

几种污染物对草鱼细胞 SCE 的影响*

毛树坚 王昌留
(杭州大学)

提要 1987年10月—1988年6月期间,以草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) ZC-7901 细胞株和 1 龄稚鱼作实验材料,选 5 种金属盐和 4 种农药作水体环境的污染物,对培养细胞和稚鱼进行处理,观察培养细胞和鱼体内肾细胞 SCE 的变化。结果表明:在每毫升培养基中分别含有 104×10^{-7} mg 的 Cr^{6+} , 112×10^{-7} mg 的 Cd^{2+} , 74.9×10^{-7} mg 的 As^{3+} , 201×10^{-6} mg 的 Hg^{2+} , 207×10^{-6} mg 的 Pb^{2+} 及 216×10^{-6} mg 的敌百虫等污染物,都能诱使培养细胞的 SCE 明显增加;稚鱼在每升分别含有 15×10^{-7} g 的 Cr^{6+} , 15×10^{-7} g 的 Cd^{2+} , 13×10^{-7} g 的 Hg^{2+} 的池水中喂养 40 天后,体内肾细胞的 SCE 也见增加;但是三环唑、甲胺磷、呋喃丹对细胞的 SCE 没有影响。本文认为,能够引起草鱼 SCE 变化的污染物的浓度,应该作为今后制定水质标准的参考;同时,草鱼培养细胞和体内肾细胞 SCE 的检测技术,可以发展成为一种监测水体环境污染的检测系统。

姐妹染色单体交换 (SCE) 最早是 Taylor 在植物细胞中应用氚放射自显影技术发现的^[18],以后 Latt 用荧光染料作染色体染色,可以在荧光显微镜下观察姐妹染色单体交换^[16]。Kornberg 改用 Giemsa 液染色^[4,17],可以用普通显微镜分辨染色单体并检测 SCE,从而使 SCE 的检测更为简便易行。

SCE 可以自然发生,但本底都比较稳定^[10]。大多数致突变、致畸、致癌物都能诱发 SCE^[12],因此利用 SCE 技术来检测环境污染越来越受到重视^[10]。

鱼类的 SCE 研究见报道的已有泥鳅鱼 (*Umbra limi*)^[14], *U. pygmaea*, *Ameioba splendens*^[12], 黄鳝^[2,13]、草鱼^[14]、白鲢^[9]等,最近又有建立体外 SCE 检测系统的报道^[3]。我们应用草鱼吻端组织 ZC-7901 细胞并结合选用草鱼体内肾细胞,检测几种常见的水体环境污染对鱼类细胞 SCE 的影响,从而探讨建立监测水体环境污染的细胞 SCE 检测系统。

一、材料与方 法

1. 体外培养细胞的 SCE 试验

(1) 试验细胞 草鱼 ZC-7901 细胞株,是上皮样细胞与纤维样细胞的混合型细胞,有较强的分裂能力,染色体 $2n = 48$ ^[7]。

* 本研究承浙江省淡水水产研究所张念慈、杨广智、尹文林、沈锦玉等同志,杭州环保研究所蒋美珍同志,浙江农业大学马庆立同志及我校张铭、郁照愈、杜英等同志大力支持和协助,俞大维同志对论文提供宝贵意见,均此一并致谢。

收稿日期: 1988 年 10 月 25 日。

(2) 培养方法 以含小牛血清 10% 的 M-199 培养基常规方法培养。

(3) 污染物 选 5 种金属盐和 4 种农药作为水体模拟污染物, 配成不同的浓度(表 1)。将各不同浓度的污染物分别加入培养基中处理细胞, 对照组不加任何试验污染物。

表 1 选用污染物的种类与浓度

Tab. 1 The kinds and concentration of applied pollutants

污 染 物 组 别		浓 度				
金 属 盐 类	K ₂ Cr ₂ O ₇ ①	10	5	1	0.1	0.01
	含 Cr ⁶⁺ ②	104×10 ⁻³	520×10 ⁻⁶	104×10 ⁻⁶	104×10 ⁻⁷	104×10 ⁻⁸
	CdCl ₂ ①	5	1	0.1	0.01	
	含 Cd ²⁺ ②	560×10 ⁻⁶	112×10 ⁻⁶	112×10 ⁻⁷	112×10 ⁻⁸	
	NaAsO ₂ ①	20	10	1	0.1	0.01
含 As ³⁺ ②	150×10 ⁻³	74.9×10 ⁻³	74.9×10 ⁻⁶	74.9×10 ⁻⁷	74.9×10 ⁻⁸	
HgCl ₂ ①	10	5	1	0.1	0.01	
含 Hg ²⁺ ②	201×10 ⁻³	101×10 ⁻³	201×10 ⁻⁶	201×10 ⁻⁷	201×10 ⁻⁸	
PbSO ₄ ①	1 000	100	10	1		
含 Pb ²⁺ ②	207×10 ⁻³	207×10 ⁻⁴	207×10 ⁻³	207×10 ⁻⁶		
农 药 类	敌百虫①②	1 000	100	10	1	
		216×10 ⁻³	216×10 ⁻⁴	216×10 ⁻³	216×10 ⁻⁶	
	三环唑②	1×10 ⁻¹	1×10 ⁻²	1×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴	
	甲胺磷②	1×10 ⁻²	5×10 ⁻³	1×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻³
呋喃丹②	1×10 ⁻²	5×10 ⁻³	1×10 ⁻³	1×10 ⁻⁴	1×10 ⁻³	

注: ① 单位为 $\mu\text{mol/L}$; ② 单位为 g/L 。

(4) SCE 标本制作 细胞在培养基中生长两个细胞周期后, 经秋水仙素处理, 以常规方法制成染色体标本。标本经硫酸及 Na₂HPO₄ 溶液处理, 紫外光照射, Giemsa 液染色^[4,17]。

2. 体内肾细胞的 SCE 试验

1 龄草鱼取自浙江省湖州市郊鱼塘, 共约 280 尾, 体重在 12—14g 间。试验时饲养于 1m³ 的水泥池中, 加水 0.3m³, 每池各放养试验鱼 6—7 尾。两天后, 池水中按规定含量加

入各模拟污染物；对照组不加任何药物。饲养 40 天（在此期间，间隔取水样测定各污染物含量，如浓度下降则补足到规定浓度）后，取前肾组织细胞制作染色体标本：先按试验鱼每克体重 $8\mu\text{g}$ 量向鱼体注射 PHA 液，再以每克体重注射 $500\mu\text{g}$ BrdU；5 天后，按每克体重 $2\mu\text{g}$ 量注射秋水酰胺，再取细胞制染色体标本。

3. 观察与分析

选取染色单体分染效果较好的早中期相标本，检查 SCE 细胞。计数 SCE 时，以染色体的端部交换与着丝点部交换为 1 次交换，中部交换为 2 次交换（图 1）。各不同浓度污染物处理后的 SCE 计数，最后均进行统计学处理。

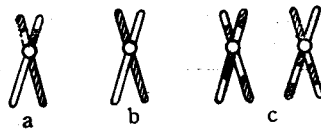


图 1 染色单体交换模式

Fig. 1 The pattern of sister chromatid exchange

a. 端部交换； b. 着丝点部交换； c. 中部交换。

二、结 果

1. 培养细胞经不同污染物处理后的 SCE 变化

(1) 对照组 平均每个中期相有 SCE 3.10 次，即自发的本底 $\text{SCE} = 3.10$ ，SCE 变化幅度为 1—6，SCE 高峰为 2。

(2) 金属盐试验组 不同浓度的各金属盐加入培养基后，细胞的生长和 SCE 变化见表 2。对药物不同浓度所引起的 SCE 变化进行回归分析见图 2。

(3) 农药试验组 不同浓度的各农药加入培养基后，结果见表 2。敌百虫引起 SCE 显著的变化，其余 3 种在较高浓度时影响细胞生长并造成死亡；在较低浓度时对 SCE 无显著影响。

2.1 龄草鱼经污染物处理后的生长及肾细胞 SCE 的变化

(1) 对照组 鱼体生长正常，无死亡，肾细胞的本底 $\text{SCE} = 2.85$ ，SCE 变化幅度为 1—5，高峰为 3。

(2) 试验组 Cr^{6+} 、 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 、 Hg^{2+} ，三环唑、呋喃丹处理后的草鱼生长和肾细胞 SCE 变化见表 3。

用含 As^{3+} $74.9 \times 10^{-6}\text{g/L}$ 的池水养鱼，鱼体生长正常，但肾细胞中期相极少，只在个别鱼体中检出两个有 SCE 的中期相，无法进行统计学分析。

用含敌百虫 $50 \times 10^{-7}\text{g/L}$ 的池水养鱼，第二天时即死亡 2 尾，15 天后鱼体全部弯曲变形，在 23—31 天期间余下的 5 尾陆续死亡，无法作肾细胞的检查。

用含甲胺磷 $20 \times 10^{-7}\text{g/L}$ 的池水养鱼，鱼体基本正常，但在 28—33 天期间作肾细胞检查前死亡 3 尾，余下 3 尾中有 1 尾检查到 18 个中期相，SCE 未升高，另 2 尾分裂相极少。

3. 培养细胞和体内肾细胞经污染物处理后 SCE 变化的比较

表 2 污染物对草鱼 ZC-7901 细胞的生长和 SCE 的影响

Tab. 2 The effect of some pollutants on growth of Grass carp ZC-7901 cells and SCE

污染物	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	细胞生长情况	浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	SCE 的变化②					
				增减	幅度	高峰	t	p	显著性
$\text{K}_2\text{Cr}_2\text{O}_7$	10	12h 细胞死亡	1	+1.45	1-10	4	7.57	<0.01	极显著
	5	98h 大量细胞死亡	0.1	+0.83	1-10	4	4.72	<0.01	极显著
			0.01	-0.09	1-5	3	-0.47	>0.05	不显著
CdCl_2	5	48h 大量细胞死亡	1	+2.11	3-10	4.5	8.23	<0.01	极显著
			0.1	+1.30	2-9	4	5.76	<0.01	极显著
			0.01	+0.01	2-9	3	0.11	>0.05	不显著
HgCl_2	10	24h 细胞死亡	1	+1.50	2-9	4	8.91	<0.01	极显著
	5	细胞生长极慢, 10d 内陆续全部死亡	0.1	+0.40	2-7	4	1.44	>0.05	不显著
			0.01	-0.04	1-6	3	-0.22	>0.05	不显著
NaAsO_2	20	18h 细胞死亡	1	+1.46	2-9	5	5.77	<0.01	极显著
	10	18h 较多细胞死亡	0.1	+0.76	2-9	4	4.59	<0.05	显著
			0.01	+0.11	1-7	3	0.62	>0.05	不显著
PbSO_4	1000	细胞生长极慢, 大量细胞陆续全部死亡	100	+0.90	2-7	4	5.89	<0.01	极显著
			10	+0.23	1-6	3	1.17	>0.05	不显著
			1	+0.05	1-5	3	0.21	>0.05	不显著
敌百虫	1000	细胞大量死亡	100	+1.53	2-7	4	9.20	<0.01	极显著
			10	+0.95	2-7	4	4.85	>0.05	不显著
			1	-0.02	1-5	3	-0.09	>0.05	不显著
三环唑①	100×10^{-6}	细胞生长慢, 7d 全部死亡	10×10^{-6}	+0.11	1-6	4	0.77	>0.05	不显著
甲胺磷	10×10^{-6}	24h 细胞死亡	1×10^{-6}	+0.08	1-5	3	0.52	>0.05	不显著
	5×10^{-6}	细胞生长慢, 5d 全部死亡							
呋喃丹	10×10^{-6}	24h 细胞死亡	1×10^{-6}	-0.04	0-8	2	0.22	>0.05	不显著
	5×10^{-6}	大量不能贴壁, 5d 全部死亡							
对 照		细胞生长良好		本底 3.10	1-6	2			

注: ① 三环唑、甲胺磷、呋喃丹三种污染物的浓度单位为 g/L。② SCE 增减, 使用药物后 SCE 细胞平均值与对照组本底 SCE 之间的比较, 增(+), 减(-)。幅度, SCE 细胞的最高数值与最低数值之间的幅度。高峰, 在 SCE 幅度内, 出现频率最高的 SCE 细胞数值。表 3 同。

表 3 污染物对草鱼生长和体内肾细胞 SCE 的影响

Tab. 3 The effect of some pollutants on fish growth and SCE of kidney cells *in vivo* of Grass carp

污 染 物	浓度 (g/L)	草鱼生长情况	增 减	幅 度	高 峰	t	p	显著性
Cr^{6+}	15×10^{-7}	正常	+0.73	1-6	4	4.05	<0.05	显 著
Cd^{2+}	15×10^{-7}	鱼体弯曲, 2/6 死亡	+0.80	2-5	4	4.72	<0.05	显 著
Hg^{2+}	13×10^{-7}	鱼体稍弯曲, 5/7 死亡	+0.75	1-6	4	3.93	<0.05	显 著
Pb^{2+}	20×10^{-4}	鱼体稍弯曲, 4/6 死亡	+0.31	1-5	3	1.44	>0.05	不显著
三环唑	20×10^{-7}	鱼体稍弯曲, 2/7 死亡	+0.20	1-5	3	1.18	>0.05	不显著
呋喃丹	3×10^{-7}	正常	-0.17	1-4	3	-0.89	>0.05	不显著
对 照		正常	本底 2.85	1-5	3			

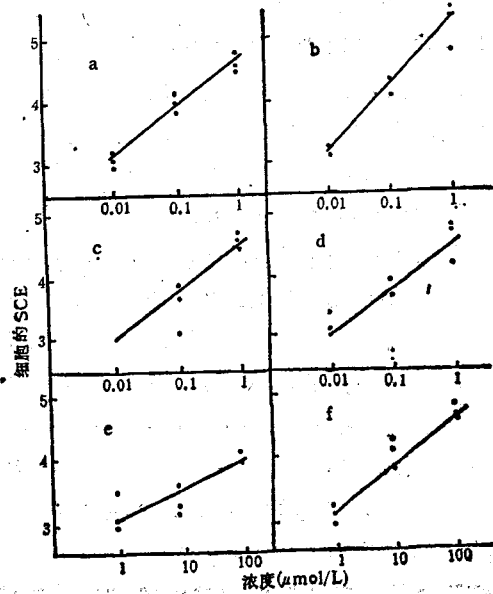


图 2 污染物对草鱼 ZC-7901 细胞 SCE 的相关与回归线

Fig. 2 Curve diagram of regression line between pollutants and ZC-7901 cells SCE in Grass carp

- a. $K_2Cr_2O_7$ 组, $\hat{y} = 0.77\log x + 4.6$, $r = 0.96$, $p < 0.01$; b. $CdCl_2$ 组, $\hat{y} = 1.05\log x + 5.39$, $r = 0.96$, $p < 0.01$; c. $HgCl_2$ 组, $\hat{y} = 0.77\log x + 4.49$, $r = 0.92$, $p < 0.01$; d. $NaAsO_2$ 组, $\hat{y} = 0.68\log x + 4.56$, $r = 0.94$, $p < 0.01$; e. $PbSO_4$ 组, $\hat{y} = 0.43\log x + 3.15$, $r = 0.85$, $p < 0.01$; f. 敌百虫组, $y = 0.77\log x + 3.15$, $r = 0.96$, $p < 0.01$.

在引起培养细胞 SCE 升高的药物中, 其作用 $Cr^{6+} > Cd^{2+} > As^{3+} > Hg^{2+} >$ 敌百虫 $> Pb^{2+}$, 三环唑、甲胺磷、呋喃丹对 SCE 无明显影响。SCE 变化的幅度以 Cr^{6+} 最明显(1—10); Cd^{2+} , Hg^{2+} 次之(分别为 3—10, 2—9)。肾细胞受不同污染物影响后, SCE 的变化相似于培养细胞, 但升高的程度和变化的幅度都较小。

三、讨论与结论

1. 污染物对草鱼体外培养细胞与体内细胞 SCE 的影响

ZC-7901 细胞经不同污染物处理后表明, Cr^{6+} , Cd^{2+} , As^{3+} , Hg^{2+} , Pb^{2+} 均能诱发 SCE 的升高, 其浓度与秦世真等报道的致使人血淋巴细胞 SCE 变化的浓度相似^[10], 但 Cd^{2+} 对鱼类细胞 SCE 诱发的浓度比对人血淋巴细胞的浓度要低得多, 说明鱼类细胞对 Cd^{2+} 很敏感。4 种农药对鱼体和细胞生长都有毒害, 但其中只有敌百虫影响鱼类细胞 SCE 的增加, 其余 3 种对 SCE 的影响不显著。据以前报道, 甲胺磷不会引起 SCE 的升高^[6], 我们的结果与其一致; 呋喃丹与三环唑对 SCE 是否有影响? 未见直接报道。但据记载, 用含三环唑 $275 \times 10^{-6}g/L$ 的饲料喂兔, 没有导致兔的畸胎^[8]。由此推测, 三环唑可能不会导致染色体的变化, 因此对 SCE 无影响; 呋喃丹则尚无其它报道可以佐证。

本文实验所得草鱼肾细胞本底 SCE = 2.85, 与魏彦章报道 SCE = 3.05 相近^[14]。实验中 ZC-7901 细胞与体内肾细胞的 SCE 变化倾向是一致的; 但 SCE 变化的幅度和升高的程度, 肾细胞明显低于培养细胞。这主要是生物体都有一定的“整体效应”, 如排毒、

解毒、免疫等能力,因而降低了金属离子和农药对细胞的毒害。

2. 草鱼适宜于作监测水体环境污染的实验动物

用生物学方法监测环境污染,已有许多研究和应用,如 Ames 试验、染色体畸变分析试验、果蝇伴性隐性致死试验等^[1,5,11]。SCE 也可用于监测致突变、致畸、致癌物,而且比染色体畸变敏感 200 倍^[15,3]。多年前,有应用鱼类 SCE 的变化检测水体环境污染的报道,如 Howell 曾建议应用 *Apteronotus albifrons* 为水生脊椎动物的实验模型^[12],但因价格昂贵,不易推广。因此有人试图选用泥荫鱼、*Umbra pygmaea*, *Ameca splendens*, 黄鳍、麦穗鱼^[12]等鱼作检测水质污染的实验动物。这些鱼的优点是,染色体数目少而且都属末端着丝点染色体,检测 SCE 方便;缺点是,鱼的分布不广,大多是非养殖鱼,来源不很稳定。本文选用我国经济价值最大的淡水养殖鱼——草鱼为实验动物,草鱼的养殖面广,随时可以得到,染色体数目也不很多,是比较适宜于选作监测水体环境污染的实验材料。同时,本研究还选择草鱼体外培养细胞——吻端组织 ZC-7901 细胞,建立体外 SCE 的检测系统。试验表明,ZC-7901 细胞的 SCE 对金属离子反应灵敏而稳定,的确可以考虑作为监测水体污染的一种实验模型材料。

3. 可以建立以草鱼细胞 SCE 变化监测水体污染的体外检测系统

目前城乡河道、湖沼、鱼池等水体中常可检测到本文所选用的几种污染物。据杭州市附近某水体检测记录,Cr⁶⁺ 达到 $16.75 \times 10^{-8}(\text{g/ml})$, Cd²⁺ 达到 $43 \times 10^{-8}(\text{g/ml})$, As³⁺ 达到 $38 \times 10^{-8}(\text{g/ml})$, Pb²⁺ 达到 $28.8 \times 10^{-7}(\text{g/ml})$, 甲胺磷达到 $30.3 \times 10^{-7}(\text{g/ml})$, 味喃丹达到 $5.4 \times 10^{-8}(\text{g/ml})$, 三环唑达到 $65 \times 10^{-8}(\text{g/ml})$ 。本文实验表明,Cr⁶⁺, Cd²⁺, As³⁺ 3 种金属离子诱发 SCE 升高的浓度大大低于水体中该污染物的实际浓度,也低于国家规定的水面三级水标准。这一现象必须引起我们的密切注意。细胞 SCE 的升高,究竟对生物体有何影响? 因致突变、致畸、致癌物都能诱发 SCE 的升高,因此不得不密切注意 SCE 与生物体癌变和遗传特性的关系。由此说明,在环境保护工作中,应该严格控制能促使 SCE 升高的各种污染物在环境中的浓度;同时,也建议水质评价及环境保护部门在制定水质标准和监测污染物时,应将 SCE 的因素考虑进去。应用 ZC-7901 细胞或者草鱼体内肾细胞 SCE 的检测可以迅速测知环境污染物对生物体的影响,方法比较简便,可以发展成为一种监测水体污染的体外检测系统。

参 考 文 献

- [1] 毛德寿、同宗灿、王志远等, 1986。环境生化毒理学。辽宁大学出版社, 307—337 页。
- [2] 刘凌云, 1984。黄鳍的姐妹染色单体分化染色 (SCD)、互换 (SCE) 及点状染色体 (SD)。北京师范大学学报(自然科学版) 3: 85—89。
- [3] 狄少杰、刘凌云, 1988。黄鳍染色体外 SCE 检测系统的建立及对两种清洗剂的检测。环境科学学报 8(2): 249—254。
- [4] 李长富、林治光、江三多, 1981。姐妹染色单体分化染色中 IdUrd 和 BrdUrd 的效果比较。遗传 3(2): 1—3。
- [5] 李昌本、赵寿元、邱信芳等, 1979。哺乳动物姐妹染色单体互换检测化学物质诱发性及同 Ames 氏法相比较。实验生物学报 12(2): 132—136。
- [6] 肖振彬、周阿燕、韩秀菊等, 1987。甲胺磷作业工人外周血淋巴细胞 SCE 的初步观察。农药 1: 38—39。
- [7] 张念慈、杨广智, 1981。草鱼吻端组织细胞株 ZC-7901 及其亚株 ZC-7901s 的建立。实验生物学报 14(1): 101—105。
- [8] 岳钺, 1985。农药新品种及其使用方法。化学工业部出版社, 198—200 页。
- [9] 周墩, 1984。鱼类染色体研究。动物学研究(增刊) 5(1): 38—46。

- [10] 秦世真、薛京伦, 1984. 姐妹染色单体互换. 国外医学(遗传分册) **3**: 116—121.
- [11] 黄幸纾、陈星若, 1985. 环境化学物致突变致畸致癌试验方法. 科学出版社, 1—52, 195—207, 236—246, 282—291 页.
- [12] 贺维顺, 1985. 鱼染色体畸变和姐妹染色单体交换技术及其在监测水体污染工作中的应用. 生物科学动态 **1**: 18—22.
- [13] 虞士嘉, 1985. 黄鳞活体内制备 SCD 法和 SCE 频率的测定. 细胞生物学杂志 **7**(4): 182—183.
- [14] 魏彦章、陆仁后, 1987. 草鱼体内肾细胞姐妹染色单体分化及交换的初步研究. 水生生物学报 **11**(1): 29—33.
- [15] Carrano, A. V., L. H. Thompson and P. A. Lindl, et al., 1978. Sister chromatid exchange as an indicator of mutagenesis. *Nature* **271**: 551—552.
- [16] Latt, S. A., 1973. Microfluorometric detection of deoxyribonucleic acid replication in human metaphase chromosomes. *Proc. Nat. Acad. U. S. A.* **70**(12): 3395—3399.
- [17] Perry, P., S. Wolf, 1974. New Giemsa method for the differential staining of sister chromatids. *Nature* **251**: 156—158.
- [18] Wolf, S., J. Bodycote and G. H. Thomas, et al., 1975. Sister chromatid exchange in Xeroderma pigmentosum cells that defective in DNA excision repair or post-replication repair. *Genetics* **81**: 349—355.

THE EFFECT OF SOME POLLUTANTS ON SCE OF GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODON IDELLUS*) CELLS

Mao Shujian and Wang Changliu

(Hangzhou University)

ABSTRACT

During Oct. 1987—Jun 1988, cell strain ZC-7901 and kidney cells *in vivo* of one-year juveniles of Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) were used as experimental material, 5 metal ions and 4 pesticides as river system environmental pollutants were applied to the cultured cells and juveniles, the chromosome samples of cultured cells and kidney cells *in vivo* were prepared, then the changes of sister chromatid exchange (SCE) were observed. The results showed:

(1) A millilitre medium contained 104×10^{-7} mg Cr^{6+} or 112×10^{-7} mg Cd^{2+} , 74.9×10^{-7} mg As^{3+} , 201×10^{-6} mg Hg^{2+} , 207×10^{-4} mg Pb^{2+} , 216×10^{-4} mg Dipterex, respectively, which could induce the SCE of cultured cells to be increased, and the breeding water contained 15×10^{-7} g Cr^{6+} or 15×10^{-7} g Cd^{2+} , 13×10^{-7} g Hg^{2+} , per litre respectively, SCE of the juveniles' kidney cells *in vivo* were also increased, while Tricyluzole, Methamidophos and Carbofunan could not.

(2) Because of the vast breeding scope of Grass carp, the materials were drawn conveniently, and the methods of detecting SCE were simple, the cultured cells and the kidney cells *in vivo* were sensitive, hence the Grass carp could be considered as the experimental materials to monitor the extent of river system pollution.

(3) Nowadays, in river, lakes, ponds and other river system of towns and countrysides, some pollutants, such as metal ions and pesticides were applied by this article, could be frequently high enough to induce SCE appearing. So it was suggested that we consider the factors of affecting SCE, while determining the standard of evaluating water quality and monitoring the environmental pollution of river system. Thus a kind of detecting system could be developed, which applied the changes of SCE of the cells *in vitro* and *in vivo* of Grass carp to monitor the water pollution.