

Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 诱导稀有 鲫应激蛋白质的研究

胡 炜 汪亚平 周永欣

(中国科学院水生生物研究所; 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 以稀有 鲫为材料, 研究了应激蛋白质作为生物学指标的敏感性。结果表明, 在无可观察效应浓度下, 经 5d 亚慢性胁迫暴露, 以 Cu^{2+} 为胁迫因子, 稀有 鲫被诱导出约 54KDa 的应激蛋白质; 以 Zn^{2+} 为胁迫因子, 稀有 鲫被诱导出约 94KDa, 67KDa 和 40KDa 的应激蛋白质。应激蛋白质有可能成为一种生物学指标运用于生态风险性早期预警。

关键词: 稀有 鲫; 应激蛋白质; 生物指标; 敏感性

中图分类号: 965.117 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)01-004

当受到环境胁迫时, 生物体发生应激反应(Stress responses), 产生应激蛋白质(Stress protein), 并藉此防止细胞免受胁迫和修复正在遭受的胁迫伤害, 应激反应及应激蛋白质存在于从细菌到人类的所有生物体中。近年来的研究发现, 应激蛋白质有可能成为一种生物指标(Biomarker)而应用于分子生态毒理学研究, 但许多方面只是停留在推测阶段^[1-2]。应激蛋白质作为生物学指标是否具有灵敏性, 尤其是其敏感性与慢性胁迫效应存在怎样的关系? 已成为应激蛋白质能否作为生物指标所必须首先解决的问题。为此, 本试验研究了亚慢性条件下, 稀有 鲫受重金属 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的胁迫后, 应激蛋白质诱导的敏感性, 以探索应激蛋白质作为一种早期预警(Early warning)指标应用于生态风险性评价的可行性。

1 材料与方法

1.1 5d 亚慢性毒性试验 稀有 鲫(*Grobicypris rarus.*) < 3d, 由本所王剑伟博士惠赠, 胁迫因子选用国际上常用的标准参比毒物 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} , 试验用稀释水按 USEPA 标准配制, 硬度 80—100mg/L (CaCO_3), pH 7.4—7.8。胁迫因子浓度依据前文研究结果^[3], 选择无可观察效应浓度(No observable effect concentration, NOEC), 按几何级数设置, 每浓度组及对照组随机放置 25 尾试验鱼, 水温 $25 \pm 1^\circ\text{C}$, 试验采用换水方式进行, 每天投喂两次卤虫(*Artemia salina*)无节幼体, 更新一次试验溶液, 试验持续 5d。

1.2 应激蛋白质制备及 SDS-PAGE 电泳分析 亚慢性毒性试验完毕, 将各试验组稀有 鲫置于 1.5mL 离心管, 冰浴上加蛋白质抽提液(0.1mol/L Tris-Cl, pH 8.0, 0.45mol/L

收稿日期: 2000-01-16; 修订日期: 2000-08-08

基金项目: 淡水生态与生物技术国家重点实验室基金, 中国科学院水生所所长择优基金

作者简介: 胡 炜(1968—), 男, 湖北天门人; 南开大学生物系毕业, 助理研究员; 在职博士研究生

蔗糖, 6mmol/L Vc, 6mmol/L L-半光氨酸, 2mmol/L EDTA) 匀浆, 4℃, 10000r/min, 10min, 取上清, 按 1: 1 体积比与凝胶加样缓冲液(50mmol/L Tris-Cl, pH6. 8, 100mmol/L DTT, 2% SDS, 0. 1% 溴酚蓝, 10% 甘油) 混匀, - 20℃保存备用。采用聚丙烯酰胺垂直板状凝胶电泳分离蛋白质, 分离胶 12%, 积成胶 5%, 考马斯亮蓝染色。所有操作均按“分子克隆”所示方法^[4], 在 PAC-300 型(BIORAD 公司产品) 电泳仪上进行, 电泳结果经 UVP 凝胶成像系统检测分析。

2 结果

2.1 稀有 鲫 5d 亚慢性毒性试验(表 1)

| 表 1 稀有 鲫经 Cu ²⁺ 、Zn ²⁺ 暴露 5d 后的死亡率 | | | | | | | |
|--|----|----|-----------|-----------------------------|----|----|-----------|
| Tab. 1 Mortality of <i>G. rarus</i> larvae after 5d exposed to Copper and Zinc | | | | | | | |
| Cu ²⁺ 浓度(μg/ L) | 试验 | 死亡 | 死亡率(%) | Zn ²⁺ 浓度(μg/ L) | 试验 | 死亡 | 死亡率(%) |
| Concentration | 尾数 | 尾数 | Mortality | Concentration | 尾数 | 尾数 | Mortality |
| 对照 | 25 | 0 | 0 | 对照 | 25 | 0 | 0 |
| 20 | 25 | 1 | 4 | 100 | 25 | 1 | 4 |
| 10 | 25 | 1 | 4 | 50 | 25 | 0 | 0 |
| 5 | 25 | 0 | 0 | 25 | 25 | 0 | 0 |
| 2. 5 | 25 | 0 | 0 | 12. 5 | 25 | 0 | 0 |

由表 1 可知, 稀有 鲫幼鱼经不同浓度 Cu²⁺、Zn²⁺ 处理 5d 后, 各试验组和对照组死亡率不存在显著性差异, 该结果与稀有 鲫亚慢性毒性试验结果相吻合^[3], 即在本试验条件下, 以死亡作为指标, 各浓度组 Cu²⁺、Zn²⁺ 对稀有 鲫幼鱼未观察到毒性效应。

2.2 应激蛋白质 SDS-PAGE 分析

稀有 鲫幼鱼经重金属离子 Cu²⁺、Zn²⁺ 5d 亚慢性胁迫后, 应激蛋白质的诱导结果见图 1—2。

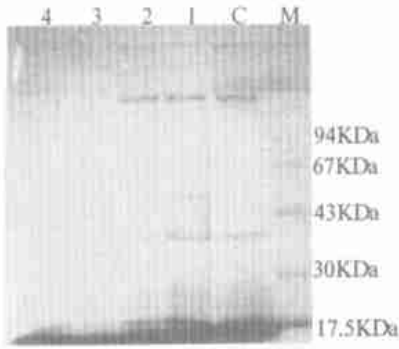


图 1 Cu²⁺ 胁迫诱导稀有 鲫应激蛋白质
Fig. 1 Stress proteins in *G. rarus* larvae induced by Cu²⁺ after 5d exposed

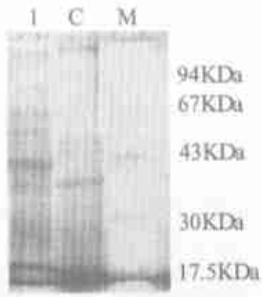


图 2 Zn²⁺ 胁迫诱导稀有 鲫应激蛋白质
Fig. 2 Stress proteins in *G. rarus* larvae induced by Zn²⁺ after 5d exposure

从图 1 可知, 经 Cu²⁺ 亚慢性胁迫暴露 5d 后, 浓度为 20μg/L 及 10μg/L 的试验组稀有 鲫幼鱼被诱导出特异的约 54KDa 的应激蛋白质。图 2 分析表明, 经 Zn²⁺ 亚慢性胁迫

暴露 5d 后,浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 的试验组稀有 鲫幼鱼被诱导出特异的约 94KDa, 67KDa 和 40KDa 的应激蛋白质。上述结果表明,以应激蛋白质为生物指标,稀有 鲫幼鱼对上述浓度组重金属离子的胁迫表现出应激反应,即以生长为测试指标得出的 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 无可观察效应浓度^[3],对稀有 鲫幼鱼存在毒性效应。因此,应激蛋白质作为生物指标,不仅具有敏感性,而且还具备胁迫因子的特异性。

3 讨论

3.1 快速有效地诊断生物体受到的亚致死水平的胁迫,是环境监测中建立生物指标的目的,生物指标的要素之一在于其是否具有比生物死亡、生长受阻或繁殖受影响等传统的测试指标更敏感的特性^[5]。因此,应激蛋白质作为生物学指标是否具有灵敏性,尤其是其敏感性与慢性胁迫效应存在怎样的关系,已成为目前研究的焦点^[6]。Bradley 等研究了造纸排放废水对 类的亚致死毒性,随后认为,当囿于灵敏性等之故,其他方法无法检测分析毒性物资时,应激蛋白质有可能成为一种敏感的测试指标^[7]。同年,Stringham 和 Candido 以 LacZ 为报告基因,研究了在 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 及除草剂百草枯(Paraquat)等污染物胁迫下,转基因线虫应激蛋白质的表达特征,发现应激蛋白质比常规的 LC50 指标更敏感^[8]。贻贝对铜暴露的研究也表明,以应激蛋白质的累积与以生长为测试指标相比,其敏感性要高一个数量级^[9]。然而,迄今尚无人涉及在个体水平上鱼类应激蛋白质诱导的敏感性,更未见有研究鱼类应激蛋白质诱导与慢性胁迫的关系。

3.2 在评价有毒化学物质对水生生物的潜在危险时,生活周期慢性毒性试验资料是重要的依据,鱼类早期生活阶段的亚慢性毒性试验,因其试验结果与慢性试验结果吻合度好,重复性高,从而能迅速有效地预测有毒化学品和工业废水的慢性毒性,是目前进行有毒化学品风险性评价的重要手段之一^[10]。稀有 鲫是我国一种特有的鲤科小型鱼类,是较理想的毒理学研究试验材料,此前的研究发现,经 5d 亚慢性胁迫暴露,以生长为测试指标,标准参比胁迫因子 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 对稀有 鲫幼鱼的最低可观察效应浓度(Lowest observable effect concentration, LOEC)分别为 40 $\mu\text{g/L}$ 和 200 $\mu\text{g/L}$,无可观察效应浓度(NOEC)分别为 20 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ ^[3]。然而,经 20 $\mu\text{g/L}$ 及 10 $\mu\text{g/L}$ 的 Cu^{2+} 胁迫暴露 5d 后,稀有 鲫幼鱼被诱导出约 54KDa 的特异的应激蛋白质;而经 100 $\mu\text{g/L}$ 的 Zn^{2+} 亚慢性胁迫暴露 5d 后,稀有 鲫幼鱼则被诱导出约 94KDa, 67KDa 和 40KDa 的特异的应激蛋白质。上述研究表明,应激蛋白质作为测试指标,反映了生物体对所受环境胁迫在分子水平上的应激,具有比现行鱼类亚慢性毒性试验体系更为敏感的特性,这是迄今第一次从鱼类亚慢性试验的角度出发,研究应激蛋白质作为生物指标的敏感性。不仅如此,应激蛋白质的诱导还表现出胁迫因子的特异性,将有助于甄别复杂环境系统中的毒物作用。因此,应激蛋白质可望成为一种早期预警生物学指标运用于生态风险性研究。而若应激蛋白质一旦成为一种现实的毒理学生物指标,将不仅有助于了解毒物作用的靶器官,阐明毒物作用的毒性机理,而且,由于应激蛋白质存在于从细菌到人类的所有的生物中,具有高度的保守性,其作为生物指标能运用于不同门类的生物,从而避免了其它测试指标因生物体和环境条件的差异而引起的变异等,甚至可能将低等生物的试验结果外推。

参考文献:

- [1] Sanders B M. Stress proteins in aquatic organisms: an environmental perspective [J]. *Crit Rev Toxicol.* 1993, **23**: 49—75
- [2] McCarthy J F, Shugart L R. Biomarkers of environmental contamination[M]. Florida: Lewis Boca Raton, 1990, 165—192
- [3] 胡 炜, 成水平, 周永欣. 稀有 鲫亚慢性毒性试验[J], 水生生物学报, 1998, **22**(4): 336—340
- [4] J 萨姆布鲁克, E F 弗里奇, T 曼尼阿蒂斯, 分子克隆[M]. 北京: 科学出版社, 1992
- [5] Huggett R J, Kimerie R A, Jr Mehrle P M, et al. Enzyme and protein synthesis as indicators of contaminant exposure and effect [M]. Florida: Lewis Boca Raton, 1992, 235—335
- [6] Sanders B M, Dyer S D. Cellular stress response [J]. *Environ. Toxicol. Chem.* 1994, **13**(8): 1209—1210
- [7] Bradley B P, Gonzalez C M, Bond J A, et al. Complex mixture analysis using protein expression as a qualitative and quantitative tool [J]. *Environ. Toxicol. Chem.* 1994, **13**(7): 1043—1050
- [8] Stringham E G, Candido E P M. Transgenic hsp 16 LacZ strains of the soil nematode *Caenorhabditis elegans* biological monitors of environmental stress [J]. *Environ. Toxicol. Chem.*, 1994, **13**(8): 1211—1220
- [9] Sanders B M. Relationships between accumulation of a 60KDa stress protein and scope for growth in *Mytilus edulis* exposed to a range of copper concentrations [J]. *Mar. Environ. Res.* 1991, **31**: 81—97
- [10] Norberg-King, T J. An evaluation of the fathead minnow seven-day subchronic test for estimation chronic toxicity [J]. *Environ. Toxicol. Chem.* 1989, **8**(11): 1075—1089

THE INDUCTION OF STRESS PROTEIN IN *GROBIOCYPRIS* *RARUS* BY Cu^{2+} AND Zn^{2+}

HU Wei, WANG Yaoping and ZHOU Yongxin

(State Key Laboratory for Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology,
The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

Abstract: The sensitivity of stress protein as a biomarker was researched in the project. The experiment was initiated using < 3d old *Grobicypris rarus* larvae according to sub-chronic toxicity test and run for 5d. Special stress proteins of approximately 54KDa or 94KDa, 67KDa and 40KDa were induced in response to Cu^{2+} or Zn^{2+} at the No Observable Effect Concentration, respectively. Compared with the conventional end points such as growth, this assay is a more sensitive and rapid indicator. Therefore, stress protein might be an useful biomarker as an early warning system in risk assessment.

Key words: *Grobicypris rarus*; Stress protein; Biomarker; Sensitivity