

学校编码: 10384  
学号: 33120121151656

密级\_\_\_\_\_

廈門大學

硕士学位论文

常见海洋污染物对褐菖鲉肝 HSP60 和  
HSP70 蛋白含量的影响

Effects of marine pollution on the expression of hepatic  
HSP60 and HSP70 protein in *Sebastiscus marmoratus*

王毅捷

指导教师姓名: 陈荣 副教授  
专业名称: 环境科学  
论文提交日期: 2015 年 4 月  
论文答辩时间: 2015 年 5 月

2015年4月

## 厦门大学学位论文原创性声明

本人呈交的学位论文是本人在导师指导下，独立完成的研究成果。本人在论文写作中参考其他个人或集体已经发表的研究成果，均在文中以适当方式明确标明，并符合法律规范和《厦门大学研究生学术活动规范(试行)》。

另外，该学位论文为( )课题(组)的研究成果，获得( )课题(组)经费或实验室的资助，在( )实验室完成。(请在以上括号内填写课题或课题组负责人或实验室名称，未有此项声明内容的，可以不作特别声明。)

声明人(签名)：

年 月 日

## 厦门大学学位论文著作权使用声明

本人同意厦门大学根据《中华人民共和国学位条例暂行实施办法》等规定保留和使用此学位论文，并向主管部门或其指定机构送交学位论文(包括纸质版和电子版)，允许学位论文进入厦门大学图书馆及其数据库被查阅、借阅。本人同意厦门大学将学位论文加入全国博士、硕士学位论文共建单位数据库进行检索，将学位论文的标题和摘要汇编出版，采用影印、缩印或者其它方式合理复制学位论文。

本学位论文属于：

(        )1. 经厦门大学保密委员会审查核定的保密学位论文，于  
年    月    日解密，解密后适用上述授权。

(        )2. 不保密，适用上述授权。

(请在以上相应括号内打“√”或填上相应内容。保密学位论文应是已经厦门大学保密委员会审定过的学位论文，未经厦门大学保密委员会审定的学位论文均为公开学位论文。此声明栏不填写的，默认为公开学位论文，均适用上述授权。)

声明人(签名)：

年    月    日

## 目 录

摘 要.....	I
Abstract.....	III
第 1 章 绪 论.....	1
1.1 海洋石油污染概述.....	1
1.1.1 石油污染对鱼类的危害.....	2
1.2 海洋重金属污染概述.....	3
1.2.1 Cd 污染对鱼类的毒性.....	4
1.2.2 Pb 污染对鱼类的毒性.....	5
1.3 Heat Shock Proteins 概述.....	7
1.3.1 HSP 分类.....	7
1.3.2 HSP 功能.....	9
1.4 鱼类 HSP 研究概述.....	12
1.4.1 基础研究.....	13
1.4.2 应用研究.....	14
1.5 本研究的意义、目的及主要内容.....	14
1.5.1 研究目的.....	14
1.5.2 研究意义.....	15
1.5.3 研究内容.....	15
第 2 章 原油污染对褐菖鲉肝 HSP60 和 HSP70 蛋白含量的影响.....	16
2.1 材料.....	16
2.1.1 实验动物.....	16
2.1.2 主要试剂.....	16
2.1.3 主要仪器.....	17
2.2 实验方法.....	17
2.2.1 污染实验.....	17
2.2.2 实验样品准备.....	18
2.2.3 统计学处理.....	21
2.3 实验结果.....	22

2.4 讨论.....	25
<b>第 3 章 Cd、Pb 污染对褐菖鲉肝 HSP60 和 HSP70 蛋白含量的影响.....</b>	<b>28</b>
3.1 材料.....	28
3.1.1 实验动物.....	28
3.1.2 主要试剂.....	28
3.1.3 主要仪器.....	28
3.2 实验方法.....	29
3.2.1 污染实验.....	29
3.2.2 实验样品准备.....	29
3.2.3 数据处理.....	28
3.3 实验结果.....	28
3.4 讨论.....	35
<b>第 4 章 复合污染对褐菖鲉肝 HSP60 和 HSP70 蛋白含量的影响.....</b>	<b>39</b>
4.1 材料.....	39
4.1.1 实验动物.....	39
4.1.2 主要试剂.....	39
4.1.3 主要仪器.....	40
4.2 实验方法.....	40
4.2.1 原油 WSF 和 Cd、Pb 复合污染实验.....	40
4.2.2 实验样品准备.....	40
4.2.3 数据处理.....	40
4.3 实验结果.....	40
4.4 讨论.....	46
<b>第 5 章 结论与展望.....</b>	<b>50</b>
5.1 结论.....	50
5.2 创新点.....	50
5.3 展望.....	50
<b>参考文献.....</b>	<b>52</b>
<b>发表文章及参加课题.....</b>	<b>64</b>

致谢.....65

厦门大学博硕士论文摘要库

**Table of Contents**

Abstract (in Chinese).....	I
Abstract (in English).....	III
Chapter 1 Preface.....	1
1.1 Overview of marine oil pollution.....	1
1.1.1 Biological toxicity of oil pollution on fish.....	2
1.2 Overview of marine heavy metal pollution.....	3
1.2.1 Biological toxicity of Cd pollution on fish.....	4
1.2.2 Biological toxicity of Pb pollution on fish.....	5
1.3 Overview of Heat Shock Proteins.....	7
1.3.1 HSP classification.....	7
1.3.2 HSP function.....	9
1.4 Overview of researches on Heat Shock Proteins of fish.....	12
1.4.1 Basic researches.....	13
1.4.2 Application researches.....	14
1.5 Main point and Significance of the research .....	14
1.5.1 Research purposes.....	14
1.5.2 Research significance.....	15
1.5.3 Content of the study.....	15
Chapter 2 Effects of Crude oil on Hepatic HSP60 and HSP70 in <i>Sebastiscus marmoratus</i> .....	16
2.1 Materials.....	16
2.1.1 Experiment animals.....	16
2.1.2 Main reagent.....	16
2.1.3 Main instruments.....	17
2.2 Methods.....	17
2.2.1 Pollution experiments.....	17
2.2.2 Sample prepared.....	18

2.2.3 Statistical analysis.....	21
2.3 Result.....	22
2.4 Discussion.....	25
Chapter 3 Effects of Cd and Pb on Hepatic HSP60 and HSP70 in <i>Sebastes marmoratus</i> .....	28
3.1 Materials.....	28
3.1.1 Experiment animals.....	28
3.1.2 Main instruments.....	28
3.1.3 Main reagents.....	28
3.2 Methods.....	29
3.2.1 Pollution experiments.....	29
3.2.2 Sample prepared.....	29
3.2.3 Statistical analysis.....	29
3.3 Results.....	29
3.4 Discussion.....	35
Chapter 4 Effects of compound pollution on Hepatic HSP60 and HSP70 in <i>Sebastes marmoratus</i> .....	39
4.1 Materials.....	39
4.1.1 Experiment animals.....	39
4.1.2 Main instruments.....	39
4.1.3 Main reagents.....	40
4.2 Methods.....	40
4.2.1 Pollution experiments.....	40
4.2.2 Sample prepared.....	40
4.2.3 Statistical analysis.....	40
4.3 Results.....	40
4.4 Discussion.....	46
Chapter 5 Summary and prospection.....	50



5.1 Conclusions.....	50
5.2 Innovation.....	50
5.3 Propection.....	50
References.....	52
Participated project and Publication.....	64
Acknowledgements.....	65

厦门大学博硕士论文摘要库

## 摘 要

热应激蛋白(Heat Shock Proteins, HSPs)是一种生物体内普遍适用并高度存在的应激蛋白, 在外界污染影响下, HSPs的表达量发生变化, 能快速保护细胞对抗外源性或内源性应激的攻击, 提高细胞的修复能力并增强细胞对付应激的耐受程度。HSPs的诱导被认为是反映环境污染状况最灵敏的生物学反应之一, 本文着重研究海洋鱼类HSP60和HSP70蛋白对常见海洋污染物的响应规律, 探讨作为生物标志物的可行性。

本研究利用蛋白印迹法测定不同浓度石油水溶性成分 (water soluble fraction, WSF)( $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $320 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )、Cd和Pb ( $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )单独污染后, 以及WSF和重金属复合污染后褐菖鲉肝HSP60和HSP70的表达量, 分析不同类型污染后HSP60和HSP70蛋白含量之间的浓度-效应和时间-效应规律。主要研究结果如下:

(1) WSF 单独污染的剂量-效应实验表明, 不同浓度 WSF 单独污染 5 d 后对 HSP60 和 70 蛋白含量都没有显著影响, 但延长暴露时间可显著诱导 HSP70 的表达, 抑制 HSP60 的表达。

(2) 重金属单独污染的剂量-效应实验表明,  $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Cd显著抑制HSP60蛋白的表达, 但是 $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和更高剂量的Cd显著诱导HSP60的表达。Pb整体而言显著抑制HSP60蛋白的表达。Cd和Pb对HSP70的剂量-效应影响规律非常相似: 在 $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时即出现显著抑制, 在 $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 恢复至对照组水平, 随浓度增大, HSP70蛋白含量又出现显著下降, 整体表现为抑制效应。

(3) 重金属单独污染的时间-效应实验则显示Cd和Pb对HSP蛋白含量的影响规律非常不同。Cd在暴露的第6 d才开始显著诱导HSP60蛋白含量, 且随时间延长蛋白含量保持稳定; 而HSP70蛋白在第2 d即被显著诱导并达到最大值, 为对照的4.18倍, 随后缓慢下降至对照水平。Pb仅在第10 d显著诱导HSP 60和HSP 70蛋白的表达, 分别是对照的3.0倍和7.5倍。

(4) 复合污染的剂量-效应实验表明, 随着 WSF+Pb 浓度的增大, HSP60 和 HSP70 蛋白表达量增加, 且 HSP60 被显著诱导。但当 WSF 浓度超过  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  之后, HSP60 蛋白表达被显著抑制。HSP70 在  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ WSF+ $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Pb 时被显著诱导, 其他浓度时 HSP70 蛋白表达则没有显著变化。WSF+Cd 复合污染对

HSP70 的影响不显著。并且只有  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ WSF 及  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ WSF 和  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd 复合污染时才会显著诱导 HSP60 表达, 其他浓度对 HSP60 的影响也不显著。

(5) 复合污染的时间-效应实验结果表明, WSF+Pb复合污染显著抑制HSP70 蛋白的表达; 在污染的第2 d诱导HSP60的表达, 但在第8 d却又抑制HSP60的表达。HSP60、HSP70蛋白含量随WSF+Cd复合污染时间延长有所波动, 但都没有达到显著性差异。

(6) 综合而言, HSP 70可作为潜在的生物标志物用于监测海洋复合污染。

关键词: HSP 蛋白含量; Cd; Pb; 石油水溶性成分(WSF); 复合污染

## Abstract

Heat Shock Proteins (HSPs) is a universal stress proteins in vivo. Under the environmental pollution, changes in the expression of HSPs can quickly protect the cells against exogenous or endogenous stress through increasing the repair capacity of cells and enhancing the tolerance of cell to stresses. Induction of HSPs is considered to be one of the most sensitive biological responses to environmental pollution. This research focused on the response of marine fish HSP60 and HSP70 of common marine pollutants, and to explore the feasibility of them to be biomarkers.

In this study, *Sebastes marmoratus* was exposed to different concentrations of water soluble fraction (WSF) ( $20 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $160 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $320 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), Cd and Pb ( $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $8.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ,  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ), and the mix of them. Then, the expression of HSP60 and HSP70 protein in the liver of *Sebastes marmoratus* was detected with Western blotting, in order to investigate the dose-effect and time-effect. The results showed that:

(1) WSF individual pollution dose-response experiments showed that After exposure of different concentrations of WSF for 5 days, HSP60 and HSP70 protein content both have no significant changes. but prolonged exposure time could significantly induce the expression of HSP70, inhibit HSP60.

(2) Cd could significantly inhibit the expression of HSP60 at the concentration of  $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , while higher concentration of  $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  could significantly induce the expression of HSP60. Pb could significantly inhibit the expression of HSP60. HSP70 could be significantly inhibited by Cd and Pb at  $0.8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ . At  $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , the expression level of HSP70 was not significantly different from control. After  $4.0 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , HSP70 was significantly inhibited by Cd and Pb.

(3) The time-effect is quite different between Cd and Pb. Cd started to significantly induce the expression of HSP60 at day 6, then the expression level kept steady. Cd started to significantly induce the expression of HSP70 at day 2 by 4.18 folds, then the expression level went down. Pb only induce the expression of HSP60 and HSP70 at day 10 by 3 and 7.5 folds respectively.

(4) Dose-effect of combination pollution experiments indicated that with the WSF + Pb concentration increasing, HSP60 and HSP70 protein expression increased, and moreover HSP60 is significantly induced. But when WSF concentration was over  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , HSP60 was significantly inhibited. HSP70 exposed of  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  WSF +  $8 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Pb was significantly induced, and when there is no significant changes under other concentrations. WSF + Cd combined pollution made no significant influence on HSP70. And only  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  WSF +  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd and  $80 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  WSF +  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  Cd could significantly induced the expression of HSP60, other concentrations could not.

(5) Compound Pollution time-effect experiment results showed that, WSF + Pb combined pollution significantly inhibit the expression of HSP70; HSP60 expression in the first 2 d was induced, but at the 8th d inhibited. HSP60 and HSP70 protein were fluctuated by polluted time after exposure of WSF + Cd compound pollution, but did not make significant difference.

(6) To sum up, HSP 70 can be used as a potential biomarker for monitoring marine complex pollution.

Key words: HSP protein level; Cd; Pb; water soluble fraction; Compound pollution

## 第 1 章 绪 论

### 1.1 海洋石油污染概述

石油及其产品的广泛应用,使海洋石油污染空前严重,海洋生态系统被严重破坏(Lee et al., 2013)。据统计每年倾注到海洋的石油总量在 200-1000 万吨之间(徐金兰等, 2007)。随着我国石油工业的发展,受石油污染的海洋面积不断扩大,污染程度也日益严重。全国每年直接排入近海的石油约 10 余万吨,仅渔业损失每年就达数亿元。每年海上都有大量各种漏油、溢油事故发生,近海海域海水含油量已超过国家规定海水水质标准 2-8 倍。石油一旦进入海洋,便会迅速扩散,降低海水含氧量,危及海洋生物,打破海洋生态系统平衡,最终损害人类健康。2011 年 6 月蓬莱 19-3 油田发生连续溢油事故,对渤海海域生物及生态环境产生了极其严重的危害。2014 年,国家海洋局对蓬莱 19-3 油田溢油事故的跟踪监测数据表明,事发海域的海洋生态环境状况继续呈改善态势,但其生态环境影响依然存在。事故海域鱼类体内石油烃含量基本与事故前水平持平,甲壳类生物体内石油烃含量略高于事故前水平。浮游生物多样性指数、浮游动物幼虫幼体密度基本与事故前水平持平,但鱼卵仔鱼数量仍未得到恢复。

石油污染海洋环境,危害海洋生态系统,破坏生态平衡,毒害海洋生物。石油在海洋表层形成大范围的油膜,降低表层海水中的日光辐射量,因而引起靠光合作用的浮游植物数量的减少;油膜造成大气与水面隔绝,使海水中氧数量明显减少,海洋自身净化能力减弱。此外,油膜还可能对局部地区水文气象状况产生一定影响,覆盖在海面上的油膜严重阻碍海水蒸发,影响大气和海洋的热交换,进入海洋表层的日光辐射和海面反射率皆会因油膜的作用明显降低(姚鑫等, 2012);石油进入海洋后,发生光化学反应,产生硫、酸等氧化物,危害海洋生物(Prince et al., 2003)。石油中各种馏分物(组分)的毒性是不一样的,而不同的组分给海洋生物带来的毒性也是不一样的(马志华, 2002)。轻质油能麻醉海洋动物,高浓度轻质油能杀死还有生物细胞,引起死亡。大部分的多环芳烃有强的毒性、致癌性、致畸性和致突变性(Ruiz et al., 2011; Liu et al., 2012)。烷烃和多环芳烃污染物的水环境造成严重污染的水生态的系统和有害生物和人体的健康。(Zhang & Kang, 2009; El-Sheshtawy et al., 2014)

石油对海洋生物的毒性可分急性毒性和慢性毒性。海上经常发生的溢油事故

是典型的急性毒性；低浓度石油长期作用则是慢性毒性，对海洋生物产生长期累积影响。海上溢油对海洋生物造成急性毒性或慢性毒性取决于许多因素。这些因素包括海洋条件、地理位置、季节变化、气象条件、影响面积及油的剂量、代谢产物和油的类型等。

### 1.1.1 石油污染对鱼类的危害

石油一旦泄露，光化学反应几小时后便会发生，生成酮、醌、酚、醇、硫和酸的氧化物等，对海洋生物危害极大(Prince et al., 2003)。石油的水溶性成分很复杂，含有多种芳香烃和烷烃，尤其是多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbon, PAHs)，对海洋生物有生殖毒性、免疫毒性、基因毒性、神经毒性等多种慢性毒性作用。

(1) 生殖毒性：石油污染对鱼卵和幼鱼危害很大，在石油污染的海水中孵化出来的幼鱼大多是畸形的，鱼体扭曲而且没有生命力(张瑞安, 1997)。孵化场或产卵场受到严重油污会影响鱼的产卵行为和怀卵数量，种群繁衍可能会受到危害(陈刚, 2002)。

(2) 免疫毒性：油污干扰了鱼类正常的生化、生理机能，引起鱼类病变，会造成鱼类对病虫害、海洋细菌等病原菌及海洋环境污染的免疫功能下降(陈刚, 2002)。

(3) 致死毒性：海洋石油污染在短期内对成鱼不会产生明显的毒害作用，但毒性大的燃料油却能大量的杀死鱼类。鱼的嘴和鳃、体表都有一层粘性的防油薄膜，如果将鱼浸泡在含油的废水中，半分钟后再放回清洁的水中，鱼体上的油就会完全漂走，并不会产生危害(马志华, 2002)，但若是长期暴露在含油废水中，油膜则会堵住鱼鳃，导致其生理机能失常，造成呼吸困难，因而死亡。

另外，石油进入海洋后，会漂浮在水面并迅速扩散形成油膜，油膜覆盖于海面,阻断  $O_2$ 、 $CO_2$  等气体的交换。 $O_2$  的交换被阻碍导致海洋中的  $O_2$  被消耗后无法由大气中补充， $CO_2$  交换被阻首先破坏了海洋中  $CO_2$  平衡，妨碍海洋从大气中吸收  $CO_2$  形成  $HCO_3^-$ 、 $CO_3^{2-}$  盐缓冲海洋 pH 值的功能，从而破坏了海洋中溶解气体的循环平衡。同时这也破坏了光合作用的客观条件。同时，分散和乳化油侵入海洋植物体内，破坏叶绿素，阻碍细胞正常分裂，堵塞植物呼吸孔道，进而破坏光合作用的主体。此外石油的降解大量消耗水体中的氧，然而海水复氧的主要途径

大气溶氧又被油膜阻碍，直接导致海水的缺氧(方曦等, 2007)。缺氧环境对鱼类生存也是一大胁迫。

## 1.2 海洋重金属污染概述

海洋重金属污染的两大来源是人为来源和天然来源。人为来源如矿山与海洋油井的开采、工农业废水和污水的排放等。海底火山喷发带来的地壳深处的重金属则属于天然来源。重金属在水体、沉积物以及生物体中可以发生相互转化。通过物理化学作用，海洋中的重金属逐渐以颗粒物质的形式下沉到海底；或者被生物吸收，当生物死亡后又随其残骸沉入海底。此外，沉积物中的金属元素还可能通过生物矿化以及早期成岩等过程，再次进入海水，对海洋环境造成二次污染。底栖动物摄入重金属的一个重要来源就是沉积物(韦蔓新 等, 2004)。

重金属污染的来源十分广泛，在生物体内残留时间长，而且难以降解，又很容易沿食物链转移、富集，会对生物产生间接或直接的危害，进而严重威胁生态系统，影响到生物物种和群落发生，降低生物资源的利用价值(Chen et al., 2003; Rainbow & Luoma, 2011)。重金属是环境中存在的潜在危害性较大的重要污染物，其毒性效应和地球化学、化学性质都很特殊，危害性高且难以治理。海洋重金属污染则呈全球化分布，危害很大。海洋中的重金属一般多种类共存，而且在水体中分布形态多样化，分布状况不仅仅受自身物化性质影响，还受到水温、pH、盐度等环境条件，甚至大气沉降及水文气象条件都能对其产生影响。有对全球各地海域重金属污染状况的调查表明，世界多处海域都存在重金属污染。如美国旧金山湾，希腊萨洛尼卡湾(Zabetoglou et al., 2002)，德国波罗的海海域等(Szefer et al., 2009)。目前造成海洋污染的重金属元素主要有Cd、Hg、Pb、Cr、Zn、Cu等，它们对海洋生物的毒性作用和危害机理各不相同。海洋水生生物对重金属的蓄积作用也严重影响了海洋水产品的品质，并且可通过食物链传递最终影响人类的健康。不仅如此，重金属污染还影响养殖业、捕捞业以及旅游业的发展，并且有可能刺激赤潮的发生。因而海洋重金属污染引起了极大的关注，这方面的研究越来越深入。

从2010年起，我国连续发生30多起重特大重金属污染事故，重金属污染问题愈发引起人们的关注。我国渤海湾、香港海域、珠江口海域、湛江港湾及三亚湾等都出现了不同程度的重金属污染(黄德银 等, 2003; 郝泽嘉 等, 2008; 毛天



Degree papers are in the “[Xiamen University Electronic Theses and Dissertations Database](#)”.

Fulltexts are available in the following ways:

1. If your library is a CALIS member libraries, please log on <http://etd.calis.edu.cn/> and submit requests online, or consult the interlibrary loan department in your library.
2. For users of non-CALIS member libraries, please mail to [etd@xmu.edu.cn](mailto:etd@xmu.edu.cn) for delivery details.