

镉和汞胁迫对四角蛤蜊(*Macra veneriformis*) 血细胞的毒性损伤研究*

王晓宇^{1,2} 杨红生¹ 邢坤³ 王清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 青岛 266071; 2. 天津市水产研究所
天津 300221; 3. 大连海洋大学 大连 116023)

提要 采用透射电镜观察、溶酶体膜稳定性衡量和微核生成率检测的方法,系统研究了室内模拟 Cd 和 Hg 污染胁迫对四角蛤蜊血细胞的毒性损伤。结果表明, Cd 对四角蛤蜊血细胞超微结构的损伤表现出明显的浓度依赖效应, 125 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫下血细胞结构损伤程度高于 25 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫; 不同浓度 Cd 和 Hg 暴露 14 天后, 各处理组(2 $\mu\text{g/L}$ Hg 处理组除外)中性红保持时间(NRRT)随胁迫浓度的增高逐渐降低, 微核率(MNF)和总畸形核率(TANF)随胁迫浓度的增高而逐渐增大; 25 $\mu\text{g/L}$ Hg 处理组血细胞中性红保持时间要低于 25 $\mu\text{g/L}$ Cd 处理组, 而微核率和总畸形核率则高于 25 $\mu\text{g/L}$ Cd 处理组, 说明 Hg 胁迫对四角蛤蜊血细胞溶酶体膜和细胞核具有更强的损伤作用; 相关性分析表明中性红保持时间、微核率和总畸形核率三种指标对于衡量重金属污染对四角蛤蜊血细胞的毒性效应有非常好的协同检测作用, 可以作为有效的生物标志物。

关键词 镉, 汞, 超微结构, 中性红保持时间, 微核率, 总畸形核率

中图分类号 X503.2

双壳贝类由于分布广泛, 栖息地多在污染比较严重的滨海或者河口地区, 其成体移动性差, 活动范围小, 营滤食的摄食方式, 它们容易暴露于各种污染物中并对其进行富集, 因此被广泛用作海洋环境污染的指示种生物(Shulkin *et al.*, 2003)。四角蛤蜊(*Macra veneriformis*)属软体动物门、瓣鳃纲、真瓣鳃目、蛤蜊科, 生活在泥沙滩潮间带, 是我国南北沿海滩涂养殖主要经济贝类之一, 仅辽宁省资源量就约 8 万 t, 居滩涂贝类第三位, 仅低于菲律宾蛤仔和文蛤(闫喜武等, 2008)。

重金属被生物体吸收后, 会导致生理过程的障碍或者致遗传突变, 并通过对生物个体的损伤而影响到生态系统的结构和功能, 甚至危害到人类的健康和生命安全(王志铮等, 2009; 张丽岩等, 2010)。

双壳贝类的血细胞在营养运输、伤口修复、免疫防御和异源物质清除等方面具有很重要的作用(Feng *et al.*, 1977)。重金属污染胁迫下, 贝类血细胞很容易受到各种损伤, 例如细胞膜、细胞核和各种细胞器(线粒体、溶酶体等)的损伤, 从而影响到血细胞的生理功能(Matozzo *et al.*, 2001)。溶酶体是位于细胞质内含多种水解酶的球形细胞器, 它的主要功能是消化和清除进入体内的有害物质。重金属胁迫会导致溶酶体内水解酶活力变化, 溶酶体大小改变和溶酶体膜的通透性增加(Koukouzika *et al.*, 2005)。因此可以通过检测血细胞溶酶体膜的改变来指示贝类生理状况是否受到污染物的影响(UNEP/RAMOG, 1999)。此外, DNA 损伤是血细胞在污染胁迫下的主要氧化损伤类型。在细胞分裂后期, 如果完整的染色体或染色体片断不

* 国家“973”计划资助项目, 2007CB407305 号; 国家海洋公益性行业科研专项资助项目, 200805069 号; 国家基金委创新研究群体科学基金项目, 40821004 号; 中国科学院创新工程重要方向项目, KZCX2-YW-Q07-03 号; 天津市科技兴海专项, kx2010-4 号。王晓宇, 博士, 助理研究员, E-mail: heyxiaoyu@163.com

通讯作者: 杨红生, 研究员, E-mail: hshyang@qdio.ac.cn

收稿日期: 2009-10-09, 收修改稿日期: 2009-12-15

能合并到子细胞核中, 就会存留在细胞质中形成微核(Micronuclei, MN)。除微核外, 细胞核在受到损害后还会呈现其它形态, 例如双核(bi-nucleated, BN)、芽核(nuclear buds, NB)、裂核(fragmented-apoptotic, FA)等, 以上这些总称为核畸形(nucleus abnormality, NA)。即使在短期的污染物暴露中, 细胞也会在分裂过程中表现出细胞核的遗传损伤, 因此微核试验很适合用来评估环境污染物对生物体的遗传毒性效应(Fenech *et al.*, 2003)。

目前, 国际上已经开始重视用中性红保持力和微核试验来评估海洋贝类的毒理损伤, 在长牡蛎(*Crassostrea gigas*)、美洲牡蛎(*C. virginica*)、紫贻贝(*Mytilus galloprovincialis*)和砂海螂(*Mya arenaria*)等毒理研究中被应用并报道(Mersh *et al.*, 1997), 但在我国相关报道极少。本研究以四角蛤蜊作为研究对象, 通过室内模拟镉和汞的污染胁迫, 检测四角蛤蜊血细胞超微结构的损伤、溶酶体膜稳定性的改变、微核生成率和总畸形核生成率, 评估了重金属污染对双壳贝类血细胞的毒性效应和遗传损伤, 为解释污染胁迫下贝类资源衰退提供理论基础, 为开展环境评估和保护提供科学依据, 为建立快速有效的污染生物标志物检测方法提供技术支撑。

1 材料与方法

1.1 实验动物暂养和试剂配制

实验对象为二龄的健康四角蛤蜊(*Macra veneriformis*), 购自日照岚山滩涂贝类养殖场, 运回实验室后先暂养 7 天。暂养期间每 24h 换水 1 次, 连续充气, 定时定量投喂金藻 3011, 暂养期间贝类活动正常, 无病, 死亡率低于 2%。实验前 1 天停止投饵, 选择健康、反应灵敏、大小基本一致的四角蛤蜊随机分组进行实验。实验用贝壳长为(29.43±1.04)mm, 壳高为(26.19±1.51)mm, 湿重为(6.91±0.97)g。

CdCl₂·2.5H₂O(分析纯)和 HgCl₂(分析纯)均为国药集团化学试剂有限公司的产品, 用 Millipore 去离子水分别配成含镉和汞浓度为 20g/L 的母液, 然后按照实验需要进行浓度稀释。

1.2 室内胁迫实验

实验在 61.8cm×43.0cm×31.3cm 的聚乙烯水族箱中进行, 实验期间用水为中国科学院海洋研究所水族楼提供的经砂滤、净化处理过的养殖用海水。每次换水前进行充分曝气, 并且在实验室内预存放 3 天, 以保持相应的理化因子稳定。每一个水族箱中加入养

殖海水 50L, 将实验室驯养后的健康四角蛤蜊, 分别暴露在含 0、25、75、125μg/L Cd²⁺和 0、2、6、10、25μg/L Hg²⁺的实验处理组中, 每个处理组设置三个平行。

实验期间保持连续微量充气, 每 24h 换水 1 次, 并且定时定量投养金藻 3011。整个实验过程保持理化条件基本稳定, 水温为 17—19℃, 盐度为 31—33, pH 7.79—8.11。实验进行 14 天后取样。

1.3 透射电镜观察

在四角蛤蜊后闭壳肌血窦处皮下注射法抽取血淋巴, 用 2.5%戊二醛 4℃下固定 2h, 静止沉淀。血细胞沉淀用磷酸缓冲溶液冲洗 3 次, 然后用 1%的 OsO₄ 在 4℃下固定 75min, 系列梯度酒精脱水, 用 Epon 包埋, 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅双染色后, 在 H7000 型透射电镜下观察。

1.4 溶酶体膜稳定性检测: 中性红保持时间

称取 20mg 中性红溶解到 1ml 二甲基亚枫中配成储备液, 然后转移 5μl 储备液到 995μl 中性红生理盐水中, 混匀, 作为中性红染液。用皮下注射器(内有 0.5ml 中性红生理盐水)插入四角蛤蜊后闭壳肌部位抽取 0.5ml 血淋巴, 然后将 40μl 血淋巴-生理盐水混合物吸到载玻片上。放入潮湿箱中 3min 使细胞附着, 倾斜载玻片小心的倒掉多余液体, 然后加入 40μl 中性红染液, 置于潮湿箱中(15—16℃)15min。加上载玻片, 镜检。

第一个小时内每 15min 镜检, 接下来的两小时内每 30min 镜检。检测滤出中性红到细胞液中的溶酶体达到 50%的时间, 得到每个样品的平均值和所有样品的平均值。滤出率的增加表征着血细胞受污染胁迫程度的增加。结果记录见表 1。

表 1 中性红保持时间实验结果记录样表
Tab.1 Neutral red retention time measurements

样品	0min	15min	30min	45min	60min	90min
对照组	+	+	+	+	+	+
处理组	+	+	+	-	-	-

注: “+”表示中性红保持力超过 50%, “-”表示中性红保持力低于 50%

1.5 遗传毒性效应评价: 微核率和总畸形核率检测

在四角蛤蜊后闭壳肌血窦处皮下注射法抽取血淋巴, 用相同体积的 Hanks' 平衡液稀释, 1000r/min 离心。血淋巴样品用甲醇: 乙酸(3:1)溶液固定 20min, 然后展到载玻片上, 风干, 用 3% Giemsa 染色, 编

号。Olympus 显微镜下用 1000 倍放大倍率的油镜观察载玻片, 每个样品计数 2000 个细胞。由于个体间微核发生率的高差异性, 每个处理组要求计数 8—10 只贝。

计数时遵循下述规则: 血细胞必须是完整细胞; 染色质结构和颜色程度与大多数细胞的相近; 细胞核要在同一光学平面上; 血细胞圆形或卵圆形; 细胞不能破碎。

2 实验结果

2.1 透射电镜观察结果

2.1.1 对照组四角蛤蜊血细胞超微结构概述 除了小部分由于生理性细胞老化造成结构改变的血细胞外, 对照组的血细胞充满细胞质, 膜结构没有损伤, 表明在电镜样品固定过程中没有出现渗透损伤或者细胞固定不充分的情况(图 1A、B)。

透射电镜下可以观察到两种类型的血细胞: 透明细胞和颗粒细胞。透明细胞大小约 6—8 μm , 细胞核较大, 染色质深, 通常看不到核仁, 细胞质中缺少或只含有少量的细胞器和滤泡结构。线粒体较少, 分散在细胞质中; 溶酶体较少; 细胞质中发现有大量光面内质网, 组成了丰富的囊泡结构; 核糖体较少; 细胞表面光滑, 伪足不明显(图 1A)。颗粒细胞大小约 4—6 μm , 细胞内最显著的特征是有大量同质性分泌性颗粒, 颗粒电子密度大并充满整个细胞, 细胞核被挤在一边。细胞器很少; 线粒体较少, 但线粒体膜结构和线粒体嵴完整; 滤泡很少, 零星地分布在细胞质中; 糙面内质网发达, 可见有大量核糖体; 细胞边缘粗糙, 伪足很小且不明显(图 1B)。

2.1.2 25 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫下血细胞超微结构的改变

25 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫下, 透明细胞的超微结构发生了显著性变化: 光面内质网有轻度扩增, 并呈碎片状, 分散在细胞质中; 滤泡大量出现, 组成了丰富的滤泡结构; 线粒体减少; 吞噬体开始出现, 并形成溶酶体; 伪足开始活跃, 变得粗大; 血细胞膜增厚, 扭曲, 变得模糊, 并出现溶解现象, 结果显示透明细胞结构和功能已受到影响(图 2A)。颗粒细胞的超微结构变化有: 血细胞吞噬活跃, 甚至在细胞质中出现了空泡, 这是伪足过度伸展造成的; 细胞器形态和数量发生变化; 颗粒细胞线粒体外膜肿胀, 线粒体嵴溶解, 电镜下线粒体内部结构不明显; 糙面内质网上的核糖体开始脱落; 颗粒呈现轻微溶解, 数量减少; 细胞膜扭曲, 伪足大量伸出(图 2B)。

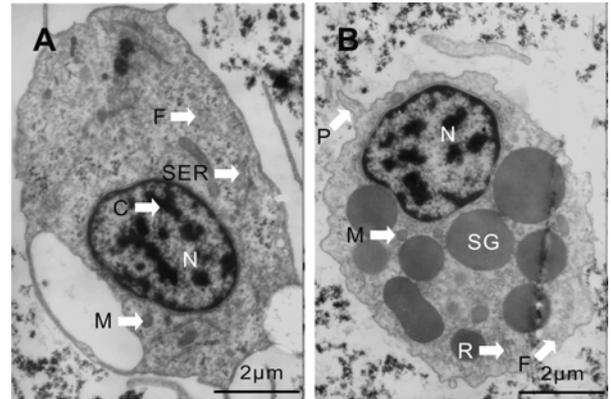


图 1 透射电镜下对照组四角蛤蜊血细胞结构

Fig.1 Hemocyte ultrastructure of *M. veneriformis* in the control group

A. 透明细胞; B. 颗粒细胞。M: 线粒体; N: 细胞核; C: 染色质; F: 滤泡; SER: 光面内质网; P: 伪足; R: 核糖体; SG: 分泌性颗粒

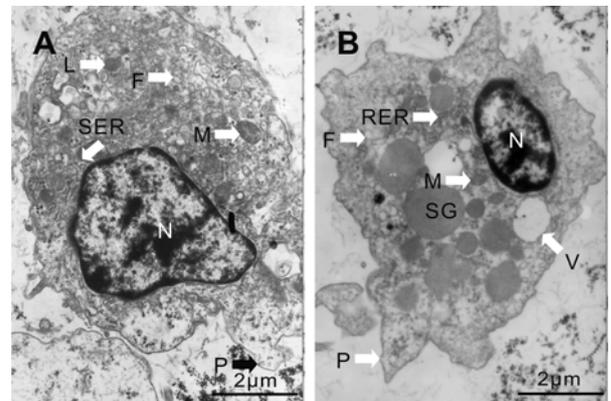


图 2 25 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫后透射电镜下的血细胞结构

Fig.2 Hemocyte ultrastructure of *M. veneriformis* exposed to 25 $\mu\text{g/L}$ Cd

A. 透明细胞; B. 颗粒细胞。M: 线粒体; N: 细胞核; F: 滤泡; V: 空泡; P: 伪足; SER: 光面内质网; RER: 糙面内质网; L: 溶酶体; SG: 分泌性颗粒

2.1.3 125 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫下血细胞超微结构的改变

125 $\mu\text{g/L}$ Cd 胁迫下, 透明细胞的细胞核萎缩, 核膜溶解, 界线模糊; 细胞质电子密度低, 其结构呈空泡状, 可能是由滤泡变大组合而成; 吞噬物形成并与细胞质组分溶合成次级溶酶体; 线粒体数量减少并溶解破损; 没有发现内质网构造(图 3A)。颗粒细胞细胞核伸长变形, 颗粒进一步溶解, 留下空泡状物质, 细胞质中核糖体结构消失, 只发现内质网碎片, 高尔基体严重扭曲变形, 伪足异常伸长(图 3B)。

2.2 Cd 和 Hg 胁迫对血细胞溶酶体中性红保持力的影响

Cd 和 Hg 胁迫下, 血细胞溶酶体中性红保持时间

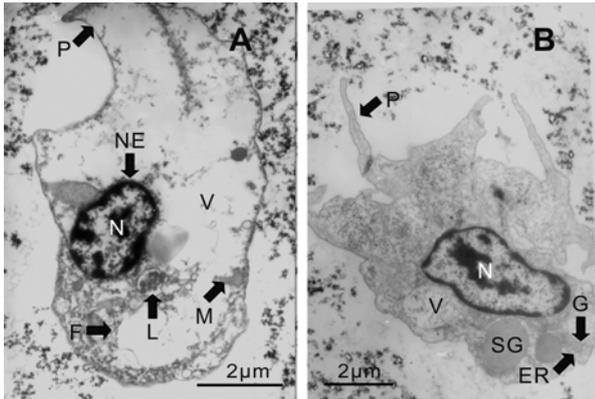


图3 125µg/L Cd 胁迫后透射电镜下的血细胞结构

Fig.3 Hemocyte ultrastructure of *M. veneriformis* exposed to 125µg/L Cd

A. 透明细胞; B. 颗粒细胞。M: 线粒体; N: 细胞核; F: 滤泡; V: 空泡; P: 伪足; ER: 内质网; L: 溶酶体; NE: 核膜; G: 颗粒; SG: 分泌性颗粒

(*NRRT*)随着胁迫浓度的升高而逐渐降低,表现出明显的浓度依赖效应(图 4A、B)。Cd 暴露 14 天后,对照组和 25、75、125µg/L 处理组 *NRRT* 平均值分别为 75、39.38、22.5 和 15.63min, 处理组平均值均显著低于对照组($P < 0.05$, one way ANOVA)(图 4A)。Hg 暴露 14 天后,对照组和 2、6、10、25µg/L 处理组 *NRRT* 平均值分别为 75、69.38、56.25、45 和 30min。除 2µg/L 处理组外,其余处理组的 *NRRT* 值均显著低于对照组($P < 0.05$, one way ANOVA)(图 4B)。

2.3 Cd 和 Hg 胁迫对四角蛤蜊血细胞微核产生率的影响

Cd 和 Hg 分别暴露 14 天后,血细胞微核(MN)产生率随暴露浓度的升高而升高,表现出明显的浓度依赖效应(图 5A、B)。Cd 暴露后,对照组和 25、75、125µg/L 处理组血细胞微核产生率分别为 0.75MN/1000 细胞、4.75MN/1000 细胞、6MN/1000 细胞和 8.29MN/1000 细胞。所有处理组微核产生率均显著高于对照组($P < 0.05$, one way ANOVA)(图 5A)。Hg 暴露后,对照组和 2、6、10、25µg/L 处理组血细胞微核产生率分别为 0.63MN/1000 细胞、1.63MN/1000 细胞、3.38MN/1000 细胞、

4.5MN/1000 细胞和 5.75MN/1000 细胞。除 2µg/L 处理组外,其余处理组微核产生率均显著高于对照组($P < 0.05$, one way ANOVA)(图 5B)。

2.4 Cd 和 Hg 胁迫对四角蛤蜊血细胞总畸形核产生率的影响

Cd 和 Hg 暴露后,血细胞总畸形核(TAN)产生率随暴露浓度的升高而升高,表现出明显的浓度依赖效应(图 6A、B)。Cd 暴露后,对照组和 25、75、125µg/L 处理组血细胞总畸形核产生率分别为 1.13TAN/1000 细胞、7.5TAN/1000 细胞、9.75TAN/1000 细胞和 12.57TAN/1000 细胞。所有处理组总畸形核产生率均显著高于对照组($P < 0.05$, one way ANOVA)。25µg/L 处理组畸形核的产生率是对照组的 6.64 倍,而 125µg/L 处理组则是对照组的 11.12 倍(图 6A)。Hg 暴露后,对照组和 2、6、10、25µg/L 处理组血细胞总畸形核产生率分别为 1.13TAN/1000 细胞、2.13TAN/1000 细胞、4.63TAN/1000 细胞、6.63TAN/1000 细胞和 8.25TAN/1000 细胞。除 2µg/L 外,其余所有处理组畸形核产生率均显著高于对照组($P < 0.05$)(图 6B)。

2.5 四角蛤蜊血细胞 *NRRT*、微核率(*MNF*)和总畸形核率(*TANF*)之间的相关性分析

通过相关性分析可知, Cd 胁迫下 *NRRT* 和 *MNF* 之间的线性关系为: $y = -0.18x + 14.67$, $R^2 = 0.98$; *NRRT* 和 *TANF* 之间的线性关系为: $y = -0.12x + 9.40$, $R^2 = 0.97$; *MNF* 和 *TANF* 之间的线性关系为: $y = 1.54x +$

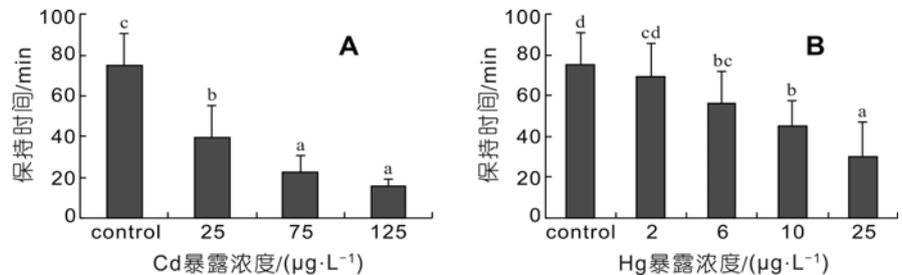


图4 Cd 和 Hg 胁迫下血细胞溶酶体中性红保持时间的变化

Fig.4 Change of lysosomal neutral red retention time in the presence of Cd and Hg

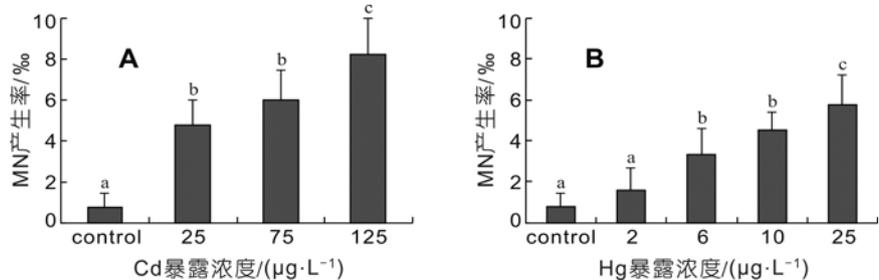


图5 Cd 和 Hg 胁迫下血细胞微核产生率的变化

Fig.5 Change of micronucleus frequency in hemocyte under Cd and Hg exposure

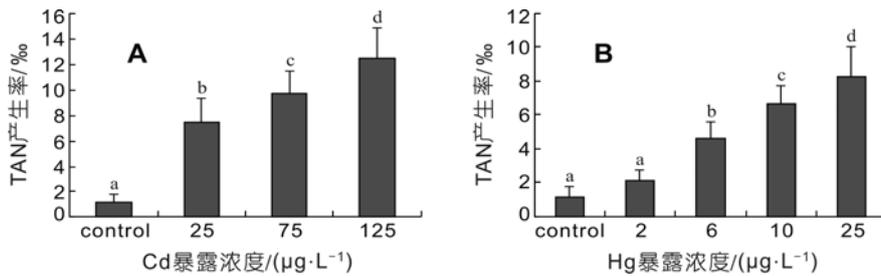


图6 Cd和Hg胁迫下血细胞总畸形核产生率的变化

Fig.6 Change of total abnormal nucleus frequency in hemocyte under Cd and Hg exposure

0.12, $R^2 = 1.00$ 。Hg胁迫下, 以上线性关系分别为: $y = -0.11x + 9.40$, $R^2 = 0.98$; $y = -0.16x + 13.26$, $R^2 = 0.98$; $y = 1.43x + 0.02$, $R^2 = 1.00$ 。

3 讨论

3.1 Cd胁迫对四角蛤蜊血细胞超微结构的损伤

研究污染物与细胞结构和功能损伤的关系, 不仅可以评价污染物的有害性效应, 还可以阐明污染物毒害作用的本质, 早期预警污染物对生态系统的影响。Zorita等(2006)研究发现, 靠近铜矿的紫贻贝 *M. galloprovincialis* 由于受到Cu的污染, 消化腺细胞中溶酶体的密度和大小改变, 消化细胞有所损失(消化上皮萎缩), 而且细胞类型发生变化(消化细胞体密度变小, 嗜碱性细胞体密度变大), 性腺指数增加, 在嗜碱性细胞内具有较高的类卵黄原蛋白含量。Domouhtsidou等(2000)提出重金属污染胁迫影响了紫贻贝组织的整体形态, 导致消化细胞内残余小体融合, 糙面内质网破裂或空泡化以及嗜碱性细胞内颗粒增加, 此外还在鳃内发现了鳃丝的融合。

关于重金属污染导致贝类血细胞结构损伤的研究较少。四角蛤蜊的血淋巴细胞可以分为透明细胞和颗粒细胞, 这与在其它双壳贝类中得到的结果一致(Nakamura *et al*, 1985; Pipe, 1990), 血淋巴细胞在双壳贝类防御过程中起到了非常关键的作用, 它们对异物具有吞噬、杀菌和包裹作用, 通过合成释放活性氧产物, 水解酶类和活性物质调节体液反应, 帮助清除入侵的异源物质(Feng *et al*, 1977)。本研究发现四角蛤蜊血细胞的结构损伤表现出明显的浓度依赖效应, 在暴露相同时间后, 高浓度Cd胁迫下损伤程度和概率高于低浓度胁迫。主要的结构损伤包括: 细胞膜增厚, 溶解; 糙面内质网上的核糖体脱落, 颗粒

数量减低; 光面内质网有轻度扩增, 并呈碎片状, 分散在细胞质中; 线粒体结构破坏, 水肿, 嵴溶解; 出现大量的电子密度透明的空泡; 滤泡增多, 伪足异常活跃; 溶酶体膜溶解, 吞噬物形成与细胞质组分溶合成次级溶酶体等。

本研究发现的血细胞主要结构损伤与重金属胁迫下其它贝类组织细胞结构损伤类似, 能够直

观地反映出细胞结构上的破坏和因此可能造成的功能损伤。但是以结构损伤作为污染调查和评估的生物指示物, 还需要进一步建立对结构损伤量化评估的方法。

3.2 Cd和Hg胁迫对四角蛤蜊血细胞溶酶体膜稳定性的影响

在亚细胞结构水平, 溶酶体系统已经被确定是研究污染物致毒效应的特定目标之一(Moore, 1990)。溶酶体的病理变化特别是溶酶体膜稳定性的研究, 已经被证实检测环境污染对海洋双壳贝类的毒理效应方面非常有用(Moore *et al*, 1996)。导致溶酶体膜稳定性改变的机制目前还没有研究清楚, 这可能是由于化学物质直接作用于溶酶体膜导致膜结构损伤或者离子通道障碍(Moore, 1985)。

中性红保持时间法能够有效反映溶酶体膜稳定性, 已经被证实是一种衡量污染物暴露时间和程度的敏感生物指示物, 近年来逐渐被用于评价重金属或有机物污染物对贝类毒性的相关研究中(Koukouzika *et al*, 2008)。

本研究结果表明, 各处理组Cd胁迫14天后, 四角蛤蜊血细胞溶酶体中性红保持时间显著低于对照组。125µg/L处理组血细胞溶酶体的中性红保持时间仅为15.6min, 表明四角蛤蜊的血细胞在该浓度胁迫下, 溶酶体膜稳定性急速下降, 其溶酶体已经严重受损。Koukouzika等(2008)研究发现100µg/L的Cd胁迫15天后, 紫贻贝血细胞中性红保持时间约为20min, 与本研究结果接近, 说明Cd对四角蛤蜊和紫贻贝血细胞溶酶体具有相同程度的毒性损伤。

25µg/L Hg处理组中血细胞中性红保持时间要低于25µg/L Cd处理组, 说明较高浓度Hg胁迫对四角

蛤蜊血细胞具有较强的损伤作用。相关研究发现(Wang *et al*, 2011)¹⁾, 四角蛤蜊软体部组织对 Hg 的富集能力远低于 Cd, 但是 Hg 的毒性损害仍然较强, 说明四角蛤蜊体内较低的 Hg 含量可能是因为 Hg 进入生物体后, 无机汞被甲基化为甲基汞, 改变了赋存形态, 不容易被检测到, 但是毒性却大大增强(Metian *et al*, 2008)。

本研究建立了较为可行的四角蛤蜊血细胞溶酶体膜稳定性检测 *NRRT* 技术, 并能够有效反映血细胞溶酶体膜的稳定性程度, 说明该指标适合用来指示四角蛤蜊对镉和汞胁迫的响应。作者希望 *NRRT* 技术的引进和建立, 能够为应用该指示物指征贝类受到环境污染胁迫的程度提供依据和技术指导, 为改进和完善我国海洋监测生物标志物指标体系提供参考。

3.3 Cd 和 Hg 胁迫下血细胞微核及总畸形核生成率

Ching 等(2001)认为 DNA 损伤是一种典型的氧化损伤, 一般是由过多活性氧自由基引起的, 可以用来评估污染物的遗传毒性。评价 DNA 损伤的方法有 ³²P 后标记法、碱洗提法、单细胞凝胶电泳(即彗星电泳)、姐妹染色体交换和微核实验等。这几种方法针对不同的 DNA 损伤类型(DNA 加合物、DNA 单双链断裂、DNA-蛋白质交联、姊妹染色单体交换和纺锤体损伤等)和不同的实验条件, 来研究细胞 DNA 损伤的情况。其中微核测定法操作简便并可指示细胞遗传损伤, 自 20 世纪 70 年代以来国内外在该领域的研究一直十分活跃(Fenech *et al*, 2003), Brunetti 等(1988)首次将该实验用于海洋无脊椎动物的遗传损伤研究中。

生物体受到毒性损伤后, 细胞发生不规则分裂, 在细胞分裂后期, 染色体断裂或者一个染色体缺失, 相对于其它染色体分裂延滞, 从而在细胞分裂间期染色体的很小一部分脱离细胞主核, 形成一个微小的次级核, 这就是微核, 它是染色体断裂或有丝分裂纺锤丝功能紊乱的明显标志(Heddle *et al*, 1991)。

在早期的水生生物遗传损伤研究中, 学者们仅仅关注于微核的检测, 后来有人研究发现, 细胞核的畸形形态除了微核外, 还存在双核、芽核、裂核等, 这些畸形形态的细胞核在衡量遗传毒性时同样重要。因此各种畸形形态的细胞核损伤被称为总畸形核, 并被逐渐应用到细胞损伤的评价中(Pacheco *et al*, 2005)。但是由于个体间微核的发生率差异性高, 而且

微核的判断标准比较严格, 存在着较大的人为误差。有研究结果表明, 微核试验在检测现场调查采集的贝类遗传损伤中, 并不能有效地区分出贝类的来源和受污染胁迫程度(Zorita *et al*, 2006)。因此, 需要进一步研究, 使这种检验手段在海洋环境污染监测中得以运用。本实验研究了室内胁迫下四角蛤蜊血细胞内微核和总畸形核的生成率以及阐明这两种标志物之间的关联性, 使其能够更好地应用到生物监测研究中。

本研究结果表明, 在重金属胁迫 14 天后, 各处理组(2μg/L Hg 处理组除外)四角蛤蜊血细胞产生了大量微核和总畸形核, 显著高于对照组。由此可见, 重金属对四角蛤蜊血细胞造成了明显的遗传损伤。除微核外, 其它细胞核畸形的频率也很高。根据计算出, 畸形核数目约为微核数目的 1.5 倍。总细胞核畸形率的检测非常有用, 因为它与微核形成率有很强的相关性, 而且更为敏感。本研究中, *NRRT*、*MNF* 和 *TANF* 三种指标的相关性都很显著, 说明这三种指标对于衡量重金属污染对四角蛤蜊血细胞的毒性效应, 有非常好的协同检测作用, 是有效的生物标志物。

参 考 文 献

- 王志铮, 吕敢堂, 施建军等, 2009. 4 种重金属离子对中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 稚鳖的急性致毒效应. 海洋与湖沼, 40(6): 745—752
- 闫喜武, 张跃环, 左江鹏等, 2008. 北方沿海四角蛤蜊人工育苗技术的初步研究. 大连水产学院学报, 23: 348—352
- 张丽岩, 宋 欣, 高玮玮等, 2010. Cd²⁺对青蛤(*Cyclina sinensis*)的毒性及蓄积过程研究. 海洋与湖沼, 41(3): 418—421
- Brunetti R, Majone F, Gola I *et al*, 1988. The micronucleus test: example of application to marine ecology. Mar Ecol Prog Ser, 44: 65—68
- Ching E W K, Siu W H L, Lam P K S *et al*, 2001. DNA adduct formation and DNA strand breaks in green-lipped mussels (*Perna viridis*) exposed to benzo[a]pyrene: dose- and time-dependent relationships. Mar Poll Bull, 42: 603—610
- Domouhtsidou G P, Dimitriadis V K, 2000. Ultrastructural localization of heavy metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in gills and digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis* (L.). Arch Environ Contam Toxicol, 38: 472—478
- Fenech M, Chang W P, Kirsch-Volders M *et al*, 2003. HUMN project: Detailed description of the scoring criteria for the

1) Wang Xiaoyu, Yang Hongsheng, Wang Qing *et al*, 2011. Bioaccumulation and metallothionein induction in the clam *Macra veneriformis* exposed to dissolved cadmium and mercury under laboratory conditions. Environ Toxicol

- citokinesis block micronucleus assay using isolated human lymphocyte cultures. *Mutat Res*, 534: 65—75
- Feng S Y, Feng J S, Yamasu T, 1977. Roles of *Mytilus coruscus* and *Crassostrea gigas* blood cells in defense and nutrition. *Comp Pathobio*, 3: 31—67
- Heddle J A, Cimino M C, Hayashi M *et al*, 1991. Micronuclei as an index of cytogenetic damage: past, present, and future. *Environ Mol Mutagen*, 18: 277—291
- Koukouzika N, Dimitriadis V K, 2005. Multiple biomarker comparison in *Mytilus galloprovincialis* from the Greece coast: lysosomal membrane stability, neutral red retention, micronucleus frequency and stress on stress. *Ecotoxicology*, 14: 449—463
- Koukouzika N, Dimitriadis V K, 2008. Aspects of the usefulness of five marine pollution biomarkers, with emphasis on MN and lipid content. *Mar Pollut Bull*, 56: 941—949
- Matozzo V, Ballarin L, Pampanin D M *et al*, 2001. Effects of copper and cadmium exposure on functional responses of hemocytes in the clam, *Tapes philippinarum*. *Arch Environ Contam Toxicol*, 41: 163—170
- Mersh J, Beauvais M N, 1997. The micronucleus assay in the zebra mussel, *Dreissena polymorpha*, to *in situ* monitor genotoxicity in freshwater environments. *Mutation Res*, 393: 141—149
- Metian M, Cosson R P, Oberhansli F *et al*, 2008. Bioaccumulation and detoxification processes of Hg in the king scallop *Pecten maximus*: Field and laboratory investigations. *Aquat Toxicol*, 90: 204—213
- Moore M N, 1985. Cellular response to pollutants. *Mar Pollut Bull*, 16: 134—139
- Moore M N, 1990. Lysosomal cytochemistry in marine environmental monitoring. *Histochem J*, 22: 187—191
- Moore M N, Wedderburn R J, Lowe D M *et al*, 1996. Lysosomal reaction to xenobiotics in mussel hemocytes using BODIPY-FL-verapamil. *Mar Environ Res*, 42: 99—105
- Nakamura M, Mori K, Inooka S, 1985. *In vitro* production of hydrogen peroxide by the amoebocytes of the scallop, *Patinopecten yessoensis*. *Dev Comp Immunol*, 9: 407—417
- Pacheco M, Santos M A, Teles M *et al*, 2005. Biotransformation and genotoxic biomarkers in mullet species (*Liza*) sp. from a contaminated coastal lagoon (Ria De Aveiro, Portugal). *Environ Monitor Assess*, 107: 133—153
- Pipe R K, 1990. Hydrolytic enzymes associated with the granular haemocytes of the marine mussel *Mytilus edulis*. *Histochem J*, 22: 595—603
- Shulkin V M, Presley B J, Via K, 2003. Metal concentrations in mussel *Crenomytilus grayanus* and oyster *Crassostrea gigas* in relation to contamination of ambient sediments. *Environ Int*, 29: 493—502
- UNEP/RAMOG, 1999. Manual on the Biomarkers Recommended for the MED POL Biomonitoring Programme. UNEP, Athens, 1—92
- Zorita I, Ortiz-Zarragoitia M, Sotoet M *et al*, 2006. Biomarkers in mussels from a copper site gradient (Visnes, Norway): An integrated biochemical, histochemical and histological study. *Aquat Toxicol*, 78: 109—116

TOXICITY ASSESSMENT OF CADMIUM AND MERCURY ON THE HEMOCYTES OF *MACTRA VENERIFORMIS*

WANG Xiao-Yu^{1,2}, YANG Hong-Sheng¹, XING Kun³, WANG Qing¹

(1. Key Laboratory of Marine Ecology and Environmental Sciences, Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao, 266071; 2. Tianjin Fisheries Research Institute, Tianjin, 300221; 3. Dalian Ocean University, Dalian, 116023)

Abstract The toxicities of Cd and Hg on the hemocytes of *Macrta veneriformis* were studied by examining ultrastructural changes, lysosomal membrane stability (measured by neutral red retention time, *NRRT*), micronucleus frequency (*MNF*) and total abnormal nucleus frequency (*TANF*) in hemocytes under laboratory conditions. Results showed that the 125 μ g/L Cd inflicted more injury than 25 μ g/L Cd, indicating Cd impaired hemocytes in a dose-dependent manner. The *NRRTs* of all treatments, except 2 μ g/L Hg, decreased with the increasing exposure concentration. However, *MNF* and *TANF* increased as concentrations were elevated. The *NRRT* of 25 μ g/L Hg treatment was shorter than that of 25 μ g/L Cd treatment, while *MNF* and *TANF* were higher than those of 25 μ g/L Cd treatment, respectively. The above results indicate that the injury of Hg to hemocytes is more severely than Cd. In addition, there were significant linear correlations among *NRRT*, *MNF* and *TANF*, suggesting that they can be used in combination to monitor pollution.

Key words Cadmium, Mercury, Ultrastructure, Neutral red retention time, Micronucleus frequency, Total abnormal nucleus frequency