

腐植酸在褐鳟鱼鳃和肌肉抵抗镉中毒的组织病理学和生物化学作用

Gonca Alak¹, Muhammed Atamanalp², Ahmet Topal², Harun Arslan², Ertan Oruç³, Serdar Altun³ 著
李 双⁴ 译

- (1 土耳其阿塔特克大学农学系 埃尔祖鲁姆 25240
- 2 土耳其阿塔特克大学渔业系 埃尔祖鲁姆 25240
- 3 土耳其阿塔特克大学兽医系 埃尔祖鲁姆 25240
- 4 中国腐植酸工业协会 北京 100120)

摘要: 为了探究腐植酸(HA)对褐鳟鱼鳃和肌肉在抵抗镉(Cd)中毒方面是否发挥积极作用,进行了组织病理学和生物化学方面的研究。试验中,褐鳟暴露在仅施加2 ppm镉,施加2 ppm镉加5 ppm腐植酸,仅施加5 ppm腐植酸的3种环境条件下,分别测定其鳃和肌肉组织的谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平。在含镉条件下,褐鳟组织中的GPx和SOD活性显著低于对照组($P<0.05$),而含镉环境中褐鳟组织的MDA并未升高($P>0.05$)。然而,腐植酸并未影响镉造成的生化伤害。镉对鱼鳃和肌肉组织造成明显的组织病理学变化,而在镉+腐植酸处理组中,肌肉组织病理学变化较小。这些结果表明,腐植酸可从组织病理学方面中和肌肉组织镉中毒。

关键词: 毒性 抗氧化酶 褐鳟 组织病理学 腐植酸

中图分类号: TQ314.1

文献标识码: A

文章编号: 1671-9212(2015)06-0029-05

Histopathological and Biochemical Effects of Humic Acid Against Cadmium Toxicity in Brown Trout Gills and Muscles

Gonca Alak¹, Muhammed Atamanalp², Ahmet Topal², Harun Arslan², Ertan Oruç³, Serdar Altun³ write
Li Shuang⁴ translate

- (1 Turkey Ataturk University, Agriculture Faculty, Erzurum, 25240
- 2 Turkey Ataturk University, Fisheries Faculty, Erzurum, 25240
- 3 Turkey Ataturk University, Veterinary Faculty, Erzurum, 25240
- 4 China Humic Acid Industry Association, Beijing, 100120)

Abstract: It was biochemically and histopathologically investigated whether humic acid (HA) has protective effects on cadmium (Cd) toxicity on muscle and gills of brown trout. The brown trout were exposed to cadmium (2 ppm) and/or humic acid (5 ppm). For this purpose, levels of glutathione peroxidase (GPx), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA) was investigated in muscle and gills tissues of brown trout. The activities of GPx and SOD in the tissues of fish exposed to Cd was significantly lower than the control groups ($P<0.05$). MDA levels did not increase in the groups exposed to cadmium ($P>0.05$). However, humic acid did not affect biochemical damage in cadmium group. Cd caused a significant increase in histopathological changes in muscle and gills tissues, but histopathological changes were lower in the muscle tissue of Cd+HA group. These results suggest that humic acid may counteract the cadmium toxicity in muscles tissue in histopathologic aspect.

[收稿日期] 2013-09-09

[译者简介] 李双,女,1983年生,博士,主要从事园林植物遗传育种研究, E-mail: chaia@126.com。

镉是一种有潜在毒性的重金属元素，从上世纪起，它在大气、水、土壤和植物中的浓度呈升高趋势。由食物或水进入水生动物后，镉与血液中的白蛋白和红细胞结合而进一步转移到组织和器官中。通过诱导金属硫蛋白mRNA的合成，形成小分子量的金属硫蛋白。镉在生物体中的富集是一个值得关注的重要的生态学问题，尤其因为其快速积累的能力。对鱼类而言，镉能造成其各器官结构和病理形态学的变化。在鱼类的肾脏和肝脏中含镉量最高。近年来，特定酶系统和不同药物，金属离子和化学药品之间的互作都有广泛的研究。许多环境污染物会引起水生动物的氧化应激反应。化学有毒污染物是生物系统活性氧的重要来源，会抑制抗氧化防御系统中一些酶的活性。在环境毒理学和生态毒理学领域已经初步形成了氧化应激反应和对基础生物分子的伤害以及器官的抗氧化防御系统。抗氧化酶如内源谷胱甘肽(GSH)、超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽S-转移酶(GST)和过氧化氢酶(CAT)能降低造成组织伤害的活性氧含量。

腐植酸在环境中普遍存在，并发现它可以影响水生生物的生理功能。在欧洲兽医实践中，腐植酸已被用作止泻剂，镇痛剂，免疫刺激剂，抗菌剂。有文献表明，在不同动物物种中，通过一些生理变化和免疫的形成，腐植酸与生长和健康防护能力有很大关联。

本研究目的是为了调查腐植酸在褐鲟抵御镉伤害过程中可能起到的保护作用。依据组织病理学毒性评估，对肌肉和鱼鳃组织中抗氧化物GPx、SOD和MDA水平进行测定。

1 材料和方法

1.1 试验设计

褐鲟(*Salmo trutta fario*, L.)，从阿塔特克大学渔业和内河鱼类育种研究中心购买。该研究

在鱼毒理学实验室进行，并在遵守批准的道德准则前提下开展。为了让受试褐鲟适应环境条件，在实验前，将其在池塘内预喂养15天。过了适应期后，10条褐鲟被放入400 lt(1 lt=1016 kg)体积的玻璃水箱中。用来测试的褐鲟平均重量为 203.31 ± 8.09 g，身长为 22.21 ± 0.49 cm。水箱水的理化性质为：温度(10~12℃)；pH(7.4~8.0)；溶氧量(7.52 ± 0.50 ppm)；水硬度CaCO₃含量(164.1 ± 4.17 ppm)。

腐植酸购于Farmavet医学公司。配制一定浓度氯化镉(Sigma)和腐植酸原液。原液中镉和腐植酸的浓度分别为2 ppm，5 ppm。

待测褐鲟被分为4组。第1组为对照组，第2组为镉处理组，第3组为腐植酸处理组，第4组为镉+腐植酸处理组，每组有10条。给第2组褐鲟单次施入浓度2 ppm的氯化镉。这个剂量为前人研究中对虹鲟造成毒性的剂量值。第3组褐鲟的单次施入浓度5 ppm的腐植酸。第4组褐鲟施入浓度2 ppm镉和5 ppm腐植酸的混合液。褐鲟在含不同剂量镉或(和)腐植酸的环境中生存7天。

1.2 生化分析

根据Alak等的方法，分析出褐鲟不同组织中谷胱甘肽过氧化物酶(GPx)，超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的水平。在Wiegand等的方法上进行改良，获得每个个体各个组织的提取物。将组织浸入液氮，用研钵研磨。研磨后放入KH₂PO₄(30 mM，pH=7.3)缓冲液中混成匀浆。匀浆在4℃下，13000 rpm离心2 h后取上清液测定酶活性，用蛋白含量表示。褐鲟鱼组织中MDA含量按照Gülcin等的方法测定。将200 μL溶血产物，800 μL磷酸盐缓冲液(50 mM，pH=7.4)，25 μL BHT和500 μL浓度30%的TCA，迅速混匀，在-20℃条件下放置2 h，然后以2000 rpm离心15 min，取1.0 mL上清液，分别加入75 μL EDTA-Na₂H₂O，250 μL TBA，之后放入沸水浴15 min，冷却至室温，在532 nm波长下测定。

用总硫代巴比妥酸反应物来表示MDA的含量。每份匀浆的蛋白含量用Bradford(考马斯亮蓝G-250)法,以牛血清白蛋白为标样,以MDA的摩尔消光系数 $1.56 \times 10^5 / (\text{cm} \cdot \text{M})$ 计算得出。

1.3 组织病理学检测

用于光学显微镜检测的组织样本先在10%的福尔马林中固定24 h,在不同浓度的酒精下脱水后用二甲苯清洗干净,将样本埋入融化的石蜡中,之后用薄片切片机(Leica, Germany)切蜡块切面。每个蜡块连续切成5 μm 厚的薄片。将切好的石蜡薄片在苏木精-伊红(H-E)中染色,然后在光学显微镜下观察(Olympus BX52 with DP72 camera system)。所有组织病理学改变用图像处理系统(Olympus, DP2-BSW)进行评估。光学显微镜检测结果用半定量的方法进行评估,记录如下:无病变(-),轻度病变(+),中度病变(++),重度病变(+++)。

表1 施加腐植酸(HA)对含镉和不含镉肌肉组织中GPx、SOD活性和MDA水平的影响

Tab.1 The effects on GPx, SOD activity and MDA levels in the muscle tissue of humic acid (HA) administration to fishes with or without cadmium (Cd)

| 处理 | GPx含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | SOD含量(U/mg) | MDA含量(nmol/mg) |
|-------|------------------------------------|------------------|------------------|
| 对照 | 4.54 \pm 3.13A | 2.16 \pm 0.22A | 0.06 \pm 0.01A |
| 腐植酸 | 3.15 \pm 0.07B | 1.97 \pm 0.35A | 0.05 \pm 0.01A |
| 镉 | 1.86 \pm 2.33C | 0.83 \pm 0.21B | 0.07 \pm 0.01A |
| 腐植酸+镉 | 2.09 \pm 0.23C | 0.75 \pm 0.20B | 0.05 \pm 0.02A |

注:所有的值为8个独立测量值的平均值 \pm 标准偏差,不同字母代表统计上的显著差异($P < 0.05$)。下同。

表2 施加腐植酸(HA)对含镉和不含镉鱼鳃组织中GPx、SOD活性和MDA水平的影响

Tab.2 The effects on GPx, SOD activity and MDA levels in the gill tissue of humic acid (HA) administration to fishes with or without cadmium (Cd)

| 处理 | GPx含量($\mu\text{mol}/\text{mg}$) | SOD含量(U/mg) | MDA含量(nmol/mg) |
|-------|------------------------------------|------------------|------------------|
| 对照 | 3.55 \pm 1.33A | 0.38 \pm 0.10A | 0.38 \pm 0.16A |
| 腐植酸 | 2.01 \pm 0.06B | 0.72 \pm 0.09B | 0.31 \pm 0.41A |
| 镉 | 1.00 \pm 1.23C | 0.17 \pm 0.20C | 0.45 \pm 0.09A |
| 腐植酸+镉 | 0.93 \pm 1.05C | 0.19 \pm 0.61C | 0.35 \pm 0.26A |

2.2 组织病理学结果

对照组中的肌肉(图1a)和鱼鳃组织(图2a)没有任何病理学的变化;腐植酸处理组(图1b和图2b)同

1.4 统计分析

所有数据用平均值 \pm 标准偏差表示。用单因素方差分析法(ANOVA)和Duncan检验对数据进行分析。 $P < 0.05$ 的数据被视作差异显著。数据使用SPSS 10.0(SPSS Inc., Chicago, IL, USA)软件进行分析。

2 试验结果

2.1 生化结果

与对照组相比,镉的施加使褐鲟肌肉和鱼鳃组织中SOD和GPx的水平显著降低($P < 0.05$),见表1、表2。施加腐植酸和镉并没有使褐鲟肌肉和鱼鳃组织中SOD和GPx的水平显著升高。镉处理后,褐鲟肌肉和鱼鳃组织中MDA数据并未显著增加($P > 0.05$)。同时也发现,与对照组数值相比,褐鲟鳃组织中MDA活性并没有显著富集。

样也没有发现病理性变化;在镉处理组发现有明显变化。

在镉处理组中,发现鱼鳃组织的水样变质,

空泡性恶化，第二层腮瓣上皮细胞增生和第二层腮瓣的破坏(图1c)。另外，在镉处理组的肌肉组织中，发现组织间隙有单核细胞浸润(图2c)。同时施加镉和腐植酸处理组也发现有类似的病理学变

化；在该处理组的鱼鳃组织中，血管堵塞，细胞衰退，脱皮(图1d)；然而在该处理组的肌肉组织中发现有轻微炎细胞浸润(图2d)。病理变化的严重程度见表3。

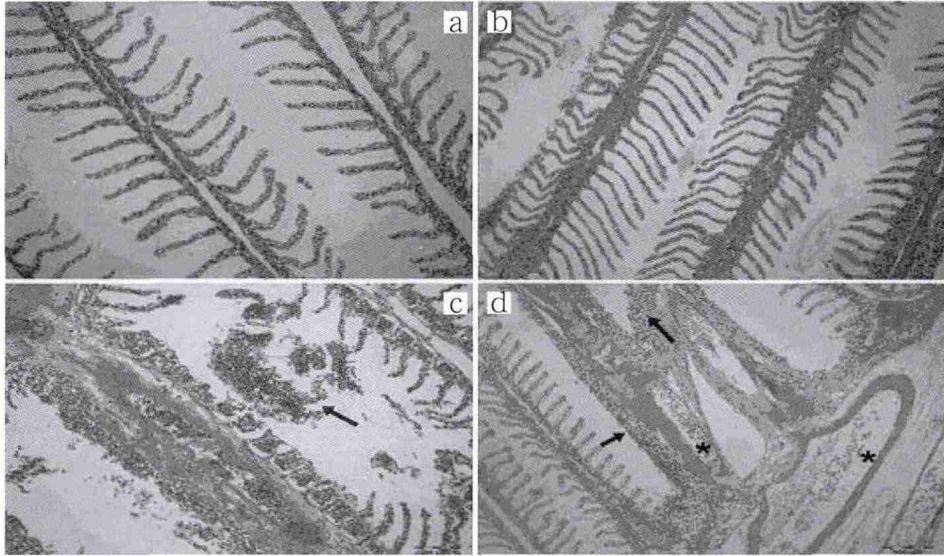


图1 不同处理鱼鳃组织学表现

Fig.1 Histologic appearance of gill tissue in different groups

注：对照组(a)和腐植酸处理组(b)鳃组织表现正常；镉处理组鳃上皮细胞的严重性和脱落(c-箭头)；镉+腐植酸处理组有类似的上皮细胞丢失(d-箭头)，并出现许多充血血管(*)。

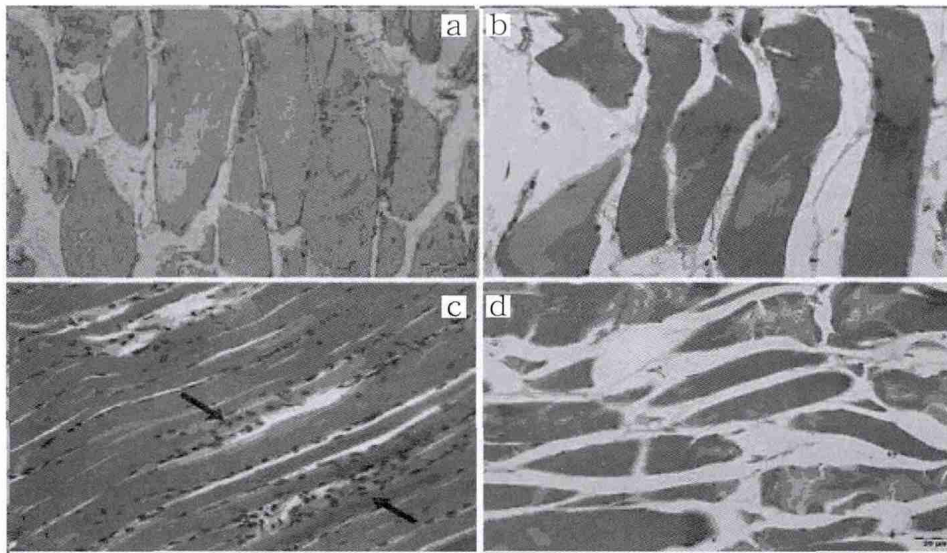


图2 不同处理肌肉组织学表现

Fig.2 Histologic appearance of muscle tissue in different groups

注：对照组(a)和腐植酸处理组(b)肌肉组织表现正常；镉处理组出现炎症单核细胞侵入(c-箭头)；镉+腐植酸处理组没有炎症细胞(d)。

表3 鱼鳃和肌肉组织中病理学变化的严重程度

Tab.3 The intensity and severity of histopathological alterations in gill and muscles tissues

| 病理损伤 | | 对照组 | 腐植酸处理组 | 镉处理组 | 腐植酸+镉处理组 |
|------|--------|-----|--------|------|----------|
| 鳃 | 充血 | - | - | ++ | ++ |
| | 胞质空泡 | - | - | ++ | ++ |
| | 脱落 | - | - | ++ | ++ |
| | 增生 | - | - | ++ | ++ |
| 肌肉 | 血管堵塞 | - | - | + | - |
| | 炎症细胞浸润 | - | - | ++ | + |

注：-表示无病变，+表示轻度病变，++表示中度病变，+++表示重度病变。

3 讨论

本研究旨在探究镉对褐鱒的毒性效应和利用腐植酸防止毒性的可能性。病理学研究将金属毒性归咎于自由基和活性氧。生物体暴露在含镉环境下，自由基的生成量和抗氧化防御系统都会有变化。在水生生态系统存在污染物，包括镉，会使细胞内形成大量活性氧，对生物造成氧化性伤害。从而镉会和一些基础金属竞争蛋白结合位点，引发 Fe^{2+} 和 Cu^{2+} 释放，致使活性氧生成增加。

抗氧化酶水平是研究像重金属类污染物影响的重要指标。抗氧化酶如谷胱甘肽过氧化物酶和超氧化物歧化酶预防氧化应激反应。本研究中，镉处理组中褐鱒肌肉和鳃组织GPx和SOD显著下降，表明GPx和SOD抑制肌肉和鱼鳃组织中氧自由基形成。相似报道称，褐鱒受重金属毒害时SOD和GSH-Px水平降低，造成组织自由基和氧化损伤。也有报道称镉破坏线粒体酶造成细胞和组织的缺陷。一般而言，金属引起的氧化胁迫可直接通过氧化还原反应循环引起，也可间接通过干扰酶或非酶氧化胁迫抵御系统产生。因此，我们评估了一种膜脂过氧化产物MDA的功效。它可以作为检测因金属导致的早期细胞损伤氧化毒性的生物标记。结果表明，镉及镉+腐植酸处理组肌肉和鱼鳃组织中MDA水平无变化。镉+腐植酸处理组肌肉和鱼鳃组织中GPx和SOD水平无显著升高。

有报道称腐植酸增强了镉造成的急性和慢性毒性，不影响金属在生物体内的富集。但也有研究表明，腐植酸持续降低镉在各组织器官中的富

集。通过水传播，镉可以在水生动物的全身，肌肉和脊椎中明显富集。在Liu等的研究中，肌肉组织中的镉含量高得令人担忧。本研究中镉+腐植酸处理组病理学变化相对较小，此结果表明，腐植酸降低了肌肉组织中的镉毒性。

重金属损伤是很多病理和毒物学过程中的一个重要因素。对鱼类而言，镉会造成多种器官结构和病理性变化。鱼鳃是一重要组织，因其与水直接接触，任何有直接或间接影响的物质都先通过鳃才能进入鱼体内。有报道称薄层上皮黏膜对水中溶解铅反应，造成组织渗透调节不平衡。也有研究显示，鱼鳃担当着镉的储藏库。有报道称，镉胁迫会造成罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)形态和生化指标的变化。鱼类在有毒物环境极度活跃可能是由于其鳃因刺激而受到损害引发缺氧造成的。而血红蛋白的增加可以补偿受损的呼吸效率，这在降低欧鲢(*Leuciscus cephalus*)镉中毒试验中有相似报道。本研究结果与之相似。因此，可以说明该病理学变化是由镉中毒造成的。

总之，病理学变化的加剧和抗氧化物活性的降低说明镉处理对鱼鳃和肌肉组织造成了伤害。腐植酸对镉造成的伤害并没有很多影响，但它可以减弱镉引起的肌肉组织病理学变化。因此，腐植酸可调节肌肉组织中镉毒性。

致谢和参考文献(略)

译自：*Turkish Journal of Fisheries and Aquatic Sciences*, 2013, (13): 315 ~ 320.