RRPC88020453 ((0 P)

行政院國家科學委員會專題研究計畫成果報告

牡蠣與蚵岩螺體內金屬硫蛋白與毒性物質之相關研究
Relationships between Metallothionein and Toxicants in Oysters and Rock-shells of Taiwan

計畫編號：NSC 88-2314-B-038-05
執行期限：87 年 8 月 1 日至 88 年 7 月 31 日
主持人：韓柏樫　教授　台北醫學院公共衛生學系

一、中文摘要

有些金屬是經由一種低分子量蛋白稱爲金屬硫蛋白的物質結合在肝臟及腎臟中。本研究進行之動機是爲了了解金屬及金屬硫蛋白濃度還有必需金屬 Zn、Cu、非必需金屬 Hg、Cd、Sn、As 在組織之內的關係。

這些結果指出銅和鋅在牡蠣和蚵岩螺體內之濃度依不同地區及不同種類而異，而來自鹿港的蚵岩螺含有高濃度的鉛和鎘（各約 1-4 ug/g 及 5-8 ug/g 濕重），其鋅和銅的濃度爲 1437 ug/g 和 812-1022 ug/g，這個濃度大於牡蠣中鋅和銅的濃度（分別約爲 721 ug/g 和 315-396 ug/g）。

除此之外，所有的樣本都在光譜分析儀波長 250 nm 和 280 nm 下，分析從香山，鹿港和布袋岩石區的牡蠣和蚵岩螺的金屬硫蛋白。牡蠣和蚵岩螺在波長 280 nm 有高吸收率爲 1.5 及 2.0，大致而言，在蚵岩螺中發現高濃度的金屬硫蛋白其鍵結親合力比較分別是鉛＜鎘和鋅＜銅。

關鍵詞：金屬硫蛋白，貝類，金屬，生物偵測

Abstract

Heavy metals are bound up within the liver and kidney to a low molecular weight protein called metallothionein. Few studies have investigated metallothionein levels in shellfish of Taiwan. The study is understand to investigate metal and metallothionein concentrations, and inter- and intra-tissue relationships between metallothionein, the essential metals Zn and Cu, and the nonessential metals Hg, Cd, As, and Sn.

The results show that Cu and Zn concentrations in oysters and rock-shells varied with different species and sampling locations. However, the higher Pb and Cd concentrations of 1-4 ug/g and 5-8 ug/g wet weight were obtained in oysters from the Lukong coastal area. In Lukong area, the concentrations of Zn (1437 ug/g) and Cu(812-1022 ug/g)in rock-shells is higher than those of Zn and Cu concentrations (721 ug/g and 315-396 gu/g, respectively) in oysters.

In addition, all fraction were measured at 250 and 280 nm on a spectrophotometer for metallothionein of oysters and rock-shells collected from Hsiangshan, Lukang, and Putain coastal areas. The high absorbance are 1.50 and 2.00 at 280 nm for oysters and rock-shells. In general, the higher metallothionein was found in rock-shells. In order of increasing binding affinity for metallothioein was, the list of metals are Pb<Cd and Zn<Cu, respectively.

Keywords: Metallothionein, Shellfish, Metals, Biomonitoring

二、緣由與目的

Cu, Zn, Pb, Cd, Hg 與 As 為在水域環境中自然存在分布的重金屬，但有證據顯示其含量在某些區域逐漸隨著人類活動而增加 (Slemr and Langer, 1992)。這些金屬即使在相當低的濃度還是具毒性且會在許多水生動物體內累積 (Thompson,1990)。根據生物偵測及毒理學的觀點，瞭解在這些動物體內組織器官中，非絕對必須金屬其生理變化過程和動力學變化是很重要的 (Stewart et al., 1996)。而這些金屬是經由一種低分子量蛋白稱為金屬硫蛋白的物質結合在肝臟中的。金屬硫蛋白 (Metallomionein; MT) 已被證實，普遍地存在於脊椎動物 (Olatson and Thompson,1974) 和無脊椎動物 (Engel and Brower, 1987; Noel-Lambot et al., 1980) 體內，包括魚類 (Beauttie and Pascoe, 1979; Marafante,1976)。

半胱胺酸 Cysteine 是蛋白質內一般存在的 20 種胺基酸中，唯一含有 SH 基的蛋白質。而金屬硫蛋白中，即是含有許多此種 Cysteine 的蛋白質 (Bonwick et al., 1990)。半胱腰酸的 R 基團，及硫代基 (thiol) 或氫硫基 (sulfhydryl)，值得特別注意。此一基團，為弱酸，有極強的反應性。在鹼性溶液，半胱胺酸會於一系列複雜的反應中將硫失去。當半胱胺酸接觸於微量濃度的某些重金屬離子，將會形成硫醇鹽類 (mercaptides)。半胱胺酸的氫硫基也易於遭受氧化作用。

本研究進行之動機是為了瞭解金屬及金屬硫蛋白濃度，還有金屬硫蛋白所結合之必須金屬 Zn , Cu、非必須金屬 Hg, Pb, Cd, As, Sn 在組織之內的關係。同時由 B.C.Han 等 (1996, 1997) 之報導指出在不同的環境下生存的蚵岩螺 (Rock.Shells) 是一相當適合之銅、鋅、砷之污染指標生物，其對砷的累積甚至可達 1236 μg，而本省的牡蠣至今仍有綠牡蠣出現，其對鋅及銅之累積能力，亦是令人有興趣的研究議題。本研究之目的即著重於瞭解在複雜而多變但相同之生存環境下，不同生物體其累積不同金屬之能力及其體內金屬硫蛋白變化之差異，尤其是含高濃度銅及鋅之綠牡蠣及累積高濃度砷之蚵岩螺。

更進一步，本研究將探討金屬、金屬硫蛋白與必須金屬銅、鋅及非必須金屬鉛、鎘等在組織內的相互關係。由此結果，試著去推論在污染高環境下生長的生物，其體內金屬硫蛋白濃度是否亦高，將來是否可訂出金屬硫蛋白的指標濃度做為環境污染監測，此應是一具潛力的議題。

三、結果與討論

本研究是在於探討台灣西部沿海地區之貝類生物中，其體內重金屬累積量、各種重金屬的累積分佈情形、與金屬硫蛋白對重金屬之鍵結狀況，藉以研究生物體中的重金屬含量與金屬硫蛋白鍵結重金屬的情形，是否有其潛在之相關性；研究的對象為牡蠣（Oyster）及蚵岩螺（Rock Shell）。研究結果將針對採樣地點之地域性、牡蠣及蚵岩螺兩者物種上的差異、生物體必需金屬（Zn、Cu）與非必需金屬（Pb、Cd）的累積程度、及金屬硫蛋白對重金屬的鍵結情形等方向，加以討論。

（一）重金屬累積程度與地域性之關係

本研究採樣的地點分別為香山、鹿港與布袋，均是台灣西部沿海養殖漁業集中地，依其地理位置可分別代表北部、中部、南部地區（圖）。鉛含量方面，香山與布袋約為 2 - 3 ug/g 左右，鹿港為 1 - 4 ug/g 之間，鹿港隱約有高於香

山與布袋的趨勢；鎘含量方面，香山與布袋約為 2 - 3 ug/g 左右，鹿港則在 5 - 8 ug/g 之間，鹿港有明顯高於香山與布袋的趨勢；鋅含量方面，香山與布袋約在 850 - 950 ug/g 之間，鹿港部份則明顯因物種不同，鋅的累積量有很大的差距，故摒除鹿港部份，可約略推測香山與布袋的鋅累積情形大致相同；銅含量方面，亦可明顯看出物種間的差異性，此部份在第二點會加以討論，故暫且不理會物種間的差異，銅的累積情況，香山、鹿港及布袋三地大致上都有相同的趨勢。

總結以上所述，可做出下列之分析：

鉛：鹿港＞香山≒布袋

鎘：鹿港＞香山≒布袋

鋅：香山≒布袋（鹿港不計）

銅：香山≒鹿港≒布袋

另外、從地域上的區分可發現，鹿港地區似乎有較高的特異性，除了鉛、鎘含量較高外，鋅的累積亦有不一樣的狀況，故針對鹿港地區，應有大規模深入調查之需要。

（二）重金屬累積程度與物種差異之關係

牡蠣與蚵岩螺此兩種生物體對各種重金屬的累積情形，在鉛的部份，除了鹿港地區差異較大之外（蚵岩螺 1.42 ug/g、牡蠣 4.03 ug/g），香山與布袋地區無論蚵岩螺或牡蠣均是在 2.5 ug/g 左右，差異性並不大；鎘的部份、鹿港地區亦有較明顯差異（蚵岩螺 5.77 ug/g、牡蠣 7.62 ug/g），香山與布袋地區亦相當接近（2.19～2.90 ug/g）；鋅的部份，鹿港地區大致有兩倍的差距（蚵岩螺 1437 ug/g、牡蠣 721 ug/g），香山與布袋地區則相當接近（865～954 ug/g）；銅的部份，蚵岩螺則明顯高於牡蠣，其累積量約有三倍之多（蚵岩螺 812～1022 ug/g、牡蠣 315～396 ug/g）。

綜合以上所述，除了在銅的部份有非常明顯的物種累積情形存在之外，鉛、鎘、鋅的累積與物種之間的關係，實際上並無太大的關連性。

（三）金屬硫蛋白對金屬鍵結情形

香山、鹿港與布袋等研究地區的牡蠣與蚵岩螺樣本，於 UV 波長 250nm 和 280nm 均有特別的吸收情形，依據 Kohler and Riisgard, 1982, Pavicic et al, 1991 的相關研究，可明確判斷出牡蠣與蚵岩螺中皆有金屬硫蛋白的存在，再詳細比較物種間之差異，牡蠣的吸光值約為 1.50 (280 nm)、1.20 (250 nm)，蚵岩螺則為 2.00 (280 nm)、1.30 (250 nm)，蚵岩螺有較高的傾向。

在比較金屬硫蛋白對不同金屬的鍵結差異部份，各地區及物種間的差異的確有影響到各金屬累積量的不同，但由大方向來看，金屬硫蛋白對鉛、鎘、鋅、銅等四種金屬的確有明顯的鍵結選擇性，在必需金屬方面是鎘＞鉛，非必需金屬則為銅＞鋅，此結果與 J. H. R., Kagi and Y. Kojima, 1987 的金屬硫蛋白鍵結選擇性研究：Zn(II) < Pb(II) < Cd(II) < Cu(I), Ag(I), Hg(II), Bi(III)，有相當程度的吻合。

在許多實驗室中劑量反應的研究，金屬硫蛋白對非必需的毒性重金屬確實有較強的鍵結能力，在生物體中可說是帶有解毒能力的重要蛋白質；但本實驗由於是野外調查，生物體內必需金屬（Zn、Cu）的含量遠遠超過非必需金屬（Pb、Cd），亦可推測為採樣地區並無嚴重的毒性重金屬污染，故並無反應到金屬硫蛋白的解毒效用上，因此金屬硫蛋白在必需金屬（Zn、Cu）與非必須金屬（Pb、Cd）鍵結量上的極大差異，應在可理解的範圍之內。

（四）生物體重金屬含量與金屬硫蛋白

鍵結金屬含量之關係

根據第三點所述，由於物體內必需金屬（Zn、Cu）的含量遠遠超過非必需金屬（Pb、Cd），因此將這兩類金屬將其分開，仍針對地域性及物種差異來比較。

生物體中鉛的含量，牡蠣部份是鹿港的含量較高，蚵岩螺部份是鹿港的含量較低，兩者均明顯反映在牡蠣及蚵岩螺體內金屬硫蛋白對鉛的鍵結量上，鹿港牡蠣的金屬硫蛋白對鉛的鍵結量就較高，鹿港蚵岩螺的金屬硫蛋白對鉛的鍵結量就較低；鎘的含量，鹿港均較其他兩地高，亦同樣反映在生物體的金屬硫蛋白對鎘的鍵結量上，鹿港牡蠣與蚵岩螺的金屬硫蛋白對鎘的鍵結量均較高。

鋅的部份，香山、布袋兩地的牡蠣與蚵岩螺並無很大差異，其金屬硫蛋白對鋅的鍵結量亦無太大差異，倒是在鹿港的部份，蚵岩螺約是牡蠣的兩倍，但在金屬硫蛋白對鋅的鍵結量上並無反映出很大的差距；在銅的部份，三地的情形大致相同，蚵岩螺大致是牡蠣的三倍左右，但金屬硫蛋白對銅的鍵結並無反映出很大的差距，這部份跟鋅有一樣的狀況，可見在必需金屬的鍵結上，金屬硫蛋白有其一定的鍵結飽和量，從另一角度來看，必需金屬必定還累積於生物體內的其他組織中，例如本省的綠牡蠣，即是其對鋅及銅之累積能力反應於皮膚組織上的結果。

四、參考文獻

1. Alonso, J. I. and Martin-Mateo, M. C. (1996) Induction and Characterization of Metallothionein indifferent organs of *Ostrea edulis L.* Biological Trace Element Research. Vol.53, 85-94.
2. B.C.Han, W. L. Jeng, T. C. Hung and M. Y. Wen (l996) Relationship between copper speciation in sediments and bioaccumulation by marine bivalves of Taiwan. Environ. Pollut. 91:35-39.
3. B.C.Han, W. L. Jeng, M. S. Jeng, L. T. Kao, P. J. Meng and Y. L. Huang. (1997) Rock-shells (*Thais Clavigera*) as an indicator of As, Cu and Zn contamination from Putai coast of black-foot disease area in Taiwan. Arch. Environ. Contam. Toxicol. 32:456-461.
4. Beattie J.H. and Pascoe, D (l979) A cadmium binding protein in rainbow trout. Toxicol. Left. 4, 241-246.
5. Bebiannol M.J. and Langston, W.J. (1991) Metallothionein induction in *Mytilus edulis* exposed to cadmium. Mar. Biol. 108, 91-96.
6. Bonwick, G.A., Vas, P., Fielden., P.R. and Gordon, J.D.M. (1990) Metallothionein-like proteins in the livers of qualoid and carcharhinid sharks. Mar. Pollut. Bull. Vol.21, No. 12, pp.567-570.
7. Bouquegneau, J.M. (1979) Evidence for the protective effect of metallothioneins against inorganic mercury injuries to fish. Bull. Environ. Contam. Toxicol. 23, 218-219.
8. Cheriarl, M.G. and Goyer, R.A. (1978) Metaliothioneins and their role in the metabolism and toxicity ofmetal.life Sci. 23, 11~251.
9. Colborn, T.,Vom Saal, F.S. and Soto, A.M. (1993) Development effects of endocrine-disrupting chemicalsin wildlife and humans. Environ. Health Perspect, 101:378-384.
10. Engel, D.W. and Brouwer, M. (1987) Metal regulation and molting in the blue

crab, *Callinectes sapidus* : Metallothionein function in metal metabolism. Biol. Ull. 173, 239-251.

11. Hamilton, S.J., and P.M. Mehrle (1986) Metallothionein in fish : review of its importance in assessing stress from metal contaminants, Transactions of the American Fisheries Society, 115:596-609.
12. Horiguchi, T., Shiraishi, H., Shimizu, M. and Motita, M. (1997) Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds in the development of imposex in the rock sell, *Thais clavigera*. Environ. Pollut. 95:85-91.
13. J. H. R., Kagi and Y. Kojima, *Experientai Suppl*. 52, 25-61 (1987).
14. Liu. C., H.J. Huang, H.C. Wang, P.Y. Chung and K.H. Huang (1996) Liver metallothionein level and metal content in fish of Chung-Kung Stream, Taiwan Tilapia and Liza Macrolepsis, Chemistry and Ecology. 12:125-134.
15. Marafante, E. (1976) Binding of mercury and zinc to cadmium-binding protein in liver and kidney of gold-fish (*Carcrssius awzrtus* L.). Experentia 32, 149-150.
16. Noel-Lambot, F., Bouquegneau, J. M., Frankenne, F. and Disteche, A. (1980) Cadmium, zinc and copper accumulation in limpets (Patella vulgata) from the Bristol Channel with specialreference to metallothioneins. Mar. Ecol. Frog. Ser. 2, 81-89.
17. Olafson, R. W. and Thompson, J. A. (1974) Isolation of heavy metal binding proteins from marine vertebrates. Mar.Biol. 28, 83-86.
18. Olafson, R.W. (1981) Differential pulse polarographic detemiination of murine metallothionein induction kinetics. J Biol Chem 256:1263-11-73.
19. Olsson, P. E. (1993) Metallothionein gene expression and ergulation in fish in Biochemistry and Molecular Biology of Fishes, Vol. 2 (editor: Hochacha and Mommsen). 259-268.
20. Olsson, P and C. Haux (1986) Increased hepatic metallothionein content correlates to cadmium accumulation in environmentally exposed perch (Perca Fluviatilis). Aguatic Toxicology. 9:231-242.
21. Overnell, J.and Abdullah, M.I. (1988) Metallothionein and metal level in flounder *Platichthys flesus*, from four field sites, and in flounder dosed with water-borne copper. Mar. Ecol. Prog. Ser. 46, 71-74.
22. Pavicic J. Skreblin M. Rasper, B. and Branica,, M.(1987) Metal pollution a *ilus galloprovincialis*. Mar. Chem. 36, 249-265.
23. Scheuhammer AM (1987) The chronic toxicity of aluminium, cadmium, mercury and lead in birds: a review. Environ Pollut 46:263-295-(1988) The dose dependent deposition of cadmium into organs of Japanese quail following oral administration. Toxicol Appl Pharmacol 95:153-161.
24. Scheuhammer AM., Cherian MG. (1986). Quantification of metallothionein by a silver saturation method. Toxicol Appl Pharmacol 82:417-425.
25. Slemr F., Langer E. (1992) Increase in 21 obal atmosphere concentrations of mercury inferred*from measurements over the Atlantic ocean. Nature 355:434-436.

26. Thompson DR, Furness RW, Walsh PM. (1992) Historical changes in mercury concentrations in the marine ecosystem of the north and northeast Atlantic ocean as indicated seabird feathers. J Appl Ecol. 29:79-84.
27. Ueng Y. F., C. Liu, C.F. Lai, L.M. Meng, Y.Y. Hung, T.H. Ueng (1996) Effect if cadmium and environmental pollution on metallothionein and cytichrome P450 in Tilapia. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology. 57:125-131.
28. Viarengo, A., Pertica, M., Mancinelli, G., Palmerol S., Zanicchi., G., and Orunesu, M. (1981) Synthesis of Cu-binding proteins in different tissues of mussels exposed to the metal. Mar. Pollut. Bull. Vol. 12, No. 10, pp.347-350.
29. Waalkes, M.P., and P.L. Goering. (1990) Metallothionein and other cadmium-binding proteins: recent developments. Chemical Research and Toxicology. 3:281-288.
30. Wilson. S.P.,Ahsanullah. M and Thomposon, G.B. (1993) Imposer in neogastropod: An indicator of tributyltin contaminantion in eastern Australia. Mar. Pollut.Bull. 26:44-48.
31. Winge, D.R., J. Krasno, and A.V. Colucci. (1974) Cadmium accumulation in rat liver : correlation between bound metal and pathology, 500-502 in (editor: Hoekstra, W., J.W. Suttie, H.E. Ganther and W. Mertz.).
32. 柳家瑞、叢皓(1994)魚肝金屬硫蛋白含量作為臺灣河川重金局污染指標研究---以二仁溪為例。環境檢驗所環境調查年報第二號：295-304.

五、圖表

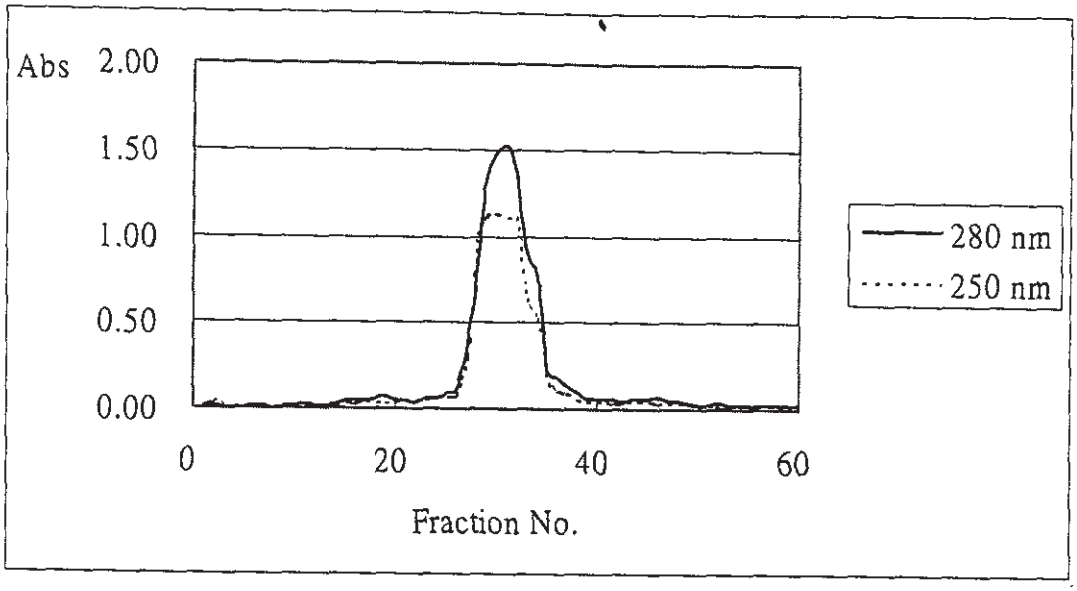
表一、鹿港地區牡蠣體內重金屬含量

No.	Pb (ug/g)	Cd (ug/g)	Zn (ug/g)	Cu (ug/g)
B1	2.61	7.61	579	274
B2	4.23	10.35	678	297
B3	3.51	6.78	768	342
B4	5.07	9.34	666	281
B5	5.38	6.39	799	349
B6	5.83	6.31	828	383
B7	2.90	7.92	631	258
B8	4.20	5.49	726	330
B9	3.41	7.63	885	295
B10	3.21	8.35	650	386
平均值	4.03	7.62	721	320
標準差	1.10	1.47	97	45

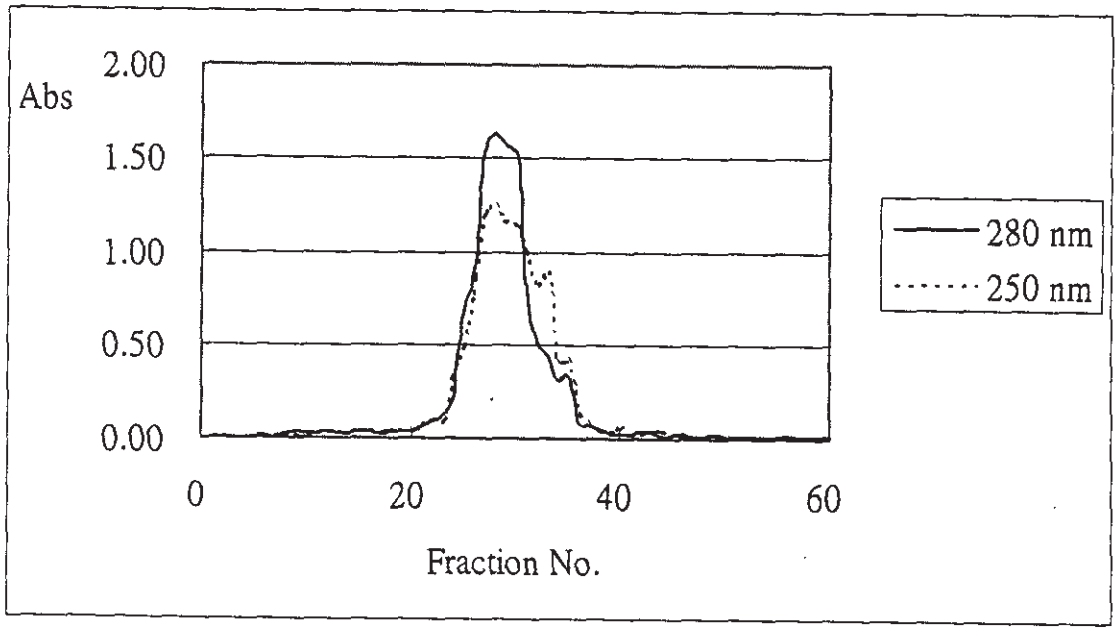
表二、鹿港地區蚵岩螺體內重金屬含量

No.	Pb (ug/g)	Cd (ug/g)	Zn (ug/g)	Cu (ug/g)
E1	1.52	5.83	1316	975
E2	1.80	5.90	1331	827
E3	1.22	4.51	1269	949
E4	1.11	6.49	1479	873
E5	0.81	4.57	1610	950
E6	1.03	6.27	1576	998
E7	1.92	5.76	1265	878
E8	2.03	6.31	1450	934
E9	1.55	6.31	1625	919
E10	1.19	5.81	1451	916
平均值	1.42	5.77	1437	922
標準差	0.41	0.70	138	51

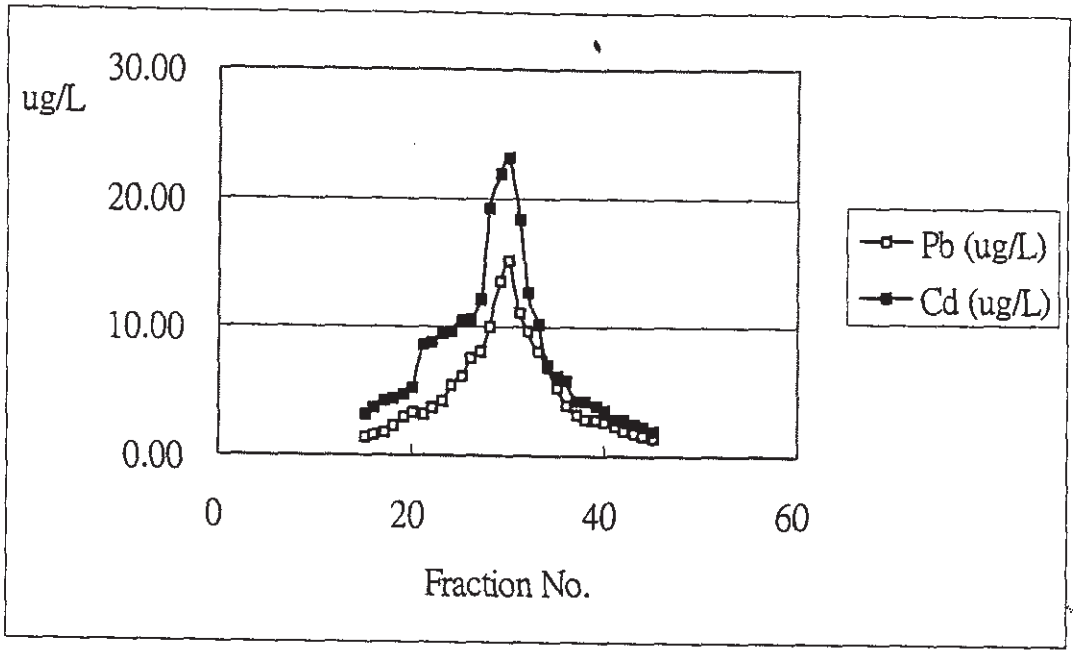
圖一、香山地區牡蠣體內蛋白質在 UV 波長 280nm 及 250nm 下吸光值變化圖



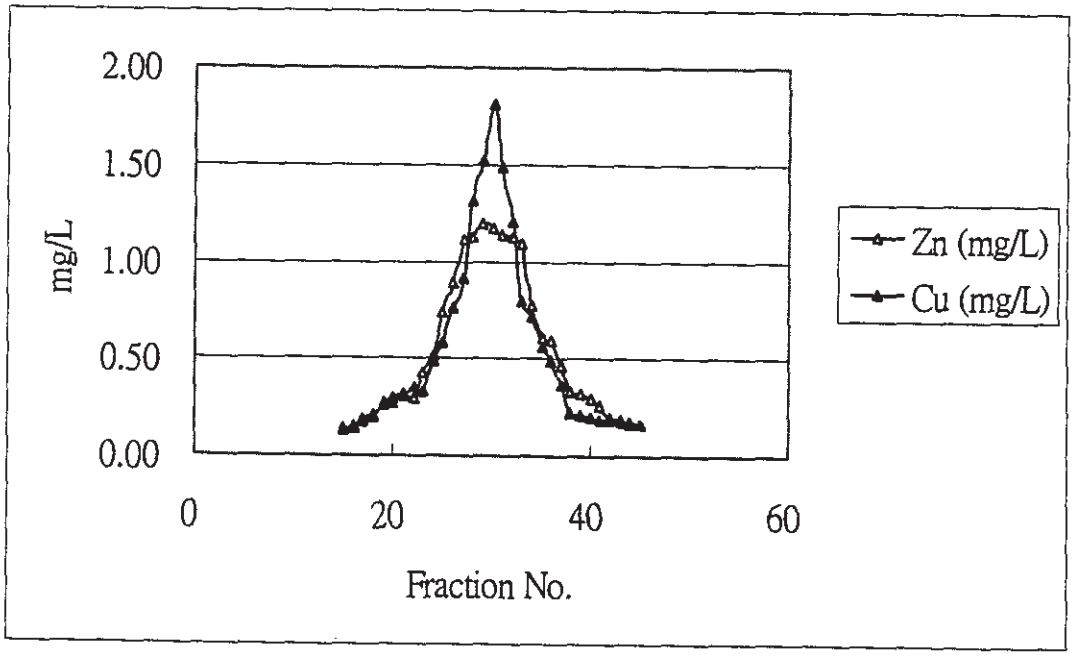
圖二 、鹿港地區牡蠣體內蛋白質在 UV 波長 280nm 及 250nm 下吸光值變化圖



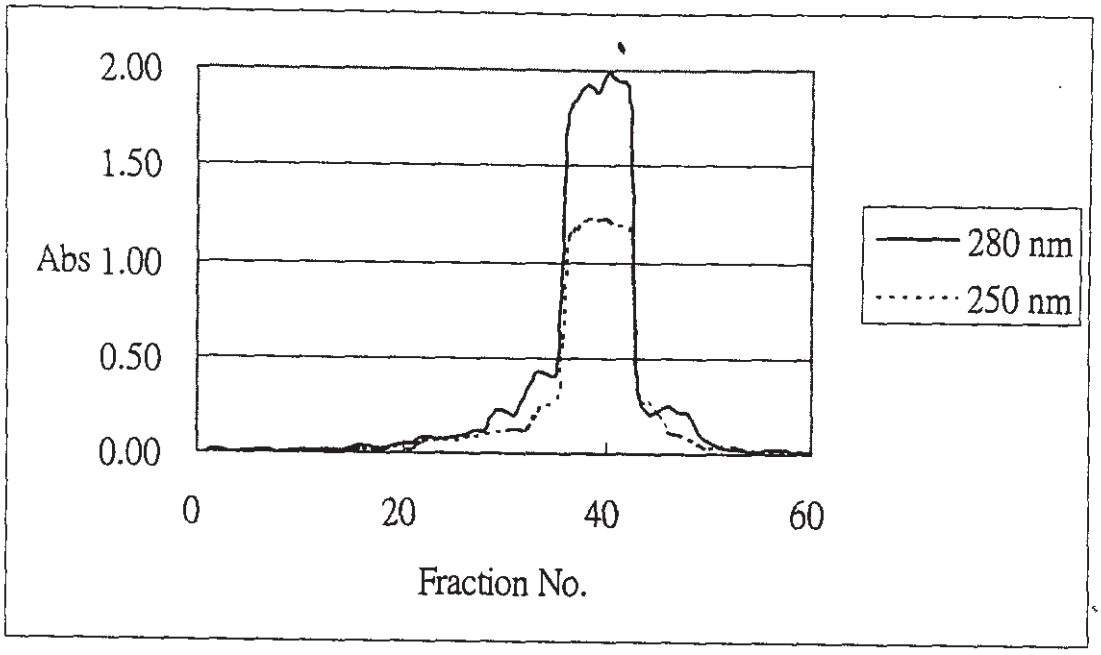
圖三、鹿港地區牡蠣體內蛋白質中重金屬含量變化圖（Pb、Cd）



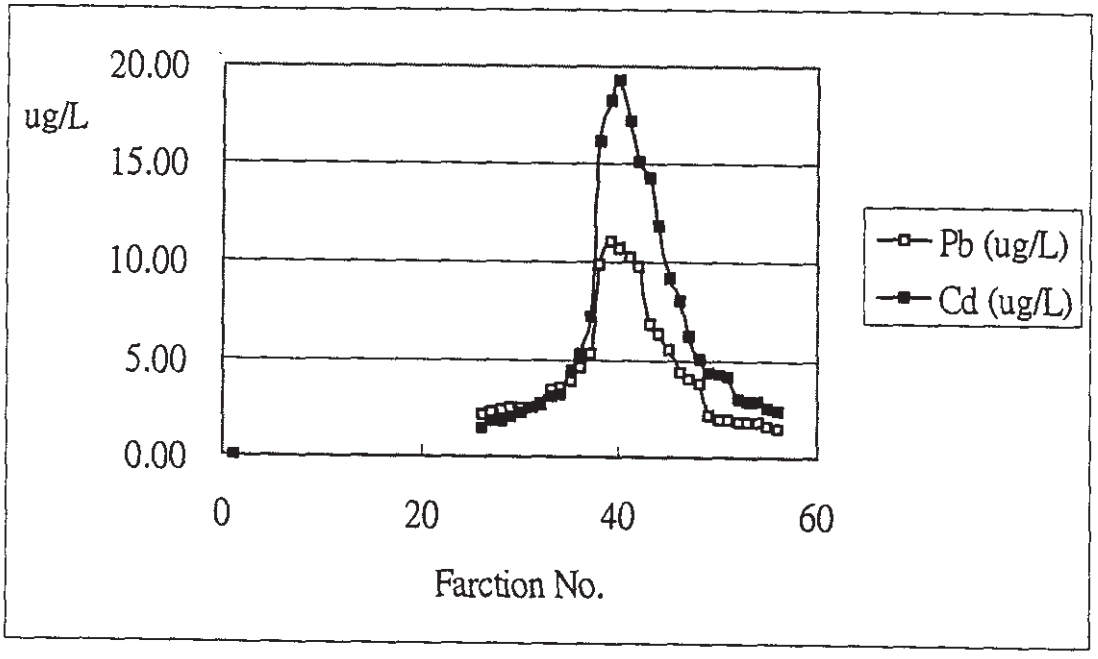
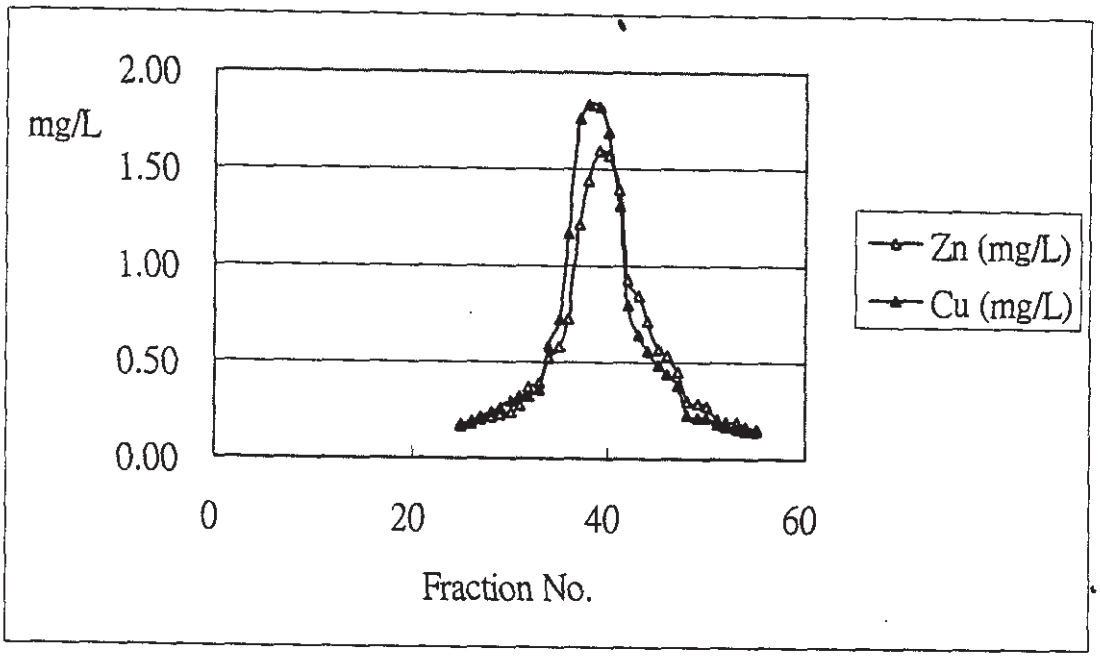
圖四、鹿港地區牡蠣體內蛋白質中重金屬含量變化圖（Zn、Cu）



圖五 、鹿港地區蚵螺體內蛋白質在 UV 波長 280nm 及 250nm 下吸光值變化圖



圖六、鹿港地區蚵螺體內蛋白質中重金屬含量變化圖（Pb、Cd）



圖七、鹿港地區蚵螺體內蛋白質中重金屬含量變化圖（Zn、Cu）