

镉胁迫对大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*) 血细胞遗传损伤的研究*

金春华¹ 李明云¹ 刘伟成^{1,2} 张春丹¹ 陈 炯¹ 史雨红¹ 朱爱意³

(1. “应用海洋生物技术”教育部重点实验室 宁波大学生命科学与生物工程学院 宁波 315211;
2. 浙江省海洋水产养殖研究所 温州 325000; 3. 浙江海洋学院海洋科学学院 舟山 316004)

提要 以大弹涂鱼为研究对象,应用单细胞凝胶电泳技术并结合外周血基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳,研究了镉胁迫对大弹涂鱼外周血细胞的遗传损伤。结果表明:(1) 镉对大弹涂鱼外周血细胞是遗传毒性而非细胞毒性,并且产生的遗传损伤存在显著($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)的剂量效应,染毒 1h 的大弹涂鱼的全长和尾长与浓度的相关方程分别是 $y = 29.592x - 10.576$ ($r^2 = 0.9786$), $y = 28.417x - 14.859$ ($r^2 = 0.9857$),染毒 2h 的大弹涂鱼的全长和尾长与浓度的相关方程分别是 $y = 32.044x - 5.0235$ ($r^2 = 0.941$), $y = 29.911x - 9.539$ ($r^2 = 0.9635$)。(2) DNA 的损伤程度和污染胁迫之间存在着时间效应。以上结果表明, DNA 损伤可作为大弹涂鱼受镉胁迫时的生物指标。

关键词 镉, 单细胞凝胶电泳(彗星试验), DNA 凝胶电泳, 大弹涂鱼

中图分类号 X835

重金属镉属动物非必需元素, 具蓄积毒性, 能引起生物体基因突变和 DNA 损伤, 并可以通过食物链富集, 对动物和人体健康造成危害。近来, 海洋环境中的重金属镉污染具有逐渐加大的趋势, 因此, Cd 的毒理学特别是分子毒理学研究越来越受到重视(贺广凯, 1996; 刘春颖等, 2001; 刘伟成等, 2006)。过去人们采用各种方法研究 Cd 引起的基因毒性以预测污染带来的潜在风险, 如 *Allium* 试验、染色体断裂(CA)、Ames 实验等, 但有些方法操作繁琐、花费高, 不利于广泛采用。单细胞凝胶电泳(Single cell gel electrophoresis, SCGE)又称彗星实验(Comet assay), 是一种快速、简单、可靠的基因毒性研究方法, 可以定量检测真核细胞中的多种形式的 DNA 损伤, 如单链断裂、双链断裂、碱性不稳定位点不完全切除以及 DNA 交联等(Navarrete *et al*, 1997)。自 Ostling 等(1984)首次报道以来, 研究人员对单细胞凝胶电泳方法进行了大量改进, 其中 Singh 对其改进后的方法被认为是较经典的操作方法(Singh, 1994, Singh *et al*, 1988)。

大弹涂鱼(*Boleophthalmus pectinirostris*)隶属鲈形目、鰕虎鱼亚目、弹涂鱼科、大弹涂鱼属, 为沿岸暖水两栖鱼类, 广泛分布于浙江、江苏、福建、广东以及台湾沿海等地, 具有食物链短、易养活等特点(刘伟成等, 2006)。已有的研究表明大弹涂鱼的多项生理指标对环境污染敏感(冯涛等, 2001a, b, 2003; 李明云等, 2005; 郑微云等, 2000)。

本研究以大弹涂鱼为实验材料, 采用单细胞凝胶电泳、琼脂糖凝胶电泳试验的方法检测了镉胁迫对大弹涂鱼外周血的遗传损伤, 探讨了 DNA 损伤作为污染暴露生物标记的可行性, 同时为镉的血液毒理学以及评估镉对海洋生态系统的影响提供科学依据。

1 材料与方 法

1.1 材料

实验所用野生大弹涂鱼捕自浙江宁波镇海沿海, 体长 10.8—13.5cm, 体重 8.4—11.8g。样本鱼在实验室清洁海水(曝气自来水和海水晶配制, 盐度为 17.65—

* 长江学者和创新团队发展计划, IRT0734 号; 浙江省重大国际合作项目, 2006C14017 号。金春华, 副教授, E-mail: jinchunhua@nbu.edu.cn

收稿日期: 2009-02-17, 收修改稿日期: 2009-04-22

18.30)中暂养 7 天, 选取活泼、无病、表皮无损伤的个体进行实验。氯化镉、十二烷基肌氨酸钠为 Sigma 公司产品, 其他药品购自上海生工生物工程技术有限公司。

1.2 SCGE 检测 Cd 对大弹涂鱼血细胞 DNA 损伤的影响

1.2.1 大弹涂鱼血细胞样品处理

取健康大弹涂鱼, 用肝素钠处理过的注射器尾动脉取血, 每次取样 10 尾。将血液用 PBS 稀释到 10^5 — 10^6 个细胞/ml 分装, 加入 CdCl_2 母液使终浓度分别为 0.05、0.5、5mg/L (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), 另设空白对照组, 于 25℃ 分别染毒 1h 和 2h 后, 2000r/min 离心 5min 收集细胞, 用台盼蓝染色 15min 后检查细胞染毒后活性。其中折光强的为活细胞, 染色的为死细胞。

1.2.2 凝胶制备

本实验采用目前最常用的“三明治”三层凝胶结构, 铺设方法参考 Singh(1994)、Singh 等(1988)。在预热的载玻片上滴加 100 μ l 45℃ 0.5% 正常熔点的琼脂糖, 盖上盖玻片, 4℃ 冷凝 10min。揭去盖玻片, 将 1% 的低熔点琼脂糖与血细胞悬液等体积混匀, 取 85 μ l 滴在第一层胶上, 迅速盖上盖玻片, 同样 4℃ 冷凝 10min; 最后加 90 μ l 的 0.5% 的低熔点琼脂糖, 加盖玻片后 4℃ 使其凝固。

1.2.3 细胞裂解与 DNA 解旋

于 4℃ 将载玻片水平浸于高盐裂解液(NaCl 2.5mol/L, Na_2EDTA 100 mmol/L, Tris-HCl 10mmol/L, 1% 十二烷基肌氨酸钠, 临用前加 Triton X-100 终浓度为 1%, 二甲亚砜终浓度为 10%) 中 4℃ 裂解 2h。裂解后用 PBS 漂洗 3 次, 放入新配制的碱性电泳缓冲液中(Na_2EDTA 1mmol/L, NaOH 300mmol/L) 40min, 使 DNA 变性解旋。

1.2.4 电泳

变性结束后在 200mA 下电泳 45min。电泳过程中用滤纸吸除产生的泡沫避免影响电流, 同时通过调节缓冲液高度达到恒压 20V。

1.2.5 中和与染色

电泳结束后将载玻片浸入 0.4mol/L 的 Tris-HCl (pH 7.5) 缓冲液中, 中和 15min。随后用滤纸吸干, 浸入无水乙醇放置 1h, 取去乙醇晾干。用 20 μ g/ml 的丫啶橙染色 15min, 在荧光显微镜(NIKON ECLIPSE 80I)下观察, 随机测量 50 个彗星尾长及全长, SPSS11.5 进行数据分析, 评价 DNA 损伤程度。

1.3 外周血基因组 DNA 琼脂糖凝胶电泳

以 0.1 LD_{50} (即浓度为 1.25mg/kg)的 Cd^{2+} 对大弹涂鱼进行腹腔注射染毒, 3 天后重复一次作为实验组, 对照组注射等量生理盐水。第 7、14、19 天分别进行尾动脉取血 15 尾, 2000r/min 离心 10min, 弃血清取中间层。用 0.01mol/L PBS 等比稀释, 沿离心管壁滴加在等体积淋巴细胞分离液液面上, 2000r/min 离心 10min, 收集液面处白细胞, 4℃ 保存。按照常规酚-氯仿法抽提基因组 DNA, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳。

2 结果

2.1 镉胁迫对彗星尾长和全长的影响

彗星实验结果见图 1, 各组彗星的全长和尾长见表 1。实验结果显示同一染毒时间浓度越大彗星的拖尾程度越强, 其中 5mg/L 浓度组染毒 1h 的全长和尾长测定结果都最大。彗星全长的测量结果, 0.05mg/L 组与对照组差异显著, 0.5mg/L 与 0.05mg/L 差异不显著, 5mg/L 与 0.5mg/L 差异极显著; 就彗星尾长而言, 仅有 5mg/L 与 0.5mg/L 存在极显著差异。在同一染毒时间内, 随 Cd^{2+} 浓度增大, 彗星全长和尾长均增大, 即存在剂量效应, 染毒 1h 的大弹涂鱼的全长和尾长与浓度的相关方程分别是 $y = 29.592x - 10.576$ ($r^2 = 0.9786$), $y = 28.417x - 14.859$ ($r^2 = 0.9857$), 染毒 2h 的大弹涂鱼的全长和尾长与浓度的相关方程分别是 $y = 32.044x - 5.0235$ ($r^2 = 0.941$), $y = 29.911x - 9.539$ ($r^2 = 0.9635$)。经台盼兰染色发现, 重金属镉染毒后的大弹涂鱼外周血细胞的存活率 >91%, 表明重金属镉对大弹涂鱼外周血细胞的毒性系遗传毒性而非细胞毒性。

2.2 镉胁迫对外周血细胞基因组 DNA 断裂程度的影响

大弹涂鱼白细胞基因组 DNA 琼脂糖电泳图谱如图 2。试验结果表明对照组大弹涂鱼外周血 DNA 电

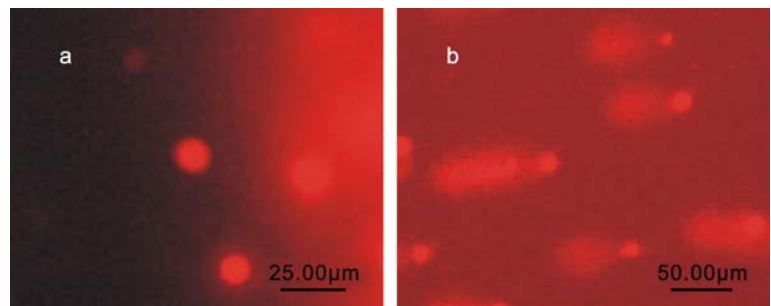


图 1 5mg/L Cd^{2+} 处理 1h 后大弹涂鱼外周血细胞 DNA 损伤的彗星图像

Fig.1 The comet image of erythrocyte of *B. pectinirostris* DNA exposed to cadmium (5mg/L) after 1h damage

a. 对照组; b. 5mg/L Cd^{2+} 浓度处理组

表 1 镉胁迫对彗星尾长和全长的影响

Tab.1 The tail length and comet length exposed to cadmium (Mean \pm SE)

染毒 1h	浓度(mg/L)	长度(μ m)	染毒 2h	浓度(mg/L)	长度(μ m)
全长	0.00	15.167 \pm 6.164 ^a	全长	0.00	17.861 \pm 7.172 ^A
	0.05	56.515 \pm 5.295 ^b		0.05	73.932 \pm 5.584 ^B
	0.50	73.940 \pm 4.721 ^{bc}		0.50	88.854 \pm 7.321 ^C
	5.00	108.583 \pm 7.202 ^D		5.00	119.701 \pm 9.0754 ^D
尾长	0.00	10.400 \pm 4.495 ^a	尾长	0.00	14.333 \pm 7.129 ^A
	0.05	48.233 \pm 7.185 ^{ab}		0.05	61.350 \pm 5.489 ^B
	0.50	67.348 \pm 5.523 ^{bc}		0.50	77.261 \pm 5.297 ^C
	5.00	98.750 \pm 3.804 ^D		5.00	108.734 \pm 7.453 ^D

注:测定数值用平均值 \pm 标准方差表示。两个浓度组有相同字母表示无显著差异($P>0.05$),不同小写字母表示差异显著($P<0.05$),如果出现与小写字母不同的大写字母或大写字母不同的表示差异极显著($P<0.01$)

泳后主要集中在两个长度范围内(图 2a); 染毒后大弹涂鱼外周血 DNA 两个较长片段断裂呈梯状带, 其中染毒 7 天外周血基因组较长片段 DNA 几乎完全断裂, 断裂后的 DNA 片断长度相对集中, 且断裂长度大(图 2b)。染毒 14 天和 19 天后, 两个较长范围的 DNA 片段已经不存在。比较第 3 与第 4 泳道的 DNA 断裂片段, 发现染毒 14 天时大弹涂鱼外周血基因组 DNA 断裂的片断长度更短, 而 19d 时大弹涂鱼基因组 DNA 的断裂长度却有所增加(图 2c、d)。

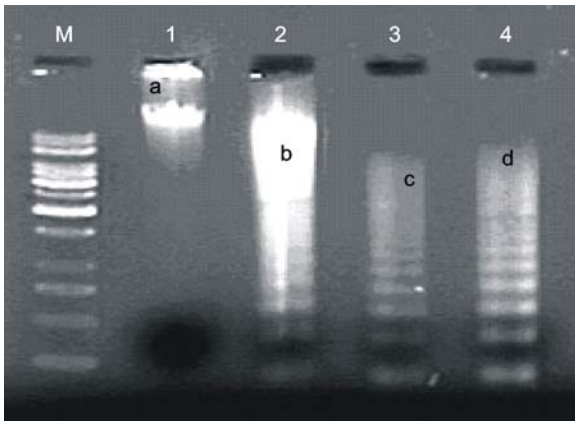


图 2 大弹涂鱼外周血基因组 DNA 电泳图谱

Fig.2 The electrophoresis of the DNA extracted from peripheral blood of *B. pectinirostris* exposed to cadmium
1: 对照; 2: 染毒 7d; 3: 染毒 14d; 4: 染毒 19d

3 讨论

重金属镉能够造成机体内多种细胞的 DNA 损伤, 进而发挥毒性作用。Mitchellmore 等(1998)研究发现镉在低浓度(5—35mmol/L)时诱导 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)形成, 引起核 DNA 链断裂。Hirano 等(1997)研究发现镉还能通过降低机体的抗氧化能力使细胞

对 8-OHdG 的修复能力下降, 影响 DNA 的碱基修饰。同时镉还能降低 DNA 聚合酶活性, 影响其在碱基配对中的高保真性(Palus *et al.*, 2003)。刘伟成等(2006)研究发现镉胁迫能诱导肝脏一种自由基催化酶黄嘌呤氧化酶活性升高, 催化产生自由基, 从而造成 DNA 损伤。

单细胞凝胶电泳技术在监测评价污染暴露对动物 DNA 损伤方面具有敏感性高、速度快、操作简单等多方面优点(吴若菁等, 2005)。目前, 许多水生动物的血细胞或其他实质细胞被用于单细胞凝胶电泳进行水环境的污染监测, 包括斑马鱼(*Brachydanio rerio*) (Deventer, 1996)、贻贝(*Mytilus edulis*) (Hamoutene *et al.*, 2002)等。本试验首次采用大弹涂鱼外周血细胞为实验材料, 应用单细胞凝胶电泳方法检测了镉胁迫遗传微观损伤。实验结果表明, DNA 的迁移距离和浓度存在着明显的“剂量效应”, 可以作为污染暴露的生物标记。同时, 实验结果还显示对照组外周血细胞 DNA 在单细胞凝胶电泳实验中也表现有微弱的迁移现象, 作者认为主要是由于细胞分离时不可避免的会受到某些非生理条件的影响, 使细胞 DNA 受到不同程度的损伤, 从而导致微量 DNA 在电泳时发生迁移, 在已有的研究中也发现类似的现象(Betti *et al.*, 1994; Ribas *et al.*, 1995)。

大弹涂鱼外周血基因组 DNA 电泳结果表明, 镉胁迫可以引起大弹涂鱼基因组 DNA 的断裂, 引起外周血细胞的遗传损伤。实验结果表明, 镉胁迫条件下, 7 天即能引起大弹涂鱼外周血基因组 DNA 断裂, 并对其引起的遗传损伤在一定范围内存在明显的时间效应, 可以作为污染暴露的生物标记。同时研究发现, 染毒 14 天、19 天后, 对照组的两个长 DNA 片段消失, 但是相比较而言, 染毒 19 天的外周血基因组 DNA 断

裂片段较长, 作者认为这可能与自身 DNA 损伤修复有关。

本研究从微观和宏观的角度评价了镉对大弹涂鱼外周血细胞的遗传损伤, 总体而言, 单细胞凝胶电泳所需时间短, 对镉胁迫最敏感。

参 考 文 献

- 冯 涛, 郑微云, 洪万树等, 2001a. 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
- 冯 涛, 郑微云, 洪万树等, 2001b. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝脏芳烃羟化酶活性的影响. 水产学报, 25(2): 156—160
- 冯 涛, 魏凤琴, 欧阳高亮等, 2003. 苯并(a)芘对大弹涂鱼肝细胞超微结构的影响. 应用生态学报, 14(10): 1780—1782
- 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
- 刘春颖, 张正斌, 刘莲生, 2001. 大亚湾珊瑚礁痕量金属的研究. 青岛海洋大学学报, 31(4): 559—565
- 李明云, 黄福勇, 竺俊全等, 2005. 大弹涂鱼急性镉中毒对脾脏 4 种同工酶表达的影响. 海洋水产研究, 26(2): 36—40
- 吴若菁, 陈宜秋, 林 霞等, 2005. 利用泥鳅红细胞核的遗传损伤监测福州市内河水质. 应用与环境生物学报, 11(1): 59—63
- 郑微云, 冯 涛, 郭祥群, 2000. 苯并(a)芘对大弹涂鱼 *Boleophthalmus pectinirostris* 卵巢还原型谷胱甘肽含量的影响. 应用生态学报, 6(4): 349—353
- 贺广凯, 1996. 黄渤海沿岸经济贝类中重金属残留量水平. 中国环境科学, 16(2): 96—100
- Betti C, Davini R T, Giannessi L *et al*, 1994. Microgel electrophoresis assay (comet assay) and SCE analysis in human lymphocytes from 100 normal subjects. Muta Res, 307: 323—333
- Deventer K, 1996. Detection of genotoxic effects on cells of liver and gills of *B. rerio* by means of single cell gel electrophoresis. Bull Environ Contam Toxicol, 56: 911—918
- Hamoutene D, Payne J F, Rahimtula A *et al*, 2002. Use of the comet assay to assess DNA damage in hemocytes and digestive gland cell of mussels and calms exposed to water contaminated with petroleum hydrocarbons. Mar Environ Res, 54: 471—474
- Hirano T, Yamaguchi Y, Kasai H, 1997. Inhibition of 8-hydroxydeoxyguanosine repair in testes after administration of cadmium chloride to GSH-depletes rats. Toxicol Appl Pharmacol, 387: 147—163
- Mitchelmore C L, Chipman J K, 1998. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of comet assay in environmental monitoring. Mutat Res, 399(2): 135—147
- Navarrete M H, Carrera P, Miguel M *et al*, 1997. A fast comet assay variant for solid tissue cells. The assessment of DNA damage in higher plants. Mutat Res, 389: 271—277
- Ostling O, Johanson K J, 1984. Microelectrophoretic study of radiation induced DNA damage in individual mammalian cells. Biochem Biophys Res Commun, 123: 291—298
- Palus J, Rydzynski K, Dziubaltowska E *et al*, 2003. Genotoxic effects of occupational exposure to lead and cadmium. Mutat Res, 540(1): 19—28
- Ribas G, Frenzilli G, Barale R *et al*, 1995. Herbicide-induced DNA damage in human lymphocytes evaluated by the single cell gel electrophoresis (SCGE) assay. Mut Res, 334: 41—54
- Singh N P, 1994. Technical Report: modification of alkaline microgel electrophoresis for sensitive detection of DNA damage. Int Radiat Bio, 66: 23—28
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R *et al*, 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. Exp Cell Res, 175: 184—191

GENTENIC DAMAGES IN PERIPHERAL BLOOD OF *BOLEOPHTHALMUS PECTINIROSTRIS* EXPOSED TO CADMIUM

JIN Chun-Hua¹, LI Ming-Yun¹, LIU Wei-Cheng^{1,2}, ZHANG Chun-Dan¹, CHEN Jiong¹,
SHI Yu-Hong¹, ZHU Ai-Yi³

(1. Key Laboratory of Applied Technology of Marine Biology, Ministry of Education, Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo, 315211; 2. Zhejiang Mariculture Research Institute, Wenzhou, 325000; 3. College of marine science, Zhejiang Ocean University, Zhoushan, 316004)

Abstract Cadmium stress on genetic damage of peripheral blood cells of marine fish *Boleophthalmus pectinirostris* was studied using single cell gel electrophoresis (SCGE) and DNA gel electrophoresis. The SCGE results shows that the cadmium toxicity in peripheral blood cells was not cytotoxicity but genotoxicity. Significant ($P < 0.05$) dose-dependent correlation was found between DNA migrancy distance and cadmium concentration, and so did the time-dependent one. On the other hand. DNA repair occurred in late period with 0.1 LD_{50} *in vitro* cadmium exposure due probably to the self-immunity respond. These results suggest that the DNA damage can used as the biology markers of Cadmium stress on the *B. pectinirostri*. These characters made a possibility of field work, but the factor of age must be thought in field work.

Key words Cadmium, Single cell gel electrophoresis (comet assay), DNA gel electrophoresis, *Boleophthalmus pectiniros*