

Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊幼虫的毒性及对三种生物化学标志物的影响*

王剑南** 许力山 曹传旺***

(东北林业大学林学院, 哈尔滨 150040)

摘要 【目的】为了探讨花翅摇蚊 *Chironomus kiiensis* Tokunaga 对重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫响应。【方法】测定 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊4龄幼虫的急性毒性、联合毒性以及体内3种生物化学标志物(CAT、SOD活性和MT含量)的影响。【结果】花翅摇蚊幼虫暴露于重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及混合离子中表现出典型的中毒症状,且24 h和48 h重金属 Cd^{2+} 致死中浓度 LC_{50} 显著低于 Pb^{2+} 的 LC_{50} 。混合离子 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 的联合毒性随着不同配比和作用时间呈现差异性;24 h $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}=1:1$ 配比表现为部分相加作用, $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}=2:1$ 和 $1:2$ 配比表现为拮抗作用;而作用48 h不同配比联合毒性均为部分相加作用。2种单一和混合重金属 $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}$ 均不同程度对摇蚊体内SOD和CAT产生抑制作用,而暴露于 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及其混合离子作用下MT含量显著高于对照,且随着时间表现为先增加后降低。【结论】重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对摇蚊幼虫具有急性联合毒性,体内抗氧化酶系CAT、SOD及体内MT参与了重金属污染物的胁迫的应答响应,并表现出时间-剂量效应,可作为水体环境监测的生化标志物。

关键词 重金属;花翅摇蚊;联合毒性;生物化学标志物

Toxicity of Cd^{2+} and Pb^{2+} to *Chironomus kiiensis* larvae, and its effects on three biochemical markers

WANG Jian-Nan** XU Li-Shan CAO Chuan-Wang***

(College of Forestry, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China)

Abstract [Objectives] To investigate the effects of heavy metal exposure on *Chironomus kiiensis* larvae. [Methods] The toxicity of Cd^{2+} , Pb^{2+} and Cd-Pb ions, to 4th instar *C. kiiensis* larvae, and on three biochemical markers (CAT, SOD and MT) were measured. [Results] *C. kiiensis* larvae developed typical toxic symptoms after exposure to Cd^{2+} and Pb^{2+} and their ions. The LC_{50} of Cd^{2+} was significantly lower than that of Pb^{2+} after 24 h and 48 h. The joint toxicity of Cd^{2+} and Pb^{2+} varied with ion ratios and exposure time. The joint toxicity of $1:1$ $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}$ was partially additive whereas $2:1$ and $1:2$ of $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}$ had an antagonistic effect after 24 h. However, the joint toxicity of different ratios of $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}$ was partially additive after 48 h. SOD and CAT activity was inhibited to various degrees by Cd^{2+} and Pb^{2+} . The MT content of larvae exposed to Cd, Pb and mixed ions of these elements, was significantly higher than that of the control, and MT content increased, then decreased, with duration of exposure. [Conclusion] Cd^{2+} and Pb^{2+} are both independently, and jointly, toxic to *C. kiiensis* larvae. The activity of the anti-oxidative enzymes CAT and SOD, and MT content, changed in response to exposure to these heavy metals in a time and dose-dependent manner, which suggests that these could be biochemical markers of water quality.

Key words heavy metal; *Chironomus kiiensis*; acute and joint toxicity; biochemical markers

*资助项目 Supported projects: 国家自然科学基金项目 (31570642)

**第一作者 First author, E-mail: 1442350612@qq.com

***通讯作者 Corresponding author, E-mail: chuanwangcao@nefu.edu.cn

收稿日期 Received: 2018-09-08; 接受日期 Accepted: 2018-11-18

随着电气和电子行业的发展以及工业废水的排放,河流、湖泊等水生环境中普遍存在重金属污染,环境污染中所指的重金属主要包括汞(Hg)、镉(Cd)、铅(Pb)、铬(Cr)和砷(As)等元素(杨国远等,2014)。重金属污染后进入水体不仅对水生态系统造成严重损害,而且间接威胁人类健康。许多外源性化学污染通过产生大量活性氧而诱发生物机体损坏,同时生物体中起重要保护作用的抗氧化酶的活性或含量可能会因污染物的胁迫作用而发生改变(Banerjee *et al.*, 1999)。金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一种有效的自由基清除剂,其清除自由基(-OH)的能力约为超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)的几千倍,而且具有很强的抗氧化活性,MT含量能够指示水体中重金属的污染程度(Arambourou *et al.*, 2013)。有关重金属污染对水生生物影响主要表现在宏观和微观水平上,对其污染监测手段涉及从群落落到分子等各层次的生物标记(Mccarthy and Shugart, 1990; 万斌, 2000),寻找敏感、特异性的生物标记来监测水质污染已成为国内外研究的重点领域(Adams, 2002; Sarkar *et al.*, 2006)。

摇蚊属于昆虫纲(Insecta)、双翅目(Diptera)摇蚊科(Tendipedidea)是一种世界性分布的水生昆虫,全球已知有5000余种,我国记载400种左右(张彤和金洪均,1995)。摇蚊幼虫是一种分布广且种类数量众多的底栖生物,其生物量约占底栖生物总量的70%-80%,在水生食物链中占据重要环节。相比于其他水质监测指示生物,摇蚊幼虫个体小、繁殖快、生活周期短,对环境要求低,且对不同化合物敏感度不同,能够迅速对环境变化作出响应,适合于各种毒性试验,常作为水体环境污染生物监测的重要指示生物(Domingues *et al.*, 2010; Dijkstra *et al.*, 2014; 李修伟等, 2015)。虽然摇蚊分布广泛且种类繁多,但目前国外作为生物指示物的种类主要为 *Chironomus riparius* 和 *Chironomus tentans*。由于这2个种在我国尚未发现或还没有作为生物指示物使用,而花翅摇蚊 *Chironomus*

kiinensis Tokunaga 是我国南方地区优势种,具有很大的应用潜能(刘洪霞等, 2008)。因此本文以 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 为胁迫因子,研究花翅摇蚊4龄幼虫的急性及联合毒性、体内抗氧化酶(SOD和CAT)活性以及MT含量的影响,以期阐明重金属对花翅摇蚊的生化毒性,同时为水环境的生态风险评价提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试昆虫与试剂

CdCl_2 购自天津市光复科技发展有限公司, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 购自天津市巴斯夫化工有限公司,花翅摇蚊初始种群来源于中国农业大学昆虫生理与毒理实验室,饲养于玻璃鱼缸中,置于自然光照、通风良好、20-25℃养虫室内,用曝晒除氯5d以上的自来水养殖,每7d换水一次,并用氧气泵供氧,每次换水投喂5-10g金鱼饲料,采用50目纱网罩住玻璃鱼缸以防止成虫逃逸。

1.2 单一毒性测定

根据化学品-沉积物-水系统中摇蚊毒性试验加标于沉积物法来配制水体中的沉积物(中国检验检疫科学研究院, 2012),模拟外界环境,沉积物配比如下:4%-5%粉末状泥炭(粒度 $\leq 1\text{ mm}$), pH 5.5-6.0; 20%高岭粘土(干重,高岭石含量 $>30\%$); 75%-76%石英砂(以细沙为主,50%以上50-200 μm 石英砂颗粒);加入去离子水,最终混合物的水分含量为30%-50%;加入化学纯碳酸钙 CaCO_3 ,将最终混合物的pH调至7.0-7.5。通过预实验确定致死浓度范围后,将 CdCl_2 用蒸馏水配制1.25、2.5、5、10、20 mmol/L共5个浓度梯度, $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 用蒸馏水配制3.125、6.25、12.5、25、50 mmol/L共5个浓度梯度,并设置蒸馏水为对照,将健壮、大小一致的10头摇蚊4龄幼虫放入盛有30 mL药液的透明玻璃瓶中,每个浓度处理3个重复,室内饲养(20-25℃)自然光照下处理,实验过程中不更新溶液,观察摇蚊的中毒症状,及时挑出死亡虫体,分别于24 h和48 h统计死亡数,用显微镜观察探针触动摇蚊尾部对机械刺激物无反应者视为死亡。

1.3 联合毒性测定

以重金属单一毒性 24 h LC_{50} 为基准, 按等比毒性配比设置浓度梯度。通过预实验确定合适的浓度范围, 采用 1.2 单一毒性生物测定方法, 并用 1975 年 Marking 和 Dawson 联合毒性评价法(毒性单位法)判断联合毒性的作用方式。毒性单位法(TU)的评价公式如下所示:

$$TU = \frac{C_i}{IC_{50i}}$$

其中: C_i 是混合物中 i 组分的浓度, IC_{50i} 是该组分的 IC_{50} 值。对于一个 n 组分来说:

$$M = \sum_{i=1}^n TU_i \frac{C_1}{IC_{501}} + \frac{C_2}{IC_{502}} + \dots + \frac{C_n}{IC_{50n}}$$

$$M_0 = M / (TU_i)_{\max}$$

当 $M < 1$ 时为协同作用; $M = 1$ 为简单相加作用; $M = M_0$ 为独立作用; $M > M_0$ 为拮抗作用; $M_0 > M > 1$ 为部分相加作用。

1.4 SOD、CAT 活性及 MT 含量测定

1.4.1 染毒处理 以 2 种重金属对花翅摇蚊 4 龄幼虫 48 h 亚致死浓度为基准, $CdCl_2$ 用蒸馏水配制 1.79、2.93、6.35 mmol/L 3 个亚致死浓度, $Pb(NO_3)_2$ 用蒸馏水配制 14.27、18.48、27.72 mmol/L 3 个亚致死浓度, 混合离子则按照单一毒力 48 h LC_{50} 为基准, 按等比毒性 1:1、1:2、2:1 配比, 以蒸馏水为空白对照, 并配制水体中的沉积物模拟外界环境, 将健壮、大小、颜色一致的花翅摇蚊 4 龄幼虫放入盛有 1 L 药液的鱼缸中, 每个浓度 3 个重复, 每个重复处理 50 头, 于 6、12、24 和 48 h 从各个浓度中随机挑取活泼的幼虫 20 头, 用蒸馏水润洗后吸水纸吸干, 液氮速冻后置于 $-80^\circ C$ 保存。

1.4.2 SOD 和 CAT 活性测定 随机挑取 5 头经过处理的 4 龄摇蚊幼虫, 加 3 mL 预冷的提取液(0.05 mol/L PBS, 含 1% PVP、0.04% 苯基硫脲和 10 mmol/L EDTA, pH 7.0), 玻璃匀浆器冰浴充分匀浆, 于 $4^\circ C$, 4 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 作为 SOD 和 CAT 的活性测定酶液。SOD 活性测定参照 Beauchamp 和 Fridovich (1971) 方法, 略有改进。3 mL 反应液(含 50 mmol/L PBS

pH 7.8, 13 mmol/L Met, 0.1 mmol/L EDTA, 75 μ mol/L NBT), 加入 25 μ L 粗酶液, 最后加入 0.6 mL 0.5 mmol/L 核黄素, 以不加酶液管作为最大光还原管, 光照培养箱中 $25^\circ C$ 、三级光照下(4 000 lx)处理 15 min 后, 立即避光迅速测定 OD_{560} 值, 以未光照的相同反应管为对照管, 反应 3 次重复, 计算 SOD 活性。SOD 活性($\Delta OD \cdot \min^{-1} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$) = $(A \times N \times 60) / (P \times T \times V \times 50\%)$; A : 表示样品与对照的差值; N : 表示反应总体积(mL); P : 蛋白含量(mg/mL); T : 反应时间(min); V : 反应中加入酶液体积(mL)。

CAT 活性测定参照 Cohen 等(1970)方法。取 0.5-0.6 mL 30% H_2O_2 , 加水至 50 mL, 从中取出 4 mL, 加入 26 mL 0.05 mol/L PBS (pH 7.0), 测定 240 nm 的 OD 值, 如其 OD 值在 0.5-0.55, 即作为过氧化氢酶的底物溶液, 取 3 mL 配制的底物溶液, 在 $25^\circ C$ 的条件下加入粗酶液 20 μ L, 立即于 240 nm 下每隔 30 s 读数 1 次, 记录 3 min。以 OD_{240} 减少 0.1 的酶量为 1 个酶活性单位(U)。

CAT 活性($U \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$) = $(2.303/60) \times 1 \text{ g} (OD_1/OD_2)/M$ 。其中 OD_1 为零时 OD_{240} , OD_2 为 1 min 后 OD_{240} , M 为反应液中蛋白质含量(mg)。

1.4.3 MT 含量测定 MT 含量测定采用 DTNB 比色法(孟范平等, 2010; 吴云辉等, 2013)。取 0.2 g 摇蚊 4 龄幼虫, 加入 3 mL 0.1 mol/L Tris-HCl 缓冲液(含 0.1 mmol/L PMSF, 0.15 mol/L HCl, pH 7.5)玻璃匀浆器冰浴充分匀浆, 于 $4^\circ C$, 15 000 r/min 离心 20 min, 取上清液, 放入 $80^\circ C$ 水浴锅中温育 10 min, 除去杂质后于 $4^\circ C$, 15 000 r/min 离心 10 min, 取上清进行 MT 含量测定。反应体系为 50 μ L 上清液, 10 μ L 1.2 mol/L HCl 溶液和 200 μ L 0.1 mmol/L EDTA, 消化 10 min, 碱性条件下加入 200 μ L, 5 mmol/L DTNB, 待充分反应后用 1 mol/L PBS 稀释至 4 mL, 测定 OD_{412} , 同时分别在 40 μ L 5 mmol/L 的 DTNB 中依次加入 50、100、150、200、250 μ g MT 标准品, 反应后以 0.1 mol/L Tris-HCl pH 7.5 缓冲液稀释至 4 mL, 并测定 412 nm 波长吸光度, 并以标准 MT 蛋白质量(μ g)为横坐标, 光密度值 OD_{412} 为纵坐标, 制作标准曲线。参照标准曲

线即可求得反应物中 MT 含量, 单位为 $\mu\text{g}/\text{mg}$ 。

1.5 数据分析

利用 SPSS 20.0 统计学软件计算急性及联合毒性的半致死浓度 LC_{50} 和 95% 置信区间, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 和 Duncan's 方法进行显著性差异分析 ($P < 0.05$)。

2 结果与分析

2.1 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊幼虫急性毒性

2 种重金属对花翅摇蚊 4 龄幼虫毒力如表 1 所示。单一重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 随着作用时间的延长其半致死浓度 LC_{50} 逐渐降低, Cd^{2+} 对 4 龄幼虫 24 h 和 48 h 的 LC_{50} 分别为 9.29 mmol/L 和 6.35 mmol/L; Pb^{2+} 对 4 龄幼虫 24 h 和 48 h 的 LC_{50} 分别为 45.98 mmol/L 和 27.71 mmol/L, 表明花翅摇蚊幼虫随着作用时间延长对重金属的敏感性增大。花翅摇蚊幼虫在高浓度重金属作用下中毒症状明显, 幼虫移动速度减慢, 受刺激的应激反应减弱, 且随着浓度的增加症状加重。蒸馏水中正常死亡的幼虫, 身体卷曲, 体色为黄白色, 而在重金属暴露下中毒而死的幼虫身体僵直, 尾部出现“S”型弯曲, 体色变为灰绿色。

2.2 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊幼虫联合毒性

利用 TU 评价法对重金属混合离子 (等比毒性配比) 对摇蚊幼虫的急性毒性 (24 h 和 48 h) 进行评价。结果表明 $\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ (1:1)、 $\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ (1:2)、 $\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ (2:1) 3 组二元组合中, 24 h 1:1 配比时为部分相加作用, 2:1 和 1:2 配比时为拮抗作用; 而在 48 h 不同配比均为部分相加作用 (表 2)。

2.3 亚致死浓度 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊幼虫 SOD 和 CAT 活性影响

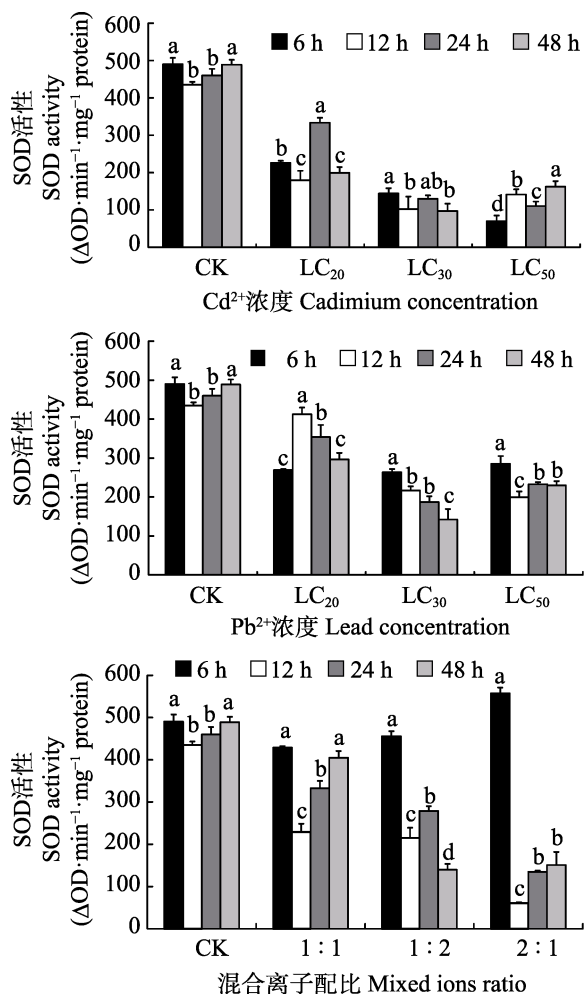
Cd^{2+} 胁迫处理下花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 SOD 的活性均低于对照组, 高浓度胁迫 6 h 处理组 SOD 活性抑制率最大, 为 85.81%; Pb^{2+} 胁迫处理下花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 SOD 活性也均低于对照组, 48 h LC_{30} 浓度下抑制率最大, 为 70.92%。不同配比 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 混合离子处理下, 除混合离子以 2:1 配比处理 6 h SOD 活性高于对照, 为对照组 1.14 倍外, 其余均低于对照组。重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 胁迫对花翅摇蚊 4 龄幼虫 SOD 活性表现出时间-剂量效应, 主要表现为抑制作用, 且 Cd^{2+} 的抑制作用高于 Pb^{2+} , 而混合离子除 2:1 配比处理 6 h 时为激活作用外, 其余配比浓度下 SOD 活性均表现为抑制降低。(图 1)。

表 1 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊 4 龄幼虫急性毒力
Table 1 Acute toxicity of Cd^{2+} and Pb^{2+} to 4th instar *Chironomus kiiensis* larvae

重金属 Heavy metal	处理时间 (h) Treatment time (h)	亚致死浓度 (mmol/L) Sublethal concentration (mmol/L)	斜率 Slope $\pm$ SE	χ^2 (df)
Cd^{2+}	24	LC_{20}	5.43 (4.78-5.99)	8.19 (13)
		LC_{30}	6.65 (6.02-7.30)	
		LC_{50}	9.29 (8.38-10.67)	
Pb^{2+}	24	LC_{20}	29.57 (21.87-34.17)	3.08 (10)
		LC_{30}	35.09 (29.10-40.31)	
		LC_{50}	45.98 (40.07-59.45)	
Cd^{2+}	48	LC_{20}	1.79 (0.65-2.73)	2.69 (10)
		LC_{30}	2.93 (1.59-4.22)	
		LC_{50}	6.35 (4.40-12.23)	
Pb^{2+}	48	LC_{20}	14.27 (9.68-18.09)	3.08 (10)
		LC_{30}	18.48 (13.80-22.85)	
		LC_{50}	27.72 (22.40-35.49)	

表 2 毒性单位法对 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 联合毒性评价指标值及评价结果Table 2 The index values and evaluation results of joint toxicity of Cd^{2+} and Pb^{2+} by toxic unit method

二元混合物 Binary mixture	处理时间 (h) Treatment time (h)	联合毒性 (M) Joint toxicity index (M)	评价结果 Evaluation result
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}(1:1)$	24	1.39	部分相加 Partial addition
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}(2:1)$	24	3.75	拮抗 Antagonism
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}(1:2)$	24	6.99	拮抗 Antagonism
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}(1:1)$	48	1.01	部分相加 Partial addition
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}(2:1)$	48	1.44	部分相加 Partial addition
$\text{Cd}^{2+}+\text{Pb}^{2+}(1:2)$	48	1.10	部分相加 Partial addition

图 1 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及混合离子对花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 SOD 活性影响Fig. 1 Effects of Cd^{2+} , Pb^{2+} and mixed ions on SOD activities in 4th instar *Chironomus kiiensis* larvae

图中数据为平均值±标准差；柱上标有不同小写字母表示同一时间不同浓度间差异显著 ($P < 0.05$)。下同。

The data are mean ± SD. Histograms with different lowercase letters indicate significantly difference at 0.05 level. The same below.

2 种重金属及混合离子对花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 CAT 活性影响如图 2 所示, 暴露于 Cd^{2+} 6 h 时, 随着浓度增加 CAT 活性呈现出下降-上升-下降的趋势, 且在 LC_{30} 浓度下 CAT 活性诱导增加, 处理 12 h 时, LC_{20} 浓度处理组 CAT 活性高于对照, 为对照的 1.24 倍, 而中等浓度 (LC_{30}) 和高浓度 (LC_{50}) 下却呈现抑制下降, 处理 24 h, 各浓度均低于对照, 最大抑制率为 55.7%, 处理 48 h, CAT 活性呈现上升-下降-上升的波动性。暴露于 Pb^{2+} 时, CAT 活性均低于对照, 处理 6 h 和 24 h 抑制作用先增加后降低, 作用 48 h 随浓度增加抑制率也随之增大, 高浓度最大抑制率为 77.3%; 混合离子处理 6-24 h 活性均低于对照组, 混合离子 2:1 配比下处理 48 h 活性高于对照, 为对照的 1.18 倍, 且不同配比混合离子处理组 CAT 活性不同作用时间差异性显著。重金属胁迫下摇蚊体内的 CAT 含量存在时间-剂量效应, Cd^{2+} 对 CAT 活性影响主要表现为抑制作用, 且不同浓度不同时间间差异性显著, 不同浓度 Pb^{2+} 作用不同时间对 CAT 活性影响也主要表现为抑制作用, 混合离子 $\text{Cd}^{2+}:\text{Pb}^{2+}$ 2:1 配比下暴露 48 h 时 CAT 活性表现为激活作用外, 其余配比浓度下 CAT 活性均表现为抑制降低 (图 2)。

2.4 亚致死浓度 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对花翅摇蚊幼虫 MT 含量影响

重金属及其混合离子对花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 MT 含量影响均显著高于对照, 24 h MT 含量最大, 暴露于低浓度 Cd^{2+} 时 MT 含量为对照组

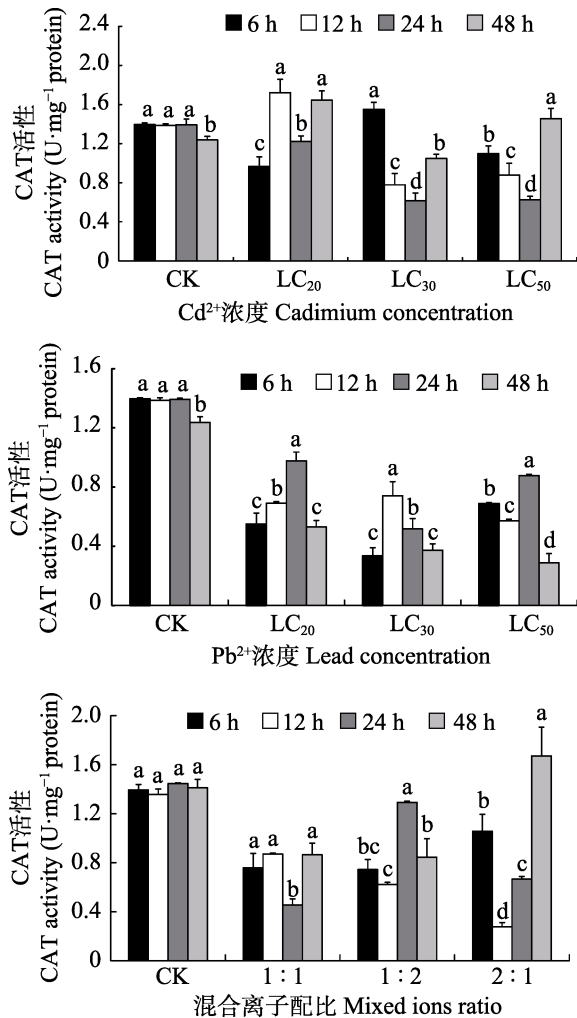


图 2 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及混合离子对花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 CAT 活性影响

Fig. 2 Effects of Cd^{2+} , Pb^{2+} and mixed ions on CAT activities in 4th instar *Chironomus kiiensis* larvae

的 8.20 倍, 而暴露于中等 Pb^{2+} 浓度时 MT 含量为对照组的 7.17 倍。胁迫 48 h 体内 MT 的含量降低。暴露于 Cd^{2+} 6、24、48 h 时, 低浓度处理下摇蚊幼虫 MT 含量均高于中等和高浓度处理组, 而暴露于 Pb^{2+} 12、24、48 h 时中等浓度下摇蚊幼虫 MT 含量最高, 而混合离子处理下, 在 6 h 和 12 h 2:1 配比浓度下、24 h 1:1 浓度配比下及 48 h 1:2 浓度配比下摇蚊 MT 含量为该时间点最大。重金属胁迫下 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 以及混合离子胁迫下 MT 含量随时间变化均表现先增加后降低, 且暴露于 Pb^{2+} 浓度下 MT 含量高于 Cd^{2+} , 而暴露于混合离子的 MT 含量均高于 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 浓度处理组 (图 3)。

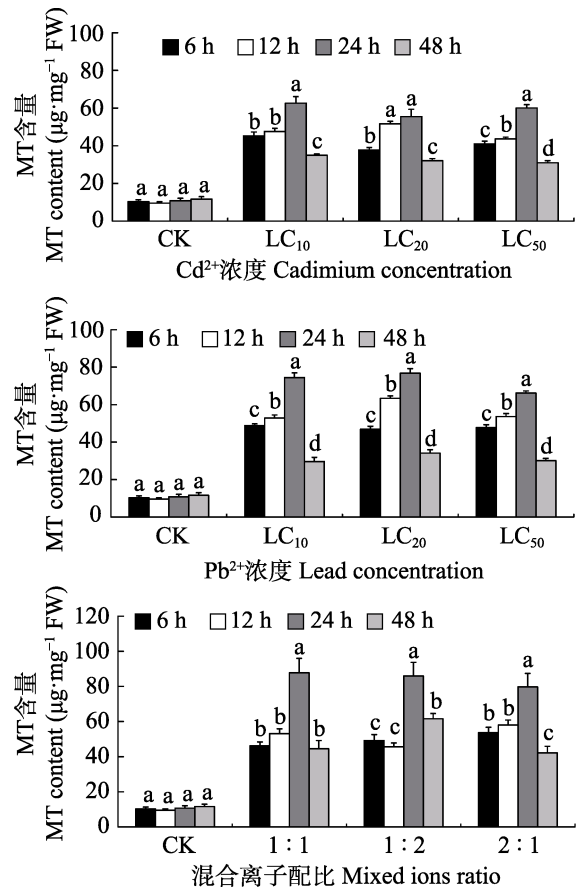


图 3 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及混合离子对花翅摇蚊 4 龄幼虫体内 MT 含量影响

Fig. 3 Effects of Cd^{2+} , Pb^{2+} and mixed ions on MT content in 4th instar *Chironomus kiiensis* larvae

3 结论与讨论

单一重金属离子 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 随着作用时间的延长其 LC₅₀ 逐渐降低, 24 h 和 48 h Cd^{2+} 的毒力大于 Pb^{2+} , 但随着作用时间延长 Pb^{2+} 的 LC₅₀ 变化比 Cd^{2+} 明显, 这主要由于 Cd^{2+} 能够降低昆虫体内血淋巴的含量, 干扰血淋巴的氧化平衡, 破坏昆虫细胞和组织的完整性, 抑制昆虫的体液和细胞免疫 (王晶等, 2015); 而 Pb^{2+} 作用于生物体各个系统和器官, 并与体内一系列蛋白质、酶和氨基酸中的功能团结合, 干扰机体生理和生化活动 (牛亚青等, 2010)。实际环境水体中污染物以混合物形式存在, 本文进一步研究了 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 联合毒性, 1:1 配比 24 h 表现为部分相加作用, 2:1 和 1:2 配比时为拮抗作用; 而不同配比 48 h 均为部分相加作用。酶抑制或诱导

理论认为,混合体系中一种物质对其他物质代谢酶的抑制或诱导作用是产生拮抗、协同等不同联合作用的重要原因(于瑞莲等,2009),根据单一毒性 LC_{50} 的结果, Pb^{2+} 对昆虫产生作用的时间比 Cd^{2+} 长,可以推测在 24 h 毒力主要是 Cd^{2+} 起作用, Pb^{2+} 还未完全发生作用,而作用 48 h, Pb^{2+} 发挥作用,使混合离子毒性增强,所以 2:1 配比 24 h Cd^{2+} 占主导作用,毒力高于 Pb^{2+} 主导下的 1:2 配比的毒力,而 1:2 的毒力小于 1:1 的毒力,则可能是由于过量的 Cd^{2+} 对 Pb^{2+} 作用产生了抑制。胁迫 48 h, Cd^{2+} 发挥作用的同时 Pb^{2+} 也逐渐产生作用,使 1:2 配比下混合离子对摇蚊的毒力增加,作用方式也由拮抗作用变为部分相加作用。

SOD 是生物细胞内最重要的自由基清除酶,与生物体的自身防御和对杀虫剂的耐药性、抗逆性有关,而 CAT 可以清除 H_2O_2 分解氢氧自由基,保护机体细胞稳定的内环境及细胞的正常生活,是昆虫体内最重要的酶促防御系统之一,其活性高低与昆虫的抗逆性密切相关(葛士林等,2011)。以重金属对摇蚊急性毒性结果为基础,结合摇蚊受到重金属胁迫时的中毒症状,本文系统的研究了 3 种亚致死浓度(LC_{20} 、 LC_{30} 、 LC_{50})重金属(Cd^{2+} 、 Pb^{2+})及其混合离子对摇蚊幼虫体内 3 种生化指标(SOD、CAT、MT)的影响。3 种亚致死浓度的单一重金属及混合离子对摇蚊体内 SOD 影响主要表现为抑制效应,但抑制程度与作用时间有关,对摇蚊体内 CAT 影响也主要表现为抑制作用,而混合离子在 2:1 配比下暴露 48 h CAT 出现激活效应外,其余配比浓度下 CAT 活性均处于抑制作用。已有研究表明过量活性氧自由基能损伤细胞膜中的不饱和脂肪酸和蛋白质,使细胞膜结构松散,引起细胞功能衰退; Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 离子对含硫化合物具有亲和特性,而很多新陈代谢酶的活性中心就是-SH,当金属离子与-SH 结合就会使酶失去活性,破坏细胞的正常功能(Basha and Rani, 2003; 许燕等,2010),从而抑制了 SOD 和 CAT 的活性,降低了 SOD 和 CAT 对昆虫的保护能力,最终将加速昆虫的死亡。

3 种亚致死浓度的单一重金属及其混合离子对摇蚊体内 MT 含量的影响基本一致,2 种重金属离子及其混合离子均表现出显著激活作用,暴露于重金属离子 6-24 h,各个浓度处理组 MT 含量随着时间变化而升高,但作用 48 h,MT 含量显著降低,这些研究结果表明单一重金属和混合离子胁迫下 MT 表现为诱导增加作用,且在 6-24 h 诱导作用逐渐增强,这可能是摇蚊受到外界胁迫,体内重金属离子增加,激发了 MT 与金属离子的结合作用,从而使体内金属离子浓度降低,达到防御自身的目的;而到了 48 h,诱导作用开始减弱,这可能是由于细胞富集的大量能与 MT 结合的重金属离子,细胞中 MT 的螯合作用逐渐饱和,MT 含量不再上升,甚至出现下降趋势,导致过量金属离子在细胞中累积而引起过氧化损伤(刘祥等,2016)。另外,MT 构象较坚固具有较强的耐热性和蛋白酶分解的能力,像 SOD 和 CAT 的活性在高温下就会降解,而 MT 则不受温度所局限,所以测定 MT 含量能够很直观的判断重金属的污染情况(张艳和杨传平,2006)。然而在实际的水体中,不仅仅存在无机重金属离子污染物,污染物的形式大多以有机污染物和无机污染物混合存在的,因此以昆虫体内 MT 含量来判断水体中的重金属污染是可行的,但无法判断水体中的有机物污染情况。

重金属污染物 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 对摇蚊幼虫具有急性毒性,且 2 种重金属不同配比(1:1,1:2,2:1)混合离子对摇蚊幼虫表现出联合毒性和时间-剂量效应。重金属污染对抗氧化酶 SOD 和 CAT 生成的影响效果显著,导致超氧阴离子自由基升高。本文研究结果表明重金属 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及其混合离子对摇蚊幼虫抗氧化系统酶活性主要表现为抑制作用,这表明 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 破坏抗氧化防御系统产生急性和联合毒性,而 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 及其混合离子对 MT 含量主要表现为诱导增加作用,这表明摇蚊幼虫通过提高 MT 表达增加自由基清除,提高抗氧化防御能力免受重金属离子的侵害。因此,摇蚊抗氧化系统酶 SOD 和 CAT 以及 MT 含量水平可进一步开发作为监测 Cd^{2+} 和 Pb^{2+} 污染的生化指标物。

参考文献 (References)

- Adams SM, 2002. Biological Indicators of Aquatic Ecosystem Stress. Bethesda: American Fisheries Society. 111–148.
- Arambourou H, Gismondi E, Branchu P, Beisel JN, 2013. Biochemical and morphological responses in *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae) larvae exposed to lead-spiked sediment. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 32(11): 2558–2564.
- Banerjee BD, Seth V, Bhattacharya A, Jean NB, 1999. Biochemical effects of some pesticides on lipid peroxidation and free-radical scavengers. *Toxicology Letters*, 107(1/3): 33–47.
- Basha PS, Rani AU, 2003. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia). *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 56(2): 218–221.
- Beauchamp C, Fridovich I, 1971. Superoxide dismutase: Improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Analytical Biochemistry*, 44(1): 276–287.
- Chinese Academy of Inspection and Quarantine Sciences, 2012. The Toxicity Test of Chironomid in Chemical Sediment-Water System was Added to the Sediment Method. Beijing: China Standard Press. 2–3. [中国检验检疫科学研究院, 2012. GB/T27859-2011 化学品沉积物-水系统中摇蚊毒性试验加标于沉积物法. 北京: 中国标准出版社. 2–3.]
- Cohen G, Dembiec D, Marcus J, 1970. Measurement of catalase activity in tissue extracts. *Analytical Biochemistry*, 34(1): 30–38.
- Dijkstra KD, Monaghan MT, Pauls SU, 2014. Freshwater biodiversity and aquatic insect diversification. *Annual Review of Entomology*, 59(1): 143–163.
- Domingues I, Agra AR, Monaghan K, Soares A, Nogueira A, 2010. Cholinesterase and glutathione-S-transferase activities in freshwater invertebrates as biomarkers to assess pesticide contamination. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 29(1): 5–18.
- Ge SL, Cao CW, Fang GF, Wang ZY, 2011. Responses of biological markers of larval *Prosilocerus akamusi* to phenol. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 22(7): 1900–1906. [葛士林, 曹传旺, 方国飞, 王志英, 2011. 红裸须摇蚊幼虫生物标志物系统对苯酚的响应. 应用生态学报, 22(7): 1900–1906.]
- Liu HX, Gao XW, Leng PE, 2008. Substrate specificity of acetylcholinesterase and its sensitivity to cholinesterase inhibitor in *Chironomus kiinensis*. *Chinese Journal of Applied & Environmental Biology*, 14(2): 211–214. [刘洪霞, 高希武, 冷培恩, 2008. 花翅摇蚊乙酰胆碱酯酶的底物专一性及对胆碱酯酶抑制剂敏感度的比较. 应用与环境生物学报, 14(2): 211–214.]
- Liu X, Wang M, Liu JJ, Chen K, Hu LM, 2016. Effects of oxidative stress on *Macrobrachium nipponense* induced by single and joint exposure to mercury and arsenic. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 11(6): 144–152. [刘祥, 王敏, 刘俊杰, 陈凯, 胡柳明, 2016. 汞和砷单一及联合暴露对日本沼虾的氧化应激效应. 生态毒理学报, 11(6): 144–152.]
- Li XW, Xiao XL, Liang YP, Zhang CP, Zhang SL, Gu ZM, Qi ZQ, 2015. Inhibition effect of alachlor on glutathione S-transferase of *Chironomus riparius* (Diptera: Chironomidae). *Asian Journal of Ecotoxicology*, 10(2): 243–250. [李修伟, 校新蕾, 梁亚萍, 张春萍, 张淑兰, 谷祖敏, 祁之秋, 2015. 环境激素甲草胺对摇蚊谷胱甘肽硫转移酶的抑制作用. 生态毒理学报, 10(2): 243–250.]
- Marking LL, Dawson VK, 1975. Method for assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals. *United States Department of the Interior, Fish and Wildlife Service Investigate Fish Control Laboratories*, 67: 1–8.
- Mccarthy JF, Shugart LR, 1990. Biomarkers of Environmental Contamination. Chelsea: Lewis. 205–216.
- Meng FP, Xiao J, Zhao SS, Fu HF, 2010. Extraction optimization of metallothionein from *Ruditapes philippinarum*. *Periodical of Ocean University of China (Natural Science Edition)*, 40(7): 121–125. [孟范平, 肖静, 赵顺顺, 付海防, 2010. 菲律宾蛤仔金属硫蛋白的提取方法优化. 中国海洋大学学报(自然科学版), 40(7): 121–125.]
- Niu YQ, Zheng JF, Wang HL, 2010. Progress in effect of lead on anti-oxidative damage enzyme of aquatic animal. *Environmental Science and Technology*, 23(2): 74–78. [牛亚青, 郑济芳, 王晗莉, 2010. 重金属铅对水生动物抗氧化损伤酶的影响研究进展. 环境科技, 23(2): 74–78.]
- Sarkar A, Ray D, Shrivastava AN, Sarkar S, 2006. Molecular biomarkers: Their significance and application in marine

- pollution monitoring. *Ecotoxicology*, 15(4): 333–340.
- Wan B, 2000. Advances in biomarkers in ecotoxicology. *Journal of Environmental Hygiene*, 27(2): 110–114. [万斌, 2000. 生态毒理学中生物标志物研究进展. 环境卫生学杂志, 27(2): 110–114.]
- Wang J, Ren TJ, Wang FQ, 2015. Toxicity of cadmium on aquatic animals and its mechanism. *China Feed*, (17): 25–27. [王晶, 任同军, 王福强, 2015. 重金属镉对水生动物的毒性作用及其机制. 中国饲料, (17): 25–27.]
- Wu YH, Wang JK, Sun JP, Zeng JL, 2013. Colormetric determination of metallothionein using DTNB. *Food Science*, 34(16): 196–199. [吴云辉, 王俊坤, 孙继鹏, 曾佳玲, 2013. DTNB 比色法测定金属硫蛋白含量. 食品科学, 34(16): 196–199.]
- Xu Y, Yang J, Sun JQ, Yu YD, Ye JQ, 2010. Cytochemical location of superoxide dismutase and peroxidase in different tissues of *Litopenaeus vannamei*. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 34(2): 402–409. [许燕, 杨洁, 孙静秋, 余亚东, 叶军强, 2010. 凡纳滨对虾不同组织内 SOD、POD 酶的细胞化学定位. 水生生物学报, 34(2): 402–409.]
- Yang GY, Wan LL, Lei XQ, Wang YJ, Li AF, 2014. Effects of lead and chromium on the growth, photosynthetic performance, and antioxidant activity of *Scenedesmus obliquus*. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 34(6): 1606–1614. [杨国远, 万凌琳, 雷学青, 汪亚俊, 李爱芬, 2014. 重金属铅、铬胁迫对斜生栅藻的生长、光合性能及抗氧化系统的影响. 环境科学学报, 34(6): 1606–1614.]
- Yu RL, Lin XY, Hu GR, 2009. The joint toxicity of phenols to *Photobacterium phosphoreum*. *Journal of Huaqiao University (Nature Edition)*, 30(5): 549–552. [于瑞莲, 林喜燕, 胡恭任, 2009. 酚类化合物对发光菌的联合毒性. 华侨大学学报(自然版), 30(5): 549–552.]
- Zhang Y, Yang CP, 2006. Study advances of metallothionein. *Molecular Plant Breeding*, 4(z1): 73–78. [张艳, 杨传平, 2006. 金属硫蛋白的研究进展. 分子植物育种, 4(z1): 73–78.]
- Zhang T, Jin HJ, 1995. Advances in aquatic ecotoxicology of *Chironomid* larvae. *Environmental Protection Science*, 21(4): 17–21. [张彤, 金洪钧, 1995. 摇蚊幼虫的水生态毒理学研究进展. 环境保护科学, 21(4): 17–21.]