

贾秀英, 施蔡雷, 张杭君. 2011. 镉暴露致黑斑蛙精巢氧化损伤与 DNA 损伤[J]. 环境科学学报, 31(7): 1537-1541

Jia X Y, Shi C L, Zhang H J. 2011. DNA damage and oxidative damage in testes of *Rana nigromaculata* exposed to cadmium [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 31(7): 1537-1541

镉暴露致黑斑蛙精巢氧化损伤与 DNA 损伤

贾秀英* 施蔡雷 张杭君

杭州师范大学生命与环境科学学院 杭州 310036

收稿日期: 2010-10-05 修回日期: 2010-11-18 录用日期: 2010-11-30

摘要: 在实验条件下, 将健康性成熟黑斑蛙(*Rana nigromaculata*) 暴露于 0.005、0.01、0.05、0.1、0.5 和 1.0 mg·L⁻¹ 浓度的镉溶液中 30 d, 采用彗星实验检测其精巢细胞 DNA 损伤, 并测定精巢组织中活性氧自由基(ROS) 的水平 and 脂质过氧化主要终产物丙二醛(MDA) 含量, 探讨镉暴露对黑斑蛙精巢组织的遗传损伤和氧化损伤作用. 结果表明, 随镉暴露浓度的增加, 黑斑蛙精巢组织中的 ROS 水平明显升高, 0.5、1.0 mg·L⁻¹ 镉染毒组与对照组比较有显著性差异; 精巢 MDA 含量以及精巢细胞尾长和尾相显著增加, 0.05、0.1、0.5、1.0 mg·L⁻¹ 镉染毒组与对照组比较均有显著性差异; ROS 水平、MDA 含量以及精巢细胞尾长和尾相与镉暴露浓度之间均呈浓度-效应关系. 结果启示, 诱导产生自由基并导致脂质过氧化损伤作用增强及 DNA 损伤是镉引起两栖动物雄性生殖毒性的主要机制之一.

关键词: 镉; 活性氧自由基; 丙二醛; DNA 损伤; 黑斑蛙

文章编号: 0253-2468(2011)07-1537-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

DNA damage and oxidative damage in testes of *Rana nigromaculata* exposed to cadmium

JIA Xiuying*, SHI Cailei, ZHANG Hangjun

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

Received 5 October 2010; received in revised form 18 November 2010; accepted 30 November 2010

Abstract: To explore the genetic damage and induced by cadmium exposure in testes of *Rana nigromaculata*, the healthy adult frogs were exposed to 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mg·L⁻¹ of cadmium solution for 30 days. The DNA damage *Rana nigromaculata* in the testes was examined using comet assay, and the ROS level and MDA content in the testes were measured. The results showed that the ROS level in testes increased with the increase of cadmium concentration and there were significant differences in the 0.5, 1.0 mg·L⁻¹ cadmium-treated groups compared with control group. The MDA content, the tail length and tail moment at the dosages of 0.05, 0.1, 0.5 and 1.0 mg·L⁻¹ all significantly increased compared with that of the control, and all displayed an obvious concentration-effect relationship. These results show that the primary mechanism of reproductive toxicity on male frogs by cadmium may be that cadmium can induce free radical generation, followed by lipid peroxidation and DNA damage.

Keywords: cadmium; ROS; malondialdehyde; oxidative damage; DNA damage

1 引言(Introduction)

两栖类动物是生态群落的重要组成部分. 据报道, 两栖动物种群数量在急剧下降, 环境化学污染是其重要的影响因素之一(Alford *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2002; Kiesecker *et al.*, 2001). 重金属镉是典型的工业毒物 and 环境污染物, 对机体具有多器官和组织毒性, 精巢是镉作用的重要靶器官, 对生殖功能具有较大的影响(Stessen *et al.*, 1999;

Byrne *et al.*, 2009; Iavicili *et al.*, 2009). 已有研究表明, 镉能促进活性氧自由基(Reactive oxygen species, ROS) 的产生, 使机体处于氧化应激状态(Lee *et al.*, 2006). 脂质过氧化是细胞氧化损伤的一种特殊形式, 也是许多毒物对机体组织细胞产生作用的起点(Liu *et al.*, 2009). 脂质过氧化过程可产生多种自由基和小分子产物, 如丙二醛(malondialdehyde, MDA), 引起各种碱基损伤和 DNA 链断裂(Nzengue *et al.*, 2008). 目前国内外交

基金项目: 浙江省新苗人才计划项目(No. 2008R40G2150056)

Supported by the Xinmiao Talent Project of Zhejiang Province (No. 2008R40G2150056)

作者简介: 贾秀英(1966—), 女, 教授; * 通讯作者(责任作者), E-mail: XY_Jia@163.com

Biography: JIA Xiuying (1966—), female, professor; * Corresponding author, E-mail: XY_Jia@163.com

于镉对两栖动物的脂质过氧化损伤已开展了不少研究(Wang *et al.*, 2006; Jia *et al.*, 2010),但主要集中在肝脏、肾脏,有关镉对两栖动物精巢的影响研究报道并不多,尤其是镉诱发DNA损伤的确切机制有待于深入探讨.本实验以黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)为供试动物,应用慧星实验(comet assay)检测整体染毒黑斑蛙的精巢细胞DNA损伤,同时测定精巢组织中ROS水平和MDA含量,研究镉暴露对黑斑蛙精巢的遗传毒性与氧化损伤作用及两者之间的关系,为当前探寻两栖类动物种群数量下降的原因提供相应的毒理学资料,也为进一步探讨镉对两栖动物的生殖毒性作用机制提供重要信息.

2 材料和方法(Materials and methods)

2.1 供试动物

健康成年雄性黑斑蛙捕自杭州市郊,平均体长为 (5.85 ± 0.32) cm,平均体重为 (20.05 ± 3.78) 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.

2.2 实验试剂

Cd采用 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ (上海金山亭新试剂厂,分析纯),用双蒸馏水配制成 $1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 母液,实验时稀释成所需各浓度.

2.3 实验方法

2.3.1 实验处理 实验用黑斑蛙随机分成7组,每组20只.根据96 h急性毒性实验,参考镉的国家标准污水综合排放标准(GB3838—1988),将染毒组黑斑蛙分别暴露于3 cm水深浓度为0.005、0.01、0.05、0.1、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ (以镉计, $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 配制)的Cd溶液中,对照组黑斑蛙暴露于3 cm深的清洁水溶液中.实验容器为室内玻璃水族箱(60 cm \times 40 cm \times 35 cm),实验用水为曝气过的自来水(实验时水温18~22 $^{\circ}\text{C}$,pH值为6.5~7.0,溶氧为6~8 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$),暴露实验持续30d.实验采用静态置换法,每天更换试验溶液,每天投喂蚯蚓(*Eisensia foetida*)2次.驯养期间及实验过程中黑斑蛙基本没有出现死亡情况.染毒结束后,用双毁髓法处死取精巢组织待测.

2.3.2 样品处理 取一侧精巢,清洗,吸干,称重.按质量体积比($\text{g} : \text{mL}$) = 1:19加入预冷的0.65%

生理盐水,冰浴匀浆,1000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$ 离心5 min,将上清液分装-20 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于精巢组织ROS、MDA含量的测定.

取另一侧精巢,预冷的PBS漂洗,滤纸吸干,称重,放入盛有1 mL的50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH 7.4磷酸缓冲液(PBS)的离心管中,用眼科剪剪碎,静置.用PBS调细胞至 $(4 \sim 6) \times 10^6 \cdot \text{mL}^{-1}$,得单细胞凝胶电泳细胞悬浮液.

2.4 测定指标及方法

2.4.1 ROS水平测定 ROS水平测定参照Curtin等(2002)的方法稍加改进,单位以荧光强度(FI)值 $\cdot \text{mg}^{-1}$ (以蛋白计)表示.

2.4.2 MDA检测 丙二醛(MDA)测定采用硫代巴比妥酸(TBA)法,测试步骤按试剂盒(购自南京建成生物工程研究所)说明进行.蛋白质含量的测定参考考马斯亮蓝试剂盒.

2.4.3 DNA损伤测定 DNA损伤测定参照Singh等(1998)的方法并加以改进.制备1.0%正常熔点琼脂糖(NMA)(PBS配制)和1.0%低熔点琼脂糖(LMA)(用细胞缓冲液配制),取细胞悬浮液与1.0%低熔点琼脂糖混匀后加到预处理过的毛玻璃载玻片上,经细胞裂解和DNA解旋后,于4 $^{\circ}\text{C}$ 、电压22 V、电流220 mA条件下,电泳30 min,经过中和、EB染色,低温避光并在2 d内于荧光显微镜下观察、测定.每片随机观察100个细胞核,每个浓度组制片5~7张.用Image-Pro Plus慧星分析软件分析,单位以尾长(tail length, TL)(μm)和尾相(tail moment, TM)表示.

2.5 数据处理

实验所得数据采用SPSS 11.5统计软件包中的 t 检验,分析各处理组与对照组之间的差异性, $p < 0.05$ 为有显著差异.所有的结果均以平均值 \pm 标准误差来表示.

3 结果(Results)

3.1 精巢组织ROS水平与染镉浓度的关系

图1为不同浓度镉暴露30d后黑斑蛙精巢组织ROS水平的变化情况.由图1可知,黑斑蛙精巢组织ROS水平随镉暴露浓度的增加而升高,且有显著的剂量-效应关系($n = 10$, $r = 0.683$, $p < 0.01$).与对照组比较,0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉染毒组的ROS水平升高,有显著性差异($p < 0.05$).

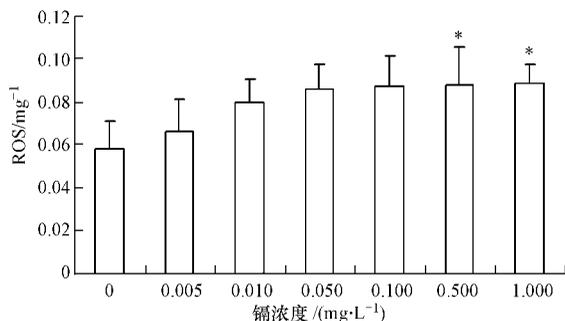


图1 黑斑蛙精巢组织 ROS 水平随镉暴露浓度的变化 ($n = 10$, 与对照组比较, * $p < 0.05$)

Fig. 1 The level of ROS in the tissues of *Rana nigromaculata* testes exposed to Cd ($n = 10$; * Compared with the control, $p < 0.05$)

3.2 精巢组织中 MDA 含量与染镉浓度的关系

图2为不同浓度镉暴露30d后黑斑蛙精巢组织MDA含量的变化情况。由图可知,黑斑蛙精巢中MDA含量随着Cd暴露浓度的升高而逐渐增加,且呈现明显的剂量-效应关系($n = 10$, $r = 0.717$, $p < 0.01$)。除0.005、0.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉染毒组外,其它各染毒组与对照组比较MDA含量均有显著性差异($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。

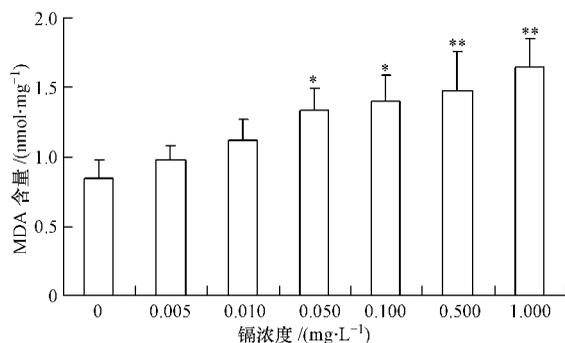


图2 黑斑蛙精巢组织 MDA 含量随镉暴露浓度的变化 ($n = 10$, 与对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 2 The content of MDA in the tissues of *Rana nigromaculata* testes exposed to Cd ($n = 10$; Compared with the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

3.3 精巢细胞 DNA 损伤与染镉浓度的关系

图3为不同浓度镉暴露30d后黑斑蛙精巢组织DNA的损伤情况。由图3可知,随着镉暴露浓度的增加,黑斑蛙精巢细胞尾长和尾相呈上升趋势,且与染毒浓度均存在显著的浓度-效应关系($n = 10$, $r_{\text{TL}} = 0.931$, $r_{\text{TM}} = 0.911$, $p < 0.01$)。0.05、0.1、0.5、1.0 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉染毒组与对照组比较,尾长、尾相均有

显著性差异($p < 0.05$ 或 $p < 0.01$)。

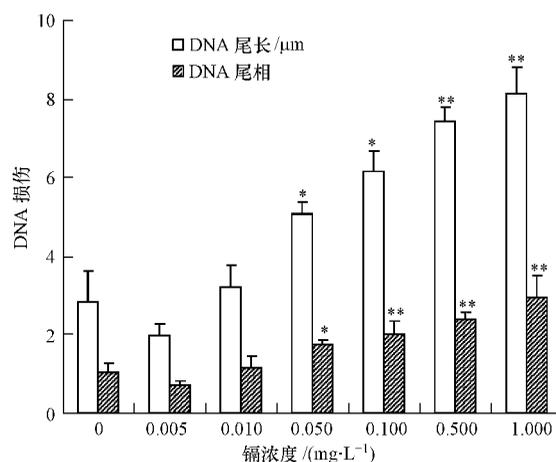


图3 黑斑蛙精巢细胞尾长和尾相随镉暴露浓度的变化 ($n = 10$, 与对照组比较, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

Fig. 3 The tail length and tail moment of testes of *Rana nigromaculata* exposed to Cd ($n = 10$; Compared with the control, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$)

3.4 ROS、MDA 和 DNA 损伤之间的回归统计分析

将黑斑蛙精巢组织 ROS 水平、MDA 含量、DNA 损伤(尾长、尾相)之间作回归分析,尾长(TL)和尾相(TM)均随着 ROS 水平、MDA 含量的升高而增加,且均呈二次曲线关系,经检验具有显著关系(表1)。MDA 含量也随 ROS 水平的升高而增加,二者之间呈二次曲线关系,经检验具有显著关系, R^2 为 0.9290 (表1)。

表1 ROS、MDA 和 DNA 损伤之间的关系

Table 1 Correlations among the ROS, MDA and DNA damage in testes of *Rana nigromaculata* exposed to Cd

指标 X	指标 Y	回归方程	R^2	p
ROS	MDA	$Y = 920.12x^2 - 114.46x + 4.4303$	0.9290	$p < 0.01$
ROS	TL	$Y = 15321x^2 - 2109.5x + 74.005$	0.9416	$p < 0.01$
ROS	TM	$Y = 5179.5x^2 - 714.83x + 25.187$	0.9034	$p < 0.01$
MDA	TL	$Y = 6.5022x^2 - 8.0439x + 4.3788$	0.9422	$p < 0.01$
MDA	TM	$Y = 3.1918x^2 - 5.1766x + 2.964$	0.9717	$p < 0.01$

4 讨论 (Discussion)

正常情况下,机体自由基的产生和清除处于动态平衡状态。过量的自由基特别是 ROS,可以攻击包括 DNA 在内的几乎所有的生物分子,导致多种疾病的发生、发展以及生命体的衰老 (Finkel *et al.*, 2000)。精巢作为镉毒作用的主要靶器官,本实验结果显示,在低剂量镉的长期暴露下,黑斑蛙精巢中的 ROS 水平呈现明显的上升趋势,表明低剂量镉

的长期作用,可引起机体活性氧自由基的蓄积.大量产生氧自由基在镉毒性机制中发挥着重要作用,并可能是镉致毒的主要机制,最终导致对机体广泛的损害作用.造成氧自由基蓄积的原因,一种可能是镉负荷诱导氧化应激,促使机体自由基大量产生,同时自由基清除酶系统活力应激性升高,但仍不足以清除过量的自由基,致使自由基的产生和清除处在一个较高的失衡状态,自由基含量也维持在一个较高的水平;另一种可能是镉通过拮抗其它金属离子,如超氧化物歧化酶(SOD)中的铜和锌、过氧化氢酶(CAT)中的血红素铁等,从而抑制机体的抗氧化酶系统,使机体抗氧化能力显著下降,导致自由基的大量堆积.具体机理尚有待于进一步实验研究.

在过量自由基引发的机体损伤中,脂质过氧化反应产生的多种代谢物可引起多种细胞功能的损伤,并且和多种疾病的发生发展有密切关系.MDA是自由基攻击生物膜而发生脂质过氧化反应的产物,是反映机体氧化损伤的最具代表性的指标之一(Pang *et al.*, 2005).已有研究表明,镉可引起机体肝、肾等组织MDA含量的升高,导致机体的氧化损伤(Chater *et al.*, 2008; Jia *et al.*, 2010).本实验结果表明,随着镉暴露浓度的增加,黑斑蛙精巢组织MDA含量逐渐升高,且呈现明显的浓度-效应关系,证实了镉暴露下可引起黑斑蛙精巢的脂质过氧化水平增高,产生氧化性损伤.进一步分析精巢组织MDA含量与ROS水平的关系发现,MDA含量与ROS水平呈二次曲线关系($R^2 = 0.9290$),说明其损伤机制与镉诱发组织细胞自由基的产生有着密切的关系.

大量研究表明ROS与细胞凋亡密切相关,而且诱发DNA损伤是ROS引起细胞凋亡最主要的因素之一.ROS及其介导的脂质过氧化过程中产生的脂质自由基、丙二醛等可以直接攻击DNA,引起严重的DNA损伤(Pan *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2006).重金属镉能够造成机体内多种细胞的DNA损伤,进而发挥毒性作用.刘伟成等(2006)研究发现镉胁迫能诱导肝脏一种自由基催化酶黄嘌呤氧化酶活性升高,催化产生自由基,从而造成DNA损伤.金春华等(2010)报道,镉胁迫可以引起大弹涂鱼基因组DNA的断裂,引起外周血细胞的遗传损伤.本研究慧星实验的结果也发现,随着镉暴露浓度的增加,黑斑蛙精巢细胞尾长和尾相均明显增加,从

$0.05 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉染毒组开始,尾长和尾相的升高与对照组比较均有显著性差异.表明镉暴露对精巢细胞的DNA造成了损伤.从本研究结果可以看出,ROS水平、MDA含量和精巢细胞的尾长、尾相的变化趋势总体上保持一致,即都表现为随镉暴露浓度的增加而升高.指标之间的回归分析结果进一步表明,精巢细胞尾长和尾相与ROS水平、MDA含量均呈现明显的相关性(表1).由此推断,镉导致精巢组织的氧化损伤是其导致细胞核DNA损伤最可能的原因,而镉引起的精巢组织ROS增加可能是造成细胞DNA损伤最直接的原因,其确切机制还有待于作进一步探讨.

本研究结果启示,重金属镉可通过黑斑蛙皮肤的渗透作用,引起精巢组织中过量的自由基堆积,诱导精巢组织氧化应激和精巢细胞DNA损伤,从而影响生精过程和精子质量,对两栖动物的雄性生殖产生毒理学作用.

5 结论(Conclusions)

1) 在 $0.005 \sim 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 镉溶液中暴露30d,随镉暴露浓度的增加,黑斑蛙精巢组织ROS水平升高,并导致了MDA含量增加、精巢细胞DNA迁移距离增加,表明镉对两栖动物精巢组织有氧化损伤作用和DNA损伤作用.

2) 研究结果发现,精巢细胞尾长和尾相与ROS水平、MDA含量均呈现明显的相关性,说明镉导致精巢组织的氧化损伤是其导致细胞DNA损伤最可能的原因,而镉引起的精巢组织ROS水平的增加可能是造成细胞DNA损伤最直接的原因.

3) 比较各检测指标与镉暴露浓度之间的关系,发现精巢组织ROS水平、MDA含量以及精巢细胞尾长和尾相与镉暴露浓度均呈明显的浓度-效应关系,可作为镉毒害机体的生物标志物.

责任作者简介:贾秀英,教授,研究方向为生态毒理学. E-mail: xy_jia@163.com.

参考文献(References):

- Alford R A, Dixon P M, Pechmann J H. 2001. Global amphibian population declines [J]. *Nature*, 412(6848): 499-500
- Byrne C, Divekar S D, Storch G B, *et al.* 2009. Cadmium-a metallothionein [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 238(3): 266-271
- Curtin J F, Donovan M, Cotter T G. 2002. Regulation and measurement of oxidative stress in apoptosis [J]. *J Immunol Methods*, 265 (1/2): 49-72

- Chater S, Douki T, Garrel C, *et al.* 2008. Cadmium-induced oxidative stress and DNA damage in kidney of pregnant female rats [J]. *Cr Biol*, 33(1): 426-432
- Finkel T, Holbrook N J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 408(6809): 239-247
- Hayes T B, Haston K, Tsui M, *et al.* 2002. Herbicides: feminization of male frogs in the wild [J]. *Nature*, 419(6910): 895-896
- Iavicoli I, Fontana L, Bergamaschi A. 2009. The effects of metals as endocrine disruptors [J]. *J Toxicol Environ Health (B: Crit Rev)*, 12(3): 206-223
- 贾秀英, 施蔡雷. 2010. 镉致黑斑蛙肝脏中 ROS 生成及其蛋白质氧化损伤作用 [J]. *环境科学学报*, 30(1): 186-191
- Jia X Y, Shi C L. 2010. Reactive oxygen species generation and protein oxidative damage in liver of *Rana nigromaculata* by Cadmium [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 30(1): 186-191 (in Chinese)
- 金春华, 李明月, 刘伟成, 等. 2010. 镉胁迫对大弹涂鱼 (*Boleophthalmus Pectinirostris*) 血细胞遗传损伤的研究 [J]. *海洋与湖沼*, 41(1): 80-84
- Jin C H, Li M Y, Liu W C *et al.* 2010. Genotoxic damage in peripheral blood of *Boleophthalmus Pectinirostris* exposed to Cadmium [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 41(1): 80-84 (in Chinese)
- 贾秀英, 施蔡雷, 刘晓旭. 2010. 镉致黑斑蛙肝脏氧化损伤与金属硫蛋白含量的变化 [J]. *生态学报*, 30(2): 416-420
- Jia X Y, Shi C L, Liu X X. 2010. Effects of Cadmium on oxidative stress and metallothionein of liver in frog *Rana nigromaculata* [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 30(2): 416-420 (in Chinese)
- Kiesecker J M, Blaustein A R, Belden L K. 2001. Complex causes of amphibian population declines [J]. *Nature*, 410(6829): 681-684
- Liu J, Qu W, Kadiiska M B. 2009. Role of oxidative stress in cadmium toxicity and carcinogenesis [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 238: 209-214
- Lee D H, Lim J S, Song K *et al.* 2006. Graded associations of blood lead and urinary cadmium concentrations with oxidative-stress-related markers in the U. S. population: results from the third National Health and Nutrition Examination Survey [J]. *Environmental Health Perspect*, 114(3): 350-354
- Li J J, Tang Q, Li Y, *et al.* 2006. Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 27(8): 1078-1084
- 刘伟成, 李明月, 黄福勇, 等. 2006. 镉胁迫对大弹涂鱼肝脏黄嘌呤氧化酶和抗氧化酶的影响 [J]. *应用生态学报*, 17(7): 1310-1314
- Liu W C, Li M Y, Huang F Y *et al.* 2006. Effects of cadmium stress on xanthine oxidase and antioxidant enzyme activities in *Boleophthalmus Pectinirostris* liver [J]. *Chinese J of Applied Ecology*, 17(7): 1310-1314 (in Chinese)
- Nzengue Y, Steiman R, Garrel C, *et al.* 2008. Oxidative stress and DNA damage induced by cadmium in the human keratinocyte HaCaT cell line: Role of glutathione in the resistance to cadmium [J]. *Toxicology*, 243: 193-206
- Pan J, She M, Xu Z X, *et al.* 2005. Farnesyl transferase inhibitors induce DNA damage via reactive oxygen species in human cancer cells [J]. *Cancer Res*, 65(9): 3671-3681
- SteffenBlottner, Kai Frölich, Hannelore Roelants, *et al.* 1999. Influence of environmental cadmium on testicular proliferation in roe deer [J]. *Reproductive Toxicology*, 13: 261-267
- Singh N P, McCoy M T, Tice R R, *et al.* 1998. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells [J]. *Exp Cell Res*, 175(1): 184-191
- 汪美贞, 贾秀英, 董爱华, 等. 2006. 镉长期暴露对黑斑蛙的氧化胁迫和抗氧化能力的影响 [J]. *生态学报*, 26(6): 1718-1724
- Wang M Z, Jia X Y, Dong A H, *et al.* 2006. Effects of cadmium on oxidative stress and antioxidative ability in Frog *Rana nigromaculata* under a long-term exposure [J]. *Acta Ecologica Sinica*, 26(6): 1718-1724 (in Chinese)