

氯化锌对松江鲈肾细胞系的毒性效应

梁艳¹, 白丽雯¹, 李霞^{1,2}, 秦艳杰¹, 吴迪¹, 周诗珈¹

(1. 大连海洋大学 辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023; 2. 大连海洋大学 农业部北方海水增养殖重点实验室, 辽宁 大连 116023)

摘要: 本文研究了不同浓度的氯化锌对 55~65 代松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)肾细胞系的毒性效应。采用 MTT 法测得氯化锌 24 h 半致死浓度为 308.41 $\mu\text{mol/L}$ 。酶活力测定的结果显示: 超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽-S-转移酶(GST)的活性在氯化锌浓度为 0~250 $\mu\text{mol/L}$ 时, 随浓度的升高逐渐升高; 在 250 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时达到最大值, 而后随着氯化锌浓度的升高逐渐降低。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)的活性在氯化锌浓度为 125 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时达到最大值, 而后随着氯化锌浓度的升高逐渐降低。微核实验结果是微核率随氯化锌浓度增加而增加, 最高达 12.33%。彗星实验发现在半致死浓度条件下松江鲈肾细胞拖尾率为 48.00%、迁移长度 $15.03 \mu\text{m} \pm 2.51 \mu\text{m}$, 与对照组差异显著($P < 0.05$)。以上结果表明: 氯化锌会引起肾细胞氧化酶活性的改变以及细胞核 DNA 损伤, 本研究认为松江鲈肾细胞系可以作为 Zn^{2+} 污染的监测平台。

关键词: 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*); 肾细胞系; 氯化锌; 半致死浓度; 酶活力; DNA 损伤

中图分类号: S963.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3096(2018)04-0064-07

DOI: 10.11759/hyxx20160617001

Zn^{2+} 在低浓度下是有机体正常生理活动的必需元素, 是酶的辅基成分或酶的激活剂。然而当它在有机体内积累超过某一阈值时, 则可以导致生物直接或间接中毒^[1-3]。 Zn 作为化学工业的原材料被广泛应用。工业生产过程中排放含 Zn 的废水和废渣的渗液能够直接进入水体, 加之 Zn 是农业生产中常用的杀虫剂, 农业生产中各类含 Zn 化学制品被大量使用, 致使水体中 Zn 含量增加。近年来, 随着沿海经济的飞速发展, 工业和生活污水的排放量增大, 近岸海域重金属污染日趋严重^[4]。 Zn 易通过食物链富集而逐级放大, 鱼类处于海洋食物链的高层, 会蓄积更多的 Zn , 因此研究 Zn^{2+} 对鱼类的毒性损伤有重要意义^[5]。关于 Zn^{2+} 对水生动物致毒的研究报道较多, 如李丽娜^[6]等报道了 Zn^{2+} 对泥螺(*Bullacta exarata*)的毒性实验, 结果表明 Zn^{2+} 对泥螺的 24 h 半致死量为 0.133 g/L。但利用细胞系所做的研究较少, Rachlin 等^[7]初步尝试利用黑头呆鱼肌细胞系(fathead minnow muscle cell line, FHM)研究 Zn^{2+} 的细胞毒性。Taju 等^[8]比较了印度鲤(*Catla catla*)成体与鳃细胞系(*Catla gill cell line*, ICG)对 ZnCl_2 敏感性, 结果两者反应一致, 认为细胞系可以替代成体进行 Zn^{2+} 的毒理学研究。Tan 等^[9]报道了草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肾细

胞系(*Ctenopharyngodon idellus kidney*, CIK)、斑点叉尾鲷(*Ictalurus punctatus*)卵巢细胞系(channel catfish ovary, CCO)、鲤(*Cyprinus carpio*)上皮瘤细胞系(epithelioma papulosum cyprinid, EPC)等 6 种鱼类细胞系对 Zn^{2+} 的毒性敏感性研究, 发现不同细胞系对重金属的敏感性不同, EPC 对 Zn^{2+} 更为敏感。迄今, Zn^{2+} 对细胞生化毒性和遗传毒性效应的研究尚未见系统报道。

松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)属于鲉形目(Scorpaeniformes)、杜父鱼科(Cottidae)、松江鲈鱼属(*Trachidermus*), 为小型降海洄游性鱼类^[10-11], 本文以松江鲈肾细胞系为实验材料, 研究了氯化锌对细胞主要氧化酶活性的影响以及引起的 DNA 损伤, 目的是探讨氯化锌对细胞的毒性效应, 为利用细胞系作为一种模型来评估水环境中 Zn^{2+} 污染打下基础。

收稿日期: 2017-12-08; 修回日期: 2018-02-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272650)

[Foundation: National Natural Science Foundation of China, No. 31272650]

作者简介: 梁艳(1994-), 女, 山西忻州人, 硕士研究生, 从事海洋生物学研究方向, E-mail: 782589364@qq.com; 李霞(1961-), 通信作者, 女, 教授, E-mail: lx@dliou.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 实验材料

实验所用的细胞系为大连海洋大学细胞工程实验室 2013 年建立的 55~65 代松江鲈肾细胞系。细胞系用含有 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养基培养 (25℃、5%二氧化碳培养箱)。

实验所用 DMEM/F12 培养基、胎牛血清(FBS)、胰酶为 Hyclone 公司产品;超氧化物歧化酶、谷胱甘肽-S-转移酶和 GSH-Px 酶检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 方 法

1.2.1 染毒实验

取处于对数生长期、状态良好的 55~65 代松江鲈肾细胞系,以 2×10^5 个/mL 的密度接种到 96 孔板上,接种量为 200 μ L 或同密度接种到细胞培养瓶中,接种量为 5 mL。培养 24 h 后,弃去培养基,再加入 5 mL、浓度分别为 0、100、200、300、400、500、600、700、800 μ mol/L 的氯化锌(浓度梯度根据预实验结果设置),每个浓度设 3 个重复,在 CO₂ 培养箱 (5%, 25℃)中培养 24 h。

1.2.2 MTT 法测定氯化锌对松江鲈肾细胞系成活率的影响

染毒 24 h 后,向孔中加入 40 μ L MTT,继续培养 4 h。弃去培养液,用 PBS 缓冲液快速冲洗 2 次,然后每孔加入 150 μ L DMSO,室温震荡 15min 后,在酶标仪 570 nm 波长下测定吸光度值(A)。将处理过的样本中氯化锌浓度为 0 的一组设为阴性对照组,没有细胞的孔只加入相同体积的新鲜培养液作为阳性对照组。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{试验组}} - A_{\text{阳性对照}}) / (A_{\text{阴性对照}} - A_{\text{阳性对照}})$$

1.2.3 细胞内 SOD、GST、GSH-Px 酶含量的测定

根据 1.2.2 中计算的细胞存活率及半致死浓度,重新设置氯化锌浓度为 0(对照组),125, 250, 375, 500 μ mol/L,对细胞染毒 24 h 后,用胰酶消化并收集各个实验组细胞,1500 r/min 离心 10 min,将沉淀用 PBS 重悬后,在冰浴中用超声波破碎仪破碎细胞(工作 3 s, 间隙 3 s, 处理 10 min),再将破碎后的细胞悬液于 3 000 r/min, 4℃离心 10 min,分别离心取上清液进行酶活性测定。利用南京建成生物工程研究所生产的检测试剂盒得到松江鲈肾细胞 SOD 酶、GST 酶以及 GSH-Px 酶活性变化情况。

1.2.4 细胞微核率的测定

根据 1.2.2 中计算的细胞存活率及半致死浓度,重新设置氯化锌浓度为 0(对照组),125, 250, 375, 500 μ mol/L,收集各个实验组染毒后的细胞,离心,去除上清,加入 0.5 mL PBS 重悬细胞,滴于干净的载玻片上,用干净的玻璃棒迅速从一端刮向另一端,空气干燥,甲醇固定 10 min,用磷酸缓冲液稀释 Giemsa 染液(9:1)染色 5 min,蒸馏水冲洗,晾干,置于显微摄影仪下观察拍照。每个玻片计数 1 000 个细胞。

$$\text{微核细胞率}(\%) = \frac{\text{带有微核的细胞数}}{\text{观察的细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{观察的细胞总数} \times 100\%$$

1.2.5 彗星实验

彗星实验方法参考梁亚芳等^[12]报道的方法并做了细微调整。取预热的磨砂载玻片浸入 0.7%的正常熔点琼脂糖(NMPA)1 min, 4℃固化过夜,制成第一层胶。将对照组、氯化锌半致死浓度组的细胞悬液分别以 1:7 的体积比与 37℃低熔点琼脂糖(LMPA)混合,取 100 μ L 加到第一层胶上,盖上盖玻片,再置 4℃固化 10 min。取下盖玻片后,将载玻片浸于新鲜配制的冰冷裂解液中,避光低温裂解 1 h。载玻片蒸馏水充分清洗后,置于电泳液中低温避光解旋 30 min。22 V, 200 mA 条件下低温避光电泳 30 min。之后取出载玻片,用蒸馏水漂洗 3 次,观察时滴加 25 μ L 20 μ g/mL 的溴化乙啶,盖上盖玻片,在荧光显微镜下观察拍照,计算细胞的拖尾率和平均尾长。

$$\text{拖尾率} = \frac{\text{拖尾的细胞数}}{\text{观察的细胞总数}} \times 100\%$$

$$\text{平均尾长} = \frac{\text{拖尾细胞的尾长之和}}{\text{拖尾的细胞数}}$$

1.2.6 数据处理

应用 SPSS Statistics V17.0 软件对数据进行统计分析。结果用平均值 \pm 标准差表示,差异显著性用 *t* 检验分析($P < 0.05$)。

2 结 果

2.1 氯化锌对松江鲈肾细胞系存活率的影响

以不同浓度的氯化锌处理松江鲈肾细胞系 24 h 后,其存活率如图 1 所示。随着氯化锌浓度的增加,其存活率逐渐降低,且存在着明显的浓度依赖性。存活率与浓度的自然对数之间为良好的线性关系,其回归方程为: $y = -0.4163 \ln x + 2.886$ $r^2 = 0.9701$ 。根据剂量-效应回归方程可知细胞的半致死浓度为 308.41 μ mol/L。

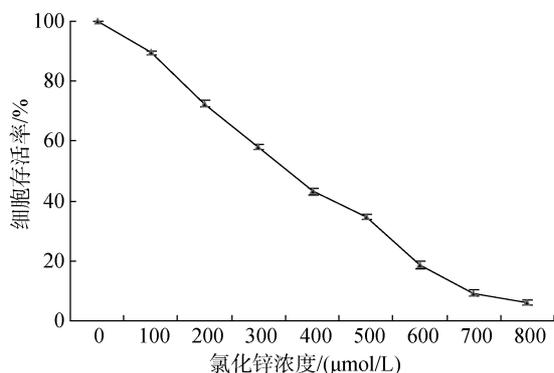


图1 氯化锌对松江鲈肾细胞系存活率的影响

Fig. 1 Effects of zinc chloride on *Trachidermus fasciatus* cell viability

2.2 氯化锌对松江鲈肾细胞系氧化酶活性的影响

2.2.1 氯化锌对细胞系 SOD 的影响

不同浓度的氯化锌处理松江鲈肾细胞系的 SOD 酶活性的变化如图 2 所示。氯化锌处理 24 h 后, 细胞系 SOD 酶的活性在氯化锌浓度为 0~250 μmol/L 时, 随浓度的升高逐渐升高, 250 μmol/L 氯化锌浓度组 SOD 活性最高, 和对照组比较差异显著 ($P < 0.05$), 随后则逐渐降低。

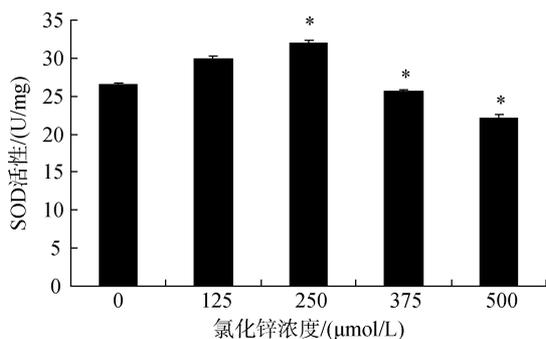


图2 不同浓度氯化锌对松江鲈肾细胞系 SOD 活力的影响

Fig. 2 Effects of different concentrations of zinc chloride on the SOD activity of renal cells

2.2.2 氯化锌对细胞系 GST 的影响

不同浓度氯化锌处理松江鲈肾细胞系的 GST 酶活性的变化如图 3 所示。氯化锌处理 24 h 后, 细胞系 GST 酶的活性在氯化锌浓度为 0~250 μmol/L 范围内, 随浓度的升高逐渐升高, 在 250 μmol/L 浓度时 GST 活性显著增加 ($P < 0.05$), 达到最大值, 随后则逐渐降低。

2.2.3 氯化锌对细胞系 GSH-Px 的影响

不同浓度氯化锌处理松江鲈肾细胞系的 GST-Px

活性的变化如图 4 所示。氯化锌处理 24 h 后, 细胞系 GST-Px 酶的活力在氯化锌 125 μmol/L 浓度组时达到最高, 在氯化锌浓度到达 250 μmol/L 时有明显的下降, 当到达 375 μmol/L 时显著下降 ($P < 0.05$) 之后一直维持在一个较低水平。

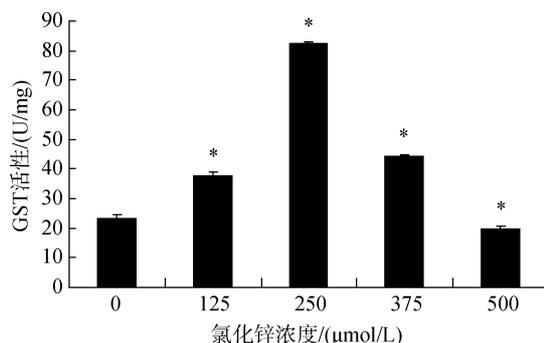


图3 不同浓度氯化锌对松江鲈肾细胞系 GST 活力的影响

Fig. 3 Effects of different concentrations of zinc chloride on the GST activity of renal cells

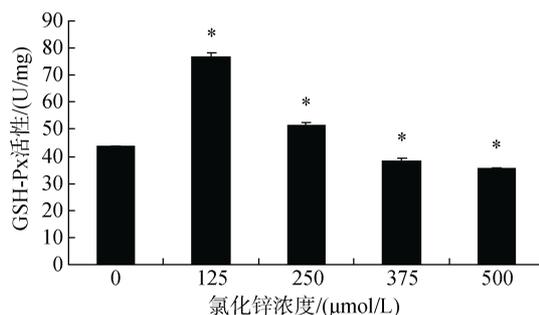


图4 不同浓度氯化锌对松江鲈肾细胞系 GSH-Px 活力的影响

Fig. 4 Effects of different concentrations of zinc chloride on the GSH-Px activity of renal cells

2.3 氯化锌对细胞微核率的影响

试验中发现, 经不同浓度的氯化锌处理后, 细胞系内均发现微核。微核位于细胞质中, 呈圆形, 边缘光滑, 与细胞核染色一致(图 5)。由表 1 可见, 在所设定的浓度范围内, 微核率随氯化锌的浓度的增加而增加。

2.4 氯化锌对松江鲈肾细胞系的 DNA 损伤

用 308.41 μmol/L (24 h-半致死浓度) 的氯化锌处理 24 h 后得到的细胞即为实验组细胞。由彗星实验结果分析发现, 对照组的细胞核多数为圆形, 拖尾的极少(图 6-A), 细胞拖尾率为 10.00%, DNA 迁移长度为 $5.36 \mu\text{m} \pm 1.78 \mu\text{m}$; 实验组(图 6-B)的细胞核出现拖尾现象, 氯化锌组细胞拖尾率为 48.00%, DNA 迁

移长度为 $15.03 \mu\text{m} \pm 2.51 \mu\text{m}$ 。与对照组比较, 有显著差异 ($P < 0.05$)。

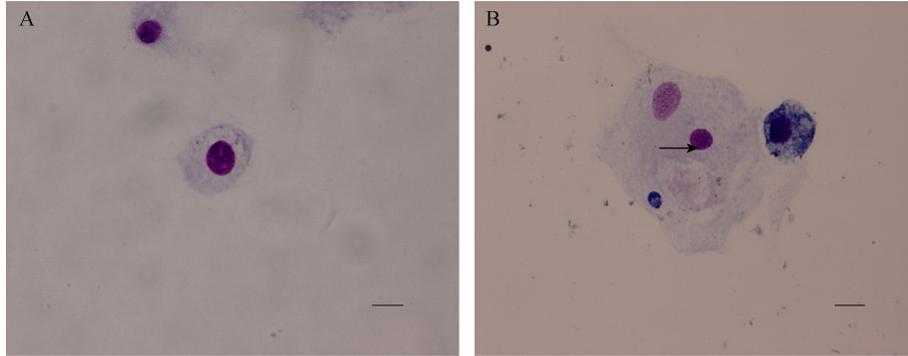


图 5 正常细胞(A)和氯化锌(B)处理后松江鲈肾细胞核的形态
Fig. 5 The nuclear morphology of *T. fasciatus* treated with PBS (A) and zinc chloride (B).
箭头所示为微核
arrow shows the micronucleus

表 1 不同浓度氯化锌对松江鲈肾细胞系微核率的影响
Tab. 1 The effect of different concentrations of zinc chloride on the micronucleus rates of renal cells from *T. fasciatus*

浓度/ $(\mu\text{mol/L})$	微核率/ $\%$
0	6.33
125	7.33
250	9.67
375	10.33
500	12.33

胞毒性和生长抑制作用, 对细胞的 24 h 半致死浓度为 $308.41 \mu\text{mol/L}$ 。谭凤霞^[11]研究了 ZnCl_2 对 EPC 的毒性作用, 发现细胞死亡率随着 ZnCl_2 浓度的增加而增加, 24 h 的 LC_{50} 为 $35 \mu\text{mol/L}$, 其变化规律与本研究结果一致, 但半致死量要低于松江鲈细胞, 这可能与不同细胞系间的差异有关。

3.2 氯化锌对细胞酶活力的影响

氯化锌作用于松江鲈肾细胞后, 产生了一定的毒性作用, 并引起了细胞内 SOD、GST 和 GSH-Px 酶活性的显著变化。SOD 是一种重要的抗氧化酶, 目前, 抗氧化防御系统的变化作为污染物胁迫的生物标志物已成为环境科学领域的研究热点^[13]。实验结果表明, SOD 酶活性均随着 ZnCl_2 浓度的升高而出现先上升后下降的趋势, 表明适量的补充 ZnCl_2 可以使 SOD 活力增加。这与锌对黄颡鱼^[1]及锦鲤组织^[14]

3 讨论

3.1 氯化锌对细胞存活率的影响

利用不同浓度的氯化锌处理松江鲈肾细胞 24 h 后, MTT 法分析 ZnCl_2 对细胞系的毒性效应, 结果显示 $100 \mu\text{mol/L}$ ZnCl_2 即对松江鲈肾细胞系表现出细

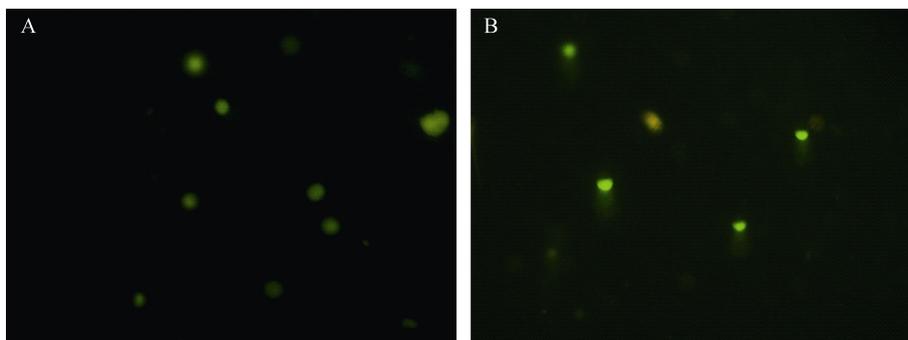


图 6 ZnCl_2 处理细胞 24 h 后 DNA 损伤观察
Fig.6 Effect of zinc chloride on DNA damage
A. 对照; B. ZnCl_2
A. control; B. ZnCl_2 treated for 24 h

SOD 的结论相似。GSH-PX 是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶,通过保护细胞膜的结构与功能使得细胞不受氧化物的损害, Zn^{2+} 对 EPC 的 GSH-Px 活性的影响^[15]与本实验结果相似。实验结果中,细胞系 GSH-Px 在氯化锌浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 时达到最大值,说明低浓度的 Zn^{2+} 可以刺激细胞产生 GSH-Px 进行自我保护; GST 可以催化谷胱甘肽(GSH)与脂溶性物质的甲基结合,谷胱甘肽与其结合后,可防止外源性的化合物损伤细胞^[16-18]。刘慧等^[19]研究了 Zn^{2+} 对鲫鱼(*Carassius auratus*)肝脏 GST 活性的影响,发现鲫鱼肝脏 GST 活性随着 Zn^{2+} 浓度的升高而呈现先上升后下降的趋势。三种抗氧化酶在低浓度氯化锌刺激下呈现活力上升的现象,说明氯化锌导致细胞产生了较多的氧自由基,并激活了松江鲈细胞的免疫保护系统用以清除这些自由基;而高浓度的氯化锌刺激下,过多的氧自由基可能破坏了细胞内各种膜结构,从而三种酶类活性明显下降,细胞失去免疫保护能力。同时,这种双相剂量效应关系符合毒物兴奋效应模型,可以看做一种能在预防、修复、信号转导等广泛的范围内介导细胞应激的适应性反应^[20]。

3.3 $ZnCl_2$ 对细胞 DNA 损伤的影响

本实验从微核实验和彗星实验两个方面研究了 $ZnCl_2$ 对松江鲈肾细胞系的 DNA 损伤。微核试验是遗传毒理学常用的试验方法之一,可以检测染色体断裂和染色体丢失等方面细胞受到 DNA 损伤的程度^[21-22]。由表 1 可以看出,松江鲈肾细胞微核率随 $ZnCl_2$ 浓度的增加而增加,表明 $ZnCl_2$ 对松江鲈肾细胞具有遗传毒性。

彗星试验 (Comet assay),又称单细胞凝胶电泳 SCGE (Single cell gel electrophoresis),是一种在单细胞水平上通过测定细胞的拖尾率和迁移长度来检测 DNA 微损伤的方法^[23]。细胞在 308.41 $\mu\text{mol/L}$ (24 h-半致死浓度)的氯化锌处理 24 h 后的拖尾率为 48.00%,表明 $ZnCl_2$ 能够引起细胞的 DNA 断裂,这与张迎梅等研究的 Zn^{2+} 对泥鳅 DNA 具有损伤作用的结论相似。

4 结论

本研究采用松江鲈肾细胞系,检测了氯化锌对松江鲈细胞的生物学毒性和遗传毒性,发现氯化锌可导致细胞中一系列抗氧化酶活力呈现规律的剂量-

效应关系,符合毒物兴奋效应模型^[23, 24];同时,氯化锌可以引起细胞出现微核和 DNA 断裂现象,呈现出一定程度的遗传损伤。

参考文献:

- [1] 闫杰,陈瑾,刘凡,等.铜、锌对肋骨条藻生态毒理研究[J].淮海工学院学报,2014,23(3):88-92.
Yan Jie, Chen Jin, Liu Fan, et al. Ecotoxicological studies of Copper and Zinc on *Skeletonema costatum*[J]. Journal of Huaihai Institute of Technology (Natural Science Edition), 2014, 23(3): 88-92.
- [2] 孙德文,詹勇,许梓荣.重金属对鱼类危害作用的研究[J].水利渔业,2003,23(2):4-6.
Sun Dewen, Zhan Yong, Xu Pengrong. Studies on the effects of heavy metals on fish[J]. Water fishery, 2003, 23(2): 4-6.
- [3] 马桂云,张振华,严少华,等.重金属对鱼类污染的研究进展[J].江苏环境科技,2003,16(2):38-40.
Ma Guiyun, Zhang Zhenhua, Yan Shaohua, et al. Study progress of fish pollution by heavy metals[J]. Jiang Su Environmental Science and Technology, 2003, 16(2): 38-40.
- [4] 梁健,雷雅云,李永仁. Cu^{2+} 对青蛤的胁迫效应[J].海洋科学,2015,39(11):74-78.
Liang Jian, Lei Yayun, Li Yongren. Effects of Cu^{2+} stress on *Cyclina sinensis*[J]. Marine Sciences, 2015, 39(11): 74-78.
- [5] 孙维萍,刘小涯,潘建明.浙江沿海经济鱼类体内重金属的残留水平[J].浙江大学学报(理学版),2012,39(3):338-344.
Sun Weiping, Liu Xiaoya, Pan Jianming. Levels of heavy metals in commercial fish species from the near-shore of Zhejiang Province[J]. Journal of Zhejiang University (Science Edition), 2012, 39(3): 338-344.
- [6] 李丽娜,陈振楼,张亚雷,等.长江口滨岸潮滩底栖动物泥螺受锌污染的急性毒理试验研究[J].生命科学研究,2008,12(4):373-378.
Li Lina, Chen Zhenlou, Zhang Yalei, et al. Acute toxicity test of benthic fauna, *Bullacta exarata*, by pollutant zinc in the tidal flat of Changjiang estuary[J]. Life Science Research, 2008, 12(4): 373-378.
- [7] Rachlin J W, Perlmutter A. Fish cells in culture for study of aquatic toxicants[J]. Water Research, 1968, 2: 409-414.
- [8] Taju G, Abdul M S. Development and characterization of cell line from the gill tissue of *Catla catla* (Hamilton, 1822) for toxicological studies[J]. Chemosphere, 2013, 90: 2172-2180.
- [9] Tan F, Wang M. Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals

- in vitro[J]. *Toxicology in Vitro*, 2008, 22: 164-170.
- [10] 毕潇潇. 松江鲈(*Trachidermus fasciatus*)种群的形态学与遗传学研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2013.
Bi Xiaoxiao. Studies on the morphology and genetics of *Trachidermus fasciatus* populations[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2013.
- [11] 谭凤霞. 三株鱼类细胞系的建立和十二株鱼类细胞系对重金属毒性的敏感性研究[D]. 湖北: 华中农业大学, 2008.
Tan Fengxia. Establishment of three Fish Cell Lines and Sensitivity of 12 Fish Cell Lines to Metals Toxicity Study[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008.
- [12] 梁亚芳, 苗亮, 李祥云, 等. 铅、铬胁迫对大弹涂鱼血细胞遗传损伤的彗星实验检测[J]. *生物学杂志*, 2014, 31(6): 38-38.
Liang Yafang, Miao Liang, Li Mingyun, et al. Detection of genetic damages in peripheral blood of *Boleophthalmus pectinirostris* exposed to Pb and Cr by comet assay[J]. *Journal of Bioogy*, 2014, 31(6): 38-38.
- [13] 蒋凤华, 高伟, 赵美丽. 原油污染对栉孔扇贝抗氧化酶活性的影响[J]. *海洋科学*, 2012, 36(7): 28-33.
Jiang Fenghua, Gao Wei, Zhao Meili. Effect of crude oil on the activity of antioxidant enzyme of scallop *Chlamys farreri*[J]. *Marine Sciences*, 2012, 36(7): 28-33.
- [14] 郑桂红, 唐玲玲, 孙建梅, 等. 重金属锌对锦鲤组织氧化损伤的作用[J]. *江苏农业科学*, 2014, 42(3): 187-1189.
Zheng Guihong, Tang Lingling, Sun Jianmei, et al. Effects of heavy metal Zinc on oxiclative damage of koi[J]. *Jiangsu Agricultural Science*, 2014, 42(3): 187-189.
- [15] 马召腾, 刘至治, 潘连德, 等. 中国境内松江鲈鱼群体遗传变异的 ISSR 分析[J]. *水产学报*, 2012, 36(7): 1042-1048.
Ma Zhaoteng, Liu Zhizhi, Pan Liande, et al. Genetic variation analysis of roughskin sculpin (*Trachidermus fasciatus*) in native populations of China by ISSR[J]. *Journa of Fisheries of China*, 2012, 36(7): 1042-1048.
- [16] 徐晓辉. 两种星鲈组织细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2010.
Xu Hui. Establishment of tow novel cell lines from barfin flounder (*Verasper moseri*) and spotted halibut (*Verasper variegates*), and their cytotoxicities[D]. Qingdao: Ocean University of China, 2010.
- [17] 樊廷俊, 孙爱, 杨秀霞, 等. 大黄鱼鳍细胞系的建立及久效磷对其毒性作用的研究[J]. *中国海洋大学学报*, 2010, 12: 64-70.
Fan Tingjun, Sun Ai, Yang Xiuxia, et al. Establishment and identification of a continuous fin cell line from large yellow croaker, *Pseudosciaena crocea* and cytotoxic effects of monocrotophos to the fin cells[J]. *Periodical of Ocean University of China*, 2010, 12: 64-70.
- [18] Qin X, Zhang S C, Guo H R, et al. Nonylphenol causes decrease in antioxidant enzyme activities, increase in O₂-content, and alteration in ultrastructures of FG cells, a flounder (*Paralichthys olivaceus*) gill cell line[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2007, 17(3): 127-134.
- [19] 刘慧, 王晓蓉, 王为木, 等. 低浓度锌及其 EDTA 配合物长期暴露对鲫鱼肝脏锌富集及抗氧化系统的影响[J]. *环境科学*, 2005, 26(1): 173-176.
Liu Hui, Wang Xiaorong, Wang Weimu, et al. Effect of long-term exposure of low level Zinc and Zn-EDTA complex on zinc accumulation and antioxidant defense system in liver of *Carassius auratus*[J]. *Environmental Science*, 2005, 26(1): 173-176.
- [20] 龚春梅. 浅谈毒物兴奋效应[J]. *中山大学研究生学刊(自然科学、医学版)*, 2007, 28(4): 24-34.
Gong Chunmei. On hormesis[J]. *Journal of the Graduates, Sun Yat-sen University (Natural sciences medicine)*, 2007, 28(4): 24-34.
- [21] 尹荣焕, 白文林, 张文亮, 等. 喹乙醇对小鼠血细胞及骨髓微核率的影响[J]. *湖北农业科学*, 2007, 46(1): 107-109.
Yin Ronghuan, Bai Wenlin, Zhang Wenliang, et al. Effects of olaquinox on blood cell and bone marrow micronuclear rates in jimpy mice[J]. *Hubei Agricultural Sciences*, 2007, 46(1): 107-109.
- [22] 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属 Cd²⁺、Pb²⁺和 Zn²⁺对泥鳅 DNA 损伤的研究[J]. *水生生物学报*, 2006, 30(4): 399-403.
Zhang Yingmei, Wang Yejing, Yu Runliu, et al. Effects of heavy metals Cd²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on DNA damage[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(4): 399-403.
- [23] 屈颖, 齐浩, 罗明志, 等. DNA 损伤检测新方法简述[J]. *西北大学学报(自然科学网络版)*, 2006, 3(4): 2-9.
Qu Ying, Qi Hao, Luo Mingzhi, et al. Comet assay, a new method for detecting DNA damage[J]. *Journal of Northwest University Online*, 2006, 3(4): 2-9.
- [24] 李宏. 微核试验的研究进展[J]. *安徽农业科学*, 2009, 37(7): 2864-2866.
Li Hong. Research progresses on micronucleus assay[J]. *Journal of Anhui Agri Sci*, 2009, 37(7): 2864-2866.

Study on the cytotoxicity of zinc chloride to *Trachidermus fasciatus* kidney cell lines *in vitro*

LIANG Yan¹, BAI Li-wen¹, LI Xia^{1, 2}, QIN Yan-jie¹, WU Di¹, Zhou Shi-jia¹

(1. Key Laboratory of Marine Bio-resource Restoration and Habitat Reparation in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China; 2. Key Laboratory of Mariculture, Agriculture Ministry, PRC, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China)

Received: Dec. 8, 2017

Key words: *Trachidermus fasciatus*; kidney cell line; zinc chloride; semi-lethal concentration; enzyme activity; DNA damage

Abstract: This study investigated the toxicity of zinc chloride *in vitro* administered to the kidney cell line of *Trachidermus fasciatus*. The 24-h LC₅₀ of zinc chloride was 308.41 μmol/L as estimated by the MTT assay. The SOD activity and the GST activity of the kidney cells gradually increased with increasing concentrations of zinc chloride over the range of 0–250 μmol/L, reaching a maximum at 250 μmol/L, and then gradually decreased. The GSH-Px activity reached a maximum at 125 μmol/L and then gradually decreased. The micronucleus test indicated that kidney cells produced the micronucleus, and the micronucleus rates gradually increased with increasing concentrations of zinc chloride; the highest micronucleus rate was 12.33%. The comet assay showed that zinc chloride could cause nucleus damage. The comet rate was 48.00%, and the comet length of cellular DNA was 15.03 μm ± 2.51 μm. Both the micronucleus test and the comet assay results showed that there were genotoxic effects on the kidney cell line of *T. fasciatus* when exposed to zinc chloride. The kidney cell line of *T. fasciatus* could be used to monitor the contamination by zinc as a bioindicator for in coasta.

(本文编辑: 梁德海)