

Pb²⁺·Cu²⁺诱发蝌蚪红细胞微核及核异常的研究

周雪瑞^{1,2}, 沈后方¹, 潘正军^{1,2}, 王丽君¹

(1.淮阴师范学院生物系, 江苏淮安 223300; 2.江苏省环洪泽湖生态农业生物技术重点实验室, 江苏淮安 223300)

摘要 [目的]研究不同浓度的 Pb²⁺、Cu²⁺对蝌蚪红细胞微核率和核异常率的影响。[方法]采用微核试验法, 分别配制不同浓度的 Pb²⁺ (0.125~20.000 mg/L)、Cu²⁺ (0.01~0.15 mg/L) 溶液, 并以经曝气后的自来水为对照进行诱发蝌蚪红细胞微核及核异常的研究。[结果] 毒染 1 周后, 大于等于 0.5 mg/L 的 Pb²⁺ 组及所有 Cu²⁺ 组蝌蚪红细胞微核细胞率及核异常细胞率均大于对照组, 且蝌蚪红细胞微核率及核异常率在该试验浓度范围内随离子溶液浓度的升高而增大。其中, Cu²⁺ 的毒害又明显严重于 Pb²⁺。[结论] 为探讨 Pb²⁺ 和 Cu²⁺ 的毒害机制, 及研究分析污水对水生生物的毒害机理提供了新的科学依据。

关键词 Pb²⁺; Cu²⁺; 红细胞; 微核试验; 蝌蚪

中图分类号 Q243 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2008)14-05842-02

Study on Micronuclear and Nuclear Abnormalities Induced by Pb²⁺ and Cu²⁺ in Tadpoles Erythrocyte
ZHOU Xue-rui et al (Department of Biology, Huaiyin Teachers College, Huaian, Jiangsu 223300)

Abstract [Objective] The aim of this paper was to study the influence of Pb²⁺ and Cu²⁺ with different densities on tadpoles, micronuclear and nuclear abnormal rates. [Method] By the method of micronucleus, different densities of solutions with Pb²⁺ (0.125–20.000 mg/L) and Cu²⁺ (0.01–0.15mg/L) were collocated. Taking running water out of the air as the control, study on micronuclear and the nuclear abnormality induction of erythrocyte was carried out. [Result] After a week, the tadpoles abnormal rates of red blood cell micronucleus and nucleus were higher than those of control group with significant differences, except for the groups with lower than 0.5 mg/L Pb²⁺. And the micronucleus and nucleus abnormal rates increased with the rising of the ion solution density. [Conclusion] This research provided scientific basis for the discussion on Pb²⁺ and Cu²⁺ toxic mechanisms and the analysis of the mechanism of polluted water toxicity on aquatic organisms.

Key words Pb²⁺; Cu²⁺; Erythrocyte; Micronucleus test; Tadpole

随着工农业的发展, 环境污染问题日趋严重, 特别是水体污染。大量废弃物包括重金属排入河流, 已经对水生生物造成了极大危害^[1]。水污染中又以金属离子的危害最为严重。铅(Pb)和铜(Cu)是目前水域污染常见的重金属元素, 不仅可以在人和动物体内富积, 具有很强的神经发育毒性^[2], 而且它们在水体中相伴存在, 对水生生物如两栖类、甲壳类等具有不同程度的毒性乃至致死作用^[3-6]。有关 Pb²⁺ 和 Cu²⁺ 对蝌蚪红细胞的毒性作用报道甚少。为此, 笔者以两栖类蝌蚪为研究对象, 开展 Pb²⁺ 和 Cu²⁺ 诱发蝌蚪红细胞微核及核异常的相关研究, 为进一步探讨 Pb²⁺ 和 Cu²⁺ 的毒害机制, 以及研究分析污水对水生生物的毒害机理提供新的科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。中华大蟾蜍 (*Bufo gargarizans*) 变态期的蝌蚪, 体重 0.2 g 左右, 4 月初采于淮安市郊洁净的水体中。染毒前 1 周, 饲养于经曝气后的自来水中, 水温为室温。每周换水 2 次, 每天投放 1 次磨细的金鱼饲料, 试验时挑选处于变态期且发育状态良好的个体为材料^[7]。

1.1.2 试剂。CuSO₄ (化学纯, 上海试剂一厂), Pb(NO₃)₂ (上海金山化工厂生产)。固定液、染色液的配制: 甲醇原液 (GB683-79, 分析纯); Giemsa 染色液: 称取 Giemsa 粉 0.5 g, (Q/G HSC1092-97) 甘油 33 ml, 甲醇 33 ml。先往 Giemsa 粉中加少量甘油, 在研钵内研磨至无颗粒, 剩余甘油倒入, 最后加入甲醇混匀, 过滤, 56℃ 恒温放置 2~24 h, 使其充分溶解, 使用时用 1/15 mol/L 的磷酸缓冲溶液 (pH=6.81) 稀释 10 倍即可。

1.2 方法

1.2.1 分组。先用范围较大的不同 Pb²⁺、Cu²⁺ 溶液对蝌蚪进

行毒害试验, 找出最小致死浓度 (在 16 h 被毒死的浓度即为致死浓度)。以此为基础并参照国家 GB5084-2005 农田灌溉水质标准 (铅 ≤ 0.2 mg/L, 铜 ≤ 0.5 mg/L)^[8], 设置 8 个不同的浓度梯度。对照组用曝气后自来水; 处理组用蒸馏水配制, 每组溶液均为 500 ml。Pb²⁺ 的浓度分别为 0、0.125、0.250、0.500、2.500、5.000、10.000、20.000 mg/L; Cu²⁺ 的浓度分别为 0、0.010、0.0125、0.025、0.050、0.100、0.125、0.150 mg/L。

1.2.2 染毒。选择来源相同、发育状况和体重相似的蝌蚪, 在实验室内用曝气后自来水静养 1 周后随机放入每一试验水样中。每组投放 20 只蝌蚪。染毒时间均为 1 周。染毒 1 周后蝌蚪全部存活, 转移到经曝气后的自来水中, 6 h 后处死制血涂片。每一浓度中随机取 10 只蝌蚪进行采样处理。

1.2.3 血涂片制备。取蝌蚪, 吸干体表水分, 断尾取血涂片, 自然晾干, 用甲醇固定液固定 15 min, Giemsa 染液染色 15 min, 水洗, 晾干。

1.2.4 数据记录及结果分析。镜检涂片均匀区, 沿“弓”字型路线观察, 每张片子观察 2 000 个红细胞, 记录微核及核异常的细胞数, 有关微核和核异常的鉴别参考文献 [9] 的方法, 观察结果以千分率 (‰) 表示。微核细胞率 (‰) = 具有微核的细胞总数 / 观察细胞总数 × 1 000; 核异常细胞率 (‰) = 具有核异常 (除微核) 的细胞总数 / 观察细胞总数 × 1 000。试验数据采用 SPSS10.0 软件包进行统计学分析 (t-test)。及时运用显微分析系统采集典型的微核和核异常的红细胞图像。

2 结果与分析

2.1 Pb²⁺对蝌蚪红细胞微核率及核异常率的影响 蝌蚪在 Pb²⁺ ≤ 20 mg/L 的溶液中全部存活。蝌蚪红细胞的微核率, 对照组为 1.25‰, 0.125~0.250 mg/L 组与对照组相比无显著性差异 (P > 0.05), 而 0.500 mg/L 组与对照组相比有显著差异 (P < 0.05), 其他 4 组的平均微核率与对照组相比有极显著差异 (P < 0.01), 核异常率情况见表 1。在该试验中, 不同浓度的

基金项目 江苏省高校自然科学基金研究项目资助 (06KJD180032)。

作者简介 周雪瑞 (1962-), 女, 浙江江山人, 副教授, 从事动物生物学及肿瘤生物学特性的研究。

收稿日期 2008-03-06

Pb²⁺溶液致蝌蚪红细胞的微核率和核异常率随 Pb²⁺浓度的升高而有增大的趋势。蝌蚪红细胞微核和核异常现象见图1。

表1 铅离子对蝌蚪红细胞微核率及核异常率的影响
Table 1 Effects of Pb²⁺ on the RBC micronuclear and nuclear abnormal rates of tadpoles

浓度 Concentration//mg/L	微核细胞数 Number of micronucleus cells//个	微核细胞率 Rate of micronucleus cells//‰	核异常细胞数 Number of abnormal nucleus cell//个	核异常细胞率 Rate of abnormal nucleus cell//‰
曝气水 Aerated water	25	1.25	47	2.35
0.125	35	1.75	63	3.15
0.250	39	1.95	72	3.60
0.500	55	2.75*	156	7.80*
1.000	130	6.50**	200	10.00**
5.000	180	9.00**	482	24.10**
10.000	343	17.15**	953	47.65**
20.000	600	30.00**	1 685	84.25**

注:蝌蚪观察总数为 10 只,观察细胞总数为 2.0×10⁴ 个;*,** 分别表示与对照组相比差异显著、极显著。下同。

Note: The total observed number of tadpoles is 10. Total number of observed cell is 2.0 × 10⁴. * and ** stand for significant and extremely significant differences compared with control group. The same as follows.

2.2 Cu²⁺对蝌蚪红细胞微核率及核异常率的影响 在 0.2 mg/L 的溶液中 16 h 内有 50% 的蝌蚪死亡,在 48 h 内全

部死亡,而在 0.15 mg/L 内全部存活。对照组蝌蚪红细胞的微核率为 1.25‰,而 Cu²⁺试验组最低浓度溶液的平均微核率为 1.75‰,为对照组的 1.4 倍,与对照组相比有显著性差异(P<0.05),其他几组的平均微核率经统计学检验与对照组均存在差异,蝌蚪红细胞的微核率和核异常率在该试验范围内随 Cu²⁺浓度的升高而升高,不同浓度溶液的统计结果见表 2。

表2 铜离子对蝌蚪红细胞微核率及核异常率的影响
Table 2 Effects of Cu²⁺ on micronucleus rate and abnormal nucleus rate of tadpole erythrocyte

浓度 Concentration//mg/L	微核细胞数 Number of micronucleus cells//个	微核细胞率 Rate of micronucleus cells//‰	核异常细胞数 Number of abnormal nucleus cell//个	核异常细胞率 Rate of abnormal nucleus cell//‰
曝气水 Aerated water	25	1.25	47	2.35
0.010 0	35	1.75*	112	5.60*
0.012 5	52	2.60*	178	8.90*
0.025 0	96	4.80*	226	11.30*
0.050 0	249	12.45**	662	33.10**
0.100 0	460	23.00**	1 170	58.50**
0.125 0	590	29.50**	1 435	71.75**
0.150 0	745	37.25**	1 903	95.15**

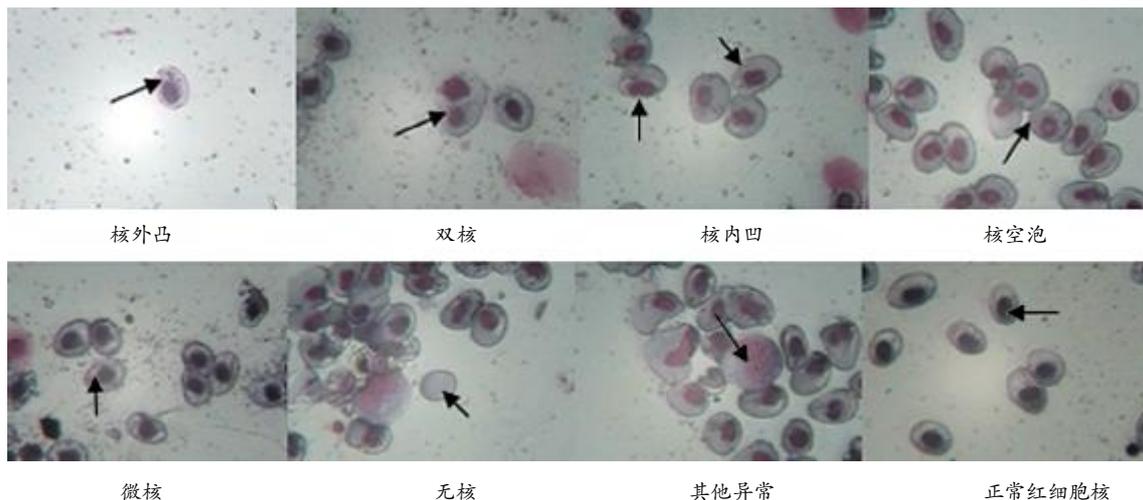


图1 蝌蚪红细胞微核及核异常现象

Fig. 1 Micronucleus and abnormal nucleus of tadpole erythrocyte

3 讨论

近年来,蝌蚪红细胞微核检测法已成为检测水环境中致突变物或致癌物灵敏度高的方法之一^[10-13]。该试验用 0.125~20.000 mg/L Pb²⁺和 0.010 0~0.150 0 mg/L Cu²⁺诱发蝌蚪的红细胞微核,结果表明,除 0.500 mg/L 以下的 Pb²⁺溶液外,其他 2 种离子组水样致蝌蚪红细胞的微核率及核异常率均显著高于对照组,且在试验浓度范围内,随毒染浓度的增加其影响有增高的趋势,说明水体中 Pb²⁺、Cu²⁺对蝌蚪红细胞致突变的存在。同时,当 Pb²⁺浓度高于 20.000 mg/L、Cu²⁺浓度高于 0.150 0 mg/L 时将 对 蝌 蚪 的 生 存 产 生 严 重 的 影 响,其 中 Cu²⁺的毒害又明显严重于 Pb²⁺。

铜是人和动物体所需的一种金属元素,但其浓度高时也会对人 和 动 物 产 生 毒 害 作 用。环 境 污 染 中 铜 的 来 源 很 多,如 电 池、废 旧 电 脑 的 处 理、含 铜 产 品 的 老 化、含 铜 药 品 的 生 产、铜 矿 富 积 地 以 及 使 用 一 定 浓 度 的 硫 酸 铜 来 防 治 水 产 养

殖动物的疾病等。铅的来源也很多,含铅汽油的燃烧、含铅油漆的挥发和某些含铅产品老化以后的不慎处理都会使环境中铅的成分增加。现代农业生产过程中,对农作物使用的大量农药,其中不少也都含有铅、铜等金属离子,这些金属离子不仅可在农作物中富集,超过一定浓度时也会对农田中的其他生物造成毒害,对农田生态系统构成一定的威胁^[13]。该试验中,Cu²⁺对蝌蚪红细胞的微核诱变作用明显大于 Pb²⁺,且低于农田灌溉标准中所列的相应离子浓度。为保护水环境和水生动物的正常生长与发育,应高度重视农田灌溉水质监测,有效防范铅、铜等金属离子特别是重金属离子对农田生态系统的破坏以及对水生动物及人类健康造成的潜在威胁。

关于 Pb²⁺和 Cu²⁺对蝌蚪的毒害机理目前尚不十分清楚,有研究表明铜属于亲硫重金属元素,与某些生物组织酶的
(下转第 5912 页)

2、4 和 CK 差异不显著。经测定,复合基质的 pH 值在 7.08~7.16,比对照(pH=6.79)稍高,略偏碱性,但都在黄瓜生长适宜的 pH 值范围(5.0~8.5)内。复合基质的 EC 值在 5.93~6.37,表明复合基质可溶性盐分含量高。

2.2 不同基质配比对黄瓜株高的影响 从表 2 可以看出,处理 2、3 的株高较高,与 CK 接近,二者之间差异不显著;处理 1 株高最低,其与 CK 差异显著。

表 2 不同基质配比对黄瓜株高的影响
Table 2 Effects of different substrate compositions on plant height of cucumber cm

处理 Treatment	株高 Plant height
1	99.25 b
2	121.59 a
3	124.50 a
4	116.29 ab
CK	124.90 a

注:同列不同字母表示在 0.05 水平上有差异。下表同。

Note: Different letters in a row mean differences at 0.05 level. The same as follows.

2.3 不同基质配比对黄瓜单株产量及可溶性固形物含量的影响 从表 3 可以看出,在单株产量上,处理 2、3、4 与 CK 之间的差异不显著;在可溶性固形物含量上,处理 1、2、

表 3 不同基质配比对黄瓜单株产量及可溶性固形物含量的影响
Table 3 Effects of different substrate compositions on single plant yield and soluble solid content of cucumber

处理 Treatment	单株产量 Single plant yield//g	可溶性固形物 Soluble solid//%
1	968.3 b	4.73 a
2	1 016.7 ab	4.83 a
3	1 145.0 a	4.80 a
4	1 062.9 ab	3.73 b
CK	1 249.0 a	4.37 ab

(上接第 5843 页)

巯基(-SH)有极大的亲和力,能抑制这些酶的活性,从而妨碍机体的代谢作用而引起死亡^[4]。Cu²⁺对染色体和纺锤体具有双重毒性,可通过导致染色体和纺锤体断裂,而引起微核和双核的产生^[5]。该研究中均已观察到相应的核异常现象。铅中毒后,可使血红蛋白浓度和红细胞数量显著降低。Pb²⁺不仅可通过改变脑血管内皮细胞的膜结构,使血脑屏障发生渗漏,而且 Pb²⁺还可蓄积于血管内皮细胞内,当浓度达到很高时,就会损害未成熟大脑的血脑屏障,从而侵害动物的中枢神经系统^[6]。该试验中高浓度的 Pb²⁺和 Cu²⁺致蝌蚪死亡,可能与这 2 种离子对酶活性的影响、对代谢的影响以及对中枢神经系统的影响有关,具体作用机制有待于进一步的深入研究。

参考文献

[1] 孟顺龙,陈家长,冷春梅.微核试验及其在水污染监测中的应用[J].水利渔业,2006,26(4):71-73.
 [2] 谢寒芳,颜崇淮.铅影响学习记忆的分子神经生物学机制研究进展[J].国外医学儿科学分册,2005(4):156-158.
 [3] 汪学英,卢祥云,李春梅,等.重金属离子对黑斑蛙胚胎及蝌蚪的毒性影响[J].四川动物,2001,20(2):50-61.
 [4] 龙静,张迎梅,赵东芹,等.铅对花背蟾蜍受精卵出膜及蝌蚪生长的影响[J].甘肃科学报,2004,16(2):3-7.
 [5] 金显文,石春梅,杨青.铜和苯酚对锯齿米虾的急性致毒研究[J].淮

3 含量较高,且与对照差异不显著,但与处理 4 差异显著。

2.4 不同基质配比对成熟期黄瓜叶绿素含量的影响 从表 4 可以看出,5 个处理间植株叶绿素含量差异不显著,其中,叶绿素含量较高的是处理 2 和处理 3。

表 4 不同基质配比对成熟期黄瓜叶绿素含量的影响
Table 4 Effects of different substrate compositions on chlorophyll content of cucumber at mature stage mg/g

处理 Treatment	叶绿素含量 Chlorophyll content
1	49.6 a
2	51.8 a
3	51.6 a
4	49.5 a
CK	50.0 a

3 结论与讨论

(1)通过对棉秆、蛭石和珍珠岩复合基质的理化性质分析,可以看出复合基质的容重适中,保水性能较强,略偏碱性,可溶性盐的含量较高。

(2)从试验结果分析可以看出,以腐熟棉秆作为黄瓜栽培基质原料时,棉秆:蛭石=3:1,棉秆:珍珠岩=3:1 是较为适宜的基质配比。在新疆地区,珍珠岩比蛭石容易获得,且每袋价格比蛭石便宜 10 元左右,从降低成本的角度看,可采用棉秆:珍珠岩=3:1 作为黄瓜栽培的基质。

参考文献

[1] 郭世荣.无土栽培学[M].北京:中国农业出版社,2003.
 [2] 顾言容.蔬菜无土栽培[Z].2005.
 [3] 蒋卫杰,刘卫,郑光华,等.无土栽培新技术[M].北京:金盾出版社,1998.
 [4] 刘淑娴,张金云,高正辉,等.黄瓜有机生态型无土栽培基质的筛选[J].安徽农业科学,2003,31(4):549-550,552.
 [5] 北煤炭师范学院学报:自然科学版,2007,28(1):18-21.
 [6] 黄斌,李杰,刘新浩.铜对蝌蚪的急性毒性研究[J].信阳师范学院学报:自然科学版,2005,18(4):73-75.
 [7] 周雪瑞,丁月荣,诸葛莹,等.里运河水对蝌蚪红细胞微核率及核异常率的影响[J].江苏预防医学,2005,16(4):1-3.
 [8] 刘凤枝.农业环境监测实用手册[M].北京:中国标准出版社,2001.
 [9] 耿德贵,张大生,程伟,等.四种除草剂对中华大蟾蜍蝌蚪红细胞微核及核异常的影响[J].动物学杂志,2000,35(1):12-16.
 [10] 苑宇哲,徐仕霞,姚春生,等.应用蝌蚪快速检测环境变异的两种方法——微核试验和单细胞凝胶电泳[J].四川动物,2004,1(23):74-78.
 [11] 金士威,王静,吴明亮,等.生活污水对蝌蚪红细胞微核及异常的诱导[J].江苏环境科技,2006,19(4):51-53.
 [12] BEKAERT, RAST C, FERRIER V, et al. Use of in vitro (ames and mutatox tests) and in vivo (amphibian micronucleus test) assay to assess the genotoxicity of leachates from a contaminated soil[J]. Org Geochem, 1999(30):953-962.
 [13] ZOLL-MOREUX C, FERRIER V. The Jaylet test (newt micronucleus test) and the micronucleus test in xenopus: two in vivo tests on amphibia evaluation of the genotoxicity of five environmental pollutants and of five effluents [J]. Water Research, 1999, 33(10): 2301-2314.
 [14] 高孝莉,齐凤生,罗胡英,等.铜、汞、镉对泥鳅急性毒性和联合毒性实验[J].水利渔业,2003,23(2):101-103.
 [15] 张贵生,朱道玉.铜离子诱发鲮鱼红细胞微核及核异常的研究[J].环境与健康杂志,2006,23(6):543-545.
 [16] 杨晓刚,余东游,许梓荣.动物铅毒性研究进展[J].中国畜牧杂志,2006,19(42):57-59.