

重金属 Cu、Pb 对泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)卵细胞凋亡及 DNA 损伤的 SCGE 试验*

唐建勋¹ 程樟顺² 郑荣泉³ 陶晓敏² 刘忠良¹ 赵 华¹

(1. 金华职业技术学院农业与生物工程学院 金华 321007; 2. 金华职业技术学院制药与材料工程学院 金华 321007; 3. 浙江师范大学化学与生命科学学院 金华 321004)

提要 采用室内暴露试验方法,以单细胞凝胶电泳技术(SCGE)检测,研究了 Cu、Pb 不同浓度梯度与不同暴露时间联合染毒对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤。结果表明,各 Cu、Pb 浓度组 DNA 平均迁移长度增加,与阴性对照组比较差异有显著性($P < 0.05$)。此外,随着 Cu、Pb 染毒剂量的增加,各试验组 DNA 的平均迁移长度逐渐增加,在试验浓度梯度范围内(Cu 0.01mg/L+Pb 0.05mg/L、Cu 0.10mg/L+Pb 0.50mg/L、Cu 0.25mg/L+Pb 0.75mg/L),存在较为显著的剂量-效应关系($P < 0.05$),但未见明显的时间-效应关系($P > 0.05$)。Cu、Pb 可引起泥鳅卵细胞凋亡和 DNA 损伤,卵细胞的不同损伤水平可望作为较为理想的水环境基因毒性指标。

关键词 Cu, Pb, 泥鳅, 卵细胞, SCGE, DNA 损伤

中图分类号 X171.5

Cu 为生物体必需的一种微量元素,许多关键的酶和转录因子都需要 Cu 以发挥活性作用,但 Cu 超出一定的数量时会对生物体造成不良的影响(Gupte et al, 2009; Turski et al, 2009); Pb 则为生物体所非必需的一种微量元素。在当今经济社会迅猛发展的过程中,Cu 和 Pb 作为工农业生产的原材料而被广泛使用,导致目前 Cu、Pb 等重金属成为水环境的主要污染物之一。Cu 与 Pb 进入水体后,通过有机体的生物放大(biological amplification)作用,在食物链各营养级有机体内蓄积,使生物的种类和数量、群落组成及其结构、生长繁殖以及遗传特性发生变化(孔繁翔, 2001)。过去人们对 Cu、Pb 等重金属毒性的评价多采用理化方法、生化分析、 LD_{50} 测定等,但这些单一指标难以反映重金属污染对水生动物的总体效应。单细胞凝胶电泳技术(single cell gel electrophoresis, SCGE)是近些年来国内外用于各种动物细胞 DNA 损伤检测的一种较为成熟的技术,与传统的 DNA 损伤检测方法相

比,SCGE 具有简便、快速、灵敏等一系列特点,适合于各种动物体内不同类型细胞的试验(宋春英等, 2007; 张春红等, 2011; 陈忻等, 2007; 葛亚明等, 2007; 胡晓磐等, 2005)。本文采用单细胞凝胶电泳技术即彗星试验,以在我国水环境中广泛分布的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)为试验动物,研究 Cu 与 Pb 对泥鳅卵细胞凋亡和 DNA 的损伤效应,旨在筛选水环境中基因毒剂指标,进一步阐明 Cu 与 Pb 的毒理学作用机制,以及为水环境污染评价等提供更多的参考依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

硫酸铜($CuSO_4 \cdot 5H_2O$, 上海试剂总厂),醋酸铅($CH_3COO_2Pb \cdot 3H_2O$, 上海试剂四厂),均为分析纯,使用前各配制成质量浓度为 1000mg/L 的母液;正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖(Biotech 公司); Triton

* 浙江省自然科学基金资助项目,LY12C03006 号。唐建勋,副教授,硕士, E-mail: jhtjxun@163.com

收稿日期: 2012-05-16, 收修改稿日期: 2012-06-25

X-100(进口分装); 溴化乙锭(Sigma 公司)。水平电泳槽和 DYY-6B 型电泳仪(北京六一仪器厂); 荧光倒置显微镜(CKX-41 型, OLYMPUS, 日本)。

1.2 试验动物

用作试验的 2 龄泥鳅(♀)购自金华市农产品市场(水库水源养殖), 平均体长(13±2.9)cm, 平均体重(14±0.28)g, 于试验前暂养 5d, 期间活动正常, 无病无伤, 死亡率低于 5%。试验过程中每隔 2d 更换少量与容器重金属浓度相同的溶液; 试验期间不投饲料, 以微型电动充气泵日增氧 4—6h。

1.3 试验设计

采用室内暴露试验方法; 暴露装置为 40cm×30cm×45cm 的玻璃水族箱, 各盛曝气 2d 以上的自来水 20L; 试验期间水质参数为: 水温 8—13℃, pH 6.2—6.4, DO 5.3—6.1mg/L, 平均硬度为 2.67mmol/L, 平均碱度为 2.59mmol/L。试验设置 1 个对照组, 3 个不同浓度梯度 Cu、Pb 处理组。处理组 Cu、Pb 浓度按照国家《渔业水质标准》(GB11607-89)分别以 1、10、25 倍设定, 进行联合毒性试验。选择规格趋于一致的泥鳅随机分组, 每水族箱放置 12 尾, 各设 3 个平行样。暴露试验以 20d 为一个周期。

1.4 试验方法

1.4.1 样品的处理 分别于第 5、10、20d 将泥鳅解剖并挖取卵巢, 取泥鳅卵细胞(每尾 100—120 粒), 加入羊血清, 置放于 4℃冰箱中保存; 经 2000r/min 离心 10min 后, 弃去上清液, 提取卵细胞。

1.4.2 SCGE 试验 凝胶电泳胶板的制作、卵细胞的裂解以及电泳和中和等参照相关文献(徐西长等, 2005; Collins *et al*, 2008)。先在载玻片上涂抹一薄层 0.6%常熔点琼脂糖制备成常熔点胶板; 之后在常熔点胶板上铺设混有泥鳅卵细胞的 0.6%低熔点琼脂糖; 置放于 4℃冰箱中固化 10—30min, 制备成用于单细胞凝胶电泳的低熔点胶板。

将上述制成的胶板浸入预冷的碱性裂解液(205mol/L NaCl, 100mmol/L Na₂-EDTA, 10mmol/L Tris, pH 10, 临用前添加 10%的二甲基亚酚和 1%的 Triton X-100)中, 于 4℃裂解 1—1.5h, 使卵细胞充分裂解, DNA 趋于松散状态。

从裂解液中取出低熔点载玻片胶板, 在蒸馏水中洗去过量的盐 2 次, 每次 5min; 再用预冷的 PBS 缓冲液漂洗胶板 3 次, 每次 5min, 置于水平电泳槽内, 加入碱性电泳液(1mmol/L Na₂-EDTA, 300mmol/L NaOH, pH>13)并使液面高于胶板 2mm, 使卵细胞 DNA 避光解旋 30min, 待到 DNA 充分展开, 然后于 25V(有效电泳长度 1V/cm)、300mA, 室温下电泳 30min。

电泳完毕, 取出胶板, 用中和缓冲液(用蒸馏水稀释)漂洗 3 次, 每次 5min, 再行自然干燥。

1.4.3 染色、镜检和图像分析 在暗室中往胶板上滴加 GV 染色剂(20μg/L) 50—60μl, 染色 4min 成像; 参照相关方法(陈忻等, 2007; 党炳俊等, 2011), 用蒸馏水冲洗胶板后立即进行荧光倒置显微镜观察; 根据 DNA 损伤后彗星尾部的形状及长度预制彗星图谱(图 1)。将标准图谱分为 4 个级别, 即 0 级: 无尾部, 仅见一明亮圆点; 1—3 级示不同程度 DNA 损伤后的彗星图像。卵细胞 DNA 损伤的程度逐渐加重, 则彗星尾部逐渐拉长变大, 彗星头部逐渐缩小且荧光强度减弱。

根据预制的彗星图谱将每个样品中 200 个泥鳅卵细胞的彗星尾部进行分级, 统计样品中各不同级别彗星的分布情况; 计算样品中的彗星率, 即呈现 1—3 级彗星尾部卵细胞占总卵细胞的比例; 利用 Comet A 1.0 软件对彗星长度进行测量; 计算各样品彗星的荧光强度 AU(Arbitrary units)值: $AU = \sum \text{各级 } AU \text{ 单位} \times (\text{各级卵细胞数} / \text{总卵细胞数})$ 。每个样品 AU 值的计算为: DNA 彗星尾部级别 0—3 级被分别规定为 AU 单位 0、100、200、300。

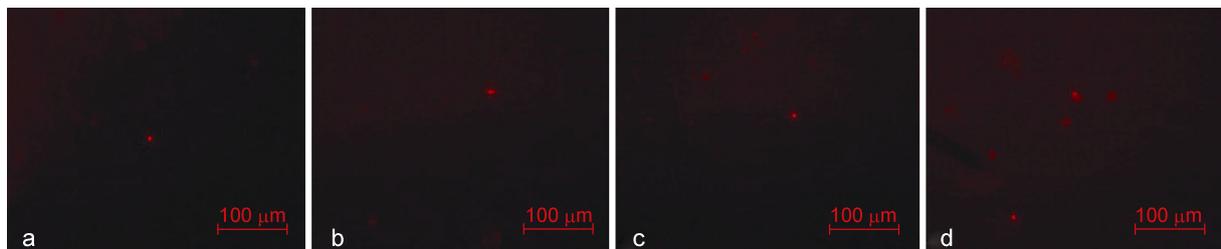


图 1 标准彗星分级图谱

Fig.1 Standard comet image of different grades

注: a 为 0 级, b 为 1 级, c 为 2 级, d 为 3 级

1.5 统计分析

泥鳅卵细胞 Cu、Pb 不同浓度梯度溶液暴露试验的处理重复 3 次, 以 χ^2 检验进行卵细胞彗星率的统计分析, 采用 t 检验进行 AU 和彗尾长度的统计分析。

2 结果与分析

从图 2 中可以看出, 经彗星试验后对照组的泥鳅卵细胞核 DNA 完整, 无彗尾出现, 而 Cu 和 Pb 分别为: Cu 0.01mg/L+Pb 0.05mg/L、Cu 0.10mg/L+Pb 0.50mg/L 以及 Cu 0.25mg/L+Pb 0.75mg/L 时, 处理 5d、10d、20d 后, 泥鳅卵细胞凋亡现象逐渐加重, 大量卵细胞出现较为明显的凋亡特征。同时, 卵细胞核中 DNA 受到损伤, 多数卵细胞核发生彗星拖尾的现象。

随着溶液 Cu、Pb 浓度的增加, 泥鳅卵细胞发生凋亡的数量增多, 卵细胞核彗星率也随之上升, 彗尾荧光强度(AU 值)相对加大, 这表明各试验组泥鳅卵细胞 DNA 的平均迁移长度逐渐增加, DNA 损伤程度明显提高(表 1)。统计结果分析显示, 各处理组与阴性对照组之间存在着显著差异($P<0.05$), 其中, 以 Cu 0.10mg/L+Pb 0.50mg/L 浓度组以及 Cu 0.25mg/L+Pb 0.75mg/L 浓度组对卵细胞的损伤尤为严重, 呈现出较为显著的剂量-效应关系($P<0.05$)。然而, 当

Cu+Pb 浓度继续加大时(从 Cu 0.10mg/L+Pb 0.50mg/L 到 Cu 0.25mg/L+Pb 0.75mg/L), 卵细胞 DNA 的受损程度并非呈叠加的关系, 而是随 Cu+Pb 剂量的增加相对减轻。

从表 1 还可看出, 在同一 Cu+Pb 浓度组中, 泥鳅卵细胞的彗星率、彗尾荧光强度及彗尾长度并未随着时间的延续而增加, 该现象表明时间-效应关系并不显著($P>0.05$)。

3 讨论

Cu 与 Pb 是水环境中常见的重金属污染物, 可对水生动物体产生直接危害或在其皮肤、鳃以及其它组织器官包括性腺中蓄积, 从而导致潜在的危害(Allen, 1995; 唐建勋等, 2010; 杨丽华等, 2003; 王银秋等, 2003)。此外, Cu、Pb 等重金属还作用于动物体组织细胞的 DNA, 从而导致不同类型生物细胞的基因毒性效应(周新文等, 2001; 项黎新等, 2001)。本试验的结果显示, 随着溶液 Cu 和 Pb 浓度的增加, 泥鳅卵细胞凋亡及其 DNA 的损伤相对加重, 说明在一定的试验条件下, Cu 和 Pb 可引起泥鳅卵细胞的凋亡和不同程度的 DNA 损伤, 并对泥鳅具有遗传毒性作用。在本试验中还发现, 就“DNA 的损伤程度”与“彗尾长

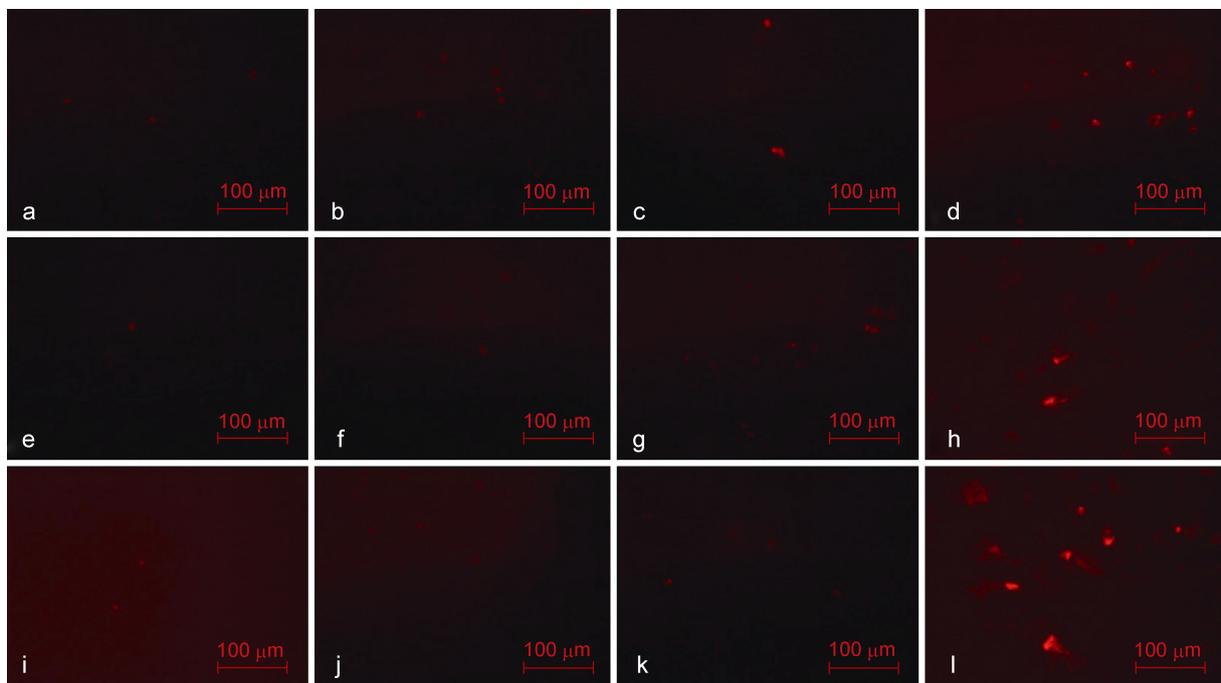


图 2 不同 Cu、Pb 处理组 SCGE 的彗星图像

Fig.2 SCGE comet assay of loach oocytes treated with different concentration of Cu and Pb

注: a、e、i: Cu 0mg/L+Pb 0mg/L (5d、10d、20d); b、c、d: Cu 0.01mg/L+Pb 0.05mg/L (5d、10d、20d); f、g、h: Cu 0.10mg/L+Pb 0.50mg/L (5d、10d、20d); j、k、l: Cu 0.25mg/L+Pb 0.75mg/L (5d、10d、20d)

表 1 不同 Cu、Pb 质量浓度的卵细胞 DNA 损伤评价
Tab.1 Evaluation on DNA damage to the oocytes in different Cu and Pb concentration

Cu/Pb 浓度 (mg/L)	暴露时间 (d)	彗尾分级及卵细胞数(n=200)				彗星率 (%)	彗尾荧光 强度(AU)	彗尾长度 μm (n=20)
		0 级	1 级	2 级	3 级			
0.00/0.00	5	197	2	1	0	1.5 ^d	2.0 ^a	3.26±2.65 ^a
	10	193	5	2	0	3.5 ^e	4.5 ^b	3.27±1.94 ^a
	20	192	6	2	0	4.0 ^e	5.0 ^b	3.32±2.15 ^a
0.01/0.05	5	140	37	15	8	30.0 ^f	45.5 ^c	7.25±3.78 ^f
	10	138	32	22	8	31.0 ^f	50.0 ^f	7.34±6.96 ^f
	20	125	47	19	9	37.5 ^g	56.0 ^g	7.67±2.14 ^f
0.10/0.50	5	34	72	47	47	83.0 ^e	153.5 ^b	11.51±4.87 ^e
	10	38	69	39	54	81.0 ^e	154.5 ^b	11.38±5.13 ^e
	20	31	63	55	51	84.5 ^e	163.0 ^b	11.87±3.99 ^e
0.25/0.75	5	35	79	44	42	82.5 ^e	146.6 ^b	13.24±5.67 ^e
	10	29	68	57	46	85.5 ^e	160.0 ^b	13.33±3.85 ^e
	20	28	70	46	56	86.0 ^e	165.0 ^b	13.87±5.27 ^e

同一列中上标字母不同表示差异显著($P < 0.05$)

度”这两个评价指标而言,前者更能有效地衡量泥鳅卵细胞的损伤,后者则在相对较高剂量时才能有效地反映出其差异,这与以往研究者在其它动物组织细胞 DNA 检测的类似研究相一致(张遵真等, 2001; 范丽君等, 2007; 张迎梅等, 2006)。

重金属对水生动物的毒性作用与它们在其组织器官中的运转、分布、转化、排泄等代谢有关(胡晓馨等, 2005)。与此同时,鱼类等水生动物暴露于 Cu、Pb 等重金属时均能诱导体内的金属硫蛋白(Metallothionein, MT), 这些蛋白质在 Cu、Pb 等重金属的解毒过程中起着重要作用。因此, Cu 和 Pb 对泥鳅卵细胞的损伤是一个复杂的过程。本次试验并未发现 Cu 和 Pb 对泥鳅卵细胞的损伤存在明显的时间-效应关系,这可能与上述原因及 DNA 的损伤修复有关,或是由于暴露时间的延长,卵细胞核的 DNA 断裂程度较高,以致在电泳时断片可能丢失(范丽君等, 2007)。

水生动物的生殖细胞作为遗传物质的主要传递者,其 DNA 的完整性对于其物种的繁衍和延续的意义不言而喻,因而在水生动物的遗传育种、种质资源和生物多样性保护中,对于配子 DNA 的检测显得尤为为重要。迄今为止,国内外有关 Cu、Pb 导致鱼类等水生动物生殖器官(尤其是卵巢)基因毒性的研究还十分有限。水生动物卵细胞的 SCGE 试验由于实验条件相对简便、样品需要量小、分析检测时间短、敏感性较高,且其生物学变化能较为直接与准确地反映水环境污染对水生动物的影响,因此对鱼类等水生动物卵细胞 DNA 的损伤检测有望成为一个较为理想的

水环境基因毒性指标。

参 考 文 献

- 王银秋, 张迎梅, 赵东芹, 2003. 重金属镉、铅、锌对泥鳅和泥鳅的毒性. 甘肃科学学报, 15(1): 35—38
- 孔繁翔, 2001. 环境生物学. 北京: 高等教育出版社, 77—80
- 杨丽华, 方展强, 郑文彪, 2003. 重金属对鲫鱼的急性毒性及安全浓度评价. 华南师范大学学报(自然科学版), 2: 101—106
- 宋春英, 杨建一, 高宝珍, 2007. 单细胞凝胶电泳技术在生殖细胞 DNA 损伤检测中的应用. 生殖医学杂志, 16(4): 293—296
- 张迎梅, 王叶菁, 虞闰六等, 2006. 重金属 Cd²⁺、Pb²⁺和 Zn²⁺对泥鳅 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 30(4): 399—403
- 张春红, 林欣大, 2011. 单细胞凝胶电泳检测 DNA 损伤的最新进展. 核农学报, 2(6): 1230—1234
- 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 DNA 损伤. 癌变·畸变·突变, 13(1): 4—7
- 陈 忻, 西田浩志, 小西微也, 2007. 单细胞凝胶电泳技术检测小鼠成纤维细胞 DNA 的氧化损伤及修复. 西安交通大学学报(医学版), 28(1): 25—27
- 范丽君, 周忠良, 陈东华等, 2007. HgCl₂与 CdCl₂对河蟹精子 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳检测研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 4: 95—100
- 周新文, 朱国念, 孙锦荷, 2001. Cu、Zn、Pu、Cd 对鲫鱼 (*Carassius auratus*)组织 DNA 毒性的研究. 核农学报, 15(3): 167—173
- 项黎新, 邵健忠, 孟 真, 2001. 六种重金属离子胁迫诱导鱼类细胞凋亡的研究. 生物化学与生物物理进展, 28(6): 866—869

- 胡晓磐, 周建华, 时夕金, 2005. 利用单细胞凝胶电泳技术研究镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤. 农业环境科学学报, 24(1): 43—45
- 党炳俊, 王 君, 杜启艳等, 2011. 单细胞凝胶电泳检测百草枯对大鳞副泥鳅血细胞 DNA 的损伤. 水生态学杂志, 32(5): 105—108
- 徐西长, 丁福红, 李 军, 2005. 单细胞凝胶电泳用于检测低温保存的真鲷(*Pagrosomus major*)精子 DNA 损伤. 海洋与湖沼, 36(3): 221—225
- 唐建勋, 邢承华, 刘忠良等, 2010. 重金属 Cu、Pb 在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)卵巢的蓄积特性及其对卵细胞发育的影响. 海洋与湖沼, 41(3): 386—390
- 葛亚明, 宁红梅, 李敬玺等, 2007. 单细胞凝胶电泳技术在临床兽医学中的应用. 动物医学进展, 28(12): 77—80
- Allen P, 1995. Soft-tissue accumulation of lead in the blue Tilapia, *Oreochromis zcureus* (Steindachner) and the modifying effects of cadmium and mercury. Biological Trace Element Research, 50(3): 193—208
- Collins A R, Osooz A A, Brunborg G *et al*, 2008. The come assay topical issues. Mutagenesis, 23(3): 143—151
- Gupte A, Mumper R J, 2009. Elevated copper and oxidative stress in cancer cells as a target for cancer treatment. Cancer Treatment Review, 35(1): 32—46
- Turski M L, Thiele D J, 2009. New roles for copper metabolism in cell proliferation, signaling and disease. Journal of Biological Chemistry, 284(2): 717—721

SCGE TEST OF OOCYTES APOPTOSIS AND DNA DAMAGE ON LOACHES *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS* BY HEAVY METAL Cu AND Pb

TANG Jian-Xun¹, CHENG Zhang-Shun², ZHENG Rong-Quan³, TAO Xiao-Min²,
LIU Zhong-Liang¹, ZHAO Hua¹

(1. Department of Agricultural and Bio-Engineering, Jinhua Polytechnic, Jinhua, 321007; 2. Department of Pharmacy and Material-Engineering, Jinhua Polytechnic, Jinhua, 321007; 3. College of Chemistry and Life Science, Zhejiang Normal University, Jinhua, 321004)

Abstract With the method of single cell gel electrophoresis (SCGE), the test studied the DNA damage to the loach oocytes, which suffered different concentration of joint attacking of Cu and Pb with various exposure time and doses. The results showed that the average migration length of the DNA increased in each concentration group that was treated by both Cu and Pb. The significant differences appeared as compared with the negative control group ($P < 0.05$). In addition, with the contamination doses enhanced, the average migration length of DNA increased gradually in each treatment group. It was obvious that the relationship of dose-effect existed ($P < 0.05$), but there is no distinct relationship of time-effect ($P > 0.05$) in the gradient range of concentration (Cu 0.01mg/L + Pb 0.05mg/L, Cu 0.10mg/L + Pb 0.50mg/L, Cu 0.25mg/L + Pb 0.75mg/L). As a conclusion, the joint toxicity of Cu and Pb can cause apoptosis and DNA damage to the oocytes and the level of damage will be ideal index for water environment genetic toxicity.

Key words Cu, Pb, *Misgurnus anguillicaudatus*, Oocyte, SCGE, DNA damage