

# 重金屬對魚貝類效應之研究

## 第一報：氯化汞急性毒害文蛤心肌之效應

林金盾\* 吳京一\*\*

### 摘要

本實驗在於研究無機汞急性毒害文蛤 (*Meretrix lusoria*) 心肌的情形。施行方法使用吸引電極及多用途記錄儀，記錄文蛤心肌細胞的活動電位和收縮張力。實驗中並探討、分析各種濃度之無機汞對其毒害的效應。

使用吸引電極法測得文蛤心肌細胞活動電位： $5.40 \pm 0.49$  mV, (mean  $\pm$  S. E. 以下同) 機械張力： $225.0 \pm 29.0$  mg, 50%平原期時距： $1.0 \pm 0.09$  秒, 心搏率： $16.47 \pm 1.89$  次/分。在持續六十分鐘記錄中，顯著急性毒害文蛤心肌細胞的氯化汞濃度為 5 ppm。心肌受無機汞毒害時，其活動電位和心搏率皆漸減小，活動電位平原期時距延長而機械性收縮張力先有短暫性增強而後減弱的現象。若將心臟置於 20 ppm 氯化汞溶液灌流時，在 30 分鐘內，心肌完全喪失其生理功能，若以 50 ppm 的氯化汞灌流，則在 15 分鐘內心肌活動電位消逝。

### 緒言

一些微量的重金屬對生命的維持，是重要而必要的 (23)。然而，工業發達引起嚴重之重金屬污染後，這些重金屬的分佈，不但失去了均衡甚至成爲危害生命最巨的污染源。很多報告確證重金屬中以汞對生物之害最劇 (20, 24, 35)。而汞化合物具有特殊的實用價值，且一般用途頗爲廣泛。因此，汞被散佈在我們生活周遭的可能性也最大。

研究汞中毒的報告很多，有研究生物體含汞量者 (1, 3, 13, 20-22, 40, 41)；有研究汞之致毒機制者 (31, 34)，也有探求汞之特異拮抗劑者 (8, 10, 27)。惟大多侷限於以脊椎動物爲對象，鮮見有關海產軟體動物的研究報告。

魚貝的生產，在台灣經濟上占相當重要的地位，魚貝且爲國人嗜好食品，每年消費很大 (42)。台灣食用魚貝大多來自本省西南沿海，河川入海口處的淺海灘養殖場。這些養殖場是工業或都市含毒污水，污染魚貝類首要之地 (18-20, 24)。在本省彰化縣境

大肚溪被工業污染，汞含量已超過安全養殖限度 (42)；在中港溪捕獲之部份魚貝含汞量也超過容許食用規定標準 (41)，而且養殖場魚貝類常有突然大量死亡現象，究其原因，可能是河川帶來有毒物質所致 (18, 19)。

上列諸事實，頗爲作者所關切和興趣，乃以貝類 (文蛤) 爲材料，用重金屬中毒性最強的汞做爲毒劑，進行文蛤心臟在汞毒侵害時之毒害效應實驗，期能尋找無機汞毒害貝類之解救和預防方法。

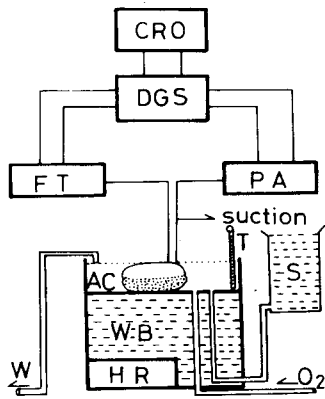
### 實驗材料與方法

選取體重 (帶殼) 約  $25 \pm 2$  克，體長 ( $25 \pm 3$ )  $\times$  ( $15 \pm 2$ ) 毫米的文蛤，放入附裝有自動循環過濾和供氧裝置的人工海水 (30) 飼養池中馴化二天，以 48 小時內能鑽入沙中可露水孔於沙面者爲材料。

用刀片插入文蛤腹面，切斷閉殼肌，將個體移入實驗動物槽 (圖一)，並以細鋼針插在閉殼肌上加以定位。剖露心臟，在心室遠離心房的一端鉤以細絲，接至張力測定儀 (force transducer,

\*國立師範大學生物學系

\*\*國立師範大學生物研究所



圖一 實驗裝置：

- |            |                    |
|------------|--------------------|
| CRO：陰極示波儀  | PA：前置放大器           |
| S：處理用溶液    | W：多餘溶液             |
| DGS：多用途記錄儀 | AC：恒溫動物槽           |
| WB：水浴      | O <sub>2</sub> ：氧氣 |
| FT：張力測定儀   | T：溫度計              |
| HR：自動調溫器   | suction：吸引電極       |

Lafayette 76601-A)，近心房端則以吸引電極（尖端口徑為 300 μm）吸住，經微電極前置放大器（microelectrode preamplifier, Nihon Kohden MEZ 8101），及多用途記錄儀（datagraph system, Lafayette 76104），同時記錄文蛤心肌之收縮張力和活動電位，將訊號接連於示波儀（Oscilloscope, Tektronix Type 565）以為監

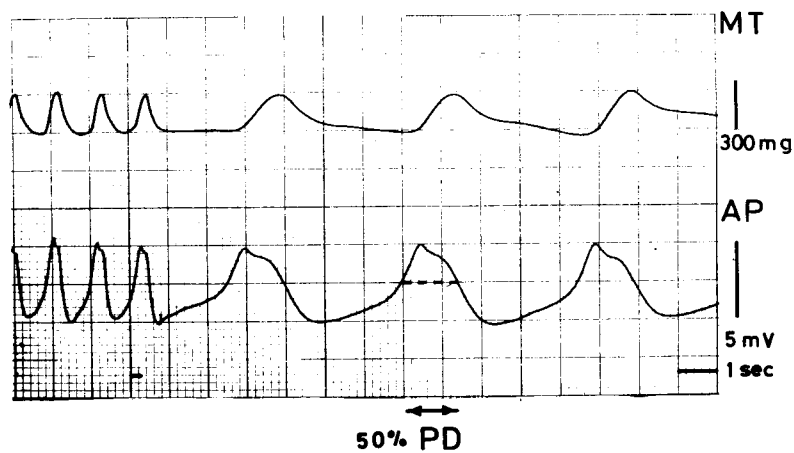
視之用。恒溫動物槽（24±1°C）只可容納7毫升海水，實驗時之灌流速度為450毫升/時，經六次預備實驗測得，各濃度氯化汞完全置換時間為五分鐘。

本實驗分析項目共有：(1)活動電位（action potential；AP），(2)機械張力（mechanical tension；MT），(3)50%平原期時距（50% plateau duration；PD）和(4)心搏率（heart rate；HR）。50%PD即指活動電位50%處之持續時間（duration）（圖二）。所有圖表之數據皆以平均值±標準機差（S. E.）表示，且以Student's t-test，測驗其差異之顯著性。

### 實驗結果

#### (一) 人工海水處理組

用吸引電極測得正常文蛤之AP為5.40±0.49 mV，MT為225.0±29.0 mg，50%PD為1.0±0.09秒，HR為16.47±1.89次/分。而吸引電極所記錄的活動電位，頗受吸引壓力大小的影響（14,15）。本實驗在穩定吸引壓力下，出現正常且穩定的活動電位（16），而能持續20分鐘後，才開始實驗。用人工海水灌流心肌，每10分鐘記錄一次，連續記錄60分鐘，確得其AP，MT，50%PD和HR值均與對照值無差異（表一）。



圖二：文蛤心肌機械張力和活動電位之同時記錄：

- |                          |         |
|--------------------------|---------|
| MT：機械張力                  | AP：活動電位 |
| 50%PD：平原期時距（活動電位50%處之時間） |         |
| ※以下表一、二及圖三、四亦同。          |         |

表一 人工海水處理的結果

Chemicals	N	MEAS.	measurement after treatment (min)						
			( control )	10	20	30	40	60	
Artificial sea water	9	AP (mV)	5.40 ± 0.49 <sup>A</sup>	5.19 ± 0.20	5.00 ± 0.19	4.75 ± 0.05	4.75 ± 0.03	4.73 ± 0.09	4.78 ± 0.17
		MT (mg)	225.00 ± 29.00	218.19 ± 6.85	208.80 ± 8.66	208.81 ± 8.66	204.88 ± 9.08	206.55 ± 10.50	205.12 ± 10.65
		PD (sec)	1.00 ± 0.09	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.65	1.03 ± 0.13	1.05 ± 0.12	0.99 ± 0.07
		HR (/min)	16.47 ± 1.89	16.47 ± 0.00	16.90 ± 1.00	16.50 ± 1.40	16.90 ± 1.00	16.11 ± 1.30	15.71 ± 1.01

<sup>A</sup> mean ± S. E.

表二 不同濃度氯化汞對文蛤心肌活性的效應

HgCl <sub>2</sub> (ppm)	N	( control )	measurement after treatment (min)						
			10	20	30	40	50	60	
5	9	AP (mV)	6.60 ± 0.60	6.60 ± 0.60	6.60 ± 0.60	6.11 ± 0.13	5.46 ± 0.16	5.26 ± 0.18*	4.50 ± 0.16*
		MT (mg)	283.33 ± 22.04	281.24 ± 2.09	256.24 ± 0.97	227.86 ± 14.42	193.05 ± 15.64*	170.30 ± 16.12*	123.67 ± 15.57**
		PD (sec)	0.90 ± 0.02	0.88 ± 0.02	0.81 ± 0.07	0.89 ± 0.12	0.92 ± 0.12	1.07 ± 0.25	1.22 ± 0.22
		HR (/min)	20.0 ± 2.82	19.68 ± 0.3	18.35 ± 0.38	17.98 ± 0.25	17.58 ± 0.25	17.26 ± 0.51	17.25 ± 0.43
10	12	AP (mV)	5.70 ± 0.35	5.09 ± 0.14	4.50 ± 0.13*	4.10 ± 0.20*	3.91 ± 0.24*	3.56 ± 0.24**	3.72 ± 0.25**
		MT (mg)	345.83 ± 10.03	395.97 ± 31.18	387.62 ± 28.28	333.72 ± 17.34	298.16 ± 15.45*	260.74 ± 16.70**	202.87 ± 14.11**
		PD (sec)	0.89 ± 0.09	0.98 ± 0.09	1.23 ± 0.01	1.39 ± 0.03*	1.37 ± 0.02*	1.43 ± 0.08**	1.25 ± 0.12**
		HR (/min)	18.48 ± 0.98	18.79 ± 0.57	19.04 ± 0.80	17.72 ± 0.95	16.82 ± 1.23	15.72 ± 1.22*	14.85 ± 1.20*
20	14	AP (mV)	5.53 ± 0.16	3.79 ± 0.12*	0.98 ± 0.15**	-	-	-	-
		MT (mg)	268.75 ± 23.51	337.12 ± 12.29*	208.28 ± 14.78*	-	-	-	-
		PD (sec)	1.21 ± 0.15	1.42 ± 0.07	2.03 ± 0.30**	-	-	-	-
		HR (/min)	17.21 ± 0.83	17.76 ± 0.63	14.55 ± 0.28*	-	-	-	-
50	6	AP (mV)	5.87 ± 0.14	2.18 ± 0.68**	-	-	-	-	-
		MT (mg)	266.67 ± 26.4	284.54 ± 12.32	-	-	-	-	-
		PD (sec)	1.13 ± 0.08	1.89 ± 0.38*	-	-	-	-	-
		HR (/min)	21.5 ± 2.02	18.40 ± 0.65	-	-	-	-	-

N : number of tested animals

\* : p < 0.05      \*\* p < 0.01

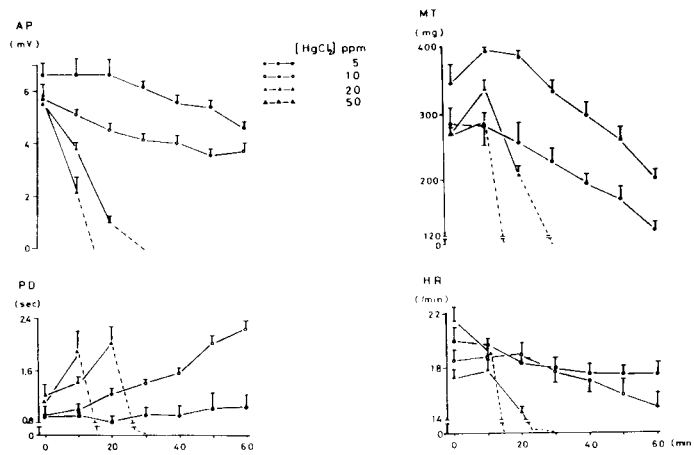
- : death

(二) 各種氯化汞濃度對心肌的效應

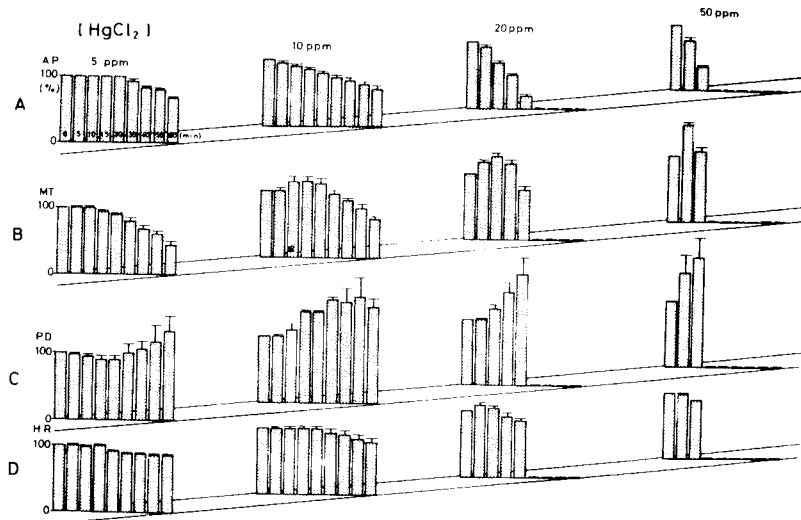
先以人工海水灌流心肌，出現正常心肌活動電位而能持續 20 分鐘後，再分別以 5, 10, 20, 50 ppm 之氯化汞置換，連續灌流並記錄 60 分鐘，觀察心肌之 AP, MT, PD 和 HR 變化。結果：以 5 ppm  $HgCl_2$  處理心肌 40 分鐘後，AP、MT 顯著地減少，而 PD 差異雖不顯著但有增加的趨勢（表二，圖三，四）。10 ppm  $HgCl_2$  處理後，AP、HR 更顯著地減少且 50% PD 延長，MT 則先增強隨即減弱。將心肌置於 20 ppm 濃度，則毒害現象更明顯，且在 30 分鐘內活動電位便完全消逝。

討 論

研究心肌細胞電生理的實驗，一般可用細胞內記錄法 (intracellular recording method)，惟軟體動物心肌細胞很小 (29)，微細玻璃電極不易插入，即使偶爾插入，也因其緩慢而大幅度的收縮，易折斷電極或破壞心肌細胞膜，致影響心肌正常功能。因而，胞內記錄法不宜做持久而穩定的連續記錄 (14,15)。雖然吸引電極記錄法 (suction electrode method) 所記錄的心肌活性，其電位大約只有胞內記錄法所得之電位的十分之一 (16)，但，此法



圖三 各種濃度之氯化汞對文蛤心肌的效應



圖四 用百分比表示不同濃度之氯化汞對文蛤心肌活性的作用

※格中數字 0, 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60 表示該濃度處理之時間(分)。

簡易而穩定，而且所記錄的電位圖型 (action potential pattern) 與胞內記錄法所得相同 (14,16)。因此，爲了獲得持續觀察記錄的需要，吸引電極在研究軟體動物心肌活動電位上可以取代胞內記錄法 (14)。

本實驗使用吸引電極法所記錄之文蛤心肌活動電位圖型中，均具類似脊椎動物心臟節律點細胞所特有的緩慢舒張期毀極化現象 (slow diastolic depolarization)，而且每個機械收縮都規律地伴隨在活動電位之後出現 (11, 12, 15, 17, 25, 30, 37-39)。這種現象和 Irisawa 等人 (1964, 1968) (14,15) 使用同法記錄牡蠣心肌活動電位時，所觀察的結果相仿。

一般研究有毒物質對有機體的效應必須考慮的因素有毒物的濃度和作用時間 (33)。要比較藥劑之毒性大小就必須同時考慮此二因素。本實驗處理文蛤心肌之氯化汞作用時間均爲 60 分鐘，此時間內能急性毒害文蛤心肌的汞離子，其最低濃度爲 5 ppm，而 10 ppm 時，中毒症狀更顯著，即有活動電位和心搏率減低，機械張力先短暫地增強而隨即減弱和活動電位平原期時距延長等中毒現象。若以 20 ppm 氯化汞處理 30 分鐘便有急性中毒致死現象。中毒過程中，其 50% PD 增長的同時，機械張力會持續增強 5~10 分鐘，隨後減弱而消逝。此種 PD 延長的同時，機械張力增強的反應和 Nomura 等人 (1963) 發現海產腹足類中的 *Dolabella* 之心肌活動電位平原期時距增長時，收縮張力會增強之結果一致 (25)。而 Hill 等人 (1974) 用相同的動物，證實：5-HT (Serotonin) 能促使該類動物心肌之收縮張力隨平原期時距增長而增強。究其原因，可能是由於 PD 延長，增加鈣離子的通透時間，所以，可短暫地增強張力 (11)。本報告中，汞離子促使文蛤心肌 PD 增長的同時，MT 則短暫性增強，此種結果是否和上述作用機制相同，有待進一步的求證。

汞存在生物圈的形態有三種：元素態、有機化合態和無機化合態 (4, 32)。任何形態的汞對硫基均有很強的親和力 (5, 6, 9)，特別容易和生物體內蛋白質的硫氫基 (SH group) 結合在一起 (7, 9, 23, 36)。汞離子可毒害心肌細胞的作用機制，可能是汞和心肌細胞膜上的蛋白質結合後，改變細胞膜內

外各種離子的分佈 (26)，干擾細胞膜的正常通透性，抑制 ATPase 之活性 (2, 28)，造成細胞電性的異常變化 (31, 34)，終致影響心肌膜的正常功能，使心肌活動電位不斷地減少。處理時間如果增長，則導致死亡。

根據文獻報導：多數無機汞的急性中毒是可逆的 (6, 36) 而文蛤心肌受無機汞毒害時，可否使用化學藥物使之恢復活性，有待下一實驗來證實。

## 參考文獻

1. Bebbington, G. N., N. J. Mackay, R. Chvojka, R. J. William, A. Dunn and E. H. Auty. (1977): "Heavy metals, selenium and arsenic in nine species of Australian commercial fish." *Aust. J. Mar. Freshwater Res.* 28: 277-286.
2. Bownan, G. J. and E. J. Landon, (1967): "Organic mercurials and net movements of potassium in rat kidney slices." *Amer. J. Physiol.* 213: 1209-1217.
3. Bryan, G. W. and L. G. Hummerstone, (1978): "Heavy metals in the burrowing bivalve *Scrobicularia plana* from contaminated and uncontaminated estuarines." *J. Mar. Biol. Ass. U. K.* 58: 401-419.
4. Clarkson, T. W. (1968): "Biochemical aspects of Hg poisoning." *J. Occupational Med.* 10: 351-355.
5. Eichhorn, G. L. (1977): "Inorganic biochemistry." Vol. I, American Elsevier Publishing Company INC.
6. Goldwater, L. J. (1971): "Mercury in the environment." *Sci. Amer.* 224: 15-21.
7. Goodman, L. S. and A. Gilman, (1975): "The pharmacological basis of therapeutics." The Macmillan Company, N. Y.

8. Groth, D. H., L. Stettler, and G. Mackay, (1976): "Interactions of mercury, cadmium, selenium, tellurium, arsenic and beryllium." *In*: Effects and dose-response relationships of toxic metals (edited by Norberg, G. F.) pp. 527-547, Elsevier, Amsterdam.
9. Hellerman, L. (1937): "Reversible inactivations of certain hydrolytic enzymes." *Physiol. Rev.* 17: 454-484.
10. Hill, C. H. (1974): "Reversal of selenium toxicity in chicks by mercury, copper, and cadmium." *J. Nutr.* 104: 593-598.
11. Hill, R. B. (1974a): "Effects of 5-hydroxytryptamine on action potentials and on contractile force in the ventricle of *Dolabella auricularia*." *J. Exp. Biol.* 61: 529-539.
12. Hill, R. B. (1974b): "Effects of acetylcholine on resting and action potentials and on contractile force in the ventricle of *Dolabella auricularia*." *J. Exp. Biol.* 61: 629-637.
13. Huang, Y. S. and S. G. Huang, (1974): "Mercury contamination of fishes from fishmarkets in Taiwan." *J. Fisheries Soc. China* 261: 16-18.
14. Irisawa, H. and M. Kobayashi, (1964): "On the spontaneous activities of oyster myocardium caused by several inorganic ions in sucrose solution." *Jap. J. Physiol.* 14: 165-176.
15. Irisawa, H., A. Noma, and R. Ueda, (1968): "Effect of calcium on the spontaneous activities of the oyster myocardium in sodium free solution." *Jap. J. Physiol.* 18: 157-168.
16. Irisawa, H., M. Kobayashi, and T. Matsubayashi, (1961): "Action potentials of oyster myocardium." *Jap. J. Physiol.* 11: 162-168.
17. Irisawa, H., L. A. Wilkeno, and M. J. Greenberg, (1973): "Increase in membrane conductance by 5-hydroxytryptamine and acetylcholine on the hearts of *Modiolus demissus* and *Mytilus edulis* (Mytilidae, bivalve)." *Comp. Biochem. Physiol.* 45A: 653-666.
18. Jeng, S. S. (1975): "Effects of river water pollution on the mass mortalities of cultured shellfishes along the southwest coast of Taiwan." *J. Fisheries Soc. Taiwan.* 4(1): 51-65.
19. Jeng, S. S., and S. J. Chen, (1975): "Acute toxicities of Po-Tzu River water and the mass mortalities of cultured shellfishes." *J. Fisheries Soc. Taiwan.* 4(1): 73-83.
20. Jeng, S. S., Y. W. Huang, (1973): "Heavy metal contamination of fish and shellfish in Taiwan." *J. Fisheries Soc. China.* 254: 8-10.
21. Jeng, S. S., Y. W. Huang, Y. S. Lee, G. S. Wang, and S. J. Jeng, (1973): "Heavy metal contents of fishes caught in Keelung Harbor." *J. Fisheries Soc. Taiwan.* 2(1): 78-81.
22. Kipfler, F. C. (1974): "The accumulation of organic and inorganic mercury compounds by the eastern oyster (*Crassostrea virginica*)." *Bull. Environ. Cont. Toxicol.* 11(3C): 275-280.
23. Lehninger, A. L. (1975): "Biochemistry-the molecular basis of cell structure and function." *The Johns Hopkins Univ. School of Medicine.*

24. Nelson, D. A., A. Calabrese, A. B. Nelson, J. R. MacInnes, and D. R. Wenzloff, (1976): "Biological effects of heavy metals on juvenile bay scallops, *Argopecten irradians*, in short-time exposures." Bull, Environ. Cont. Toxicol. 16(3C): 275-282.
25. Nomura, H. (1963): "The effect of stretching on the intracellular action potential from the cardiac muscle fibre of the marine mollusc, *Dolabella auricula*." Sci. Rep. Tokyo Kyoiku Daigaku, Sec. B, 11:153-165.
26. Passow, H., A. Rothstein, and T.W. Clarkson, (1961): "The general pharmacology of heavy metals." Pharmacol. Rev. 13:185-224.
27. Peters, F. R. S., L. A. Stocken, and R. H. S. Thompson, (1945): "British anti-lewisite (BAL)." Nature 156(3909): 816-819.
28. Renfro, J. L., B. Schmidt-Nielsen, D. Miller, D. Benos, and J. Allen, (1974): "Methyl mercury and inorganic mercury-uptake, distribution, and effect on osmoregulatory mechanisms in fishes." In: Pollution and physiology of marine organisms. edited by Vernberg, F. J. and W. B. Vernberg, Academic press, N. Y. (1974).
29. Sanger, J.W. (1979): "Cardiac fine structure in selected arthropods and molluscs." Amer. Zool. 19:9-27.
30. Shigeto, N. (1970): "Excitatory and inhibitory action of acetylcholine on hearts of oyster and mussel." Amer. J. Physiol. 218:1773-1778.
31. Singerman, A. (1976): "Clinical signs versus biochemical effects for toxic metals." In: Effects and dose-response relationships of toxic metal (edited by Nordberg, G. F.) (1976), Elsevier Scientific Publishing Company.
32. Stocker, H. S. and S. L. Seager, (1976): "Environmental chemistry-air and water pollution." Scott Foresman and Company.
33. Tsuchiya, K., Y. Seki, and J. Kubota, (1976): "Biological significance of responses in low exposures to toxic metals." In: Effects and dose response relationships of toxic metals. edited by Nordberg, G. F. Elsevier Scientific Publishing Company, (1976).
34. Verity, M. A. (1972): "Mercury-induced renal necrosis-- a model of cell necrosis based upon heavy metal-membrane interaction." Amer. Heart J. 83:573-574.
35. Waldichuk, M. (1974): "Some biological concerns in heavy metals pollution." In: Pollution and physiology of marine organisms. edited by Vernberg, F. J. and W. B. Vernberg, Academic Press N. Y. (1974).
36. Watkins, D., S. J. Cooperstein, and A. Lazarow, (1971): "Effect of sulfhydrylbinding reagents on islet tissue permeability--protection and reversal by thiol compounds." J. Pharmacol. Exp. Ther. 176:42-51.
37. Wilkens, L. A. (1972a): "Electrophysiological studies on the heart of the bivalve mollusc, *Modiolus demissus*--ionic basis of the membrane potential." J. Exp. Biol. 56:273-291.
38. Wilkens, L. A. (1972b): "Electrophysiological studies on heart of the bivalve mollusc, *Modiolus demissus*--ionic basis of the action potential."

- J. Exp. Biol. 56: 293-310.
39. Wilkens, L. A. and M. J. : Greeberg, (1973): "Effects of acetylcholine and 5-hydroxytryptamine and their ionic mechanisms of action on the electrical and mechanical activity of molluscan heart smooth muscle. " Comp. Biochem. Physiol. 45A:637-651.
40. Yeh, S. J., P. Y. Chen, and W. H. Chang, (1973): "Determination of mercury in fish muscles by neutron activation analysis." Chemistry (the Chinese Chem. Soc. Taiwan, China ) 2: 33-37.
41. 李錦地, 王松賓, 洪正中, (1980): "中港溪捕獲魚貝類汞含量之研究"。中國生物學會第十三屆會員大會論文宣讀摘要(動物組)。
42. 農復會(1978): "工業污染影響農業環境調查報告"。農復會特刊新24號。

## The Acute Toxic Effect of Mercury Chloride on the Heart of Marine Bivalve *Meretrix lusoria*

Jin-Tun Lin and Chin-Yih Wu

### ABSTRACT

In order to realize the acute intoxication of mercury chloride in marine bivalve, *Meretrix lusoria*, suction electrode and datagraph system were used to monitor the mechanical force and electrical activities *in vivo* of the ventricle of the heart.

Using the suction electrode method, the myocardial action potential of the bivalve was  $5.4 \pm 0.49$  mV, mechanical force was  $225.0 \pm 29.0$  mg, 50% plateau duration was  $1.0 \pm 0.09$  sec and heart rate was  $16.47 \pm 1.89$ /min (in artificial sea water,  $24 \pm 1^\circ\text{C}$ ).

The minimal toxic concentration of mercury chloride of the heart has been detected to be 5 ppm. For the myocardium of *Meretrix lusoria*, during the period of animal toxication, the cardiac action potential decreased rapidly, and the plateau duration persisted longer than a normal condition, however, the mechanical tension only increased at the beginning of the recording and then decreased toward its minimal stage.