

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16187

锌对海湾扇贝中镉累积和亚细胞分布的影响

翟明丽^{1,2}, 赵艳芳², 翟毓秀^{1,2}, 尚德荣², 盛晓风², 丁海燕²

1. 南京农业大学 无锡渔业学院, 江苏 无锡 214081;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 农业部水产品质量安全检测与评价重点实验室, 山东 青岛 266071

摘要: 采用室内模拟混合暴露方式, 研究了在镉(Cd)质量浓度一定(0.05 mg/L)的条件下, 添加不同质量浓度(0 mg/L、0.1 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L)的锌(Zn)对海湾扇贝整体、组织及亚细胞水平 Cd 累积和分布的影响。结果表明, Zn 能显著抑制扇贝全贝对 Cd 的富集, 并且这种抑制作用随暴露时间的延长和 Zn 浓度的升高而增强。在扇贝不同组织中 Zn 对 Cd 的富集均具有抑制作用, 其中以鳃最为明显。在亚细胞水平, 扇贝各组织累积的 Cd 主要分布在类金属硫蛋白(MTLT)和细胞碎片(CD)组分。在内脏各亚细胞组分中, Zn 对 Cd 的抑制作用显著, 且 Zn 的加入使 CD 中的 Cd 百分比从 32%下降到 21%~27%, 而 MTLT 中的 Cd 百分比从 57%增加到 59%~67%。鳃组织中 Zn 对 Cd 百分比的影响更加明显, CD 中 Cd 百分比从 36%下降到 14%~17%, MTLT 中 Cd 百分比从 59%增加到 76%~79%; 而性腺中 MTLT 和细胞器(ORG)组分中 Cd 百分比受 Zn 浓度影响较为明显, 随着 Zn 浓度的升高, MTLT 中 Cd 百分比下降, 而 ORG 中 Cd 百分比升高; 肌肉组织中 Cd 含量及百分比分布在亚细胞水平没有明显规律。

关键词: 镉; 锌; 混合暴露; 亚细胞; 海湾扇贝

中图分类号: S968

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0165-08

镉(Cd)是一种毒性很强的重金属污染物, 具有持续时间长、隐藏性、不可逆等特点, 极易在水生生物体中累积, 以滤食性贝类尤为明显。众多研究发现, 扇贝具有特异性富集 Cd 的特性, 即使在无 Cd 污染的环境中也能在体内积累很高浓度的 Cd, 但对其他元素如铅、锌、铜等则没有这种高累积的现象^[1]。Cd 在扇贝中的特异性富集为扇贝养殖及其食用安全带来了严重影响, 因此探究扇贝对 Cd 的吸收、富集、转运、分布及其解毒机理, 揭示扇贝对 Cd 的特异性富集机制成为近年来研究的热点。目前国内有关于 Cd 毒性机理的研究观点, 但均普遍认为是 Cd 影响了机体内锌、铜、钙等必需金属元素的正常生理活动, 如 Cd²⁺可以与 Zn²⁺一起通过 Ca²⁺通道吸收转运^[2-3], Cd 对金属结合蛋白的硫醇基团具有更高的亲和性, 可以从中置换出 Ca²⁺和 Zn²⁺, 从而

抑制其活动^[4-5]。由于锌(Zn)与 Cd 的离子半径相近, 化学性质相似, 在对生物体的毒性作用中, Zn 与 Cd 间的相互作用最为明显^[6], 且因生物种类、暴露浓度、组织器官的不同而表现为协同或拮抗作用^[7]。由此, 研究必需元素 Zn 对扇贝 Cd 累积的影响对进一步探究扇贝特异性 Cd 富集机理具有重要意义。

细胞区域化是生物体耐受和积累重金属的重要机制, 金属进入细胞后会进一步分布到各个亚细胞组分中, 与不同组分结合所表现的毒性反应也会不同。因此从亚细胞水平能更加深入地解释扇贝高 Cd 积累机理。目前已有关于 Zn、Cd 在扇贝亚细胞水平分布的研究, 如有研究者发现扇贝在单一金属暴露下, Zn 和 Cd 均会与不可溶组分(细胞器、金属富含颗粒、细胞碎片)结合, 但两者在扇贝中的主要存储组分和在各亚细胞组分间的

收稿日期: 2016-06-15; 修订日期: 2016-07-04.

基金项目: 国家自然科学基金项目(41206101).

作者简介: 翟明丽(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为水产品安全与质量控制. E-mail: 1548152661@qq.com

通信作者: 翟毓秀, 研究员. E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn

重新分配存在差异^[8], 而对于扇贝在 Zn、Cd 混合暴露下 Zn 对 Cd 亚细胞分布的影响还未见报道。本研究拟以海湾扇贝(*Argopecten irradians*)为研究对象, 采用 Zn、Cd 混合暴露方式, 分别从全贝、组织和亚细胞水平, 研究 Zn 对扇贝吸收、累积 Cd 的影响, 以期为揭示扇贝特异性富集 Cd 的机理提供理论依据, 同时为扇贝养殖的污染评估、食用的安全评价和海洋重金属污染监控提供重要参考。

1 材料与方法

1.1 实验贝来源与驯养

海湾扇贝采自青岛市黄岛区贝类养殖场, 随机选取壳长 6~8 cm, 重量 50~60 g 的健康扇贝, 在水温[(16±1)℃]、盐度(32±1)、pH (8±0.2)的过滤海水中暂养 3 d, 暂养期间不投喂, 保证 24 h 持续充气, 每天定时换水并及时清除死亡的扇贝。

1.2 实验方法

1.2.1 实验设计 实验设置 1 个空白对照组和 4 个 Zn 处理组, 据文献报道^[9], Cd 对海湾扇贝的安全浓度为 0.0345 mg/L, 结合预实验结果本研究采用 0.05 mg/L Cd 浓度进行实验暴露, 4 个 Zn 处理组 Cd 浓度一定, Zn 质量浓度依次为 0 mg/L(无锌对照组)、0.1 mg/L(低锌浓度组)、0.5 mg/L(中锌浓度组)、1 mg/L(高锌浓度组)。每组设置 3 个重复, 每个重复放养 45 只扇贝。实验期为 7 d, 暴露期间不投喂。

暂养结束后, 挑选健康状况良好的扇贝随机分组, 置于装有 15 L 海水的塑料水族箱(60 cm×40 cm×15 cm)中进行暴露实验。实验用水为盐度(32±1)、pH (8±0.2)的过滤海水, 保证 24 h 持续充气、水温恒定[(16±1)℃], 每天定时换水、投毒。Zn、Cd 分别由 ZnSO₄·7H₂O 和 CdCl₂·2.5H₂O 配制成 1 g/L 母液按比例稀释后投入到暴露水体中平衡一夜。

1.2.2 样品制备 分别在暴露的第 1、3、5、7 天, 每个平行组随机取 8 只扇贝清洗干净, 3 只去壳、匀浆用于全贝分析, 5 只解剖出内脏、鳃、性腺、肌肉四部分匀浆用于组织及亚细胞分析, 匀浆样品冷冻在-80℃冰箱以供分析备用。

1.2.3 亚细胞组分分离 称取 0.5 g 各组织样品

于 10 mL 离心管中, 加 8 mL 缓冲液(0.02 mol/L Tris, 0.01 mol/L NaCl, 0.1 mmol/L PMSF, 0.1 mmol/L DTT, pH=8.6)研磨匀浆, 采用 Wallace 等^[10]建立的差速离心法提取各亚细胞组分: 匀浆液在 4℃ 1450 g 离心 15 min 得到上清液 S 和沉淀物 P; 上清液 S 继续在 4℃ 100000 g 离心 1 h, 得到上清液 S₁ 和沉淀物 P₁(细胞器, organelles, ORG); 上清液 S₁ 经过 80℃ 热处理后冰水冷却, 于 4℃ 50000 g 离心, 得到上清液 S₂(类金属硫蛋白, metallothionein-like protein, MTLP) 和沉淀物 P₂(热敏感蛋白, heat-sensitive protein, HSP); 沉淀物 P 加入 8 mL NaOH (1 mol/L) 80℃ 消化 10 min, 5000 g 离心 10 min 得到上清液 S₃(细胞碎片, cellular debris, CD) 和沉淀物 P₃(富含金属颗粒, metal-rich granules, MRG)。由以上过程得到实验所需的 5 种亚细胞组分。

1.2.4 测定方法 将样品解冻, 称取 5 g 样品于 100 mL 消化管中, 加入 10 mL 浓硝酸, 2.5 mL 高氯酸, 在控温消化炉消化至澄清透明, 冷却后用二次蒸馏水定容到 100 mL, 用于全贝及各组织中 Cd 含量的测定。分离出的 5 种亚细胞组分加酸消解、定容用于亚细胞组分 Cd 分析。

Cd 含量测定采用电感耦合等离子体质谱法 (ICP-MS)^[11]。由该方法得到的标准曲线线性良好, 相关系数>0.9995, 检出限为 0.001 mg/kg。为检验和保证测定的准确性, 采用国家标准物质中心扇贝成分分析标准物质 GBW10024[(1.06±0.10) mg/kg] 进行分析质量控制。

1.2.5 数据统计 结果用平均值±标准差($\bar{x} \pm SD$) 表示, 采用 SigmaPlot 12.5 作图、SPSS 20.0 统计分析软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA) 及 Duncan 多重比较分析, 以 $P<0.05$ 作为差异显著水平。

2 结果与分析

2.1 混合暴露下扇贝全贝 Cd 含量及其变化

混合暴露过程中扇贝全贝中 Cd 含量变化见表 1。与空白对照组相比, 4 个 Zn 处理组 Cd 含量均随暴露时间而增加, 其中以无锌组最为显著。从暴露第 3 天开始, 不同 Zn 处理组中扇贝累积的

表1 Zn 和 Cd 联合暴露下扇贝全贝中 Cd 含量

Tab. 1 The contents of cadmium in the whole scallop under mixed exposure of Zn and Cd

 $n=3; \bar{x} \pm SD; mg \cdot kg^{-1}$

组别 group	暴露天数 exposure days			
	1	3	5	7
空白组 control group	0.82±0.11 ^b	0.86±0.07 ^c	0.83±0.03 ^d	0.85±0.09 ^c
无锌组 zinc free group	2.15±0.15 ^a	3.92±0.07 ^a	6.86±0.09 ^a	10.19±0.32 ^a
低锌组 low zinc group	2.25±0.01 ^a	2.97±0.19 ^b	3.92±0.20 ^b	5.18±0.13 ^b
中锌组 middle zinc group	2.29±0.25 ^a	2.79±0.04 ^b	3.28±0.04 ^c	4.40±0.04 ^c
高锌组 high zinc group	2.42±0.10 ^a	2.77±0.19 ^b	3.18±0.06 ^c	3.61±0.07 ^d

注: 同一列中不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)。Note: Values in the same column with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

Cd 随 Zn 暴露浓度的升高而减少, 且随暴露时间延长, 不同组之间 Cd 含量差异达到显著水平 ($P<0.05$)。暴露第 1 天, 4 个暴露组扇贝中的 Cd 含量差异不显著, 但均显著高于空白组; 暴露 3 天后, 低、中、高锌组 Cd 含量差异不显著, 而均显著低于无锌组; 到第 5 天, 低锌组 Cd 含量与中、高锌组间出现差异; 至第 7 天暴露结束时, 各暴露组间 Cd 含量均差异显著。因此, Zn 能显著抑

制扇贝对 Cd 的吸收, 且 Zn 对 Cd 的抑制作用会随暴露时间的延长和 Zn 浓度的升高而增强。

2.2 混合暴露下扇贝不同组织 Cd 含量变化

由表 2 可以看出, 混合暴露条件下, 扇贝各组织中内脏累积的 Cd 含量最高, 其次为鳃和性腺, 肌肉中含量较低。在内脏组织中, 经过 1 d 的混合暴露, 各组 Cd 含量差异显著, 表现为无锌组>空白组>低锌组>中锌组>高锌组, 3 个 Zn 浓度

表2 Zn 和 Cd 联合暴露下扇贝各组织 Cd 含量变化

Tab. 2 Change of cadmium contents in different tissues of scallop under mixed exposure of Zn and Cd

 $n=3; \bar{x} \pm SD; mg \cdot kg^{-1}$

组织 tissue	暴露天数 exposure days	组别 group				
		空白组 control group	无锌组 zinc free group	低锌组 low zinc group	中锌组 middle zinc group	高锌组 high zinc group
内脏 viscera	1	9.05±0.15 ^b	10.35±0.30 ^a	7.69±0.17 ^c	6.80±0.50 ^d	5.33±0.11 ^c
	3	8.76±0.20 ^b	11.20±0.30 ^a	8.53±0.20 ^b	6.82±0.16 ^c	6.33±0.42 ^c
	5	8.73±0.22 ^b	13.72±0.03 ^a	8.79±0.31 ^b	8.34±0.51 ^b	6.56±0.33 ^c
	7	8.40±0.43 ^c	17.07±0.24 ^a	10.61±0.46 ^b	8.70±0.05 ^c	7.12±0.22 ^d
鳃 gill	1	0.52±0.05 ^c	1.58±0.03 ^a	0.61±0.04 ^b	0.42±0.05 ^d	0.33±0.04 ^e
	3	0.32±0.09 ^d	4.24±0.24 ^a	1.28±0.15 ^b	0.59±0.09 ^{cd}	0.85±0.12 ^c
	5	0.52±0.11 ^c	5.12±0.12 ^a	1.31±0.08 ^b	0.69±0.12 ^c	0.96±0.07 ^{bc}
	7	0.37±0.04 ^c	11.56±0.73 ^a	1.35±0.14 ^b	0.85±0.16 ^{bc}	1.08±0.20 ^b
性腺 gonad	1	0.24±0.03 ^{bc}	0.48±0.04 ^a	0.18±0.08 ^c	0.23±0.05 ^{bc}	0.29±0.03 ^b
	3	0.26±0.05 ^c	0.58±0.02 ^a	0.45±0.05 ^b	0.46±0.01 ^b	0.43±0.06 ^b
	5	0.35±0.06 ^c	1.02±0.05 ^a	0.86±0.04 ^b	0.39±0.04 ^c	0.31±0.06 ^c
	7	0.31±0.04 ^d	1.25±0.12 ^a	0.99±0.09 ^b	0.62±0.08 ^c	0.66±0.11 ^c
肌肉 muscle	1	0.16±0.03 ^{ab}	0.21±0.04 ^a	0.12±0.03 ^b	0.17±0.03 ^{ab}	0.14±0.04 ^b
	3	0.09±0.02 ^c	0.33±0.07 ^a	0.18±0.04 ^{bc}	0.27±0.07 ^{ab}	0.16±0.06 ^c
	5	0.12±0.01 ^b	0.30±0.02 ^a	0.15±0.01 ^b	0.12±0.03 ^b	0.11±0.04 ^b
	7	0.06±0.02 ^d	0.30±0.05 ^a	0.23±0.03 ^b	0.16±0.04 ^c	0.13±0.02 ^c

注: 同一行中不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)。Note: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

组中 Cd 含量与 Zn 的暴露浓度呈负相关。随着暴露时间的延长, 各 Zn 处理组 Cd 累积量不断升高, 至 7 天暴露结束, 无锌组显著高于低锌组, 而中锌组与空白组差异不显著, 高锌组 Cd 含量最低。由此表明, Zn 的加入抑制了内脏对 Cd 的吸收, 且 Zn 浓度越高, 抑制作用越显著。鳃组织中 Zn 的抑制作用更加明显, 无锌组 Cd 累积量持续升高, 至暴露结束, Cd 含量达 11.56 mg/kg; 而 3 个 Zn 浓度组随暴露时间的延长与空白组 Cd 含量显著性规律不明显。在性腺中, 无锌组与低锌组 Cd 累积量不断增加, 而中、高锌组 Cd 含量变化一致, 在暴露过程中呈现出先上升后下降再上升的趋势。至暴露结束, 无锌组 Cd 含量显著高于低锌组, 中、高锌组差异不显著, 均显著高于空白组。肌肉组织中 Cd 含量显著性规律不明显, 3 个 Zn 浓度

组均呈现先上升后下降再上升的趋势, 且 Cd 累积量高于空白组而低于无锌组。由以上结果可以看出, 在扇贝各组织中 Zn 对 Cd 均表现出抑制作用, 尤以鳃中最为明显。

2.3 混合暴露下扇贝不同组织亚细胞组分 Cd 含量及百分比分布

混合暴露 7 d 后, 扇贝各组织亚细胞组分中 Cd 含量见表 3。在内脏中, Zn 处理组 CD 组分中的 Cd 含量均显著高于空白组, 其中无锌组最高达 12.10 mg/kg, 显著高于低、中、高锌组。各组 MTLF 组分中 Cd 含量均存在显著差异, 表现为无锌组>中锌组>高锌组>低锌组>空白组。而各组 MRG、ORG 和 HSP 组分中的 Cd 含量分布一致, 均为无锌组最高, 其他组差异不显著。由 Cd 分布(图 1a)可知, 空白组扇贝内脏亚细胞组分中 Cd

表 3 扇贝不同组织各亚细胞组分 Cd 含量
Tab. 3 Cadmium contents of each subcellular fraction in scallop's different tissues

$n=3$; $\bar{x} \pm SD$; $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$

组织 tissue	亚细胞组分 subcellular fraction	组别 group				
		空白组 control group	无锌组 zinc free group	低锌组 low zinc group	中锌组 middle zinc group	高锌组 high zinc group
内脏 viscera	CD	4.04±0.74 ^c	12.10±2.4 ^a	6.23±0.72 ^b	6.12±1.12 ^b	6.47±0.37 ^b
	MTLP	9.68±1.29 ^e	21.65±1.90 ^a	13.55±1.50 ^d	19.64±3.30 ^b	16.08±2.10 ^c
	MRG	0.22±0.02 ^b	0.42±0.03 ^a	0.24±0.31 ^b	0.22±0.10 ^b	0.20±0.03 ^b
	ORG	2.40±0.40 ^b	3.21±0.55 ^a	2.36±0.46 ^b	2.62±0.12 ^b	2.57±0.13 ^b
	HSP	0.60±0.10 ^b	0.80±0.23 ^a	0.59±0.06 ^b	0.66±0.03 ^b	0.64±0.04 ^b
鳃 gill	CD	0.19±0.02 ^d	8.47±1.04 ^a	0.76±0.21 ^b	0.31±0.02 ^c	0.31±0.03 ^c
	MTLP	0.42±0.02 ^d	13.87±2.07 ^a	4.22±0.53 ^b	1.70±0.33 ^c	1.42±0.09 ^c
	MRG	0.04±0.02 ^{bc}	0.19±0.03 ^a	0.06±0.01 ^b	0.02±0.01 ^c	0.02±0.00 ^c
	ORG	0.14±0.04 ^{cd}	0.84±0.17 ^a	0.22±0.05 ^b	0.16±0.03 ^{bc}	0.09±0.02 ^d
	HSP	0.04±0.02 ^b	0.21±0.07 ^a	0.05±0.02 ^b	0.04±0.01 ^b	0.02±0.01 ^b
性腺 gonad	CD	0.02±0.01 ^c	0.72±0.11 ^a	0.26±0.04 ^b	0.27±0.05 ^b	0.29±0.03 ^b
	MTLP	0.07±0.02 ^c	0.99±0.32 ^a	0.55±0.14 ^b	0.45±0.10 ^b	0.42±0.17 ^b
	MRG	0.01±0.00 ^b	0.12±0.03 ^a	0.01±0.01 ^b	0.02±0.00 ^b	0.03±0.02 ^b
	ORG	0.04±0.02 ^b	0.12±0.03 ^a	0.09±0.02 ^a	0.10±0.01 ^a	0.04±0.00 ^b
	HSP	0.01±0.00 ^a	0.03±0.01 ^a	0.02±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	0.04±0.01 ^a
肌肉 muscle	CD	0.03±0.02 ^c	0.09±0.03 ^b	0.09±0.00 ^b	0.09±0.01 ^b	0.24±0.07 ^a
	MTLP	0.05±0.02 ^c	0.13±0.04 ^{bc}	0.70±0.10 ^a	0.16±0.03 ^b	0.22±0.03 ^b
	MRG	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.01 ^a
	ORG	0.02±0.01 ^b	0.06±0.01 ^a	0.03±0.01 ^b	0.03±0.00 ^b	0.08±0.02 ^a
	HSP	0.01±0.00 ^a	0.01±0.01 ^a	0.01±0.00 ^a	0.01±0.00 ^a	0.02±0.00 ^a

注: 同一行中不同上标字母表示差异显著($P<0.05$)。

Note: Values in the same row with different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

百分比为 MTL(57%)>CD(24%)> ORG(14%)。对比空白组, 经过单独 Cd 暴露的无锌组 CD 中 Cd 百分比增加(32%), 而 ORG 中 Cd 百分比降低(8%)。当加入不同浓度 Zn 混合暴露后, 低、中、高锌组 CD 中 Cd 百分比有所下降(21%~27%), 但 MTL 中 Cd 百分比相对增加(59%~67%)。

鳃组织中, CD 组分的 Cd 含量在空白组、无锌组、低锌组和中、高锌组间均存在显著差异, 且无锌组 Cd 含量最高, 为 8.47 mg/kg, 空白组最低, 为 0.19 mg/kg。MTL 组分中 Cd 含量分布与 CD 一致, 无锌组(13.87 mg/kg)>低锌组(4.22 mg/kg)>中、高锌组(1.42~1.70 mg/kg)>空白组(0.42 mg/kg)。各组 MRG、ORG 和 HSP 组分中也均表现为无锌

组 Cd 含量显著高于其他组。如图 1b 所示, 鳃组织亚细胞组分 Cd 百分比变化明显, 相较于空白组, 无锌组 CD 和 MTL 组分中 Cd 百分比增加, 而 MRG、ORG 和 HSP 组分 Cd 百分比有所下降。对比无锌组, 加入 Zn 后 CD 中 Cd 百分比下降, MTL 组分中 Cd 百分比升高, 而 MRG、ORG 和 HSP 组分的 Cd 百分比保持稳定。

性腺中 CD 和 MTL 组分的 Cd 含量分布一致, 表现为无锌组>低、中、高锌组>空白组。对于 MRG 组分, 无锌组 Cd 含量最高(0.12 mg/kg), 其他组 Cd 含量范围为 0.01~0.03 mg/kg。而在 ORG 和 HSP 组分中, 各组 Cd 含量显著性规律不明显。在性腺 CD 组分中 Cd 百分比分布表现为无锌组

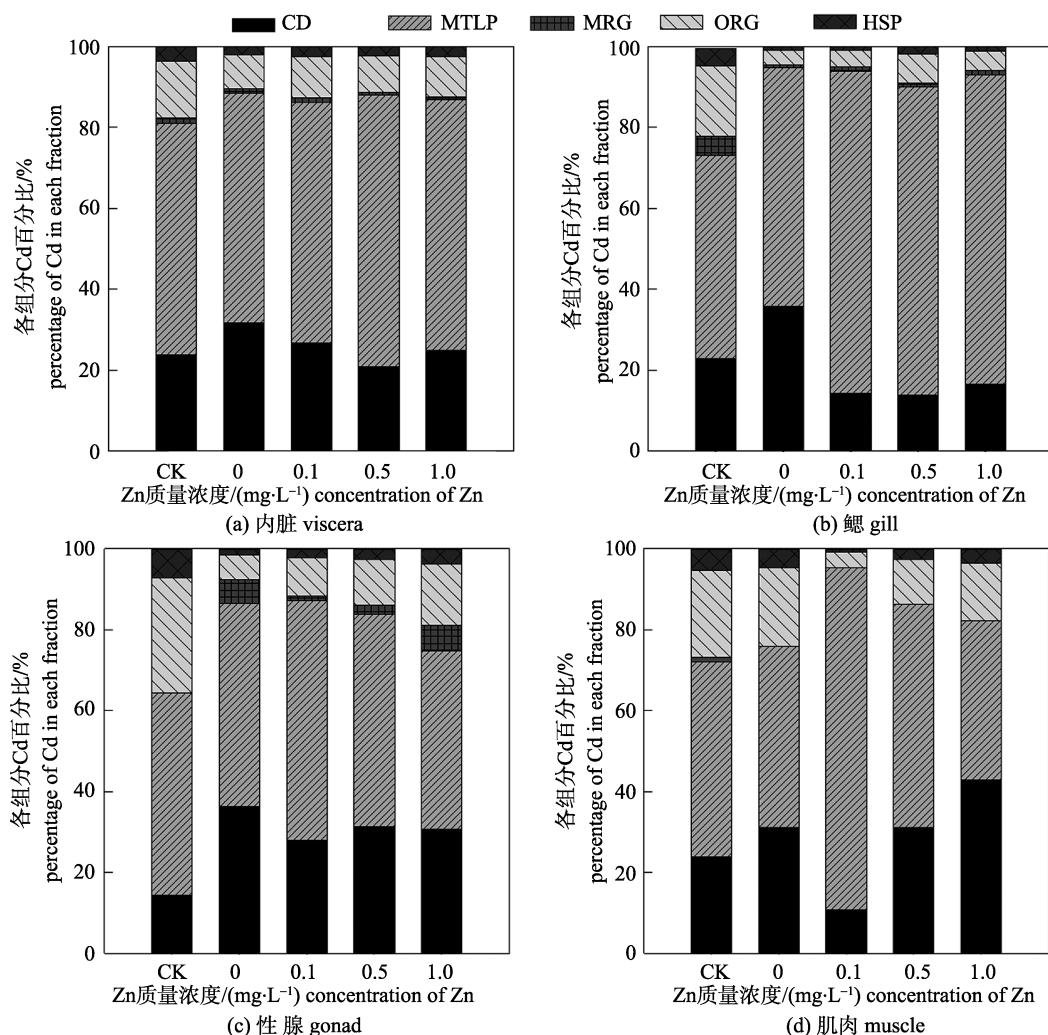


图 1 扇贝不同组织各亚细胞组分 Cd 百分比

CD: 细胞碎片; MTL: 类金属硫蛋白; MRG: 富含金属颗粒; ORG: 细胞器; HSP: 热敏感蛋白.

Fig. 1 Percents of cadmium in each subcellular fraction of different tissues

CD: cellular debris; MTL: metallothionein-like protein; MRG: metal-rich granules; ORG: organelles; HSP: heat-sensitive proteins.

(36%)>低、中、高锌组(28%~31%)>空白组(15%),而 MTLP 和 ORG 组分中 Cd 百分比受 Zn 浓度影响较为明显,随着 Zn 浓度的升高,MTLP 中 Cd 百分比下降,而 ORG 中 Cd 百分比升高(图 1c)。

同组织水平一样,不同 Zn 处理组 Cd 含量及百分比(图 1d)分布在肌肉亚细胞水平没有明显规律。

3 讨论

在自然环境中,生物体大多处于多种金属的联合暴露之中,金属在体内的相互作用错综复杂。梁秋燕等^[12]研究表明 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼 (*Danio rerio*)早期胚胎发育的联合毒性表现为协同或拮抗,主要与染毒剂量和时间相关。曲荣辉等^[13]研究得出在中低剂量 Cd 污染条件下,施加 Zn 可以显著降低水稻对 Cd 的吸收和转运。本研究中扇贝在 Zn、Cd 联合暴露下,Zn 对全贝 Cd 累积表现出明显的抑制作用,且抑制作用随暴露时间的延长和 Zn 浓度的升高而增强;在组织器官水平,在扇贝内脏、鳃、性腺和肌肉中 Zn 对 Cd 均表现出抑制作用,这与已报道的 Zn 能显著抑制 Cd 在罗非鱼肝、鳃和肌肉组织中的累积的研究结果一致^[14]。而张美琴等^[7]研究发现,在 Zn、Cd 混合暴露下,Zn 对 Cd 的作用因组织器官和暴露浓度而异,在中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)鳃组织中,低浓度的 Zn 会促进 Cd 的吸收,高浓度的 Zn 会抑制 Cd 的吸收;在肝胰腺中,Zn 对 Cd 始终表现为协同作用;而在肌肉中则没有明显规律。可见 Zn 对 Cd 的作用效果在不同种生物中表现不同。由于贝类的滤食性特征,通过鳃不断吸收溶解在水中的金属离子然后再运输到机体各个部位是其累积重金属的主要途径,因此当扇贝受到 Zn²⁺、Cd²⁺的双重胁迫时,在鳃中体现最明显。

金属在亚细胞水平的分布直接影响其毒性作用。金属在敏感组分的含量越高,毒性越强;反之,若金属在不敏感组分的含量高,则毒性降低。Kalman 等^[15]研究发现,在 As、Cu、Zn 三种金属混合暴露下浅沟蛤(*Scrobicularia plana*)的主要金属存储部位是 MTLP、MRG 和 CD 组分。本研究结果显示,在不同 Zn 浓度联合暴露下,扇贝各组织亚细胞组分中的 Cd 含量及其百分比有所改变,但总体分布相同,均表现为在 MTLP 中分布最多,其次为 CD、ORG,而在 HSP 和 MRG 中分布较少。

金属硫蛋白是一种富含半胱氨酸的金属结合蛋白,其巯基有很强的金属螯合能力,在调节机体必需元素如 Zn²⁺、Cu²⁺的动态平衡过程中发挥着重要作用,而对有毒金属元素则有抑制和解毒的作用^[16~17]。大量的研究表明,MTLP 是生物体主要的 Cd 存储部位^[8, 19, 21]。Daisuke 等^[18]研究发现,暴露 Zn 浓度的升高减少了 Cd 在多毛实蝇(*Capitella capitata*) MTLP 组分中的累积,认为 MTLP 在 Zn、Cd 间的相互作用中发挥着重要作用。从本研究结果可以看出,在扇贝内脏、鳃和性腺中,Zn 对 Cd 在 MTLP 组分的累积均表现出明显的抑制作用,且在内脏和鳃中 Zn 的加入能够提高 MTLP 组分的 Cd 百分比。Cd、Zn 之间的相互作用主要取决于它们与 MTLP 结合的能力和它们诱导 MTLP 合成的能力,由于 Zn 的加入,诱导合成的 MTLP 增加并与 Zn 形成络合物,而 Cd 与 MTLP 的结合能力比 Zn 强,因此 Cd 可以替换 Zn,得到更多的结合位点和贮存空间。柴茜等^[19]研究表明,MTLP 和 MRG 是 Cd 在河南华溪蟹(*Sinopotamon henanense*) 鳃中蓄积的重要场所,且高浓度的 Zn 能促进 Cd 在 MRG 中的累积。而本研究中扇贝各组织 MRG 组分的 Cd 累积量较少,这与 Sophie 等^[20]对淡水双壳类 *Pyganodon grandis* 的研究结果不同。MRG 是金属结合形态的物质,属于生物解毒组分,可以通过细胞排泄功能将金属排出体外,这里得出的 Cd 在 MRG 组分分布较少的结果也印证了 Ke 等^[8]关于扇贝对 Cd 低排出的结论。

目前,普遍认为 ORG 和 HSP 属于生物活性组分,是金属敏感组分。其中 ORG 包含线粒体、溶酶体等,而 HSP 主要由一些酶组成。已有关于河南华溪蟹的研究表明,Zn 能降低肝胰腺金属敏感组分的 Cd 含量^[21],但会促进 Cd 在鳃组织金属敏感组分的累积,且随 Zn 浓度的增加,Cd 富集呈先升高后降低的趋势^[19]。本研究中,Zn 对 Cd 在扇贝内脏和鳃金属敏感组分的累积中均表现出明显的抑制作用,但不同 Zn 浓度组间 Cd 累积量差异不显著,且 ORG 和 HSP 组分的 Cd 累积量较低,这也是扇贝具有高耐 Cd 性的重要因素。而在性腺中,随着 Zn 浓度的升高,MTLP 中 Cd 百分比下降,而 ORG 中 Cd 百分比升高,由此看出性腺对 Zn 浓度较为敏感,在混合暴露中容易受到伤害。

由于功能的不确定性,关于 CD 组分的分类

存在争议, 现多将其归于对金属敏感程度中性的存储组分^[22~23]。CD 包括细胞膜、组织碎片及一些功能未知的成分。本研究结果显示, Cd 在扇贝各组织 CD 组分的累积量仅次于 MTLP, 是扇贝第二大存储组分, 且单独 Cd 暴露后, CD 组分的 Cd 百分比升高, 而加入 Zn 后, CD 组分的 Cd 百分比有所下降。Lucu 等^[24]认为 Cd 可以通过与细胞膜作用而改变其流动性。从本研究中 Zn 对 Cd 在 CD 组分的抑制作用推测可能是 Zn²⁺与 Cd²⁺竞争细胞膜上的金属结合位点, 从而在一定程度上能减少扇贝对 Cd 的吸收。从 Cd 存储角度, 有关 CD 的组成及功能还有待进一步的探究。

参考文献:

- [1] Bustamant P, Miramand P. Interspecific and geographical variations of trace element concentrations in Pectinidae from European waters[J]. Chemosphere, 2004, 57: 1355~1362.
- [2] Brzózka M M, Moniuszko-Jakoniuk J. Interactions between cadmium and zinc in the organism[J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39(10): 967~980.
- [3] Wang W X, Fisher N S. Effects of calcium and metabolic inhibitors on trace element uptake in two marine bivalves[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 1998, 236(1): 149~164.
- [4] Baudouin-Cornu P, Labarre J. Regulation of the cadmium stress response through SCF-like ubiquitin ligases: comparison between *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and mammalian cells[J]. Biochimie, 2006, 88: 1673~1685.
- [5] Gagnon E, Hontela A, Jumarie C. Reciprocal inhibition of Cd and Ca uptake in isolated head kidney cells of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Toxicol Vitro, 2007, 21(6): 1077~1086.
- [6] Komjarova L, Blust R. Multimetal interactions between Cd, Cu, Ni, Pb, and Zn uptake from water in the Zebrafish *Danio rerio*[J]. Environ Sci Technol, 2009, 43(19): 7225~7229.
- [7] Zhang M Q, Chen H Q, Wu G H, et al. Interaction of Zn and Cd on uptake and accumulation by crab, *Eriocheir sinensis*[J]. Journal of Fisheries of China, 2010, 34(8): 1270~1276. [张美琴, 陈海仟, 吴光红, 等. 水体中锌与镉在中华绒螯蟹体内吸收蓄积的相互作用[J]. 水产学报, 2010, 34(8): 1270~1276.]
- [8] Ke P, Wang W X. The subcellular fate of cadmium and zinc in the scallop *Chlamys nobilis* during waterborne and dietary metal exposure[J]. Aquat Toxicol, 2008, 90(4): 253~260.
- [9] Li Y H, Lin H. Studies on acute toxicity of cadmium to Bay scallop *Argopecten irradians*[J]. Marine Fisheries Research, 2006, 27(6): 80~83. [李玉环, 林洪. 镉对海湾扇贝的急性毒性研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 80~83.]
- [10] Wallace W G, Luoma S N. Subcellular compartmentalization of Cd and Zn in 2 bivalves. II. The significance of trophically available metal (TAM)[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2003, 257: 125~137.
- [11] SN/T 2208~2008 Determination of sodium, magnesium, aluminium, calcium, chromium, iron, nickel, copper, zinc, arsenic, strontium, molybdenum, cadmium, lead, mercury, selenium in aquatic products-Microwave digestion-ICP/MS method[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008. [SN/T 2208~2008 水产品中钠、镁、铝、钙、铬、铁、镍、铜、锌、砷、锶、钼、铅、汞、硒的测定微波消解-电感耦合等离子体质谱法[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008.]
- [12] Liang Q Y, Xie Y P, Fang Z Q. Individual and joint toxicity of Zn²⁺ and Cd²⁺ during the early embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2012, 19(2): 283~292. [梁秋燕, 谢勇平, 方展强. Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼早期胚胎发育阶段的单一与联合毒性[J]. 中国水产科学, 2012, 19(2): 283~292.]
- [13] Qu R H, Zhang X, Li H L, et al. Effects of zinc level on low dose cadmium transport in rice plant[J]. Chinese Journal of Eco-Agriculture, 2016, 24(4): 517~523. [曲荣辉, 张曦, 李合莲, 等. 不同锌水平对低剂量镉在水稻中迁移能力的影响[J]. 中国生态农业学报, 2016, 24(4): 517~523.]
- [14] Kargin F, Cogun H Y. Metal interactions during accumulation and elimination of zinc and cadmium in tissues of the freshwater fish *Tilapia nilotica*[J]. Bull Environ Contamin Toxicol, 1999, 63(4): 511~519.
- [15] Kalman J, Bonnail-Miguel E, Smith B D, et al. Toxicity and the fractional distribution of trace metals accumulated from contaminated sediments by the clam *Scrobicularia plana* exposed in the laboratory and the field[J]. Sci Total Environ, 2015, 506~507: 109~117.
- [16] Kameo S, Nakai K, Kurokawa N, et al. Metal components analysis of metallothionein-III in the brain sections of metallothionein-I and metallothionein-II null mice exposed to mercury vapor with HPLC/ICP-MS[J]. Anal Bioanal Chem, 2005, 381(8): 1514~1519.
- [17] Leite C M, Botelho A S, Oliveira J R, et al. Immunolocalization of HLA-DR and metallothionein on amalgam tattoos[J]. Brax Dent J, 2004, 15(2): 99~103.
- [18] Daisuke G, William G W. Interaction of Cd and Zn during uptake and loss in the polychaete *Capitella capitata*: Whole body and subcellular perspectives[J]. J Exp Mar Biol Ecol, 2007, 352(1): 65~77.
- [19] Chai X, Li Y J, Jing W X, et al. Effects of zinc exposure on the bioaccumulation of cadmium in the subcellular fractions of freshwater crab *Sinopotamon henanense* gills[J]. 2014, Acta Scientiae Circumstantiae, 34(6): 1628~1634. [柴茜, 李颖君, 井维鑫, 等. 锌对镉在河南华溪蟹鳃组织亚细胞中富集的影响[J]. 环境科学学报, 2014, 34(6): 1628~1634]
- [20] Sophie C, Landis H, Peter G C. Subcellular partitioning of cadmium in the freshwater bivalve, *Pyganodon grandis*, after separate short-term exposures to waterborne or diet-borne metal[J]. Aquat Toxicol, 2010, 100(4): 303~312.
- [21] Li Y J, Wu H, Wei X X, et al. Subcellular distribution of Cd and Zn and MT mRNA expression in the hepatopancreas of *Sinopotamon henanense* after single and co-exposure to Cd and Zn[J]. Comp Biochem Physiol C: Toxicol Pharmacol, 2015, 167: 117~130.
- [22] 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 detoxi-

- fied metal (BDM)[J]. Mar Ecol Prog Ser, 2003, 249: 183–197.
- [23] Daisuke G, William G W. Metal intracellular partitioning as a detoxification mechanism for mummichogs (*Fundulus heteroclitus*) living in metal-polluted salt marshes[J]. Mar Environ Res, 2010, 69(3): 163–171.
- [24] Lucu C, Obersnel V. Cadmium influx across isolated *Carcinus* gill epithelium: interaction of lanthanum and calcium with cadmium influxes[J]. J Comp Physiol B, 1996, 166(3): 184–189.

Effects of zinc on the accumulation and subcellular distribution of cadmium in the bay scallop, *Argopecten irradians*

Zhai Mingli^{1,2}, Zhao Yanfang², Zhai Yuxiu^{1,2}, Shang Derong², Sheng Xiaofeng², Ding Haiyan²

1. Wuxi Fisheries College, Nanjing Agricultural University, Wuxi 214081, China;

2. Key Laboratory of Testing and Evaluation for Aquatic Product Safety and Quality, Ministry of Agriculture; Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: Cadmium is among the most toxic metals in the aquatic environment. Cadmium has unknown biological role and exhibits high toxicity if allowed to accumulate in metabolically-active sites. Many bivalves accumulate high concentrations of cadmium in tissues and organs, particularly scallops, which have a high tolerance to cadmium and accumulate large quantities from the water. Zinc and cadmium often coexist in the aquatic environment and often demonstrate the substitution effect because of their similar chemical properties. Most previous studies have focused on absorption, accumulation, transport, distribution, and detoxification mechanisms in scallops under a single cadmium exposure, but results from mixed-exposure experiments are relatively rare, particularly the effects of zinc exposure on the accumulation and distribution of cadmium in scallop tissues. Because of the potential interaction between essential and non-essential metals, the present study was conducted to investigate the effects of accumulation and distribution of cadmium in bay scallops during short-term exposure to cadmium and zinc. The accumulation and distribution characteristics of cadmium at the whole body, tissue, and subcellular levels of bay scallops, *Argopecten irradians*, exposed to mixed metals of Zn and Cd were investigated under laboratory conditions. The results showed that exposure to different zinc concentrations inhibited bioaccumulation and distribution of cadmium in bay scallops and was time- and concentration-dependent. Bay scallops concentrated cadmium in all soft tissues, and cadmium content increased over the 7-day exposure. The inhibitory effect of zinc was enhanced as zinc concentration was increased. Cadmium concentrations in different tissues after exposure to the two metals were in the order of: viscera > gill > gonad > muscle, and inhibitory effect by zinc occurred in all tissues, particularly in the gill. Subcellular metal partitioning in bivalves has received increasing attention as it provides valuable information on metal toxicity and bioavailability. Here, subcellular cadmium content was examined following differential centrifugation, which divided the tissues into five subcellular fractions, including metallothionein-like proteins (MTLP), cellular debris (CD), metal-rich granules (MRG), organelles (ORG), and heat-sensitive proteins (HSP). The MTLP fraction was the predominant cadmium-binding compartment, suggesting that MTLP plays a key role detoxifying metals in bay scallops. The CD fraction contained the second largest cadmium fraction, whereas the CD fraction mainly contained tissue fragments and cell membranes. We speculate that the inhibitory effect by zinc on cadmium demonstrates competition between Zn^{2+} and Cd^{2+} to bind cell membrane sites. MRG and HSP only played a minor role in cadmium binding. Cadmium content in the metal-sensitive HSP fraction was lower than that in the other subcellular fractions, which may be the reason why scallops have high tolerance to cadmium. Inhibition occurred in all subcellular fractions of the viscera, and the proportion of cadmium in the CD fraction decreased, whereas that in the MTLP fraction increased as zinc was added. Zinc had an antagonistic and protective action on the uptake and toxic effects of cadmium, probably because zinc induces synthesis of MT, which detoxifies cadmium by binding. A similar effect was observed in the gill. However, the percentages of cadmium in the MTLP and ORG fractions of the gonad were affected by zinc concentration. The proportion of cadmium in the MTLP fraction decreased as zinc concentration was increased, whereas the proportion of cadmium in the ORG fraction increased. Cadmium content in the subcellular muscle distribution was relatively low. These results provide insight into the toxic effects of cadmium on bay scallops under mixed-metal exposure, but the mechanisms require further study.

Key words: *Argopecten irradians*; cadmium; zinc; mixed exposure; subcellular fraction

Corresponding author: Zhai Yuxiu. E-mail: zhaiyx@ysfri.ac.cn