

doi: 10.7541/2013.51

重金属 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 单因子及联合毒性对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤效应

唐建勋¹ 唐奕扬² 孙红祥³ 李君荣¹ 吴瑗¹ 赵华¹

(1 金华职业技术学院农业与生物工程学院, 金华 321007; 2 浙江交通技师学院, 金华 321015;
3 浙江大学动物科学学院, 杭州 310029)

摘要: 采用室内暴露试验方法, 研究了不同浓度 Cu^{2+} (0.01、0.10、0.25 mg/L)、 Pb^{2+} (0.05、0.50、0.75 mg/L) 单因子染毒以及 $\text{Cu}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ (0.01 mg/L+0.05 mg/L、0.10 mg/L+0.50 mg/L、0.25 mg/L+0.75 mg/L) 联合染毒对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤效应, 并以 SCGE 技术进行检测。结果显示, Cu^{2+} 与 Pb^{2+} 单因子染毒对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤具有较为显著的剂量-效应与时间-效应关系($P<0.05$)。 $\text{Cu}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ 联合染毒, 在溶液暴露的 0—5d 表现为剂量-效应与时间-效应关系($P<0.05$); $\text{Cu}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ 暴露 5—10d 则表现出拮抗作用。研究结果显示, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 单因子及联合染毒均造成泥鳅卵细胞 DNA 损伤, 具有基因毒性效应。

关键词: 泥鳅; 卵细胞; Cu^{2+} ; Pb^{2+} ; SCGE 检测; DNA 损伤

中图分类号: Q255 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2013)03-0501-06

随着经济社会的迅速发展, 环境污染其中包括水环境重金属的污染问题日益凸显。 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 等重金属离子由于具有毒性强及生物放大(Biological amplification)作用等特点, 对各种水生动物的生长繁殖和种族延续构成了严重的威胁。与其他水环境重金属污染物类似, Cu^{2+} 与 Pb^{2+} 不仅可在水生动物的体内富集, 而且对生物有机体产生遗传毒性作用^[1-3]。因此, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 等作为水环境的一类主要污染物而对鱼类等水生动物产生的毒害, 也逐渐引起人们的关注。近些年来, 有关学者对鱼类等水生动物重金属胁迫进行了许多探索和研究, 但重金属对鱼类卵细胞 DNA 损伤的研究尚未见报道。为此, 本文以我国水环境分布广泛且对重金属污染耐受能力较强的泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)为对象^[4, 5], 通过 Cu^{2+} 与 Pb^{2+} 的单一染毒和联合毒性试验, 研究重金属 Cu^{2+} 与 Pb^{2+} 对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤效应, 以期为重金属的细胞毒理机制、水环境污染评价、水生动物种质资源的保护以及生物多样性的维系等提供相关参考。

1 材料与方法

1.1 试剂材料

硫酸铜($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 分析纯, 上海试剂总厂)、醋酸铅 $[(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Pb} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 分析纯, 上海试剂四厂]配制成质量浓度为 1000 mg/L 的母液, 然后根据需要稀释成相应浓度注入水族箱内。溴化乙锭(Sigma 公司), 正常熔点琼脂糖、低熔点琼脂糖(Biotech 公司), 其他药品均为国产分析纯试剂。试验动物为 2 龄泥鳅(♀), 购自金华市农产品市场(水库水源养殖); 泥鳅全长平均为(12.5±2.1) cm, 平均体重(32±0.39) g ($n=200$)。

1.2 仪器设备

水平电泳槽和 DYY-6B 型电泳仪(北京六一仪器厂)、荧光倒置显微镜(CKX-41 型, OLYMPUS, 日本)、RS-型增氧泵(中山日胜电器有限公司)、PHS-3C 型 pH 计、Triton X-100 (进口分装)、BCD-301WD 型电冰箱(青岛海尔集团)。

1.3 试验设计

试验容器为 40 cm×30 cm×45 cm 的玻璃水族箱,

收稿日期: 2013-02-25; 修订日期: 2013-03-26

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(LY12C03006)资助

通信作者: 唐建勋(1956—), 男, 副教授; 硕士; 研究方向为水生动物生态。E-mail: jhtjxun@163.com

箱内用水为曝气 2d 以上的自来水 20 L, 采用室内暴露方法; 实验期间水质参数为: 水温 8—12℃, pH 6.2—6.4, DO 5.5—6.3 mg/L, 平均硬度为 2.67 mmol/L, 平均碱度为 2.59 mmol/L。试验设置 1 个对照组、3 个不同浓度梯度 Cu 处理组、3 个不同浓度梯度 Pb 处理组和 3 个不同浓度梯度 Cu²⁺+Pb²⁺处理组。各处理组 Cu²⁺、Pb²⁺浓度分别按《渔业水质标准》(GB11607-89)的 1、10、25 倍设定。采用单一因子和联合毒性试验。试验前将泥鳅暂养 1 周, 挑选活动正常、无病无伤且规格相当的泥鳅随机分组, 每水族箱放养 12 尾, 各设 3 个平行样。在试验过程中不更换水族箱内的溶液, 不投饲料, 每天充气 4—6h, 以 10d 为一个周期。

1.4 分析测定

样品处置 试验开始时以及第 5、第 10 天, 从各水族箱分别捕出 3 尾泥鳅解剖, 取卵细胞约 200 粒置 5 mL 离心管并滴加羊血清 1 mL, 置于 4℃ 冰箱保存; 使用前以 2000 r/min 离心 10 min, 弃去上清液, 提取卵细胞。

SCGE 试验 凝胶电泳胶板的制作、泥鳅卵细胞的裂解以及电泳和中和等参照相关文献略作修改^[6, 7]。先在载玻片上蘸一薄层 0.6% 常熔点琼脂糖制成常熔点胶板, 再在此胶板上注入混有泥鳅卵细胞的 0.6% 低熔点琼脂糖, 置于冰箱(4℃)固化约 20min, 使之制成凝胶电泳的低熔点胶板。

将碱性裂解液(205 mol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂-EDTA, 10 mmol/L Tris, pH 10, 临用前添加 10% 的二甲基亚酚和 1% 的 Triton X-100) 预冷, 并将制成的低熔点载玻片胶板浸入其中, 于 4℃ 下裂解约 1.5h, 使泥鳅卵细胞得以充分裂解、DNA 松散。

取出胶板, 用蒸馏水洗涤载玻片胶板上过多的盐 2 次(5min/次), 再进行 3 次漂洗(预冷 PBS 缓冲液, 5min/次), 之后摆放于水平电泳槽内; 加入碱性电泳液(1 mmol/L Na₂-EDTA, 300 mmol/L NaOH, pH>13, 液面高于胶板 2 mm), 避光解旋泥鳅卵细胞 DNA 约 30min, 使之充分展开; 在 25 V(有效电泳长度 1 V/cm)、300 mA、室温下电泳 30min; 最后于 4℃ 电泳 20min。结束电泳后取出胶板, 即用中和缓冲液漂洗 3 次(5min/次)并让其自然干燥。

染色、镜检和图像分析 滴加 GV 染色剂 50—60 μL(20 μg/L)于胶板, 染色 4—5min 成像; 参考有关操作方法^[8, 9], 载玻片胶板经蒸馏水冲洗后

即进行荧光倒置显微镜检查; 按照泥鳅卵细胞 DNA 损伤后的彗尾长度和形状事先制作标准彗星图谱(图 1), 将图谱分为 0 级(无尾部, 仅见以圆形亮点)及 DNA 损伤由轻至重的 1—3 级。彗尾长度以 Comet A 1.0 测量, 同时计算彗星的荧光强度 AU(Arbitrary units)值。每个样品 AU 值的计算为: DNA 彗星尾部级别 0—3 级分别规定为 AU 单位 0、100、200、300。AU=∑各级 AU 单位×(各级卵细胞数/总卵细胞数)。

1.5 统计处理

重金属 Cu²⁺、Pb²⁺ 及 Cu²⁺+Pb²⁺不同浓度染毒对泥鳅卵细胞 DNA 损伤暴露试验的处理重复 3 次, 卵细胞彗星率、AU 值以及彗尾长度的统计分析分别采用方差分析和多重比较(其中彗星率先进行反正弦变换)。

2 结果

重金属离子不同浓度 Cu²⁺(0.01、0.10、0.25 mg/L)、Pb²⁺(0.05、0.50、0.75 mg/L)单因子染毒和混合重金属离子 Cu²⁺+Pb²⁺(0.01 mg/L +0.05 mg/L)、Cu²⁺+Pb²⁺(0.10 mg/L +0.50 mg/L)、Cu²⁺+Pb²⁺(0.25 mg/L +0.75 mg/L)联合染毒试验开始之前, 泥鳅卵细胞未见 DNA 彗星拖尾现象。单因子不同重金属浓度及不同浓度混合重金属染毒 5d、10d 时, 泥鳅卵细胞 DNA 均出现不同程度的损伤(图 1)。无论是单因子不同重金属浓度组还是不同混合重金属浓度组, 泥鳅卵细胞的 DNA 损伤均随着剂量的增加与时间的延续而有一定程度的加剧。

2.1 单一重金属离子对 DNA 的损伤

随着染毒时间的延续与重金属剂量的增加, Cu²⁺对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤加重。镜检发现许多细胞核出现彗星拖尾现象, 彗星率明显增加, AU 值逐渐上升, DNA 平均迁移长度提高(图 1), 并呈现较显著的剂量-效应和时间-效应($P<0.05$)。从 0—10d 的染毒情况看, Cu²⁺对于卵细胞 DNA 的损伤呈现线性关系, 表明在该时间段中泥鳅卵细胞对于 Cu²⁺具有较强的吸收能力; 而卵细胞对于 Pb²⁺的吸收, 则大致与 Cu²⁺的吸收相类似。这两种重金属离子分别于不同时间与不同剂量时, 均可造成卵细胞 DNA 不同程度的损伤, 但损伤多以 1 级、2 级为主, 3 级损伤极少(表 1、表 2)。

2.2 混合重金属离子对 DNA 的损伤

由表 3 可见, 随着染毒时间的延续与溶液浓度

图 1 标准彗星分级图谱及不同 Cu²⁺、Pb²⁺浓度处理组的 SCGE 图像

Fig. 1 Standard comet image of different grades and SCGE images of loach oocytes treated with different concentration of Cu²⁺ and Pb²⁺

图 a—d 分别为标准分级图谱的 0、1、2、3 级, 图 01、02 分别为 Cu²⁺+Pb²⁺(0.01 mg/L+0.05 mg/L)5d、10d; 图 03、04 分别为 Cu²⁺+Pb²⁺(0.10 mg/L+0.50 mg/L)5d、10d; 图 05、06 分别为 Cu²⁺+Pb²⁺(0.25 mg/L+0.75 mg/L)5d、10d; 图 07、08 分别为 Cu²⁺(0.01 mg/L)5d、10d; 图 09、10 分别为 Cu²⁺(0.10 mg/L)5d、10d; 图 11、12 分别为 Cu²⁺(0.25 mg/L)5d、10d; 图 13、14 分别为 Pb²⁺(0.05 mg/L)5d、10d; 图 15、16 分别为 Pb²⁺(0.50 mg/L)5d、10d; 图 17、18 分别为 Pb²⁺(0.75 mg/L)5d、10d

表 1 不同浓度 Cu²⁺单一因子对泥鳅卵细胞 DNA 损伤的评价Tab. 1 Evaluation on DNA damage to the oocytes in different Cu²⁺ concentration

Cu 浓度 Concentration of Cu (mg/L)	暴露时间 Exposure time (d)	彗尾分级及卵细胞数 Grade of comet tail and number of oocytes (N=200)				彗星率 Comet ratio (%)	彗尾荧光强度 Arbitrary units (AU)	DNA 平均迁移长度 DNA migration length in average, μm (N= 20)
		G0	G1	G2	G3			
0.01	0	199	1	0	0	0.5±0.05 ^d	0.5 ^a	2.11±1.93 ^a
	5	191	6	3	0	4.5±0.25 ^c	6.0 ^b	6.25±2.53 ^k
	10	171	17	12	0	14.5±1.05 ⁱ	20.5 ^j	11.23±3.17 ^y
0.05	0	198	2	0	0	1.0±0.25 ^f	2.0 ^a	3.32±1.66 ^a
	5	151	28	21	0	24.5±0.75 ^e	35.0 ^f	8.24±3.17 ^f
	10	119	59	19	3	40.5±1.25 ^a	53.0 ^e	11.77±4.99 ^y
0.25	0	198	2	0	0	0.5±0.05 ^d	0.5 ^a	1.87±3.99 ^a
	5	142	31	25	2	29.0±1.25 ^e	43.5 ^h	11.23±3.44 ^e
	10	98	69	29	4	51.0±1.55 ^c	69.5 ^m	18.46±4.17 ^d

注: 同一列中上标字母不同表示差异显著(P<0.05); 下同

Note: The different letters (upper labeled) in the same column showed the significant differences (P<0.05); the same bellow

的增加, Cu²⁺+Pb²⁺对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤加重, 多数卵细胞核发生彗星拖尾现象, AU 值不断上升, DNA 平均迁移长度提高(图 1)。在不同的 Cu²⁺+Pb²⁺浓度下, 0—5d 表现出较显著的剂量-效应和时间-效应关系(P<0.05)。但在 5—10d 时, 卵细胞核彗尾长

度基本相当, 表明 DNA 的损伤水平相对减弱, 这可能与 Cu²⁺+Pb²⁺联合染毒时, 经过一定时间后两种重金属发生拮抗作用有关。此外, 无论在单因子不同浓度组抑或是不同混合重金属浓度组, 泥鳅卵细胞中均未检出 DNA 3 级以上的损伤, 且 3 级损伤也相

表 2 不同浓度 Pb^{2+} 单一因子对泥鳅卵细胞 DNA 损伤的评价
Tab. 2 Evaluation on DNA damage to the oocytes in different Pb^{2+} concentration

Pb 浓度 Concentration of Pb (mg/L)	暴露时间 Exposure Time (d)	彗尾分级及卵细胞数 Grade of comet tail and number of oocytes (N=200)				彗星率 Comet ratio (%)	彗尾荧光强度 Arbitrary units (AU)	DNA 平均迁移长度 DNA migration length in average, μm (N= 20)
		G0	G1	G2	G3			
0.05	0	197	3	0	0	1.5±0.25 ^d	1.5 ^a	3.05±1.74 ^a
	5	192	6	2	0	4.0±0.05 ^e	5.0 ^b	5.19±2.81 ^k
	10	181	13	6	0	9.5±0.55 ⁱ	9.5 ^j	10.88±2.91 ^y
0.50	0	193	7	0	0	3.5±1.15 ^d	3.5 ^a	2.76±2.11 ^a
	5	159	33	8	0	20.5±0.85 ^e	24.5 ^f	9.23±4.10 ^f
	10	104	78	16	2	48.0±1.15 ^q	58.0 ^f	12.05±3.14 ^y
0.75	0	195	5	0	0	2.5±0.35 ^d	2.5 ^a	2.22±3.06 ^a
	5	141	27	31	1	29.5±0.75 ^p	59.5 ^h	12.78±2.97 ^e
	10	86	66	46	2	57.0±1.75 ^e	82.0 ^m	16.92±4.04 ^d

表 3 不同浓度 $Cu^{2+}+Pb^{2+}$ 联合染毒对泥鳅卵细胞 DNA 损伤的评价
Tab. 3 Evaluation on DNA damage to the oocytes in different $Cu^{2+} + Pb^{2+}$ concentration

Cu+Pb 浓度 Concentration of Cu+Pb (mg/L)	暴露时间 Exposure time (d)	彗尾分级及卵细胞数 Grade of comet tail and number of oocytes (N=200)				彗星率 Comet ratio (%)	彗尾荧光强度 Arbitrary units (AU)	DNA 平均迁移长度 DNA migration length in average, μm (N= 20)
		G0	G1	G2	G3			
0.01+0.05	0	198	2	0	0	1.5±0.25 ^d	1.5 ^a	3.05±1.74 ^a
	5	197	2	1	0	1.5±0.55 ^d	2.0 ^a	7.25±3.78 ^k
	10	193	5	2	0	3.5±1.05 ^c	4.5 ^b	7.34±6.96 ^y
0.10+0.50	0	193	7	0	0	3.5±0.15 ^d	3.5 ^a	2.76±2.11 ^a
	5	34	72	47	47	81.0±1.05 ^e	154.5 ^h	11.51±4.87 ^f
	10	38	69	39	54	84.5±0.55 ^e	163.0 ^h	11.38±5.13 ^y
0.25+0.75	0	195	5	0	0	2.5±1.00 ^d	2.5 ^a	2.22±3.06 ^a
	5	35	79	44	42	82.5±0.75 ^e	146.6 ^h	13.24±5.67 ^e
	10	29	68	57	46	85.5±1.75 ^e	160.0 ^h	13.33±3.85 ^e

对较少, 这可能是在长期的演化过程中, 鱼类性腺器官所形成的自身保护机制发挥了作用。

3 讨论

Cu^{2+} 与 Pb^{2+} 为水环境中常见的重金属污染物, 在环境中难以降解且能通过食物链传递蓄积。适量的 Cu^{2+} 为生物有机体所必需, 而 Pb^{2+} 则不然。水环境中 Cu^{2+} 与 Pb^{2+} 的浓度超出一定范围时, 会对鱼类等水生动物产生较强的毒性效应, 诸如可在受精卵中蓄积, 导致胚胎死亡或仔鱼畸形及引起其他危害^[10-14]。水环境中单因子重金属的污染较为少见, 多数情况下则以混合物形式出现, 这些重金属通过物理化学以及脱毒过程对鱼类等水生动物的呼吸、免疫、酶活性、DNA 损伤等产生毒害^[15-17]。

重金属作用于卵细胞 DNA 而产生的基因毒性, 将可能导致动物遗传方式的改变, 其后果的严重性

不言而喻。因此, 探索重金属对鱼类卵细胞 DNA 的损伤效应, 对于水生动物的基因毒性研究和水环境污染评价等领域具有重要的现实意义。鉴于 SCGE 技术具有应用范围广以及快速、简便、灵敏、重复性好等特点, 适用于各种动物不同类型的细胞实验^[18, 19], 本文采用重金属 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 单因子及混合染毒, 以 SCGE 技术检测泥鳅卵细胞 DNA 的损伤, 以期从基因毒性的角度, 比较不同浓度的单因子 Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 以及 $Cu^{2+}+Pb^{2+}$ 混合染毒对泥鳅卵细胞 DNA 的损伤。

本试验发现, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 单因子染毒对于泥鳅卵细胞 DNA 的损伤, 在 0—10d 内可见细胞核彗星拖尾、彗星率逐渐增加、AU 值随之上升、DNA 平均迁移长度提高, 且呈现出较显著的剂量-效应和时间-效应关系。 $Cu^{2+}+Pb^{2+}$ 混合染毒时, 在 0—5d 内亦可见细胞核彗星拖尾、彗星率逐渐增加、AU 值随之上升、DNA 平均迁移长度提高, 且呈现剂量-效应和时

间-效应关系;但在 5—10d 时,泥鳅卵细胞 DNA 的损伤程度则相对增长缓慢,未见明显的时间-效应关系,类似于以往的学者以重金属 Cd^{2+} 对鲫鱼淋巴细胞 DNA 以及缢蛏脏细胞 DNA 损伤的研究^[20, 21]。这可能与动物体自身 DNA 的损伤修复,或者多种重金属离子在卵细胞同时存在而发生的拮抗作用等有关。以往的研究也曾发现,各种重金属离子之间有着诸如协同、拮抗、加和等相互作用的现象,它可影响到重金属离子在动物体内的吸收、积累和毒性作用^[22]。

试验结果表明, Cu^{2+} 、 Pb^{2+} 单因子染毒以及 $\text{Cu}^{2+}+\text{Pb}^{2+}$ 混合染毒,对于泥鳅卵细胞 DNA 均有着损伤效应和遗传毒性。以 SCGE 技术可作为检测水生动物性腺受水环境重金属毒害的理想方法之一,鉴于迄今为止水生动物性腺重金属离子基因毒性的研究尚十分少见,其检测 DNA 损伤的结果可作为较为合适的水环境基因毒剂指标。此外,研究重金属的单一染毒尤其是重金属混合染毒中的相互作用,在环境评价上具有较为重大的意义。然而,由于天然水环境中重金属离子存在形式的复杂性(如游离水合离子、配合离子、无机离子对和配合物、螯合物以及化合物等)、水环境理化因子的影响以及其他环境因素的参与等^[23, 24],都会对动物体的重金属蓄积和 DNA 的损伤带来不同的效应。因此,许多问题还有待于今后的继续探索与研究。

参考文献:

- [1] Li L, Shen X Q, Wang Y L, *et al.* Kinetic study on the bio-concentration of Cu and Pb in two kinds of marine bivalve molluscs under the condition of sediment exposure [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2012, **36**(3): 522—531 [李磊, 沈新强, 王云龙, 等. 在沉积物暴露条件下 2 种海洋贝类对 Cu、Pb 的富集动力学研究. 水生生物学报, 2012, **36**(3): 522—531]
- [2] Zhang Y M, Wang Y J, Yu R L, *et al.* Effects of heavy metals Cd^{2+} , Pb^{2+} and Zn^{2+} on DNA damage of loach *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2006, **30**(4): 399—403 [张迎梅, 王叶菁, 虞闰六, 等. 重金属 Cd^{2+} 、 Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对泥鳅 DNA 损伤的研究. 水生生物学报, 2006, **30**(4): 399—403]
- [3] Has Schon E, Bougut I. Heavy metal concentration in fish tissues inhabiting waters of Busko Blato reservoir (Bosnia and Herzegovina) [J]. *Environment Monitoring Assessment*, 2007, **9**(11): 1125—1130
- [4] Gao X L, Qi F S, Luo H Y, *et al.* Acute and joint toxicity tests of Cu, Hg and Cr to loaches [J]. *Reservoir Fisheries*, 2003, **23**(2): 63—64 [高晓莉, 齐凤生, 罗胡英, 等. 铜、汞、铬对泥鳅的急性毒性和联合毒性实验. 水利渔业, 2003, **23**(2): 63—64]
- [5] Wang Y Q, Zhang Y M, Zhao D Q. Effects of heavy metals cadmium, lead and zinc on the survival of *Carassius auratus* and *Misgurnus anguillicaudatus* [J]. *Journal of Gansu Sciences*, 2003, **15**(1): 35—38 [王银秋, 张迎梅, 赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性. 甘肃科学学报, 2003, **15**(1): 35—38]
- [6] Fan L J, Zhou Z L, Chen D H, *et al.* Study on DNA damage induced by HgCl_2 and CdCl_2 using SCGE in *Eriocheir sinensis* sperms (in vitro) [J]. *Journal of East China Normal University (Natural Science)*, 2007, **4**: 95—100 [范丽君, 周忠良, 陈东华, 等. HgCl_2 与 CdCl_2 对河蟹精子 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳检测研究. 华东师范大学学报(自然科学版), 2007, **4**: 95—100]
- [7] Xu X C, Ding F H, Li J. Cryopreservation caused sperm DNA damage in red sea bream *Pagrosomus major* and its detection [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2005, **36**(3): 221—225 [徐西长, 丁福红, 李军. 单细胞凝胶电泳用于检测低温保存的真鲷(*Pagrosomus major*)精子 DNA 损伤. 海洋与湖沼, 2005, **36**(3): 221—225]
- [8] Dang B J, Wang J, Du Q Y, *et al.* The DNA damage effect of paraquat on blood red cell of *Paramisgurnus dabryanus* [J]. *Journal of Hydroecology*, 2011, **32**(5): 105—108 [党炳俊, 王君, 杜启艳, 等. 单细胞凝胶电泳检测百草枯对大鳞副泥鳅血细胞 DNA 的损伤. 水生态杂志, 2011, **32**(5): 105—108]
- [9] Chen X, Hiroshi Nishida, Tetsuya Konishi. Oxidant-induced DNA damage and the reparation in NIH_3T_3 mouse fibroblasts by single cell gel electrophoresis [J]. *Journal of Xi'an Jiaotong University (Medical Sciences)*, 2007, **28**(1): 25—27 [陈忻, 西田浩志, 小西徹也. 单细胞凝胶电泳技术检测小鼠成纤维细胞 DNA 的氧化损伤及修复. 西安交通大学学报(医学版), 2007, **28**(1): 25—27]
- [10] Jezierska B, Lugowska K, Witeska M. The effects of heavy metals on embryonic development of fish (a review) [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2009, **35**(4): 625—640
- [11] Abou El-Naga, E H, El-Mosehy K M, Hanmed M A. Toxicity of cadmium and copper and their effect on some biochemical parameters of marine fish *mugil seheli*. Egyptian [J]. *Journal of Aquatic Resources*, 2005, **31**(2): 60—71
- [12] Hproratsu MURANO, Kanae MATSUZAKI, Hiroaki SHIRAFIHI, *et al.* Effects of heavy metals in river waters in Japan on immobility and mortality of *Daphnia magna* and *Oryzias latipes* larva [J]. *Fisheries Science*, 2007, **73**: 1078—1086
- [13] Tang J X, Xing C H, Liu Z L, *et al.* Accumulation of heavy metals (Cu and Pb) in the ovary of *Misgurnus anguillicaudatus* and the subsequent effects on ova development [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2010, **41**(3): 386—390 [唐建勋, 邢承华, 刘忠良, 等. 重金属 Cu、Pb 在泥鳅卵巢

- 的蓄积特性及其对卵细胞发育的影响. 海洋与湖沼, 2010, 41(3): 386—390]
- [14] Sun D W, Zhan Y, Xu Z R. The harmful effects of heavy metals to fishes [J]. *Journal of Aquaculture*, 2002, 15: 38—42 [孙德文, 詹勇, 许梓荣. 重金属对鱼类的危害作用. 水产养殖, 2002, 15: 38—42]
- [15] Zhou X W, Zhu G N, Sun J H, *et al.* Toxicity of copper, zinc, lead and cadmium to tissue's cellular DNA of the fish (*Carassius auratus*) [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2001, 15(3): 167—173 [周新文, 朱国念, 孙锦荷, 等. Cu、Zn、Pb、Cd 对鲫鱼(*Carassius auratus*)组织 DNA 毒性的研究. 核农学报, 2001, 15(3): 167—173]
- [16] Ge Z Q, Qin W, Zhu Y F. The influence of embryonic development and fry survival to big whitebait by heavy metal ions Pb^{2+} , Cu^{2+} and Cd^{2+} [J]. *Inland Fisheries*, 2004, 11: 35—36 [戈志强, 秦伟, 朱玉芳. 重金属离子 Pb^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 对大银鱼胚胎发育和仔鱼存活的影响. 内陆水产, 2004, 11: 35—36]
- [17] Al-Weher S M. Levels of heavy metal Cd, Cu and Zn in three fish species collected from the North Jordan Valley, Jordan [J]. *Jordan Journal of Biological Sciences*, 2008, 1(1): 41—46
- [18] Zhang C H, Lin Q D. The latest progress in single cell gel electrophoresis (SCGE) based on DNA damage detection [J]. *Journal of Nuclear Agricultural Sciences*, 2011, 2(6): 1230—1234 [张春红, 林欣大. 单细胞凝胶电泳检测 DNA 损伤的最新进展. 核农学报, 2011, 2(6): 1230—1234]
- [19] Ge Y M, Ning H M, Li J X. Application of single cell gel electrophoresis in clinical veterinary medicine [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(12): 77—80 [葛亚明, 宁红梅, 李敬玺, 等. 单细胞凝胶电泳技术在临床兽医学中的应用. 动物医学进展, 2007, 28(12): 77—80]
- [20] Hu X P, Zhou J H, Shi X J. Detection of DNA damage in *Carassius auratus* lymphocytes induced by cadmium with single cell gel electrophoresis assay [J]. *Journal of Agro-environmental Science*, 2005, 24(1): 43—45 [胡晓磐, 周建华, 时夕金. 利用单细胞凝胶电泳技术研究镉对鲫鱼淋巴细胞 DNA 的损伤. 农业环境科学学报, 2005, 24(1): 43—45]
- [21] Lu H X, Xu Y J. Effects of cadmium on antioxidant enzyme activity and DNA damage in *Sinonovacula constricta* [J]. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(1): 96—101 [陆慧贤, 徐永健. 镉胁迫下缙蛭(*Sinonovacula constricta*)抗氧化酶活性及 DNA 损伤的研究. 海洋环境科学, 2011, 30(1): 96—101]
- [22] Ma G Y, Sun K J, Wang J P, *et al.* Effects of the interaction of heavy metals on the accumulation of lead and copper in *Carassius auratus* [J]. *Chinese Journal of Spectroscopy Laboratory*, 2005, 22(5): 983—986 [马桂云, 孙开进, 王京平, 等. 混合重金属离子相互作用对 Cu 和 Pb 在鲫鱼体内积累的影响. 光谱实验室, 2005, 22(5): 983—986]
- [23] Ding W Q, Liu D Q, Ge F, *et al.* The molecular mechanism by heavy metal stress in fish [J]. *Journal of Biology*, 2012, 29(2): 84—87 [丁为群, 刘迪秋, 葛锋, 等. 鱼类对重金属胁迫的分子反应机理. 生物学杂志, 2012, 29(2): 84—87]
- [24] Lei Y Z. *Water Environmental Chemistry of Aquaculture* [M]. Beijing: China Agriculture Press. 2004, 251—260 [雷衍之. 养殖水环境化学. 北京: 中国农业出版社. 2004, 251—260]

EFFECTS OF Cu^{2+} AND Pb^{2+} (SINGLE FACTOR AND JOINT TOXICITY) ON DNA DAMAGE IN *MISGURNUS ANGUILLICAUDATUS* OOCYTES

TANG Jian-Xun¹, TANG Yi-Yang², SUN Hong-Xiang³, LI Jun-Rong¹, WU Yuan¹ and ZHAO Hua¹

(1. Department of Agricultural and Bio-engineering, Jinhua Polytechnic, Jinhua 321007, China; 2. Traffic Technician College of Zhejiang, Jinhua 321015, China; 3. College of Animal Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: The effects of Cu^{2+} and Pb^{2+} (single factor and joint toxicity) attack on DNA damages in loach oocytes with different concentration of Cu^{2+} (0.01, 0.10 and 0.25 mg/L respectively) and Pb^{2+} (0.05, 0.50 and 0.75 mg/L respectively), and $Cu^{2+}+Pb^{2+}$ (0.01 mg/L+0.05 mg/L, 0.10 mg/L+0.50 mg/L and 0.25 mg/L+0.75 mg/L respectively) were studied by means of in door exposure and with the technique of SCGE. The results showed that the DNA damages in loach oocytes by single factor Cu^{2+} or Pb^{2+} showed significant differences with dose-effect and time-effect ($P<0.05$). As for joint attack of $Cu^{2+}+Pb^{2+}$, it showed that there were significant differences with dose-effect and time-effect under 5d exposure ($P<0.05$), but it seemed to be an antagonism within 5d to 10d exposure. The results of the study showed that both single factor or joint attack by heavy metals will cause DNA damages to loach oocytes. Meanwhile, the genetic toxicity effects appears.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; Oocyte; Cu^{2+} ; Pb^{2+} ; SCGE detection; DNA damage