

镉致鲫(*Carassius auratus*)外周血单个核细胞 DNA 损伤与增殖抑制*

丁磊 黄鹤忠 吴康¹⁾ 张伟明 时夕金²⁾ 周建华³⁾

(苏州大学农业科技学院 苏州 215006)

¹⁾(苏州市水产研究所 苏州 215107)

²⁾(苏州大学核医学院 苏州 215006)

提要 采用体内注射染镉的方法进行镉诱导鲫外周血单个核细胞(PBMC)DNA损伤与增殖抑制相关性的研究。将鲫(400g/尾)驯养4周后进行随机分组,每组5尾,以Cd²⁺浓度1.25、2.50和3.75mg/kg腹腔注射染镉,以生理盐水腹腔注射鲫为对照,染镉后0、3、5、7、10和14天取无菌抗凝鲫鱼血,经淋巴细胞分离液离心分离获取PBMC,用单细胞凝胶电泳法检测PBMC的DNA损伤,用³H-胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法检测PBMC的增殖。结果表明,3天时各染镉组DNA迁移度增加,5天时继续加大并于7天时达到峰值,10天和14天时呈现逐渐减小的趋势。1.25mg/kg组与对照组在不同时间放射性活度(dpm)的差异均无显著性;0天和3天时各染镉组与对照组dpm的差异均无显著性;5天时2.50和3.75mg/kg组dpm明显下降,7天和10天时dpm与5天时基本相同,14天时dpm呈上升趋势。镉诱导DNA损伤与其抑制PBMC增殖相比,作用时间短且浓度低,初步推测镉诱导的DNA损伤是镉抑制PBMC增殖的重要机制之一。

关键词 镉, 鲫, 外周血单个核细胞, DNA 损伤, 增殖抑制

中图分类号 Q789

镉是多靶效应的毒物,来自矿石、冶金、电镀和染料等行业的含镉废水可被鱼类等水生生物所吸收蓄积(刘长发等,2001;王兰等,2001)。有关研究表明,镉对鱼类具有免疫毒性(董书芸等,2001;丁磊等,2004a,b),但其毒性机制尚未十分清楚。单细胞凝胶电泳(SCGE)是近年来最流行的在单细胞水平上检测DNA损伤与修复的技术,主要用来检测环境因子对哺乳类细胞的DNA损伤(Hellman *et al.*, 1999; Pouget *et al.*, 1999; 张遵真等,2001),然而用SCGE检测鱼类细胞的DNA损伤目前国内尚未见报道。³H-胸腺嘧啶脱氧核苷(³H-TdR)掺入法主要用来检测细胞的增殖程度(朱立平等,2000)。本实验以一定的Cd²⁺浓度腹

腔注射染镉,以富含T、B、NK及单核细胞的鲫外周血单个核细胞(PBMC)为效应细胞,用SCGE和³H-TdR掺入法分析镉诱导鲫PBMC的DNA损伤与增殖抑制的相关性,以期进一步阐明镉的免疫毒性机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试鲫 鲫(*Carassius auratus*)(400g/尾)购自无污染源的苏州相城区水产养殖总场,经2% NaCl消毒后在水族箱(100cm×60cm×50cm)中驯养4周。实验时随机分配到各水族箱中,每箱5尾。实验期间日投饲率约3%,每天换水排污1次,每次换水1/2—2/3,水温23—27℃,溶氧

* 科技部农业科技成果转化基金,02EFN213200220号;江苏省科技发展资助项目,BS2002016号;苏州市科技局资助项目,SNT0405号;苏州大学校青年基金资助项目,Q3113401号。丁磊,讲师,E-mail:dinglei4444@hotmail.com

1) 通讯作者,吴康,副教授,E-mail:wukang02@sina.com

收稿日期:2003-07-31,收修修改稿日期:2004-09-28

保持在 5mg/L 以上。

1.1.2 试剂 正常熔点琼脂糖(NMA)、溴化乙锭(EB)、EDTA·Na₂、Triton X-100 和 Tris 为 Amresco 公司产品, 十二烷基肌氨酸钠为东京化成工业株式会社产品, 低熔点琼脂糖(LMA)、RPMI 1640 和 FBS 为 Gibco 公司产品, DMSO 为 E. Merck 公司产品, PHA 为 Sigma 公司产品, CdCl₂(分析纯)为上海试剂二厂产品, ³H-TdR(浓度为 3.7 × 10⁷Bq/ml, 比放射性为 1.85 × 10¹⁴Bq/mol)为中国原子能研究院产品, 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 鲫的染镉处理

按丁磊等(2002)以 0.1、0.2 和 0.3LD₅₀ 即 Cd²⁺ 浓度为 1.25、2.50 和 3.75mg/kg 腹腔注射鲫, 以生理盐水腹腔注射鲫为对照, 以染镉后 12h 为 0 天。

1.3 PBMC 的提取

分别于染镉后 0、3、5、7、10 和 14 天取无菌抗凝鲫血, PBS(0.01mol/L, pH7.2)等体积稀释后沿离心管壁滴加在淋巴细胞分离液上, 2000r/min 离心 10min, 吸取界面处的 PBMC, 1500r/min 离心洗涤 2 次后用含 10% FBS 的 RPMI 1640 稀释至 1 × 10⁶/ml, 4℃保存。每次 10 尾。

1.4 SCGE

1.4.1 胶板 取 75μl、55℃的 0.8% NMA 铺在 40℃的磨砂载玻片上, 盖上玻片后 4℃放置 10min, 移去玻片制成底层胶; 将 PBMC 与 37℃的 0.8% LMA 混匀后取 75μl 铺在底层胶上, 盖上玻片后 4℃放置 10min, 移去玻片制成中层胶; 取 75μl、37℃的 0.8% LMA 铺在中层胶上, 4℃放置 10min。

1.4.2 裂解 将胶板水平浸入含细胞裂解液(pH10, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 0.01mol/L Tris-HCl, 0.1mol/L EDTA·Na₂, 用前加 1% Triton X-100 和 10% DMSO)的平皿中, 4℃静置 3h。

1.4.3 解旋 取出胶板, 吸干裂解液后并列置于水平电泳槽中, 电泳缓冲液(0.001mol/L EDTA·Na₂, 0.3mol/L NaOH)约覆过胶板 0.25cm, 4℃放置 40min。

1.4.4 电泳 在电压 25V、电流 200mA、4℃条件下电泳 1h。

1.4.5 中和 把胶板放在含 0.4mol/L Tris-HCl(pH7.5)的平皿内中和 2 次, 每次 15min。吸去 Tris-HCl, 用滤纸将平皿内液体吸干, 缓缓加入无

水乙醇将胶板浸埋 1h, 吸去乙醇, 室温下过夜。

1.4.6 染色 每块胶板加 50μl 的 0.03mg/ml EB, 盖上玻片后染色 20min。

1.4.7 阅片 在荧光显微镜(Olympus BX-60)下可看到核 DNA 和迁移的 DNA, 每尾鲫随机测定 30 个淋巴细胞。以迁移度为评价 DNA 损伤的指标, 迁移度 = $\Sigma(\text{迁移的 DNA 长度} - \text{核 DNA 直径}) / 30$ 。

1.5 ³H-TdR 掺入法

将 PBMC 以每孔 0.1ml 接种于 96 孔细胞培养板, 加 0.1ml PHA 致终浓度为 0.1mg/ml, 于 27℃在 5% CO₂ 培养箱(Heraeus 公司)中培养 60h, 加 0.02ml ³H-TdR 至终浓度为 1.85 × 10⁵Bq/ml, 培养 12h 后收集细胞于 49 型玻璃纤维滤纸, 依次用 PBS、5% 三氯醋酸和无水乙醇洗涤细胞各 3 次, 将滤纸烘干后浸入有 3ml 闪烁液(含 0.05% POPOP 和 0.5% PPO 的二甲苯溶液)的测定瓶中, 2h 后置 LS-6800 液闪仪(Beckman 公司)中测其放射性活度(dpm)。每尾鱼的 dpm 做 3 次重复, 以其平均值表示之。

1.6 数据分析

用单因素方差分析不同 Cd²⁺ 浓度间 dpm 以及 DNA 迁移度的差异, 以 P < 0.05 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 鲫 PBMC 的 SCGE 检测

2.1.1 SCGE 图象 不同浓度注射染镉 7 天后的鲫 PBMC 的 SCGE 图象如图 1 所示。对照组鲫 PBMC 的 DNA 未损伤, 在电场中核 DNA 几乎不泳动, 染色后呈圆形的荧光团, 无拖尾现象; 染镉组鲫 PBMC 的 DNA 受损, 染色后呈一个亮的头部和尾部, DNA 受损越严重, 尾部就越长, 甚至核骨架也丧失。由图 1 可知, 镉对鲫 PBMC 的 DNA 有损伤作用且呈剂量效应。

2.1.2 DNA 迁移度 染镉后鲫 PBMC 的 DNA 迁移度如图 2 所示。由图 2 可知, 3—14 天期间各染镉组 DNA 迁移度与对照组的差异均有显著性且呈剂量效应(P < 0.05), 表明镉能诱导鲫 PBMC 的 DNA 损伤; 3 天时差异较小, 5 天时差异增大, 7 天时差异达到高峰, 10 天和 14 天时差异呈现逐渐缩小的趋势, 表明染镉 7 天后已出现损伤 DNA 的修复合成。

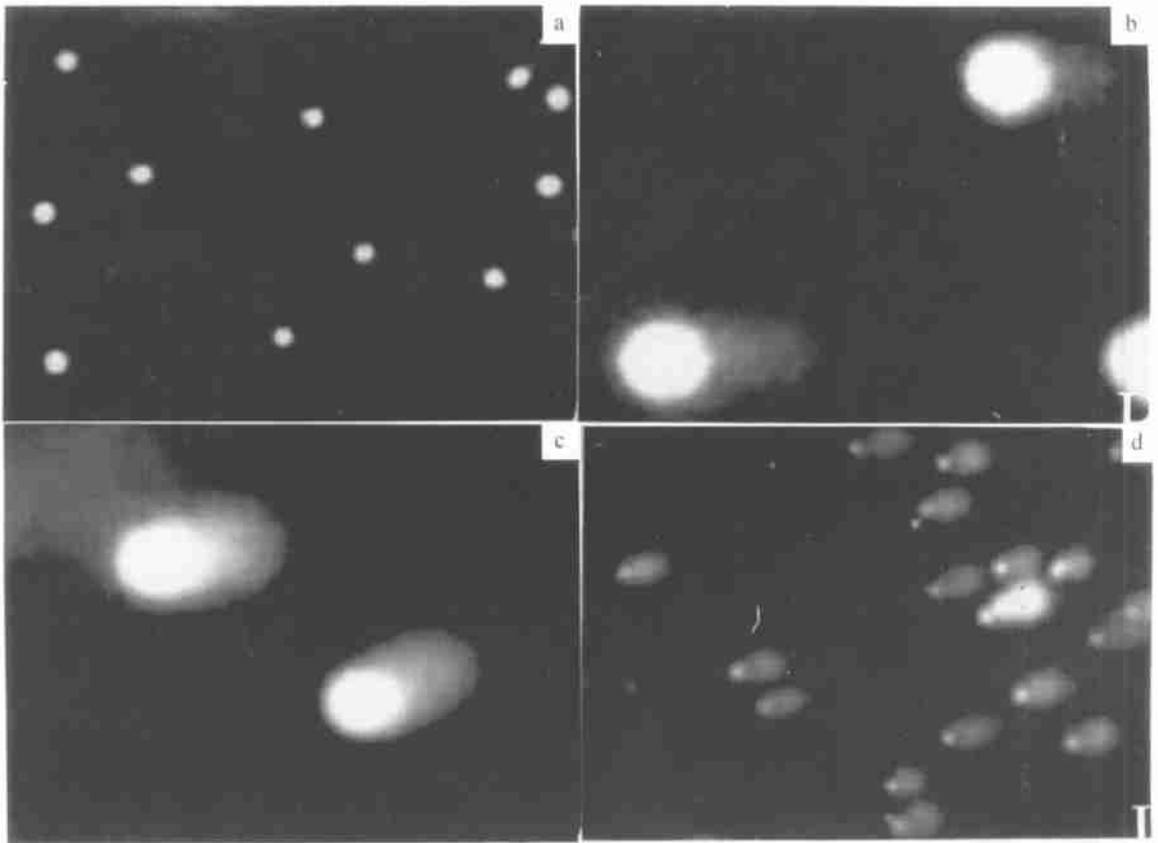


图 1 染镉 7 天后鲫 PBMC 的 SCGE 图象

Fig. 1 SCGE image of PBMC of *C. auratus* in Cd^{2+} at 7 days

a 对照(100×); b. 1.25mg/kg 组(400×); c. 2.50mg/kg 组(400×); d. 3.75mg/kg 组(100×)

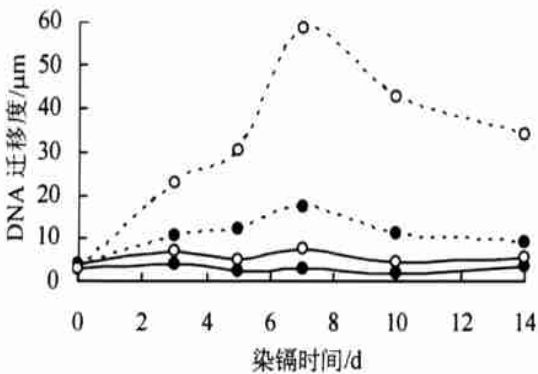


图 2 染镉后鲫 PBMC 的 DNA 迁移度

Fig 2 DNA migration of PBMC of *C. auratus* in Cd^{2+} dose and times

—●— 对照; —○— 1.25mg/kg; ...●... 2.50mg/kg;
...○... 3.75mg/kg

2.2 鲫 PBMC 增殖的³H-TdR 掺入法检测

染镉后鲫 PBMC 的 *dpm* 如图 3 所示。由图 3 可知, 1.25mg/kg 组与对照组在实验期间 *dpm* 的差异均无显著性 ($P < 0.05$), 即该染镉组对鲫

PBMC 的 *dpm* 影响不大; 0 天和 3 天时各染镉组与对照组 *dpm* 的差异均无显著性 ($P < 0.05$), 即该时段对鲫 PBMC 的 *dpm* 影响不大; 5 天时 2.50 及 3.75mg/kg 组与对照组 *dpm* 的差异有显著性且呈

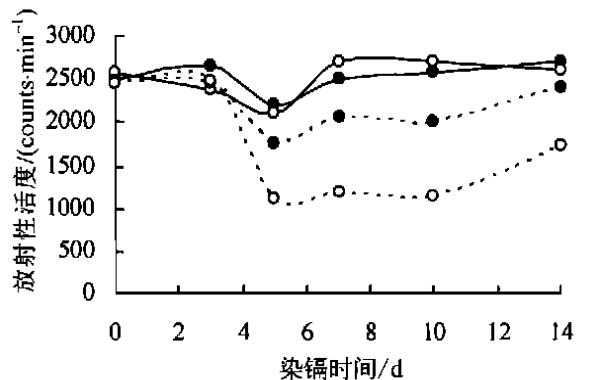


图 3 染镉后鲫 PBMC 的 *dpm*

Fig 3 The *dpm* of PBMC of *C. auratus* in Cd^{2+} dose and times

—●— 对照; —○— 1.25mg/kg; ...●... 2.50mg/kg;
...○... 3.75mg/kg

剂量效应($P < 0.05$), 7天和10天时 dpm 变化情况与5天时基本相同, 即该期间 2.50及 3.75mg/kg 组对鲫 PBMC 的 dpm 有影响且随着 Cd^{2+} 浓度提高而愈发严重; 14天时除了 3.75mg/kg 组外, 其余组 dpm 的差异已无显著性($P < 0.05$), 并且 3.75mg/kg 组与其余组 dpm 的差异也呈现缩小的趋势, 这均表明 14天时染镉组 dpm 已开始上升。

3 讨论

DNA 为紧密的四级超螺旋结构, 部分 DNA 的单链断裂, 其断片不易释放, 只有 DNA 解链后才会释放出来。在 SCGE 中, 包埋在琼脂凝胶中的细胞在细胞裂解液作用下, 细胞膜、核膜及其他膜结构受到破坏, 细胞内的蛋白质、RNA 及其他成分均可进入凝胶而扩散到裂解液中, 而核 DNA 相对分子质量很大只能留在原位, 在碱性电泳液作用下 DNA 双链解螺旋且碱变性为单链。如果 DNA 未损伤, 在电场中核 DNA 几乎不泳动, 染色后呈圆形的荧光团, 无拖尾现象; 一旦 DNA 受损, 则 DNA 断片因相对分子质量较小, 在电场中离开核 DNA 向阳极迁移, 染色后呈一个亮的头部和尾部。DNA 受损越严重, 产生的断片就越多且断片越小, 在电场中迁移量就越多, 迁移度也越长。因此 SCGE 可定量检测单个细胞的 DNA 损伤和修复。

3H -TdR 是 DNA 合成的特异性前体 TdR 的同源标记物, 因此 3H -TdR 掺入率代表了细胞 DNA 的合成水平, 即细胞增殖过程中细胞代谢的旺盛程度。 dpm 低表明 DNA 合成降低, 细胞增殖受到抑制, 反之则增高。

本实验表明, 3天时各染镉组 DNA 已受损且呈剂量效应, 5天时损伤加重, 而染镉组 dpm 在3天时变化不大, 至5天时才降低, 且 1.25mg/kg 组与对照组 dpm 的差异无显著性, 故镉诱导 DNA 损伤与其抑制 PBMC 增殖相比, 效应快且灵敏度高, 其原因可能是正常的 S 期 DNA 合成抑制存在滞后效应; 7天时 DNA 迁移度最大, 由于滞后效应, dpm 低点应出现在 10天左右, 但实际上 5、7 和 10天的 dpm 变化不大, 推测 5天的 DNA 已开始修复合成, 但修复不完全, 处于 DNA 合成抑制与损伤 DNA 修复合成的动态平衡期, 但修复不完全的 DNA 仍可出现迁移, 因而 DNA 迁移度峰值在 7天而不是 5天; 随着 DNA 损伤修复的推移, DNA 合成抑制趋于解除, 14天时可见 DNA 迁移度缩小, dpm 上升。

镉诱导 DNA 损伤的机理与镉是较强的脂质过氧化诱导剂(Kamaker *et al.*, 1999; Patra *et al.*, 1999; Yüin *et al.*, 1999) 有关。脂质过氧化损伤可引起 DNA 单链损伤(Hassoun *et al.*, 1996), 其终产物丙二醛(MDA) 可与 DNA 形成 DNA 加合物, 进一步引起突变和癌变(Leuratti *et al.*, 1998), 同时脂质过氧化过程产生多种活性自由基(Cheng *et al.*, 1992), 而活性自由基代谢异常会导致 DNA 损伤(Dix *et al.*, 1996)。

杨丰等(1996)用 2.0mg/kg $CdCl_2$ 诱导褐菖蒲, 6天后在肝提取液中获得 450 μ g/ml 的金属硫蛋白(MT), 比其基础表达量高出 20 倍。MT 是一类富含巯基的低分子内源性应激蛋白, 具有调节重金属离子代谢、清除自由基、抗脂质过氧化和参与细胞生长调节等功能, 是迄今体内最强的羟自由基清除剂(Ravindra *et al.*, 2000; Vasak *et al.*, 2000; Hirst *et al.*, 2000), 因此能保护 DNA 免受氧化损伤。本实验中鲫 PBMC 的 DNA 损伤修复从 5天开始亦可能与 MT 有关。

细胞周期与各种细胞因子密切相关, 其中 p53 蛋白是目前已知的最重要的转录调控因子(Tomomi *et al.*, 2001; Gad *et al.*, 2002)。DNA 损伤时 p53 被激活, 表现为对细胞周期的负调控, 即把细胞滞留在 G_1 期或 G_1/M 期, 使细胞得以修复 DNA 损伤的机会; 如果细胞不能成功修复 DNA 损伤, p53 则诱导细胞凋亡。本实验的结果可能是由于镉诱导了鲫 PBMC 的 DNA 损伤, 从而激活了 p53, 使 PBMC 不能进入 DNA 合成 S 期或有丝分裂而出现增殖抑制。由此推测镉诱导的 DNA 损伤是镉抑制 PBMC 增殖的重要机制之一。

致谢 本院 2003 届毕业生王得强、王刚、刘长飞和 03 级研究生孙菊燕参加了本项目的研究, 谨致谢忱。

参 考 文 献

- 丁 磊, 蔡春芳, 吴 萍等, 2002. 镉对鲫血红蛋白的影响. 水利渔业, 22(3): 10—11 [Ding L, Cai C F, Wu P *et al.*, 2002. Effects of cadmium on the hemoglobin contents in the russian carp *Carassius auratus*. Reservoir Fisheries, 22(3): 10—11]
- 丁 磊, 黄鹤忠, 吴 康等, 2004a. 镉对鲫非特异性免疫力的影响. 农业环境科学学报, 23(1): 64—66 [Ding L, Huang H Z, Wu K *et al.*, 2004a. Effects of $CdCl_2$ on

- non-specific immunity activity of *Carassius auratus*. Journal of Agro-Environment Science, 23(1): 64—66]
- 丁 磊, 吴 萍, 蔡春芳等, 2004b. 镉对鲫鱼血清溶菌酶和过氧化物酶的影响. 农业环境科学学报, 23(2): 243—245 [Ding L, Wu P, Cai C F *et al*, 2004b. Effects of CdCl₂ on lysozyme and peroxidase activities of *Carassius auratus*. Journal of Agro-Environment Science, 23(2): 243—245]
- 王 兰, 杨秀清, 王 茜等, 2001. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响. 动物学报, 47(专刊): 96—100 [Wang L, Yang X Q, Wang Q *et al*, 2001. The accumulation of Cd²⁺ and the effect on EST in five tissues and organs of *Eriocheir sinensis*. Acta Zoologica Sinica, 47(special): 96—100]
- 刘长发, 陶 澍, 龙爱民, 2001. 金鱼对铅和镉的吸收蓄积. 水生生物学报, 25(4): 344—349 [Liu C F, Tao S, Long A M, 2001. Accumulations of lead and cadmium in goldfish, *Carassius auratus*. Acta Hydrobiologica Sinica, 25(4): 344—349]
- 朱立平, 陈学清主编, 2000. 免疫学常用实验方法. 北京: 人民军医出版社, 120—187
- 杨 丰, 陈荣忠, 徐 洵, 1996. 褐鳇 (*Sebastiscus marmoratus*) 金属硫蛋白的分离提纯及免疫测定. 环境科学学报, 16(4): 469—474 [Yang F, Chen R Z, Xu X, 1996. Purification and enzyme-linked immunosorbent assay for red scomponifish (*Sebastiscus marmoratus*) metallothionein. Acta Scientiae Circumstantiae, 16(4): 469—474]
- 张遵真, 衡正昌, 廖 艳等, 2001. 彗星试验检测间接诱变剂对小鼠睾丸细胞的 DNA 损伤. 癌变·畸变·突变, 13(1): 4—7 [Zhang Z Z, Heng Z C, Liao Y *et al*, 2001. Study on DNA damage induced by indirect mutagens using comet assay in testicular cells in vitro. Carcinogenesis Teratogenesis and Mutagenesis, 13(1): 4—7]
- 董书芸, 胡前胜, 余贵英等, 2001. 水环境镉对鲫鱼免疫毒性的研究. 中国公共卫生, 17(3): 226—228 [Dong S Y, Hu Q S, Yu G Y *et al*, 2001. Studies on cadmium induced immunotoxicity to *Carassius auratus*. China Public Health, 17(3): 226—228]
- Cheng K C, Cajill D S, Kasai H *et al*, 1992. 8-Hydroxyguanine, an abundant form of oxidative DNA damage, causes G-T and A-C substitutions. J Biol Chem, 267(39): 166—171
- Dix T A, Hess K M, Medina M A *et al*, 1996. Mechanism of site-selective DNA nicking by the hydrodioxyyl (perhydroxyl) radical. Biochemistry, 35: 4578—4585
- Gad A, Joseph L, Leo S *et al*, 2002. MDM-2 and ubiquitin-independent p53 proteasomal degradation regulated by NQO1. PNAS, 99(20): 13125—13130
- Hassoun E A, Stohs S J, 1996. Cadmium-induced production of superoxide anion and nitric oxide, DNA single strand breaks and lactate dehydrogenase leakage in J774A. 1 cell culture. Toxicology, 112(3): 219—226
- Hellman B, Friis L, Vaghef H, 1999. Alkaline single cell gel electrophoresis and human biomonitoring for genotoxicity: a study on subjects with residential exposure to radon. Mutat Res, 442(2): 121—132
- Hirst S J, Walker T R, Chilvers E R, 2000. Phenotypic diversity and molecular mechanisms of airway smooth muscle proliferation in asthma. Eur Respir J, 16(1): 159—177
- Kamaker R, Roy S, Chatterjee M, 1999. The effects of cadmium on the hepatic and renal levels of reduced glutathione, the activity of glutathione S-transferase and gamma glutamyl transpeptidase. J Environ Pathol Oncol, 18(1): 29—35
- Leuratti C, Singh R, Lagneau C *et al*, 1998. Determination of malondialdehyde-induced DNA damage in human tissues using an immunoslot blot assay. Carcinogenesis, 19(11): 1919—1924
- Patra R C, Swarup D, Senapati S K, 1999. Effects of cadmium on lipid peroxides and superoxide dismutase in hepatic, renal and testicular tissue of rats. Vet Hum Toxicol, 41(2): 65—67
- Pouget J P, Douki T, Richard M J *et al*, 1999. Use of the alkaline comet assay to monitor DNA damage in technicians exposed to low dose radon. Occup Environ Med, 41(8): 693—698
- Ravindra N, Dinender K, Timao Li *et al*, 2000. Metallothioneins, oxidative stress and the cardiovascular. Toxicology, 155: 17—26
- Tomomi I, Rory K G, Zhong K Y *et al*, 2001. Downregulation of MDM2 stabilizes p53 by inhibiting p53 ubiquitination in response to specific alkylating agents. FEBS Letters, 490(2001): 196—201
- Vasak M, Hasler D W, 2000. Metallothionein: new functional and structural insights. Cur Opin Chem Bio, 4: 177—183
- Yiin S J, Chem C L, Sheu J Y, 1999. Cadmium induced renal lipid peroxidation in rats and protection by selenium. J Toxicol Environ Health, 57(6): 403—413

CADMIUM INDUCED DNA DAMAGE IN PERIPHERAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS AND PROLIFERATION SUPPRESSION IN RUSSIAN CARP *CARASSIUS AURATUS*

DING Lei, HUANG He-Zhong, WU Kang, ZHANG Wei-Ming,

SHI Xi-Jin, ZHOU Jian-Hua

(College of Agricultural Science and Technology, Suzhou University, Suzhou, 215006)

(Suzhou Fisheries Institute, Suzhou, 215107)

(College of Nuclear Medicine, Suzhou University, Suzhou, 215006)

Abstract In the paper, the author studied for the first time the cadmium-induced damage to peripheral blood mononuclear cells (PBMC) of Russian carp *Carassius auratus*. The correlation of DNA damage with proliferation suppression in these damage cells was also studied. The test fish were intraperitoneally injected with Cd^{2+} at 1.25, 2.50, 3.75mg/kg to three groups individually, and the control is Cd^{2+} free. After injection at the 1st, 3rd, 5th, 7th, and 14th day, the PBMC were analyzed by single cell gel electrophoresis (SCGE) with 3H -TdR incorporated. For the SCGE analysis, $10\mu l$ of cells have been mixed with $75\mu l$ of 0.8% low-melting agarose and incubated at $37^\circ C$. These samples were layered on pre-coated slide of 0.8% normal agarose gel, and chilled for 10min at $4^\circ C$, and then covered with a layer of normal agarose gel. After they have been immersed in prechilled lysis solution for 3h to remove cellular proteins, above slides were placed in a horizontal electrophoresis unit and incubated in fresh alkaline electrophoresis buffer for 40min to unwind DNA. Before the samples were electrophoresed at 25V (200mA) for 1h, all the above procedures were conducted at $4^\circ C$ in the dark to minimize possible DNA damage from outer sources. Following electrophoresis, the slides were immersed in neutralization buffer, gently washed twice for 15min at $4^\circ C$ to remove alkalis and detergents, and then dehydrated with 100% C_2H_5OH for 1h. EB was added to each slide to stain the DNA, then covered with a slip and kept in the dark in an air-tight moist container before being investigated. DNA migration was measured under an Olympus BX-60 microscope with scaled ocular using fluorescent beam source. When light-colored patches, resembling the tail of a comet in pattern, spread out from the cell, migrations were measured by the "tail" length (μm) in the mean of three slides of each fish from 30 randomly selected cells of each slide. Using 3H -TdR incorporation analysis, after have been seeded on 96-well plates (1×10^5 /well), the PBMC were added with 0.1ml PHA to final concentration of 0.1mg/ml, and cultured for additional 60h at $27^\circ C$ and 5% CO_2 in air, before being added with 0.02ml 3H -TdR to final concentration of $1.85 \times 10^5 Bq/ml$. After 12h incubation, the cells were harvested onto 49# glass fiber filters, washed three times in turn by PBS, 5% $C_2HCl_3O_2$ and 100% C_2H_5OH respectively. The 3H -TdR incorporation of the cells was measured by LS-6800 liquid scintillation spectroscopy and recorded in *dpm*. The results are expressed in mean of triplicated cultures from each fish. It was shown that the distance of DNA migration increased at all doses at 3d, and further at 5d, peaked at 7d, then it gradually decreases at 10 and 14d. The values in *dpm* insignificantly changed all the times in 1.25mg/kg and control groups ($P < 0.05$), and has no large differences in all test groups at 0 and 3d. While the value rapidly dropped at 5d, then stayed between 5—10d, and finally increased at 14d in 2.50, 3.75mg/kg. With cadmium induction, the DNA damage had shorter effecting time and lower Cd^{2+} concentration than those of the suppression on PBMC. The above results indicated that cadmium could result in DNA damage *in vivo*, which is probably an important mechanism of the suppression on PBMC proliferation.

Key words Cadmium, *Carassius auratus*, Peripheral blood mononuclear cells, DNA damage, Proliferation suppression