

镉对两种泥鳅多种组织细胞转录活性的影响

杜启艳, 南平, 郝艳丽, 韩惠丽, 常重杰* (河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453007)

摘要 [目的] 为了达到不同镉浓度下泥鳅和大鳞副泥鳅肝、脑、肾3种组织细胞核Ag-NORs数目变化情况, 并比较不同时间条件下镉对Ag-NORs颗粒数目影响研究的目的。[方法] 以Ag-NORs为指标, 研究镉污染对泥鳅和大鳞副泥鳅肝、肾和脑组织细胞核转录活性的影响。在实验室条件下, 把试验动物置于镉浓度分别为0.01、0.05、0.5 ng/L的水溶液中, 分别在处理后12、24、48、84、132 h取样测定其肝、肾、脑组织细胞核中Ag-NORs颗粒数目变化。[结果] 结果表明: 镉污染后2种泥鳅肝、脑、肾细胞核Ag-NORs数目均下降。在镉处理后48 h或0.25 ng/L镉浓度下, 肝细胞核Ag-NORs数目显著下降, 而在镉处理后84 h或0.05 ng/L镉浓度下, 肾细胞核Ag-NORs数目即显著下降。随着时间延长, 浓度增大, Ag-NORs数目越少, 且下降幅度越大; 脑组织镉污染对脑组织Ag-NORs数目下降影响不显著。[结论] 该研究为探讨镉中毒的作用机理提供了试验依据。

关键词 泥鳅; 大鳞副泥鳅; 镉污染; Ag-NORs

中图分类号 Q953+.3 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)19-05779-02

Effects of Cadmium on Transcription Activity in Tissues of Two Species of Loaches

DU Qi-yan et al (College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453007)

Abstract The effects of cadmium on transcription activity of the tissues of liver, kidney, and brain of *Meigurnus anguillicadatus* and *Paramegurnus dabryanus* were studied by means of taking the number of silver-staining nucleolus organizer regions (Ag-NORs) as a index. Two species of loaches were exposed to different Cd concentrations (0.01 ng/L, 0.05 ng/L, 0.25 ng/L, 0.5 ng/L) in different period (12 h, 24 h, 48 h, 84 h, 132 h), under controlled conditions. The results showed that: after Cd treatment, the numbers of Ag-NORs decreased whatever in liver, brain or kidney. Ag-NORs in liver nucleus decreased significantly at 48 h after the treatment of Cd or the Cd concentration of 0.25 ng/L. While the numbers of Ag-NORs in kidney nucleus were observed the similar results at 84 h after Cd treatment or 0.05 ng/L Cd concentration. As time goes by, the more cadmium used, the less the Ag-NORs appeared and the faster the range of Ag-NORs declined. As to brain, the effect was not significant.

Key words *Meigurnus anguillicadatus*; *Paramegurnus dabryanus*; Cadmium pollution; Ag-NORs

镉进入生物圈, 使水环境受到污染, 给渔业生产和人类身体健康带来严重危害^[1-3]。对Ag-NORs的定量分析反映出细胞和细胞核的活性, 并反映出细胞的增生和分化状态^[4]。笔者研究不同镉浓度下泥鳅和大鳞副泥鳅肝、脑、肾3种组织细胞核Ag-NORs数目变化情况, 并比较不同时间条件下镉对Ag-NORs颗粒数目的影响。以期探讨镉中毒的作用机理提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 试验用鱼 泥鳅和大鳞副泥鳅购自新乡市农贸市场。

鱼体健壮, 体长13~17 cm, 体重13~19 g。

1.2 材料处理 试验用经过24 h曝气的自来水。镉对泥鳅和大鳞副泥鳅的毒害作用采用静态污染法^[5-6]。将CdCl₂·2.5 H₂O(A.R)用蒸馏水配制成含Cd²⁺81.2 ng/L的母液, 然后稀释成试验所需各浓度。试验分4个浓度梯度, 即分别为0.01、0.05、0.25、0.5 ng/L, 同时设1对照, 共5个组。试验浓度的选择参考文献[5]、[6]。试验在鱼缸中进行, 每鱼缸加4 L药液, 放入试验用大鳞副泥鳅15尾, 置于室温, 正常饲养。在分别处理12、24、48、84、132 h后每组取出3尾, 取其肝、脑、肾等组织, 分别置于盛有0.75% NaCl的小烧杯中。

1.3 样品制备 取出的组织块经破碎, 0.4% KCl低渗, 离心, 甲醇-冰醋酸(3:1)固定2次, 制成细胞悬液, 滴片, 自然干燥, 以备银染。

1.4 Ag-NORs技术 参照Hbwell等^[7]的快速银染法并加以改进。将50% AgNO₃溶液与2%明胶(内含1%甲酸)以2:1混合后, 立即加到玻片标本上, 覆以盖片, 在63℃水浴锅内

染色5~8 min, 当整片呈金属褐色时取出, 流水冲去盖片, 干燥后100倍镜检, 每张片子计数100个细胞核, 并以颗粒数/细胞核表示^[8]。

1.5 数据统计分析 结果分析采用统计学方法进行处理。所得结果均为平均数±标准差; 用NOVA单因素方差分析Ag-NORs平均值的差异; 组间应用数据比较采用t检验法, p<0.05被认为是差异显著, 统计分析应用SPSS 11.0 for windows软件。

2 结果与分析

2.1 不同镉浓度对泥鳅和大鳞副泥鳅肝组织细胞核的影响 从表1、2可以看出, 在镉浓度为0.01、0.05 ng/L较低浓度处理时, 两种泥鳅肝组织细胞核Ag-NORs数目与对照相比,

表1 不同浓度镉对2种泥鳅肝组织细胞核Ag-NORs数目的影响

镉浓度 ng/L	数量 条	X±sd	
		大鳞副泥鳅	泥鳅
0	4	1.582 5 ±5.000 E-03	1.470 7 ±0.113 2
0.01	15	1.505 3 ±0.105 9	1.452 5 ±0.130 5
0.05	15	1.495 3 ±7.661 E-02	1.448 0 ±0.161 6
0.25	15	1.428 7 ±9.486 E-02*	1.397 3 ±0.164 9*
0.50	15	1.381 3 ±0.132 4*	1.290 7 ±0.137 2*

注: 每组数据均为平均数±标准差, *表示差异显著。下同。

表2 不同时间镉对2种泥鳅肝组织细胞核Ag-NORs数目的影响

时间 h	数量 条	X±sd	
		大鳞副泥鳅	泥鳅
0	4	1.582 5 ±5.000 E-03	1.461 7 ±0.163 6
12	12	1.486 7 ±0.401 E-02	1.452 5 ±0.130 5
24	12	1.473 3 ±0.114 4	1.428 3 ±0.150 0
48	12	1.419 2 ±0.103 6*	1.390 8 ±0.128 4
84	12	1.409 2 ±0.123 0*	1.379 2 ±0.223 0*
132	12	1.405 0 ±0.144 5*	1.348 3 ±0.156 3*

均无明显差异。但在镉浓度为0.25、0.5 ng/L时, Ag-NORs数目显著下降; 大鳞副泥鳅中处理后12、24 h较短时间内Ag-

基金项目 河南高校杰出科研人才创新工程项目(2001KYCX010); 河南省杰出青年基金和河南省省级重点学科动物学资助。

作者简介 杜启艳(1964-), 女, 河南卫辉人, 副教授, 从事动物遗传学研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-20

NORs 数目无显著变化; 到处理后 48、84、132 h Ag NORs 数目显著低于对照。在泥鳅中只有到处理后 84、132 h Ag NORs 数目才显著低于对照。

2.2 不同镉浓度对大鳞副泥鳅脑组织细胞核 Ag NORs 数目的影响 由表 3、4 可以看出, 在整个试验阶段, 其脑组织细胞核的 Ag NORs 数目依次减少但与对照无显著性差异。表明这些时间和浓度条件对脑组织 Ag NORs 影响不显著。

表 3 不同镉浓度对大鳞副泥鳅脑组织细胞核 Ag NORs 数目的影响

镉浓度 ng/L	数量 条	X ± sd	
		大鳞副泥鳅	泥鳅
0	4	1.550 0 ± 0.112 2	1.524 0 ± 0.115 5
0.01	15	1.513 3 ± 0.168 3	1.508 0 ± 0.107 5
0.05	15	1.507 3 ± 0.102 4	1.485 0 ± 0.151 8
0.25	15	1.490 0 ± 9.899 E- 02	1.388 7 ± 0.134 1
0.50	15	1.421 3 ± 9.954 E- 02	1.341 3 ± 0.104 7

表 4 不同时间镉对大鳞副泥鳅脑组织细胞核 Ag NORs 数目的影响

时间 h	数量 条	X ± sd	
		大鳞副泥鳅	泥鳅
0	4	1.550 0 ± 0.112 2	1.485 0 ± 0.151 8
12	12	1.533 3 ± 0.174 2	1.493 3 ± 0.167 2
24	12	1.495 0 ± 9.47 E- 02	1.472 5 ± 0.103 4
48	12	1.476 7 ± 9.109 E- 02	1.460 0 ± 0.104 7
84	12	1.464 2 ± 0.105 6	1.442 5 ± 0.113 8
132	12	1.445 8 ± 0.116 6	1.334 2 ± 0.147 7

2.3 不同镉浓度对大鳞副泥鳅肾组织细胞核 Ag NORs 数目的影响 从表 5、6 可以看出, 在镉浓度较低组(0.01 ng/L) 中的肾细胞核 Ag NORs 数目与对照无显著差异, 在镉浓度分别为 0.05、0.25、0.5 ng/L 时, 两种泥鳅肾组织细胞核 Ag NORs 颗粒数均显著下降。在加药处理的 12、24、48 h 观察, 肾细胞核 Ag NORs 数目与对照无差别, 即处理后 84、132 h 的 Ag NORs 数目均显著低于对照。

表 5 不同浓度镉对大鳞副泥鳅肾组织细胞核 Ag NORs 数目的影响

镉浓度 ng/L	数量 条	X ± sd	
		大鳞副泥鳅	泥鳅
0	4	1.667 5 ± 0.116 2	1.637 5 ± 7.274 E- 02
0.01	15	1.571 3 ± 0.140 7	1.494 7 ± 0.141 7
0.05	15	1.523 3 ± 0.133 7 *	1.485 3 ± 0.102 5 *
0.25	15	1.506 0 ± 0.111 8 *	1.460 0 ± 0.117 0 *
0.5	15	1.460 0 ± 0.106 0 *	1.402 7 ± 0.222 5 *

表 6 不同时间镉对大鳞副泥鳅肾组织细胞核 Ag NORs 数目的影响

时间 h	数量 条	X ± sd	
		大鳞副泥鳅	泥鳅
0	4	1.667 5 ± 0.116 2	1.637 5 ± 7.274 E- 02
12	12	1.632 5 ± 0.130 2	1.514 2 ± 0.118 4
24	12	1.592 5 ± 8.635 E- 02	1.496 7 ± 0.183 9
48	12	1.535 8 ± 9.424 E- 02	1.495 0 ± 0.106 6
84	12	1.479 2 ± 0.133 4 *	1.438 3 ± 0.124 0 *
132	12	1.460 8 ± 8.743 E- 02 *	1.359 2 ± 0.184 8 *

3 讨论

(1) Ag NORs 是染色体上 18S 和 28S rRNA 基因所在的位

置, 可以被硝酸银特异染色。有关研究表明, 银染色的并不是核糖体基因本身, 而是与 rDNA 转录有关的一种嗜酸性蛋白, 只有具有转录活性的核仁组织区域才能被硝酸银染色。核内 Ag NORs 的数目和水平反映了核仁结构和功能变化, 并反映细胞的增生、分化及生理生化状态^[9]。因此, 可以通过细胞核内 Ag NORs 的数量变化检测重金属污染对鱼类生理生化状态的影响, 从而推知重金属污染的机制。

(2) 镉污染对 2 种泥鳅不同组织细胞核 Ag NORs 颗粒数影响不同, 污染后统计结果显示肝、肾组织的 Ag NORs 数目显著下降, 而脑组织细胞核的 Ag NORs 数目则下降不明显。2 种泥鳅对镉污染的生理反应非常相似, 这可能是由于两者具有非常密切的亲缘关系, 具有较为相似的遗传基础。

(3) 试验结果显示, 2 种泥鳅肝、肾组织细胞核 Ag NORs 数目有一定差别, 肝的细胞核 Ag NORs 数目低于肾的细胞核 Ag NORs。在不同的镉浓度处理下, 肾细胞核 Ag NORs 数目下降比肝的明显, 在镉浓度为 0.05 ng/L 时, 肾的细胞核 Ag NORs 颗粒数即显著低于对照组, 而肝组织在镉浓度为 0.25 ng/L 时, 其细胞核 Ag NORs 颗粒数才显著下降, 这可能是肝、肾组织在生物体内具有不同的生理功能引起的, 肝脏是鱼体内主要解毒器官, 能将进入体内的毒物在肝脏内氧化还原水解, 而肾是鱼体的主要排泄器官, 因而对毒物的作用更敏感。

(4) 研究表明, 镉进入动物体内后, 在肝、肾细胞内与巯基的蛋白结合, 形成对金属有储存、传递和解毒作用的镉金属硫蛋白(Cd—MT), Cd—MT 主要存在于肾小管细胞内^[10]。而脑、心、肠、骨和肌肉则无镉的存留或贮量甚微^[11]。另一方面, 也与肝、肾组织在生物体内具有不同的生物功能有关。肝具有防御和解毒功能, 能将进入体内的毒物在肝内氧化、还原、水解, 而肾是体内主要的排毒器官, 因而两者对镉的作用反应更敏感。

参考文献

- [1] 郭笃发. 环境中的铅和镉的来源及其对人和动物的危害[J]. 环境科学进展, 1994, 2(3): 71 - 76.
- [2] 丁磊, 吴萍, 宋学宏, 等. 镉对鲫鱼脏器系数的影响[J]. 水利渔业, 2002, 22(4): 18 - 19.
- [3] 曹剑辉, 马广智, 方展强. 镉对草鱼鳃和肝组织超氧化物歧化酶活性的影响[J]. 水利渔业, 2004, 24(1): 9 - 11.
- [4] UNDERWOOD J C E, GRIFFIN D D. Nucleolar organizer regions as diagnostic discriminants for malignancy[J]. Pathology, 1988, 155: 95 - 96.
- [5] 蒋辉. 环境水化学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 224 - 227.
- [6] 邱郁春. 水污染鱼类毒性实验方法[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1992: 77 - 79.
- [7] HOWELL W M, BLACK D A. Controlled silver-staining of nucleolar organizer with protective colloid developer: A step method[J]. Experiment, 1980, 36: 1014 - 1015.
- [8] 宁黔冀, 翟心慧, 李恩中, 等. 皮质酮对大鼠肝再生细胞转录活性的影响[J]. 动物学报, 2003, 49(5): 615 - 619.
- [9] 王风光, 张中仪, 孙正, 等. 银染核仁组织区技术方法及应用[J]. 北京口腔医学, 1999, 7(2): 10 - 11.
- [10] 丁磊, 蔡春芳. 镉对鲫鱼生长的影响[J]. 淡水渔业, 2002, 32(1): 56 - 57.
- [11] 惠秀娟. 环境毒理学[M]. 北京: 化学工业出版社, 2003: 100 - 101.
- [12] DECONTO GNER C, PEITZ-RAMEL M, FAURE R, et al. Cadmium bioaccumulation in carp (*Cyprinus carpio*) tissues during long-term high exposure: analysis by induction coupled plasma-mass spectrometry[J]. Ecotoxicol Environ Sci, 1997, 38(2): 137 - 143.