounders (*Platichthys flesus*) subjected to estuarine pollution [J]. Mar Environ Res, 2004, 58(2-5): 571–575.

Effects of heavy metals Cu and Cd on gene expression in liver tissue of *Carassius auratus*

LIU Diqiu¹, GE Feng¹, CHEN Chaoyin¹, LI Zhong², LIANG Hongwei², ZOU Guiwei²

(1. College of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Y Kunming 650224, China; 2. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fisheries Science, Jingzhou 434000, China)

Abstract: In this study the semi-quantitative RT-PCR was applied to detect gene expression in liver tissue of *Carassius auratus* after exposure to Cu²⁺ or Cd²⁺ with different dose for 12 h, 24 h, and 36 h, respectively. Totally 17 stress-related genes were used to analyze the gene expression during stress of the two heavy metals including the catalase, metallothionein, heat shock protein genes, and so on. *GST α*, *GST π* and *CAT* were upregulated in liver of *C. auratus* throughout the experiments of Cu²⁺ stress, and the expression of the other genes belonged to the middle type which meant that those genes were induced in some assays of heavy-metal stress but depressed in the other assays. *GST α* was the only one induced by exposure to Cd²⁺. In contrast, mRNA abundance of *HSP 30*, *GR*, and *GPx 4a* were decreased evidently in liver tissue of *C. auratus* exposed to Cd²⁺, and the expression of the other 13 genes fell into the middle type. Although exposure to Cu²⁺ and Cd²⁺ had diverse effects on the transcription level of the 17 genes, Cu²⁺ induced higher gene expression than Cd²⁺ did. There was no evident dose-dependent or time-dependent responses of these stress-related genes in liver of *C. auratus* following exposure to Cu²⁺ and Cd²⁺. The expression levels of stress-related genes greatly varied in liver of *C. auratus* treatment with Cu²⁺ or Cd²⁺, and the results of present study is helpful for further understanding the relationship between gene expression of fish and molecular mechanism of heavy metal detoxification. [Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(6): 1243–1249]

Key words: *Carassius auratus*; liver; gene expression; RT-PCR; Cu; Cd

Corresponding author: ZOU Guiwei. E-mail: zougw@yfi.ac.cn