

南方鲇对水体 Cd 暴露的急性中毒效应*

李健^{1,2}, 罗其勇³, 闫玉莲², 谢小军²

(1. 钦州学院 海洋学院 广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室, 广西 钦州 535011;

2. 西南大学 生命科学学院 水生生物及水环境研究所, 重庆 400715; 3. 广西科技大学 招生就业中心, 广西 柳州 545006)

摘要:【目的】考查南方鲇(*Silurus meridionalis*)对 Cd 胁迫的毒理反应。【方法】以人工繁育获得的体质量为(20.80±0.51)g 的南方鲇当年幼鱼为研究对象,在水体硬度为 25 mg·L⁻¹(以 CaCO₃ 质量浓度计)、水温为(27.5±0.5)℃、水体 Cd²⁺ 质量浓度分别为 0,4.0,5.0,6.0,7.0,8.0 mg·L⁻¹ 条件下进行了 96 h 急性暴露实验,测定了该物种 96 h 半致死浓度(LC₅₀)、肝线粒体状态 3 呼吸率、细胞色素 C 氧化酶(CCO)活性以及脑组织乙酰胆碱酯酶(AChE)活性。【结果】水体中 Cd²⁺ 对南方鲇的 96 h LC₅₀ 为 5.46 mg·L⁻¹;在水体中质量浓度分别为 0,4.0,5.0,6.0,7.0 mg·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 暴露处理下,实验鱼的肝脏线粒体状态 3 呼吸率随着水体 Cd²⁺ 的质量浓度增加而降低,分别为(42.20±2.50),(34.97±1.61),(32.29±1.40),(31.63±1.82),(28.69±1.69) nmol·min⁻¹·mg⁻¹,且不同质量浓度 Cd²⁺ 暴露处理组的测得值均比对照组的更低,与后者的差异均具有统计学意义($p<0.05$);肝脏线粒体的呼吸控制率(RCR)随着水体 Cd²⁺ 的质量浓度升高而呈降低趋势,且不同质量浓度 Cd²⁺ 暴露处理组肝脏线粒体的 RCR 均比对照组的更低,与后者的差异均具有统计学意义($p<0.05$);实验鱼肝线粒体 CCO 的活性随着水体 Cd²⁺ 暴露质量浓度的增加而降低,且质量浓度为 7.0 mg·L⁻¹ 的 Cd²⁺ 暴露处理组的这一指标值比对照组的更低,差异具有统计学意义($p<0.05$);不同质量浓度 Cd²⁺ 暴露处理组实验鱼脑组织 AChE 活性均比对照组的更低,与后者的差异均具有统计学意义($p<0.05$)。【结论】南方鲇对水体 Cd²⁺ 暴露的耐受能力相对较强;受到 Cd²⁺ 暴露的实验鱼肝脏线粒体状态 3 呼吸率、CCO 活性和 RCR 降低结果提示:在 Cd²⁺ 急性胁迫下线粒体功能受到损伤,呼吸代谢能力减弱;急性水体 Cd²⁺ 暴露抑制了实验鱼的脑组织 AChE 活性,使鱼体神经系统功能损伤,导致鱼体行为异常。

关键词: 水体 Cd 暴露;急性毒性;线粒体呼吸率;细胞色素 C 氧化酶;乙酰胆碱酯酶;南方鲇

中图分类号: Q175

文献标志码: A

文章编号: 1672-6693(2018)01-0036-07

水生生物毒性试验是评价污染物毒性的重要手段,也是制定渔业标准的重要依据。半致死浓度(LC₅₀)是评价重金属对鱼类毒性大小的指标,也是研究重金属慢性暴露对鱼类的毒性机制重要的参照指标^[1]。Cd 是生物体的一种非必需元素且是毒性较强的重金属之一。水环境中的 Cd²⁺ 经过不同途径在水生生物体内积累并产生毒害作用^[2-3]。线粒体是细胞能量代谢的中心,是 Cd²⁺ 在细胞内主要的靶细胞器^[4],Cd²⁺ 暴露影响水生生物线粒体结构和功能^[5-6]。表征线粒体代谢能力的指标即线粒体状态 3 呼吸率和细胞色素 C 氧化酶(Cytochrome C oxidase,CCO)的活性已经被一些研究作为评价 Cd²⁺ 暴露影响水生生物线粒体功能的指标^[7-8]。Cd²⁺ 暴露也对鱼神经系统产生毒害^[9-10],乙酰胆碱酯酶(AChE)是生物神经传递中的关键性酶,对维持神经系统正常功能起关键作用^[11],该酶活性的变化被用于评价 Cd²⁺ 影响鱼体神经系统的指标^[12-14]。

南方鲇(*Silurus meridionalis*)是一种专性的肉食性鱼类,位于长江上游水生生态系统食物链的顶端,占有重要的生态位。已有的研究表明,长江上游的底泥和鱼体中均有不同程度的 Cd 积累^[15-16]。本研究观测了水体 Cd²⁺ 暴露对南方鲇的急性致死效应以及急性水体 Cd²⁺ 暴露对南方鲇肝脏线粒体呼吸代谢和脑中 AChE 活性的影响,目的是确定水体 Cd²⁺ 对南方鲇的 96 h LC₅₀ 以及急性水体 Cd²⁺ 暴露对南方鲇线粒体能量代谢和神经系统的毒性影响,进而为探讨水体 Cd²⁺ 暴露对南方鲇的致毒机理提供基础资料。

* 收稿日期:2017-02-20 修回日期:2017-11-29 网络出版时间:2018-01-18 15:21

资助项目:国家自然科学基金(No.31300338);重庆市自然科学基金(No.cstc2013jjB80008);中央高校基本科研业务费专项基金(No.XDJK2016C156);钦州学院校级科研项目(No.2017KYQD107);广西北部湾海洋生物多样性养护重点实验室项目(No.2018ZB03)

第一作者简介:李健,男,副研究员,博士,研究方向为鱼类生理生态学,E-mail:jianlinefu@163.com;通信作者:谢小军,教授,E-mail:xjxie@swu.edu.cn

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1165.N.20180118.1521.012.html>

1 材料与方法

1.1 实验鱼的来源和驯化

实验鱼采用西南大学水生生物及水环境研究所于 2013 年 4 月份同批次人工繁殖的南方鲇当年幼鱼。首先,在循环养殖系统内以曝气 48 h 的自来水(硬度为 $172.14 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,以 CaCO_3 质量浓度计,下同)驯化 14 d。然后,以软水(硬度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)驯化 7 d。驯化期间水温为 $(27.5 \pm 0.5) ^\circ\text{C}$,溶解氧质量浓度大于 $7 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,pH 为 (7.10 ± 0.2) ;光周期为 12 h 光照:12 h 黑暗;以草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)肉块为饵料,每 2 d 投喂 1 次,达饱食状态。在实验前,禁食 24 h,选取规格接近,体表无伤的南方鲇随机分组进行实验。

1.2 实验用水和实验毒物

采用重庆利迪实验仪器有限公司生产的 LD-3000G-A2 纯水制备系统获得去离子水,参照 GB/T 13267—91 方法^[17],以成都科龙化工试剂厂生产的 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 K_2SO_4 、天津光复精细化工研究所生产的 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、重庆川东化工有限公司生产的 NaHCO_3 来配制硬度为 $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的软水。以阿拉丁(上海)工业公司生产的 CdCl_2 配制成 Cd^{2+} 质量浓度为 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的母液储藏备用,根据实验所需稀释成不同质量浓度,作为各实验处理组养殖用水。上述有关试剂均为分析纯。

1.3 实验设计

实验鱼的体质量为 $(20.8 \pm 0.51) \text{ g}$,实验期间不喂食。每 24 h 换掉 1/2 体积的水。实验水体溶解氧含量、水温、水体硬度、pH 以及光照周期与驯化期条件均保持一致。根据预实验确定 Cd^{2+} 对南方鲇的 96 h 最大不致死浓度和最小全致死浓度分别为 $4.0, 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;在两个指标间的范围内按等差间距设定 5 个不同质量浓度的 Cd^{2+} 暴露处理,各组养殖水体中的 Cd^{2+} 质量浓度分别 $4.0, 5.0, 6.0, 7.0, 8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$;设定 1 个对照组,养殖水体中的 Cd^{2+} 质量浓度为 $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。以上 6 个实验组每组均设 3 个重复,每个重复 10 尾鱼。实验开始后,最前面的 10 h 进行连续观察,之后每 2 h 观察 1 次,记录鱼体的中毒症状和死亡情况。测定实验组养殖水体的实际硬度为 $(30.68 \pm 0.85) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=6$)。每日取各实验组的水样,采用石墨炉-原子分光光度计法检测水体中 Cd^{2+} 的质量浓度,测得以上 6 个实验组水体中 Cd^{2+} 实际质量浓度依次分别为 $(3.73 \pm 0.060), (4.70 \pm 0.058), (5.62 \pm 0.031), (6.62 \pm 0.106), (7.52 \pm 0.052), (0.000 22 \pm 0.000 032) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ($n=3$)。96 h 后实验结束,以 Cd^{2+} 的暴露实际质量浓度为自变量,鱼体的死亡百分比为因变量,计算得到回归方程。运用直线内插法,求得水体 Cd^{2+} 暴露对南方鲇 96 h LC_{50} 。

1.4 肝线粒体呼吸率和 CCO 活性测定

肝脏线粒体的提取、线粒体呼吸率和 CCO 活性的测定均参照本实验室已采用的方法^[18]。线粒体状态 3 的呼吸率和 CCO 活性以 1 mg 线粒体蛋白在 1 min 内的耗氧量表示,单位为 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$;用线粒体状态 3 与状态 4 耗氧量的比值表示线粒体的呼吸控制率(Respiratory control ratio, RCR)。

1.5 AChE 活性测定

实验鱼脑组织中乙酰胆碱酯酶活性测定参照 Ellman 的方法^[19-20]。实验结束后,取实验存活鱼脑组织 20 mg,放入冰浴,加 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 为 8.0) 1 mL,用匀浆机匀浆 10~15 s,转玻璃匀浆器匀浆 5~8 次。在 $4 ^\circ\text{C}$ 条件下, $11 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min。取上清用于酶活性和蛋白质含量的测定。酶活性检测具体操作如下:取 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐缓冲液(pH 为 8.0) $200 \mu\text{L}$ 加入 96 孔酶标板,在 $25 ^\circ\text{C}$ 条件下预温 3 min,依次加入 $20 \mu\text{L}$ 浓度为 $4.095 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 5,5'-二巯基(2-硝基苯甲酸)(DTNB)溶液、 $20 \mu\text{L}$ 脑匀浆提取液、 $20 \mu\text{L}$ 浓度为 $6.162 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的碘化乙酰硫代胆碱溶液,混合后,总体积为 $260 \mu\text{L}$ 。在波长 412 nm 处每 10 s 记录 1 次吸光值,连续 5 min。乙酰胆碱酯酶活性以 1 mg 脑蛋白在 1 min 催化所生成底物物质的量表示,单位为 $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。线粒体蛋白和脑匀浆液蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定^[21]。

1.6 数据处理方法

研究中所得数据均采用“平均值±标准误”表示,用软件 Excel 2003 和 SPSS 17.0 对数据进行统计分析。采用单因素方差分析检验 Cd^{2+} 对实验鱼的影响,并用 LSD 法分析各实验组数据间的差异。当 $p < 0.05$ 时,统计结果具有统计学意义。

2 结果

2.1 对南方鲇的急性致死效应

在不同质量浓度的 Cd^{2+} 暴露处理中,实验鱼体的中毒症状均表现出相同的渐进特征:随着暴露时间的延长,实验鱼表现出行为异常,垂直上下游泳次数增加,对外界刺激反应敏感,剧烈游泳,侧泳;有时在水中转圈,碰撞实验水箱,实验鱼个体间也出现相互碰撞的现象。大多数个体出现唇裂带有红色出血点。随着中毒时间延长,实验鱼的游泳能力减弱,匍匐箱底,呼吸频率加快,大口吐气泡,部分个体表现出单鳃呼吸,最后死亡。质量浓度越低的 Cd^{2+} 暴露处理组中的实验出现中毒症状越晚,最低质量浓度($4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 Cd^{2+} 暴露处理组实验鱼在 96 h 后才开始有个体死亡;而最高质量浓度($8.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的 Cd^{2+} 暴露处理组在 24 h 后就出现死鱼现象,48 h 后死亡过半,96 h 后所有实验鱼全部死亡。解剖死亡鱼个体后发现,内脏没有出现肉眼可见的病理变化。与对照组相比, Cd^{2+} 暴露处理组鱼的体表粘液增多,鱼鳃也有大量的粘液分泌。

水体中不同质量浓度的 Cd^{2+} 暴露对南方鲇急性致死效应见图 1。在实验期间,对照组的鱼没有出现死亡。随着水体中 Cd^{2+} 质量浓度的增加,南方鲇的死亡率也增加,从而表现出剂量效应。以 Cd^{2+} 的质量浓度为自变量,鱼体的死亡百分比为因变量,计算得到回归方程如图 1 所示。运用直线内插法,求得水体 Cd^{2+} 暴露对南方鲇 96 h LC_{50} 为 $5.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2.2 对南方鲇肝脏线粒体代谢水平的影响

实验鱼肝脏线粒体状态 3 呼吸率随着水体 Cd^{2+} 暴露质量浓度增加而降低(表 1)。对照组和 4 个质量浓度分别为 $4.0, 5.0, 6.0, 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 暴露处理组肝脏线粒体状态 3 呼吸率分别为 $(42.20 \pm 2.50), (34.97 \pm 1.61), (32.29 \pm 1.40), (31.63 \pm 1.82), (28.69 \pm 1.69) \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。与对照组相比,4 个不同质量浓度的 Cd^{2+} 暴露处理组肝脏线粒体状态 3 呼吸率均较低,与对照组这一指标的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。实验鱼肝脏线粒体的 RCR 随着水体 Cd^{2+} 暴露质量浓度的升高而呈降低趋势(表 1),且 4 个不同质量浓度的 Cd^{2+} 暴露处理组肝脏线粒体 RCR 均比对照组的更低,与后者的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

实验鱼肝脏线粒体 CCO 活性随着水体 Cd^{2+} 暴露质量浓度增加而降低(表 1)。对照组和质量浓度分别为 $4.0, 5.0, 6.0, 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 暴露处理组肝脏线粒体 CCO 活性分别为 $(334.23 \pm 39.02), (306.09 \pm 17.86), (270.76 \pm 19.03), (262.53 \pm 21.60), (220.73 \pm 22.75) \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。 $7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Cd^{2+} 暴露处理组肝脏线粒体 CCO 活性低于对照组肝脏线粒体 CCO 活性,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

2.3 对南方鲇脑组织 AChE 活性的影响

实验鱼脑组织的 AChE 活性随水体 Cd^{2+} 暴露质量浓度增加而降低(表 1)。对照组和质量浓度分别为 $4.0, 5.0, 6.0, 7.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd^{2+} 暴露处理组脑组织 AChE 活性分别为 $(231.98 \pm 6.24), (195.74 \pm 6.03), (189.31 \pm 13.94), (175.09 \pm 17.15), (160.09 \pm 7.65) \text{ nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。4 个不同质量浓度 Cd^{2+} 暴露处理组中脑组织 AChE 活性均低于对照组中脑组织 AChE 活性,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

3 讨论

水体中的 Cd^{2+} 通过鱼鳃和皮肤在体内积累到一定剂量时就会导致鱼体死亡,96 h LC_{50} 是评价 Cd^{2+} 对鱼体毒性大小的重要指标^[1,22]。本研究中,水体中 Cd^{2+} 对南方鲇幼鱼的 96h LC_{50} 为 $5.46 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。杨丽华等人^[23]根据 96h LC_{50} 大小将各种毒物对鱼体毒性进行分级,其中: LC_{50} 小于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为剧毒; LC_{50} 在 $0.1 \sim < 1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为高毒; LC_{50} 在 $1 \sim 10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为中等毒性; LC_{50} 大于 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时为低毒。由此可知,本研

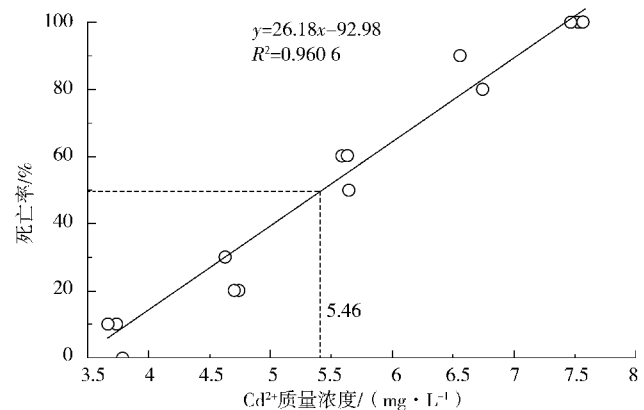


图 1 南方鲇在水体 Cd^{2+} 暴露中的 96 h 死亡率

Fig. 1 The mortality rate of *S. meridionalis* in the water-borne Cd^{2+} exposure for 96 h

究中的 Cd²⁺ 对南方鲇为中等毒性。已有的研究发现, Cd²⁺ 对斯氏鲮脂鲤(*Prochilodus vimboides*) 等 7 种鱼类的 96 h LC₅₀ 范围为 0.10~4.45 mg·L⁻¹[13-14,24-27] (表 2)。不难发现, Cd²⁺ 对南方鲇的 96 h LC₅₀ 比上述文献报道的相关数值更高, 表明南方鲇对水体 Cd²⁺ 暴露的耐受能力相对较强。

表 1 水体 Cd²⁺ 暴露对南方鲇肝线粒体状态 3 呼吸率、RCR 值、CCO 酶活性和脑组织 AChE 活性的影响

Tab. 1 Effects of water-borne Cd²⁺ on state 3 respiration rate, cytochrome C oxidase activity,

RCR value of hepatic mitochondria and acetylcholinesterase (AChE) activity of brain in *S. meridionalis*

Cd ²⁺ 质量浓度/ (mg·L ⁻¹)	状态 3 呼吸率/ (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	RCR	CCO 活性/ (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)	AChE 活性/ (nmol·min ⁻¹ ·mg ⁻¹)
0	42.20±2.50 ^a	4.30±0.21 ^a	334.23±39.02 ^a	231.98±6.24 ^a
4	34.97±1.61 ^b	2.91±0.14 ^b	306.09±17.86 ^a	195.74±6.03 ^b
5	32.29±1.40 ^{bc}	2.66±0.19 ^b	270.76±19.03 ^{ab}	189.31±13.94 ^b
6	31.63±1.82 ^{bc}	2.66±0.11 ^b	262.53±21.60 ^{ab}	175.09±17.15 ^b
7	28.69±1.69 ^c	2.72±0.11 ^b	220.73±22.75 ^b	160.09±7.65 ^b

注:不同字母表示同列数据的差异具有统计学意义($p < 0.05$)。

表 2 水体中 Cd²⁺ 对各种鱼类的 96 h LC₅₀

Tab. 2 The 96 h LC₅₀ of water-borne Cd²⁺ for different fishes

物种名称	96 h LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	水硬度/(mg·L ⁻¹)	体质量/g	发育阶段	数据来源
虹鳟(<i>Oncorhynchus mykiss</i>)	1.30	70	5~15	幼鱼	文献[24]
花鱗鱼(<i>Poecilia reticulata</i>)	0.17	15.60±2.70		成鱼	文献[27]
草鱼(<i>C. idellus</i>)	3.98	28	67.62±1.54	幼鱼	文献[13]
稀有鮡鲫(<i>Biocypis rarus</i>)	2.75	35.72	0.88±0.03	成鱼	文献[14]
苏门答腊波鱼(<i>Rasbora sumatrana</i>)	0.10	15.60±2.70		成鱼	文献[27]
斯氏鲮脂鲤(<i>P. vimboides</i>)	3.16	40±8	1.5±0.7	幼鱼	文献[26]
唐鱼(<i>Tanichthys albonubes</i>)	4.45	40	0.16±0.06	幼鱼	文献[25]
南方鲇(<i>S. meridionalis</i>)	5.46	30.69	20.8±0.51	幼鱼	本研究

有研究表明重金属暴露能抑制鱼体线粒体的呼吸, 而线粒体状态 3 呼吸降低会使机体 ATP 合成的能力减弱^[28-29]。在已有的研究中鲫(*Carassius auratus*) 的肝脏离体线粒体暴露于 Cu²⁺ 和 Cd²⁺ 时, 状态 3 耗氧率会受到明显抑制^[30]。虹鳟经水体 Cd²⁺ 暴露后, 肝脏线粒体状态 3 耗氧率受到抑制^[6]。本研究结果表明, 南方鲇受到水体中不同质量浓度的 Cd²⁺ 暴露后, 肝脏线粒体状态 3 呼吸率相对于对照组的测得值下降了 17.13%~32.01%, 并且各个不同质量浓度的 Cd²⁺ 暴露处理组与对照组相比, 与后者肝脏线粒体状态 3 呼吸率的差异均具有统计学意义($p < 0.05$), 表明 Cd²⁺ 暴露抑制了南方鲇肝脏的 ATP 合成。重金属暴露也对鱼类线粒体酶的活性产生影响, 柏世军^[31] 研究 Cd²⁺ 暴露对罗非鱼(*Oreochromis niloticus*) 鳃线粒体能量代谢影响时发现, 经 5 d 暴露后, 低质量浓度(0.5 mg·L⁻¹) 和高质量浓度(2.5 mg·L⁻¹) 的 Cd²⁺ 暴露处理组中鳃线粒体的 CCO 活性均明显升高; 暴露 7 d 后, 低质量浓度 Cd²⁺ 暴露处理组 CCO 活性回到对照组的水平, 高质量浓度 Cd²⁺ 暴露处理组的 CCO 活性明显比对照组的更低。Garceau 等人^[30] 发现鲫的肝脏离体线粒体暴露于 Cd²⁺ 时, 线粒体 CCO 活性明显升高。线粒体 CCO 活性升高可能是对 Cd²⁺ 胁迫的补偿反应, 线粒体 CCO 活性降低则可能是线粒体的功能受到损害。分析上述文献报道的资料表明, 低质量浓度 Cd²⁺ 暴露时, 鱼组织线粒体 CCO 活性被诱导升高; 高质量浓度 Cd²⁺ 暴露时, 鱼组织线粒体 CCO 活性被抑制降低。本研究观测了水体中高质量浓度 Cd²⁺ 对南方鲇的

急性中毒效应,检测的线粒体 CCO 活性的组织样本均来自亚致死状态的实验个体。结果表明,水体 Cd^{2+} 暴露后南方鲇肝脏线粒体 CCO 活性下降了 8.42%~33.96%,且最高质量浓度 Cd^{2+} 暴露处理组肝脏线粒体 CCO 活性比对照组的更低,两者差异具有统计学意义($p < 0.05$)。线粒体 RCR 大小可以反映线粒体结构完整性和氧化磷酸化的偶联程度^[32]。与对照组相比,南方鲇暴露在不同质量浓度的 Cd^{2+} 后,肝脏线粒体 RCR 降低了 32.33%~36.74%,这提示水体 Cd^{2+} 暴露对鱼体肝脏线粒体的结构造成损伤,同时也导致了肝脏线粒体氧化磷酸化的偶联程度下降。

另外,有研究表明鱼体受到重金属暴露后需要额外的能量应对重金属暴露胁迫^[33-34]。南方鲇暴露于水体不同质量浓度 Cd^{2+} 后,肝脏线粒体酶的活性受到抑制,线粒体结构会受到损害,导致线粒体正常代谢功能损害,呼吸率下降提示合成 ATP 能力减弱,使鱼体不能及时补充能量应对胁迫——这可能是急性 Cd^{2+} 暴露引起南方鲇致死的原因之一。

水环境中 Cd^{2+} 暴露可抑制鱼体脑组织 AChE 活性,使鱼体神经系统的功能受到损害^[10]。已有研究表明,鲫、克林雷氏鲇(*Rhamdia quelen*)、斑马鱼(*Danio rerio*)受到水体 Cd^{2+} 污染后,脑组织 AChE 的活性明显降低^[9-10,12]。本研究发现,水体中不同质量浓度 Cd^{2+} 暴露处理后的南方鲇脑组织 AChE 活性随着 Cd^{2+} 的质量浓度升高而降低,且与对照组实验鱼脑组织 AChE 活性相比下降了 15.62%~30.99%。本研究中还观察到急性水体 Cd^{2+} 暴露使南方鲇游泳平衡能力减弱,出现碰撞实验水箱的现象,表明南方鲇受到水体 Cd^{2+} 污染后脑中 AChE 活性受到抑制,导致鱼体神经系统中以乙酰胆碱为神经递质的突触传递功能受到影响,因而出现运动功能失调,行为异常。

综上所述,在水温为 27.5 °C 和水体硬度为 25 mg · L⁻¹ 的条件下,水体 Cd^{2+} 暴露对南方鲇来说属中等毒性,该物种对水体中 Cd^{2+} 的耐受性相对较强;急性水体 Cd^{2+} 暴露明显降低了南方鲇肝脏线粒体状态 3 呼吸率、RCR 和肝脏线粒体 CCO 活性,同时也抑制该物种脑组织 AChE 的活性,使之神经系统功能紊乱,导致行为异常。

参考文献:

- [1] YILMAZ M, GUL A, KARAKOSE E. Investigation of acute toxicity and the effect of cadmium chloride ($\text{CdCl}_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$) metal salt on behavior of the guppy (*Poecilia reticulata*) [J]. *Chemosphere*, 2004, 56(4): 375-380.
- [2] OMER S A, ELOBEID M A, FOUAD D, et al. Cadmium bioaccumulation and Toxicity in Tilapia Fish (*Oreochromis niloticus*) [J]. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 2012, 11(10): 1601-1606.
- [3] ZHANG T, ZHANG Y, LI D L, et al. Exposure of silver carp (*Hypophthalmichthys molitrix*) to environmentally relevant levels of cadmium: hematology, muscle physiology, and implications for stock enhancement in the Xiangjiang river (Hunan, China) [J]. *Science China Life Sciences*, 2013, 56(1): 66-72.
- [4] CANNINO G, FERRUGGIA E, LUPARELLO C, et al. Cadmium and mitochondria [J]. *Mitochondrion*, 2009, 9(6): 377-384.
- [5] 柏世军, 许梓荣. 镉对黄颡鱼鳃线粒体结构和能量代谢的影响 [J]. *应用生态学报*, 2006, 17(7): 1213-1217.
BAI S J, XU Z R. Effects of cadmium on mitochondrion structure and energy metabolism of *Pelteobagrus fulvidraco* gill [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2006, 17(7): 1213-1217.
- [6] ADIELE R C, STEVENS D, KAMUNDE C. Cadmium-and calcium-mediated toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) in vivo: Interactions on fitness and mitochondrial endpoints [J]. *Chemosphere*, 2011, 85(10): 1604-1613.
- [7] SOKOLOVA I M, SOKOLOV E P, PONNAPPA K M. Cadmium exposure affects mitochondrial bioenergetics and gene expression of key mitochondrial proteins in the eastern oyster *Crassostrea virginica* Gmelin (Bivalvia: Ostreidae) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 73(3): 242-255.
- [8] DORTS J, KESTEMONT P, DIEU M, et al. Proteomic response to sublethal cadmium exposure in a sentinel fish species, *Cottus gobio* [J]. *Journal of Proteome Research*, 2011, 10(2): 470-478.
- [9] 贾秀英, 董爱华. Cd Cr(VI) 及其复合污染对鲫鱼脑组织乙酰胆碱酯酶活性的影响 [J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(3): 337-339.
JIA X Y, DONG A H. Single and combined pollution on acetylcholinesterase activity in brain of *Carassius auratus* [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2003, 22(3): 337-339.
- [10] PRETTO A, LORO V L, MORSCH V M, et al. Acetylcholinesterase activity, lipid peroxidation, and bioaccumulation in silver catfish (*Rhamdia quelen*) exposed to cadmium [J]. *Archives of environmental contamination and toxicology*, 2010, 58(4): 1008-1014.
- [11] LIONETTO M G, CARICATO R, CALISI A, et al. Acetylcholinesterase as a biomarker in environmental and occupational medicine: new insights and future perspectives

- [J].Biomed Research International,2013,2013(5):321213
- [12] DE LIMA D,ROQUE G M,DE ALMEIDA E A.In vitro and in vivo inhibition of acetylcholinesterase and carboxylesterase by metals in zebrafish (*Danio rerio*)[J].Marine Environmental Research,2013,91(5):45-51.
- [13] 田鹏.水体中的镉暴露对草鱼的氧化胁迫研究[D].重庆:西南大学,2013.
TIAN P.Study on the oxidative stress of the grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) after exposure to the waterborne cadmium (Cd)[D].Chongqing:Southwest University,2013.
- [14] 刘燕.水体中的镉暴露对稀有鮡鲫氧化应激及组织学影响[D].重庆:西南大学,2014.
LIU Y.Effects of the water-borne cadmium (Cd) on the oxidative stress and histology of *Gobiocypris rarus* [D].Chongqing:Southwest University,2014 .
- [15] MA W B,WANG F,ZHAI Q,et al.Study on Potential ecological risk assessment of sediment from the Yangtze river (Chongqing downtown section) in China [J].Advanced Materials Research,2012,414:262-267.
- [16] YI Y J,ZHANG S H.Heavy metal (Cd,Cr,Cu,Hg,Pb,Zn) concentrations in seven fish species in relation to fish size and location along the Yangtze River[J].Environmental Science and Pollution Research,2012,19(9):3989-3996.
- [17] 国家环保局.GB/T13267—91 水质物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性测定方法[S].北京:中国标准出版社,1992.
Environmental Protection Bureau of China.GB/T13267—91 Water quality-determination of the acute toxicity of substance to freshwater fish (*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan) [S]. Beijing,China Standards Press,1992 .
- [18] 闫玉莲,谢小军.南方鲇不同组织间线粒体代谢的比较研究[J].水生生物学报,2011,35(2):262-269.
YAN Y L,XIE X J.Comparative studies on metabolism of mitochondria isolated from various tissues of southern catfish, *Silurus meridionalis* Chen[J].Acta Hydrobiologica Sinica,2011,35(2):262-269.
- [19] LLMAN G L,COURTNEY K D,ANDRES V J,et al.A new and rapid colorimetric determination of acetylcholinesterase activity[J].Biochemical Pharmacology,1961,7(2):88-95.
- [20] TORRE F R D L,FERRARI L,SALIBIAN A.Freshwater pollution biomarker:response of brain acetylcholinesterase activity in two fish species[J].Comparative Biochemistry and Physiology Part C,2002,131(3):271-280.
- [21] BRADFORD M.A rapid and sensitive assay of protein utilizing the principle of dye binding[J].Analytical Biochemistry,1976,72:248-254.
- [22] WANG H,LIANG Y,LI S,et al.Acute toxicity,respiratory reaction,and sensitivity of three cyprinid fish species caused by exposure to four heavy metals[J].PloS ONE,2013,8(6):e65282.
- [23] 杨丽华,方展强,郑文彪.重金属对鲫鱼的急性毒性及安全浓度评[J].华南师范大学学报(自然科学版),2003,2:101-106.
YANG L H,FANG,Z Q,ZHENG W B.Safety assessment and acute toxicity of heavy metals to crucian *Carasius auratus*[J]. Journal of South China Normal University (Natural Science Edition),2003,2:101-106.
- [24] PASCOE D,EVANS S V,WOODWORTH J.Heavy metal toxicity to fish and the influence of water hardness[J].Archives of Environmental Contamination and Toxicology,1986,15(5):481-487.
- [25] 王瑞龙,马广智,方展强.铜、镉、锌对唐鱼的急性毒性及安全浓度评价[J].水产科学,2006,25(3):117-120.
WANG R L,MA G Z,FANG Z Q.Safety assessment and acute toxicity of copper,cadmium and zinc to white cloud mountain minnow *Tanichthys albonubes*[J].Fisheries Science,2006,25(3):117-120.
- [26] GOMES L C,CHIPPARI-GOMES A R,OSS R N,et al. Acute toxicity of copper and cadmium for piauçu, *Leporinus macrocephalus*, and curimatã, *Prochilodus vimboides*[J].Acta Scientiarum-Biological Sciences,2009,31(3):313-315.
- [27] SHUHAIMI-OTHTMAN M,NADZIFAH Y,AHMAD A K. Toxicity of copper and cadmium to freshwater fishes [J].World Academy of Science,Engineering and Technology,2010(65):869- 871.
- [28] CAMBIERA S,BENARDB G,MESMER-DUDONSA N, et al.At environmental doses,dietary methylmercury inhibits mitochondrial energy metabolism in skeletal muscles of the zebra fish (*Danio rerio*)[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2009,41(4):791-799.
- [29] BOURDINEAUD J P,ROSSIGNOL R,BRETHES D. Zebrafish:A model animal for analyzing the impact of environmental pollutants on muscle and brain mitochondrial bioenergetics[J].The International Journal of Biochemistry & Cell Biology,2013,45(1):16-22.
- [30] GARCEAU N,PICHAUD N,COUTURE P.Inhibition of goldfish mitochondrial metabolism by in vitro exposure to Cd,Cu and Ni[J].Aquatic Toxicology,2010,98(2):107-112.
- [31] 柏世军.水环境镉对罗非鱼的毒性作用和机理探讨[D].杭州:浙江大学,2006.
BAI S J.Effects of waterborne cadmium on tilapia (*Oreochromis niloticus*) and approach to mechanism of the effects[D].Hangzhou:Zhejiang University,2006.
- [32] GUDERLEY H,PIERRE J S,COUTURE P,et al.Plasticity of the properties of mitochondria from rainbow trout red muscle with seasonal acclimatization[J].Fish Physiol-

- ogy and Biochemistry, 1997, 16(6): 531-541.
- [33] ALMEIDA J A, NOVELLI E L B, SILVA M D P, et al. Environmental cadmium exposure and metabolic responses of the Nile tilapia, *Oreochromis niloticus* [J]. Environmental Pollution, 2001, 114(2): 169-175.
- [34] FERRARI L, EISSA B L, SALIBIAN A. Energy balance of juvenile *Cyprinus carpio* after a short-term exposure to sublethal water-borne cadmium [J]. Fish Physiol Biochem, 2011, 37(4): 853-862.

Animal Sciences

The Acute Toxicological Response of the Southern Catfish to Water-Borne Cadmium

LI Jian^{1,2}, LUO Qiyong³, YAN Yulian², XIE Xiaojun²

(1. Guangxi Key Laboratory of Beibu Gulf Marine Biodiversity Conservation, Ocean College,

Qinzhou University, Qinzhou Guangxi 535011;

2. Institute of Hydrobiology and Water Environment, School of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715;

3. Admission and Employment center, Guangxi University of Science and Technology, Liuzhou Guangxi 545006, China)

Abstract: [Purposes] It aims to investigate the acute toxicological response of the *Silurus meridionalis* to water-borne cadmium.

[Methods] The juveniles of the *S. meridionalis* (body mass: (20.80 ± 0.51) g) which were bred using artificial fertilization were exposed to different concentrations of cadmium (Cd^{2+}) (0, 4.0, 5.0, 6.0, 7.0 and 8.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) in artificial soft water (CaCO_3 25 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) at 27.5 °C. After a 96-hour exposure, the median lethal concentration (96 h LC_{50}), state 3 respiration rate and cytochrome C oxidase (CCO) activity of mitochondria isolated from liver, and the activity of acetylcholine esterase (AChE) in brain were assessed. [Findings] Acute 96h LC_{50} value of the test fish for Cd^{2+} toxicity was 5.46 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$. State 3 respiration rate was strongly inhibited by the addition of Cd^{2+} . The value in the groups of 4.0, 5.0, 6.0, and 7.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were (34.97 ± 1.61) , (32.29 ± 1.40) , (31.63 ± 1.82) , and (28.69 ± 1.69) $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectively, which were significantly lower compared with the control group (42.20 ± 2.50) $\text{nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ ($p < 0.05$). The respiratory control ratio (RCR) decreased with the increasing Cd^{2+} concentration and the value in the control group was significantly higher than that in other groups ($p < 0.05$). The CCO activity decreased along the Cd^{2+} concentration gradient, significant inhibition of CCO activity by Cd^{2+} compared to controls was achieved only at the highest concentration tested ($p < 0.05$). The activity of AChE in group of 4.0, 5.0, 6.0 and 7.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ were significantly lower than that of the control group ($p < 0.05$). [Conclusions] *S. meridionalis* have higher tolerance for Cd^{2+} toxicity. The decrease in state 3 respiration rates, RCR, and CCO activity suggest that the mitochondrial impairment might be caused by waterborne Cd^{2+} , and which lead to the inhibition of the aerobic capacities in liver. The inhibition of AChE activity and abnormal behavior of the fish in the acute exposure suggest that nervous system of the southern catfish was quite sensitive to toxic effects of Cd^{2+} .

Keywords: water-borne cadmium; acute toxicity; mitochondrial respiration rate; cytochrome C oxidase; acetylcholine esterase; *Silurus meridionalis*

(责任编辑 方 兴)