

镉诱导缢蛏(*Sinonovacula constricta*)体内 金属硫蛋白基因变化规律研究*

霍礼辉^{1,2} 陈彩芳¹ 林志华¹ 董迎辉¹ 顾海龙^{1,3}
汪青^{1,3} 包永波¹

(1. 浙江万里学院生物与环境学院 宁波 315100; 2. 宁波大学海洋学院 宁波 315211;
3. 上海海洋大学水产与生命学院 上海 201306)

提要 采用荧光定量 PCR 法,研究了缢蛏体内 7 种组织中金属硫蛋白(MT) mRNA 的组织特异性表达,以及不同浓度梯度重金属 Cd²⁺对缢蛏内脏团中 MT mRNA 的诱导效应。结果表明,在自然状态下,MT mRNA 在缢蛏内脏团中的相对表达量最高;在不同浓度重金属 Cd²⁺胁迫条件下,缢蛏内脏团中 MT mRNA 的诱导表达具有明显的剂量效应和时间效应,即随着 Cd²⁺浓度的增加,MT mRNA 的最大表达量明显升高,而随着时间的变化,MT 基因的表达呈现脉冲式波动,具有较强的时间依赖性。在 3h 和 48h 缢蛏内脏团中 MT 基因表达量与重金属 Cd²⁺浓度之间具有较好的线性相关性,说明缢蛏内脏团中 MT mRNA 表达变化可以作为指示环境重金属 Cd²⁺污染的一个生物参考指标。

关键词 缢蛏, Cd²⁺, MT mRNA, 内脏团

中图分类号 Q789

近年来,随着沿海经济的高速发展,大量的工农业废水排放入海,致使海洋环境日趋恶化,尤其是重金属污染。水体重金属污染具有持久性、高危害性和难治理性,如何快速、准确监测并对其进行科学评价,成为当今环境科学关心的热点问题(赵顺顺等, 2010)。水生生物体内许多生物分子对水体重金属污染具有特异性、敏感性等优势,常常被用来指示水体中重金属污染的生物指标。金属硫蛋白(Metallothionein, MT)是一种富含半胱氨酸的低分子量金属结合蛋白,在必需金属元素的调节和非必需金属元素的解毒等方面具有重要的作用(Coyle *et al.*, 2002),且被用作监测重金属污染的生物标志物,已经在鱼类、虾蟹类、贝类生物(周彦锋等, 2009; 苏文等, 2010; Berthet *et al.*, 2005)中开展了相关研究。Wang 等(2009)研究发现,通过荧光定量 PCR 可以在 MT mRNA 层面上快速指

示重金属污染,具有较好的指示效果。

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)俗称蛏子、海蛏等,属软体动物门(Mollusca)、瓣鳃纲(Lamellibranchia)、异齿亚纲(Heterodonta)、帘蛤目(Veneroidea)、竹蛏科(Solcnidae)、缢蛏属(*Sinonovacula*),主要分布于中国和日本,是我国传统四大养殖贝类之一。缢蛏作为滩涂贝类的一个代表物种,主要营埋栖生活,对环境中的重金属等污染物有较强的累积能力,能够较好地反映栖息地水体和底质的污染状况。然而,目前主要是将贻贝、牡蛎和扇贝等固着型和附着型贝类(Rainbow, 2002)作为监测海洋环境的指示生物,在滩涂贝类这方面的研究则较少。因此,开展缢蛏重金属富集、MT 蛋白诱导合成和 MT 基因表达等方面的研究,并与其它生化指标相结合,对水体环境和底质环境中重金属污染的早期诊断、生态风险评估和海洋贝

* 国家现代贝类产业技术体系项目资助, CARS-48 号; 宁波市科技局重点科技项目, 2011C11004 号; 宁波市科技创新团队项目, 2011B82017 号; 浙江万里学院省重中之重学科开放基金, KF2011005 号。霍礼辉, 硕士研究生, E-mail: huolihui@yahoo.cn

通讯作者: 林志华, E-mail: zhihua9988@126.com

收稿日期: 2011-09-21, 收修改稿日期: 2011-12-04

类健康养殖等具有重要的价值。

1 材料与方法

1.1 材料

缢蛏(*Sinonovacula constricta*)取自乐清湾地区清江镇贝类养殖池塘,先在砂滤海水中暂养2d,挑选体格健壮、大小规格一致[体壳长(6.45±0.21)cm,体总重(16.82±1.35)g]的缢蛏作为实验对象。实验用砂滤海水盐度为16—19, pH 8.0±0.1, 水温(26.5±3.0)°C, 溶解氧大于8.5mg/L。

1.2 方法

1.2.1 缢蛏不同组织取样 从暂养的缢蛏中取15只,分为三组,分别解剖取进水管、出水管、鳃、内脏团、闭壳肌、外套膜和斧足7种组织,装入冻存管,

投入液氮中保存。

1.2.2 缢蛏攻毒实验 用Cd(NO₃)₂·6H₂O试剂配制成Cd²⁺浓度为1.0000g/L母液备用。各实验组浓度依次为:0、5、25、50、100μg/L Cd²⁺, 每组设置三个平行;采用半静态养殖方法,实验水体20L,每箱30个缢蛏,实验期间连续充气,不投饵,每24h更换同浓度实验水体一次,开始实验前用等浓度Cd²⁺的实验水体浸泡小水箱24h以上,消除容器对重金属的吸附作用。分别在实验开始的0h、3h、6h、12h、24h、48h和96h进行取样,每箱取3只缢蛏,解剖后取内脏团组织,装入冻存管,投入液氮中保存。实验期间,分别在每箱中取200ml水体,0.45μm滤膜抽滤后加硝酸1.0ml保存于聚乙烯塑料瓶中,带回测水体重金属实际值(表1)。

表1 实验水体中Cd²⁺的理论值与实测值(μg/L)

Tab.1 Theoretical and measured concentrations of Cd²⁺ in experimental set-up (μg/L)

分组	(对照组)				
理论值	0	5	25	50	100
实测值	0.14±0.02	5.22±0.87	24.54±2.32	51.86±3.76	104.32±4.65

1.2.3 总RNA的提取与cDNA合成 采用酸性酚-异硫氰酸胍-氯仿提取法,取出缢蛏样品,在液氮中研磨成粉末,取50mg左右,分两步提取总RNA。第一步,消除样品中蛋白质、脂肪和多糖类物质等,抽提获得总RNA和DNA;第二步,降解DNA,得到纯的总RNA。然后加10μl RNase-Free-H₂O溶解,取1.0μl溶解液,用1%琼脂糖凝胶电泳检测总RNA质量。

利用M-MuLV First Strand cDNA Synthesis Kit (BIO BASIC INC), 37°C条件下以总RNA为模板, Oligo(dT)为引物进行cDNA第一链合成。

1.2.4 荧光定量PCR 用Primer primer 5.0设计荧光定量引物,检测前先对设计的引物进行筛选,扩增产物无非特异性扩增产物和引物二聚体,与模板量线性关系良好,所用内参基因为β-actin(秦玉明等, 2010)。各引物序列见表2。

使用Bio-rad IQ5 Real-time PCR仪(Bio-Rad, USA)和SYBR® Premix Ex Taq™ Kit (TaKaRa, Japan)对MT mRNA在各组织中的表达量,以及不同Cd²⁺浓度条件下内脏团中MT mRNA的表达量进行相对定量分析,并依据熔解曲线判定基因扩增的特异性。反应体系为25μl, 两步法PCR扩增标准程序:预变性95°C 30s; 95°C 5s, 60°C 20s, 30个循环;随后进行溶解曲线检测,60°C 15s, 45个循环。

表2 实验所用引物名称及序列

Tab.2 Sequences and primers used for experiments

引物	序列(5'—3')	温度(°C)	产物长度
MT-F	GAATCTACCAAGACGCCACA	58.0	156
MT-R	CCGTTACACGAGGGAAGTCA	59.7	
β-actin-F	ACACTACTGAAGGCACGCTAA	58.0	140
β-actin-R	ACAACGAACCAACCAAGA	55.4	

1.3 数据处理

经过荧光定量PCR, MT mRNA的相对表达量的计算公式为:

$$MT \text{ 值} = 2^{-\{[Ct(Mt_A) - Ct(\beta\text{-Actin}_A)] - [Ct(Mt_0) - Ct(\beta\text{-Actin}_0)]\}}$$

式中, MT值为MT的相对表达量; Ct(Mt_A)为实验组MT的Ct值; Ct(β-Actin_A)为实验组β-actin的Ct值; Ct(Mt₀)为对照组MT的Ct值; Ct(β-Actin₀)为对照组β-actin的Ct值。采用SPSS13.0等软件对缢蛏7种组织中MT mRNA的表达量进行显著性分析;通过Origin7.5作图,得到不同Cd²⁺浓度条件下MT mRNA相对表达量随时间变化的关系图;使用Dps7.05软件对MT mRNA表达量与重金属Cd²⁺浓度之间的关系进行线性拟合。

2 结果

2.1 缢蛏各组织总RNA

采用1%的琼脂糖凝胶电泳检测缢蛏进水管、出

水管、鳃、内脏团、闭壳肌、外套膜和斧足7种组织中总RNA的提取质量,见图1。由图1可知,酸性酚-硫氰酸胍-氯仿提取法提取的总RNA,无蛋白质和DNA残留,5.8S、18S和28S条带清晰,并微弱可见其它小片段RNA,总RNA提取质量较高。在同等倍数稀

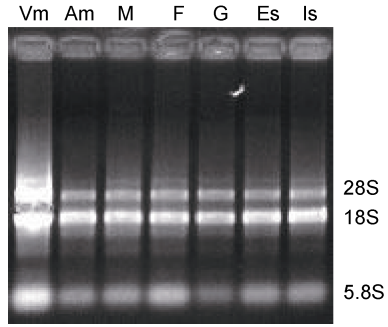


图1 缢蛏7种组织中总RNA提取质量检测

Fig.1 The quality examination of total RNA in seven tissues
注: Vm: 内脏团; Am: 闭壳肌; M: 外套膜; F: 斧足; G: 鳃; Es: 出水管; Is: 进水管

释条件下,内脏团中总RNA量最多,说明缢蛏内脏团部位是其生物合成与代谢最活跃场所,是研究其分子生物学的良好组织。

2.2 缢蛏体内MT mRNA的组织特异性表达

以缢蛏 β -actin 为内参标基因,通过荧光定量检测

MT mRNA在各组织中的表达量(图2),发现在自然条件下,以内脏团中MT表达量作为标准值(1.0×10^6),其它各组织中MT的表达量均远远低于内脏团组织;对结果进行显著性分析可知,缢蛏内脏团中MT的表达量显著高于其它各组织($P < 0.01$),进水管和外套膜中MT的表达量显著低于鳃($P < 0.05$),其它各组织间则无显著性差异($P > 0.05$)。由此可见,在自然水体条件下,缢蛏是通过其内脏团部位MT的合成与代谢来调节体内金属元素平衡以及应对各种胁迫刺激,故进一步研究将以缢蛏内脏团为目标组织。

2.3 不同处理组缢蛏内脏团MT mRNA的

差异性表达

经过96h的攻毒实验,以 β -actin为内参标基因,分别以各时间点对照组缢蛏内脏团中

MT mRNA为基础值1,得到该时刻其它浓度组MT mRNA的相对表达量,结果见图3。由图3可知,在 Cd^{2+} 浓度为 $5 \mu g/L$ 的实验组,缢蛏内脏团中的MT

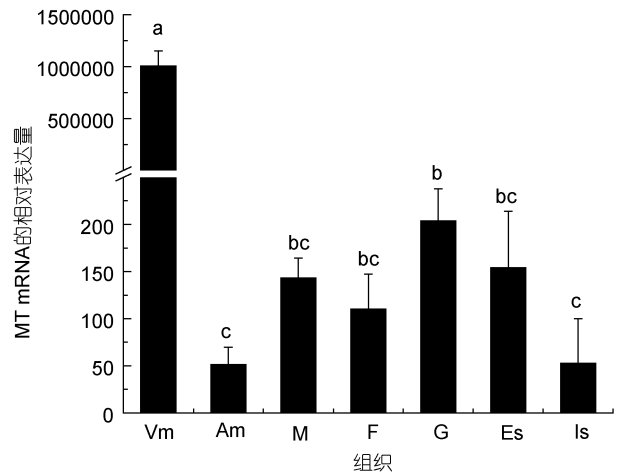


图2 缢蛏7种组织中MT mRNA的差异性表达

Fig.2 The different expressions of MT mRNA in seven tissues of *S. constricta*

注: Vm: 内脏团; Am: 闭壳肌; M: 外套膜; F: 斧足; G: 鳃; Es: 出水管; Is: 进水管

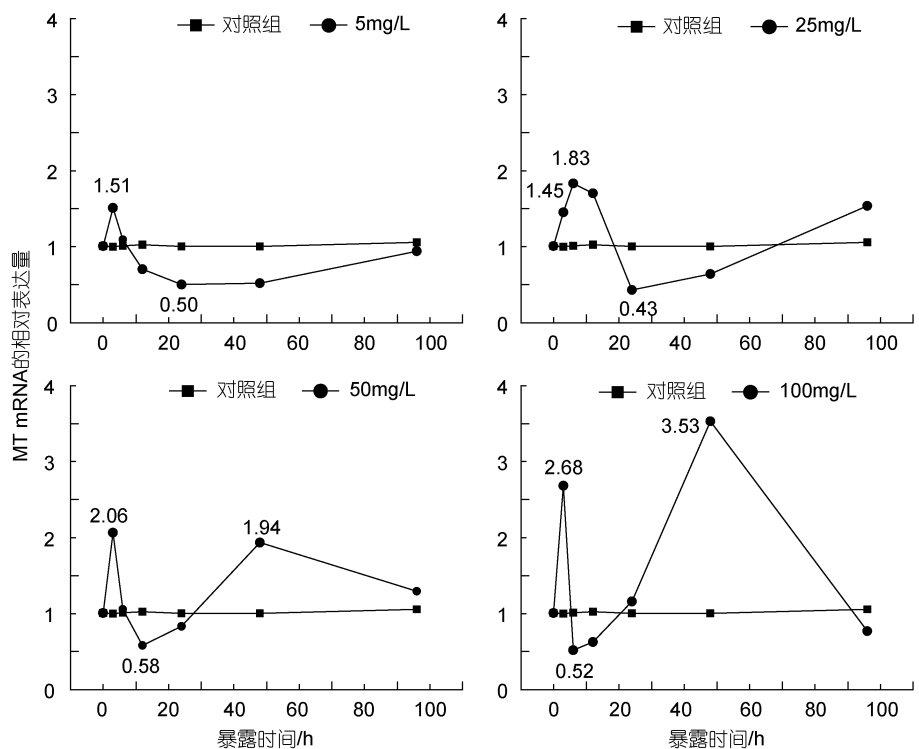


图3 不同 Cd^{2+} 浓度组缢蛏内脏团中MT mRNA相对表达量

Fig.3 The expression level of MT mRNA in visceral mass of *S. constricta* at different Cd^{2+} concentrations

注: 分别以各时间点对照组缢蛏内脏团中MT mRNA为基础值,各时间点缢蛏内脏团MT mRNA相对表达量为MT mRNA表达量与基础值之比(%)

mRNA 的相对表达量在 3h 附近达到最高值(1.51), 然后开始下降, 在 24h 附近达到最低值(0.50), 低于相对标准值(1.005), 之后开始缓慢地上升; 在其它三个浓度组, 缢蛭内脏团中 MT mRNA 的相对表达量亦表现出相似的变化规律, 但最高相对表达量均高于最低浓度组(5 $\mu\text{g/L}$), 表达时间方面亦快于最低浓度组, 且 50 $\mu\text{g/L}$ 和 100 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 两个浓度组在 48h 达到第二个峰值(1.94 和 3.53); 通过比较可知, 缢蛭内脏团中 MT 的相对表达量与重金属 Cd^{2+} 之间, 存在一定的剂量效应和时间效应关系, 即重金属 Cd^{2+} 浓度越高, MT mRNA 的最高表达量越高, 上升和下降的速度也越快。各浓度组最低相对表达量均在 0.5 左右, 这可能与 MT 的诱导合成和重金属解毒有一定的相关性。

分别对各个时间点缢蛭内脏团中 MT mRNA 相

对表达量与重金属 Cd^{2+} 浓度之间的相关性进行线性拟合, 结果见表 3 和图 4。对各个时间点线性拟合优度进行检验发现, 仅有 3h 和 48h 线性相关性较好: F 值大于 $F_{0.05}(7.71)$, 线性方程自变量与因变量之间关系显著; R^2 在 0.909—0.929, 线性方程解释了因变量的 0.909%—0.929%, 拟合程度良好; P 值也小于 0.05。其它几个时间点的线性相关性都较差。结合图 3 可以观察到, 在不同浓度重金属 Cd^{2+} 水体中, 由于时间效应的影响, 缢蛭内脏团中 MT mRNA 的变化周期不完全同步, 仅在 3h 和 48h, MT mRNA 的变化处在相同的上升周期中, 与重金属浓度之间存在良好的剂量效应关系; 而在下降过程和不同周期中, MT mRNA 的相对表达量与重金属浓度之间的线性拟合不具有现实意义, 拟合效果也较差。

表 3 不同时间点缢蛭内脏团中 MT mRNA 相对表达量与不同浓度重金属 Cd^{2+} 的关系
Tab.3 The relationship between Cd^{2+} concentration and MT mRNA expression in visceral mass of *S. constricta*

时间点	公式	df	F 值	P 值	R^2
3h	$y = 0.0146x + 1.1961$	4	39.36	0.008	0.929
6h	$y = -0.0062x + 1.3295$	4	1.36	0.327	0.312
12h	$y = -0.0042x + 1.0795$	4	0.53	0.520	0.150
24h	$y = 0.0043x + 0.6236$	4	1.56	0.301	0.342
48h	$y = 0.0279x + 0.4857$	4	29.81	0.012	0.909
96h	$y = -0.0022x + 1.1900$	4	0.32	0.613	0.095

注: 线性拟合结果及参数

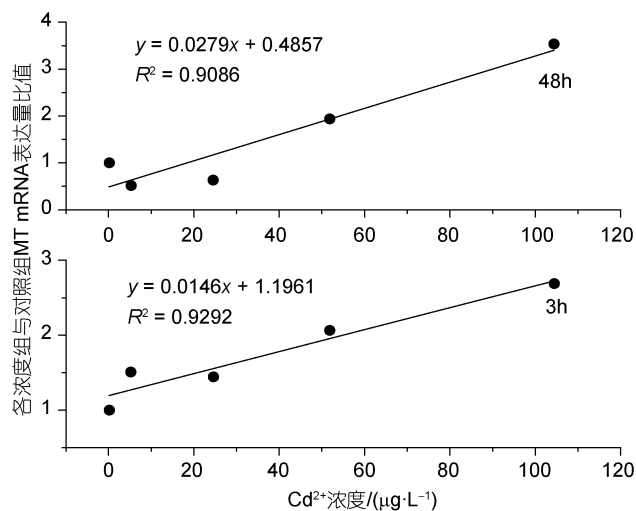


图 4 3h 和 48h 缢蛭内脏团中 MT mRNA 随 Cd^{2+} 浓度的变化规律

Fig.4 The variation of MT mRNA in visceral mass of *S. constricta* with Cd^{2+} concentration at 3h and 48h

3 讨论

金属硫蛋白(MT)广泛存在于大多数生物体内,

现已发现有很多因素能够诱导 MT 的合成, 如重金属、激素、寄生虫寄生、各种应激刺激等(Ivanković *et al*, 2010; Baudrimont *et al*, 2007)。许多研究指出, 对 MT 的监测可以在多个水平进行, 如 MT 中金属含量的增加、MT 蛋白的增加和相应 mRNA 的增加都可以作为指标(徐立红等, 1995)。其中 MT mRNA 是在转录水平直接检测 MT 的诱导, 具有快速的指示作用(刘维青等, 2006)。本研究发现, MT mRNA 在缢蛭内脏团中的表达量最为丰富, 而在其它组织的表达量极少, 说明在自然水体中, 缢蛭内脏团部位是其调节体内必需金属元素平衡与非必需重金属元素解毒的主要场所, 许多贝类体内重金属分布的检测结果也间接证明了这一结论(Amiard *et al*, 1989); Zhao 等(2010)对菲律宾蛤仔(*Ruditapes philippinarum*)的研究亦指出, 内脏团中 MT 含量比鳃有更高的背景值。

在重金属 Cd^{2+} 的胁迫条件下, 缢蛭内脏团中 MT mRNA 相对表达量与重金属浓度和攻毒时间呈现出一定的剂量效应关系和时间效应关系, 这与以往的研究有一些相似的结论。Wang 等(2009)以海湾扇贝(*Argopecten irradians*)为研究对象, 经过 10d 的攻毒

实验,发现随着 Cd^{2+} 浓度的升高, AiMT2 mRNA 的表达量在 10d 时出现显著的上升,表现出一定的剂量效应关系。随着 Cd^{2+} 浓度的增加,缢蛭内脏团中 MT mRNA 最大表达量亦呈现上升的趋势,且在 3h 和 48h 两个时间点, MT mRNA 的表达量与重金属 Cd^{2+} 浓度之间存在很好的剂量效应关系,实验前期 3h 的剂量效应关系有更好的拟合优度;在其它时间点, MT mRNA 的表达量与 Cd^{2+} 浓度剂量效应关系很差,并不适合作为指示重金属污染的指标。

Paul-Pont 等(2010)在研究欧洲鸟尾蛤(*Cerastoderma edule*)时发现, Cd^{2+} 暴露水体中,鳃中 *Cemt1* 基因在攻毒后 24h 和 168h 时有较高的表达水平,而在 72h 的诱导则被显著抑制,称之为脉冲式波动(Desclaux-Marchand *et al*, 2007; Lemoine *et al*, 2003); Ren 等(2003)发现暴露在 Cd^{2+} 条件下小鼠肝脏 MT mRNA 在早期(3h)有一个很快的上升过程,之后出现迅速的下降(6h),表现出很强的时间依赖性;无论是在低浓度,还是高浓度 Cd^{2+} 暴露条件下,缢蛭内脏团中的 MT mRNA 的表达量均随着时间变化而波动,呈现出脉冲式波动。分析认为:重金属 Cd^{2+} 进入缢蛭内脏团后,产生一个毒物刺激效应,诱导 MT 基因表达, MT mRNA 的量迅速升高,合成大量的 MT 与 Cd^{2+} 结合;当 MT 的量达到较高的浓度时,能够满足重金属解毒的需求, MT 基因的表达就会受到抑制,呈现明显的下降趋势;随着合成的 MT 与内脏团中重金属的不断结合, MT 的量又逐渐下降到较低水平,即相当于对照组一半(0.5 左右)水平时,抑制解除,新一轮 MT 基因的表达开始,全程 MT 基因相对表达量呈现出脉冲式的波动。因此,在探讨 MT mRNA 作为环境重金属污染指标的研究中,时间是一个不容忽视的重要参数,而且与重金属浓度密切相关。

MT 基因诱导水平往往受多种因素影响,存在温度效应关系、剂量效应关系和时间效应关系等,这就增加了 MT mRNA 监测指标应用的难度。本研究可知,选择合适的时间段,缢蛭内脏团中 MT mRNA 可以作为监测水体环境重金属 Cd^{2+} 污染的生物参考指标。贝类体内 MT mRNA 的早期诱导,以及较长时期的重金属暴露对贝类体内 MT mRNA 整体水平的影响将是下一步研究的重点。因此,在开展水体环境重金属监测时,将 MT mRNA 水平与贝类体内重金属富集、MT 蛋白水平和以及其它生化指标综合考虑,会具有更好的监测效果。

参 考 文 献

- 刘维青,倪多娇,宋林生等,2006. 海湾扇贝(*Argopecten irradians*)金属硫蛋白基因的克隆与分析. 海洋与湖沼, 37(5): 444—449
- 苏文,吴惠丰,廖春阳等,2010. 锌铅暴露条件下菲律宾蛤仔消化腺和鳃内金属和金属硫蛋白的变化. 中国科学院研究生院学报, 27(4): 456—462
- 周彦锋,吴伟,胡庚东等,2009. 镉锌联合诱导金属硫蛋白在鲫鱼肝脏和肾脏中的表达. 生态环境学报, 18(3): 811—816
- 赵顺顺,孟范平,王震宇等,2010. 监测水体重金属污染分子生物标志物研究进展. 生态环境学报, 19(2): 453—458
- 秦玉明,苏秀榕,李晔等,2010. 缢蛭(*Sinonovacula constricta*)cDNA 文库的构建及肌动蛋白基因的研究. 海洋与湖沼, 41(1): 54—60
- 徐立红,张甬元,陈宜瑜,1995. 分子生态毒理学研究进展及其在水环境保护中的意义. 水生生物学报, 19(2): 171—185
- Amiard J C, Amiard-Triquet C, Ballan-Dufrançais C *et al*, 1989. Study of the bioaccumulation at the molecular, cellular and organism levels of lead and copper transferred to the oyster *Crassostrea gigas* Thunberg directly from water or via food. In: Proceedings of the European Marine Biology Symposium, 20e EMBS, 521—529
- Baudrimont M, de Montaudouin X, 2007. Evidence of an altered protective effect of metallothioneins after cadmium exposure in the digenean parasite-infected cockle (*Cerastoderma edule*). Parasitology, 134(2): 237—245
- Berthet B, Mouneyrac C, Pérez T *et al*, 2005. Metallothionein concentration in sponges (*Spongia officinalis*) as a biomarker of metal contamination. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology, 141(3): 306—313
- Coyle P, Philcox J C, Carey L C *et al*, 2002. Metallothionein: The multipurpose protein. Cellular and Molecular Life Sciences, 59(4): 627—647
- Desclaux-Marchand C, Paul-Pont I, Gonzalez P *et al*, 2007. Metallothionein gene identification and expression in the cockle (*Cerastoderma edule*) under parasitism (trematodes) and cadmium contaminations. Aquatic Living Resources, 20(1): 43—49
- Ivanković D, Pavčić J, Beatović V *et al*, 2010. Inducibility of metallothionein biosynthesis in the whole soft tissue of zebra mussels *Dreissena polymorpha* exposed to cadmium, copper, and pentachlorophenol. Environmental Toxicology, 25(2): 198—211
- Lemoine S, Laulier M, 2003. Potential use of the levels of the mRNA of a specific metallothionein isoform (MT-20) in mussel (*Mytilus edulis*) as a biomarker of cadmium contamination. Marine Pollution Bulletin, 46(11): 1450—1455

- Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M *et al*, 2010. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: Discrepancy between mRNA and protein responses. *Aquatic Toxicology*, 97(3): 260—267
- Rainbow P S, 2002. Trace metal concentrations in aquatic invertebrates: why and so what? *Environmental Pollution*, 120(3): 497—507
- Ren X Y, Zhou Y, Zhang J P *et al*, 2003. Metallothionein gene expression under different time in testicular sertoli cells of rats treated with cadmium. *Progress in Biochemistry and Biophysics*, 30(6): 965—968
- Wang L L, Song L S, Ni D J *et al*, 2009. Alteration of metallothionein mRNA in bay scallop *Argopecten irradians* under cadmium exposure and bacteria challenge. *Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, Toxicology & Pharmacology*, 149(1): 50—57
- Zhao S, Meng F, Fu H *et al*, 2010. Metallothionein levels in gills and visceral mass of *Ruditapes philippinarum* exposed to sublethal doses of cadmium and copper. *International Conference on Challenges in Environmental Science and Computer Engineering, CESCE 2010, 2*: 181—186

THE METALLOTHIONEIN GENE EXPRESSION IN *SINONOVACULA CONSTRICTA* EXPOSING TO CADMIUM

HUO Li-Hui^{1,2}, CHEN Cai-Fang¹, LIN Zhi-Hua¹, DONG Ying-Hui¹,
GU Hai-Long^{1,3}, WANG Qing^{1,3}, BAO Yong-Bo¹

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo, 315100; 2. School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo, 315211; 3. College of Fisheries and Life Sciences, Shanghai Ocean University, Shanghai, 201306)

Abstract The tissue specific expression of MT mRNA in seven tissues of *Sinonovacula constricta* and the effect of cadmium on visceral mass were studied using real-time quantitative PCR. In the absence of Cd²⁺, the level of MT mRNA was highest in visceral mass. But in the presence of Cd²⁺, the MT mRNA expression level in visceral mass of *S. constricta* showed significant dose and time dependency. With the increase of Cd²⁺ concentration, the level of MT expression increased significantly. The “pulse-scheme” expression showed by the time change indicated that MT-mRNA expression following metal exposure was largely dependent of time. Linear relationship existed between MT expression and Cd²⁺ concentration from 3h point and 48h point. The change of MT mRNA expression in visceral mass could be a biomarker index for Cd²⁺ pollution.

Key words *Sinonovacula constricta*, Cadmium, MT mRNA, Visceral mass