

周妍英,李瑞金,任国锐,等. 2011. 镉对长江华溪蟹金属硫蛋白 mRNA 表达的诱导及低分子量壳聚糖的联合作用[J]. 环境科学学报, 31(9): 2028-2032

Zhou Y Y, Li R J, Ren G R, et al. 2011. Effects of cadmium and the combination of cadmium with low molecular weight chitosan on the mRNA expression of metallothionein in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31(9): 2028-2032

镉对长江华溪蟹金属硫蛋白 mRNA 表达的诱导及低分子量壳聚糖的联合作用

周妍英¹, 李瑞金^{1, 2}, 任国锐¹, 王兰^{1, *}

1. 山西大学生命科学学院, 太原 030006

2. 山西大学环境科学与工程研究中心, 太原 030006

收稿日期: 2010-11-09

修回日期: 2011-01-12

录用日期: 2011-01-13

摘要: 采用实时荧光定量 PCR 法, 研究了不同浓度镉 (Cd^{2+}) 对长江华溪蟹 (*Sinopotamon yangtsekiense*) 金属硫蛋白 (metallothionein, 简称 MT) 在肝胰腺、鳃、肌肉和心脏中 mRNA 表达的诱导作用及低分子量壳聚糖 (low molecular weight chitosan, 简称 LMWC) 的联合作用。镉浓度分别为 29、58 和 87 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 镉与 LMWC 的联合作用组分别为 58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} + 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LMWC、58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} + 40 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LMWC 和 58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+} + 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ LMWC; 处理时间均是 4 d。结果显示, 与对照组相比, 在镉胁迫下, 长江华溪蟹肝胰腺、鳃和肌肉组织中 MT mRNA 表达显著增加, 而心脏中的变化不显著。在 LMWC 和镉共同作用下, MT mRNA 的表达在肝胰腺和鳃组织中比镉单独作用 (58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Cd^{2+}) 显著下降, 而肌肉和心脏中的变化没有统计学意义。镉能诱导长江华溪蟹 4 种组织中 MT mRNA 的表达, 且具有组织差异性; 在 LMWC 与镉联合作用下, MT mRNA 的表达有一定程度的下降。

关键词: 长江华溪蟹; 金属硫蛋白 mRNA 表达; 镉; 低分子量壳聚糖

文章编号: 0253-2468(2011)09-2028-05

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Effects of cadmium and the combination of cadmium with low molecular weight chitosan on the mRNA expression of metallothionein in the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*

ZHOU Yanying¹, LI Ruijin^{1, 2}, REN Guorui¹, WANG Lan^{1, *}

1. School of Life Science, Shanxi University, Taiyuan 030006

2. Research Center of Environmental Science and Engineering, Shanxi University, Taiyuan 030006

Received 9 November 2010;

received in revised form 12 January 2011;

accepted 13 January 2011

Abstract: In order to investigate the impact of cadmium on the mRNA expressions of metallothionein (MT) in hepatopancreas, gill, heart and muscle of the freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* and its effects in combination with low molecular weight chitosan (LMWC), individual crabs were exposed to different concentrations of cadmium (0, 29, 58 and 87 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), or exposed to cadmium (58 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) plus different concentrations of LMWC (20, 40 and 80 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) for 4 days. The expression levels of MT were measured by real-time quantitative PCR. The results showed that cadmium significantly induced mRNA expressions of MT in hepatopancreas, gill and muscle, while the alteration of mRNA was not significant in the heart of *S. yangtsekiense* compared with the control. Moreover, the mRNA expressions in hepatopancreas and gill were markedly decreased in the groups of cadmium plus LMWC compared with the cadmium group. It is concluded that cadmium can induce MT mRNA expressions in four tissues of *S. yangtsekiense*. However the effects are different in various tissues. The combination treatment of LMWC and cadmium can decrease the MT in *S. yangtsekiense* in a certain range.

Keywords: *Sinopotamon yangtsekiense*; metallothionein mRNA expression; cadmium; low molecular weight chitosan

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (No. 30870267, 30970361); 山西省自然科学基金资助项目 (No. 2008011069); 中国博士后基金资助项目 (No. 20100471580)

Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 30870267, 30970361), the Natural Science Foundation of Shanxi Province (No. 2008011069) and the China Post-doctoral Science Foundation Funded Project (No. 20100471580)

作者简介: 周妍英 (1983—), 女, E-mail: sxzhouyanying@yahoo.com.cn; * 通讯作者 (责任作者) E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

Biography: ZHOU Yanying (1983—), female, E-mail: sxzhouyanying@yahoo.com.cn; * Corresponding author E-mail: lanwang@sxu.edu.cn

1 引言(Introduction)

镉(cadmium ,Cd) 在水生生态系统中通过食物链的逐级放大 ,危害生态系统 ,最终对人体产生影响. 研究表明 ,大多数重金属能诱导水生动物肝脏、肾脏和脑等一些重要器官金属硫蛋白(metallothionein ,简称 MT) 的生物合成增加(任宏伟等 2001) . 金属对 MT 的诱导作用发生在转录水平 ,它与 MT 基因上游序列中的金属效应元件(MREs) 结合 ,从而启动 MT 的 mRNA 转录(Mahmood *et al.* , 2009) . 这种转录调节与重金属浓度密切相关 ,可反映水环境中的重金属污染程度(陈春等 2009) . 因此 ,MT mRNA 的转录水平可以作为一种监测水体受重金属毒害的生物标志物(Ma *et al.* , 2009) .

壳聚糖(chitosan) 是甲壳素脱乙酰基后的降解产物 ,是自然界中唯一大量存在的碱性氨基多糖. 低分子量壳聚糖(low molecular weight chitosan ,简称 LMWC) 是壳聚糖经降解形成的可溶于水的低分子聚合物 ,具有抗氧化、抗菌、抗肿瘤等作用(Yin *et al.* , 2009) . 在抗氧化作用方面 ,壳聚糖具有很强的还原能力 ,能有效清除羟基自由基、超氧阴离子(Feng *et al.* , 2007; Kim *et al.* , 2007) 等自由基 ,减少脂质过氧化产物丙二醛(MDA) 的生成量 ,提高超氧化物歧化酶(SOD) 、过氧化氢酶(CAT) 、谷胱甘肽过氧化物酶(GPx) 等抗氧化酶的活性.

本课题组吉晋芳等(2008) 通过测定 SOD、CAT、GPx 等抗氧化酶的活性发现 ,LMWC 对镉引起的长江华溪蟹组织器官氧化损伤有一定的防护作用. MT 具有重金属解毒功能. 那么 ,LMWC 对 MT mRNA 转录水平的作用又如何? 鉴于此 ,本实验采用实时荧光定量 PCR 法(Paul-Pont *et al.* , 2010) ,研究了镉胁迫下长江华溪蟹(*Sinopotamon yangtsekiense*) 4 种组织(肝胰腺、鳃、肌肉和心脏) MT 在 mRNA 转录水平的变化 ,以及在镉和 LMWC 联合作用下表达的变化规律 ,从而阐明机体防护镉污染的机理与 LMWC 的防护机制 ,为 LMWC 作为重金属毒性的防护剂提供科学依据.

2 材料与方法(Materials and methods)

2.1 实验材料

长江华溪蟹购于太原市五龙口水产批发市场 ,置实验室水缸中暂养两周以上 ,养殖用曝气 48 h 的自来水 ,实验前 24 h 停止喂食. 实验时随机选取 28

只活动正常、反应灵敏的个体(体重(21.97 ± 3.97) g) 随机分成 7 组进行染毒.

2.2 试剂与仪器

乙醇、氯仿、异丙醇(北京化工厂) , $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (天津市博迪化工厂) ,LMWC(浙江金壳甲壳生物公司) ,Trizol 试剂盒(北京 Biomed) ,反转录试剂盒(TaKaRa) ,HS Taq 酶(TaKaRa) ,MT 和 β -actin 基因的引物与探针均由上海水源生物公司合成.

低温冷冻离心机(Thermo MR23) ,凝胶成像系统(Fluor Chem HD2) ,实时荧光定量 PCR 仪(7500 Real Time PCR system ,ABI) ,酶标仪(Spectra Max M5) .

2.3 实验方法

2.3.1 染毒处理 采用体外暴露法对长江华溪蟹进行染毒. 实验设计 7 个处理组 ,分别是空白对照组 , $29.58.87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 组 , Cd^{2+} ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 与 3 个不同浓度的 LMWC(20、40 和 $80 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 联合作用组 ,每组 4 只个体 ,且均设平行. 染毒时间 4 d.

2.3.2 提取 RNA 严格按照 Trizol 试剂盒说明书操作提取各组织中总 RNA ,所提取的 RNA 用酶标仪测定其 A_{260} 、 A_{280} 并且计算比值 ,其中 $A_{260/280}$ 在 1.8 ~ 2.1 之间为合格.

2.3.3 引物与探针 MT 与 β -actin 基因的引物和探针序列见表 1.

表 1 MT 与 β -actin 基因的引物与探针序列

Table 1 Sequences of primers and probes of MT and β -actin

基因	引物与探针序列
MT 正向引物	5'-CCTAGACCTGCTCGCTGATC-3'
MT 反向引物	5'-CCGCTGTCCCTGCTGATAG-3'
MT 探针	5'-CGTCACCGCCACTACCGTCACACC-3'
β -actin 正向引物	5'-ATGAAGGTTATGACTGAACGAGG-3'
β -actin 反向引物	5'-GCAGCAGCTTGAGCCATTT-3'
β -actin 探针	5'-TCCTTCACTACCACAGCAGAGCG-3'

2.3.4 MT mRNA 表达的测定 将所有提取好的 RNA 反转合成 cDNA 第一链 ,再以 cDNA 为模板在实时荧光定量 PCR 仪上进行荧光定量 PCR. PCR 反应体系为 $20 \mu\text{L}$,其中 ddH_2O $12.3 \mu\text{L}$, Mg^{2+} $2.0 \mu\text{L}$, $10 \times \text{PCR buffer}$ $2.0 \mu\text{L}$, dNTP $0.1 \mu\text{L}$,正义引物(+) 和反义引物(-) 各为 $1.0 \mu\text{L}$,Taq DNA 聚合酶($5 \text{ u} \cdot \text{L}^{-1}$) $0.2 \mu\text{L}$,模板 cDNA $1.0 \mu\text{L}$,MT 探针 $0.4 \mu\text{L}$. PCR 反应条件: 预变性 $95 \text{ }^\circ\text{C}$: 3 min ; $94 \text{ }^\circ\text{C}$: 30 s , $55 \text{ }^\circ\text{C}$: 30 s , $72 \text{ }^\circ\text{C}$: 30 s ,共 45 个循环; 在 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸阶段收集荧光信号.

2.3.5 β -actin mRNA 表达的测定 用管家基因(β -actin)作参照,实验方法同上。

2.4 数据分析

数据均为 MT mRNA 与 β -actin mRNA 表达量的比值. 实验所得数据用 spss15.0 软件分析,各处理组与对照组的比较用单因素方差分析,结果用平均值 \pm 标准误差表示, $p < 0.05$ 表示有显著性差异; $p < 0.01$ 表示有极显著差异。

3 结果(Results)

3.1 镉对长江华溪蟹 4 种组织 MT mRNA 表达的诱导

从图 1 看出,在较高浓度 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 胁迫下,长江华溪蟹肝胰腺中 MT mRNA 表达显著升高,为对照组表达量的 1.83 倍 ($p < 0.05$); 鳃组织在浓度 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 时其表达量为对照组的 1.52 倍 ($p < 0.05$), MT mRNA 的表达显著升高,在高剂量 ($87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) 下其表达没有进一步增加. 肌肉组织在 $29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 时,其 MT mRNA 的表达量为对照组的 1.29 倍 ($p < 0.05$),随着镉浓度的增加,肌肉中 MT mRNA 的表达呈下降趋势,但无显著性变化. 而心脏组织中 MT mRNA 的表达在各个剂量组下均无显著性变化。

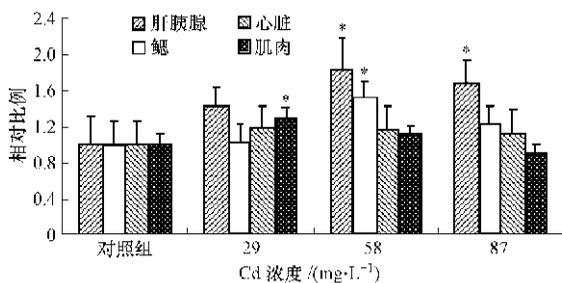


图 1 镉对长江华溪蟹 4 种组织 MT mRNA 表达的诱导作用 (将对照组数值标准化为 1, 其它组数值为与对照组的比值; 与空白对照组相比, * $p < 0.05$ 表示有显著性差异)

Fig. 1 MT mRNA expression levels in four tissues of *S. yangtsekiense* exposed to Cd^{2+} (The values of control group are standardized as 1, the other values of groups are the ratios with the control group; significant difference is indicated by * $p < 0.05$ compared with the control group)

3.2 低分子量壳聚糖对镉诱导长江华溪蟹 4 种组织 MT mRNA 表达的作用

由图 2 观察到,与 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 单独作用相比,加入 LMWC 的 3 个浓度组中,长江华溪蟹肝胰腺组织中 MT mRNA 的表达均显著下降,分别是对

照组的 0.60、0.59、0.56 倍 ($p < 0.05$). 鳃中 MT mRNA 的表达量比 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 显著下降 ($p < 0.05$). 但是,在 LMWC 作用下肌肉和心脏中 MT mRNA 的表达变化与 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$ 单独作用相比均没有统计学意义。

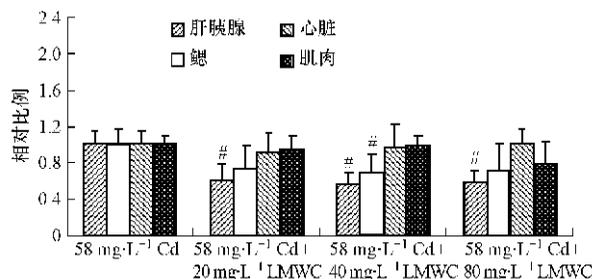


图 2 LMWC 对镉诱导长江华溪蟹 4 种组织 MT mRNA 表达的作用 (注:将浓度组 ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) 数值标准化为 1, 其它组数值为与浓度组 ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) 的比值; 与浓度组 ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) 相比, # $p < 0.05$ 表示有显著性差异)

Fig. 2 MT mRNA expression levels in four tissues of *S. yangtsekiense* exposed to LMWC plus Cd^{2+} (Note: The values of concentration ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) are standardized as 1, the other values of groups are the ratios with the concentration ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$); significant difference compared with Cd group ($58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cd}^{2+}$) is indicated by # $p < 0.05$)

4 讨论(Discussions)

镉通过呼吸道和消化道进入机体,在动物体内的半衰期长达 10~35 年,不仅对肝、肾、骨和生殖等多种器官系统产生损伤,还具有一定的致癌性和致突变性. 镉暴露引起机体细胞膜受到活性氧自由基攻击,会导致脂质过氧化. 李涌泉等 (2008) 研究指出,镉浓度 $29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露 4 d 显著降低了河南华溪蟹 (*Sinopotamon henanense*) 肝胰腺和鳃 SOD、GPx 酶活性,并增加了脂质过氧化物 MDA 的含量,反映出镉对华溪蟹组织有氧化损伤作用. 因此,有必要深入研究机体预防镉毒性作用的机制。

金属硫蛋白被认为是在重金属代谢和解毒中发挥极其重要作用的生物标志物. 重金属诱导 MT 合成主要是通过调控其基因转录水平来实现的. MT 是自然状态下已知的唯一的含镉的蛋白质,富含半胱氨酸,具有被镉诱导高效表达的特点,其基因表达水平更能灵敏的反应生物体受镉污染程度 (Fang et al., 2010). 当机体中的 MT 被诱导后,一方面可与镉结合,降低镉浓度;另一方面可通过清除羟自

由基,增强抗氧化酶的活性,阻断脂质过氧化链式反应,减少脂质过氧化损伤。

本实验研究表明,在镉胁迫下长江华溪蟹肝胰腺和鳃组织中 MT mRNA 表达水平都有不同程度的升高,其中 $58 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉诱导肝胰腺和鳃 MT mRNA 表达达到最大值,而 $87 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉浓度下 MT 表达量没有进一步增加;镉浓度 $29 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时显著增加了肌肉 MT mRNA 表达,但是随着镉浓度的增加肌肉组织的变化与对照组相比没有显著性差异;镉对心脏 MT mRNA 表达的改变没有显著性差异。其原因可能是 MT 作为应激蛋白,其诱导表达是有一定限度的,在一定条件下,其表达量随重金属浓度增加及暴露时间延长而升高,由于 MT 半胱氨酸残基上的巯基与有害重金属结合,减少了重金属对机体的毒性;而当重金属浓度持续增加时,暴露时间持续延长,MT 表达量不再增加,甚至有下降趋势。从本文结果还可以看出,镉在不同组织中诱导产生 MT mRNA 的水平有较大差异,其中肝胰腺 MT mRNA 的诱导量较大,其次是鳃和肌肉组织,且与对照组相比有显著性变化,而心脏中 MT mRNA 的诱导量较低。这主要是由于肝胰腺是重金属蓄积的主要组织,是 MT 合成的重要场所,而鳃是甲壳类动物的呼吸器官,鳃中镉吸收程度强于排泄及转移。何永吉等(2007)发现,镉暴露可诱导河南华溪蟹肝胰腺和鳃中 MT 蛋白大量表达,且肝胰腺中的诱导量高于鳃和肌肉的,这与本文结果一致。此外,镉对华溪蟹心脏组织 MT mRNA 表达的影响及相关机制有待于进一步研究。

低分子量壳聚糖能吸附、螯合镉离子形成复合物(丁纯梅等,2003),减少镉进入机体的浓度;另外,LMWC 本身还具有抗氧化作用。Sun 等(2007)报道,LMWC 具有相对更强的抗氧化活性,短链壳聚糖分子中的活性官能团更容易暴露出来,有利于清除氧自由基,发挥其抗氧化能力。LMWC 活性羟基上的 H 与 $\cdot\text{OH}$ 作用从而清除 $\cdot\text{OH}$; 其一 NH_2 与 $\cdot\text{OH}$ 发生取代基反应,形成稳定的大分子自由基;LMWC 对 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 的螯和还可以阻断氧化性最强的 $\cdot\text{OH}$ 的生成。LMWC 清除生物体内氧自由基 ($\text{O}_2^{\cdot-}$ 和 $\cdot\text{OH}$) 不仅降低了镉的毒性,还缓解了镉对 SOD 和 GPx 活性的抑制(吉晋芳等,2008)。多项研究表明,LMWC 能使实验动物肝组织中的 SOD、CAT 等抗氧化酶显著升高,MDA 明显降低(王鑫等,2007;金黎明等,2007;高晚霞等,2009),对肝损伤有较为

明显的防护作用。本文结果显示,在 LMWC 与镉联合作用下,长江华溪蟹肝胰腺和鳃中 MT mRNA 表达水平明显下降,而心脏和肌肉中 MT mRNA 水平的变化没有显著性差异。总之,LMWC 可以保护生物体组织细胞膜免受自由基攻击,间接降低 MT 在镉胁迫下的应激压力,提高机体的防护能力。

水生无脊椎动物如溪蟹对水体重金属污染比较敏感,其生长、发育、繁殖及种群变化都会受到重金属的影响。对于 LMWC 而言,深入研究其对重金属引起的水生动物毒性作用的预防机制,不但能减轻水生动物受到重金属的危害,有利于水产养殖和水生态系统保护,而且能为综合利用壳聚糖和控制镉污染提供科学依据。

致谢:感谢国家自然科学基金项目(No. 30970361, 30870267),山西省自然科学基金项目(No. 2008011069)和中国博士后基金项目(No. 20100471580)资助。

责任作者简介:王兰(1960—),女,教授,博士生导师,主要从事典型重金属污染物的生物学效应与分子机制方面的研究。E-mail:lanwang@sxu.edu.cn。

参考文献(References):

- 陈春,周启星. 2009. 金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. 农业环境科学学报, 28(3): 425-432
- Chen C, Zhou Q X. 2009. Researching Advance in Metallothionein and Its Biomarker of Heavy Metal Contamination [J]. Journal of Agro-Environment Science, 28(3): 425-432 (in Chinese)
- 丁纯梅,宋庆平,王岚. 2003. 壳聚糖吸附 Cd^{2+} 的机理[J]. 应用化学, 20(2): 203-204
- Ding C M, Sun Q P, Wang L L. 2003. On the absorption mechanism of chitosan towards Cd^{2+} [J]. Chinese Journal of Applied Chemistry, 20(2): 203-204 (in Chinese)
- Feng T, Du Y, Li J, et al. 2007. Antioxidant activity of half N-acetylated water-soluble chitosan in vitro [J]. Eur Food Res Technol, 225: 133-138
- Fang Y, Yang H, Wang T, et al. 2010. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macra veneriformis* [J]. Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol, 151(3): 325-333
- 高晚霞. 2009. 壳寡糖及其衍生物抗氧化作用的研究进展[J]. 咸宁学院学报, 29(3): 127-129
- Gao W X. 2009. Researching advance in antioxidant ability of chitosan and chitosan oligosaccharide [J]. Journal of Xianning College, 29(3): 127-129 (in Chinese)
- 何永吉, 马文丽, 王兰, 等. 2007. 镉诱导金属硫蛋白在华溪蟹组织中的表达[J]. 动物学杂志, 42(3): 48-53
- He Y J, Ma W L, Wan L, et al. 2007. Metallothionein in different

- tissues of freshwater crab exposed to Cadmium[J]. Chinese Journal of Zoology, 42(3): 48-53 (in Chinese)
- 金黎明, 郑奕, 杨艳, 等. 2007. 壳寡糖及其衍生物对 CCl_4 诱导的小鼠肝损伤的保护作用[J]. 山东大学学报(理学版) 42(7): 1-3
- Jin L M, Zheng Y, Yang Y, et al. 2007. Protective effects of chitosan oligosaccharide and its derivatives on carbon tetrachloride-induced liver damage in mice[J]. Journal of Shandong University(Natural Science), 42(7): 1-3 (in Chinese)
- 吉晋芳, 王兰, 王茜, 等. 2008. 低分子量壳聚糖对镉染毒引起的氧自由基变化的影响[J]. 食品科学 29(7): 73-77
- Jin J F, Wang L, Wang Q, et al. 2008. Effects of low molecular weight chitosan on cadmium-induced oxygen free radicals [J]. Food Chemistry, 29(7): 73-77 (in Chinese)
- Kagi J H R. 1991. Overview of metallothionein[J]. Methods Enzymol, 205: 613-626
- Kim K W, Thomas R L. 2007. Antioxidative activity of chitosans with varying molecular weights [J]. Food Chemistry, 101: 308-313
- 李涌泉, 王兰, 刘娜, 等. 2008. 镉对长江华溪蟹酶活性及脂质过氧化的影响[J]. 水生生物学报 32(3): 373-379
- Li Y Q, Wang L, Liu N, et al. 2008. Effects of Cadmium on enzyme activity and lipid peroxidation in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 32(3): 373-379 (in Chinese)
- Mahmood K, Yang J S, Chen D, et al. 2009. Response of metallothionein gene-1 to laboratory exposure to heavy metals and thermal stress in the freshwater prawn *Macrobrachium rosenbergii* [J]. Journal of Hazardous Materials, 167(1): 523-530
- Ma W L, Yan T, He Y J, et al. 2009. Purification and cDNA cloning of a cadmium-binding metallothionein from the freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. Arch Environ Contam Toxicol, 56: 747-753
- Paul-Pont I, Gonzalez P, Baudrimont M, et al. 2010. Short-term metallothionein inductions in the edible cockle *Cerastoderma edule* after cadmium or mercury exposure: discrepancy between mRNA and protein responses [J]. Aquat Toxicol, 97(3): 260-267
- 任宏伟, 茹炳根, 林凡, 等. 2001. 鱼体内金属硫蛋白与水环境关系的研究[J]. 北京大学学报(自然科学版) 37(6): 779-784
- Ren H W, Ru B G, Lin F, et al. 2001. Study of metallothionein in fishes for Donghu aquatic environment [J]. Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Pekinensis, 37(6): 779-784 (in Chinese)
- Sun T, Zhou D X, Mao F, et al. 2007. Preparation of chitosan oligomers and their antioxidant activity [J]. Eur Food Res Technol, 225: 451-456
- 王鑫, 林强, 田平芳, 等. 2007. 低分子量壳寡糖改型 II 糖尿病大鼠症状及其作用机制研究[J]. 食品科学 28(11): 529-532
- Wang X, Lin Q, Tian P F, et al. 2007. Symptom and mechanism of low molecular chitooligosaccharides in II type diabetic rats [J]. Food Chemistry, 28(11): 529-532 (in Chinese)
- Yin H, Du Y, Zhang J. 2009. Low molecular weight and oligomeric chitosans and their bioactivities [J]. Curr Top Med Chem, 9(16): 1546-1559