

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

胡晓磐, 周建华, 时夕金

(苏州大学放射与公共卫生学院, 江苏 苏州 215007)

摘 要:以鲫鱼作为受试生物,采用单细胞凝胶电泳技术,研究了不同浓度及不同染毒时间氯化镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤。结果显示,各氯化镉染毒组 DNA 平均迁移长度明显增加,与阴性对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);另外,随着氯化镉染毒剂量的增加,各剂量组 DNA 的平均迁移长度逐渐增加,在实验浓度范围内,存在明显的剂量-效应关系($P < 0.01$),但未见明显的时间-效应关系。氯化镉可引起鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤,鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤可望成为一个较好的水环境基因毒剂指标。

关键词:镉; 鲫鱼; 单细胞凝胶电泳; DNA 损伤

中图分类号:X171.5 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)01-0043-03

Detection of DNA Damage in Carassius Auratus Lymphocytes Induced by Cadmium with Single Cell Gelelectrophoresis Assay

HU Xiao-pan, ZHOU Jian-hua, SHI Xi-jin

(College of Radiation Medicine and Public Health, Suzhou University, Suzhou 215007, China)

Abstract: This study was designed to assess whether cadmium chloride could induce DNA damage in lymphocytes of Carassius auratus using single cell gelelectrophoresis (SCGE) assay. 60 Carassius auratus were randomly divided into ten groups with 6 Carassius auratus in each group. For dose-effect groups, the Carassius auratus were injected intraperitoneally with 0.125, 0.313, 0.626 and 1.250 mg · kg⁻¹ water solution of cadmium chloride respectively for 24 h, and a negative control group was set up. At the concentration of 1.250 mg · kg⁻¹, four time-effect groups (12, 24, 48 and 72 h) and a zero time control group were set up. The samples of 1.5 mL blood were obtained in testing time for SCGE assay. The results showed that the average length of DNA migration in all cadmium chloride exposed groups was significantly higher than that of negative control group ($P < 0.05$) and increased gradually with the dose increasing of cadmium chloride. There existed dose-effect relationship, but no time-effect relationship among the tested concentrations ($P < 0.01$). Cadmium chloride could induce DNA damage in lymphocytes of Carassius auratus which might be a better gene toxicant index in water.

Keywords: cadmium; Carassius auratus; SCGE; DNA damage

镉是生物体非必须的有毒重金属元素,由于其在工农业生产过程中应用广泛,目前已成为水环境的主要污染物之一。镉进入水体后,通过食物链在各营养级的生物体内蓄积,使生物种类和数量、群落组成及其结构、生物的生长繁殖及遗传特性发生变化^[1]。以往对其毒性的评价多采用理化、生化分析、LD₅₀测定

等,但这些单一的指标难以反映镉污染对水生生物的总体效应。

单细胞凝胶电泳技术是近年来国内外用于哺乳动物细胞 DNA 损伤检测的一种成熟技术,与传统的 DNA 损伤检测方法相比,它简便、快速、灵敏,适合体内不同类型实验和各种类型细胞。为此,本文采用单细胞凝胶电泳技术 (Single cell gel-electrophoresis SCGE) 研究镉对鲫鱼 (Carassius auratus) 淋巴细胞 DNA 的损伤效应,为水体环境的生物监测,筛选水环

收稿日期: 2004-06-18

基金项目:江苏省自然科学基金社会发展项目(BS2001050)

作者简介:胡晓磐(1962—),男,硕士,讲师,主要从事环境毒理学研究。

E-mail: huxiaopan@suda.edu.cn

境中基因毒剂指标,进一步阐明镉的毒理学作用机制提供更多的线索。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

氯化汞(HgCl_2),分析纯,上海试剂四厂生产;正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖(Biotech 公司);Triton X-100(进口分装);Tris(Amresco 公司);溴化乙锭(Sigma 分装)。水平电泳槽和 DYY-6B 型电泳仪(北京六一仪器厂);荧光显微镜(BX-60 型,OLYMPUS,日本)。

1.2 供试鱼及其饲养

鲫鱼,白鲫种,体重(125 ± 20)g,由苏州某水产养殖场提供,饲养于水簇箱($50\text{ cm} \times 38\text{ cm} \times 40\text{ cm}$)。饲养水采用自来水,自然曝气 2 d,水温 $15\text{ }^\circ\text{C} \sim 20\text{ }^\circ\text{C}$,pH 值为 $6.8 \sim 7.2$,溶解氧为 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,余氯为 0。每天换水一次,每次换水量为原水体积的 $1/3$,用小型气泵充气增氧,饲养 3 d 后无异常开始实验,实验期间不投食。

1.3 处理方法

鲫鱼 60 尾,随机分成 10 组,每组 6 尾。试验分剂量效应和时间效应两部分,剂量效应设 4 个组,在预实验基础上,以鲫鱼不出现急性、亚急性中毒症状为原则,鲫鱼分别腹腔注射 0.125、0.313、0.626 和 $1.250\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 氯化镉,染毒 24 h,另设一个阴性对照组,腹腔注射等容积的鱼用生理盐水;在 $1.250\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 染毒条件下,设 12、24、48、72 h 4 个时间效应组,另设一个 0 时间对照组。各组在规定时间内尾静脉取血 1.5 mL 进行 SCGE 试验。

1.4 实验方法

1.4.1 样品的处理

肝素抗凝血 1.5 mL 溶于等体积的鱼用 PBS 缓冲液,将混合液加入淋巴细胞分离液中, $2\,000\text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 20 min,提取淋巴细胞。

1.4.2 SCGE 试验

按 Singh 等方法^[2]略加改进。取 1.0% 正常熔点琼脂糖 $75\text{ }\mu\text{L}$ 铺于载玻片上成第一层,凝固后将 $10\text{ }\mu\text{L}$ 细胞悬液和 $75\text{ }\mu\text{L}$ 0.7% 低熔点琼脂糖混匀,铺第二层,再用 0.7% 低熔点琼脂糖 $75\text{ }\mu\text{L}$ 铺第三层。待胶完全凝固后玻片放入预冷的细胞裂解液中($2.5\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaCl}$, $100\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{EDTA}$, $10\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Tris}$, 10% DMSO 和 1% Triton X-100)裂解 90 min;之后取出玻片置于盛有新鲜配制电泳液(300

$\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ NaOH}$, $1\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{EDTA}$, pH13)的电泳槽内解旋 30 min;调节电压为 25V,电流为 300mA,电泳 20 min;取出玻片用中和液($0.4\text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}\text{ Tris}$ pH 7.5)冲洗 3 次,甲醇固定 10min,滴加 $40\text{ }\mu\text{L}$ 溴乙锭($2\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)染色 20 min。

用荧光显微镜在 515 nm 的激发波长下观察,每组随机观察 150 个细胞。DNA 出现拖尾现象即为彗星细胞,用目镜测微尺测量彗星细胞的尾长(即 DNA 迁移长度),再计算出每组的平均迁移长度及其标准差。

1.5 统计学处理

采用 SPSS10.0 软件包处理数据,用 ONEWAY-ANOVA 进行方差分析,两两比较采用 Tamhane's T2 法。

2 结果

2.1 不同浓度氯化镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤的影响

由表 1 可知,各剂量组 DNA 平均迁移长度明显增加,与阴性对照组比较差异有显著性($P < 0.05$);另外,随着氯化镉染毒剂量的增加,各剂量组 DNA 平均迁移长度逐渐增加,在实验浓度范围内,存在明显的剂量-效应关系($P < 0.01$),提示氯化镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 有损伤作用,且随着染毒剂量的增加,DNA 损伤加重。

表 1 不同浓度氯化镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤的影响
Table 1 Effect of cadmium at different doses on DNA damage in lymphocytes of Carassius auratus

组别	氯化镉 / $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1}$	观察细胞数	彗星细胞数	DNA 平均迁移长度 / μm , $\bar{x} \pm s$
阴性对照组	0	150	5	8.28 ± 2.60
染毒组	0.125	150	16	$10.26 \pm 4.73^*$
	0.313	150	30	$12.42 \pm 6.49^*$
	0.626	150	50	$14.79 \pm 7.48^*$
	1.250	150	70	$17.26 \pm 8.23^*$

注: * 为与阴性对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 不同染毒时间对鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤的影响

由表 2 可知,在 $1.250\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 染毒条件下,随着染毒时间的延长,DNA 平均迁移长度逐渐增加,24 h 时达到最大值,之后开始下降;与 0 时间组比较,各时间效应组的 DNA 平均迁移长度明显增加,且差异有显著性($P < 0.05$),说明氯化镉在较短的时间内(12 h)即可引起鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤,但未发现明显的时间-效应关系。

表 2 不同染毒时间对鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤的影响

Table 2 Effect of cadmium on DNA damage in lymphocytes of *Carassius auratus* under different exposed times

染毒时间 /h	观察细胞总数	彗星细胞数	DNA 平均迁移长度 / μm , $\bar{x} \pm s$
0	150	5	8.46 ± 2.74
12	150	25	$17.07 \pm 7.58^*$
24	150	70	$18.79 \pm 7.78^*$
48	150	24	$12.81 \pm 4.26^*$
72	150	25	$14.04 \pm 5.98^*$

注：* 为与 0 时间组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

作为一种有毒的重金属物质,镉进入水体后与水体中的各种物质发生相互作用,对生物体产生毒性作用。Jones I 等^[3-5]研究发现:镉对鲫鱼的生长具有抑制作用,且能损伤鲫鱼的脾、肾等器官。本实验通过建立鱼类生物模型,研究了氯化镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤。结果证实,氯化镉可以引起鲫鱼淋巴细胞 DNA 损伤,随着镉剂量的增加, DNA 损伤加重,说明氯化镉对鲫鱼具有遗传毒性作用。检索哺乳动物的相关资料,发现氯化镉可诱发人体外周血淋巴细胞 DNA 单链、双链断裂,且 DNA 双链断裂呈剂量反应关系^[6];余日安、陈学敏^[7]也发现一定剂量的氯化镉能引起离体和在大鼠肝细胞 DNA 损伤。可见,在一定实验条件下,氯化镉可导致不同类型生物细胞的 DNA 损伤。

重金属对鱼类的毒性作用与它在鱼体内的运转、分布、转化、排泄等代谢有关,此外,鱼类暴露于 Zn、Cu、Cd 等重金属均能诱导体内的金属硫蛋白,这些蛋白质在镉的解毒过程中起着重要作用^[8]。因此,镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤是一个复杂的过程,本次实验并未发现氯化镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤存在明显的时间效应关系,这可能和上述原因及 DNA 损伤修复有关,或是由于随着暴露时间的延长, DNA 断裂程度较高,以致在电泳时断片可能丢失^[9]。

有关镉致鱼类的基因毒性研究较少,有限的资料表明,镉易于诱发鱼类细胞染色体畸变,导致红细胞核异常及不同组织中蛋白质发生质和量的变化^[10];鳊鱼肝细胞体外暴露于不同浓度的镉,能诱导细胞凋亡及 DNA 单链断裂^[9];经金属镉离子的诱导,草鱼 ZC7901 细胞 DNA 发生特异降解^[11]。对于镉致鱼类的

基因毒性作用机制更是不甚清楚,有人认为,活性氧族(ROS)在镉致 DNA 单链断裂中发挥了重要作用^[9-12],用 ROS 清除剂和镉同时处理鱼类细胞,能显著降低 DNA 断片的形成及 DNA 单链断裂。由此可以推测,镉引起的细胞 DNA 损伤是由于氧化应激引起脂质过氧化并有自由基的介入。

本研究将 SCGE 技术用于鱼类淋巴细胞的 DNA 损伤的检测,结果表明 SCGE 技术能够检测出鱼类淋巴细胞的 DNA 损伤。由于其无需复杂的实验条件,所需样品量小,分析时间相对较短,敏感性较高,且生物学变化更直接地反映出水环境污染对水生生物的影响,因而鱼类淋巴细胞 DNA 损伤可望成为一个较好的水环境基因毒剂指标。

参考文献:

[1] 孔繁翔. 环境生物学[M]. 北京:高等教育出版社,2001. 77 - 80.

[2] Singh NP, McCoy MT, Tice RR, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cell[J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175(2): 184 - 191.

[3] 丁磊,蔡春芳,吴萍,等. 镉对鲫鱼生长的影响[J]. *淡水渔业*, 2002, 32(1): 56 - 57.

[4] Jones I, Kille P, Sweeney G. Cadmium delays growth hormone expression during rainbow trout development[J]. *J Fish Biol*, 2001, 59: 1015 - 1022.

[5] 丁磊,吴萍,宋学宏,等. 镉对鲫鱼脏系数的影响[J]. *水利渔业*, 2002, 22(4): 18 - 19.

[6] 蔡颖,庄志雄. 镍和镉对人外周血淋巴细胞的 DNA 损伤作用[J]. *中华预防医学杂志*, 1999, 33(2): 75 - 77.

[7] 余日安,陈学敏. 应用单细胞凝胶电泳研究镉对大鼠肝细胞 DNA 损伤的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2000, 17(5): 271 - 273.

[8] Dang Z C, Berntssen M H G, Lundbye A K, et al. Metallothionein cortisol receptor expression in gills of Atlantic salmon, *Salmo salar*, exposed to dietary cadmium[J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 53: 91 - 101.

[9] Risso - de Faverney C, Devaux A, Lafaurie M, et al. Cadmium induces apoptosis and genotoxicity in rainbow trout hepatocytes through generation of reactive oxygene species[J]. *Aquat Toxicol*, 2001, 53: 65 - 76.

[10] Chandra P, Khuda - Bukhsh A R. Genotoxic effects of cadmium chloride and azadirachtin treated singly and in combination in fish[J]. *Ecotox Environ Safety*, 2004, 58: 194 - 201.

[11] 项黎新,邵健忠,孟真. 六种重金属离子胁迫诱导鱼类细胞凋亡的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2001, 28(6): 866 - 869.

[12] Siraj Basha P, Usha Rani A. Cadmium - induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) [J]. *Ecotox Environ Safety*, 2003, 56: 218 - 221.