

镉和苯并芘胁迫对文蛤血细胞功能的影响

王清^{1,2}, 杨红生¹, 王晓宇³

(1. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049; 3. 河北工业大学 海水资源高效利用化工技术教育部工程研究中心, 天津 300130)

摘要: 应用流式细胞仪技术, 通过检测血细胞的吞噬活力、活性氧产物和死亡率, 研究了 Cd²⁺和苯并芘 (Bap)胁迫 7 d 对文蛤血细胞功能的影响。结果表明, 10 μg/L 和 100 μg/L Cd²⁺胁迫会显著降低血细胞的吞噬活力, 增加血细胞的死亡率, 100 μg/L Cd²⁺会显著增加血细胞活性氧产物。5 μg/L 和 50 μg/L Bap 胁迫会显著降低文蛤血细胞的吞噬活力, 增加血细胞的死亡率, 50 μg/L Bap 会显著增加血细胞活性氧产物。可见, Cd²⁺和苯并芘胁迫会显著降低文蛤血细胞的功能, 导致文蛤免疫力下降, 增大文蛤被病害感染的机率。

关键词: 文蛤 (*Meretrix meretrix*); 血细胞; 镉; 苯并芘

中图分类号: S912

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2010)09-0082-05

我国是贝类养殖大国, 滩涂贝类养殖量很大, 其中菲律宾蛤仔 (*Ruditapes philippinarum*)、文蛤 (*Meretrix meretrix*) 和四角蛤蜊 (*Macra Veneriformis*) 等是产量最大的几种贝类之一^[1]。随着工农业生产的发展, 我国近岸海域环境污染日趋严重, 导致滩涂贝类可能长期遭受污染物的胁迫, 从而免疫力下降, 容易受到各种病原菌的感染而导致死亡。近年来, 在我国近岸海域, 由于污染等原因造成的滩涂贝类大规模死亡现象时有发生^[2]。已有相关学者研究并探讨了重金属对四角蛤蜊的毒害作用^[3]。

贝类的免疫功能包括体液免疫和细胞免疫。体液免疫系统由溶酶体酶, 凝集素和抗菌肽等组成, 细胞免疫主要依靠血细胞的吞噬作用, 后者在贝类免疫过程中起着主要作用^[4]。血细胞可以通过合成各种各样的水解酶类以及活性氧产物(呼吸爆发产物)清除入侵的异源物质^[5]。另一方面, 血细胞的吞噬作用是整个免疫防御系统最主要的过程, 由识别, 粘连, 摄取, 破坏和清除外源细胞等不同阶段组成^[6]。另外, 贝类血细胞在营养物质的转运, 伤口修复, 去除代谢产物等方面起着重要作用^[7]。

近年来, 大量的研究开始关注污染物对海洋双壳类免疫功能的影响, 研究指标主要包括血细胞的浓度、成活率、不同类型血细胞的比例, 以及血细胞的呼吸爆发和吞噬活力等^[8-10]。目前, 我国有关污染物对贝类细胞免疫影响的研究主要集中在扇贝上^[11,12], 而污染物对滩涂贝类血细胞功能的研究鲜有报道。作者检验了两种常见污染物对文蛤血细胞免疫功能

的影响, 评估了污染胁迫对文蛤的毒性效应, 为解释污染胁迫下文蛤资源衰退现象提供理论基础, 为开展环境评估和保护提供科学依据。

1 材料方法

1.1 试剂配制

Cd²⁺母液采用 CdCl₂ 配制, 质量浓度为 50 g/L。Bap 在水体中的溶解度较低, 因此先将 Bap 溶于二甲基亚砜(DMSO)中, 再用海水配成质量浓度为 5 g/L 的母液。

文蛤血细胞抗凝剂配置参考 Chen 等^[13]的方法, 配方如下: 葡萄糖 20.8 g/L, EDTA 20 mmol/L, NaCl 20 g/L, Tris-HCl 0.05 mol/L, 配好后调节 pH 至 7.4。

1.2 实验动物的暴露胁迫

实验对象为二龄的健康文蛤, 购自青岛南山水产品市场, 买回实验室后先暂养 7 d。暂养期间每 24 h 换水 1 次, 连续充气, 投喂三角褐指藻和青岛大扁藻混合液。实验用文蛤壳长为(29.43±1.04) mm, 壳高

收稿日期: 2009-12-23; 修回日期: 2010-03-12

基金项目: 国家基金委创新研究群体科学基金项目(40821004); 国家 973 计划资助项目(2007CB407305); 国家农业部公益性计划资助项目(nyhyzx07-047); 国家海洋公益性行业科研专项资助项目(200805069)
作者简介: 王清(1981-), 男, 山东济宁人, 博士研究生, 主要从事养殖生态学方面的研究, 电话: 0532-82898705, E-mail: wangqing1220@sina.com; 杨红生, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898620, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

为(26.19±1.51) mm, 湿质量为(6.91±0.97)g。

实验在 61.8 cm×43.0 cm×31.3 cm 的聚乙烯水族箱中进行。每个水族箱中加入沙滤海水 50 L, 将实验室驯养后的健康文蛤, 分别暴露在不同质量浓度的污染物中。Cd²⁺的质量浓度设置为 1、10 和 100 μg/L; Bap 的质量浓度设置为: 0.5、5 和 50 μg/L。同时设有助溶剂 DMSO(0.001% v/v)对照组和空白对照组。每个处理组设置 3 个平行。

实验期间保持连续微量充气, 每天换水, 换水后加入新的污染物, 达到暴露所需质量浓度。实验期间盐度为 31~33, pH 为 7.97~8.11, 水温 8~10℃。在实验胁迫的第 7 天取样。

1.3 血淋巴工作液的制备

采用 1 mL 预冷的注射器(Becton and Dickinson 公司, 含有 500 μL 抗凝剂)从每个文蛤后闭壳肌中抽取约 500 μL 血淋巴, 放到 5 mL 塑料管中, 混匀后置于冰水混合物中作为血淋巴工作液备用。从每个质量浓度处理组和对照组随机取文蛤 9 只, 每 3 只混合为一个样本。

1.4 血细胞功能参数测定

血细胞的成活率, 吞噬活力和活性氧产物使用 BD(Becton and Dickinson)公司生产的 FACS Vantage 流式细胞仪进行检测。文蛤血淋巴样品上样前先用孔径为 50 μm 的筛绢过滤, 去除杂质防止堵塞仪器。

1.4.1 血细胞的死亡率

取 400 μL 的血淋巴工作液于离心管中, 加 PI(propidium iodide 碘化丙锭)至终质量浓度 20 mg/L, 18℃ 避光抚育 10 min 后上样分析。PI 只能渗透死亡血细胞的细胞膜结合到双链 DNA 上发出荧光, 其激发光为 630 nm。

血细胞死亡率=具 PI 荧光的死细胞数/总的细胞数×100%。

1.4.2 血细胞吞噬活力

取 400 μL 血淋巴工作液离心 10 min(4℃, 780 g), 去上清, 沉淀的血细胞以过滤灭菌海水重悬。然后加入 60 μL 荧光微球(Fluoresbrite YG Microspheres 2.00μm; Polysciences) 使荧光微球的最终浓度为商品浓度的 0.3%。18℃ 避光抚育 1 h 后, 用 460 μL 6% 的福尔马林溶液中止反应, 然后上样分析。

1.4.3 血细胞活性氧产物

400 μL 血淋巴工作液于离心管中, 加入 4 μL 的 2', 7'-二氯荧光黄(DCFH-DA), 至终浓度为 0.01

mmol/L。18℃ 避光抚育 1 h 后上样。DCFH-DA 本身不带荧光, 渗透入细胞后, DCFH-DA 被水解为 DCFH, 结合在细胞内, 被细胞内的活性氧产物进一步氧化成为具有强荧光的 DCF。本实验只测定活性氧产物的静息值, DCF 荧光值以任意单位表示 (A.U.)。

1.5 统计分析

流式细胞仪的原始数据处理使用 WinMDI2.9 软件, 数理统计采用 SPSS16.0 软件进行单因子方差分析。当 $P < 0.05$ 时, 认为差异显著。

2 实验结果

2.1 镉对文蛤血细胞吞噬活力、活性氧产物和死亡率的影响

如图 1 所示, 10 μg/L 和 100 μg/L Cd²⁺能显著地

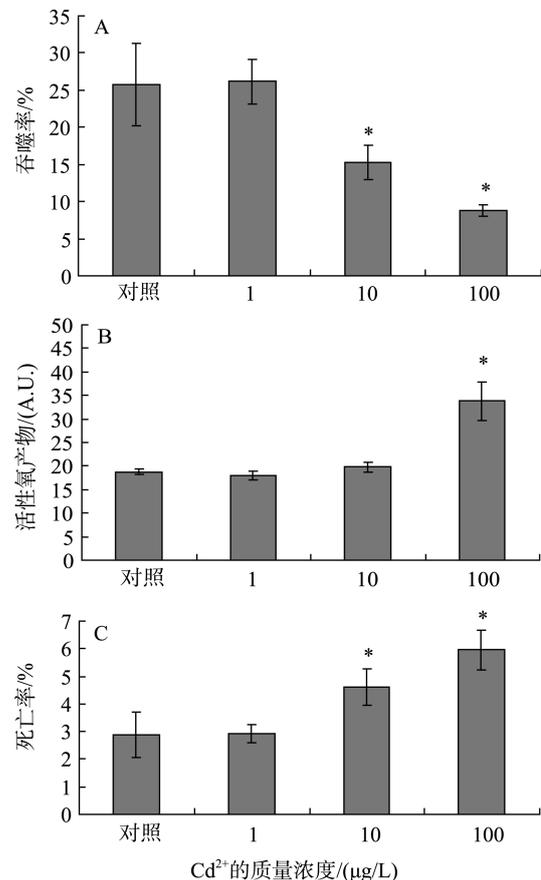


图 1 Cd²⁺对文蛤血细胞吞噬活力(A)、活性氧产物(B)和死亡率(C)的影响

Fig. 1 Effects of Cd²⁺ on phagocytosis (A), reactive oxygen species (B), and mortality(C) of *Meretrix meretrix* hemocytes

*表示与对照相比具有显著差异

* indicates significant differences with respect to control values

抑制文蛤血细胞的吞噬率，增加文蛤血细胞的死亡率($P < 0.05$)。而仅有 $100 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 会显著地增加血细胞活性氧产物。 $1 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 胁迫 7 d 后对血细胞各功能指标均无显著影响。

2.2 Bap 对文蛤血细胞吞噬活力、活性氧产物和死亡率的影响

如图 2 所示， $5 \mu\text{g/L}$ 和 $50 \mu\text{g/L}$ Bap 能显著地抑制文蛤血细胞的吞噬率，增加血细胞的死亡率($P < 0.05$)。 $50 \mu\text{g/L}$ Bap 会显著地增加血细胞内活性氧产物($P < 0.05$)。DMSO 和 $0.5 \mu\text{g/L}$ Bap 胁迫 7 d 后对血细胞各功能指标均无显著影响。

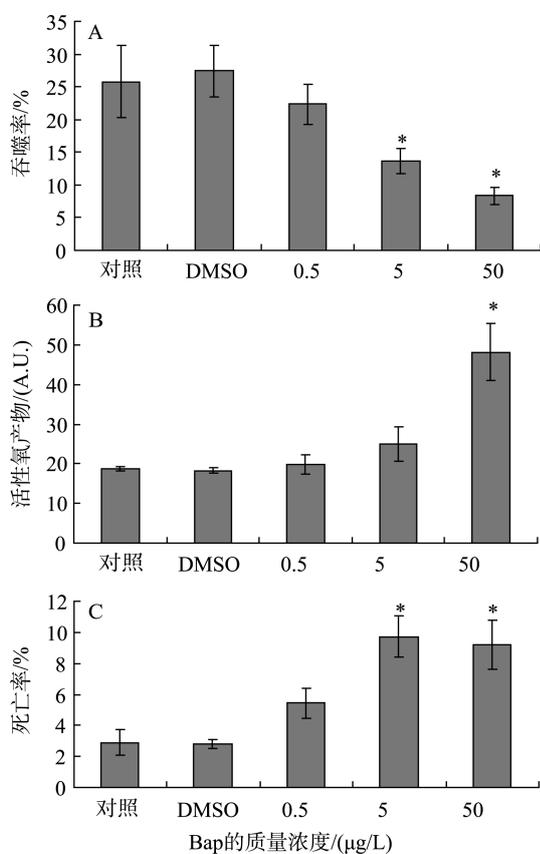


图 2 Bap 对文蛤血细胞吞噬活力、活性氧产物和死亡率的影响

Fig. 2 Effects of benzo[α]pyrene on phagocytosis (A), reactive oxygen species (B), and mortality (C) of *Meretrix meretrix* hemocytes

*表示与对照相比具有显著差异

* indicates significant differences with respect to control values

3 讨论

3.1 重金属对双壳贝类血细胞功能的影响

血细胞在双壳贝类免疫防御过程中起到了非常关

键的作用，可以通过各种吞噬和分泌水解酶类等作用清除入侵的异源物质，包括病原体和污染物等。大量研究表明，贝类血细胞在实验室条件下暴露于一定浓度的污染物后，其免疫功能会受到明显影响^[14-19]。

本研究结果表明文蛤长期暴露于较高浓度重金属后，其免疫功能会受到明显影响，主要是血细胞吞噬活力的下降以及死亡率的增加。文蛤血细胞的呼吸爆发产物会增加，这可能与重金属所受到的氧化胁迫有关。活性氧产物的增加会对自身产生一定的危害，但也会提高文蛤抵抗病原体入侵的能力。高浓度的 Cd^{2+} 胁迫会显著抑制血细胞吞噬功能，而最低浓度 Cd^{2+} 处理组吞噬活力却稍微高于对照组。低浓度的污染物胁迫会提高血细胞的吞噬活力，这可能是由于毒物兴奋效应 (hormesis) 引起的^[9]。Brousseau 等^[15]发现，低浓度(10^{-9} , 10^{-8} mol/L) Cd^{2+} 体外胁迫能提高砂海螂 *Mya arenaria* 血细胞的吞噬活力，而高浓度(10^{-6} , 10^{-7} mol/L) Cd^{2+} 胁迫则会显著降低吞噬活力。低浓度的 Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 可以发挥类似激素的作用，提高淡水贝 *Elliptio complanata* 血细胞的吞噬活力；高浓度的 Hg^{2+} 和 Zn^{2+} 体外暴露会显著抑制该淡水贝类血细胞的吞噬活力，而且具有明显的剂量依赖效应^[9]。

研究表明，在较短时间(多数短于 24 h)的体外暴露实验中，只有重金属浓度很高时，才会对贝类血细胞的免疫功能产生影响。例如，砂海螂血细胞分别暴露于 10^{-4} mol/L CH_3HgCl 和 10^{-3} mol/L HgCl_2 溶液 18 h 后，血细胞死亡率才会显著增加^[9]。长牡蛎血细胞在体内或体外暴露于 Hg^{2+} (10^{-5} mol/L) 24 h 后，死亡率会显著升高^[16]。然而，当暴露时间较长时，较低浓度的重金属胁迫就有可能导致血细胞功能受到显著抑制。例如，菲律宾蛤仔受到 $100 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 胁迫 7 d 后，血细胞的吞噬活力明显受到抑制^[8]。砂海螂暴露于 10^{-6} mol/L HgCl_2 28 d 后，血细胞的死亡率会上升，血细胞的吞噬活力会显著下降^[7]。翡翠贻贝暴露于 $20 \mu\text{g/L Cu}^{2+}$ 和 $10 \mu\text{g/L Hg}^{2+}$ 5 d 后，血细胞吞噬活力会显著下降，而活性氧产物显著升高^[17]。

虽然上述重金属浓度仍然高于绝大多数海区重金属的实际浓度，但是长时间暴露和多种重金属的共同胁迫可能会严重影响贝类的免疫功能，导致其免疫力下降，死亡率增加。

3.2 多环芳烃对双壳贝类血细胞功能的影响

与重金属胁迫的结果类似，高浓度的 Bap 胁迫

会显著抑制血细胞吞噬功能, 增加血细胞的死亡率和活性氧产物。本研究结果与多环芳烃室内胁迫其他双壳贝类的实验结果类似。

200 µg/L Bap 体外胁迫长牡蛎血细胞 4 h 和 24 h 后, 能够显著降血细胞的存活率^[18]。紫贻贝(*Mytilus edulis*)血细胞在体内和体外暴露于 PAHs 后, 其吞噬活力明显下降^[14]。在暴露于 PAHs 混合物(蒎、荧蒎、菲)2 到 4 周后, 紫贻贝血细胞的吞噬功能受到明显抑制^[19]。Wootton 等^[20]发现欧洲鸟尾蛤(*Cerastoderma edule*)暴露于 100 µg/L 菲 7 d 后, 血细胞吞噬活力会显著下降。Zhang 等^[11]最近发现, 栉孔扇贝受到 Bap(0.5, 1, 2.5 和 7.5 µg/L)胁迫 15 d 后, 血细胞数目和吞噬活力会显著下降。

有研究结果表明, PAHs 增加了过氧化物酶和活性氧产物的量, 以呼吸爆发的形式表现出来, 呼吸爆发产物会导致细胞膜脂质发生过氧化, 从而间接导致细胞膜稳定性的下降^[21,22]。血细胞吞噬活力的下降可能与血细胞细胞骨架以及膜结构的破坏有关。细胞骨架元件与无脊椎动物血细胞的活动和吞噬能力有关^[23]。细胞骨架蛋白的任何损伤都会导致血细胞免疫功能的下降, 因为血细胞的吸附、运动和吞噬入侵颗粒物的能力都依赖于细胞骨架^[22]。

致谢: 感谢中国海洋大学赵苑博士在样品测定过程中给予的帮助。

参考文献:

[1] 闫喜武, 张跃环, 左江鹏, 等. 北方沿海四角蛤蜊人工育苗技术的初步研究[J]. 大连水产学院学报, 2008, 23: 348-352 .

[2] 詹文毅, 王南平, 叶辉, 等. 江苏如东文蛤大面积死亡原因探究[J]. 海洋水产研究, 2003, 24(4): 62-65 .

[3] 王晓宇, 王清, 杨红生. 镉和汞两种重金属离子对四角蛤蜊的急性毒性[J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 24-29 .

[4] Roch P. Defense mechanisms and disease prevention in farmed marine invertebrates [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 125-145 .

[5] Lambert C, Soudant P, Choquet G, *et al* . Measurement of *Crassostrea gigas* haemocyte oxidative metabolism by flow cytometry and the inhibiting capacity of pathogenic vibrios [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2003, 15: 225-240 .

[6] Chu F L E . Defense mechanisms of marine bivalves [A]. Fingerman N, Nagabhushanam R .Recent advances

in marine biotechnology [C]. Enfield: Science Publishers, 2000 . 1-42 .

[7] Feng S Y . Cellular defense mechanisms of oysters and mussels [A]. Fisher W S . Disease Processes in Marine Bivalve Molluscs [C]. Bethesda: American Fisheries Society, 1988. 153-168 .

[8] Fournier M, Pellerin J, Clermont Y, *et al* . Effects of *in vivo* exposure of *Mya arenaria* to organic and inorganic mercury on phagocytic activity of hemocytes [J]. *Toxicology*, 2001, 161: 201-211 .

[9] Matozzo V, Ballarin L, Pampanin D M, *et al* . Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam *Tapes philippinarum* [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2001, 41: 163-170 .

[10] Sauve S, Brousseau P, Pellerin J, *et al* . Phagocytic activity of marine and freshwater bivalves: *in vitro* exposure of hemocytes to metals (Ag, Cd, Hg and Zn) [J]. *Aquat Toxicol*, 2002, 58: 189-200 .

[11] Zhang L, Pan L, Liu J . Immunotoxicity effect of benzo [α] pyrene on scallop *Chlamys farreri* [J]. *Journal of Ocean University of China*, 2009, 8: 89-94 .

[12] Liu J, Pan L Q, Zhang L, *et al* . Immune responses ROS generation and the haemocyte damage of scallop *Chlamys farreri* exposed to Aroclor 1254 [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2009, 26: 422-428 .

[13] Chen M Y, Yang H S, Delaporte M, *et al* . Immune condition of *Chlamys farreri* in response to acute temperature challenge [J]. *Aquaculture*, 2007, 271: 479-487 .

[14] Grundy M M, Moore M N, Howell S M, *et al* . Phagocytic reduction and effects on lysosomal membranes by polycyclic aromatic hydrocarbons in haemocytes of *Mytilus edulis* [J]. *Aquat Toxicol*, 1996, 34: 273-290 .

[15] Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, *et al* . Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* haemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals [J]. *Toxicology*, 1999, 142: 145-156 .

[16] Gagnaire B, Renault T, Thomas-Guyon H . *In vitro* and *in vivo* effects of mercury on haemocytes of Pacific oyster *Crassostrea gigas* (Thunberg): development of techniques evaluating estuarine pollution [J]. *Journal de la Recherche Oceanographique*, 2003, 28 (1-2): 34-38 .

[17] Thiagarajan R, Gopalakrishnan S, Thilagam H. Immu-

- nomodulation in the marine green mussel *Perna viridis* exposed to sub-lethal concentrations of Cu and Hg [J]. **Arch Environ Contam Toxicol**, 2006, 51: 392-399 .
- [18] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, *et al*. Pollutants effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: screening of 23 molecules using flow cytometry[J]. **Cell Biol Toxicol**, 2006, 22: 1-14 .
- [19] Grundy M M, Ratcliffe N A, Moore M N . Immune inhibition in marine mussels by polycyclic aromatic hydrocarbons [J] . **Mar Environ Res**, 1996, 42: 187-190 .
- [20] Wootton E C, Dyrinda E A, Pipe R K, *et al* .Comparisons of PAH-induced immunomodulation in three bivalve mollusks [J] . **Aquat Toxicol**, 2003, 65: 13-25 .
- [21] Gómez-Mendikute A, Etxeberria A, Olabarrieta I, *et al* . Oxygen radicals production and actin filament disruption in bivalve haemocytes treated with benzo(a)pyrene [J] . **Mar Environ Res**, 2002, 54: 431-436 .
- [22] Winston G W, Moore M N, Kirchin M A, *et al* . Production of reactive oxygen species by haemocytes from the marine mussel *Mytilus edulis*: lysosomal localization and effect of xenobiotics [J] . **Comp Biochem Physiol C**, 1996, 113: 221-229 .
- [23] Alvarez M R, Friedl F E, Johnson M S, *et al* . Factors effecting in vitro phagocytosis by oyster hemocytes [J] . **J Invert Pathol**, 1989, 54: 233-241 .

The effects of cadmium and benzo[α]pyrene exposure on the immune function of *Meretrix meretrix* hemocytes

WANG Qing^{1,2}, YANG Hong-sheng¹, WANG Xiao-yu³

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. The Engineering Research Center of Seawater Utilization Technology, Ministry of Education, Hebei University of Technology, Tianjin 300130, China)

Received: Dec., 23, 2009

Key words: *Meretrix meretrix*; hemocyte; cadmium; benzo[α]pyrene

Abstract: The effects of cadmium and benzo[α]pyrene (Bap) exposure on the immune function of *Meretrix meretrix* hemocytes were examined by flow cytometry. The results showed that 10 and 100 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} significantly suppressed phagocytosis of hemocytes and increased the mortality of hemocytes, while 100 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} stimulated reactive oxygen species (ROS) in hemocytes. Bap (5 and 50 $\mu\text{g/L}$) inhibited phagocytosis and increased the mortality of hemocytes, while 50 $\mu\text{g/L}$ Bap could enhance ROS. The results suggested that cadmium and benzo[α]pyrene exposure significantly inhibited the immune function of hemocytes, which may lead to low immunity and increased infection of *M. meretrix*.

(本文编辑: 梁德海)