

镉和汞两种重金属离子对四角蛤蜊血细胞 DNA 损伤的初步研究

房 燕^{1,2}, 杨红生¹

(1. 中国科学院 海洋研究所海洋生态与环境科学重点实验室, 山东 青岛 266071; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100049)

摘要: 利用彗星电泳技术, 研究了不同胁迫浓度和胁迫时间下, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 对四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)血细胞 DNA 损伤的情况。研究结果显示, 50、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫 14 天不能造成四角蛤蜊血细胞 DNA 损伤。10、20 和 40 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫均能明显损伤血细胞 DNA, 并且 DNA 损伤程度分别与 Hg^{2+} 胁迫时间、胁迫浓度具有一定正相关性。200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} +20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 复合胁迫组, 四角蛤蜊血细胞 DNA 损伤程度随胁迫时间延长而增加, 并且大于 Hg^{2+} 胁迫组。上述结果表明对于四角蛤蜊而言, Hg^{2+} 潜在的遗传毒性大于 Cd^{2+} ; Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 对 DNA 的损伤具有协同作用。

关键词: 四角蛤蜊(*Macra veneriformis*); Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; DNA 损伤; 彗星电泳

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2011)02-0001-05

工农业的快速发展以及人口的急剧增加, 特别是沿海地区工业的快速发展, 导致了近海海洋环境污染日益突出。调查结果显示, 我国近岸海域部分海水和沉积物样品中重金属镉(Cd)、汞(Hg)含量超标^[1]。重金属是一类毒性较大的污染物, 可以被水生生物大量富集, 引起生物体代谢的紊乱、疾病甚至死亡, 还可以通过食物链的生物放大作用危害人类健康^[2]。而且, 许多重金属污染物具有潜在的遗传毒性, 能够导致 DNA 损伤, 引起疾病, 并危害子代健康。

双壳贝类是监测水域污染物的常用指示生物, 同时, 污染物对贝类的毒理学研究也成为研究热点。目前, 这些研究多集中于贻贝和牡蛎。由于缺乏附着基, 在滩涂区域, 贻贝和牡蛎的分布量非常小。随着该区域生态与环境状况恶化, 开发其他贝类用于滩涂污染物检测和毒理学研究是十分必要的。四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)是一种典型的埋栖型滩涂贝类, 广泛分布在我国、韩国和日本沿海, 是我国主要的经济贝类之一。它能够大量富集重金属, 具有作为污染物指示物种的潜力^[3]。但是有关四角蛤蜊的毒理学研究还较少, 尤其是污染物导致四角蛤蜊 DNA 损伤的研究还未见报道。本研究开展了室内模拟实验, 利用彗星电泳技术评价了 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 对四角蛤蜊 DNA 损伤的情况。为重金属毒性评价体系的建立提供技术支持, 为阐明重金属对生物体的毒性机制提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验生物的驯养和胁迫实验

实验用二龄四角蛤蜊[壳长(3.27 ± 0.23)cm, 壳高(2.95 ± 0.31)cm, 壳宽(2.17 ± 0.17)cm, 湿质量(12.07 ± 1.56)g], 于 2009 年 6 月购自日照养殖场。在实验室驯养 14 d[水温(20 ± 2), 溶解氧 7.7~8.3mg/L, pH 7.9~8.1, 盐度 33], 将四角蛤蜊转移至聚乙烯箱内开始正式胁迫实验。每只箱内海水体积为 50 L, 放养 100 只四角蛤蜊。根据课题组前期研究中得到的 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 对四角蛤蜊 96h LC_{50} ^[4], 结合参考文献中常用的 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 对双壳贝类亚致死浓度^[5,6], 设置了以下 7 个胁迫组 50 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 、100 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 、200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 、10 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 、20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 、40 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 、200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} +20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} , 并设对照组, 每组均设 2 个平行。配备 1.35 g/L HgCl_2 和 2.03 g/L $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 母液, 加入到海水中以达到相应的 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 浓度, 对照组不加 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 。实验进行

收稿日期: 2010-08-12; 修回日期: 2010-10-21

基金项目: 国家基金委创新研究群体科学基金项目(40821004); 国家 973 计划资助项目(2007CB407305); 国家农业部公益性计划资助项目(nyhyzx07-047); 国家海洋公益性行业科研专项资助项目(200805069)
作者简介: 房燕(1983-), 女, 山东郓城人, 博士研究生, 主要从事生态毒理学方面的研究, 电话: 0532-82898596, E-mail: fly12689@163.com; 杨红生, 通信作者, 研究员, 电话: 0532-82898620, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

14 d, 整个实验过程持续充气, 并监测水体理化参数, 每天固定时间换水, 换水后补加相应浓度的重金属溶液。投饵在换水前 2 h 进行。

1.2 血淋巴的采集

在胁迫的第 0、1、4、7、11、14 天, 用 1mL 注射器从四角蛤蜊的闭壳肌中抽取血淋巴, 及时存放于 4℃ 冰箱。第 11 天 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 复合胁迫组和第 14 天 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫组, 四角蛤蜊已全部死亡, 无血淋巴可取。每组随机取 9 只四角蛤蜊, 每 3 只混合为一个样本。用台盼蓝染色法检测血细胞存活率。存活率大于 95% 的样本才可以用于后续的彗星电泳实验。

1.3 彗星电泳实验流程

本实验在 Singh 等^[7]的方法上稍做改进, 具体程序如下: (1) 胶板制备(烤胶法): 在烧杯里配置 100mL 0.6% 正常熔点琼脂糖, 煮沸后, 放入磨砂玻片并取出, 室温凉干。37℃ 下, 取 75 μL 低熔点胶与 25 μL 血淋巴混匀, 用枪直接把凝胶吹到玻片上, 4℃ 放置 10 min。 (2) 裂解: 将玻片放入裂解液(2.5 mmol/L NaCl、100 mmol/L Na_2EDTA 、10 mmol/L Tris-base, pH10, 用前加 TritonX-100 和 DMSO), 4℃ 裂解 2 h, 取出玻片, 用 0.2 mol/L pH7.4 的磷酸钠缓冲液漂洗。 (3) 解旋: 将玻片放入水平电泳槽中, 倒入新鲜的电泳缓冲液(0.3 mol/L NaOH、1 mmol/L Na_2EDTA , pH>13), 4℃ 避光放置 20 min 以解旋。 (4) 电泳: 调整电压为 25V, 调整液面高度使电流达到 300 mA, 4℃ 避光电泳 20 min。电泳结束, 用磷酸钠缓冲液漂洗玻片。 (5) 中和: 用预冷的中和液(0.4 mmol/L Tris-base, pH

7.5), 4℃ 漂洗 3 次, 每次 10 min。 (6) 染色和观察: 在胶板上滴加核酸染料 gene finder, 染色 15 min 后, 在 Nikon80i 荧光显微镜 200 倍下, 观察并拍照。 (7) 图像分析, 用 CASP 软件分析彗星图像。Olive 尾矩(OTM 值)是彗星细胞尾长与尾部 DNA 含量的乘积, 与 DNA 损伤有很好的正相关性^[8], 作者选择该指标用于 DNA 损伤的评价。

1.4 数据处理

每个玻片上随机选择 30 个细胞进行分析, 结果表示为平均值 $\pm$ 标准差。采用 SPSS13.0 软件对数据作单因素方差分析, Turkey 检验比较每个取样点不同实验组间的差异, 显著水平为 0.05。

2 结果

2.1 Cd^{2+} 胁迫对四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤

图 1A 显示的是四角蛤蜊血细胞内未受损伤的 DNA 电泳后的图片。图 1B 显示的是细胞内损伤的 DNA 电泳后的图片, 彗尾即是断裂的 DNA 碎片。由图 2 可见, Cd^{2+} 胁迫期间, 四角蛤蜊血细胞 OTM 值没有发生显著的变化, 表明在本实验胁迫浓度和时间下, Cd^{2+} 未能造成四角蛤蜊血细胞 DNA 明显的损伤。

2.2 Hg^{2+} 胁迫对四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤

由图 3 可知, Hg^{2+} 胁迫第 1 天, 血细胞 OTM 值即开始显著升高, 10 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组 OTM 值在第 7 和 11 天下降, 14 天又上升; 20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 和 40 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组第 7 天下降, 之后又上升。10 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 、

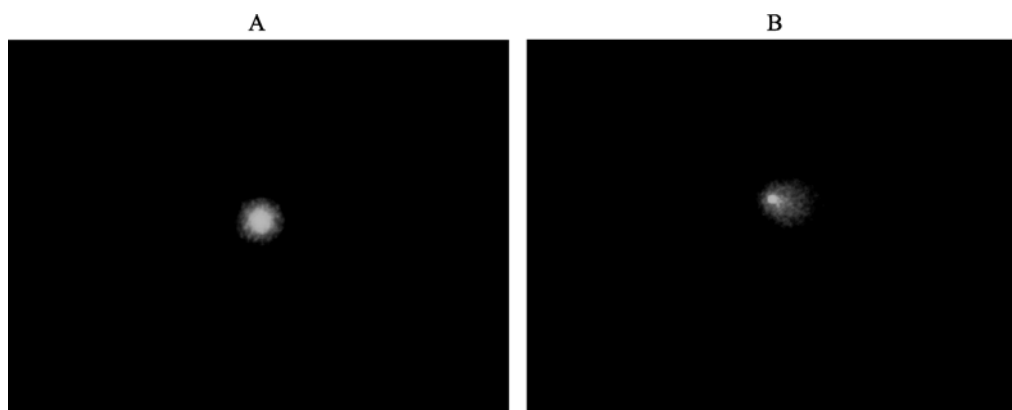


图 1 四角蛤蜊血细胞 DNA 电泳

Fig. 1 The comet assay of *Mactra veneriformis* haemocyte

A. 未损伤的 DNA; B. 损伤的 DNA
A. undamaged DNA; B. damaged DNA

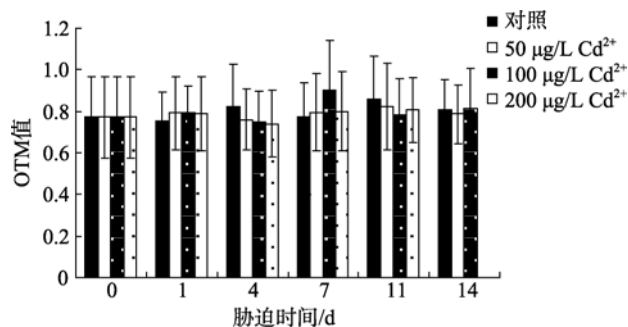


图 2 Cd^{2+} 胁迫对四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤

Fig. 2 DNA damage in haemocytes of *M. veneriformis* exposed to Cd^{2+}

20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 和 40 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组, OTM 值最高值均出现在第 14 天, 分别为 9.12 ± 0.14 、 13.09 ± 2.11 和 15.95 ± 3.48 。OTM 值分别与 Hg^{2+} 胁迫时间、胁迫浓度具有一定的正相关性。上述结果表明 Hg^{2+} 能够显著诱导四角蛤蜊血细胞 DNA 损伤。 Hg^{2+} 胁迫组与对照组 OTM 值的差值与胁迫时间的回归曲线表明, 20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 和 40 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组 OTM 值与胁迫时间具有较好的线性相关性, 相关系数分别为 0.907 2 和 0.825; 而 10 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组 OTM 值与胁迫时间相关性较差, 相关系数为 0.564 2(图 4)。

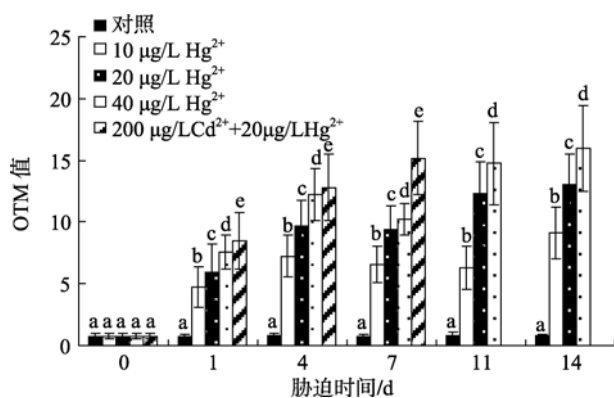


图 3 Hg^{2+} 胁迫和 $\text{Cd}^{2+}+\text{Hg}^{2+}$ 复合胁迫对四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤

Fig. 3 DNA damage in haemocytes of *M. veneriformis* exposed to Hg^{2+} and the combination of Cd^{2+} and Hg^{2+}
同一取样点, 不同字母表示差异显著

2.3 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 复合胁迫对四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤

由图 3 可见, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 复合胁迫组血细胞 OTM 值在第 1 天即显著上升, 随胁迫时间的延长, OTM 值逐渐增加。OTM 最大值出现在第 7 天, 为

15.17 ± 2.94 。同一时间点, 该组 OTM 值高于 Hg^{2+} 胁迫组。

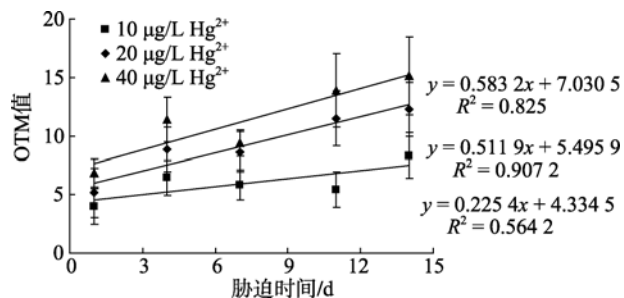


图 4 Hg^{2+} 胁迫组四角蛤蜊血细胞 OTM 值与胁迫时间的回归曲线

Fig. 4 Correlation between OTMs in haemocytes of *M. veneriformis* in Hg^{2+} -treated groups and duration of exposure

3 讨论

彗星电泳是在一种在单细胞水平上检测 DNA 损伤与修复的方法, 能够评价外源污染物对细胞潜在的遗传毒性和致癌性。由于其简便、快速、灵敏等特点, 被广泛应用于遗传毒理学、医学、生物学和环境监测等领域。

本研究发现, 50、100 和 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫 14 d, 不能引起四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤。这与普遍认为 Cd 是一种具有较微弱遗传毒性的重金属的观点相一致。据报道, 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫贻贝 *Mytilus edulis* 28 d, 100 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫海鲷 *Sparus aurata* 11 d, 均不能导致血细胞 DNA 的损伤^[5,9]。作为生物体的防御机制, 四角蛤蜊金属硫蛋白和超氧化物歧化酶在 mRNA 和蛋白水平可被 Cd^{2+} 显著诱导^[10], 有效地保护了 DNA 分子免受 Cd^{2+} 毒性的伤害。但是, 大于 50 $\mu\text{mol/L}$ 的 Cd^{2+} 能够引起大鼠肝细胞 TRL 1215 DNA 链的断裂^[11]; 112 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫贻贝 *Mytilus galloprovincialis* 5 d 能够引起血细胞 DNA 的损伤^[12]。可见, Cd^{2+} 引起的 DNA 损伤程度因物种、细胞类型、作用剂量和作用时间的不同而不尽相同。本研究中, 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 胁迫组, 在第 14 天, 四角蛤蜊已全部死亡, 表明 Cd^{2+} 可能通过其他的途径, 而不是直接作用于 DNA, 对四角蛤蜊产生较高的毒性。

本研究表明 Hg^{2+} 能够明显导致四角蛤蜊血细胞 DNA 的损伤。20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫贻贝 *M. edulis* 3 d, 32 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫紫贻贝 *M. galloprovincialis* 5 d, 血细胞 DNA 损伤的程度显著增大^[12-13], 与本研究结果一

致。据报道,只有当污染物在生物体内靶组织中的浓度到达一定阈值时,才可启动 DNA 修复系统^[14]。结合实验过程中, Hg^{2+} 胁迫组血细胞 OTM 值在第 7 天下降的现象,表明生物体可能启动了 DNA 修复机制,对断裂的 DNA 进行一定的修复。11 天 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 和 $40\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组与 14 天 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组,OTM 值再次上升,表明四角蛤蜊的 DNA 修复系统被持续的 Hg^{2+} 胁迫所抑制, DNA 损伤程度加剧。OTM 值与胁迫时间线性相关性分析表明, $10\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 组的相关性较差,仅为 0.564 2,而 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 组和 $40\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 组的相关性均高于 0.8,可见 $10\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组, DNA 修复能力大于 $20\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 和 $40\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 胁迫组。低浓度胁迫组 DNA 修复能力大于高浓度胁迫组这一现象,也在其他的研究中得到证实^[14]。随着水体中 Hg^{2+} 质量浓度的升高,生物体自身修复的相对作用变小, DNA 损伤程度加剧,对生物体造成不可逆的损伤。

Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 复合胁迫能够显著损伤四角蛤蜊血细胞 DNA,随着胁迫时间的延长, DNA 损伤程度逐渐增大。在同一时间点,该组血细胞 DNA 损伤程度大于 Hg^{2+} 胁迫组,表明 Cd^{2+} 的存在加重了 DNA 的损伤, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 对 DNA 损伤具有协同作用。 Cd^{2+} 能够加重 H_2O_2 对贻贝 *M. edulis* 鳃细胞 DNA 的损伤^[5]。 Cd^{2+} 胁迫能够通过减缓虾 *Palaemonetes pugio* 胚胎 DNA 修复的过程,加重 UV 辐射和苯并芘导致的 DNA 损伤^[15]。研究发现, Cd^{2+} 可以通过取代 DNA 修复过程中某些关键酶例如 8-羟基鸟嘌呤 DNA 糖苷酶锌指结构中的 Zn^{2+} ,导致酶活性的丧失,干扰 DNA 修复,间接引起 DNA 损伤^[16]。综合本文的实验结果,推测 Cd^{2+} 可能会干扰四角蛤蜊 DNA 损伤的修复过程,使得 DNA 损伤不能及时修复,从而加重 Hg^{2+} 胁迫导致的 DNA 损伤。但具体的作用机制,还需要进一步的实验来阐明。

综上所述,彗星电泳技术可以成功地检测四角蛤蜊 DNA 损伤,能够应用于重金属对四角蛤蜊的毒理学研究领域。 $200\text{ }\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 不能造成四角蛤蜊血细胞 DNA 损伤, $10\text{ }\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} 即可显著诱导血细胞 DNA 损伤,因此,对于四角蛤蜊而言, Hg^{2+} 潜在的遗传毒性大于 Cd^{2+} 。 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 复合胁迫造成的 DNA 损伤显著大于 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 单独胁迫, Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 对 DNA 损伤具有协同作用。因此,应充分重视我国近海复合污染对贝类的毒性效应,开展更深入的研究,阐明复合污染对贝类的作用机制。

参考文献:

- [1] Wang C Y, Wang X L. Spatial distribution of dissolved Pb, Hg, Cd, Cu and as in the Bohai sea [J]. Journal of Environmental Sciences, 2007, 19: 1 061-1 066.
- [2] Booth S, Zeller D. Mercury, food webs, and marine mammals: implications of diet and climate change for human health [J]. Environmental Health Perspectives, 2005, 113: 521-526.
- [3] Wang Y W, Liang L, Shi J B, et al. Study on the contamination of heavy metals and their correlations in mollusks collected from coastal sites along the Chinese Bohai Sea [J]. Environmental International, 2005, 31: 1 103-1 113.
- [4] 王晓宇, 王清, 杨红生. 镉和汞两种重金属离子对四角蛤蜊的急性毒性 [J]. 海洋科学, 2009, 33(12): 24-29.
- [5] Pruski A M, Dixon D R. Effects of cadmium on nuclear integrity and DNA repair efficiency in the gill cells of *Mytilus edulis* L [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 57: 127-137.
- [6] Tran D, Moody A J, Fisher A S, et al. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 84: 11-18.
- [7] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. Experimental Cell Research, 1988, 175: 1 841-1 891.
- [8] Chang M, Wang W N, Wang A L, et al. Effects of cadmium on respiratory burst, intracellular Ca^{2+} and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei* [J]. Comparative Biochemistry and Physiology, Part C, 2009, 149: 581-586.
- [9] Isani G, Andreani G, Cocchioni F, et al. Cadmium accumulation and biochemical responses in *Sparus aurata* following sub-lethal Cd exposure [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2009, 72: 224-230.
- [10] Fang Y, Yang H, Wang T, et al. Metallothionein and superoxide dismutase responses to sublethal cadmium exposure in the clam *Macoma veneriformis* [J]. Comparative Biochemistry Physiology, Part C, 2010, 151: 325-333.
- [11] Misra R R, Smith G T, Waalkes M P. Evaluation of the direct genotoxic potential of cadmium in four different rodent cell lines [J]. Toxicology, 1998, 126: 103-114.
- [12] Bolognesi C, Landini E, Roggieri P, et al. Genotoxicity biomarkers in the assessment of heavy metal effects in

- mussels: Experimental studies [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 1999, 33: 287-292.
- [13] Tran D, Moody A J, Fisher A S, et al. Protective effects of selenium on mercury-induced DNA damage in mussel haemocytes [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 84: 11-18.
- [14] Black M C, Ferrell J R, Horning R C, et al. DNA strand breakage in freshwater mussels (*Anodonta grandis*) exposed to lead in the laboratory and field [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1996, 15: 802-806.
- [15] Hook, S E, Lee R F. Interactive effects of UV, benzo[alpha] pyrene, and cadmium on DNA damage and repair in embryos of the grass shrimp *Palaemonetes pugio* [J]. *Marine Environmental Research*, 2004, 58: 735-739.
- [16] Giaginis C, Gatzidou E, Theocharis S. DNA repair systems as targets of cadmium toxicity [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 213: 282-290.

Effects of Cd^{2+} and Hg^{2+} on DNA damage in haemocytes of *Macra veneriformis*

FANG Yan^{1,2}, YANG Hong-sheng¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China; 2. Graduate University, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Received: Aug., 12, 2010

Key words: *Macra veneriformis*; Cd^{2+} ; Hg^{2+} ; DNA damage; comet assay

Abstract: The objective of this study was to investigate the effects of Cd^{2+} and Hg^{2+} on DNA damage in haemocytes of *Macra veneriformis* that were exposed to different concentrations of Cd^{2+} or/and Hg^{2+} for 14 days. DNA damage was determined by the comet assay. There was no obvious DNA damage in haemocytes caused by 50, 100, and 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} during the exposure period. However, Hg^{2+} caused significant DNA damage in haemocytes at doses of 10, 20, and 40 $\mu\text{g/L}$ in a dose- and time- dependent manner. Combination of 200 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} and 20 $\mu\text{g/L}$ Hg^{2+} induced a time-dependent increase of DNA damage. The degree of DNA damage in the combined exposure group was severer than that in Hg^{2+} -treated groups. These results indicate that the ranking of genotoxic potential to *M. veneriformis* is in decreasing order: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+}$. There is a synergistic effect to DNA damage between Cd^{2+} and Hg^{2+} .

(本文编辑: 梁德海)