农业环境科学学报 2010,29(6):1079-1085
Journal of Agro-Environment Science

应用彗星试验研究产毒微囊藻喂食暴露对铜锈环棱螺肝细胞 DNA 的损伤

陆开宏，张双玲，张春景，谢丽凤，梁晶晶

（宁波大学应用海洋生物技术教育部重点实验室，浙江 宁波 315211）

摘 要：把铜锈环棱螺（*Bellamya aeruginosa*）暴露于 3 组不同成分的微藻悬浮液中[蓝藻组：只投喂产毒铜绿微囊藻（*Microcystis aeruginosa*）；混合藻组：50%四尾栅藻（*Scenedesmus quadricanda*）+50%产毒铜绿微囊藻；对照组：只投喂四尾栅藻]，用酶联免疫检测法（Enzyme-linked immuno sorbent assay，ELISA）检测藻液和螺肝组织中的藻毒素浓度。结果表明，藻液中包括藻相和水相的总微囊藻毒素（MCs）浓度分别为：蓝藻组（36.34±4.12）μg·L^{-1}；混合藻组（18.69±2.12）μg·L^{-1}；对照组未检出。在喂食暴露的前 6 h 内，混合藻组和蓝藻组螺肝组织中微囊藻毒素含量持续增长，而后出现下降趋势；第 12 h 更换藻液并将微藻浓度调整至初始值后，肝组织中 MCs 含量又迅速回升。同期螺肝细胞 DNA 损伤指标彗星尾长（TL）、彗星尾距（TM）和彗星尾部 DNA 百分含量（Tail DNA%）也随螺肝组织中 MCs 含量发生相应变化，各项 DNA 损伤指标均在产毒微囊藻喂食暴露 6 h 时达到最大值，之后，各项指标值有所回落，但第 12 h 更换藻液后，DNA 损伤再次加剧。整个实验期间（24 h），混合藻组和蓝藻组的 DNA 损伤指标均显著高于对照组，混合藻组均显著高于蓝藻组。说明铜锈环棱螺经产毒微囊藻喂食暴露后，其肝组织细胞的 DNA 受到损伤，且螺肝组织 MCs 积累越多，DNA 损伤越严重。

关键词：微囊藻毒素；DNA 损伤；彗星试验；铜锈环棱螺
中图分类号：X503.225　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1672-2043(2010)06-1079-07

Detection of DNA Damage in Liver Cells of *Bellamya aeruginosa* Induced by Microcystins with Comet Assay

LU Kai-hong, ZHANG Shuang-ling, ZHANG Chun-jing, XIE Li-feng, LIANG Jing-jing
(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: *Bellamya aeruginosa* is one of the most common freshwater snails in China. It not only can ingest and digest bloom-forming cyanobacteria, but also enrich microcystins (MCs) from the cyanobacteria. Therefore it can be used as a potential indicator organism for monitoring MCs pollution. In this study, comet assay was used to detect the short-term toxic effects on the liver cell of *B. aeruginosa* under different levels of MCs exposure. *B. aeruginosa* was exposed to three different concentrations of MCs, respectively, presented in three different components of the microalgae suspension (Cyanobacteria group: MC-producing *Microcystis aeruginosa* only; mixed algal group: 50% *Scenedesmus quadricanda* +50% MC-producing *M. aeruginosa*; and control group: *S. quadricauda* only). Concentration of MCs in the microalgae suspension and the hepatic tissue of the snails was measured using the enzyme-linked immuno-sorbent assay (ELISA). The average MCs concentrations of the microalgae suspension were (36.34±4.12) μg·L^{-1} for the cyanobacteria group, (18.69±2.12) μg·L^{-1} for the mixed algal group, and undetectable for the control group. The MCs concentration in the liver of *B. aeruginosa* continued to increase both in the cyanobacteria and the mixed algal groups, and reached the maxima at 6 h post-exposure, followed by a decline, however, it increased rapidly after the density of the algae was adjusted to the initial value at the 12th hour. The MCs concentration in the hepatic tissue of the mixed algae group was significantly higher than that of the cyanobacteria group, whereas the MCs was either below detection or in trace concentrations in the control group. Over the same period, the DNA damage indices [comet tail length (TL), tail moment (TM) and the percentage of comet tail DNA content (Tail DNA%)] in the liver cells of *B. aeruginosa* changed correspondingly to the MCs concentrations in the hepatic tissue, and reached the maxima at 6 h post-exposure, followed by slight decline. However, the indices values increased again after the replacement of algal solution at the 12th hour. During the entire experiment (24 h), the snail's DNA damage index of the mixed algal group was significantly higher than that of the cyanobacteria group, and both treatment groups were significantly higher than the control group. Our study showed that

收稿日期：2009-11-28
基金项目：国家自然科学基金（30771658）；浙江省自然科学基金（Z505319）
作者简介：陆开宏（1964—），男，浙江余姚人，教授，博士生导师，研究方向水生生态。E-mail：lukaihong@nbu.edu.cn

the snail's liver cell's DNA could be damaged after feeding on MC-producing cyanobacteria, and the degree of damage increased with increasing MCs concentration.

Keywords: microcystins(MCs); DNA damage; comet assay; *Bellamya aeruginosa*

微囊藻毒素(microcystins,MCs)是一类具有生物活性的环状七肽化合物,为分布最广泛的肝毒素。由于它们的高急性毒性、强促癌活性以及与人类癌症发生的相关性使其受到全球的关注[1]。DNA 是生物体内的遗传物质,它的稳定对于生命体的正常繁殖与生长至关重要。然而环境中各种理化及生物因子,如电离辐射、各种氧化剂、病菌、MCs 等都可能引起 DNA 损伤。多年的研究表明,至少人类的两大问题——癌症与衰老与 DNA 损伤密切相关。因此,DNA 的损伤及测定越来越引起人们的重视。

测定 DNA 损伤的方法有很多种[2],其中彗星试验(comet assay),又称单细胞凝胶电泳试验(single cell gel electrophoresis assay,SCGE)被认为是一种简便、快速、敏感性高的 DNA 损伤与修复的检测技术[3]。彗星试验可以定量检测真核细胞中的多种 DNA 损伤[4],如单链断裂、双链断裂、碱基不稳定位点、不完全修复位点和 DNA 交联等[5]。Mitchelmore 等[6]认为,彗星试验敏感、快速、经济,特别适用于鱼类和其他水生生物的遗传毒理学检测,可以作为非特异性的生物标记,对于研究水体有机污染物对鱼类乃至所有水生生物的潜在危害及其遗传毒理学原理具有重要的意义。目前,彗星试验已经被用于检测哺乳动物、蚯蚓、一些高等植物、鱼类、两栖动物以及某些海洋无脊椎动物的细胞DNA 损伤[7-12]。但是,利用彗星试验开展有关 MCs 对细胞 DNA 损伤作用的毒理学研究,还仅局限于人、大鼠和小鼠等少数哺乳动物[13-20],MCs 对水生动物细胞 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳研究鲜有报道。作为淡水生态系统的重要组分,螺类的摄食与生理代谢显著影响着水层中包括颗粒悬浮物、营养盐和浮游藻类的种类和数量组成,在构建水生群落结构和食物链传递中发挥着重要作用。

铜锈环棱螺(*Bellamya aeruginosa*)是我国最常见的淡水螺类之一,不仅能摄食消化水华蓝藻,同时对 MCs 具有较强的富集能力[21-22],是水体 MCs 污染监测的潜在指示生物。本文运用彗星试验探索不同含量 MCs 微藻喂食暴露对铜锈环棱螺肝组织细胞的短期毒性效应,以期通过量化 MCs 暴露对螺肝组织细胞 DNA 的损伤程度,为 MCs 对水生无脊椎动物的生态毒性效应及其遗传毒性机制的研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

铜绿微囊藻(*Microcystis aeruginosa*)和四尾栅藻(*Scenedesmus quadricanda*)藻种由宁波大学水域生态与环境实验室提供,铜绿微囊藻采用 BG11 培养基于锥形瓶内培养,温度(25±1)℃,光照 36 μE·m^{-2}·s^{-1},光暗比 12 h:12 h;四尾栅藻采用"浙水院 3 号"培养基通气培养,室温,自然光照。

实验所用铜锈环棱螺采自宁波姚江流域同一小型水体。螺类采回后,清除其体表附着生物及污物,置于实验室水族缸内已曝气过的自来水中暂养,每日换水并以四尾栅藻喂食,死亡的螺及时挑出。

1.2 喂食暴露和取样

试验前将螺饥饿 2 d,挑选活力好的个体放于培养箱中 24 h 适应实验条件。24 h 后再将活力差的螺挑出。试验分以下 3 组:(1)单独投喂铜绿微囊藻(以下简称蓝藻组);(2) 投喂 50%铜绿微囊藻+50%四尾栅藻的混合藻液(细胞数量比,以下简称混合藻组);(3)单独投喂四尾栅藻(以下简称对照组)。试验开始时,先用血球计数板法计数培养好的原藻液浓度,再根据螺的数目、所需藻液的浓度和体积计算所需要的藻液体积,用经脱脂棉过滤和煮沸处理后的自来水配好试验所需藻液,再对藻液计数,以求精确。各组藻类起始总浓度均设定为 1×10^6 cells·mL^{-1}。

每组用 3 个 1 L 烧杯(3 个重复),每个烧杯分别放入洗净后的螺 9 个,初始时,每个烧杯放 900 mL 试验藻液,保持每个螺负荷 100 mL 藻液的密度。试验进行至第 3、6、12、24 h 时,每个烧杯各取 2 个螺分别用于毒素测定和彗星试验。试验期间,随着试验螺数量的减少,藻液也相应减少。将所有的烧杯放于光照培养箱中。温度(25±1)℃,光照 36 μE·m^{-2}·s^{-1},光暗比 12 h:12 h。试验进行至第 12 h 时更换藻液,调整微藻密度至初始浓度。

1.3 藻毒素测定

采用美国 Beacon 公司生产的 MCs 检测试剂盒对试验所用的微囊藻、栅藻悬浮液和铜锈环棱螺肝组织进行 ELISA 法检测。螺肝组织样品的处理参照张维昊等[23]的方法。

取试验用藻液 1 mL，冻融 3 次后于 10 000 r·min^{-1} 下离心 10 min，取上清液用 ELISA 法分析藻液的藻毒素浓度(包括藻相和水相中的毒素)。

1.4 彗星试验步骤

按 Singh 等[24]描述的方法稍作改良。

1.4.1 准备细胞

取螺的肝组织，4 ℃冷超纯水洗去污渍后，用滤纸吸干表面水分，置于已加入 400 μL 4 ℃冷磷酸缓冲液(PBS)的 1.5 mL 离心管中，用眼科剪剪碎，静止 3 min 后取上清液于 500 μL 离心管中，置于 4 ℃冰箱中备用。按照上述方法获得的细胞经台盼蓝染色，统计细胞存活率，均在 95%以上。试验前，调整细胞密度为 1×10^6 cells·mL^{-1}。

1.4.2 铺胶

在微波炉中加热 0.8%正常熔点琼脂糖至胶体完全熔解成透明液体，在电炉上烘烤彗星载玻片后，用移液器迅速滴加正常熔点琼脂糖溶液于彗星载玻片的每个孔里，使每个孔均匀的铺上薄薄的一层，制成第一层胶。4 ℃下固化 15 min 后，取出载玻片于室温下静止 3 min，取新鲜制备的细胞悬液 15 μL，与 75 μL 0.7%低熔点琼脂糖混匀后快速滴加到第 1 层胶上，用移液器吸取多余溶液，使溶液只在第一层的胶体的表面形成薄薄的一层，制成第二层胶。4 ℃固化 15 min。

1.4.3 裂解

将凝胶载玻片水平浸没于装有新配制的、预冷的裂解液的平皿中，4 ℃下裂解 3 h。

1.4.4 DNA 碱解旋

取出载玻片用冷超纯水漂洗 3 次，每次 5 min(置于冰箱中)，共计 15 min。然后将载玻片移入水平电泳槽中阳极端。倒入预冷的电泳缓冲液覆过玻片约 2.5 mm，避免出现气泡。4 ℃下避光解旋 30 min。

1.4.5 细胞电泳

电压 25 V，电流 300 mA。电压、电流采用改变电泳缓冲液面高低来调节，电泳时间 30 min。

1.4.6 中和

电泳完毕，从电泳槽中取出玻片放置到平皿中，加入预冷的 Tris-HCl 中和缓冲液(pH=7.4)置于冰箱中，中和 5 min 后，倒掉反应液，重新加入预冷的 Tris-HCl 缓冲液。重复 3 次，每次反应 5 min，共计 15 min。

1.4.7 染色、镜检

取出载玻片，用滤纸吸干表面水分，暗处每孔滴加 10 μL 100 μg·mL^{-1} EB 染色，5 min 后用荧光显镜观察(激发波长 515~560 nm，滤过波长 590 nm)。每组制作 3 张载玻片(4 孔)凝胶体。

1.5 观察与分析

每组随机观察 300 个细胞，并拍照。所摄图像用彗星图像分析软件 (TriTek CometScore™ software)进行分析，所有数据均以 50 个平行组数据的平均值±标准差(Means±SD)表示，并采用 SPSS13.0 进行单因素方差分析(ANOVA)和相关性分析。量效关系、时效关系均采用单因素方差分析判断总体显著性差异，组间资料采用 Fisher's least-significant difference (LSD)分析统计学差异。本实验所分析的指标有：彗星尾长(Tail Length，TL)，彗星尾距(Tail Moment，TM)，彗星尾部 DNA 百分含量 (Tail DNA%)。根据彗星尾部 DNA 百分含量，将 DNA 损伤程度分为 5 级[25]：

0 级：<5%，无损伤，细胞无拖尾，只有一个圆形细胞核形成的荧光头；

1 级：5%~20%，低度损伤，有少量拖尾；

2 级：20%~40%，中度损伤，出现明显拖尾；

3 级：40%~95%，高度损伤，出现严重拖尾；

4 级：>95%，重度损伤，成为片断。

2 结果与分析

2.1 MCs 在铜锈环棱螺肝组织内的积累

先后于试验开始时和试验 12 h 更换藻液后测定各处理组藻液毒素浓度，测得结果为：混合藻组藻液水相和藻相的总 MCs 浓度平均为(18.69±2.12)μg·L^{-1}；蓝藻组为(36.34±4.12)μg·L^{-1}；对照组藻液则没有检测到 MCs。

铜锈环棱螺肝组织内 MCs 含量变化如图 1。试验开始后，两个处理组螺肝组织中 MCs 迅速积累，并在喂食暴露 6 h 时达到最大值，其中，混合藻组螺肝组织 MCs 积累量达 (17.65±0.69)ng·g^{-1}*WW*，蓝藻组(16.16 ±0.52)ng·g^{-1}*WW*，同期混合藻组螺肝 MCs 含量要显著高于蓝藻组(P<0.05)；之后，两个处理组的螺肝组织 MCs 含量均呈缓慢下降趋势，直至第 12 h 重新调整藻液浓度后，肝组织中 MCs 含量又迅速回升。在此期间，对照组螺肝组织中没有或仅监测到微量 MCs。

2.2 MCs 对铜锈环棱螺肝组织细胞 DNA 损伤的影响

分析所得的各项 DNA 损伤指标彗星尾长、彗星尾距和彗星尾部 DNA 百分含量情况分别见表 1~表 3，彗星图像见图 2。

由表 1 可知，同一处理时间内，不同处理组铜锈

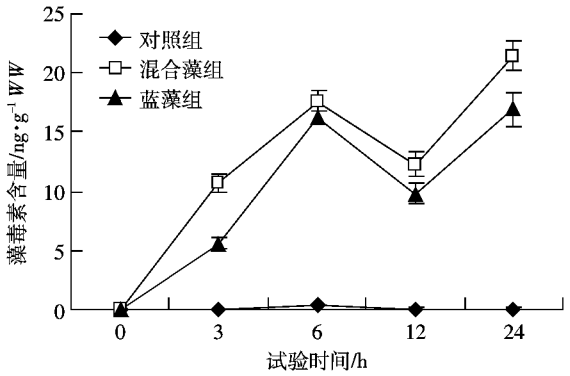


图 1 MCs 在铜锈环棱螺肝组织内的积累

Figure 1 Accumulation of MCs in the liver of *B. aeruginosa*

环棱螺肝组织细胞彗星尾长(TL)有极显著差异($P<0.01$),同期,混合藻和蓝藻组的 TL 值均显著高于对照组,混合藻组均显著高于蓝藻组($P<0.01$);同一处理组不同处理时间的 TL 之间也有极显著差异($P<0.01$);产毒微囊藻喂食暴露后,TL 在两处理组均表现为增加,并在 6 h 时达到最大值,混合藻组 TL 为(66.2±8.70)μm,蓝藻组为(58.45±3.94)μm,之后,两处理组 TL 缓慢降低,至 12 h 时,混合藻组下降至(24.6±2.78)μm,蓝藻组下降至(16.55±3.24)μm;第 12 h 调整藻液浓度后,TL 再次增加,至 24 h 时,混合藻组 TL 增加至(73.1±5.25)μm,蓝藻组增加至(50.05±4.66)μm,而对照组在不同处理时间的 TL 之间无显著差异。

由表 2 可知,同一时间不同处理组铜锈环棱螺肝组织细胞彗星尾距(TM)有极显著差异($P<0.01$),同期,混合藻和蓝藻组的 TM 值均显著高于对照组,混合藻组均显著高于蓝藻组($P<0.01$);同一处理组不同处理时间的 TM 之间也有极显著差异($P<0.01$),且表现出与 TL 一样的变化动态。

由表 3 可知,同一时间不同处理组铜锈环棱螺肝

表 1 MCs 对铜锈环棱螺肝组织细胞彗星尾长(TL)的影响

Table 1 Effects of MCs on tail length in the liver cells of *Bellamya aeruginosa*

处理组	不同观察时间彗星尾长/μm					
	3 h	6 h	12 h	24 h	*F*	*P*
对照组	3.15±0.86	2.9±1.25	3.55±1.28	2.8±0.89	1.876	0.141
混合藻组	26±4.05**	66.2±8.70**	24.6±2.78**	73.1±5.25**	417.031	0.000
蓝藻组	14.7±4.38**	58.45±3.94**	16.55±3.24**	50.05±4.66**	609.444	0.000
F	215.434	771.318	341.417	1 538.034		
P	0.000	0.000	0.000	0.000		

注:与对照组相比:*$P<0.05$,**$P<0.01$。下同。

表 2 MCs 对铜锈环棱螺肝组织细胞彗星尾距(TM)的影响

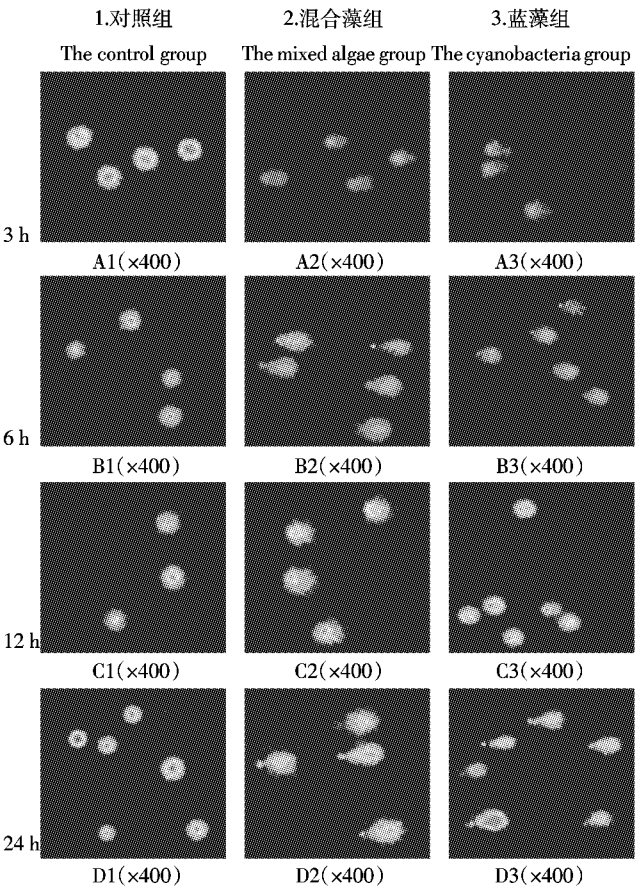
Table 2 Effects of MCs on tail moment in the liver cells of *Bellamya aeruginosa*

处理组	不同观察时间彗星尾长/μm					
	3 h	6 h	12 h	24 h	*F*	*P*
对照组	0.083±0.045	0.078±0.051	0.13±0.065	0.13±0.047	6.339	0.001
混合藻组	5.63±1.03**	34.74±4.06**	8.15±1.39**	59.29±4.06**	677.429	0.000
蓝藻组	2.40±1.34**	30.89±7.35**	3.99±1.10**	26.14±3.43**	666.794	0.000
F	163.072	307.471	308.137	1 867.412		
P	0.000	0.000	0.000	0.000		

表 3 MCs 对铜锈环棱螺肝组织细胞彗星尾部 DNA 含量的影响

Table 3 Effects of MCs on tail DNA% in the liver cells of *Bellamya aeruginosa*

处理组	不同观察时间彗星尾部 DNA 含量 / Tail DNA%					
	3 h	6 h	12 h	24 h	*F*	*P*
对照组	2.57±1.28	2.55±1.10	3.62±1.32	4.79±0.69	17.855	0.000
混合藻组	21.90±4.04**	59.47±5.94**	33.14±4.42**	81.38±6.67**	302.067	0.000
蓝藻组	15.50±6.16**	46.86±9.80**	24.03±4.45**	52.40±6.50**	269.614	0.000
F	103.964	404.561	333.568	1 027.812		
P	0.000	0.000	0.000	0.000		



A:染毒 3 h; B:染毒 6 h; C:染毒 12 h; D:染毒 24 h

A:Exposed to MCs for 3 h; B:Exposed for 6 h; C:Exposed for 12 h; D:Exposed for 24 h

图 2 铜锈环棱螺肝细胞彗星图像

Figure 2 Comet image of liver cell of *Bellamya aeruginosa*

组织细胞彗星尾部 DNA 百分含量(Tail DNA%)有极显著差异($P<0.01$),混合藻和蓝藻组的 Tail DNA%值均显著高于对照组,混合藻组均显著高于蓝藻组($P<0.01$);同一处理组不同处理时间的 Tail DNA%之间也有极显著差异($P<0.01$)。产毒微囊藻喂食暴露后,Tail DNA%在两处理组均表现为增加,在 3 h 时DNA 损伤均为 1 级损伤,在 6 h 时达到最大值,混合藻组 Tail DNA%为(59.47±5.94)%,为 3 级损伤,蓝藻组为(46.86±9.80)%,主要为 3 级损伤,部分为 2 级损伤;之后,两处理组 Tail DNA%缓慢降低,至 12 h 时,Tail DNA%在混合藻组下降至(33.14±4.42)%,为 2 级损伤,在蓝藻组下降至(24.03±4.45)%,主要为 2 级损伤,部分为 1 级损伤;第 12 h 调整藻液浓度后,Tail DNA%再次增加,至 24 h 时,混合藻组 Tail DNA%增加为(81.38±6.67)%,主要为 3 级损伤,部分为 4 级损伤,蓝藻组则增加至(52.40±6.50)%,为 3 级损伤。

表 4 TL、TM 和 Tail DNA%分别和螺肝组织中毒素含量的相关关系矩阵

Table 4 Correlation between tail length、tail moment or tail DNA% and MCs content in the liver of *B. aeruginosa*.

	MCs	TL	TM	Tail DNA%
MCs	1			
TL	0.954**	1		
TM	0.871**	0.947**	1	
Tail DNA%	0.959**	0.961**	0.96**	1

注:显著水平 *$P<0.05$,**$P<0.01$。

TL、TM 和 Tail DNA%分别和螺肝组织中毒素含量的相关关系矩阵可见(表 4),TL、TM 和 Tail DNA%的变化与 MCs 在螺肝组织中的积累动态高度一致。

3 讨论

3.1 MCs 在铜锈环棱螺肝组织内的积累

试验可知,产毒微囊藻喂食暴露后的数小时内,微囊藻毒素即在螺肝组织内迅速积累,两处理组螺肝组织 MCs 含量均表现为先增加后减少,在补充藻液后再增加的趋势,且混合藻组螺肝组织内 MCs 积累速率快、同期肝组织中 MCs 含量也显著高于蓝藻组。本研究与实验室前期研究结果[21-22]说明,螺体在由产毒蓝藻与不产毒绿藻混合的相对低浓度 MCs 暴露中,比单一产毒蓝藻的高浓度 MCs 暴露在肝组织中更易积累毒素。在 MCs 的积累过程中,影响毒素积累的因素有很多,如:摄藻动物的自我保护机制(紧闭其厣)[26]、食性选择(通过假粪)[26]、体内毒素的快速降解[27]、摄藻后动物机体内解毒酶活性被激活[22,28]等。结合国内外资料,作者认为,高浓度的 MCs 暴露之所以没有导致螺肝组织中高浓度的 MCs 积累,可能因为高浓度的 MCs 使螺本身出现某种抵御机制所致。事实上,长期暴露于高浓度下的螺类,多数时间紧闭足厣,摄食量也明显比低 MCs 浓度的混合藻组螺类少,一定程度上减少了摄食和滤水这两条暴露途径的毒素积累。

3.2 MCs 对铜锈环棱螺肝组织细胞 DNA 损伤的影响

彗星试验时,在细胞裂解液的作用下,有核细胞的生物膜破坏,使细胞内的 RNA、蛋白质及其他成分进入凝胶,继而扩散到裂解液中,只有核 DNA 仍附着在剩余的核骨架上而留在原位。如果细胞未受损伤,电泳中核 DNA 停留在核基质中,经荧光染色后呈现圆形的荧光团,无拖尾现象。若细胞受到损伤,在碱性电泳液(pH>13)中,先是 DNA 双链解螺旋且碱变性

为单链,单链断裂的碎片离开核 DNA 向阳极迁移,形成拖尾。细胞核 DNA 受损伤越严重,产生的断链或碱变性断片就越多,片段也越小,电泳表现为尾长增加和尾部荧光增强。

宋瑞霞等[29]对太湖水华中 MCs 进行彗星试验显示,MCs 对 V79 细胞 DNA 直接造成断裂损伤,使断裂的 DNA 片断在碱性环境中电泳时迁移速度加快,脱离未断裂的双链 DNA,形成明显的"拖尾"现象,使彗星样细胞百分率及损伤程度都显著高于对照组。周珏平等[19]也在研究中发现,不同剂量的 MCs 均可引起外周血淋巴细胞 DNA 迁移长度增加,且有剂量-反应关系,DING 等[17]在彗星试验中观察到 MCs 对大鼠原代肝细胞 DNA 的损伤;胡小磐等[31]以鲫鱼(*Carassius auratus*)作为受试物,采用彗星试验,研究不同浓度不同染毒时间氯化镉($CdCl_2$)对鲫鱼淋巴细胞的 DNA 损伤。结果显示,在试验浓度范围内,存在明显的剂量-效应关系($P<0.01$),但未见明显时间-效应关系。本试验中,螺肝组织细胞的彗星尾长、彗星尾距和彗星尾部 DNA 百分含量分别随着螺肝组织中 MCs 含量的增加而增加,一定时间内,随时间延长而增加,说明经 MCs 暴露后使螺肝组织细胞 DNA 受到损伤,且螺肝 MCs 含量越高,损伤程度也越高;作用时间越长,损伤程度也越高。Žegura 等[13]在 MC-LR 导致人肝细胞瘤 HepG2 细胞 DNA 损伤的研究中指出,在 HepG2 细胞中,MC-LR 导致的 DNA 损伤与 MC-LR 呈现剂量-效应和时间-效应关系;Rao 等[16]在对小鼠的 MC-LR 染毒试验中,也得出了一致的结论。综合国内外所报道的彗星试验结果,可以认为,MCs 作用过程中确实存在着 DNA 损伤,且有明显的剂量-效应和时间-效应关系,但因为遗传物质本身对外界因素比较敏感,这种损伤是否仅由 MCs 的毒性作用所致,还有待通过更加深入的研究证明[31]。

有研究指出,DNA 损伤程度与 DNA 链断裂形式和 DNA 修复过程有关,直接导致的 DNA 单链断裂可以由机体快速地自我修复,这种损伤是不致命的[32]。很多遗传毒素导致的 DNA 单链断裂是间接的,这种情况下,在 DNA 修复期间出现的 DNA 断裂和碱性不稳定位点只是暂时的[33]。本试验中由产毒微囊藻喂食暴露引起的 DNA 损伤在第 6 h 时达到最高水平,然后随着螺肝组织内 MCs 含量降低 DNA 损伤也相应减弱,说明 DNA 损伤得以修复。12 h 调整微藻密度(恢复 MCs 暴露浓度)后,螺肝组织内 MCs 含量再次增加,DNA 损伤也再次加重,由此我们可推断:在较短的暴露时间内,MCs 导致的螺肝细胞的 DNA 损伤可能只是暂时的,在解除或降低 MCs 毒性后,可以通过机体自身修复;如果长时间持续染毒,可能会造成永久性的 DNA 损伤。有关这一点,还有待于后续试验予以验证。目前,MCs 引起 DNA 损伤的机理尚不十分明确,可能与活性氧(Reactive oxygen speties,ROS)有关,有研究认为,MCs 通过刺激细胞产生或蓄积大量的活性氧,最终对细胞 DNA 产生氧化损伤作用[13,34]。

4 结论

(1)把铜锈环棱螺暴露于产毒铜绿微囊藻悬浮液、或产毒微囊藻与单细胞绿藻的混合悬浮液后,微囊藻毒素(MCs)能在螺肝组织中快速积累,且螺肝组织在相对低浓度 MCs 的混合藻液中更易积累毒素。

(2)铜锈环棱螺经产毒微囊藻喂食暴露后,其肝组织细胞的 DNA 受到损伤。螺肝组织细胞的彗星尾长、彗星尾距和彗星尾部 DNA 百分含量均随螺肝组织中 MCs 含量的增加而增加,说明螺肝组织 MCs 含量越高,DNA 损伤程度也越严重。

(3)在较短的暴露时间内,MCs 导致的螺肝细胞 DNA 损伤可能只是暂时的,在解除或降低 MCs 毒性后,可以通过机体自身修复。有关这一点,还有待于后续试验予以验证。

参考文献:

[1] 陈加平, 翁登坡, 傅文宇, 等. 微囊藻毒素 LR 对大鼠淋巴细胞 DNA 的损伤效应[J]. 水生生物学报, 2004, 28(6):677-678.
CHEN J P, WENG D P, FU W Y, et al. Damage of microcystin-LR on rat lymphocytes DNA[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2004, 28(6):677-678.

[2] 夏 璐, 丘冠英. DNA 链断裂检测技术的进展 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1997, 24(1):31-35.
XIA L, QIU G Y. Recent progress of methodology in measuring DNA damages[J]. *Prog Biochem Biophys*, 1997, 24(1):31-35.

[3] Marzin D. New approaches to estimating the mutagenic potential of chemicals[J]. *Cell Bio Toxicol*, 1999, 15:359-365.

[4] Ticc R R, Agurell E, Anderson D, et al. Single cell gel/comet assay: Guidelines for in vitro and in vivo gentic toxicology testing [J]. *Environ Mol Mutagen*, 2000, 35(3):206-221.

[5] Horváthová E, Slameňová D, Hlincíková L, et al. The nature and origin of DNA single-strand breaks determined with the comet assay[J]. *Mutat Res*, 1998, 409:163-171.

[6] Mitchelmore C L, Chipman J K. DNA strand breakage in aquatic organisms and the potential value of comet assay in environmental monitoring[J]. *Mutat Res*, 1998, 399(2):135-147.

[7] Woods J A, O'Leary K A, McCarthy R P, et al. Preservation of comet assay slides: Comparison with fresh slides [J]. *Mutat Res*, 1999, 429(2):181-187.

[8] Larno V, Laroche J, Launey S, et al. Responses of Chub (*Lerciscus cephalus*) population to chemical stress, assessed by genetic markers, DNA damage and cytochrome P450IA induction[J]. *Ecotoxicol*, 2000, 10:145-158.

[9] Clements C, Ralph S, Petras M. Genotoxicity of select herbicides in Rana catesbelana tadpoles using the alkaline single-cell DNA electrophoresis (comet) assay[J]. *Environmental Molecular Mutagenesis*, 1997, 29:277-288.

[10] 季　遥, 沈盎绿, 平仙隐, 等. 废电池浸出液对鲫鱼红细胞 DNA 损伤的研究[J]. 农业环境科学学报, 2007, 26(3):1178-1182.
JI Y, SHEN A L, PING X Y, et al. Effects of waste battery lixivium on DNA damage of *Carassius auratus* erythrocyte[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(3):1178-1182.

[11] Chen L, Li X B, Yang G T, et al. DNA damage in brain cells of gold crucian carp induced by Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2008, 3(2):144-148.

[12] 薛良义, 李　卢, 聂松平. 苯酚和对苯二酚对鲫鱼血细胞 DNA 损伤的研究[J]. 水生生物学报, 2006, 30(2):241-243.
XUE L Y, LI L, NIE S P. Studies on DNA damage of the blood cells in *Carassius auratus* induced by phenol and hydroquinone[J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, 30(2):241-243.

[13] Žegura B, Sedmak B, Filipic M. Microcystin-LR induces oxidative DNA damage in human hepatoma cell line HepG2[J]. *Toxicon*, 2003, 41:41-48.

[14] Žegura B, Tamara T L, Filipič M. The role of reactive oxygen species in microcystin-LR-induced DNA damage[J]. *Toxicology*, 2004, 200:59-68.

[15] Maidana M, Carlis V, Galhardi F G, et al. Effects of microcystins over short-and long-term memory and oxidative stress generation in hippocampus of rats[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2006, 159:223-234.

[16] Lakshmana Rao P V, Bhattacharya R. The cyanobacterial toxin microcystin-LR induces DNA damage in mouse liver in vivo[J]. *Toxicology*, 1996, 114(1):29-36.

[17] Ding W X, Shen H M, Zhu H G, et al. Genotoxicity of microcystic cyanobacteria extract of a water source in China[J]. *Murat Res*, 1999, 442(2):69-77.

[18] 张占英, 俞顺章, 陈传炜. 微囊藻毒素 LR 对 DNA 和自然杀伤细胞的损伤效应研究[J]. 中华预防医学杂志, 2001, 35(2):75-78.
ZHANG Z Y, YU S Z, CHEN C W. Study on the effects of DNA and natural killer cell damage induced by microcystins LR [J]. *Chin J Prev Med*, 2001, 35(2):75-78.

[19] 周珏平, 沈建国, 童　建. 微囊藻毒素 LR 对小鼠肝脏和淋巴细胞的损伤效应[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(1):41-42.
ZHOU J P, SHEN J G, TONG J. Adverse effect of microcystin-LR on mouse liver and lymphocytes[J]. *J Environ Occup Med*, 2003, 20(1):41-42.

[20] 农清清, 张志勇, 何　敏, 等. 微囊藻毒素-LR 对 HL60 细胞遗传毒作用的研究[J]. 中国热带医学, 2008, 8(6):898-899.
NONG Q Q, ZHANG Z Y, HE M, et al. Genotoxic effects of microcystin-LR on HL60 cells [J]. *China Tropical Medicine*, 2008, 8(6):898-899.

[21] 潘洁慧, 陆开宏. 铜锈环棱螺对微囊藻的摄食及其毒素积累研究[J]. 宁波大学学报(理工版), 2008, 21(4):479-484.
PAN J H, LU K H. Ingestion of microcystis aeruginosa and accumulation of microcystins by *Bellamya aeruginosa* under laboratory conditions[J]. *Journal of Ningbo University*, 2008, 21(4):479-484.

[22] 张双玲, 陆开宏, 郑忠明, 等. 微囊藻毒素在铜锈环棱螺肝组织中的累积、降解及对三种酶活性的影响[J], 农业环境科学学报, 2009, 28(1)54-59.
ZHANG S L, LU K H, ZHENG Z M, et al, Accumulation and degradation of microcyctins and their effects on activities of three kinds of ebzymes in liver of *Bellamya aeruginosa* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(1)54-59.

[23] 张维昊, 金丽娜, 徐小青. 鱼肉中微囊藻毒素的高效液相色谱法分析[J]. 分析科学学报, 2001, 17(2):117-119.
ZHANG W H, JIN L N, XU X Q. Determination of microcystins in fish by high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Analytical Science*, 2001, 17(2):117-119.

[24] Singh N P, MoCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. *Exp Cell Res*, 1988, 175:184-191.

[25] Goerin P L. Handbook of experimental phermarolgy[M]. New York: Spring verlag, 1995:187-213.

[26] Vanderploeg H A, Liebig J R, Carmichael W W, et al. Zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) selective filtration promoted toxic microcystis blooms in Saginaw Bay (*Lake Huron*) and Lake Erie[J]. *Can J Fish Aquat Sci*, 2001, 58:1208-1221.

[27] Dionisio Pires L M, Karlsson K, Meriluoto J A O, et al. Assimilation and depuration of microcystin-LR by the zebra mussel, Dreissena polymorpha[J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 69:385-396.

[28] Pflugmacher S, Ame V, Wiegand C, et al. Cyanobacterial toxins and endotoxins-their origin and their ecophysiological effects in aquatic organisms[J]. *Wasser Boden*, 2001, 53:15-20.

[29] 宋瑞霞, 刘征涛, 沈萍萍. 太湖微囊藻毒素对细胞染色体及 DNA 损伤效应[J]. 中国公共卫生, 2004, 20(12):1446-1447.
SONG R X, LIU Z T, SHEN P P. Injury effect of microcystins extracted from Taihu Lake on chromosome and DNA[J]. *Chin J Public Health*, 2004, 20(12):1446-1447.

[30] 胡晓磐, 周建华, 时夕金. 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[J]. 农业环境科学学报, 2005, 24(1):43-45.
HU X P, ZHOU J H, SHI X J. Detection of DNA damage in carassius auratus lymphocytes induced by cadmium with single cell gelelectrophoresis assay[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2005, 24(1):43-45

[31] 杨松芹. 微囊藻毒素遗传毒性研究进展[J]. 卫生研究, 2007, 36(1):117-119.
YANG S Q. Advances in the study of genotoxicity of microcystins[J]. *Journal of Hygiene Research*, 2007, 36(1):117-119.

[32] Frankenberg-Schwager M. Review of repair kinetics for DNA damage induced in eucaryotic cells in vitro by ionizing radiation[J]. *Radiother Oncol*, 1989, 14:307-320.

[33] Collins A R, Dobson V L, Dušinska M, et al. The comet assay: What can it really tell us?[J]. *Mutat Res*, 1997, 375:183-193.

[34] Gehringer MM. Microcystin-LR and okadaic acid-induced cellular effects: A dualistic response[J]. *FEBS Lett*, 2004, 557(3):1-8.