

四种重金属对中国鲎(*Tachypleus tridentatus*) 胚胎发育的影响

梁君荣, 王 军, 苏永全, 王德祥, 么久刚

(厦门大学海洋学系 亚热带海洋研究所, 厦门 361005)

摘要: 分析了不同离子浓度的 Zn、Pb、Cu、Cd 对中国鲎胚胎发育的影响。结果表明: ① 4 种金属离子浓度 $\leq$ 渔业水域水质标准浓度 4 倍时, 对中国鲎胚胎发育无明显毒性效应; $\geq$ 渔业水域水质标准浓度 8 倍时, Cd 离子和 Cu 离子对中国鲎胚胎发育无明显影响, 而 Zn 离子组和 Pb 离子组胚体发育随离子浓度提高而卵径变小, 发育速度下降; ② 浓度为 1.6 mg/L 时, Zn 和 Pb 离子组胚胎畸形率分别为 44% 和 58%, Pb 离子组胚体孵化率仅 2.67%; ③ 4 种重金属对中国鲎胚胎发育的毒性效应表现为 $Pb > Zn > Cu = Cd$; ④ 中国鲎胚胎对重金属有蓄积作用, 蓄积效应随金属种类不同而异。

关键词: 中国鲎; 胚胎; 重金属

Effects of metals on embryodevelopment of *Tachypleus tridentatus*

LIANG Jun-Rong, WANG Jun, SU Yong-Quan, WANG De-Xiang, YAO Jiu-Gang (Department of Oceanography & Institute of Subtropical Oceanography, Xiamen University, Xiamen 361005, China)

Abstract: The effects of Zn, Pb, Cu and Cd on embryodevelopment of horseshoe crab *T. tridentatus* were investigated in present paper. The results showed that: (1) The embryodevelopment of this animal was not obviously affected by each of the four metals when the concentration of each ion was not more than four times of those described in Standard of Fishery Water Quality, but being disturbed in varying degrees as the concentration of each ion reached eight times or even higher than that of the Standard, for example, there is no effect on the embryodevelopment for the Cd and Cu ion at this degree, nevertheless, the diameter of embryos seemed smaller and the embryodevelopment rate became lower as Zn or Pb concentration increased. (2) Teramorphous rate of embryo was 44% as Zn concentration reached 1.6mg/L; but teramorphous rate and hatching rate were 58% and 2.67% respectively as the same concentration of Pb. (3) Based on the results above, the toxicity of heavy metals to the horseshoe crab's embryo showed: $Pb > Zn > Cu = Cd$. (4) Each of the four heavy metals could be accumulated by *T. tridentatus*, and the accumulative effects varied with the different metals.

Key words: *Tachypleus tridentatus*; embryodevelopment; heavy metal

文章编号: 1000-0933(2001)05-1009-04 中图分类号: Q178.1, Q178.53 文献标识码: A

中国鲎(*Tachypleus tridentatus* Leach)是暖水性近海名贵珍稀节肢动物, 俗称三刺鲎、海怪, 是现存 4 种鲎中个体最大的一种^[1]。鲎早于恐龙, 在古生代的泥盆纪就已出现了, 是地球上现存的“活化石”之一。鲎不仅在节肢动物系统发生的研究上具有重要意义^[2], 而且用鲎血制成的鲎试剂检验内毒素(或药物中的热原)极为敏感、快速、简易^[3]。因此鲎在古生物学、进化学上和医学研究上都有极高的价值。目前由于人类捕杀和自然海区环境的恶化, 鲎资源正在严重衰减。有关中国鲎资源及环境因子对鲎资源影响等方面的研究

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(批准号: 39670147)

厦门大学环境科学研究中心洪丽玉老师为本文测定胚体金属含量, 海洋学系陈锦民同学参加部分工作, 特此致谢。

收稿日期: 1999-06-04; 修订日期: 1999-12-29

作者简介: 梁君荣(1975~), 女, 福建人, 博士。主要从事鱼类生化生态研究。

少见报道,而在金属污染方面仅见 K. Kannan 报道了日本海区中国鲎的肝脏、书鳃和卵对金属的富集^[3]。本文就我国沿海主要污染源之一的金属污染液对中国鲎胚胎发育的影响进行了研究,企望研究结果能更好地保护鲎资源,合理的开发利用鲎资源提供一些科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料来源 1998 年 6 月从厦门市渔市场购买性腺成熟的中国鲎,按 Koichi 方法人工授精获得受精卵^[1]。

1.2 金属污染液的配制 用消毒过滤海水分别将 ZnSO_4 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 CuSO_4 和 CdCl_2 按渔业水域水质标准浓度 (Zn 、 $\text{Pb} \leq 0.1 \text{ mg/L}$, $\text{Cu} \leq 0.01 \text{ mg/L}$, $\text{Cd} \leq 0.005 \text{ mg/L}$)^[4] 的 2、4、8、16 倍配制污染液(表 1)。

1.3 实验温盐范围 盐度为 27 ± 2 , 水温为 $26 \pm 2^\circ\text{C}$

1.4 胚体重金属蓄积量测定 取发育至第 4 次胚内蜕皮的胚体,去胚膜,置于消化罐中,加入高纯 HNO_3 和 HClO_4 ($\text{HNO}_3 : \text{HClO}_4 = 2 : 1$) 在 150°C 中进行消化;而后赶酸、定容,用火焰原子吸收分光光度法^[3] 测定胚体各种金属的蓄积量。

1.5 毒性效应测试指标 胚胎完成 3 次胚内蜕皮所需平均天数、完成第 4 次胚内蜕皮的卵径、孵化率和致畸率等。

2 结果

2.1 几种金属离子对中国鲎胚胎发育的影响

2.1.1 对胚胎发育速度的影响 实验结果表明,在本实验范围内当 Cu 离子和 Cd 离子浓度 $\leq 0.16 \text{ mg/L}$ 和 0.08 mg/L (16 倍组) 时,两种金属离子均不影响中国鲎胚胎发育速度(表 2)。 Pb 离子浓度 $\geq 0.8 \text{ mg/L}$ (8 倍组)、 Zn 离子浓度 $\geq 0.4 \text{ mg/L}$ (4 倍组) 时,中国鲎胚胎发育速度随水体中两种离子浓度升高而明显减缓。

2.1.2 对卵径大小的影响 卵径测量结果如表 3 所示, * Group of times

在本实验范围内, $\leq 0.16 \text{ mg/L}$ (16 倍组) 的 Cu 离子和 0.08 mg/L (16 倍组) 的 Cd 离子对中国鲎卵径发育大小没有明显影响;但卵径发育大小随 Zn 离子和 Pb 离子浓度的增加而减小。

表 2 在不同金属离子浓度中中国鲎的胚胎发育(d)

Table 2 Embryodevelopment rates of *T. tridentatus* in concentrations of four metal ions

项目 Item	对照组 CK	2 倍组				4 倍组				8 倍组				16 倍组			
		Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd
第 2 次胚 内蜕皮	28.8	27.6	29.2	26.9	27.5	28.2	30.3	27.8	27.5	31.9	32.0	26.7	27.6	33.6	34.7	26.5	28.2
第 3 次胚 内蜕皮	30.6	30.6	30.4	29.4	30.0	30.7	31.1	30.3	29.5	37.6	33.0	29.4	29.3	40.5	34.5	29.9	29.9
第 4 次胚 内蜕皮	47.1	47.9	48.3	45.3	46.5	47.9	49.3	47.5	45.6	50.9	51.5	45.5	45.6	52.0	52.0	45.7	46.5

表 3 在不同金属离子浓度中中国鲎的胚胎卵径、孵化率和致畸率

Table 3 The embryo diameter and hatching rates and teramorphous rates of *T. tridentatus* in concentrations of four metal ions

项目 Item	对照组 CK	2 倍组				4 倍组				8 倍组				16 倍组			
		Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd	Pb	Zn	Cu	Cd
卵径①(mm)	5.16	4.99	5.10	5.18	4.91	4.96	5.11	5.13	5.00	4.60	4.81	5.11	5.09	4.20	4.63	5.14	5.16
孵化率②(%)	16.34	24.67	15.00	14.33	23.00	19.00	25.57	27.33	18.00	13.35	27.00	11.00	20.00	2.67	23.33	13.00	16.67
致畸率③(%)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	10	3	0	0	58	44	0	0

①Embryo diameter, ②Hatching rates, ③Teramorphous rates

2.1.3 对胚胎孵化率的影响 Pb 离子实验组中,胚胎孵化率随着水体中 Pb 离子浓度的提高而下降; Cu

离子除了 0.04mg/L 组(4 倍组)孵化率较高外,其余各实验组孵化率均略低于对照组;Cd 和 Zn 两种金属离子各实验组的孵化率几乎都高于对照组,表明在本实验范围内低于 0.08mg/L(16 倍组)的 Cd 离子和 1.6mg/L(16 倍组)的 Zn 离子不影响中国鲎的胚胎孵化率(表 3)。

2.1.4 对胚胎致畸率的影响 表 3 可见,在 Cu 离子和 Cd 离子分别 $\leq 0.16\text{mg/L}$ 和 0.08mg/L (16 倍组)的海水中中国鲎胚胎能够正常发育,致畸率均为 0。Zn 离子、Pb 离子浓度 $\leq 0.4\text{mg/L}$ (4 倍组)时,胚胎也能正常发育,但随着 Zn 离子、Pb 离子浓度提高至 1.6mg/L 时,胚胎致畸率分别高达 44%和 58%。高浓度的 Pb 离子使中国鲎胚体的前体部与后体部的连接处向上隆起,呈“驼背状”,有些胚胎发育到第 3 次胚内蜕皮就停止发育。而高浓度的 Zn 离子使中国鲎胚体的后体部发育不良,呈萎缩状的短小,前后体部比例失调。

2.2 中国鲎胚胎对 4 种金属离子的蓄积效应

完成第 4 次胚内蜕皮胚体金属含量测定结果表明:① 对照组胚胎的 Cu 和 Zn 的含量较高,均在 $30\mu\text{g/g}$ 以上;② 胚体对 Pb、Zn、Cd 离子的蓄积量均随水体中金属离子浓度的升高而增加,Cu 离子各实验组胚体的金属离子蓄积量虽略低于对照组,但基本上也是呈随环境中 Cu 离子浓度升高而略增加的趋势;③ 在金属离子蓄积量上,中国鲎胚体对 Zn 离子蓄积量最大,对 Cd 离子的蓄积量最小;在金属蓄积量的倍数效应上,Cd 离子的蓄积倍数最高(表 4)。

表 4 第 4 次胚内蜕皮的胚胎对四种金属的蓄积量

Table 4 Accumulations of four heavy metals in the fourth molting embryo

离子 ^① 浓度	Zn		Pb		Cd		Cu	
	蓄积量 ^② ($\mu\text{g/g}$)	蓄积倍数 ^③ (倍)	蓄积量 ($\mu\text{g/g}$)	蓄积倍数 (倍)	蓄积量 ($\mu\text{g/g}$)	蓄积倍数 (倍)	蓄积量 ($\mu\text{g/g}$)	蓄积倍数 (倍)
对照组	30.51	1.00	3.67	1.00	0.04	1.00	36.13	1.00
2 倍组	45.55	1.49	6.16	1.68	0.45	11.25	27.02	0.75
4 倍组	74.15	2.43	13.97	3.81	0.45	11.25	29.43	0.81
8 倍组	87.34	2.86	23.53	6.41	0.77	19.05	26.47	0.73
16 倍组	193.88	6.35	15.08*	4.11	1.09	27.05	29.52	0.82

* 此数据偏低主要是因为 Pb 离子毒性较强,有些胚胎在高浓度的 Pb 离子水体中不能正常发育至第 4 次胚内蜕皮,一些尚能发育到第四次胚内蜕皮的胚体为中毒较浅的个体,用这些胚体测定出 Pb 离子蓄积量相对较少,故其值偏低。

①Concentration of metal ions;②Accumulations;③Times of accumulation

3 讨论

中国鲎胚胎对上述 4 种金属表现出不同的蓄积力,且蓄积了一定量的重金属后胚胎本身并不表现出明显的中毒反应,这说明中国鲎胚胎对 4 种金属离子具有积累、贮存并有解毒的特殊机制。这特殊机制可能包括以下两方面,一方面是鲎胚胎内原来具有或在一定条件下能诱导合成某种特殊的配位体(如金属硫蛋白),使得进入体内的重金属被很快结合起来,起到积累和贮存的作用,同时使这些重金属没能与细胞内的酶或核酸等活性物发生反应,从而未表现出毒性效应;另一方面是进入胚胎内的重金属经细胞代谢后集中到某些亚细胞颗粒中,与其它细胞成分相隔离,避免引起中毒反应^[5]。但当这些特殊配位体被重金属饱和之后,多余的金属就会“溢出”到体内其它生物分子上,包括酶和核酸等生物大分子相互作用,引起中毒现象的发生^[6],正如 8 倍和 16 倍组的 Pb 和 Zn 超出了中国鲎胚胎的解毒能力而导致胚胎畸形。与某些软体动物、甲壳动物一样,鲎选择了铜构成它的氧化还原体系的主要成分,并在血液中以其运输氧气^[7],因此 Cu 对于鲎的生存是有重要价值的。实验结果表明,鲎的胚胎对 Cu 的蓄积不同于其它 3 种金属,可能原因是鲎对 Cu 的蓄积、利用和排泄有其特殊的方式,关于这一点有待于今后进一步的探讨。

由表 5 可知,当 Pb、Zn 两种金属离子浓度达到 1.6mg/L (16 倍组浓度)时,引起中国鲎胚胎出现大量的畸形。在化学致畸作用机理尚未完全清楚的情况下,通常认为化学致畸主要有如下几种机制:①细胞死亡或细胞增殖速度减慢;②胚胎细胞代谢障碍;③突变引起胚胎发育异常;④胚胎组织发育过程的不协调^[8]。本实验结果可看出 Pb、Zn 两种金属离子引起中国鲎胚胎畸形的部位不一样,说明 Pb 离子、Zn 离子对中国鲎胚体致畸作用有其不同的靶组织和特定的方式。至于 Pb 离子和 Zn 离子的致畸作用机理还有待

更深入的研究。

中国鲎胚胎对 4 种金属离子的蓄积量测定结果可看出,当环境水体中离子浓度越大时,中国鲎胚胎所蓄积金属的量也越大。可见,中国鲎的胚膜对这 4 种金属具有一定的通透性。Langhlin 通过放射性元素示踪法测得,鲎的胚膜对 H_2O 、 Na^+ 、 Cl^- 都有一定的通透性^[9]。洪水根观察到鲎卵膜的基膜上存在有相间排列的直径为 200 的小孔,这些小孔可作为细胞外卵黄蛋白通过的通道^[10]。本实验通过电镜也观察到受精卵表面存在有不规则分布的小孔,基膜上的小孔是否也是胚胎外物质进入胚体的一条通道尚待今后的探讨。

实验结果表明,4 种金属中当 Zn 和 Pb 的离子浓度 $\geq$ 渔业水域水质标准 8 倍时,中国鲎的胚体在卵径和发育速度上受到明显的影响。吴国琳对厦门近岸表层海水中几种重金属离子浓度进行检测,结果表明 Cu 离子、Pb 离子和 Zn 离子的总量分别是 $1.70 \times 10^{-3} \text{mg/L}$ 、 $1.14 \times 10^{-3} \text{mg/L}$ 和 $1.32 \times 10^{-3} \text{mg/L}$ ^[11],均低于国家渔业水域水质标准,适于中国鲎的胚胎发育。因此,作者认为近年来厦门海域中国鲎数量迅速下降的主要原因是人为过度大量的捕杀和海滩生态环境的破坏。鲎的生活周期很长,从受精卵到性成熟要经历 13~15a 漫长的发育生长过程,因而鲎的世代更新很慢,增殖潜力小,资源一旦遭到破坏就很难恢复,而且中国鲎受精卵要经过 4 次的胚内蜕皮和 2 次的胚外蜕皮,历时 2 个月左右才能孵化出幼鲎,因而中国鲎的早期发育特别需要稳定的生态环境做保障。为保护我国鲎资源,本文建议:①在厦门近海建立鲎自然保护区,营造一个适合鲎繁衍生息的良好环境,特别是改善野生鲎早期发育的海滩生态环境,以保证中国鲎的幼体发育不受人类活动的干扰。②采用人工育苗放流增殖的技术,维持海域中鲎的种群数量。③禁止杀鲎取血的鲎试剂生产方法,提倡活体抽血、重复利用、保护鲎资源的取血技术。④寻求人工合成鲎素的方法,缓和医学上对鲎资源的压力。

参考文献

- [1] Koichi S. Biology of Horseshoe crabs Science House. Co., Ltd. Tokyo., 1988. 139~144.
- [2] 徐友茂,陈祥才. 珍稀海产动物——鲎. 福建水产, 1985, 26(4): 59~61.
- [3] Kannan K, Yasunaga Y, Ichihashi H, et al. Concentrations of Heavy Metals, Organochlorines, and Organotins in Horseshoe Crab, *Tachypleus tridentatus*, from Japanese Coastal Waters. Arch. Environ. Contam. Toxicol., 1995, 28, 40~47.
- [4] 张宏陶主编. 生活饮用水标准检验方法注解. 重庆:重庆大学出版社, 1993. 68~154, 335.
- [5] 刘发义,吴玉霖. 重金属污染物在海洋生物体内的积累和解毒机理. 海洋科学, 1988, 5: 63~66.
- [6] Winge D, Krano J and Colucci A V. Cadmium accumulation in rat liver; Correlation between bound metal and pathology. In: Hoekstra, W. G. et al. Eds. Trace Elements Metabolism in Animals. University Park Press, Baltimore, 1973. 2: 500~501.
- [7] 施罗德 H A 编. 陈荣三, 张祖喧译. 痕量元素与人. 北京: 科学出版社, 1979. 18.
- [8] 郑微云, 翁恩琪. 环境毒理学概论. 厦门: 厦门大学出版社, 1993. 100~102.
- [9] Langhlin R B Jr. Sodium chloride and water exchange in selected developmental stages of the horseshoe-crab *Limulus-polyphemus*. J. exp. mar Biol. Ecol., 1981, 52(23): 135~146.
- [10] 洪水根, 汪德耀. 中国鲎卵膜发生的研究. 厦门大学报, 1986, 25(2): 233~239.
- [11] 吴国琳. 厦门近岸表层海水中铜、铅和镉的存在形态. 厦门大学学报, 1994, 33(4): 521~524.