

重金属在鲫鱼卵巢的富集及对卵细胞的损伤效应

唐建勋¹ 唐奕扬² 陶晓敏³ 程樟顺³ 邢承华¹

(1. 金华职业技术学院农业与生物工程学院, 金华 321007; 2. 金华海月传媒技术有限公司, 金华 321017;
3. 金华职业技术学院制药与材料学院, 金华 321007)

ENRICHMENT OF HEAVY METALS IN OVARY AND ITS DAMAGE EFFECTS TO OCYTE IN *CARASSIUS AURATUS*

TANG Jian-Xun¹, TANG Yi-Yang², TAO Xiao-Min³, CHENG Zhang-Shun³ and XING Cheng-Hua¹

(1. Department of Agriculture and Bio-engineering, Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua, 321007 China;
2. Jinhua Sea Moon Media Technology Co., Ltd., Jinhua, 321007 China; 3. Department of Pharmacy and Material,
Jinhua College of Profession and Technology, Jinhua, 321007 China)

关键词: 鲫鱼; 卵巢; 卵细胞; Pb^{2+} ; Cu^{2+} ; 富集

Key words: *Carassius auratus*; Ovary; Ovum; Pb^{2+} ; Cu^{2+} ; Enrichment

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2012)03-0573-05

近些年来,随着国民经济的快速发展,环境和生态问题也日益凸显,其中水域环境受重金属的污染亦愈演愈烈,水生动物的生存受到严峻的挑战。在水环境中,各种重金属元素不但在水生动物的皮肤、肌肉、鳃和其他内脏器官中富集^[1-4],而且在其赖以生息繁衍、绵延种群的生殖器官富集并构成威胁^[5-7]。因此,进行鱼类生殖器官的重金属富集与胁迫效应研究,对于开展水生动物繁殖保护和保护生物多样性等都具有显而易见的现实意义。

铅(Pb^{2+})与铜(Cu^{2+})是水体中常见的重金属污染物,其特点是在环境中不易降解且能通过食物链富集放大^[8],从而对人类的健康带来潜在的危害。本文以淡水水域广泛分布的鲫鱼(*Carassius auratus*)为实验对象,研究重金属 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 在鲫鱼卵巢的富集规律及其对卵细胞发育的胁迫效应,旨在为渔业资源保护、环境毒理学、环境污染诊断学等提供一定的理论依据。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

实验前分别将 $PbCl_2$ (AR)、 $CuCl_2$ (GR)配制成质量浓度为 1000 mg/L 的母液,再根据需要稀释成各相应的浓度

注入水族箱内。以 4:1 比例将 $HClO_4$ (GR)、 HNO_3 (GR)混合待用。实验对象为 2 龄鲫鱼(♀),购自本地水产品市场;鲫鱼平均体重(35 ± 0.39) g($n=96$);平均体长(12 ± 2.8) cm。

1.2 仪器设备

LSP 型远红外消煮炉; KD 型(冰冻)切片机; PHS-3C 型 pH 计; DGG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱; AA800 型原子吸收光谱仪; 2040 型自动消解仪; CKX41 型荧光倒置显微镜(HQ2592×1944)。

1.3 实验设计

暴露装置为自制 40 cm×30 cm×45 cm 的聚乙烯水族箱,各盛曝气 48h 的自来水 20 L;实验期间水质参数如下:水温 8—12℃,pH 6.2—6.5,DO 5.4—6.3 mg/L,平均硬度:2.67 mmol/L,平均碱度:2.6 mmol/L。实验之前将鲫鱼暂养 5d,期间无病无伤,生理活动正常,死亡率低于 6%;采用静水法生物测试^[9]。实验期间更换少量与水族箱浓度相一致的溶液,不投饲料,并以增氧泵全天充气。实验设置 1 个对照组,3 个不同浓度 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 处理组。处理组 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 浓度分别参照《渔业水质标准》(GB11607—89)的 2、5、10 倍(Pb^{2+})和 10、25、50 倍(Cu^{2+})设定,进行联合毒性试验。两种重金属离子浓度系列各为 0.00、0.10、

收稿日期: 2011-10-08; 修订日期: 2012-02-21

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(Y307535; Y304185)资助

通讯作者: 唐建勋(1956—),男,副教授,硕士;研究方向为水生生态和水产养殖。E-mail: bjhtjxun@163.com

0.25、0.50 mg/L。选择大小基本一致的鲫鱼随机分组, 每只水族箱放养鲫鱼 12 尾, 各设平行样, 以 20d 为一暴露周期。

1.4 取样测定

分别于实验开始时以及第 5、第 10、第 20 天, 从每只水族箱各捕出鲫鱼各 3 尾解剖, 取其卵巢, 用波恩氏液固定、常规脱水、石蜡包埋、连续切片(厚度 10.0 μm)、HE 染色、加拿大树胶封片, 在荧光倒置显微镜下观察其形态结构并摄像。同时, 分别各自称取卵巢样品若干, 用消解仪消解、鼓风干燥箱烘干后, 用双蒸水定容至 50 mL, 以原子吸收光谱仪进行卵巢样品 Pb²⁺、Cu²⁺含量的测定。

1.5 统计分析

数据采用均数±标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 数据处理采用 Excel 11.0 版中的分析工具库软件进行统计分析。不同重金属浓度组间的比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA); 各浓度组与对照组进行两两比较; 采用 Dunnett-t 检验。 $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果

2.1 Pb²⁺、Cu²⁺在卵巢的富集规律

卵巢中在第 0 天未检测出 Pb²⁺、Cu²⁺。在联合染毒 10d 时, 实验组鲫鱼卵巢中 Pb²⁺、Cu²⁺富集量迅速增加; 在联合染毒 20d 时, 实验组鲫鱼卵巢中的 Pb²⁺、Cu²⁺富集量与第 10 天相比均呈现出快速上升的趋势; 染毒 20d 后, 鲫鱼卵巢 Pb²⁺、Cu²⁺的富集量与 0d、10d 和 20d 相比较呈明显下降($P < 0.05$)。卵巢对 Pb²⁺、Cu²⁺的富集能力与暴露浓度有关, 浓度越高富集量相对越大($P < 0.01$)。而在染毒 20d 后, 卵巢中 Pb²⁺、Cu²⁺的富集逐渐降低。在高浓度组与低浓度组中, 鲫鱼卵巢对于 Cu²⁺的富集水平远大于 Pb²⁺($P < 0.01$)。鲫鱼卵巢 Pb²⁺、Cu²⁺的富集呈时间-效应和剂量-效应的特点(图 1、图 2)。对照组鲫鱼卵巢中 Pb²⁺、Cu²⁺未被检出。鲫鱼卵巢中重金属的富集与染毒时间关系的回归方程及相关系数(表 1)。

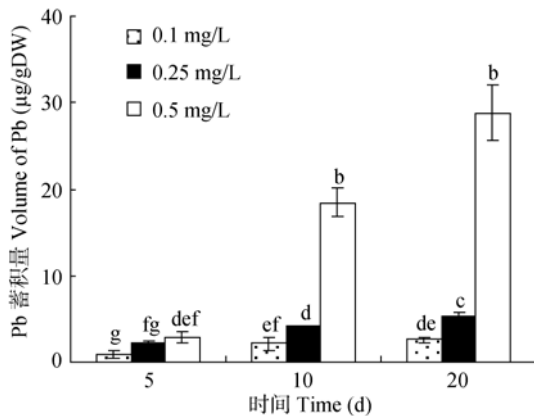


图 1 卵巢中 Pb²⁺的富集与暴露时间的关系

Fig. 1 The relationship of accumulation for lead and exposure time in ovary

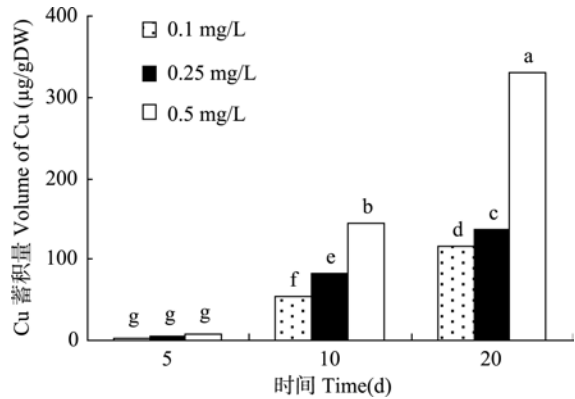


图 2 卵巢中 Cu²⁺的富集与暴露时间的关系

Fig. 2 The relationship of accumulation for copper and time in ovary

表 1 卵巢中 Pb²⁺、Cu²⁺的富集量(y)与暴露时间(t)的回归方程及相关关系

Tab. 1 The regression and coefficient of accumulation for Pb²⁺, Cu²⁺ and exposure time in ovary

组别	回归方程	相关系数
Group	Regression equation	Correlation coefficient(R^2)
处理组 1	Pb $y = 0.185t + 0.7408$	0.7834
Treatment 1	Cu $y = 8.6708t - 7.3133$	0.6814
处理组 2	Pb $y = 0.32354t + 1.2608$	0.9355
Treatment 2	Cu $y = 9.1619t - 8.1858$	0.7274
处理组 3	Pb $y = 2.1839t - 1.915$	0.8183
Treatment 3	Cu $y = 23.289t - 21.352$	0.6765

2.2 Pb²⁺、Cu²⁺对卵巢发育的影响

在实验期间, 对照组卵巢和卵细胞生理活动正常。处理组当重金属 Pb²⁺、Cu²⁺浓度依次为 0.10、0.25、0.50 mg/L 联合染毒时, 鲫鱼卵巢 Pb²⁺、Cu²⁺的富集迅速, 卵细胞在染毒第 5 天时即出现卵巢逐渐萎缩和卵细胞受损等现象。染毒 10d 时, 出现卵巢萎缩、卵细胞萎缩和细胞质外渗, 卵巢表现出组织学创伤。染毒第 20 天时, 出现卵细胞变性现象趋重、细胞相互黏结, 卵巢整体萎缩(图版)。

3 讨论

鲫鱼卵巢对 Pb²⁺、Cu²⁺的富集能力与重金属的种类、浓度和染毒时间有关。随着重金属离子浓度的升高和染毒时间的延续, 鲫鱼卵巢中 Pb²⁺、Cu²⁺的富集量也随之升高, 呈现出浓度-效应与时间-效应关系。但当染毒过程超过一定的时间界限, 其富集水平逐渐趋缓, 这可能与生物体接触到 Pb²⁺、Cu²⁺等重金属时, 后者会在体内激活脏器中的金属硫蛋白(Metallothionein, MT)基因的转录, 增加 MT 基因的表达量, 由于 MT 分子中的大量巯基对二价重金属离子尤其重金属离子具有极高的亲和力^[10], 使进入细胞内的重金属结合到这类新合成的蛋白质上, 或者将原来结合在该蛋白质上的其他金属加以取代, 并在体内贮存

有关^[11]。本实验结果表明, 在一定的时间范围内, 因 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 在鲫鱼卵巢中的富集量随溶液浓度的增加和随时间的延长而加大, 使卵巢的解毒能力逐步消失, 卵细胞受到损伤, 继而失去代谢能力, 最终会引起卵巢功能破坏或丧失。这与有关重金属在水产动物其他脏器富集规律的研究相似^[12-14]。

Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 是水环境生物毒性较强的重金属物质, 也是常见的环境优先污染物之一。其中, Pb^{2+} 是生物体非必需的微量元素, 而 Cu^{2+} 却是水生动物生长发育所必需的微量元素。通常, Cu^{2+} 在水生动物组织器官的富集大于 Pb^{2+} , 说明组织器官对于 Cu^{2+} 具有更强的富集能力。然而, 张海瑞等的研究却表明 Cu^{2+} 在锦鲤各组织器官的富集小于 Pb^{2+} ($P>0.01$)^[15], 与本实验及其他许多研究的结果不一致。这可能与动物体内重金属具有种间组织器官选择富集的倾向性差异或对其吸收具有选择性有关^[16]。对于 Pb^{2+} 和 Cu^{2+} 而言, 后者处于较高的浓度时, 比前者对于水生动物的危害更大, 通常认为, 较高浓度的 Cu^{2+} 对水生动物为剧毒物质, 而 Pb^{2+} 的危害则相对较小^[17]。

曾有实验表明, 水体中适量的 Cu^{2+} 可增强水生动物对环境的免疫能力, 因而 Cu^{2+} 对机体的生理活动十分重要。但是, 当周围环境 Cu^{2+} 的浓度超过一定生理阈值时, 将会对鱼类等水生动物带来很大的危害^[18]。在本实验中, 当 Cu^{2+} 为 0.10 mg/L (相对低浓度) 时, 在短期内不会影响鲫的生长发育, 然而随着对 Cu^{2+} 富集量的增加, 通过时间-效应和剂量-效应, 鲫卵巢的生理机能受到威胁乃至造成致命的损伤。

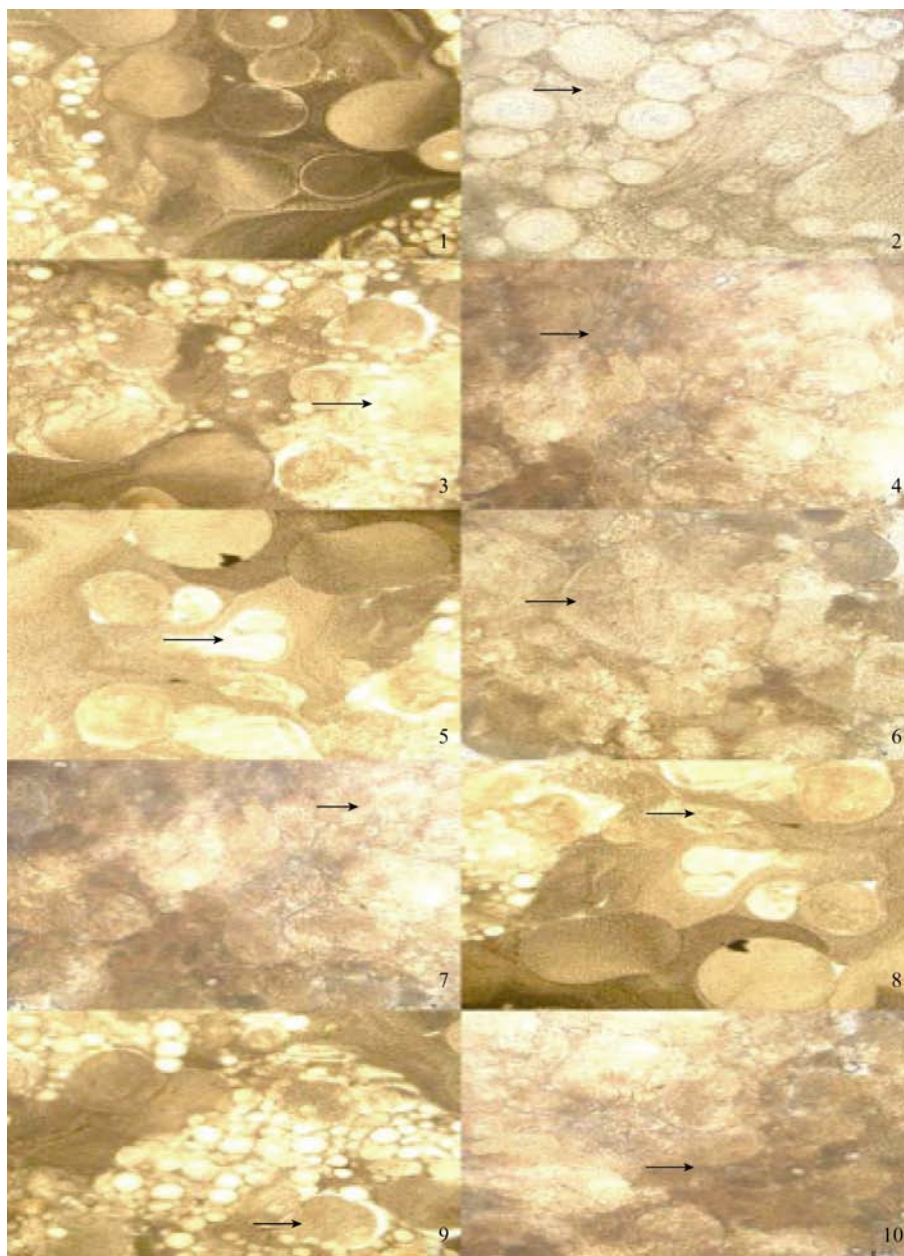
实验的全过程均在实验室完成, 水环境中的诸多复杂因素未被考虑, 具有明显的局限性, 因此其结果与野外水环境状况会有较大的出入。事实上, 水域中重金属的毒性在很大程度上取决于其游离离子的浓度^[19]。例如, Cu 的自由离子浓度高时, 毒性作用增强^[20, 21]; 水环境温度高时, 重金属对动物体组织器官的毒性增大; 而水环境其他条件的改变, 也会对重金属的富集产生影响^[22]。与此同时, 重金属离子间的相互作用十分复杂, 当多种重金属共存于水环境时, 将出现复杂的联合毒性效应, 均有可能存在协同作用或拮抗作用^[23]。此外, 当水环境中含有其他诸如 CO_3^{2-} 、 PO_4^{3-} 等离子时, 重金属离子的毒性也可能增强^[7]。因此, 水环境中 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 对于卵巢及卵细胞影响的复杂作用机理和毒理过程等, 还有待于继续深入地进行探索和研究。

参考文献:

- [1] Has S E, Bougut I. Heavy metal concentration in fish tissues inhabiting waters of Busko Blato reservoir (Bosnia and Herzegovina) [J]. *Environment Monitoring Assessment*, 2007, 9(11): 1125—1130
- [2] Dutta T K, Kavira J A. Acute toxicity of cadmium to fish

- Labeo rohita* and copepod *Diaptomus forbesi* pre-exposed to CaO and KMnO_4 [J]. *Chemosphere*, 2001, 4(8): 955—958
- [3] Al-Weher S M. Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the North Jordan Valley, Jordan [J]. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2008, 1(1): 41—46
- [4] Wang X Y, Yang H S, Wang Q. Ecotoxicological effects of heavy metal pollution on bivalves: a review [J]. *Marine Sciences*, 2009, 33(10): 112—118 [王晓宇, 杨红生, 王清. 重金属离子污染胁迫对双壳贝类生态毒理效应研究进展. 海洋科学, 2009, 33(10): 112—118]
- [5] Xiang L X, Shao J Z, Meng Z. Apoptosis induction in fish cells under stress of six heavy metal ions [J]. *Progress In Biochemistry and Biophysics*, 2001, 28(6): 866—869 [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. 生物化学与生物物理进展, 2001, 28(6): 866—869]
- [6] Ebrahimi M. Effects of *in vivo* and *in vitro* zinc and cadmium treatment on sperm steroidalogenesis of the African catfish *Clarias fahirinus* [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2007, 10(17): 2862—2867
- [7] Han Z X, Xu X Y, Xie H Z. Interaction between heavy metals and the DNA from salmon sperm [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2007, 26(1): 164—169 [韩照祥, 许兴友, 谢惠珠. 重金属与鲑鱼精 DNA 作用的比较研究. 农业环境科学学报, 2007, 26(1): 164—169]
- [8] Chen W G, Guo Z J, Deng P P, *et al.* Acute toxicity of three heavy metal ions to rose bitterling *Rhodeus ocellatus* fry [J]. *Fisheries Science*, 2010, 29(2): 99—111 [陈万光, 郭志君, 邓平平, 等. 3 种重金属离子对高体鲫鱼苗的急性毒性试验. 水产科学, 2010, 29(2): 99—111]
- [9] Wu B C, Fei L. The Modern Environmental Monitoring Technology (1st ed) [M]. Beijing: Environmental Science Press of China. 1999, 252—254 [吴邦灿, 费龙. 现代环境监测技术 (第一版). 北京: 中国环境科学出版社. 1999, 252—254]
- [10] Chen H Q, Zhang M Q, Wu G H, *et al.* Accumulating and release characteristics of eriochier sinensis for Pb and Cd [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2010, 34(4): 828—836 [陈海仟, 张美琴, 吴光红, 等. 中华绒螯蟹对 Pb 和 Cd 的富集与释放特性. 水生生物学报, 2010, 34(4): 828—836]
- [11] Allen P. Soft-tissue accumulation of lead in the blue Tilapia, *Oreochromis zcureus* (Steindachner) and the modifying effects of cadmium and mercury [J]. *Biological Trace Element Research*, 1995, 50(3): 193—208
- [12] Zhou Y F, Wu W, You Y, *et al.* Dynamics of metallothionein in organs of *Carassius auratus* under combined stresses of Cd and Zn [J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2010, 26(1): 63—67 [周彦锋, 吴伟, 尤洋, 等. 重金属镉锌联合胁迫下鲫鱼组织中金属硫蛋白的动态变化. 生态与农村环境学报, 2010, 26(1): 63—67]
- [13] Wang Y Q, Zhang Y M, Zhao D Q. Effects of heavy metals

- cadmium, lead and zinc on the survival of *Carassius auratus* and *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2003, **15**(1): 35—38 [王迎秋, 张迎梅, 赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性. 甘肃科学学报, 2003, **15**(1): 35—38]
- [14] Tang J X, Xing C H, Liu Z L, *et al.* Accumulation of heavy metals (Cu^{2+} and Pb^{2+}) in the ovary of *Misgurnus anguillicaudatus* and the subsequent effects on ova development [J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2010, **41**(3): 386—390 [唐建勋, 邢承华, 刘忠良, 等. 重金属 Cu、Pb 在泥鳅卵巢的富集特性及其对卵细胞发育的影响. 海洋与湖沼, 2010, **41**(3): 386—390]
- [15] Zhang H R, Xu X X. Research on accumulation of heavy metal ions copper and lead in *Cyprinus carpio* juveniles [J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2009, **30**(7): 276—278 [张海瑞, 许晓曦. 重金属离子铜、铅在锦鲤鱼幼鱼体内的积累研究. 食品工业科技, 2009, **30**(7): 276—278]
- [16] Weng H X, Presley B J. Bioaccumulation of heavy metals in oyster (*Crassostrea virginica*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 1996, **16**(1): 51—58 [翁焕新, Presley B J. 重金属在牡蛎中的生物累积及其影响因素的研究. 环境科学学报, 1996, **16**(1): 51—58]
- [17] Wang R L, Ma G Z, Fang Z Q. Safety assessment and acute toxicity of copper, cadmium and zinc to white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes* [J]. *Fisheries Science*, 2006, **25**(3): 117—120 [王瑞龙, 马广智, 方展强. 重金属铜、镉、锌对唐鱼的急性及安全浓度评价. 水产科学, 2006, **25**(3): 117—120]
- [18] Yao H F, Yang Y, Chen W Y, *et al.* Acute toxicity of four heavy metals on zoea larvae of *Portunus trituberculatus* [J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2008, **13**(4): 304—308 [姚海富, 杨阳, 陈伟杨, 等. 四种重金属对三疣梭子蟹溞状幼体的急性毒性. 集美大学学报(自然科学版), 2008, **13**(4): 304—308]
- [19] Long A M, Tao S, Xu F L, *et al.* pH, alkalinity and mucus in the gills of *Paracheirodon innesi* and their effects on copper speciation [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2001, **21**(2): 218—223 [龙爱民, 陶澍, 徐福留, 等. 彩虹方头鱼鳃微环境特性及铜的生物有效性. 环境科学学报, 2001, **21**(2): 218—223]
- [20] Zamuda C D, Sunda W C. Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. I. Importance of chemical speciation [J]. *Marine Biology*, 1982, **66**(1): 77—82
- [21] Engel D W, Brouwer M. Metallothionein-like Proteins Physiological Importance [M]. Berlin: Advances in Comparative and Environmental Physiology, 1985, 53
- [22] Li S X, Sun H W, Wang Y Q, *et al.* Bioconcentration and partition behaviors of tributyltin [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2002, **22**(6): 726—731 [李书霞, 孙红文, 王玉秋, 等. 三丁基锡的生物富集与分配行为. 环境科学学报, 2002, **22**(6): 726—731]
- [23] Zhang Y M, Wang Y J, Yu R L, *et al.* Effects of heavy metals on ATPase and SOD activities of hepatopancreas in *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2008, **20**(3): 55—59 [张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属胁迫对鲫鱼肝胰脏 ATPase 和 SOD 活性的影响. 甘肃科学学报, 2008, **20**(3): 55—59]



图版 I 不同浓度 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 暴露后鲫鱼卵巢与卵细胞形态特征($\times 40$)

Plate Characteristics of ovary and ovum exposed under different concentration of Pb^{2+} and Cu^{2+}

1. 对照组不同时相正常发育的卵细胞; 2. 处理组 1 暴露 5d 后: 示卵巢逐渐萎缩, 卵细胞形状逐渐不规则; 3. 处理组 1 暴露 10d 后: 示卵细胞萎缩、细胞质外渗; 4. 处理组 1 暴露 20d 后: 示卵细胞萎缩、相互拥挤、细胞溶解, 卵巢功能丧失; 5. 处理组 2 暴露 5d 后: 示卵巢萎缩, 卵细胞形状逐渐不规则; 6. 处理组 2 暴露 10d 后: 示卵细胞萎缩、相互挤压; 7. 处理组 2 暴露 20d 后: 示卵细胞萎缩、相互黏结、细胞质外渗; 8. 处理组 3 暴露 5d 后: 示卵细胞变形、萎缩, 相互黏结; 9. 处理组 3 暴露 10d 后: 示卵细胞相互挤压、萎缩, 细胞质外渗; 10. 处理组 3 暴露 20d 后: 示卵细胞逐渐融化相互黏结, 卵巢极度萎缩

1. Different phases of normal development of ova in control group; 2. Treatment 1 after 5d exposure, shows gradually atrophic ovary and gradually irregular shape of ova; 3. Treatment 1 after exposure 10d, shows atrophic ova and cytoplasm exuded; 4. Treatment 1 after exposure 20d, shows mutual crowded, atrophic and ova dissolved, and function of ovary damaged; 5. Treatment 1 after exposure 5d, shows shrunk ovary and gradually irregular shape of ova; 6. Treatment 2 after exposure 10d, shows mutual extruding and withering ova; 7. Treatment 2 after exposure 20d, shows withering and mutual bond ova, and cytoplasm exuded; 8. Treatment 3 after exposure 5d, shows deformative, atrophic and mutual bond ova; 9. Treatment 3 after exposure 10d, shows mutual extruding and flat withering ova, and cytoplasm exuded; 10. Treatment 3 after exposure 20d, shows the ova gradually melting and cohere together, and extremely atrophied ovary