

学校编码: 10384

密级 \_\_\_\_\_

学号: 33320131151733

廈門大學

碩 士 學 位 論 文

长期多世代暴露下汞、镉对海洋桡足类日本虎斑猛水蚤的毒性效应及其机理研究

Mechanistic study on mercury or cadmium toxicity in  
marine copepod *Tigriopus japonicus* under  
multigenerational exposure

石 琳

指导教师姓名: 王明华 副教授

专 业 名 称: 环 境 科 学

论文提交日期: 2016 年 08 月

论文答辩时间: 2016 年 08 月

2016 年 08 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 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

厦门大学博硕士学位论文摘要库

## 目 录

目 录.....	i
Table of Contents.....	v
摘要.....	ix
Abstract.....	xi
<b>第一章 前言</b> .....	<b>1</b>
1.1 汞、镉的毒性效应及机理.....	1
1.1.1 汞的毒性效应及机理.....	1
1.1.1.1 汞污染.....	1
1.1.1.2 汞的毒性效应及可能的致毒机理.....	4
1.1.2 镉的毒性效应及机理.....	5
1.1.2.1 镉污染.....	5
1.1.2.2 镉的毒性效应及可能的致毒机理.....	5
1.2 日本虎斑猛水蚤的生物学特征及其在海洋生态毒理学研究中的应用.....	7
1.2.1 日本虎斑猛水蚤的生物学特征.....	7
1.2.2 日本虎斑猛水蚤在海洋生态毒理学研究中的应用研究.....	8
1.3 多世代毒性暴露.....	9
1.3.1 多世代毒性暴露研究.....	9
1.3.2 多世代暴露体系的应用.....	10
1.4 蛋白质组学.....	10
1.4.1 蛋白质组学的发展.....	11
1.4.2 蛋白质组学的应用.....	15
1.5 研究内容和技术路线.....	16
<b>第二章 汞对日本虎斑猛水蚤的毒性作用及其蛋白质组学研究</b> .....	<b>19</b>
2.1 材料与方法.....	19
2.1.1 日本虎斑猛水蚤及饵料的培养.....	19

2.1.2 暴露溶液的配置.....	19
2.1.3 实验仪器耗材.....	20
2.2 实验方法.....	20
2.2.1 日本虎斑猛水蚤发育繁殖相关参数的测定方法.....	20
2.2.2 总汞含量的测定.....	23
2.2.3 定量蛋白质组学方法.....	24
2.2.3.1 蛋白质的提取.....	24
2.2.3.2 蛋白质定量.....	25
2.2.3.3 蛋白质的酶解及标记.....	26
2.2.3.4 高效液相色谱 (HPLC) 分离.....	27
2.2.3.5 质谱 (LC-MS/MS) 分析.....	28
2.2.3.6 生物信息学分析.....	28
2.3 数据分析.....	29
2.4 结果.....	30
2.4.1 汞多个世代连续暴露的实验结果.....	30
2.4.1.1 生物体内总汞含量.....	30
2.4.1.2 汞对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	30
2.4.2 暴露后恢复培养的实验结果.....	33
2.4.2.1 恢复培养时生物体内汞的含量.....	33
2.4.2.2 恢复培养对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	34
2.4.3 蛋白质组学研究结果.....	35
2.4.3.1 蛋白质鉴定结果和数据质量控制.....	35
2.4.3.2 差异表达蛋白质的功能分类.....	39
2.4.3.3 差异蛋白质的功能富集分析.....	41
2.5 讨论.....	46
2.5.1 生物体内汞的累积.....	46
2.5.2 汞对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	46
2.5.3 恢复培养对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	48
2.5.4 暴露世代及恢复世代的蛋白质组学分析.....	48

2.5.4.1 汞多世代毒性暴露下的蛋白质组学分析.....	49
2.5.4.2 多世代暴露后恢复世代的蛋白质组学分析.....	51
2.6 小结.....	54
<b>第三章 镉对日本虎斑猛水蚤的毒性作用及其蛋白质组学研究.....</b>	<b>56</b>
3.1 材料与方法.....	56
3.1.1 日本虎斑猛水蚤及饵料的培养.....	56
3.1.2 暴露溶液的配制.....	56
3.1.3 实验仪器耗材.....	57
3.2 实验方法.....	57
3.2.1 日本虎斑猛水蚤发育繁殖相关参数的测定方法.....	57
3.2.2 总镉含量的测定.....	58
3.2.3 定量蛋白质组学方法.....	59
3.3 数据分析.....	59
3.4 结果.....	60
3.4.1 镉多个世代连续暴露的结果.....	60
3.4.1.1 生物体内镉的含量.....	60
3.4.1.2 镉对日本虎斑猛水蚤发育、繁殖的影响.....	61
3.4.2 暴露后恢复培养的结果.....	63
3.4.2.1 恢复培养时生物体内镉的含量.....	63
3.4.2.2 恢复培养对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	64
3.4.3 蛋白质组学研究结果.....	66
3.4.3.1 蛋白质鉴定结果和数据质量控制.....	66
3.4.3.2 差异表达蛋白质的功能分类.....	67
3.4.3.3 差异表达蛋白质的功能富集分析.....	68
3.5 讨论.....	73
3.5.1 生物体内镉的累积.....	73
3.5.2 镉对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	74
3.5.3 恢复培养对日本虎斑猛水蚤发育繁殖的影响.....	74
3.5.4 镉多世代暴露下的蛋白质组学分析.....	75



3.6 小结.....	79
第四章 结语.....	82
4.1 结论.....	82
4.2 特色与创新点.....	82
4.3 不足与展望.....	83
参考文献.....	85
附 录.....	98
攻读硕士期间论文发表情况.....	125
致谢.....	126

厦门大学博硕士论文摘要库

**Table of Contents**

Abstract in Chinese.....	ix
Abstract in English.....	xi
Chapter 1 Introduction.....	1
1.1 The toxic mechanism of mercury and cadmium.....	1
1.1.1 The toxic mechanism of mercury.....	1
1.1.1.1 Mercury pollution.....	1
1.1.1.2 Mercury toxic effects and its possible mechanism.....	4
1.1.2 The toxic mechanism of cadmium.....	5
1.1.2.1 Cadmium pollution.....	5
1.1.2.2 Cadmium toxic effects and its possible mechanism.....	5
1.2. The biological characteristics of <i>Tigriopus japonicus</i> and its application in marine ecotoxicology.....	7
1.2.1 The biological characteristics of <i>Tigriopus japonicus</i> .....	7
1.2.2 The application of <i>Tigriopus japonicus</i> in marine ecotoxicology.....	8
1.3 Multigenerational toxic exposure.....	9
1.3.1 Multigenerational effects.....	9
1.3.2 Application of multigenerational toxic exposure.....	10
1.4 Proteomic study.....	10
1.4.1 Development in proteomics.....	11
1.4.2 Application of proteomics.....	15
1.5 Aims and contents of this study.....	16
Chapter 2 Proteomic study reveals the molecular mechanisms of mercury toxicity in <i>Tigriopus japonicus</i> under multigenerational exposure.....	19
2.1 Materials and methods.....	19
2.1.1 <i>Tigriopus japonicus</i> maintenance.....	19

2.1.2 Preparation for exposure solution .....	19
2.1.3 Materials .....	20
2.2 Experimental method .....	20
2.2.1 Measurement for life history traits in <i>Tigriopus japonicus</i> .....	20
2.2.2 Determination of total mercury content in <i>Tigriopus japonicus</i> .....	23
2.2.3 Quantitative proteomics .....	24
2.2.3.1 Protein extraction .....	24
2.2.3.2 Protein quantitation .....	25
2.2.3.3 Protein digestion and labeling.....	26
2.2.3.4 HPLC separation.....	27
2.2.3.5 LC-MS/MS analysis.....	28
2.2.3.6 Bioinformatics analysis.....	28
2.3 Data analysis .....	29
2.4 Results.....	30
2.4.1 The results of multi-generational mercury exposure .....	30
2.4.1.1 Total mercury content in copepods .....	30
2.4.1.2 Effects of mercury on development and reproduction.....	30
2.4.2 Results of recovery generations after mercury exposure .....	33
2.4.2.1 Total mercury content in copepods under recovery .....	33
2.4.2.2 Effects of recovery on development and reproduction in the copepods .....	34
2.4.3 The proteomic result .....	35
2.4.3.1 Protein identification and QC .....	35
2.4.3.2 Functional classification of differentially expressed proteins.....	39
2.4.3.3 Proteins functional enrichment analysis .....	41
2.5 Discussion .....	46
2.5.1 Total mercury content in copepods .....	46
2.5.2 Effects of mercury on development and reproduction.....	46
2.5.3 Effects of mercury on development and reproduction.....	48
2.5.4 Aanalysis of proteomics results .....	48

---

2.5.4.1 Proteomics analysis of multi-generational mercury exposure ....	49
2.5.4.2 Proteomics analysis of recovery generation.....	51
2.6 Summary .....	54
Chapter 3 Proteomic study reveals the molecular mechanisms of cadmium toxicity in <i>Tigriopus japonicus</i> under multigenerational exposure .....	56
3.1 Materials and methods .....	56
3.1.1 <i>Tigriopus japonicus</i> maintenance .....	56
3.1.2 Preparation for exposure solution .....	56
3.1.3 Materials .....	57
3.2 Experimental method .....	57
3.2.1 Measurement for life history traits in <i>Tigriopus japonicus</i> .....	57
3.2.2 Determination of total cadmium content in <i>Tigriopus japonicus</i> .....	58
3.2.3 Quantitative proteomics .....	59
3.3 Data analysis .....	59
3.4 Results.....	60
3.4.1 The results of multi-generational cadmium exposure.....	60
3.4.1.1 Total cadmium content in the copepods.....	60
3.4.1.2 Effects of cadmium on development and reproduction .....	61
3.4.2 Results of recovery generations after cadmium exposure .....	63
3.4.2.1 Total cadmium content in the copepods under recovery.....	63
3.4.2.2 Effects of recovery on development and reproduction in the copepods .....	64
3.4.3 The proteomics results .....	66
3.4.3.1 Protein identification and QC .....	66
3.4.3.2 Functional classification of differentially expressed proteins.....	67
3.4.3.3 Proteins functional enrichment analysis .....	68
3.5 Discussion .....	73
3.5.1 Total cadmium content in the copepods.....	73

3.5.2 Effects of cadmium on development and reproduction .....	74
3.5.3 Effects of recovery on development and reproduction in the copepod.	74
3.5.4 Proteomics analysis of multi-generational cadmium exposure .....	75
3.6 Summary .....	79
Chapter 4 Summary and prospect .....	82
4.1 Conclusion .....	82
4.2 Creativity.....	82
4.3 Prospect.....	83
References.....	85
Appendix .....	98
Papers and awards.....	125
Acknowledgements .....	126

## 摘要

如今，海洋重金属污染已是最严峻的环境问题之一，会对海洋生态系统乃至人类造成巨大的危害，其中汞和镉是最有代表性的重金属，两者即使在低剂量下也会对海洋生物产生较高的毒性效应，而且会在生物体内累积并在食物链传递过程中有生物放大现象，最终威胁人类健康和生命安全。海洋桡足类日本虎斑猛水蚤 (*Tigriopus japonicus*)，因其广泛的地理分布、相对短的世代周期、高的繁殖力、易于区分的雌雄形态及在海洋环境中重要的生态位等，已成为海洋生态毒理学研究的重要模式生物。因此本论文选取日本虎斑猛水蚤作为受试生物，研究长期多个世代暴露和恢复下汞或镉在该桡足类体内的累积状况及其对该动物 6 个重要生活参数（如存活率、无节幼体发育时间、世代发育时间、10 d 产卵批次、平均产卵数和 10 d 繁殖力）的影响，同时利用定量蛋白质组学手段来研究汞或镉暴露引起的蛋白质组差异，揭示汞或镉对桡足类的毒性作用机理以及该动物对两者的可能抵抗机制。主要的研究结果如下：

1) 汞、镉胁迫均引起金属在桡足类体内显著累积，金属含量与暴露浓度呈剂量依赖关系，此外，累积效应还随暴露世代数的增加而加剧；

2) 多世代连续暴露下，汞对日本虎斑猛水蚤的繁殖有明显的抑制，该效应随暴露液的汞浓度而加剧，且在一定时间范围内随着暴露世代数的增加而增加。镉对日本虎斑猛水蚤有明显的发育延迟及繁殖抑制作用，该两种效应均与镉的暴露浓度呈剂量相关，而且随着暴露世代数的增加而加剧。汞、镉对日本虎斑猛水蚤发育、繁殖的累积损伤效应可能是由于生物体内金属不断累积的结果；

3) 多世代汞连续暴露后在干净海水中恢复培养时，日本虎斑猛水蚤体内的汞含量有所降低但仍有积累，而且呈现剂量依赖性；与此同时，6 个生活史参数均迅速恢复正常。在镉暴露后的两世代恢复培养中，日本虎斑猛水蚤体内镉的含量在第一恢复世代迅速降低但仍保持一定剂量依赖性，同时，6 个生活史参数在低浓度组已完全恢复；第二恢复世代体内的镉被完全清除，生活史参数也全部恢复到正常水平。综上，这种金属抗性的迅速获得但又快速失去可能是由于生物存在生理驯化作用造成的，也就是表型可塑性；

4) 汞的多世代毒性会显著抑制日本虎斑猛水蚤的许多重要细胞过程及通路，

如蛋白质翻译、生物分子代谢、核酸合成、细胞周期、卵黄生成、角质层形成等，并在随后更高的组织水平上产生不利影响，如桡足类繁殖力的降低。恢复世代 F5 中，桡足类体内许多上调表达蛋白质参与补偿机制，如糖类代谢、肌球蛋白重组和应激相关防御途径的增强等；特别是，日本虎斑猛水蚤通过增加非氧依赖性的糖酵解途径，为汞解毒及耐受性获得提高能量预算，同时降低 ROS 的产生；

5) 镉胁迫引起一些重要蛋白质(如谷胱甘肽还原酶、谷胱甘肽过氧化物酶、丝氨酸羟甲基转移酶和亚甲基四氢叶酸还原酶等)的差异表达，导致含硫化合物谷胱甘肽(GSH)、甲硫氨酸等的增加，进而可能参与桡足类对该金属的解毒(镉与-SH 结合产生低毒或无毒物质)。镉还抑制蛋白酶体和糜蛋白酶样蛋白酶的表达，降低对受损或有害蛋白质的水解，从而对桡足类产生毒性作用。尽管如此，日本虎斑猛水蚤可能通过糖酵解及呼吸链过程中相关蛋白(如磷酸丙糖异构酶、果糖-1,6-二磷酸酶 1、细胞色素 bc1 复合物亚基 7 和 ATP 合酶亚基 b 等)的上调表达来增加能量产生，为对抗金属毒性提供更多的能量。

关键词：汞；镉；日本虎斑猛水蚤；多世代暴露；恢复；蛋白质组学

## Abstract

By now, marine metal pollution has been one of the most serious environmental problems, and it potentially causes a great threat to marine ecosystem and even humans. Mercury and cadmium, as the mostly representative metals, result in severe toxicity to marine organisms, even at a low dose. Particularly, these two metals are able to accumulate in marine biota and biomagnify along the food chain transfer, ultimately threatening human health and safety. Marine copepod *Tigriopus japonicus*, has been considered as an important model species in marine ecotoxicology, owing to its numerous advantages such as the widely geographical distribution, a short generation time, a high fecundity, an easily distinguished morphology between male and female, an important niche in marine environment, etc. Therefore, we used *Tigriopus japonicus* as a test organism and investigated metal accumulation and its effects on the six important life history traits (survival, nauplius phase, development time, fecundity/10 d, number of clutch and number of nauplii/clutch) of the copepod under the long-term multigenerational exposure to mercury or cadmium and the subsequent recovery in clean condition. Also, we analyzed the different expressed proteins in the copepod caused by mercury or cadmium, using quantitative proteomics. Finally, this work is aimed to reveal the molecular mechanisms for metal toxicity/tolerance in marine copepod.

The main findings are described as follows:

- 1) Under the multigeneration exposure, mercury or cadmium stress significantly led to metal accumulation in *Tigriopus japonicus* with a dose-dependent manner. Moreover, at the same exposure level, the metal bioaccumulation trended to increase with the increased generations;

- 2) Under the multigenerational exposure, mercury significantly inhibited the reproduction in *Tigriopus japonicus*, and the inhibitory effects were correlated with mercury concentrations in the exposure solutions, which became worse and worse during the first three generations. Similarly, cadmium significantly restrained



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.