

重金属 Cu、Pb 在泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*) 卵巢的蓄积特性及其对卵细胞发育的影响*

唐建勋 邢承华 刘忠良 程樟顺 李君荣

(金华职业技术学院农业与生物工程学院 金华 321007)

提要 采用静水法生物测试手段,研究了不同浓度梯度 Cu、Pb(各 0.00、0.10、0.25、0.50mg/L)随时间变化在泥鳅卵巢中的蓄积特性以及对卵细胞发育的影响。结果表明,泥鳅卵巢对 Cu、Pb 有较强的蓄积能力,在暴露期间 20 天内,蓄积量与时间呈线性关系,之后呈对数关系。其中, Cu 的蓄积显著大于 Pb ($P < 0.01$); 卵巢中重金属的蓄积与水溶液中 Cu、Pb 的浓度梯度相关($P < 0.01$),具有明显的时间效应和剂量效应。泥鳅卵巢中卵细胞的发育水平,亦与溶液重金属浓度的高低、暴露时间长短有关;在不同浓度重金属溶液中较长时间的暴露,将对卵巢及卵细胞的发育产生不可逆转的负效应。

关键词 Cu, Pb, 泥鳅, 卵巢, 蓄积特性, 卵细胞发育

中图分类号 X171.5

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)隶属于鲤形目、鳅科,广泛分布于我国除青藏高原外的广大地区。然而,由于近些年来随着工农业生产的迅猛发展,水域环境受重金属的污染愈演愈烈,给泥鳅等水生动物的生存带来严峻的挑战。Cu、Pb 是水体中常见的重金属污染物,它们在环境中难以降解,并能通过食物链富集放大(曹德菊等, 2004)。水体中的重金属不仅在各种水生动物的皮肤、肌肉、鳃和内脏器官蓄积(Van Aardt *et al*, 2004; Has *et al*, 2007; Al-Weher, 2008; 吴众望等, 2005; 匡维华等, 2007),与此同时也对其赖以繁衍后代、维系种群数量的生殖器官构成威胁(Woodall *et al*, 1988; Ebrahimi, 2007; 韩照祥等, 2007)。因此,开展重金属对鱼类性腺影响的研究,对于鱼类的生长发育、繁殖保护和资源利用等都具有较为重要的现实意义。

迄今为止,有关重金属对鱼类等水产动物胁迫多数以毒性试验为主,对于重金属在脏器中的生物学蓄积研究并不多见,重金属在鱼类(尤其是泥鳅)性腺中的蓄积研究则罕有报道。本试验以泥鳅为对象,着重探索与研究重金属 Cu、Pb 在泥鳅卵巢的蓄积规

律及其对卵细胞发育的影响,以期为重金属对水生生物的影响评价、环境污染诊断学和渔业资源保护等提供相应的参考。

1 材料与方法

1.1 试剂

CuCl₂ (优质纯, Grand Reagent, GR)、PbCl₂ (分析纯, Analytical Reagent, AR, PbCl₂ 含量 ≥ 98.0%); 各先配制成质量浓度为 1000mg/L 的母液,然后根据需要稀释成各相应的浓度。HNO₃(GR)、HClO₄(GR); 使用前以 4 : 1 混合。

1.2 仪器

日本 Olympus 公司 CKX41 型荧光倒置显微镜(HQ2592 × 1944); 美国 Thermo Elemental 公司 IRIS Intrepid ER/S 型 ICP 原子发射光谱仪; LSP 型远红外消煮炉; KD 型(冰冻)切片机; DGG-9070A 型电热恒温鼓风干燥箱。

1.3 试验动物

试验用 2 龄泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)购自浙江金华水产品市场(水库水源养殖); 平均体长

* 浙江省自然科学基金项目, Y307535 号, Y304185 号; 浙江省教育厅科研计划项目, Y200804870 号。唐建勋, 副教授, 硕士, E-mail: jhtjxun@163.com

收稿日期: 2009-06-19, 收修改稿日期: 2009-08-25

(12±3.2)cm, 平均体重为(15±0.36)g。

1.4 试验设计

Cu²⁺、Pb²⁺暴露装置为 37cm×27cm×40cm 的聚乙烯塑料水族箱, 各盛曝气 3 天的自来水 20L; 试验水质参数为: pH 6.3—6.6, DO 7.3—7.7mg/L, 水温 10—16℃, 硬度(均值)2.80mmol/L, 碱度(均值) 2.3 mmol/L。泥鳅于试验前暂养 7 天, 暂养期间活动正常, 无病无伤, 死亡率低于 5%; 采用静水法生物测试(吴邦灿等, 1999), 试验期间不更换水族箱溶液; 试验期间不投饲料; 用充气泵全天充气增氧。

设置 3 个不同浓度 Cu²⁺、Pb²⁺试验组, 1 个对照组。Cu²⁺、Pb²⁺浓度分别以《渔业水质标准》(GB11607-89)的 10、25、50 倍和 2、5、10 倍设定, 浓度系列各为 0.00、0.10、0.25、0.50mg/L(表 1)。选择大小基本一致的泥鳅随机分组, 每只水族箱放养泥鳅 10 尾, 设平行样, 暴露时间为 30 天。同时, 分别于试验前及第 10、20、30 天取各组卵巢(中部)切片观察并称取样品, 消煮、烘干、检测。

表 1 不同试验组别重金属 Cu²⁺、Pb²⁺浓度设定
Tab.1 The concentrations of heavy metals (Cu²⁺, Pb²⁺) in different experiments

处理组	重金属离子	浓度(mg/L)(各)
对照组	—	—
试验组 1	Cu ²⁺ / Pb ²⁺	0.10
试验组 2	Cu ²⁺ / Pb ²⁺	0.25
试验组 3	Cu ²⁺ / Pb ²⁺	0.50

1.5 统计分析

试验结果统计的处理方法参照文献(熊治延, 2000)。全部数据采用 SPSS11.0 数据处理系统进行统计分析。

2 结果

2.1 Cu²⁺、Pb²⁺在卵巢的蓄积规律

重金属 Cu²⁺、Pb²⁺在泥鳅卵巢中的蓄积呈现时间效应和剂量效应的特点(表 2), 在攻毒试验前(0 天), 未检测出卵巢中的重金属离子; 在 Cu²⁺、Pb²⁺浓度分别为 0.10、0.25、0.50mg/L 组联合攻毒 10 天内, 卵巢中 Cu²⁺、Pb²⁺含量迅速增加; 在联合攻毒 20 天内, 试验组卵巢中的 Cu²⁺、Pb²⁺含量均呈现急剧上升趋势; 攻毒 20 天后, 卵巢蓄积 Cu²⁺、Pb²⁺的速度与 0—20 天内相比则明显减缓($P<0.05$)。卵巢对 Cu²⁺、Pb²⁺的蓄积能力与水溶液中重金属浓度有关, 溶液浓度越

高, 蓄积量越大($P<0.01$)。而在攻毒 30 天后, 卵巢 Cu²⁺、Pb²⁺的蓄积速度减缓。同时, 在两种重金属中, 无论是高重金属浓度组还是低浓度组, 泥鳅卵巢对于 Cu²⁺的蓄积能力远大于 Pb²⁺($P<0.01$), 这与以前的研究者有关重金属在鱼类其它脏器的蓄积规律的研究类似(杨丽华等, 2003; 徐永江等, 2004)。而对照组(Cu²⁺、Pb²⁺浓度分别为 0.00mg/L)卵巢中未检测出 Cu²⁺、Pb²⁺。

卵巢中 Cu²⁺、Pb²⁺的蓄积量与染毒时间关系的回归方程及相关系数见表 3; Cu²⁺、Pb²⁺在泥鳅卵巢中的蓄积随时间变化的关系见图 1a、图 1b。

2.2 Cu²⁺、Pb²⁺对卵巢发育的影响

在重金属 Cu²⁺、Pb²⁺浓度分别为 0.10、0.25、0.50mg/L 联合攻毒后, 泥鳅卵巢对重金属的蓄积十

表 2 不同时间重金属 Cu²⁺、Pb²⁺在泥鳅卵巢中的蓄积(μg/g)

Tab.2 The accumulation of heavy metals (Cu²⁺, Pb²⁺) in the ovaries at different times (μg/g)

时间(d)	组别	Cu ²⁺ (μg/g 干重)	Pb ²⁺ (μg/g 干重)
10	对照组	—	—
	试验组 1	5.3±0.5 ^e	1.3±0.4 ^g
	试验组 2	7.6±0.7 ^e	2.5±0.4 ^f
20	对照组	—	—
	试验组 1	79.8±3.7 ^f	3.1±0.8 ^{ef}
	试验组 2	114.2±4.7 ^e	5.1±0.2 ^d
30	对照组	—	—
	试验组 1	150.7±6.7 ^d	4.3±0.3 ^{de}
	试验组 2	160.1±11.0 ^c	7.6±0.4 ^c
	试验组 3	396.1±18.4 ^a	39.1±3.2 ^a

注: 上标字母不同者表示差异显著($P<0.05$), 相同者表示组间差异不显著($P>0.05$)

表 3 泥鳅卵巢中 Cu²⁺、Pb²⁺的蓄积量(y)与暴露时间(t)的回归方程及相关系数

Tab.3 Correlations between the ovarian accumulation of Cu²⁺ or Pb²⁺ and the exposure time

组别	重金属	回归方程	相关系数(R ²)
试验组 1	Cu ²⁺	$y = 7.2721t - 66.8260$	0.9952
	Pb ²⁺	$y = 0.1474t - 0.0489$	0.8525
试验组 2	Cu ²⁺	$y = 7.6213t - 58.4710$	0.9406
	Pb ²⁺	$y = 0.2538t - 0.0200$	0.9761
试验组 3	Cu ²⁺	$y = 19.1290t - 181.5100$	0.9947
	Pb ²⁺	$y = 1.7731t - 12.4440$	0.9566

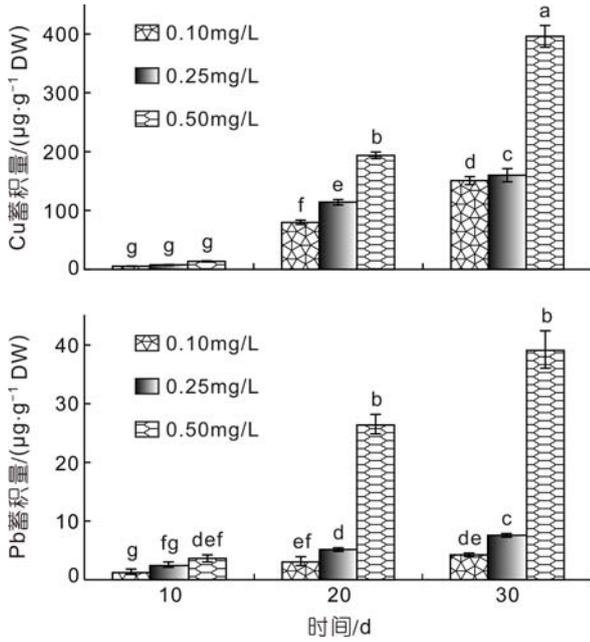


图1 Cu²⁺、Pb²⁺在卵巢中的蓄积随时间变化的关系
Fig.1 The relationship between the ovarian accumulation of Cu²⁺, Pb²⁺ and the exposure time

分迅速, 不同时相的卵细胞在染毒第 10 天内即表现出细胞损伤, 出现细胞质渗出、变性, 卵细胞发育受阻, 发育速度减缓。在染毒第 20 天内表现出部分卵膜脱落, 细胞质渗出、萎缩、变性、干瘪, 发育迟滞, 卵膜与卵细胞分离, 造成卵巢的组织学损伤。在染毒第 30 天内, 卵细胞严重变性、干瘪, 相互粘结, 卵巢整体萎缩, 且不可逆转。藉此可作为判定卵细胞代谢能力终结及卵巢生殖功能丧失的依据。而对照组 (Cu²⁺、Pb²⁺浓度分别为 0.00mg/L) 卵巢及不同时相的卵细胞则发育正常(图 2)。

3 讨论

生物细胞内存在着重金属硫蛋白(MT), 能结合大量的金属离子, 且对某些重金属的毒性起解毒作用, 但重金属硫蛋白的解毒作用是有限的。当重金属离子在体内蓄积到一定程度, 多余的重金属就会转移到鱼的肝肾等器官中, 与体内其它生物分子, 包括酶和核酸相互作用, 造成致命的创伤(蓝伟光等, 1990)。泥鳅的组织器官对一定浓度的重金属离子虽有一定的抵抗作用, 然而随着染毒时间的延续, 其抵抗作用渐渐消失。而重金属毒性的增强, 其结果是导致动物体代谢紊乱、器官受损等。本研究结果表明, Cu²⁺、Pb²⁺在泥鳅卵巢中的蓄积量随溶液浓度的增加

而增加、随时间的延长而增加, 卵巢重金属蓄积量持续增大后, 卵巢的解毒能力逐步消失, 卵细胞受损, 继而失去代谢能力, 最终导致卵巢功能衰退或丧失。

Cu²⁺是鱼类生长发育所必需的微量元素, 是酶的组成成分或构成酶活性基团的物质之一。许多试验证明, 适量的 Cu²⁺可增强鱼体的免疫能力, 对机体的生

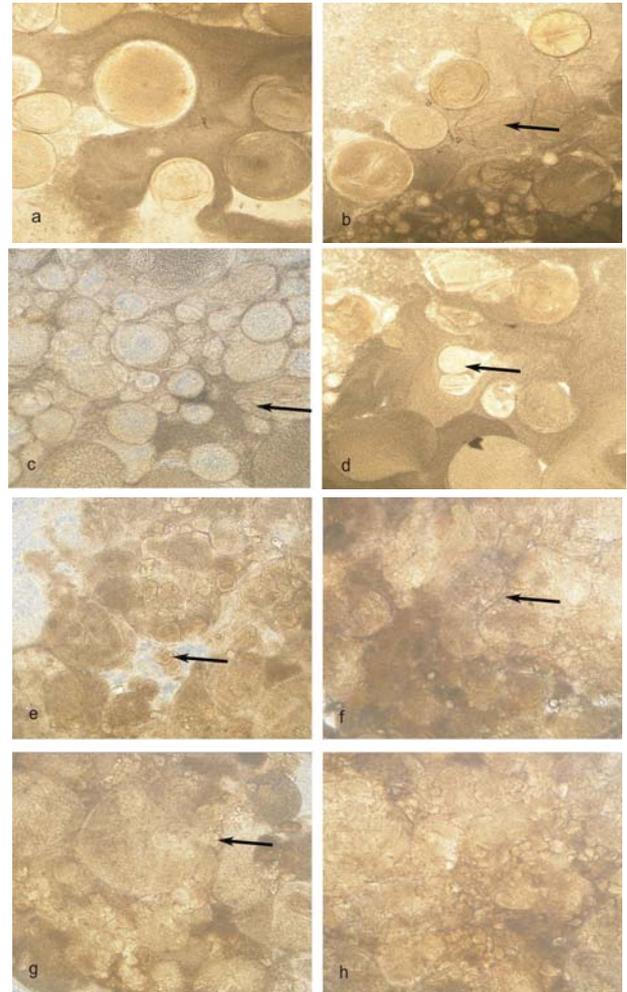


图2 不同 Cu²⁺、Pb²⁺浓度联合攻毒后的卵巢及卵细胞变化
Fig.2 The combined effects of various concentrations of Cu²⁺ and Pb²⁺ on ovaries and ova
a. 对照组; 正常发育的卵巢, 示不同发育时相卵细胞。b. 试验组 1; 10 天后的卵巢及卵细胞; 箭头示卵细胞变性。c. 试验组 1; 20 天后的卵巢及卵细胞; 箭头示卵细胞脱水、萎缩、变性。d. 试验组 2; 20 天后的卵巢及卵细胞; 箭头示卵细胞脱水、萎缩、变性, 发育受阻。e. 试验组 3; 20 天后的卵巢及卵细胞; 箭头示卵细胞与卵膜分离、萎缩、干瘪。f. 试验组 1; 30 天后的卵巢及卵细胞; 箭头示卵细胞萎缩、干瘪并相互粘结, 功能丧失。g. 试验组 2; 30 天后的卵巢及卵细胞; 箭头示卵细胞干瘪、萎缩并粘结, 功能丧失。h. 试验组 3; 30 天后的卵巢及卵细胞; 示卵细胞干瘪、萎缩并相互粘结, 功能丧失

理活动具有重要意义, 但当其浓度超过机体的生理阈值时, 则会对鱼类产生极大的危害(沈竑等, 1994)。本研究也表明, 当 Cu^{2+} 为 0.10mg/L (相对低浓度)时, 在短期内不会影响泥鳅的生长发育, 然而随着对 Cu^{2+} 蓄积量的增加, 通过时间效应和剂量效应, 泥鳅生殖器官将受到损伤, 进而影响到其整体的生理机能。

Pb^{2+} 是毒性较强的重金属, 是泥鳅和其它鱼类非必需的微量元素。通常, Pb^{2+} 在水产动物组织器官的蓄积 $< \text{Cu}^{2+}$, 但有研究显示, Pb^{2+} 在锦鲤鱼各组织器官的蓄积 $> \text{Cu}^{2+}$ ($P > 0.01$) (张海瑞等, 2009), 与本试验及许多其它研究的结果恰恰相反。这可能与重金属在机体内具有种间组织器官选择积累的倾向性差异或对环境重金属元素的吸收具有选择性有关(刘长发等, 2001; 袁旭音等, 2005)。一般认为, 当重金属在动物体内蓄积到一定水平, 多余的重金属会转移至肝、肾等器官中, 而引起机体致命的创伤(杨丽华等, 2003)。相对而言, 水体中较高浓度的 Cu^{2+} 比 Pb^{2+} 对鱼类的危害更大, 如 Cu^{2+} 浓度为 0.16mg/L 时, 即可引起草、鲢鱼胚胎发育迟缓、出现怪胎及畸形鱼苗, 而当 Pb^{2+} 的浓度为 1mg/L 时, 草、鲢鱼才会出现前述情况(姜礼燧等, 1979)。

泥鳅等鱼类的组织器官对水体重金属离子都具有较强的吸收和蓄积能力。天然水域中重金属的毒性, 与其化学形态密切相关, 并主要取决于其游离(水合)离子的浓度(徐永江等, 2004)。例如, Cu 的自由离子浓度高时, 毒性作用增强(Zamuda *et al*, 1982; Engel *et al*, 1985); 水环境温度高时, 重金属对动物体组织器官的毒性增大; 而水环境其它条件的改变, 也会对重金属的蓄积产生影响(李书霞, 2002)。与此同时, 重金属离子间相互作用十分复杂, 既有协同作用也有拮抗作用(张迎梅等, 2008), 本试验中的 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 对于泥鳅卵巢和卵细胞的影响属何种效应尚不甚明了, 还需要继续探讨。此外, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 对于卵巢及卵细胞影响的作用机理以及毒理过程等, 有待进一步的深入研究。

参 考 文 献

匡维华, 张德云, 黄雪源, 2007. 重金属离子 Cd、Hg、Pb 在鳊鱼体内残留规律研究. 科技通报, 23(5): 589—692
刘长发, 陶 澍, 尤爱民等, 2001. 金鱼对铅和镉的吸收蓄积. 水生生物学报, 25(4): 344—349
李书霞, 2002. 三丁基锡的生物富集与分配行为. 环境科学学报, 22(6): 726—731

杨丽华, 方展强, 郑文彪, 2003. 重金属对鲫鱼的急性毒性及安全浓度评价. 华南师范大学学报(自然科学版), (2): 101—106
吴邦灿, 费 龙, 1999. 现代环境监测技术. 北京: 中国环境科学出版社, 252—254
吴众望, 潘鲁青, 张红霞, 2005. 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏、鳃丝和血液 SOD 活力的影响. 应用生态学报, 16(10): 1962—1966
沈 竑, 徐 韧, 彭立功等, 1994. 铜对鲫鱼血清生化成分的影响. 海洋湖沼通报, (1): 55—61
张迎梅, 王叶菁, 虞闰六等, 2008. 重金属胁迫对泥鳅肝胰脏 ATPase 和 SOD 活性的影响. 甘肃科学学报, 20(3): 55—59
张海瑞, 许晓曦, 2009. 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, 30(7): 276—278
姜礼燧, 黄穆桂, 1979. 重金属对草鱼、鲢鱼胚胎发育的影响. 环境科学, 1: 6—11
袁旭音, 乔 磊, 刘红樱等, 2005. 江苏海岸带生物体中的重金属水平与生态评价. 河海大学学报(自然科学版), 33(3): 237—240
徐永江, 柳学周, 马爱军, 2004. 重金属对鱼类毒性效应及其分子机理的研究概况. 海洋科学, 28(10): 67—70
曹德菊, 岳永德, 黄祥明等, 2004. 巢湖水体 Pb、Cu、Fe 污染的环境质量评价. 中国环境科学, 24(4): 509—512
韩照祥, 许兴友, 谢惠珠, 2007. 重金属与鲑鱼精 DNA 作用的比较研究. 农业环境科学学报, 26(1): 164—169
蓝伟光, 杨孙楷, 1990. 海水污染物对对虾毒性研究的进展. 福建水产, (1): 41—45
熊治延, 2000. 环境生物学. 武汉: 武汉大学出版社, 134—137
Al-Weher S M, 2008. Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the North Jordan Valley, Jordan. Jordan Journal of Biological Sciences, 1(1): 41—46
Ebrahimi M, 2007. Effects of *in vivo* and *in vitro* zinc and cadmium treatment on sperm steroidogenesis of the African catfish *Clarias gairepinus*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 10(17): 2862—2867
Engel D W, Brouwer M, 1985. Metallothionein-like proteins physiological importance. In: Advances in Comparative and Environmental Physiology, Springer-Verlag, Berlin, 53
Has Schon E, Bogut I, 2007. Heavy metal concentration in fish tissues inhabiting waters of Busko Blato reservoir (Bosnia and Herzegovina). Environ Monit Assess, 9(11): 1125—1130
Van Aardt W J, Erdman R, 2004. Heavy metals (Cd, Pb, Cu, Zn) in mudfish and sediments from three hard-water dams of the Mooi river catchment, south Africa. Water, 30: 211—218
Woodall C, Maclean N, Crossley F, 1988. Responses of trout fry (*Salmo gairdneri*) and *Xenopus laevis* tadpoles to cadmium and zinc. Comp Biochem Physiol C, 89(1): 93—99
Zamuda C D, Sunda W C, 1982. Bioavailability of dissolved copper to the American oyster *Crassostrea virginica*. Importance of chemical speciation. Mar Biol, 66: 77—82

ACCUMULATION OF HEAVY METALS (Cu^{2+} AND Pb^{2+}) IN THE OVARY OF *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS* AND THE SUBSEQUENT EFFECTS ON OVA DEVELOPMENT

TANG Jian-Xun, XING Cheng-Hua, LIU Zhong-Liang, CHENG Zhang-Shun, LI Jun-Rong
(Agricultural and Bio-Engineering School, Jinhua College of Vocation and Technology, Jinhua, 321007)

Abstract We studied the accumulation of Cu^{2+} and Pb^{2+} (0.00, 0.10, 0.25 and 0.50mg/L, respectively) in the ovary of *Misgurnus anguillicaudatus* as well as the subsequent effects on ova development. We found that the ovarian accumulation of Cu^{2+} and Pb^{2+} was time- dose- dependently related to the environmental concentrations ($P<0.01$). The ovary of *M. anguillicaudatus* showed a high capacity of accumulating Cu^{2+} and Pb^{2+} ; the correlation between the accumulation level and the exposure time for the initial 20 days was linear, and became exponential afterwards. In addition, the accumulation of Cu^{2+} was significantly higher than that of Pb^{2+} ($P<0.01$). The development of the ova was affected by the concentrations and exposure duration; prolonged exposure to various concentrations of these heavy metals resulted in irreversible damage in the ovaries and the ova.

Key words Cu, Pb, *Misgurnus anguillicaudatus*, Ovary, Accumulation characteristic, Ovum development