

雷 忻,郭兆权,延志莲,等. 镉胁迫对泥鳅血清卵黄蛋白原的诱导作用[J]. 江苏农业科学,2013,41(9):321-322.

镉胁迫对泥鳅血清卵黄蛋白原的诱导作用

雷 忻,郭兆权,延志莲,王文强,苑彩霞

(延安大学生命科学学院,陕西延安 716000)

摘要:将雄性泥鳅分别暴露于 4 种不同浓度镉(45、58、75、97 mg/L)中持续 7、14、21、28 d,采用碱不稳定性蛋白结合磷法检测泥鳅血清卵黄蛋白原(Vtg)水平的变化。结果显示,与对照相比,泥鳅在低浓度镉溶液(45 mg/L)中暴露 7 d,血清 Vtg 水平极显著升高,并且随着镉浓度的增加,Vtg 水平逐渐升高;在同一暴露浓度下,Vtg 水平在 14 d 略有下降,之后随暴露时间的延长逐渐升高。镉可诱导雄性泥鳅肝脏合成 Vtg,具有一定的环境雌激素效应,其诱导作用随着暴露剂量的增大和时间的延长逐渐增强。

关键词:镉;泥鳅;卵黄蛋白原;血清

中图分类号: Q958 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)09-0321-02

镉(Cadmium)是水中常见的重金属污染物,对水生生物及人体具有一定毒害作用。卵黄蛋白原(Vitellogenin, Vtg)是卵生动物卵黄蛋白的前体,雄性个体在外源雌激素或类雌激素化合物的诱导下可由肝细胞合成,因此雄性动物体内卵黄蛋白原的异常变化可作为生物标志物来检测环境化学污染物的雌激素效应^[1-2]。目前环境雌激素效应多集中于对酚类化合物的研究^[3-4],对重金属镉的环境雌激素效应研究鲜有报道。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是一种良好的土壤与水域环境污染的监测动物,是一种鲤形目(Cypriniformes) 鲇科(Cobitidae)泥鳅属(*Misgurnus*)^[5]小型淡水鱼,能适应淤泥、水体 2 种栖息环境,抗病能力较强,食性广,是一种较理想的动物试验材料^[6]。本研究以泥鳅为试验动物,检测镉胁迫下泥鳅血清 Vtg 水平的变化规律,分析其环境雌激素效应,旨在为重金属对鱼类的内分泌干扰作用研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

试验用泥鳅购于陕西省延安市农贸市场。室温下,用经

过 3 d 自然脱氯的自来水驯养 2 周后,挑选健康强壮的雄性泥鳅进行试验。受试泥鳅平均体重为(12.6 ± 3.5) g,平均体长为(11.4 ± 2.5) cm。氯化镉分析纯购自天津市福晨化学试剂厂。

1.2 暴露试验

根据预试验所确定的安全浓度和最大零致死浓度,将镉设置 4 个浓度处理(45、58、75、97 mg/L)进行毒性暴露试验,同时设置空白对照组。每个处理 3 次重复,每个处理 10 尾雄性泥鳅。24 h 更换 1 次受试药液,以保证药液溶氧量、pH 值、水温及其他理化指标的稳定^[7],并及时捞出死亡泥鳅。隔天喂食少许小米和玉米碎粒,取样前一天停止喂食。每隔 1 周观察 1 次鱼的活动、中毒情况以及体色变化。

1.3 血清样品制备

分别在试验开始后 7、14、21、28 d 处死泥鳅,断尾取血,所得血样在 4 ℃ 下静置 4 ~ 6 h,10 000 r/min 离心 15 min,取上清, -80 ℃ 冷冻保存^[8-10]。采血结束后,解剖泥鳅,根据性腺进一步鉴定其性别,雄性:白色精巢,雌性:黄色卵巢。

1.4 Vtg 含量测定

采用碱不稳定性蛋白结合磷的方法测定血清 Vtg 含量。将血清样品加入含 10% 三氯乙酸(TCA)溶液的离心管中, 0 ℃ 过夜,离心;加入 5% TCA 溶液,90 ℃ 孵育 30 min,离心去上清;分别用无水乙醇、氯仿:乙醚:无水乙醇(体积比 1:1:2)、丙酮、乙醚按顺序清洗沉淀,弃上清;加入 NaOH, 100 ℃ 水解 3 h,待测。将样品转入比色管中,盐酸中和,加显色液,37 ℃ 孵育 1.5 ~ 2 h。用 7230 型分光光度计测定 780 nm 波长处的吸光度,根据吸光度算出磷含量,即可反映 Vtg 的含量。为使测定的吸光度在有效范围内,将血清稀释

收稿日期:2013-05-02

基金项目:国家自然科学基金(编号:31240076);陕西省自然科学基金研究计划(编号:2012JM3012);陕西省高水平大学建设专项资金(编号:2012SXTS03);陕西省教育厅科学研究项目(编号:2013JK0710);陕西省延安市科学技术研究发展计划(编号:2012KS-15);生态学陕西省重点学科专项。

作者简介:雷 忻(1972—),女,陕西延安人,博士,副教授,主要从事环境毒理学及生态学研究。Tel:(0911)2332030;E-mail:leizz66@126.com。

[14] Srivastava A, Jüttner F, Strasser R J. Action of the allelochemical, fischerellin A, on photosystem II[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1998, 1364(3): 326-336.

[15] 梁长华. 纳米 NiO 对小球藻的生物毒性及致毒机制研究[D]. 大连:大连海事大学,2010:1-69.

[16] Longstreth D J, Nobel P S. Nutrient influences on leaf photosynthesis: effects of nitrogen, phosphorus, and potassium for *Goaaypium*

hirsutum L. [J]. Plant Physiology, 1980, 65(3): 541-543.

[17] 王丽娜, 克热木·伊力, 侯江涛. 水分胁迫对扁桃砧木叶片脯氨酸、可溶性蛋白质、质膜透性、相对含水量的影响[J]. 新疆农业大学学报, 2006, 29(3): 53-58.

[18] 马剑敏, 李 今, 张改娜, 等. Hg²⁺ 与 POD 复合处理对小麦萌发及幼苗生长的影响[J]. 植物学通报, 2004, 21(5): 531-538.

200 倍。标准液为无水磷酸二氢钾(KH_2PO_4)。

1.5 数据处理

采用 SPSS 18.0 统计软件进行单因素方差分析,用最小显著差数法进行多重比较,结果表示为“平均值±标准差”。

2 结果与分析

2.1 镉胁迫下泥鳅中毒症状

低浓度镉处理时,泥鳅行为无明显异常,未出现中毒或死亡现象。高浓度镉处理(75、97 mg/L)下,1 周内泥鳅活动剧

烈;7 d 时活动减缓,体表黏液增加;14 d 时嘴角溃烂,鱼体略微灰白;28 d 时泥鳅基本不活动、不进食,体色变灰变浅,体表出现小血点,局部皮肤溃疡。

2.2 镉对泥鳅血清 Vtg 的诱导作用

由表 1 可见,与对照相比,泥鳅在低浓度镉(45 mg/L)中暴露 7 d,血清 Vtg 水平极显著升高,随着镉浓度的增加,血清 Vtg 水平逐渐升高。泥鳅在高浓度镉(97 mg/L)中暴露 7 d,血清 Vtg 水平达到 2.429 ± 0.001 mg/L。在不同浓度镉处理下,泥鳅血清 Vtg 水平均在 14 d 时略有下降,之后继续上升。

表 1 不同浓度镉对泥鳅血清 Vtg 的诱导

镉浓度 (mg/L)	Vtg 浓度 (mg/L)			
	暴露 7 d	暴露 14 d	暴露 21 d	暴露 28 d
0	0.017 ± 0.001	0.020 ± 0.001	0.019 ± 0.003	0.018 ± 0.003
45	$2.340 \pm 0.002^{**}$	$2.160 \pm 0.001^{**}$	$2.373 \pm 0.001^{**}$	$2.566 \pm 0.001^{**}$
58	$2.354 \pm 0.001^{**}$	$2.193 \pm 0.001^{**}$	$2.429 \pm 0.002^{**}$	$2.646 \pm 0.001^{**}$
75	$2.387 \pm 0.002^{**}$	$2.226 \pm 0.002^{**}$	$2.505 \pm 0.001^{**}$	$2.722 \pm 0.002^{**}$
97.000	$2.429 \pm 0.001^{**}$	$2.269 \pm 0.002^{**}$	$2.557 \pm 0.002^{**}$	$2.783 \pm 0.002^{**}$

注:同列数据后“**”表示与对照相比差异极显著($P < 0.01$)。

3 结论与讨论

卵黄蛋白原含量与性类固醇激素之间存在密切关系。詹翠琼等对暴露在多氯联苯(PCBs)中的雄性孔雀鱼 Vtg 含量进行检测,发现 PCBs 可诱导其产生 Vtg^[11]。王宏元等通过检测雄性中国林蛙肝细胞雌激素受体和 Vtg 水平,认为壬基酚对 Vtg 有明显的诱导作用^[4]。本研究表明,暴露在重金属镉中的雄性泥鳅血清 Vtg 水平极显著升高,说明镉可诱导雄性泥鳅肝脏合成 Vtg,对雄性泥鳅具有一定的环境雌激素效应。赵岩等研究双酚 A 对雄性泥鳅血清 Vtg 的诱导作用时,发现血清 Vtg 含量随双酚 A 暴露时间的延长和暴露浓度的增加而显著升高^[12]。本研究表明,随着镉浓度的增大,雄性泥鳅血清 Vtg 水平呈逐渐上升趋势。重金属镉对雄性泥鳅的血清 Vtg 的诱导作用与暴露浓度和时间密切相关,随着镉浓度的增大和暴露时间的延长,诱导作用逐渐增强。

参考文献:

[1] Chikae M, Ikeda R, Hasan Q, et al. Effect of alkylphenols on adult male medaka: plasma vitellogenin goes up to the level of estrous female[J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2003, 15 (1): 33-36.

[2] Yadetie F, Arukwe A, Goksoyr A, et al. Induction of hepatic estrogen receptor in juvenile Atlantic salmon *in vivo* by the environmental estrogen, 4-nonylphenol[J]. The Science of the Total Environment, 1999, 233(1/2/3): 201-210.

[3] 刘 萍, 李正炎, 李江玲. 酚类污染物对金鱼卵黄蛋白原诱导的雌激素效应研究[J]. 中国海洋大学学报: 自然科学版, 2010, 40 (11): 134-140.

[4] 王宏元, 巨荣菊, 白 瑶, 等. 壬基酚对雄性中国林蛙肝细胞中雌激素受体和卵黄蛋白原的影响[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2011, 39(6): 54-59.

[5] 成庆泰, 郑葆珊. 中国鱼类系统检索[M]. 北京: 科学出版社, 1987: 53-55.

[6] 王万云, 丁海华, 毛治彦, 等. 秦岭地区泥鳅生物学特性及人工繁殖技术研究[J]. 陕西师范大学学报: 自然科学版, 2003(增刊): 149-153.

[7] 沈洪艳, 宋存义, 甄芳芳, 等. 对氯硝基苯对锦鲤鱼的急性毒性效应[J]. 河北师范大学学报: 自然科学版, 2007, 31(4): 514-517.

[8] Shi G, Shao J, Jiang G, et al. Membrane chromatographic method for the rapid purification of vitellogenin from fish plasma[J]. Journal of Chromatography B - Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2003, 785(2): 361-368.

[9] 林浩然, 刘晓春. 鱼类生理学实验技术与方法[M]. 广州: 广东高等教育出版社, 2006: 64-67.

[10] 张艳珍, 陈细华, 危起伟, 等. 中华鲟血清卵黄蛋白原水平的初步观察[J]. 淡水渔业, 2008, 38(5): 10-14.

[11] 詹翠琼, 黄絮洁, 方展强, 等. 多氯联苯对孔雀鱼卵黄蛋白原的诱导及检测[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(3): 333-338.

[12] 赵 岩, 时国庆, 孙春宝, 等. 双酚 A 对泥鳅卵黄蛋白原的诱导[J]. 科学技术与工程, 2007, 7(9): 2156-2159.