

甲基汞在褐牙鲈幼鱼体内蓄积的组织特异性及其对免疫功能和生长的毒性作用

任中华^{1,3}, 曹亮^{1,2,4}, 刘金虎^{1,2,4}, 崔雯婷^{1,3}, 窦硕增^{1,2,3,4}

(1. 中国科学院海洋研究所 中国科学院海洋生态与环境科学重点实验室, 青岛 266071; 2. 青岛海洋科学与技术试点国家实验室 海洋生态与环境科学功能实验室, 山东 青岛 266071; 3. 中国科学院大学, 北京 100049; 4. 中国科学院 海洋大科学研究中心, 山东 青岛 266071)

摘要: 甲基汞(MeHg)对鱼类多种生命过程存在极强的毒性作用, 但有关其对海水鱼类免疫功能的毒性作用研究较少。本文利用实验毒理学方法研究了 MeHg(暴露浓度 0.0, 0.1, 1.0, 10.0, 20.0 μg/L; 暴露时间 30 天)在褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)幼鱼组织(鳃、肝脏和脾脏)中的蓄积特征及其对幼鱼的四种免疫功能生物指示物(溶菌酶 LZM、酸性磷酸酶 ACP、碱性磷酸酶 AKP 和免疫球蛋白 M IgM)和生长的毒性作用。结果表明, 幼鱼体内 MeHg 蓄积量具有显著的浓度依赖性和组织特异性, 各组织对 MeHg 的蓄积能力总体上呈现肝脏>鳃>脾脏的趋势; 四种免疫功能生物指示物(活性或含量)对不同 MeHg 浓度暴露的响应方式各异, 且具有显著的组织特异性; MeHg 达到一定暴露浓度后显著抑制幼鱼的生长。总体而言, MeHg 在褐牙鲈幼鱼体内蓄积, 对其产生免疫毒性, 并抑制幼鱼的生长。此外, ACP、AKP 和 LZM 等免疫性指标能较好的反映对 MeHg 暴露的浓度依赖关系和组织特异性, 可作为海水环境中 MeHg 污染风险评估和生物毒性分析的潜在生物指示物。

关键词: 甲基汞; 褐牙鲈; 免疫功能; 生物指示物; 蓄积; 毒性

中图分类号: S917.4 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2019)05-0071-10

DOI: 10.11759/hyxx20181108002

甲基汞(MeHg)是近海环境中一种持久性有机污染物。在被海洋生物摄取或吸收之后, MeHg 会沿着食物链传递^[1]。自然海水中的 MeHg 浓度通常较低, 但经过食物链的传递、富集和生物放大作用后, 其在一些消费者体内的蓄积浓度可远超其在水体中的浓度^[2-4], 对海洋生物和食品安全造成潜在威胁。

不论食物相还是水相 MeHg 暴露都可能会影响鱼类的繁殖发育和存活生长等生命过程^[5-9]。同时, MeHg 脂溶性强, 易与蛋白质中巯基(-SH)结合并改变蛋白结构和功能, 从而会影响生物大分子合成和能量代谢等生命过程^[10]。此外, MeHg 能引发生物的免疫毒性, 如导致免疫细胞死亡、抑制非特异性免疫和引起免疫功能异常等^[11-12], 最终影响生物种群的繁殖、生长和资源数量变动。

褐牙鲈(*Paralichthys olivaceus*)是我国近海重要的底层经济鱼类和增殖养殖鱼种。过度捕捞和环境变化等多重因素影响已导致其自然种群资源严重衰退。产卵场和育饵场的环境污染是其资源补充衰退和种群数量减少的重要原因之一^[13]。目前国内外有一些关

于汞(Hg)对褐牙鲈早期生命过程的毒性研究^[13-18], 但关于 MeHg 对褐牙鲈早期生活阶段毒理作用的研究报道很少。

本文以褐牙鲈幼鱼为实验对象, 研究暴露实验中 MeHg 在褐牙鲈生物组织中的蓄积特征及其对鱼类生长的影响, 解析免疫功能生物指示物对 MeHg 毒性的响应。开展相关研究有助于深入认识近海污染对鱼类种群补充机制和资源量变动的的影响, 并为渔业资源保护和管理提供科学依据。

收稿日期: 2018-11-08; 修回日期: 2019-01-15

基金项目: 国家重点基础研究发展规划项目(2015CB453302); 国家自然科学基金项目(41406176)

[Foundation: The National Key Basic Research Program, No. 2015CB453302; the National Natural Science Foundation of China, No. 41406176]
作者简介: 任中华(1990-), 男, 山东高密人, 博士研究生, 主要从事海洋生物资源与环境研究, 电话: 0532-82898924, E-mail: renzhonghua16@mails.ucas.ac.cn; 窦硕增, 通信作者, 电话: 0532-82898842, E-mail: szdou@qdio.ac.cn

1 材料与方法

1.1 实验鱼类

实验用褐牙鲈幼鱼(平均体重 6.65 ± 0.49 g, 平均体长 7.42 ± 0.39 cm)取自海阳市黄海水产有限公司。实验开始前, 将 500 尾个体大小相近的幼鱼置于 2 m^3 沙滤海水水池内驯化一周(pH 7.67 ± 0.15 , 盐度 29.92 ± 0.70 , 温度 26.17 ± 1.01 °C, 溶解氧 6.49 ± 0.17 mg/L, 持续充气)。驯化期间, 每日投喂人工配合饵料(粗蛋白 $\leq 50.0\%$ 、粗脂肪 $\leq 8.0\%$ 、粗纤维 $\leq 3.0\%$ 、粗灰分 $\leq 17.0\%$ 、水分 $\leq 9.0\%$ 、其他 $\leq 17\%$)三次, 及时清除池内粪便和残饵; 每天更换一次水体。

1.2 实验设计

本实验研究水体中 MeHg 浓度对不同鱼体组织内的蓄积量及其对免疫功能生物指示物含量(活性)的影响。实验设置一个对照组和四个 MeHg 处理水平组(0.1, 1.0, 10.0, 20.0 $\mu\text{g/L}$), 每组设三个平行。设置 MeHg 浓度时, 先用甲醇(purity $\geq 99.9\%$; Merck KGaA)将氯化甲基汞(纯度 $\geq 99.5\%$; Sigma-Aldrich)配置成浓度为 200 mg/L 母液, 然后通过母液定容稀释将各实验水槽(聚乙烯材质, 200 L 水体)的水体调至 MeHg 标定浓度。从驯化水槽中随机选取 30 尾健康幼鱼置于各实验水槽, 每天按相同方法彻底更换一次实验水体, 持续暴露 30 天。其他实验条件和饲养方法与驯化期间一致。暴露实验结束后, 完成鱼类样品取样。

1.3 样品采集

从实验开始至实验结束的 30 天内, 每隔 5 天从每个处理组的其中一个水槽中取 50 mL 水样, 置于 60 mL 的硼硅玻璃瓶中, 用 HCl(痕量金属级)固定后冷冻(-20 °C)保存至化学测试分析。

实验结束后, 分别从每个实验桶内随机取 5 尾和 8 尾幼鱼, 测量其体长(L_B)。现场解剖鱼体, 分别取鳃、肝脏和脾脏组织, 用生理盐水(0.9% NaCl 溶液)冲洗后, 用吸水纸吸干表面水分后称重, 置于液氮内保存。5 尾组样品用于各组织内生物指示物活性(含量)分析, 8 尾组样品用于各组织内的 MeHg 含量分析。

所有样品的体长数据用于分析 MeHg 浓度对鱼类生长的影响。鱼类体长特定生长率(SGR_L)计算公式为: $\text{SGR}_L = (e^g - 1) \times 100\%$, $g = (\ln L_B - \ln L_0) / t$, 其中, L_0 为鱼类个体初始平均体长(7.42 cm; 实验开始时 50

个幼鱼个体的平均体长), L_B 为个体最终体长(cm), t 为暴露实验天数(d)。

1.4 样品测试分析

1.4.1 生物组织和水样中 MeHg 含量测定

将鳃、肝脏和脾脏组织样品解冻后放入冷冻干燥机内干燥 48 h 后, 研磨样品至粉末状。称取 0.03~0.07 g 粉末状样品置于消化罐(Teflon)中, 加入 25% 的 KOH/CH₃OH 溶液, 于加热套中消解至溶液为清溶液。冷却后, 将消解液和醋酸溶液、1%NaBEt₄ 进行反应, 并用高纯氮气(200 mL/min)对反应后的溶液进行吹扫, 将吹扫后的 Tenax 管通过气相色谱-冷原子荧光光谱联用仪(Brooks Rand Lab., Model III, 美国)测定各生物组织内的 MeHg 含量(单位干重)。

水样解冻后, 取 45 mL 水样置于蒸馏管(Teflon)内, 加入 1%APDC 溶液, 通气后置于加热套内蒸馏 2.5~4 h。利用上述同样方法测定蒸馏后水样中的 MeHg 含量。

1.4.2 组织样品中生物指示物活性(含量)分析

将鳃、肝脏和脾脏组织解冻后放入玻璃匀浆器中, 按照 1:9 重量比加入生理盐水, 在冰浴内匀浆后在冷冻离心机上(4 °C, $12\,000 \times g$, Eppendorf 5804R)离心 15 min, 取其上清液测定酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)、溶菌酶(LZM)和免疫球蛋白 M(IgM)的活性(含量)。ACP、AKP、LZM 和 IgM 的活性(含量)分别依据 Barka 和 Anderson^[19]、Bessey 等^[20]、Parry Jr 等^[21]和 Cuesta 等^[22]的方法测定。其中, ACP 和 AKP 的活性单位表示为每克蛋白质中的酶单位(U/g prot), IgM 的活性单位表示为每升上清液中的酶单位(U/L), LZM 的含量单位表示为每毫升上清液中酶重量($\mu\text{g/mL}$)。总蛋白含量依据 Bradford^[23]的方法测定。使用试剂盒测定四种生物指示物的活性(含量)。按相应说明书(南京建成生物工程研究所)建立反应体系, 利用酶标仪(Biotek Epoch)测定吸光值, 计算酶活性(含量)。

1.5 数据统计与分析

用实测浓度与标定浓度之差的绝对值占标定浓度的百分比表示水体中 MeHg 实测浓度的误差。

利用 Kolmogorov-Smirnov test 和 Levene test 分别检验数据的正态分布和方差齐性。在数据不满足上述条件时对其对数转化, 进行方差分析(ANOVA)。利用单因素方差分析(one-way ANOVA)检验 MeHg 暴露浓度间鱼类生长(SGR_L)的差异显著性。利用双

因素方差分析(two-way ANOVA)检验 MeHg 蓄积量或生物指示物活性(含量)的浓度依赖性和组织特异性。利用多重比较分析(Duncan test)检验鱼类生长、MeHg 蓄积量和各生物指示物活性(含量)在两两实验组之间的差异显著性。

数据统计结果表示为平均值±标准差(Mean±SD), 差异显著水平设置为 $P<0.05$ 。统计分析均在 SPSS 22.0 软件上进行。

2 结果

2.1 实验水体中甲基汞的实测浓度

甲基汞暴露实验的对照组为新鲜沙滤海水, MeHg 实测浓度均 $<10^{-5}$ $\mu\text{g/L}$ 。各实验组水体中的 MeHg 实测浓度误差均 $<20\%$ (表 1), 符合欧洲经济合作发展组织(OECD)关于鱼类毒理实验化合物测定标准^[24]。

表 1 暴露实验水体中甲基汞的标定浓度和实测浓度及其浓度误差

Tab. 1 Nominal and measured MeHg concentrations and the corresponding errors in the test solutions

甲基汞标定浓度 /($\mu\text{g/L}$)	甲基汞测定浓度 /($\mu\text{g/L}$)	误差 /%
0.0	$<10^{-5}$	-
0.1	0.09 ± 0.01	10.7
1.0	0.88 ± 0.02	12.3
10.0	8.76 ± 0.33	12.4
20.0	21.49 ± 1.05	7.5

表 2 甲基汞暴露实验中褐牙鲈幼鱼各组织内甲基汞蓄积量

Tab. 2 MeHg contents in tissues of juvenile flounder during the exposure experiment

甲基汞标定浓度/($\mu\text{g/L}$)	组织内甲基汞蓄积量($\mu\text{g/g}$ 干重)		
	肝脏	鳃	脾脏
0.0	$0.01\pm 0.001^{a***}$	$0.03\pm 0.003^{a***}$	$0.003\pm 0.000\ 3^{a**}$
0.1	$0.05\pm 0.01^{b*}$	$0.09\pm 0.004^{b**}$	$0.13\pm 0.02^{b***}$
1.0	$0.96\pm 0.09^{c***}$	$0.19\pm 0.01^{c**}$	$0.16\pm 0.01^{c*}$
10.0	$7.55\pm 0.13^{d***}$	$6.41\pm 0.15^{d**}$	$1.57\pm 0.01^{d*}$
20.0	$13.38\pm 0.06^{e***}$	$6.86\pm 0.01^{d**}$	$5.41\pm 0.01^{e*}$

注: 不同星号表示特定暴露浓度下组织间差异显著, 不同字母表示特定组织内不同暴露浓度组间差异显著

2.3 甲基汞暴露下免疫功能生物指示物活性(含量)变化

在不同 MeHg 暴露浓度组中, 幼鱼在各组织内的免疫功能生物指示物(酸性磷酸酶 ACP、碱性磷酸酶 AKP、溶菌酶 LZM 和免疫球蛋白 M IgM)的活性(含量)均存在显著的浓度依赖性和组织特异性(two-

2.2 甲基汞在幼鱼各组织内的蓄积及其对鱼类生长的影响

甲基汞在幼鱼各组织内的蓄积量均存在显著的浓度依赖性和组织特异性(two-way ANOVA, $P<0.05$; 表 3)。随着 MeHg 浓度的升高, MeHg 在各组织内的蓄积量均显著升高($P<0.05$); 在特定 MeHg 暴露浓度下, 其蓄积量在不同组织内的差异均为显著($P<0.05$)。

具体而言, 肝脏($0.05\sim 13.38\ \mu\text{g/g}$)和脾脏($0.13\sim 5.41\ \mu\text{g/g}$)中 MeHg 蓄积量在 $0.1\sim 20.0\ \mu\text{g/L}$ 浓度组间差异显著(Duncan test, $P<0.05$), 且均显著高于对照组(肝脏, $0.01\ \mu\text{g/g}$; 脾脏, $0.003\ \mu\text{g/g}$; $P<0.05$; 表 2)。在鳃组织中, MeHg 蓄积量在 $0.1\sim 10.0\ \mu\text{g/L}$ 浓度组间差异显著($0.09\sim 6.41\ \mu\text{g/g}$; $P<0.05$), 且均显著高于对照组($0.03\ \mu\text{g/g}$; $P<0.05$); 而 $20.0\ \mu\text{g/L}$ 浓度组 MeHg 蓄积量($6.86\ \mu\text{g/g}$)与 $10.0\ \mu\text{g/L}$ 浓度组差异不显著($P>0.05$), 但显著高于对照组和其它浓度组($P<0.05$)。总体而言, 在特定暴露浓度下, 肝脏对 MeHg 的蓄积能力明显高于鳃, 脾脏的蓄积能力最弱。

甲基汞暴露显著抑制褐牙鲈幼鱼生长(one-way ANOVA, $P<0.05$)。SGR_L在对照组、0.1、1.0 和 $10.0\ \mu\text{g/L}$ 浓度组分别为 $0.85\pm 0.12\%/d$ 、 $0.83\pm 0.13\%/d$ 、 $0.92\pm 0.15\%/d$ 和 $0.73\pm 0.04\%/d$, 各组间差异均不显著(Duncan test, $P>0.05$), 但在 $20.0\ \mu\text{g/L}$ 浓度组的 SGR_L ($0.50\pm 0.10\%/d$)均显著低于其他实验组($P<0.05$)。

way ANOVA, $P<0.05$; 表 4)。

具体而言, 鳃($97.3\sim 122.6\ \text{U/g prot}$)和肝脏($194.1\sim 221.9\ \text{U/g prot}$)内 ACP 活性在低浓度处理组($0.1\sim 1.0\ \mu\text{g/L}$)显著高于对照组(鳃, $78.8\ \text{U/g prot}$; 肝脏, $120.4\ \text{U/g prot}$; Duncan test, $P<0.05$), 但在高浓度组($10.0\sim 20.0\ \mu\text{g/L}$)其活性(鳃, $57.2\sim 58.3\ \text{U/g prot}$; 肝脏, $24.9\sim 89.5\ \text{U/g prot}$)均显著低于对照组($P<0.05$)。

脾脏内 ACP 活性在最高浓度组(20.0 $\mu\text{g/L}$; 265.3 U/g prot)显著高于对照组(147.2 U/g prot; $P<0.05$), 但在其他实验组之间均无显著差异($P>0.05$; 图 1a)。

表 3 不同暴露浓度下褐牙鲈幼鱼三种组织内甲基汞蓄积量的差异显著性分析

Tab. 3 Results of two-way ANOVA of the effects of MeHg concentration on the bioaccumulation of MeHg in three tissues (gills, liver, and spleen) of juvenile flounder

影响因素	方差	自由度	均方差	统计量	P
浓度	52	4	12.9	13 814	<0.001
组织	2	2	0.8	821	<0.001

与 ACP 活性类似, 鳃(168.9~195.0 U/g prot)和肝脏(240.2~276.7 U/g prot)内 AKP 活性在低浓度处理组(0.1~1.0 $\mu\text{g/L}$)显著高于对照组(鳃, 125.0 U/g prot; 肝脏, 140.6 U/g prot; Duncan test, $P<0.05$), 但在高浓度组(10.0~20.0 $\mu\text{g/L}$)其 AKP 活性(鳃, 46.8~76.6 U/g

prot; 肝脏, 99.4~118.2 U/g prot)均显著低于对照组($P<0.05$)。脾脏内 AKP 活性(234.9~378.1 U/g prot)在高浓度组(10.0~20.0 $\mu\text{g/L}$)显著高于对照组(148.4 U/g prot)和低浓度组(0.1~1.0 $\mu\text{g/L}$)的 AKP 活性(175.6~183.0 U/g prot; $P<0.05$; 图 1b)。

在 1.0~20.0 $\mu\text{g/L}$ 浓度下, 鳃组织内 LZM 含量(0.41~0.65 $\mu\text{g/mL}$)均显著低于对照组(0.94 $\mu\text{g/mL}$)和 0.1 $\mu\text{g/L}$ 组中的含量(0.84 $\mu\text{g/mL}$; Duncan test; $P<0.05$)。在所有处理组中, 肝脏内 LZM 含量(1.90~2.63 $\mu\text{g/mL}$)均显著高于对照组中的含量(0.96 $\mu\text{g/mL}$; $P<0.05$)。脾脏内 LZM 含量除了在 0.1 $\mu\text{g/L}$ 浓度组(1.81 $\mu\text{g/mL}$)显著低于其他实验组中的含量(2.28~2.39 $\mu\text{g/mL}$; $P<0.05$)外, 其他处理组的组间差异不显著($P>0.05$), 且均与对照组无显著差异($P>0.05$)。在各实验组中(对照组除外), 肝脏和脾脏内的 LZM 含量均显著高于鳃内 LZM 的含量(图 2a)。

表 4 甲基汞暴露对褐牙鲈幼鱼三种组织内的四种免疫功能生物指示物活性(含量)的影响

Tab. 4 Results of two-way ANOVA of the effects of MeHg concentration on the activities or contents of four enzymes (ACP, AKP, LZM, and IgM) in three tissues (gills, liver, and spleen) of juvenile flounder

酶	影响因素	方差	自由度	均方差	统计量	P
酸性磷酸酶	组织	56 954	2	28 477	307	<0.001
	浓度	21 648	4	5 412	58	<0.001
碱性磷酸酶	组织	77 388	2	38 694	168	<0.001
	浓度	39 421	4	9 855	43	<0.001
溶菌酶	组织	21	2	11	907	<0.001
	浓度	1	4	1	26	<0.001
免疫球蛋白 M	组织	71	2	36	51	<0.001
	浓度	16	4	4	6	<0.001

在 20.0 $\mu\text{g/L}$ 组(2.34 U/L), 鳃内 IgM 活性显著低于对照组(3.02 U/L)和其他浓度组(0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$)的活性(3.43~3.64 U/L; Duncan test; $P<0.05$), 在除 20.0 $\mu\text{g/L}$ 组外的实验组中组间差异不显著($P>0.05$)。肝脏内 IgM 活性在所有实验组的组间差异显著($P<0.05$), 但 IgM 活性与暴露浓度的高低无明显变化趋势关系。脾脏内 IgM 活性(5.00~6.97 U/L)的组间差异不显著($P>0.05$; 图 2b)。

3 讨论

3.1 甲基汞在鱼类体内蓄积的浓度依赖性和组织特异性

甲基汞在幼鱼三种组织内的蓄积量随着暴露浓度的升高总体上呈现上升趋势, 但其在鱼体内的蓄积存在显著的组织特异性。水相或食物相 MeHg 暴

露研究表明, MeHg 在鱼体内的蓄积量通常随着暴露浓度的增大而升高^[8, 13, 25-28], 但其组织特异性会因物种和暴露方式、时间的不同而存在差异。例如, 青鳉(*Oryzias latipes*)在暴露于 2.2~40 ng/mL MeHg 水体时, 其肝脏对 MeHg 的蓄积能力明显高于鳃和其他组织^[29]; 而胡椒鲷(*Plectorhynchus gibbosus*)暴露于 0.105~0.361 $\mu\text{g/L}$ MeHg 水体时, 各组织的蓄积能力为鳃>内脏>其他组织^[25]。篮子鱼(*Siganus canaliculatus*)暴露于 0.1~0.4 $\mu\text{g/L}$ MeHg 水体时, 各组织的蓄积能力为鳃>肝脏>肠道>肌肉; 但暴露于食物相 MeHg(50.9 ng/g, 单位重量饵料的含量)的篮子鱼各组织的蓄积能力为肝脏>肠道>鳃>肌肉^[28]。此外, 杂色鲮(*Cyprinodon variegatus*)暴露于食物相 MeHg (16 mg/kg)1.5 天以内时, 各组织的蓄积能力为肠道>

肝脏>鳃>其他组织,但随着暴露的延长,肝脏的蓄积能力明显高于肠道和鳃等组织^[26]。总体上,相对于其它组织,鱼类的肝脏和鳃对 MeHg 的蓄积能力较强。MeHg 蓄积的组织特异性与各组织的生理代谢活动特性等密切相关。肝脏是鱼类的重要解毒器官,内源性和外源性毒性物质在通过生理代谢后都需要在肝脏中分解并排出体外^[13]。因此,肝脏通常会受到更频繁、更严重的毒害,其解毒功能更容易遭受损伤,是 MeHg 等毒性物质蓄积的主要器官之一。鳃直接与水体接触,通过呼吸、渗透压和酸碱平衡调节等生理活动将水环境中的 MeHg 等毒性物质直接摄入鳃内,鳃组织通过过滤、吸附及渗透等途径更容易蓄积较高水平的毒性物质^[30]。这与其它形态 Hg 化合物在

生物体内蓄积的组织特异性类似^[25, 28, 31-32]。

此外,环境因素(如水温 and 溶解氧等)也会通过作用于鱼类的生理活动对 MeHg 在鱼体内蓄积的组织特异性产生影响。例如,低温可抑制鱼类的代谢活动,导致流经鳃组织的血液循环减缓,随血液循环被运送到其他组织的 MeHg 也会相应减少;而低氧会促进鱼类呼吸频率,提高鳃从水中对 MeHg 的蓄积水平^[33-34]。因此,在实验过程中维持环境因子的稳定对提高实验结果的准确性非常重要。本实验中,各实验组的环境条件均控制在相对稳定或一致的水平上,暴露浓度为实验变量,因此,研究结果可比较客观的反映 MeHg 在褐牙鲆幼鱼体内蓄积量的浓度依赖性和组织特异性。

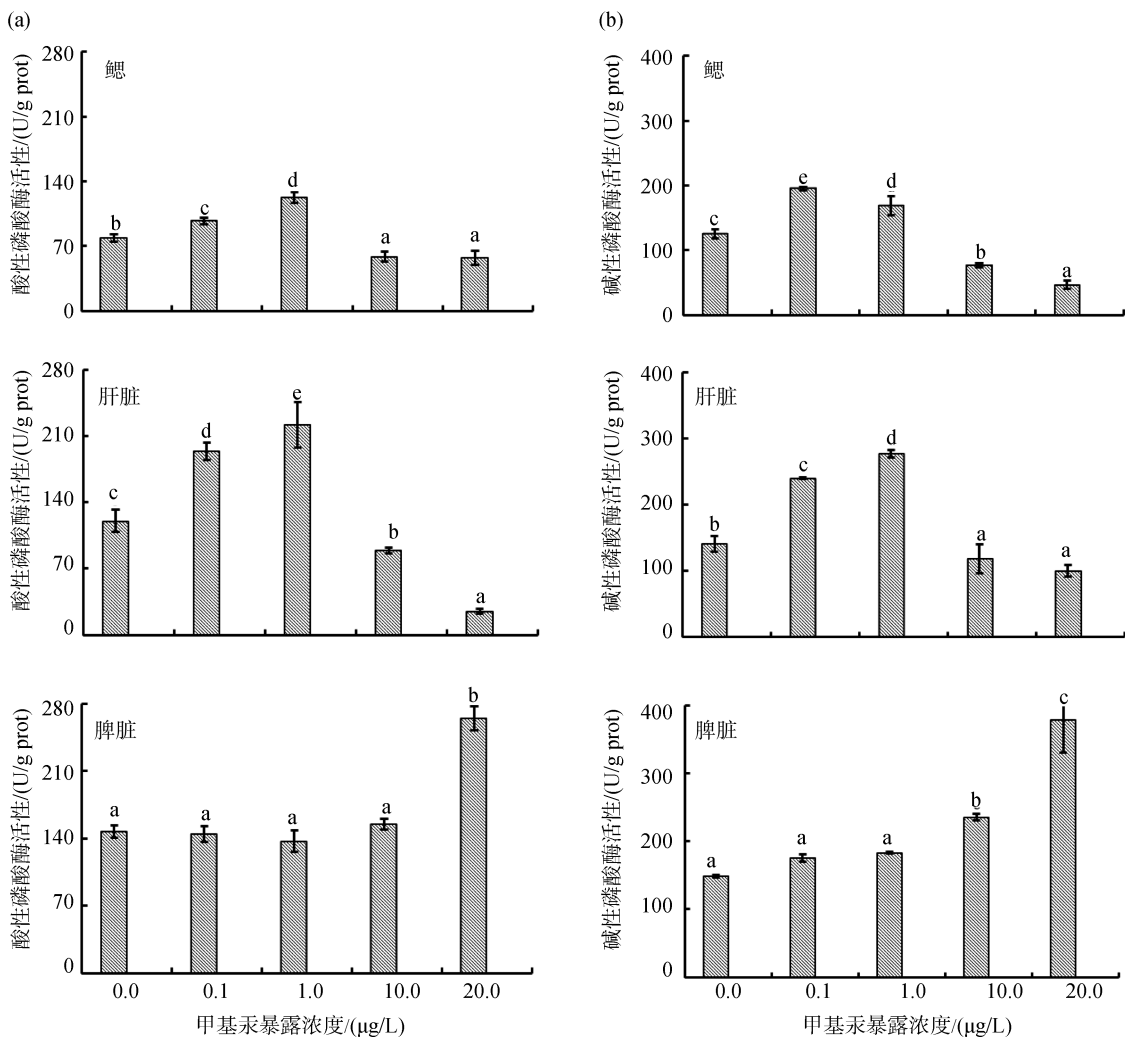


图 1 甲基汞暴露对褐牙鲆幼鱼鳃、肝脏和脾脏内的酸性磷酸酶(a)和碱性磷酸酶(b)活性的影响
 Fig. 1 Effects of MeHg on the activities of ACP (a) and AKP (b) in gills, liver, and spleen tissues of juvenile flounder
 注: 不同字母表示特定组织内不同暴露浓度组间差异显著

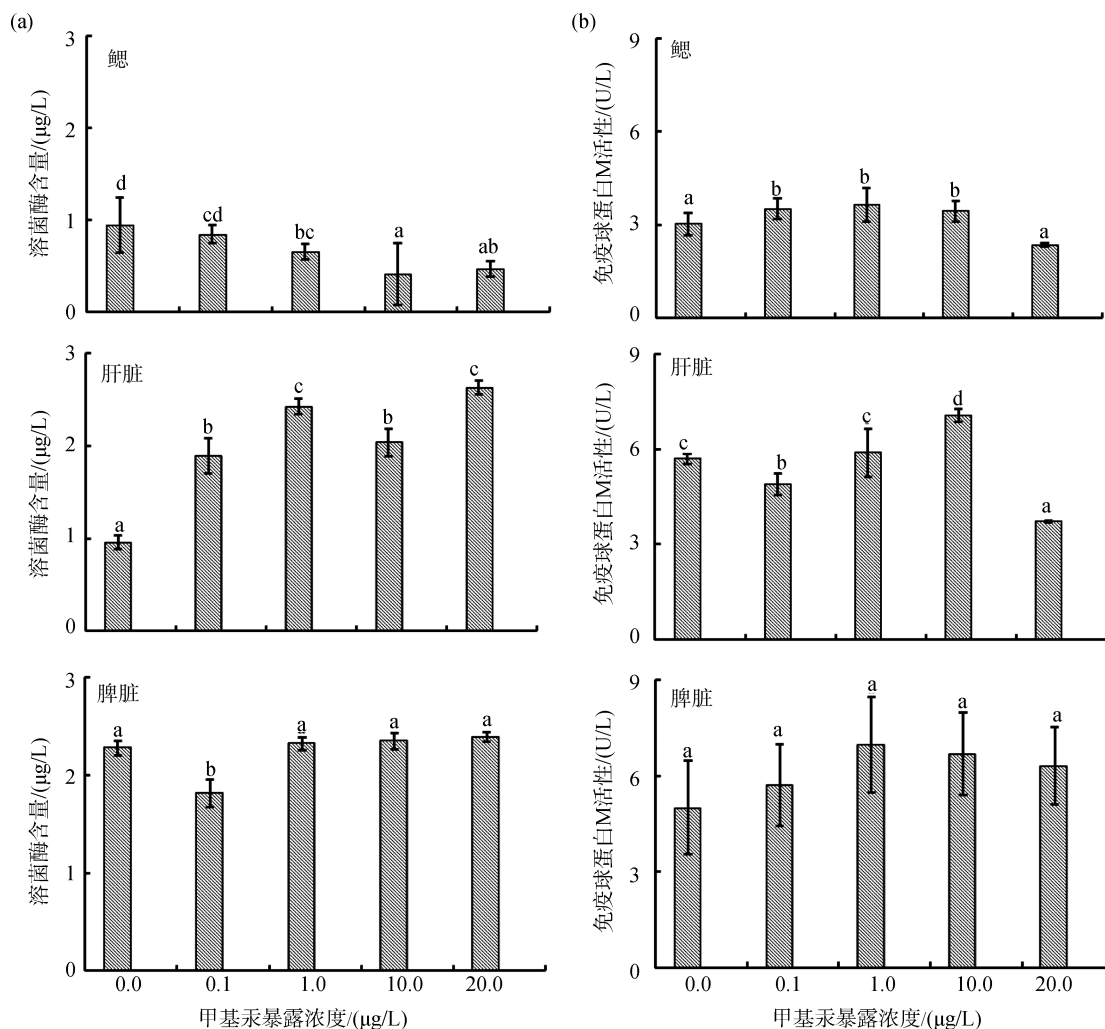


图 2 甲基汞暴露对褐牙鲈幼鱼鳃、肝脏和脾脏内的溶菌酶含量(a)和免疫球蛋白 M 活性(b)的影响

Fig. 2 Effects of MeHg on the LZM content (a) and the activity of IgM (b) in gills, liver, and spleen tissues of juvenile flounder
注: 不同字母表示特定组织内不同暴露浓度组间差异显著

3.2 甲基汞对鱼类的免疫功能生物指示物和生长的毒理作用

一般而言, 包括 MeHg 在内的 Hg 化合物对动物都有较强的免疫毒性^[11], 因为 MeHg 能通过诱导动物免疫细胞凋亡、损伤免疫细胞 DNA、抑制非特异性免疫和诱导自身免疫等方式, 对动物自身免疫系统的发育和功能产生毒性。酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(AKP)和溶菌酶(LZM)均参与鱼类的先天性免疫防御, 在 MeHg 暴露下其活性(含量)变化能反映生物体免疫功能对 MeHg 暴露的生理响应。

低浓度 MeHg 暴露(0.1~1.0 µg/L)显著诱导幼鱼的鳃和肝脏内 ACP 和 AKP 的活性, 但高浓度 MeHg(10.0~20.0 µg/L)暴露显著抑制其活性。两种磷酸酶在鱼类新陈代谢的磷酸化和脱磷酸化过程起到

至关重要的作用。当鱼类受到低浓度 MeHg 毒性影响时, ACP 和 AKP 活性升高, 参与到 MeHg 的解毒和代谢中^[35], 通过自身调节以提高先天性免疫能力, 防止 MeHg 毒性造成的免疫力下降。同时, ACP 和 AKP 还是特殊的金属酶, 在受到包括 Hg 在内的污染物影响时, 其构象和活性也会受到影响^[36-38]。当 MeHg 暴露升高到一定浓度值后, MeHg 毒性将会超出磷酸酶的解毒和代谢能力, 其活性受到抑制, 鱼类先天性免疫功能可能会下降。与鳃和肝脏内两种磷酸酶活性变化不同, 脾脏内磷酸酶活性在低浓度组间无显著变化, 而在高浓度组显著升高, 这可能与 MeHg 在脾脏内的蓄积量低有关。脾脏对 MeHg 的蓄积能力相对于鳃和肝脏比较弱, 可能只有在高浓度暴露下 MeHg 在脾脏内的蓄积量才开始升高,

达到对免疫产生毒性影响的水平,其组织内磷酸酶活性被诱导并参与到 MeHg 的解毒和代谢中,以减轻 MeHg 对脾脏的免疫毒性。

总体上, MeHg 暴露浓度的升高会抑制幼鱼鳃内 LZM 含量,诱导肝脏内 LZM 含量升高,而对脾脏内 LZM 含量影响较小。鱼类在受到 MeHg 等污染物毒性刺激时,其体内溶酶体活性增强, LZM 分泌增多,参与到有毒污染物的代谢和排出活动。鳃是鱼类呼吸、渗透调节和维持酸碱平衡的重要器官,也是水相 MeHg 进入鱼类体内的重要通道之一。因此,鳃可能会比其它组织更早表现出毒性反应。而且,鳃内的多种酶活性(含量)对水体中的污染物表现的尤为敏感^[13],其 LZM 含量受 MeHg 抑制而减少。另外, MeHg 易与膜蛋白的巯基结合^[35],从而影响溶酶体膜的稳定性。当 MeHg 浓度过高时,溶酶体结构和功能受到损伤, LZM 的分泌也会受到抑制。肝脏是鱼类机体进行蛋白质合成和新陈代谢的重要场所,也是机体进行解毒、排毒和氧化还原调控的重要器官^[39]。因此, MeHg 暴露会诱导肝脏 LZM 含量升高,参与机体先天性免疫防御来增强鱼类代谢机能和排毒能力。 MeHg 对脾脏内 LZM 含量影响较小,这可能与脾脏本身的免疫特性及其对 MeHg 蓄积能力较弱有关。在本实验 MeHg 暴露水平下,脾脏内 LZM 含量对毒性的反应可能在脾脏正常承受范围以内,因此,脾脏可通过自身的生理调节恢复其免疫功能。

免疫球蛋白 M 是鱼类获得性免疫系统的重要组成部分,在抵御污染物胁迫造成的免疫损伤方面发挥着重要的作用。在受到污染物毒性影响时,鱼类通常通过提高 IgM 的活性水平以增强机体免疫力^[40]。例如,金头鲷(*Sparus aurata*)在 10 $\mu\text{g/L}$ 的 MeHg 暴露下,其体液内的 IgM 活性在暴露第 2 天和第 10 天均高于对照组^[41]。高浓度 Hg 暴露也能降低虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)头肾组织中 IgM 的活性,导致其组织免疫系统受到损伤^[42]。本研究中,幼鱼在三种组织中的 IgM 活性与 MeHg 暴露浓度之间的关系有所不同。在鳃和肝脏中, IgM 活性总体上呈随暴露浓度升高(0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$)而升高后再下降(20.0 $\mu\text{g/L}$)的趋势,但在暴露组之间未表现出明显的浓度依赖关系。在较低浓度 MeHg 暴露(0.1~10.0 $\mu\text{g/L}$),幼鱼的鳃和肝脏内 IgM 活性通常被诱导而升高,以防御毒性对免疫系统的损伤。但当 MeHg 暴露浓度达到 20.0 $\mu\text{g/L}$ 时,其免疫功能如 B 淋巴细胞的活性可能受到较大损伤, IgM 活性相应地被抑制^[41]。脾脏内 IgM 活性在

各实验组的组间差异均不显著。如前所述,幼鱼脾脏内的 MeHg 蓄积水平低于鳃和肝脏内的蓄积水平,本实验中的 MeHg 暴露浓度的毒性可能未达到显著影响脾脏内 IgM 活性的水平。

总之, MeHg 暴露对褐牙鲂幼鱼的 ACP、AKP、LZM 和 IgM 等免疫功能组分的影响存在浓度依赖性和组织特异性,这与鱼类各组织的生理特性有关,也与各组织对 MeHg 的蓄积能力有关。相对于 IgM, ACP、AKP 和 LZM 等免疫指标能较好的反映对 MeHg 暴露的浓度依赖关系和组织特异性,可作为水环境中 MeHg 污染风险评估的潜在生物指示物。

由于 MeHg 在褐牙鲂幼鱼重要器官组织内存在蓄积效应,并在达到一定蓄积水平时对其一些重要生理免疫功能产生影响,因此,这些影响自然表现在 MeHg 暴露抑制褐牙鲂幼鱼生长方面。低浓度 MeHg 暴露($\leq 10.0 \mu\text{g/L}$)对幼鱼生长的抑制作用不显著,但高暴露浓度(20.0 $\mu\text{g/L}$)显著抑制幼鱼生长。实验过程中,尽管各实验组的平均投饵水平和幼鱼个体数量相近,但高暴露浓度组的残饵总体上明显高于对照组和低浓度组,这说明高浓度 MeHg 暴露可能影响幼鱼的摄食能力或行为,进而抑制其生长。在其它鱼类中,暴露于 MeHg 水体中的底鳉(*Fundulus heteroclitus*; 5~10 $\mu\text{g/L}$)和河鲈(*Thymallus thymallus*; 0.16~20 $\mu\text{g/L}$)的摄食能力和摄食效率均显著下降,其生长受到显著抑制^[43-44];而虹鳟(*Salmo gairdneri*; 25.0~95.0 mg/kg)和大眼狮鲈(*Stizostedion vitreum*; 0.1~1.0 $\mu\text{g/g}$)在摄食含有 MeHg 的饲料时,其生长在高暴露条件下相比对照组和低暴露组亦显著被抑制^[45-46]。水相或食物相 MeHg 暴露可能造成鱼类食欲下降和游泳行为异常,导致其捕食能力和捕食效率降低,进而抑制鱼类生长。

另一方面, MeHg 可能通过损伤消化吸收器官组织、抑制营养物质同化吸收和相关酶活性,以及升高额外能量消耗等途径影响鱼类生长。例如, MeHg 能破坏直齿鱼(*Orthodon microlepidotus*)的肠道细胞结构,降低其营养物质的吸收功能和效率,影响营养物质传输、生物大分子合成及其他重要的生命过程,从而抑制鱼类的生长^[47]。另外, MeHg 暴露能诱导鱼类机体氧化应激,需要消耗额外的能量进行解毒和损伤修复,导致正常生长的能量代谢减少和生长迟缓^[27, 48]。本研究中, MeHg 暴露对其幼鱼免疫功能组分的抑制或损伤也可能是抑制其生长的生理因素之一。

参考文献:

- [1] Benoit J M, Gilmour C C, Mason R P, et al. Behavior of mercury in the Patuxent River estuary[J]. Biogeochemistry, 1998, 40(2-3): 249-265.
- [2] 王文雄, 潘进芬. 重金属在海洋食物链中的传递[J]. 生态学报, 2004, 24(3): 599-604.
Wang Wenxiong, Pan Jinfen. The transfer of metals in marine food chains[J]. Acta Ecologica Sinica, 2004, 24(3): 599-604.
- [3] 李欢. 海洋生物中甲基汞污染水平及变化特征研究[D]. 大连: 大连海事大学, 2008.
Li Huan. Study on methyl mercury pollution and transformation characteristics in the sea food[D]. Dalian: Dalian Maritime University, 2008.
- [4] Lee Y H, Kang H M, Kim D H, et al. Adverse effects of methylmercury (MeHg) on life parameters, antioxidant systems, and MAPK signaling pathways in the copepod *Tigriopus japonicus*[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 184: 133-141.
- [5] Hammerschmidt C R, Sandheinrich M B, Wiener J G, et al. Effects of dietary methylmercury on reproduction of fathead minnows[J]. Environmental Science & Technology, 2002, 36 (5): 877-883.
- [6] Drevnick P E, Sandheinrich M B. Effects of dietary methylmercury on reproductive endocrinology of fathead minnows[J]. Environmental Science & Technology, 2003, 37(19): 4390-4396.
- [7] Weis J S. Reproductive, developmental, and neurobehavioral effects of methylmercury in fishes[J]. Journal of Environmental Science and Health Part C: Environmental Carcinogenesis and Ecotoxicology Reviews, 2009, 27(4): 212-225.
- [8] Stefansson E S, Heyes A, Rowe C L. Accumulation of dietary methylmercury and effects on growth and survival in two estuarine forage fish: *Cyprinodon variegatus* and *Menidia beryllina*[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2013, 32(4): 848-856.
- [9] Dong W, Liu J, Wei L X, et al. Developmental toxicity from exposure to various forms of mercury compounds in medaka fish (*Oryzias latipes*) embryos[J]. Peerj, 2016, 4(8): e2282.
- [10] 周启星, 孔繁翔, 朱琳. 生态毒理学[M]. 北京: 科学出版社, 2004.
Zhou Qixing, Kong Fanxiang, Zhu Lin. Ecotoxicology[M]. Beijing: Science Press, 2004.
- [11] 刘颖, 孙志伟. 汞的免疫毒性研究进展[J]. 中国公共卫生, 2005, 21(2): 234-236.
Liu Ying, Sun Zhiwei. Advances in the study of immunotoxicity of mercury[J]. Chinese Journal of Public Health, 2005, 21 (2): 234-236.
- [12] 冯永全, 耿雪, 胡静, 等. 28 d 灌胃给予氯化甲基汞对 Wistar 雌性大鼠免疫系统影响的研究[J]. 毒理学杂志, 2015, 29(2): 102-105.
Feng Yongquan, Geng Xue, Hu Jing, et al. Immunotoxicity assessment of methyl mercury chloride in female rats after 28-day oral exposure[J]. Journal of Toxicology, 2015, 29(2): 102-105.
- [13] Huang W, Cao L, Ye Z J, et al. Tissue-specific bioaccumulation and oxidative stress responses in juvenile Japanese flounder (*Paralichthys olivaceus*) exposed to mercury[J]. Chinese Journal of Oceanology and Limnology, 2012, 30(4): 569-579.
- [14] Kang J C, Hwang U G, Jee J H, et al. Chronic toxicity of mercury on survival, growth, and oxygen consumption in the juvenile olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Journal of Fish Pathology, 2002, 15(1): 37-42.
- [15] Huang W, Cao L, Liu J H, et al. Short-term mercury exposure affecting the development and antioxidant biomarkers of Japanese flounder embryos and larvae[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73(8): 1875-1883.
- [16] Huang W, Cao L, Ye Z J, et al. Antioxidative responses and bioaccumulation in Japanese flounder larvae and juveniles under chronic mercury exposure [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2010, 152(1): 99-106.
- [17] Kim J H, Lee J S, Kang J C. Effect of inorganic mercury on hematological and antioxidant parameters on olive flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Fisheries and Aquatic Sciences, 2012, 15(3): 215-220.
- [18] 姜洪波, 王桂兴, 刘海金, 等. Hg²⁺对克隆牙鲆和普通牙鲆的急性毒性 [J]. 渔业科学进展, 2014, 35(3): 68-73.
Jiang Hongbo, Wang Guixing, Liu Haijin, et al. Acute toxicity of Hg²⁺ to clonal and common Japanese flounder *Paralichthys olivaceus*[J]. Progress in Fishery Sciences, 2014, 35(3): 68-73.
- [19] Barka T, Anderson P. Histochemical methods for acid phosphatase using hexazonium pararosanilin as coupler[J]. Journal of Histochemistry & Cytochemistry, 1962, 10(6): 741-753.
- [20] Bessey O A, Lowry O H, Brock M J. Rapid coloric method for determination of alkaline phosphatase in five cubic millimeters of serum[J]. Journal of Biological Chemistry, 1946, 164(1): 321-329.
- [21] Parry Jr R M, Chandan R C, Shahani K M. A rapid and sensitive assay of muramidase[J]. Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine, 1965, 119(2): 384-386.
- [22] Cuesta A, Meseguer J, Esteban M A. Total serum immunoglobulin M levels are affected by immunomodulators in seabream (*Sparus aurata* L.)[J]. Veterinary

- Immunology and Immunopathology, 2004, 101(3-4): 203-210.
- [23] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72(1-2): 248-254.
- [24] OECD. Fish, Short-term Toxicity Test on Embryo and Sac-fry Stages[M]. Paris, France: Organisation for Economic Co-operation and Development, 1998.
- [25] Wang W X, Wong R S. Bioaccumulation kinetics and exposure pathways of inorganic mercury and methylmercury in a marine fish, the sweetlips *Plectorhinchus gibbosus*[J]. Marine Ecology Progress Series, 2003, 261(8): 257-268.
- [26] Leaner J J, Mason R P. Methylmercury uptake and distribution kinetics in sheepshead minnows, *Cyprinodon variegatus*, after exposure to CH₃Hg-spiked food[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2004, 23(9): 2138-2146.
- [27] Lee J W, De Riu N, Lee S, et al. Effects of dietary methylmercury on growth performance and tissue burden in juvenile green (*Acipenser medirostris*) and white sturgeon (*A. transmontanus*)[J]. Aquatic Toxicology, 2011, 105(3-4): 227-234.
- [28] Peng X Y, Liu F J, Wang W X. Organ-specific accumulation, transportation, and elimination of methylmercury and inorganic mercury in a low Hg accumulating fish[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2016, 35(8): 2074-2083.
- [29] 廖春阳. 几种典型环境污染物的神经毒性效应研究[D]. 北京: 中国科学院生态环境研究中心, 2006.
Liao Chunyang. Studies on the neurotoxic effects of several typical environmental pollutants[D]. Beijing: Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, 2006.
- [30] 蔺玉华, 关海虹. 甲基汞对鲤鱼鳃组织及氯细胞的影响[J]. 水产学杂志, 2003, 16(1): 53-56.
Lin Yuhua, Guan Haihong. Effect of methylmercury chloride on gills filaments and chloride cells of common carp[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2003, 16(1): 53-56.
- [31] Boudou A, Ribeyre F. Experimental study of trophic contamination of *Salmo gairdneri* by two mercury compounds-HgCl₂ and CH₃HgCl-analysis at the organism and organ levels[J]. Water, Air, and Soil Pollution, 1985, 26(2): 137-148.
- [32] Huang S S Y, Strathe A B, Fadel J G, et al. Absorption, distribution, and elimination of graded oral doses of methylmercury in juvenile white sturgeon[J]. Aquatic Toxicology, 2012, 122-123(2): 163-171.
- [33] Pärt P. The perfused fish gill preparation in studies of the bioavailability of chemicals[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 1990, 19(1): 106-115.
- [34] Yediler A, Jacobs J. Synergistic effects of temperature; oxygen and water flow on the accumulation and tissue distribution of mercury in carp (*Cyprinus carpio* L.)[J]. Chemosphere, 1995, 31(11-12): 4437-4453.
- [35] Gharaei A, Ghaffari M, Keyvanshokoo, et al. Changes in metabolic enzymes, cortisol and glucose concentrations of Beluga (*Huso huso*) exposed to dietary methylmercury[J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2011, 37(3): 485-493.
- [36] 李春英, 邱炳源. 甲基汞的毒性作用[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(6): 365-366.
Li Chunying, Qiu Bingyuan. Toxicity of methylmercury[J]. Chinese Journal of Preventive Medicine, 2001, 35(6): 365-366.
- [37] Covelli S, Faganeli J, Horvat M, et al. Mercury contamination of coastal sediments as the result of long-term cinnabar mining activity (Gulf of Trieste, northern Adriatic Sea)[J]. Applied Geochemistry, 2001, 16(5): 541-558.
- [38] De Mora S, Sheikholeslami M R, Wyse E, et al. An assessment of metal contamination in coastal sediments of the Caspian Sea[J]. Marine Pollution Bulletin, 2004, 48 (1-2): 61-77.
- [39] Oliveira M, Pacheco M, Santos M A. Organ specific antioxidant responses in golden grey mullet (*Liza aurata*) following a short-term exposure to phenanthrene[J]. Science of the Total Environment, 2008, 396(1): 70-78.
- [40] Robohm R A, Brown C, Murchelano R A. Comparison of antibodies in marine fish from clean and polluted waters of the New York Bight: relative levels against 36 bacteria[J]. Applied and Environmental Microbiology, 1979, 38(2): 248-257.
- [41] Guardiola F A, Chaves-Pozo E, Espinosa C, et al. Mercury accumulation, structural damages, and antioxidant and immune status changes in the gilthead seabream (*Sparus aurata* L.) exposed to methylmercury[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2016, 70(4): 734-746.
- [42] Sanchez-Dardon J, Voccia I, Hontela A, et al. Immunomodulation by heavy metals tested individually or in mixtures in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed in vivo[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1999, 18(7): 1492-1497.
- [43] Fjeld E, Haugen T O, Vøllestad L A. Permanent impairment in the feeding behavior of grayling (*Thymallus thymallus*) exposed to methylmercury during embryogenesis[J]. Science of the Total Environment, 1998, 213(1-3): 247-254.
- [44] Zhou T, Scali R, Weis J S. Effects of methylmercury on

- ontogeny of prey capture ability and growth in three populations of larval *Fundulus heteroclitus*[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 41(1): 47-54.
- [45] Rodgers D W, Beamish F W H. Dynamics of dietary methylmercury in rainbow trout, *Salmo gairdneri*[J]. Aquatic Toxicology, 1982, 2(5-6): 271-290.
- [46] Friedmann A S, Watzin M C, Brinck-Johnsen T, et al. Low levels of dietary methylmercury inhibit growth and gonadal development in juvenile walleye (*Stizostedion vitreum*)[J]. Aquatic Toxicology, 1996, 35(3-4): 265-278.
- [47] NRC (National Research Council). Mineral Tolerance of Animals[M]. Washington, DC: National Academies Press, 2005.
- [48] Houck A, Cech Jr J J. Effects of dietary methylmercury on juvenile Sacramento blackfish bioenergetics[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 69(2): 107-123.

Tissue-specific bioaccumulation of methylmercury (MeHg) and its toxicity to the immunologic function and growth of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*

REN Zhong-hua^{1, 3}, CAO Liang^{1, 2, 4}, LIU Jin-hu^{1, 2, 4}, CUI Wen-ting^{1, 3}, DOU Shuo-zeng^{1, 2, 3, 4}

(1. CAS Key Laboratory of Marine Ecology and Environment Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Laboratory for Marine Ecology and Environmental Science, Pilot National Laboratory for Marine Science and Technology (Qingdao), Qingdao 266071, China; 3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 4. Center for Ocean Mega-Science, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

Received: Nov. 8, 2018

Key words: methylmercury; flounder *Paralichthys olivaceus*; immunologic function; bioindicator; accumulation; toxicity

Abstract: Methylmercury (MeHg) poses a great threat to various life processes of fish, but its toxic effect on the immune function of marine fish is rarely studied. In this study, a laboratory toxicity test (30 days) was conducted to investigate the bioaccumulation of MeHg in three tissues (gills, liver, and spleen) and its toxicity to four immunological indicators (lysozyme (LZM), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (AKP), and immunoglobulin M (IgM)) and the growth of juvenile flounder *Paralichthys olivaceus*. In the test, the nominal exposure concentrations of MeHg were 0.0 (control), 0.1, 1.0, 10.0, and 20.0 $\mu\text{g/L}$. The results revealed that the bioaccumulation of MeHg was positively concentration-dependent and tissue-specific, with an overall bioaccumulation ranking of liver > gills > spleen. The activities or contents of the four immunological indicators responded differently to MeHg exposure, depending on indicators and tissues. The MeHg exposure of over a certain concentration (e.g., 20.0 $\mu\text{g/L}$) could significantly inhibit the growth of the fish. Generally, MeHg accumulated in biological tissues of flounder juveniles, which produced immunotoxicity and inhibited the growth of juveniles. In addition, changes in activities or contents of ACP, AKP, and LZM well reflected the concentration-dependent and tissue-specific responses to MeHg exposures and therefore can be used as potential bioindicators for assessing the risk of MeHg pollution and toxicity to organisms in seawater.

(本文编辑: 丛培秀)