

镉致黑斑蛙肝脏氧化损伤与金属硫蛋白含量的变化

贾秀英*, 施蔡雷, 刘晓旭

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要:为观察镉对黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)肝脏脂质过氧化产物和金属硫蛋白含量的影响, 将黑斑蛙暴露于 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度的镉溶液中 30d, 分别测定了黑斑蛙在暴露 4、10d 和 30d 时肝脏组织中镉(Cd)、还原型谷胱甘肽(GSH)、金属硫蛋白(MT)和过氧化产物丙二醛(MDA)的含量。实验结果表明, 黑斑蛙肝脏中镉的积累量、GSH 和 MT 含量均随着镉暴露时间的延长而显著升高, 具有明显的时间-效应关系; 在镉暴露的第 10 天, 肝 MDA 含量明显高于对照组。提示镉可对黑斑蛙肝脏造成氧化损伤, 而 GSH、MT 含量的升高则可能是机体抗氧化损伤的机理之一。

关键词:镉; 金属硫蛋白; 氧化损伤; 黑斑蛙

Effects of Cadmium on oxidative stress and metallothionein of liver in frog *Rana nigromaculata*

JIA Xiuying*, SHI Cailei, LIU Xiaoxu

College of Life and Environmental Science, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: Amphibian populations appear to be declining around the globe. Among many reasons behind this, an important factor may be heavy metals pollution. Heavy metals such as cadmium (Cd) are one of the most fundamental causes of soil and water pollution in industrial and developing countries. The liver is the main target organ affected by Cd toxicity. We used the frog *Rana nigromaculata* as a test specimen to evaluate the oxidative stress and metallothionein (MT) content of liver under long-term exposure to toxic levels of Cd. Adult frogs were exposed to $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd in the form of CdCl_2 in water for 4, 10, and 30 days. The Cd concentration along with metallothionein (MT), glutathione (GSH) and malondialdehyde (MDA) contents in the liver were detected. The results indicated that Cd accumulation, GSH and MT contents in liver increased significantly in a time-dependent manner. MDA content in liver increased significantly compared with the control groups after 10 days treatment. These results suggest that Cd can induce hepatic oxidative damage, and the increasing of GSH and MT contents might be part of general defense strategies to cope with oxidative stress.

Key Words: Cadmium; metallothionein; oxidative damage; *Rana nigromaculata*

镉(Cadmium, Cd)是一种机体非必需元素, 具有蓄积性, 现已被美国农业委员会列为当前最重要的一种农业环境污染物。数十年来, 有关镉对水生动物、哺乳动物的机体结构及生理生化等方面的影响作了较多的研究^[1-4], 研究表明, 镉毒性作用表现在多个方面, 作用机制也非常复杂, 但引起氧化损伤是 Cd 对机体产生毒害的一个重要原因^[5]。

金属硫蛋白(metallothionein, MT)是一类广泛存在于机体内、富含半胱氨酸、与金属离子具有高度亲和性的低分子量蛋白, MT 与 Cd 等有毒重金属离子结合能减少其对组织的损害, 具有解毒、调节机体抗氧化功能的作用, 是影响 Cd 毒性作用的重要因素之一^[6]。

基金项目: 浙江省自然科学基金资助项目(302056)

收稿日期: 2008-10-03; 修订日期: 2008-11-16

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: XY_Jia@163.com

两栖类动物是生态群落的重要组成部分,近年来,随着全球范围内两栖类动物数量在日渐减少^[7-9],环境污染(包括杀虫剂和重金属等)对两栖类动物生长发育各阶段影响的研究,正成为生态毒理学研究的热点^[10-11]。目前关于重金属 Cd 对两栖动物的生长、发育及生理生化等方面的影响国内外已开展了不少研究^[12-15],但有关 Cd 致两栖动物肝脏 MT 变化情况的研究目前还少见报道。本研究以经典的实验动物黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)为研究对象,通过检测 Cd 暴露后肝脏中 MT 含量、还原型谷胱甘肽(GSH)及丙二醛(MDA)含量的变化,为系统探讨 Cd 对两栖动物的毒性作用机制及 MT 在抗肝脏氧化损伤中的作用提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 实验试剂

Cd 采用 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (中国亨新化工试剂厂),分析纯。用双蒸馏水配制成 $12.22\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,实验时稀释成所需各浓度。

1.2 实验动物及处理

健康成年黑斑蛙捕自杭州市郊,平均体长为 (74.5 ± 4.3) mm,平均体重为 (36.6 ± 9.8) g。在室内盛有 2—3 cm 曝气自来水(曝气 3d 以上)的玻璃水族缸(实验前用 10% 的稀硝酸浸泡)中暂养 7d 后,挑选健壮、规格整齐的黑斑蛙进行实验。实验随机均分为对照组和染毒组,每组 30 只(雌雄各半)。暴露实验在玻璃缸($60\text{cm} \times 40\text{cm} \times 35\text{cm}$)中进行。根据急性毒性实验测定的 96h 的 LC_{50} 浓度($60.7\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),将染毒组黑斑蛙暴露于 3 cm 深的 $10.0\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的镉溶液(按镉计,用 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 配制),对照组黑斑蛙暴露于 3 cm 深的清洁水溶液中。每 1 处理各设 1 平行组。暴露实验共进行 30d,采用静态置换法每天更新溶液 50%,每天投喂 1 次。驯养期间及实验过程中黑斑蛙没有出现死亡情况。

1.3 实验设计和样品处理

对照组和染毒组于暴露后第 4 天、10 天和 30 天分别取样,每次每组取蛙 10 只。暴露结束时,将每个处理组的黑斑蛙击死,先测量体长和体重,然后解剖,取出肝脏,称重后迅速置于液氮中冷冻,保存待测。

1.4 测定指标及方法

计算肝脏的脏器系数,脏器系数计算公式:脏器系数 = 肝脏质量(g)/黑斑蛙体重(g) $\times 100\%$ 。

镉含量的测定采用原子吸收分光光度法;金属硫蛋白(MT)含量的测定采用镉-血红蛋白亲和分析法^[16];谷胱甘肽(GSH)含量的测定采用二硫代二硝基苯甲酸比色法;丙二醛(MDA)测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法。试剂购自南京建成生物工程研究所,测试步骤按试剂盒说明进行。

1.5 数据处理

实验所得数据采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析,处理与对照间的差异比较用单因素方差分析法,处理间的差异比较采用新复极差法(SSR); $P < 0.05$ 为有显著差异。实验数据用平均值 $\pm$ 标准误表示。

2 结果与分析

2.1 黑斑蛙肝脏器系数的变化

由表 1 可见,在不同时间暴露下,对照组黑斑蛙肝脏器系数无明显变化($P > 0.05$);与对照组相比,处理组经 Cd 染毒暴露 4d,黑斑蛙肝脏器系数没有明显变化($P > 0.05$);经 Cd 染毒暴露 10、30d,黑斑蛙肝脏器系数减少,显著低于对照组和 4d 处理组($P < 0.05$)。由此可见,在研究 Cd 对两栖类动物的亚慢性毒性效应时,可以考虑把肝脏器系数作为一种反映毒性效应的有效评价指标。

2.2 肝脏中 Cd 的含量

由图 1 可见,经 Cd 暴露 4、10d 和 30d 后,黑斑蛙肝脏中 Cd 的含量均显著高于对照组($P < 0.05$),且随着暴露时间的延长而不断增加,在 30d 达到最大值,显著高于 4d 和 10d 处理组($P < 0.05$)。经相关分析,肝脏中 Cd 的含量与暴露时间呈显著相关关系(相关系数 $r = 0.975$, $P < 0.01$),表明肝脏中 Cd 的含量与 Cd 暴露有明确的时间-效应关系。

表 1 不同时间 Cd 暴露后黑斑蛙的肝脏器系数

Table 1 The coefficient of liver in *Rana nigromaculata* after exposure to Cd for different time

暴露时间 Exposure times/d	动物数 (No.) Animal numbers	体长 Body length/mm		肝脏器系数 Coefficient of liver/%	
		对照组 CK	处理组 CK	对照组 CK	处理组 CK
0	10	74.5 ± 4.32	74.8 ± 4.12	2.33 ± 0.45	2.45 ± 0.43
4	10	75.2 ± 3.98	75.9 ± 3.32	2.45 ± 0.32	2.54 ± 0.39
10	10	75.6 ± 4.02	73.8 ± 2.48	2.38 ± 0.42	1.75 ± 0.26ab
30	10	74.8 ± 4.24	74.7 ± 3.69	2.35 ± 0.28	1.88 ± 0.32ab

a 与对照组比较差异显著 $P < 0.05$; b 与 4d 处理组比较差异显著 $P < 0.05$

2.3 肝脏 MT 含量的变化

由图 2 可知,经 Cd 暴露 4、10 和 30d 后,与对照组相比,黑斑蛙肝脏中的 MT 含量均显著升高 ($P < 0.05$),且随暴露时间的延长逐渐增加,呈时间依赖关系 ($r = 0.979$, $P < 0.05$)。说明 Cd 能诱导黑斑蛙肝脏中 MT 的产生。

2.4 肝脏 MDA 含量的变化

从图 3 可见,经 Cd 暴露 4d,肝脏 MDA 含量有所增加,但与对照组比无显著性差异 ($P > 0.05$);暴露 10d 后,肝脏 MDA 含量显著高于对照组和 4d 处理组 ($P < 0.05$);暴露 30d 后,肝脏 MDA 含量没有继续升高,与暴露 10d 时的含量基本接近,二者之间无显著性差异 ($P > 0.05$)。说明 Cd 暴露可引起黑斑蛙肝脏脂质过氧化损伤。

2.5 肝脏 GSH 含量的变化

从图 4 可以看出,随 Cd 暴露时间的延长,肝脏 GSH 含量逐渐升高。暴露 4d 后,肝脏 GSH 含量与对照组相比无显著性差异 ($P > 0.05$);暴露 10d 和 30d 后,肝脏 GSH 含量显著高于对照组 ($P < 0.05$);处理组内各暴露时间点比较差异均显著 ($P < 0.05$)。在本实验条件下,黑斑蛙肝脏 GSH 含量与 Cd 暴露呈明显的时间-效应关系 ($r = 0.963$, $P < 0.05$)。

2.6 肝脏 MT、GSH 含量与 Cd 含量之间的相关性分析

将肝脏中的 MT、GSH 和相应的 Cd 含量作相关性分析,二者均呈线性正相关,相关系数 r 分别为 0.990、0.963,均具有显著性意义 ($P < 0.05$)。

3 讨论

多种动物实验研究表明,许多重金属元素如锌、铜和镉等均能诱导 MT 的生物合成^[17-19]。Cd 在动物机体组织内,主要与富含半胱氨酸的胞浆蛋白结合,形成金属硫蛋白蓄积在机体组织内^[20]。金属硫蛋白含量的变化可以作为 Cd 的效应性标志物,反映其在组织器官的蓄积情况^[21]。目前研究认为,Cd 在动物体内的蓄积有较强的选择性,肝脏是主要的蓄积器官^[22]。本研究结果表明,在 $10.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cd 浓度暴露下,黑斑蛙肝脏中镉的含量、MT 含量均随着暴露时间的延长而升高,二者在同一时间点上的变化趋势基本一致。肝脏 MT 和 Cd 含量之间的相关分析表明,Cd 在肝脏中的含量与 MT 的含量呈明显正相关。由此可见,由于两栖动物皮肤的高渗透性,环境中的 Cd 可以通过皮肤的渗透作用进入机体,在肝脏等主要器官中积累,并能诱导肝脏

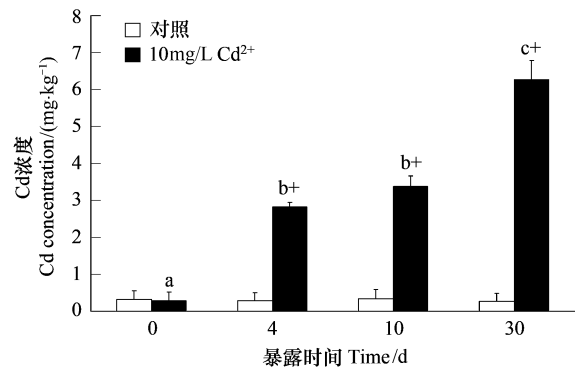


图 1 黑斑蛙肝脏中的 Cd 的含量

Fig. 1 Cd concentration in liver of *Rana nigromaculata*

+ 表示与对照组有显著性差异, $P < 0.05$; 不同字母表示不同暴露时间下处理组之间有显著性差异, $P < 0.05$; 下同

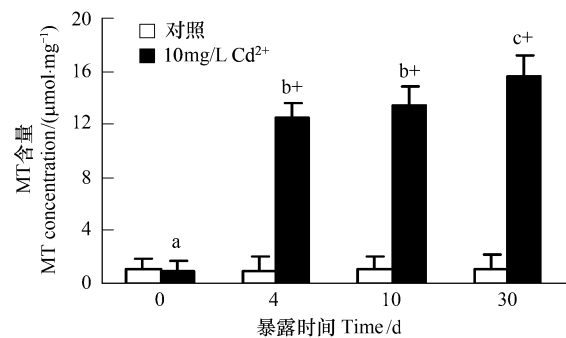


图 2 黑斑蛙肝脏中 MT 含量

Fig. 2 MT contents in liver of *Rana nigromaculata*

MT 的合成. MT 在一定程度上决定了 Cd 在肝脏中的积累, 是 Cd 在肝脏中大量蓄积的重要原因。

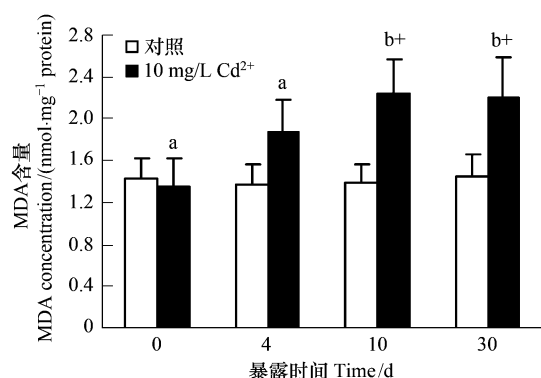


图3 黑斑蛙肝脏中的 MDA 含量

Fig. 3 MDA contents in liver of *Rana nigromaculata*

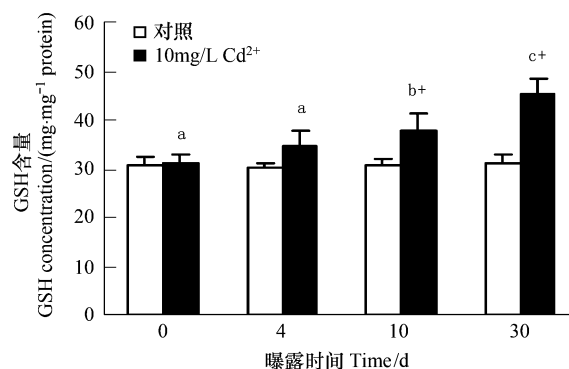


图4 黑斑蛙肝脏中 GSH 含量

Fig. 4 GSH contents in liver of *Rana nigromaculata*

已有大量研究表明,镉毒性与氧化损伤密切相关^[23-24]。MDA 是目前反映机体氧化损伤最具代表性的指标之一,其在机体中的含量水平反映了脂质过氧化程度,即机体细胞受自由基攻击的严重程度^[25]。本实验研究表明,在 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}$ 暴露下,黑斑蛙肝脏 MDA 含量在暴露的第 10 天显著升高,与对照组相比差异有显著性,说明在一定浓度、一定时间的暴露下, Cd 可引起黑斑蛙肝脏脂质过氧化水平的增高,产生氧化性损伤,其损伤机制可能与镉诱发组织细胞自由基的产生有关.但在 Cd 暴露的第 30 天,黑斑蛙肝脏 MDA 含量并未继续显著升高,与暴露 10d 时的含量基本接近,二者之间无显著性差异,而在同一时间点上,黑斑蛙肝内 MT、GSH 含量仍显著高于暴露 10d 时的含量。GSH 作为生物体内重要的抗氧化剂,既可由于污染的暴露而产生适应性诱导反应,也可由于污染的毒性作用而产生中毒反应^[26]。一般认为,GSH 含量的增加可能代表了机体对污染物暴露的适应性反应^[27],而 GSH 含量的降低则可能与细胞对污染物及其代谢物解毒能力的饱和作用有关,也可能是污染物暴露的毒性效应的反应^[28]。本实验中黑斑蛙肝脏 GSH 含量的升高可能象金属硫蛋白升高一样,是机体对镉暴露的一种适应性调节。MT 可以通过与 Cd 的结合对氧化损伤起保护作用^[29];升高的 GSH 作为活性氧自由基的清除剂,通过抗自由基作用,阻止镉引起脂质过氧化.提示肝脏中的 MT 和 GSH 可能以协同作用的方式共同发挥抗氧化功能,这可能是黑斑蛙在 $10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{Cd}$ 暴露下仍能较好存活的原因。

References:

- [1] Foote R H. Cadmium affects testes and semen of rabbits exposed before and after puberty. *Reproductive Toxicology*, 1999, 13:269-277.
- [2] Wang L, Shun H F, Li C Y. Effects of cadmium on sperma to genesis in freshwater Crab (sinopotamon yangtsekiense). *Acta Zoologica Sinica*, 2002, 48(5):677-684.
- [3] Flament S, Kuntz S, Chesnel A. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles walil*. *Aquatic Toxicology*, 2003, 64:143-153.
- [4] Baldisserotto B, Chowdhury M, Wood C M. Effects of dietary calcium and cadmium on cadmium accumulation, calcium and cadmium uptake from the water, and their interactions in juvenile rainbow trout. *Aquatic Toxicology*, 2005, 72:99-117.
- [5] Almeida J A, Diniz Y S, Marques S F. The use of the oxidative stress response as biomarkers in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) exposed to in vivo cadmium contamination. *Environment International*, 2002, 27(8):673-679.
- [6] Park J D, Liu Y, Klaassen C D. Protective effect of metallothionein against the toxicity of Cadmium and other metals. *Toxicology*, 2001, 163(2/3):93-100.
- [7] Blaustein A R, Wake D B. The puzzle of declining amphibian populations. *Scientific American*, 1995, 272:56-61.
- [8] Alford R A, Dixon P M, Pechmann J H. Ecology. Global amphibian population declines. *Nature*, 2001, 412(6848):499-500.
- [9] Kiesecker J M, Blaustein A R, Belden L K. Complex caused of amphibian population declines. *Nature*, 2001, 410(6829):681-684.
- [10] Hayes T B, Collins A, Lee M, Mendoza M, Noriega N, Stuart A A, Vonk A. Hermaphroditic, demasculinized frogs after exposure to the herbicide atrazine at low ecologically relevant doses. *Proceedings of the National Academy of Sciences(USA)*, 2002, 99(8):5476-5480.
- [11] Blaustein A R, Romansic J M, Kiesecker J M, Kiesecker J M and Hatch A C. Ultraviolet radiation, toxic chemical and amphibian population

- declines. Diversity and Distributions, 2003, 42(9):123-140.
- [12] Vogiatzis A K, Lombourdis N S. Cadmium accumulation in liver and kidneys and hepatic metallothionein and glutathione levels in *Rana ridibunda*, after exposure to CdCl₂. Environmental Contamination and Toxicology, 1998, 34:64-68.
- [13] Flament S, Kuntz S, Chesnel A. Effect of cadmium on gonadogenesis and metamorphosis in *Pleurodeles waltl* (urodele amphibian). Aquatic Toxicology, 2003, 64:143-153.
- [14] Carattino M D, Peralta S, Perez-Coll C, Naab F, Burlo A, Kreiner A J, Preller A F. Effects of long-term exposure to Cu²⁺ and Cd²⁺ on the pentose phosphate pathway dehydrogenase activities in the ovary of adult *Bufo arenarum*; possible role as biomarker for Cu²⁺ toxicity. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2004, 57:311-318.
- [15] Lombourdis NS, Iason Kostaropoulos, Basiliki Theodoropoulou, Dimitra Kalmanti. Heavy metal accumulation and metallothionein concentration in the frog *Rana ridibunda* after exposure to chromium or a mixture of chromium and cadmium. Environmental Pollution, 2007, 145:787-792.
- [16] Eaton D L, Cherian M G. Determination of Metallothionein in tissues by cadmium hemoglobin affinity assay. Methods in Enzymology, 1991, 205:83-88.
- [17] Hamer DH. Metallothionein. Annual Review of Biochemistry, 1986, 55:913-917.
- [18] Suzuki K T, Kawamura R. Metallothionein present or induced in the three species of frogs *Bombina orientalis*, *Bufo bufo japonicus* and *Hyla arborea japonica*. Comparative Biochemistry and Physiology, 1984, 79C:255-260.
- [19] Hylland K, Haux C, Hogstrand C, Sletten K, Andersen R A. Properties of cod metallothionein, its presence in different tissues and effects of Cd and Zn treatment. Fish Physiology Biochemistry, 1994, 13:81-91.
- [20] Lu J, Jin T, Nordberg G, Nordberg M. Metallothionein gene expression in peripheral lymphocytes from cadmium-exposed workers. Cell Stress Chaperones, 2001, 6:97-104.
- [21] Chang X L, Jin T G, Chen L, Lei L J, Zhou Y F. Application of metallothionein gene isoforms expression as biomarkers in cadmium exposure. Chinese Journal of Industrial Hygiene and Occupational Diseases, 2006, 4(1):12-15.
- [22] Bernard A, Lauwerys R. Handbook of experimental pharmacology. Berlin: Springer-Verlag, 1986:141-150.
- [23] Bagchi D, Bagchi M, Hassoun E A, Stohs S J. Cadmium induced excretion of urinary lipid peroxidation in Sprague-Dawley rats. Biological Trace Element Research, 1996, 52:143-154.
- [24] Karmaker R, Banik S, Bandyopadhyay S. Cadmium induced alteration of hepatic lipid peroxidation, glutathione S-transferase activity and reduced glutathione level and their possible correlation with chromosomal aberration in mice, a time course study. Mutation Research, 1998, 397:183-190.
- [25] Li H, Wang K Y, Shi X Q. Study on the protective effects of pre-supplement zinc on liver lipid peroxidation damage of rat induced by cadmium. Acta Academiae Zunyi, 2004, 27(4):322-323.
- [26] Di Giulio R T, Washburn P C, Wenning R J. Biochemical responses in aquatic animals; a review of determinants of oxidative stress. Environment Toxicology and Chemistry, 1989, 8:1103-1123.
- [27] Kosower N S. The glutathione status of cells. International Review Cytology, 1978, 54:109-159.
- [28] Ketterer B, Coles B, Meyer D J. The role of glutathione in detoxication. Environment Health Perspect, 1983, 49:59-69.
- [29] Tian X L, Guo J H. Study advances of metallothionein. Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy, 2005, 32(2):119-124.

参考文献:

- [2] 王兰, 孙海峰, 李春源. 镉对长江华溪蟹精子发生的影响. 动物学报, 2002, 48(5):677-684.
- [21] 常秀丽, 金泰广, 陈亮, 雷立健, 周袁芬. 金属硫蛋白基因亚型表达在镉接触中作为生物标志物的研究. 中华劳动卫生职业病杂志, 2006, 4(1):12-15.
- [25] 李红, 王克跃, 石修权. 锌对镉所致大鼠肝脏脂质过氧化损伤的保护作用研究. 遵义医学院学报, 2004, 27(4):322-323.
- [29] 田晓丽, 郭军华. 金属硫蛋白的研究进展. 国外医学药学分册, 2005, 32(2):119-124.