

浙江大学
博士学位论文
棕尾别麻蝇对重金属的反应及适应机制的研究
姓名：吴国星
申请学位级别：博士
专业：农业昆虫与害虫防治
指导教师：胡萃;叶恭银
20050501

中文摘要

城市和现代工业的飞速发展带来了许多环境问题,其中重金属污染被越来越多的人所关注。因重金属不能降解,且能够在生物体内积累并在不同的生物学水平(如种群、个体、组织和细胞)产生不利影响。这些影响涉及到生物的生长发育、寿命、存活和繁殖等方面。在生态系统中,昆虫(如蝇类、蚊子、甲虫和蚂蚁等)在金属的转移和再利用方面起了重要作用,且它们在金属污染的胁迫下已经发展了特殊的适应机制。因此,研究重金属在昆虫体内的累积、代谢及昆虫对重金属的适应是非常有意义的。本论文就棕尾别麻蝇 *Boettcherisca (Sarcophaga) peregrina* (双翅目:麻蝇科)对重金属镉(Cd)和铜(Cu)的积累、反应、内稳态调控和贮存机制进行了研究。主要结果概括如下:

1 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 对亲代和子代生长发育和繁殖的影响

棕尾别麻蝇亲代初产幼虫取食含有不同浓度 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的饲料,发育受到显著影响。如幼虫各龄期和蛹期随金属离子浓度的升高而延长,成虫寿命随着浓度的升高而缩短;幼虫、蛹和新羽化成虫的重量、幼虫体长和蛹长均低于对照;幼虫、蛹和成虫的存活率随金属离子浓度的升高而降低;虽然经 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理后成虫性比与对照没有显著差异,但雌雄交配率与对照相比明显降低,雌蝇生殖力也明显下降。然而, Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理亲代的子一代的发育和对照子一代相比并无显著差异。这些结果表明经 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理后当代试虫的生长发育及生殖受到严重的损害,但此损害没有影响到后代的生长发育和繁殖。另外,低浓度的 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇的生长发育影响不大,在某些方面还有一定的刺激作用,这暗示着棕尾别麻蝇体内存在着有效的重金属调控机制。

2 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 在幼虫体内的积累和排泄

棕尾别麻蝇幼虫连续取食含有 Cd^{2+} 的饲料后,大部分 Cd^{2+} 连续积累在体内,少部分通过排泄系统排出。在幼虫体内的积累量与处理时间成比例,但与食物中金属离子的浓度不成比例。但处理浓度超过 $200 \mu\text{g/g}$ 时,积累量和排泄量都比 $200 \mu\text{g/g}$ 处理显著降低,这可能由于高浓度的 Cd^{2+} 使幼虫中毒有关。在变态过程中,蛹的 Cd^{2+} 含量比幼虫的低,刚羽化成虫的 Cd^{2+} 含量比蛹的低。这都与 Cd^{2+} 的排泄相关。

棕尾别麻蝇幼虫取食含 Cu^{2+} 的饲料后, Cu^{2+} 的积累量和排泄量大体相当,随着处理时间的延长,不断在体内积累,而且积累量和排泄量基本上与处理的 Cu^{2+} 浓度成比例。在

变态过程中, Cu^{2+} 也不断被排泄, 体内 Cu^{2+} 含量随之下降。

3 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 在幼虫组织中的累积分布

棕尾别麻蝇幼虫取食含 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的食物后, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 主要积累在幼虫的消化道, 特别是中肠。在表皮、脂肪体、血淋巴和马氏管中的 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 含量很低, 但是就器官中的 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 浓度而言, 马氏管与中肠接近, 甚至更高, 且马氏管与中肠中的浓度都远远高于表皮、脂肪体和血淋巴中的浓度。

4 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 对幼虫中肠及马氏管超微结构的影响

两种金属对中肠和马氏管的形态及超微结构都有明显的影响。中肠和马氏管的形态在光学显微水平下有相似的变化: 与对照相比, 中肠色泽变深, 长度变短, 壁变薄, 且在中肠的表面出现了许多瘤状突起; 马氏管也相应地变得短而薄。在 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的诱导下, 中肠的超微结构改变包括了线粒体浓缩, 肿胀和消失。粗面内质网 (rER) 变得膨胀和空泡化。微绒毛 (MV) 变短和无序。脂滴数量下降, 贮存的糖元量上升。出现了许多矿物颗粒体。马氏管超微结构的改变包括 rER 的空泡化和线粒体的肿胀及嵴的缺失, 微绒毛排列无序且缩短, 出现了大量液泡水肿及矿物颗粒体, 基膜明显变薄。

5 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 对幼虫血细胞的数量、存活和延展的影响

活体测定结果表明, 在幼虫取食含有 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 食物后血细胞的总数和血细胞的存活率下降, 且下降的程度与金属剂量和处理时间有关。离体测定结果表明, 重金属对4日龄幼虫的血细胞的存活有显著影响, 且具有浓度依赖效应, 而 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理对血细胞的延展无显著影响。

6 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 对幼虫血淋巴能量水平的影响

棕尾别麻蝇幼虫分别取食含 100、200、400、800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的食物 48 h 后血淋巴中糖、脂类和蛋白的浓度降低, 由这些化合物决定的能量水平也降低, 且这种降低受 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 浓度的影响。幼虫接触 800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 24、48、72、96 和 120 h 后, 幼虫的血淋巴化学组成和能量水平都比相应的对照幼虫的低。

7 Cd^{2+} 与 Cu^{2+} 对幼虫脂质过氧化作用的影响

镉和铜可以诱导幼虫体内的脂质过氧化作用的显著增强, 且这种作用存在浓度效应和

时间效应。

8 金属硫蛋白的分离纯化及性质分析

棕尾别麻蝇幼虫取食含 $800 \mu\text{g/g Cd}^{2+}$ 的食物 48 h 后, 可诱导金属硫蛋白 (MT) 的合成。诱导处理后的幼虫匀浆上清液经 Sephadex G-50 分子筛柱、UNO™ Q1 阴离子交换柱 和 Bio-Gel P-6 脱盐柱层析, 纯化得到 2 个 MT 亚型, 即 MT-I 和 MT-II。MT-I 和 MT-II 的分子量为 9 kDa, 每蛋白分子均含 7 个 Cd 和 20 个巯基, 且具 254 nm 的 Cd-SH 特征吸收肩。两者的氨基酸组成中, 以半胱氨酸含量最高, 各为 36.6% 和 31.8%, 而芳香族氨基酸和组氨酸含量甚少, 约 1%~2%。

9 幼虫中肠对 Cd^{2+} 反应的蛋白质组分析

通过双向电泳检测棕尾别麻蝇幼虫取食急性浓度的 Cd^{2+} 后中肠细胞的蛋白质组变化。结果表明, 有 14 个蛋白表达量增加, 11 个蛋白表达量减少。在蛋白量增加的 14 个蛋白中, 通过肽指纹 (PMF) 和基质辅助激光解析离子飞行时间质谱 (MALDI-TOF-MS) 对其中 10 个点进行了鉴定。其中 7 个高覆盖率蛋白可能与 Cd^{2+} 的细胞内解毒有关, 它们的功能包括移动并调控 Cd^{2+} (p-糖蛋白, p-glycoprotein, pGp)、应急功能(热激蛋白, Heat shock proteins, Hsp)、渗透调节和转运金属离子(Cd 诱导的溶酶体蛋白 CDR-5, cadmium-inducible lysosomal protein CDR) 等。

10 耐性品系和敏感品系重金属积累、生长发育、繁殖及抗氧化酶活力的比较

用镉和铜分别连续筛选棕尾别麻蝇 20 代获得耐 Cd 品系 (R_{Cd}) 和耐 Cu 品系 (R_{Cu})。与相对敏感品系 (S) 相比, R_{Cd} 品系和 R_{Cu} 品系幼虫积累 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的量增加, 存活率升高; 成虫生殖力增加, 这证明其对重金属的耐性增强。相同水平的 Cd^{2+} 诱导, R_{Cd} 品系幼虫的 MT 表达量高于 S 品系幼虫的 MT 表达量, 相同水平的 Cu^{2+} 诱导, R_{Cu} 品系幼虫的 MT 表达量高于 S 品系幼虫的 MT 表达量。 R_{Cd} 和 R_{Cu} 两品系幼虫的谷胱甘肽还原酶 (GR) 酶活性显著高于 S 品系幼虫的 GR 酶活性, 而超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽-S-转移酶 (GST) 和 酯酶 (EST) 酶活性在品系间无显著差异。

关键词: 棕尾别麻蝇, 重金属, 积累, 排泄, 定位, 超微结构, 血细胞, 能量水平, 脂质过氧化, 金属硫蛋白, 蛋白质组, 耐性机制

RESPONSES OF FLESH FLY (*BOETTCHERISCA PEREGRINA*) TO HEAVY METALS AND ITS ADAPTATION MECHANISM

Abstract

There is a growing public concern over the potential pollution of heavy metals in China owing to rapid urban and industrial development in the last several decades. Heavy metals are nonbiodegradable and they can be accumulated by organisms and have adverse effects at different levels of organization, such as population, individual organisms, tissues and cells. These effects are demonstrated in life-history traits of an organisms, for example, development, growth, aging, longevity, survival and reproduction. In the ecosystems insects (such as flies, mosquitoes, beetles and ants) play an important role in the transport and reintegration of heavy metals, and the insects have developed special adaptation mechanism to resist the heavy metal under the metal-pollution stress. Thus, it is of the utmost importance to investigate heavy metal accumulation in such insects, effects on the insects and adaptation mechanism of the insects. In this paper, the accumulation, the responses, homeostasis and storage mechanism of flesh fly (*Bieltcherisca peregrina*) to Cd^{2+} and Cu^{2+} are studied. The results are shown as follows:

1 Effects of Cd^{2+} and Cu^{2+} on development and reproduction of parental generation (P) and filial generation (F_1) of *Bieltcherisca peregrina*

The development and reproduction of P generation and F_1 generation of *B. peregrina* were studied after newly oviposited larvae of P generation were exposed to various concentrations of Cd^{2+} or Cu^{2+} administered in the artificial diet until pupation. The duration of the larval stages and pupal stages in P generation increased in proportion to the concentrations of metal ion, but the adult lives of treated-group got shortened than control group. The weight of larvae, pupae and newly emerged adults in P generation of treated-group decreased with Cd^{2+} or Cu^{2+} concentration. In addition, the body length of larvae and pupae in P generation of treated-group decreased with Cd^{2+} or Cu^{2+} concentration too. Survival of larvae, pupae and adult in P generation of treated-group was decreased with metal concentration. Although the sex ratio of adult coming

from the larvae exposed to Cd^{2+} or Cu^{2+} had no significance compared with the control, mating rate of male and female were significantly lower than controls. Fecundity of females of treated groups was also significantly reduced. However, all above parameters of F_1 generation coming from parents exposed to Cd^{2+} or Cu^{2+} and controls were not significantly different. These results show that development and reproduction of P generation are seriously impaired at sublethal Cd^{2+} or Cu^{2+} concentrations, but the impairment of P generation induced by Cd^{2+} or Cu^{2+} don't influence the development and reproduction of the offspring. Moreover, low concentrations of heavy metals affected little to the development of *B. peregrina* and have stimulatory function to some extent, implying that *B. peregrina* has good mechanism to regulate metals.

2 Accumulation and excretion of Cd^{2+} and Cu^{2+} in *Biethcherisca peregrina* larvae

B. peregrina larvae fed on food supplemented with Cd^{2+} retained most of ingested Cd^{2+} . Few ingested Cd^{2+} were excreted by excretory system. Cd^{2+} accumulation in larvae of *B. peregrina* was proportional to treatment time, but not to Cd^{2+} concentration in food. Especially, Cd^{2+} accumulation and excretion in larvae both decreased at more than $200 \mu\text{g/g}$ Cd^{2+} exposure than $200 \mu\text{g/g}$ exposure. This maybe ascribe to toxic effect of Cd^{2+} on larvae. During metamorphosis, the loss of Cd^{2+} took place almost entirely at pupation. Newly eclosion adults had lower Cd^{2+} contents than the larvae. This loss of Cd^{2+} was correlated to the excretion of Cd^{2+} .

B. peregrina larvae fed on food supplemented with Cu^{2+} retained about half amounts of ingested Cu^{2+} . Few ingested Cu^{2+} were excreted by excretory system. Cu^{2+} accumulation and excretion in larvae of *B. peregrina* were proportional to treatment time and to Cu^{2+} concentration in food. During metamorphosis, Cu^{2+} was excreted by final instar larvae and newly eclosion adults and Cu^{2+} content *in vivo* decreased.

3 The distribution of Cd^{2+} and Cu^{2+} among tissues of *Biethcherisca peregrina* larvae

The larvae of *B. peregrina* were fed with Cd^{2+} -containing or Cu^{2+} -containing diet and the distributions of Cd^{2+} and Cu^{2+} among tissues were determined by separating each organ. The results determined by atomic absorption spectrophotometer showed most of Cd^{2+} and Cu^{2+} accumulated in the alimentary canal, especially midgut, and the content of Cu^{2+} and Cd^{2+} in integument, fat body, haemolymph and malpighian tubules were very low. But the concentrations

of heavy metal in malpighian tubules was adjacent to that in midgut, and was much higher than that in integument, fat body and haemolymph.

4 Morphological and ultrastructural alternations in the midgut and malpighian tubules after the Cd²⁺ and Cu²⁺ exposure

The effects of Cd²⁺ (80 µg/g) and Cu²⁺ (100 µg/g) on the morphology and ultrastructure of midgut and malpighian tubules of *B. peregrina* larvae were studied by light microscopy and transmission electron microscopy (TEM). Treatment times (48 h) and metal concentrations were in the sublethal range to the larvae as determined by toxicity test. Under the treatment time and metal concentrations, the two metal species had profound effects on the morphology and ultrastructure of midgut and malpighian tubules. The morphology of midgut and malpighian tubules in treatment showed similar changes at the light microscopical level: the midgut got darker, shorter and thicker than control midgut, and many strumaes occurred on the surface of the midgut; and the malpighian tubules got shorter and thinner. Ultrastructural alterations in midgut induced by Cu²⁺ and Cd²⁺ included mitochondrial condensation, swelling, and lysis. The rough endoplasmic reticulum (rER) showed dilation and vesiculation. The microvilli (MV) were shortened and disordered. The lipid droplets decreased and stored glycogens were increased. Many mineral spherites appeared. Ultrastructural alterations observed in the malpighian tubules included rER vesiculation and mitochondria swelling with loss of cristae. Shortened and disordered microvilli, increased numbers of large hydropic vacuoles and mineral spherites were also observed. It was special to malpighian tubules basal membrane became thinner.

5 Effects of Cd²⁺ and Cu²⁺ on the number, spreading and viability of the larval hemocytes

we investigated the effects of Cd²⁺ and Cu²⁺ on hemocytes of *B. peregrina* *in vivo* and *in vitro*. *In vivo*, the total number of hemocytes and viability of hemocytes decreased after the larvae fed cadmium-containing and copper-containing diets in a dose- and time-dependent manner. *In vitro*, Haemocytes from 4th-day-old larvae were seeded in 96-well microplates and exposed to Cd²⁺ or Cu²⁺ at the concentrations of 0.1, 1, 10, 20 and 40 µg/ml. The viability of hemocytes was affected by heavy metals in a dose- dependent manner, and the viability ratio is no difference after 0.5 h and 4 h incubation. Moreover, the spreading had no difference among metal-exposed hemocytes and control hemocytes. The above results indicated Cd²⁺ or Cu²⁺ can

disturb hemocytes of *B. peregrina*.

6 Changes of energy level in larval haemolymph on exposure of larvae to Cd^{2+} and Cu^{2+}

The biochemical constituents of larval haemolymph such as total sugar, proteins and lipids were determined in *B. peregrina* larvae to Cd^{2+} or Cu^{2+} at different concentrations for 48 h, respectively. The results showed the biochemical constituents decreased on exposure to Cd^{2+} and Cu^{2+} , and the energy level determined by the biochemical constituents decreased too. Moreover, high concentrations were found to be more effective than low concentration. The effect of Cd^{2+} or Cu^{2+} at the concentration of 800 $\mu\text{g/g}$ was also studied on the above biochemical constituents at intervals of 24, 48, 72, 96 and 120 h. The results showed biochemical constituents and energy level in Cd^{2+} - or Cu^{2+} -exposed larvae were lower than that in control larvae. Therefore, measuring the caloric concentration in larval haemolymph of *B. peregrina* can be used to evaluate the physiological effects of combating Cd^{2+} and Cu^{2+} toxicity.

7 Lipid peroxidation induced by Cd^{2+} and Cu^{2+} in *Bieltcherisca peregrina* larvae

Cd^{2+} and Cu^{2+} could induce the increasing of lipid peroxidation in *B. peregrina* larvae in dose-dependent and time-dependent ways.

8 Isolation, purification and characterization of metallothionein

The metallothioneins (MT) in *B. peregrina* larvae were induced to be produced after feeding the dietary containing 800 μg cadmium per gram diet for 48 h. Two forms of MTs (MT-I and MT-II) were isolated and purified from the supernatant of the whole body homogenates from the larvae after exposure to cadmium chlorides, using gel chromatography on Sephadex G-50, ion-exchange chromatography on UNOTM Q1, and on Bio-Gel P-6 for desalination. Both molecular weights of MT-I and MT-II were 9 kDa. Both MT-I and MT-II contained 7 cadmium atoms and 20 sulfhydryl groups per molecule, and showed the spectral characteristic of cadmium-thionein, *i.e.* a broad shoulder at 254 nm. As to amino acid composition of MT-I and MT-II, their contents of cysteine residues were the highest, accounting for 36.6% and 31.8% of all amino acids, respectively. However, their contents of aromatic amino acid and histidine were very low, just sharing 1%~2% of all amino acids.

9 Proteomic analysis of Responses to Cd^{2+} in the midgut of *Bieltcherisca peregrina*

We examined proteome changes of midgut cells in a *B. peregrina* larvae to acute cadmium stress using two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. The expression levels of many protein spots showed changes. Amounts of fourteen proteins increased and of ten proteins decreased. Of these fourteen increased protein, ten protein were identified by peptide mass fingerprinting using matrix-assisted laser desorption ionizationtime of flight mass spectrometry, and 7 proteins have previously been reported to be relevant to cellular detoxification processes. The functions of 7 proteins include the removal of Cd (p-glycoprotein, pGp), emergency function (Heat shock proteins, Hsp), osmoregulation and transport metal ion (cadmium-inducible lysosomal protein CDR). The functions of other three proteins have not previously been reported.

10. Comparison of metal accumulation, growth and development, reproduction and antioxidant enzymes in resistant strain and susceptible strain

Development of cadmium tolerance and copper tolerance in a natural *B. peregrina* population maintained in the laboratory for 20 generations. Increased metal tolerance in selected strains (R_{Cd} and R_{Cu}) was reflected by increased metal accumulation, enhanced juvenile survivorship, and increased fecundity of female adult compared with the relative susceptible strain (S). The R_{Cd} and R_{Cu} strains displayed higher metallothionein levels than S strain after inducement with same level of heavy metals. This correlated with increased metal accumulation. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), glutathione reductase (GR), glutathione-S-transferase (GST) and esterase (EST) were measured after the larvae of different strains were exposed to heavy metal. Significant enhancement of GR activity were observed in R_{Cd} and R_{Cu} strains compared with S strain, while SOD, CAT, GST and EST levels were not significantly different.

Key words: *Biethcherisca peregrina*, heavy metal, accumulation, excretion, distribution, ultrastructure, hemocyte, energy level, lipid peroxidation, metallothionein, proteomic, resistance mechanism

前 言

随着采矿、冶炼、电镀等工业的发展,镉(Cd)、铜(Cu)等重金属伴随着三废排放到环境中,造成环境的污染。国内有关金属污染的报道越来越多,例如2001年的中国台湾著名的农业县彰化县发现的“镉米事件”;渤海湾汞、锌、铅等重金属污染;我国茶叶重金属污染(庚晋和周洁,2002);城郊蔬菜重金属污染(梁称福等,2002)和果园重金属污染(聂继云和董雅风,2002)等。这意味着重金属污染越来越受到人们的广泛关注。虽然环境中的重金属含量可能不至于直接影响居民健康,但这些金属能够在植物和动物体内累积并进入食物链,因此,值得密切注意。在陆地生态系统的食物链中,昆虫是重要的金属分散者,因为它们既是植物及腐食性物质(包括各种动植物的尸体)的主要消费者,又是其它较高营养级动物的重要食物。另外,昆虫数量多、分布广,容易接触到重金属,它们不仅对重金属表现敏感,而且有些在长期的重金属胁迫下发展了特定的适应机制,从而能够积累、转移和代谢重金属。因此,揭示昆虫对重金属反应及其适应机制是非常重要的。从环境角度来看,这些个体小、分布广、世代周期较短且繁殖力强的昆虫可被用作指示生物,监测环境中重金属污染程度;昆虫体内与其适应重金属相关物质如金属硫蛋白等也可用作重金属污染的生物标志物。目前,重金属在昆虫体内的富集及其对昆虫致毒机制的研究还处于探索阶段,昆虫对重金属的累积、代谢、转化与消除的机制还没有完全弄清楚,且研究比较深入的昆虫只有果蝇和弹尾虫。

在我国,有关昆虫与重金属的研究还很少,除了牛长缨(2000)关于家蝇对重金属的反应及有关金属硫蛋白的研究外,尚少有其它报告。有鉴于此,我们选择在中国及其他亚洲地区分布广的、腐食性的、卵胎生的棕尾别麻蝇 *Boettcherisca (Sarcophaga) peregrina* (双翅目:麻蝇科)作为研究对象,探测重金属镉(Cd)或铜(Cu)对它的生物效应及棕尾别麻蝇体内积累代谢Cd和Cu的生理生化机制。

博士学位论文

棕尾别麻蝇对重金属的反应及适应机制的研究

答辩委员会主席：程家安 教授（浙江大学农业与生物技术学院）

论文评阅人：戴华国 教授（南京农业大学植保学院）

（按姓氏笔画排列）

龚 和 研究员（中科院动物研究所）

洪晓月 教授（南京农业大学植保学院）

林乃銓 教授（福建农林大学植保学院）

张传溪 教授（浙江大学农业与生物技术学院）

论文答辩日期：二零零五年六月十四日

本研究承蒙

国家自然科学基金重点项目
(编号: 30230070)

资 助

致 谢

本论文是在胡萃教授和叶恭银教授的悉心指导下完成的。从试验到论文完成都凝聚着两位恩师的大量心血。二位导师严谨治学，为人师表的师德风范，呕心沥血献身科学事业的精神，把握学科前沿的敏锐洞察力以及丰富的知识面使我终生受益。三年来，导师在我生活、学习中给予的关怀、谆谆教导和悉心指导令我刻骨铭心。在此谨向两位导师表示衷心的感谢和深深的敬意。

三年来我得到浙江大学应用昆虫学研究所许多老师的关心和帮助，他们是程家安教授、刘树生教授、陈学新教授、张传溪教授、唐启义教授、沈志成教授、莫建初教授、姚洪渭副教授等等。在此表示诚挚的谢意。

三年来得到许多同窗好友的大力帮助，他们是：张忠、李凯、黄诚华、陈亮、陈茂、董胜张、朱家颖、蒋彩英、吴玛莉、王慧、石宇、李芳芳、谭红、卢新民、慎小晶、王欢、方琦、袁志东等同学。在此谨向他们表示最诚挚的谢意。在实验过程中，浙江大学环境保护研究所的徐向华、徐圣友、王远鹏和杨世迎等同学提供了很多便利和帮助，浙江大学分析测试中心的徐颖老师在透射电镜分析中给予了指导和帮助，在此一并表示真挚的谢意。

我还要特别感谢我的父母、姐姐，他们的理解和支持使我能够安心于学业。特别感谢我的爱人高熹女士多年来对我一如既往的理解和支持，感谢她与我同甘共苦、患难与共地投身课题研究！

最后，谨向参加论文评阅及答辩委员会的专家、教授致以崇高的敬意！

吴国星

2005年5月于杭州，浙江大学

第一部分 文献综述

第一章 重金属对生物的毒性及生物对其适应

1 生物体与重金属

在金属元素中，把比重大于5.0的称为重金属，因此，除碱金属、碱土金属和铝以外的其他金属都属于重金属的范围(Nieboer and Richardson,1980)。构成地壳的金属主要是碱金属、碱土金属和铝，在地表诞生的生物体必然是以轻金属元素(如钠、钾、镁、钙)为主要金属成分，但铁例外，它属于重金属。微量存在的重金属元素虽然不是构成生物体的主要成分，但实际上却是极为重要的物质。

1.1 重金属的必要性

生物体所需要的重金属元素，对于动物、植物、微生物来说是略有差别的，元素的必要性也因元素的化学形态、生物体培养方法等不同而异。迄今证明生物体的最常见的必需重金属元素有：Fe、Cu、Zn 3种元素。必需重金属元素具有两大功能：第一是具有催化功能，这种功能可由各种金属酶表现出来，Fe、Cu、Zn 都是金属酶不可缺少的因子；第二是具有金属蛋白载体的作用，血红蛋白是具有代表性的金属蛋白，其具有运输氧的功能；肌红蛋白也能储藏氧；细胞色素在呼吸链和光合作用等方面具有电子传递体的功能(表 1-1)(王夔, 1988)。重金属元素的化学形态与其在动物体内的必要性有一定关系，如在天然水体中，重金属多数被络合或不同程度被胶体物质吸附(王夔, 1991)，其化学形态不同对生物的可给性也不同，而且重金属作用部位的存在状态未必与最初摄取时的形态相同。例如，由于给患有缺钴症的动物投给钴盐，疾病可以解除，因此最初人们认为动物体内缺钴，但是后来证实以前的缺钴症实际上是维生素B₁₂ 缺乏症。也就是说，钴是维生素B₁₂ 必不可少的因子，只有当体内的细菌将钴转化成维生素B₁₂ 后才有效(王夔, 1991)。

重金属的代谢是指重金属被运送到生物体内所需要的部位，参与一些重要的生命活动，这一过程包括重金属的吸收、转运、贮存和排泄，以确保重金属在生物体内的内稳态平衡(Homeostasis)，以及排出过剩和有毒的重金属(Hoare, 1980)。生物对重金属的吸收，无论是从土壤、海水、食物中，还是自体内环境中的吸收，是重金属代谢的第一步。游离的重金属离子是亲水性的，不能通过细胞膜的脂质双层结构，因此它们必须和质溶性的化合物如血红素结合，或者经过载体的运输才能穿过细胞膜。这些载体包括糖、氨基酸、小肽及其它一些离子载体。一旦重金属离子穿过细胞膜，它们会和一些转运蛋白结合在一起(见表 1-2)。

表 1-1 典型金属蛋白质及其功能 (王夔, 1988)

Table 1-1 Typical metal-proteins and its functions

Heavy metal	Protein name	Physiological function
Fe	血红蛋白 (hemoglobin)	存在于血液里参与组织氧的运输
	细胞色素 (cytochrome)	通过 Fe (II)、Fe (III) 的可逆性, 进行电子传递
	过氧化氢酶 (catalase)	$2\text{H}_2\text{O}_2 \rightarrow 2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2$ 反应的催化剂
	醛氧化酶 (aldehyde oxidase)	$\text{R-CHO} + \text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{R-COOH} + \text{H}_2\text{O}_2$ 反应的催化剂
	铁氧还蛋白 (ferredoxin)	光合成体系的叶绿素受到光还原; 构成铁氧还蛋白— NADP^+ 还原酶, 使 NADP^+ 还原; 是固氮菌形成固氮酶的电子供体, 与 N_2 的还原反应有关
	琥珀酸脱氢酶 (Succinate dehydrogenase)	琥珀酸脱氢酶为延胡索酸反应的催化剂
Zn	碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase)	$\text{H}_2\text{CO}_3 \leftrightarrow \text{H}_2\text{O} + \text{CO}_2$ 反应的 催化剂
	羧肽酶 (carboxypeptidase)	将多肽链的 C 末端肽链有选择地切断
	乙醇脱氢酶 (alcohol dehydrogenase)	乙醇脱氢生产醛的反应可逆催化剂
Cu	血蓝蛋白 (hemocyanin)	存在于软体动物、节肢动物血淋巴中的氧运输体
	细胞色素 C 氧化酶 (cytochrome oxidase)	细胞呼吸时在电子传递系统 (呼吸链) 的末端工作, 将呼吸基质传递的电子直接交给 O_2
	酪氨酸酶 (tyrosinase)	参与分子 O_2 氧化 L-Tyr 生产黑色素的反应
	质体蓝素 (plastocyanin)	在光合成的电子传递中, 光化学系统 I 和 II 之间电子传递系统的一员
	血浆铜蓝蛋白 (ceruloplasmin)	运输血液中的 Cu, 氧化 Fe (II)

表 1-2 重金属代谢过程中的转运和贮存蛋白

Table 1-2 Transport proteins and stored proteins in metabolism of heavy metal

Proteins	Molecular weight (Da)	Binding metal
I. 转运蛋白		
转铁蛋白	80,000	Fe、Zn、Mn
血浆铜蓝蛋白	132,000	Cu
白蛋白	69,000	Cu、Zn、Ni
钴胺传递蛋白	38,000	Co
II. 贮存蛋白		
铁蛋白	444,000	Fe
金属硫蛋白	6,000~8000 甚至更大	Zn、Cd、Cu、Hg、Ag、Bi

然而细胞内重金属的内稳态调控是十分重要的,不用说非必需重金属,即使是必需重金属在过量时也会产生毒害作用。重金属的内稳态平衡通过活性运输和贮存机制得以实现,其中最重要的贮存机制是金属硫蛋白和铁蛋白的作用。金属硫蛋白能结合过量的锌、铜,作为一个暂时的“贮存库”,调控锌、铜的内稳态,此外,金属硫蛋白还能结合毒性金属如镉和汞等,起着解毒的功能。

1.2 重金属过量的危害

许多重金属元素在生命活动中是有用的和必需的,在生命活动中常常缺失了不行,然而多了不但无益反而会造成危害。无论是生命活动中必须的或非必需的重金属元素,当在生物体内积累值超过一定的阈值,或者进入生物体内的途径是非正常行为,都将或多或少地危害或影响生物的生命活动。不少重金属,当量值为ppb 数量级时,它会对物质代谢起着催化作用,而当达到PPM 数量级时,常可以观察到无益有害的作用(张毓琪和陈叙龙, 1993)。例如,铁元素对于分子氧的运送和代谢十分重要,但由于偶然性的吸收和疾病使过剩的铁积聚起来且不易排出时,他们将会催化各种各样的含氧自由基的形成并广泛地损伤组织(Lippard and Berg, 1994)。特别是随着社会工农业的发展,工业废水和城市生活污水污染及矿山和冶金工业,重金属污染使河流、湖泊水质急剧下降,水生生物多样性减少,物种灭绝,而且对经济发展和人民身心健康构成严重威胁。例如1948年美国宾夕法尼亚州多诺拉镇发生了二氧化硫与金属元素的复合污染,死亡17人(王焕校, 2000); 1955年日本的富山县矿山引起的镉污染造成的骨痛病事件(王焕校, 2000); 1956年日本水俣湾的有机汞中毒造成受害居民万余人的水俣病事件(孔繁翔, 2000)。

1.3 重金属毒性机制

重金属进入生物体内是怎样产生毒性作用的,这是我们感兴趣的问题之一。重金属及其化合物对生物体内某些器官和系统中的生物分子有特殊的亲和力。这种重金属的侵入途径、浓度、溶解性、存在状态、代谢特点等因素密切相关。重金属的毒性机制主要表现在以下几方面(王夔, 1988):

(1) 阻断了生物分子表现活性所必需的功能基。例如, Hg^{2+} 与酶中半胱氨酸残基的SH基结合,半胱氨酸的SH基是许多酶的催化活性部位,当结合金属离子后,就抑制了酶的催化活性。

(2) 置换了生物分子中必需的金属离子。例如, Be^{2+} 可以取代 Mg^{2+} -激活酶中的 Mg^{2+} ,

由于 Be^{2+} 与酶结合的强度比 Mg^{2+} 大，因而它会阻断酶的活性。

(3) 改变生物分子构象或高级结构。为了使生物分子有一定的功能，它必须具有附加种特定的构象，金属离子的结合能改变一些生物大分子如蛋白质、核酸和生物膜的构象。例如，多核苷酸负责贮存的传递遗传信息，一旦发生变化，可能会引起严重后果，如致癌和先天性畸形。

在生物分子中，蛋白质、磷脂、某些糖类和核苷酸都具有许多能与金属离子结合的配位基团或原子，例如，咪唑（组氨酸）、 NH_2 （赖氨酸等）、嘌呤和嘧啶碱基（DNA 和 RNA 内）中氮原子， OH （丝氨酸、酪氨酸等）、 COO^- （谷氨酸、天冬氨酸等）和 PO_4^{3-} （磷脂、核苷酸等）中的氧原子， SH （半胱氨酸）和 SR （蛋氨酸等）中的硫原子等，都可作为配位原子。上述三种毒性机制都是以金属离子对生物分子的配位能力作基础的。

1.4 生物对重金属的贮存和解毒机制

为了利用环境中藏量丰富的那些重金属元素，各种生物都呈现出相适应的代谢机制或体内平衡机制。利用最普遍存在的元素是生物进化的结果，其目的是保证生命活动的正常进行；同理，防御机制也是生物进化的结果。在一些生物体中，似乎已形成了各种有毒重金属的防御机制或解毒机制。金属硫蛋白即是最著名的具体例子。毛发往往会累积重金属离子，如 Zn^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} ，毛发的脱落起着去除重金属毒害的作用。重金属化合物的胶体物质，也可通过吞噬作用而结合到网状内皮系统中去。在某些情况下，甚至肿瘤也能排除重金属毒害所产生的严重后果。据分析，生活在严重污染区并同时长有肿瘤鱼类，其体内所含的重金属（特别是铜）都富集在肿瘤细胞中。

1.4.1 金属硫蛋白（MT）

Margoshes 和 Vallee (1957) 首次从马的肾皮质中分离出这类含铜量非常高的金属结合蛋白。Kagi (1991) 又从人肝组织中分离出同类蛋白质。肝作为重金属解毒部位，肾作为尿排前加工部位，都集中了较多的重金属，这些重金属以 MT 结合方式存在。其后又不断从不同的生物如蓝藻、酵母、无脊椎动物、哺乳动物体内都分离出了基本相同的 MT。由于 MT 对镉、汞有强的结合作用，所以是急性镉、汞中毒的一种保护剂。从 MT 在体内的诱导合成可看出，生物体具有自我解毒系统来抵御或减缓来自有毒重金属对组织的损坏。

1.4.2 硒的化合物

金枪鱼体内含有高含量的汞，有趣的是，金枪鱼本身并没有发现汞中毒的迹象。在金枪鱼体内，应存在某种清除汞毒性的机制。现一般公认，金枪鱼的硒含量是非常高的，而且硒的存在与汞的含量有关。硒的含量随着汞含量的增加而增加。如果将金枪鱼肉加到动物饲料中，能减轻汞对动物的毒性。这些观察结果表明，硒化合物能螯合 Hg^{2+} ，并抑制 Hg^{2+} 对细胞以及各组织的毒害作用。因此可以认为，生物必需硒的一个原因，可能是为了保护自身免遭重金属的毒害。

1.4.3 细胞器里的沉积

铅中毒的特殊症状如贫血症，只有在较高的铅剂量时才会出现。在较低的铅剂量时，可观察到的最初症状是，在肾小管中形成核内包涵体 (Intranuclear inclusion bodies)。包涵体除了含铅以外，还含有可检测的微量钙、铁、糖原和一定量的蛋白质。据认为，包涵体有保护作用，由于铅积累在软组织中，因而降低了对其它细胞质、细胞器的毒害。在苔藓植物叶中，也发现了类似的包涵体。因此，在一般生物机制中，包涵体似乎起保护和贮存作用，以防止铅对细胞的毒害 (Shaw, 1989)。

除了包涵体以外，在其它细胞器里也发生大量重金属的聚集。这些细胞器包括线粒体、溶酶体等等。

1.4.4 细胞外结合和沉淀

海藻类急剧暴长和繁殖，可能是由于吸附水中大量 Cu、Zn、Cd、Hg 等重金属的缘故，因此海藻成为海洋重金属污染的一种重要的生物指示物。在某些情况下，藻类的细胞下可产生结晶作用。例如，一种藻类 (*Cyanidium caldarium*) 通过形成金属硫化物结晶沉积在细胞表面，从而自废水中吸附 Cu、Ni、Al、Cr 等重金属 (Shaw, 1989)。另外，一些藻类能分泌高分子化合物，如多糖，结合大量重金属离子。藻类细胞壁的结构组成类似于阳离子交换剂的作用，因此一些重金属 (如 Cd) 能够以中性络合物的形式积累在细胞外。

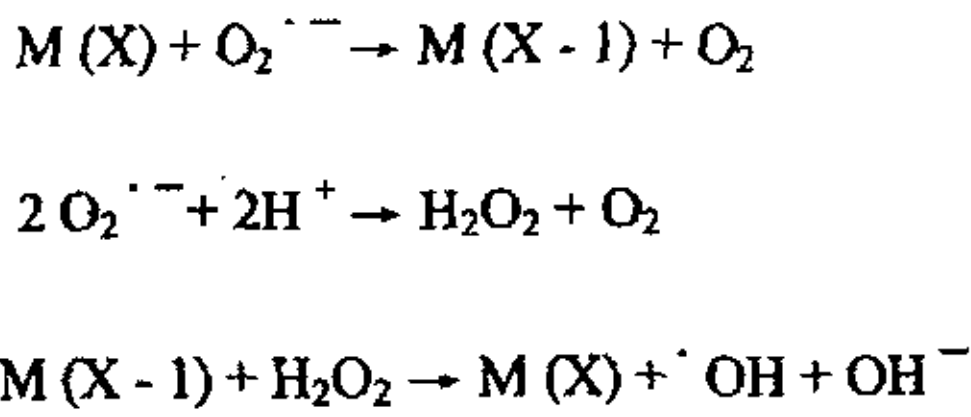
1.4.5 重金属置换作用

微生物对重金属引起化学置换作用，如氧化、还原、甲基化和脱甲基化作用，从而对重金属产生防御机制。其中，最著名的例子是汞的甲基化作用。某些微生物能使汞和汞的化合物甲基化，并生成比无机汞化合物更易挥发的甲基汞 $(\text{CH}_3)_2\text{Hg}$ 或 CH_3Hg^+ 。这些有机汞从生物体中挥发出去，要比无机汞化合物容易得多。目前已证实，一些厌氧细菌能使汞甲基化，而甲基化的机制需要维生素 B_{12} 的甲基衍生物参加反应 (E.J 奥西埃, 1987; Shaw,

1989)。另一方面，有机汞化合物可被一些细菌还原为 Hg^0 。 Hg^0 是低毒的，并具有较高的蒸气压，使汞能蒸发到生物体外去。因此，这种置换是一种有效的解毒方法。

1.5 重金属的氧化毒性和解毒机制

在生命活动中，过渡金属在生物大分子的氧化变质过程中扮演着催化剂的作用，因此，与这些金属相关的毒性可能来源于受氧化组织的损伤。近来的研究表明金属如Fe、Cu、Ca、Cr、Pb、Hg、Ni 和Va 具有产生活性氧（ $\cdot O_2^-$ 、 H_2O_2 和 $\cdot OH$ ）的能力，反应如下：



这些活性氧导致了脂质过氧化，DNA损伤，巯基的损耗及钙平衡的改变（如图 1-1）。图 1-1 总结活性氧及自由基间的相互作用以及对脂类，蛋白及DNA，硫醇和抗氧化剂的伤害，也包括了维生素A、E、C，还有改变Ca 的动态平衡（膜受伤的结果），导致了与Ca 相关系统的活化，如核酸内切酶。此外，也涉及了肿瘤坏死因子a（TNFa），蛋白激酶C及胁迫蛋白。随着新技术的出现，涉及到有关毒性及致癌作用的活性氧及它们的运输，组织受损效应，及顺序问题将可得到回答。

生物体内的抗氧化系统——抗氧化酶和小分子的抗氧化物可以清除生物体细胞内生产的活性氧（表 1-3）（美浓真，1994；浅田浩二，1994；李毅平和龚和，1998），从而解除重金属的氧化毒性。

表 1-3 生物抗氧化系统的组成
Table 1-3 Composition of antioxidant system in organisms

抗氧化酶					
超氧化物歧化酶	过氧化氢酶	谷胱甘肽转移酶	过氧化物酶	抗坏血酸过氧化物酶	
醌还原酶	谷胱甘肽还原酶	脱氢抗坏血酸还原酶	抗坏血酸自由基还原酶		
抗氧化蛋白					
铁蛋白	转铁蛋白	血浆铜蓝蛋白	金属硫蛋白	清蛋白等	
化学物质					
脂溶性抗氧化剂：维生素 E 类胡萝卜素 泛醌 胆红素等					
水溶性抗氧化剂：维生素 C 尿酸 谷胱甘肽 3-羟基犬尿氨酸 海藻糖 葡萄糖 甘油 乙二醇等					

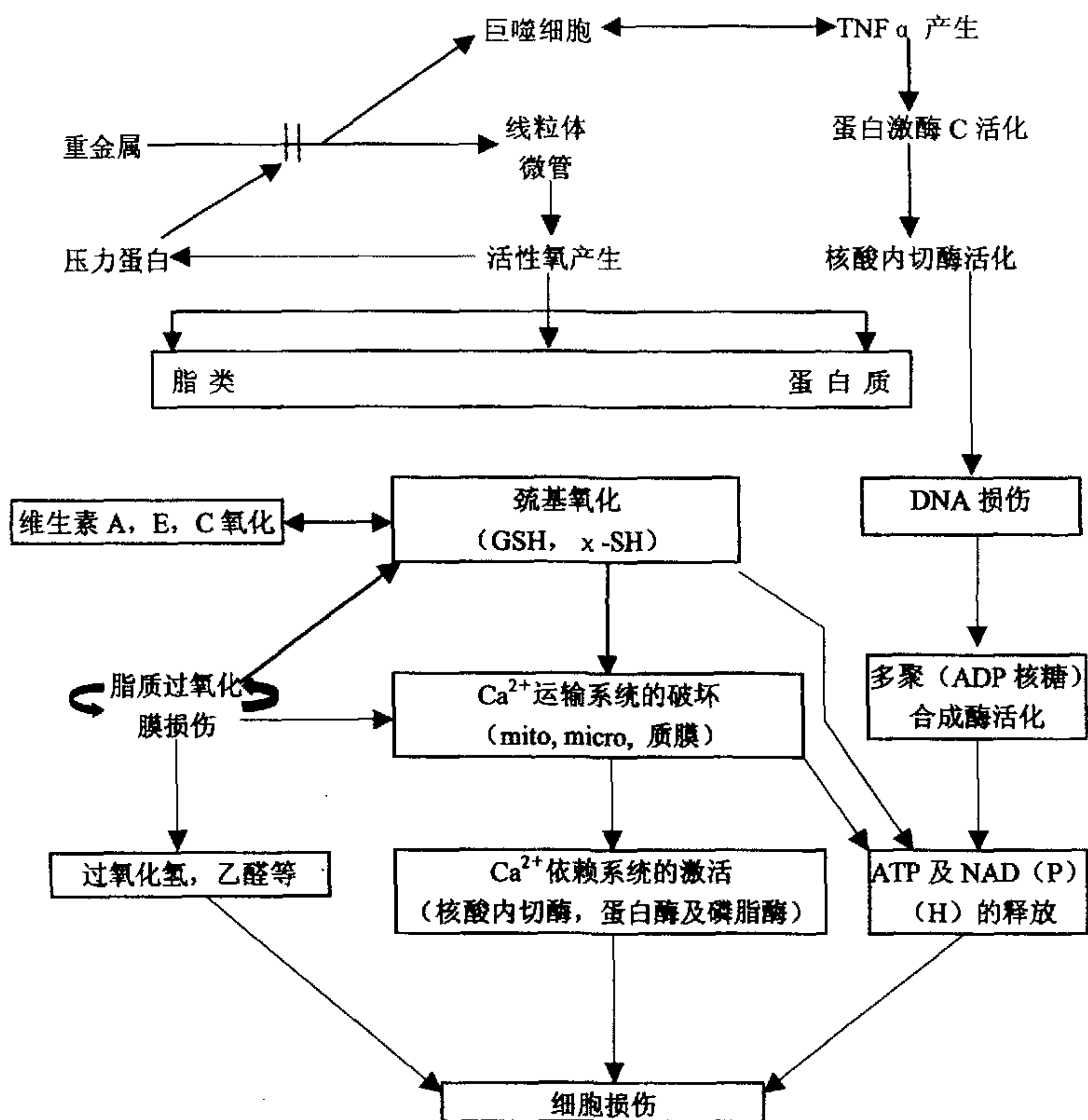


图 1-1 已知的活性氧物种及其对组织损伤的影响相互作用

Fig. 1-1 Summary of the interactions that are known to exist involving reactive oxygen species and tissue damaging effects (Stohs and Bagchi, 1995)

2 四种重金属概述

重金属的污染发生越来越广泛，已经成为重要的环境污染的之一。Cd、Cu、Pb 和Hg 尤其严重。在这里我们对这四种元素作一综述。

2.1 镉 (Cd)

镉污染是当今重金属污染中面积最广、危害最大的重全属元素之一,被称为“五毒之首”。由于工业的缘故, Cd 在环境中的积累量丰富, 且它是非必需元素。它在电镀 (electroplating) 和镀锌 (galvanizing) 中广泛使用, 作为染料及用于电池中。它也是锌矿和铅矿及冶炼厂的副产物。可溶性的镉盐积累会导致对肝, 肾, 脑, 肺, 心, 精巢及中枢神经系统的毒性。由于镉污染毒理机制和生物效应的复杂性, 对镉污染的研究一直是当前学术界的热点研究课题。现在对镉的环境行为和对生物有机体毒理机制与危害进行综述。

2.1.1 Cd 的来源、用途及污染

Cd 是一种具有银白色光泽、软性、延展性好、耐腐蚀的稀有金属。它于十九世纪初首先在 ZnCO_3 的杂质中发现, 主要存在于 Zn 的各类矿石中, 目前大部分 Cd 常在炼锌时以副产品得到。研究表明, 单质 Cd 本身并没有毒性, 然而其化合物具有毒性及腐蚀性。Cd 的主要用途是用于颜料和电镀工业, 作颜料主要是 CdS 作为镉黄, 用它镀到钢铁或铜上可增加金属的强度和耐磨性, 但不影响其导电性它还应用于制备镍镉、铜镉合金, 这些合金作为材料具有优良的性能被广泛用于尖端科技; 还可用于半导体和荧光体, 原子反应堆的控制棒等; 它的化合物还能作为农药治理植物的病虫害。但是随着采矿、冶炼、电镀等工业的发展, 伴随着大量的三废的排放, 造成环境污染, 严重的威胁着人类和生物的生存。这个问题在工业发达国家已经出现了严重的危害, 并引起全世界的关注, 不少科学家致力于这方面的深入研究, 各国纷纷采取有力措施以防治 Cd 的污染。

环境中 Cd 的自然来源很少, Cd 主要是以硫化物、氧化物、碳酸盐形式与闪锌矿共存。据资料介绍, 地壳中含 Cd 为 0.18 ppm, 土壤中 Cd 的含量随不同地区而异, 但大多数在 0.12 ppm 以下。环境中 Cd 的污染主要是工业污染造成的, 采矿、冶炼、合金制造、电镀、油漆颜料制造、核反应堆、陶瓷等工业部门是引起 Cd 污染环境的主要源泉。工业发达国家尤为突出, 如美国工业向大气排放的 Cd 多达 1000 吨以上, 日本神户每年排放含 Cd 的废水高达 3000 吨。目前, 随着我国城市和工业的发展, 城市和郊区的重金属污染也日益严峻。各类垃圾中的 Hg、Cd 元素含量均超过了北京市郊土壤背景值和污染起始值的最高允许含量 (李仙粉等, 2003)。广东珠江三角洲城市郊区农业土壤 Cd 超标率达 56% (土壤环境质量二级标准), 广州市郊区 Cd 的超标率达 82% (王凯荣, 1997)。沈阳张士灌区有 2533 km^2 遭受镉污染, 其中严重污染占 13% (张义贤, 1997)。

2.1.2 镉对动物的影响

镉主要通过食物、水、空气等进入动物体内，动物作为消费者，环境中的镉主要是通过植物进入动物体内的。因而镉在动物体内的含量与动物所食植物种类、部位和年龄相关。镉能与含羟基、氨基、巯基高分子有机结构结合，能使许多酶系统受到抑制，从而影响肝、肾等器官中酶系统的正常功能。另外镉还损伤肾小管，导致糖尿、蛋白尿、氨基酸尿，并使尿钙和尿酸的排出量增加，引起肾功能不全，进而影响维生素D₃的活性与吸收。因此长期食用含镉植物会影响钙和磷的代谢，引起肾、肺、肝等器官的病理变化。诱发骨质疏松骨软化和肾结石等疾病，最终引发“骨痛病”。另外镉对哺乳动物具有较强的致畸、致癌和致突变作用，被有机体吸收后，自然排泄十分缓慢，镉在体内的半衰期长达10~35年，为已知的最易在体内蓄积的毒物。镉可以降低体外受精后的胚胎移植的成活率，导致超排卵的数目减少(沈维干等, 1999)。破坏或抑制卵母细胞的减数分裂过程，降低卵母细胞的受精能力和存活率，提示育龄妇女接触镉及其化合物会导致生育能力下降甚至不孕不育。

2.1.3 镉的毒性机理

2.1.3.1 诱导金属硫蛋白(MT)的产生

金属硫蛋白(Metallothionein, 简称MT)是一类低分子量、高金属含量、富含半胱氨酸的金属结合蛋白。它能够通过自身的巯基与多种金属(Cd、Zn、Cu、Hg等)结合，是目前发现金属相对含量最大的蛋白质。MT广泛存在于自然界中。MT现已被发现广泛存在于哺乳类动物的几乎所有的组织，在植物、无脊椎动物、真核微生物、原核生物体内也有MT存在。并且MT还具有一定的生物进化保守性。

MT具有广泛的生物功能(如参与微量元素的贮存、运输和代谢;拮抗电离辐射;清除羟自由基及重金属解毒等多种作用),围绕它和镉毒性关系的研究已经很多。普遍认为它是镉胁迫时机体自身诱发的自我保护措施之一。镉对MT有很强的诱导作用。它可直接作用于MT基因的启动子,从而诱导MT mRNA的大量表达。诱导合成的MT反过来可以整合一定量的镉形成Cd-MT复合物以降低胞内镉的浓度,还可以通过自身巯基还原态/氧化态的转换来清除由镉诱发产生的自由基,从而减轻镉对生物体的损伤。

但同时Cd-MT复合物与镉毒性的发挥却是分不开的:(1)镉可直接作用于金属硫蛋白(MT)基因的启动子,从而诱导肝脏或肾脏中MT mRNA的大量合成。MT被诱导后可迅速与锌离子结合,使母体血浆锌的浓度降低进而造成胚胎锌的供应不足。由于锌是许多金属酶的正常的组成成分,缺锌可抑制这些金属酶的活性,从而影响碳水化合物、脂类、蛋

白质及核酸的合成和降解（王葵，1992）。(2) MT 可能是充当镉的运载蛋白。由于进入人体的镉主要在肝脏中诱导 MT 的合成并进一步形成 Cd-MT 复合物，该复合物可经过血液运输达到肾脏，经肾小球滤过后大部分被肾小管吸收，然后通过胞饮作用，Cd-MT 进入肾小管细胞溶酶体，在溶酶体中降解、分离并释放出游离的镉，游离的镉就开始发挥它的毒性作用。由此还确立了一次性大量注射 Cd-MT 造成肾损伤的动物模型来研究镉的肾毒性机制。(3) 镉除了能够诱导母体肝和肾脏中 MT 合成外，也可诱导胎盘滋养层细胞 MT 的合成。MT 在胎盘内被诱导合成后，可通过与锌结合而导致锌的转运障碍。抑制胎盘的物质转运是镉的一种发育毒性作用机制。

最近，用敲除了 MT 基因的转基因动物的实验结果表明，镉所致的肾损伤并不一定依赖于 Cd-MT 的形成，无机镉也能直接造成肾脏损伤。1993 年美国毒理学年会上就 MT 与镉关系作了专题报告会，一致认为 MT 的诱导是影响镉致癌的重要因素，但许多细节还有待进一步研究。

2.1.3.2 与钙、锌竞争

同样作为二价金属离子，镉与钙具有很多相似的地方。两者的离子半径分别为 0.099 nm 和 0.097 nm。这也就决定了镉的毒性作用往往与对钙水平及钙功能的影响有关。

镉是如何进入细胞的？一种假说认为它是通过钙离子通道进入细胞的。在进入细胞前，镉还可以与细胞表面的孤儿受体相结合而启动胞内钙信号系统（Smith *et al.*, 1989）。镉进入细胞后，一方面可以通过抑制钙泵引起胞内钙浓度增加；另一方面又可以替代钙与钙调蛋白相结合激活钙调蛋白依赖型激酶或直接激活某些与钙相关的酶类如蛋白激酶 C (PKC)、丝裂原激活蛋白激酶 (MAPK) 等，干扰细胞内与钙有关的信息传递系统，产生细胞毒性。最近的资料还表明，细胞内的镉能取代钙与肌动蛋白、微管、微丝相结合，从而破坏细胞骨架的完整，损害细胞的功能；镉还能通过与细胞粘附分子相结合而使其构象发生改变从而破坏细胞之间的连接，这也与镉-钙的相互作用有关。因此，阐明镉-钙之间的相互作用是探讨镉毒性作用机制的一个重要方面。

另外，镉还可以取代锌，与锌指蛋白结合，从而影响细胞内的调控系统。

2.1.3.3 Cd 的氧化机制

一些研究显示，镉的毒性与其诱导的氧化损伤有关，如镉可诱导脂质过氧化水平升高，抑制抗氧化酶如超氧化物歧化酶 (SOD) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 的活性，影响 MT 和谷胱甘肽 (GSH) 的水平。而且，抗氧化剂如抗坏血酸、 α -生育酚等可抑制镉的毒

性作用。目前，镉毒性作用机理的研究不少集中于镉引发的氧化损伤方面。镉可以引起脂质过氧化、DNA 链的断裂以及蛋白质的氧化修饰等 (Berlett and Stadtman, 1997)。镉引起的氧化损伤一方面与细胞内谷胱甘肽等含巯基肽 (蛋白) 的耗竭有关；另一方面还要归咎于它诱导产生的过量自由基 (Li *et al.*, 2000)。虽然作为非 Fenton 反应的金属元素，镉并不能直接作为电子供体产生活性氧自由基 (ROS) 引起氧化损伤 (Thevenod *et al.*, 2000)。但是，在 MT 存在下，其表现出产生 $\cdot\text{OH}$ 自由基的能力，这可能是因为镉可以与金属硫蛋白上络合的铁、铜等金属离子进行交换替代使其释放出来发生反应，或者是由于对自由基清除剂的消除所致。

镉产生氧化损伤主要是通过以下几种途径来实现 (刘杰, 1998): (1) 镉可以损伤线粒体，协同铜、铁离子在受干扰的细胞呼吸过程中产生氧化自由基；(2) 镉可以抑制细胞内超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 和谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等抗氧化酶的活性从而削弱细胞抗氧化能力；(3) 镉可以通过活化黄嘌呤氧化酶、血红素氧化酶使细胞内产生过量的超氧自由基 (O_2^-)。

镉似乎不产生自由基 (Ochi *et al.*, 1987)，但经 Cd 处理后生物器官中的脂质过氧化迅速提高 (Muller, 1986)。如 Fariss (1991) 的研究就说明了自由基清除剂及抗氧化剂可以用来消除镉毒性。

Manca 等 (1991) 往鼠的腹腔内注入 25-1250 $\mu\text{g Cd/kg}$ 的氯化镉，处理 24 h 后杀之，之后检测了肝、肾、脑、肺、心及精巢。脂质过氧化有明显的上升说明了在肺，脑及肝中有硫巴比妥酸反应物质 (thiobarbituric acid reactive substances, TBARS) 的形成。这些研究揭示了脂质过氧化是镉污染早期的且敏感的反应。

当注入氯化镉达致癌剂量 (30 mg mol/kg) 12 h 时，鼠的精巢就出现了出血性损伤。此外，这一种群双丸状莱迪希细胞 (testicular Leydig cells) 中的脂质过氧化、Fe 组分及胞内生产过氧化氢的能力都显著地提高了 (Koizumi and Li, 1992)。而且，当谷胱甘肽还原酶及过氧化氢酶活性下降时，谷胱甘肽过氧化物酶活性上升。Fe 水平的上升可能是来源于铁在再分配从结合位点的置换，导致了 Fe 调控的脂质过氧化。这些结果支持氧化物如过氧化氢酶在靶标细胞群中刚开始发生致癌作用时起了重要作用。

Hudecova 和 Ginter (1992) 检测了天竺鼠在食用水中加入 1 mg Cd/只/天 后抗坏血酸对脂质氧化的影响。当镉与低量摄入抗坏血酸 (2 mg/只/天) 相结合时能提高肾，肝及血清中脂质过氧化 (脂质过氧化物酶) 的水平。高量摄入抗坏血酸 (100 mg/只/天) 能降低相同器官中丙二醛 (MDA) 的形成。抗坏血酸的抗氧化作用是综合的。抗坏血酸能综合镉或氧

化还原被镉替换的金属离子,以防止脂质过氧化。此外,抗坏血酸能提高或是减少其他的抗氧化剂如维生素E或尿酸。Hussain 等(1987)检测了鼠肝及肾中镉对超氧化物歧化酶(SOD)及脂质过氧化离体与体内的影响。醋酸镉在体内时能抑制SOD的活性,并提高肝及肾中脂质过氧化及脂质过氧酶的水平。离体的镉也能抑制这两个器官中SOD的活性。

而且,在这两个器官的新鲜的匀浆物中加入镉后,脂质过氧化能显著地上升。这结果说了无论是体内还是体外,镉有诱导脂质氧化的能力。然而,脂质氧化的上升是否是镉的直接影响效应,通过镉诱导是否能置换氧化还原金属离子或使谷胱甘肽下降,还有待进一步的研究。

在尿中脂质氧化的产物检测为评估在各种异生素下产生的脂类代谢及氧化胁迫,提供了一种方便,非入侵的手段。鼠尿中四种主要的脂类代谢物可以用高效液相色谱鉴定出,包括了乙醛、甲醛、MDA 和丙酮(Shara *et al.*, 1992)。近来的研究(Bagchi *et al.*, 1996)表明Sprague-Dawley 鼠在一剂口服剂量的 CdCl_2 (44 mg/kg) 后,尿液分泌物中的四种脂类代谢物明显地升高了。最初并不上升,直到取食了 CdCl_2 后24 h,在48 - 60 h 时出现最高峰。60 h时,尿液中的乙醛、甲醛、MDA 和丙酮比对照高了2.6、2.6、3.4、 2.8倍。这结果说明了 CdCl_2 能显著提高脂类代谢及氧化胁迫。

通过控制V79中国大颊鼠的纤维原细胞培养基中的Cd 浓度,一些细胞发展出对Cd 的抗性及对氧化胁迫的交叉抗性(Chubatsu *et al.*, 1992)。Cd 诱导下的细胞产生的抗氧化胁迫的交叉抗性与谷胱甘肽的量成正相关,可以扮演抗氧化剂与金属螯合剂两种功能。金属硫蛋白的含量看上去对经Cd 诱导过的细胞中的抗氧化胁迫没有主要的影响。

Chin 和Templeton (1993)说明了离体培养的鼠肾小球膜细胞,胞内谷胱甘肽的浓度与Cd 诱导的剂量及时间成正相关。结果说明了在Cd 诱导的细胞中谷胱甘肽的上升可以作为蛋白保护的机制,特别是在Cd 污染环境时谷胱甘肽含量会上升。然而,在高的Cd 浓度下,发生了谷胱甘肽损耗,可能是由于活性氧的产生速度超过了减少的谷胱甘肽重生的能力。

Li 等(1993)也检测了Cd 对胞内谷胱甘肽水平的影响。此外,这些作者研究了培养的3T3细胞,Cd 对胞内骨骼蛋白巯基的影响,及胞内骨架元素的组织影响,微管及微丝。在这些细胞进行镉处理时,导致了胞内谷胱甘肽水平及胞内骨骼蛋白巯基的上升与Cd 的量相关。在Cd 处理后,可观察到两阶段的反应,初期两种巯基参数的上升,但是,胞内的谷胱甘肽恢复后胞内骨骼蛋白巯基的量也恢复,说明了胞内的谷胱甘肽在调控胞内骨骼蛋白巯基时扮演了重要角色。

许多化学及物理胁迫能提高特定蛋白的合成(特别是胁迫或是热激蛋白)。人们认为这

些蛋白能抵抗胁迫或推迟合成的时期，因此它们可能作为环境污染及胞内受损的生物指示剂。Goering 等（1993）检测了在鼠中胁迫蛋白的合成是应对Cd 的反应。在用2 mg Cd/kg 饲喂鼠2 h后，能提高肝内70、90 和110 kDa 蛋白的从头合成，量最高时出现在2~4 h。基于两种生化测试及组织病理学的试验，说明这些蛋白的合成比肝内受损来得要早。此外，胁迫蛋白的合成看上去只发生在靶标器官如肝，在肾中缺乏证据或是胁迫蛋白的合成。

海拉细胞HeLa 和 HL60细胞经CdCl₂ 或亚砷酸钠处理时，导致了胁迫蛋白合成量的显著上升（Taketani *et al.*, 1989）。更多的研究说明在人类细胞中这些蛋白是血红素加氧酶，揭示了氧化胁迫是用于抵抗Cd 毒性的。Bauman 等（1993）用Cd 孵育肝细胞可诱导出70 kDa 的胁迫蛋白。在这些研究中Cd 也是MT的积累诱导者。Cd 比Ni、Hg、Zn 更容易诱导出70和90 kDa 的蛋白。Yamada 和 Koizumi（1993）的研究表明人类的外淋巴细胞能合成70 kDa 的蛋白，与MT截然不同。Cd 及Zn 都能诱导出这些蛋白，而Cu、Hg、Ni、Ag 也是MT的诱导者，但不能诱导出70 kDa 的胁迫蛋白。钴（Co）诱导出这一胁迫蛋白而非MT。这些差异的原因还未明确。胁迫蛋白的诱导可能与胞内抵抗机制相关。但是，诱导胁迫蛋白与自由基的产生的关系是很复杂的，因为已知的自由基产生者（Cu、Hg、Ni）并不诱导胁迫蛋白，然而，Zn 并不产生自由基，也不促进胁迫蛋白的形成。Wahba 等（1993）提出Se 能防止通过某种未明机制抵抗Cd 的致癌机制，众多的研究总结了Se 的保护效应。这些作者说明了Se 能防止急性的Cd 中毒，通过显著地提高Cd 的保持力而不是诱导MT 的产生。

2.1.3.4 引起线粒体结构和功能的改变

研究表明肿瘤坏死因子（TNF）、重金属离子镉等均可作用于线粒体，引起它的结构和功能的改变，从而引发细胞凋亡的发生。

镉主要通过以下几种方式引起线粒体结构和功能性改变：(1) 镉和巯基之间具有很强的亲合能力，而线粒体上含有丰富的 MT 和谷胱甘肽等含巯基蛋白(肽)。这一结构特点也就决定了它往往是重金属离子镉攻击的亚细胞靶部位。镉可以结合于线粒体膜的-SH 上，使得邻近的两个还原性的-SH 形成共价二硫键，而线粒体膜蛋白二硫键的形成被认为是镉诱导膜通透性增加的主要机制。同样镉在 MT 存在下也可以直接诱导活性氧自由基（ROS）的产生，ROS 又进一步发挥信使分子的功能引发线粒体与细胞凋亡相关事件发生。(2) 由于镉与钙的相似性，所以镉可以通过钙运输方式进入线粒体基质并与线粒体基质中的蛋白巯基结合，这一结合为镉进入所必需，并且伴随它们的结合是质子（H⁺）的流入以及氧化磷酸化的解耦联。(3) 镉还可以引起呼吸链上的某些重要蛋白如细胞色素等的氧化还原态

发生改变，并且线粒体上的一些关键酶也可被其抑制或激活。有研究表明，镉引起的线粒体氧化磷酸化的解耦联就是通过镉激活 Pi/H^+ 同向协同运输器 (synpoker) 促进 H^+ 的流入引起的。(4) 除此之外，也有研究认为镉引起的线粒体损伤主要是由其引起的基质酸化所致。

2.1.3.5 导致淋巴细胞活化过程受到干扰

一般而言，淋巴细胞活化过程中，抗原或有丝分裂原与淋巴细胞膜上受体结合，激活膜上 G 蛋白，进而活化磷脂酶 C (PLC)，后者水解磷脂酰肌醇二磷酸，分解生成肌醇三磷酸 (IP_3) 和甘油二酯 (DAG)。 IP_3 导致细胞内 $[\text{Ca}_2]_i$ 增加及活化蛋白激酶 C (PKC)，进而导致淋巴因子，如白介素-2 (IL-2) 产生和其受体表达，淋巴细胞活化。镉可能引起淋巴细胞内 $(\text{Ca}_2)_i$ 增加异常，同时影响钙调素 (CaM) 的含量和活性，而导致淋巴细胞活化过程受到干扰 (张铨等, 1999)。

2.1.3.6 其它

镉可以诱导许多早期应激反应基因的异常表达，如肿瘤抑制基因 $p53$ 。镉还可以影响细胞凋亡、死亡和增殖的有关基因和蛋白质的表达，镉引起的细胞凋亡、死亡和增殖之间的平衡是研究镉的毒性，尤其是慢性毒性和致癌性的一个重要方面。另外，镉也可以诱导除 MT 外其它一些应激反应蛋白如热休克蛋白 (HSPs) 的基因的表达。HSPs 的诱导同样也是机体的一种保护性反应，可防止或减轻镉引起的上述基因的异常表达，增加机体对镉毒性的耐受性。从剂量—效应、时间—效应关系上分析镉与各种基因表达的关系，有助于深入了解镉的毒性作用机制。

由上可见，镉的这几种作用方式实质上是互相促进互相作用，共同引起镉的毒性。

2.2 铅 (Pb)

铅是有害重金属，在人体内无任何生理作用，理想血铅浓度应为零。但随着工业、农业、交通、油漆及印刷工业的迅速发展，空气、水及食物中的生物链都不同程度地受到了铅的污染，长期的接触铅使人们对这种非必需元素的接触和吸收在逐渐增加，导致人体组织中的铅沉积 (袁宝珊和吴宜群, 1998)，累及神经、肾脏、造血、消化、内分泌等系统，直接危害人类的健康 (李静等, 2003)。由于铅应用的越来越广泛，人们对铅有关问题的研究也更加深入，本文针对铅污染的途径及其铅毒性做一综述。

2.2.1 铅污染的途径

2.2.1.1 环境铅污染

2.2.1.1.1 大气中铅的来源

包括自然来源和非自然来源，自然环境中的铅通过地壳侵蚀、火山爆发、海啸发生和森林山火等自然现象而释放入大气环境中（熊亚，2003）；非自然来源的铅主要是指来自工业和交通等方面的铅排放，工厂排出的“三废”为环境大气铅污染的主要来源，包括有色金属开采、冶炼、钢铁生产、铅的应用工业、燃煤、燃油、燃木材、垃圾焚烧、磷肥生产等。机动车使用含铅汽油致使其尾气中的铅直接污染环境，是城市铅污染的主要来源（任旭红和任旭华，1999），同时也是造成儿童铅中毒的主要原因（沈晓明，1998）。

2.2.1.1.2 居室装修造成局部环境铅污染

这主要是由于含铅油漆的应用越来越广，造成大量铅尘散布于周围环境中。使用油漆装饰墙面的家庭，儿童血铅水平显著高于没有进行墙面装修的家庭；家庭地面为不上漆的木质地板其儿童血铅水平最低；塑料地板家庭儿童血铅水平最高，后者铅中毒患病率为前者的3倍，地面为木板油漆的家庭儿童铅中毒患病率为34.8%，三者比较差异有统计学意义（秦税，1998）。这说明居室装修可造成儿童铅负荷的增加。

2.2.1.2 饮食中的铅

大气中的铅直接沉积到谷物和蔬菜中，过高的土壤铅污染谷物和蔬菜。室内铅尘污染厨房中的食物；以含铅油彩的器皿储存食物造成的污染。铅质焊锡制作的食品罐头、易拉罐对食物饮料的污染等，其中铅污染罐装食品的危害最大。WHO报道美国和澳大利亚等国80年代末期儿童摄铅量明显降低，其原因之一是那时这些国家正好采用无焊容器盛装儿童食品。

2.2.1.3 手—口途径

国外报告指出，咬手指和吸吮手指是儿童铅中毒的主要途径（Semerjian, 1993）。儿童多有啃咬、吸吮手指或非食物性物品的行为习惯，这类儿童铅水平可比无异食癖儿童高25%。学习用品和玩具中铅含量多是超标的，因而儿童很容易通过手口途径将铅摄入体内。

2.2.1.4 职业接触铅途径

接触铅最主要的作业场所为冶炼厂、蓄电池厂、印刷厂等。据文献报道，低浓度铅作业的女工的FEN（血游离原叶琳）、血铅、尿铅与对照组比较差异均有统计学意义（王贤，2000）。

2.2.2 铅的毒性

铅是广泛存在的毒物，最终可经呼吸道、消化道进入体内，可造成全身几乎所有组织脏

器的损害。

2.2.2.1 铅对神经系统的毒性作用

由于铅的神经发育毒性较为突出,所以目前主要集中在铅和神经发育关系方面的研究 (Chen and Golemboski, 1999)。儿童长期接触低浓度铅,可引起行为功能改变。常见的有模拟学习困难、空间综合能力下降、运动失调、多动、易冲动、注意力不集中、侵袭性增强和智商下降等(高代全和张书岭, 2001)。

2.2.2.2 铅对血液系统的影响

表现为小红细胞、血红蛋白过少性贫血及轻度溶血性贫血。这是因为铅通过对血红素合成中几种酶的抑制作用及红细胞膜的损伤所引起的。儿童贫血比成人更敏感,可出现面色苍白、心悸、气短、乏力等重症表现(熊亚, 2003)。

2.2.2.3 铅对肾功能的影响

Verberk 等人在1996年首次表明了环境铅污染能够引起儿童肾小管病变,且血铅水平越高,损害越严重。

2.2.2.4 心血管系统的影响

长期以来,人们认为心脏不是铅的靶器官,但有报道 (Kopp *et al.*, 1988) 显示,铅对心血管系统的影响是可以肯定的。铅可干扰心肌兴奋性,传导性和收缩性 (Cheng *et al.*, 1998), 诱导ROS (Ding *et al.*, 1998) 产生, ROS 使一系列 H_2O_2 、 $O^{\cdot -}$ 、 $OH^{\cdot}$ 组成反应氧族链,可使 NO 减少,血管平滑肌收缩,血压升高。

2.2.2.5 其他影响

母亲血铅对出生后小孩30个月内的婴儿精神发育指数 (MDI) 和婴儿运动发育指数 (PDI) 有负相关趋势,特别是24个月时的小孩存在显著的负相关(李光等, 2000),说明铅可对儿童的发育产生不良影响。

2.2.3 Pb毒性机理

目前普遍认为,铅中毒主要是由于卟啉代谢障碍所致,铅可与体内一系列酶和蛋白质的功能团配合,使相应的代谢过程受到影响,从而干扰机体许多方面的生化和生理活动。近年的研究表明,铅可诱发组织脂肪酸的改变及增加脂质过氧化(安琪等, 1998)。

2.2.3.1 Pb的氧化机制

Pb 在环境中重要的环境毒物,导致血液毒性,胃肠毒性及神经紊乱。长期接触Pb 能造成生殖损伤,高血压及肾病。而且, Pb 能减慢神经传导,改变Ca 的动态平衡,抑制酶

活性，刺激结合蛋白的生物合成。Pb 的主要污染源是：垃圾，水，油漆，化妆品，中药材，食物添加剂（Lockitch, 1993）。虽然Pb 不是一过渡金属元素，Pb毒性的主要影响是对高氧化反应产生催化。Donaldson 和 Knowles（1993）基于现有的证据，评论在铅下氧化组织的损伤，及改变脂肪酸的组成，氧化机制看上去与铅的毒性相关。Pb 到达肝时，在肝微粒体膜上过氧化氢及花生四烯酸含量与Pb 的量成剂量及时间相关（Lawton and Donaldson, 1991）。Ramstoeck等（1980）说明Pb 对鼠能造成乙烷的产生，脂质过氧化，而用维生素E 能防止脂质过氧化。

Pb 复合物对于鼠也能造成脑中脂质氧化的上升（Gerber *et al.*, 1978; Rehman, 1984）。以一定剂量三乙烯铅（1.75 mg/kg 体重每天）喂食5天能造成鼠脑前皮层脂质过氧化，最早出现在最后一次注射的第一天，最后一次注射后21天上升仍很明显。但是，通过过渡金属元素测定，海马趾膜及脑膜中的过氧化量没有增长（Ali and Bondy, 1989）。Pb 导致了组织中谷胱甘肽水平的上升，包括肝、肾及红血球。组织中谷胱甘肽的上升看上去是对改善Pb 中毒的一种补偿（Sarafian and Verity, 1991）。Pb 的毒性包括出现活性氧及氧化胁迫，与其他重金属看上去是相一致的。

2.2.3.2 铅对神经系统的毒性机理

在铅的神经毒性、血液毒性、肾毒性中，神经毒性更为重要。中枢神经系统是铅作用的主要靶器官，特别是低浓度铅对人体的毒性研究表明，铅对神经系统具有明显的影响。铅对神经系统的损害，包括影响血脑屏障、海马回、大脑皮质和小脑。据研究发现，血脑屏障非常容易受到铅毒性的损害，大脑内微静脉内皮细胞与铅的亲合力非常高，且它们储存铅的能力较大脑的其他部分也高，铅由于与大脑内微静脉内皮细胞结合而影响神经系统的传导。星形胶质细胞也是血脑屏障的主要结构成分之一，该细胞的主要作用是为维持血脑屏障的完整性而提供必要的信号，铅可能是首先引起星形胶质细胞的原发性损害，然后再引起大脑内微静脉内皮细胞的继发性损害，从而破坏了血脑屏障。铅对于海马回也有显著的影响。实验证明，给予哺乳期大鼠低水平铅处理，就会发现其海马回出现苔藓样纤维细胞、颗粒细胞层以及齿状回分子层联合区的细胞显著增大等。大脑皮质是控制动物和人的行为以及认知功能的部位，有资料表明，铅损害大脑皮质的部位可能在大脑皮质额前区，从而引起持续言语（或动作）症，注意力分散等临床症状和不能控制的不恰当的行为反应等。小脑则是负责姿势平衡的部位。若小脑受到损害时，所导致的临床表现为失衡症。

对于铅神经毒性的细胞、细胞内以及分子水平机制的研究，目前认为低水平铅的神经

毒性的各种发病机制都可通过一个最终的共同的通道而发挥作用。铅通过不同的细胞内水平的机制，包括电压启闭通道，第一、二、三信使系统，发挥着广泛的多样的生物学效应。有资料表明，发育过程中的成年大鼠在接受了中等水平铅的长期处理后，其胆碱能使视觉系统发生变化，乙酰胆碱酯酶（ACE）的活力有所下降。还有资料表明，多巴胺能系统、谷氨酸盐能系统以及 N-甲基-D-天冬氨酸受体复合物在学习能力以及记忆过程中起着一定的作用。这些系统受到铅的影响。因此，可以说明铅可能是通过第三信使系统而发挥影响儿童的学习能力以及记忆过程的。铅还可以取代钙而在第二信使代谢过程中起作用。“钙”起着多种细胞功能调节者的作用，而铅的许多神经毒性作用都可能与它对钙的作用的干扰而引起。铅对许多种神经毒性作用还可以通过第三信使系统而发挥着生物学效应。研究资料表明，铅作用于两种早期反应基因 *fos* 和 *jun*，引起 mRNA 水平的提高。铅还可以影响各种特异地依赖于各种金属离子的蛋白因子包括锌-脂蛋白和金属硫蛋白（MT）等，从而引起各种神经临床症状。

2.2.3.3 铅对血液的毒性机理

铅对血液的毒性可能是通过影响血红素的生化合成引起的。铅主要抑制血红素合成的两个主要的酶 δ -氨基- γ -酮戊酸脱水酶（ δ -ALAD）和铁结合蛋白的活性。另外，铅还可能增强 δ -氨基- γ -酮戊酸（ δ -ALA）合成酶的活性，从而导致 δ -ALA 的蓄积。在铁插入卟啉环之前，线粒体提供能量将三价铁转化为二价铁，而铅可干扰此供能过程。当缺铁时铁结合蛋白对铅毒性更为敏感，从而抑制造血功能，使铅对血液的毒性将会增加。综上所述，铅和缺铁影响造血系统的不同阶段，但缺铁性铅中毒引起的血液毒性（如贫血）比单纯性的铅中毒的毒性会增加。

2.2.3.4 铅对肾的毒性机理

肝脏和肾脏都是铅的主要蓄积部位，也是铅毒作用的主要蓄积器官。铅对肝肾组织具损伤作用（陈敏，2000）。脂质过氧化作用在铅肝肾中毒的过程中起着重要作用。另外铅也引起肝肾钙浓度升高，同时铅可使肝肾细胞损伤，使细胞外钙离子内流。

2.2.3.5 铅解毒及其防治

根据铅中毒指南，血铅水平可分为 5 级，通常是不同的血铅水平采用不同的处理方式。对于中度和重度中毒的血铅水平（200~700 $\mu\text{g/L}$ ），还需要治疗药物进行驱铅。

CaNa₂EDTA 是较强的络合剂，是医学上常用的驱铅药物。它可以单独对中度中毒直接

进行治疗，常采用的方法为肌肉注射法，有时为减少注射引起的疼痛，可以与普鲁卡因合用。对重度铅中毒的治疗， CaNa_2EDTA 常与二巯基丙醇（BAL）联合应用，并已取得较好的效果。驱铅治疗若采用 CaNa_2EDTA 与 BAL 联合应用时，首先将 BAL 在深部肌肉注射，然后持有较多尿量时，再用 CaNa_2EDTA 的生理盐水溶液或右旋糖酐溶液（0.5%）进行滴注，疗程为 5 天。 CaNa_2EDTA 的缺点是不能采用口服方法，口服不但不能驱铅，反而会增加铅的吸收。更令人遗憾的是， CaNa_2EDTA 可能会影响肝、肾的功能，因此，在治疗过程中应对肝、肾的功能进行监测，同时还应注意微量元素的丢失或电解质的平衡，否则会引起微量元素的缺乏或电解质的不平衡。

尽管 CaNa_2EDTA 可以驱铅，但它不能口服。于是有人推荐使用以下 2 种方法：一是口服整合剂二巯基丁二酸（DMSA），另一种方法则是增加膳食钙的摄入。DMSA 是第一个正式被美国国家食品和药品管理局（FDA）批准治疗铅中毒的口服药物。它与传统的驱铅药物 CaNa_2EDTA 和 BAL 相比，具有一定的优越性。首先，DMSA 给药比较方便，无需静脉或肌肉注射，易为铅中毒患者所接受。第二，DMSA 能选择性排铅，与铅结合成水溶性络合物从肾脏排出。第三，DMSA 可以逆转铅诱导的免疫毒性；最后，使用 DMSA 排铅的患者不需住院治疗，能降低患者的费用；尽管 DMSA 可以驱铅，但在完成 5 日疗程给药以后，与 CaNa_2EDTA 驱铅的结果类似，血铅同样会出现反弹现象，因此，临床医生常采用在常规给药 5 日以后，再维持给药 2 周，以助于减少血铅的反弹现象。

研究资料表明，膳食中摄入钙可有效的降低铅的肠道吸收。但要达到膳食钙对铅吸收和毒性的预防作用，钙的摄入量需要达到甚至超过 1500 mg/L。我国在用膳食钙拮抗铅的吸收方面也有研究，在这次研究中，其结果显示，钙治疗组血铅下降幅度（75 $\mu\text{g/L}$ ）远大于安慰剂组（35 $\mu\text{g/L}$ ）。在治疗过程中两组患儿均未出现肝肾功能异常、高尿钙症及其他不良反应。因此，可以初步说明增加膳食钙摄入可减少铅的吸收，是减低内源性和外源性铅毒性的一种补充措施。

应用金属硫蛋白（MT）来驱铅和预防铅毒性可能是未来的最好方法（陈敏，2000）。MT 与重金属 Pb 之间的相互作用，很早就引起科学家们的注意，特别是应用 MT 解 Pb 毒，已引起了人们的极大兴趣。因为 MT 本身是机体金属中毒应激体系的天然组分，对人体无毒。它不仅不会引起锌的流失，相反 Zn-MT 还可作为一种高效的生物补锌剂。在 MT 的研究中，早期有人报道 Pb^{2+} 能诱导中国仓鼠卵母细胞（CHO）细胞系 MT mRNA 水平的提高。在现场实验中还发现，在接触 Pb 的工人血液中 Pb 浓度与 MT 水平呈正相关性，而且浓度 Pb^{2+} 中毒患者红细胞中超过 70% 的 Pb 与一种性质与 MT 极为相似的蛋白结合，但 Pb

诱导体内合成 MT 的能力并不强,大鼠皮下注射乙酸铅 6 h 后含 Pb MT 就逐渐减少直至检测不到。这些都说明 MT 在体内 Pb 的运转、代谢和解毒方面可能具有重要的作用。最近的体外实验证明, apo-MT 与 Zn-MT 结合 Pb 的能力是相当的,同时,由于 Pb-MT 的亲合力 (K_0 为 8.71×10^{-7} mol/L) 比较高,而且 Pb-MT 结构的不稳定性,使得 Pb-MT 的体内半定期相对较短,如果能使 Pb-MT 迅速排出体外,相信 MT 可能是一个比较有前途的预防和治疗铅中毒药物。总之 MT 可以作为体内转运和促进排 Pb 的有效“载体”,如果结合其他驱 Pb 药物,MT 在 Pb 中毒的防治方面会有一定的应用前景。最近几年,有人还对 MT 在大鼠体内排铅作用进行了研究(吴怡和杨华平,1998)。实验结果表明,MT 可加速铅在体内的排泄,可降低组织及骨内铅浓度,抵抗铅中毒引起的巯基值下降,可对铅中毒起防治作用、是值得推广使用的新一代解毒剂。然而,在应用 MT 解 Pb 毒方面,还有许多问题需要解决。首先,Pb-MT 在体内的代谢动力学是需要解决的主要问题,这包括 MT 的吸收部位、MT 的吸收率,Pb-MT 在体内的半衰期、排泄率和排泄途径等。其次,Pb-MT 对 MT 各亚型在解 Pb 毒功能方面的研究结果还不一致。有人报道, apo-MT-I 和 apl-MT-II 与 Pb 的结合方式各不相同、但也有人得出相反的结论,认为两种亚型与 Pb 的结合能力并无显著差异。另外, MT-铅的剂量关系也是人们需要探讨的问题之一。特别令人感到遗憾的是,还有人通过实验证明,MT 在体内不具有排 Pb 功能等,这些都迫使人们需要进一步研究 MT 与 Pb 之间的相互作用。

2.3 汞 (Hg)

Hg 根据 Mercury 行星命名的。它早就被古代的中国人和印度人所熟悉,而且人们在公元前 1500 年的埃及坟墓中已发现它。15 世纪晚期它曾经被用来治疗当时欧洲流行的梅毒,但是 19 世纪广泛的论述开始否认其医疗作用,而强调其毒性。

从 20 世纪 20 年代到 60 年代,一个日本的化工厂用汞作催化剂进行乙醛和氯乙烯的生产。氯化甲基汞随着工厂的污水被排放到九州南部的 Minamata Bay。它在 Shiranui 海浓缩,在那儿它被浮游生物和其他微生物吸收,然后随着水生食物链积累(Harada, 1995)。鱼积累甲基汞没有显示重要毒性,但是人和动物却是不幸的,因为他们面临一个新的中枢系统疾病—水俣病。在 1956 年 5 月,4 个工厂的工人出现脑损伤,并被推定是一个传染性病因。当更多的人产生相似的症状以后,各种不正确的诊断被提供。在 1956 年 8 月,水俣病的致病因子被初步确认为是工厂排放物中的重金属。在 1959 年 10 月,甲基汞被证明是致病因子,在 60 年代早期,这个工厂被强迫修改处理办法。不幸的是这个工厂和其他化学工厂继

续倾倒未处理的无机汞。

在 40 年里近 150 吨的甲基汞被排放到 Minamata Bay。这个污染的有害性最初没有被认识到，也许是因为甲基汞通过血脑屏障和胎盘屏障的能力没有被完全弄清。在 20 世纪 60 年代和 70 年代期间，研究发现，如果母亲取食被污染鱼之后，其子女会发生慢性脑损伤、智力迟钝、发育混乱、肝疾病、高血压和代谢匮乏等。在子宫内汞的出现将使婴儿有舞蹈病、共济失调、震颤和抓挠等症状。

水俣病的第二次流行发生在日本的新潟。在那儿来自 Agano 河的鱼具有高水平的汞，原因是工业的汞化合物排放到河里。汞污染鱼的事件也在加拿大发生；汞污染谷物的事件在伊拉克、巴基斯坦、加纳和危地马拉等国家被发现。在 1959 年、1960 年和 1972 年大约 6000 个伊拉克人在吃了由甲基汞处理的谷物制成的面包之后得病住院 (Bakir *et al.*, 1973)。在子宫内接触汞的 15 个伊拉克婴儿发育也不正常，类似于水俣病的情况。在 1969 年的美国新墨西哥州，一个家庭（有一个怀孕的妇女）在吃了由汞杀菌剂处理的谷物饲养的猪之后，汞的毒性被报道。最近关于墨西哥生产的奶酪 (Crema de Belleza—manning) 被食用后引起的汞中毒已经报道许多，这种奶酪含有 6%~8% 氯化汞。当前汞的工业用途是电池、蓄电池和灯泡中氯化钾的生产。汞也被用作油漆或涂料中的防污剂、纸生产的杀黏菌剂、器械工具的工作流体、农业杀菌剂、塑料生产的一种催化剂。在汞合金牙齿的生产中，汞被用作杀菌剂。

2.3.1 毒性病理生理学

汞以三种化学形式发生：(1) 不起化学反应的元素汞，以蒸汽或液体存在；(2) 无机汞盐或矿物；(3) 有机汞剂。无机汞剂包括氯化汞、碘化汞、氧化汞和硫化汞等。有机汞剂包括甲基汞、乙基汞、汞溴红、硫柳汞和苯基汞盐。各种形式的汞在环境中可以互相转化，与各类型的汞接触能对身体各组织产生毒性。汞的毒性由汞剂的摄取、吸入、注射或皮肤吸收产生。

汞剂被吸引到巯基群上，并结合到膜蛋白和酶上。短链烃基汞剂（如甲基汞和乙基汞）刺入血红细胞并结合到血红素上。甲基汞作为有机汞在红血球中浓缩，无机汞却不这样。当汞在神经细胞的溶酶体、致密体中被吸收后，元素汞和甲基汞很快穿过血脑屏障。蒸汽汞的污染比无机汞的污染引起更高的脑中汞浓度。

Hg 导致了在肾脏管道中谷胱甘肽的耗尽，也造成 SOD、CAT、谷胱甘肽过氧化物酶活性的降低，这些酶能保护细胞免受超氧化物阴离子及过氧化氢的高氧化作用。但是肾毒

性可能来源于汞所产生的膜结构完整性的改变，从而使抗氧化物的形成及抗氧化剂抵抗机制发生混乱。

Hg 的毒性及它应对消耗自由基的能力未有过相关研究 (Goyer, 1991)。Hg 的无机、有机形式均能产生毒性，包括了神经毒性，肾毒性及肠胃中毒如溃疡和出血。最早的污染来自于环境污染中的开矿，熔炼及工业废弃物，包括吸入及食物链 (Goyer, 1991)。自由巯基数的下降导致了氧化胁迫的形成，器官的损伤。氯化汞引起鼠急性肾衰竭 (Gstraunthaler *et al.*, 1983)。

鼠肾脏中的脂质过氧化发生于鼠处理后 12 h (Fukino *et al.*, 1984)。维生素 C 和 E 在 12 h 后也可在肾中检测到。当鼠预先用 Zn 处理后，肾中的脂质过氧化下降，且伴随着谷胱甘肽量的上升。当鼠预先用硫醇解毒剂二巯基丙磺酸钠 (DMPS) 和 D-青霉胺 (PA) 预先处理后，再用 Hg 处理，在抵抗汞诱导的脂质过氧化时，肝与肾中巯基都可起保护作用，而肾中只有 PA 起了作用 (Benov *et al.*, 1990)。在离体的试验中，相同的研究表明这两种解毒剂都能作为氧自由基的清除剂及脂质过氧化的抑制剂。但是，PA 更为有效。但是这些螯合剂的抗氧化活性对于金属的解毒是有益的。

鲑鱼经氯化汞 (HgCl_2 , 0.20 mg/l) 处理 30 d 将导致肝，脑，肌肉中脂质过氧化的显著上升 (Bano and Hasan, 1989)。当对鼠肾进行离体孵育时，在辅酶 Q - 细胞色素 b 区 (可被抗霉素 A 抑制)，NADH 脱氢酶区 (可被鱼藤酮抑制) 过氧化氢酶将会明显地上升。伴随的，在 NADPH 脱氢酶酶区与离子浓度相关的脂质过氧化有 3.5 倍的上升，而在辅酶 Q - 细胞色素 b 区仅有少量的上升 (Lund *et al.*, 1991)。此外，线粒体中谷胱甘肽还原酶的浓度随着 Hg 的浓度及孵育的时间而下降。然而，在低浓度 (12-30 nmol/mg 蛋白) 时，线粒体中的 Hg 耗尽，在影响了电子呼吸链的条件下，过氧化氢的形成上升。过氧化氢的上升导致了氧化组织的损伤，包括了脂质过氧化，及汞诱导的肾毒性。

Lund 等 (1993) 也说明了 Hg (II) (1.5 or 2.25 mg HgCl_2 /kg) 能导致过氧化氢形成量的上升，谷胱甘肽的耗尽，及肾中脂质过氧化的上升。而且，Hg (II) 能诱导线粒体中 Ca 的动态平衡的改变。这些结果揭示了 Hg (II) 能影响过氧化氢的形成，主要是在线粒体呼吸链中的辅酶 Q - 细胞色素区，与先前的结果相似 (Lund *et al.*, 1991)。这些影响的结合导致了氧化胁迫，产生了肾毒性。

Tan 等 (1993) 也显示了 Hg 可改变 Ca 的动态平衡。Ca 能激活水解酶，包括蛋白酶，核酸内切酶和磷脂酶 (Nicotera *et al.*, 1990; Reed, 1990; Farber, 1990)。用鼠的 T 淋巴细胞，调查者说明了甲基汞能引起胞内 Ca 的上升，通过 Ca 从胞外流入及胞内 Ca 的积极贮存。然而， HgCl_2 要提高胞内 Ca 的含量只能通过 Ca 从胞内介质中流入胞内。从而，有机与无机汞

能改变Ca的动态平衡,但其机制是不同的。与汞相关的氧化膜伤害及活性氧是否与Ca的流入及贮存有关仍有待研究。老鼠经Hg、Cr或Ag处理能造成肝及肾中丙二醛(MDA)产量的提高(Rungby and Ernst, 1992)。在肾中MDA的水平在60 min内保持持续上升,之后恢复正常。在肝中48 h后MDA开始上升。此外,脂质过氧化及毒性的相互作用可从无机汞和四氯化碳中检测出来。保护性巯基的耗空及过氧化氢产量的上升与四氯化碳的代谢活性相结合,能起到协同增强效应。在Cr或Ag中预先处理后,并不能迅速耗尽巯基且及增强线粒体中过氧化氢的产量,也不能提高四氯化碳(通过测定MDA的含量来计算)的毒性。这些差异的原因还未知。

与其他金属诱导的氧化胁迫相似,在食物中添加高量的维生素E能保护因氯化甲基汞诱导的肝脏脂质过氧化,提高依赖硒的谷胱甘肽过氧化物酶活性(Andersen and Andersen, 1993)。但是,食入过量的胡萝卜素并不能提供保护,且对谷胱甘肽过氧化物酶的活性也没有影响。维生素E与胡萝卜素的差异可能与氯化甲基汞分布及特殊作用位点的效应有关。DNA损伤与体内醋酸汞的水平有关(Williams *et al.*, 1987)。这些研究者观察到在人口腔上皮癌细胞(KB)在培养时,dUTPase和DNA聚合酶的活性受到抑制,DNA尿嘧啶的糖基化酶活性与DNA单链打断的诱导及细胞生存能力相关。

LeBel等(1992)检测到甲基汞能通过Fe调控氧化损伤以达到神经毒性。鼠脑中氧化物的形成可由氧化的荧光探针的倍率来测定。腹腔内注射入甲基汞后(5 mg/kg IP),活性氧形成量的上升,而预先注入去铁敏(Desferrioxamine, DFX; 解毒药)(500 mg/kg)可以阻止这种效应,DFX可以看作是一种螯合剂或是自由基清除剂(Shaw and Jayatilleke, 1987)。这些发现揭示了Fe在甲基汞造成神经毒性是能催化氧自由基产生,支持了在氧化损伤时能异地使用DFX。当鼠的颗粒细胞用甲基汞孵育时,细胞的损伤与时间及剂量相关(Sarafian and Verity, 1991)。当在甲基汞诱导的细胞中加入螯合剂如乙二醇四乙酸(EGTA)、DFX和氰化钾(KCN)时,可起到蛋白保护的作用,而加入维生素E与EDTA时则无效果。作者解释说这一结果揭示了氧化过程对于分离出的脑粒状神经元甲基汞的胞内毒性有作用。但是,缺乏蛋白保护(维生素E和EDTA)就出现了这一问题。如果包括了氧化过程,由Fe和其他阳离子产生的氧化自由基能对胞内毒性和甲基汞产生作用。甲基汞能导致阳离子从结合位点上的置换,造成了Fe或其他阳离子形成的接触反应的积极分子。

Suda等(1991)检测到通过体外的氧自由基产生系统,甲基汞与乙烷汞变为无机汞。抗坏血酸铜、黄嘌呤次黄嘌呤氧化酶、EDTA-Fe,可产生羟氢氧自由基。所有的甲基汞和乙烷汞都被这三个系统降解。降解看上去与超氧化物阴离子及过氧化氢过氧化物的产量无

关，揭示了羟氢氧基分子是氧自由基对有机汞两种系统中的根本反应。

2.3.2 症状学

重金属毒性可以以多种方式出现，但主要由重金属的污染形式和化学形态决定。由于在细胞内有机汞和无机汞之间的转化，往往形成复杂的毒性症状。

汞蒸汽的吸入非常危险，它几乎完全被吸收，且 75% 被保留。汞蒸汽被吸入后的主要目标器官是脑、肾、胃肠道和肺。如果人接触几小时，可能会引起咳嗽、呼吸困难、胸闷、寒战、发烧、虚弱和胃肠不适。ARDS 可能被发现，接着可能会引起周边神经病和肾亏。

元素汞被肠吸收很少，几乎完全从粪便中消除。总之，元素汞的摄取相对无害。但是当肠胃蠕动降低或漏管时元素汞被吸附在肠内，这将延长肠黏膜对元素汞的接触，并增加生物转化和汞的吸收。相反，无机汞盐对胃肠道具有强的腐蚀性，通常被贮存在卷绕的肾小管内 (Giunta *et al.*, 1983)。容纳汞盐的圆盘屏障 (disk battery) 偶然的摄取能引起黏膜腐蚀和汞的毒性 (Mant *et al.*, 1987)。

肢端痛是超敏性的一种特殊形式。当小孩接触在尿布粉中的氯化汞下时，它可以发生；当小孩摄取有机汞盐或吸入含有元素汞和羟基汞复合物的工业或农业蒸汽。慢性接触油漆中的汞杀菌剂蒸汽中或重复的 γ -血球素（汞为基础的细菌抑制剂）中能导致肢端病。肢端病的综合症状包括手掌和脚底发红、手和脚浮肿、脱落的皮疹、脱发、发汗、心动过速、高血压、畏光、易怒、厌食、失眠、较差的肌肉颜色、便秘或痢疾。

有机汞污染的毒性可以被延迟几周至几个月，并且以消化系统和中枢神经系统的症状最为显著。乙基汞和甲基汞毒性特别大，因为它们完全被消化道吸收，并且被慢慢分泌，穿过胎盘屏障，最后在胎儿和母乳中集中。

2.3.3 系统报道

汞毒性的主要靶标器官系统是神经系统、肺部系统、消化系统、泌尿系统和造血组织。

2.3.3.1 中枢神经系统

已报道的汞对中枢神经系统的毒性引起的症状包括过敏性、易怒、疲乏、失眠、头疼、有限的视野、听力损失、下降的认知功能、混乱、无生气、震脑电图减慢、构音障碍和共济失调等。甲基汞能引起的症状有包括含糊、多涎、喊叫、吞咽困难、盲点、神经衰弱症、性欲丧失、抑郁、幻觉、舞蹈病、手足徐动症、肌阵挛、瘫痪、昏迷和死亡。

2.3.3.2 周围神经系统

汞对周围神经系统的毒性表现在：无力、萎靡不振、周围神经痛、痉挛状态、感觉异

常和非正常的反射。

2.3.3.3 肺部

元素汞的吸入可能引起咳血、苍白病、肺炎和呼吸窘迫。尽管进行了整合治疗，但接下去会引起永久性肺损伤。汞蒸汽对肺部的刺激可以引起间质性肺炎、细支气管炎、肺出血、气胸或肺浮肿。

2.3.3.4 消化系统

在口中重金属的体验是口渴、恶心、呕吐、痢疾、异常的疼痛和厌食。汞和汞盐对眼、皮肤和黏液膜有腐蚀性，从而引起吐血、便血、下坠、口腔炎、过量分泌唾液、血痢疾、大肠炎和肠黏膜的坏疽。接下去会引起脱水和心血管崩溃。报道修复牙齿的汞合金引起口腔炎，汞蒸汽的吸入会引起齿龈炎。汞盐的慢性污染会引起牙齿疏松。

2.3.3.5 泌尿系统

无机汞主要通过肾被排泄。蛋白尿、血尿症、糖尿、少尿症、尿毒症、肾小管损伤和急性肾衰竭可能发生。使用汞制的药膏和汞剂可能会造成肾病综合症和肾小管酸毒症。

2.3.3.6 造血组织

血小板减少症和贫血症可能发生。白血球减少症和嗜曙红细胞过多很少发生。

2.3.3.7 皮肤病学

静脉内或皮下注射汞产品可能会造成栓塞和并发的脓肿。局部用汞剂会造成灰色或蓝黑的色素沉着在皮肤上，可引起风疹、湿疹、皮肤灼伤、接触性皮炎、脓疱或瘀斑。

2.3.3.8 胎儿

汞能穿过胎盘，这将对正在发育的胎儿具有很高的毒性 (Davis *et al.*, 1994)。严重的脑损伤、智力迟钝、痉挛、大脑性麻痹、舞蹈症、手足徐动症、共济失调、震颤、白内障、听觉障碍、身体变小、贫血和肾功能不良等都可能随着子宫接触汞而发生 (Davis *et al.*, 1994)。对汞中毒并怀有胎儿的病人用 X 线断层摄影术进行观察，发现脑室增大、小脑发育不良、简化的回旋模式和皮层及皮层下的损伤。很多病例显示小脑的粒状层明显发育不全。有机汞还可能引起畸形精子症。

2.3.4 诊断

目前对汞毒性的诊断研究已经开展了许多。血和尿中汞的水平可以被测定，但是，血中的汞是快速流动转移的，所以血中的水平作为汞过多的指示剂并不总是可靠的。尽管如此，血中的水平被建议用于急性中毒，因为血中汞水平的升高先于尿中汞水平的升高；血

中的水平还被建议用于被怀疑的有机汞中毒，因为大部分汞是被排泄的。尽管吃过海产品 2—3 天之后血中汞的水平升高了，但正常血中汞的水平很少超过 1.5 $\mu\text{g/dL}$ 。尿中汞的水平具有不连续性、不一致性和不可诊断性。在 24 小时内尿中正常分泌的非整合汞很少超过 50 μg 。尿中汞的水平超过 300 $\mu\text{g/L}$ 以上症状才会明显。样品的收集应当用不含重金属的玻璃器皿。

射线照相被用来证明汞的出现和转移，被用来评价胃灌洗的潜在好处。如果呼吸道被涉及，胸部的射线照片可能有帮助。能量弥散 X 射线荧光 (Energy-Dispersive X-Ray Fluorescence, EDXRF) 被用来测定汞的毒性数量。即使一根头发丝也可以用 X 射线荧光进行评价。

2.3.5 治疗

治疗包括去除汞的进一步累积、净化和整合治疗。在急性汞蒸汽中毒时，血管内输液、升高血压的物质和电解液的置换可能被需要。胃的灌洗已经被建议用于急性有机汞盐的摄取，特别是在腹部照片中可以看见汞时。皮肤上汞的复合物应当用肥皂和水洗掉。元素汞引起的皮下脓肿应当进行外科排水。

整合剂应当用来治疗症状性病人，整合治疗的时间应当有汞的水平决定。当危急的病人被怀疑是汞中毒时，不管被推测汞的形态如何，整合治疗应当率先被进行。但是在颠倒了慢性有机汞和慢性元素汞的毒性时，整合治疗可能是无效的。二巯基丙醇 (BAL)、D-青霉胺、N-乙酰基-D,L-青霉胺、二巯基丁二酸 (DMSA) 和二巯基丙磺酸钠 (DMPS) 等整合剂已经被利用。

传统上，汞中毒常用口服青霉胺和 BAL 进行整合治疗。BAL 现在被显示对甲基汞的毒性治疗不当，因为它实际上增加了脑中汞的水平，恶化了中枢神经系统的症状。N-乙酰基-D,L-青霉胺在甲基汞毒性中能降低血液和脑中汞的水平，能增加泌尿系统和排泄系统对汞的排泄。DMSA 被报道是有效的，它能降低组织中的水平，能提高对无机汞盐和有机汞盐的排泄。DMSA 优于 N-乙酰基-D,L-青霉胺，并且 DMSA 几乎完全能够抑制人的红细胞和肝细胞对甲基汞的吸收 (Ding and Liang, 1991)。在欧洲，DMSA 被广泛应用，已经被用于治疗汞蒸汽的暴露、静脉内的暴露、无机汞盐的摄取和腹膜暴露。相对于 D-青霉胺和 N-乙酰基-D,L-青霉胺，DMPS 在清除汞中毒病人血中的汞方面是最有效的。这一点在 1960 年的伊拉克汞灾难中已经被证实。有时候汞可能留在肠中，这就需要外科切除。汞引起的胃肠疽也需要外科切除。

2.4 铜 (Cu)

尽管铜是一个必需微量营养元素,但是过多的吸入也会引起中毒。如来自铜制容器带来的饮料污染,伴随的症状有:恶心、腹泻、黄疸、血红素尿、血尿症、无尿症和少尿(Chuttani *et al.*, 1965)。慢性铜中毒可能会比急性中毒引起更多的关注。因为铜在肝脏的逐渐积累会导致肝损伤、极端的病例和死亡。慢性铜中毒少有发生,反映了高效率的自我调控机制。如肠吸收和胆汁分泌使组织铜浓度维持在一个较低的范围。但是铜中毒在一定情况下会显现出来。这些情况要根据物种、遗传、年龄和食物而定(Bremner, 1979)。例如铜吸入的增加而胆汁铜分泌未增加的绵羊特别容易铜中毒。然而猪对铜有耐性以至于250 mg Cu/kg的食物都能刺激生长。新生的奶养动物比成年的更容易中毒。也许是铜吸收率高和未成熟的胆汁分泌机制。这可以解释铜诱导肝硬化如印度儿童肝硬化(Tanner, 1997)。铜中毒也有遗传的原因,例如人类Wilson 疾病的发生是因为铜转移蛋白表达的失败,特别是在肝(Bull *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994)。不同动物品系对铜耐性也有差异,例如绵羊(Woolliams *et al.*, 1983)。也就是说一些个体特别容易铜中毒。上面这些表明,对铜敏感性的差异主要是铜吸收效率和铜分泌效率的差异引起的,但其它因素也有涉及,如硫、其它金属和影响保护因素因子。例如,在食物中加锌能通过限制和调节铜在肝的积累和分布来阻止绵羊铜中毒,同样也可以阻止Wilson 疾病(Bremner, 1979)。增加肝毒素生物碱(危及肝功能)可以减少绵羊对铜的耐性。然而增加抗氧化剂(如 α -生育酚)的吸入可以保护老鼠免受铜的毒性(Sokol *et al.*, 1990)。其它重要的因素包括铜在肝脏内的分布,特别是溶酶体积累、金属硫蛋白的发生(Bremner, 1987)和铜运转因子的表达(Bull *et al.*, 1993; Wu *et al.*, 1994)。

2.4.1 铜中毒的诊断症状

慢性铜中毒的症状是变化的,并且在种间变化。对于相对耐铜的猪来说,过多的铜吸入最后将导致反应迟钝、衰弱、呼吸困难、贫血和黄疸,伴随着肺部浮肿和胃及食道的溃疡(Allen and Harding, 1962)。老鼠也相对耐铜,但是取食含 > 500 mg/kg 铜的食物时,生长被损害和肝细胞发生坏疽。肾小管上皮细胞也有大量的坏疽发生。但是随着肝的再生老鼠能适应铜暴露,并且肝内的铜浓度最后下降(Fuentealba *et al.*, 1989; 1993)。相反,即使食入相对低浓度的铜(<25 mg/kg)绵羊也会铜中毒,并且分两个时期(Bremner, 1979)。第一个时期没有明显的中毒症状,取食量和生长率正常。血液中的铜浓度无变化或稍微升高,但是血浆中肝特有的酶浓度升高了。这是一个在肝内逐渐的大量积累的过程,浓度会增加到

1000 mg/g 干物质。这将导致肿胀的含铜肝脏巨噬细胞的坏疽 (Ishmael *et al.*, 1971; 1972)。疾病的第二个时期发生比较突然, 一般被称为溶血性危象。主要诊断症状包括黄疸、厌食、干渴和血色素尿 (Ishmael *et al.*, 1971; 1972)。血液中的血色素和谷胱甘肽浓度在几天内迅速下降, 血液中高铁血红蛋白浓度暂时增加。动物通常在几天内死亡, 但是一些仍然可以存活。这些症状的开始伴随着铜从肝脏释放和血液铜浓度的大量增加。血浆中肝特有酶的活性增加的更多, 伴随肝降解、坏疽发生、致炎细胞发生和胆栓发生。这时肾铜浓度明显增加, 并有相当大的肾损伤、坏疽和肾小管线粒体酶活性的损失。铜中毒动物肝的超微结构观察表明光滑内质网膨胀、空泡逐渐增加 (King and Bremner, 1979)。空泡最初包含非降解的细胞成分, 但是当他们成熟和溶酶体继续降解, 它们的成分获得电子密度残留体 (包括颗粒物质、脂滴和铜) 的特性。肝中铜的浓度增加时, 细胞缺失和凋亡小体的发生的机率也跟着增加。

2.4.2 铜在肝内的分布

铜中毒的一个重要的特征是铜在肝内明显的积累。但是, 铜在肝内的分布也非常重要, 这关系到亚细胞分布和铜的离子形式。铜在肝内的积累不总是肝损伤的原因, 因为即使新生儿肝内铜浓度很高, 也不会有肝问题。铜在肝内的分布及与特殊的结合蛋白的结合根据物种、年龄、遗传和铜暴露时间而定 (Bremner, 1987)。

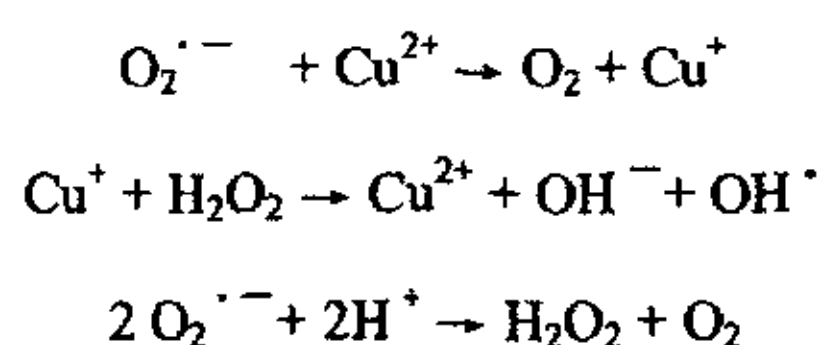
正常条件下, 大部分肝内的铜在细胞质, 但是当随着铜的积累, 在微粒部分的比例增加, 主要是核和溶酶体。溶酶体积累可能联系着铜诱导的细胞自我吞噬作用, 并被看作是解毒过程的一部分和金属胆汁分泌的前奏 (虽然铜胆汁分泌也有非溶酶体路径)。溶酶体铜积累已经在婴儿 (Goldfischer and Bernstein, 1969)、贝得灵敦厚毛犬 (Johnson *et al.*, 1981)、Wilson病人 (Goldfischer, 1967) 和积累铜的老鼠 (Haywood, 1985) 被报道。但是, 因为铜组织化学染色的困难和通过肝匀浆液差异离心法从核内分离含铜溶酶体的困难, 对一些溶酶体定位的声明表示怀疑。例如在密度梯度离心前用洋地黄皂苷来溶解溶酶体的膜显示胎鹿肝内的铜不是在溶酶体, 而是在核区。但是X-射线微分析 (X-ray microanalysis) 积累了铜的老鼠肝证明铜出现在溶酶体和核子 (Haywood, 1985)。尽管溶酶体数量增加, 多样性增加, 但是没有溶酶体裂解和瓦解的证据。相反, 有人报道铜通过脂质过氧化反应损伤溶酶体膜。但是在离体核内铜的积累确实影响了DNA (Bryan and Frieden, 1967), 抑制了RNA聚合酶的活性 (Novello and Stirpe, 1969)。因此, 铜的细胞毒性影响已经导致核组织破坏, 并以凋亡小体和噬菌作用的形式处理坏疽。

2.4.3 铜在肝内结合体的形成

蛋白涉及铜在肝内的积累。金属硫蛋白起了一个重要的作用，并且它可以被铜诱导在肝内合成，主要是通过诱导增加基因转录的过程（Bremner, 1987）。锌对金属硫蛋白提前诱导可以减少铜对组织培养的肝细胞的毒性（Liu *et al.*, 1991），并且无金属硫蛋白老鼠的肝细胞比正常的肝细胞对铜敏感。抗铜的肝细胞瘤细胞系具有高的金属硫蛋白表达水平，这主要是转录率和基因复制数量的增加引起的（Freedman *et al.*, 1989）。在这些铜抗性细胞许多铜与金属硫蛋白结合。但是，在肝中并不是总这样，因为结合铜的金属硫蛋白的含量从< 5%到> 80%变化的。在铜积累的猪（Mehra and Bremner, 1984）和贝得灵敦厚毛犬（Johnson *et al.*, 1981）中大多数的肝铜被结合在细胞质和微粒部分（包括溶酶体）的金属硫蛋白。但是如果猪缺少锌，结合在金属硫蛋白的铜将非常少。这种对锌的依靠也被应用到羊和牛，因为结合到金属硫蛋白的铜数量是肝内锌含量和铜锌比例的一个功能；一般在肝内只有少量的铜结合到金属硫蛋白（Bremner, 1987）。铜的摄入可以诱导肝内金属硫蛋白的合成。但是，如果肝内积累的铜来自食物摄入，直到肝内浓度达到500 mg Cu/g 这个阈值才诱导金属硫蛋白，甚至之后只有小比例的外加铜结合到金属硫蛋白（Bremner *et al.*, 1986）。已经证明老鼠对铜的适应与铜从肝到肾的转移及金属硫蛋白结合量增加有关（Evering *et al.*, 1991）。但是LEC (long-Evans Cinnamon)大鼠对铜的毒性极端敏感与金属硫蛋白能为铜的肝中毒提供保护有差异。年龄在4个月以下的LEC 老鼠快速在肝内积累铜并很快发展为爆发性肝炎，肝的损伤比其它实验室的其它老鼠都严重，然而LEC 老鼠肝内的铜大部分结合在金属硫蛋白上（Sugawara *et al.*, 1992）。可能在LEC 老鼠中铜的肝毒素影响与非重金属部分或大多数金属硫蛋白出现在细胞质有关。

2.4.4 铜的毒性机理

许多铜过量的病理影响与膜或大分子的氧化损伤相关。作为氧化还原的金属活性因子，铜离子能通过Haber-Weiss反应催化羟基氢氧基自由基的形成：



主要通过DNA 损伤产物的分析、芳香羟基化反应的研究和电子自旋共振（electron-spin resonance spectroscopy）证明羟基氢氧基自由基的产生（Antholine *et al.*, 1985）。后面的技术已经被用于检测铜处理老鼠体内羟基自由基的形成和抗坏血酸；这涉及到羟基自由基与二甲基亚砷反应生成甲基自由基，甲基自由基作为胆汁中的旋转捕捉加合物被检测（Kadiiska *et*

al., 1992)。

铜诱导活性氧产生的结果是增加脂质过氧化。当肝匀浆液或肝细胞与铜离子反应时戊烷、丙二醛及硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 的生成增加可以证实。并且老鼠食物中铜过量将导致体内线粒体膜脂质过氧化, 共轭二烯烃和TBARS 浓度增加 (Sokol *et al.*, 1990)。这将导致肝内部线粒体膜膨胀和其它肝损伤的生化和组织症状, 引起肝中线粒体内膜的脊加宽和胞囊和其它肝损伤的生化和组织信号。这些影响甚至铜过量老鼠更加明显, 缺少维生素E, 这将支持铜诱导肝细胞氧化损伤的结论。这和铜过量但缺少维生素E与硒的老鼠胆汁中自由基加合物检测相一致 (Kadiiska *et al.*, 1993)。如果老鼠被给予维生素E或硒, 将没有检测到自由基。这些结果为铜毒性涉及到细胞内脂质过氧化提供了令人信服的证据。

因为在微粒体没有可比较的影响发生, 线粒体可能是铜诱导肝损伤的特殊起始目标。这与后来的发现一致, 如铜过量鼠肝线粒体功能被削弱, 线粒体呼吸对照率下降 (Sokol *et al.*, 1993)。这与后来发现铜暴露老鼠肝的线粒体功能被损伤是一致的 (Sokol *et al.*, 1993)。线粒体电子转移蛋白复合物的氧化还原酶活性分析表明复合物IV (细胞色素C氧化酶) 活性降低。这些线粒体功能的变化减少细胞的能荷, 使钙从线粒体泄漏进细胞质的量增加, 使细胞暴露于数量增加的过氧化物中, 最后导致类肝细胞功能紊乱。

铜催化脂质过氧化也是铜过量老鼠肝细胞溶酶体变化的基础 (Myers *et al.*, 1993)。这些老鼠分离的溶酶体膜脆度增加, 流动性减少。膜中的TBARS 浓度加倍。脂肪酸膜含量也有变化, 并常伴随着多未饱和脂肪酸的增加。当溶酶体pH 也增加时, 这些膜的变化会影响ATP 酶的质子泵。铜过量动物肝内a凋亡小体的发生预示铜诱导DNA 损伤 (King and Bremner, 1979)。即使铜催化羟基氢氧基自由基在细胞内的产生, 也不能推出他们对DNA是必要的, 因为即使铜在体内催化羟基氢氧基的生产, 也不能得出它是DNA 损伤所必需的, 因为它们能与许多生物大分子反应, 他们也可能在到达DNA 之前被其它细胞成分摄取。但是, 铜结合容易结合到DNA形成加合物, 并且确实涉及到核染质的浓缩 (Sagripanti *et al.*, 1991)。因此DNA结合的铜能促进羟基氢氧基的产生并导致DNA 氧化损伤是可能的。铜在核内积累到过量明显增加了这些反应发生的可能性。

Cu^{2+} 出现时DNA 暴露于过氧化氢, 并且抗坏血酸导致DNA 氧化损伤。虽然谷胱甘肽在核内的浓度相对比较高, 但它并不激发这些变化。相反它被发现可抑制自由基的形成 (Milne *et al.*, 1991)。这促进铜在 Cu^+ 态的稳定和铜参加自由基产生的能力。因此谷胱甘肽可以保护铜诱导的DNA 损伤。锌金属硫蛋白也可以提供相似的保护, 从而防止铜诱导的DNA 断裂。因为锌金属硫蛋白螯合铜后阻止了铜参与氧化还原反应 (Cai *et al.*, 1995)。但

是有铜和1,10-邻二氮杂菲 (1,10-phenanthroline) 出现时, 谷胱甘肽刺激自由基形成和DNA损伤, 因为它不能把Cu (I) 从1,10-邻二氮杂菲上移走但是可以参与活性1,10-邻二氮杂菲—铜复合物氧化还原循环 (Milne *et al.*, 1991)。

氧化胁迫期间的DNA 损伤由活性氧种的直接攻击或核酸内切酶引起的。用1,10-邻二氮杂菲—铜复合体培养HepG2 细胞引起核小体DNA断裂, 这是凋亡的一个特点 (Tsang *et al.*, 1996)。但是, 在低温断裂没有发生及添加抗坏血酸后活性恢复, 因此可以推断DNA 断裂确实是羟基氢氧基直接攻击DNA 造成的。正常温度的代谢过程表明羟基氢氧基是邻二氮杂菲—铜复合体的氧化还原循环产生的。在低温, 抗坏血酸产生一种人造的还原环境恢复了羟基氢氧基的形成。当用1,10-邻二氮杂菲培养离体的鼠肝核子, 并进一步提高抗坏血酸和过氧化氢时, 核小体DNA的裂变也被检测到 (Burkitt *et al.*, 1996)。DNA 含有8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷表明羟基氢氧基的氧化。这些结果与结合铜的邻二氮杂菲是一致的, 结合铜的邻二氮杂菲存在于染色体形成一个复合物, 这个复合物能促进羟基氢氧基引起的DNA 断裂。尽管这些观察基础于体外研究系统, 但是8-羟基脱氧鸟嘌呤核苷浓度的增加已经被在连续暴露于铜的老鼠肝和肾中被报道 (Toyokuni and Sagripanti, 1994)。这表明铜能引起DNA碱基的氧化损伤。

这些金属复合物一般特性有降低硫醇复合物及被铁氧化, 或降低铁化合物产生自由基的能力。Cu 对于许多酶 (包括氧化酶和加氧酶) 来说是一种余因子 (Gutteridge, 1984)。与Fe 相似, Cu 在活性氧的形成和膜的脂质过氧化中扮演着催化剂的角色 (Chan *et al.*, 1982)。

铜在对苯二酚到苯醌的氧化中的作用及对苯二酚的细胞毒性已被报道 (Li and Trush, 1993a)。Cu 能显著地加快从对苯二酚到苯醌的氧化, 且与浓度成正相关。此外, 当在初级骨髓基质的细胞培养基中添加Cu 时, 可以显著地提高对苯二酚诱导的胞内毒性。谷胱甘肽和二硫苏糖醇作为抗氧化剂或是金属螯合物, 能阻止Cu 催化生成对苯二酚所产生的胞内毒性。

更进一步的研究说明在对苯二酚的存在下, Cu能显著地提高DNA链的断裂率。纯态氧清除剂而不是羟基氢氧基分子清除剂能提供部分的保护, 说明纯态氧而不是羟基氢氧基分子能促使DNA 链的断裂 (Li and Trush, 1993b)。然而, 这些清除剂缺乏绝对的特异性, 纯态氧的涉及面很小, 因为现在对于何物能形成氧自由基的机理尚未明确, 虽然 Steinbeck 等 (1992) 报道了吞噬嗜中性粒细胞能产生胞内的纯态氧。其他的金属离子包括了 Fe^{3+} 、 Mn^{2+} 、 Cd^{2+} 和 Zn^{2+} 都不能显著地提高对苯二酚的氧化作用或是诱导DNA 链的断裂 (Li and Trush,

1993b)。但是，Cu 可能是在靶标器官内通过对苯二酚产生活性氧，胞内毒性及DNA损伤的重要因素。

Milne 等（1993）检测到谷胱甘肽及其他螯合物对Cu-调控的DNA氧化的影响。在过氧化氢酶，抗坏血酸和DNA的存在下，谷胱甘肽能抑制由Cu离子产生的自由基的形成。谷胱甘肽的保护效应来源于它稳定Cu 在Cu⁺ 氧化态的能力，防止氧化还原剂循环及自由基的产生。然而，在细胞核中的谷胱甘肽用以防止而不是促进Cu 诱发的DNA 损伤。谷胱甘肽对于Cu-调控的DNA 氧化的影响可能是源于自由基沉默(radical sink)，如Winterbourn（1993）所描述的。通过这一系统，无论是直接的还是通过使谷胱甘肽减少，多种的自由基都能将它们的未成对电子转移给氧以产生超氧化物。超氧化物歧化酶对于此系统（防御氧化胁迫）是必需的。

Ozawa 等（1993）通过将闭合的环状双链超螺旋DNA 转变成开环的和线性DNA，以评价单链和双链DNA 被Cu²⁺ 乙烯基二胺与过氧化氢的反应打断。使用这一简单的系统，可得出DNA 断裂的剂量相关曲线，为在过氧化氢的存在下Cu²⁺ 对DNA 的损伤提供依据。先前的研究表明Cu²⁺ 的复合物与过氧化氢反应，以提供高产量的羟羟基自由基，可以直接造成DNA的损伤（Ozawa *et al.*, 1993）。

第二章 重金属在昆虫体内螯合和解毒机制

昆虫是自然界中最大的动物类群，它们具有种类数量多、个体数量大、分布范围广的特点，因此它们极易受到各种环境胁迫，如冷、热、干旱、重金属和有机化学物质等。因此很多学者已经开始研究昆虫对环境的胁迫的反应。在这里我们对昆虫对重金属抵御机制作一简要的概述。

1 重金属在昆虫体内的积累

关于昆虫对重金属的积累已经有很多报道，如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Poulson *et al.*, 1952; Maroni and Watson, 1985)、松尺蠖 *Bupalus piniarius* 和松夜蛾 *Panolis flammea* (Heliovaara and Vaisanen, 1990)、舞毒蛾 *L. dispa* (Gintenreiter *et al.*, 1993a)、黄粉虫 *Tenebrio molitor* (Lindqvist, 1995)、非洲飞蝗 *Locusta migratoria*、弹尾虫 *Orchesella cincta* (Hensbergen *et al.*, 2000)、角石蛾 *Stenopsyche marmorata* (Tochimoto *et al.*, 2003)、美洲脊胸长蝓 *Oncopeltus fasciatus* (Cervera *et al.*, 2004) 等等。已经证明食物是昆虫体内重金属的主要来源 (Munger and Hare, 1997; Munger *et al.*, 1999)。一般影响昆虫对金属积累的与食物有关的因素有：食物中金属种类及浓度、食物摄取率、食物金属的吸收率 (Poulson *et al.*, 1952; Thomann, 1981; Species and Hamelink, 1985; Crawford *et al.*, 1990, 1995, 1996; Luoma *et al.*, 1992; Lindqvist, 1995; Wang and Fisher, 1996; Munger and Hare, 2000)。还有人报道昆虫体内的重金属浓度与环境中重金属污染程度直接相关 (Van Straalen *et al.*, 1987; Roth-Holzappel and Funke, 1990)。另外，重金属在昆虫体内的积累与昆虫发育期有关 (Lindqvist, 1994)。

目前已证明Cu 和Cd 主要积累在昆虫中肠 (Suzuki *et al.*, 1984; Maroni and Watson, 1985; Hensbergen, 2000; Niu *et al.*, 2002)。脂肪体也是金属贮存的重要器官。其他器官，如表皮和生殖道也可积累金属。

2 重金属在昆虫体内的排泄调控

重金属在昆虫体内的积累和排泄是动态变化的。金属在昆虫体内的动力学紧密联系着昆虫的生理，如中肠上皮细胞在每一次蜕皮时再生，老的上皮细胞作为肠的代谢物排出。Posthuma等 (1992) 报道弹尾虫体内的Cd 90%积累在中肠，每次蜕皮只有35%的Cd 被排泄。

这就有两种可能：一半以上的Cd 不在同一层上皮细胞，也不在基膜；老上皮细胞中的Cd 被新的上皮细胞再吸收或穿过肠被其它细胞吸收。同样，Cd 浓度也在双翅目（Aoki and Suzuki, 1984; Timmermans and Walker, 1989）、鳞翅目、膜翅目（Lindqvist, 1992）、和鞘翅目（Lindqvist and Block, 1995）昆虫变态过程中逐渐降低。因为在变态过程中，中肠上皮细胞也再生（Chapman, 1982），部分Cd 可能脱离中肠上皮，而进入肠腔，羽化后被成虫排出体外；部分Cd 留在中肠上皮或进入那些未重建器官，这部分Cd 留在体内。另外，Cd和Cu 也积累在昆虫体壁（Niu, 2000），这意味着Cd 在变态过程中随蛹壳排出体外。

另外，昆虫对不同重金属的调控能力是不同的。有人对那些生活在废弃炼铜厂的无脊椎动物进行金属含量的调查，结果表明许多初级消费者能调控 Cu，但是不能调控 Cd（Rabitsch, 1995a,b,c）。杂食性的蚂蚁（Rabitsch, 1995b）显示了相似的体内调控 Cu 的能力，然而体内 Cd 的水平与其生活地 Cd 浓度密切相关。在较高的营养层能有效的调控 Cu 和 Cd 的水平（Rabitsch, 1995c）。但是在实验地提高铅的水平会扰乱体内金属代谢，特别是在低的金属水平。有人报道甜菜蚜 *Aphis fabae* 取食 Cu 污染的寄主植物蚕豆后，没有积累 Cu（Crawford *et al.*, 1990），其原因是甜菜蚜分泌排泄了很多 Cu 而把体内的含量维持相对稳定的水平（Crawford *et al.*, 1995）。Crawford 等（1996）报道非洲飞蝗 *L. migratoria* 也通过排泄有效地调控食物中过多的 Cu，使昆虫体内 Cu 保持在一定水平，进而推导出昆虫体内的 Cu 水平与处理时间无关（Crawford *et al.*, 1996）。这充分证明了昆虫对食物中低水平 Cu 的调控能力。

3 细胞内金属动态平衡

无脊椎动物拥有一系列细胞内解毒途径来减少体内的有毒金属。这些路径主要包括：(1) 平衡金属吸收率和排泄率的生理调控机制；(2) 细胞内金属的螯合机制，涉及到低分子量金属硫蛋白的高亲合位点，以及后来的溶酶体膜系统的排除；(3) 细胞内金属的螯合过程涉及到特殊的矿物颗粒体，这些颗粒体产生固体的含金属的、磷的或硫的颗粒，后来经胞外分泌排出。在昆虫中，食物的摄入是金属离子的主要来源，从口使之到达中肠。在很多目（弹尾目，缨尾目，鞘翅目，同翅目，毛翅目，鳞翅目，半翅目和双翅目）中，中肠是吸收的主要位点，在金属离子调控和矿物沉积上起着至关重要的作用。同时，金属的摄取和解毒过程还涉及到循环的血细胞、马氏管和后肠。图 2-1 阐明了单价、二价和三价金属离子穿过中肠上皮细胞膜的摄取率。在中肠上皮细胞中，金属离子可能有以下的

贮存方式: (1) 与金属硫蛋白或谷胱甘肽螯合 (Maroni and Watson, 1985; Hensbergen *et al.*, 2000); (2) 被溶酶体贮存 (Tapp, 1975; Tapp and Hickaday, 1977; Lauvedat *et al.*, 1989); (3) 被转移进内质网 (Gouranton, 1968; Alberts *et al.*, 1995; Ballan-Dufrançais, 2002); (4) 被其它的亚细胞结构结合; (5) 通过细胞膜进入血淋巴。其中血淋巴中的金属离子又可以被马氏管吸收, 然后排入后肠, 最后经肛门排出。

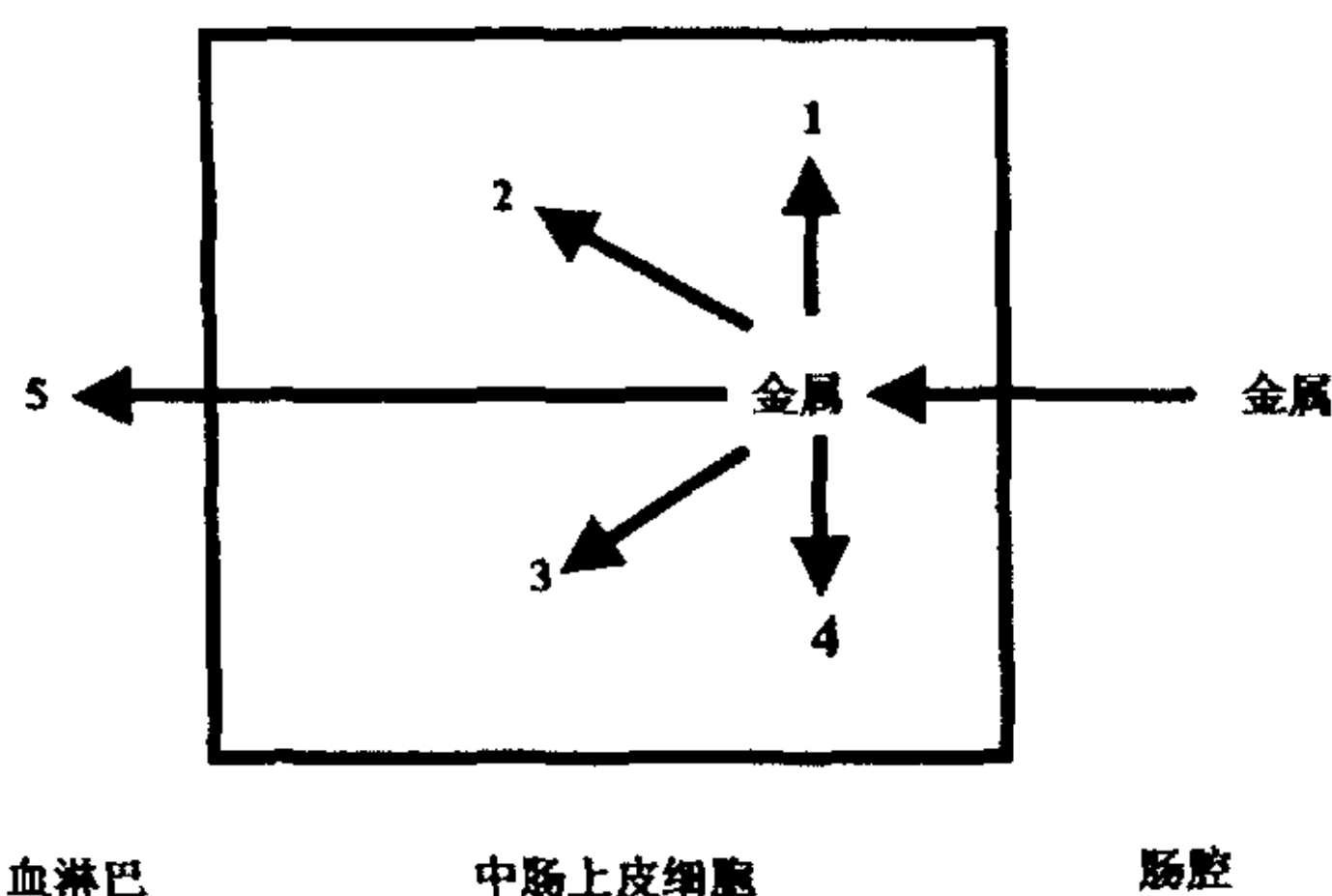


图 2-1 重金属在中肠上皮细胞中可能的去向。

Fig. 2-1 Possible fates of heavy metals in epithelial cells of midgut.

重金属可以通过转运或渗透扩散穿过细胞膜进入细胞质。在细胞质中, 金属可以与金属硫蛋白螯和(1), 被积累到溶酶体 (2); 被转移进内质网(3); 被其它的亚细胞结构结合(4); 通过细胞膜进入血淋巴(5)。Metal may cross the brush border membrane into cytoplasm by carrier-mediated or diffusional processes. In the cytoplasm, the metal may complex with metallothionein (1), enter mitochondria be accumulated by lysosomes (2), be transferred to the ER (3), Other fates for cytoplasmic metals are also possible (4), or be transported across the intestinal membrane to the haemolymph (5).

4 球晶与重金属摄取

球晶是相当小的矿物结晶, 直径从 1 到几 μm , 由一种有机的酶解多聚糖 (peptoglycan) 基质组成。多聚糖上各种厚度的矿物层聚集成同心圆 (图 2-2), 这些矿物层可能是矿物盐 (Ca、Mg、K、Mn、Fe、和 Zn 一般以磷酸盐或碳酸盐的形式存在) 或是嘌呤废物 (尿酸钾或尿酸钠), 往往厚度很大。球晶通常在细胞中产生, 但有时在内腔和胞间区域也可见到。它们在偏振光下表现出弱的 (Turbeck, 1974) 或是强的 (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1979) 双折射, 导致了结构的异向, 他们主要由不定形的物质组成 (Ballan-Dufrançais, 1975; Ballan-Dufrançais *et al.*, 1979)。

胞内的球晶出现在内质网-高尔基体复合区。有时可在内质网池区见到球晶正在被内质网包围, 如在 *Formica polyctena* 及 *Formica cetcopids* 的幼虫中肠内, 德国蠊 *Blatella germanica* 的回肠及生殖道内 (Gouranton, 1968; Ballan-Dufrançais, 1970, 1972; Jeantet, 1971), 缨翅目和直翅目的中肠的高尔基体管道内 (Fain-Maurel *et al.*, 1973; Waku and Suminato, 1974)。矿物沉积的来源可能是离子 (Wessing and Zierold, 1996)。它们可能是利用信道蛋白通过膜, 例如, Ca²⁺ 离子泵, 可以在内质网中调节Ca的存贮 (Alberts *et al.*, 1995)。球晶在腔内的存在揭示了它是以有机物作为核而形成的。Wessing 和 Zierold (1996) 揭示在果蝇的马氏管腔内 II 型的结晶来源于酶解多聚糖对K⁺ 的俘获。由高尔基体分泌出的粘多糖, 从血管基膜或是腔的顶上胞内分泌而出, 而后粘多糖转变为可以捕取K⁺ 的蛋白多糖。在腔内, 球体通常由尿酸钾组成。

内质网-高尔基体复合的球晶的核也可来源于粘多糖, 因为他们常常包含有粘多糖 (Gouranton, 1968; Ballan-Dufrançais, 1970, 1972; Jeantet, 1971; Lhonore, 1971; Marshall and Cheung, 1974)。当球晶出现在内质网时, 粘多糖看上去够成熟以捕获阳离子。高尔基体管道可能增加了成熟球晶中粘多糖的组分 (Jeantet, 1971)。

5 溶酶体对金属的贮存

软体动物的溶酶体出现在肾中 (Coombs, 1980)。与之不同的是, 溶酶体结晶在昆虫中是非自然产生的, 无规则且有同心圆的层。来源于胞内的内分泌膜的球晶可以发展成为溶酶体, 溶酶体在家蝇和果蝇中肠中已经被描述 (Sohal *et al.*, 1977; Lauverjat *et al.*, 1989) (图 2-3)。在家蝇中, 在成虫期长度为 0.5~1 μm, 包含了 Ca、Fe、Cu、Zn、P 和 S。但其沉积的结构不是太好, 有密集的复合光, 呈均一的小粒体状, 结晶的外形不规则。在有胞内球晶的细胞中, 产生了许多小的溶酶体 (图 2-2), 并在衰老的金属酶里含有 (Ca、Mg、Cu、Zn、Fe 和 S) (Ballan-Dufrançais *et al.*, 1980)。但是到目前为止有关重金属被转运到溶酶体的机制还没有被报道。

6 昆虫金属硫蛋白与重金属的螯合

现已发现 MT 广泛存在于哺乳类动物的几乎所有组织中, 广泛存在于植物、无脊椎动物、真核微生物和原核生物中。MT 是一类低分子量 (6,000-7,000 Da), 高金属含量 (每分子含 7-12 个金属原子), 富含半胱氨酸 (约占总的 30%) 的蛋白。金属硫蛋

白是水溶性耐热蛋白。因为富含半胱氨酸,这种蛋白展示了对金属离子的高亲和性及选择性结合细胞内低浓度金属离子的能力。环境中金属浓度升高可以诱导金属硫蛋白产生,因此细胞内金属硫蛋白的水平与摄取金属的量是相关的。金属硫蛋白的主要生理功能是贮存并提供合成脱辅基酶蛋白(apoenzymes)的阳离子,如 Cu 和 Zn (Viarengo *et al.*, 1985, 1987; Viarengo, 1989; Viarengo and Nott, 1993)。但昆虫 MT 的功能还不是很明确。据一些实验结果推论,MT 昆虫的功能的主要是稳态调节细胞内金属水平,即参与昆虫体内必需金属元素的调节和非必需元素的解毒作用。在昆虫体内受金属诱导而合成的 MT 能结合这些过量必需金属和有毒金属,并能限制中毒作用,保护细胞器免受金属毒性的影响。例如,Zn 作为一种主要的微量元素,参与昆虫体内一些重要的生物过程,如复制、转录、蛋白质合成和降解、能量代谢等。MT 作为一种重要的 Zn 结合蛋白,可能通过调节细胞中 Zn 的水平来调控上述一些生物过程。当昆虫体内发生 Zn 缺乏时,MT 产生降解,释放出 Zn,使之转移到一些辅酶中去,而当 Zn 过剩时,MT 又能结合这部分 Zn,以此来调控 Zn 在体内的平衡。

目前,已见报道的 MT 初级结构的只有果蝇 *Drosophila melanogaster* 和弹尾虫 *Orchesella cincta*。Mtn 和 Mto 是 *D. melanogaster* 的两个不同的 cDNAs (Mokdad *et al.*, 1987; Lastowski-Perry *et al.*, 1985)。MTN (40 amino acids) 和 MTO (43 amino acids) 这两个蛋白只有 25% 的序列同源性,这与脊椎动物 MT 类群 (75% 以上的同源性) 是显著不同的。MTN 和 MTO 分别在 *D. melanogaster* 的两个不同发育期表达 (Silar and Theodore, 1990)。Mto 的转录发生在胚胎形成时的 0-3 h,并持续到 3 龄幼虫期。而 Mtn 表达开始于胚胎形成时的 12-15 h,并持续到整个幼虫期和成虫期。MTO 蛋白的序列与其核酸的序列是一致的,它可能涉及到发育过程中金属动态平衡的调控; MTN 蛋白的分离纯化没有成功,原因是 MTN 蛋白在细胞内合成后迅速与溶酶体结合,在那里以某种不能被纯化的方式进行加工,MTN 蛋白的功能主要涉及解毒过程。*O. cincta* MT 有 2 个富含半胱氨酸并与 Cd 结合的肽。2 个肽的分子量分别为 2989 Da 和 4139 Da。分子量为 2989 Da 的肽的氨基酸序列对 MT 来说是一个典型序列。分子量为 4139 Da 的肽测序没有成功,也许是由于 N 端受到了破坏。根据确定的 2989 Da 肽的氨基酸序列设计引物进行 PCR,克隆出一个 MT 的 cDNA,这个 cDNA 的序列可编码一个 77 个氨基酸的蛋白。*O. cincta* MT 与 *D. melanogaster* MT 的氨基酸序列相似性较低,它和无脊椎动物 MT 之间的相似性甚至比与脊椎动物 MT 之间的还低 (Hensbergen *et al.*,

1999)。此外, MT 和金属结合蛋白也在摇蚊 *Chironomus yoshimatsui*、棕尾别麻蝇 *Sarcophaga peregrina*、石蝇 *Eusthenia spectabilis*、德国小蠊 *Blatella germanica*、蜉蝣 *Baetis thermicus*、家蝇 *Musca domestica* 和桑蚕 *Bombyx mori* 中有过报道 (Yamamura *et al.*, 1983 ; Aoki *et al.*, 1984 ; Aoki *et al.*, 1989 ; Everard and Swain , 1983 ; Bouquegneau *et al.*, 1985 ; Suzuki *et al.*, 1989 ; Kasai *et al.*, 1993; 田晓光等, 1998; Niu *et al.*, 2000; 何秀萍等, 2000)。

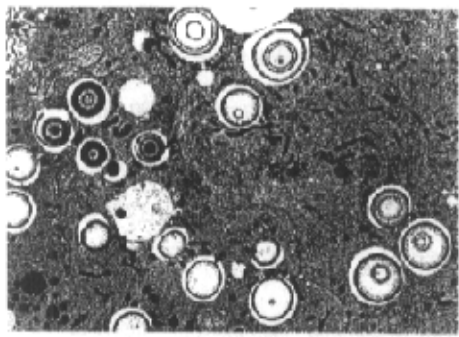


图 2-2 蚂蚁 *Formica polyctena* 中肠柱状细胞的超微结构图 (×8,200)
Fig. 2-2 General view of a midgut columnar differentiated epithelial cell. Note the abundance of spherocrystals (arrows). Small lysosomes are present. (×8,200)
大量球晶 (箭头) 和小溶酶体出现。M: 线粒体, mitochondria; L: 溶酶体 lysosome.

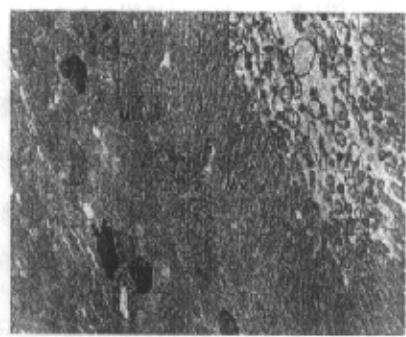


图 2-3 野生型果蝇暴露于 Cd 后中肠中段含有含有 Cu 和 S 溶酶体出现 (×10,000)
Fig. 2-3 Lysosomes are present in middle midgut of wildtype *Drosophila* exposed to cadmium, containing Cu and S. (×10,000)
Mv: 微绒毛, microvilli. M: 线粒体, mitochondria.

综上所述, 关于昆虫与重金属的研究已经开展一些, 但是研究远没有脊椎动物及某些软体无脊椎动物研究的深入, 昆虫对重金属的积累、代谢、转化与消除的机制还没有完全弄清楚, 很多问题还有待于研究, 重金属在中肠上皮细胞内的转运机制; 重金属离子从中肠上皮细胞到血淋巴的转运机制; 血细胞对重金属离子的转运机理及过程; 以及在整个过程中抗氧化酶 (SOD、CAT 、 GST、GSTPX 、 GR) 的作用等。

第三章 昆虫金属硫蛋白的研究进展

金属硫蛋白 (Metallothionein, 简称 MT) 是一类低分子量、富含半胱氨酸而缺少芳香族氨基酸的金属结合蛋白。1957 年, Margoshes 和 Vallee 在研究镉的生物学作用时, 从蓄积镉的马肾中首次分离出该物质 (Margoshes and Vallee, 1957)。现已发现 MT 广泛存在于哺乳类动物的几乎所有组织中, 广泛存在于植物、无脊椎动物、真核微生物和原核生物中。昆虫纲是动物王国中数量最大的纲, 但是有关昆虫 MT 的研究却相对较少, 而且仅限于几种昆虫, 如摇蚊 *Chironomus yoshimatsui*、石蝇 *Eusthenia spectabilis*、棕尾别麻蝇 *Sarcophaga peregrina*、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster*、德国小蠊 *Blatella germanica*、家蝇 *Musca domestica*、桑蚕 *Bombyx mori*、弹尾虫 *Orchesella cincta* 等。现从诱导、分离纯化、理化性质、功能、分子生物学、应用等方面对昆虫 MT 作一综述。

1 MT的诱导

昆虫中的MT一般是由重金属诱导产生的。Maroni 和 Watson (1985) 报道了金属Cd、Cu 能够在果蝇幼虫的中肠中诱导出镉结合蛋白、铜结合蛋白, 并推断它们为MT, 而金属Zn 不能诱导出MT。Debec 等 (1985) 报道在果蝇的细胞系中的加入 Cd^{2+} 后, 可以诱导到MT, 并且稳定的耐Cd 细胞系 (Cd R₂₀₀) 中的MT的量是原来细胞用 Cd^{2+} 诱导后的22倍多; 若在细胞培养物中加入L-半胱氨酸 R₂₀₀ 对CdCl₂ 的耐性上限被突破, 且MT的量是原R₂₀₀ 的4倍。Everard 和 Swain (1983) 证实在石蝇中也可诱导到MT。Bouquegneau 等(1985) 证实Hg 可诱导MT在德国小蠊回肠中产生。Kasai等 (1993) 报道从经CdCl₂ 诱导的家蝇中可分离提取到MT; 牛长缨也作了类似报道 (牛长缨, 2000)。Yamamur等(1983) 的研究表明在摇蚊幼虫中可诱导出MT。Aoki 等(1984) 报道在麻蝇幼虫中可诱导出MT。其他可诱导MT合成的重金属包括Cu、Hg、Co、Ni、Mu、Au 等。总之, 对于许多昆虫, 重金属可诱导MT产生, 并且不同金属的诱导效率是不同的, 其中Cd和Zn的诱导效率最高。但并不意味着Cd、Zn 与MT的结合力最高, Kasai 等 (1993) 报道Cu 可以替换MT中的Cd、Zn, 说明Cu 比Cd、Zn 对MT的结合能力强。另外有人报道MT 对常见金属的相对亲和力依次为Ag > Hg > Cu > Cd > Zn > Co = Ni (Nielson and Winge, 1983)。因此, 金属对MT 的诱导和结合是两回事。

2 MT在昆虫组织中的定位

在哺乳动物解毒功能的肝脏和肾脏中 MT 含量高。但是一些实验证明在昆虫的主要储存和排泄器官——脂肪体和马氏管中 MT 含量并不高，而在消化道，尤其是中肠部分 MT 含量高 (Maroni and Watson, 1985; Aoki *et al.*, 1984; Hensbergen *et al.*, 2000)。通常研究 MT 组织定位的方法主要是先定位金属的位置，然后根据金属以 MT 的形式存在而推知 MT 的位置。现在定位金属的方法有：(1) 解剖学和原子吸收法；(2) 放射性示踪实验；(3) 组织化学和 X 射线结合的方法。

3 MT 的分离纯化

目前已经从昆虫中分离纯化到了 MT 及各种同功蛋白。一般最为常用的方法是凝胶过滤和离子交换技术相结合的层析法 (Kasai *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 2002)。Aoki 等 (1984) 采用应用凝胶过滤 HPLC-AAS 分离纯化了 5 种麻蝇幼虫的金属结合蛋白并推测是 MT。Hensbergen 等 (2000) 用凝胶过滤和反相液相色谱从 Cd 诱导后的弹尾虫中分离纯化了两个金属硫蛋白小肽。这些均表明昆虫金属硫蛋白的分离纯化技术已有所进步。但是 MTN 蛋白的分离纯化没有成功，原因是 MTN 蛋白在细胞内合成后迅速与溶酶体结合，在那里以某种不能被纯化的方式进行加工 (Silar and Theodore, 1990)。另外 MT 在分离纯化过程中容易产生降解，主要是因为化学修饰剂引起的失活以及蛋白酶的存在 (Hensbergen *et al.*, 2000)。因此，在分离纯化过程中要加入蛋白酶抑制剂如 PMSF 防止降解，添加足够的还原剂如 2-巯基乙醇保护巯基。

4 MT 的类型

哺乳动物 MT 被分成四种类群，每一种类群都有各种同型异构体 (Isoforms) (Palmiter RD, 1998; Zhang *et al.*, 2001)。*D. melanogaster* 合成 2 种 MT 类型：MTO，一个包括 43 个氨基酸的小肽；MTN，一个包括 40 个氨基酸的小肽 (Valls *et al.*, 2000)。这两个蛋白显示了 25% 的相似性 (Bonneton *et al.*, 1996)。它们的基因 (*Mto* 和 *Mtn*) 在不同发育期表达，在各种金属的诱导影响下它们的表达量增高 (Bonneton *et al.*, 1996; Zhang *et al.*, 2001)。Domenech 等 (2003) 报道 MTO 和 MTN 被定性为铜 MTs，因为在这种配置下 MT 的配位和折叠最稳定。

Hensbergen (1999) 在弹尾虫 MT、果蝇 MTO 和 MTN¹ 之间作了一个比较 (如图 3-1) 发现：MTO 和 MTN 只有 25% 同源，MTO 分别与弹尾虫 MT 的 N-端和 C-端部分相匹配，有 32.2% 同源，而 MTN 只与 N-端部分相匹配，有 46.7% 同源。

```

D. melanogaster MTO      MVCEGCGTNGCCSAGS-----D-----DAPACHNDC  GCYCKNGFEDQCCSEK
O. cincta MT             MSSTQCSASEAIPNLCCEHCNKGDAEGSPPTUCSEFKKGGGATCTASCCIVTSPKLVCKDGALEPCUANKTCK
D. melanogaster MTN1    NPOPCGSGCKCASQWNGECNCGEDCKCGG-DKKSACVCKE

```

图 3-1 *O. cincta* 和 *D. melanogaster* 的 MT cDNA 的氨基酸序列同源性

Fig. 3-1 Amino acid alignment of deduced amino acid sequences from metallothionein cDNAs from *O. cincta* and *D. melanogaster*.

同源性比较基于 FASTA 序列比对软件。相同残基(:), 相关残基(.) The alignment is based on a FASTA sequence comparison program. Identical residues (:), related residues (.)

5 MT的理化性质

与哺乳动物的 6~7 kDa (Kagi, 1991) 相比, 昆虫 MT 的分子量种间差异比较大, 如麻蝇的 8000Da (Aoki *et al.*, 1984) 黑腹果蝇的 4555 Da (MTN) 和 5281 Da (MTO) (Mokdad *et al.*, 1987)、家蝇的 5225 Da (Kasai *et al.*, 1993) 或 9045.9 Da /11560.2 Da (Niu *et al.*, 2000), 及弹尾虫的 7128 Da (Hensbergen *et al.*, 1999)。Debec 等 (1985) 从果蝇细胞系中诱导出的 MT 分子量为 7000 Da, Maroni 和 Watson (1985) 用 CdCl_2 诱导出果蝇幼虫 MT, 发现其分子量小于 10000Da。弹尾虫 MT 的分离得到 2 个 Cd 结合肽, 分子量分别为 2989 Da 和 4139 Da, 说明弹尾虫 MT 被分割为 2 个金属结合肽。其两个分割点 TQ 氨基酸的后面, 一个位于 N 端, 另一个位于两个金属结合族之间的连接区 (Hensbergen *et al.*, 1999; 2001)。

昆虫氨基酸中半胱氨酸含量比较高, 在果蝇的 MTN 中有 12 个半胱氨酸, 占有所有氨基酸 (40 个) 的 28%。在弹尾虫的重组 MT 中有 19 个半胱氨酸 (Hensbergen *et al.*, 2001), 占有所有氨基酸 (77 个) 的近 1/4。MT 中不含芳香族氨基酸, 所以它们在 280 nm 处没有吸收峰。家蝇 MT 在 250 nm 处有宽的吸收峰 (Kasai *et al.*, 1993)。家蝇 MT 的摩尔消光系数是 $9.20 \pm 0.25 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$, 石蝇 MT 的摩尔消光系数为 $1.29 \pm 0.24 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Everard and Swain, 1983)。

重组蛋白的化学计算显示弹尾虫 MT 可结合 7 个或 8 个 Cd^{2+} , 并且主要位于 2 个金属结合族 (Hensbergen *et al.*, 2001), 这类似于其它已知的 MTs (Otvos and Armitage, 1980; Otvos *et al.*, 1982; Wang *et al.*, 1995)。两个果蝇 (*Drosophila* sp) MT cDNA 的证明包含的金属群不能超过一个 (Lastowski-Perry *et al.*, 1985; Mokdad *et al.*, 1987)。含有 40 个氨基酸的果蝇 MT (MTO) 在大肠杆菌中重组表达后可结合 3 或 4 个 Cd^{2+} (Valls *et al.*, 2000)。MT 有多态性, 在摇蚊幼虫

中发现MT有4种同功蛋白 (Yamamura *et al.*, 1983), 麻蝇幼虫MT包含5种同功蛋白 (Aoki *et al.*, 1984), 家蝇幼虫MT有2个同功蛋白: MT-I 和MT-II。二者每摩尔分别含有3.9克和4.5克原子的重金属 (Kasai *et al.*, 1993)。通常满载金属的MTs不易蛋白水解。通过降低 pH 方法脱去金属的MT常常容易蛋白水解 (Klaassen *et al.*, 1994)。*O. cincta* MT 断裂的位置在两个富含半胱氨酸区的中间, 在*O. cincta* MT 两个金属结合域之间连接区的长度比其它已发现的动物MT大。几个研究评估了连接区的长度在断裂反应中的重要性 (Morris *et al.*, 1999; Kille *et al.*, 1991)。海洋海胆的重组Cd-MT 在细胞外能被枯草杆菌蛋白酶从金属结合域处断裂 (Wang *et al.*, 1996)。一个在大肠杆菌中表达的植物MT 有一个42个氨基酸的连接区, 并被证明在连接区的几个位置断裂 (Kille *et al.*, 1991)。然而有14个氨基酸的重组海藻MT没有被细菌蛋白水解酶分解 (Morris *et al.*, 1999)。*O. cincta* MT连接区的断裂是因为昆虫本身的酶活性, 而不是外来的蛋白水解酶或分离条件引起的化学不稳定性引起。连接区内的断裂可能是把金属结合肽定位到特殊细胞内位置的重要因素 (Kille *et al.*, 1991)。*O. cincta* 提供了一个研究体内断裂功能重要性的唯一的机会。

MT 引人注意的特征是具有热稳定性, 在沸水中加热短时间不变性。麻蝇幼虫 MT 在 60℃水浴中加热 5min 仍然保持原样 (Aoki *et al.*, 1984)。果蝇 MT 具有耐热和耐酒精的特性 (Maroni and Watson, 1985)。

MT 的另一个显著特征是含有对 Cu 高度亲合的硫醇基, 从而使 Cu 很容易取代 MT 中的 Cd 和 Zn (Aoki *et al.*, 1984; Maroni and Watson, 1985)。

6 MT的功能

MT 的功能在哺乳动物中已经研究的很深入, 但昆虫 MT 的功能还不是很明确。据一些实验结果推论, MT 昆虫的功能的主要是动态调节细胞内金属水平, 即参与昆虫体内必需金属元素的调节和非必需元素的解毒作用。在昆虫体内受金属诱导而合成的 MT 能结合这些过量必需金属和有毒金属, 并能限制中毒作用, 保护细胞器免受金属毒性的影响。例如, Zn 作为一种主要的微量元素, 参与昆虫体内一些重要的生物过程, 如复制、转录、蛋白质合成和降解、能量代谢等。MT 作为一种重要的 Zn 结合蛋白, 可能通过调节细胞中 Zn 的水平来调控上述一些生物过程。当昆虫体内发生 Zn 缺乏时, MT 产生降解, 释放出 Zn, 使之转移到一些辅酶中去, 而当 Zn 过剩时, MT 又能结合这部分 Zn, 以此来调控 Zn 在体内的平衡。在果蝇中肠中, 铜和镉主要与 MTN 型的果蝇 MT 结合, 然而锌在马氏管

主要与 MTO 型结合 (Durliat *et al.*, 1995)。这些观察与 Bonneton 等 (1996) 的观察并不完全一致。Bonneton 等 (1996) 报道, MTO 的主要功能是联系细胞内活性金属的代谢 (维持在必需水平), 而 MTN 的功能更直接联系金属的解毒, 可能在细胞的溶酶体内。这些结论是建立在 MTN 和 MTO 特殊组织基因表达的基础上。MTN 和 MTO 主要在消化道表达, 但是 MTN 也在脂肪体和马氏管表达。这种活性可能是由于这些器官吸收血淋巴环境的金属离子引起的。MTN 和 MTO 细胞内功能和位置的定位可能与基因组成的差异有关。*Mtn* 基因有两个等位基因: *Mtn*¹ 和 *Mtn*³。*Mtn*¹ 有时候被重复。有重复的 *Mtn*¹ 品系比单链的 *Mtn*¹ 基因品系合成 *Mtn* mRNA 的水平高, 并且能耐受较高的金属浓度 (Bonneton *et al.* 1996)。一个 C-端组成的明显差异可能支持功能和位置的不同定位: *Mtn*¹ C-端有一个谷氨酸残基, 然而 C-端 *Mtn*³ 和 *Mto* 有一个赖氨酸残基。这可能导致 MTN¹ 在溶酶体产生的功能与 MTN³ 及 MTO 在细胞质产生的功能之间的差异。Maroni 等 (1995) 把 C-端氨基酸残基的差异和与金属亲和力差异联系在一起, 并认为 *Mtn*¹ 是一个低亲和力的 MT, 因此往往以较高水平的表达来弥补。

但应注意的是, MT 对重金属的解毒和调节作用是有限的, 一旦环境中重金属的含量超过一定的阈值, 昆虫就会表现出病理状态, 严重时导致死亡或不育、后代畸形。

7 MT分子生物学

关于昆虫 MT 的分子方面的研究主要集中在果蝇上, 而在其它昆虫上大部分没有涉及分子的工作。

7.1 MT基因

果蝇 (*D. melanogaster*) 有 2 个 MT 基因: *Mtn* 和 *Mto*, *Mtn* 只有一个复制片段, 位于第 3 条染色体的右臂的 85E10-15 区 (Maroni *et al.*, 1986), 而 *Mto* 位于 92E 区。*Mtn* 的结构序列在 GLY-8 密码子处被一个包括拼接信号 GT-AG 的小内含子 (265bp, 位于 C 末端第 7 个残基) 将密码区分开来。在转录启动子上游 300 个碱基对内, TATA 盒之前有 7 个短的被分离的 12 碱基对的保守序列片段, 非常类似于哺乳动物控制金属调节的 12 碱基片段 (相似程度大于 75%) 具有 5' ... (GC) TTTTGCAYNCG...3' 序列, 推测此序列可能与重金属的调节作用有关。

7.2 MT基因的调控和表达

细胞拥有特殊的金属调控转录因子 (metal-responsive transcription factors, MRTFs) 来活化 MT 基因。在哺乳动物细胞中, 6 个 MRTFs 已经被报道。其中性质最好的是 MTF-1, 它是一个在所有组织表达的必需锌指蛋白 (Latchman, 1995)。在静止的细胞, 锌指蛋白位于细胞质, 然而在胁迫条件下, 它被转移到核子中 (Zhang *et al.*, 2001)。最近, Zhang 等 (2001) 报道了果蝇的金属调控转录因子 dMTF-1, 它在 DNA 结合锌指区最相似于哺乳动物的 MTF-1。dMTF-1 和 MTF-1 的差异主要是金属和组织特异性。MTF-1 主要被 Zn 或 Cd 激活, 然而 dMTF-1 被 Cu 或 Cd 激活。这并不能归结为在 MTF-1 因子间存在物种的差异, 因为转染到老鼠细胞的 dMTF-1 可以像人的 MTF-1 一样调节锌调控的转录。这些差异可能与重金属代谢的差异有关, 如特殊组织的整合或排出。组织特异性的差异表现在: 哺乳动物的 MTF-1 在目前分析的所有组织表达, 然而果蝇的 dMTF-1 在很少几个组织 (中肠和脂肪体) 表达 (Zhang *et al.*, 2001)。这与组织特异性整合是可能有关的。但是在重金属调控的某些方面已经受限于果蝇和哺乳动物分歧进化。

事实上各种生物 MT 基因的启动子上都有金属调控元件 (Metal Responsive Elements, MREs)。果蝇 *Mto* 基因链有 4 个 MREs; *Mtn* 基因有 2 个 MREs (Bonneton *et al.*, 1996)。在果蝇细胞中, 铜和镉比锌更容易激活 dMTF-1 (Domenech *et al.*, 2003)。dMTF-1 不能在快速诱导哺乳动物细胞转录的锌浓度诱导转录 (Zhang *et al.*, 2001)。

如果果蝇被热激, *Mto* 和 *Mtn* 基因将在那些积累金属区域表达, 如中肠和后肠的铁和铜细胞区 (Bonneton *et al.*, 1996)。热激可能干扰金属与内生金属分子 (endogenous metallomolecule) 的结合。这样金属离子将自由地与 MT 基因的金属调控系统作用 (Bonneton *et al.*, 1996; Freedman *et al.*, 1993)。

Mtn 和 *Mto* 能被特定的金属离子诱导, Cd、Cu 是有效的诱导剂, 能产生 15~20 倍的 RNA 序列增加, Hg、Ag、Zn 也能产生可见的 RNA 序列增加。金属处理后, MT mRNA 的水平增加很快, 并且在处理后大约 36 小时达到一个最大值 (Lastowski-Perry *et al.*, 1985)。诱导蛋白主要位于中肠, 中肠是摄入金属离子吸收的地方 (Maroni and Watson, 1985)。在果蝇细胞系、成虫、幼虫中 Cd^{2+} 能强诱导 MTO mRNA 的合成。MTO mRNA 的浓度在 Cd 处理 4 小时内较低, 处理后 8 小时增加很快, 然后一直慢慢增加到 48 小时。相反, Cu^{2+} 在果蝇细胞中诱导 MTO 的效率很低, 但在成虫和幼虫中具有高的诱导效率。

在带有已报道基因的启动子的转基因果蝇中, MTN 和 MTO 的表达曾作过单独研究 (Wilson, 2001)。因此, 用于一个转基因的观察诱导和组织定位是非常有效的。Cd、Cu 除

主要诱导 MT 在中肠的表达外, 也诱导 MT 在脂肪体和马氏管的表达。在脂肪体和马氏管中, 两种基因具有不同的表达模式。这项工作很好地说明了如何利用转基因果蝇来观察已报道基因的表达水平和组织定位。

在世界范围的果蝇田间种群中, *Mtn* 和 *Mto* 的基因结构和表达已观察。最初是在欧洲的葡萄生产区(那里有一个用 CuSO_4 防治植物病害的历史)发现了对铜的抗性, 并且这些抗性伴随着较高的 MT 水平 (Lange *et al.*, 1990; Maroni *et al.*, 1987; Theodore *et al.*, 1991)。某些抗性品系携带的 *Mtn* 有一个串联重复 (tandem duplications) (Otto *et al.*, 1986)。这些抗性品系在实验研究中显示了增加的金属耐受性 (Otto *et al.*, 1986), 后来对世界范围的 1666 个田间种群调查研究发现了 4 种不同的 *Mtn* 串联重复, 但是没有 *Mto* (Lange *et al.*, 1990)。北美和欧洲的品系显示了最高的重复百分比 (12~22%), 然而热带非洲的品系没有显示重复的 *Mtn* (Maroni *et al.*, 1987; Theodore *et al.*, 1991)。但是在 *Mtn* 重复的频率和环境中的金属污染的程度之间没有相关性。Wilson (2001) 认为由 *D. melanogaster* 迁移造成基因漂流 (gene flow) 可能使携带 *Mtn* 重复的基因型和金属污染之间的关联变得不明显; *Mto* 重复是与下面解释不相一致的: MTO 主要涉及金属自我平衡, MTN 主要涉及金属毒性。

7.3 基因复制与基因进化

普遍认为, 基因重复是新基因进化的第一步之一。由于本身的功能能被 2 个重复的一个来维持, 另一个重复就可以避开自然选择的压力, 同时积累发展一个新功能必需的突变。如果重复和分歧或趋异的过程被重做, 就会导致有联系但功能不同的基因族, 然后进一步趋异进化 (divergent evolution) 能产生带有不同功能的基因缺少自然发生的, 具有功能意义的, 近来起源的重复限制了现象的研究 (Ohta, 1987)。但是在自然种群中发现的果蝇 MT 基因 (*Mtn*) 的重复可能代表一个新基因家族发展的早期阶段。*Mtn* 基因的复制分布广泛, 已在四个大陆发现例子, 并且他们是功能性的, 携带 *Mtn* 重复的果蝇产生更多 MTN RNA。在非选择实验种群中的另一个重复表明果蝇 *Mtn* 重复可能是多态的 (Maroni *et al.*, 1987)。用来自 *Mtn* 区的探针进行限制性酶分析, 6 个不同的重复型被确定。限制性图谱显示在 4 个重复型中, 大小在 2.2 ~ 6.0 kb 之间的序列被直接串联重复; 在其它 2 个重复中, 这种基础模式由于一个转座因子 (Putative transposable element) 插入到一个重复中而被改变。串联重复可能通过 2 个机制产生: (1) 非同源断裂和重接; (2) 基因侧面有相似序列的 DNA 片段之间不等的同源重组。

一个关于 *Mtm* 位点进化的假设是：工业化已经导致对位点表达增加的强烈选择，等位基因最近已经升到高频率 (Maroni *et al.*, 1987.)。重金属增加的水平导致对具高活性特殊等位基因的选择。如果等位基因的最初频率是 10^{-3} ，那么这个等位基因的选择条件是不得不超过 7×10^{-3} 。假如每年有 10 代，它已经到达 0.999 以上的频率。对 *Mtm* 表达的继续筛选可能把稀有频率当作中间频率，并允许它们扩散到整个种群。*Mtm* 的两个等位基因已经没发现，即 *Mtm*¹ 和 *Mtm*³。由于小的缺失，它们在尺度上不同。并且点突变可能导致 *Mtm*¹ 高的可诱导性 (Theodore *et al.*, 1991)。在欧洲和北美，*Mtm*¹ 是最普遍的等位基因。在非洲刚果的种群中，只有 *Mtm*³ 出现，大概反映了其非选择性。另外有人认为 *Mtm*¹ 起源于较老的 *Mtm*³，即 *Mtm*¹ 是由 *Mtm*³ 受非洲外部的环境金属离子污染的选择而来。

8 MT的应用

MT 已经被应用于医药、食品工业、化妆品和环境治理等行业领域，但昆虫 MT 的应用主要集中在环境学方面。其功能有：

8.1 作为环境监测的生物标志物

重金属是环境中的主要污染物之一，在环境科学研究中一直受到广泛的重视。MT 的一个显著特点是能在转录水平上被环境中的金属所诱导，且这种诱导水平与环境中的金属浓度有直接的相关性。生物体内调节必需金属元素已具有一定的 MT 基础水平。当周围环境中生物体内的金属含量达到一定高的浓度时，才能诱导合成新的 MT。通过监测环境中昆虫 MT 含量的增加，就能反映环境中金属水平，从而估计出生物受金属污染的状况和重金属的污染压力。金属硫蛋白 (MT) 被认为是陆地环境重金属污染的生物标志物。弹尾虫金属硫蛋白的研究为其作为土壤重金属污染的生物标志物提供了可能性 (Hensbergen *et al.*, 2000)。

8.2 对环境重金属污染的净化功能及其在环境污染治理中的作用

MT 在高度诱导以后，能大量地结合重金属，可以推断 MT 是有效地解离、解毒重金属的一种生物途径。但对于昆虫来说，其 MT 毕竟有限，能够结合的金属也有限。因此我们应该尝试利用基因工程的方法进行相关治理。另外有人报道可利用克隆 MT 基因的植物或工程菌或水生生物（包括藻类）来排除环境中受污染土壤或污水中的有毒金属（茹炳根等，1991；茹炳根，1998）。这为环境重金属污染的治理开辟了一条崭新的道路。目前对昆虫 MT 生态服务功能的研究很少，需要作进一步的研究和探讨。

综上所述，关于昆虫金属硫蛋白的研究已经开展一些，但只是集中在少数的昆虫上，并且只有果蝇研究的比较深入。所以有关昆虫 MT 的结构、功能和应用的研究有待进一步拓展和深入。

第二部分 试验研究

第四章 镉对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育与繁殖的影响

随着采矿、冶炼、电镀等工业的发展,镉(Cd)、铜(Cu)等重金属被排放到环境中,造成环境的污染,严重威胁着人类的健康和其他动植物的生存。在陆地和水域生态系统中,昆虫可通过其特定的适宜能力起到积累、转移和代谢重金属的作用。因此,在揭示昆虫对重金属适应的生物学效应及其机理的基础上,一方面可将这些个体小、世代周期较短且能繁殖的昆虫用作指示生物,监测环境中重金属污染程度;另一方面也可将昆虫体内与其适应重金属相关物质如金属硫蛋白等用于治理环境的重金属污染。为此,国内外不少学者就此也作了不少探讨。目前,已明确 Cd^{2+} 等可对昆虫产生多种慢性的生物学效应。这些效应包括:体重减轻(Posthuma, 1990; Schmidt *et al.*, 1992; Ortel, 1996; Sildanchandra and Crane, 2000)、发育历期延长(Gintenreiter *et al.*, 1993a; McCahon and Pascoe, 1991; Rayms-Keller *et al.*, 1998; Cervera *et al.*, 2004)、成虫寿命缩短(Gintenreiter *et al.*, 1993a; Sildanchandra and Crane, 2000; Rayms-Keller *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1991, 1992; Laskowski, 2001)和繁殖力下降(Van Straalen *et al.*, 1989; Schmidt *et al.*, 1991, 1992; Gintenreiter *et al.*, 1993a; Niu *et al.*, 2002; Laskowski, 2001; Cervera *et al.*, 2004)等。然而,这些研究多限于考查 Cd^{2+} 处理后对其亲代或当代各发育阶段虫体的生物学效应,而有关这种效应是否会延续至子代则尚不明确。

棕尾别麻蝇 *Boettcherisca (Sarcophaga) peregrina* (双翅目:麻蝇科)是一种腐食性、卵胎生的昆虫。在自然条件下,它主要以富集有大量重金属的腐败动植物、垃圾和粪便等为食物源。开展重金属对其影响的生物学效应,将该蝇用作指示生物,有望找到适宜的指标以监测环境中重金属污染状况。为此,本章研究了 Cd^{2+} 对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育和繁殖的影响,为将来开展重金属污染的生物监测提供理论基础与技术参数。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇系本实验室在人工气候室($25 \pm 1\text{ }^{\circ}\text{C}$, L12: D12)饲养多年的品系。幼虫饲喂人工饲料(麦麸:水:猪肝=3:5:6),成虫饲喂水和食用蔗糖。

1.2 Cd^{2+} 对亲代生长发育与繁殖的影响

收集成虫8 h 内产的幼虫作为亲代 (P代) 用于实验。将幼虫放入500 ml 的玻璃果酱瓶中, 每瓶300头, 喂饲150 g 含 Cd^{2+} 或无 Cd^{2+} 污染的人工饲料。将P代幼虫移入500 ml 的玻璃果酱瓶中, 分别饲喂含100、200、400和800 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ 的人工饲料。每隔24 h 从每瓶中取出10头幼虫, 用蒸馏水洗净后排空24 h, 以吸水纸拭干, 先用电子天平 (AB204-E, Mettler Toledo) 称重。然后, 以 X. A.液 (二甲苯: 乙醇=1:1) 处理, 待虫体伸长后再用游标卡尺测量体长 (王江峰, 1999); 定时考查幼虫历期。取样考查直到对照开始化蛹为止。化蛹后, 继续考查各浓度处理和对照的化蛹率、蛹体长、蛹重和历期。同时, 取样所获各浓度处理和对照的幼虫和蛹, 供作其体内 Cd^{2+} 含量的测定。待成蝇羽化后, 将各浓度处理和对照的刚羽化雌雄成蝇分开饲养, 分别考查雌雄蝇体重与寿命, 及雌性比, 并选取羽化后第1、5、10、15 和20 d的成虫, 作体内 Cd^{2+} 含量的测定。同时, 将各浓度处理和对照的羽化后6~7 d的未交配雌雄成虫一玻璃果酱瓶内, 每瓶雌雄成虫各4头, 参照Chapman等 (1995) 测定3 h 内的交配率, 试验重复3次。交配后, 将雌蝇单独转移至放有新鲜猪肝的养虫笼内任其产仔, 测定单头雌蝇的产仔量。

1.3 Cd^{2+} 对子代生长发育与繁殖的影响

收集方法1.2各浓度处理和对照的雌蝇所产的幼虫供作 F_1 代, 分别转移到不含 Cd^{2+} 的人工饲料饲养。之后, 按方法1.2考查幼虫、蛹和成虫的各项指标, 并收集幼虫、蛹和成虫期各阶段的样品供体内 Cd^{2+} 含量的测定。

1.4 Cd^{2+} 含量的测定

参照Niu 等 (2002) 将方法1.2和1.3准备的各样品 (幼虫或蛹均为10头, 成虫含雌雄虫各5头), 分别用2.0 ml 混合酸 (HClO_4 : HNO_3 =1: 5 v/v) 消化, 然后定容到25 ml, 再用原子吸收分光光度计 (Perkin Elmer, AAnalyst 100) 测定 Cd^{2+} 的浓度, 然后计算样品 Cd^{2+} 含量。每样品均设有3个重复。

1.5 数据分析

利用DPS软件 (唐启义和冯明光, 2002) 对各处理指标进行方差分析, 再以Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 对亲代生长发育与繁殖的影响

2.1.1 幼虫期

亲代幼虫经不同浓度 Cd^{2+} 处理后, 幼虫体重和体长则受到明显的影响, 其中对体重(图 4-1A) ($F = 14.545, df = 4, P < 10^{-4}$) 和体长(图 4-1B) ($F = 20.555, df = 4, P < 10^{-4}$) 的影响程度均受到 Cd^{2+} 处理浓度的极显著影响, 处理浓度越高, 体重越轻, 体长越短。就幼虫发育历期而言, Cd^{2+} 处理则导致其明显延长, 其中影响的程度又受到 Cd^{2+} 处理浓度的极显著影响 ($F = 6.940, df = 4, P = 0.0002$), 处理浓度越高, 幼虫龄期延长越明显(表 4-1)。

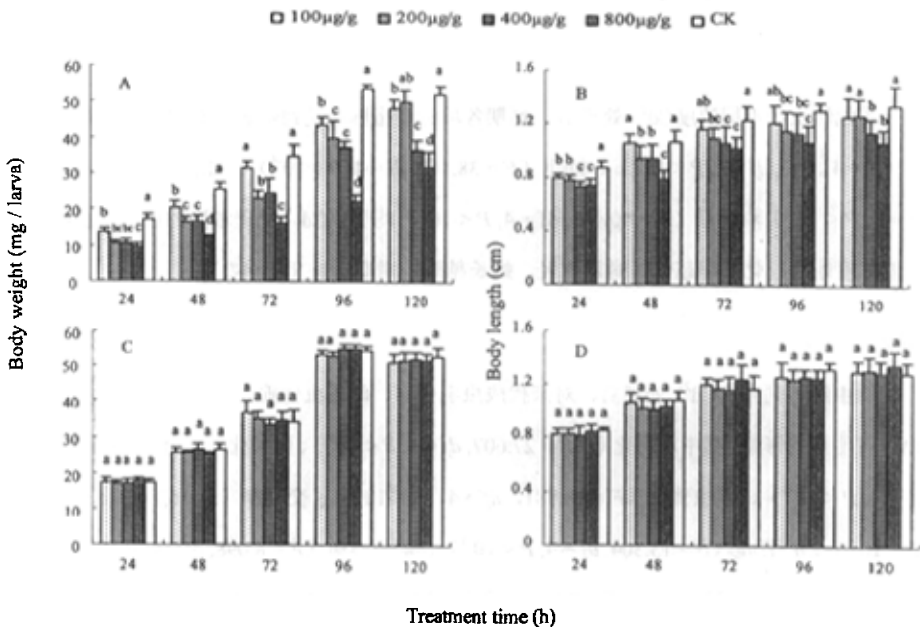


图 4-1 不同浓度 Cd^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代 (A, B) 和子代 (C, D) 幼虫体重和体长的影响

Fig. 4-1 Effects of Cd^{2+} at different concentrations on the body weight and body length of *Boettcherisca peregrine* larvae at the parental generation (A, B) and the first filial generation (C, D)

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)。Duncan's新复极差法检验表明, 同一时间具相同小写字母的数据间差异未达显著水平 ($P < 0.05$)。The values are means $\pm$ standard deviation. For the same time after exposure to cadmium, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

表 4-1 不同浓度 Cd^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代和子代幼虫历期的影响

Table 4-1 Effects of Cd^{2+} at different concentrations on the stadia of *B. peregrine* larvae at the parental generation (P) and the first filial generation (F_1)

Concentrations ($\mu\text{g/g}$)	Stadium (h)					
	1st instar		2nd instar		3rd instar	
	P	F_1	P	F_1	P	F_1
100	15.67±3.51 b	14.67±2.53 a	34.67±5.13 ab	31.71±3.72 a	82.33±6.51 b	78.32±6.83 a
200	16.00±3.00 b	14.42±3.51 a	36.00±4.58 ab	31.09±4.18 ab	82.33±4.93 b	77.67±5.21 a
400	18.00±3.00 ab	15.04±2.32 a	37.67±8.08 ab	28.76±6.54 b	99.67±8.62 a	79.72±5.91 a
800	22.00±3.61 a	14.81±2.72 a	42.00±4.00 a	29.08±4.02 b	104.67±14.01 a	78.12±6.43 a
CK	14.33±2.08 b	14.73±2.91 a	29.67±6.03 b	29.92±4.33 ab	74.67±8.39 b	77.42±6.31 a

数据为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)。Duncan's 新复极差法检验表明, 同一列中具相同小写字母的数据间差异未达显著水平 ($P < 0.05$)。The values are means $\pm$ standard deviation. In the same column, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

2.1.2 蛹期

亲代幼虫经不同浓度 Cd^{2+} 处理后, 蛹期各项考查指标均受到明显的影响, 其中对化蛹率 ($F = 41.092$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、蛹重 ($F = 38.862$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、蛹长度 ($F = 14.320$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$) 和蛹期 ($F = 40.495$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$) 均受到 Cd^{2+} 处理浓度的极显著影响。处理浓度越高, 化蛹率越低, 蛹重越轻, 蛹长越短、蛹期越长 (表 4-2)。

2.1.3 成虫期

幼虫经不同浓度 Cd^{2+} 处理后, 对亲代成虫羽化率、雌雄虫体重、交配率、产仔量和寿命均有明显的影响, 其中对羽化率 ($F = 27.607$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、刚羽化雌虫体重 ($F = 24.31$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、雄虫体重 ($F = 18.881$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、交配率 ($F = 62.843$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、产仔量 ($F = 13.304$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、雌虫寿命 ($F = 8.098$, $df = 4$, $P = 0.0001$) 和雄虫寿命 ($F = 7.331$, $df = 4$, $P = 0.005$) 的影响程度均受到 Cd^{2+} 处理浓度的极显著影响。处理浓度越高, 影响越明显。然而 Cd^{2+} 处理对成虫雌雄性比则无显著影响 ($F = 0.689$, $df = 4$, $P = 0.6302$) (表 4-3)。

2.2 Cd^{2+} 对子代生长发育与繁殖的影响

2.2.1 幼虫期

各处理 F_1 代幼虫若不再经受 Cd^{2+} 处理时, 其体重 ($F = 0.356$, $df = 4$, $P = 0.836$) 和体长 ($F = 2.248$, $df = 4$, $P = 0.1095$) (图 4-1C, D), 以及幼虫历期 ($F = 0.595$, $df = 4$, $P =$

0.6663) 与对照相比则均未受到显著的影响 (表 4-1)。

2.2.2 蛹期

当各处理 F_1 代幼虫不再经受 Cd^{2+} 处理时, 其化蛹率 ($F=1.082, df=4, P=0.366$)、蛹重 ($F=0.084, df=4, P=0.9862$)、蛹长、($F=0.218, df=4, P=0.9272$) 和蛹期 ($F=0.112, df=4, P=0.973$) 与对照相比则同样均未受到显著的影响 (表 4-2)。

2.2.3 成虫期

当各处理 F_1 代幼虫不再经受 Cd^{2+} 处理时, 其羽化率 ($F=0.864, df=4, P=0.518$)、雌雄性比 ($F=0.689, df=4, P=0.6302$)、雌虫体重 ($F=0.466, df=4, P=0.7594$)、雄虫体重 ($F=0.546, df=4, P=0.7048$)、交配率 ($F=1.194, df=4, P=0.371$)、产仔量 ($F=0.029, df=4, P=0.9983$)、雌虫寿命 ($F=1.053, df=4, P=0.4279$), 以及雄虫寿命 ($F=0.856, df=4, P=0.5218$) 与对照相比则同样均未受到显著的影响 (表 4-3)。

2.3 各虫态体内的 Cd^{2+} 含量

幼虫经不同浓度 Cd^{2+} 处理后, 亲代体内 Cd^{2+} 含量明显高于对照, 且其在变态过程中变化趋势十分明显 (图 4-2A)。在幼虫期, 随着幼虫发育时间的推移 (也即 Cd^{2+} 处理时间的延续), 体内 Cd^{2+} 含量逐渐升高, 至蛹前达到高峰, 且这种趋势因 Cd^{2+} 处理浓度的升高而加剧。蛹期 Cd^{2+} 含量陡然下降, 这说明幼虫在化蛹前可能排出体内积累的部分 Cd^{2+} 。羽化后, 体内 Cd^{2+} 含量继续下降, 并渐趋稳定。

当各处理 F_1 代幼虫不再经受 Cd^{2+} 处理时, Cd^{2+} 含量在 F_1 代变态过程中变化趋势十分类似于亲代, 但其体内含量极低。这说明亲代中的 Cd^{2+} 通过化蛹和羽化等过程已被大量排出体外, 没有通过产仔传递予其 F_1 代 (图 4-2B)。

3 讨论

本文结果表明, 棕尾别麻蝇幼虫喂饲含 Cd^{2+} 食物后, 其当代或亲代幼虫、蛹和成虫的大小与体重均受到了显著的影响, 其中高浓度处理则尤为明显 (图 4-1、表 4-2 和 表 4-3)。这与 Cd^{2+} 对陆生昆虫, 如弹尾虫 *Orchesella cincta* (Posthuma, 1990)、美洲脊胸长蝽 *Oncopeltus fasciatus* (Cervera et al., 2004)、绿纹蝗 *Aiolopus thalassinu* (Schmidt et al., 1992) 和舞毒蛾 *Lymantria dispar* (Ortel, 1996), 及水生昆虫幼虫如摇蚊 *Chironomus riparius* (Sildanchandra and Crane, 2000) 的影响是类似的。就 Cd^{2+} 处理后导致棕尾别麻蝇亲代幼虫

历期和蛹期明显延长（表 1-1、表 1-2和表 1-3）的结果，在其他昆虫，如绿纹蝗（Schmidt *et al.*, 1991）、舞毒蛾（Gintenreiter *et al.*, 1993a），摇蚊（McCahon and Pascoe, 1991）、埃及伊蚊 *Aedes aegypti*（Rayms-Keller *et al.*, 1998）和美洲脊胸长蜡（Cervera *et al.*, 2004）中也有类似的报道，其中当绿纹蝗将卵产于100 mg CdCl₂/kg 土壤中时，自卵发育至成虫的时间比对照延长了一倍（Schmidt *et al.*, 1991）。相反，Cd²⁺ 处理后则导致棕尾别麻蝇亲代成虫寿命明显缩短，这与在绿纹蝗（Schmidt *et al.*, 1991, 1992）、摇蚊（Sildanchandra and Crane, 2000）和豌豆蚜 *Acyrtosiphon pisum*（Laskowski, 2001）中所观察到的情况是一致的。出现上述这些现象的原因在一定程度上反映了体重的减轻与历期延长可能是紧密相关的，Cd²⁺ 处理后发育历期的延长在一定程度上可能是补偿了重金属抑制昆虫生长的一种策略（Gintenreiter *et al.*, 1993）。这可从下面的实例得以旁证，如Cd²⁺ 处理后美洲脊胸长蜡必须生长达到一定体重时才能蜕皮变成新虫龄；当其体重与对照相同时，则蜕皮时间与对照一致，而那些体重较对照轻的个体则羽化时间明显延迟，且体重的减得越轻，延迟时间的越长（Cervera *et al.*, 2004）。鳞翅目幼虫也要达到一特定的体重才能成功地化蛹（Gintenreiter *et al.*, 1993）。这种规律是否普遍存在有待进一步研究归纳。

本文结果表明，Cd²⁺ 处理能明显抑制棕尾别麻蝇亲代的交配和产仔能力，高浓度处理时，抑制作用则更显著（表 4-3）。这与在绿纹蝗（Schmidt *et al.*, 1991, 1992）、舞毒蛾（Gintenreiter *et al.*, 1993）、豌豆蚜（Laskowski, 2001）、家蝇 *Musca domestica*（Niu *et al.*, 2002）和美洲脊胸长蜡（Cervera *et al.*, 2004）中所观察到的现象是类似。究其原因，可能是Cd²⁺ 处理后导致了昆虫生殖器官的非正常发育。

有关Cd²⁺ 对绿纹蝗（Schmidt *et al.*, 1991）和美洲脊胸长蜡（Cervera *et al.*, 2004）子代卵孵化影响的结果显示，当幼虫期遭受Cd²⁺ 污染后，其羽化成虫所产卵的孵化率明显下降，其原因是Cd²⁺ 对卵胚胎发育产生了毒害作用（Schmidt *et al.*, 1991）。本文结果表明，Cd²⁺ 处理导致了棕尾别麻蝇的产仔量的显著下降。考虑到该蝇营卵胎生的习性，可推测产仔量的显著下降原因可能就是有些卵在产仔前未能正常孵化所致，从这点来看是与前人的结果是相似的。但具体究竟如何则有待解剖观察验证。本文结果还表明，一旦产仔后，其子代在不再经受Cd²⁺ 处理的前提下，其生存、生长发育和繁殖则不会受到显著的影响。其原因在于Cd²⁺ 处理后仅能在亲代高浓度地累积，但随着化蛹和羽化过程已经被大量地排出体外了，而没有通过初孵化传递予子代。可见，Cd²⁺ 对亲代的影响不能传递至下一代。

综上所述，Cd²⁺ 对棕尾别麻蝇亲代幼虫、蛹和成虫的多项生物学特性影响是显著的，其中幼虫体重与体长、幼虫历期与蛹期，及产仔量所受影响更为显著。因此，若用该蝇监测 Cd²⁺ 污染程度，可首选考查这几个指标，使监测的灵敏更高。是否适用尚待实践验证。

表 4-2 不同浓度 Cd^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代和子代蛹及有关生物学特性的影响
 Table 4-2 Effects of Cd^{2+} at different concentrations on biological characters of *B. peregrine* pupae at the parental generation (P) and the first filial generation (F_1)

Concentrations ($\mu\text{g/g}$)	Pupation ration (%)		Pupa weight (mg fw/pupa)		Pupa length (cm)		Pupa stage (d)	
	P	F_1	P	F_1	P	F_1	P	F_1
100	$96.67 \pm 1.53\text{ a}$	$97.43 \pm 2.35\text{ a}$	$37.36 \pm 1.54\text{ a}$	$40.10 \pm 3.20\text{ a}$	$0.86 \pm 0.04\text{ ab}$	$0.90 \pm 0.07\text{ a}$	$11.33 \pm 1.53\text{ b}$	$10.00 \pm 0.61\text{ a}$
200	$88.00 \pm 3.00\text{ b}$	$98.24 \pm 4.65\text{ a}$	$39.18 \pm 3.10\text{ a}$	$39.90 \pm 3.70\text{ a}$	$0.83 \pm 0.05\text{ b}$	$0.89 \pm 0.03\text{ a}$	$11.67 \pm 1.53\text{ b}$	$9.71 \pm 1.12\text{ a}$
400	$75.67 \pm 1.15\text{ c}$	$95.70 \pm 1.74\text{ a}$	$26.55 \pm 1.34\text{ b}$	$39.10 \pm 3.10\text{ a}$	$0.77 \pm 0.04\text{ c}$	$0.90 \pm 0.05\text{ a}$	$14.33 \pm 2.08\text{ a}$	$9.62 \pm 0.27\text{ a}$
800	$65.00 \pm 5.57\text{ d}$	$97.50 \pm 3.21\text{ a}$	$22.20 \pm 3.52\text{ c}$	$40.20 \pm 2.70\text{ a}$	$0.76 \pm 0.06\text{ c}$	$0.90 \pm 0.03\text{ a}$	$15.33 \pm 3.51\text{ a}$	$9.72 \pm 0.46\text{ a}$
CK	$98.33 \pm 3.51\text{ a}$	$96.46 \pm 2.42\text{ a}$	$40.11 \pm 2.84\text{ a}$	$40.10 \pm 2.80\text{ a}$	$0.89 \pm 0.02\text{ a}$	$0.89 \pm 0.02\text{ a}$	$9.33 \pm 0.58\text{ c}$	$9.91 \pm 0.92\text{ a}$

数据为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)。Duncan's 新复极差法检验表明, 同一列中具相同小写字母的数据间差异未达显著水平 ($P < 0.05$)

The values are means $\pm$ standard deviation. In the same column, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).
 fw: fresh weight.

表 4-3 不同浓度 Cd^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代和子代成虫有关生物学特性的影响
Table 4-3 Effects of Cd^{2+} at different concentrations on biological characters of *B. peregrine* adults at the parental generation (P) and the first filial generation (F_1)

Parameters	Generation	Cd^{2+} concentrations ($\mu g/g$)				CK
		100	200	400	800	
Eclosion ratio (%)	P	99.67 $\pm$ 0.58 a	99.33 $\pm$ 0.58 a	99.00 $\pm$ 1.00 a	93.00 $\pm$ 1.73 b	99.98 $\pm$ 0.53 a
	F_1	99.33 $\pm$ 0.58 a	98.00 $\pm$ 1.00 a	99.00 $\pm$ 1.00 a	97.33 $\pm$ 2.08 a	98.33 $\pm$ 2.08 a
Sex ratio ($\varphi : \delta$)	P	1.07 $\pm$ 0.12 a	1.04 $\pm$ 0.06 a	0.97 $\pm$ 0.07 a	0.96 $\pm$ 0.04 a	1.03 $\pm$ 0.10 a
	F_1	1.07 $\pm$ 0.02 a	1.02 $\pm$ 0.06 a	1.08 $\pm$ 0.02 a	1.00 $\pm$ 0.02 a	0.98 $\pm$ 0.04 a
Mating ratio (%)	P	65.33 $\pm$ 2.52 a	51.67 $\pm$ 2.08 b	47.00 $\pm$ 4.58 b	19.00 $\pm$ 6.24 c	64.00 $\pm$ 3.61 a
	F_1	66.00 $\pm$ 3.61 a	69.00 $\pm$ 3.61 a	63.33 $\pm$ 4.16 a	67.33 $\pm$ 3.51 a	64.00 $\pm$ 3.61 a
Oviposition number (egg/ φ)	P	67.12 $\pm$ 13.27 a	73.12 $\pm$ 10.10 a	51.80 $\pm$ 7.12 b	43.61 $\pm$ 9.13 b	78.01 $\pm$ 16.16 a
	F_1	81.03 $\pm$ 15.61 a	83.11 $\pm$ 4.61 a	81.22 $\pm$ 15.64 a	82.32 $\pm$ 12.92 a	82.11 $\pm$ 16.25 a
Body weight (mg fw/larva)	P (φ)	32.36 $\pm$ 1.54 a	31.93 $\pm$ 2.44 a	21.80 $\pm$ 1.16 a	17.45 $\pm$ 3.25 b	34.86 $\pm$ 2.48 a
	F_1 (φ)	35.64 $\pm$ 5.10 a	36.71 $\pm$ 2.80 a	34.01 $\pm$ 2.25 a	36.51 $\pm$ 2.24 a	35.10 $\pm$ 3.12 a
	P (δ)	27.36 $\pm$ 1.54 a	29.18 $\pm$ 3.10 a	19.55 $\pm$ 1.34 b	15.20 $\pm$ 3.52 b	30.11 $\pm$ 2.84 a
	F_1 (δ)	30.60 $\pm$ 3.30 a	32.91 $\pm$ 2.50 a	30.21 $\pm$ 3.31 a	31.51 $\pm$ 3.92 a	31.14 $\pm$ 2.81 a
Longevity (d)	P (φ)	33.32 $\pm$ 3.22 bc	34.01 $\pm$ 3.62 b	33.01 $\pm$ 4.61 bc	31.31 $\pm$ 3.15 c	37.32 $\pm$ 6.04 a
	F_1 (φ)	30.04 $\pm$ 2.73 a	33.01 $\pm$ 2.01 a	29.70 $\pm$ 2.53 a	31.03 $\pm$ 3.01 a	33.35 $\pm$ 3.82 a
	P (δ)	34.71 $\pm$ 2.50 a	33.04 $\pm$ 2.53 a	29.00 $\pm$ 1.72 b	27.01 $\pm$ 3.61 b	34.04 $\pm$ 2.02 a
	F_1 (δ)	29.02 $\pm$ 2.07 b	30.72 $\pm$ 3.11 a	31.08 $\pm$ 2.72 a	29.32 $\pm$ 1.51 b	32.04 $\pm$ 2.01 a

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$)。Duncan's 新复极差法检验表明, 同一行中具相同小写字母的数据间差异未达显著水平 ($P < 0.05$)

The values are means $\pm$ standard deviation. In the same row, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

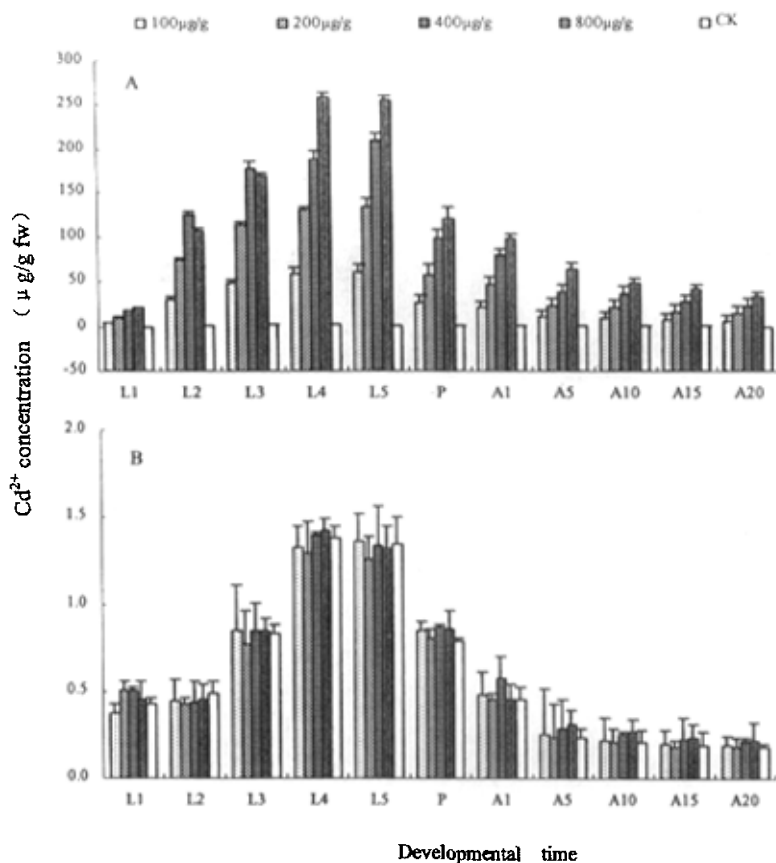


图 4-2 不同浓度 Cd^{2+} 处理后棕尾别麻蝇亲代 (A) 和 F_1 代 (B) 变态过程中体内 Cd^{2+} 浓度的变化
 Fig. 4-2 Changes of Cd^{2+} concentrations in *B. peregrine* during its metamorphosis at the parental generation (A) and the first filial generation (B) after exposure to Cd^{2+} at different concentrations

L1、L2、L3、L4 和 L5 分别表示幼虫经 Cd^{2+} 处理后的第 1、2、3、4 和 5 天；P 表示蛹期；A1、A5、A10、A15 和 A20 分别表示成虫羽化后的第 1、5、10、15 和 20 天。L1, L2, L3, L4 and L5 mean the larvae on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th day after exposure to Cd^{2+} , respectively; P means pupal stage; A1, A5, A10, A15 and A20 mean the adults on the 1st, 5th, 10th, 15th and 20 th day after eclosion, respectively. fw: fresh weight

第五章 铜对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育与繁殖的影响

尽管铜是必要的微量营养元素,但是过度吸入在一定条件下是有毒的(Bremner, 1998)。铜中毒的易感性由许多因素而定,如物种、遗传、年龄和食物。在陆地生态系统中昆虫种类多、数量大、分布广,往往会取食、转移和代谢环境中的铜,因此研究铜对昆虫的影响是重要的。目前有关Cu对昆虫影响的研究还较少,且主要集中于Cu在昆虫中的积累和吸收方面(Crawford *et al.*, 1990; Crawford *et al.*, 1995; Gintenreiter *et al.*, 1993; Lindqvist, 1992)。为此,本章研究了Cu对棕尾别麻蝇亲代及子代生长发育和繁殖的影响,并与第四章Cd的影响作对比,一方面表明了不同重金属对同一昆虫生长发育和生殖的影响程度,另一方面也为将来开展重金属污染的生物监测提供理论基础与技术参数。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章 1.1。

1.2 Cu^{2+} 对亲代生长发育与繁殖的影响

收集成虫8 h 内产的幼虫当作亲代(P代)用于实验。将P代幼虫移入500 ml 的玻璃果酱瓶中,分别饲喂含200、400和800、1600 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$ 的人工饲料。考查指标及方法同第四章 1.2。

1.3 Cu^{2+} 对子代生长发育与繁殖的影响

收集方法1.2各浓度处理和对照的雌蝇所产的幼虫供作 F_1 代,分别转移到不含 Cu^{2+} 的人工饲料中饲养。之后,按方法1.2考查幼虫、蛹和成虫的各项指标,并收集幼虫、蛹和成虫期各阶段的样品供体内 Cu^{2+} 含量的测定。

1.4 Cu^{2+} 含量的测定

参照Niu 等(2002)将方法1.2 和1.3 准备的各样品(幼虫或蛹均为10头,成虫含雌雄虫各5头),分别用2.0 ml 混合酸($\text{HClO}_4:\text{HNO}_3=1:5$ v/v)消化,然后定容到25 ml,再用原子吸收分光光度计(Perkin Elmer, AAnalyst 100)测定 Cu^{2+} 的浓度,然后计算样品 Cu^{2+} 含量。每样品均设有3个重复。

1.5 数据分析

采用DPS软件（唐启义和冯明光，2002）对各处理指标进行方差分析，再以Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 对亲代生长发育与繁殖的影响

2.1.1 幼虫期

亲代幼虫经不同浓度 Cu^{2+} 处理后，幼虫体重和体长则受到明显的影响，其中对体重（图 5-1A）（ $F=7.577, df=4, P=0.0013$ ）和体长（图 5-1 B）（ $F=13.815, df=4, P<10^{-4}$ ）的影响程度均受到 Cu^{2+} 处理浓度的极显著影响，处理浓度越高，体重越轻，体长越短，但低浓度的 Cu^{2+} （200 $\mu\text{g/g}$ ）不仅对体重和体长无抑制作用，反而有促进作用。就幼虫发育历期而言， Cu^{2+} 处理则导致其明显延长，其中影响的程度又受到 Cu^{2+} 处理浓度的极显著影响（ $F=3.398, df=4, P<10^{-4}$ ），低浓度（200 $\mu\text{g/g}$ 和 400 $\mu\text{g/g}$ ）处理无显著影响，高浓度（800 $\mu\text{g/g}$ 和 1600 $\mu\text{g/g}$ ）处理，幼虫龄期明显延长（表 5-1）。

表 5-1 不同浓度 Cu^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代和子代幼虫历期的影响

Table 5-1 Effects of Cu^{2+} at different concentrations on the stadia of *Boettcherisca peregrine* larvae at the parental generation (P) and the first filial generation (F_1)

Concentrations ($\mu\text{g/g}$)	Stadium (h)					
	1st instar		2nd instar		3rd instar	
	P	F_1	P	F_1	P	F_1
200	14.28 $\pm$ 2.02 b	14.28 $\pm$ 2.02 a	26.67 $\pm$ 2.52 c	26.67 $\pm$ 2.52 a	76.00 $\pm$ 1.00 c	75.67 $\pm$ 3.51 a
400	14.33 $\pm$ 1.53 b	14.33 $\pm$ 1.53 a	28.33 $\pm$ 2.52 bc	28.33 $\pm$ 2.53 a	78.33 $\pm$ 2.08 c	75.00 $\pm$ 4.58 a
800	17.67 $\pm$ 0.58 ab	14.00 $\pm$ 1.00 a	32.02 $\pm$ 2.65 b	28.13 $\pm$ 1.80 a	95.04 $\pm$ 3.02 b	79.17 $\pm$ 2.51 a
1600	20.33 $\pm$ 2.52 a	13.20 $\pm$ 2.16 a	40.00 $\pm$ 2.00 a	28.00 $\pm$ 1.40 a	115.33 $\pm$ 11.85a	74.62 $\pm$ 3.38 a
CK	14.57 $\pm$ 1.69 b	13.90 $\pm$ 1.15 a	28.67 $\pm$ 1.53 bc	28.67 $\pm$ 1.53 a	74.33 $\pm$ 4.04 c	74.33 $\pm$ 4.04 a

数据为平均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{x} \pm \text{S.D.}$ ），同一列中标有不同字母表示差异显著（ $P < 0.05$ ，Duncan 新复极差法检验）。The values are means $\pm$ standard deviation. In the same column, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

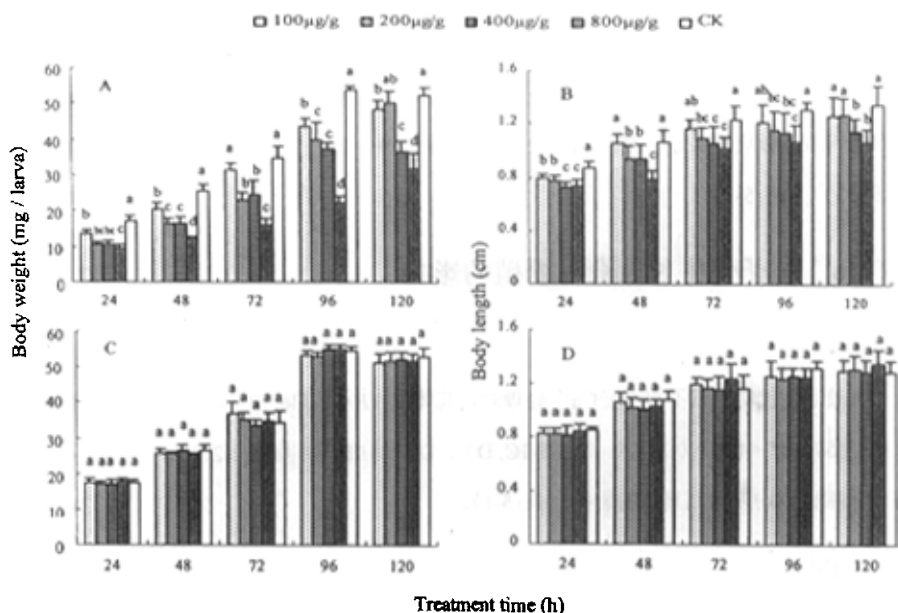


图 5-1 不同浓度 Cu^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代 (A, B) 和子代 (C, D) 幼虫体重和体长的影响
Fig. 5-1 Effects of Cu^{2+} at different concentrations on the body weight and body length of *B. peregrine* larvae at the parental generation (A, B) and the first filial generation (C, D)

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)，柱子上标有不同字母表示同一时间不同种群间差异显著 ($P < 0.05$ ，Duncan 新复极差法检验)。The values are means $\pm$ standard deviation. For the same time after exposure to cadmium, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

2.1.2 蛹期

亲代幼虫经不同浓度 Cu^{2+} 处理后，蛹期各项考查指标均受到明显的影响，其中化蛹率 ($F = 111.128$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、蛹重 ($F = 182.183$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$)、蛹长度 ($F = 29.476$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$) 和蛹期 ($F = 11.489$, $df = 4$, $P = 0.0009$) 均受到 Cu^{2+} 处理浓度的极显著影响。但低浓度处理和高浓度处理后的影响不一样。低浓度 (200 $\mu\text{g/g}$ 和 400 $\mu\text{g/g}$) 蛹重变重，蛹长变长 (表 5-2)；而高浓度 Cu^{2+} (800 $\mu\text{g/g}$ 和 1600 $\mu\text{g/g}$) 处理的幼虫，化蛹率比对照明显下降，蛹重变轻，蛹长变小，蛹期延长 (表 5-2)。

2.1.3 成虫期

幼虫经不同浓度 Cu^{2+} 处理后，对亲代成虫羽化率、雌雄虫体重、交配率、产仔量和寿

命均有明显的影响,其中对羽化率($F=56.207, df=4, P<10^{-4}$)、刚羽化雌虫体重($F=74.183, df=4, P<10^{-4}$)、雄虫体重($F=156.302, df=4, P<10^{-4}$)、交配率($F=3.721, df=4, P=0.0115$)、产仔量($F=51.46, df=4, P<10^{-4}$)、雌虫寿命($F=4.531, df=4, P=0.024$)和雄虫寿命($F=7.022, df=4, P=0.0022$)的影响程度均受到 Cu^{2+} 处理浓度的极显著影响。处理浓度越高,影响越明显。然而 Cu^{2+} 处理对成虫雌雄性比则无显著影响($F=0.18, df=4, P=0.9435$) (表 5-3)。

2.2 Cu^{2+} 对子代生长发育与繁殖的影响

2.2.1 幼虫期

各处理 F_1 代幼虫若不再经受 Cu^{2+} 处理时,其体重($F=2.336, df=4, P=0.0996$)和体长($F=1.576, df=4, P=0.2287$) (图 5-1C, D),以及幼虫历期($F=1.201, df=4, P=0.381$)与对照相比则均未受到显著的影响(表 5-1)。

2.2.2 蛹期

当各处理 F_1 代幼虫不再经受 Cu^{2+} 处理时,其化蛹率($F=0.557, df=4, P=0.6972$)、蛹重($F=0.604, df=4, P=0.6684$)、蛹长($F=0.869, df=4, P=0.49$)、和蛹期($F=1.410, df=4, P=0.2994$)与对照相比则同样均未受到显著的影响(表 5-2)。

2.2.3 成虫期

当各处理 F_1 代幼虫不再经受 Cu^{2+} 处理时,其羽化率($F=0.181, df=4, P=0.9429$)、雌雄性比($F=0.434, df=4, P=0.7815$)、雌虫体重($F=0.741, df=4, P=0.585$)、雄虫体重($F=0.98, df=4, P=0.4606$)、交配率($F=0.079, df=4, P=0.9879$)、产仔量($F=1.837, df=4, P=0.1438$)、雌虫寿命($F=1.019, df=4, P=0.4215$),以及雄虫寿命($F=0.954, df=4, P=0.4729$)与对照相比则同样均未受到显著的影响(表 5-3)。

2.3 Cu^{2+} 在棕尾别麻蝇各虫态中的含量

幼虫经不同浓度 Cu^{2+} 处理后,亲代体内 Cu^{2+} 含量明显高于对照,且其在变态过程中变化趋势十分明显(图 5-2A)。在幼虫期,随着幼虫发育时间的推移(也即 Cu^{2+} 处理时间的延续),体内 Cu^{2+} 含量逐渐升高,至蛹前达到高峰,且这种趋势因 Cu^{2+} 处理浓度的升高而加剧。蛹期 Cu^{2+} 含量度陡然下降,这说明幼虫在化蛹前可能排出体内积累的部分 Cu^{2+} 。羽化后,体内 Cu^{2+} 含量继续下降,并渐趋稳定。

当各处理 F_1 代幼虫不再经受 Cu^{2+} 处理时, Cu^{2+} 含量在 F_1 代变态过程中变化趋势十分类似于亲代, 但其体内含量极低。这说明亲代中的 Cu^{2+} 通过化蛹和羽化等过程已被大量排出体外, 没有通过产仔传递予其 F_1 代(图5-2 B)。

3 讨论

本文结果表明, 棕尾别麻蝇幼虫取食含 Cu^{2+} 食物后, 其当代或亲代幼虫、蛹和成虫的大小与体重均受到了显著的影响, 其中高浓度处理则尤为明显(图 5-1、表 5-2和表 5-3)。但低浓度的 Cu^{2+} 如(200 $\mu\text{g/g}$)会促进棕尾别麻蝇的生长, 只有高浓度的 Cu^{2+} 才和 Cd^{2+} 一样抑制棕尾别麻蝇生长(Posthuma, 1990; Cervera *et al.*, 2004; Schmidt *et al.*, 1992; Ortel, 1996; Sildanchandra and Crane, 2000)。就高浓度 Cu^{2+} 处理后导致棕尾别麻蝇亲代幼虫历期和蛹期明显延长(表 5-1、表 5-2和表 5-3)的结果, 与 Cd^{2+} 对昆虫的影响是相类似的(Schmidt *et al.*, 1991; Gintenreiter *et al.*, 1993a; McCahon and Pascoe, 1991; Rayms-Keller *et al.*, 1998; Cervera *et al.*, 2004)。相反, 高浓度 Cu^{2+} 处理后则导致棕尾别麻蝇亲代成虫寿命明显缩短, 这与 Cd^{2+} 的影响也是相类似的(Schmidt *et al.*, 1991, 1992; Sildanchandra and Crane, 2000; Laskowski, 2001)。出现上述这些现象的原因在一定程度上反映了体重的减轻与历期延长可能是紧密相关的, 重金属处理后发育历期的延长在一定程度上可能是补偿重金属抑制昆虫生长的一种策略(Gintenreiter *et al.*, 1993)。这可从下面的实例得以旁证, 如 Cd^{2+} 处理后美洲脊胸长蜡 *Oncopeltus fasciatus* 必须生长达到一定体重时才能蜕皮变成新虫龄; 当其体重与对照相同时, 则蜕皮时间与对照一致, 而那些体重较对照轻的个体则羽化时间明显延迟, 且体重的减得越轻, 延迟时间的越长(Cervera *et al.*, 2004)。鳞翅目幼虫也要达到一特定的体重才能成功地化蛹(Gintenreiter *et al.*, 1993)。这种规律是否普遍存在有待进一步研究归纳。

本文结果表明, 高浓度的 Cu^{2+} 处理能明显抑制棕尾别麻蝇亲代的交配和产仔能力(表 5-3)。这与Cd对昆虫的影响是类似的(Schmidt *et al.*, 1991, 1992; Gintenreiter *et al.*, 1993; Laskowski, 2001; Niu *et al.*, 2002; Cervera *et al.*, 2004)。究其原因, 可能是 Cu^{2+} 处理后导致了昆虫生殖器官的非正常发育。

本文结果还表明, 一旦产仔后, 其子代在不再经受 Cu^{2+} 处理的前提下, 其生存、生长发育和繁殖则不会受到显著的影响。其原因在于处理后 Cu^{2+} 仅能在亲代高浓度地累积, 但随着化蛹和羽化过程已经被大量地排出体外了, 而没有通过初孵传递予子代。可见, Cu^{2+} 对亲代的影响不能传递至下一代。

表 5-2 不同浓度 Cu^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代和子代蛹及有关生物学特性的影响
 Table 5-2 Effects of Cu^{2+} at different concentrations on biological characters of *B. peregrine* pupae at the parental generation (P) and the first filial generation (F_1)

Concentrations ($\mu\text{g/g}$)	Pupation ration (%)		Pupa weight (mg fw/pupa)		Pupa length (cm)		Pupa stage (d)	
	P	F_1	P	F_1	P	F_1	P	F_1
200	97.67 $\pm$ 2.08 a	96.38 $\pm$ 1.49 a	45.25 $\pm$ 2.35 a	40.19 $\pm$ 0.44 a	0.87 $\pm$ 0.05 a	0.84 $\pm$ 0.04 a	10.03 $\pm$ 0.31 b	10.03 $\pm$ 0.31 a
400	89.00 $\pm$ 1.00 a	95.63 $\pm$ 3.82 a	39.52 $\pm$ 2.56 b	40.27 $\pm$ 0.93 a	0.83 $\pm$ 0.04 a	0.83 $\pm$ 0.04 a	10.67 $\pm$ 1.15 b	10.67 $\pm$ 1.15 a
800	70.67 $\pm$ 5.86 b	97.50 $\pm$ 1.91 a	25.51 $\pm$ 1.61 c	39.79 $\pm$ 1.07 a	0.70 $\pm$ 0.04 b	0.82 $\pm$ 0.03 a	14.67 $\pm$ 1.53 a	11.83 $\pm$ 1.61 a
1600	20.00 $\pm$ 10.00 c	94.75 $\pm$ 2.63 a	15.39 $\pm$ 0.18 d	39.43 $\pm$ 0.91 a	0.67 $\pm$ 0.04 b	0.84 $\pm$ 0.02 a	16.00 $\pm$ 2.65 a	12.17 $\pm$ 1.76 a
CK	97.67 $\pm$ 2.08 a	95.00 $\pm$ 4.16 a	38.13 $\pm$ 0.90 b	40.33 $\pm$ 0.78 a	0.71 $\pm$ 0.08 b	0.85 $\pm$ 0.03 a	9.67 $\pm$ 0.58 b	10.33 $\pm$ 1.53 a

数据为平均值 $\pm$ 标准 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)，同一列中标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$ ，Duncan 新复极差法检验)。The values are means $\pm$ standard deviation. In the same column, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test). fw: fresh weight.

表 5-3 不同浓度 Cu^{2+} 处理对棕尾别麻蝇亲代和子代成虫有关生物学特性的影响Table 5-3 Effects of Cu^{2+} at different concentrations on biological characters of *B. peregrine* adults at the parental generation (P) and the first filial generation (F_1)

Parameters	Generation	Cu^{2+} concentrations ($\mu\text{g/g}$)				CK
		200 $\mu\text{g/g}$	400 $\mu\text{g/g}$	800 $\mu\text{g/g}$	1600 $\mu\text{g/g}$	
Eclosion ratio (%)	P	97.03 $\pm$ 2.62 a	98.02 $\pm$ 0.99 a	88.78 $\pm$ 4.02 b	64.69 $\pm$ 5.45 c	98.02 $\pm$ 0.99 a
	F_1	95.69 $\pm$ 2.07 a	96.35 $\pm$ 2.09 a	95.35 $\pm$ 3.8 a	96.03 $\pm$ 2.65 a	94.67 $\pm$ 2.08 a
Sex ratio (♀: ♂)	P	1.03 $\pm$ 0.08 a	0.99 $\pm$ 0.11 a	1.01 $\pm$ 0.05 a	1.05 $\pm$ 0.15 a	1.01 $\pm$ 0.06 a
	F_1	1.01 $\pm$ 0.06 a	0.98 $\pm$ 0.07 a	0.99 $\pm$ 0.07 a	1.03 $\pm$ 0.11 a	1.05 $\pm$ 0.09 a
Mating ratio (%)	P	66.67 $\pm$ 17.68 a	69.44 $\pm$ 16.67 a	41.67 $\pm$ 33.07 bc	33.33 $\pm$ 30.62 c	61.11 $\pm$ 22.05ab
	F_1	62.20 $\pm$ 14.29 a	64.00 $\pm$ 12.94 a	65.40 $\pm$ 20.63 a	72.00 $\pm$ 18.15 a	67.00 $\pm$ 21.10a
Oviposition number (egg/♀)	P	84.1 $\pm$ 8.56 a	78.5 $\pm$ 10.28 b	48.5 $\pm$ 9.71 c	33.8 $\pm$ 5.63 d	74.2 $\pm$ 12.23 ab
	F_1	85.25 $\pm$ 8.99ab	82.13 $\pm$ 7.62 ab	85.88 $\pm$ 8.79 ab	87.67 $\pm$ 7.08 a	76.38 $\pm$ 12.74 b
Body weight (mg fw/ larva)	P (♀)	33.25 $\pm$ 2.35 a	29.52 $\pm$ 2.56 b	15.51 $\pm$ 1.61 c	14.39 $\pm$ 0.18 c	29.13 $\pm$ 0.9 b
	P (♂)	31.59 $\pm$ 0.56 a	28.85 $\pm$ 2.11 b	15.17 $\pm$ 1.04 c	13.72 $\pm$ 0.73 c	28.47 $\pm$ 0.64 b
	F_1 (♀)	31.97 $\pm$ 2.63 a	32.51 $\pm$ 3.13 a	32.29 $\pm$ 1.07 a	30.93 $\pm$ 1.30 a	33.77 $\pm$ 1.20 a
	F_1 (♂)	30.27 $\pm$ 2.83 a	28.85 $\pm$ 2.11 a	30.35 $\pm$ 2.07 a	27.44 $\pm$ 1.47 a	29.07 $\pm$ 1.68 a
Longevity (d)	P (♀)	33.33 $\pm$ 3.21a	32.67 $\pm$ 6.81ab	24.67 $\pm$ 4.51bc	22.00 $\pm$ 2.65c	34.00 $\pm$ 4.36a
	P (♂)	31.07 $\pm$ 4.32a	29.84 $\pm$ 5.19a	24.27 $\pm$ 2.75ab	18.25 $\pm$ 4.03b	30.76 $\pm$ 4.19a
	F_1 (♀)	33.4 $\pm$ 2.51 a	32.20 $\pm$ 2.59a	28.40 $\pm$ 5.1284 a	29.4 $\pm$ 7.67 a	29.00 $\pm$ 4.42 a
	F_1 (♂)	26.90 $\pm$ 3.64 a	28.70 $\pm$ 2.65 a	27.40 $\pm$ 3.80 a	25.20 $\pm$ 2.75 a	23.20 $\pm$ 5.51 a

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)，同一行中数据后标有不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$, Duncan 新复极差法检验)。The values are means $\pm$ standard deviation. In the same row, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test). fw: fresh weight.

综上所述， Cu^{2+} 对棕尾别麻亲代幼虫、蛹和成虫的多项生物学特性影响是显著的，其中幼虫体重与体长、幼虫历期与蛹期，及产仔量所受影响更为显著。因此，若用该蝇监测 Cu^{2+} 污染程度，可首选考查这几个指标，使监测的灵敏更高。具体是否适用，尚待实践验证。

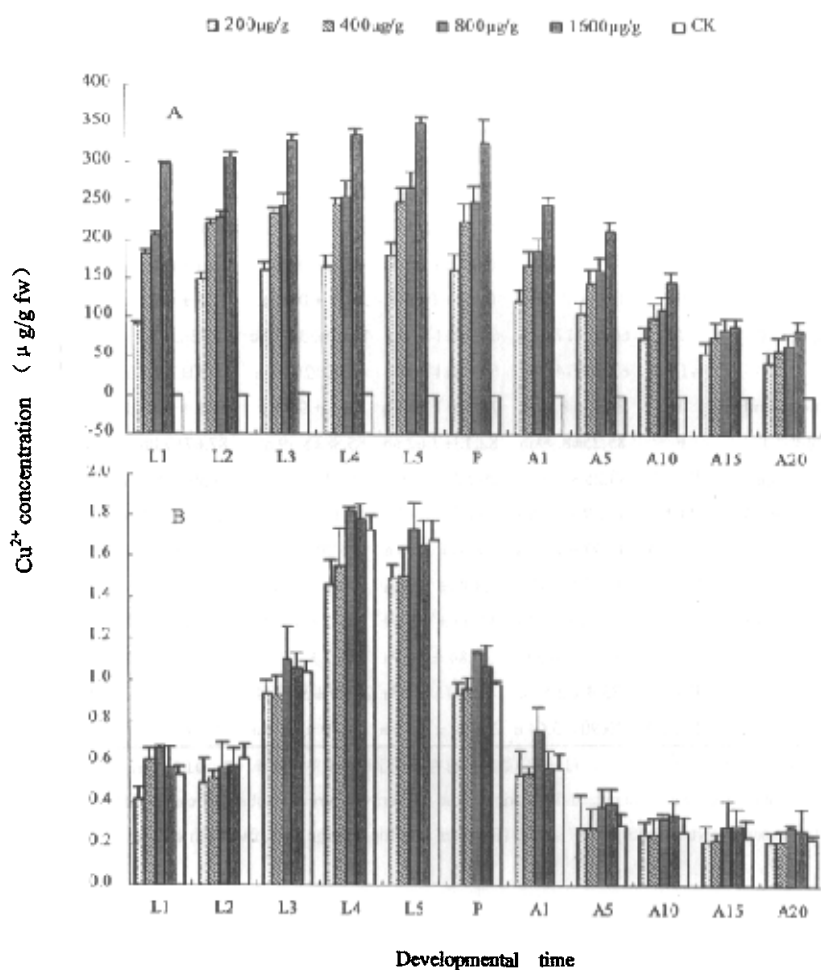


图 5-2 不同浓度 Cu^{2+} 处理后棕尾别麻蝇亲代 (A) 和 F_1 代 (B) 变态过程中体内 Cu^{2+} 浓度的变化
 Fig. 5-2 Changes of Cu^{2+} concentration in *B. peregrine* during its metamorphosis at the parental generation (A) and the first filial generation (B) after exposure to Cu^{2+} at different concentrations. fw: fresh weight

L1、L2、L3、L4 和 L5 分别表示幼虫经 Cu^{2+} 处理后的第 1、2、3、4 和 5 天；P 表示蛹期；A1、A5、A10、A15 和 A20 分别表示成虫羽化后的第 1、5、10、15 和 20 天。L1, L2, L3, L4 和 L5 mean the larvae on the 1st, 2nd, 3rd, 4th and 5th day after exposure to Cu^{2+} , respectively; P means pupal stage; A1, A5, A10, A15 and A20 mean the adults on the 1st, 5th, 10th, 15th and 20 th day after eclosion, respectively. fw: fresh weight.

第六章 镉和铜在棕尾别麻蝇体内的积累及其排泄

Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇的生物学特性有负面影响, 如体重, 体长, 化蛹率, 羽化率, 龄期, 寿命, 生育力(产仔量)。但一定浓度的 Cd^{2+} 不会引起棕尾别麻蝇大量死亡, 原因可能是昆虫对 Cd^{2+} 有特定的吸收和解毒机制, 例如通过消化道脱落物排泄金属以保证它们体内仅保留低浓度的 Cd^{2+} (Van Straalen *et al.*, 1987); 又如有很多储存器官(如中肠、马氏管-肛道复合体、回肠、脂肪体、表皮和生殖道)可以储存 Cd^{2+} (Ballan-Dufrançais, 2002); 诱导产生镉结合蛋白也可结合并储存 Cd^{2+} (Aoki *et al.*, 1984); 解毒酶和抗氧化酶也在其中起了重要的作用 (Wang *et al.*, 2001)。了解 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 在棕尾别麻蝇体内的分布和累积状况是解释这些的基础。金属在昆虫体内蓄积与排泄已经有不少报道 (Bengtsson *et al.*, 1985; Van Straalen *et al.*, 1987; Posthuma, 1990; Heliovaara and Vaisanen, 1990; Posthuma *et al.*, 1992; Lindqvist, 1994; Tochimoto *et al.*, 2003; Cervera *et al.*, 2004)。Crawford 等 (1990) 证明甜菜蚜 *Aphis fabae* 取食 Cu 和 Cd 污染的寄主植物蚕豆后, 积累了 Cd 但没有积累 Cu。甜菜蚜排泄了很多铜, 但只排泄了少量的 Cd (Crawford *et al.*, 1995)。Crawford 等 (1996) 报道非洲飞蝗 *Locusta migratoria* 可以有效的调控食物中过多的 Cu, 但是不能有效调控食物中过多的 Cd。本章的主要目的是监测 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 在棕尾别麻蝇 (*Boettcherisca peregrina*) 幼虫生长发育过程中积累和排泄的变化, 为了解重金属在昆虫体内的运转、沉积、排泄等提供依据, 并为揭示昆虫在污染条件下对金属的调控作初步的探索。

1 材料与方 法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章 1.1。

1.2 实验设计

收集成虫 8 h 内产的幼虫用于实验, 把幼虫放入 500 ml 的果酱瓶中, 每瓶 100 头, 喂食含 Cd^{2+} 或无污染的人工饲料。5 个 Cd^{2+} 浓度为: 0、100、200、400 和 800 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$, 每浓度设 3 个重复。5 个 Cu^{2+} 浓度为: 0、100、200、400 和 800 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$, 每浓度设 3 个重复。 Cd^{2+} 的溶液用 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ 和蒸馏水配制, 然后与麦麸、猪肝按比例混匀从而得到 Cd^{2+} 的最

后测试浓度。 Cu^{2+} 的溶液用 $\text{CuCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 和蒸馏水配制，然后与麦麸、猪肝按比例混匀从而得到 Cu^{2+} 的最后测试浓度。

每隔24 h 从每个瓶子中取出10头幼虫（直到对照开始化蛹）。取出的幼虫用蒸馏水洗净后放在含有少量水的玻璃瓶中排空24 h，然后分别将幼虫和排泄物进行消化，定容，最后用原子吸收分光光度计（Perkin Elmer, AAnalyst 100）测 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 含量。把老龄幼虫放到干燥的内有碎滤纸的果酱瓶中进行化蛹，化蛹后，取蛹和碎滤纸（老龄幼虫的排泄物）测量 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 含量。羽化后，取走蛹壳，把成虫放入果酱瓶中排泄24 h，最后取走成虫，并洗取瓶壁上的成虫排泄物，进行 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 含量的测定。

1.3 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 含量的测定

幼虫（10头幼虫/重复）、蛹（10头幼虫/重复）、成虫（5头雌虫与5头雄虫/重复）、幼虫排泄物（10头的排泄物/重复）和成虫排泄物（10头的排泄物/重复）分别用2.0 ml 混合酸（ $\text{HClO}_4:\text{HNO}_3=1:5$ v/v）消化（Niu *et al.*, 2002），然后定容到25 ml。金属含量测定采用原子吸收分光光度计（Perkin Elmer, AAnalyst 100）。

1.4 数据分析

采用DPS软件（唐启义和冯明光，2002）对各处理指标进行方差分析，再以Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 在幼虫中的积累与排泄

图 6-1 结果表明，棕尾别麻蝇幼虫取食含 Cd^{2+} 的食物5天内，虫体中的 Cd^{2+} 含量始终明显多于排泄物中含量（ $F=10.518$, $df=1$, $P=0.0022$ ），平均体内积累的 Cd^{2+} 占摄取量的83.78%，而排泄的只占16.22%。棕尾别麻蝇幼虫体内 Cd^{2+} 的积累量并不与处理的 Cd^{2+} 浓度成比例，当 Cd^{2+} 浓度在 $200\text{ }\mu\text{g/g}$ 以下时， Cd^{2+} 浓度越高，虫体内 Cd^{2+} 含量越高；但 Cd^{2+} 浓度超过 $200\text{ }\mu\text{g/g}$ 时， Cd^{2+} 浓度升高，虫体内的 Cd^{2+} 含量反而下降。同样，棕尾别麻蝇幼虫对 Cd^{2+} 的排泄也不与处理的 Cd^{2+} 浓度成比例，当 Cd^{2+} 浓度在 $200\text{ }\mu\text{g/g}$ 以下时， Cd^{2+} 浓度越高，幼虫排泄的 Cd^{2+} 越多；但 Cd^{2+} 浓度超过 $200\text{ }\mu\text{g/g}$ 时， Cd^{2+} 浓度升高，幼虫排泄的 Cd^{2+} 反而减少。

取食实验中各种 Cd^{2+} 浓度的食物，棕尾别麻蝇幼虫在体内连续积累 Cd^{2+} 的趋势都是一样的：都随着处理时间的延长，不断在体内积累，然后化蛹前稍微有点降低。棕尾别麻蝇幼虫在不同时间对 Cd^{2+} 的排泄规律与积累的趋势相类似（图 6-2）。

2.2 Cd^{2+} 在变态过程中的变化

从表 6-1 可以看出，幼虫积累在体内的 Cd^{2+} 大部分在变态过程中随着幼虫排泄物、蛹壳和成虫排泄物排出，只有少部分（30%左右）留在成虫体内，高浓度（800 $\mu\text{g/g}$ ）时留在体内百分含量比较高，达到 56.12%。

2.3 Cu^{2+} 在幼虫中的积累与排泄

图 6-3 结果表明，棕尾别麻蝇幼虫取食含 Cu^{2+} 的食物后，虫体中的 Cu^{2+} 含量和排泄物中含量基本相当，即无显著差异（ $F=0.011$, $df=1$, $P=0.9168$ ）。平均体内积累的 Cu^{2+} 占摄取量的 50.78%，而排泄的只 49.22%。棕尾别麻蝇幼虫体内 Cu^{2+} 的积累量基本上与处理的 Cu^{2+} 浓度成比例。同样，棕尾别麻蝇幼虫对 Cu^{2+} 的排泄也与处理的 Cu^{2+} 浓度成比例。

对于所有测试浓度的 Cu^{2+} ，棕尾别麻蝇幼虫连续在体内积累 Cu^{2+} 的趋势都是一样的：都随着处理时间的延长，不断在体内积累，然后化蛹前稍微有点降低。除 96 h 时外，棕尾别麻蝇幼虫在不同时间对 Cu^{2+} 的排泄规律与积累的趋势类似（图 6-4）。

2.4 Cu^{2+} 在变态过程中的变化

从表 6-2 可以看出，幼虫积累在体内的 Cu^{2+} 大部分在变态过程中随着幼虫排泄物、蛹壳和成虫排泄物排出，只有少部分（30%左右）留在成虫体内，高浓度（800 $\mu\text{g/g}$ ）时留在体内百分含量比较高，达到 40.56%。

3 讨论

一般影响动物对金属积累的与食物有关的因素有：食物中金属浓度、食物摄取率、食物金属的吸收率（Thomann, 1981; Spacies and Hamelink, 1985; Luoma *et al.*, 1992; Wang and Fisher, 1996; Munger and Hare, 2000）。本文的试验证明，棕尾别麻蝇幼虫取食含有 Cd^{2+} 的饲料后，把大部分 Cd^{2+} 连续积累在体内，小部分通过排泄系统排泄掉，但幼虫在体内的积累量并不与食物的浓度成比例，可能是当体内的浓度超过某个水平时，棕尾别麻蝇就加强了

排泄调控。而高浓度的处理 ($800 \mu\text{g/g}$), 积累量和排泄量都降低了, 可能是幼虫中毒较重, 摄取能力下降, 排泄能力下降。与我们的结论类似, Crawford 等(1996)报道非洲飞蝗 *Locusta migratoria* 可以在体内积累Cd, 并认为Cd 积累是一个连续过程。Cd 积累也在其它昆虫中发生, 如黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Maroni and Watson, 1985)、舞毒蛾 *Lymantria dispar* (Gintenreiter *et al.*, 1993a)、松尺蠖 *Bupalus piniarius* 和松夜蛾 *Panolis flammea* (Heliovaara and Vaisanen, 1990)、弹尾虫 *Orchesella cincta* (Hensbergen *et al.*, 2000)、美洲脊胸长蝽 *Oncopeltus fasciatus* (Cervera *et al.*, 2004)。与必需金属相比, 昆虫体内的Cd 浓度更多的取决于环境中Cd污染程度 (Van Straalen *et al.*, 1987; Roth-Holzappel and Funke, 1990)。Lindqvist (1995) 也报道黄粉虫 *Tenebrio molitor* 幼虫体内的Cd 浓度和食物中的浓度有很强的相互关系, 从而认为黄粉虫幼虫不能调控体内Cd 浓度。但是Lindqvist (1994) 认为当昆虫成熟时分泌能力提高, 所以Cd 不会被积累。这可能只是昆虫对食物中低水平Cd 的调控。Cd在昆虫体内的积累可能是由于产生金属结合蛋白(如金属硫蛋白)和效率有限的Cd 排泄系统 (Starcher *et al.*, 1980; Hensbergen *et al.*, 2000)。

而棕尾别麻蝇取食含 Cu^{2+} 的饲料后, 积累 Cu^{2+} 的量和排泄 Cu^{2+} 的量大体相当, 随着处理时间的延长, 不断在体内积累, 而且积累量和排泄量基本上与处理的 Cu^{2+} 浓度成比例。同样, Poulson 等. (1952) 观察到黑腹果蝇 *D. melanogaster* 幼虫积累的Cu大体与食物中的浓度成比例。另外, 有人报道松尺蠖 *B. piniaris* (Heliovaara and Vaisanen, 1990; Lindqvist, 1994) 和角石蛾 *Stenopsyche marmorata* (Tochimoto *et al.*, 2003) 也积累Cu。相反, 有人报道甜菜蚜 *Aphis fabae* 取食Cu 污染的寄主植物蚕豆后, 没有积累Cu (Crawford *et al.*, 1990), 其原因是甜菜蚜分泌排泄了很多Cu 而把体内的含量维持相对稳定的水平 (Crawford *et al.*, 1995)。Crawford 等 (1996) 报道非洲飞蝗 *L. migratoria* 也通过排泄有效地调控食物中过多的Cu, 使昆虫体内的Cu 保持在一定水平, 进而推导出昆虫体内的Cu 水平与处理时间无关 (Crawford *et al.*, 1996)。这可能是昆虫对食物中低水平Cu 的调控。

有人对那些生活在废弃炼铜厂的无脊椎动物进行金属含量的调查, 结果表明许多初级消费者能调控Cu, 但是不能调控Cd (Rabitsch, 1995a,b,c)。杂食性的蚂蚁 (Rabitsch, 1995b) 显示了相似的体内调控Cu 的能力, 然而对Cd 没有调控能力, 所以其体内Cd 的水平与其生活地Cd 浓度密切相关。一般在较高的营养层能有效的调控Cu 和Cd 的水平 (Rabitsch, 1995c)。但是在实验地提高铅的水平会扰乱体内金属代谢, 特别是在低的金属水平。另外,

昆虫对金属的反应与发育期有关。舞毒蛾 *L. dispar* 刚孵化幼虫比在对照食物中长大的4龄幼虫对食物中的Cu 和Cd 敏感 (Gintenreiter *et al.*, 1993b)。F₁代体内积累的金属量增加也反应Cu 和Cd 的生物积累 (Gintenreiter *et al.*, 1993b)。目前已证明Cu 和Cd 主要积累在昆虫中肠 (Suzuki *et al.*, 1984; Maroni and Watson, 1985; Hensbergen, 2000; Niu *et al.*, 2002)。

棕尾别麻蝇幼虫取食含重金属的食物后, 重金属在体内的积累和排泄是动态变化的。金属在昆虫体内的动力学紧密联系着昆虫的生理, 因为中肠上皮细胞在每一次蜕皮时再生, 老的上皮细胞作为肠的代谢物排出。Posthuma等 (1992) 弹尾虫体内的90%的Cd 积累在中肠, 每次蜕皮只有35%的Cd 排泄。这就有两种可能: 一半以上的Cd 不在同一层上皮细胞, 也不在基膜; 老上皮细胞中的Cd 被新的上皮细胞再吸收。

棕尾别麻蝇幼虫体内积累的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 在变态过程中随着幼虫排泄物、蛹壳和成虫排泄物排出, 只有少部分留在成虫体内。类似的报道有很多, 如 Cd 浓度在双翅目 (Aoki and Suzuki, 1984; Timmermans and Walker, 1989)、鳞翅目、膜翅目 (Lindqvist, 1992) 和鞘翅目 (Lindqvist and Block, 1995) 昆虫变态过程中逐渐降低。变态过程对昆虫生理有很大的影响。因为在变态过程中, 许多器官遭到破坏, 由胚胎细胞发育来的新器官又重建, 然而其它器官没有太大的变化就变成成虫的器官 (Wigglesworth, 1974)。对于双翅目来说, 来自幼虫的组织在蛹期被溶解、吞噬, 组织几乎全部重建, 中肠上皮细胞也不理外 (Chapman, 1982)。在这个过程中, 部分 Cd 可能脱离中肠上皮, 而进入肠腔, 羽化后被成虫排出体外; 部分 Cd 留在中肠上皮或进入那些未重建器官, 这部分 Cd 留在体内。另外, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 也积累在昆虫体壁 (Niu, 2000), 这意味着 Cd 在变态过程中随蛹壳排出体外。

总之, 我们的结论是 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 都能在棕尾别麻蝇幼虫体内积累, 积累的量与处理时间及食物中 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 浓度密切相关, 同时幼虫可以排泄 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 其中对 Cu^{2+} 的排泄能力比对 Cd^{2+} 的排泄能力强。昆虫体内 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 被分成两部分: 一部分在中肠上皮及分泌物, 这部分在变态过程中可能随着幼虫排泄物和成虫排泄物排出; 另一部分在中肠上皮或其它组织, 除了体壁中的 Cd^{2+} 外, 这部分 Cd^{2+} 在变态过程中不会排出。

表 6-1 变态过程中幼虫、成虫及代谢废物内金属含量 ($\mu\text{g}/\text{头}$)

Table 6-1 Heavy metal contents ($\mu\text{g}/\text{individual}$) in the larvae, adult and waste matter during metamorphosis

Metal concentrations ($\mu\text{g}/\text{g}$)		Final larvae	Excreta of larvae	Pupae	Pupariums	Adults	Excreta of adults
Cd^{2+}	100	6.16 ± 0.70	1.79 ± 0.19 (29.06%)	4.19 ± 0.50 (68.02%)	1.02 ± 0.10 (16.56%)	1.98 ± 0.22 (32.14%)	1.0 ± 0.13 (16.23%)
	200	6.86 ± 0.75	1.83 ± 0.20 (26.68%)	4.53 ± 0.54 (66.03%)	1.17 ± 0.11 (17.06%)	2.14 ± 0.23 (31.20%)	1.08 ± 0.14 (15.74%)
	400	7.47 ± 0.82	2.10 ± 0.22 (28.11%)	4.96 ± 0.59 (66.40%)	1.29 ± 0.12 (17.27%)	2.34 ± 0.26 (31.33%)	1.18 ± 0.15 (15.80%)
	800	1.39 ± 0.17	0.40 ± 0.04 (28.78%)	1.04 ± 0.12 (74.82%)	0.27 ± 0.03 (19.42%)	0.78 ± 0.09 (56.12%)	0.16 ± 0.02 (11.51%)
	CK	0.01 ± 0.00	0	0.01 ± 0.00	0	0.01 ± 0.00	0
Cu^{2+}	100	1.78 ± 0.21	0.51 ± 0.06 (28.65%)	1.31 ± 0.16 (73.60%)	0.33 ± 0.03 (18.54%)	0.61 ± 0.07 (34.27%)	0.41 ± 0.05 (23.03%)
	200	4.26 ± 0.50	1.21 ± 0.13 (28.40%)	3.13 ± 0.38 (73.47%)	0.87 ± 0.08 (20.42%)	1.43 ± 0.16 (33.57%)	0.74 ± 0.10 (17.37%)
	400	4.69 ± 0.52	1.27 ± 0.14 (27.08%)	3.28 ± 0.39 (69.94%)	0.82 ± 0.08 (17.48%)	1.54 ± 0.17 (32.84%)	0.78 ± 0.10 (16.63%)
	800	4.29 ± 0.47	1.14 ± 0.13 (26.57%)	2.95 ± 0.35 (68.76%)	0.74 ± 0.07 (17.25%)	1.74 ± 0.18 (40.56%)	0.97 ± 0.13 (22.61%)
	CK	0.01 ± 0.00	0	0.01 ± 0.00	0	0.01 ± 0.00	0

注: 数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$), 括号内的值表示与幼虫比的百分率。Note: Each value represents the mean $\pm$ standard deviation. The values in the parentheses represent percentage over larvae value.

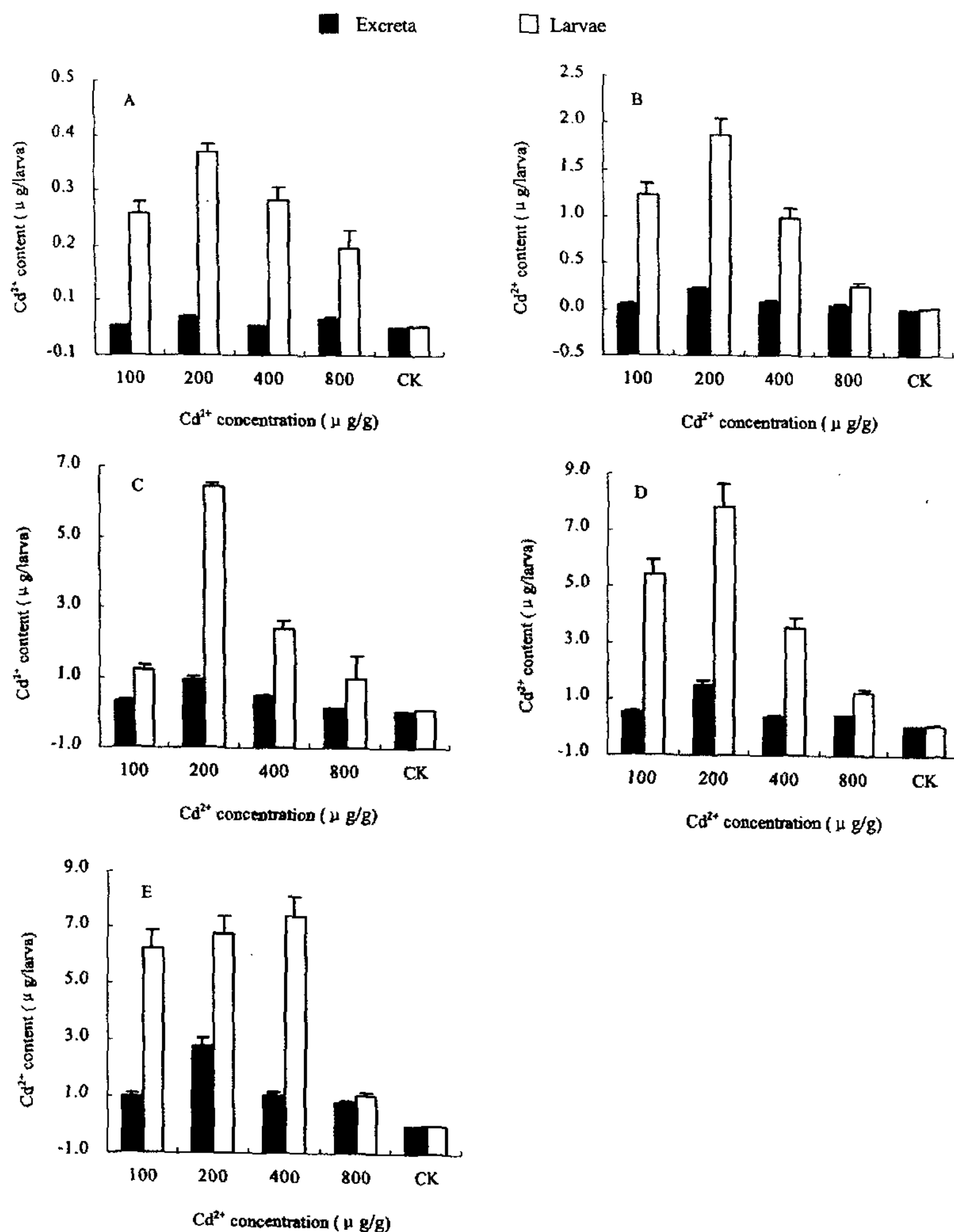


图 6-1 不同处理浓度下棕尾别麻蝇幼虫对 Cd^{2+} 的积累和排泄

Fig. 6-1 Accumulation and excretion of Cd^{2+} in *B. peregrina* larvae at different treatment concentration

柱子上的竖线表示标准差, A、B、C、D、E 分别表示取食后 24、48、72、96、120 h. The vertical bars represent standard deviation. A, B, C, D, E represent 24、48、72、96、120 h after diets, respectively.

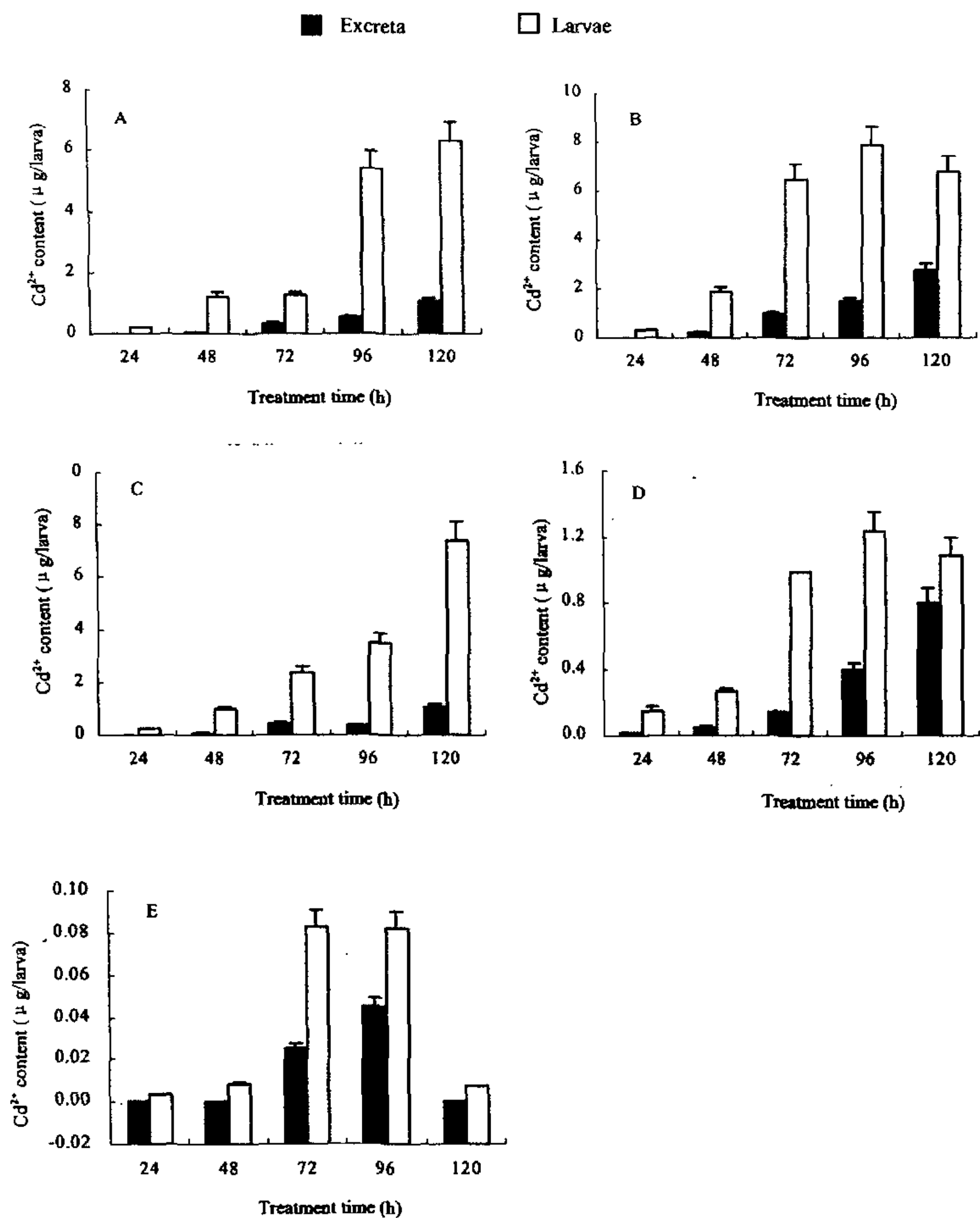


图 6-2 棕尾别麻蝇幼虫在不同处理时间对 Cd^{2+} 的积累和排泄

Fig. 6-2 Accumulation and excretion of Cd^{2+} in *B. peregrina* larvae at different treatment time

柱子上的竖线表示标准差, A、B、C、D、E 分别表示幼虫食物中的 5 个 Cd^{2+} 浓度 100、200、400、800 和 $0 \mu\text{g/g}$ 。The vertical bars represent standard deviation. A, B, C, D, E represent five concentration: 100、200、400、800 和 $0 \mu\text{g/g}$ in diets, respectively.

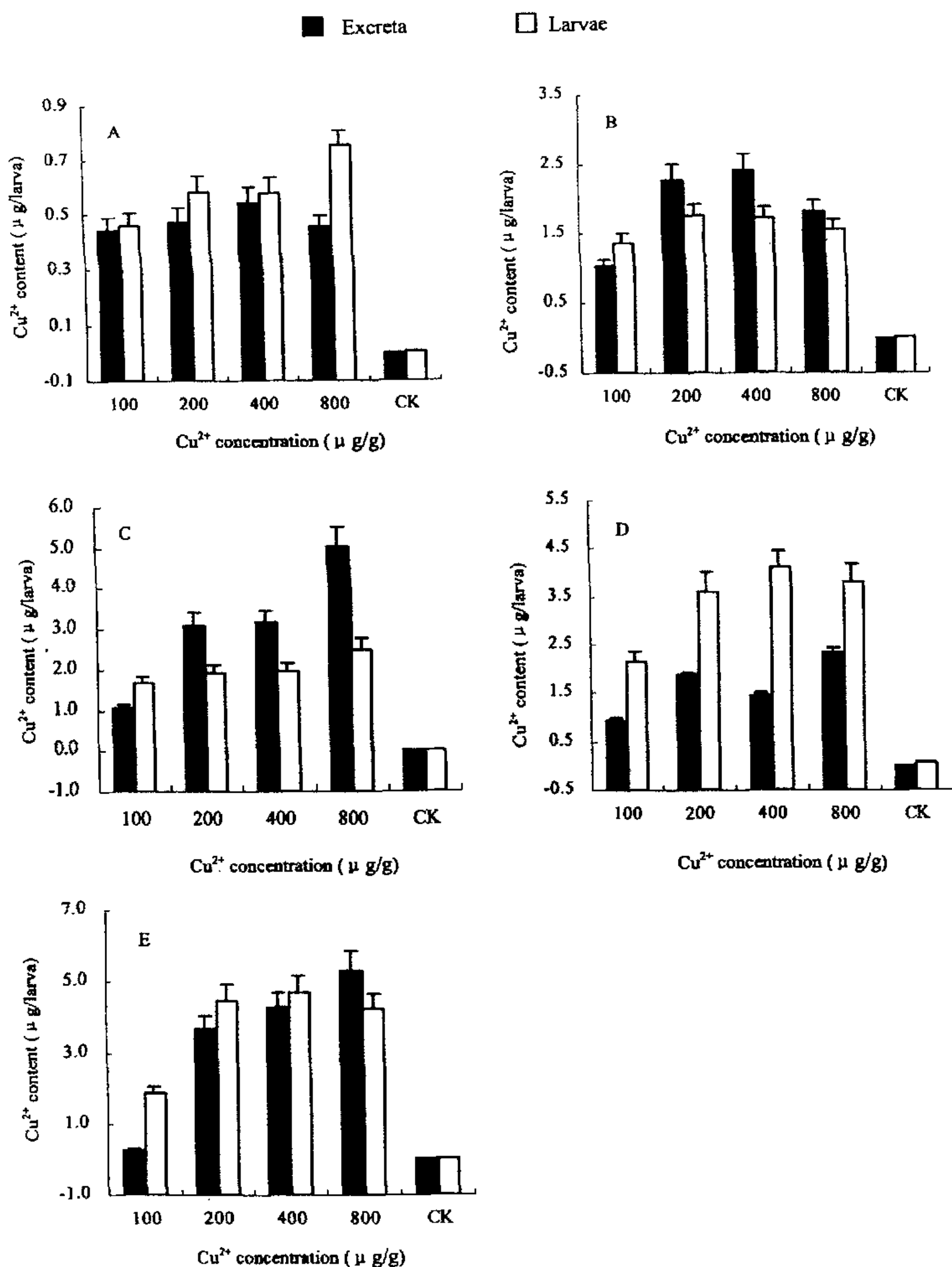


图 6-3 不同处理浓度下棕尾别麻蝇幼虫对 Cu^{2+} 的累积和排泄

Fig. 6-3 Accumulation and excretion of Cu^{2+} in *B. peregrina* larvae at different treatment concentrations

柱子上的竖线表示标准差，A、B、C、D、E 分别表示取食后 24、48、72、96、120 h。The vertical bars represent standard deviation. A, B, C, D, E represent 24、48、72、96、120 h after diets, respectively.

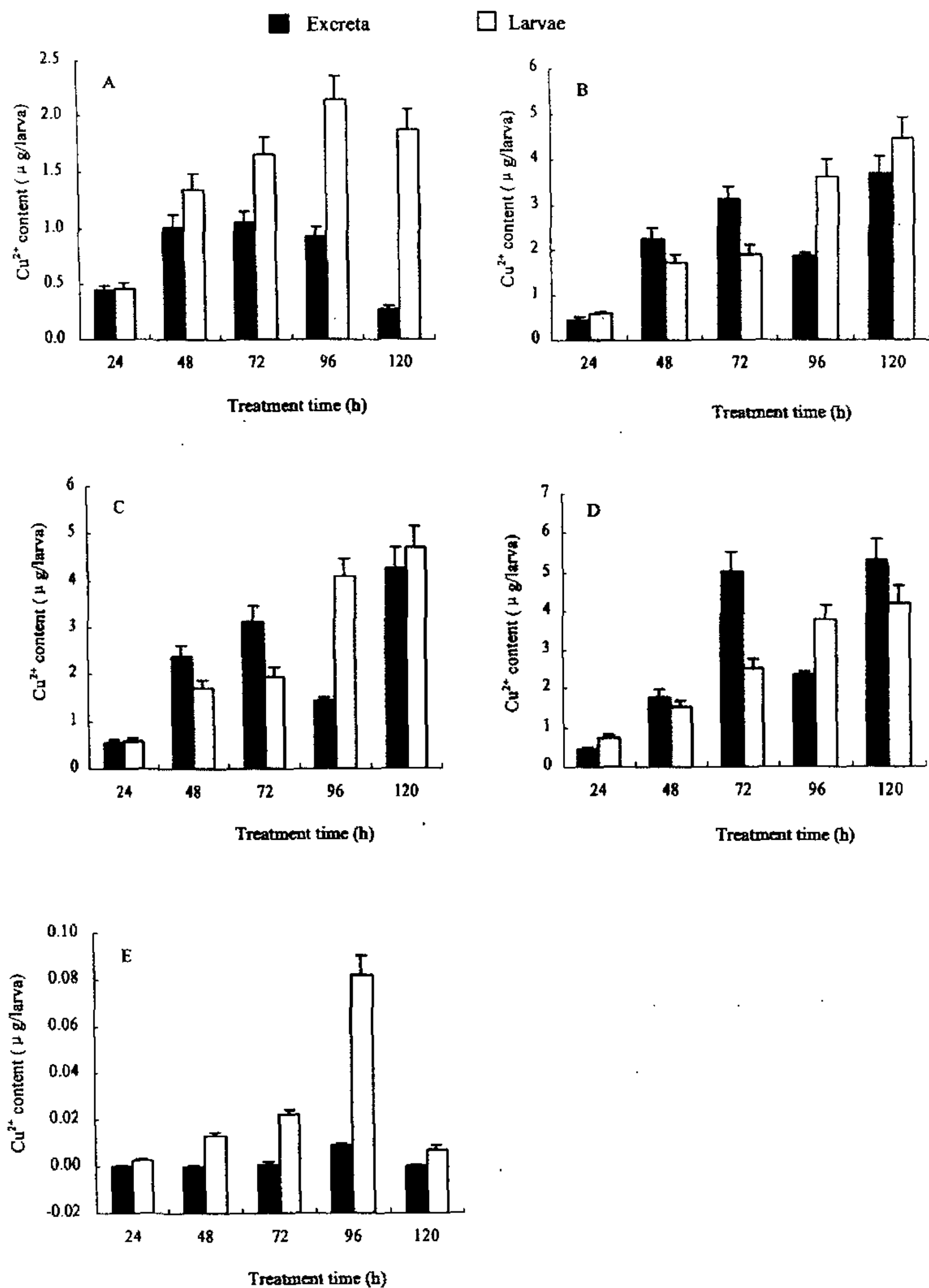


图 6-4 棕尾别麻蝇幼虫在不同处理时间对 Cu^{2+} 的积累和排泄

Fig. 6-4 Accumulation and excretion of Cu^{2+} in *B. peregrina* larvae at different treatment time

柱子上的竖线表示标准差，A、B、C、D、E 分别表示幼虫食物中的 5 个 Cd^{2+} 浓度 100、200、400、800 和 $0 \mu\text{g/g}$ 。The vertical bars represent standard deviation. A, B, C, D, E represent five concentration: 100、200、400、800 和 $0 \mu\text{g/g}$ in diets, respectively.

第七章 镉和铜在棕尾别麻蝇组织器官中累积分布

昆虫有很多储存器官（如中肠、马氏管-肛道复合体、回肠、脂肪体、表皮和生殖道），均可以储存重金属（Ballan-Dufrançais, 2002）；但在昆虫的主要储存和排泄器官——脂肪体和马氏管中重金属含量并不高，而在消化道，尤其是中肠部分重金属含量却相当高（Suzuki *et al.*, 1984; Maroni and Watson, 1985; Postma *et al.*, 1996; Hensbergen, 2000; Niu *et al.*, 2000）。铜主要在中肠的杯状细胞（cuprophilic cell）被吸收，锌和铜在马氏管被吸收，镉在中肠上皮细胞被吸收（Durliat *et al.*, 1995）。但是这些研究只是建立在某一时刻的基础上，也就是说重金属在昆虫生长发育过程中的动态定位尚未有报道，这不能为了解重金属在昆虫体内的运转、沉积、排泄等提供依据。本实验通过解剖棕尾别麻蝇（*Boettcherisca peregrina*）的幼虫来定位重金属 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} ，为揭示昆虫在污染条件下的解毒机制制作一个初步的探索。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章 1.1。

1.2 解剖

将产下 1 d 的幼虫分别放入含 $400 \mu\text{g/g Cd}^{2+}$ 和 $400 \mu\text{g/g Cu}^{2+}$ 的人工饲料中，任其自由取食，每隔 24 h 取出部分幼虫置于盛有少量水的容器中，让其排泄一段时间，然后解剖取样。具体解剖的步骤为：把幼虫放在载玻片上，用解剖针刺破表皮，用毛细管吸去血淋巴，然后用眼科小剪刀自虫体末端沿体壁剪向口沟。在显微镜下解剖，用解剖针拨开体壁，逐渐剥掉成片的脂肪体，去掉气管及微气管，整个消化道及马氏管即暴露出来。

1.3 取样

10 头幼虫被解剖并分成血淋巴、表皮、中肠、消化道（除中肠）、马氏管、脂肪体六部分，分别放入预先用电子天平（AB204-E, Mettler Toledo）称重的小玻璃瓶中，然后放入冷冻干燥机（Alpha 1-2, Christ 公司）冷冻干燥，再称重，两次的重量之差就是器官的干重。

1.4 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 含量测定

Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 含量测定方法同第四章 1.4。

1.5 数据分析

利用 DPS 软件(唐启义和冯明光, 2002)对各处理指标进行方差分析, 再以 Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 在幼虫各组织器官中的分布

由图 7-1 可知, 无论处理时间长短, 棕尾别麻蝇各器官中的 Cd^{2+} 含量差异显著 ($P = 16.184$, $df = 5$, $F < 10^{-4}$), 以中肠中的 Cd^{2+} 含量为最高, 其次是除中肠外的消化道, 而脂肪体、表皮、马氏管、血淋巴中 Cd^{2+} 含量较低。说明 Cd^{2+} 被棕尾别麻蝇幼虫取食后主要分布在消化道, 尤其是中肠部分。但中肠单位干重的 Cd^{2+} 含量并不是最高的, 它仅次于马氏管, 而其它器官中的 Cd^{2+} 浓度都较低(图 7-2)。

2.1 Cu^{2+} 在幼虫各组织器官中的分布

由图 7-3 可知, 无论处理时间长短, 棕尾别麻蝇各器官中的 Cu^{2+} 含量差异显著 ($P = 19.585$, $df = 5$, $F < 10^{-4}$), 以中肠中的 Cu^{2+} 含量为最高, 其次是除中肠外的消化道, 而脂肪体、表皮、马氏管、血淋巴中 Cu^{2+} 含量较低。说明 Cu^{2+} 被棕尾别麻蝇幼虫取食后主要分布在消化道, 尤其是中肠部分。但中肠中的 Cu^{2+} 浓度并不一定是最高的, 在 48 h 之前马氏管中的 Cu^{2+} 浓度最高, 中肠中的 Cu^{2+} 浓度其次; 48 h 之后中肠中的 Cu^{2+} 浓度在各器官中是最高的, 马氏管中的 Cu^{2+} 浓度紧随其后, 在消化道(除中肠外)中 Cu^{2+} 浓度也较高, 而其它器官中的 Cu^{2+} 浓度都较低(图 7-4)。

3 讨论

本研究揭示了幼虫在取食含 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的食物后, 可以在消化道、马氏管、表皮、脂肪体和血淋巴中检测到这些重金属, 这解释了棕尾别麻蝇可以在许多器官中贮存 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 以维持体内环境的平衡。消化道(特别是中肠)和马氏管中 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的浓度都比其它器官的要高。这说明了中肠和马氏管是积累与代谢 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 的重要器官。因此, 这两个器官在金属贮存上有着特殊的意义。

在昆虫中, 食物的摄入是金属离子的主要来源, 从口使之到达中肠。在很多目(弹尾目,

缨尾目, 鞘翅目, 同翅目, 毛翅目, 鳞翅目, 半翅目和双翅目) 中, 中肠是吸收的主要位点, 在离子调控和矿物沉积上起着重要作用。本文的试验证明, 积累在虫体的 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 绝大多数在消化道, 而不是脂肪体。这与前人的相关报道是一致的。Poulson 等 (1952) 用放射性示踪法证明黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* 幼虫中肠的所有部分都会有大量的 Cu 出现, 并用组织化学的方法检测到 Cu 最先储存在中肠的一个小区。Filshie 等 (1971) 报道 Cu 出现在中肠杯状细胞中的自然发荧光的微体上。紧接着有人用 X-射线微量分析的方法证明这种微体中有硫存在; 他们还通过细胞化学的方法证明这个微体中有酸性磷酸酯酶存在 (Tapp, 1975; Tapp and Hickaday, 1977), 并证明了这些细胞器官是溶酶体。Sohal 等 (1977) 报道家蝇成虫中肠的 Cu 存储与上皮细胞溶酶体密切相关。也就是说, 中肠可以贮存 Cu 在小的溶酶体 ($1\mu\text{m}$) 内 (Lauvedat *et al.*, 1989)。这些溶酶体对中肠贮存金属起了重要作用。另外, 有人证明 Cu 可以诱导并结合金属硫蛋白 (Maroni and Watson, 1985; Errais *et al.*, 1989), 也就是说金属硫蛋白与金属的贮存和解毒有关。因此, 中肠杯状细胞内的溶酶体可能结合不溶性的铜, 而可溶性的铜可能分布在金属硫蛋白和其它结合蛋白上 (Maroni and Watson, 1985)。但是贮存机制是否也适合棕尾别麻蝇中肠还有待于进一步的证实。

Maroni 和 Watson (1985) 曾用放射性的 $^{109}\text{CdCl}_2$ 拌入饲料中饲喂果蝇幼虫, 经放射性自显影显示 85% 以上的摄入 ^{109}Cd 贮存在体内, 95% 以上贮存的 ^{109}Cd 分布在幼虫中肠。Hensbergen 等 (1999, 2000) 证明弹尾虫 *Orchesella cincta* 也主要在中肠积累 Cd。这都与本文得到的结论相一致。另外许多学者都证明中肠内大多数的 Cd 与其自身诱导产生的金属硫蛋白结合 (Maroni and Watson, 1985; Hensbergen *et al.*, 2000)。金属硫蛋白在细胞内合成后迅速与溶酶体结合, 在那里以某种方式进行加工 (Silar and Theodore, 1990)。但这种情况在弹尾虫中似乎不存在 (Hensbergen *et al.*, 2000)。有关 Cd 处理后昆虫中肠内的颗粒体结构已有报道 (Pawert *et al.*, 1996; Posthuma, 1992), 但还没有关于双翅目昆虫 Cd 处理后中肠内颗粒体结构的报道。

另外, 金属也可以贮存在马氏管、表皮和脂肪体等器官 (Ballan-Dufrançais, 2002)。在马氏管中矿物球晶被认为是贮存重金属的重要亚细胞器官 (Garayoa *et al.*, 1992; Ballan-Dufrançais, 2002)。但有关其它器官贮存机制的研究还很少。在这些器官中是否也有金属硫蛋白存在呢? 这都需要进行进一步的研究。

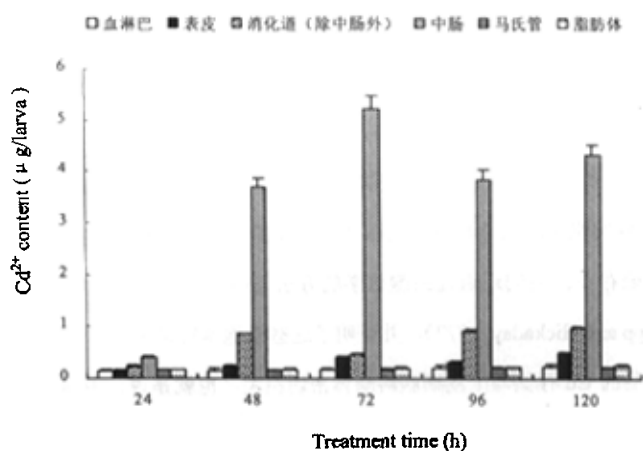


图 7-1 镉在棕尾别麻蝇幼虫各组织器官中的含量

Fig. 7-1 The contents of cadmium in the organs of *Boettcherisca peregrina* larvae

数据为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$)。The values are means $\pm$ standard deviation.

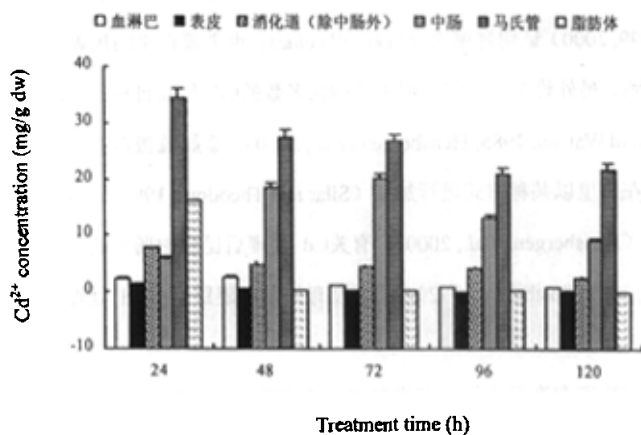


图 7-2 镉在棕尾别麻蝇幼虫各组织器官中浓度

Fig. 7-2 The concentrations of cadmium in the organs of *B. peregrina* larvae

数据为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$)。The values are means $\pm$ standard deviation.. dw: dry weight.

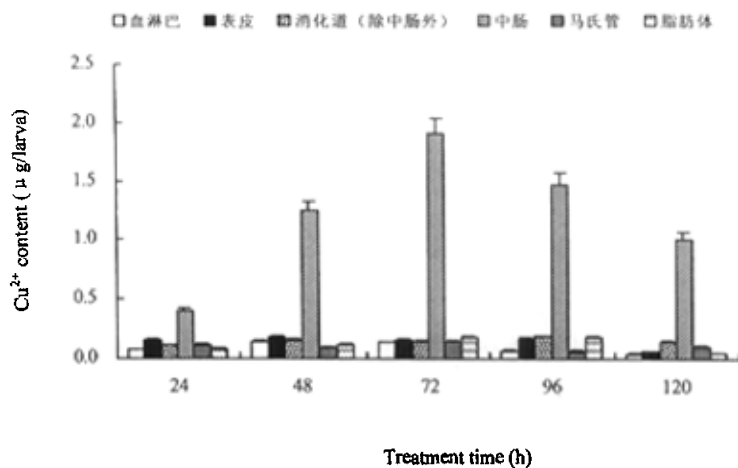


图 7-3 铜在棕尾别麻蝇幼虫各组织器官中的含量

Fig. 7-3 The contents of copper in the organs of *B. peregrina* larvae

数据为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$)。The values are means $\pm$ standard deviation.

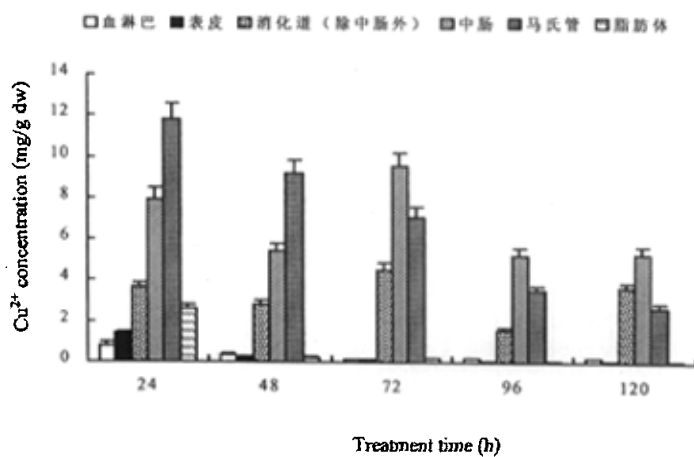


图 7-4 铜在棕尾别麻蝇幼虫各组织器官中浓度

Fig. 7-4 The concentrations of copper in the organs of *B. peregrina* larvae

数据为平均值±标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$)。The values are means $\pm$ standard deviation, dw; dry weight.

第八章 镉和铜对棕尾别麻蝇中肠及马氏管超微结构的影响

过量的重金属 (Cu和Cd) 或是接触时间均能对各种动物的健康造成紊乱。由于环境水平的持续恶化, 此问题的广度和生态学上的重要性已受到了相当关注 (Goering *et al.*, 1995)。在昆虫中, 重金属的急性和慢性毒性或是为害常可到见相关报道。许多的研究说明了Cd 对昆虫的生理过程有多向性的慢性影响, 如影响生长, 发育, 生殖或是孵化能力 (Cervera *et al.*, 2004; Gintenreiter *et al.*, 1993; Mathova, 1990; Niu *et al.*, 2002; Ortel and Vogel, 1989; Rayms-Keller *et al.*, 1998; Schmidt *et al.*, 1992; Sildanchandra and Crane, 2000; van Straalen *et al.*, 1989), 扰乱碳水化合物和脂类的代谢 (Bischof, 1995; Shin *et al.*, 2001; Ortel, 1995), 氧的消耗 (Ortel and Vogel, 1989) 及氧化压力的诱导 (Zaman *et al.*, 1994; Cervera *et al.*, 2003)。生理过程的紊乱及它们的敏感性看上去是有物种特异性的, 虽然通常造成负面影响的金属浓度要明显低于致死浓度。这些发现暗示发展高敏感性的和稳定的且无物种特异性的昆虫标志物 (biomarker) 评估陆地和水生环境的重金属污染是很有必要的。与之相适应, 研究证实昆虫受重金属污染后的形态变化或胞内变化发生的贮存器官 (如球晶和溶酶体) 能作为重金属污染的适宜标志物, 因为它们在一些接触重金属的昆虫物种中广泛存在 (Ballan-Dufrançais, 2002; Pawert *et al.*, 1996; Sorour, 2001)。然而, 很少有人就重金属对城市昆虫特别是卫生害虫贮存器官和排泄器官 (如中肠和马氏管) 的超微结构进行研究。因此, 本章在前面研究Cd²⁺ 在棕尾别麻蝇体内积累、排泄和分布代谢的基础上, 利用透射电镜 (TEM), 针对棕尾别麻蝇 (*Boettcherisca peregrina*) 中肠和马氏管在亚致死剂量的Cd²⁺ 和Cu²⁺ 后的形态及胞内反应进行研究, 从而了解重金属在昆虫细胞内的分布及其对昆虫细胞的毒性。同时为中肠和马氏管作为监测Cd²⁺ 和Cu²⁺ 污染的生物指示剂提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章 1.1。

1.2 幼虫毒性测试及生存能力评价

为了分析亚致死剂量的Cd²⁺ 和Cu²⁺ 造成的胞内反应, 棕尾别麻蝇1日龄幼虫分别喂食含以下浓度重金属的饲料: 50、100、200、400、800、1600、3200 μg Cd²⁺/g和50、100、200、

400、800、1600、3200 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$ 。与此同时，对照取食无污染的人工饲料。每浓度设3次重复，每处理的死亡数从24 h计数直到化蛹。亚致死剂量LC 曲线显示两个实验的平均值，每处理包含了三次重复。计算 LC_5 ， LC_{50} 和 LC_{95} 。亚致死的金属浓度（存活率大于95%），暴露时间依Braeckman（1997）的标准计算。

1.3 幼虫金属处理及解剖

根据1.2 的结果（图 8-1），将1龄末幼虫取食亚致死剂量的如100 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$ 或是100 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$ 食物中，48 h 后取出100头幼虫，蒸馏水洗净。洗净后的幼虫与浅层水接触一天以排净体内的食物，然后在DM143 数码显微镜（Motic公司）下进行解剖。解剖时，幼虫放在载玻片上，用解剖针刺破表皮，以毛细管吸去血淋巴，然后用眼科小剪刀自虫体末端沿体壁剪向口沟。在显微镜下解剖，用解剖针拨开体壁，逐渐剥掉成片的脂肪体，去掉气管及微气管，整个消化道及马氏管即暴露在镜下。

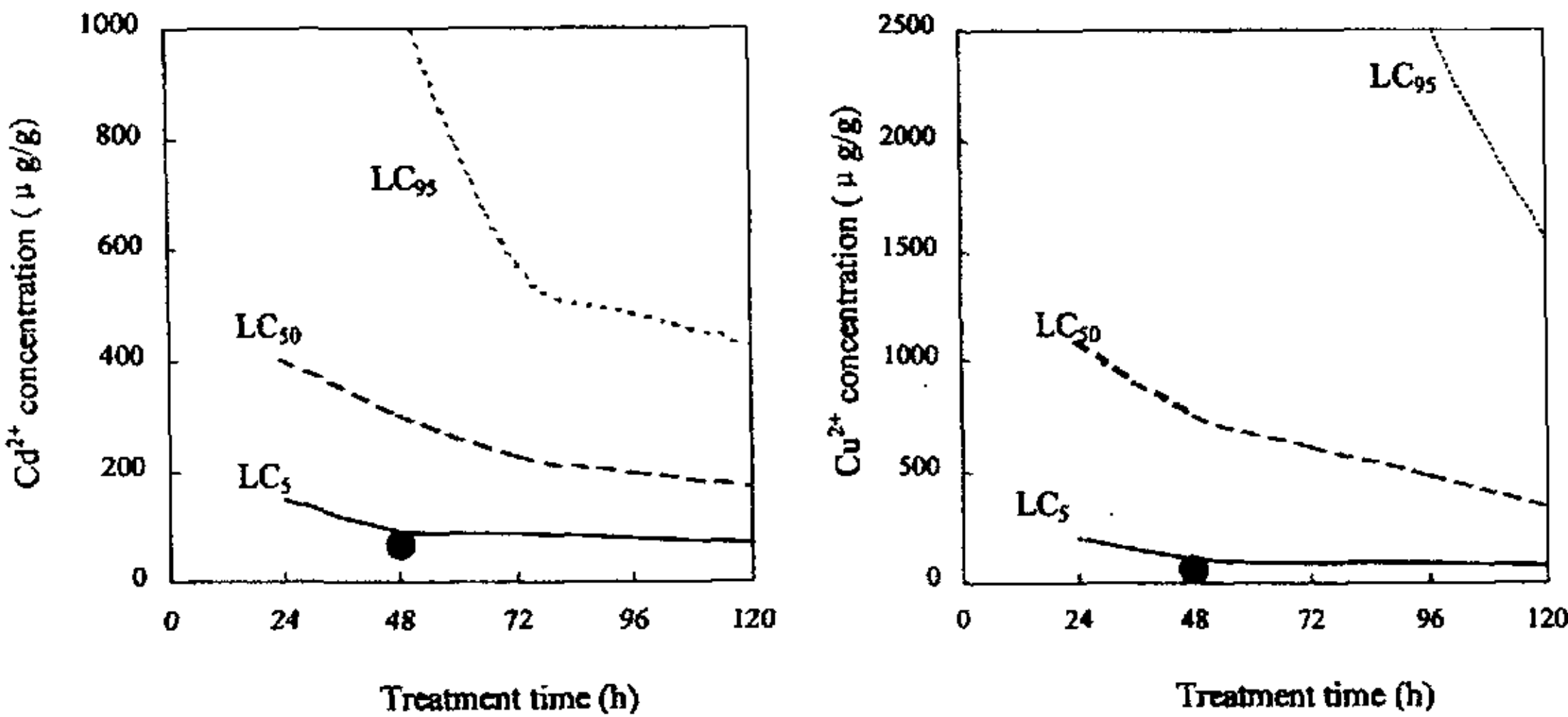


图 8-1 根据浓度和处理时间绘制的重金属对棕尾别麻蝇幼虫的 LC 曲线

Fig. 8-1 LC curves of heavy metal on *B. peregrina* larvae are plotted against metal concentration and treatment time

两个 ● 代表我们选择的重金属浓度和处理时间。The metal concentrations and treatment times which were used for the experiments are indicated as closed circles (●).

1.4 中肠和马氏管光学形态观察

按方法 1.3 解剖得到的中肠和马氏管，用 DM143 数码显微镜联机拍照，然后用立体解剖镜自身附带的图像处理软件（Motic Images Advance 3.0, 中国）测量中肠和马氏管（ $n = 30$ ）的长和宽。

1.5 中肠和马氏管透射电镜观察

按方法 1.3 解剖出中肠和马氏管后, 取中肠及马氏管的中部 ($n = 5$) 用含 2.5% 戊二醛的磷酸缓冲液固定, 4°C 下过夜, 之后倒掉固定液。用 0.1 M 的磷酸缓冲液 (pH 7.4) 漂洗三次, 每次 15 min。1% 的锇酸固定 1 h, 倒掉固定液, 再用磷酸缓冲液漂洗样品三次, 每次 15 min。乙醇梯度脱水 (包括 50 %, 70%, 80%, 90% 和 95% 五种浓度), 每个浓度处理 15 min, 无水乙醇处理 20 min, 纯丙酮脱水 20 min。用 Spurr 环氧树脂 (Sigma) 对样品进行渗透处理: 预包埋用纯包埋剂与纯丙酮的混合液 (混合比例为 1:1) 处理样品 1 h, 然后用混合比例为 3:1 的混合液处理样品 3 h, 最后用纯包埋剂处理样品过夜。将经过渗透处理的样品用环氧树脂包埋, 70°C 加热过夜, 即得到包埋好的样品。包埋好的样品在超薄切片机上用玻璃刀切成 80 nm 的超薄切片, 再用饱和醋酸铀和柠檬酸铅双重染色。在透射电镜 (JEM-1200EX, 日本) 下观察拍照, 加速电压 60 kV。

1.6 数据分析

数据表达形式为平均值 $\pm$ 标准差。用 DPS 数据分析系统 (唐启义与冯明光, 2002) 中 Duncan's 新复极差。 $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果

2.1 中肠和马氏管形态结构的变化

在取食含 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的饲料后中肠和马氏管形态结构发生了显著的变化 (图 8-2)。在处理 48 h 后, 中肠和马氏管的色泽变深, 可在中肠的表面上观察到一些瘤状突起, 马氏管的顶部颜色从黄色变为褐色。在经 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理后, 中肠显著变短变薄。无论是 Cd^{2+} 还是 Cu^{2+} 处理, 马氏管的长度和直径都变短 (表 8-1)。

2.2 中肠超微结构

2.2.1 对照

中肠是营养吸收的器官, 由一层薄的上皮层, 纵肌, 横肌及基膜组成, 上皮层中的柱状细胞主要参与了金属的生物积累。这些细胞的基本部与基膜相连, 顶部到达中肠的腺腔内, 附有许多发达的微绒毛, 中间有平行排列的微管和小的胞饮管道 (图 8-3a,b)。微绒毛外紧紧

地包裹了一层围食膜（图 8-3b）。粗面内质网（rER）主分布于长的内质网池中，表现出一种平行的结构（图 8-4d）。细胞质中有大量和高密度的脂滴（图 8-5a，表 8-2），但贮存性的糖原颗粒较少（图 8-6a，表 8-2）。此外，可观察到一些电子致密度低的溶酶体及高电子致密度的矿物颗粒体（图 8-7a）。

2.2.2 Cd^{2+} 处理

经 Cd^{2+} 处理后，中肠的柱状细胞的部分区域显示了显著的超微结构的变化。微绒毛区域无序地排列，微管破坏，围食膜缺失（图 8-3c）。有些细胞顶部（即有微绒毛端）的细胞膜发生了破裂，细胞质从裂口处泄漏到腺腔中。许多线粒体的嵴缺失（图 8-4b）。内质网的嵴也变得模糊，被许多无规则形状的亲水泡所包围。与对照组相比，在细胞质中脂滴的体积小且量少（图 8-5b，表 8-2），贮存性糖元颗粒量增加（图 8-6b，表 8-2）。许多大小不一的矿物颗粒体（concretion spherites）出现细胞质中。小的颗粒体包含高电子致密物的同源颗粒，大的颗粒体由膜多层旋转围绕（图 8-7b, c，表 8-2）。除了两种矿物颗粒体外，细胞质内还存在有一些高电子致密度的聚合物。它们被一限制性膜所包围，且包含了大量的粒状或无定形的物质（图 8-7d, e，表 8-2）。这些聚合物可能是富含了异质颗粒的溶酶体（Ballan-Dufrencois, 2002）。有时，可见大量丛生的高电子密度的物质（图 8-7b）。有时，大量的水肿空泡占据细胞的中心位置（图 8-7f）。然而，核并没有表现出任何的超微结构变化。

2.2.3 Cu^{2+} 处理

中肠经接触 Cu^{2+} 后也显示出超微结构的变化。顶部区域可见多许多细丝状的微绒毛和一些由微绒毛分泌出的小液泡（图 8-3a）。与对照不同的是围食膜与微绒毛相脱离（图 8-3a）。许多线粒体的内膜结构受到了严重的破坏（图 8-4c）。粗面内质网空泡化，内质网池成环形排列，且与某些高电子致密度的矿物颗粒体及亲水性液泡相接触（图 8-4f）。与 Cd^{2+} 处理相似的，细胞质中脂滴的数量下降（图 8-5c），贮存性糖元的量上升（图 8-6c）。细胞质中出现了大小不一的矿物颗粒体，小的包含高电子密度的同源物质，大的不但含有高电子密度的同源物质，周围还存在有许多的不规则空泡（图 8-7g，表 8-2）。核没有表现出任何变化。

2.3 马氏管超微结构

2.3.1 对照

马氏管有着排泄含氮废物，其他代谢产物，及某些过量离子的功能。对照中有许多发达

的质膜内褶,基膜的厚度较厚 $0.264 \pm 0.0383 \mu\text{m}$ (平均值 $\pm$ 标准差) (图 8-8a)。刷状边由不规则的微绒毛组成,其上分布有许多的线粒体(图 8-8d)。线粒体内膜发达(图 8-9a)。粗面内质网分布于一个长的内质网池内,呈平行排列(图 8-9d)。此外,有两种包含了轻微电子致密物矿物颗粒体。一种轻微电子致密物不规则排列,另一种轻微电子致密物规则排列,但它们都形成一个同心圆(图 8-9g)。但是,没有发现高电子致密度的矿物颗粒体。

2.3.2 Cd^{2+} 处理

经 Cd^{2+} 处理后,马氏管的某些区域细胞出现了明显的变化。基膜比对照要薄,厚度仅有 $0.1688 \pm 0.0220 \mu\text{m}$ (平均值 $\pm$ 标准差)。在基膜之后,质膜褶皱叠不发达(图 8-8b),刷状边的微绒毛脱落,线粒体的数量明显下降(图 8-8e)。线粒体内膜受到破坏,有些看上去已空泡化(图 8-9b)。甚至没有观察到粗面内质网。但是许多亲水性空泡出现于细胞质中(图 8-9e)。此外,许多大小不一的高电子密度的矿物颗粒体出现于细胞质中。小颗粒中包含了同源物质,大的含有异源物质(图 8-9h)。

2.3.3 Cu^{2+} 处理

经 Cu^{2+} 处理后,马氏管的相应区域细胞显示出了变化。基膜变薄,厚度仅为 $0.1625 \pm 0.0194 \mu\text{m}$ (平均值 $\pm$ 标准差)(图 8-8c)。微绒毛缩短,排列无序,线粒体数量显著下降(图 8-8f)。线粒体内膜空泡化,但不是太明显(图 8-9c)。在细胞中,粗面内质网几乎不见。但是大量的水肿空泡占据了细胞中心位置(图 8-9f)。而且,与 Ca 处理相似,许多大小不一的高电子密度的矿物颗粒体出现于细胞质中,也包括了同源物质和异源物质(图 8-9i)。

3 讨论

棕尾别麻蝇幼虫经亚致死剂量的 Cu^{2+} 或 Cd^{2+} 处理 48 h 后,中肠和马氏管的形态受到影响,并导致它们的胞内器官发生变化。中肠上皮细胞中观察到的一般的超微结构变化包括:核质的浓缩,线粒体的肿胀和空泡;粗面内质网膨胀或是囊化,甚至空泡化。在重金属对双翅目昆虫如果蝇(Lauverjat *et al.*, 1989)和家蝇(Sohal *et al.*, 1977)的研究中,也表现相似的症状:核质的浓缩,线粒体肿胀及嵴的缺失, rER 膨胀或空泡化,及溶酶体的增生扩散。这些病理症状缘自于重金属可以抑制 Na^+/H^+ 携带者,影响了细胞内的渗透调节的整个过程(Vilella *et al.*, 1991)。线粒体的肿胀程度甚至比急性处理还要严重。线粒体作为一种渗透计,在重金属压力下变得肿胀,这反映出在重金属伤害下,溶液和水已进入了线粒体腔内(Cheville, 1994)。无论是铜还是镉,都造成了内质网的膨胀及空泡,这与其他有毒物质所

造成的伤害是相似的 (Sutherland, 2002)。

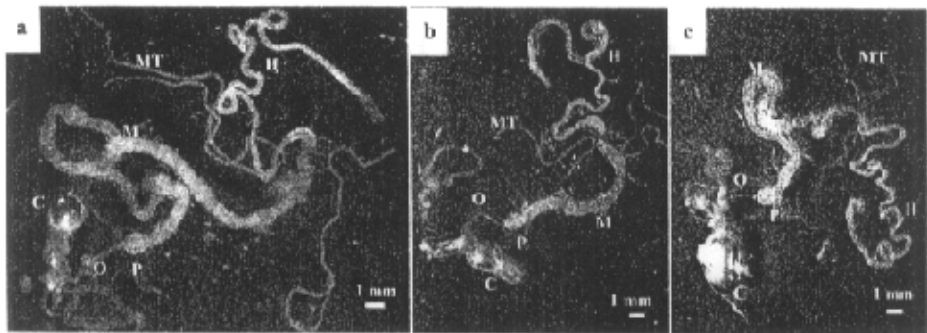


图 8-2 棕尾别麻蝇幼虫经亚致死浓度的重金属处理48 h 后的中肠及消化道形态的比较

Fig. 8-2 Comparison of morphology of alimentary canal and malpighian tubes at the light microscopical level after *B. larvae* were treated with sublethal concentrations of heavy metal for 48 h.

(a) 对照消化道和马氏管的形态图; (b) Cu^{2+} 处理后的消化道和马氏管的形态图; (c) Cd^{2+} 处理后的消化道和马氏管的形态图。 (a) C: 嗉囊; O: 食道; P: 前胃; M: 中肠; H: 后肠; MT: 马氏管。 The sketch of control alimentary canal and malpighian tubes. (b) The morphology with shortened midgut and malpighian tubes because of Cu^{2+} exposure. (c) The morphology with shortened midgut and malpighian tubes because of Cd^{2+} exposure. C, craw; O, oesophagus; P, proventriculus; M, midgut; H, hindgut; MT, malpighian tubes.

经 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理后, 中肠内的矿物颗粒体和溶酶体数量明显增多。有人认为二者是相互联系的 (Dallinger and Prosi, 1988)。此外, 来源于细胞内质网的矿物颗粒体也可发展成溶酶体。溶酶体在黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Tapp, 1975; Tapp and Hickaday, 1977; Lauverjat *et al.*, 1989) 和家蝇 *Musca domestica* (Sohal *et al.*, 1977) 中肠中也有报道。在亚致死剂量的作用下, 作为细胞的一种修补机制, 溶酶体不仅能沉积重金属 (Lauverjat *et al.*, 1989), 而且还能吸收受伤的细胞器 (Cheville, 1994)。相当数量的溶酶体出现是昆虫受重金属胁迫的典型症状, 这表明在重金属 (如Cd) 的作用下细胞内起了一系列的应激反应。溶酶体数量的上升, 是细胞尝试消化重金属或是有毒物质的结果, 认为是受伤后的一般反应。

矿物颗粒体通常被认为具有金属贮存和解毒的功能, 然而, 这些器官广泛地分布于无脊椎动物消化道的上皮细胞中。虽然金属也能贮存于胞内的溶酶体或液泡中, 矿物颗粒体仍还是主要的贮存器官 (Brown, 1982)。本研究中, 重金属贮存于矿物颗粒体中, 这揭示了为什么在重金属污染后矿物颗粒体的数量能上升且色泽变深。在前人的研究中细胞内矿物颗粒体在内质网-高尔基体复合体上产生。它们可以在中肠内质网中看到, 有时在粗面内质网 (Ballan-Dufrancais, 2002)。矿物沉积的来源可能是以离子作为核而形成的, 极可能是以有

机物如粘多糖及尿酸钾等 (Wessing and Zierold, 1996)。究竟是何种物质捕捉这些矿物颗粒体, 还有待于以后的研究。内质网-高尔基复合体可能是以离子作为核而形成的, 极可能是以有机物如粘多糖及尿酸钾等。当球晶出现于内质网中时, 粘多糖看上去够成熟以捕获阳离子。高尔基管道能增加成熟球晶中粘多糖的组分 (Jeantet, 1971)。

作为能量提供物质的糖原颗粒, 在受重金属伤害后有增多的趋势, 可能是在重金属压力下, 仍保留了足量的受影响不大的细胞, 它们仍能为上皮细胞能有效地吸收营养提供保障。然而, 过多的糖元将导致细胞器的扩大及细胞的瓦解 (Cheville, 1994)。

我们的研究表明, 棕尾别麻蝇幼虫经亚致死剂量的 Cu^{2+} 或 Cd^{2+} 处理 48 h 后, 马氏管超微结构的改变是瞬时的反应, 是细胞受伤的信号。这些病理变化包括了核的改变, 如异染色质的浓缩, 大量的核仁消失, 破坏。大量的线粒体肿胀, rER 扩张, 破碎, 微绒毛受到严重破坏。出现了大量的水肿状的空泡及溶酶体。

表 8-1 经亚致死剂量的 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 处理 48 h 后棕尾别麻蝇幼虫中肠及马氏管大小的变化
Table 8-1 Changes in the size of the midgut and malpighian tubules of *B. peregrina* larvae exposed to sublethal doses of Cd^{2+} or Cu^{2+} for 48 h

Treatment	Midgut		Malpighian tubules	
	Length (mm)	Diameter (mm)	Length (mm)	Diameter (mm)
Cd^{2+}	32.45 ± 1.90 b	1.62 ± 0.09 a	33.96 ± 1.05 b	0.16 ± 0.02 c
Cu^{2+}	16.54 ± 0.90 c	1.56 ± 0.02 a	32.08 ± 1.78 b	0.25 ± 0.01 b
Control	45.75 ± 4.66 a	1.34 ± 0.08 b	38.55 ± 0.68 a	0.29 ± 0.05 a

数据为平均值 ± 标准差 ($\bar{X} \pm \text{S.D.}$)。Duncan's 新复极差法检验表明, 同一列中具不同小写字母的数据间差异达显著水平 ($P < 0.05$)。Values are expressed as means ± standard deviation ($n = 30$). Means in the same column followed by different lowercase letters are significantly different by Duncan's multiple range tests ($P < 0.05$).

镉能抑制绒毛区的 Na^+/H^+ 交换, 加快了 H^+ 的被动渗透, 并抑制、转运、影响渗透调节的全过程 (Vilella, 1991)。线粒体的肿胀势必会影响溶质和水进入线粒体的通道 (Cheville, 1994)。rER 的膨胀是细胞受伤的信号, 水的无序流动及对它的冲撞, 导致了细胞停止运作并走向解体 (Cheville, 1994)。本试验中核的改变如异染色质的浓缩及核的边缘化, 揭示了核内组分的进一步不活跃化 (Braunbeck, 1994)。核的体积及外形的改变是新陈代谢活性变化的指标 (Braunbeck *et al.*, 1990)。当细胞受到伤害, 阻断了脂到脂-蛋白结合体的利用渠道,

造成了细胞质中出现大量的脂滴 (Cheville, 1994)。重金属通过细胞膜进入细胞可以结合到生物大分子上, 可以积累或沉积到脂质体 (liposomes) 和脂滴上, 也可能参与新陈代谢或是被排出 (Roesijadi and Robinson, 1994; Di *et al.*, 1995)。因而脂滴的增多也是一种适应重金属的机制。重金属的吸收从口腔, 经由血液循环系统进入中肠和马氏管; 再通过钙离子通道过入细胞膜内, 与配合基相结合, 特别是金属硫蛋白, 从而可降低在细胞中游离金属的浓度 (Viarengo, 1989)。胞内的配合基 (ligand) 可以在细胞内的特定部位发现, 如金属沉积团, 金属颗粒或是溶酶体 (George, 1990; Mason and Jenkins, 1995) 或是细胞质内如金属硫蛋白 (Engel and Roesijadi, 1987)。但是, 一旦配合基被Cd所饱和, 过量的Cd就会溢出到亚细胞结构中, 这与机体的病理改变是相一致的 (Wolstowski *et al.*, 2004)。

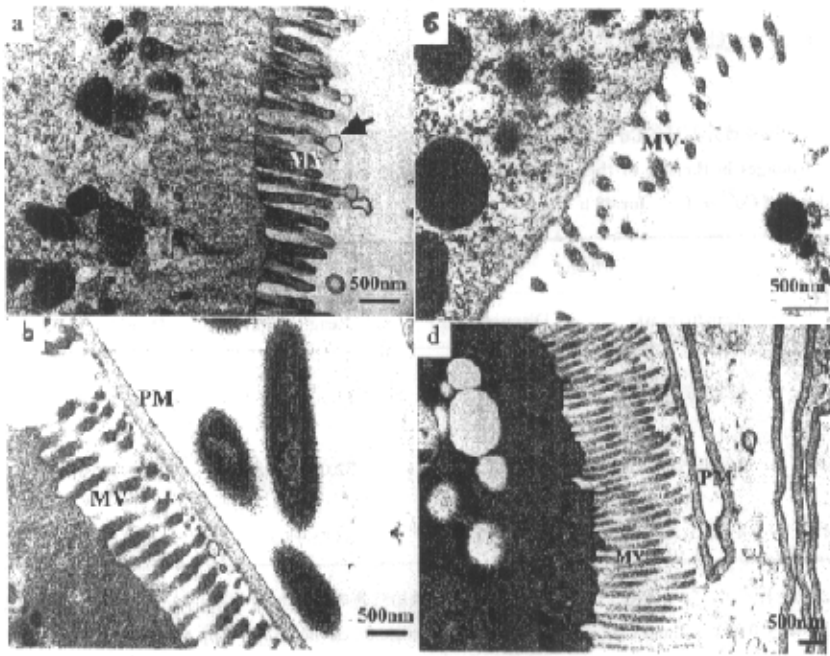


图 8-3 中肠上皮细胞顶端部分的透射电子显微镜

Fig. 8-3 Transmission electron micrographs of the apical part of the midgut epithelium.

(a) 对照中肠顶端有很多微绒毛及分泌物液泡 (箭头); (b) 对照中围食膜紧密覆盖在微绒毛上; (c) Cd^{2+} 处理后微绒毛被破坏, 排列杂乱; (d) Cu^{2+} 处理后分泌物液泡减少, 围食膜脱离微绒毛边缘。MV: 微绒毛; PM: 围食膜。 (a) Apical cell region with numerous microvilli with secretory vacuoles (arrow) in the control state. (b) The peritrophic membrane (PM) tightly covers the microvilli in the control state. (c) The microvilli are destructed and disordered after exposure to Cd^{2+} . (d) Little secretory vacuoles are showed and the peritrophic membrane is free from the microvillous border after exposure to Cu^{2+} . MV: microvilli; PM: peritrophic membrane.

表 8-2 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 处理幼虫与对照幼虫的中肠和马氏管亚细胞结构的比较
Table 8-2 Comparisons of some structural parameters of the midgut and Malpighian tubules in *B. perezgrana* larvae exposed to sublethal doses of Cd^{2+} or Cu^{2+} for 48 h and their control

Organs	Subcellular structures	Heavy metals		Control		
		Cd ²⁺	Cu ²⁺			
Midgut	Lipid droplet	Diameter (μ m)	1.04 ± 0.55 b (0.28~2.2)	1.42 ± 0.88 b (0.33~2.63)	2.02 ± 0.99a (0.47~3.92)	
		Density (No./ μ m ²)	0.15 ± 0.06 b	0.17 ± 0.06 b	0.33 ± 0.06 a	
	Glycogen granule	Density (No./ μ m ²)	201.85± 16.36 a	196.30 ±20.69 a	100.00± 28.11b	
		Small spherite	Diameter (μ m)	0.26 ± 0.09 b (0.11~0.40)	0.47 ± 0.15 a (0.23~0.78)	
	Large spherite	Density (No./ μ m ²)	8.40 ± 0.53 a	1.60 ± 0.44 b		
		Diameter (μ m)	0.68 ± 0.26 a (0.38~1.13)	0.80 ± 0.27 a (0.33~1.08)	ND	
	Lysosome with spherites	Density (No./ μ m ²)	1.07 ± 0.24 a	0.39 ± 0.28 b		
		Diameter (μ m)	1.49 ± 0.84 (0.57~3.40)	ND		
	Malpighian tubule	Small concretion spherites	Density (No./ μ m ²)	0.22 ± 0.18		
			Diameter (μ m)	0.49 ± 0.26 a (0.25~0.97)	0.65 ± 0.36 a (0.46~1.25)	
Large concretion spherites		Density (No./ μ m ²)	0.15 ± 0.12 a	0.17 ± 0.14 a	ND	
		Diameter (μ m)	0.60 ± 0.18 b (0.25~0.90)	1.01 ± 0.40 a (0.51~1.68)		
	Density (No./ μ m ²)	0.10 ± 0.09 b	0.22 ± 0.20 a			

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$) ($n = 20$)。脂滴和糖元大小和密度的Duncan's新复极差法检验表明, 同一行中具不同小写字母的数据间差异达显著水平 ($P < 0.05$)。其它结构进行student's t -检验。ND 表示没有被发现。Values are expressed as means $\pm$ standard deviation ($n = 20$). Means in the same row followed by different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$) by Duncan's multiple range tests for the size and density of lipid droplet and glycogen granule, and student's t -test for other structures observes. ND means that is not detectable.

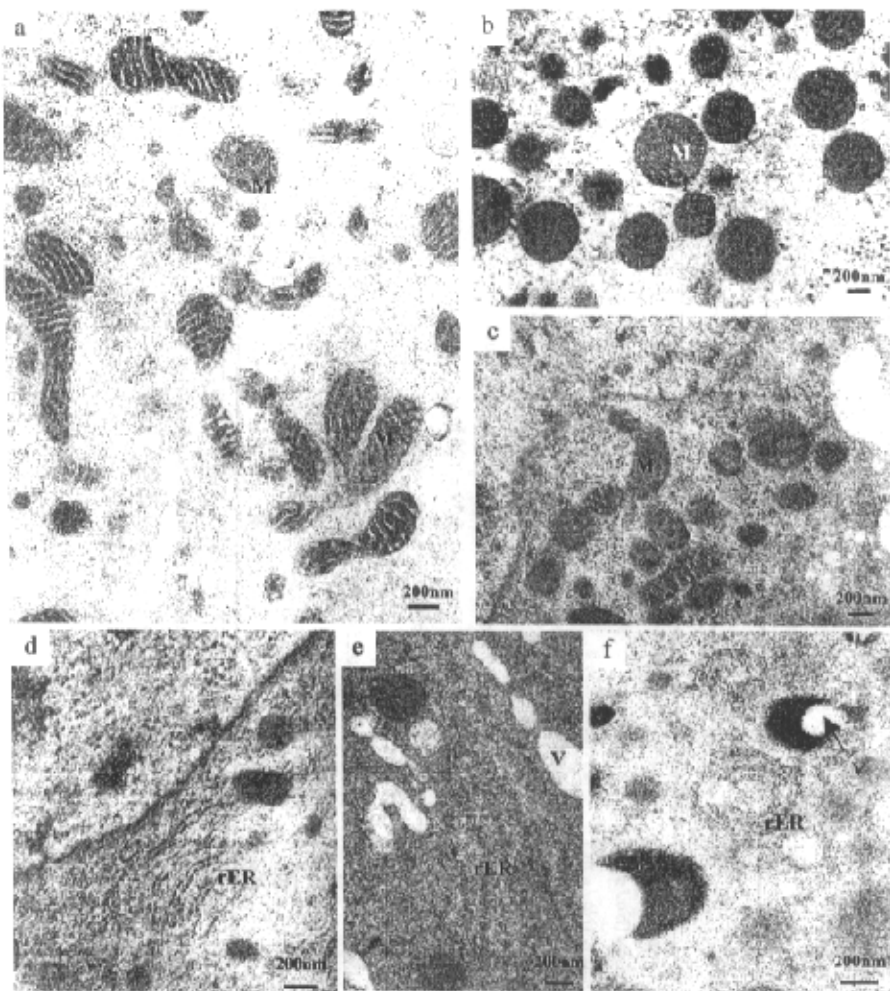


图 8-4 中肠上皮细胞的线粒体和粗面内质网的透射电子显微镜

Fig. 8-4 Transmission electron micrographs of mitochondria and rough endoplasmic reticulum (rER) of the midgut epithelium.

(a) 对照线粒体 (M) 数量多且嵴及内膜结构清晰; (b) Cd^{2+} 处理后线粒体浓缩, 嵴模糊, 消失; (c) Cu^{2+} 处理后线粒体内膜被破坏, 伴随有空泡; (d) 对照粗面内质网平行排列, 有明显的嵴; (e) Cd^{2+} 处理后内质网的嵴也变得模糊, 被许多无规则形状的空泡所包围; (f) Cu^{2+} 处理后内质网池成环形排列, 且与某些高电子致密度的矿物颗粒体及亲水性液泡紧密接触。M: 线粒体; rER: 粗面内质网; V: 空泡。 (a) Numerous mitochondria with obvious inner membranes and cristae in the control state. (b) Numerous condensed mitochondria with loss of cristae are present after exposure to Cd^{2+} . (c) The inner membrane of many mitochondria showed signs of destruction in close association with hydropic vacuoles after exposure to Cu^{2+} . (d) The rER with conspicuous cristae is arranged towards a parallel organization in the control. (e) The cristae of the rER appeared inconspicuous, surrounded by some hydropic vacuoles after exposure to Cd^{2+} . (f) The cristae of rER form circular arrays, in close association with some highly electron-dense spherites containing hydropic vacuoles (arrow) after exposure to Cu^{2+} . M: mitochondria; rER: rough endoplasmic reticulum; V: hydropic vacuole.

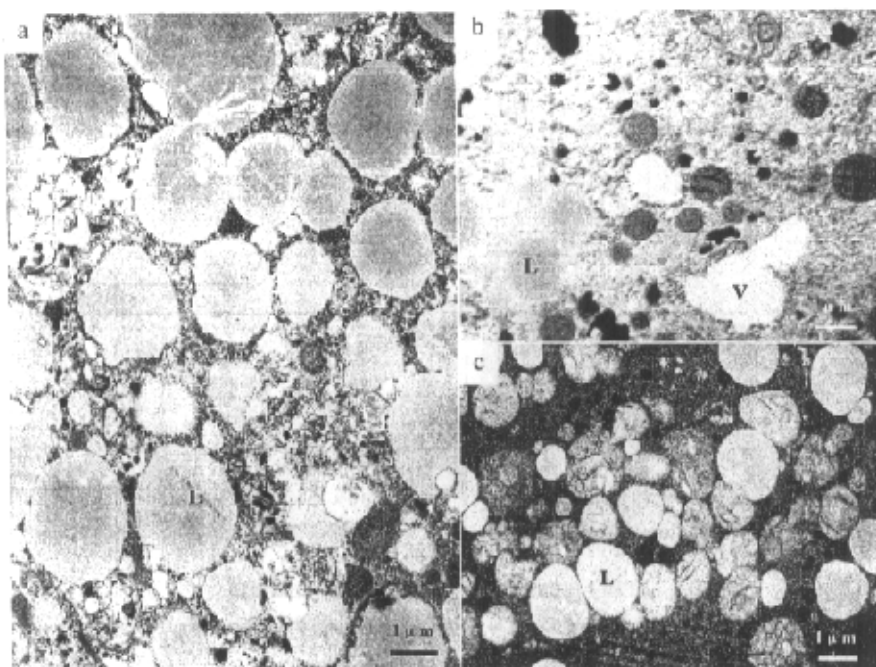


图 8-5 中肠上皮细胞的脂滴透射电子显微图

Fig. 8-5 Transmission electron micrographs of lipid droplets of the midgut epithelium.

(a) 对照细胞质中有大量和高密度的脂滴；(b) Cd^{2+} 处理后细胞质中脂滴的体积小且密度小；(c) Cu^{2+} 处理后细胞质中脂滴的体积和密度都变小。L: 脂滴；V: 空泡。(a) Larger lipid droplets with higher density occur in the control state. (b) Smaller lipid droplets with lower density are present after Cd^{2+} exposure. (c) Smaller lipid droplets with lower density are showed after Cu^{2+} exposure. L: lipid droplets; V: hydropic vacuole.

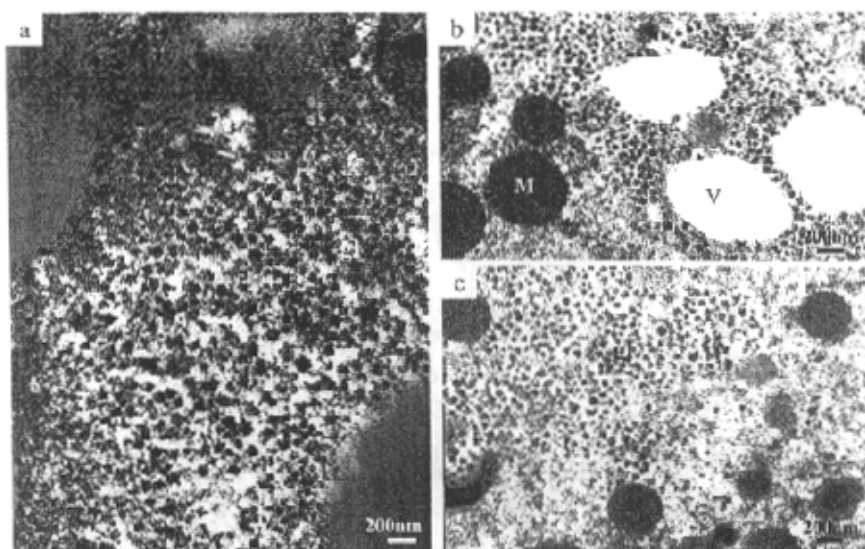


图 8-6 中肠上皮细胞中贮存糖元颗粒的透射电子显微图

Fig. 8-6 Transmission electron micrographs of stored glycogen granules of the midgut epithelium.

(d) 对照的贮存糖原颗粒较少；(b) Cd^{2+} 处理后贮存性糖元颗粒数量增加；(c) Cu^{2+} 处理后贮存性糖元颗粒密度增加。gl: 糖元颗粒；V: 空泡。(a) Glycogen granules with lower density occur in the control state. (b) Glycogen granules with higher density are present after exposure to Cd^{2+} . (c) Glycogen granules with higher density are showed after exposure to Cu^{2+} . gl: glycogen granules; V: hydropic vacuole.

总之，当棕尾别麻蝇幼虫接触含有亚致死剂量的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 时，中肠和马氏管的形态及胞内器官都发生了变化，几乎所有中肠和马氏管细胞的变化都与脊椎动物和无脊椎动物中的相似。这说明了它们的靶标和结合位点是相同的，因此，棕尾别麻蝇可作为一种指示生物用以监测重金属污染，溶酶体和矿物颗粒体可以作为生物标志物。此外，中肠和马氏管的形态及胞内器官的变化还揭示了两种金属扰乱细胞功能的多个方面。这些对环境监测、重金属毒性机理及生物体耐受重金属机制的研究是很有用的。

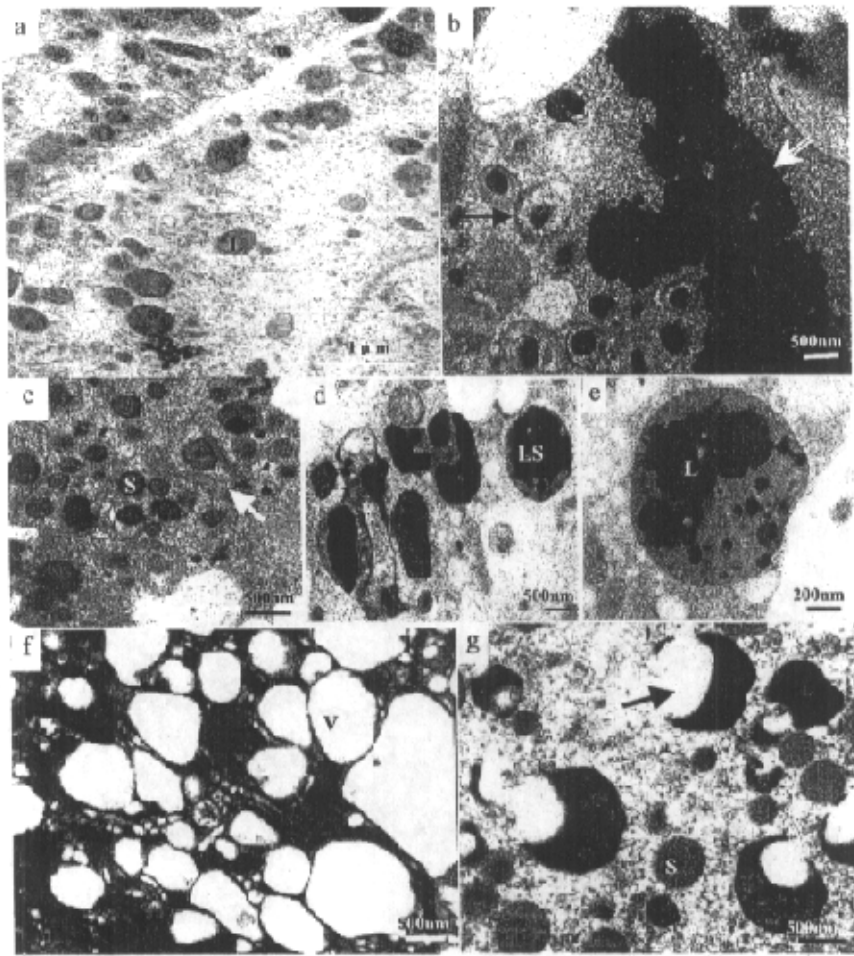


图 8-7 中肠上皮细胞中溶酶体、矿物颗粒体和空泡的透射电子显微图

Fig. 8-7 Transmission electron micrographs demonstrating lysosomes, some concretion spherites and vacuoles in the midgut epithelium.

(a) 对照电子致密度低的溶酶体; (b) Cd^{2+} 处理下大的矿物颗粒体 (黑箭头) 和大量丛生的高电子密度的物质 (白箭头); (c), Cd^{2+} 处理下的许多大的 (白箭头) 和小的矿物颗粒体; (d, e) Cd^{2+} 处理下的一些高电子致密度的聚合物, 可能是富含了异质颗粒的溶酶体; (f) Cd^{2+} 处理下大量的水肿空泡占据细胞的中心位置; L: 溶酶体; S: 颗粒体; LS: 带有颗粒体的溶酶体; V: 空泡。 (g) Cu^{2+} 处理后出现的大小不一的矿物颗粒体和许多的不规则空泡。(a) Some lysosomes with slightly electron-dense in control state; (b) Many large concretion spherites (black arrow) and some larger clumping of highly electron-dense material (white arrow) under Cd^{2+} exposure; (c) Many large concretion spherites (white arrow) surround by multiples whirls of membranes and some small ones contained homogenous material with highly electron-dense under Cd^{2+} exposure; (d,e) Lysosome with spherites under Cd^{2+} exposure; (f) Many large hydric vacuoles dominated the central part of the cell. (g) Many small and large concretion spherites in close association with irregular vacuoles under Cu^{2+} exposure. L: lysosome; S: spherite; LS: Lysosome with spherites; V: vacuole.

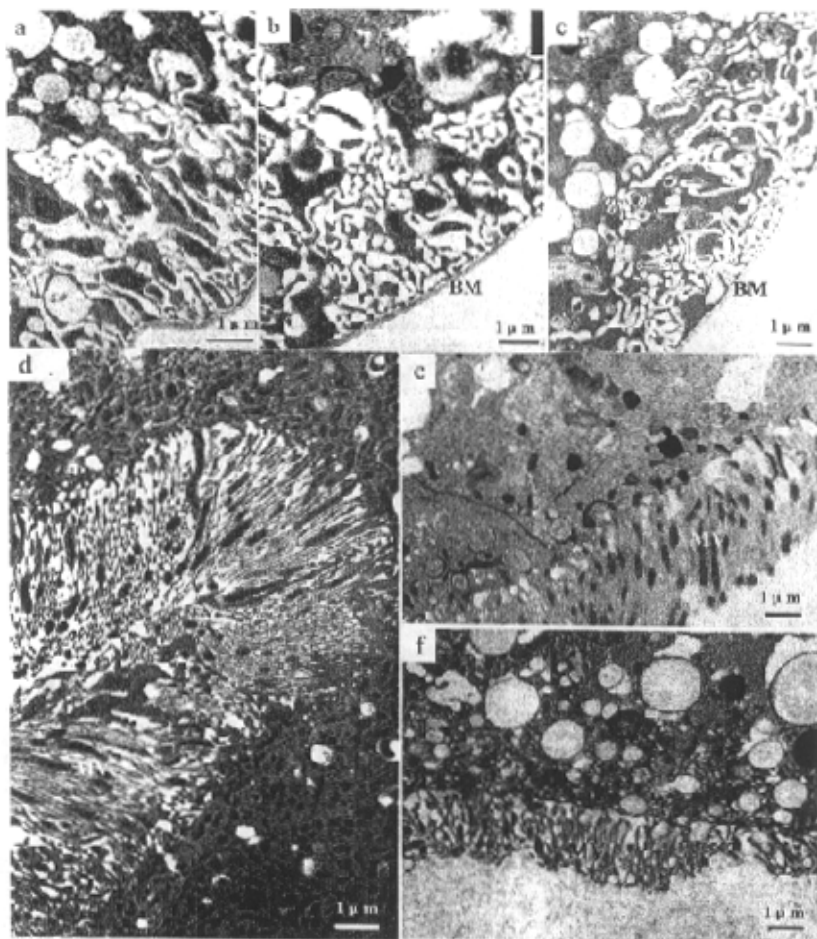


图 8-8 马氏管基膜和微绒毛的透射电子显微图

Fig. 8-8 Transmission electron micrographs of basement membrane and microvilli in the malpighian tubules.

(a) 对照中有许多发达的质膜内褶；(b) Cd^{2+} 处理后基膜变薄，质膜褶皱不发达；(c) Cu^{2+} 处理后，基膜变薄；(d) 对照由规则的微绒毛组成的刷状边，线粒体含量丰富；(e) Cd^{2+} 处理后刷状边上微绒毛脱落，线粒体的数量明显下降；(f) Cu^{2+} 处理后微绒毛缩短，排列无序，线粒体数量显著下降。BM：基膜；MV：微绒毛。(a) Cells have numerous well-developed infoldings of the plasma membrane in control; (b) The thinner basement membrane and underdeveloped infoldings under Cd^{2+} exposure; (c) The basement membrane significantly became thinner under Cu^{2+} exposure. (d) The brush border formed by regular closely packed microvilli and many mitochondria in control; (e) The brush border with microvilli falling off and the decreasing number of mitochondria after Cd^{2+} exposure; (f) The brush border formed by closely packed microvilli became shortened and disorderly arranged, and the number of mitochondria in close associate with microvillous region obviously decreased under Cu^{2+} exposure. BM: basement membrane; MV: microvilli.

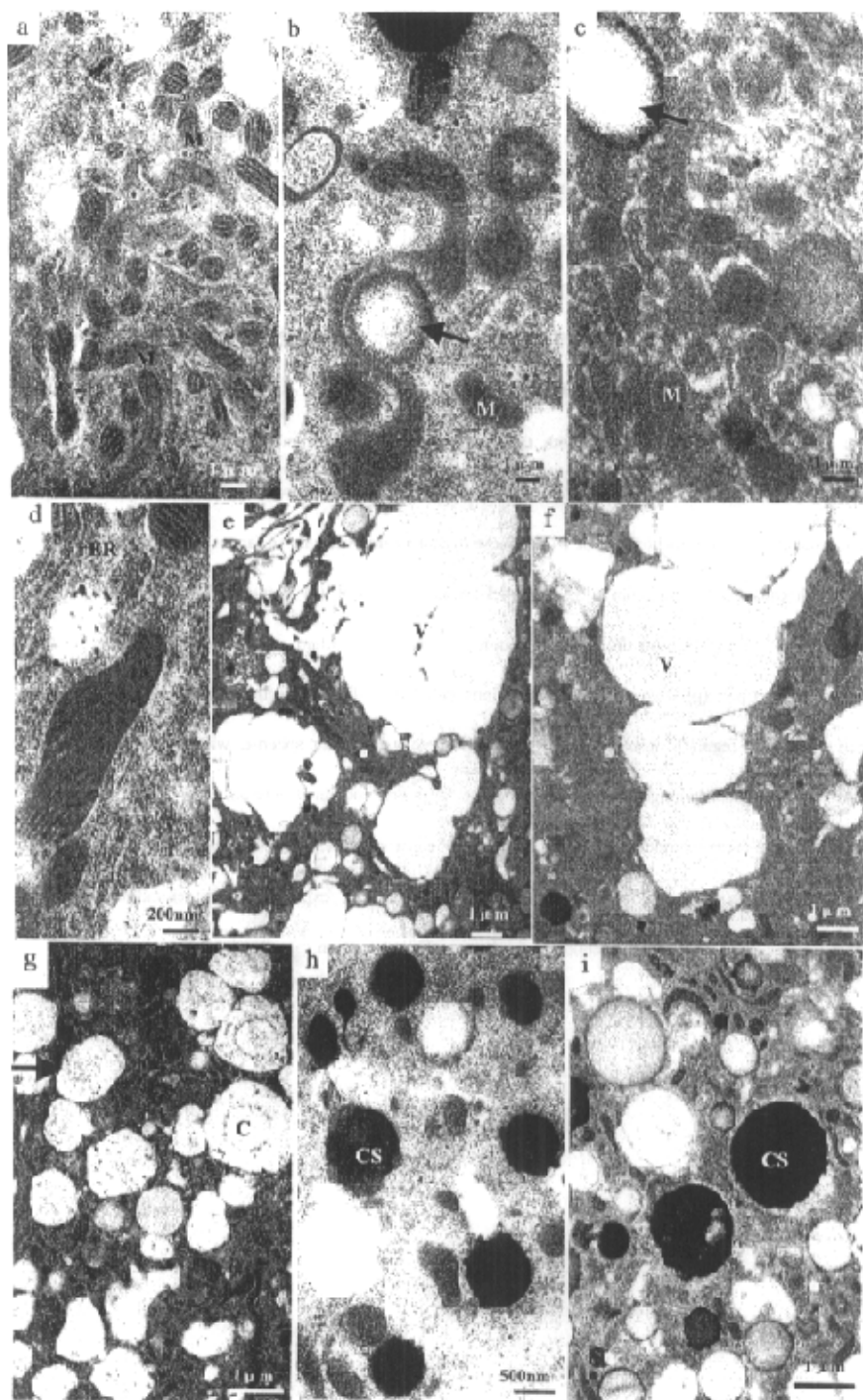


图 8-9 马氏管线粒体、内质网和矿物颗粒体的透射电子显微图

Fig. 8-9 Transmission electron micrographs of mitochondria, endoplasmic reticulum and concretion spherites in the malpighian tubules.

(a) 对照线粒体内膜发达; (b) Cd^{2+} 处理后内膜受到破坏甚至空泡化的线粒体(箭头); (c) Cu^{2+} 处理后线粒体内膜空泡化, 但不是太明显(箭头); (d) 对照呈平行排列粗面内质网; (e) Cd^{2+} 处理后的许多亲水性空泡; (f) Cu^{2+} 处理后几乎不见的粗面内质网和大量的水肿空泡; (g) 对照有两种包含了低电子致密物矿物颗粒体: 不规则排列的(箭头)和规则排列的; (h) Cd^{2+} 处理后的高电子密度的矿物颗粒体: 小颗粒中含有同源性物质, 大的含有异源物质; (i) Cu^{2+} 处理后的高电子密度的矿物颗粒体: 小颗粒中包含了同源性物质, 大的含有异源物质。M: 线粒体; rER: 粗面内质网; V: 空泡; C: 矿物体; CS: 矿物颗粒体。(a) The obvious mitochondria with the well-developed inner membrane in control; (b) Numerous mitochondria with destructed inner membranes or vacuolation (arrow) after exposure to Cd^{2+} ; (c) The obscure inner membranes of most mitochondria, of which some even appeared vesiculated (arrow) after exposure to Cu^{2+} ; (d) The rough endoplasmic reticulum with a parallel arrange in control; (e) Numerous large hydropic vacuoles after exposure to Cd^{2+} ; (f) Almost disappearing rough endoplasmic reticulum and many large hydropic vacuoles after exposure to Cu^{2+} ; (g) Two types of concretions containing slightly electron-dense material: irregularly arranged (arrow) and regularly arranged in control; (h) Numerous concretion spherites with highly electron-dense: the small one contained homogenous material and the large one contained heterogeneous material after Cd^{2+} exposure; (i) Numerous concretion spherites with highly electron-dense: the small one contained homogenous material and the large one contained heterogeneous material after Cu^{2+} exposure. M: mitochondria; rER: rough endoplasmic reticulum; V: hydropic vacuole; C: concretion; CS: concretion spherites

第九章 镉和铜对棕尾别麻蝇血细胞数量、存活及延展的影响

众所皆知，重金属能对有机体产生毒性。近来，重金属的免疫调控效应已得到了论证 (Druet, 1995; Jiang and Moller, 1995; Pelletier *et al.*, 1988; Pietsch *et al.*, 1989)。许多金属能诱导人类或其他实验动物的免疫效应 (Cruz, 1995; Goldman *et al.*, 1991; Kubicka-Muranui *et al.*, 1993; Perlingeiro and Queiroz, 1994; Queiroz *et al.*, 1994; Sapin *et al.*, 1987)。然而有关Cd对昆虫免疫系统毒性效应的报道还很少 (Braeckman *et al.*, 1997, 1999)。昆虫免疫包括细胞免疫与体液免疫，其中细胞免疫包括血细胞的吞噬、成瘤和包被作用以及血浆凝集和溶菌作用等。它们对外界因子（如温度、盐分和化学污染）比较敏感。重金属往往影响血细胞的形态、数量以及噬菌作用等 (Krocova *et al.*, 2000)。有鉴于此，本章我们通过活体喂食和离体培养处理方法，测定 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇 (*Boettcherisca peregrina*) 血细胞数量、存活和延展的影响，为Cd 和Cu 毒性研究提供一些新的信息。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章 1.1。

1.2 活体血细胞的测定

重金属溶于蒸馏水配成不同浓度的溶液，然后按麦麸：水：猪肝=3:5:6 配制成含 Cd^{2+} 或含 Cu^{2+} 的饲料，其中饲料中 Cd^{2+} 浓度分别为 0、100、200、400、800 $\mu\text{g/g}$ ， Cu^{2+} 浓度分别为0、100、200、400、800 $\mu\text{g/g}$ 。用上述配好的饲料分别放入果酱瓶，然后接入200头1日龄末幼虫饲养至化蛹。每浓度设三次重复。分别取处理后第1、2、3、4、5 d 的幼虫血淋巴镜检。取血淋巴时，用昆虫针刺破幼虫，取10 μl 血淋巴与等体积0.04%的台盼蓝溶液（台盼蓝0.04 g溶于100 ml 生理盐水中）混匀，10 min 后以血球计数板于Olympus 相差显微镜下考查染成蓝色（死亡）和未被染色（存活）的细胞数量，计算血细胞总数及血细胞存活率。

1.3 离体血细胞的测定

1.3.1 TC-100 昆虫细胞培养液的配制

2.02 g TC-100 细胞培养基 (GIBCO 公司) 加入 80 ml 去离子水, 以 NaHCO_3 调节 pH 至 6.3, 加入青霉素 10,000 U 和链霉素 0.1 mg, 最后以去离子水定容至 100 ml, 过滤除菌, 分装后 -20°C 保存。

1.3.2 血细胞培养

幼虫孵化后分别以正常饲料和含 $200\ \mu\text{g/g}$ Cu^{2+} 或 Cd^{2+} 饲喂至 4 日龄, 取出洗净, 以 75% 酒精消毒幼虫体表, 于无菌操作台内采集血淋巴, 置于含少量苯基硫脲的 Eppendorf 离心管中, 再各取 $50\ \mu\text{l}$ 分别加到每孔含 $200\ \mu\text{l}$ 的 TC100 昆虫细胞培养液 (含 10% 胎牛血清) 的 48 孔细胞培养板的各孔穴中。而后, 将不同浓度的重金属按 $2\ \mu\text{l}$ 的量分别加入 3 个不同孔穴中, 使有关孔穴中金属浓度分别为 0.1、1、10、20 和 $40\ \mu\text{g/ml}$ 。设仅加 $2\ \mu\text{l}$ 灭菌水为对照。接着, 置 27°C 细胞培养箱中培养, 并分别于 0.5 和 4 h 后置 Nikon 倒置显微镜下任选 3 个视野观察、考查各处理孔穴中延展和未延展的浆血细胞和颗粒血细胞的数量, 并计算两种血细胞的延展率和延展抑制率。延展率 (%) = 延展的某种血细胞数量/考查的该种血细胞的总数量 $\times 100$ 。同时, 以 Eppendorf 微量移液器吸出各处理孔穴中的血细胞悬浮液, 加等体积的 0.04% 台盼蓝溶液混匀, 室温置 10 min 后以血球计数板于 Olympus 相差显微镜下考查染成蓝色 (死亡) 和未被染色 (存活) 的浆血细胞和颗粒血细胞的数量, 计算血细胞存活率。以 Eppendorf 微量移液器吸出各处理孔穴中的血细胞悬浮液, 加等体积的 0.04% 台盼蓝溶液混匀, 10 min 后置血球计数板于 Olympus 相差显微镜下考查染成蓝色 (死亡) 和未被染色 (存活) 的细胞数量, 计算血细胞存活率。

1.4 数据分析

利用 DPS 软件 (唐启义和冯明光, 2002) 对各处理指标进行方差分析, 再以 Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 对棕尾别麻蝇幼虫活体血细胞的总数和存活的影响

棕尾别麻蝇幼虫经不同浓度的 Cd^{2+} 处理后, 血细胞的总数明显低于对照。经统计分析知, 血细胞的数量与 Cd^{2+} 浓度显著相关 ($F = 18.799$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$), 与时间也显著相关 ($F = 21.575$, $df = 4$, $P < 10^{-4}$) (图 9-1A)。幼虫经不同浓度的 Cu^{2+} 处理后, 血细胞的总数也发生了变化, 高浓度的 Cu^{2+} 使血细胞数量下降, 低浓度的 Cu^{2+} 对血细胞的数量无显著

影响,甚至还使细胞数量增加(图 9-1B)。经统计分析知,血细胞的数量与 Cu^{2+} 浓度显著相关($F = 10.016, df = 4, P = 0.0003$),还与时间显著相关($F = 14.246, df = 4, P < 10^{-4}$)。就对幼虫血细胞数量的影响而言, Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 之间存在明显差异($F = 38.606, df = 1, P < 10^{-4}$)。

就重金属对血细胞的存活率影响而言,幼虫经不同浓度 Cd^{2+} 处理后血细胞的存活率有不同程度的降低(图 9-2A)。经统计知,血细胞的存活率与 Cd^{2+} 浓度显著相关($F = 42.828, df = 4, P < 10^{-4}$),也与时间显著相关($F = 19.723, df = 4, P < 10^{-4}$)。幼虫经不同浓度的 Cu^{2+} 处理后,血细胞的存活率也有不同程度的降低(图 9-2B)。经统计知,血细胞的存活率与 Cu^{2+} 浓度显著相关($F = 3.883, df = 4, P = 0.0217$);但与时间无显著相关关系($F = 2.273, df = 4, P = 0.1065$)。 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对幼虫血细胞存活率影响存在明显差异($F = 9.293, df = 1, P = 0.0037$)。

2.2 对棕尾别麻蝇幼虫离体血细胞存活和延展的影响

Cd^{2+} 可以明显影响棕尾别麻蝇幼虫血细胞的存活($F = 13.783, df = 1, P = 0.0007$),且血细胞的存活率与 Cd^{2+} 浓度显著相关($F = 19.332, df = 5, P = 0.0028$),但在时间上无显著差异($F = 0.056, df = 1, P = 0.8220$)(图 9-3A)。 Cu^{2+} 也可以明显影响棕尾别麻蝇幼虫血细胞的存活($F = 7.663, df = 1, P = 0.0091$),血细胞的存活率与 Cu^{2+} 浓度显著相关($F = 10.509, df = 5, P = 0.0110$),但在时间上无显著差异($F = 6.344, df = 1, P = 0.0533$)(图 9-3C)。

离体培养条件下,棕尾别麻蝇幼虫血细胞能正常延展,并形成伪足(图 9-4A),经不同浓度的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理后未见受到明显的抑制。 Cd^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫血细胞的延展率没有显著影响($F = 0.080, df = 1, P = 0.7792$),这样, Cd^{2+} 浓度对血细胞的延展率也无显著差异($F = 0.885, df = 5, P = 0.5517$),但不同处理时间的血细胞的延展率有显著差异($F = 24.693, df = 1, P = 0.0042$)(图 9-3B)。同样, Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫血细胞的延展率没有显著影响($F = 0.044, df = 1, P = 0.8360$),其浓度对血细胞的延展率也无显著差异($F = 0.197, df = 5, P = 0.9505$),不同处理时间的血细胞的延展率有显著差异($F = 36.894, df = 1, P = 0.0017$)(图 9-3D)。

2.3 对经 Cd^{2+} 处理棕尾别麻蝇幼虫的离体血细胞存活和延展的影响

棕尾别麻蝇幼虫经 Cd^{2+} 处理后,其血细胞离体培养时存活率与 Cd^{2+} 无关($F = 3.263, df = 1, P = 0.0797$),血细胞的存活率与 Cd^{2+} 浓度也没有显著相关性($F = 1.731, df = 5, P = 0.1658$),在时间上无显著差异($F = 2.973, df = 1, P = 0.0975$)(图 9-5A)。但 Cu^{2+} 仍然可

以明显影响来自经 Cd^{2+} 胁迫棕尾别麻蝇幼虫的血细胞存活 ($F = 7.078, df = 1, P = 0.0118$), 血细胞的存活率与 Cd^{2+} 浓度显著相关 ($F = 23.479, df = 5, P = 0.0018$), 在时间上也有显著差异 ($F = 56.031, df = 1, P = 0.0007$) (图 9-5C)。

棕尾别麻蝇幼虫经 Cd 处理后, 离体培养条件下, 幼虫血细胞能正常延展 (图 9-4A), 但 Cd^{2+} 喂食后的幼虫血细胞外层会产生许多颗粒 (图 9-4B,C)。 Cd^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫血细胞的延展率无显著影响 ($F = 0.253, df = 1, P = 0.6180$), Cd^{2+} 浓度对血细胞的延展率也无显著差异 ($F = 0.459, df = 5, P = 0.7938$), 但不同处理时间的血细胞延展率有显著差异 ($F = 148.187, df = 1, P = 0.0001$) (图 9-5B)。同样, Cu^{2+} 对经 Cd^{2+} 胁迫棕尾别麻蝇幼虫的血细胞延展没有显著影响 ($F = 0.253, df = 1, P = 0.6180$), 其浓度对血细胞的延展率也无显著差异 ($F = 2.185, df = 5, P = 0.2055$), 不同处理时间的血细胞的延展率有显著差异 ($F = 139.319, df = 1, P = 0.0001$) (图 9-5D)。

2.4 对经 Cu^{2+} 处理棕尾别麻蝇幼虫的离体血细胞存活和延展的影响

棕尾别麻蝇幼虫经 Cu^{2+} 处理后, 其血细胞离体培养时存活率与 Cd^{2+} 显著相关 ($F = 3.449, df = 1, P = 0.0270$), 血细胞的存活率与 Cd^{2+} 浓度显著相关 ($F = 7.724, df = 5, P = 0.0213$), 在时间上无显著差异 ($F = 3.953, df = 1, P = 0.1035$) (图 9-6A)。在离体条件下, Cu^{2+} 能显著影响 Cu^{2+} 胁迫棕尾别麻蝇幼虫血细胞的存活 ($F = 4.426, df = 1, P = 0.0429$), 血细胞的存活率与 Cu^{2+} 浓度显著相关 ($F = 10.82, df = 5, P = 0.0103$), 在时间上也有显著差异 ($F = 8.056, df = 1, P = 0.0363$) (图 9-6C)。

棕尾别麻蝇幼虫经 Cu^{2+} 处理后, 离体培养条件下, 幼虫血细胞能正常延展。 Cd^{2+} 对这样的幼虫血细胞的延展率没有显著影响 ($F = 0.928, df = 1, P = 0.3422$), 这样, Cd^{2+} 浓度对血细胞的延展率也无显著差异 ($F = 1.84, df = 5, P = 0.2597$), 但不同处理时间的血细胞的延展率有显著差异 ($F = 40.455, df = 1, P = 0.0014$) (图 9-6B)。同样, Cu^{2+} 对来自 Cu^{2+} 胁迫棕尾别麻蝇幼虫的血细胞延展没有显著影响 ($F = 0.001, df = 1, P = 0.9852$), 其浓度对血细胞的延展率无显著差异 ($F = 1.466, df = 5, P = 0.3424$), 不同处理时间的血细胞的延展率也没有显著差异 ($F = 1.809, df = 1, P = 0.2364$) (图 9-6D)。

3 讨论

重金属对环境的威胁在于强的毒性效应。产生的细胞损伤与金属的类型、亚细胞分布及浓度有关 (Cherian and Ferguson, 1997)。高浓度的金属运输入细胞中, 能导致细胞膜的破裂,

导致自我平衡控制的紊乱，损害能量代谢和由坏疽引起的细胞死亡。另一方面，在低金属浓度长期的接触下，可观察到在出现毒性损伤前，金属在胞内的积累将到达一极限。金属积累能直接影响特定的酶，改变信号转导途径，还可产生非直接的影响如形成自由基，过氧化物或细胞因子(Oikawa *et al.*, 1995; Kasprzak, 1997)。此外，在低剂量时，某些金属能增加或抑制细胞凋亡，取决于胞内靶标的种类及金属 (Lohmann and Beyersmann, 1993)。在这点上，说明了重金属对于调控凋亡，对于细胞的生长及分化有显著的影响。本研究结果表明，将 Cd^{2+} 饲喂给棕尾别麻蝇幼虫或用以处理离体培养幼虫血细胞，均能显著影响棕尾别麻蝇幼虫血细胞的存活，但 Cd^{2+} 对来自经 Cd^{2+} 胁迫棕尾别麻蝇幼虫的血细胞存活不再有显著影响。另外活体实验中还表明 Cd^{2+} 可以影响血细胞的总数量，但在离体实验中， Cd^{2+} 没有显著影响血细胞的延展，但 Cd^{2+} 处理来自经 Cd^{2+} 胁迫棕尾别麻蝇幼虫的血细胞后细胞表面形成很多颗粒(图 9-4B,C)。这些均证明 Cd^{2+} 对昆虫血细胞的凋亡作用及它对免疫系统的毒性影响。

我们的结果还表明，将重金属 Cu^{2+} 饲喂给棕尾别麻蝇幼虫或用以处理离体培养幼虫血细胞，均能显著影响棕尾别麻蝇幼虫血细胞的存活。另外活体实验中还表明 Cd^{2+} 可以影响血细胞的总数量，但在离体实验中， Cu^{2+} 对细胞的延展没有显著影响。这些均证明 Cu^{2+} 对昆虫血细胞细胞的凋亡作用及它对免疫系统的毒性影响。

总之，化学污染引起的免疫毒性效应可以通过监测“岗哨”生物免疫系统中细胞的和功能的参数被评价。不同的血细胞数量，活性氧中间体的产生和释放，这些都与污染的严重度相关。

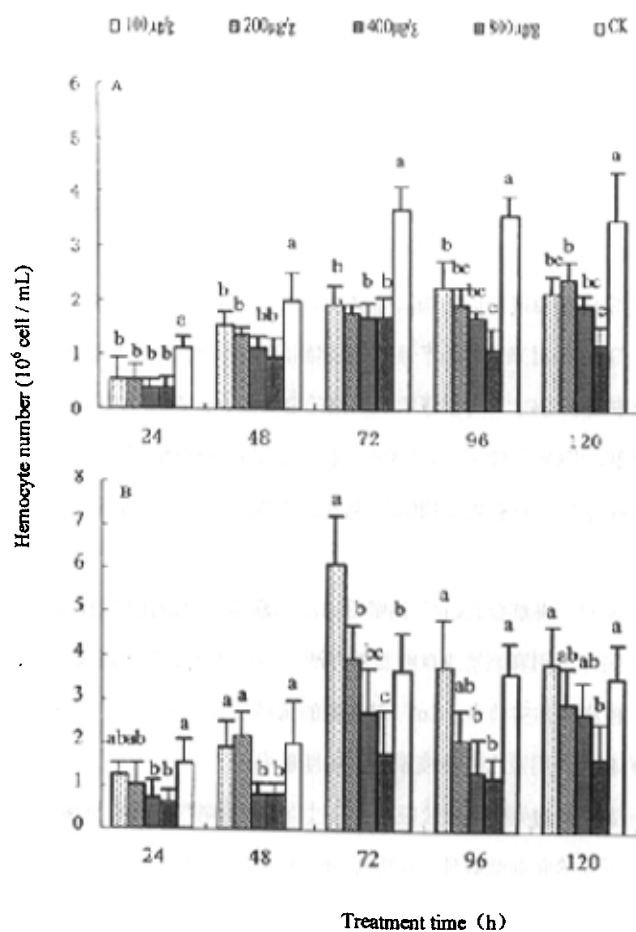


图 9-1 Cd^{2+} (A) 和 Cu^{2+} (B) 对棕尾别麻蝇幼虫血细胞总数的影响

Fig. 9-1 Effects of Cd^{2+} (A) and Cu^{2+} (B) on total number of hemocytes of *B. peregrina* larvae

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差, 同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$), Duncan's 新复极差多重比较). The columns represent means $\pm$ S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

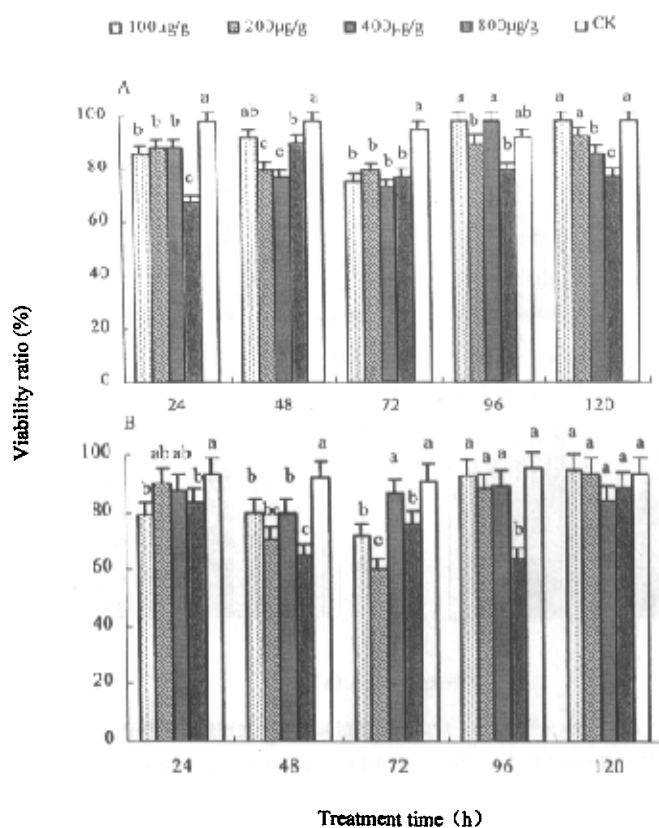


图 9-2 Cd^{2+} (A) 和 Cu^{2+} (B) 对棕尾别麻蝇幼虫血细胞存活的影响

Fig. 9-2 Effects of Cd^{2+} (A) and Cu^{2+} (B) on Viability of hemocytes of *B. peregrina* larvae

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差, 同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$, Duncan's 新复极差多重比较). The columns represent means $\pm$ S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

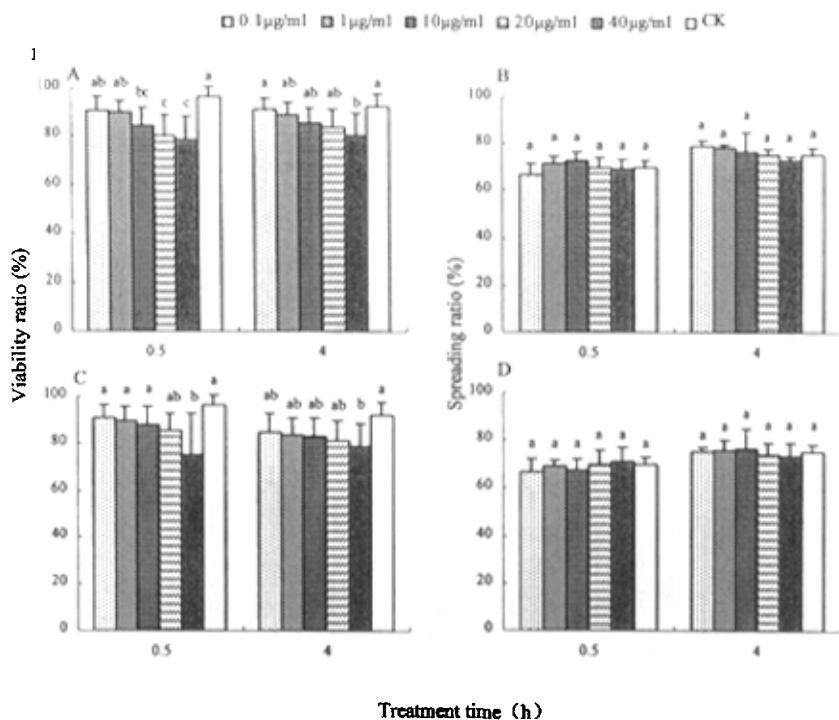


图 9-3 Cd^{2+} (A,B) 和 Cu^{2+} (C,D) 对离体棕尾别麻蝇幼虫血细胞存活和延展的影响

Fig. 9-3 Effects of Cd^{2+} (A,B) and Cu^{2+} (C,D) on Viability and spreading of hemocytes of *B. peregrina* larvae in vitro

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差, 同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$, Duncan's 新复极差多重比较)。The columns represent means $\pm$ S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

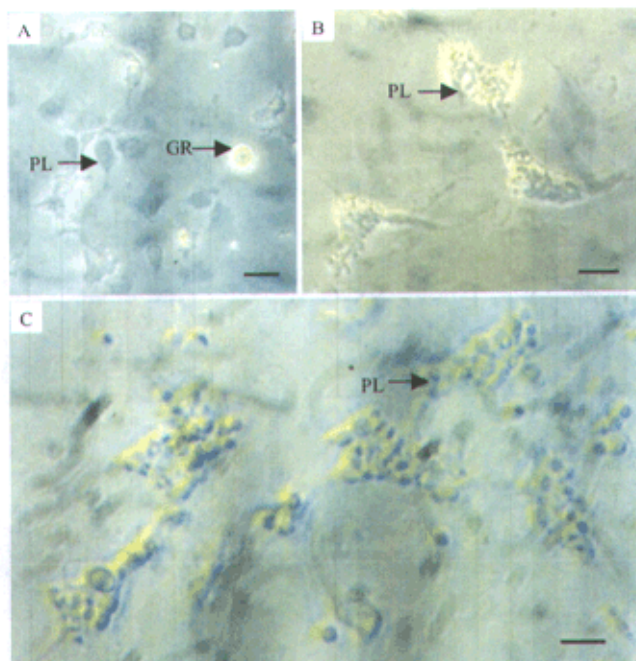


图 9-4 离体培养棕尾别麻蝇幼虫血细胞的形态及其经 Cd^{2+} 处理后的变化

Fig. 9-4 Micrograph and changes of hemocytes of *B. peregrina* larvae *in vitro* after exposure to Cd^{2+}

A: 正常血细胞的形态 Normal hemocytes; B, C: 经 Cd^{2+} 诱导棕尾别麻蝇幼虫血细胞在 Cd^{2+} 处理后的形态 Morphology of hemocytes from Cd^{2+} -treated larvae after treated with Cd^{2+} ; PL: 浆血细胞; GR: 颗粒血细胞. 标尺 Scale bar = 10 μm .

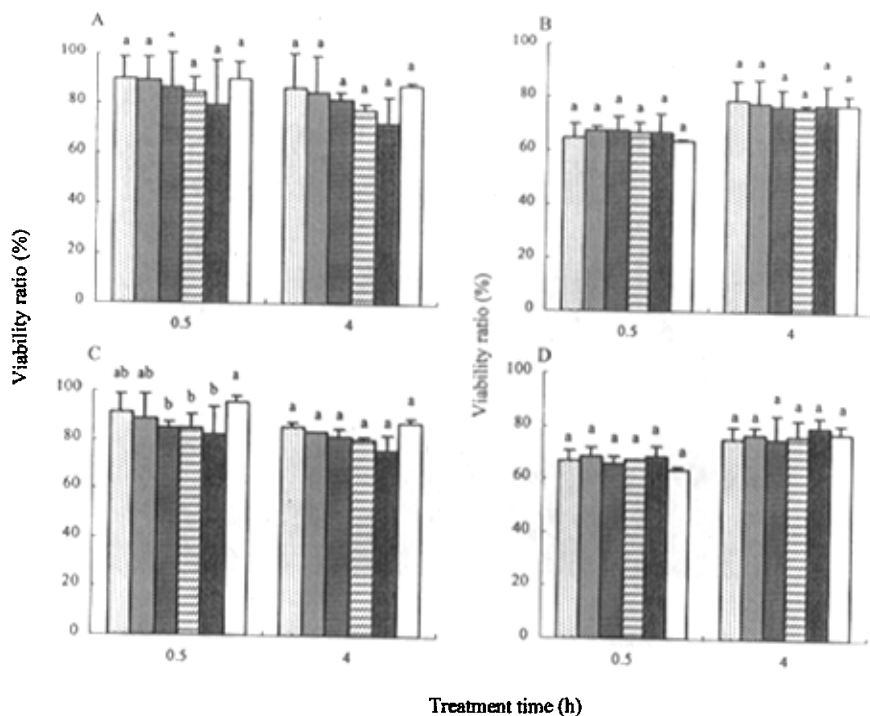


图 9-5 Cd²⁺ (A,B) 和 Cu²⁺ (C,D) 对取食含 Cd²⁺ 饲料棕尾别麻蝇幼虫离体血细胞存活和延展的影响
 Fig. 9-5 Effects of Cd²⁺ (A,B) and Cu²⁺ (C,D) on Viability and spreading of hemocytes of *B. peregrina* larvae fed diet containing Cd²⁺ *in vitro*

图中数据为平均数 ± 标准差, 同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$, Duncan's 新复极差多重比较)。The columns represent means ± S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

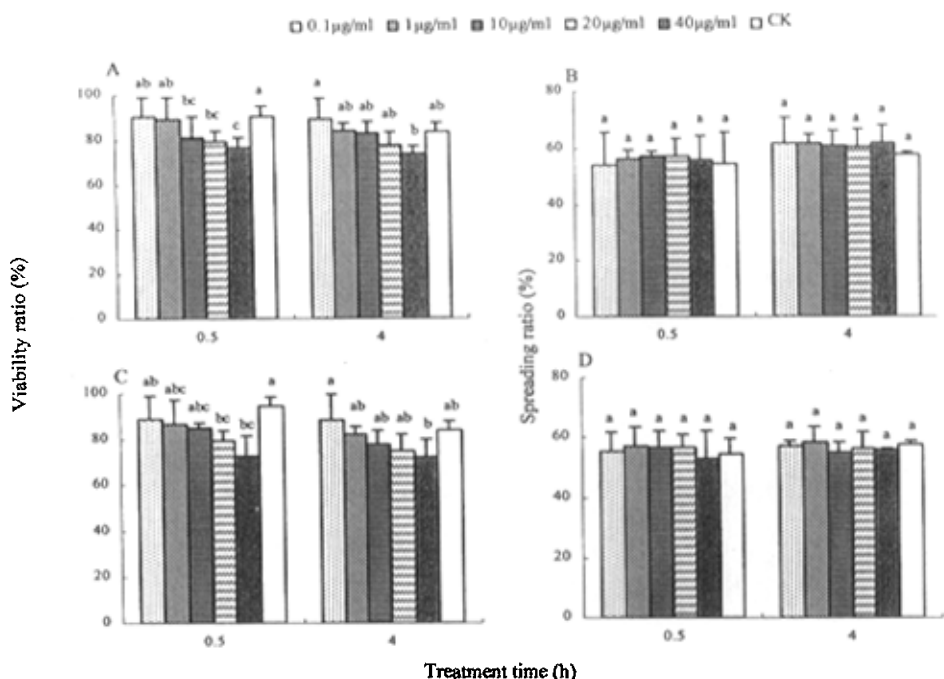


图 9-6 Cd^{2+} (A,B) 和 Cu^{2+} (C,D) 对取食含 Cu^{2+} 饲料棕尾别麻蝇幼虫离体血细胞存活和延展的影响
Fig. 9-6 Effects of Cd^{2+} (A,B) and Cu^{2+} (C,D) on Viability and spreading of hemocytes of *B. peregrina* larvae fed diets containing Cu^{2+} *in vitro*

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差, 同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$, Duncan's 新复极差多重比较)。The columns represent means $\pm$ S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

第十章 镉和铜对棕尾别麻蝇幼虫血淋巴能量水平的影响

重金属能被生物积累并干扰生物的正常新陈代谢过程,生物为了抵抗金属的毒害而增加了排泄,解毒或是对损伤的修补,解毒过程会耗费机体的能量,因此能量代谢在克服毒性胁迫上起了重要作用。很多学者报道在昆虫中能量化合物如碳水化合物、蛋白、脂质会因金属胁迫而变化 (Rathore *et al.*, 1979; Jacobson *et al.*, 1981; Islam and Roy, 1983; Graney and Giesy, 1986; Ortel and Vogel, 1989; Ortel, 1991, 1995; Schmidt *et al.*, 1992; Gintenreiter *et al.*, 1993; Martinez *et al.*, 1994; Bischof, 1995; Shin *et al.*, 2001; Chinni and Yallapragada, 2002)。但是昆虫能量化合物的变化往往因重金属的种类、重金属浓度和昆虫种类而异 (Carr *et al.*, 1985; Radhakrishnaiah and Busappa, 1986), 也因组织而异 (Islam and Roy, 1983)。且血淋巴在调控昆虫的营养状态起了重要的作用 (Simpson and Raubenheimer, 1993)。因此,我们特研究Cd和Cu影响棕尾别麻蝇 (*Boettcherisca peregrina*) 幼虫血淋巴能量水平的浓度和时间效应,并探讨能量化合物和生长发育的关系。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章 1.1。

1.2 饲料的配制

饲料配制方法同第九章 1.2。

1.3 实验设计

1.3.1 浓度效应的试验

1日龄的棕尾别麻蝇幼虫分别取食含不同浓度的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的食物: 100、200、400、800 $\mu\text{g/g}$ 。取食正常饲料的幼虫设为对照。每个浓度作为一个处理,每个处理设三个重复。分别取处理后 48 h 的幼虫血淋巴,放入预先加有少量苯基硫脲晶体的 Eppendorf 管中,然后置 Beckman 高速离心机于 4°C , 8000 g 离心 10 min, 取上清液,放入低温冰箱 (-70°C) 保存备用。

1.3.2 时间效应的试验

棕尾别麻蝇 1 日龄幼虫被喂食含 $800 \mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的食物, 分别在处理后 24、48、72、96 和 120 h 取幼虫的血淋巴, 离心后, 放入低温冰箱备用。同时设有对照。

1.4 血淋巴可溶性蛋白浓度的测定

按 Bradford (1976) 的方法进行测定, 取上述的上清液, 用生理盐水适当比例稀释。以考马斯亮蓝 G_{250} 染色, 用分光光度计测定样品 OD_{595} , 并以牛血清蛋白为标准蛋白制定标准曲线。

1.5 总糖含量的测定

参照冯慧 (1989) 的方法, 在一定量的血淋巴中加入磷基水杨酸溶液至最终浓度为 10%, 离心, 除去蛋白质沉淀, 将上清液稀释到一定浓度后, 稀释液 1 ml, 加入 0.2% 萘酚浓硫酸试剂 5 ml, 在沸水浴中加热 10 min, 冷却后在 620 nm 进行比色测定。以葡萄糖制作标准曲线。

1.6 脂质的测定

采用含磷香草醛酸法 (NaKamatsu and Tanaka, 2003)。取出幼虫血淋巴 $5 \mu\text{l}$, 用蒸馏水补足到 $100 \mu\text{l}$, 加入 0.5 ml 氯仿, 室温静置 10 min; 然后加入 0.5 ml 的浓 H_2SO_4 , 沸水中加热 10 min, 冷却至室温。最后加入 1 ml 含磷香草醛溶液 (在 14 M 的磷酸中加入 13 mM 香草醛), 混匀后, 在室温下置 30 min。测 OD_{547} 。以胆固醇 (2.5 mg/ml 甲醇) 制作标准曲线。

1.7 热量值的计算

参照 Graney 和 Giesy (1986) 的方法, 假定脂类的热量值为 9.5 cal/mg, 糖的热量值为 4.3 cal/mg, 蛋白的热量值为 4.1 cal/mg 来计算热量值 (cal/ml)。

1.8 数据分析

利用 DPS 软件 (唐启义和冯明光, 2002) 对各处理指标进行方差分析, 再以 Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 对三种生化物质及能量水平的影响

2.1.1 浓度对三种生化物质及能量水平的影响

不同浓度的 Cd^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫血淋巴总糖、蛋白和脂类的影响如表 10-1。可以看出,与对照相比,经 Cd^{2+} 处理后这三种生化物质的浓度减少,且不同浓度的 Cd^{2+} 对总糖($F=8.574, df=4, P=0.0029$)、蛋白($F=56.15, df=4, P=0.0002$)和脂类($F=17.367, df=4, P=0.0039$)的影响有显著差异,都随着 Cd^{2+} 浓度的增加,三种生化物质的浓度不断减少。

不同浓度的 Cd^{2+} 处理后,棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的热量值随着 Cd^{2+} 浓度的增加而减少,且差异显著($F=51.806, df=4, P=0.0003$)。 Cd^{2+} 浓度为 $800 \mu\text{g/g}$ 时,最大减少量达对照的48.47%(图 10-1A)。

碳水化合物与蛋白的比值随着 Cd^{2+} 浓度的增加而增加, Cd^{2+} 浓度为 $800 \mu\text{g/g}$ 时,与对照相比达显著水平($F=21.703, df=1, P=0.0096$)(图 10-2A)。碳水化合物与脂类的比值在低浓度时减少,高浓度时有增加的趋势,且 Cd^{2+} 浓度为 $800 \mu\text{g/g}$ 时,增加显著($F=15.828, df=1, P=0.0164$)(图 10-3A)。

2.1.2 处理时间对三种生化物质及能量水平的影响

棕尾别麻蝇幼虫连续取食含 $800 \mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 的食物后,糖、蛋白和脂的浓度都比对照少(表 10-2)。减少的顺序是蛋白>脂>糖。对照和 Cd^{2+} 处理的棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的热量浓度变化趋势类似,且在同一时间, Cd^{2+} 处理的热量浓度都比对照减少(图 10-4)。由图 10-5 可知,在同一时间, Cd^{2+} 处理的棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与蛋白的比率总是比对照高,且差异显著($F=216.454, df=1, P<10^{-4}$)。同时, Cd^{2+} 处理的棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与脂类的比率也比对照高,差异达显著水平($F=5.214, df=1, P=0.0335$)(图 10-6)。

2.2 Cu^{2+} 对三种生化物质及能量水平的影响

2.2.1 浓度对三种生化物质及能量水平的影响

棕尾别麻蝇幼虫血淋巴总糖、蛋白和脂类的含量随 Cu^{2+} 浓度的增加而减少,且 Cu^{2+} 浓度对总糖($F=8.924, df=4, P=0.0025$)、蛋白($F=31.652, df=4, P=0.001$)和脂类($F=10.031, df=4, P=0.0132$)的含量也有显著影响。而低浓度的 Cu^{2+} ($100 \mu\text{g/g}$)则会引起血淋巴蛋白浓度的增加(表 10-1)。

除 100 $\mu\text{g/g}$ 的处理外,棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的热量值也随着 Cu^{2+} 浓度的增加而降低,且浓度间差异显著 ($F = 37.32, df = 4, P = 0.0006$)。 Cu^{2+} 浓度为 800 $\mu\text{g/g}$ 时,最大减少量达对照的 37.02% (图 10-1B)。

Cu^{2+} 处理对碳水化合物与蛋白的比值无显著影响 ($F = 0.104, df = 1, P = 0.7518$),而对碳水化合物与脂类的比值有显著影响 ($F = 0.094, df = 1, P = 0.7634$)。 Cu^{2+} 处理浓度对碳水化合物与蛋白的比值 ($F = 2.805, df = 4, P = 0.0847$) 和水化合物与脂类的比值 ($F = 0.446, df = 4, P = 0.7729$) 均无显著影响 (图 10-2B 和 10-3B)。

2.2.2 处理时间对三种生化物质及能量水平的影响

棕尾别麻蝇幼虫连续取食含 800 $\mu\text{g/g}$ Cu^{2+} 的食物后,糖、蛋白和脂的浓度都比对照减少 (表 10-3)。减少的顺序是糖>蛋白>脂。在同一时间, Cu^{2+} 处理的热量值也比对照减少,但减少的程度比 Cd^{2+} 小 (图 10-4)。由图 10-5 可知, Cu^{2+} 处理的棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与蛋白的比率是随着时间先下降再升高,而对照是一直下降的;并且在 24 h 到 72 h 间处理的比率比对照低,之后,处理的比对照高。同时, Cu^{2+} 处理的棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与脂类的比率变化趋势与此类似 (图 10-6)。

3 讨论

棕尾别麻蝇幼虫经 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理后血淋巴热量值下降。说明棕尾别麻蝇受重金属胁迫后有能量的损耗。与此类似,甲壳类动物受重金属胁迫血淋巴热量值也下降 (Dickson *et al.*, 1982; Radhakrishnaiah and Busappa, 1986; Torreblanca *et al.*, 1991; Chinni and Yallapragada, 2002)。Graney 和 Giesy (1986) 已经证明毒物的暴露能通过代谢调节来减少热量值,并且铅暴露引起代谢率减少已经被报道 (Satyavathi *et al.*, 2000)。另外,重金属处理后,能量 (热量) 水平的减少也反应了食物吸入率和吸收率的变化 (Maryański *et al.*, 2002); 这也是解释重金属抑制生长发育和繁殖的部分原因。

在 Cd^{2+} 处理棕尾别麻蝇幼虫血淋巴中碳氢化合物与蛋白的比和碳氢化合物与脂类的比增加表明 Cd^{2+} 对蛋白和脂类的影响比对碳氢化合物 (糖) 的影响强。这可能是由于结构损伤 (在一定程度上引起蛋白和脂类的损耗) (Lauverjat *et al.*, 1989; Sohal *et al.*, 1977) 和血细胞渗透的综合影响 (Vilella *et al.*, 1991)。

我们的结果表明,与对照相比, Cd^{2+} 处理棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的蛋白浓度明显减小,并且 Cd^{2+} 浓度越高,蛋白浓度越低。这与其它报道相一致。如伸展摇蚊 *Chironomus tentans* 幼虫暴露于 10 ppm Cd^{2+} 1 h 后蛋白浓度显著下降到对照的 70% (Rathore *et al.*, 1979)。黑瘤姬蜂 *Pimpla turionellae* Cd 暴露后蛋白浓度显著降低或不变化 (Ortel, 1991)。紫蓝丽盾蜡 (金

花螞) *Chrysocoris stoll* 暴露于Cd 后蛋白水平随组织而定 (Islam and Roy, 1983)。Chinni 和 Yallapragada (2002) 报道 *Penaeus indicus* 蛋白浓度因铅暴露而降低, 并且铅浓度越高蛋白浓度降低越多。在糖虾 *Mysidopsis bahia* 中重金属通过干扰代谢来影响总蛋白含量。Cd胁迫可以损伤DNA, 使蛋白表达受到影响, 从而导致总蛋白量的减少 (Carr *et al.*, 1985)。另外重金属可以诱导昆虫产生金属硫蛋白 (Marshall, 1983; Aoki *et al.*, 1984; Maroni and Watson, 1985; Kasai, 1993; Niu, 2000), 但若金属硫蛋白螯合了过多的Cd, 将对细胞产生毒害, 从而干扰生理过程。

我们的结果表明, Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理棕尾别麻蝇幼虫后血淋巴的脂类浓度明显减小。这与以往报道的 Cd^{2+} 对脂类的影响相似。紫蓝丽盾螞 *C. stoll* 在注射 $5 \mu\text{g CdCl}_2$ /头后血淋巴胆固醇水平持续下降 (Islam and Roy, 1983)。Ortel (1991) 报道 *P. turionellae* 成虫通过食物暴露于Cd 7 天后总脂含量显著下降。4 龄舞毒蛾 *Lymantria dispar* 暴露于Cd 3 天后, 血淋巴脂类浓度严重下降 (Ortel, 1995)。Bischof (1995) 报道Cd 和Zn 引起舞毒蛾 *L. dispar* 血淋巴和虫体脂质的减少。Cd 污染的大蜡螟 *Galleria mellonella* 蛹和幼虫总脂含量也大大降低 (Shin *et al.*, 2001)。Cd 对水生生物脂类合成的影响也已被报道。高的 Cd^{2+} 浓度导致软体动物器官的磷脂组成发生相当大的变化 (Evtushenko *et al.*, 1986)。

棕尾别麻蝇幼虫血淋巴总糖的浓度也受 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的显著影响。与此类似, 受Cd 污染后, 舞毒蛾 *L. dispar* 幼虫血淋巴中海藻糖大大降低, 然而山梨糖醇和葡萄糖无明显的影响。Reddy 和 Rao (1988) 认为重金属引起的碳氢化合物的减少可以归因于金属对氧化代谢的影响。但有些学者的结论与此不一致。如Ortel (1991) 报道黑瘤姬蜂 *P. turionellae* 吸入 Cd^{2+} 后碳水化合物没有显著变化; Islam 和 Roy (1983) 报道紫蓝丽盾螞 *C. stoll* 被注射 Cd^{2+} 几小时后血淋巴碳水化合物升高, 但脂肪体和卵巢中的糖却降低。由此看来, 在重金属对昆虫体内总糖或碳水化合物的影响, 往往因昆虫的种类及器官而异。

总之, Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 扰乱了棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的化学组成。这有助于我们更好的理解 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇的有害影响。但究竟毒性过程从哪里开始尚不得而知, 也许是首先抑制取食器官的肌肉活性, 这有待于以后进一步的研究。另外重金属的神经毒性影响已经有过报道。如Cd在 10^{-5} M 或更少的浓度就可以影响神经递质的释放 (Cooper *et al.*, 1984), 并且Cd 可以抑制ATP酶的活性 (Evtushenko *et al.*, 1986)。最近更多的学者把兴趣集中在有关Cd 与Ca (Albert *et al.*, 1999)、Cd 与基因表达 (Mattingly *et al.*, 2001) 及Cd 与金属硫蛋白 (Ingrid and Dick, 2003) 的研究上。

表 10-1 不同浓度的 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫血淋巴化学组成的影响

Table 10-1 Effects of concentration-dependent treatment of Cd^{2+} or Cu^{2+} on biochemical constituents in larval hemolymph of *Boettcherisca peregrina*

Metal concentrations ($\mu\text{g/g}$)	Cd^{2+}			Cu^{2+}		
	Total sugars	Total proteins	Total lipids	Total sugars	Total proteins	Total lipids
	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)	(mg/ml)
CK	4.47 ± 0.32	67.53 ± 1.29	5.98 ± 0.22	5.05 ± 0.84	68.83 ± 0.55	5.85 ± 0.19
100	$3.71 \pm 0.24^*$ (17.11%)	$58.44 \pm 1.10^*$ (13.46%)	5.60 ± 0.22 (6.41%)	4.73 ± 0.31 (6.31%)	$72.73 \pm 0.37^*$ (-5.66%)	5.32 ± 0.40 (9.13%)
200	$3.19 \pm 0.19^*$ (28.64%)	$52.08 \pm 0.18^*$ (22.88%)	$4.89 \pm 0.32^*$ (18.15%)	4.37 ± 0.22 (13.41%)	$57.14 \pm 5.51^*$ (16.98%)	$4.78 \pm 0.16^*$ (18.28%)
400	$2.99 \pm 0.73^*$ (33.05%)	$44.42 \pm 4.59^*$ (34.23%)	$4.42 \pm 0.40^*$ (26.07%)	$3.51 \pm 0.33^*$ (30.45%)	$48.70 \pm 0.18^*$ (29.24%)	$4.37 \pm 0.07^*$ (25.33%)
800	$2.78 \pm 0.27^*$ (37.86%)	$33.57 \pm 2.48^*$ (50.29%)	$3.37 \pm 0.50^*$ (43.67%)	$3.26 \pm 0.22^*$ (35.41%)	$44.03 \pm 4.22^*$ (36.04%)	$3.82 \pm 0.63^*$ (34.77%)

注：每个值表示为平均值 $\pm$ S.D., 括号内的值表示与对照比减少的百分率。*表示与对照差异达显著水平 ($P < 0.05$)。

Note: Each value represents the mean $\pm$ standard deviation. The values in the parentheses represent percentage decrease over control value. * Significantly different from controls at $P < 0.05$.

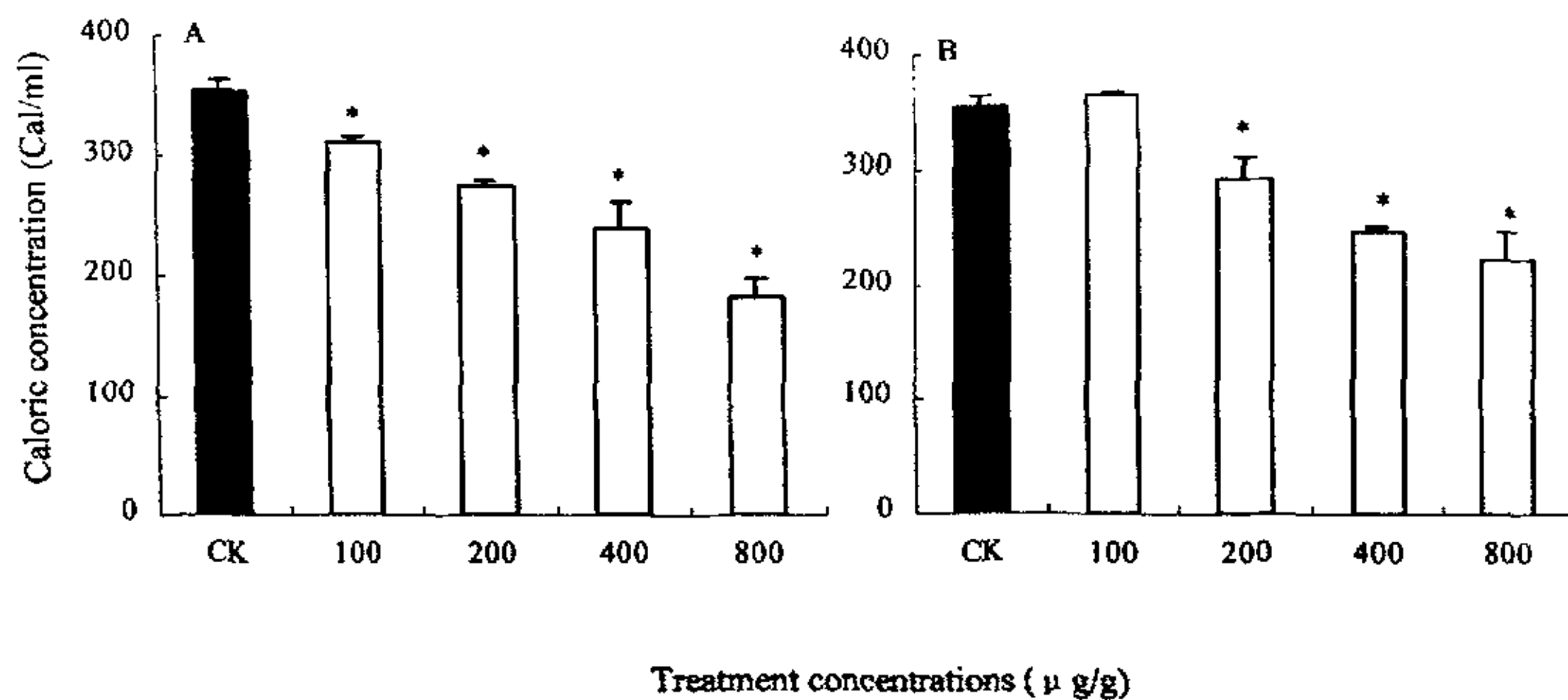


图 10-1 不同浓度 Cd^{2+} (A) 或 Cu^{2+} (B) 处理下棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的热量值

Fig. 10-1 Caloric values of larval hemolymph of *B. peregrina* after exposure to different concentrations of Cd^{2+} (A) or Cu^{2+} (B)

表示与对照差异达显著水平 ($P < 0.05$)。下同。 Significantly different from controls at $P < 0.05$ according to Duncan's multiple range tests. The same for the following figures.

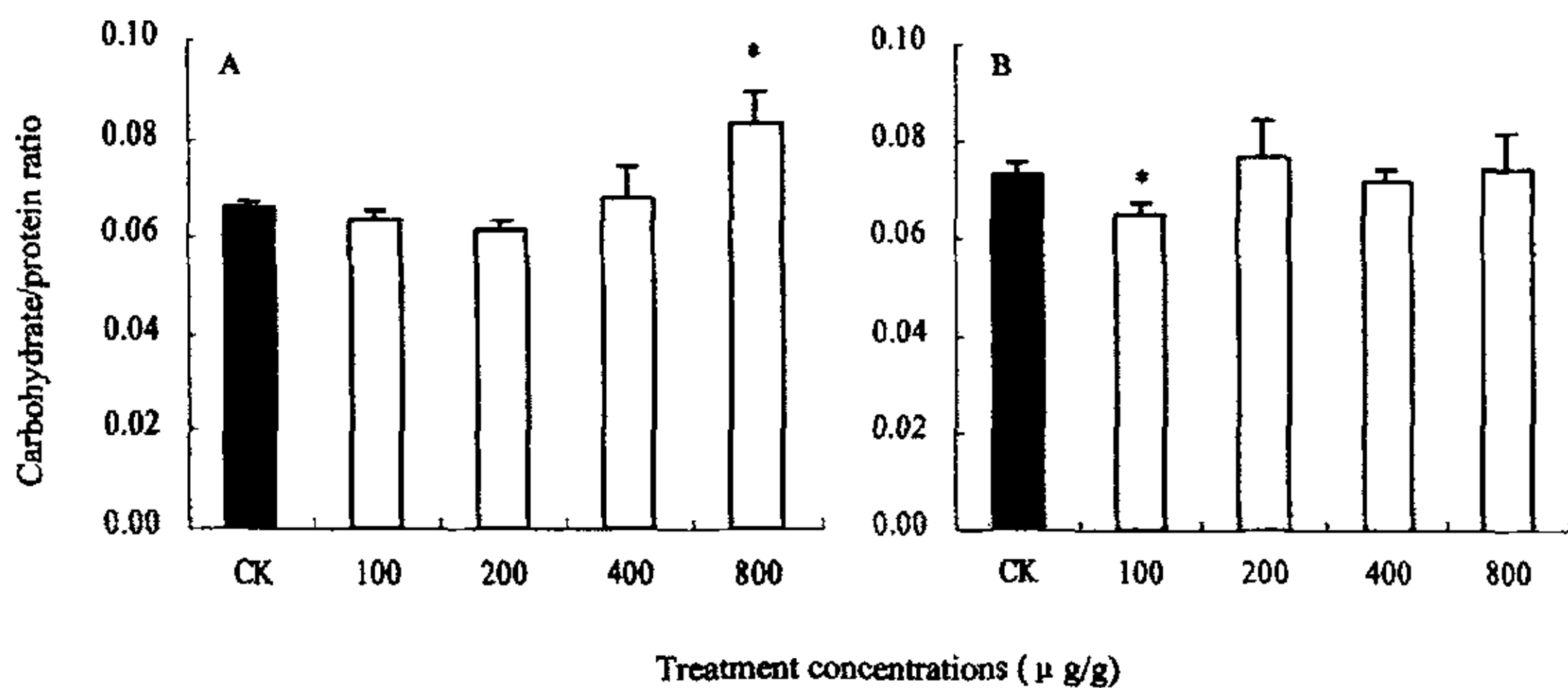


图 10-2 不同浓度 Cd^{2+} (A) 或 Cu^{2+} (B) 处理下棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与蛋白的比率

Fig. 10-2 Carbohydrate/protein ratio of larval hemolymph of *B. peregrina* under treatments with different concentrations of Cd^{2+} (A) or Cu^{2+} (B)

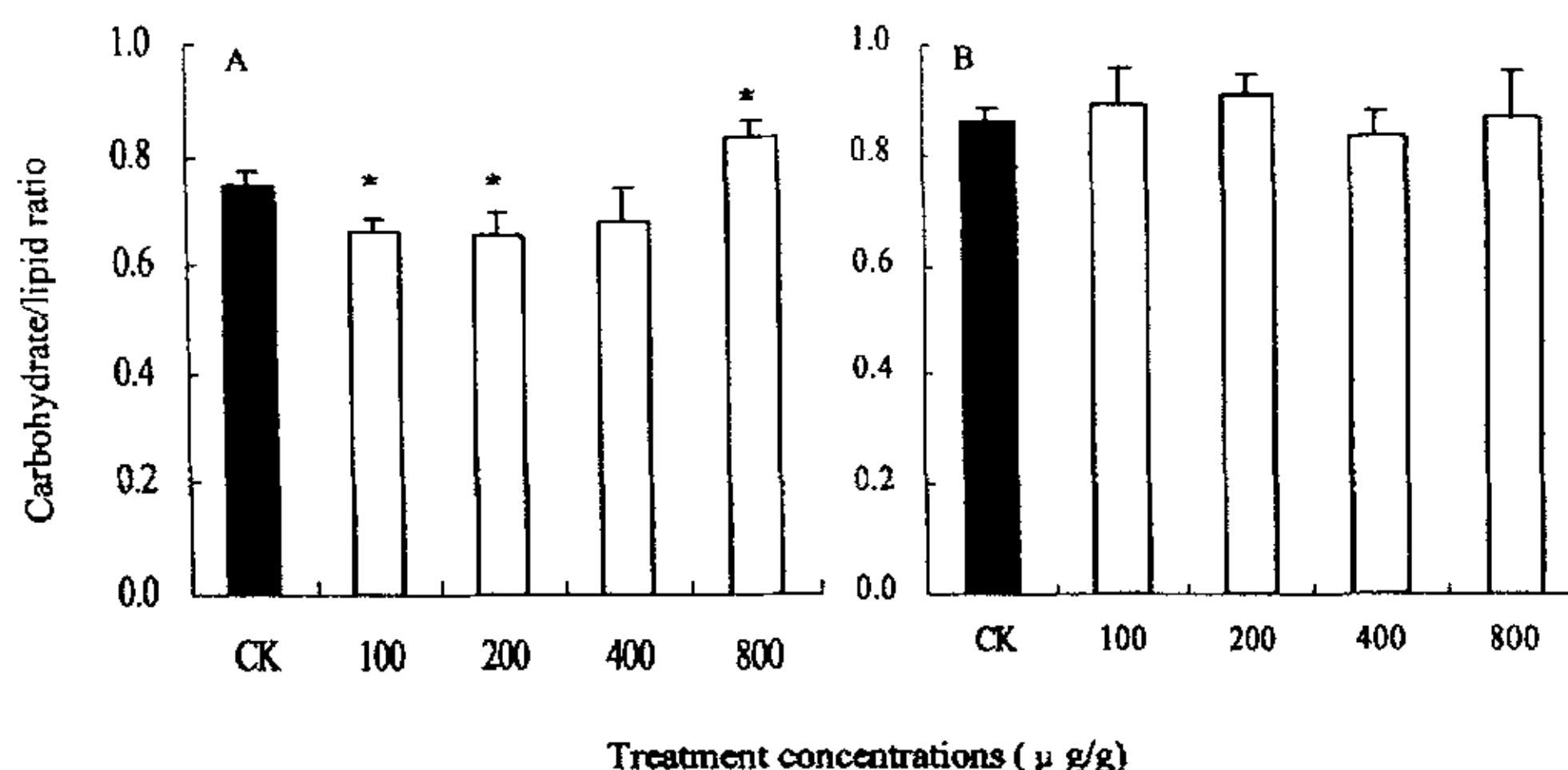


图 10-3 不同浓度 Cd^{2+} (A) 或 Cu^{2+} (B) 处理下棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与脂类的比率
Fig. 10-3 Carbohydrate/lipid ratio of larval hemolymph of *B. peregrina* at different concentrations of Cd^{2+} (A) or Cu^{2+} (B)

表 10-2 不同时间的 Cd^{2+} 处理对棕尾别麻蝇幼虫血淋巴化学组成影响
Table 10-2 Effects of time-dependent treatment of Cd^{2+} on total biochemical constituents in larval hemolymph of *B. peregrina*

Treatment time (h)	Total sugars (mg/ml)		Total proteins (mg/ml)		Total lipids (mg/ml)	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
24	2.33 ± 0.06	2.03 ± 0.27 (12.86%)	23.86 ± 1.06	5.55 ± 0.14* (76.73%)	2.68 ± 0.62	2.39 ± 0.05 (11.11%)
48	3.78 ± 0.59	2.97 ± 0.54 (21.33%)	61.69 ± 3.67	20.19 ± 1.19* (67.26%)	3.19 ± 0.30	2.25 ± 0.05* (29.67%)
72	5.11 ± 0.39	4.52 ± 0.11* (11.51%)	67.53 ± 1.29	33.57 ± 2.48* (50.29%)	5.98 ± 0.22	5.60 ± 0.22* (6.45%)
96	4.14 ± 0.44	3.41 ± 0.50 (17.15%)	83.77 ± 0.55	33.25 ± 1.47* (60.31%)	5.28 ± 0.32	3.19 ± 0.20* (39.53%)
120	3.85 ± 0.32	3.24 ± 0.16* (15.81%)	56.41 ± 2.32	49.13 ± 1.42* (12.89%)	4.32 ± 0.10	4.26 ± 0.42 (1.22%)

注: 每个值表示为平均值 ± S.D., 括号内的值表示与对照比减少的百分率。*表示与对照差异达显著水平 ($P < 0.05$)。 Note: Each value represents the mean ± standard deviation. The values in the parentheses represent percentage decrease over control value. * Significantly different from controls at $P < 0.05$.

表 10-3 不同时间的 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫血淋巴化学组成影响

Table 10-3 Effects of time-dependent treatment of Cu^{2+} on total biochemical constituents in larval hemolymph of *B. peregrina*

Treatment time (h)	Total sugars (mg/ml)		Total proteins (mg/ml)		Total lipids (mg/ml)	
	Control	Treatment	Control	Treatment	Control	Treatment
24	2.75 ± 0.31	1.84 ± 0.30* (33.35%)	27.40 ± 1.47	19.68 ± 0.18* (28.2%)	2.68 ± 0.62	1.82 ± 0.14 (32.35%)
48	4.01 ± 1.15	2.71 ± 0.13 (32.55%)	41.30 ± 2.94	38.96 ± 1.19* (5.66%)	4.34 ± 0.09	3.89 ± 0.26 (10.50%)
72	5.05 ± 0.84	3.26 ± 0.22* (35.46%)	66.56 ± 1.93	54.48 ± 0.83* (18.15%)	4.77 ± 0.10	4.19 ± 0.37 (12.12%)
96	3.12 ± 0.39	4.05 ± 0.41* (-29.88%)	72.73 ± 0.37	52.14 ± 1.56* (28.30%)	5.11 ± 0.27	5.44 ± 0.25 (-6.53%)
120	3.91 ± 0.16	5.59 ± 0.88* (-43.12)	60.52 ± 7.53	59.29 ± 3.40 (2.04%)	3.71 ± 0.31	3.98 ± 0.17 (-7.33)

注: 每个值表示为平均值 ± S.D., 括号内的值表示与对照比减少的百分率。*表示与对照差异达显著水平 ($P < 0.05$)。 Note: Each value represents the mean ± standard deviation. The values in the parentheses represent percentage decrease over control value. *Significantly different from controls at $P < 0.05$.

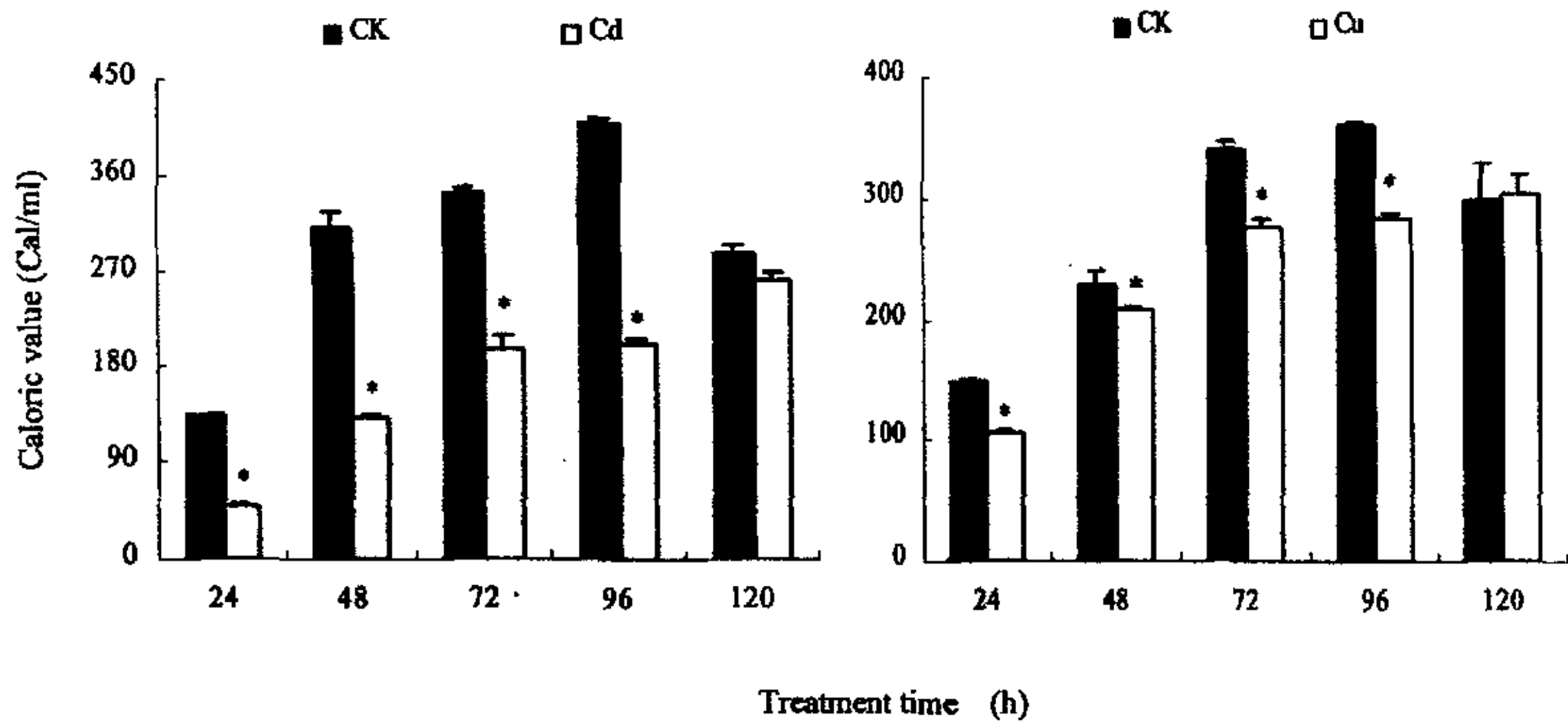


图 10-4 不同浓度 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理下棕尾别麻蝇幼虫血淋巴的热量值

Fig. 10-4 Caloric values of larval hemolymph in control and *B. peregrina* treated with 800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} or Cu^{2+} at different exposure time

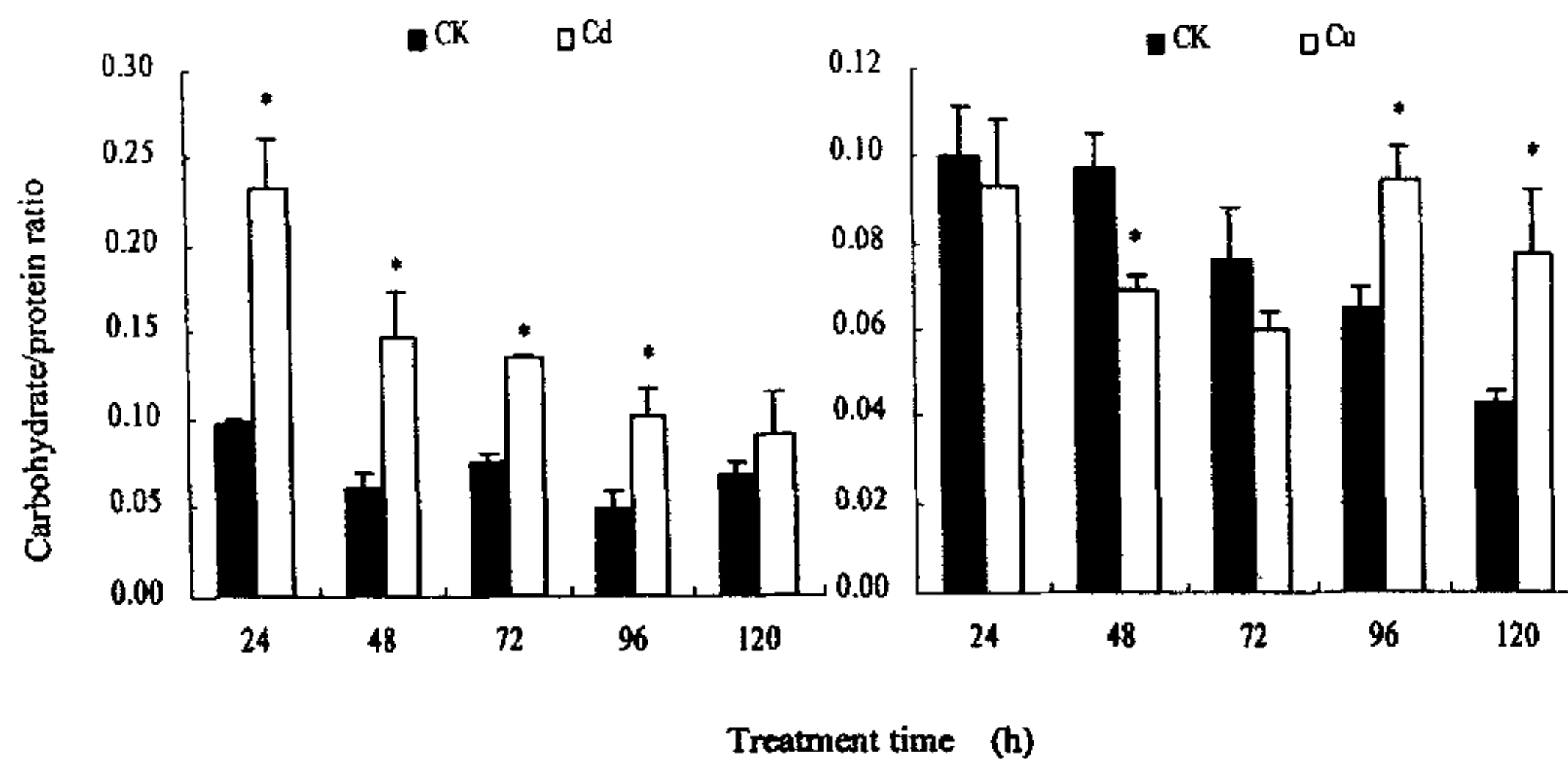


图 10-5 不同浓度 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理下棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与蛋白的比率

Fig. 10-5 Carbohydrate/protein ratio of larval hemolymph in control and *B. peregrina* treated with 800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} or Cu^{2+} at different exposure time

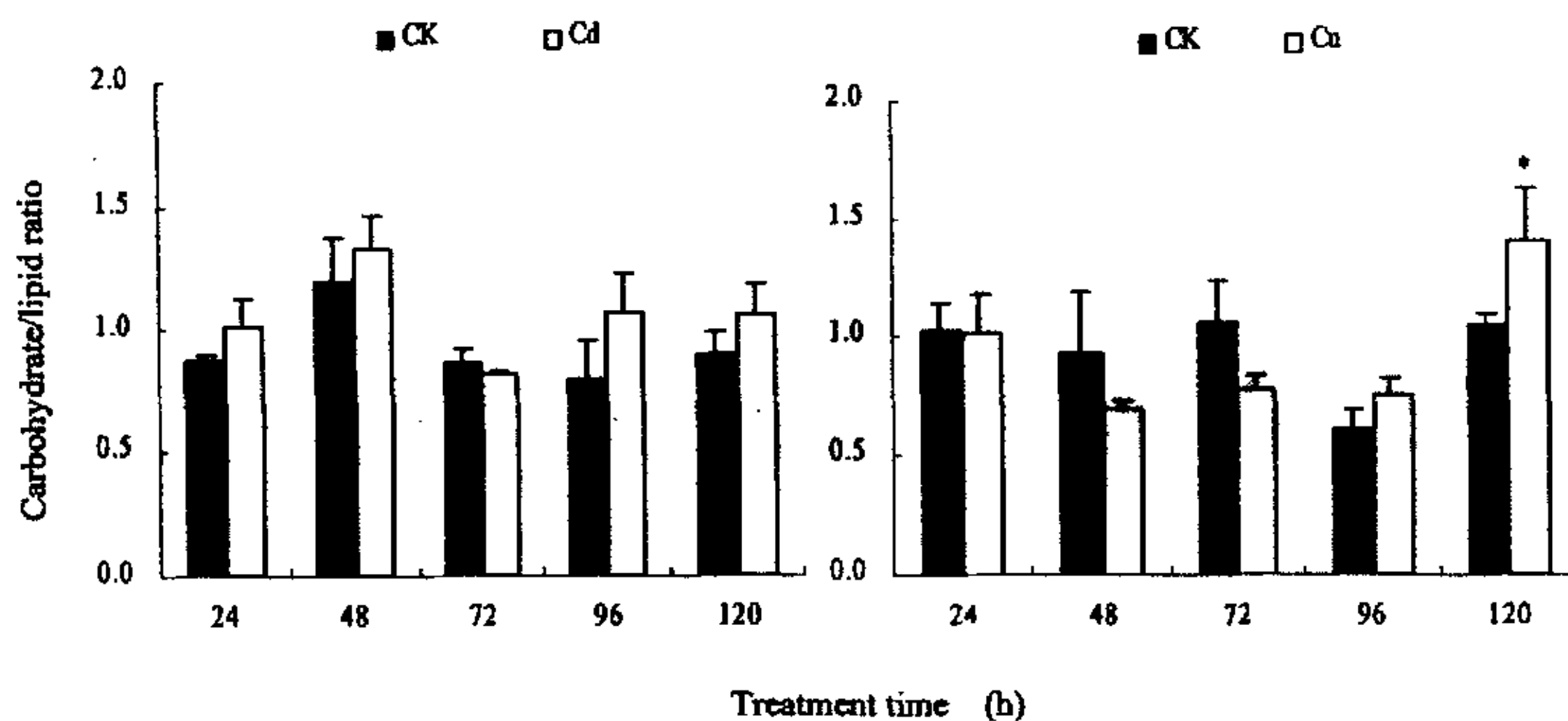


图 10-6 不同浓度 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理下棕尾别麻蝇幼虫血淋巴碳水化合物与脂类的比率

Fig. 10-6 Carbohydrate/lipid ratio of larval hemolymph in control and *B. peregrina* treated with 800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} or Cu^{2+} at different exposure time

第十一章 铜和镉对棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用的影响

重金属离子进入生物体内,诱导生物体内产生各种自由基,进而攻击多不饱和脂肪酸的烯丙基氢,引发脂质过氧化作用。这种依赖自由基反应并由脂质过氧化作用(LPO)介导的细胞功能紊乱被认为是重金属离子引发生物体病理改变的机制之一(胥宝会等,1989;张文清等,1994)。Cu作为生物必需元素,一方面可作为Cu,Zn-SOD酶的活动中心,参与清除生物体内的自由基,具有抗脂质过氧化作用,另一方面,又具有较强的诱导细胞膜的脂质过氧化作用(张文清等,1994)。在细胞水平,Cd可以通过代替金属辅因子或与必需硫醇群结合来抑制SOD和CAT等解毒活性氧的酶。这将导致 $O_2^{\cdot-}$ 增加和 $OH^{\cdot}$ 的产生,从而导致氧化胁迫和脂质过氧化,引起细胞损伤(Manca *et al.*, 1991; Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Goering *et al.*, 1995; Kawanishi, 1995; Korsloot *et al.*, 2004)。因此,调查有关Cu和Cd诱导的昆虫脂质过氧化有助于了解重金属对昆虫细胞的氧化毒性。有鉴于此,本章我们主要研究 Cu^{2+} 或 Cd^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫(*Boettcherisca peregrina*)的脂质过氧化作用及其与剂量、时间的关系。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章1.1。

1.2 饲料的配制

饲料配制方法同第九章1.2。

1.3 实验设计

1.3.1 浓度效应的试验

1日龄的棕尾别麻蝇幼虫分别喂食含以下浓度 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的食物:100、200、400、800、1600 $\mu g/g$ 。取食正常饲料的幼虫设为对照。每浓度处理设三次重复。分别取处理后48 h的幼虫放入超低温冰箱($-70^{\circ}C$)保存备用。

1.3.2 时间效应的试验

棕尾别麻蝇1日龄幼虫暴露于含800 $\mu g/g$ Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 的食物,分别在处理后24、48、72、96和120 h取幼虫放入超低温冰箱($-70^{\circ}C$)备用。取食正常饲料的幼虫设为对照。

1.4 样品液制备

取 5 头样品虫体，加入 1 ml Tris-HCl 缓冲液 (pH = 7.4)，研磨成浆，4℃ 3000 g 离心 5 min，去除组织和细胞碎片，取上清液分析过氧化产物丙二醛 (MDA) 的含量。

1.5 脂质过氧化的测定

脂质过氧化方法采用硫代巴比妥酸 (TBA) 法 (胥宝会等, 1991; 张文清等, 1994)。5 ml 稀释 10 倍的组织提取液中，加入 20% 的三氯乙酸和 2 ml 0.67% (w/v) 巴比妥酸，在沸水浴中避光加热 10 min，然后 3000 g 离心 5 min，测 OD₅₃₀。

脂质过氧化活性可表达为：(即过氧化产物丙二醛 (MDA) 的浓度) =

$$\frac{OD}{\varepsilon} \times \frac{2}{10^3} \times \frac{1}{10} \times \frac{1}{Pr} \times 10^9 \text{ (nmol/min/mg Pr)}$$

$$\varepsilon = 1.56 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}, \text{Pr: 蛋白}$$

1.6 数据分析

利用 DPS 软件 (唐启义和冯明光, 2002) 对各处理指标进行方差分析，再以 Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 Cd²⁺对棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用的影响

Cd²⁺ 浓度对幼虫体内的 MDA 浓度有显著影响 ($F = 5.544, df = 5, P = 0.0071$)，且高浓度处理组 (1600 μg/g) 体内 MDA 浓度显高于低浓度处理组及对照组 (图 11-1A)。另外，对 MDA 浓度和处理的 Cd²⁺ 浓度进行回归分析，发现二者存在正相关关系 (表 11-1)。回归方程统计检验达极显著水平 ($P < 0.01$)。这些均说明 Cd²⁺ 能引起棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用且与剂量有关。

1 龄棕尾别麻蝇幼虫连续取食含 800 μg Cd²⁺/g 人工饲料后，体内的 MDA 浓度随着暴露时间的延长而增加，并且不同时间的 MDA 浓度存在明显差异 ($F = 7.050, df = 4, P = 0.0058$) (图 11-2)。对 MDA 浓度和暴露时间进行回归分析，发现二者存在正相关关系 (表 11-2)。回归方程统计检验达极显著水平 ($P < 0.01$)。另外，在整个实验过程中 Cd²⁺ 处理组 MDA 浓度显著高于对照组 ($F = 181.457, df = 1, P = 0.0002$)。

2.2 Cu²⁺对棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用的影响

1 龄棕尾别麻蝇幼虫经不同浓度的 Cu²⁺ 处理 48 h 后, 体内 MDA 浓度随处理 Cu²⁺ 浓度的变化而变化 (图 11-1B), 结果表明 Cu²⁺ 浓度对幼虫体内的 MDA 浓度有显著影响 ($F = 7.968, df = 5, P = 0.0016$), 并且高浓度处理组 (1600 $\mu\text{g/g}$) 体内 MDA 浓度明显高于低浓度处理组及对照组。另外, 对 MDA 浓度和处理的 Cu²⁺ 浓度进行回归分析, 发现二者存在正相关关系 (表 11-1)。回归方程统计检验达极显著水平 ($P < 0.01$)。这些均说明 Cu²⁺ 能引起棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用且与剂量有关。

1 龄棕尾别麻蝇幼虫连续取食含 800 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$ 人工饲料后, 体内的 MDA 浓度随着处理时间的延长而增加, 并且不同时间的 MDA 浓度存在明显差异 ($F = 10.07, df = 4, P = 0.0016$) (图 11-2)。对 MDA 浓度和处理时间进行回归分析, 发现二者存在正相关关系 (表 11-2)。回归方程统计检验达极显著水平 ($P < 0.01$)。另外, 在整个实验过程中 Cu²⁺ 处理组 MDA 浓度显著高于对照组 ($F = 181.457, df = 1, P = 0.0002$)。

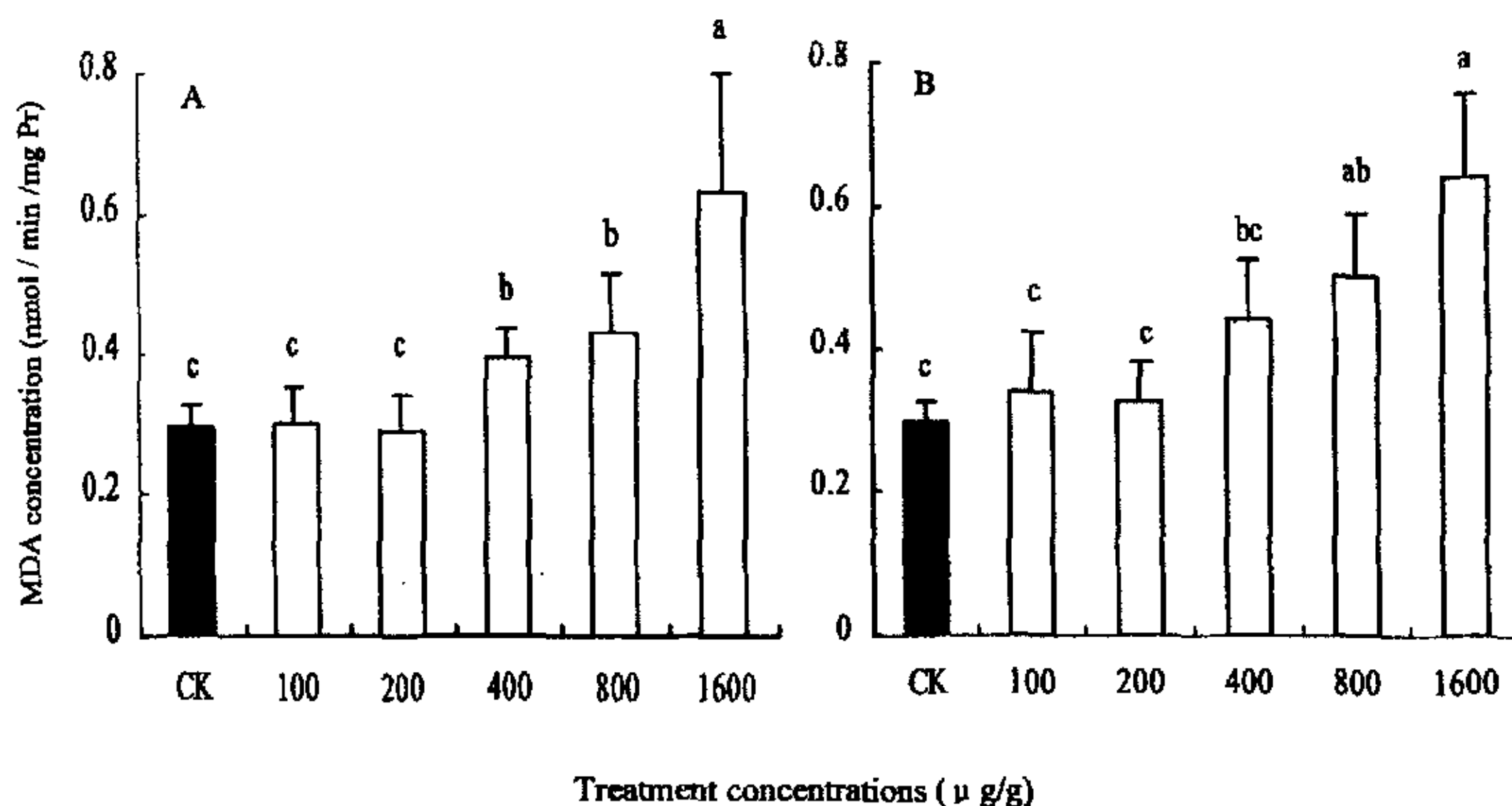


图 11-1 不同浓度 Cd²⁺ (A) 和 Cu²⁺ (B) 对棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化的诱导

Fig. 11-1 Inducement of Cd²⁺ (A) and Cu²⁺ (B) to lipid peroxidation at different concentrations

图中数据为平均数 $\pm$ 标准差, 具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$, Duncan's 新复极差多重比较). The columns represent means $\pm$ S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

表 11-1 棕尾别麻蝇幼虫 MDA 浓度与 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 浓度的回归统计结果

Table 11-1 Results of statistic analysis to the MDA concentration in *B. peregrina* larvae and the treatment concentrations of Cd^{2+} and Cu^{2+}

Heavy metal	Regression equation	R	Prominence level	F value
Cd^{2+}	$y = 0.2789 + 0.0002 x$	0.9839	0.0004	121.0818
Cu^{2+}	$y = 0.3141 + 0.0002 x$	0.9784	0.0007	89.4290

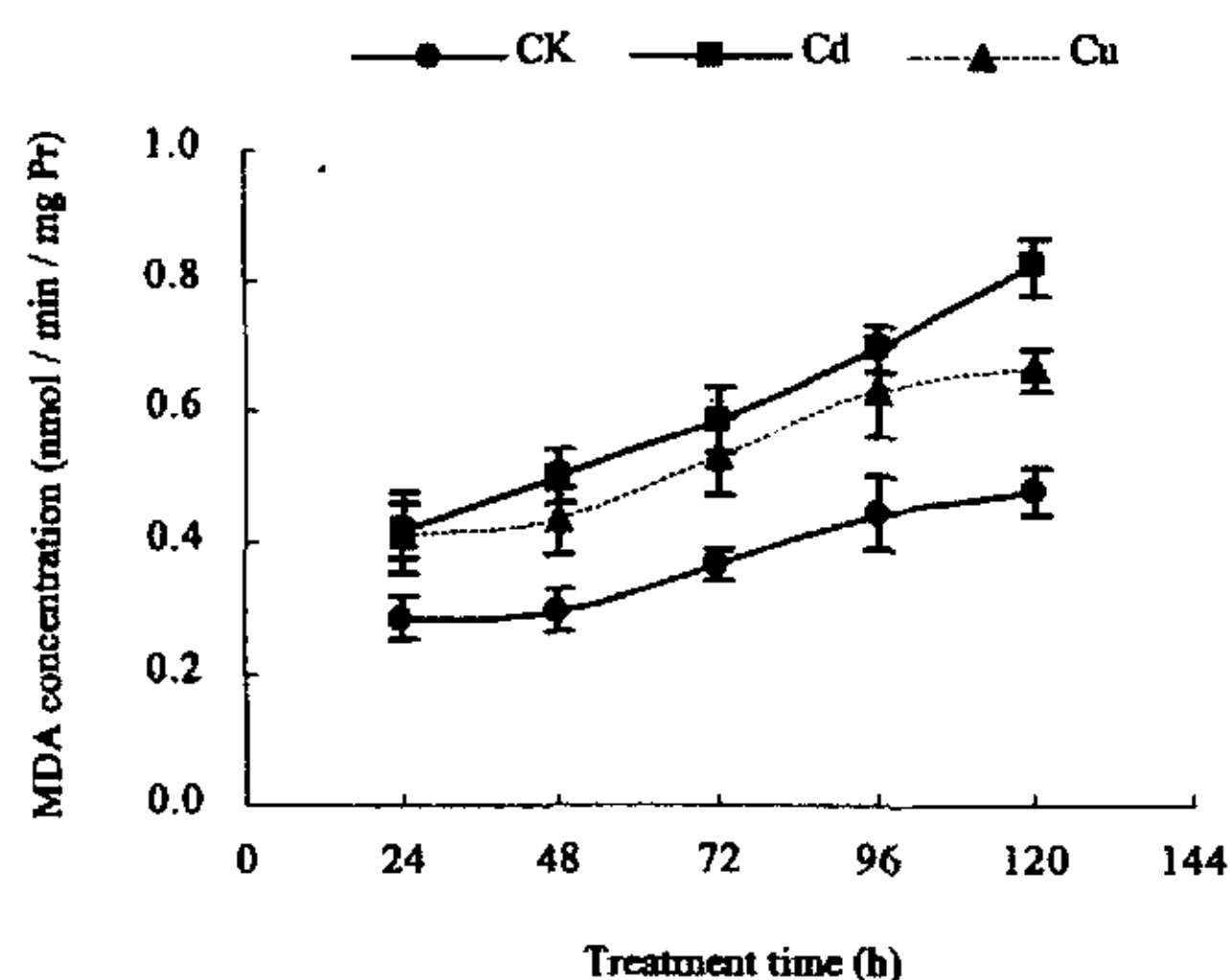


图 11-2 不同 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 处理时间对棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用的影响

Fig. 11-2 Effects of the treatment time of Cd^{2+} and Cu^{2+} on the lipid peroxidation of *B. peregrina* larvae

表 11-2 棕尾别麻蝇幼虫 MDA 浓度与时间的回归统计结果

Table 11-2 Results of statistic analysis to the MDA concentration in *B. peregrina* larvae and treatment time with Cd^{2+} and Cu^{2+}

Heavy metal	Regression equation	R	Prominence level	F value
CK	$y = 0.2133 + 0.0022 x$	0.9798	0.0034	72.0319
Cd^{2+}	$y = 0.3041 + 0.0042 x$	0.9950	0.0004	297.5410
Cu^{2+}	$y = 0.3251 + 0.0029 x$	0.9785	0.0038	67.3799

3 讨论

所谓脂质过氧化 (Lipid peroxidation, LPO)是指活性氧、自由基攻击生物膜中多聚不饱和脂肪酸而引起的一系列氧化过程, 此过程可产生一系列脂质过氧化物, 而丙二醛 (MDA)

是自由基引发的脂质过氧化作用的最终分解产物，其含量可间接反映机体的脂质过氧化水平。我们的结果显示 Cd^{2+} 诱导棕尾别麻蝇幼虫细胞内 MDA 浓度增加，从而证明 Cd^{2+} 催化脂质过氧化反应(图11-1)。这与前人的报道一致 (Manca *et al.*, 1991; Shen and Sangiah, 1995; Sarkar *et al.*, 1997)。同时， Cd^{2+} 能引起棕尾别麻蝇幼虫脂质过氧化作用，且与剂量有关。这与有关的研究一致 (Stacey *et al.*, 1980; 胥宝会等, 1989)。高浓度的 Cd^{2+} 诱导脂质过氧化，并导致严重的病理变化 (Bagchi *et al.*, 2000)。然而，脂质过氧化物的上升是否是镉的直接影响效应，通过镉诱导是否能置换氧化还原金属离子或使谷胱甘肽含量下降，还有待进一步的研究。

我们的结果还证明过量的 Cu^{2+} 可以诱导脂质过氧化。这与以往的报道是一致的。 Cu^{2+} 在活性氧的形成和膜的脂质过氧化中扮演着催化剂的角色 (Chan *et al.*, 1982)。已经证明 Cu^{2+} 在许多系统中促进脂质过氧化，其机制是通过 GSH 还原 Cu^{2+} 从铁诱导脂质过氧化的抑制剂变成了催化剂， Cu^{+} 通过还原 Fe^{3+} 来加强脂质过氧化反应 (Beckman *et al.*, 1988)。另外，铜诱导活性氧产生的结果也是增加脂质过氧化反应，当肝匀浆液或肝细胞与铜离子反应时戊烷、丙二醛及硫代巴比妥酸反应物质 (TBARS) 的生成量增加可以证实。并且老鼠摄取的铜过量将导致体内线粒体膜脂质过氧化，共轭二烯烃和 TBARS 浓度增高 (Sokol *et al.*, 1990)。这将导致肝内部线粒体膜膨胀和其它肝损伤的生化和组织症状。铜催化脂质过氧化也是铜过量时老鼠肝细胞溶酶体变化的基础 (Myers *et al.*, 1993)。这些老鼠肝细胞溶酶体的膜脆度增加，流动性减少，膜中的 TBARS 浓度加倍。脂肪酸膜含量也有变化，并常伴随着未饱和脂肪酸的增加。这些让我们想到 Cu^{2+} 导致棕尾别麻蝇幼虫中肠和马氏管的损伤的原因可能也是因为 Cu^{2+} 诱导脂质过氧化反应。

有关重金属离子诱导的脂质过氧化作用是否存在剂量效应和时间效应，曾有许多相互矛盾的报道。刘瑞明和刘毓谷 (1990) 在利用大鼠游离肝细胞培养法研究 Cd^{2+} 对肝细胞的脂质过氧化作用时，发现肝细胞脂质过氧化作用的强度与 Cd^{2+} 的浓度无关，甚至在高浓度下的 Cd^{2+} 具有抑制肝细胞脂质过氧化的作用。张文清等 (1994) 在研究 Cu 对大鼠肝细胞的脂质过氧化作用的影响时，发现 Cu^{2+} 在 Vc/Fe^{2+} 和 $\text{ADP}/\text{Fe}^{2+}$ 激发的两种 LPO 模型中表现出强的抑制作用，且在有机激发剂过氧化氢异丙苯 (CHP) 介导的脂质过氧化中有刺激作用。Sokol 等 (1989) 的研究中，发现 Cu^{2+} 与离体细胞 (肝细胞、红细胞) 孵育后，可导致这些细胞 LPO 介导的损伤。在研究中，因所用的离体模型不同，即使同一元素，得出的结论也有不一致的现象。然而，胥宝会等 (1989) 研究染 Cd 大鼠及镉污染区居民的脂质过氧化作用时，得出 Cd 可诱发大鼠的脂质过氧化作用，而且与剂量相关，Cd 污染区居民血清脂质

过氧化物浓度明显地高于非污染区，而且其血清脂质过氧化物浓度与血中的 Cd 及居民在该污染区的居住年限之间存在着正相关关系。我们的研究表明 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇幼虫的脂质过氧化作用存在着浓度效应和时间效应，在这一点上与以往离体实验模型中得出的结论不一样。我们的实验是活体实验结果。从而更能反映实际情况。所以利用本研究得到的结果，即脂质过氧化产物 MDA 浓度的变化可指示环境中重金属离子的污染。

第十二章 棕尾别麻蝇金属硫蛋白的分离纯化及性质分析

金属硫蛋白 (Metallothionein, MT) 是一类低分子量的富含半胱氨酸且可被重金属、激素和各种细胞因子诱导的金属结合蛋白。其功能包括微量元素储存、运输、代谢, 重金属解毒, 拮抗电离辐射, 清除羟基自由基等。自 Margoshes 和 Vallee (1957) 首次从马肾脏中分离出镉金属硫蛋白 (Cd-MT) 以来, 有关微生物、植物和动物 MT 的性质与功能等已得到了广泛的、不同程度的研究。相对而言, 有关昆虫 MT 的研究则较薄弱。虽然, 不少学者已证明 MT 或金属结合蛋白存在于多种昆虫中, 如摇蚊 *Chironomus yoshimatsui* (Yamamura *et al.*, 1983)、石蝇 *Eusthenia spectabilis* (Everard and Swain, 1983)、棕尾别麻蝇 *Boettcherisca* (*Sarcophaga*) *peregrina* (Aoki *et al.*, 1984)、德国小蠊 *Blatella germanica* (Bouquegneau *et al.*, 1985)、黑腹果蝇 *Drosophila melanogaster* (Lastowski-Perry *et al.*, 1985; Mokdad *et al.*, 1987)、蜉蝣 *Baetis thermicus* (Suzuki *et al.*, 1989)、家蝇 *Musca domestica* (Kasai *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 2000)、弹尾虫 *Orchesella cincta* (Hensbergen *et al.*, 1999), 以及桑蚕 *Bombyx mori* (何秀萍等, 2000)。但是, 对它们性质与功能的认识还是相当有限的。迄今, 除明确了黑腹果蝇 (Lastowski-Perry *et al.*, 1985; Mokdad *et al.*, 1987) 和弹尾虫 (Hensbergen *et al.*, 1999) MT 的一级结构外, 对其它则无任何研究。究其原因可能与研究过程中未分离纯化得到 MT 有关。为此, 本章特对棕尾别麻蝇 (*Boettcherisca peregrine*) MT 的分离纯化与生化特性作较系统的研究, 为今后深入分析其结构与功能关系等奠定良好基础。

1 材料和方法

1.1 仪器与设备

蛋白层析系统 (BioLogic DuoFlow chromatography systems, BIO-RAD公司), Sephadex G-50 (Amersham), UNO Q1 (BIO-RAD公司), Bio-gel P-6 (BIO-RAD公司), 蛋白扫描仪 (GS-800, BIO-RAD公司), 紫外分光光度计 (UV-2550, 日本岛津公司), 超速离心机 (Ultra 80, Kendro), 冷冻干燥机 (Alpha 1-2, Christ), 原子吸收分光光度计 (AA100, Perkin Elmer), 高效液相色谱 (Agilent 1100, 安捷伦公司), 色谱柱 (Zorbax Eclipse AAA, 安捷伦公司) GS-800凝胶成像系统 (Bio-rad) calibrated densitometer

1.2 供试虫源

棕尾别麻蝇来源及饲养方法同第四章1.1。

1.3 MT 适宜诱导条件的确定

1.3.1 诱导条件

以含有 0、50、100、200、400、800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 的饲料分别饲喂 2 日龄幼虫。于处理后 24、48、72、96 和 120 h，自各处理随机取 10 头幼虫，排空 24 h 后用蒸馏水洗净，贮存于 $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ 的超低温冰箱中，供幼虫体内 MT 含量测定。试验重复 3 次。

1.3.2 MT 的粗提

参照任育红等 (2002)，将收集各幼虫样品分别置于 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (含有 0.25 M 蔗糖, 100 mM 2-巯基乙醇, pH 8.6) 中匀浆, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 10,000 g 离心 10 min, 收集上清。上清经沸水浴加热 2~3 min, 再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下, 10,000 g 离心 20 min, 收集上清液。加入 3 倍体积 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预冷的无水乙醇于上清液中, 置 $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 过夜、沉淀。尔后, 于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 12,000 g 离心 20 min。取沉淀, 加 5 ml 的 0.01 M Tris-HCl 缓冲液混匀、溶解, 再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 15,000 g 离心 20 min, 收集上清, 即得 MT 粗提液。

1.3.3 MT 含量的测定

参照 Eaton 和 Toal (1982) 及 Klein 等 (1990) 的镉血红蛋白 (Cd-Hb) 饱和法。在 100 μl MT 粗提液中分别加入 10 mM Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.6) 600 μl 和 20 $\mu\text{g/ml}$ CdCl_2 溶液 100 μl , 混匀。然后, 加入 2% 牛血红蛋白 100 μl 混匀, 静置 10 min。接着置沸水浴中加热 2~3 min, 再于 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下 12,000 g 离心 10 min, 收集上清。再加入 2% 牛血清蛋白 100 μl 混匀, 静置 10 min, 沸水浴中加热 2~3 min, 12000 g 离心 10 min, 得上清。最后, 用原子吸收分光光度计 (AA100, Perkin Elmer) 测定上清液中 Cd^{2+} 含量。因 MT 螯合有 Cd^{2+} , 这样 MT 含量越高, 其螯合的 Cd^{2+} 含量也越高, 故以 Cd^{2+} 含量表示 MT 的相对含量。

综合分析对比各 Cd^{2+} 处理浓度与处理时间中虫体内 MT 含量, 确定诱导 MT 产生的适宜条件。

1.4 MT 的分离纯化

根据方法 1.3 的研究结果, 将适宜条件下诱导处理后洗净的幼虫先移入置于冰浴中的玻璃匀浆器中, 加 2 倍体积的 10 mM Tris-HCl 的缓冲液 A (含 0.25 mM PMSF, 100 mM 2-巯基

乙醇, pH 8.6), 匀浆。然后, 匀浆液于 4℃ 下以 25,000 g 离心 20 min。取上清液, 置 80 ℃ 恒温水浴处理 3 min 以除去热不稳定蛋白, 用冰水冷却, 再于 4℃ 下以 25,000 g 离心 10 min, 取 5 ml 上清液上柱分离, 剩下的分装, 贮存于-70 ℃ 冰箱中。

分离纯化以 Biologic DuoFlow™ 蛋白层析系统 (Bio-rad 公司) 进行, 具体步骤如下: 首先, 将上清液上样于预先以缓冲液 A 平衡的 Sephadex G-50 凝胶柱 (2.5 × 100 cm), 用同样的缓冲液洗脱, 流速 0.4 ml/min, 4 ml/管收集流出液。分别以波长 254 nm 和 280 nm 检测每收集管的紫外吸收值, 同时, 以原子吸收分光光度计测定每管 Cd^{2+} 浓度。其次, 收集 $A_{254} > A_{280}$ 和 Cd^{2+} 浓度均高的分离组分, 再上样于预先经缓冲液 A 平衡的 UNO™ Q1 阴离子交换层析柱 (7 × 35 mm, Bio-rad 公司), 进行离子交换层析, 样品上完后先用 4 倍体积的缓冲液 A 进行预洗, 然后改用含 0 ~ 1 M NaCl 的缓冲液 A 进行线性梯度洗脱, 流速 1 ml/min, 0.5 ml/管进行收集。再次, 收集所要的洗脱峰 ($A_{254} > A_{280}$ 和 Cd 含量均高的组分), 将其冷冻浓缩至约 1 ml, 再上样于预先经 10 mM NH_4HCO_3 平衡的 Bio-Gel P-6 分离柱 (1 × 30 cm, Bio-rad 公司) 进行脱盐。最后, 对所得 MT 组分进行冷冻干燥。

1.5 MT 的性质分析与鉴定

1.5.1 分子量测定

按 King (1971) 的方法以 SDS-PAGE 不连续体系 (15%分离胶, 4%浓缩胶) 进行电泳, 然后用考马斯亮蓝 R_{250} 染色, 脱色液 (甲醇: 冰醋酸: 水 = 1 : 1 : 8) 脱色。尔后, 以 GS-800 凝胶成像系统 (Bio-rad) 进行电泳图像扫描, 并用 Quantity one 蛋白分析软件分析 MT 的分子量。

1.5.2 整合 Cd 原子数的测定

取一定量 MT 纯化样品溶于少量 0.01 M Tris-HCl 溶液, 然后用原子吸收分光光度计测定溶液中 Cd^{2+} 浓度。用 Bradford (1976) 法测定溶液蛋白浓度, 并根据 SDS-PAGE 电泳法测得的 MT 分子量计算出每分子 MT 结合 Cd 的摩尔数。

1.5.3 巯基含量测定

用 Ellman's 方法测定巯基含量 (Riddles *et al.*, 1979)。取一定量 MT 样品, 配成 50 μl 溶液, 加入 10 μl 的 1.2 M HCl 和 200 μl 的 0.1 M EDTA, 反应 10 min 脱去金属。加入 200 μl Ellman's 试剂 (含 5 mM DTNB, 1 mM EDTA, 6 M 盐酸胍, 0.1 M PBS, pH 7.2), 混匀 3 min 使 MT 变性后与 DTNB 形成黄色络合物, 用 0.1 M PBS, pH 7.2 稀释, 用紫外分光

光度计 (UV-2550, 日本岛津公司) 在 412 nm 处测紫外吸收值。用 $C = DA/\epsilon$ 计算巯基浓度 (M), 式中 D 为稀释倍数, A 为吸收值, $\epsilon = 1.42 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。再根据巯基浓度和 MT 的摩尔浓度计算每分子棕尾别麻蝇 MT 含巯基的量。

1.5.4 氨基酸组成分析

将纯品溶于 6.0 M HCl 中, 真空条件下 110 °C 水解 24 h, 用高效液相色谱 (Agilent 1100, 安捷伦公司) 分析水解产物中氨基酸组成, 并计算氨基酸相对百分含量。其中色谱柱为 Zorbax Eclipse AAA (安捷伦公司), 激发光波长和测定光波长各为 340 nm 和 450 nm。

1.5.5 紫外吸收特征光谱测定

取一定量 MT 样品溶于 0.01 M Tris-HCl 溶液, 将待测样品适当稀释, 分装两管。其中一管直接以紫外分光光度计 (UV-2550, 日本岛津公司) 进行 190 nm~300 nm 的紫外扫描。另一管加入 HCl 使其终浓度为 0.05 M, 通过酸化作用制备脱辅基蛋白 (Byrd *et al.*, 1988), 然后在同样的波长区内进行紫外扫描。分析 MT 脱辅基前后的紫外吸收特征光谱。

2 结果

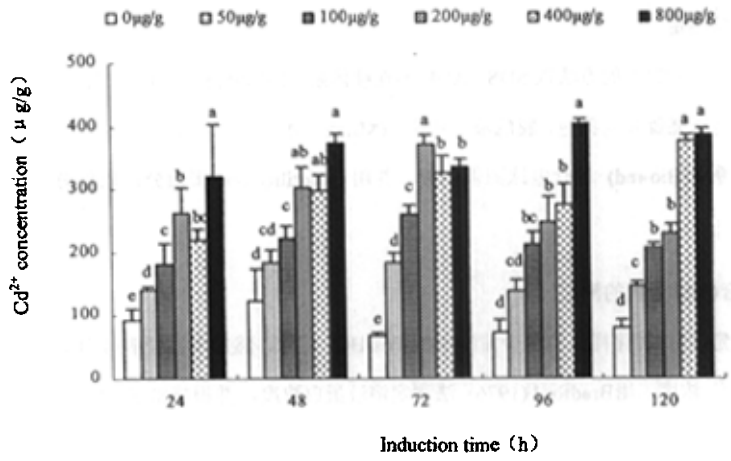


图 12-1 不同浓度 Cd^{2+} 诱导棕尾别麻蝇幼虫不同时间后其体内的 MT 的相对含量
Fig. 12-1 The relative content of metallothionein in *Boettcherisca peregrine* larvae after exposure to cadmium with different concentrations for different times

图中数据为平均数±标准差, 同一诱导时间具不同小写字母的数值间差异达显著水平 ($P < 0.05$, Duncan's 新复极差多重比较). The columns represent means ± S.D. ($n = 3$). The columns with different lowercase letters for the same exposure time are significantly different ($P < 0.05$, Duncan's multiple range tests).

2.1 MT 适宜诱导条件的确定

结果如图 12-1。 Cd^{2+} 浓度对其诱导棕尾别麻蝇幼虫体内所产生 MT 的相对含量(以 Cd^{2+} 含量表示)有着极显著的影响 ($F=59.48$, $df=5$, $P<0.01$), Cd^{2+} 浓度越高, 诱导产生 MT 的相对含量越高。但是, 诱导时间对 Cd^{2+} 诱导产生 MT 的相对含量则无显著影响 ($F=1.47$, $df=4$, $P>0.05$)。综合分析各处理所诱导产生 MT 的含量, 并结合考虑较短的幼虫饲养时间以提高时效, 认为 MT 适宜诱导条件是: Cd^{2+} 浓度为 $800 \mu\text{g/g}$, 诱导处理时间为 48 h。

2.2 MT 的分离与纯化

Cd^{2+} 诱导处理的棕尾别麻蝇幼虫匀浆上清液经凝胶过滤 Sephadex G-50 柱层析分离后的层析图谱如图 12-2 所示。从紫外吸收检测及 Cd^{2+} 浓度检测结果综合分析可知, 第二个峰含 MT 组分, 其中可能还包含了一些分子量和性质与 MT 相似的杂蛋白, 有待进行下一步的分离。经 UNO™ Q1 阴离子交换柱分离(图 12-3), 可得 2 个蛋白亚峰, 分别命名为 MT-I 和 MT-II。这两个亚峰的 Cd^{2+} 浓度测定结果表明, MT-I 和 MT-II 富含 Cd^{2+} , 且 254 nm 处吸收值明显高于 280 nm 处的吸收值。分别收集 MT-I 峰和 MT-II 峰, 将其冷冻浓缩, 然后上样于 Bio-Gel P-6 柱脱盐, 结果表明 MT-I 和 MT-II 已不含杂蛋白(图 12-4)。用此法, 可自 50 g 幼虫中纯化得到 6 mg 左右的 Cd-MT。

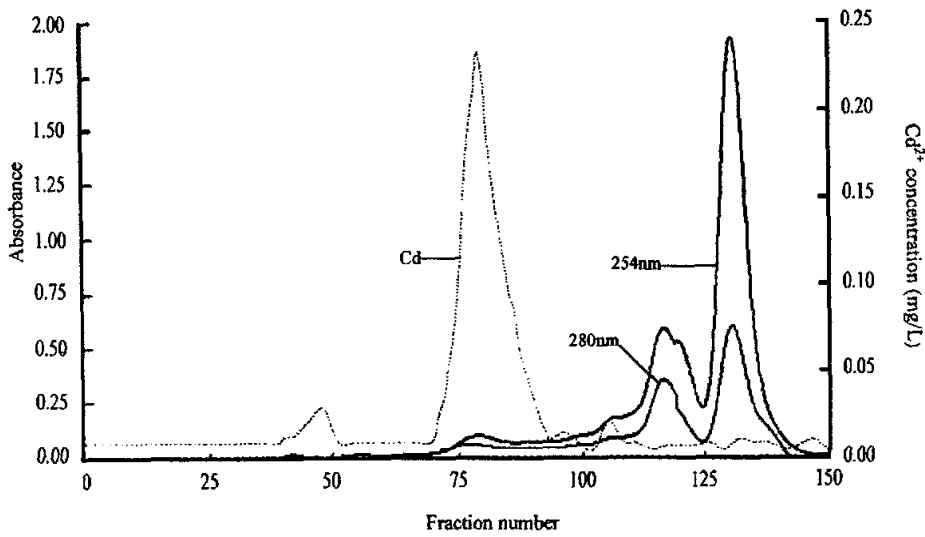


图 12-2 经 Cd^{2+} 诱导处理的棕尾别麻蝇幼虫匀浆上清液的 Sephadex G-50 柱层析图

Fig. 12-2 Gel filtration profile of homogenate supernatant of *B. peregrina* larvae after exposure to cadmium on a Sephadex G-50 column

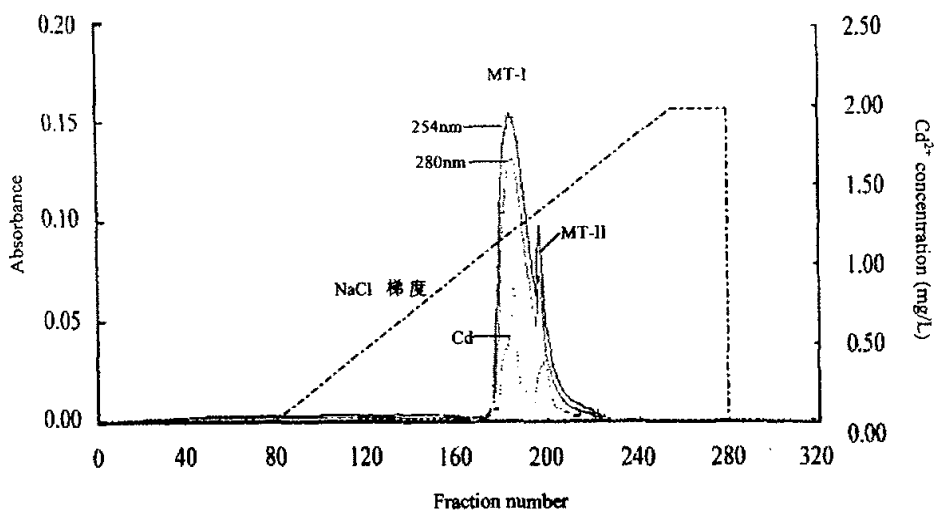


图 12-3 Sephadex G-50 凝胶过滤分离产物经 UNO™ Q1 离子交换柱的层析图

Fig. 12-3 Ion-exchange chromatography of fractions from Sephadex G-50 gel filtration on a UNO™ Q1 column

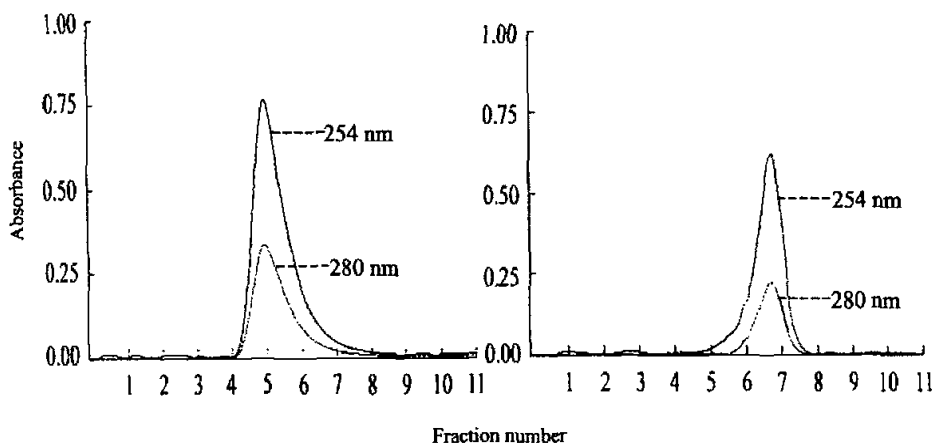


图 12-4 UNO™ Q1 离子交换分离得 MT-I 和 MT-II 的 Bio-Gel P-6 脱盐流洗图

Fig. 12-4 Elution profile of desalinization of MT-I and MT-II from UNO™ Q1 ion-exchange on a Bio-Gel P-6 column

2.3 MT 的性质分析与鉴定

2.3.1 分子量

SDS-PAGE 电泳结果显示, 棕尾别麻蝇幼虫的 2 个 MT 亚型的分子量相同, 均为 9 kDa (图 12-5)。

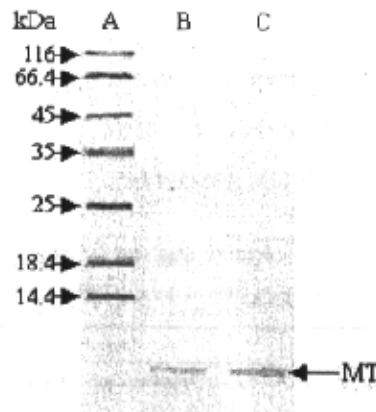


图 12-5 棕尾别麻蝇 MTs 分子量的 SDS-PAGE 分析

Fig. 12-5 Molecular weight determination of the metallothioneins (MTs) from *B. peregrine* by SDS-PAGE

A: 标准分子量 Molecular marker; B: MT-I; C: MT-II

2.3.2 整合Cd原子数

MT-I 溶液中蛋白浓度为 $76.8 \mu\text{g/ml}$, Cd^{2+} 浓度为 $6.9 \mu\text{g/ml}$, 再根据 MT-I 分子量 9 kDa 计算得出每分子 MT-I 约结合 7.2 个镉原子。MT-II 溶液中蛋白浓度为 $66.2 \mu\text{g/ml}$, Cd 的浓度为 $5.7 \mu\text{g/ml}$, 再根据测得的 MT-II 分子量 9 kDa 计算得出每分子 MT-II 约结合 6.9 个镉原子。可见, 2 个 MT 亚型的每个分子中约含有 7 个 Cd 原子。

2.3.3 巯基含量

蛋白浓度为 $0.04 \mu\text{M}$ 的 MT-I 经脱金属加入巯基试剂反应后, 根据其 412 nm 处紫外光吸收值计算得巯基浓度为 $0.81 \mu\text{M}$, 从而得出每分子 MT-I 中约含 20 个巯基。同样, 蛋白浓度为 $0.03 \mu\text{M}$ 的 MT-II 经脱金属加入巯基试剂反应后, 根据其 412 nm 处紫外光吸收值计算得巯基含量为 $0.59 \mu\text{M}$, 得出每分子 MT-II 约含 20 个巯基。可见, MT 的 2 个亚型均为典型的巯基蛋白质, 且均约含 20 个巯基。

2.3.4 氨基酸组成分析

MT-I 大约由 83 个氨基酸组成, 其中半胱氨酸含量最高, 占 36.6%; 其次为甘氨酸, 占 24.0%; 芳香族和杂环族氨基酸含量最少。MT-II 大约由 80 个氨基酸组成, 其中半胱氨酸含量最高, 占 31.8%, 其次为甘氨酸, 占 19.8%; 芳香族和杂环族氨基酸含量最少; MT-I 和 MT-II 的氨基酸组成种类相同, 但具体到某种氨基酸在含量上则略有差异 (表 12-1)。

2.3.5 紫外吸收特征光谱测定

190 nm ~ 300 nm 紫外扫描的结果表明, MTs 两个亚型在 A₂₅₄ 附近均有明显的紫外吸收肩, 即为二价 Cd-SH 的典型吸收特征; 因芳香族氨基酸微量, 在 A₂₈₀ 附近没有明显的紫外吸收肩 (图 12-6)。而脱辅基 MT (Apo-MT) 由于二价 Cd-SH 键断裂导致 A₂₅₄ 附近紫外吸收肩消失, 这一特性与镉硫金属簇的紫外吸收特性相符。

表 12-1 棕尾别麻蝇 MTs 的氨基酸组成
Table 12-1 Amino acid composition of the metallothioneins (MTs) from *B. peregrine*

Amino acid		MT-I		MT-II	
		Relative	Probable	Relative	Probable
		quantity	No.of	quantity	No.of
		(%)	residues	(%)	residues
Aliphatic amino acids	Cys	36.6	27.1 (27)	31.8	23.7 (24)
	Ser	2.5	2.1 (2)	2.8	2.4 (2)
	Thr	1.9	1.4 (1)	2.3	1.7 (2)
	Met	0	0 (0)	0	0 (0)
	Gly	24.0	28.8 (29)	19.8	23.7 (24)
	Ala	2.2	2.2 (2)	3.0	3 (3)
	Val	1.7	1.3 (1)	2.6	2 (2)
	Leu	2.3	1.6 (2)	3.1	2.1 (2)
	Ile	1.2	0.9 (1)	1.5	1 (1)
	Asp	4.3	2.9 (3)	6.2	4.2 (4)
	Glu	4.3	2.6 (3)	6.4	3.9 (4)
	Lys	2.8	1.7 (2)	4.1	2.5 (3)
	Arg	11.0	5.7 (6)	9.0	4.7 (5)
Aromatic amino acids	Phe	1.4	0.8 (1)	2.0	1.1 (1)
	Tyr	1.4	0.7 (1)	1.7	0.8 (1)
	Trp	0	0 (0)	0	0 (0)
Heterocyclic amino acids	His	1.0	0.6 (1)	2.0	1.2 (1)
	Pro	1.4	1.1 (1)	1.8	1.4 (1)
Total		100	81.5 (83)	100	79.6 (80)

注: 括号内数据为氨基酸残基数的邻近整数。Note: the data in the brackets means the nearest integer of probable number of amino acid residues.

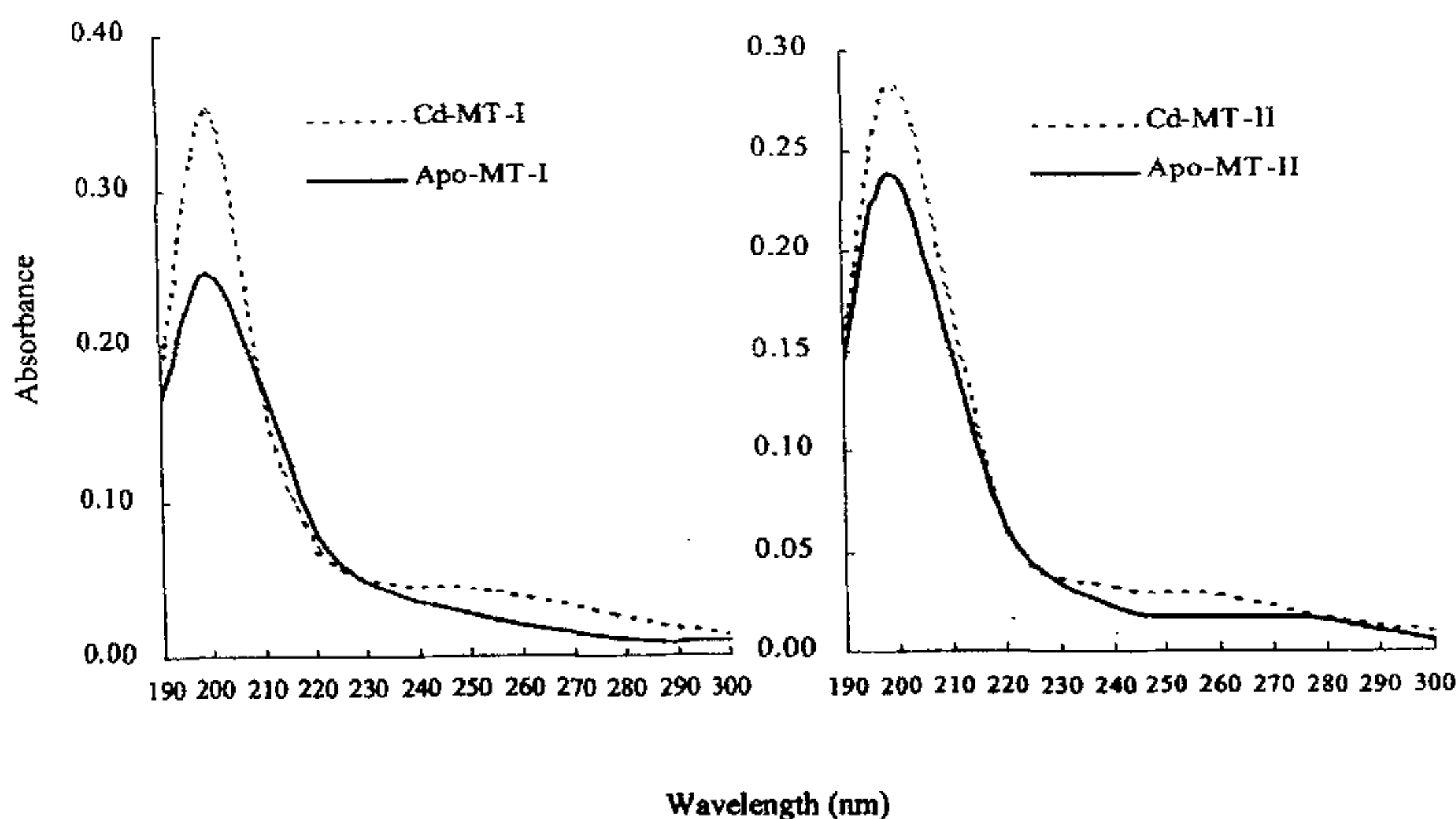


图 12-6 棕尾别麻蝇 MTs 的紫外吸收光谱

Fig. 12-6 Ultraviolet absorption spectra of the metallothioneins (MTs) from *B. peregrine*

3 讨论

MT 是一类低分子量 (6kDa~12kDa), 高金属含量 (每分子含 7~12 个金属原子), 富含半胱氨酸 (约占总的 30%) 的具很强热稳定性的蛋白。它因缺乏或少含芳香族氨基酸和组氨酸而没有一般蛋白的 280 nm 特征吸收或仅呈现该波长的弱吸收, 其特征吸收则依赖其巯基与所结合的金属而异, 如与 Cd^{2+} 结合则具 254 nm 特征吸收 (Kagi, 1991; Kojima, 1991)。本文就是根据 MT 这一基本特性, 通过对经 Cd^{2+} 诱导处理的棕尾别麻蝇幼虫匀浆上清液的热变性、Sephadex G-50 分子筛过柱、UNO™Q1 阴离子交换等步骤, 并结合对分离组分的 Cd^{2+} 含量和 254 nm 特征吸收峰的检测而获得了具 254 nm 特征吸收的高 Cd^{2+} 含量的 2 个组分。由此, 可初步断定它们就是棕尾别麻蝇的 MT。对这 2 个分离纯化组分的分子量、螯合金属原子数、氨基酸组成及紫外吸收谱特征等性质的分析表明, 分子量为 9 kDa, 属于低分子量蛋白, 半胱氨酸含量为 30% 左右, 螯合有 7 个 Cd 原子, 具有二价 Cd 与硫酯键结合而产生 254 nm 特征吸收, 即进一步证实了它们具有 MT 的一般特性。因此, 本文分离纯化的 2 个组分确实就是棕尾别麻蝇 MT 的 2 个亚型, 即 MT-I 和 MT-II。至于这 2 个亚型的区分可能与其所带核电荷数的差异有关。

就棕尾别麻蝇 MT-I 和 MT-II 的半胱氨酸含量而言, 两者均为 30% 左右, 这与典型的哺乳动物 (Kagi, 1991)、黑腹果蝇 (Mokdad *et al.*, 1987)、家蝇 (Kasai *et al.*, 1993), 及弹尾

虫 (Hensbergen *et al.*, 1999) 的 MT 相似。就两者的芳香族氨基酸和组氨酸含量而言, 为 1.0%~2.0%, 这明显不同于不含这类氨基酸的典型的哺乳动物、黑腹果蝇及弹尾虫的 MT, 而与家蝇 MT (Kasai *et al.*, 1993; Niu *et al.*, 2000) 相似。就棕尾别麻蝇 MT-I 和 MT-II 的分子量, 两者均为 9 kDa, 与哺乳动物的 6~7 kDa (Kagi, 1991)、黑腹果蝇 4555 Da 的 Mtn 和 5281 kDa 的 Mto (Mokdad *et al.*, 1987)、家蝇的 5225 Da (Kasai *et al.*, 1993) 或 9045.9 Da / 11560.2 Da (Niu *et al.*, 2000), 及弹尾虫的 7128 Da (Hensbergen *et al.*, 1999) 相比, 虽都系小分子蛋白, 但具体到分子量大小还是有明显的差异的。不论氨基酸组成, 还是分子量大小的比较可见, 不同生物体 MT 的性质是不完全相同的, 显示有一定多样性, 这也在一定程度上反映了不同生物体具有相应特定的 MT, 以满足其对重金属适宜或实现某种特定功能的需要。具体究竟如何, 则有待在系统研究各类生物体 MT 结构与功能间关系的基础上方能定论。

此外, 需要指出的是有关哺乳动物 (Kagi, 1991)、黑腹果蝇 (Lastowski-Perry *et al.*, 1985)、及弹尾虫 (Hensbergen *et al.*, 1999) 的 MT 一级结构分析显示, Cys-X-Cys 系 MT 典型序列。就棕尾别麻蝇 MT 究竟如何, 尚待研究确证。

第十三章 棕尾别麻蝇中肠对镉反应的蛋白质组分析

重金属对人类健康及环境都有极大的危害。然而, 它的毒性机理和生物学影响却没有得到深入的研究。在蛋白中 Cd^{2+} 可能替换 Zn^{2+} 或是 Fe^{2+} (Stohs and Bagchi, 1995), 导致了游离铁的释放或是它们的失活, 将产生高活性的羟氢氧基分子($\text{OH}\cdot$) (Halliwell and Gutteridge, 1984), 从而引起氧化毒性(Brennan and Schiestl, 1996), 特别是脂质过氧化(Stohs and Bagchi, 1995)。然而, 重金属的极端效应的影响仍未知。

生物以各种机制对抗镉毒性。细菌可以利用流出泵 (efflux pumps) 将有毒离子排出细胞外 (Silver and Phung, 1996)。高等的真核生物, Cd^{2+} 可被金属硫蛋白通过自身高含量的半胱氨酸所捕获 (Hamer, 1986)。镉也可被GSH 或是植物络合肽 (phytochelatin) 所整合, 后者是在植物或是酵母 *Schizosaccharomyces pombe* 由谷胱甘肽合成的结构为 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$ 的一种谷胱甘肽聚合体。 Cd -植物络合肽和 $\text{Cd}(\text{GSH})_2$ 复合物可通过ATP 结合运输体转入液泡中 (Li *et al.*, 1997; Ortiz *et al.*, 1995; Wemmie *et al.*, 1994)。解毒酶和抗氧化酶也在其中起了重要的作用 (Wang *et al.*, 2001)。

蛋白质组技术 (Proteomic technology) 现已成为毒物学家的一个重要工具。蛋白质组对毒物学领域非常有帮助, 因为它可以确立新的毒性标志物或为毒性的综合机制提供新的见解 (Bandara and Kennedy, 2002; Kennedy, 2001)。这已经被一些报道所支持, 如有人用双向凝胶蛋白质技术 (2D gel proteomic technology) 证明了毒性的新机制路径和新的毒性标志物 (Steiner *et al.*, 1996; Cutler *et al.*, 1999; Kanitz *et al.*, 1999; Witzmann *et al.*, 1999; Charlwood *et al.*, 2002; Kennedy, 2002)。但是到目前为止, 很少有人用蛋白质组技术研究重金属胁迫下的昆虫蛋白变化。昆虫蛋白标志物对监测环境的污染是非常有吸引力的。本章我们使用双向电泳和质谱技术来研究重金属对棕尾别麻蝇的极端效应的影响, 目的是发现镉诱导出的蛋白, 为昆虫解毒和镉毒害机理提供了一个图谱框架。

1 材料与方法

1.1 供试虫源

供试棕尾别麻蝇来源同第四章 1.1。

1.2 样品制备

在25 °C和L12:D12 的光周期条件下,以含有800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 的饲料分别饲喂2日龄幼虫。于处理后48 h,取幼虫置于含有少量水的玻璃容器中,让其自由排空24 h 后用蒸馏水洗净,然后在冰上解剖出消化道,去掉前胃和后肠,把中肠放入预冷的10 mM Tris 缓冲液中,让中肠的内容物流出,反复洗涤3次,最后用液氮冷冻并用匀浆器磨碎组织,将粉末悬浮于含DTT (0.2% w/v) 的10%三氯醋酸 (w/v) 的丙酮溶液中,然后-20°C过夜,35000 g (6 °C) 离心30 min。将沉淀重悬于含0.2% DTT的预冷丙酮中,-20°C放置1 h,35000 g (6°C) 离心30 min。在通风橱中让丙酮充分挥发,得到干燥的沉淀。用裂解液(含有8 M尿素、4% CHAPS和50mM DTT) 重溶沉淀(50~100 mg 组织需要1 ml 裂解液),40,000 g (15°C) 离心1 h,上清液为样品。用Bradford (1976) 法测定样品蛋白浓度。样品分装后置于-70°C保存。以取食无 Cd^{2+} 的饲料幼虫为对照,用同样的方法提取对照中肠的蛋白。

1.3 双向凝胶电泳

中肠总蛋白提取物(200 μg) 加入水化上样缓冲液(8 M 尿素,2 % CHAPS,20 mM DTT,0.002%溴酚蓝) 至体积为350 μl ,充分混匀后加入聚焦盘中,采用17cm, pH 4~7, IPG 固相pH 胶条(Bio-rad) 溶胀上样。水化和聚焦由 Protean IEF CELL 等电聚焦仪(Bio-rad) 在17 °C中自动进行,总电压时间积为33000Vh,其中水化在50 V 电压下12 h,然后经过250 V 30 min、500 V 30 min、4000 V 3 h,最后稳定在4000 V 进行等电聚集。

等电聚焦结束后,IPG 胶条分别在平衡液 I (6 M 尿素、2%SDS、0.375 M pH8.8 Tris-HCl 、20%甘油和2% DTT) 和平衡液 II (6 M 尿素、2%SDS、0.375 M pH8.8 Tris-HCl 、20%甘油和2.5%碘乙酰胺) 中各平衡15 min。

将平衡后的IPG 胶条转移到15%的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶上,低熔点琼脂糖封胶液封胶,放置5 min 彻底凝固后,将凝胶转移至 PROTEAN II Xi 型电泳槽中,打开循环水浴冷却系统,接通电泳仪电源(PowerPac 3000) 起始时用5 mA/gel,待样品在完全走出IPG 胶条,浓缩成一条线后,再转换电流至15 mA/gel 直到溴酚蓝到达胶底边缘。

1.4 考染和凝胶图像分析

电泳后的凝胶用考马斯亮蓝 R_{250} 染色,脱色液(甲醇:冰醋酸:水=1:1:8) 脱色。尔后,以GS-800TM 光密度扫描仪(Bio-Rad) 进行凝胶图像扫描。图像用PDQuest 2-D 图像分析软件(Bio-Rad) 进行分析。

1.5 胶内酶切

将选取的目标蛋白点从胶上切离,转到1.5 ml Eppendorf 管中,每个蛋白点用 milli-Q 水洗涤2次,再用100 mM $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ 和30 mM $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ (1:1)脱色完全后用 milli-Q 水洗涤,直到淡黄色基本褪尽,接着用100 mM NH_4HCO_3 (pH 8.0)反应20 min 后用ddH₂O 洗涤一次,然后用乙腈脱水两次,用SpeedVac 离心干燥仪离心15 min,加入TPCKTrypsin(20 $\mu\text{g/mL}$) 10 μl , 37℃水浴酶解12 h。酶解产物用0.1%的三氟乙酸(TFA)萃取两次后冷冻干燥。

1.6 蛋白肽指纹图谱的测定

PMF: 将制备好的样品用 5 μl 0.1%三氟乙酸(TFA)充分溶解后取 1 μl 样品点样于 ABI 公司的点样板上,然后在样品上加入 1 μl 含 10 mg/ml CCA 基质,空气中自然干燥后用美国应用生物系统公司(ABI 公司)的 Voyager-DE STR 质谱仪进行分析,采用反射模式,正离子谱测定,离子加速电压 20000 V,激光激发电压为 2100 V,时间延迟提取为 100 ns,采集质荷比介于 1000 Da 到 4000 Da 的谱峰,分别采用胰蛋白酶自切峰和分子量已知的标准肽(Perspective Biosystems)采用进行内外标校正。

MALDI-TOF 源后衰变: 采用手动模式,加速电压 20000 V,时间延迟提取 100 s,网格电压 75%,质谱信号档次扫描累加 200 次。

1.7 质谱数据的解析与数据库搜索

用 Data Explorer 软件对肽指纹图谱(PMF)进行一定的校正后,用 Mascot 数据库(<http://www.matrixscience.com>)进行 PMF 数据解析。用 MS-Tag (<http://prospector.ucsf.edu>) 数据库对 MS/MS 数据进行解析。

2 结果

与对照种群相比,接触 800 $\mu\text{g/g}$ Cd^{2+} 的棕尾别麻蝇幼虫中肠的双向蛋白图谱有显著变化,其中有 11 个蛋白表达量减少(图 13-1A),14 个蛋白表达量增加(图 13-1B)。切割 10 个表达量增加的蛋白点(图 13-1B)通过肽指纹图谱(图 13-2)和源后衰变测序(图 13-3)进行蛋白鉴定。结果如表 13-1。这些蛋白主要包括抗氧化特性的酶(蛋白点 1)、糖蛋白(蛋白点 5)、热激蛋白(蛋白点 7 和 9)、Cd 结合蛋白(蛋白点 8)、肌动蛋白(蛋白点 10)和一些未知功能的蛋白(蛋白点 3、4 和 6)。

3 讨论

我们的鉴定结果表明棕尾别麻蝇中肠的 p-糖蛋白 (p-glycoprotein, pGp) 与 Cd^{2+} 的耐性有关, 这与有关的报道相一致 (Callahan and Beverley, 1991)。pGp 是一种依赖 ATP 的膜蛋白转运子, 它可以把分子泵出细胞, 它还负责多种药物耐药性。Brooks 等 (1996) 证明当 pGp 基因在镉耐性线虫 *Caenorhabditis* 中失活, 线虫变得对镉毒性敏感。Callaghan 和 Denny (2002) 用野生型和镉抗性种群的果蝇证明部分或全部封闭 pGp 可以增加镉对果蝇幼虫的毒性, 导致成虫羽化数量的减少。这表明 pGps 有一个从细胞去除镉的作用, 有一个调控 Cd 毒性的作用。Endo 等 (2002) 报道 pGp 在肾脏上皮细胞 LLC-PK₁ 和 OK 中有一个泵出 Cd 的作用。Cd 从肾脏上皮细胞 LLC-PK₁ 和 LLC-GA5-COL 150 顶膜的流出主要依赖 pGp 的表达的水平 (Kimura *et al.*, 2005)。另外在 *Euglena gracilis* 中类 pGp 也被证明与 Cd 的耐性有关 (Einicker-Lamas *et al.*, 2003)。

烷基过氧化氢还原酶 (alkyl hydroperoxide reductase, AhpC)。这种酶是一种氧化胁迫蛋白酶, 主要功能是抑制 H_2O_2 的氧化毒性 (King *et al.*, 2000)。我们推测 AhpC 可能是通过清除 Cd 产生的 ROS 来保护细胞免受氧化毒性。

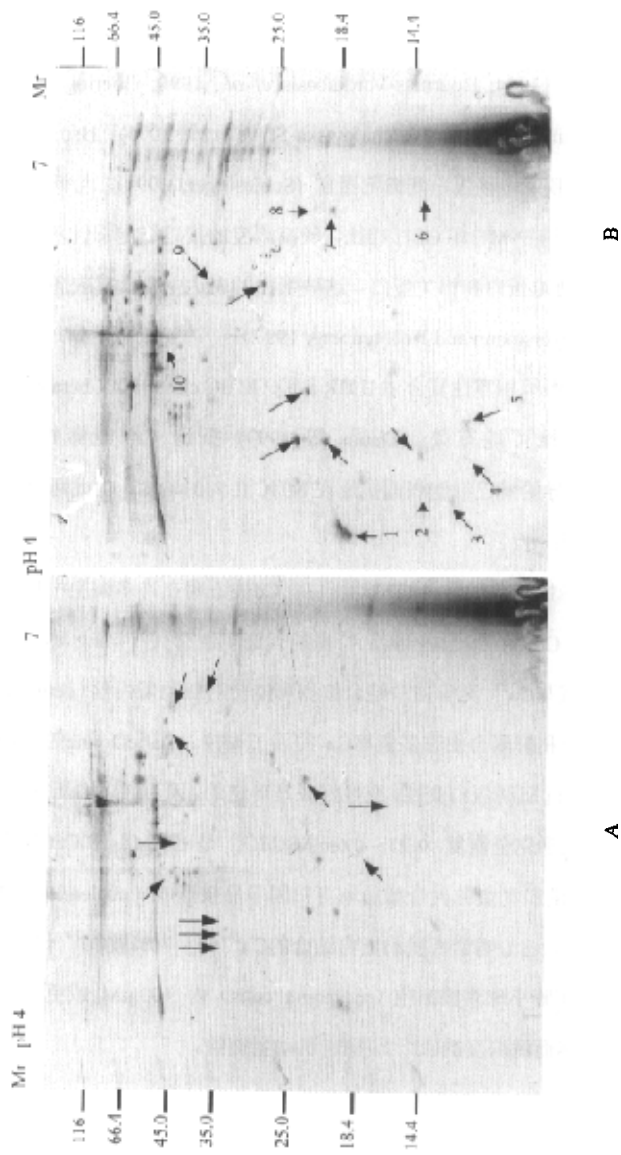
棕尾别麻蝇幼虫取食含 Cd^{2+} 的食物后, Cd^{2+} 诱导的溶酶体蛋白 CDR-5 (cadmium-inducible lysosomal protein CDR-5) 在其中肠大量地表达。关于 CDR 与生物耐 Cd 已有过报道。Dong 等 (2005) 报道了线虫 *Caenorhabditis elegans* CDR 家族的 7 个基因 *cdr-1*、*cdr-2*、*cdr-3*、*cdr-4*、*cdr-5*、*cdr-6* 和 *cdr-7* 具有高度同源性, 特别是开放读码框区 (open reading frames) 有高水平的氨基酸和核酸序列的相似性, 这可以预测蛋白的大小和特性。CDR-1、CDR-2、CDR-3、CDR-4、CDR-5、CDR-6 和 CDR-7 是极易水解的、完整的溶酶体膜蛋白。结构分析表明他们可能有相似的生物学功能。对于 Cd 的反应, *cdr-1*、*cdr-2*、*cdr-3* 和 *cdr-4* 转录大大增加。相反 *cdr-5*、*cdr-6* 和 *cdr-7* 不被严重影响或抑制。并且在无金属胁迫时, *C. elegans* 中 *cdr-2*、*cdr-4*、*cdr-6* 和 *cdr-7* 不能正常表达。当通过 RNAi 抑制 CDR-1 后, 大量的流动性小滴充满了整个线虫体腔。当有低渗压力时这种现象更加显著。这表明 CDR-1 在 *C. elegans* 中由渗透调节 (osmoregulation) 来维持盐平衡的功能, 它可以把 Cd 和其它离子泵入溶酶体内。溶酶体的功能是在细胞内贮存过渡金属。暴露于 Cd 的蚌类、蜗牛或老鼠会在溶酶体积累 Cd (Marigomez *et al.*, 1990; George and Pirie, 1979; Marshall *et al.*, 1994), 我们在对棕尾别麻蝇幼虫的中肠超微结构进行研究时也发现了这一点。几个转移金属离子泵转运 Cd 到溶酶体已经被证明: 在酵母中, Cd 调控基因 (cadmium factor gene) YCF1 编

码 ATP 结合蛋白 (ATP-binding cassette protein), 这个蛋白能够转运 Cd-GSH 复合物 (cadmium-glutathione complexes) 到囊泡 (vesicles) (Li *et al.*, 1997); Havelaar 等 (1998) 在老鼠中鉴定了一个溶酶体 P-型过渡金属转运子。许多溶酶体金属离子泵的功能是为重金属解毒 (Wemmie *et al.*, 1994; Szczypka *et al.*, 1994)。

Cd²⁺ 可以诱导棕尾别麻蝇中肠的热激蛋白 (Heat shock proteins, Hsp)。已经有学者对此作过报道 (Courgeon *et al.*, 1984; Bournias-Vardiabasis *et al.*, 1990; Goering *et al.*, 1993; Barque *et al.*, 1996; Braeckman *et al.*, 1999; Warchalowska-Sliwa *et al.*, 2005)。Hsp 的主要功能是折叠和再折叠蛋白, 如补救或转移蛋白到细胞器官 (Schlesinger, 1990)。与低的、非细胞毒性的 Cd 浓度 (1 ~ 5 μM) 诱导 MT 和 GSH 相比, 较高浓度的接近细胞毒性水平 (10 ~ 50 μM) 的 Cd 可以诱导更多胁迫蛋白和相关蛋白。这些蛋白的表达主要具有应急功能, 因为它们可以挽救敏感蛋白 (Beyersmann and Hechtenberg, 1997)。

棕尾别麻蝇幼虫中肠的组织相容性复合体 II DR β 链 (MHC class II DR beta chain) 表达量增加说明它与 Cd²⁺ 耐性可能有关。Daum 等 (1993) 报道 Cd 能够抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的淋巴细胞表面抗原在 MHC II 内的增加, 由此可以推断, Cd 可能以某种方式与 MHC II 作用。

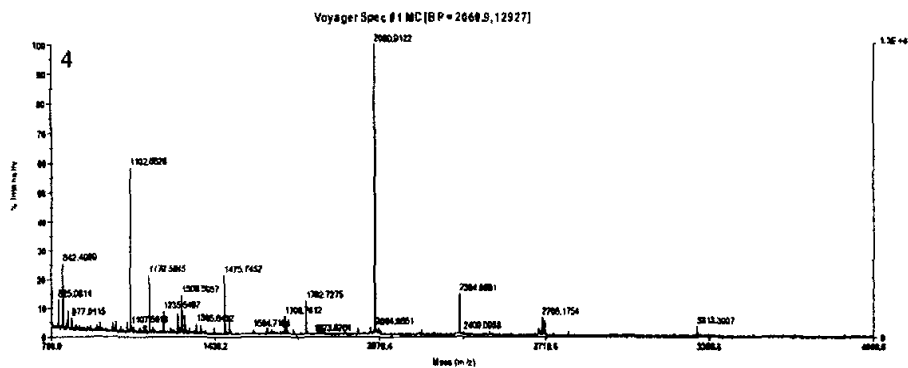
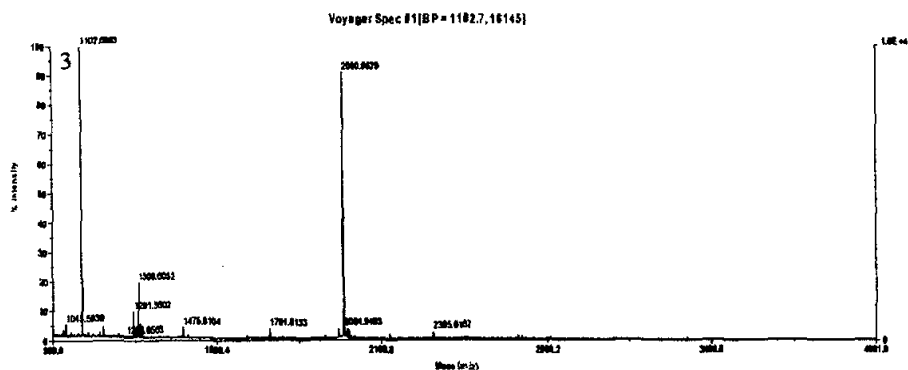
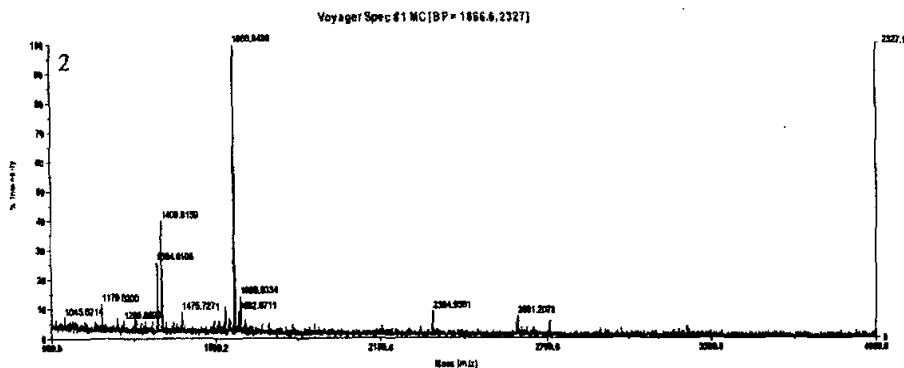
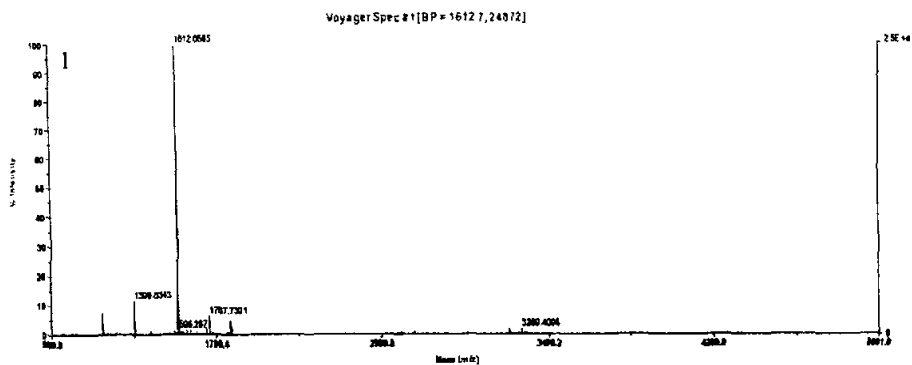
Cd²⁺ 可以影响棕尾别麻蝇幼虫细胞内的肌动蛋白。Cd 被证明在许多细胞中扰乱了肌动蛋白丝的动力学。这可能与 Cd²⁺ 在细胞内与 Ca 特殊的代谢机制有关 (Wang *et al.*, 1996)。Cd²⁺ 影响细胞内 Ca²⁺ 浓度或与 Ca²⁺ 竞争蛋白结合位点可能会对肌动蛋白丝 (actin filaments) 有影响, 肌动蛋白丝的聚合和解聚合由许多依靠 Ca 的因子调控。DalleDonne 等 (1997) 证明 0.8 ~ 1.0 mM 的 CdCl₂ 引起肌动蛋白变性, 变性好像是可逆的, 因为通过透析除去 Cd²⁺ 后沉积的肌动蛋白聚合能力几乎完全恢复; 0.25 ~ 0.6 mM CdCl₂ 是比 MgCl₂ 和 CaCl₂ 更有效的肌动蛋白聚合剂。Cd 相关的肌动蛋白聚合增加率可归因于晶核形成 (nucleation) 的增加。另外, DalleDonne 等 (1997) 还证明紧密肌动蛋白结合的 Ca²⁺ 60 ~ 70% 被 Cd²⁺ 代替。Wang 和 Templeton (1996) 报道在肾小球系膜细胞 (mesangial cells) 内 100 μM 或更高的 Cd²⁺ 提高了肌动蛋白的聚合率, 然而低浓度的 Cd²⁺ 却稳定肌动蛋白丝。

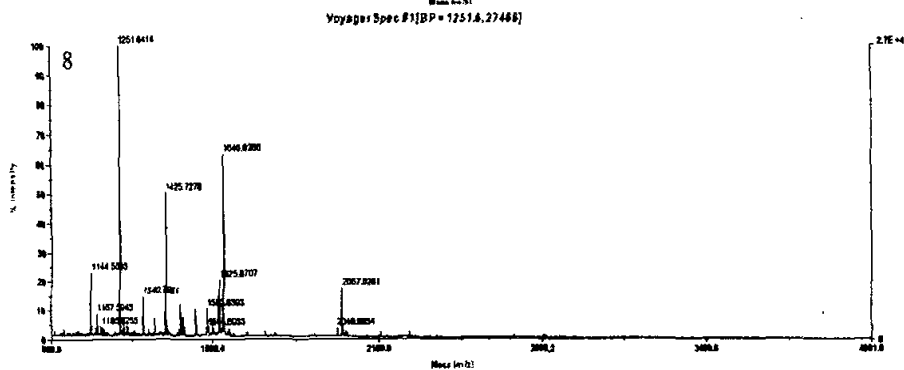
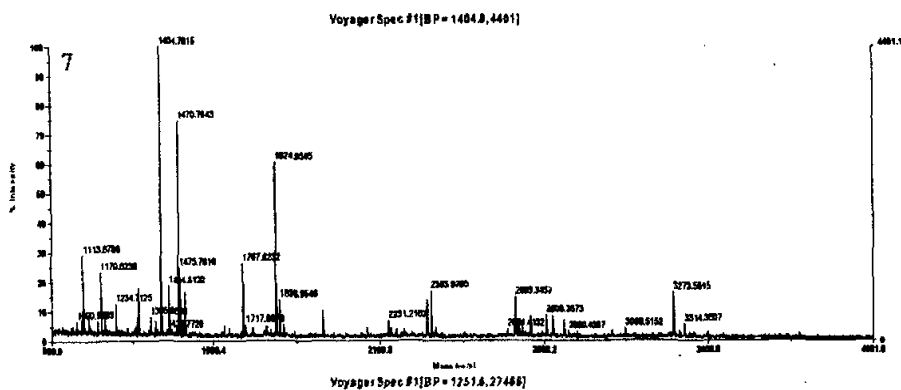
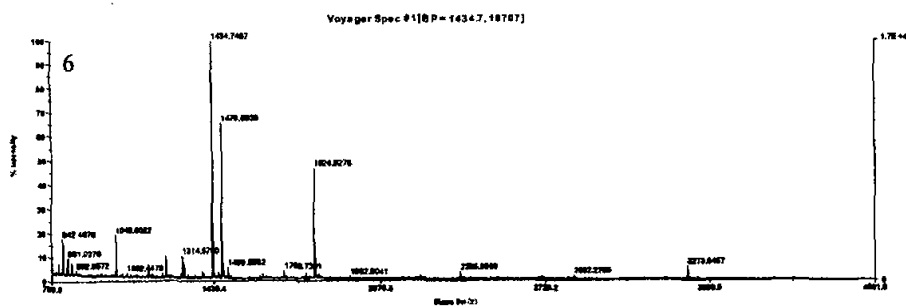
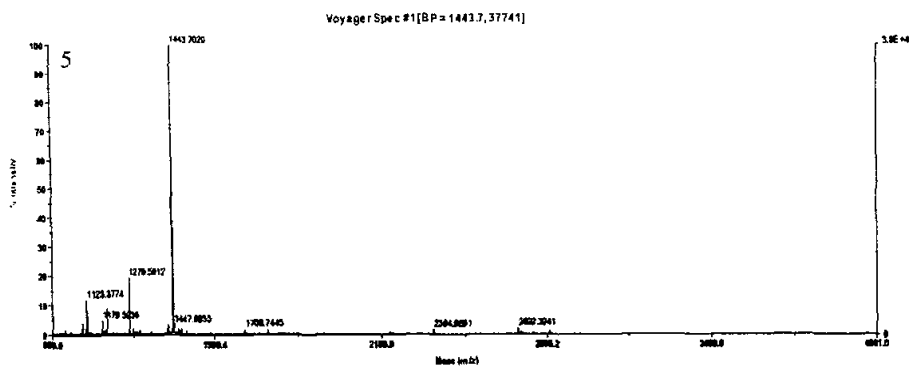


A: 对照中肠的双向电泳图谱; B: 镉处理中肠的双向电泳图谱。

图 13-1 棕尾别麻蝇幼虫对镉反应的中肠蛋白双向电泳图。

Fig. 13-1 Two-dimensional gel electrophoresis analysis of the midgut proteins in flesh fly larvae in response to cadmium.





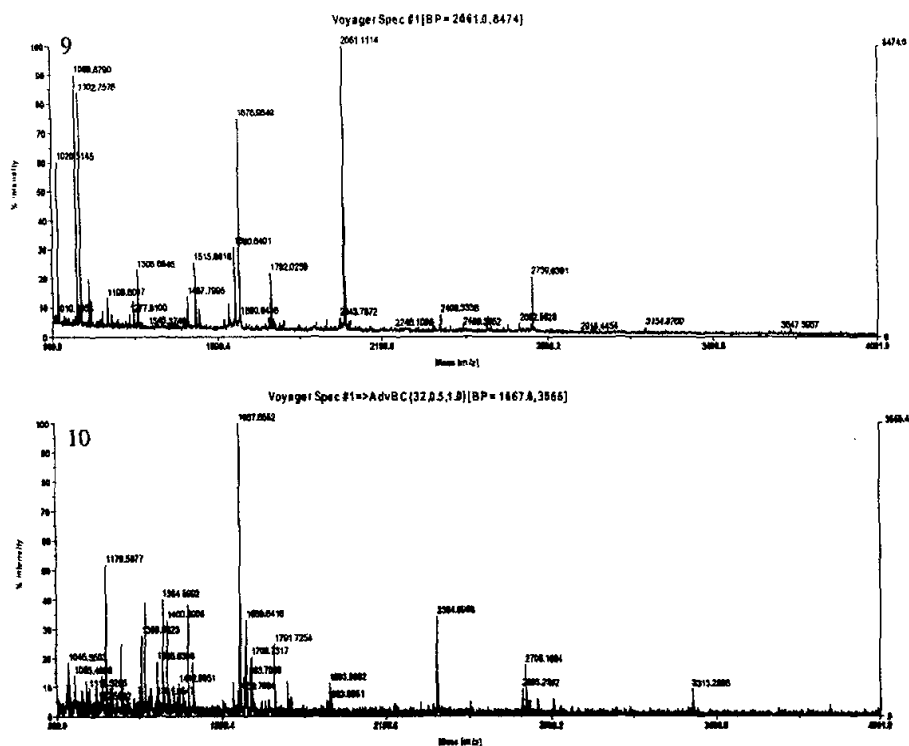


图 13-2 10个被鉴定蛋白点的肽指纹图谱
Fig. 13-2 Peptide mass fingerprints of ten protein spots having identified

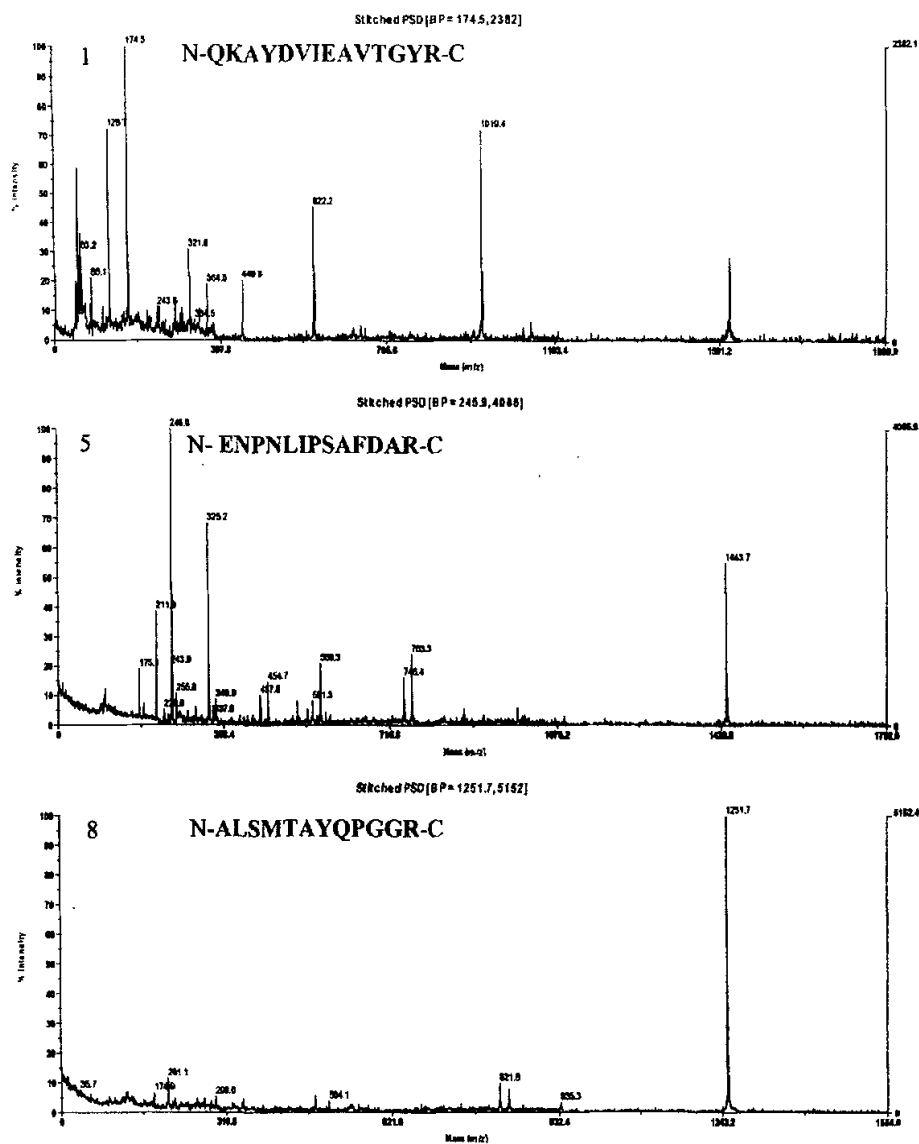


图 13-3 几个蛋白点 (1、5、8) 肽段的源后衰变 (PSD) 分析
 Fig. 13-3 Analysis of post-source decay (PSD) for several peptides from protein spot 1, 5, 8

表 13-1 10 个 Cd²⁺ 诱导的中肠蛋白点的鉴定结果
Table 13-1 Identification of ten proteins in midguts induced by Cd²⁺

Spot no.	MOWSE core	Matched (%)	Protein MW (Da)/pI	Species	Database accession number	Protein Name
1	39	19	21686/4.69	<i>Sireptomyces viridosporus</i>	MSDBQ9X5V0 STRVD	Alkyl hydroperoxide reductase
1			49000/?	<i>Psychrobacter sp.</i>	NCBIInr. 52853677	NADH: ubiquinone oxidoreductase
2	58	33	14706/6.69	<i>Capra hircus</i>	NCBIInr. 21914206	follicle stimulating hormone beta-subunit
2	44	61	9295/5.29	<i>Ovis aries</i>	NCBIInr. 7108495	MHC class II DR beta chain
3	46	27	13227/9.13	<i>Homo sapiens</i>	NCBIInr. 49354781	immunoglobulin E variable region
3	43	28	12258/4.75	<i>Ceratitis rosa</i>	NCBIInr. 634105	odorant binding protein
4	43	40	10229/5.36	<i>Capra aegagrus</i>	NCBIInr. 835672	DR beta-chain antigen binding domain
5	50	30	9693/5.28	<i>Cyathostomum patratatum</i>	NCBIInr. 3748561	P-glycoprotein
6			17562/9.2	<i>Drosophila melanogaster</i>	NCBIInr. 28416333	RH49324p
6			13579/9.0	<i>Drosophila melanogaster</i>	NCBIInr. 20129279	CG11015-PA
7	46	21	20125/6.06	<i>Nematode (Brugia pahangi)</i>	NCBIInr. 362582	small heat shock protein
7	47	22	41659/8.54	<i>Rattus norvegicus</i>	NCBIInr. 1542447	cysteine rich protein 61
8	72	35	31914/6.83	<i>Caenorhabditis elegans</i>	NCBIInr. 2352460	cadmium-inducible lysosomal protein CDR-5
9	47	20	39000/8.47	<i>Homo sapiens</i>	NCBIInr. 0086429	heat shock protein 40
9			29410/6.7	<i>Bacteroides</i>	NCBIInr. 29346761	glucose-1-phosphate cytidyltransferase
10	106	19	41776/5.29	<i>Bombix mori</i>	NCBIInr. 4750	actin A ₂
10	106	19	41653/5.37	<i>Drosophila virilis</i>	NCBIInr. 3430414	actin E ₂

第十四章 棕尾别麻蝇对镉和铜的耐性研究

——耐性品系在重金属积累、生长发育、繁殖及生化因子的变化

昆虫主要通过消化道食物摄取重金属,然后在特殊组织吸收。例如,铜主要在中肠的杯状细胞(cuprophilic cell)被吸收,锌和铜在马氏管被吸收,镉在中肠上皮细胞被吸收(Durliat *et al.*, 1995)。中肠上皮细胞可以从肠腔和血淋巴吸收重金属(Dallinger, 1993; Posthuma and van Straalen, 1993)。这些重金属的细胞吸收可能在第一位置诱导 MT 并结合这些金属,从而免受重金属的毒性影响。中肠细胞也能通过区室化(compartmentalization)整合重金属,即贮存在膜上的囊泡(颗粒,往往是细胞中的部分溶酶体片断),并与颗粒上的特殊物牢固结合,往往不再脱落(Dallinger, 1993; Hopkin, 1989; Posthuma and van Straalen, 1993)。Hopkin (1989)描述了四种类型的颗粒,这些颗粒也在果蝇中肠上皮细胞出现(Lauverjat *et al.*, 1989)。整合重金属的能力主要依靠颗粒的数量和 MT 储存及运输重金属到细胞溶酶体片断的能力(Posthuma and van Straalen, 1993)。区室化可贮存过量的重金属。但在昆虫中,金属的积累是有限的。一些昆虫能通过细胞分泌除去金属,如囊泡的胞外分泌(exocytosis)(Dallinger, 1993; Lauverjat *et al.*, 1989)。在鞘翅目,如弹尾虫 *Orchesella cincta*, 中肠上皮细胞在蜕皮过程中会脱落,同时积累的重金属被除去(Posthuma, 1992)。因此昆虫是重金属的分散者(deconcentrators)(Dallinger, 1993)。本章在室内续代饲养了棕尾别麻蝇(*Boettcherisca peregrine*)相对敏感品系、耐镉品系和耐铜品系的基础上,就不同品系在重金属积累、生长发育、繁殖及生化因子的变化进行研究,以明确棕尾别麻蝇对 Cd 和 Cu 耐性与金属硫蛋白、抗氧化酶及解毒酶的关系。

1 材料与方法

1.1 棕尾别麻蝇的续代饲养

供试棕尾别麻蝇的来源及饲养同第四章 1.1。

1.2 毒力测定方法

采用喂食法,将棕尾别麻蝇 1 日龄幼虫分别喂食含以下浓度重金属的饲料: 50、100、200、400、800、1600、3200 $\mu\text{g Cd}^{2+}/\text{g}$; 50、100、200、400、800、1600、3200 $\mu\text{g Cu}^{2+}/\text{g}$ 。与此同时,对照取食无污染的人工饲料。每浓度设 3 个重复,每重复供试虫为 30 头,每处

理的死亡数从 24 h 直计数到化蛹。用 DPS 数据处理软件（唐启义和冯明光，2002）计算毒力回归式， LC_{50} 及置信区间。

1.3 棕尾别麻蝇不同品系的室内筛选方法

1.3.1 相对敏感品系（S, Relative susceptible strain）

按上述饲养方法将棕尾别麻蝇在室内不接触重金属连续饲养 20 代。

1.3.2 耐重金属的品系（ R_{Cd} , cadmium-resistant strain; R_{Cu} , copper-resistance strain）

采用群体筛选的方法，即用一定浓度的重金属 Cd^{2+} 或 Cu^{2+} 处理群体饲养的 1 龄幼虫，使死亡率维持在 50% 左右，处理后存活的个体作为下一代筛选的虫源。每隔 5 代进行毒力测定，并根据所得结果相应调整剂量。共连续筛选 20 代。

1.4 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 在不同品系幼虫体内的积累及其对其生长发育和繁殖的影响

收集收集各品系 F_{20} 代刚产（8 h 内）的幼虫分别饲喂含 0、100、和 800 $\mu g Cd^{2+}/g$ 或 Cu^{2+}/g 的人工饲料。每瓶饲养 300 头幼虫，每浓度设 3 个重复。在处理 4 d 后从每瓶中取出一定的幼虫，用蒸馏水洗净后排空 24 h，以吸水纸拭干，先用电子天平（AB204-E, Mettler Toledo）称重，然后部分以 X. A. 液（二甲苯：乙醇=1:1）处理，待虫体伸长后再用游标卡尺测量体长（王江峰，1999），部分用来测体内金属含量（方法同第一章 1.4），部分用来测 MT 含量和酶活性。剩余的让其化蛹，羽化，交配后测单雌产卵量。

1.5 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 诱导耐性品系和相对敏感品系 MT 浓度的差异

收集 1.4 中的幼虫样品，参照 Eaton 和 Toal (1982) 及 Klein 等 (1990) 的镉血红蛋白（Cd-Hb）饱和法测定 Cd^{2+} 浓度（见第九章 1.3）。然后以每摩尔 MT 结合 7 摩尔的 Cd^{2+} ，计算 MT 浓度。

1.6 酶活性测定

1.6.1 酶液制备

分别以各种酶测定需要的缓冲液漂洗棕尾别麻蝇幼虫，然后加入适量冰冷的缓冲液，冰上匀浆。匀浆液于 4℃ 10,000 g 离心 10 min，取上清即为样品酶液。

1.6.2 SOD 活性测定

参考 McCord 和 Fridovich (1969), 邓碧玉和袁勤生 (1991) 的方法进行: 在 25℃ 下, 于 4.5 ml 50 mM 的 Tris-HCl 缓冲液 (pH 8.2) 中加入待测酶液 10 μ l, 后加入 10 μ l 45 mM 的连苯三酚, 迅速摇匀, 倒入光径 1 cm 的比色杯内, 在 325 nm 波长下每隔 30 s 测光吸收值一次, 要求自氧化速率控制在 0.070 OD/min 左右。一个酶活单位定义为在 1 ml 反应液中, 每分钟抑制连苯三酚自氧化率达 50% 的酶量, 计算公式如下:

$$\text{SOD 活力 (U/mL)} = \frac{\frac{0.070 - \Delta A_{325\text{nm}} / \text{min}}{0.070} \times 100\%}{50\%} \times \text{反应液总体积} \times \frac{\text{样液稀释倍数}}{\text{样液体积}}$$
$$\text{比活力 (U/mg pro)} = \frac{\text{SOD 活力 (U/mL)}}{\text{蛋白浓度 (mg/mL)}}$$

1.6.3 CAT 活力变化

参考 Barbehenn (2002) 的方法, 反应液由 665 μ l 磷酸钾缓冲液 (pH 7.0, 66mM)、25 μ l 样品酶液和 10 μ l 13% H_2O_2 配成。用紫外分光光度计在 240 nm 下每隔 30 s 测一次光吸收值, 连续记录吸光度 A_{240} 的变化, 计算 CAT 活性。其活性表示为每分钟每毫克蛋白还原 H_2O_2 的微摩尔数, 消光系数为 $39.4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ (Aebi, 1984)。

1.6.4 谷胱甘肽还原酶 (GR)

采用 Bergmeyer (1963) 的方法, 略加修改。最终 3 ml 反应液中含 0.1 mM 磷酸缓冲液 (pH 7.8), 1 mM Na_2EDTA , 1mM GSSG, 0.2 mM NADPH- Na_4 及 140 μ l 酶液, 用紫外分光光度计连续记录吸光度 A_{340} 的变化, 计算 GR 活性。

1.6.5 谷胱甘肽 S-转移酶 (GST)

参照 Habig 等 (1974), 取 50 μ l 酶液, 加 1.93 ml 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6) 和 100 μ l 0.05 M 还原型谷胱甘肽 (GSH), 在 25℃ 下保温 5 min 后, 加入 20 μ l 0.01 M CDNB, 用分光光度计于 340 nm 处测定 5 min 内吸光值的变化。消光系数为 $9.6 \text{ mM}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$ 。

1.6.6 酯酶 (EST)

参照 Hama 和 Hosoda (1983) 的方法, 取 5 μ l 酶液, 加 1.1 ml 0.1 M 磷酸缓冲液 (pH 7.6), 再加 0.5 ml 0.3 mM α -萘酚萘酯 (α -NA), 于 37℃ 下保温 10 min。尔后加入 0.5 ml 显色剂 (1% 固蓝 B 盐和 5% 十二烷基磺酯钠的 2:5 混合液) 终止反应, 以分光光度计测定 600 nm 处的吸光值。以 α -萘酚制作标准曲线。

1.6.7 蛋白质含量测定

参照 Bradford (1976)的方法,用考马斯亮蓝 G₂₅₀ 测定可溶性蛋白含量,以牛血清白蛋白制作标准曲线。

1.7 数据分析

利用 DPS 软件(唐启义和冯明光, 2002)对各处理指标进行方差分析,再以 Duncan's 新复极差法比较各处理之间的显著性差异。

2 结果

2.1 Cd²⁺ 和 Cu²⁺对棕尾别麻蝇幼虫的耐性筛选结果

由表 14-1 可知,在耐性筛选过程中,棕尾别麻蝇对 Cd²⁺ 的耐性发展缓慢, Cd²⁺ 对 R_{Cd} 品系的 LC₅₀ 仅为 F₀ 代的 1.60 倍,为 S 品系的 1.89 倍。由表 14-2 可以看出,在耐性筛选过程中,棕尾别麻蝇对 Cu²⁺ 的耐性发展也缓慢, Cu²⁺ 对 R_{Cu} 品系的 LC₅₀ 仅为 F₀ 的 1.64 倍,为 S 品系的 1.68 倍。

表 14-1 棕尾别麻蝇幼虫对 Cd²⁺ 耐性发展动态
Table 14-1 Resistance development of *Boettcherisca peregrine* larvae to Cd²⁺

Generations	Intercept s	Slope b	LC ₅₀ (95% Confidence interval) (μ g/g)	RR
F ₀	-1.42	2.55	327.24 (277.22 ~ 390.21)	
F ₅	-1.09	2.33	405.48 (338.82 ~ 498.31)	1.24
F ₁₀	-1.39	2.42	439.64 (367.21 ~ 544.02)	1.34
F ₁₅	-1.58	2.46	476.99 (396.78 ~ 596.93)	1.46
F ₂₀	-1.47	2.38	522.66 (430.05 ~ 667.37)	1.60

注: RR 为相对于 F₀ 抗性倍数。RR values represent resistance rates at the LC₅₀ relative to F₀ generation.

表 14-2 棕尾别麻蝇幼虫对 Cu²⁺ 耐性发展动态
Table 14-2 Resistance development of *B. peregrine* larvae to Cu²⁺

Generations	Intercept s	Slope b	LC ₅₀ (95% Confidence interval) (μ g/g)	RR
F ₁	-1.72	2.49	494.89 (411.03 ~ 622.45)	
F ₅	-1.88	2.51	553.52 (455.04 ~ 711.53)	1.12
F ₁₀	-2.17	2.57	612.58 (498.52 ~ 805.09)	1.24
F ₁₅	-2.94	2.79	700.21 (561.91 ~ 951.60)	1.41
F ₂₀	-2.43	2.55	812.99 (699.22 ~ 982.88)	1.64

2.2 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 在不同品系的棕尾别麻蝇幼虫体内的积累

由表 14-3 可知,不论是 R_{Cd}品系 ($F = 580.633, df = 1, P < 10^{-4}$)还是 S 品系($F = 284.723, df = 1, P = 0.0001$)在 800 $\mu\text{g/g}$ Cd²⁺ 下比在 100 $\mu\text{g/g}$ Cd²⁺ 时体内积累的 Cd²⁺ 浓度要高。R_{Cd} 品系对镉的积累能力比 S 品系增强,且二者间显著差异 ($F = 20.867, df = 1, P = 0.0018$)。同样, R_{Cu} 品系 ($F = 147.093, df = 1, P = 0.0003$) 和 S 品系 ($F = 110.711, df = 1, P = 0.0005$) 在高浓度 (800 $\mu\text{g/g}$) Cu²⁺ 处理下比低浓度 (100 $\mu\text{g/g}$) 处理时体内积累的 Cu²⁺ 浓度要高。耐铜品系对铜的积累 Cu²⁺ 能力比敏感品系增强,但二者间无显著差异 ($F = 0.640, df = 1, P = 0.5599$)。

表 14-3 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 在耐性品系和敏感品系棕尾别麻蝇幼虫体内积累的比较

Table 14-3 Comparison of Cd²⁺ accumulation and Cu²⁺ accumulation in *B. peregrine* larvae of relative resistant strains and susceptible strains

Strains	Cd ²⁺ concentrations of treatments ($\mu\text{g/g}$)	Cd ²⁺ concentration in larvae ($\mu\text{g/g fw}$)	Strains	Cu ²⁺ concentrations of treatments ($\mu\text{g/g}$)	Cu ²⁺ concentration in larvae ($\mu\text{g/g fw}$)
S	100	135.22 $\pm$ 13.63 b	S	100	134.95 $\pm$ 22.32 b
	800	312.42 $\pm$ 12.05 a		800	299.36 $\pm$ 7.30 a
R _{Cd}	100	150.63 $\pm$ 13.32 b	R _{Cu}	100	167.78 $\pm$ 26.82 b
	800	359.17 $\pm$ 6.88 a		800	344.01 $\pm$ 11.06 a

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm \text{S.D.}$)。Duncan's 新复极差法检验表明,同一列中具相同小写字母的数据间差异未达显著水平 ($P < 0.05$)。表 4, 5, 6, 7, 8, 9 同之。The values are means $\pm$ standard deviation. In the same column, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test). The same in Table 4, 5, 6, 7, 8 and 9. fw: fresh weight.

2.3 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 对不同品系的棕尾别麻蝇幼虫生长发育的影响

由表 14-4 知, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食正常的饲料后体重 ($F = 0.075, df = 1, P = 0.7978$) 和体长 ($F = 2.778, df = 1, P = 0.1341$) 无显著差异。1 日龄幼虫经 Cd²⁺ 处理 4 天后, 两品系幼虫的体重也无差异 ($F = 14.108, df = 1, P = 0.0641$), 但体长有显著差异 ($F = 23.462, df = 1, P = 0.0401$)。另外, 低浓度 (100 $\mu\text{g/g}$) 时, 敏感品系的体重受到抑制, 而 R_{Cd} 品系的体重增加, 差异显著 ($F = 16.065, df = 1, P = 0.0160$), 这是体现了 R_{Cd} 品系对低浓度 Cd²⁺ 的适应。但是高浓度处理时 R_{Cd} 品系和 S 幼虫体重抑制率分别为 62.99% 和 64.08%, 二者无显著差异 ($F = 1.052, df = 1, P = 0.3631$)。无论时低浓度 (100 $\mu\text{g/g}$) ($F = 2.298, df = 1, P = 0.1680$) 还是高浓度 ($F = 3.979, df = 1, P = 0.0812$), Cd²⁺ 对两品系幼虫体长的影响无差异。

由表 14-5 知, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫即使取食正常的饲料体重 ($F = 21.205, df = 1, P = 0.0100$) 和体长 ($F = 52.122, df = 1, P = 0.0001$) 也表现出显著差异。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 处理 4 天后, 两品系幼虫的体重无显著差异 ($F = 8.76, df = 1, P = 0.0977$), 但长有差异 ($F = 15.012, df = 1, P = 0.0007$)。另外, 低浓度 ($100 \mu g/g$) 时, S 品系幼虫的体重被抑制, 而 R_{Cu} 品系的体重被促进, 差异显著 ($F = 20.971, df = 1, P = 0.0102$), 这是体现了 R_{Cu} 品系对低浓度 Cu^{2+} 的适应。但是高浓度时, Cu^{2+} 对 S 品系和 R_{Cu} 品系幼虫体重抑制率分别为 34.37% 和 34.51%, 没有差异 ($F = 0.001, df = 1, P = 0.9730$)。无论时低浓度 ($F = 0.013, df = 1, P = 0.9124$) 还是高浓度 ($F = 0.511, df = 1, P = 0.4952$), Cu^{2+} 对两品系体长的影响无差异。

表 14-4 R_{Cd} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cd^{2+} 处理后体重和体长的比较

Table 14-4 Comparison of body weight and body length of *B. peregrine* larvae from R_{Cd} strain and susceptible strain after larvae being exposed to Cd^{2+}

Strains	Cd^{2+} concentrations of treatments ($\mu g/g$)	Body weight (mg/larvae)	Inhibition ratio of body weight (%)	Body length (cm)	Inhibition ratio of body length (%)
S	0	47.33 ± 6.09 a		1.36 ± 0.07 a	
	100	34.93 ± 5.08 b	26.20 ± 10.73 b	1.14 ± 0.09 b	15.75 ± 6.64 b
	800	17.00 ± 0.53 c	64.08 ± 1.12 a	0.92 ± 0.03 c	32.10 ± 2.01 a
R_{Cd}	0	48.53 ± 4.46 a		1.43 ± 0.06 a	
	100	48.64 ± 1.91 a	-0.23 ± 3.93 b	1.29 ± 0.08 b	9.82 ± 5.71 b
	800	17.96 ± 0.71 b	62.99 ± 1.47 a	1.02 ± 0.06 c	28.19 ± 3.89 a

表 14-5 R_{Cu} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cu^{2+} 处理后体重和体长的比较

Table 14-5 Comparison of body weight and body length of *B. peregrine* larvae from R_{Cu} strain and susceptible strain after larvae being exposed to Cu^{2+}

Strains	Cu^{2+} concentrations of treatments ($\mu g/g$)	Body weight (mg/larvae)	Inhibition ratio of body weight (%)	Body length (cm)	Inhibition ratio of body length (%)
S	0	65.45 ± 3.07 a		1.59 ± 0.03 a	
	100	59.47 ± 4.57 a	9.14 ± 6.99 b	1.47 ± 0.15 ab	7.90 ± 9.55 a
	800	42.96 ± 2.25 b	34.37 ± 3.44 a	1.28 ± 0.19 b	19.95 ± 12.02 a
R_{Cu}	0	47.33 ± 6.09 a		1.36 ± 0.07 a	
	100	54.87 ± 3.03 a	-15.92 ± 6.40 b	1.26 ± 0.12 ab	7.24 ± 8.84 a
	800	31.00 ± 2.77 b	34.51 ± 5.85 a	1.20 ± 0.10 b	11.69 ± 7.01 a

2.4 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 对不同品系的棕尾别麻蝇成虫生殖的影响

表 14-6 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食正常的饲料后雌成虫的产卵量无显著差异 ($F = 0.001, df = 1, P = 0.9749$)。幼虫期经 Cd²⁺ 处理后, R_{Cd} 品系 ($F = 18.659, df = 2, P < 10^{-4}$) 与 S 品系 ($F = 57.366, df = 2, P < 10^{-4}$) 雌成虫的产卵量都显著降低, 且 R_{Cd} 品系雌成虫的产卵量显著高于 S 品系的 ($F = 4.514, df = 1, P = 0.0378$)。两品系幼虫经低浓度 Cd²⁺ 处理后对雌成虫单雌产卵量的抑制作用无显著差异 ($F = 2.443, df = 1, P = 0.1338$), 幼虫的高浓度 Cd²⁺ 处理对 R_{Cd} 品系雌成虫的产卵量抑制率比 S 品系的显著降低 ($F = 8.875, df = 1, P = 0.0074$)。

表 14-6 R_{Cd} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cd²⁺ 处理后成虫生育力的比较

Table 14-6 Comparison of fecundity of adult females from R_{Cd} strain and susceptible strain after exposure to Cd²⁺

Strains	Cd ²⁺ concentrations of treatments (μg/g)	Oviposition numbers (egg/♀)	Inhibition ratio of oviposition (%)
S	0	82.8 ± 11.32 a	
	100	74.51 ± 8.795 b	11.80 ± 11.64 b
	800	42.32 ± 7.27 c	49.39 ± 8.41 a
R _{Cd}	0	82.6 ± 15.32 a	
	100	79.4 ± 13.93 a	2.05 ± 17.12 b
	800	52.7 ± 10.39 b	36.28 ± 11.94 a

由表 14-7 可知, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫取食正常的饲料后每雌产卵量无显著差异 ($F = 0.389, df = 1, P = 0.5405$)。幼虫期经 Cu²⁺ 处理后, R_{Cu} 品系 ($F = 71.244, df = 2, P < 10^{-4}$) 和 S 品系 ($F = 84.801, df = 2, P < 10^{-4}$) 雌成虫产卵量都显著降低, R_{Cu} 品系雌成虫的产卵量显著高于 S 品系的 ($F = 10.043, df = 1, P = 0.0025$)。在低浓度时, Cu²⁺ 对两品系成虫单雌产卵量的抑制率就有显著差异 ($F = 4.901, df = 1, P = 0.0400$), 高浓度时, Cu²⁺ 对两品系成虫单雌产卵量的抑制率没有显著差异 ($F = 2.533, df = 1, P = 0.1289$)。

2.5 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 对不同品系棕尾别麻蝇幼虫体内金属硫蛋白的诱导

表 14-8 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食不加重金属的饲料后体内 MT 浓度有显著差异 ($F = 10.028, df = 1, P = 0.0340$)。1 日龄幼虫经 Cd²⁺ 连续处理 4 天后, R_{Cd} 品系幼虫体内 MT 水平比 S 品系的显著升高 ($F = 12.275, df = 1, P = 0.0044$)。在低浓度时, Cd²⁺ 对两

品系幼虫 MT 的诱导率无显著差异 ($F = 2.081, df = 1, P = 0.2226$), 两品系幼虫体内 MT 水平也没有显著差异 ($F = 1.672, df = 1, P = 0.2656$); 高浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 MT 的诱导率有显著差异 ($F = 276.299, df = 1, P = 0.0001$), 两品系幼虫体内 MT 水平也有显著差异 ($F = 105.042, df = 1, P = 0.0005$)。对于同一品系来说, R_{Cd} 品系 ($F = 23.100, df = 2, P = 0.0015$) 和 S 品系 ($F = 625.865, df = 2, P < 10^{-4}$) 幼虫体内 MT 水平因 Cd^{2+} 浓度显著变化, Cd^{2+} 浓度越高, 诱导到的 MT 浓度越高。

表 14-7 R_{Cu} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cu^{2+} 处理后成虫生育力的比较

Table 14-7 Comparison of fecundity of adult female from R_{Cu} strain and susceptible strain after exposure to Cu^{2+}

Strains	Cu^{2+} concentrations of treatments ($\mu g/g$)	Oviposition numbers (egg/♀)	Inhibition ratio of oviposition (%)
S	0	79.4 ± 5.42 a	
	100	80.8 ± 6.41 a	-1.76 ± 8.07 b
	800	47.4 ± 7.47 b	40.30 ± 9.41 a
R_{Cu}	0	81.3 ± 7.96 b	
	100	89.6 ± 7.29 a	-10.21 ± 8.97 b
	800	53.4 ± 5.91 c	34.32 ± 7.27 a

表 14-8 R_{Cd} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cd^{2+} 处理后体内 MT 浓度的比较

Table 14-8 Comparison of MT concentrations in *B. peregrine* larvae from R_{Cd} strain and susceptible strain after larvae being exposed to Cd^{2+}

Strains	Cd^{2+} concentrations of treatments ($\mu g/g$)	MT concentrations ($\mu mol/g$ fw)	Inducement ratio (%)
S	0	0.87 ± 0.05 c	
	100	2.34 ± 0.15 b	170.11 ± 17.15 b
	800	4.27 ± 0.13 a	393.03 ± 15.16 a
R_{Cd}	0	1.51 ± 0.35 c	
	100	3.15 ± 1.08 b	108.83 ± 71.55 b
	800	5.15 ± 0.07 a	240.98 ± 4.68 a

表 14-9 结果表明, 幼虫取食不加金属的饲料后, R_{Cu} 品系幼虫体内 MT 水平显著高于 S 品系体内的 MT 水平 ($F = 17.670, df = 1, P = 0.0137$)。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cu} 品系幼虫体内 MT 水平也显著高于 S 品系幼虫体内 MT 水平 ($F = 52.226, df = 1, P = 0.0186$)。在低浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 MT 的诱导率没有显著差异 ($F = 2.418, df = 1, P =$

0.1949), 两品系幼虫体内 MT 水平也没有显著差异 ($F = 3.746, df = 1, P = 0.1250$); 高浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 MT 的诱导率有显著差异 ($F = 231.902, df = 1, P = 0.0001$), 两品系幼虫体内 MT 水平也没有显著差异 ($F = 85.084, df = 1, P = 0.0008$)。对于同一品系来说, R_{Cu} 品系 ($F = 129.088, df = 2, P < 10^{-4}$) 和 S 品系 ($F = 58.638, df = 2, P = 0.0001$) 幼虫体内 MT 水平因 Cu^{2+} 浓度显著变化, Cu^{2+} 浓度越高, 诱导到的 MT 浓度越高。

表 14-9 R_{Cu} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cu^{2+} 处理后体内 MT 浓度的比较

Table 14-9 Comparison of MT concentrations in *B. peregrine* larvae from R_{Cu} strain and susceptible strain after larvae being exposed to Cu^{2+}

Strains	Cu^{2+} concentration of treatments ($\mu\text{g/g}$)	MT concentrations ($\mu\text{mol/g fw}$)	Inducement ratio (%)
S	0	$0.87 \pm 0.05 \text{ c}$	
	100	$1.68 \pm 0.55 \text{ b}$	$94.61 \pm 63.71 \text{ b}$
	800	$3.69 \pm 0.13 \text{ a}$	$326.60 \pm 14.49 \text{ a}$
R_{Cu}	0	$1.72 \pm 0.34 \text{ c}$	
	100	$2.34 \pm 0.19 \text{ b}$	$36.55 \pm 11.12 \text{ b}$
	800	$4.76 \pm 0.15 \text{ a}$	$177.06 \pm 8.91 \text{ a}$

2.6 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对不同品系的棕尾别麻蝇幼虫 SOD 酶活性的影响

表 14-10 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食不加重金属的饲料后 SOD 酶活性无显著差异 ($F = 0.111, df = 1, P = 0.7554$)。1 日龄幼虫经 Cd^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cd} 品系 ($F = 36.288, df = 2, P = 0.0004$) 与 S 品系 ($F = 15.880, df = 2, P = 0.0040$) 幼虫 SOD 酶活性均被显著抑制, Cd^{2+} 浓度越高, SOD 酶活性越低, 两品系幼虫的 SOD 酶活性无显著差异 ($F = 1.845, df = 1, P = 0.1994$)。在低浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 SOD 酶活性的抑制没有显著差异 ($F = 0.435, df = 1, P = 0.5454$), 两品系幼虫的 SOD 酶活性也没有显著差异 ($F = 1.476, df = 1, P = 0.2912$); 高浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 SOD 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.751, df = 1, P = 0.4350$), 两品系幼虫 SOD 酶活性也没有显著差异 ($F = 1.148, df = 1, P = 0.3443$)。

表 14-11 结果表明, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫取食不加金属的饲料后 SOD 酶活性无显著差异 ($F = 0.401, df = 1, P = 0.5612$)。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cu} 品系 ($F = 19.589, df = 2, P = 0.0023$) 与 S 品系 ($F = 17.594, df = 2, P = 0.0031$) 幼虫 SOD 酶活性均被抑制, 并且 Cu^{2+} 浓度越高, SOD 酶活性越低, 两品系幼虫的 SOD 酶活性无显著差异 ($F = 2.300, df =$

1, $P = 0.1553$)。在低浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 SOD 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.001$, $df = 1$, $P = 0.9838$), 两品系幼虫的 SOD 酶活性也没有显著差异 ($F = 0.386$, $df = 1$, $P = 0.5679$); 高浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 SOD 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 1.533$, $df = 1$, $P = 0.2834$), 两品系幼虫的 SOD 酶活性也没有显著差异 ($F = 3.750$, $df = 1$, $P = 0.1249$)。

2.7 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对不同品系的棕尾别麻蝇幼虫 CAT 酶活性的影响

表 14-10 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食不加重金属的饲料后 CAT 酶活性无显著差异 ($F = 2.816$, $df = 1$, $P = 0.1686$)。1 日龄幼虫经 Cd^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cd} 品系 ($F = 3.527$, $df = 2$, $P = 0.0971$) 与 S 品系 ($F = 1.211$, $df = 2$, $P = 0.3616$) 幼虫 CAT 酶活性均发生不同程度的变化, 并且 Cd^{2+} 浓度越高, CAT 酶活性越低, 两品系幼虫的 CAT 酶活性有显著差异 ($F = 5.350$, $df = 1$, $P = 0.0393$)。在低浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 CAT 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.555$, $df = 1$, $P = 0.4977$), 两品系幼虫的 CAT 酶活性也没有显著差异 ($F = 1.428$, $df = 1$, $P = 0.2982$); 高浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 CAT 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.067$, $df = 1$, $P = 0.8089$), 两品系幼虫的 CAT 酶活性也没有显著差异 ($F = 1.345$, $df = 1$, $P = 0.3107$)。

表 14-11 结果表明, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫取食不加金属的饲料后 CAT 酶活性无显著差异 ($F = 4.404$, $df = 1$, $P = 0.1038$)。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cu} 品系 ($F = 5.569$, $df = 2$, $P = 0.0429$) 与 S 品系 ($F = 6.383$, $df = 2$, $P = 0.0327$) 幼虫 CAT 酶活性均被抑制, 并且 Cu^{2+} 浓度越高, CAT 酶活性越低, 并且两品系幼虫的 CAT 酶活性有显著差异 ($F = 13.078$, $df = 1$, $P = 0.0035$)。在低浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 CAT 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.526$, $df = 1$, $P = 0.5083$), 但两品系幼虫的 CAT 酶活性有显著差异 ($F = 9.423$, $df = 1$, $P = 0.0373$); 高浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 CAT 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.695$, $df = 1$, $P = 0.4514$), 两品系幼虫的 CAT 酶活性也没有显著差异 ($F = 1.804$, $df = 1$, $P = 0.2504$)。

2.8 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对不同品系的棕尾别麻蝇幼虫 GR 酶活性的影响

表 14-10 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食不加重金属的饲料后 GR 酶活性无显著差异 ($F = 0.019$, $df = 1$, $P = 0.8964$)。1 日龄幼虫经 Cd^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cd} 品系 ($F = 6.045$, $df = 2$, $P = 0.0365$) 与 S 品系 ($F = 9.488$, $df = 2$, $P = 0.0139$) 幼虫的 GR 酶活性均显著升高, 但二者之间的 GR 酶活性有显著差异 ($F = 5.563$, $df = 1$, $P = 0.0361$)。在低浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 GR 酶活性的诱导率有显著差异 ($F = 27.789$, $df = 1$, $P = 0.0062$), 两品系幼虫的

GR 酶活性也有显著差异 ($F = 33.581, df = 1, P = 0.0044$); 高浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 GR 酶活性的诱导没有显著差异 ($F = 0.236, df = 1, P = 0.6527$), 两品系幼虫的 GR 酶活性也没有显著差异 ($F = 0.194, df = 1, P = 0.6826$)。

表 14-11 结果表明, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫取食不加金属的饲料后 GR 酶活性无显著差异 ($F = 0.403, df = 1, P = 0.5599$)。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cu} 品系 ($F = 1.068, df = 2, P = 0.4011$) 与 S 品系 ($F = 4.369, df = 2, P = 0.0675$) 幼虫的 GR 酶活性均不同程度的升高, 但二者之间的 GR 酶活性无显著差异 ($F = 0.110, df = 1, P = 0.7454$)。在低浓度时, 两品系幼虫 GR 酶活性促进没有显著差异 ($F = 0.009, df = 1, P = 0.9290$), 两品系幼虫的 GR 酶活性也没有显著差异 ($F = 0.258, df = 1, P = 0.6383$); 高浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 GR 酶活性促进也没有显著差异 ($F = 2.133, df = 1, P = 0.2180$), 两品系幼虫的 GR 酶活性也没有显著差异 ($F = 0.486, df = 1, P = 0.5239$)。

2.9 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对不同品系的棕尾别麻蝇幼虫 GST 酶活性的影响

表 14-10 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食不加重金属的饲料后 GST 酶活性无显著差异 ($F = 0.164, df = 1, P = 0.7061$)。1 日龄幼虫经 Cd^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cd} 品系 ($F = 1.165, df = 2, P = 0.373$) 和 S 品系 ($F = 4.062, df = 2, P = 0.0766$) 幼虫 GST 酶活性均无显著变化, 并且两品系幼虫的 GST 酶活性无显著差异 ($F = 0.145, df = 1, P = 0.7099$)。在低浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 GST 酶活性的影响没有显著差异 ($F = 0.055, df = 1, P = 0.8267$), 两品系幼虫的 GST 酶活性也没有显著差异 ($F = 0.667, df = 1, P = 0.4601$); 高浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫的 GST 酶活性抑制没有显著差异 ($F = 0.365, df = 1, P = 0.5786$), 两品系幼虫 GST 酶活性也没有显著差异 ($F = 0.095, df = 1, P = 0.7728$)。

表 14-11 结果表明, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫取食不加金属的饲料后 GST 酶活性无显著差异 ($F = 0.251, df = 1, P = 0.6425$)。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cu} 品系 ($F = 10.938, df = 2, P = 0.0100$) 与 S 品系 ($F = 8.181, df = 2, P = 0.0193$) 幼虫 GST 酶活性均显著被抑制, Cu^{2+} 浓度越高, GST 酶活性越低, 但两品系间无显著差异 ($F = 0.156, df = 1, P = 0.7307$)。在低浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 GST 酶活性抑制有显著差异 ($F = 20.553, df = 1, P = 0.0105$), 两品系幼虫 GST 酶活性也有显著差异 ($F = 16.032, df = 1, P = 0.0161$); 高浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 GST 酶活性抑制有显著差异 ($F = 21.230, df = 1, P = 0.0100$), 两品系幼虫的 GST 酶活性也有显著差异 ($F = 25.020, df = 1, P = 0.0075$)。

2.10 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对不同品系的棕尾别麻蝇幼虫 EST 酶活性的影响

表 14-10 结果表明, R_{Cd} 品系和 S 品系幼虫取食不加重金属的饲料后 EST 酶活性无显著差异($F = 0.008$, $df = 1$, $P = 0.9326$)。1 日龄幼虫经 Cd^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cd} 品系($F = 140.279$, $df = 2$, $P < 10^{-4}$) 和 S 品系($F = 5.387$, $df = 2$, $P = 0.0458$) 幼虫 EST 酶活性均显著降低, 并且两品系幼虫 EST 酶活性有显著性差异($F = 9.100$, $df = 1$, $P = 0.0107$)。在低浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 EST 酶活性抑制有显著差异($F = 41.604$, $df = 1$, $P = 0.0030$), 两品系幼虫的 EST 酶活性也有显著差异($F = 39.080$, $df = 1$, $P = 0.0033$); 高浓度时, Cd^{2+} 对两品系幼虫 EST 酶活性抑制有显著差异($F = 33.780$, $df = 1$, $P = 0.0044$), 两品系幼虫的 EST 酶活性也有显著差异($F = 31.970$, $df = 1$, $P = 0.0048$)。

表 14-11 结果表明, R_{Cu} 品系和 S 品系幼虫取食不加金属的饲料后 EST 酶活性无显著差异($F = 0.137$, $df = 1$, $P = 0.7299$)。1 日龄幼虫经 Cu^{2+} 连续处理 4 天后, R_{Cu} 品系($F = 173.413$, $df = 2$, $P < 10^{-4}$) 与 S 品系($F = 6.852$, $df = 2$, $P = 0.0282$) 幼虫 EST 酶活性均显著被抑制, 且 Cu^{2+} 浓度越高, EST 酶活性越低, 但两品系幼虫的 EST 酶活性无显著差异($F = 0.162$, $df = 1$, $P = 0.6911$)。在低浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 EST 酶活性抑制有显著差异($F = 33.815$, $df = 1$, $P = 0.0044$), 两品系幼虫 EST 酶活性也有显著差异($F = 11.463$, $df = 1$, $P = 0.0276$); 高浓度时, Cu^{2+} 对两品系幼虫 EST 酶活性抑制没有显著差异($F = 3.761$, $df = 1$, $P = 0.1245$), 两品系幼虫的 EST 酶活性也没有显著差异($F = 7.144$, $df = 1$, $P = 0.0556$)。

3 讨论

Cd^{2+} 耐性筛选的结果表明, R_{Cd} 品系幼虫对 Cd^{2+} 的耐性是 S 品系幼虫的 1.89 倍; 在相同处理浓度下, R_{Cd} 品系对镉的积累能力也比 S 品系增强(表 14-3), 生殖力也增强(表 14-6), 这些均说明 R_{Cd} 品系对 Cd^{2+} 的耐性增加。这与 Shirley 和 Sibly (1999) 对黑腹果蝇的报道相类似。但是在体长体重方面没有明显差异(表 14-4)。

Cu^{2+} 耐性筛选的结果表明, R_{Cu} 品系对 Cu^{2+} 的耐性是 S 品系的 1.68 倍(表 14-2), R_{Cu} 品系对 Cu^{2+} 积累的能力增强(表 14-3), 生殖力也增强(表 14-7), 也说明 R_{Cu} 品系对 Cu^{2+} 耐性增加。但在体长体重方面没有表现出显著差异(表 14-5)。

我们的结果表明 R_{Cd} 品系(表 14-8) 和 R_{Cu} (表 14-9) 品系幼虫体内的 MT 水平都比 S 品系的升高, 这可能与它们积累金属能力增强以及耐性增加是相关的。这与 Gill 等 (1989) 有关果蝇和 Sterenberg 等 (2000) 有关弹尾虫的报道相类似。另外, Debec 等 (1985) 报道

表 14-10 R_{Cd} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cd^{2+} 处理后抗氧化酶和解毒酶活性的比较
Table 14-10 Comparison of activities of antioxidant enzymes and detoxification enzymes in *B. peregrine* larvae from R_{Cd} strain and susceptible strain after larvae being exposed to Cd^{2+}

Strains	Enzymes	Parameters	Cd^{2+} concentrations (μ g/g)		
			0	100	800
S	SOD	Activity (U/mg pro)	195.30 $\pm$ 29.50 a	178.19 $\pm$ 16.31 a	100.31 $\pm$ 17.79 b
		Inducement ratio (%)		-8.76 $\pm$ 8.35 a	-48.64 $\pm$ 9.11 b
	CAT	Activity (μ mol/min/mg pro)	34.56 $\pm$ 3.74 a	36.18 $\pm$ 6.51 a	19.57 $\pm$ 12.56 a
		Inducement ratio (%)		4.71 $\pm$ 18.84 a	-43.37 $\pm$ 36.33 a
	GR	Activity (U/mg protein)	0.028 $\pm$ 0.004 b	0.047 $\pm$ 0.003 a	0.039 $\pm$ 0.008 a
		Inducement ratio (%)		22.251 $\pm$ 11.119 a	29.784 $\pm$ 14.454 a
	GST	Activity (μ mol/min/mg pro)	248.34 $\pm$ 34.67 ab	286.02 $\pm$ 28.52 a	189.69 $\pm$ 176.65 b
		Inducement ratio (%)		15.17 $\pm$ 9.27 b	-13.12 $\pm$ 12.78 a
	EST	Activity (μ mol/min/mg pro)	23.69 $\pm$ 5.74 a	18.99 $\pm$ 1.10 ab	12.54 $\pm$ 0.84 b
		Inducement ratio (%)		-19.87 $\pm$ 4.65 b	-47.09 $\pm$ 3.54 a
R_{Cd}	SOD	Activity (U/mg pro)	201.20 $\pm$ 8.17 a	190.35 $\pm$ 5.87 b	117.08 $\pm$ 20.45 b
		Inducement ratio (%)		-5.39 $\pm$ 2.92 a	-41.81 $\pm$ 10.16 b
	CAT	Activity (μ mol/min/mg pro)	51.42 $\pm$ 17.00 a	46.63 $\pm$ 13.67 a	32.70 $\pm$ 15.07 a
		Inducement ratio (%)		-9.31 $\pm$ 26.59 a	-36.41 $\pm$ 29.31 a
	GR	Activity (U/mg protein)	0.028 $\pm$ 0.002 b	0.034 $\pm$ 0.003 ab	0.036 $\pm$ 0.004 a
		Inducement ratio (%)		66.580 $\pm$ 9.412 a	38.802 $\pm$ 28.720 a
	GST	Activity	237.64 $\pm$ 29.83	268.88 $\pm$ 28.15	225.78 $\pm$ 46.35
		Inducement ratio (%)		13.15 $\pm$ 11.847 a	-4.99 $\pm$ 19.50 a
	EST	Activity	24.06 $\pm$ 0.44 a	11.26 $\pm$ 1.36 b	6.67 $\pm$ 1.20 c
		Inducement ratio (%)		-53.21 $\pm$ 5.64 b	-72.27 $\pm$ 5.00 a

数据为平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm S.D.$)。Duncan's 新复极差法检验表明, 同一行中具相同小写字母的数据间差异未达显著水平 ($P < 0.05$)。The values are means $\pm$ standard deviation. In the same row, there are not significantly different among the data with the same lowercase letter at $P < 0.05$ (Duncan's multiple range test).

在果蝇的细胞系中的加入 Cd^{2+} 后, 可以诱导到 MT, 并且稳定的耐 Cd 细胞系 ($Cd R_{200}$) 中的 MT 的量是原来细胞用 Cd^{2+} 诱导后的 22 倍多。在耐铜和耐镉的酵母品系中 MT 水平也显著升高 (Tohoyama *et al.*, 1995)。

与 S 品系幼虫 SOD 酶活性相比, R_{Cd} 品系的和 R_{Cu} 品系的都未表现出差异, 这说明 SOD 不是幼虫对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 产生耐性的原因。与 S 品系幼虫 CAT 酶活性相比, R_{Cd} 品系的和 R_{Cu} 品系的都表现出显著差异, 这表明 CAT 可能与幼虫对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 产生耐性有关。与 S 品系幼虫 GR 酶活性相比, R_{Cd} 品系的有差异, 而 R_{Cu} 品系的没有差异, 这说明 GR 可能与幼虫对 Cd^{2+} 的耐性有关, 而与对 Cu^{2+} 的耐性无关。与 S 品系幼虫 GST 酶活性相比, R_{Cd} 品系的和 R_{Cu} 品系的都没有显著差异, 这表明 GST 可能与幼虫对 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 产生耐性有关。

与 S 品系幼虫 EST 酶活性相比, RCd 品系的有差异, 而 R_{Cu} 品系的没有差异, 这说明 GST 可能与幼虫对 Cd²⁺ 的耐性有关, 而与对 Cu²⁺ 的耐性无关。目前还没有发现有关这些酶与金属耐性的研究, 大多数学者往往研究重金属胁迫对酶活的影响, 从而把它们当作生物标志物。我们的结果显示, 棕尾别麻蝇幼虫经 Cd²⁺ 和 Cu²⁺ 处理后, 除了 GR 酶活性升高外, 其它 4 种酶的活性降低。这可能是因为在细胞水平 Cd²⁺ 可以通过代替金属辅因子或与必需硫醇群结合来抑制 SOD 和 CAT 等解毒活性氧的酶。这导致 O₂^{·-} 增加和 OH⁻ 的产生, 从而导致脂质过氧化和氧化胁迫 (Beyersmann and Hechtenberg, 1997; Korsloot *et al.*, 2004), 最终影响到 GST 和 EST 的酶活性。一定浓度的 Cd²⁺ 诱导可以诱导 GSH (Beyersmann and Hechtenberg, 1997), 而 GR 通过还原 GSSG 可以使得 GSH 再生, 这也许是 Cd²⁺ 处理后 GR 活性升高的原因。

表 14-11 R_{Cu} 品系和 S 品系棕尾别麻蝇幼虫经 Cu²⁺ 处理后抗氧化酶和解毒酶活性的比较

Table 14-10 Comparison of activities of antioxidant enzymes and detoxification enzymes in *B. peregrine* larvae from R_{Cu} strain and susceptible strain after larvae being exposed to Cu²⁺

Strains	Enzymes	Parameters	Cu ²⁺ concentrations (μg/g)		
			0	100	800
S	SOD	Activity (U/mg pro)	183.62 ± 24.03 a	190.41 ± 19.08 a	108.25 ± 11.06 b
		Inducement ratio (%)		3.70 ± 10.39 a	-41.04 ± 6.02 b
	CAT	Activity (μmol/min/mg pro)	34.56 ± 3.74 a	20.69 ± 6.36 b	23.19 ± 4.75 b
		Inducement ratio (%)		-40.11 ± 18.40 a	-32.88 ± 13.74 a
	GR	Activity (U/mg protein)	0.028 ± 0.004 b	0.028 ± 0.004 b	0.036 ± 0.004 a
		Inducement ratio (%)		-0.82 ± 15.53 a	28.70 ± 13.72 a
	GST	Activity (μmol/min/mg pro)	248.34 ± 34.67 a	268.91 ± 35.63 a	171.20 ± 21.17 b
		Inducement ratio (%)		8.28 ± 14.35 b	-31.06 ± 8.52 a
	EST	Activity (μmol/min/mg pro)	23.69 ± 5.74 a	14.22 ± 0.22 b	11.95 ± 0.95 b
		Inducement ratio (%)		-40.00 ± 0.95 b	-49.55 ± 4.01 a
R _{Cu}	SOD	Activity (U/mg pro)	193.56 ± 12.76 a	201.09 ± 22.86 a	125.41 ± 10.64 b
		Inducement ratio (%)		3.89 ± 11.81 a	-35.21 ± 5.50 b
	CAT	Activity (μmol/min/mg pro)	49.58 ± 11.82 a	33.83 ± 3.81 ab	28.98 ± 5.76 b
		Inducement ratio (%)		-31.76 ± 7.69 a	-41.54 ± 11.62 a
	GR	Activity (U/mg protein)	0.030 ± 0.002 a	0.030 ± 0.007 a	0.034 ± 0.003 a
		Inducement ratio (%)		0.69 ± 22.79 a	14.53 ± 9.70 a
	GST	Activity (μmol/min/mg pro)	264.42 ± 43.42 a	179.39 ± 15.18 b	329.97 ± 50.74 a
		Inducement ratio (%)		-32.16 ± 5.74 a	24.79 ± 19.19 b
	EST	Activity (μmol/min/mg pro)	22.15 ± 1.25 a	15.52 ± 0.50 b	9.32 ± 1.02 c
		Inducement ratio (%)		-29.96 ± 2.25 b	-57.93 ± 4.62 a

第三部分 总 讨 论

总 讨 论

棕尾别麻蝇体内存在有效的重金属内稳态调控和解毒机制。棕尾别麻蝇幼虫主要通过消化道从食物中摄取重金属,其中一部分直接通过消化道排出体外,一部分在其特殊组织进行吸收,铜主要在中肠的杯状细胞(cuprophilic cell)内被吸收,镉在中肠上皮细胞被吸收,这与Durliat等(1995)报道类似。吸收在中肠细胞的重金属离子可能有以下几个去向:

(1) 这些重金属离子可能在第一位置诱导MT并整合这些金属。通过结合MT,重金属变得没有了活力,细胞毒性被阻止。从而变成无毒的形式。我们已经分离纯化了其MT,说明这种方式确实存在。金属硫蛋白整合的一部分重金属可能会通过中肠上皮细胞的周期性脱落而排除体外。另外,MT蛋白在细胞内合成后可能迅速与溶酶体结合,这在黑腹果蝇中有过报道(Silar *et al.*, 1990)。

(2) 重金属也能被中肠细胞区室化(compartmentalization)整合,即贮存在矿物颗粒体(往往是细胞中的部分溶酶体片断),在那里金属与特殊化合物牢牢结合,往往不再脱落。这在以前已经有过报道(Hopkin, 1989; Dallinger, 1993; Posthuma and van Straalen, 1993)。Hopkin (1989)描述了四种类型的颗粒(图 15-1),这些颗粒也在果蝇中肠上皮细胞出现(Lauverjat *et al.*, 1989)。我们在超微结构观察中也发现了B型颗粒,从而证明通过区室化重金属离子被贮存。那么金属离子是如何转运到溶酶体中的呢?我们推断 Cd^{2+} 诱导的溶酶体蛋白CDR-5(cadmium-inducible lysosomal protein CDR-5)在其中起了重要作用,因为我们在蛋白质组学的研究中已经发现了这种蛋白与 Cd^{2+} 耐性有关,而Dong等(2005)报道了线虫*Caenorhabditis elegans* CDR可以把 Cd^{2+} 和其它离子泵入溶酶体内。

(3)另外,一些昆虫能通过细胞分泌除去金属,如囊泡的胞外分泌(exocytosis)(Dallinger, 1993; Lauverjat *et al.*, 1989)。在我们的研究中没有涉及到这方面的内容。但是我们在棕尾别麻蝇中肠内发现了p-糖蛋白(p-glycoprotein, pGp),这种蛋白有从细胞泵出 Cd^{2+} 的作用(Callaghan and Denny, 2002; Endo *et al.*, 2002)。因此,可以推断棕尾别麻蝇中肠上皮细胞中的 Cd^{2+} 也时时被排出细胞外。

昆虫整合重金属的能力主要依靠颗粒的数量和MT储存及运输重金属到细胞溶酶体片断的能力(Posthuma and van Straalen, 1993)。但是这样的金属累积是有限的,一旦中肠负担太重,容纳和吸收不了过量的重金属,重金属则开始侵入血淋巴和脂肪体。马氏管可以吸收血淋巴中的金属离子,并通过后肠排出体外;中肠上皮细胞也可以从肠腔和血淋巴吸收重金

属 (Dallinger, 1993; Posthuma and van Straalen, 1993)。因此重金属在棕尾别麻蝇体内的调控成内稳态平衡 (图 15-2)。

虽然棕尾别麻蝇能够在体内稳态调控重金属,但是当重金属超过一定阈值时,仍然会对导致棕尾别麻蝇体内代谢的紊乱,并产生毒性效应。在个体水平表现为:体重减轻、体长变小、发育历期延长、成虫寿命缩短和繁殖力下降等。在器官水平表现为:中肠的变粗变短,表面产生瘤状突起,中肠微绒毛损伤,我们在解剖过程中还发现表皮韧性降低。在细胞水平上表现为:细胞存活率降低;亚细胞结构的改变,如核质的浓缩,线粒体的肿胀和空泡;粗面内质网膨胀或是囊化,甚至空泡化;以及脂滴数量减少等。在生化水平表现为:能量化合物含量降低,能量水平降低,酶活性降低。

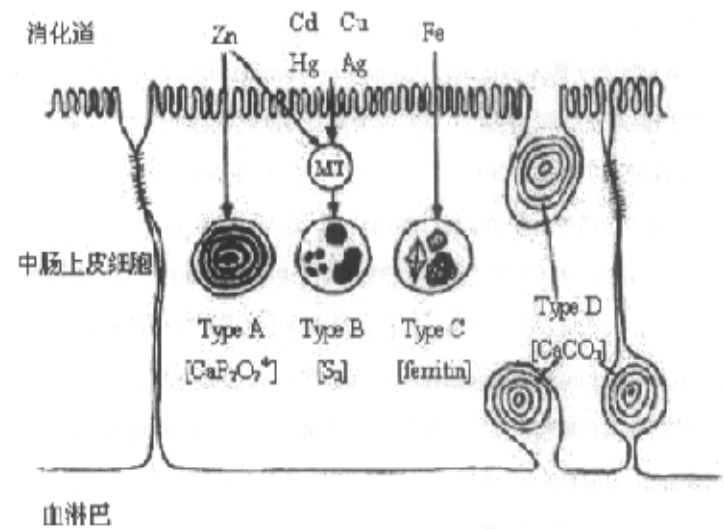


图 15-1 在无脊椎动物细胞内的细胞空泡的颗粒体类型和组成 (Hopkin, 1989)

Fig. 15-1 Types and composition of cellular vacuolar-enclosed concretions in invertebrate cells

Hopkin 描述了涉及到阳离子和阴离子的 A、B、C、D 四种类型的的颗粒体,阳离子与矿物颗粒体结合并分别与特定的阳离子和阴离子一起。MT: 金属硫蛋白。Four types of intracellular (types A, B, C) and extracellular (type D) concretions involving both cations and anions have been described with elemental analysis. Cationic metals associate with concretions which appear to illustrate specificity toward both cations and anions. M: Metallothionein.

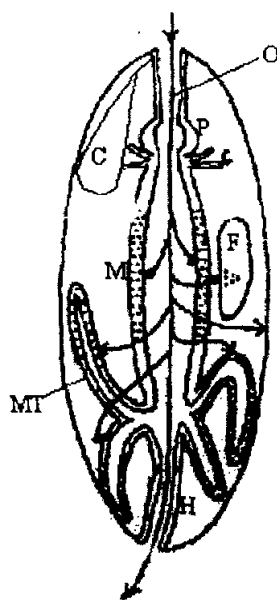


图 15-2 棕尾别麻蝇体内重金属离子的动态平衡

Fig. 15-2 Metal homeostasis in the body of *Boettcherisca peregrina*



金属贮存场所 Storage sites of heavy metal



金属转运途径 Tranportion way of heavy metal

C: 嗉囊; O: 食道; P: 前胃; M: 中肠; H: 后肠; MT: 马氏管; F: 脂肪体
C, crop; O, oesophagus; P, proventriculus; M, midgut; H, hindgut; MT, malpighian tubes.

本文的创新之处

(1) 系统的研究了 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对棕尾别麻蝇生长发育、历期、生殖等方面的影响，为该蝇作为环境指示生物监测环境重金属污染提供依据。

(2) 通过透射电镜观察 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 引起的中肠和马氏管上皮细胞的变化，展示了二者对棕尾别麻蝇细胞及亚细胞的毒性影响。同时还观察到贮存重金属的颗粒体结构，证明棕尾别麻蝇中肠可以通过这种结构整合并贮存重金属。

(3) 通过研究 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 对血细胞数量、存活和延展的影响，证明了重金属可以影响昆虫的细胞免疫。

(4) 研究了 Cd^{2+} 和 Cu^{2+} 处理后棕尾别麻蝇血淋巴化学组成及能量水平的变化，得出重金属可以通过影响棕尾别麻蝇能量化合物合成，从而为阐明重金属干扰生物正常新陈代谢过程的机理提供依据，也为解释重金属对生长生殖的毒性影响提供参考。

(5) 对棕尾别麻蝇金属硫蛋白进行了分离纯化及性质鉴定, 为进一步研究 MT 在棕尾别麻蝇体内贮存重金属的机制建立基础。

(6) 用蛋白质组技术研究棕尾别麻蝇在重金属 Cd 胁迫下的中肠蛋白变化, 鉴定了两个重要的金属离子转运蛋白 CDR 和 pGp, 这在研究重金属在昆虫体内的内稳态平衡具有重要的意义; 发现了热激蛋白 Hsp, 在重金属胁迫研究中具有重要意义。

(7) 筛选耐性品系研究昆虫适应重金属的生理生化机制, 得出耐性增加与金属硫蛋白表达增加有关, 而与几种保护酶 SOD、CAT、GST 和 EST 无相关性。

今后的研究方向

棕尾别麻蝇对重金属适应是其生理综合调控的过程, 在这个过程中, 一些蛋白如 MT、CDR、pGp 等起了重要作用。对这些蛋白的研究将是非常有意义的。棕尾别麻蝇 MT 已经被提纯, 但是, 尚有许多工作有待深入, 主要包括以下几方面: 棕尾别麻蝇 MT 一级结构的测定; 棕尾别麻蝇 MT 的定位及在变态过程中的变化, 可采用免疫手段检测, 或用 Western 杂交检测; 采用基因工程的手段, 将棕尾别麻蝇 MT cDNA 通过载体转移到 *E.coli* 中进行重组表达, 为 MT 的应用研究作探索。而对于 CDR、pGp 在棕尾别麻蝇及果蝇外的大部分昆虫还是一个崭新的领域。

有关重金属对昆虫毒性机制的研究还有很多工作要做, 如 Cd 如何扰乱 Ca 稳态平衡, 如何抑制 SOD 和 CAT 等解毒活性氧的酶, 如何影响昆虫的免疫系统等等。

参考文献

- 安琪, 王振刚, 刘宝芳, 江长层, 1998. 砷与铅对人及大鼠红细胞脂质过氧化作用的影响. 卫生研究, 27: 312-314.
- 陈敏, 谢吉民, 高晓钦, 荆俊杰, 2000. 铅对小鼠肝肾毒作用的机理探讨. 镇江医学院学报, 10: 620-622
- 邓碧玉, 袁勤生, 1991. 改良的连苯三酚自氧化测定超氧化物歧化酶活性的方法. 生物化学和生物物理进展, 18: 163
- 冯慧编著, 1989. 昆虫生物化学分析法. 北京: 农业出版社. 8-15
- 高代全, 张书岭, 2000. 低浓度铅对儿童健康的影响. 微量元素与健康研究, 18: 76
- 庚晋和周洁, 2002. 重金属污染触目惊心. 金属世界, 2: 14-15
- 何秀萍, 蔡向荣, 怀文辉, 张博润, 2000. 桑蚕金属硫蛋白基因在大肠杆菌中的克隆和表达. 微生物学报, 40: 384-388
- 贾秀英, 董爱华, 2003. Cd、Cr (VI)及复合污染对鲫鱼组织脂质过氧化的影响. 浙江大学学报(农业与生命科学版), 29: 326-328
- 孔繁翔, 2000. 环境生物学. 高等教育出版社, 5
- 李光, 郭郁芳, 井立滨, 张柏清, 赵雅茹, 陶勇, 王晓斌, 徐肇翔, 2000. 母亲血铅对婴幼儿智商的影响研究. 中国公共卫生, 16: 390-391
- 李静, 江国红, 常改, 2003. 铅污染的途径及铅毒性. 预防医学文献信息, 9: 698-700
- 李仙粉, 任福民, 汝宜红, 许兆义, 2003. 北京市生活垃圾中重金属元素污染特性调查. 中国环境监测, 19: 41-44
- 李毅平, 龚和, 1998. 昆虫体内抗氧化系统研究进展. 生命科学, 10: 240-243
- 梁称福, 陈正法, 刘明月, 2002. 蔬菜重金属污染研究进展. 湖南农业科学, 4: 45-48
- 刘杰, 1998. 镉的毒性和毒理学研究进展. 中华劳动卫生职业病杂志, 16: 1-4
- 刘瑞明, 刘毓谷, 1990. 镉的肝细胞毒性与脂质过氧化关系的研究. 中国环境科学, 10: 187-190
- 美浓真, 1994. 生物体内活性氧清除系统——抗氧化物. 日本医学介绍, 15: 295-296
- 聂继云, 董雅凤, 2002. 果园重金属污染的危害与防治. 中国果树, 1: 44-47
- 牛长缨, 2000. 家蝇对重金属的反应及有关金属硫蛋白的研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2000
- 浅田浩二, 1994. 生物体内活性氧清除系统——抗氧化酶. 日本医学介绍, 15: 293-294

- 秦税, 1998. 城市居室装修对儿童铅负荷影响的调查. 中国公共卫生, 14: 287
- 任旭红, 任旭华, 1999. 铅污染及其危害. 中国公共卫生, 15: 839-841
- 任育红, 杨加华, 吴江涛, 刘玉鹏, 茹炳根, 2002. 5种藻类金属硫蛋白的初步研究. 生物技术, 11: 9-11
- 茹炳根, 1998. 第四届国际金属硫蛋白会议简介. 生命科学, 10: 157-158.
- 茹炳根, 潘爱华, 黄秉乾, 张建业, 1991. 金属硫蛋白. 生物化学与生物物理进展, 18: 254-259, 289.
- 沈维干, 季全兰, 李朝军, 荀爱华, 陈兰, 1999. 镉对小鼠卵母细胞成熟体外受精的影响. 中国环境科学, 19: 536-538
- 沈晓明, 1998. 儿科医生在儿童铅中毒防治中的作用. 中华儿科杂志, 36: 137-138
- 唐启义, 冯明光, 2002. 实用统计分析及其DPS数据统计分析系统. 北京: 科学出版社
- 田晓光, 陶琳, 李杰, 陈晓燕, 1998. 舍蝇幼虫金属硫蛋白的提取和测定. 大连医科大学学报, 20: 23-25.
- 王焕校, 2000. 污染生态学. 高等教育出版社, 1
- 王江峰, 1999. 若干尸食性蝇类形态学及生长发育规律用于死后间隔时间判断的基础研究[D]. 杭州: 浙江大学, 78
- 王凯荣, 1997. 我国农田镉污染现状及其治理利用对策. 农业环境保护, 16: 274-278
- 王夔, 1991. 生命科学中的微量元素(上卷). 北京: 中国计量出版社, 1-10
- 王夔, 1996. 生命科学中的微量元素. 北京: 中国计量出版社, 114-124
- 王夔等, 1988. 生物无机化学. 北京: 清华大学出版社
- 王贤, 刘丽波, 杨杰, 2000. 低浓度铅接触女工血铅与红细胞游离原卟啉的关系. 卫生研究, 29: 362-363
- 吴怡, 杨华平, 1998. 金属硫蛋白对大鼠体内铅促排作用的研究. 环境与健康杂志, 15: 251-255
- 熊亚, 2003. 环境铅接触对健康的影响. 微量元素与健康研究, 20: 48-50
- 胥宝会, 冯兆良, 丁桂英, 于佩华, 1989. 镉引起脂质过氧化作用的研究. 中国环境科学, 9: 115-116
- 袁宝珊, 1998. 吴宜群. 环境铅污染与儿童健康. 微量元素与健康研究, 25: 193-198
- 张文清, 海春旭, 龚书明, 1994. 铜对大鼠肝脏脂质过氧化作用的影响. 中国环境科学, 14: 13-16
- 张铨, 薛彬, 魏雪滔, 雷志明, 刘湛, 周弘, 1999. 镉免疫毒性机理的初步探讨. 中国环境科学, 19: 530-535
- 张义贤, 1997. 重金属对大麦毒性研究. 环境科学学报, 17: 199-205
- 张毓琪, 陈叙龙, 1993. 环境生物毒理学. 天津大学出版社, 1-2
- E.I 奥西埃著, 罗锦新, 张德正译, 1987. 生物无机化学导论. 北京: 化学工业出版社, 468-478

- Aebi H, 1984. Catalase in vitro. *Methods Enzymol.*, 105: 121 – 126.
- Alazemi BM, Lewis JW, Andrews EB, 1996. Gill damage in the freshwater fish *Gnathonemus petersii* (family: Mormyridae) exposed to selected pollutants: an ultrastructural study. *Environ. Technol.*, 17: 225 – 238.
- Albert C, Landis H, André T, 1999. Experimental evidence for cadmium uptake via calcium channels in the aquatic insect *Chironomus staegeri*. *Aquat. Toxicol.*, 44: 255 – 262.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD, 1995. Biologie moléculaire de la cellule. Flammarion: Médecine-Sciences, Paris.
- Ali SF, Bondy SC, 1989. Triethyllead-induced peroxidative damage in various regions of the rat brain. *J. Toxicol. Environ. Health*, 26: 235 – 242.
- Allen MM, Harding JDJ, 1962. Experimental copper poisoning in pigs. *Vet. Rec.*, 74: 173 – 179.
- Andersen HR, Andersen O, 1993. Effects of dietary α -tocopherol and β -carotene on lipid peroxidation induced by methyl mercuric chloride in mice. *Pharmacol. Toxicol.*, 73: 192 – 201.
- Antholine WE, Kalyanaraman B, Petering DH, 1985. ESR of copper and iron complexes with antitumor and cytotoxic properties. *Environ. Health Perspect.*, 64: 19 – 35.
- Aoki Y, Natori S, 1982. Activation of latent ribonuclease on the fat-body of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*) larvae on pupation. *J. Biochem.*, 196: 699 – 703.
- Aoki Y, Suzuki KT, 1984. Excretion of cadmium and change in the relative ratio of iso-cadmium-binding proteins during metamorphosis of fleshfly (*Sarcophaga peregrina*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 78C: 315 – 317.
- Aoki Y, Hatakeyama S, Suzuki KT, 1989. Comparison of cadmium binding protein induction among mayfly larvae of heavy metal resistant (*Baetis thermicus*) and susceptible species (*B. yoshinensis* and *B. sahoensis*). *Comp. Biochem. Physiol.*, 93C : 345 – 347.
- Bagchi D, Bagchi M, Hassoun EA, Stohs SJ, 1996. Cadmium-induced excretion of urinary lipid metabolites, DNA damage, glutathione depletion, and hepatic lipid peroxidation in Sprague- Dawley rats. *Biol. Trace Elem. Res.*, 52 (2): 143 – 154.
- Bagchi D, Bagchi M, Stohs SJ, Ray SD, Kuszynski, CA, Pruess HG, 2000. Free radicals and grape seed proanthocyanidin extract: importance in human health and disease prevention. *Toxicol.*, 148: 187 – 197.
- Bakir F, Damluji SF, Amin-Zaki L, 1973. Methylmercury poisoning in Iraq. *Science*, 181: 230 – 241.
- Ballan-Dufrançais C, 1970. Données cytophysiologiques sur un organe excréteur particulier d'un insecte, *Blatella germanica* L (Dictyoptère). *Z. Zellforsch*, 109: 336 – 355.
- Ballan-Dufrançais C, 1972. Ultrastructure de l'iléon de *Blatella germanica* L (Dictyoptère) Localisation, genèse et

- composition des concrétions minérales intracytoplasmiques. *Z. Zellforsch*, 133: 163 – 179.
- Ballan-Dufrançais C, 1975. Bioaccumulation minérale, purique et flavinique chez les insectes Méthodes d'étude. Importance physiologique. Thèse de Doctorat d'état Paris.
- Ballan-Dufrançais C, 2002. Localization of metal in cells of Pterygote insects. *Microsc. Res. Tech.*, 56: 403 – 420.
- Ballan-Dufrançais C, Ruste J, Jeantet AY, 1980. Quantitative electron probe microanalysis on insects exposed to mercury. 1. Methods. An approach on the molecular form of the stored mercury. Possible occurrence of metallothionein - like proteins. *Biol. Cell.*, 39: 317 – 324.
- Ballan-Dufrançais C, Truchet M, Dhamelincourt P, 1979. Interest of Raman laser microprobe (MOLE) for the identification of purinic concretions in histological sections. *Biol. Cell.*, 36: 51 – 58.
- Bandara LR, Kennedy S, 2002. Toxicoproteomics — a new preclinical tool. *Drug Discov. Today*, 7: 411 – 418.
- Bano Y, Hasan M, 1989. Mercury induced time-dependent alterations in lipid profiles and lipid peroxidation in different body organs of cat-fish *Heteropneustes fossilis*. *J. Environ. Sci. Health*, 24: 145 – 166.
- Barbehenn RV, 2002. Gut-based antioxidant enzymes in a polyphagous and a graminivorous grasshopper. *J. Chem. Ecol.*, 28: 1329 – 1347.
- Barque JP, Abahamid A, Chacun H, Bonaly J, 1996. Different heat-shock proteins are constitutively overexpressed in cadmium and pentachlorophenol adapted *Euglena gracilis* cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 223: 7 – 11.
- Bauman JW, Liu J, Klaassen CD, 1993. Production of metallothionein and heat-shock proteins in response to metals. *Fund. Appl. Toxicol.*, 21: 15 – 22.
- Beckman JK, Borowitz SM, Greene HL, Burr IM, 1988. Promotion of iron-induced rat liver microsomal lipid peroxidation by copper. *Lipids*, 23: 559 – 563.
- Bengtsson G, Gunnarsson T, Rundgren S, 1985. Influence of metals on reproduction, mortality and population growth in *Onychiurus armatus* (Collembola). *J. Appl. Ecol.*, 22: 967 – 978.
- Benov LC, Benchev IC, Monovich OH, 1990. Thiol antidotes effect on lipid peroxidation in mercury-poisoned rats. *Chem. Biol. Interact.*, 76: 321 – 332.
- Bergmeyer HU, 1963. Methods of enzymatic analysis. New York and London: Academic Press, pp. 875 – 879.
- Berlett BS, Stadtman ER, 1997. Protein oxidation in aging, disease and oxidative stress. *J. Biol Chem.*, 272: 20313 – 20316.
- Beyersmann D, Hechtenberg S, 1997. Cadmium, gene regulation, and cellular signalling in mammalian cells. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 144: 247 – 261.

- Bischof C, 1995. Effects of heavy metal stress on carbohydrate and lipid concentrations in the haemolymph and total body tissue of parasitized *Lymantria dispar* L. larvae (Lymantriidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 112C: 87 – 92.
- Bonneton F, Theodore L, Silar P, Maroni G, Wegnez M, 1996. Response of *Drosophila* metallothionein promoters to metallic, heat shock and oxidative stresses. *FEBS Lett.*, 380: 33 – 38.
- Bouquegneau JM, Ballan-Dufrançais CB, Jeantet AY, 1985. Storage of Hg in the ileum of *Blattella germanica*: Characterization of metallothionein. *Comp. Biochem. Physiol.*, 80: 95 – 98.
- Bournias-Vardiabasis N, Buzin C, Flores J, 1990. Differential expression of heat shock proteins in *Drosophila* embryonic cells following metal ion exposure. *Exp. Cell. Res.*, 189: 177 – 182.
- Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analyt. Biochem.*, 72: 248 – 254.
- Braeckman B, Simoens C, Rzeznik U, Raes H, 1997. Effect of sublethal doses of cadmium, inorganic mercury and methylmercury on the cell morphology of an insect cell line (*Aedes albopictus*, c6/36). *Cell Biol. Int.*, 21: 823 – 832.
- Braeckman B, Smagghe G, Brutsaert N, Cornelis R, Raes H, 1999. Cadmium Uptake and Defense Mechanism in Insect Cells. *Environ. Res.*, 80: 231 – 243.
- Braunbeck T, 1994. Detection of environmentally relevant concentrations of toxic organic compounds using histological and cytological parameters: substance-specificity in the reaction of rainbow trout liver. In: Møller R., Lloyd R., editors. Sublethal and chronic effects of pollutants on freshwater fish. Boston: Blackwell Science Publishers. pp. 15 – 21.
- Braunbeck T, Storch V, Bresch H, 1990. Species-specific reaction of liver ultrastructure in zebrafish *Brachydanio rerio* and trout *Salmo gairdneri* after prolonged exposure to 4-chloroaniline. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19: 405 – 418.
- Bremner I, 1979. Copper toxicity studies using domestic and laboratory animals. In: Nriagu JO, ed. Copper in the environment. Part II: health effects. New York: John Wiley & Sons, pp. 285 – 306.
- Bremner I, 1998. Manifestations of copper excess. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67: 1069 – 1073.
- Bremner I, Mehra RK, Morrison JN, Wood AM, 1986. Effects of dietary copper supplementation of rats on the occurrence of metallothionein- I in liver and its secretion into blood, bile and urine. *Biochem J.*, 235: 735 – 739.
- Bremner I. 1987. Involvement of metallothionein in the hepatic metabolism of copper. *J. Nutr.*, 117: 19 – 29.

- Brennan RJ, Schiestl RH, 1996. Cadmium is an inducer of oxidative stress in yeast. *Mutat. Res.*, 356: 171 – 178.
- Broeks A, Gerrard B, Allikmets R, Dean M, Plasterk RH, 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes MRP and MDR contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO J.*, 15: 6132 – 6143.
- Brown BE, 1982. The form and function of metal-containing 'granules' in invertebrate tissues. *Biol. Rev.*, 57: 621 – 667.
- Bryan SE, Frieden E, 1967. Interaction of copper II with desoxyribonucleic acid below 30 °C. *Biochem.*, 6: 2728 – 2734.
- Bull PC, Thomas GR, Rommens JM, Forbes JR, Cox DW, 1993. The Wilson disease gene is a putative copper transporting P-type ATPase similar to the Menkes gene. *Nat. Genet.*, 5: 327 – 337.
- Burkitt MJ, Milne L, Nicotera P, Orrenius S, 1996. 1,10-Phenanthroline stimulates internucleosomal DNA fragmentation in isolated rat-liver nuclei by promoting the redox activity of endogenous copper ions. *Biochem. J.*, 313: 163 – 169.
- Byrd J, Berger RM, McMillin DR, Wright CF, Hamer D, Winge DR, 1988. Characterization of the copper-thiolate cluster in yeast metallothionein and two truncated mutants. *J. Biol. Chem.*, 263: 6688 – 6694.
- Cai L, Koropatnick J, Cherian MG, 1995. Metallothionein protects DNA from copper-induced but not iron-induced cleavage in vitro. *Chem. Biol. Interact.*, 96: 143 – 155.
- Callaghan A, Denny N, 2002. Evidence for an interaction between p-glycoprotein and cadmium toxicity in cadmium-resistant and -susceptible strains of *Drosophila melanogaster*. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 52: 211 – 213.
- Callahan HL, Beverley SM, 1991. Heavy metal resistance: a new role for P-glycoproteins in *Leishmania*. *J. Biol. Chem.*, 266: 18427 – 18430.
- Carr RS, Williams JW, Saska FI, Buhl RS, Neff JM, 1985. Bioenergetic alterations correlated with growth, fecundity and body burdens of cadmium in Mysids (*Mysidopsis bahia*). *Environ. Toxicol. Chem.*, 4: 181 – 188.
- Cervera A, Maymó AC, Martínez-Pardo R, Garcerá MD, 2003. Antioxidant enzymes in *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae) exposed to cadmium. *Environ. Entomol.*, 32: 705 – 710.
- Cervera A., Maymó AC, Sendra M, Martínez-Pardo R, Garcerá MD, 2004. Cadmium effects on development and reproduction of *Oncopeltus fasciatus* (Heteroptera: Lygaeidae). *J. Insect Physiol.*, 50: 737 – 749.
- Chan PC, Peller OG, Kesner L, 1982. Copper(II)-catalyzed lipid peroxidation in liposomes and erythrocyte membrane. *Lipids*, 17: 331 – 337.

- Chapman RF, 1982. The insect , structure and function. 3rd ed. Hodder and Stoughton, London.
- Chapman T, Liddle L, Kalb JM, Wolfner MF, Partridge L, 1995. Cost of mating in *Drosophila melanogaster* females is mediated by male accessory gland products. *Nature*, 373: 241–244.
- Charlwood J, Skehel M., King N, Camilleri P, Lord P, Bugelski P, Atif U, 2002. Proteomic analysis of rat kidney cortex following treatment with gentamicin. *J. Proteome Res.*, 1: 73 – 82.
- Cheng Y, Schwartz J, Vokonas PS, Weiss ST, Aro A, Hu H, 1998. Electrocardiographic conduction disturbances in association with low-level lead exposure (the Normative Aging Study). *Am. J. Cardiol.*, 82: 594 – 599.
- Cherian MG, Ferguson PJ, 1997. Metallothionein in cytotoxicity and genotoxicity of metals. In: Hadjiladis, N.D. (Ed.), Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 217 – 229.
- Cheville NF, 1994. Ultrastructural Pathology: An introduction to interpretation. 1st ed. Ames, Iowa: Iowa State University Press. pp. 67 – 68.
- Chin TA, Templeton DM, 1993. Protective elevations of glutathione and metallothionein in cadmium-exposed mesangial cells. *Toxicol.*, 77: 145 – 156.
- Chinni S, Yallapragada PR, 2002. Energy Levels of *Penaeus indicus* Postlarvae on Exposure to Lead. *Ecotoxic. Environ. Saf.*, 52: 173–179
- Chubatsu LS, Gennari M, Meneghini R, 1992. Glutathione is the antioxidant responsible for the resistance to oxidative stress in V79 Chinese hamster fibroblasts rendered resistant to cadmium. *Chem. Biol. Interact.*, 82: 99 – 110.
- Chuttani HK, Gupta PS, Gulati S, Gupta DN, 1965. Acute copper sulfate poisoning. *Am. J. Med.*, 39: 849 – 854.
- Coombs TL, 1980. Heavy metal pollutants in the aquatic environment. *Anim. Environ. Fitness*, 1: 283 – 302.
- Cooper GP, Suszkiw JB, Manalis RS, 1984. Heavy metals: effects on synaptic transmission. *Neurotoxic.*, 5: 247 – 266.
- Courgeon AM, Maisonhaute C, Best-Belpomme M, 1984. Heat shock proteins are induced by cadmium in *Drosophila* cells. *Exp. Cell Res.*, 153: 515 – 521.
- Crawford LA, Hodkinson ID, Lepp NW, 1995. The effect of elevated host-plant copper and cadmium on the performance of the aphid *Aphis fabae* (Homoptera: Aphididae). *J. Appl. Ecol.*, 32: 528 – 535.
- Crawford LA, Hodkinson ID, Lepp NW, 1990. The effects of feeding by the black bean aphid *Aphis fabae* Scop. (Homoptera: Aphididae) on copper and cadmium accumulation in broad bean (*Vicia faba* L.). *Environ. Geochem. Health*, 12: 245 – 251.

- Crawford LA, Lepp N. W., Hodkinson ID. 1996. Accumulation and egestion of dietary copper and cadmium by the grasshopper *Locusta migratoria* R and F (Orthoptera: acrididae). *Environ. Pollut.*, 92: 241 – 246.
- Cruz PD, 1995. Basic science answers to questions in clinical contact dermatitis. *American J. Contact Dermatitis*, 6: 34 – 39.
- Cutler P, Bell DJ, Birrell HC, Connelly JC, Connor SC, Holmes E, Mitchell BC, Monte SY, Neville BA, Pickford R, Polley S, Schneider K, Skehel JM, 1999. An integrated proteomic approach to studying glomerular nephrotoxicity. *Electrophoresis*, 20: 3647 – 3658.
- DalleDonne I, Milzani A, Colombo R, 1997. Actin assembly by cadmium ions. *Biochim. Biophys.*, 1357: 5 – 17.
- Dallinger R, 1993. Strategies of metal detoxification in terrestrial invetebrates. In: *Ecotoxicology of Metals in Invertebrates* (Dallinger R and Rainbow PS, Eds.). Lewis Publishers, Boca Raton, FL, pp. 245 – 290.
- Dallinger R, Prosi F, 1988. Heavy metals in the terrestrial isopod *Porcellio scaber* Latreille. II. Subcellular fraction of metal-accumulating lysosomes from hepatopancreas. *Cell Biol. Toxicol.*, 4: 97 – 109.
- Daum JR, Shepherd DM, Noelle RJ, 1993. Immunotoxicology of cadmium and mercury on B-lymphocytes--I. Effects on lymphocyte function. *Int. J. Immunopharmacol.*, 15: 383 – 394
- David B, 1994. Attentional correlates of dentin and bone lead levels in adolescents. *Arch. Environ. Health*, 49: 98 – 105.
- Davis LE, Kornfield M, Mooney HS, 1994. Methylmercury poisoning: Long-term clinical, radiological, toxicological, and pathological studies of an affected family. *Ann. Neurol.*, 35: 680 – 688.
- Debec A, Mokdad R, Wegnez M, 1985. Metallothioneins and resistance to cadmium poisoning in *Drosophila* cells. *Biochem. Biophys. Res. Comm.*, 127: 143 – 152.
- Di Giulio R, Benson W, Sander B, Van Veld P, 1995. Biochemical mechanisms: metabolism, adaptation and toxicity. In: Rand GM, editor. *Fundamentals of aquatic toxicology: effects, environmental fate and risk assessment*, 2nd ed. Washington, DC: Taylor and Francis. pp. 523 – 561.
- Dickson GW, Giesy JP, Briese LA, 1982. The effect of chronic cadmium exposure on phosphoadenylate concentrations and adenylate charge of gills and dorsal muscle of crayfish. *Environ. toxicol. Chem.*, 1: 147 – 165.
- Ding GS, Liang YY, 1991. Antidotal effects of dimercaptosuccinic acid. *J. Appl. Toxicol.*, 11: 7 – 14.
- Ding Y, Vaziri ND, Gonick HC, 1998. Lead-induced hypertension. II. Response to sequential infusions of L-arginine, superoxide dismutase, and nitroprusside. *Environ. Res.*, 76: 107 – 113.
- Domenech J, Palacios O, Villarreal L, Gonzalez-Duarte P, Capdevila M, Atrian S. 2003 MTO: the second member

- of a *Drosophila* dual copper-thionein system. *FEBS Lett.*, 533: 72 – 78.
- Donaldson WE, Knowles SO, 1993. Is lead toxicosis a reflection of altered fatty acid composition of membranes? *Comp. Biochem. Physiol.*, 104C : 377 – 379.
- Dong J, Song MO, Freedman JH, 2005. Identification and characterization of a family of *Caenorhabditis elegans* genes that is homologous to the cadmium-responsive gene *cdr-1*. *Biochim. Biophys. Acta*, 1727:16 – 26.
- Druet P, 1995. Metal-induced autoimmunity. *Hum. Exp. Toxicol.*, 14: 120 – 121.
- Durliat M, Bonneton F, Boissonneau E, Andre M, Wegnez M, 1995. Expression of metallothionein genes during the post-embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Biometals*, 8: 339 – 351.
- Durliat M, Bonneton F, Boissonneau E, Andre M, Wegnez M, 1995. Expression of metallothionein genes during the post-embryonic development of *Drosophila melanogaster*. *Biometals*, 8: 339 – 351.
- Eaton DL, Toal BF, 1982. Evaluation of the Cd/hemoglobin affinity assay for the rapid determination of metallothionein in biological tissues. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 66: 134 – 142.
- Einicker-Lamas M, Morales MM, Miranda K, Garcia-Abreu J, Oliveira AJ, Silva FL, Oliveira MM. 2003. P-glycoprotein-like protein contributes to cadmium resistance in *Euglena gracilis*. *J. Comp. Physiol.*, 173: 559 – 564.
- Endo T, Kimura O, Sakata M, 2002. Effects of P-glycoprotein inhibitors on cadmium accumulation in cultured renal epithelial cells, LLC-PK₁, and OK. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 185: 166 – 171.
- Engel DW, Roesijadi G, 1987. Metallothionein: a monitoring tool. In *Pollution Physiology of Estuarine Organisms* (ed. W. B. Vernberg, A. Calabrese, F. P. Thurberg, and J. Verneberg). Columbia: University of South Carolina Press. pp. 421– 438.
- Errais N, Silar P, Cadic-Jacquier A, Mokdad-Gargouri R, Wegnez M, 1989. The metallothionein system of *Drosophila melanogaster*. *UCLA Sym. Mol. Cell. Biol. New Ser.*, 98: 91– 99.
- Everard LB, Swain R, 1983. Isolation, characterization and induction of metallothionein in the stonefly *Eusthenia spectabilis* following exposure to cadmium. *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C: 275 – 280.
- Evering WEND, Haywood S, Bremner I, Trafford J, 1991. The protective role of metallothionein in copper overload. I. Differential distribution of immunoreactive metallothionein in copper-loaded rat liver and kidney. *Chem. Biol. Interact.*, 78: 283 – 295.
- Evtushenko ZS, Belcheva NN, Lukyanova ON, 1986. Cadmium accumulation in organs of the scallop *Mizuhopecten yessoensis*-I. Activities of phosphatases and composition and amount of lipids. *Com. Biochem. Physiol.*, 83C: 371 – 376.

- Fain-Maurel MA, Cassier P, Alibert J, 1973. Etude infrastructurale et cytochimique de l'intestin moyen de *Petrobius Maritimus* Leach en rapport avec ses fonctions excrétrices et digestives. *Tissue Cell*, 5: 603 – 631.
- Farber JL, 1990. The role of calcium in lethal cell injury, *Chem. Res. Toxicol.*, 3: 503 – 508.
- Farris MW, 1991. Cadmium toxicity: Unique cytoprotective properties of alpha tocopheryl succinate in hepatocytes. *Toxicol.*, 69: 63 – 77.
- Filshie BK, Poulson DF, Waterhouse DF, 1971. Ultrastructure of the copper accumulating region of the *Drosophila* larval midgut. *Tissue Cell*, 3: 77 – 102.
- Freedman JH, Ciriolo MR, Peisach J, 1989. The role of glutathione in copper metabolism and toxicity. *J. Biol. Chem.*, 264: 5598 – 5605.
- Freedman JH, Slice LW, Dixon D, Fire A, Rubin CS, 1993. The novel metallothionein genes of *Caenorhabditis elegans*: Structural organization and inducible, cell-specific expression. *J. Biol. Chem.*, 268: 2554 – 2564.
- Fuentealba I, Haywood S, Foster J, 1989. Cellular mechanisms of toxicity and tolerance in the copper-loaded rat. II. Pathogenesis of copper toxicity in the liver. *Exp. Mol. Pathol.*, 50: 26 – 37.
- Fuentealba IC, Davis RW, Elmes ME, Jasani B, Haywood S, 1993. Mechanisms of tolerance in the copper-loaded rat liver. *Exp. Mol. Pathol.*, 59: 71 – 84.
- Fukino H, Hirai M, Hsueh YM, Moriyasu S, Yamani Y, 1984. Effect of zinc pretreatment on mercuric chloride-induced lipid peroxidation in the rat kidney. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 73: 395 – 401.
- Garayoa M, Villaro AC, Montuenga L, Sesma P, 1992. Malpighian tubules of *Formica polyctena* (Hymenoptera): light and electron microscopy study. *J. Morphol.*, 214: 159 – 171.
- George SG, 1990. Biochemical and cytological assessments of metal toxicity in marine animals. In *Heavy Metals in the Marine Environment* (ed. R. W. Furness and P. S. Rainbow). Boca Raton: CRC Press. pp. 123 – 142.
- George SG, Pirie BJ, 1979. The occurrence of cadmium in sub-cellular particles in the kidney of the marine mussel, *Mytilus edulis*, exposed to cadmium. The use of electron microprobe analysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 580: 234 – 244.
- Gerber GM, Maes J, Gilliavod N, Casale G, 1978. Brain biochemistry of infant mice and rats exposed to lead. *Toxicol. Lett.*, 2: 51 – 63.
- Ghadially FN, 1988. Ultrastructural pathology of the cell and matrix. London: Butterworths. pp. 130.
- Gill HJ, Nida DL, Dean DA, England MW, Jacobson KB, 1989. Resistance of *Drosophila* to cadmium: biochemical factors in resistant and sensitive strains. *Toxicol.*, 56: 315 – 321.
- Gintenreiter S, Ortel J, Nop HJ, 1993a. Bioaccumulation of cadmium, lead, copper and zinc in successive

- developmental stages of *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae: Lepidoptera): A lifecycle study. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.*, 25: 55 – 61.
- Gintenreiter S, Ortel J, Nopp HJ, 1993b. Effects of different dietary levels of cadmium, lead, copper and zinc on the vitality of the forest pest insect *Lymantria dispar* L. (Lymantriidae: Lepidoptera). *Arch. Environ. Contain. Toxicol.*, 25: 62 – 66.
- Giunta F, Dilandro D, Chiaran M, 1983, Severe acute poisoning from the ingestion of a permanent wave solution of mercuric chloride. *Hum. Toxicol.*, 2: 243 – 246.
- Goering PL, Fisher BR, Kish CL, 1993. Stress protein synthesis induced in rat liver by cadmium precedes hepatotoxicity. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 122: 139 – 148.
- Goering PL, Waalkes MP, Klaassen CD, 1995. Toxicology of cadmium. In: Toxicology of Metals (Goyer RA, Cherian MG, Eds).Springer-Verlag, Berlin, pp. 189 – 214.
- Goldfischer S, 1967. Demonstration of copper and acid phosphatase activity in hepatocyte lysosomes in experimental copper toxicity. *Nature*, 215: 74 – 75.
- Goldfischer S, Bernstein J, 1969. Lipofuscin (aging) pigment granules of the newborn human liver. *J. Cell. Biol.*, 42: 253 – 261.
- Goldman M, Druet P, Gleichmann E, 1991. TH2 cells in systemic autoimmunity: Insights from allogeneic diseases and chemically-induced autoimmunity. *Immunol. Today*, 12: 223 – 227.
- Gouranton J, 1968. Composition, structure et mode de formation des concrétions minérales dans l'intestin moyen des Homoptères Cercopides. *J. Cell Biol.*, 37: 316 – 328.
- Goyer RA, 1991. Toxic effects of metals. In: Arndur, M. O.; Doull, J.; Klaassen, C. D., eds. *Casarett and Doull's toxicology: The basic science of poisons*. 4th ed. New York: Pergamon Press. pp. 629 – 681.
- Graney RL, Giesy JPJ, 1986. Effects of long-term exposure to pentachlorophenol on free amino acid pool and energy reserves of the freshwater amphipod *Gammarus pseudolimnaeus*. *Ecotoxic. Environ. Saf.*, 12: 233 – 251.
- Gstraunthaler G, Pfaller W, Kotanko P, 1983. Glutathione depletion and in vitro lipid peroxidation in mercury or maleate induced acute renal failure. *Biochem Pharmacol.*, 32: 2969 – 2972.
- Gutteridge JMC, 1984. Tissue damage by oxy-radicals: The possible involvement of iron and copper complexes. *Med. Biol.*, 62: 101 – 104.
- Habig WH, Pabst MJ, Jakoby WB, 1974. Glutathione S-Transferases: the first enzymatic step in mercapturic acid synthesis. *J. Biol. Chem.*, 249: 7130 – 7139

- Halliwell B, Gutteridge JMC, 1984. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. *Biochem. J* 219: 1 – 14.
- Hama H, Hosoda A, 1983. High aliesterase activity and Low acetylchoLinesterase sensitivity involved in organophosphorus and carbamate resistance of the brown planthopper. *Appl. Entomol. Zool.*, 18 (4): 475–485.
- Hamer D, 1986. Metallothionein. *Annu. Rev. Biochem.*, 55: 913 – 951.
- Hamilton SJ, Mehrle PM, 1986. Metallothionein in fish: its importance in assessing stress from metal contaminants. *Trans. Am. Fish Soc.*, 115: 596 – 609.
- Harada M, 1995. Minamata disease: methylmercury poisoning in Japan caused by environmental pollution. *Crit. Rev. Toxicol.*, 25: 1 – 24.
- Havelaar AC, de Gast IL, Snijders S, Beerens CE, Mancini GM, Verheijen FW, 1998. Characterization of a heavy metal ion transporter in the lysosomal membrane. *FEBS Lett.*, 436: 223 – 227.
- Haywood S, Loughran ML, Batt RM, 1985. Copper toxicosis and tolerance in the rat. III. Intracellular localization of copper in the liver and kidney. *Exp. Mol. Pathol.*, 43: 209 – 219.
- Heliovaara K, Vaisanen R, 1990. Heavy-meta contents in pupae of *Bupalus pinianus* and *Panolis flammea* near an industrial source. *Environ. Entomol.*, 19: 481 – 485.
- Hensbergen PJ, Donker MH, Hunziker PE, van der Schor RC, van Straalen NM, 2001. Two metal-binding peptides from the insect *Orchesella cincta* (Collembola) as a result of metallothionein cleavage. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 31: 1105 – 1114.
- Hensbergen PJ, Donker MH, Van Velzen MJM, Roelofs D, Van der Schors RC, Hunziker PE, Van Straalen NM, 1999. Primary structure of a cadmium-induced metallothionein from the insect *Orchesella cincta* (Collembola). *Eur. J. Biochem.*, 259: 197 – 203.
- Hensbergen PJ, van Velzen MJM, Nugroho RA, Donker MH, van Straalen NM, 2000. Metallothionein-bound cadmium in the gut of the insect *Orchesella cincta* (Collembola) in relation to dietary cadmium exposure. *Comp. Biochem. Physiol. C Toxicol. Pharmacol.*, 125: 17 – 24.
- Hoare RJ, 1980. Metals in biochemistry. London: Chapman and Hall, pp. 10 – 30.
- Hopkin SP, 1989. Ecophysiology of Metals in Terrestrial Invetebrates. Elsevier Applied Sciences, London.
- Hudecova A, Ginter E, 1992. The influence of ascorbic acid on lipid peroxidation in guinea pigs intoxicated with cadmium. *Food Chem. Toxicol.*, 30: 1011 – 1013.
- Hussain T, Shukla GS, Chandra SF, 1987. Effects of cadmium on superoxide dismutase and lipid peroxidation in liver and kidney of growing rats: In vivo and in vitro studies. *Pharmacol. Toxicol.*, 60: 355 – 358.

- Ingrid S. Dick R, 2003. Field-selected cadmium tolerance in the springtail *Orchesella cincta* is correlated with increased metallothionein mRNA expression. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 33: 741 – 747.
- Ishmael J, Gopinath C, Howell J, 1971. Experimental chronic toxicity in sheep: histological and histochemical changes during development of the changes in the liver. *Res. Vet. Sci.*, 12: 358 – 366.
- Ishmael J, Gopinath C, Howell JM, 1972. Experimental chronic toxicity in sheep: biochemical and haematological studies during the development of changes in the liver. *Res. Vet. Sci.*, 13: 22 – 29.
- Islam A, Roy S, 1983. Effects of CdCl₂ on the quantitative variations of carbohydrate, Protein, amino acid and cholesterol in *Chrysocoris stoll* wolf (Insecta: Hemiptera). *Curr. Sci.*, 52: 215 – 217.
- Jacobson KB, Qpersko L, Owenby RK, Christie NT, 1981. Effects of cadmium on *Drosophila*: toxicity, proteins and transfer RNAs. *Toxic. Appl. Pharmac.*, 60: 368–378.
- Jeantet AY, 1971, Recherches histophysiologiques sur le développement post-embryonnaire et le cycle annuel de *Formica* (Hyinénoptère). II. Particularités histochimiques et ultrastructurales de l'intestin moyen de *Formicapolyctena*. *Foerst Z. Zellforsch*, 116: 405 – 424.
- Jensen A, Bro-Rasirussen F, 1992. Environmental cadmium in Europe. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.*, 125: 101 – 181.
- Jiang Y, Moller G, 1995. In vitro effect of HgCl₂ on murine lymphocytes. I. Preferable activation of CD4+T cells in A responder strain. *J. Immunol.*, 154: 3138 - 3146.
- Krocova Z, Macela A, Kroca M, Hernychova L, 2000. The immunomodulatory effects of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicol. In Vitro.*, 14: 33 – 40.
- Johnson GF, Morell AG, Stockert RJ, Sternlieb I, 1981. Hepatic lysosomal copper protein in dogs with an inherited copper toxicosis. *Hepatology*, 1: 243 – 248.
- Kadiiska MB, Hanna PM, Hernandez L, Mason RP, 1992. In vivo evidence of hydroxyl radical formation after acute copper and ascorbic acid intake: electron spin resonance spin-trapping investigation. *Mol. Pharmacol.*, 42: 723 – 729.
- Kadiiska MB, Hanna PM, Jordan SJ, Mason RP, 1993. Electron spin resonance evidence for free radical generation in copper-treated vitamin E- and selenium-deficient rats: in vivo spin-trapping investigation. *Mol. Pharmacol.*, 44: 222 – 227.
- Kagi JHR, 1991. Overview of metallothionein. *Method Enzymol.*, 205: 613 – 626.
- Kanitz MH, Witzmann FA, Zhu H, Fultz CD, Skaggs S, Moorman WJ, Savage Jr RE, 1999. Alterations in rabbit kidney protein expression following lead exposure as analyzed by two-dimensional gel electrophoresis.

Electrophoresis, 20: 2977 – 2985.

Kasai T, Watanabe T, Inoue K, Hasegawa T, 1993. Purification and some properties of metal-binding proteins in housefly larvae (*Musca domestica*). *Biosci. Biotech. Biochem.*, 57: 1873 – 1887.

Kasprzak KS, 1997. The oxidative damage hypothesis of the metal-induced genotoxicity and carcinogenesis. In: Hadjiladis, N.D. (Ed.), *Cytotoxic, Mutagenic and Carcinogenic Potential of Heavy Metals Related to Human Environment*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp. 73 – 92.

Kawanishi R, 1995. Role of active oxygen species in metal-induced DNA damage. In: *Toxicology of Metals* (Goyer RA, Cherian MG, Eds). Springer-Verlag, Berlin, pp. 349 – 372.

Kennedy S, 2001. Proteomic profiling from human samples: The body fluid alternative. *Toxicol. Lett.* 120: 379 – 384.

Kennedy S, 2002. The role of proteomics in toxicology: Identification of biomarkers of toxicity by protein expression analysis. *Biomarkers*, 7: 1 – 22.

Kille P, Winge DR, Harwood JL, Kay J, 1991. A plant metallothionein produced in *E. coli*. *FEBS Lett.*, 295: 171 – 175.

Kimura O, Endo T, Hotta Y, Sakata M, 2005. Effects of P-glycoprotein inhibitors on transepithelial transport of cadmium in cultured renal epithelial cells, LLC-PK1 and LLC-GA5-COL 150. *Toxicol.*, 208: 123 – 132.

King J, Laemmli UK, 1971. Polypeptides of the tail fibres of bacteriophage T4. *J. Mol. Biol.*, 62: 465–477.

King KY, Horenstein JA, Caparon, MG, 2000. Aerotolerance and peroxide resistance in peroxidase and PerR mutants of *Streptococcus pyogenes*. *J. Bacteriol.*, 182: 5290 – 5299

King TP, Bremner I, 1979. Autophagy and apoptosis in liver during the prehaemolytic phase of chronic copper poisoning in sheep. *J. Comp. Pathol.*, 89: 515 – 529.

Klaassen CD, Choudhuri S, McKim Jr JM, Lehman-McKeeman LD, Kershaw WC, 1994. In vitro and in vivo studies on the degradation of metallothionein. *Environ. Health Perspect.*, 102: 141 – 146.

Klein DK, Bartsch R, Summer KH, 1990. Quantitation of Cu -containing metallothionein by a Cd-saturation method. *Anal. Biochem.*, 189 : 35 – 39.

Koizumi T, Li ZG, 1992. Role of oxidative stress in single-dose, cadmium-induced testicular cancer. *J. Toxicol. Environ. Health*, 37: 25 – 36.

Kojima Y, 1991. Definition and nomenclature of metallothionein. *Method Enzymol.*, 205: 8 – 10.

Komano H, Mizuno D, Natori S, 1980. Purification of lectin induced on the hemolymph of *Sarcophaga peregrina* larvae on injury. *J. Boil. Chem.*, 255: 2919 – 2924.

- Kopp SJ, Barron JT, Tow JP, 1988. Cardiovascular actions of lead and relationship to hypertension: a review. *Environ. Health Perspect.*, 78: 91 – 99.
- Korsloot A, van Gestel CAM, van Straalen NM, 2004. Environmental stress and cellular response in arthropods. CRC Press, Florida, pp. 83 – 88.
- Krocova Z, Macela A, Kroca M, Hernychova L, 2000. The immunomodulatory effects of lead and cadmium on the cells of immune system in vitro. *Toxicol. In Vitro*, 14: 33 – 40.
- Kubicka-Muranui M, Behmer O, Uhrberg M, Klonowski H, Bister J, Gleichmann E, 1993. Murine systematic autoimmune disease induced by mercuric chloride: Hg-specific helper T-cells react to antigen stored in macrophages. *Int. J. Immunopharmacol.*, 15: 151 – 161.
- Lange BW, Langley CH, Stephan W, 1990. Molecular evolution of *Drosophila* metallothionein genes. *Genetics*, 126: 921 – 932.
- Laskowski R, 2001. Why short-term bioassays are not meaningful effects of a pesticide (imidacloprid) and a metal (cadmium) on pea aphids (*Acyrtosiphon pisum* Harris). *Ecotoxicol.*, 10: 177 – 183.
- Lastowski-Perry D, Otto E, Maroni G, 1985. Nucleotide sequence and expression of a *Drosophila* metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 260: 1527 – 1530.
- Latchman DS, 1995. Eukaryotic transcription factors, 2nd ed., Academic Press San Diego CA.
- Lauverjat S, Ballan-Dufrançais C, Wegnez M, 1989. Detoxification of cadmium. Ultrastructural study and electron-probe microanalysis of the midgut in a cadmium-resistant strain of *Drosophila melanogaster*. *BioMetals*, 2: 97 – 107.
- Lawton LJ, Donaldson WE, 1991. Lead-induced tissue fatty acid alterations and lipid peroxidation. *Biol. Trace Elem. Res.*, 28: 83 – 97.
- LeBel CP, Ali SF, Bondy SC, 1992. Deferoxamine inhibits methyl mercury - induced increases in reactive oxygen species formation in rat brain. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 112 : 161 – 165.
- Lhonore J, 1971. Données cytophysiologiques sur les tubes de Malpighi de *Gryllotalpa gryllotalpa* Latr (Orthoptère Gryllotalpidé). *CR Acad. Sci.*, 272: 2788 – 2791.
- Li M, Kondo T, Zhao QL, Li FJ, Tanake K, Arai Y, Zhou ZC, Kasuya M, 2000. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U₉₃₇ cells through Ca²⁺-calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways. *J. Biol.Chem.*, 275: 39702 – 39709.
- Li W, Zhao Y, Chou IN, 1993. Alterations in cytoskeletal protein sulfhydryls and cellular glutathione in cultured cells exposed to cadmium and nickel ions. *Toxicol.*, 77: 65 – 79.

- Li Y, Trush MA. 1993a. Oxidation of hydroquinone by copper: Chemical mechanism and biological effects. *Arch. Biochem. Biophys.*, 30: 346 – 355.
- Li Y, Trush MA. 1993b. DNA damage resulting from the oxidation of hydroquinone by copper: Role for a Cu(II)/Cu(I) redox cycle and reactive oxygen generation. *Carcinogenesis*, 7: 1303 – 1311.
- Li ZS, Lu YP, Zhen R G, Szczypka M, Thiele DJ, Rea PA, 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 94: 42 – 47.
- Lindqvist L, 1992. Accumulation of cadmium, copper, and zinc in five species of phytophagous insects. *Environ. Entomol.*, 21: 160 – 163.
- Lindqvist L, 1994. Metal uptake and accumulation during growth of *Aglais urticae* (Lepidoptera: Nymphalidae) larvae. *Environ. Toxicol.*, 23: 975 – 978.
- Lindqvist L, Block M, 1995. Excretion of cadmium during moulting and metamorphosis in *Tenebrio molitor* (Coleoptera; Tenebrionidae). *Comp. Biochem. Physiol.*, 111C: 325 – 328.
- Lippard S. J. and Berg J. M., 1994. Principles of bioinorganic chemistry. University Science Books, pp. 97.
- Liu J, Kershaw WC, Klaassen CD, 1991. The protective effect of metallothionein on the toxicity of various metals in rat primary hepatocyte culture. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 107: 27 – 34.
- Lockitch G, 1993. Perspectives on lead toxicity. *Clin. Biochem.*, 26: 371 – 381.
- Lohmann RD, Beyersmann D, 1993. Cadmium and zinc mediated changes of the Ca^{2+} dependent endonuclease in apoptosis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 190: 1097 – 1103.
- Lund BO, Miller DM, Woods JS, 1991. Mercury-induced H_2O_2 production and lipid peroxidation in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 42: 181 – 187.
- Luoma SN, Johns C, Fisher NS, Steinberg NA, Oremland RS, Reinfelder JR, 1992. Determination of selenium bioavailability to a benthic bivalve from particulate and solute pathways. *Environ.Sci. Technol.*, 26: 485 – 491.
- Lund BO, Miller DM, Woods JS, 1993. Studies on Hg(II)- induced H_2O_2 formation and oxidative stress in vivo and in vitro in rat kidney mitochondria. *Biochem. Pharmacol.*, 45: 2017 – 2024.
- Manca D, Ricard AC, Trottier B, Chevalier G, 1991. Studies on lipid peroxidation in rat tissues following administration of low and moderate doses of cadmium chloride. *Toxicol.*, 67: 303 – 323.
- Mant TG, Lewis JL, Mattoo TK, 1987. Mercury poisoning after disc-battery ingestion. *Hum. Toxicol.*, 6: 179 – 181.
- Margoshes M, Vallee BL, 1957. A cadmium protein from equine kidney cortex. *J. Am. Chem. Soc.*, 79: 1813 – 1814.

- Marigomez JA, Cajaraville MP, Angulo E, 1990. Cellular cadmium distribution in the common winkle, *Littorina littorea* (L.) determined by X-ray microprobe analysis and histochemistry. *Histochem.*, 94: 191 – 199.
- Maroni G, Ho AS, Theodore L, 1995. Genetic control of cadmium tolerance in *Drosophila melanogaster*. *Environ. Health Perspect.*, 103: 116 – 118.
- Maroni G, Lastowski-perry D, 1985. Effects of heavy metals on *Drosophila* larvae and a metallothionein, cDNA. *Environ. Health Perspect.*, 65: 107 – 116.
- Maroni G, Otto E, Lastowski-perry D, 1986. Molecular and cytogenetic characterization of a metallothionein gene of *Drosophila*. *Genetics*, 112: 493 – 504.
- Maroni G, Watson D, 1985. Uptake and binding of cadmium, copper, and zinc by *Drosophila melanogaster*. *Insect Biochem.*, 15: 55 – 63
- Maroni G, Wise J, Young JE, Otto E, 1987. Metallothionein gene duplications and metal tolerance in natural populations of *Drosophila melanogaster*. *Genetics*, 117: 739 – 744.
- Marshall AT, Cheung WWK, 1974. Studies on water and ion transport in homopteran insects: ultrastructure and cytochemistry of the cicadoid and cercopoid Malpighian tubules and alter chambers. *Tissue Cell*, 6: 153 – 171.
- Marshall AT, Schroen C, Condon RJ, 1994. X-ray microanalysis of renal proximal tubules in cadmium-treated rats. *J. Submicrosc. Cytol. Pathol.*, 26: 59 – 66
- Martinez M, Torreblanca A, Ramo JD, Diaz-Mayans J, 1994. Effects of sublethal exposure to lead on levels of energetic compounds in *Procambarus clarkii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 52: 729 – 733.
- Maryński M, Kramarz P, Laskowski R, Niklińska M, 2002. Decreased energetic reserves, morphological changes and accumulation of metals in carabid beetles (*Poecilus cupreus* L.) exposed to zinc- or cadmium-contaminated food. *Ecotoxicol.*, 11: 127 – 139.
- Mason AZ, Jenkins KD, 1995. Metal detoxication in aquatic organisms. In *Metal Speciation and Bioavailability in Aquatic Systems*, 3 (ed. A. Tessier and D. R. Turner). Chichester: Wiley. pp. 479 – 608.
- Mathova A, 1990. Biological effects and biochemical alterations after long-term exposure of *Galleria mellonella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae to cadmium containing diet. *Acta Entomol. Bohemoslov.*, 87: 241 – 248.
- Mattingly KS, Beaty BJ, Mackie RS, McGaw M, Carlson JO, Rayms-Keller A, 2001. Molecular cloning and characterization of a metal responsive *Chironomus tentans* alpha-tubulin cDNA. *Aquat. Toxicol.*, 54: 249 – 260.
- McCahon C P, Pascoe D, 1991. Brief-exposure of first and fourth instar *Chironomus riparius* larvae to equivalent assumed doses of cadmium: effects on adult emergence. *Water, Air and Soil Pollut.*, 60: 395 – 403.

- McCord JM, Fridovich I, 1969. Superoxide Dismutase. An enzymic function for erythrocyte hemocuprein (hemocuprein). *J. Biol. Chem.*, 244: 6049 – 6055.
- Mehra RK, Bremner I, 1984. Species differences in the occurrence of copper- metallothionein in the particulate fractions of the liver of copper- loaded animals. *Biochem. J.*, 219: 539 – 546.
- Milne L, Nicotera P, Orrenius S, Burkitt MJ, 1993. Effects of glutathione and chelating agents on copper-mediated DNA oxidation: Pro-oxidant and antioxidant properties of glutathione. *Arch. Biochem. Biophys.*, 304: 102 – 109.
- Mokdad R, Debec A, Wegnez M, 1987. Metallothionein genes in *Drosophila melanogaster* constitute a dual system. *Proc. Natl. Sci. USA*, 79: 2658 – 2662.
- Morris CA, Nicolaus B, Sampson V, Harwood JL, Kille P, 1999. Identification and characterization of a recombinant metallothionein protein from a marine alga, *Fucus vesiculosus*. *Biochem. J.*, 338: 553 – 560.
- Mu JY, Xu HF, Rong XL, 1996. General Textbook of Entomology. Beijing: Chinese Agriculture Press. pp. 114 – 134.
- Muller L, 1986. Consequences of cadmium toxicity in rat hepatocytes: Mitochondrial dysfunction and lipid peroxidation. *Toxicol.*, 40: 285 – 292.
- Munger C, Hare L, 1997. Relative importance of water and food as cadmium sources to an aquatic insect (*Chaoborus punctipennis*) implications for predicting Cd bioaccumulation in nature. *Environ. Sci. Technol.*, 31: 891 – 895.
- Munger C, Hare L, 2000. Influence of ingestion rate and food types on cadmium accumulation by the aquatic insect *Chaoborus*. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 57: 327 – 332.
- Munger C, Hare L, Tessier A, 1999. Cadmium sources and exchange rates for *Chaoborus* larvae in nature. *Limnol. Oceanogr.* 44: 1763 – 1771.
- Myers BM, Prendergast FG, Holman R, Kuntz SM, Larusso NF, 1993. Alterations in hepatocyte lysosomes in experimental hepatic copper overload in rats. *Gastroenterology*, 105: 1814 – 1823.
- NaKamatsu Y, Tanaka T, 2003. Venom of ectoparasitoid, *Euplectrus* sp. near *plathypenae* (Hymenoptera: Eulophidae) regulates the physiological state of *Pseudaletia separata* (Lepidoptera: Noctuidae) host as a food resource. *J. Insect Physiol.*, 49: 149 – 159.
- Nicotera P, Bellomo G, Orrenius S, 1990. The role of calcium in cell killing. *Chem. Res. Toxicol.*, 3: 484 – 494.
- Nieboer E, Richardson DHS, 1980. The replacement of the nondescript term “heavy metals” by a biologically and chemically significant classification of metal ions. *Environ. Pollut.*, 1: 3 – 26.

- Nielson KB, Winge DR, 1983. Order of metal binding in metallothionein. *J. Biol. Chem.*, 258: 13063 – 13069.
- Niu C Y, Jiang Y, Lei C L, Hu C, 2002. Effects of cadmium on housefly: influence on growth and development and metabolism during metamorphosis of housefly. *Entomol. Sin.*, 9: 27 – 33.
- Niu CY, Lei CL, Hu C, 2000. Studies on a cadmium induced metallothionein in housefly larvae, *Musca domestica*. *Entomol. Sin.*, 7 (4): 351 – 358.
- Novello F, Stirpe F. 1969. The effect of copper and other ions on the ribonucleic acid polymerase activity of isolated rat liver nuclei. *Biochem. J.*, 111: 115 – 119.
- Ochi T, Takahashi K, Ohsawa M, 1987. Indirect evidence for the induction of a prooxidant state by cadmium chloride in cultured mammalian cells and a possible mechanism for the induction. *Mutat. Res.*, 180: 257 – 266.
- Ohta T, 1987. Simulating evolution by gene duplication. *Genetics*, 115: 207 – 213.
- Oikawa S, Kurasaki M, Kojima Y, Kawanishi S, 1995. Oxidative and nonoxidative mechanisms of site-specific DNA cleavage induced by copper-containing metallothionein. *Biochem.*, 34: 8763 – 8770.
- Ortel J, 1991. Effect of lead and cadmium on chemical composition and total water content of the pupal parasitoid, *Pimpla turionellae*. *Entomol. Exp. Appl.*, 59: 93–100.
- Ortel J, 1995. Effects of metals on the total lipid content in the gypsy moth (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepid) and its hemolymph. *Bull. Environ. Contamin. Toxicol.*, 55: 216 – 221.
- Ortel J, 1996. Metal-supplemented diets alter carbohydrate levels in tissue and hemolymph of gypsy moth larvae (*Lymantria dispar*, Lymantriidae, Lepidoptera) . *Environ. Toxicol. Chem.*, 15: 1171 – 1176.
- Ortel J, Vogel WR, 1989. Effect of lead and cadmium on oxygen consumption and life expectancy of the pupal parasitoid, *Pimpla turionella*. *Entomol. Exp. Appl.*, 52: 83 – 88.
- Ortiz DF, Ruscitti T, McCue KF, Ow DW, 1995. Transport of Metal-binding Peptides by HMT1, A Fission Yeast ABC-type Vacuolar Membrane Protein. *J. Biol. Chem.*, 270: 4721 – 4728.
- Otto E, Young JE, Maroni G, 1986. Structure and expression of a tandem duplication of the *Drosophila* metallothionein gene. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 83: 6025 – 6029.
- Otvos JD, Armitage IM, 1980. Structure of the metal clusters in rabbit liver metallothionein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 7094 – 7098.
- Otvos JD, Olafson RW, Armitage IM, 1982. Structure of an invertebrate metallothionein from *Scylla serrata*. *J. Biol. Chem.*, 257: 2427 – 2431.
- Ozawa T, Ueda J, Shimazu Y, 1993. DNA single strand breakage by copper (II) complexes and hydrogen peroxide

- at physiological conditions. *Biochem. Mol. Biol. Intern.*, 31: 455 – 461.
- Palmiter RD, 1998. The elusive function of metallothioneins. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 95: 8428 – 8430
- Pawert M, Triebkorn R, Graff S, Berkus M, Schulz J, Kohler HR, 1996. Cellular alteration in collembolan midgut cells as a marker of heavy metal exposure: ultrastructure and intracellular metal distribution. *Sci. Total Environ.*, 181: 187 – 200.
- Pelletier L, Pasquier R, Guettier C, Vial MC, Mandet Ch, Nochy D, Bazin H, Druet P, 1988. HgCl₂ induced T and B cells to proliferate and differentiate in BT rats. *Clin. Experimen. Immunol.*, 71: 336 – 342.
- Perlingeiro RCR, Queiroz MLS, 1994. Polymorphonuclear phagocytosis and killing in workers exposed to inorganic mercury. *Int. J. Immunopharmacol.*, 16: 1011 – 1017.
- Pietsch P, Vohr HW, Degitz K, Gleichmann E, 1989. Immunological alterations inducible by Mercury compounds. II. HgCl₂ and gold sodium thiomalate enhance serum IgE and IgG concentrations in susceptible mouse strains. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 90: 47 – 53.
- Posthuma L, 1990. Genetic differentiation between populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from heavy metal contaminated sites. *J. Appl. Ecol.*, 27: 609 – 622.
- Posthuma L, Hogervorst RF, Van Straalen NM, 1992. Adaptation to soil pollution by cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (L.) Collembola. *Arch. Environ. Contain. Toxicol.*, 22: 146 – 156.
- Posthuma L, van Straalen NM, 1993. Heavy-metal adaption in terrestrial invetebrates. A review of occurrence, genetics, physiology and ecological condequences. *Comp. Biochem. Physiol.*, 106C: 11 – 38.
- Poulson DF, Bowen VT, Hilse RM, Robinson AC, 1952. The copper metabolism of *Drosophila*. *Proc. Natl. Acad. Sci U.S.A.*, 38: 912 – 921.
- Queiroz MLS, Perlingeiro RCR, Dantas DCM, Bizzacchi JMA, DeCapitani EM, 1994. Immunoglobulin levels in workers exposed to inorganic mercury. *Pharmacol. Toxicol.*, 74: 72 – 75.
- Rabitsch WR, 1995a. Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. I. *Environ. Pollut.*, 90: 221 – 237.
- Rabitsch WR, 1995b. Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. II. Formicidae. *Environ. Pollut.*, 90: 239 – 247.
- Rabitsch WR, 1995c. Metal accumulation in arthropods near a lead/zinc smelter in Arnoldstein, Austria. III. Arachnida. *Environ. Pollut.*, 90: 249 – 257.
- Radhakrishnaiah K, Busappa B, 1986. Effect of cadmium on the carbohydrate metabolism of the freshwater field crab. *Oziotelphusa senex*. *J. Environ. Biol.* 73: 17 – 21.

- Raina RM, Pawar P, Sharma RN, 2001. Developmental inhibition and reproductive potential impairment in *Musca domestica* L. by heavy metals. *Indian J. Exp. Biol.*, 39: 78 – 81.
- Ramstoeck ER, Hoekstra WG, Ganther HE, 1980. Trialkyllead metabolism and lipid peroxidation in vivo in vitamin E- and selenium-deficient rats as measured by ethane production. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 54: 251 – 257.
- Rathore RS, Sanghui PK, Swarup H, 1979. Toxicity of cadmium chlorid and lead nitrate to *Chironomus tentans* larvae. *Environ. Pollut.*, 18: 173 – 177.
- Rayms-Keller A, Olson KE, McGaw M, Oray C, Carlson JO, Beaty BJ, 1998. Effect of heavy metals on *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae) larvae. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 39: 41 – 47.
- Reddy MS, Rao KVR, 1988. Modulation of carbohydrate metabolism in the selected tissues of marine prawn under phosphamidon induced stress. *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 15: 212 – 220.
- Reed DJ, 1990. Review of the current status of calcium and thiols in cellular injury. *Chem. Res. Toxicol.*, 3: 495 – 502.
- Rehman S, 1984. Lead-induced regional lipid peroxidation in brain. *Toxicol Lett.*, 21: 333 – 337.
- Renee HS, Victor R, Townsend Jr, Courtney R, Marnie E, Ritter BE, Felgenhauer JH, 2002. Spring morphology and ultrastructure of the malpighian tubules of the Chilean Common Tarantula (Araneae: Theraphosidae). *J. Morphol.*, 251: 73 – 82.
- Riddles PW, Blakeley RL, Zerner B, 1979. Ellman's reagent: 5, 5'-dithiobis (2-nitrobenzoic acid)-a reexamination. *Anal. Biochem.*, 94: 75 – 81.
- Roesijadi G, Robinson W, 1994. Metal regulation in aquatic animals: mechanisms of uptake, accumulation and release. In: Malins D, Ostrander G, editors. Aquatic toxicology: molecular, biochemical, and cellular perspectives. Boca Raton, FL: Lewis Publisher, pp. 387 – 420.
- Roth-Holzappel M, Funke W, 1990. Element content of bark-beetles (*Ips typographus* Linne, *Trypodendron lineatum* Oliver: Scolytidae): A contribution to biological monitoring. *Biol. Fertil. Soils*, 9: 192 – 198.
- Rungby J, Ernst E, 1992. Experimentally induced lipid peroxidation after exposure to chromium, mercury or silver: Interactions with carbon tetrachloride. *Pharmacol. Toxicol.*, 70: 205 – 207.
- Sagripanti J-L, Goering PL, Lamanna A, 1991. Interaction of copper with DNA and antagonism by other metals. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 110: 477 – 485.
- Saito S, Hunziker PE, 1996. Differential sensitivity of metallothionein-1 and -2 in liver of zinc-injected rat toward proteolysis. *Biochim. Biophys. Acta*, 1289: 65 – 70.

- Sapin C, Druet P, Vial MC, Guttman R, Gill TJ, 1987. Polyclonal activation induced by mercuric chloride: Role of RT1-linked genes. *Transplantation Proceedings* 11: 3194 – 3195.
- Sarafian T, Verity MA, 1991. Oxidative mechanisms underlying methyl mercury neurotoxicity. *Int. J. Dev. Neurosci.*, 9: 147 – 153.
- Sarkar S, Yadav P, Bhatnagar D, 1997. Cadmium-induced lipid peroxidation and the antioxidant system in rat erythrocytes: the role of antioxidants. *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 11: 8 – 13.
- Satyavathi C, Khan RN, Prabhakara RY, 2000. Oxygen consumption, ammonia-N excretion and metal accumulation in *Penaeus indicus* postlarvae exposed to lead. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 64: 144 – 151.
- Schlesinger MJ, 1990. Heat shock proteins. *J. Biol. Chem.* 265: 12111 – 12114.
- Schmidt GH, Ibrahim NMM, Abdallah MD, 1991, Toxicological studies on the long-term effects of heavy metals (Hg, Cd, Pb) in soil on the development of *Aiolopus thalassinus* (Fabr.) (Saltatoria: Acrididae) . *Sci. Total Environ.*, 107: 109 – 134.
- Schmidt GH, Ibrahim NMM, Abdallah MD, 1992. Long-term effects of heavy metals in food on developmental stages of *Aiolopus thalassinus* (Saltatoria: Acrididae). *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 23: 375 – 382.
- Semerjian G, 1993. The Role of the National institute of Standards and Technology in U. S. Technology Policy. *Statement of Health*, 2: 13 – 18.
- Shara MA, Dickson PH, Bagchi D, Stohs SJ, 1992. Excretion of formaldehyde, malondialdehyde, acetaldehyde and acetone in the urine of rats in response to 2,3,7,8-tetrachlorodibenzop- dioxin, paraquat, endrin and carbon tetrachloride. *J. Chromatogr.*, 57: 221– 233.
- Shaw AJ, 1989. Heavy metal tolerance in plants: evolutionary aspects. CRC Press.
- Shaw S, Jayatilke E, 1987. Acetaldehyde-mediated hepatic lipid peroxidation: Role of superoxide and ferritin . *Biochem. Bio- phys. Res. Commun.*, 143: 984 – 990.
- Shen Y, Sangiah S, 1995. Na⁺, K⁺-ATPase, glutathione, and hydroxyl free radicals in cadmium chloride-induced testicular toxicity in mice. *Arch. Environ. Contamin. Toxicol.*, 29: 174 – 179.
- Shin BS, Choi RN, Lee CU, 2001. Effects of cadmium on total lipid content and fatty acids of the greater wax moth, *Galleria mellonella*. *Korean J. Ecol.*, 24: 349 – 352.
- Shirley MDF, Sibly RM, 1999. Genetic basis of a between- environment trade-off involving resistance to cadmium in *Drosophila melanogaster*. *Evolution*, 53: 826 – 836.
- Silar P, Theodore L, Mokdad R, Erraiss NE, Cadic A, Wegnez M, 1990. Metallothionein Mto gene of *Drosophila melanogaster*: structure and regulation. *J. Mol. Biol.*, 215: 217 – 224.

- Sildanchandra W, Crane M, 2000. Influence of sexual dimorphism in *Chironomus riparius* Meigen on toxic effects of cadmium. *Environ. Toxicol. Chem.*, 19: 2309 – 2313.
- Silver S, Phung LT, 1996. Bacterial heavy metal resistance: new surprises. *Annu. Rev. Microbiol.*, 50: 753 – 789.
- Simpson SJ, Raubenheimer D, 1993. The central role of the haemolymph in the regulation of nutrient intake in insects. *Physiol. Entomol.*, 18: 395 – 403.
- Smith JB, Dwyer SD, Smith L, 1989. Cadmium evokes inositol polyphosphate formation and calcium mobilization. *J. Biol. Chem.*, 264: 7115 – 7118.
- Sohal RS, Peters PD, Hall TA, 1977. Origin, structure, composition and age-dependence of mineralized dense bodies (concretions) in the midgut epithelium of the adult housefly, *Musca domestica*. *Tissue Cell*, 9: 87 – 102.
- Sohal RS, Peters PD, Hall TA, 1977. Origin, structure, composition and age-dependence of mineralized dense bodies (concretions) in the midgut epithelium of the adult housefly, *Musca domestica*. *Tissue Cell*, 9: 87–102.
- Sokol RJ, Devereaux M, Micrau GW, Hambidge KM, Shikes H, 1990. Oxidant injury to hepatic mitochondrial lipids in rats with dietary copper overload. *Gastroenterology*, 90: 1061 – 1071.
- Sokol RJ, Devereaux MW, O'Brien K, Khandwala RA, Locher JP, 1993. Abnormal hepatic mitochondrial respiration and cytochrome *c* oxidase activity in rats with long-term copper overload. *Gastroenterology*, 105: 178 – 187.
- Sokol RJ, Devereaux MW, Traber MG, Shikes RH, 1989. Copper toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes: effect of vitamin E. *Pediatr. Res.*, 25: 55 – 62.
- Sorour J, 2001. Ultrastructural variations in *Lethocerus niloticum* (Insecta: Hemiptera) caused by pollution in Lake Mariut, Alexandria, Egypt. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 48: 268 – 274.
- Spacies A, Hamelink JL, 1985. Bioaccumulation . In *Fundamentals of aquatic toxicology*. Edited by G M Rand and S R. Petrocelli. Hemisphere Publishing, New York. pp. 495 – 525.
- Stacey NH, Cantilena Jr LR, Klaassen CD, 1980. Cadmium toxicity and lipid peroxidation in isolated rat hepatocytes. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 53: 470 – 480
- Starcher B, Glauber JG, Madaras JG, 1980. Zinc absorption and its relationship to intestinal metallothionein. *J. Nutrit.*, 110: 1391 – 1397.
- Steinbeck MJ, Khan AU, Karnovsky MJ, 1992. Intracellular singlet oxygen generation by phagocytosing neutrophils in response to particles coated with a chemical trap. *J. Biol. Chem.*, 267: 13425 – 13433.
- Steiner S, Aicher L, Raymackers J, Meheus L, Esquer-Blasco R, Anderson NL, Cordier A, 1996. Cyclosporine A

- decreases the protein level of the calcium binding protein calbindin-D 28 kDa in rat kidney. *Biochem. Pharmacol.* 51: 253 – 258.
- Sterenborg L, van Gestel CAM, van Straalen NM, 2000. Metallothionein in different non-tolerant and metal-tolerant populations of the springtail *Orchesella cincta*. *Comp. Biochem. Physiol.*, 126: 1 – 16.
- Stohs SJ, Bagchi D. 1995. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions. *Free Radic. Biol. Med.*, 18: 321 – 336
- Stone JV, Mordue AJ, 1980. Adipokinetic hormone. In: Miller, T. A. (Ed.), *Neurohormonal Techniques in Insects*. Springer, New York, pp. 31 – 80.
- Suda I, Totoki, S, Takahashi H, 1991. Degradation of methyl and ethyl mercury into inorganic mercury by oxygen free radicalproducing systems: Involvement of hydroxyl radical. *Arch. Toxicol.*, 65: 129 – 134.
- Sugawara N, Sugawara C, Sato M, Takahashi H, Mori M, 1992. Excessive accumulation of hepatic copper in LEC rats aged 80 days without hepatitis and 130 days with hepatitis. *Pharmacol. Toxicol.*, 71: 321 – 324.
- Sutherland PW, Burgess EPL, Philip BA, McManus MT, Watson L, 2002. Ultrastructural changes to the midgut of the black field cricket (*Teleogryllus commodus*) following ingestion of potato protease inhibitor II. *J. Insect Physiol.*, 48: 327 – 336.
- Suzuki KT, Aoki Y, Nishikawa M, Masui H, Matsubara F, 1984. Effect of cadmium-feeding on tissue concentration of elements in germ-free silkworm (*Bombyx Mori*) larvae and distribution of cadmium in the alimentary canal. *Com. Biochem. Physiol.*, 79C: 249 – 253.
- Suzuki KT, Sunaga H, Hatakeyama S, 1989. Differential binding of cadmium and copper to the mayfly (*Baetis thermicus*) larvae. *Comp. Biochem. Physiol.*, 94C: 99 – 103.
- Szczypka M, Wemmie JA, Moye-Rowley WS, Thiele DJ, 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance- associated protein. *J. Biol. Chem.*, 269: 22853 – 22857
- Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R, 1989. The human 32-dKa stress protein induced by exposure to arsenite and cadmium ions is heme oxygenase. *FEBS Lett.*, 245: 173 – 176.
- Tan X, Tang C, Castoldi AF, Manzo L, Costa LG, 1993. Effects of inorganic and organic mercury on intracellular calcium levels in rat T lymphocytes. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38: 159 – 170.
- Tanner MS, 1998. Role of copper in Indian childhood cirrhosis. *Am. J. Clin. Nutr.*, 67: 1074 – 1081.
- Tapp RL, 1975. X-ray microanalysis of the midgut epithelium of the fruitfly *Drosophila melanogaster*. *J. Cell Sci.*, 17: 449 – 459.

- Tapp RL, Hochaday A, 1977. Combined X-ray and microanalytical studies on the copper accumulating granules in the midgut of larval *Drosophila*. *J. Cell Sci.*, 26: 201 – 215.
- Theodore L, Ho AS, Maroni G, 1991. Recent evolutionary history of the metallothionein gene Mtn in *Drosophila*. *Genet. Res.*, 58: 203 – 210.
- Thevenod F, Friedmann JM, Katsen AD, Hauser Ingeborg A, 2000. Up-regulation of multidrug resistance p-glycoprotein via nuclear factor-KB activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium and reactive oxygen species-induced apoptosis. *J. Biol.Chem.*, 275: 1887 – 1896.
- Thomann RV, 1981. Equilibrium model of fate of microcontaminants in diverse aquatic food chains. *Can. J. Fish. Aquat. Sci.*, 38: 280 – 296.
- Timmermans KT, Walker PA, 1989. The fate of trace metals during the metamorphosis of chironomids (Diptera, Chironomidae). *Environ. Pollut.*, 62: 73 – 85.
- Tochimoto H, Maki T, Afzal M, Tanabe S, 2003. Accumulation of trace metals in aquatic insect *Stenopsyche marmorata* Navas transferred in streams. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 56: 256 – 264.
- Tohoyama H, Inouhe M, Joho M, Murayama T, 1995. Production of metallothionein in copper- and cadmium-resistant strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Ind. Microbiol.*, 14: 126 – 131.
- Torreblanca A, Del Ramo J, Diaz-Mayans J, 1991. Effects of cadmium on the biochemical composition of the freshwater crayfish *Procambarus clarkii*. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 47: 933 – 938.
- Toyokuni S, Sagripanti JL, 1994. Increased 8-hydroxydeoxyguanosine in kidney and liver of rats continuously exposed to copper. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 126: 91 – 97.
- Tsang SY, Tam SC, Bremner I, Burkitt MJ, 1996. Copper-1,10-phenanthroline induces internucleosomal DNA fragmentation in HepG2 cells, resulting from direct oxidation by the hydroxyl radical. *Biochem. J.*, 317: 13 – 16.
- Turbeck BO, 1974. A study of the concentrically laminated concretions, “spherites”, in the regenerative cells of the midgut of lepidopterous larvae. *Tissue Cell*, 6: 627 – 640.
- Ueno K, Natori S, 1982. Activation of fat body by 20-hydroxyecdysone for selective incorporation of storage protein in *Sarcophaga peregrina* larvae. *Insect Biochem.*, 12: 185 – 191.
- Valls M, Bofill R, Romero-Isart N, González-Duarte R, Abián J, Carrascal M, González-Duarte P, Capdevila M, Atrian S, 2000. *Drosophila* MTN: a metazoan copper– thionein related to fungal forms. *FEBS Lett.*, 467: 189 – 194.
- Van Straalen NM, Burghouts TBA, Doornhof MJ, Groot GM, Janssen MPM., Joosse EGN, van Meerendonk JH,

- Theeuwes J, Verhoef HA, Zoomer HR, 1987. Efficiency of lead and cadmium excretion in populations of *Orchesella cincta* (Collembola) from various contaminated forest soils. *J Appl. Ecol.*, 24: 953 – 968.
- Van Straalen NM, Schobben JHM, De Goede RGM, 1989. Population consequences of cadmium toxicity in soil microarthropods. *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 17: 190 – 204.
- Verberk MM, Willems TE, Verplanke AJ, De Wolff FA, 1996. Environmental lead and renal effects in children. *Arch. Environ. Health*, 51: 83-87.
- Viarengo A, 1989. Heavy metals in marine invertebrates mechanisms of regulation and toxicity at the cellular level. *Crit. Rev. Aquat. Sci.*, 1: 295 – 371.
- Viarengo A, Moore MN, Mancinelli G, Mazzucotelli A, Pipe RK, Farrar SV, 1987. Metallothioneins and lysosomes in metal toxicity and homeostasis in marine mussels: the effect of cadmium in the presence and absence of phenanthrene. *Mar. Biol.*, 94: 251 – 257
- Viarengo A, Moore MN, Pertica M, Mancinelli G, Zanicchi G, Pipe RK, 1985. Detoxification of copper in the cells of the digestive gland of mussel: the role of lysosomes and thioneins. *Sci. Total Environ.*, 44: 135 – 145
- Vilella S, Zonno V, Cassano G, Mafa M, Storelli C, 1991. Na⁺/H⁺ exchange in the kidney of eels *Anguilla anguilla* adapted to sea water or to freshwater environments; studies with brush border membrane vesicles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102 C : 445 – 460.
- Vilella S, Zonno V, Cassano G, Mafa M, Storelli C, 1991. Na⁺/H⁺ exchange in the kidney of eels *Anguilla anguilla* adapted to sea water or to freshwater environments; studies with brush border membrane vesicles. *Comp. Biochem. Physiol.*, 102 C: 445 – 460.
- Virarengo A, Nott JA, 1993. Mechanisms of heavy metal cation homeostasis in marine invertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.*, 404C: 355 – 372
- Wahba ZZ, Coogan TP, Rhodes SW, Waalkes MP, 1993. Protective effects of selenium on cadmium toxicity in rats: Role of altered toxicokinetics and metallothionein. *J. Toxicol. Environ. Health*, 38: 171 – 182.
- Waku Y, Sumimoto K, 1974. Metamorphosis of midgut epithelial cells in the silkworm (*Bombyx mori* L.) with special regard to the calcium salt deposits in the cytoplasm. II. Electron microscope. *Tissue Cell*, 6:127 – 136.
- Walder J, 1976. Host defense mechanisms in the gastrointestinal tract. *Pediatrics*, 57: 901 – 916.
- Wang WX, Fisher NS, 1996. Assimilation of trace elements and carbon by the mussel *Mytilus edulis*: effects of algal food composition. *Limnol. Oceanogr.*, 41: 197 – 207.
- Wang Y, Mackay EA, Zerbe O, Hess D, Hunziker PE, Vasák M, Kägi JHR, 1995. Characterization and sequential localization of the metal clusters in sea urchin metallothionein. *Biochem.*, 34: 7460 – 7467.

- Wang Y, Oberley LW, Murhammer DW. 2001. Antioxidant defense systems of two lepidopteran insect cell lines. *Free Rad. Biol. Med.*, 30: 1254 – 1262.
- Wang Z, Chin TA, Templeton DM, 1996. Calcium-independent effects of cadmium on actin assembly in mesangial and vascular smooth muscle cells. *Cell Motil. Cytoskeleton*, 33: 208 – 222.
- Wang Z, Templeton DM, 1996. Cellular factors mediate cadmium-dependent actin depolymerization. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 139: 115 – 121.
- Warchalowska-Sliwa E, Niklinska M, Gorlich A, Michailova P, Pyza E, 2005. Heavy metal accumulation, heat shock protein expression and cytogenetic changes in *Tetrix tenuicornis* (L.) (Tetrigidae, Orthoptera) from polluted areas. *Environ. Pollut.*, 133: 373 – 381.
- Wemmie JA, Szczypka MS, Thiele DJ, Moye-Rowley WS, 1994. Cadmium tolerance mediated by the yeast AP-1 protein requires the presence of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene, YCF1. *J. Biol. Chem.* 269: 32592 – 32597.
- Wessing A, Zierold K, 1992. Metal-salt feeding causes alterations in concretions in *Drosophila* larval Malpighian tubules as revealed by X-ray microanalysis. *J. Insect Physiol.*, 38: 623 – 632.
- Wessing A, Zierold K, 1996. The importance of the Golgi complex for epithelial ion transport in *Drosophila* Malpighian tubules, studied by electron microscopy, cytochemistry and X-ray microanalysis. *Eur. J. Cell Biol.*, 69: 116 – 127.
- Wigglesworth VB, 1974. Insect physiology. 7th ed. Chapman and Hall. London.
- Williams MV, Winters T, Waddell KS, 1987. In vivo effects of mercury (II) on deoxyuridine triphosphate nucleotidohydrolase, DNA polymerase (alpha, beta), and uracil-DNA glycosylase activities in cultured human cells: Relationship to DNA damage, DNA repair, and cytotoxicity. *Mol. Pharmacol.*, 31: 200 – 207.
- Wilson TG, 2001. Resistance of *Drosophila* to toxins. *Annu. Rev. Entomol.*, 46: 545 – 571.
- Winterbourn CC, 1993. Superoxide as an intracellular radical sink. *Free Rad. Biol. Med.*, 14: 85 – 92.
- Witzmann FA, Fultz CD, Grant RA, Wright LS, Komguth SE, Siegel FL, 1999. Regional protein alterations in rat kidneys induced by lead exposure. *Electrophoresis*, 20: 943 – 951.
- Wolstowski T, Bonda E, Krasowska A, 2004. Photoperiod affects hepatic and renal cadmium accumulation, metallothionein induction, and cadmium toxicity in the wild bank vole (*Clethrionomys glareolus*). *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 58: 29 – 36.
- Woolliams JA, Suttle NF, Wiener G, Field AC, Woolliams C, 1983. The long-term accumulation and depletion of copper in the liver of different breeds of sheep fed diets of differing copper content. *J. Agric. Sci. Camb.*, 100:

- Wu J, Forbes JR, Chen HS, Cox DW. 1994. The LEC rat has a deletion in the copper transporting ATPase gene homologous to the Wilson disease gene. *Nat. Genet.*, 7: 541 – 545.
- Yamada H, Koizumi S, 1993. Induction of a 70-kDa protein in human lymphocytes exposed to inorganic heavy metals and toxic organic compounds. *Toxicol.*, 79: 131 – 138.
- Yamamura M, Suzuki KT, Hatakeyama S, 1983. Tolerance to cadmium and cadmium binding proteins induced in the midge larvae, *Chironomus yoshimatsui* . *Comp. Biochem. Physiol.*, 75C: 21 – 24.
- Zaman K, Macgill RS, Johnson E, Ahmad S, Pardini RS, 1994. An insect model for assessing mercury toxicity: effect of mercury on antioxidant enzyme activities of the housefly (*Musca domestica*) and het cabbage looper moth (*Trichoplusia ni*). *Arch Environ. Contam. Toxicol.*, 26: 114 – 118.
- Zhang B, Egli D, Georgiev O, Schaffner W, 2001. The *Drosophila* homolog of mammalian zinc finger factor MTF-1 activates transcription in response to heavy metals. *Mol. Cell. Biol.*, 21: 4505 – 4514.