镉胁迫诱导胭脂鱼血细胞凋亡的研究

陈昌玉, 周传江, 蒲德永

(西南大学生命科学学院, 三峡库区生态环境教育部重点实验室水产科学重庆市市级重点实验室, 重庆　400715)

摘要: 以胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)离体血细胞为实验材料, 用不同浓度的氯化镉溶液处理。通过瑞士姬姆萨和 AO/EB 荧光染色, 在光学和荧光显微镜下观察了血细胞的形态变化, 并统计了细胞的凋亡率。结果显示, 在氯化镉的胁迫作用下, 胭脂鱼血细胞呈现细胞变圆、核变圆、核边缘化、形成凋亡小体等细胞凋亡的形态特征。较低 Cd^{2+} 浓度(0.01 mmol/L)胁迫, 1 h 即可产生明显的细胞凋亡诱导效应, 并且细胞凋亡率随着 Cd^{2+} 浓度的增加和作用时间的延长而升高。表明 Cd^{2+} 能诱导胭脂鱼血细胞发生典型的凋亡, 而且细胞凋亡率与 Cd^{2+} 的浓度和处理时间成明显的剂量 - 效应关系。

关键词: 血细胞; 镉; 细胞凋亡; 胭脂鱼

中图分类号: Q246　　**文献标志码:** A　　**文章编号:** 1674 - 3075(2009)04 - 0098 - 05

细胞凋亡(apoptosis)又称细胞程序性死亡, 是由 Kerr J F R 等(1972)首先提出的一种细胞死亡形式。细胞凋亡是细胞受内、外因子刺激后, 由自身基因控制的细胞自主的有序性死亡, 是一种区别于细胞坏死(necrosis)的主动死亡过程(项黎新等, 2001; 李跃林等, 2004)。重金属离子对鱼类细胞的结构和功能会产生明显影响, 但其诱导鱼类细胞凋亡的研究还少见报道。联合国环境规划署提出 12 种具有全球性意义的危险化学物质, 其中镉被列为首位(任继平等, 2003)。胭脂鱼(*Myxocyprinus asiaticus*)属鲤形目、亚口鱼科、胭脂鱼属, 俗称火烧鳊、黄排、木叶盘、红鱼、紫鳊、燕雀鱼、血排、粉排, 是胭脂鱼属在亚州的特有种类, 在鱼类学和动物地理学上具有重要的学术研究价值, 现已列为国家Ⅱ级重点保护鱼类。以胭脂鱼血细胞为研究对象, 用不同浓度的氯化镉进行处理, 以研究 Cd^{2+} 诱导鱼类血细胞凋亡的效应, 探讨 Cd^{2+} 对鱼类的细胞毒理学影响, 为胭脂鱼的资源保护和控制废水中镉的排放量提供理论依据。

1　材料与方法

1.1　实验材料

胭脂鱼标本采自重庆万州水产研究所, 体重 80.8 ~ 120.0 g, 体长 205.0 ~ 225.0 mm。

收稿日期: 2008 - 11 - 10

基金项目: 三峡库区生态环境教育部重点实验室开放基金资助。

通讯作者: 蒲德永, 高级实验师。E - mail: jia@swu.edu.cn

作者简介: 陈昌玉, 1987 年生, 女, 四川广汉人, 学士, 研究方向为生物科学。

1.2　药品和试剂

1.2.1　鱼用生理盐水　Burnstock 淡水鱼类生理盐水配方如下。

A 液: 氯化钠 + 氯化钾(1.25 g) + 硫酸镁(1.45 g) + 磷酸氢二钾(8.00 g) + 双蒸水(500 mL);

B 液: 氯化钙(1.4 g) + 双蒸水(500 mL);

C 液: 碳酸钠(10.06 g) + 双蒸水(500 mL);

临用时取 A、B、C 液各 10 mL, 加双蒸水 70 mL, 制成 100 mL 鱼用生理盐水。

1.2.2　重金属镉离子母液　取分析纯重金属盐 $CdCl_2 \cdot 2.5H_2O$ 按金属离子浓度计算, 用鱼用生理盐水配成浓度为 10 mmol/L 的 Cd^{2+} 溶液。

Cd^{2+} 母液: 氯化镉(0.0118 g) + 鱼用生理盐水(5mL); 并依次稀释为浓度为 1.0、0.5、0.1、0.05、0.01 mmol/L 的 Cd^{2+} 溶液。

Alsver 溶液: 葡萄糖(2.05 g) + 柠檬酸钠(0.80 g) + 氯化钠(0.42 g) + 双蒸水(100 mL);

吖啶橙(AO)/溴化乙锭(EB)储备液: 吖啶橙(1 mg) + PBS(pH 7.2)10 mL; 溴化乙锭(1 mg) + PBS(pH 7.2)10 mL;

AO/EB 染液: 用前取 AO、EB 等量混合;

PBS 溶液(0.01M, pH 7.2): 磷酸氢二钾(1.392 g) + 磷酸二氢钠(0.276 g) + 氯化钠(8.770 g) + 双蒸水(900 mL), 用 0.01 M 的氢氧化钾调 pH 为 7.4, 加双蒸水至 1 L;

姬姆萨贮藏液: 姬姆萨染料(0.8 g) + 甲醇(2 mL) + 甘油(50 mL);

姬姆萨工作液: 姬姆萨贮液 + PBS 溶液, 按比例 1: 1 配制。

1.3　方法

1.3.1　血细胞悬液制备　在胭脂鱼尾静脉采血 5 mL,分置于已用 Alsver 溶液抗凝的离心管中,存放于 4℃冰箱中备用。

1.3.2　Cd^{2+}的胁迫处理　各取胭脂鱼血细胞悬液 50 μL 分别置于 1 ~7 号抗凝离心管中,并分别加入 0(鱼用生理盐水)、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0、10.0 mmol/L 的 Cd^{2+}溶液各 450μL,处理后于 1 h、4 h、8 h、12 h、24 h、48 h 制作涂片,AO/EB 荧光染色观察,记录细胞发生变化情况并做凋亡细胞数目统计。

1.3.3　AO/EB 染色及观察结构　取经 Cd^{2+}溶液处理过的血细胞悬液 100 μL,加入 AO/EB 染料 4 μL 混匀,染色 1 min 后,取细胞悬液 10 μL 于载玻片上,盖上盖玻片,立即用 Nikon 荧光显微镜观察细胞形态变化并拍摄凋亡细胞图。随机计数 500 个细胞,列表作图分析 Cd^{2+}浓度和处理时间对鱼血细胞凋亡率的影响。

2　结果

2.1　细胞形态的显微观察

经瑞士姬姆萨染色,可见未经诱导的正常细胞呈椭圆形、核染成蓝紫色,呈长杆状,胞浆粉红色,色泽均一(图版 I-1)。经不同浓度的 Cd^{2+}诱导处理后,细胞膜破损,细胞核裂解,凋亡细胞核变圆,染色质固缩,染色变深(图版 I-2);细胞核边缘化(图版 I-3);细胞变圆,核也变圆(图版 I-4);细胞核位移(图版 I-5);形成凋亡小体(图版 I-6)等。

2.2　细胞形态学的荧光显微观察

由 AO/EB 染色,可见未经诱导的正常细胞呈椭圆形,核呈长杆状,核染色质分布均匀(图版 I-7)。经不同浓度的 Cd^{2+}诱导处理后,细胞膜破损,细胞核裂解(图版 I-8);细胞核变圆,染色质浓缩(图版 I-9);细胞核边缘化(图版 I-10);产生微核;细胞变圆,核也变圆(图版 I-11);细胞核位移,产生许多凋亡小体(图版 I-12)。

2.3　Cd^{2+}浓度和处理时间对血细胞凋亡率的影响

观察不同时间和浓度下拍摄的荧光染色细胞图,随机统计 500 个红细胞,记录其中的凋亡细胞数,并计算凋亡率,结果见表 1。

以所配制的 Cd^{2+}溶液浓度为横坐标,血细胞凋亡率为纵坐标,用 Excel 软件进行统计分析,作出不同 Cd^{2+}浓度下、不同处理时间的血细胞凋亡情况图。结果显示,用 Cd^{2+}溶液处理的胭脂鱼血细胞凋亡率均随 Cd^{2+}浓度的增大、处理时间的延长而增高,表现出明显的剂量-效应关系(图 1)。

表 1　Cd^{2+}诱导胭脂鱼血细胞凋亡情况

Tab. 1　Apoptosis rates of *M. asiaticus* blood cells treated by Cd^{2+}

浓度/	不同处理时间的细胞凋亡率/%					
mmol·L^{-1}	1 h	4 h	8 h	12 h	24 h	48 h
0	3.4	6.1	8.7	10.5	15.7	20.0
0.01	6.2	8.6	11.4	13.6	21.4	28.7
0.05	8.7	12.8	16.5	18.7	26.0	31.2
0.10	9.7	14.4	18.2	21.6	31.3	38.0
0.50	11.5	18.7	22.1	30.1	36.5	39.5
1.00	13.4	20.5	24.4	31.8	38.7	50.7
10.00	16.6	26.4	37.6	45.4	52.3	67.7

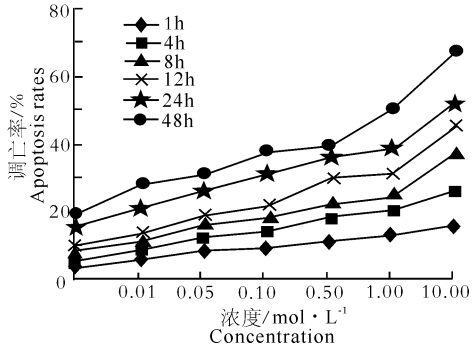


图 1　Cd^{2+}诱导胭脂鱼血细胞的凋亡率

Fig. 1　Apoptosis rates of the *M. asiaticus* blood cells treated by Cd^{2+}

用 MATLAB 软件,分别对不同 Cd^{2+}浓度和处理时间对胭脂鱼血细胞凋亡的影响进行方差分析,用 MATLAB 软件中的 ANOVAL 函数计算概率值 P(F 分布值和置信度为 c 时的概率值),并分别以 Cd^{2+}浓度和处理时间作为横坐标,以胭脂鱼血细胞凋亡率为纵坐标,绘制出盒式图(图 2、图 3)。因为 $P_{浓度}<0.05$,$P_{时间}<0.05$;可见 Cd^{2+}浓度和处理时间对胭脂鱼血细胞有显著性的影响。

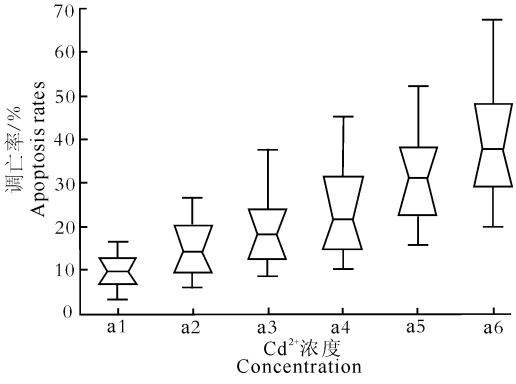


图 2　Cd^{2+}浓度对胭脂鱼血细胞凋亡率的影响

Fig. 2　Effects of Cd^{2+} concentrations on apoptosis of the *M. asiaticus* blood cells by Cd^{2+}

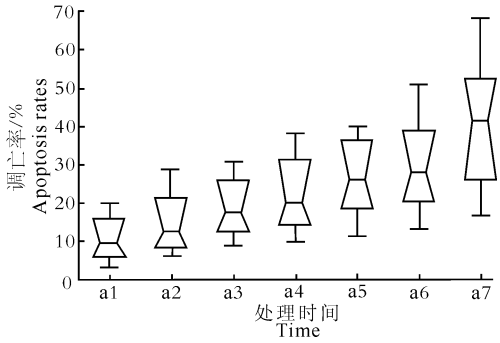


图3 Cd^{2+}处理时间对胭脂鱼血细胞凋亡率的影响

Fig. 3 Effects of treatment time on apoptosis of the *M. asiaticus* blood cells treated by Cd^{2+}

3 讨论

3.1 镉在鱼类分子毒理学方面的研究

由于镉在生物体内的半衰期长达10~35年,为已知的最易在体内蓄积的毒物(刘杰,1998;张铣等,1999)。镉作为机体生长发育非必需元素,很少的量进入机体即可通过生物放大和生物积累,对脑、肺、肝、肾、睾丸、骨等多种器官和组织造成损伤;镉还具有致畸、致突变、致癌作用,其已被国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)归类为第一类致癌物。随着现代工业的迅猛发展,镉的污染问题已日益严重,是环境和食物链中最常见且不易消除的重金属污染物。近年来的大量研究表明,镉能诱导许多组织和细胞发生凋亡,包括小鼠胸腺细胞(董书芸等,2000)、鲫外周血单个核细胞(丁磊等,2005)、人胚肾细胞(常秀丽等,2006)。因此,致细胞凋亡是镉毒性的一个重要原因,而镉致细胞凋亡的研究已成为其分子毒理学的一个热点。

项黎新等(2001)在开展几种重金属离子对鱼类毒理机制的研究中发现,1.8×10^{-5} mol/L Cd^{2+}就能胁迫诱导草鱼细胞产生典型的凋亡现象;刘颖等(2007)在研究镉诱导HL-7702细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3的表达中,得出镉能诱导HL-7702细胞凋亡,并随着剂量的增大,凋亡作用增强,呈现一定的剂量-效应关系。田婷等(2007)在研究镉致HEK293细胞凋亡中,发现氧化应激作用可以引起HEK293细胞凋亡,在一定范围内有剂量-效应关系。用重金属Cd^{2+}对胭脂鱼血细胞进行处理,当Cd^{2+}浓度分别达到0.01、0.05 mmol/L时,处理1 h后,通过AO/EB荧光染色和瑞士姬姆萨染色,观察到部分细胞出现了一系列典型的凋亡特征,实验结果表明,不同浓度的Cd^{2+}能诱导胭脂鱼血细胞发生典型的凋亡,而细胞凋亡率与Cd^{2+}的浓度和处理时间成明显的剂量-效应关系。

3.2 镉导致胭脂鱼血细胞凋亡的可能机制

田婷等(2007)研究发现,氧化应激在HEK293细胞凋亡中起着重要作用,这表明镉引起胭脂鱼血细胞凋亡也与细胞的氧化应激有关,诱发凋亡诱导物脂质过氧化物的产生,从而导致细胞凋亡。刘颖等(2007)在研究镉诱导HL-7702细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶-3的表达中,发现镉诱导HL-7702细胞凋亡极有可能有线粒体通路的参与。因此推测镉在诱导胭脂鱼血细胞凋亡的过程中也有线粒体通路的参与。线粒体对维持细胞能量代谢和正常功能活动起重要作用,线粒体内包含一些与细胞凋亡有密切关系的物质,如细胞色素C(CytC)、凋亡诱导因子(AIF)、核酸内切酶G、Ca^{2+}和活性氧自由基(ROS)等,可通过损伤线粒体,使其通透性改变,从而引起细胞凋亡。

丁磊等(2005)研究镉对鲫外周血单个核细胞凋亡的诱导时,发现在镉诱导鲫PBMC凋亡的机制中,Ca^{2+}调控和金属硫蛋白(MT)可能起了重要作用。推测镉在诱导胭脂鱼血细胞凋亡的过程中,Ca^{2+}调控和MT也起了一定的作用。镉一方面能通过钙通道进入细胞内,替代Ca^{2+}发出信号,发挥Ca^{2+}的作用;另一方面,进入细胞内的镉能引起细胞内钙的增加,核酸内切酶的活性对钙有依赖,从而被激活,将细胞核的DNA在核间小体处断裂成200碱基大小的核苷酸片断引起细胞凋亡。此外,镉是肝脏、肾脏金属硫蛋白(MT)的诱导剂。镉诱导合成的MT可以螯合一定量的镉形成Cd-MT复合物以降低细胞内镉的浓度,从而减轻镉对生物体的损伤。Cd-MT也可能激活胭脂鱼血细胞核酸内切酶,从而导致DNA的断裂,引起胭脂鱼血细胞凋亡。

3.3 镉引起细胞凋亡的研究进展及意义

细胞凋亡是当前生物科学研究最热门的的领域之一,近年来的研究已经获得了很大的突破,但是要将其机制完全阐明,还需要开展深入的研究工作。鱼类是重要的水生动物,重金属则是主要的水体污染物之一,探讨重金属与鱼类细胞凋亡的关系,不仅可以丰富环境毒理学等研究内容,而且对揭示细胞与环境的关系,了解鱼类的细胞毒理发生机制具有一定的理论意义;同时对渔业可持续发展和胭脂鱼等珍稀鱼类资源保护也具有重要意义。

参考文献:

Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. 1972. Apoptosis: a basie biologic phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics[J]. Br. J. Cancer, 26:239 – 257.

李跃林,李丽,邓卓军. 2004. 实验性脂肪性肝病大鼠肝细胞凋亡与组织病理的对比研究[J]. 河北医药,26(12):929 – 931.

项黎新,邵健忠,孟真. 2001. 六种重金属离子胁迫诱导鱼类细胞凋亡的研究[J]. 生物化学与生物物理进展,28(6):866 – 869.

任继平,李德发,张丽英. 2003. 镉毒性研究进展[J]. 动物营养学报,15 (1):145 – 149.

张铣,薛彬,魏雪涛,等. 1999. 镉免疫毒性机理的初步探讨[J]. 中国环境科学,19(6):530 – 535.

刘杰. 1998. 用转基因动物研究金属硫蛋白对镉毒性的作用[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,16(1):1 – 4.

董书芸,沈汉明,王俊南. 2000. 镉诱导小鼠胸腺细胞凋亡的研究[J]. 中国职业医学,(6):196 – 198.

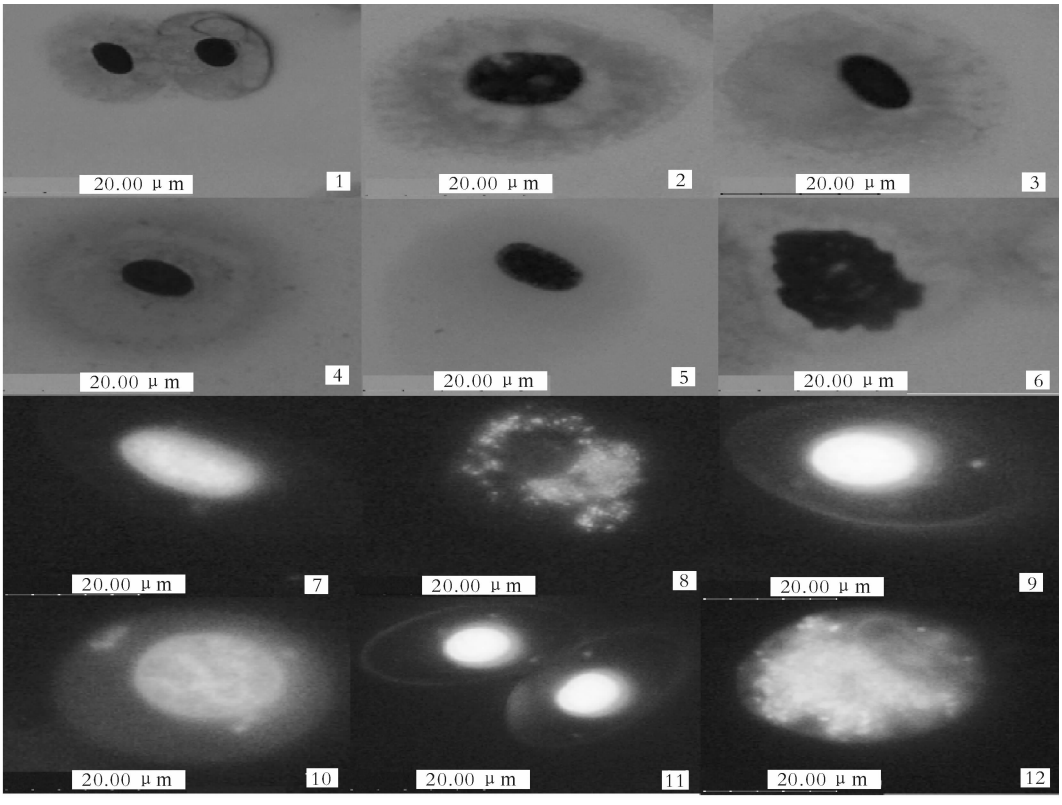
丁磊,吴康,张伟明,等. 2005. 镉对鲫外周血单个核细胞凋亡的诱导[J]. 水产学报,29(1):55 – 59.

常秀丽,陈亮,董琛,等. 2006. 镉对人胚肾细胞凋亡和血红素氧合酶 – 表达的影响[J]. 中华劳动卫生职业病杂志,24(1):16 – 19.

刘颖,孙世龙,杜海英,等. 2007. 镉诱导 HL – 7702 细胞凋亡及半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶 – 3 的表达[J]. 中华预防医学杂志,41(4):314 – 316.

田婷,毛伟平,张超,等. 2007. 镉致 HEK293 细胞凋亡中氧化应激作用[J]. 中国公共卫生,23(10):1 192 – 1 193.

(责任编辑　万月华)



1 – 正常细胞;2 – 细胞核变圆,染色质固缩,染色变深;3 – 细胞核边缘化;4 – 细胞变圆,核也变圆;5 – 细胞核位移;6 – 形成凋亡小体;7 – 正常细胞;8 – 坏死细胞;9 – 细胞核变圆;10 – 细胞变圆,核也变圆;11 – 细胞核边缘化;12 – 形成凋亡小体。

图版 I　胭脂鱼血细胞的显微观察

1 – Normal cell; 2 – Nucleus rounding , Chromatin condensation and stronger staining ;3 – Rimmed nucleus; 4 – Spherical cell and nucleus;5 – Nucleus displacement;6 – Apoptotic bodies;7 – Normal cell; 8 – Necrosis cell;9 – Rounding Nucleus;10 – Spherical cell and nucleus;11 – Rimmed nuclei;12 – Apoptotic bodies.

Plate 1　Electron micrographs of *Myxocyprinus asiaticus* in blood cells

Apoptosis Induction of Blood Cells in *Myxocyprinus asiaticus* by Cadmium Stress

CHEN Chang-yu, ZHOU Chuan-jiang, PU De-yong

(School of Life Science, Southwest University, Key Laboratory of Eco-Environments in Three Gorges Reservoir Region (Ministry of Education), Key Laboratory of Aquatic Science of Chongqing, Chongqing 400715, China)

Abstract: Effects of Cadmium (Cd^{2+}) at different concentrations on apoptosis induction in cultured blood cells of *Myxocyprinus asiaticus* were studied by AO and EB staining for fluorescence observation and Swiss Giemsa staining for optical microscopy observation. The results of morphological characteristics and apoptosis rate analysis showed that Cd^{2+} stressed the *M. asiaticus* blood cells and caused characteristic features of apoptosis, such as rounding of cells and nuclei, condensation and peripherization of nuclear chromatin, and formation of apoptotic bodies. At the low concentration (0.01 mmol/L) of Cd^{2+}, apoptosic features were clearly observed in most of *M. asiaticus* blood cells after 1 h exposure. Rates of apoptosis were elevated with the increase in Cd^{2+} concentration and treatment time. All of the results together indicated that apoptosis of *M. asiaticus* blood cells induced by Cd^{2+} is in a dose- and time-dependent manner.

Key words: Blood cells; Cadmium stress; Apoptosis; *Myxocyprinus asiaticus*