

铜锈环棱螺 HSP70 对 Cd 和 BDE-47 胁迫的响应敏感性*

马陶武¹, 王 萌¹, 彭中英¹, 何兴兵¹, 吴玲玲², 龙 奕¹, 刘珊珊¹

(1. 吉首大学 生物资源与环境科学学院, 湖南 吉首 416000; 2. 同济大学 环境科学与工程学院, 上海 200092)

摘要:采用沉积物生物毒性测试,分别研究了不同含量 Cd 和 BDE-47 污染沉积物对铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)肝胰脏热休克蛋白 HSP70 表达水平的变化,以揭示 Cd 和 BDE-47 胁迫与 HSP70 表达响应的时/剂量-效应关系,探讨 HSP70 作为持久性有毒物质对铜锈环棱螺早期伤害生物标志物的敏感性。结果表明,受到不同含量 Cd 和 BDE-47 加标沉积物胁迫后,铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达均表现出较为明显的时/剂量-效应关系。在 Cd 短期(0~10 d)暴露下,HSP70 应激水平随 Cd 含量的升高而显著升高($p < 0.05$);在 Cd 长期(10~21 d)暴露下,HSP70 应激水平随 Cd 含量的升高表现为先升后降,低 Cd 含量($5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)暴露下 HSP70 应激水平随暴露时间的延长而显著上升($p < 0.05$);中、高 Cd 含量($25, 100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)暴露下 HSP70 应激水平随时间的延长均呈先升后降的趋势。不同含量 BDE-47 暴露下 HSP70 应激水平时间的延长大体上均呈先升高后降低的变化趋势;低、中含量 BDE-47($160, 640 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)短期暴露对 HSP70 应激水平没有影响,而长期(10~21 d)暴露后,HSP70 应激水平均显著降低($p < 0.05$)。比较而言,HSP70 对 Cd 低含量($5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)短期(低于 10 d)暴露显示出较好的敏感性,而对 BDE-47 低含量($160 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$)短期暴露表现不敏感;低含量 Cd 和 BDE-47 长时间(10~21 d)暴露下,HSP70 均具有较好的指示作用。

关键词: Cd; BDE-47; 铜锈环棱螺; 肝胰脏; 沉积物; HSP70; 生态毒性; 生物标志物

中图分类号: Q958.116

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2014)06-0022-07

各种来源的持久性有毒物质进入水环境后通过吸附、络合或共沉淀等理化作用过程富集于沉积物中,形成二次污染源,对水生生物和人类健康构成潜在威胁;因此,水体沉积物中持久性有毒污染物的生态毒理学效应一直是人们关注的重要问题。镉(Cd)和 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)是两种典型的持久性有毒物质^[1]。Cd 是一种生物非必需的、毒副作用很强的重金属。有研究显示,国内一些典型淡水沉积物中 Cd 污染已达到较高水平($39 \sim 392 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)^[2-3],远高于淡水沉积物质量指南中 Cd 的毒性效应低值($1.2 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)^[4],存在较大的生态毒性风险。20 世纪 70 年代以来,多溴联苯醚(PBDEs)因成本低、性能效率高从而替代了一直使用的主要化学阻燃剂多氯联苯(PCBs)。然而,PBDEs 可通过从基质释放、废物回收处置等过程污染环境^[5]。PBDEs 属于持久性有机污染物,其中 BDE-47 在 PBDEs 同系物中分布最广,在生物材料中含量最高,对生物和人体毒性最强^[6-8]。目前,对水环境中重金属和 PBDEs 生态毒性的报道大多数与鱼类有关^[9-15],基于底栖动物的相关研究则少有报道。

底栖动物是水生态系统中最重要、最稳定的定居动物代表类群之一,选择该类动物作为测试生物将可以充分反映沉积物毒性的生态相关性。铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)是一种腹足纲(Gastropod)田螺科(Viviparidae)的淡水软体动物,在中国广泛分布,主要栖居在沉积物中,处于水生食物链的重要环节。鉴于近年来人们对该物种的生物学特性和生态重要性的充分了解,铜锈环棱螺已被建议作为中国淡水沉积物生态毒性测试的模式生物^[16],目前已经开展了一些有关该物种的沉积物生态毒性测试研究^[17-21],但有关该物种对沉积物中持久性有毒物质胁迫的分子生物标志物响应敏感性的研究还只有少量数据,需要进一步确立该物种对持久性有毒污染物胁迫的各种有效分子生物标志物响应的时/剂量-效应关系。

本研究利用实验室培养的铜锈环棱螺进行 Cd 和 BDE-47 加标沉积物的生物毒性测试,研究两种物质对铜锈环棱螺肝胰脏热休克蛋白 70(HSP70)表达水平的影响,揭示其间的时/剂量-效应关系,探讨 Cd 和 BDE-47 对铜锈环棱螺的潜在分子生态毒理学作用机理,以期寻找持久性有毒物质潜在生态风险评价的合适分子生物标

* 收稿日期:2014-09-21 修回日期:2014-10-06 网络出版时间:2014-11-19 21:49

资助项目:国家自然科学基金项目(No. 41171383);生态旅游湖南省重点实验室开放基金项目(No. JDSTLY1409)

作者简介:马陶武,男,教授,博士,研究方向为水生态毒理学,E-mail:mtw922@163.com

网络出版地址:http://www.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20141119.2149.005.html

志物提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 采用实验室人工培养的铜锈环棱螺成年个体,5月龄,壳长(18.15±1.94) mm;体重(1.50±0.42) g,培养方法见文献[16]。

1.1.2 仪器 Mini PROTEAN® Tetra Cell 垂直电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、Power Pac-HV 型电泳仪(美国 Bio-Rad 公司)、Mini Trans-Blot 转印槽系统(美国 Bio-Rad 公司);Tanon-1600R 全自动数码凝胶成像系统(上海天能科技);WD-9405B 型水平摇床(北京六一仪器厂)。

1.1.3 试剂 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (分析纯,购自上海国药);BDE-47(2,2',4,4'-四溴联苯醚,纯度 98.5%,购自 AccuStandard 公司);Tris 碱、乙基苯基聚乙二醇(Nonidet-P40)、异丙醇、苯甲基磺酰氟(PMSF)、十二烷基磺酸钠(SDS)、丙稀酰胺、双丙稀酰胺(N,N'-甲叉双丙稀酰胺)、过硫酸铵(APS)、四甲基乙二胺(TEMED)、 β -巯基乙醇、溴酚兰、考马斯亮蓝 R-250、甘油、甘氨酸、冰醋酸、甲醇、乙醇等均为国产分析纯试剂;预染蛋白 Marker SM0671(购自 Fermentas 公司);小鼠抗鸡 HSP70/90 单克隆抗体 IgG(购自 Stressgen 公司);辣根过氧化物标记的山羊抗小鼠 IgG-HRP(购自 Santa Cruz 公司)。

1.1.4 实验沉积物 实验沉积物为以采自湖南德夯自然保护区内的洁净土壤制作的人工沉积物。采集与处理方法见文献[16]。

1.2 沉积物生物测试

参照笔者所在研究团队以前的研究进行 Cd 和 BDE-47 加标沉积物实验设计^[17,20]。Cd 加标沉积物生物测试共设置 1 个对照组和 3 个 Cd 含量处理组(5、25、100 $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ 干沉积物),每个处理组设 3 个重复。Cd 加标沉积物制备方法见文献[17]。BDE-47 加标沉积物生物测试共设置 1 个对照组和 3 个 BDE-47 含量处理组(160、640、2 000 $\text{ng} \cdot \text{g}^{-1}$ 干沉积物),每个处理组设 3 个重复。BDE-47 加标沉积物制备方法见周科等人^[20]的研究。加标沉积物完成平衡后,把每个处理组的加标沉积物均分到 3 个重复测试缸中,然后缓慢注入上覆水(去氯自来水),将测试缸放置在水浴控温槽中,静置 1 d 后放置实验螺。对所有实验螺先随机分组(每组 25 只),然后放入每个测试缸,采用静水充氧的暴露方式,暴露时间为 21 d,暴露其间的光照周期为 12 h 光照:12 h 黑暗,水温保持在(24±1) °C。实验用水为去氯自来水,水质参数为:电导率 267 $\mu\text{S} \cdot \text{cm}^{-1}$ 、pH 值 7.99、总氮 0.41 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、硬度 78.4 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 计)、碱度 4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ (以 CaCO_3 计)。在测试缸上加盖尼龙网防逃,每两天投喂少许三元牌观赏鱼饵料。分别在暴露的第 0、3、7、10、14、21 d 取样,每次从每个测试缸中取 4~5 只螺,取肝胰脏,并称重,然后放入液氮保存备测。

1.3 样品制备

将肝胰脏样品与预冷蛋白抽提液(66 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 值 7.2, 3% Nonidet-P40, 0.1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ PMSF)按 1:4 的体积比加到玻璃匀浆管中,在冰浴中完成匀浆,将匀浆液转入容积为 1.5 mL 的离心管中,然后在 4 °C、10 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 下离心 20 min,取上清液;先测定蛋白含量,然后根据预实验的结果调整蛋白含量为 8.0 $\mu\text{g} \cdot \mu\text{L}^{-1}$,在液氮中速冻,然后置-80 °C 冰箱保存备测。

1.4 HSP70 测定

1.4.1 SDS-PAGE 蛋白电泳 先制备 8% 分离胶和 5% 浓缩胶,在垂直电泳仪中灌制 SDS-聚丙烯酰胺凝胶,然后制备电泳样品:先解冻样品,然后取 10 μL 样品加到 500 μL 容积离心管中,同时加入相同体积的上样缓冲液,在沸水中煮 5 min,冷却,对样品短暂离心后进行电泳上样,同时加入预染标准蛋白 marker。在 100 V 恒压下电泳,当溴酚蓝指示剂到达距凝胶底部约 1 cm 处终止电泳。

1.4.2 Western Blotting 免疫印迹 1) 转膜。先截取所需转印的电泳凝胶,将其浸泡在蛋白转移缓冲液中;然后将与凝胶相同尺寸的 1 张 NC 膜和 4 张 Whatman 滤纸在蛋白转移缓冲液中浸泡 20 min,同时还将 2 张纤维垫在蛋白转移缓冲液中适当浸泡。由下至上依次按纤维垫、2 层滤纸、凝胶、NC 膜、2 层滤纸、纤维垫的顺序进行层叠,并赶走层间气泡,放入转印槽系统,在 100 V 恒压下转印 60 min。

2) 封闭。转印结束后,取出 NC 膜,以 PBS 缓冲液反复清洗 5 min。然后放置在封闭缓冲液,在摇床上室温封闭 1 h。

3) 孵育。从封闭液中取出 NC 膜,按一抗(小鼠抗鸡 HSP70/90 单克隆抗体 IgG)和孵育液 1:500 的体积比加入一抗,在摇床上室温孵育 1 h,然后用 PBS 清洗 3 次,每次 10 min;按二抗(辣根过氧化物标记的山羊抗小鼠 IgG-HRP)和孵育液 1:2000 的体积比加入二抗,在摇床上室温孵育 1 h,然后用 TBS 缓冲液清洗 3 次,每次 10 min,以除去未结合的二抗。

4) 显色。将经孵育过的 NC 膜放置在玻璃比色皿中,在避光条件下用新配制的 4-氯-1-萘酚显色液进行显色反应 30 min,以 TBS 缓冲液终止反应。在凝胶分析系统中对 NC 膜进行扫描,并保存图像。

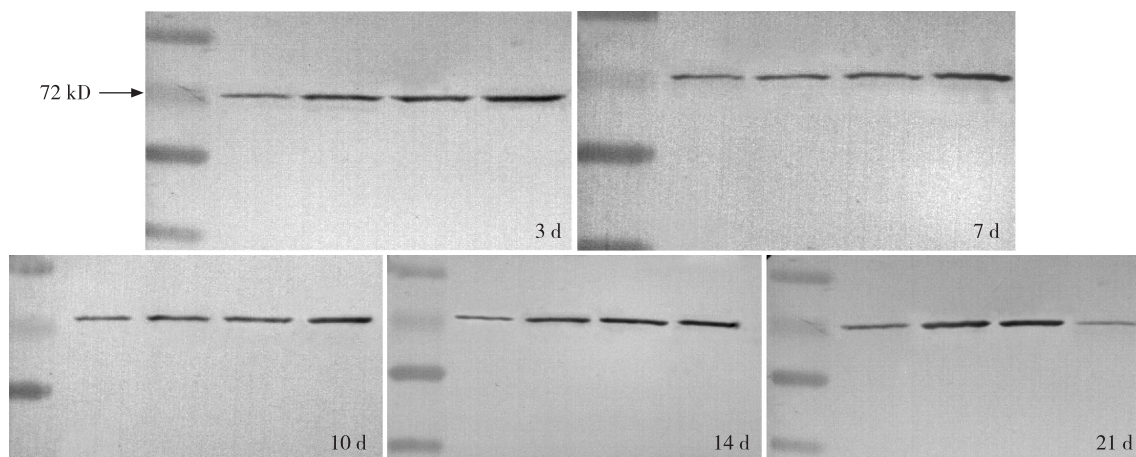
1.5 数据处理与统计分析

采用全自动数码凝胶成像系统对 Western Blotting 图像进行灰度分析,估计灰度值,并计算各处理组的相对灰度值(以实验组灰度值/对照组灰度值的比值表示)。采用 SPSS 20.0 进行数据的统计分析,利用单因素方差分析法(One-way ANOVA)和多重比较检验法(LSD)进行组间差异显著性检验,显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 Cd 对铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达水平的影响

铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 对 Cd 应激表达的 Western Blotting 免疫印迹如图 1 所示。不同 Cd 处理组 HSP70 的相对表达水平见表 1。在相同暴露时间内,铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达水平呈现一定的剂量-效应关系。在短期(0~10 d)暴露时,HSP70 表达水平随 Cd 含量的增加而显著升高($p < 0.05$);在长期(10~21 d)暴露时,HSP70 表达水平随 Cd 含量的升高呈现先升高后下降。在相同 Cd 暴露含量相同的情况下,低 Cd 含量组($5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)的 HSP70 表达水平随暴露时间的延长而显著升高($p < 0.05$),在 21 d 时达到峰值;中、高 Cd 含量组($25, 100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$)的 HSP70 表达水平则随暴露时间的延长呈现先升后降的变化趋势,在中、高 Cd 含量组 HSP70 表达水平分别在暴露 14 d 和 10 d 后达到峰值,在 21 d 时,高 Cd 含量组 HSP70 表达水平下降到最低水平。



注:各图中泳道由左至右依次为:分子量标准、对照组、 $5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd 处理组、 $25 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd 处理组、 $100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Cd 处理组。

图 1 Cd 加标沉积物暴露后铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达的 Western blot 印迹代表性图片

Fig. 1 Representative Western Blots of hepatopancreatic HSP70 in *B. aeruginosa* after exposure to Cd-spiked sediments

表 1 Cd 加标沉积物暴露后铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达水平(以相对灰度值表示)

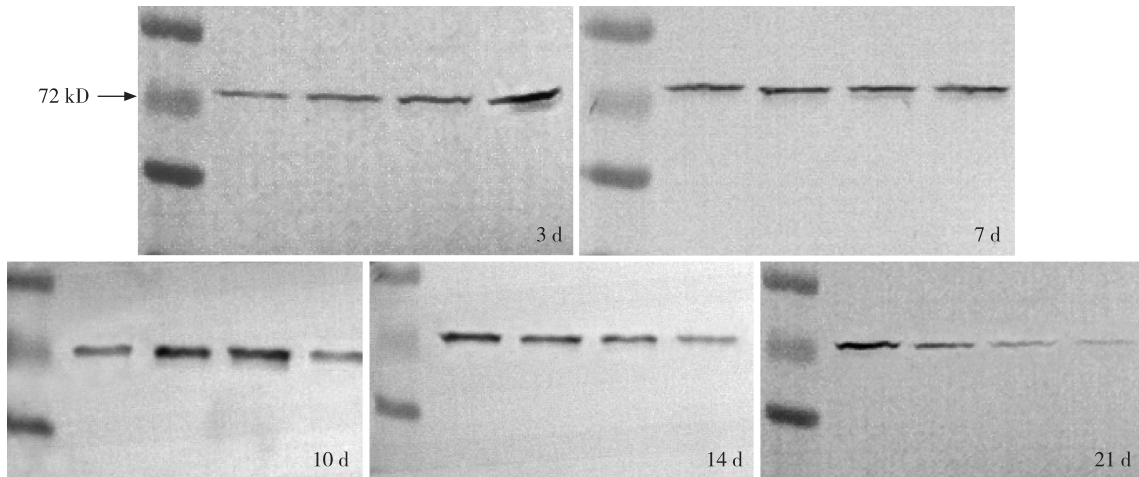
Tab. 1 Hepatopancreatic HSP70 levels (relative grey value) in *B. aeruginosa* after exposure to Cd-spiked sediments

Cd 加标含量/ $(\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1})$	暴露时间/d					
	0	3	7	10	14	21
对照组		$1.07 \pm 0.02^{a,A}$	$1.07 \pm 0.05^{a,A}$	$1.05 \pm 0.08^{a,A}$	$1.07 \pm 0.03^{a,A}$	$1.09 \pm 0.05^{a,A}$
5	1.01 ± 0.14^A	$1.29 \pm 0.02^{b,B}$	$1.35 \pm 0.03^{b,B}$	$1.48 \pm 0.09^{b,C}$	$2.05 \pm 0.07^{b,D}$	$2.96 \pm 0.08^{b,E}$
25		$1.34 \pm 0.08^{b,B}$	$1.47 \pm 0.08^{c,C}$	$1.54 \pm 0.04^{b,C}$	$2.23 \pm 0.10^{c,D}$	$1.89 \pm 0.09^{c,E}$
100		$1.69 \pm 0.01^{c,B}$	$1.89 \pm 0.09^{d,C}$	$2.16 \pm 0.09^{c,D}$	$1.63 \pm 0.06^{d,B}$	$0.73 \pm 0.07^{d,E}$

注:在相同暴露持续时间内,处理间无相同小写字母则表示差异显著($p < 0.05$);在同一处理组,不同取样时间点间无相同大写字母则表示差异显著($p < 0.05$),下同。

2.2 BDE-47 对铜锈环棱螺肝胰脏中 HSP70 表达水平的影响

铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 对 BDE-47 应激表达的 Western Blotting 免疫印迹如图 2 所示。不同 BDE-47 处理组 HSP70 的相对表达水平见表 2。肝胰脏 HSP70 表达水平随暴露时间的延长呈现不同的规律。暴露 3 d 后,低、中 BDE-47 含量组(160,640 ng · g⁻¹)的 HSP70 表达水平与对照组相比没有显著差异,高含量组(2 000 ng · g⁻¹)的 HSP70 表达水平表现为显著升高并达到最大值;暴露 7 d 后,各处理组间 HSP70 表达水平没有显著差异;暴露 10 d 后,HSP70 表达水平随 BDE-47 含量的增加呈现先升后下的变化趋势;在长期(14~21 d)暴露的情况下,各处理组 HSP70 表达水平均随 BDE-47 含量的增加而显著下降($p < 0.05$),不同处理组间存在显著差异($p < 0.05$)。在相同 BDE-47 暴露含量相同的情况下,HSP70 表达水平随暴露时间的延长总体上呈现先升后降,高 BDE-47 含量组的 HSP70 表达水平在暴露后 3 d 即达到最大值,而低、中 BDE-47 含量组的 HSP70 表达水平在暴露后 10 d 才达到最大值。



注:各图中泳道由左至右依次为:分子量标准、对照组、160 ng · g⁻¹BDE-47 处理组、640 ng · g⁻¹BDE-47 处理组、2 000 ng · g⁻¹BDE-47 处理组。

图 2 BDE-47 加标沉积物暴露后铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达的 Western blot 印迹图代表性图片

Fig. 2 Representative Western Blots of hepatopancreatic HSP70 in *B. aeruginosa* after exposure to BDE-47-spiked sediments

表 2 BDE-47 加标沉积物暴露后铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 表达水平(以相对灰度值表示)

Tab.2 Hepatopancreatic HSP70 levels (relative grey value) in *B. aeruginosa* after exposure to BDE-47-spiked sediments

BDE-47 加标含量/(ng · g ⁻¹)	暴露时间/d					
	0	3	7	10	14	21
对照组		0.93 ± 0.03 ^{a,A}	1.06 ± 0.05 ^{a,A}	1.01 ± 0.06 ^{a,A}	0.91 ± 0.05 ^{a,A}	1.04 ± 0.10 ^{a,A}
160	0.99 ± 0.11 ^A	0.90 ± 0.05 ^{a,A}	0.97 ± 0.05 ^{a,A}	1.14 ± 0.04 ^{b,B}	0.81 ± 0.06 ^{b,C}	0.82 ± 0.01 ^{b,C}
640		0.90 ± 0.08 ^{a,A}	0.99 ± 0.09 ^{a,A}	1.33 ± 0.04 ^{c,B}	0.71 ± 0.03 ^{c,C}	0.61 ± 0.02 ^{c,D}
2 000		1.22 ± 0.01 ^{b,B}	1.07 ± 0.05 ^{a,C}	0.81 ± 0.05 ^{d,D}	0.61 ± 0.05 ^{d,E}	0.40 ± 0.04 ^{d,F}

3 讨论

细胞应激反应是对细胞蛋白质保护和再利用系统中关键蛋白质的有序诱导。热休克蛋白(HSP)是机体细胞受到应激原(如代谢毒物、污染胁迫、缺氧、环境高温、氧化应激等)胁迫时能够高效表达、在进化上高度保守的一组应激蛋白,对机体细胞起到保护作用^[22]。HSP70(分子量 68~74 kD)是 HSP 超家族的重要成员,具有“细胞管家”的作用,尤其是在消除污染胁迫对机体造成的损伤方面发挥重要作用^[23-25]。由于 HSP70 对应激源诱导敏感且其序列高度保守,因此 HSP70 常被用作环境污染胁迫的敏感生物标志物^[26],是持久性有毒物质早期伤害的重要分子生态毒理学预警指标。

一些研究显示多种重金属可以明显地引起水生生物 HSP70 的上调表达。Downs 等人^[27]发现草虾(*Palaeomonetes pugio*)受 Cd 胁迫后 HSP70 的表达显著增加;Sanders 等人^[28]和 Duffya 等人^[29]的研究显示,黑头软口鲮(*Pimephales promelas*)、虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*)受 Zn、Cu 和 Hg 暴露后 HSP70 的表达水平亦明显升

高。本研究表明,在短期(0~10 d)暴露时,HSP70 表达水平随 Cd 含量的增加而显著升高;在长期(10~21 d)暴露时,HSP70 表达水平随 Cd 含量的升高呈现先升高后下降。低含量组的 HSP70 表达水平随暴露时间的延长而显著升高($p < 0.05$);中、高含量组的 HSP70 表达水平则随暴露时间的延长先升后降。低 Cd 处理组的结果与前人的研究基本一致,这说明当沉积物 Cd 含量胁迫即可导致细胞的应激反应,明显诱导铜锈环棱螺肝胰脏 HSP70 的表达,HSP70 具有较高的敏感性。在高含量 Cd 胁迫下,HSP70 的表达水平在暴露中期达到最大值,在暴露后期则显著降低($p < 0.05$),提示在高含量 Cd 胁迫下肝胰脏细胞已经遭受一定程度的损伤,肝胰脏细胞的应激能力大大减弱,不能有效地诱导 HSP70 表达。

已有的研究证实很多有机化合物对生物组织细胞 HSP70 具有诱导作用。Vijayan 等人^[30]的研究指出,亚致死含量的多环芳烃能够显著诱导虹鳟肝胰脏 HSP70 的表达;Hassanein 等人^[31]发现尼罗罗非鱼(*Tilapia nilotica*)受到杀虫剂复禄芬暴露后 HSP70 表达水平显著升高;沈骅等人^[30]的研究显示鲫鱼(*Carassius auratus*)在低含量 2-硝基-4'-羟基二苯胺胁迫下其鳃组织 HSP70 的表达水平呈现时间依赖性升高。但这些研究并没有指出剂量-效应关系,无法判断这些水生生物受到有机化学品胁迫时 HSP70 的响应敏感性。本研究表明,不同 BDE-47 含量处理组 HSP70 的表达水平随暴露时间的延长总体上表现为先升后降的变化趋势,高 BDE-47 含量组的 HSP70 表达水平在暴露后 3 d 即达到最大值,而低、中 BDE-47 含量组的 HSP70 表达水平在暴露后 10 d 才达到最大值。这提示相对低 BDE-47 含量短期胁迫不能引起铜锈环棱螺肝胰脏细胞迅速产生应激反应,但在高 BDE-47 含量短期胁迫下,HSP70 则显示出较好的敏感性;低 BDE-47 含量长期胁迫才可激发细胞的应激反应,引起 HSP70 表达水平显著升高。本研究还显示,不同 BDE-47 处理组在长期(10~21 d)后 HSP70 表达水平与对照组相比均显著降低,提示在长期胁迫下不同含量的 BDE-47 均可导致铜锈环棱螺肝胰脏细胞受损,HSP70 表达受阻,应激能力减弱。

总之,铜锈环棱螺受到 Cd 和 BDE-47 污染沉积物胁迫后,肝胰脏 HSP70 的表达表现出明显的时间或含量效应关系。HSP70 在 Cd 低含量短期胁迫下具有较好的敏感性。而 HSP70 对 BDE-47 低含量短期胁迫表现不敏感。但低含量 Cd 和 BDE-47 长时间胁迫下,HSP70 均具有较好的指示作用。

参考文献:

- [1] 江桂斌.持久性有毒污染物的环境化学行为与毒理效应[J].毒理学杂志,2005,19(Suppl):179-180.
Jiang G B. Environmental chemical behaviors and toxicological effects of persistent toxic substances[J]. Journal of Toxicology, 2005, 19(Suppl): 179-180.
- [2] 樊庆云,何江,薛红喜,等.南海湖沉积物重金属形态分布及其对水质影响的研究[J].沉积学报,2007,25(4):612-618.
Fan Q Y, He J, Xue H X, et al. Heavy metals speciation in sediments and effect on water quality in Nanhai Lake[J]. Acta Sedimentologica Sinica, 2007, 25(4): 612-618.
- [3] 彭渤,唐晓燕,余昌训,等.湘江入湖河段沉积物重金属污染及其 Pb 同位素地球化学示踪[J].地质学报,2011,85(2):282-299.
Peng B, Tang X Y, Yu C X, et al. Heavy metal contamination of inlet sediments of the Xiangjiang River and Pb isotopic geochemical implication[J]. Acta Geologica Sinica, 2011, 85(2): 282-299.
- [4] Mac Donald D D, Ingersoll C G, Berger T A. Development and evaluation of consensus-based sediment quality guidelines for freshwater ecosystems[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2000, 39(1): 20-31.
- [5] De Wit C A. An overview of brominated flame retardants in the environment[J]. Chemosphere, 2002, 46(5): 583-624.
- [6] Costa L G, Giordano G, Tagliaferri S, et al. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants: environmental contamination, human body burden and potential adverse health effects[J]. Acta Biomedica, 2008, 79(3): 172-183.
- [7] Gouin T, Harner T. Modelling the environmental fate of the polybrominated diphenyl ethers[J]. Environment International, 2003, 29(6): 717-724.
- [8] 刘佳,彭巾英,马陶武,等.沉积物中 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)在铜锈环棱螺体内的毒代动力学及其繁殖毒性[J].生态毒理学报,2012,7(3):259-267.
Liu J, Peng JY, Ma T W, et al. Toxicokinetics and Reproductive Effects of Sediment-Associated 2, 2', 4, 4'-Tetrabromodiphenyl Ether (BDE-47) in *Bellamya aeruginosa* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(3): 259-267.
- [9] 刘长发,陶澍,龙爱民.金鱼对铅和镉的吸收蓄积[J].水生生物学报,2001,25(4):343-349.
Liu C F, Tao S, Long A M. Accumulations of lead and cadmium in goldfish, *Carassius auratus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2001, 25(4): 343-349.
- [10] 杨丽华,方展强,郑文彪,等.镉对鲫鱼鳃和肝脏超氧化物歧化酶活性的影响[J].安全与环境学报,2003,3(3):13-16.

- Yang L H, Fang Z Q, Zheng W B, et al. Experiment with effect of cadmium on activity of superoxide dismutase in gill and liver tissue of crucian[J]. Journal of Safety and Environment, 2003, 3(3): 13-16.
- [11] 张春丹, 黄福勇, 李明月, 等. 镉胁迫条件下大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)外周血微核标记及肝脏过氧化物酶标记的变化[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(1): 7-13.
- Zhang C D, Huang F Y, Li M Y, et al. Cadmium-induced changes in the markers of erythrocyte micronuclei and peroxydases in liver of *Boleophthalmus pectinirostris*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(1): 7-13.
- [12] Kuiper R V, Bergmand A, Vos J G, et al. Some polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants with wide environmental distribution inhibit TCDD-induced EROD activity in primary cultured carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes[J]. Aquatic Toxicology, 2004, 68(2): 129-139.
- [13] Muirhead E K, Skillman A D, Hook S E, et al. Oral Exposure of PBDE-47 in Fish: Toxicokinetics and Reproductive Effects in Japanese Medaka (*Oryzias latipes*) and Fathead Minnows (*Pimephales promelas*)[J]. Environmental Science and Technology, 2006, 40(2): 523-528.
- [14] Mariottini M, Corsi I, Torre C D, et al. Biomonitoring of polybrominated diphenyl ether (PBDE) pollution: A field study[J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2008, 148(1): 80-86.
- [15] 吴伟, 聂凤琴, 瞿建宏, 等. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚对鲫鱼离体肝脏组织的氧化胁迫[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(5): 1005-1009.
- Wu W, Nie F Q, Qu J H, et al. Oxidative stress of tetrabromodiphenyl ether to the liver of *Carassius auratus*, in Vitro[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2009, 28(5): 1005-1009.
- [16] Ma T W, Gong S J, Zhou K, et al. Laboratory culture of the freshwater benthic gastropod *Bellamya aeruginosa* (Reeve) and its utility as a test species for sediment toxicity[J]. Journal of Environmental Sciences, 2010, 22(2): 304-313.
- [17] 马陶武, 周科, 朱程, 等. 铜锈环棱螺对镉污染沉积物慢性胁迫的生物标志物响应[J]. 环境科学学报, 2009, 29(8): 1750-1756.
- Ma T W, Zhou K, Zhu C, et al. Biomarker responses of *Bellamya aeruginosa* to the chronic stress of cadmium-contaminated sediment[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(8): 1750-1756.
- [18] 马陶武, 朱程, 周科, 等. 铜锈环棱螺对铅污染沉积物慢性胁迫的繁殖响应和氧化应激反应敏感性[J]. 生态学报, 2009, 29(10): 5350-5357.
- Ma T W, Zhu C, Zhou K, et al. The reproductive reaction and oxidative stress responses sensitivity of *Bellamya aeruginosa* to the chronic exposure of lead-contaminated sediments[J]. Acta Ecologica Sinica, 2009, 29(10): 5350-5357.
- [19] 马陶武, 朱程, 周科, 等. Cd Pb 单一及复合污染沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏 SOD 和 MT 的影响[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(1): 30-37.
- Ma T W, Zhu C, Zhou K, et al. Effects of Cd, Pb and combined contaminated sediments on hepatopancreatic SOD and MT in *Bellamya aeruginosa*[J]. Journal of Agro-Environment Science, 2010, 29(1): 30-37.
- [20] 周科, 马陶武, 朱程, 等. 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚(BDE-47)污染沉积物对铜锈环棱螺肝胰脏的 SOD, CAT 和 EROD 活性的影响[J]. 环境科学学报, 2010, 30(8): 1666-1673.
- Zhou K, Ma T W, Zhu C, et al. Effects of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenylether (BDE-47)-contaminated sediments on SOD, CAT, and EROD activities in the hepatopancreas of *Bellamya aeruginosa*[J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2010, 30(8): 1666-1673.
- [21] 彭巾英, 刘佳, 马陶武, 等. 沉积物中三丁基锡对铜锈环棱螺肝胰脏抗氧化防御系统的影响[J]. 上海环境科学, 2012, 31(3): 97-101.
- Peng J Y, Liu J, Ma T W, et al. Effects of sediment-associated tributyltin (TBT) on the hepatopancreatic antioxidant defense system of *Bellamya aeruginosa*[J]. Shanghai Environmental Sciences, 2012, 31(3): 97-101.
- [22] 张晓鹏. HSP70 的生物学功能新进展[J]. 国外医学卫生学分册, 2002, 29(6): 337-343.
- Zhang P. New progress of the biological function of HSP70 [J]. Foreign Medical Science, Section Hygiene, 2002, 29(6): 337-343.
- [23] Urania C, Melchiorretto P, Morazzonib F, et al. Copper and zinc uptake and hsp70 expression in HepG2 cells[J]. Toxicology in Vitro, 2001, 15(4/5): 497-502.
- [24] Helen M B, Douglas R G. Stress management-heat shock protein-70 and the regulation of apoptosis[J]. Trends in Cell Biology, 2001, 11(1): 6-10.
- [25] Adrienne N B, Mathilakath M V. Constitutive heat shock protein 70 (HSC70) expression in rainbow trout hepatocytes: effect of heat shock and heavy metal exposure[J]. Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2002, 132(2): 223-233.
- [26] McCarthy J F, Shugart L R. Biomarkers of Environmental Contamination[M]. Boca Raton, Florida: Lewis Publishers, 1990.
- [27] Downs C A, Fauth J E, Woodley C M. Assessing the health of grass shrimp (*Palaeomonetes pugio*) exposed to natural and anthropogenic stressors: a molecular biomarker system[J]. Marine Biotechnology, 2001, 3(4): 380-397.

- [28] Sanders B M, Nguyen J, Martin L S, et al. Induction and subcellular localization of two major stress proteins in responses to copper in the fathead minnow *Pimephales promelas* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1995, 112(3): 335-343.
- [29] Duffya L K, Scofielda E, Rodgersb T, et al. Comparative baseline levels of mercury, Hsp70 and Hsp60 in subsistence fish from the Yukon-Kuskokwim delta region of Alaska [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, 1999, 124(2): 181-186.
- [30] Vijayan M M, Pereira C, Kruzynskic G, et al. Sublethal concentrations of contaminant induce the expression of hepatic heat shock protein 70 in two salmonids [J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 40(2/3): 101-108.
- [31] Hassanein H M A, Banhawy M A, Soliman F M, et al. Induction of Hsp70 by the Herbicide Oxyfluorfen (Goal) in the Egyptian Nile Fish, *Oreochromis niloticus* [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1999, 37(1): 78-84.
- [32] 沈骅, 孙媛媛, 张景飞, 等. 以应激蛋白为生物标志物研究低浓度 2-硝基-4'-羟基二苯胺对鲫鱼肝脏和脑组织的动态暴露的影响 [J]. *湖泊科学*, 2005, 18(2): 188-192.
- Shen H, Sun Y Y, Zhang J F, et al. Dynamic effects of low-level 2-nitro-4'-hydroxydiphenylamine on the induction of HSP70 in the fish livers and brains [J]. *Journal of Lake Science*, 2005, 18(2): 188-192.

Animal Sciences

Response Sensitivity of HSP70 in *Bellamya aeruginosa* Exposed to Cadmium and BDE-47

MA Taowu¹, WANG Meng¹, PENG Jinying¹, HE Xingbing¹, WU Lingling², LONG Yi¹, LIU Shanshan¹

(1. College of Biology and Environmental Sciences, Jishou University, Jishou Hunan 416000;

2. College of Environmental Science and Engineering, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The expression levels of hepatopancreatic heat shock protein 70 (HSP70) in *Bellamya aeruginosa* exposed to Cd- and BDE-47-contaminated sediments, respectively, through sediment toxicity bioassay to reveal the time- and dose-effect relationships between Cd/BDE-47 exposure and HSP70 expression, and to further explore the sensitivity of HSP70 as a biomarker indicating the early damage of persistent toxic substances to *B. aeruginosa*. The results indicated that hepatopancreatic HSP70 expression in *B. aeruginosa* after exposure to Cd- or BDE-47-spiked sediments with various contents showed distinct time- and dose-dependent effect relationships. In the case of short-term (0~10 d) Cd exposure, HSP70 expression levels showed significant increase in a dose-dependent manner; but within relatively long-term (10~21 d) Cd exposure stage, HSP70 expression levels displayed a trend of first increase and then decrease with increasing Cd content. Cd exposure with low content ($5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) caused a time-dependent increase of HSP70 expression, and Cd exposure with medium and high contents (25 and $100 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$) led to initial increase and subsequent decrease of HSP70 expression with prolonged exposure duration. On the whole, HSP70 expression levels in all BDE-47 treatment groups showed first increase and then decrease with prolonged exposure duration. In the case of short-term (0~10 d) BDE-47 exposure with low and medium contents (160 and $640 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$), HSP70 expression levels did not show significant differences compared with that of the controls, however, after relatively long-term (10~21 d) BDE-47 exposure, HSP70 expression levels decreased significantly. Comparatively, HSP70 showed relatively good sensitivity responding to short-term exposure (<10 d) with low Cd content ($5 \mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$), but indicated insensitivity responding to short-term exposure with low BDE-47 content ($160 \text{ ng} \cdot \text{g}^{-1}$). Under long-term (10~21 d) Cd or BDE-47 exposure with low contents, HSP70 can be used as a good biomarker.

Key words: Cd; BDE-47; *Bellamya aeruginosa*; hepatopancreas; sediment; HSP70; ecotoxicity; biomarker

(责任编辑 方 兴)