

镉胁迫对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)血清转铁蛋白和血红细胞的影响*

朱爱意 谢佳彦

(浙江海洋学院海洋科学与技术学院 舟山 316004)

提要 采用人工染毒的方法,进行了镉污染暴露对大弹涂鱼血清转铁蛋白(STF)铁结合能力和血红细胞影响的研究。结果表明,自染毒第 7 天开始,血清铁浓度,血清铁饱和度稳定上升并与对照组比较有统计学上的极其显著性差异,且对镉敏感。而转铁蛋白的总铁结合力和不饱和铁结合力则无稳定的趋势。血红蛋白的 A 值与血细胞浓度均呈稳定下降趋势,并于染毒 11 天后开始出现显著性降低。揭示镉胁迫引起的大弹涂鱼机体损伤与它对动物机体的铁代谢影响紧密相关。大弹涂鱼血清的铁饱和度、血清铁浓度、血红细胞的吸光度和浓度可以作为长期海洋污染暴露的生物标记,其中血清的铁饱和度可靠度最高,而血红细胞的吸光度和浓度的测定最为简便。推测,其他鱼类在镉胁迫下也应当有相似的血液生理变化,在明确健康对照的相关指标变化范围后,可以便利地监控环境中的重金属污染。

关键词 镉,大弹涂鱼,转铁蛋白,血红细胞,生物标记

中图分类号 R994.6

重金属镉对海洋环境的污染近几年来逐渐有所增加(贺广凯,1996),并在生物体内具有很强的蓄积性(杨居荣等,1999)。大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)为沿海滩涂两栖性鱼类,多项生理指标对环境污染敏感(冯涛等,2001;黄福勇等,2004;张春丹等,2006;刘伟成等,2006)。

转铁蛋白(transferrins, TF)最初在脊椎动物的血浆和分泌液如牛奶和蛋白中被发现,根据氨基酸序列、功能和蛋白定位的差异,目前转铁蛋白家族成员主要包括血清转铁蛋白(serum transferrin, STF)、乳铁蛋白(Lactoferrin, LTF)、卵转铁蛋白(Ovotransferrin, OVT)和膜相关的色素转铁蛋白(membrane-associated melanotransferrin)等四类。其中 STF 主要存在哺乳动物的血液中,它能结合血液中的铁离子(Fe^{3+}),并通过转铁蛋白受体(Transferrin receptor, TFR)运输到红细胞供合

成血红蛋白用,是主要的铁调节转运分子(Aisen, 1998)。近年来的研究还发现,STF 还能对抗 FSH 诱导卵泡颗粒细胞的成熟,同时还具有抗氧化和抗菌作用(龙华等,2001),还可能与动物神经系统的发育(Zerpa *et al*, 2000)、Alzheimer's 和 Parkinson's 症的发生有关(Loeffler *et al*, 1995; Hussain *et al*, 2002)。血液中的红细胞(RBC)和血红蛋白(Hb)主要与动物的呼吸作用有关。外周血中单位容积内血红蛋白浓度(Hb)和细胞计数是判断贫血的两项重要的指标,红细胞和血红蛋白作为两项重要的生理指标,可用于检测各种不良环境因子对动物的压力作用(南旭阳,2002;张甫英等,1997)。

本试验中作者研究了镉污染暴露对大弹涂鱼 STF 铁结合能力和血红细胞的影响,以期对转铁蛋白的抗氧化机理以及镉毒理学研究提供基础资料。同时还探讨了相关指标作为环境镉污染生

* 浙江省重大国际科技合作项目,2006C14017 号,课题题目:中国舟山渔场主要适养鱼类种质资源与遗传改良技术的研究。朱爱意,高级实验师, E-mail: zay008@163.com

收稿日期:2006-09-29, 收修改稿日期:2007-01-27

物标记的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料 野生大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)采自浙江镇海沿海, 体长12—15cm, 体重15—24g。在实验室水族箱(玻璃缸)中暂养10天后, 选取活泼、无病、表皮无损伤的个体进行染毒试验。

1.1.2 实验仪器与试剂 实验仪器主要包括台式高速冷冻离心机(SORVALL公司)、SmartSpec3000紫外分光光度计(Bio-Rad公司)和722型光栅分光光度计(南京第四分析仪器有限公司)等; 血清铁试剂盒及总铁结合能力试剂盒购自中国科学院生物物理研究所中生公司; 氰化高铁血红蛋白试剂购自南京建成生物工程研究所; 其他药品试剂均为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 染毒 用经充分曝气的自来水配制盐度为17.65—18.30的试验用水。镉处理组设置0.05、0.5和5mg/L 3个不同的浓度组(参考国家渔业水质标准中所规定的镉离子浓度为0.005mg/L, 3个浓度组分别为标准浓度的10倍、100倍和1000倍), 同时设置一个无镉对照组。试验用塑料箱规格为60cm×40cm×40cm, 每组一个箱子, 装水4L, 放45条大弹涂鱼。每天更换相同Cd²⁺浓度的试验用水, 水温为(20±1)℃, pH为7.73左右。试验期间每天投喂藻类。

1.2.2 血清样品制备 一次性注射器、针头和离心管等用肝素钠(1000IU/ml)及柠檬酸钠溶液(3%)冲洗。用2ml注射器从鱼体尾静脉取血0.5—1ml, 4℃静置数小时, 低速离心后吸取上层血清, -30℃冰箱过夜, 次日血清解冻后再次低速度离心, 吸取上层液体保存于-20℃备用。

1.2.3 血清铁浓度及铁饱和度的测定 用血清铁试剂盒及总铁结合能力试剂盒测定鱼体血清铁浓度(μg/dl)、未饱和铁结合力(μg/dl)、总铁结合力(Total iron binding capacity, TIBC)(μg/dl)和铁饱和度(%)。样品的前处理、试剂的配制、测定及计算均按说明书进行, 操作过程严格防止所用器皿和试剂被铁污染。采用SmartSpec3000紫外分光光度计测试, 波长为540nm。

1.2.4 红细胞的吸光度(A值)测定及血细胞数测定 每次每组随机取6尾大弹涂鱼, 用2ml注射器从鱼体尾静脉取血0.5—1ml。用氰化高铁血

红蛋白试剂测定红细胞的吸光度(A值), 采用SmartSpec3000紫外分光光度计测试, 波长540nm。血红蛋白克数/升=测得的吸光度值×367.7。新鲜血液5μl用Hanks缓冲液稀释200倍, 40倍显微镜下用血球计数板计数, 将5个中方格内数得的红细胞总数乘以10000, 即得每mm³血内红细胞总数。

1.3 数据处理与分析

用SPSS软件(13.0 for Windows)进行数据统计分析, 用Student-Newman-Keuls检验进行组间差异比较。表1—表4中数值均用平均值±标准方差(Mean±SD)表示, 用单因素方差分析方法分析镉所引起的处理和对照间的差异。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫对大弹涂鱼血清转铁蛋白的影响

2.1.1 血清铁浓度 由表1数据可以看出, 染毒24h时, 3个镉浓度处理组的大弹涂鱼血清铁浓度均大幅度上升, 极显著区别于对照组。3天时, 0.05mg/L镉浓度组的血清铁浓度与对照组比较, 有显著差异; 0.5mg/L以及5mg/L镉浓度组血清铁浓度与对照组比较, 仍有极显著差异。7天时, 0.05mg/L和0.5mg/L镉浓度组血液血清与对照组比较无显著差异, 而5mg/L镉浓度组血清铁浓度与对照组仍有极显著差异, 表现为下调。11天时, 镉处理组血清铁浓度与对照组均有极显著差异, 血清铁浓度显著升高。

2.1.2 血清总铁结合力 由表2数据可以看出, 染毒24h时, 镉处理组血清总铁结合力均显著上升, 与对照组有极显著差异。3天时, 镉处理组血清总铁结合力数值基本与24h时相似, 仅有微小的波动, 可视为测量的误差及个体间差异引起的。7天后, 镉处理组血清总铁结合力与对照组无显著差异。对照组血清总铁结合力也明显升高, 可能是由于大弹涂鱼在实验室里饲养所致。

2.1.3 血清不饱和铁结合力 由表3数据可以看出, 染毒24h时, 0.5mg/L和0.05mg/L镉浓度组血清不饱和铁结合力明显高于对照组, 3天时数值继续升高, 与对照组有极显著差异。7天时, 0.05mg/L镉浓度组血清不饱和铁浓度明显低于对照组, 差异显著。11天时, 所有镉浓度组血清不饱和铁浓度均明显低于对照组。至于对照组大弹涂鱼不饱和铁浓度的显著升高, 应是饲养在实验室所致。

2.1.4 血清铁饱和度 由表4数据可以看出,

表 1 不同镉浓度下大弹涂鱼血清铁浓度 ($\mu\text{mol/L}$)

时间	对照	0.05mg/L	0.5mg/L	5mg/L
24h	3.799 \pm 0.240	6.827 \pm 2.034**	6.179 \pm 1.691**	7.403 \pm 1.643**
3d	3.743 \pm 0.280	5.540 \pm 2.523*	4.563 \pm 1.965**	4.462 \pm 1.630**
7d	5.444 \pm 0.118	5.6500 \pm 1.547	5.429 \pm 0.961	3.326 \pm 0.484**
11d	5.452 \pm 0.118	13.786 \pm 1.405**	10.523 \pm 2.539**	8.669 \pm 1.688**

* 表示处理组和对照组间差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示差异极显著 ($P < 0.01$), $n=6$, 测定数值以平均值 \pm 标准方差表示, 下同

表 2 不同镉浓度下大弹涂鱼血清总铁结合力 ($\mu\text{mol/L}$)

时间	对照	0.05mg/L	0.5mg/L	5mg/L
24h	14.617 \pm 0.420	18.289 \pm 2.567**	20.381 \pm 2.941**	21.751 \pm 1.948**
3d	14.532 \pm 0.460	17.589 \pm 2.737*	20.534 \pm 3.096**	21.202 \pm 1.574**
7d	21.671 \pm 1.433	17.579 \pm 4.545	22.214 \pm 3.974	18.530 \pm 3.175
11d	21.681 \pm 1.433	23.449 \pm 2.783	23.476 \pm 2.571	20.586 \pm 2.744

表 3 不同镉浓度下大弹涂鱼血清不饱和铁结合力 ($\mu\text{mol/L}$)

时间	对照	0.05mg/L	0.5mg/L	5mg/L
24h	10.819 \pm 0.180	11.613 \pm 3.948	14.203 \pm 2.355*	14.349 \pm 2.262*
3d	10.789 \pm 0.519	12.037 \pm 4.357	16.222 \pm 3.175**	16.740 \pm 2.220**
7d	16.227 \pm 1.550	9.567 \pm 4.280**	16.786 \pm 4.301	15.204 \pm 3.170
11d	16.235 \pm 1.550	10.837 \pm 3.159**	12.953 \pm 2.714*	11.917 \pm 3.845*

染毒 24h 时, 0.05mg/L 镉浓度组血清铁饱和度明显高于对照组, 而其他浓度组没显著变化。7 天时, 0.05mg/L 镉浓度组血清铁饱和度显著高于对照组。11 天时, 所有镉浓度组血清铁饱和度均极显著高于对照组, 特别是 0.05mg/L 镉浓度组高出对照组 1 倍以上。

2.2 镉胁迫对大弹涂鱼血红细胞的影响

2.2.1 血红细胞的 A 值 由表 5 数据可以看出, 染毒 5 天内, 镉处理组和对照组的血红细胞 A 值无显著差异。7 天时, 0.05mg/L 镉处理组大弹涂鱼血红细胞 A 值极显著(或显著)高于对照组, 此后直到试验结束一直极显著(或显著)高于对照组; 7 天时, 0.5mg/L 镉处理组组的血红细胞 A 值极显著高于对照组, 此后下降, 11 天时极显著低于对照组; 9 天和 11 天时, 5mg/L 镉处理组的大弹涂鱼的血红细胞的 A 值均极显著低于对照组。

2.2.2 血红细胞的数量 表 6 数据可以看出, 在染毒 9 天时, 0.05mg/L 镉浓度组血红细胞开始与对照组有极显著差异, 表现为极显著增加, 11 天仍是如此。而 0.5mg/L 和 5mg/L 组直到 11 天才开始与对照组有极显著差异, 表现为极显著减少。

3 讨论

3.1 镉胁迫对血清转铁蛋白的影响

血液中血清铁含量和转铁蛋白含量是反映动物体铁代谢状况的重要指标。血清铁含量是动物体铁状况的直接反映, 而血清转铁蛋白作为一种重要的功能性铁结合蛋白, 直接参与体内铁的转运和代谢, 动物血清转铁蛋白含量与铁含量存在着近似平行的关系, 二者呈显著的正相关。与代谢必需的铁不同, 镉对细胞有毒害作用, 它通过破坏线粒体功能 (Koizumi *et al*, 1994) 影响许多生命活动必需金属离子, 如铁、铜和锌的转运和代谢过程 (Chang, 1992), 也能降低机体内多种酶的活性, 尤其是含锌、含巯基的抗氧化酶, 通过与巯基结合或通过竞争或非竞争性替代作用, 置换出金属辅基, 从而降低机体抗氧化酶的活性 (刁书永等, 2005)。罗非鱼的急性镉中毒试验表明, 镉胁迫降低了血红蛋白的携氧能力, 虽然镉胁迫组罗非鱼通过代偿性增加红细胞数量增加了血液氧分压, 但是镉胁迫组的氧分压始终低于对照组 (Wu *et al*, 2006)。

本文研究结果表明, 镉胁迫引起的机体损伤

表 4 不同镉浓度下大弹涂鱼血清铁饱和度(%)

Tab.4 Serum iron saturation (%) of *B. pectinirostris* treated with different Cd concentrations

时 间	对 照	0.05mg/L	0.5mg/L	5mg/L
24h	25.964 ± 0.919	38.302 ± 13.704*	30.222 ± 6.227	34.132 ± 7.139
3d	25.777 ± 2.043	32.791 ± 15.200	21.014 ± 9.401	21.126 ± 7.563
7d	25.249 ± 2.251	39.003 ± 11.596**	25.308 ± 6.615	17.524 ± 5.020
11d	25.700 ± 1.830	60.922 ± 10.893**	44.869 ± 10.500**	43.390 ± 12.797**

表 5 不同镉浓度下大弹涂鱼血红细胞的吸光度(A 值)

Tab.5 Erythrocytes absorbency (Value A) of *B. pectinirostris* treated with different Cd concentrations

时 间	对 照	0.05mg/L	0.5mg/L	5mg/L
24h	0.218 ± 0.012	0.227 ± 0.038	0.188 ± 0.016	0.200 ± 0.012
5d	0.174 ± 0.010	0.200 ± 0.015	0.196 ± 0.034	0.145 ± 0.021
7d	0.180 ± 0.016	0.206 ± 0.012**	0.234 ± 0.010**	0.167 ± 0.006
9d	0.167 ± 0.004	0.189 ± 0.028*	0.160 ± 0.003	0.097 ± 0.001**
11d	0.136 ± 0.008	0.158 ± 0.016**	0.071 ± 0.002**	0.084 ± 0.005**

表 6 不同镉浓度下血红细胞计数($N \times 10000$, ind/ml)Tab.6 Erythrocyte numbers ($N \times 10000$, ind/ml) of *B. pectinirostris* treated with different Cd concentrations

时 间	对 照	0.05mg/L	0.5mg/L	5mg/L
24h	104.375 ± 6.263	101.625 ± 21.830	120.625 ± 15.918	94.875 ± 14.631
5d	103.625 ± 6.369	96.875 ± 12.996	101.125 ± 13.653	88.500 ± 14.183
7d	108.125 ± 16.224	86.125 ± 24.760	107.125 ± 16.943	92.125 ± 3.065
9d	73.750 ± 8.271	98.250 ± 9.385**	82.000 ± 12.668	62.875 ± 6.663
11d	65.750 ± 3.862	85.875 ± 11.048**	32.500 ± 12.062**	43.375 ± 2.359**

与它对动物机体的铁代谢影响也紧密相关。镉胁迫初期, 血红细胞携氧能力显著下降, 导致血液氧分压显著下降, 机体需要大量合成血红蛋白, 这个过程需要大量的 Fe^{2+} , 因此机体储备的铁大量释放并被 STF 结合, 导致镉胁迫 24h 后, 大弹涂鱼的血清铁浓度显著升高, 这个过程中机体肝脏可能还应激性的增加了转铁蛋白的合成, 这可以解释 24h 时镉处理组的 TIBC 显著高于对照组。此后实验组动物的血清铁浓度下降, 可能是由于转铁蛋白结合的 Fe^{3+} 代谢生成 Fe^{2+} , 并用于合成血红蛋白后, 血清转铁蛋白结合铁数量降低。到 11 天时, 实验组动物的血清铁浓度又极速升高, 并极显著高于对照组。

血清 TF 存在 3 种不同的形式: 双铁 TF、单铁 TF 和 apoTF。血清铁饱和度的升高意味着单铁 TF 数量的减少。例如, 15% 的血清铁饱和度表明双铁 TF: 单铁 TF 比率为 1:5, 而 30% 的血清铁饱和度表明比率为 1:2。11 天时, 镉处理组大弹涂鱼的血清铁饱和度均显著增加, 揭示此时双铁 TF: 单铁 TF 的比率显著提升。

3.2 镉胁迫对血红细胞的影响

镉胁迫初期, 与对照组相比, 镉处理组鱼血

细胞的吸光度(A 值)未发生明显变化, 但到了 7 天、11 天, 0.05mg/L 浓度组 A 值始终显著高于对照组, 而 0.5mg/L 组 A 值在 7 天时极显著高于对照组, 11 天时显著低于对照组, 5mg/L 浓度组自处理后 A 值一直下降, 9 天后极显著低于对照组。镉处理组和对照组相比, 血红细胞浓度在镉处理初期无明显变化, 9 天、11 天, 0.05mg/L 浓度组血红细胞浓度显著高于对照组, 揭示由于镉胁迫影响血红蛋白结合氧能力, 导致血红细胞携氧能力显著下降, 为回复血液氧分压数值, 机体血红细胞代偿性增生。而 0.5mg/L 和 5mg/L 浓度组在 11 天时血红细胞浓度显著低于对照组, 意味着机体受到严重损伤, 红细胞数量大量减少或被破坏。

3.3 转铁蛋白和血红蛋白各项指标作为生物标记的可行性

镉污染情况下, 即便是暴露在微量镉离子浓度的环境中, 持续一段时间后, 大弹涂鱼的血清铁浓度也会显著升高, 因此, 倘明确无污染情况下大弹涂鱼的血清铁浓度变化幅度, 该项数值可用作生物标记。血红细胞的吸光度和浓度变化根据微量镉和过量镉浓度两种情况有所区别, 微量

情况下, 血红细胞有明显的代偿性增生, 而过量镉浓度组鱼血红细胞浓度显著降低, 这 2 个指标适合作为生物标记。大弹涂鱼血清的总铁结合力对镉污染敏感, 并在短时间内迅速表现出差异性, 但随着在镉污染环境生活时间的推移, 逐渐恢复正常并最终恒定在一个数值附近, 因此作为生物标记并不适合。大弹涂鱼血清的铁饱和度不论在过量镉组或微量镉组试验中, 最终数值都极显著高于健康对照组, 因此该指标适合作为生物标记。

参 考 文 献

- 刁书永, 张立志, 袁 慧, 2005. 镉中毒机理研究进展. 动物医学进展, 26(5): 49—51
- 龙 华, 曾 勇, 郑 英, 2001. 转铁蛋白的研究进展. 生物工程进展, 21(2): 32—39
- 冯 涛, 郑薇云, 洪万树等, 2001. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏抗氧化酶活性影响的初步研究. 应用生态学报, 12(3): 422—424
- 刘伟成, 李明云, 黄福勇等, 2006. 镉胁迫对大弹涂鱼肝脏黄嘌呤氧化酶和抗氧化酶活性的影响. 应用生态学报, 17(7): 1310—1314
- 杨居荣, 查 燕, 1999. 食品中重金属的存在形态及其与毒性的关系. 应用生态学报, 10(6): 766—770
- 张甫英, 李辛夫, 1997. 酸性水对几种主要淡水鱼类的影响. 水生生物学报, 21(1): 40—47
- 张春丹, 黄福勇, 李明云等, 2006. 镉胁迫条件下大弹涂鱼 (*Boleophthalmus pectinirostris*) 外周血微核标记及肝脏过氧化物酶标记的变化. 海洋与湖沼, 37(1): 7—13
- 南旭阳, 2002. 镉离子对鲫鱼红细胞核、血细胞数及血红蛋白影响的研究. 浙江师范大学学报(自然科学版), 25(3): 303—307
- 贺广凯, 1996. 黄渤海沿岸经济贝类体中重金属残留量水平. 中国环境科学, 16(2): 96—100
- 黄福勇, 李明云, 竺俊全等, 2004. 急性镉中毒对大弹涂鱼血红细胞同工酶表达的影响. 上海水产大学学报, 16(4): 282—289
- Aisen P, 1998. Transferrin, the transferrin receptor, and the uptake of iron by cells. *Met Ions Biol Syst*, 35: 585—631
- Chang L, 1992. The concept of direct and indirect neurotoxicity and the concept of toxic metal/essential element interactions as a common biomechanism underlying metal toxicity. *Vuln Brain Environ Risks*, 2: 61—82
- Hussain R I, Ballard C G, Edwardson J A *et al*, 2002. Transferrin gene polymorphism in Alzheimer's disease and dementia with Lewy bodies in humans. *Neurosci Lett*, 317: 13—16
- Koizumi T, Yokato T, Suzuki K, 1994. Mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes. *Biol Trace Elem Res*, 42: 31—41
- Loeffler D A, Connor J R, Juneau P L *et al*, 1995. Transferrin and iron in normal, Alzheimer's disease, and Parkinson's disease brain regions. *J Neurochem*, 65: 710—716
- Wu S M, Deng A N, 2006. Effect of Cadmium on Hematological functions in *Tilapia (Oreochromis mossambicus)*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 76: 891—898
- Zerpa G A D, Saleh M C, Ferna'ndez P M *et al*, 2000. Alternative splicing prevents transferrin secretion during differentiation of a human oligodendrocyte cell line. *J Neurosci Res*, 61: 388—395

EFFECTS OF CADMIUM ON SERUM TRANSFERRIN AND ERYTHROCYTES OF *BOLEOPHTHALMUS PECTINIROSTRIS*

ZHU Ai-Yi, XIE Jia-Yan

(Marine Science and Technology School, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

Abstract Cd is one of the most important infectants in the pollution of water and does great harms to environmental organisms. Effects of cadmium (Cd) on serum transferring (STF) and erythrocytes of *Boleophthalmus pectinirostris* are reported. On the seventh day after Cd pollution, serum iron concentration and saturation significantly changed between the Cd-treated group and untreated group. The changes in serum total iron binding capacity and unsaturated iron-binding capacity were irregular and not suitable for use as biomarkers. Changes in erythrocyte absorbency and numbers were complicated. The increased level of erythrocytes in low Cd concentration treated fish indicated lower blood PO₂ while those with high Cd concentration show an opposite result, suggesting that serum iron concentration and saturation are suitable for use as biomarkers of environmental Cd pollution.

Key words Cadmium, *Boleophthalmus pectinirostris*, Serum transferrin, Erythrocyte, Biomarker