

DOI:10.16378/j.cnki.1003-1111.2019.02.011

铜和镉对草鱼肾脏中 3 种白细胞介素基因表达的影响

江红霞, 凌洁彬, 叶凯甲, 李学军

(河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007)

摘 要: 为探讨水体铜(Cu)和镉(Cd)污染对草鱼免疫系统的影响, 本研究利用实时荧光定量 PCR (QRT-PCR) 技术, 分析在不同时间(2、4、6、8 d)及不同质量浓度的 Cu^{2+} (0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 mg/L) 和 Cd^{2+} (0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mg/L) 暴露下, 草鱼肾脏中 3 种白细胞介素——白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 基因表达量的变化。试验结果显示, 高质量浓度和长时间的 Cu^{2+} 暴露(0.60、0.80 mg/L, 8 d) 和 Cd^{2+} 暴露(0.20、0.30、0.40 mg/L, 8 d) 下, 草鱼肾脏中的白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 基因表达量与对照组相比显著增加($P < 0.05$); 在 0.80 mg/L Cu^{2+} , 0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露下的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 的基因表达量, 以及在 0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露下的草鱼肾脏中白细胞介素-8 和白细胞介素-10 的基因表达量, 均随着暴露时间的增加而逐渐升高, 且第 8 d 时的基因表达量均显著高于第 2 d 时($P < 0.05$)。本研究揭示了高质量浓度和长时间的 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 暴露会使草鱼肾脏产生炎症反应, 为进一步深入研究重金属对鱼类的免疫毒性机制奠定了基础。

关键词: 草鱼; 肾脏; 白细胞介素; 基因表达; 铜; 镉

中图分类号: Q786

文献标识码: A

文章编号: 1003-1111(2019)02-0220-06

随着工农业的发展, 大量的重金属废弃物流入河流、湖泊和水库等水域中, 对水域生态环境造成了严重的污染。在水环境中, 重金属离子先富集于底泥中, 然后被浮游生物富集, 再通过食物链进入鱼体大量蓄积, 并最终进入人体, 对人体的生长发育造成危害, 甚至危及人类的生命安全。为保护水生态环境, 并最终保护人类的健康, 研究重金属对鱼类的毒性作用具有非常重要的意义。重金属铜(Cu)是鱼类必需的微量元素之一, 也是水产养殖中的常用药物成分, 但过量的铜又对鱼类有毒害作用, 会损伤鱼类的神经生理功能, 破坏嗅觉器官的结构以及内分泌等^[1-2]。重金属镉(Cd)是生物机体非必需元素之一, 其毒性极强, 痕量镉的短期胁迫就可对鱼类产生毒性效应及其他生物学效应, 导致鱼类各组织器官出现损害, 从而对其生长发育及生殖造成影响^[3-4]。

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国特有的淡水性鱼类, 为我国四大家鱼之一, 是人工养殖的主要种类之一, 每年产量居于世界前列。目前有关草鱼的研究主要集中在营养价值、转基因抗病、

人工繁殖、疾病防治等方面, 有关养殖水环境重金属污染对草鱼的毒性效应的研究也有较多报道^[5-9], 但水环境重金属铜和镉对草鱼免疫系统的破坏以及对其免疫基因表达的影响均未见报道。笔者主要研究水体中不同含量的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露对草鱼肾脏组织中 3 种免疫基因——白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 基因表达的影响, 以期研究重金属对鱼类的免疫毒性机制提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料及饲养管理

试验鱼购自新乡市水产市场, 体长(8.0 \pm 1.0) cm、体质量(10.0 \pm 1.0) g, 实验室暂养 7 d 后进行试验。试验容器为 100 cm \times 50 cm \times 40 cm 的 200 L 塑料水箱, 每箱放水 100 L, 放鱼 10 尾。试验期间使用小型增氧机增氧, 溶解氧 $>$ 9 mg/L, 光暗周期为 12L:12D, 水温为(26 \pm 2) $^{\circ}\text{C}$, pH 7~8。每日投喂市售商品饲料 1~2 次, 并及时清除残饵及粪便。

收稿日期: 2018-05-09; 修回日期: 2018-07-16。

基金项目: 河南省教育厅科学技术重点研究项目(13A240509)。

作者简介: 江红霞(1974—), 女, 副教授, 博士; 研究方向: 水生生物遗传资源。E-mail: jianghongxia2007@126.com。

1.2 重金属处理

将分析纯 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 用去离子水配制成 1 g/L 的母液。按照国家渔业水质标准中 Cu^{2+} 的质量浓度 ≤ 0.01 mg/L 以及 Cd^{2+} 的质量浓度 ≤ 0.005 mg/L, 重金属 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 分别设置了 5 个质量浓度梯度。 Cu^{2+} 的质量浓度梯度分别为 0.10、0.20、0.40、0.60、0.80 mg/L (依次为国家渔业水质标准允许质量浓度的 10、20、40、60、80 倍); Cd^{2+} 的质量浓度梯度分别为 0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mg/L (依次为国家渔业水质标准允许质量浓度的 10、20、40、60、80 倍)。对照组中不添加 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的质量浓度均以 0.00 mg/L 计。试验期间, 日换水 1 次, 使 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 的质量浓度保持稳定。并分别于暴露 2、4、6 d 和 8 d 后在每个处理组和对照组中随机采集 5 尾试验鱼, 冰盘解剖, 取出草鱼完整的肾脏(包括头肾和中肾), 液氮迅速冷冻后置于冰箱 -80°C 保存。

1.3 RNA 提取

按试剂盒 Total RNA kit II (Omega 公司) 的说明书提取各处理组草鱼肾脏组织的总 RNA。利用 NanoDrop 2000c 微量紫外分光光度计 (Thermo, 美国) 测定 RNA 的含量和纯度, 并利用 1.5%

琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的完整性。

1.4 实时荧光定量 PCR

使用 PrimeScript® RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) 试剂盒对各样品的总 RNA 进行反转录反应。将反转成的第一链 cDNA 置于 -20°C 保存。采用 Primer Premier 5.0 软件设计用于实时荧光定量 PCR 的特异性引物(表 1), 引物设计所依据的基因模板序列来源于美国国立生物技术信息中心 cDNA 数据库。以 β -肌动蛋白基因作为内参基因, 使用 CFX96 实时荧光 PCR 检测系统 (Bio-Rad, USA) 和 SYBR® Premix Ex Taq™ II (TaKaRa, 大连) 试剂进行实时荧光定量 PCR。PCR 反应体系 (25 μL) 为: SYBR® Premix Ex Taq II 12.5 μL , 上、下游引物各 1.0 μL , cDNA 模板 2.0 μL , ddH₂O 8.5 μL 。反应程序为: 95°C 预变性 30 s; 95°C 5 s, 60°C 30 s, 共 40 个循环。每个样本设置 3 个重复, 依据 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法分析试验样本中 3 种白细胞介素基因的相对表达量。

1.5 数据处理

试验数据以平均值士标准差表示, 采用单因素方差分析进行统计学检验, 利用 SPSS 20.0 软件进行数据的统计分析。统计学显著性水平设定为 0.05。

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

引物名称	引物序列(5'→3')	登录号	产物长度/bp
IL-1 β -F	AAGCAGCGGATCTCCTCGT	JQ692172.1	93
IL-1 β -R	AAGAACCCTTGAACCCA		
IL-8-F	AGGTCTGGGTGTAGATCCACGCTG	EU047717.1	137
IL-8-R	TTAGTGTGAAAACCTCACATGATCTCT		
IL-10-F	AAAATCCCTTTGAGTTTGCCAC	JQ768312.1	172
IL-10-R	CCAGCCATCATCCAATCCAC		
β -actin-F	CCTTCTTGGGTAGGAGTCTTG	M25013.1	221
β -actin-R	AGAGTATTACGCTCAGGTGGG		

注: 引物名称中 IL 为白细胞介素, β -actin 为 β -肌动蛋白。

2 结果

2.1 铜和镉对草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达的影响

在 0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露下, 8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量显著高于 2 d 暴露组 ($P < 0.05$); 在其他各质量浓度的 Cu^{2+} 暴露下, 2、4、6、8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1a)。在 6 d 时, 0.40、0.60 mg/L 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在 8 d 时, 0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾

脏中白细胞介素-1 β 基因表达量显著高于对照组 ($P < 0.05$); 在 2、4 d 时, 各质量浓度 Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量与对照组相比均无显著差异 ($P > 0.05$)。

在 0.05 mg/L Cd^{2+} 暴露下, 8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量显著高于 4 d 暴露组 ($P < 0.05$); 在 0.20、0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露下, 8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量显著高于 2、4、6 d 暴露组 ($P < 0.05$); 在 0.10 mg/L Cd^{2+} 暴露下, 2、4、6、8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量均无显著差异 ($P > 0.05$) (图 1b)。在 6 d 时, 0.40 mg/L Cd^{2+} 暴

露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量显著高于对照组($P < 0.05$);在8 d时,0.20、0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$);在2、4 d时,各质量浓度 Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量与对照组相比均无显著差异($P > 0.05$)。

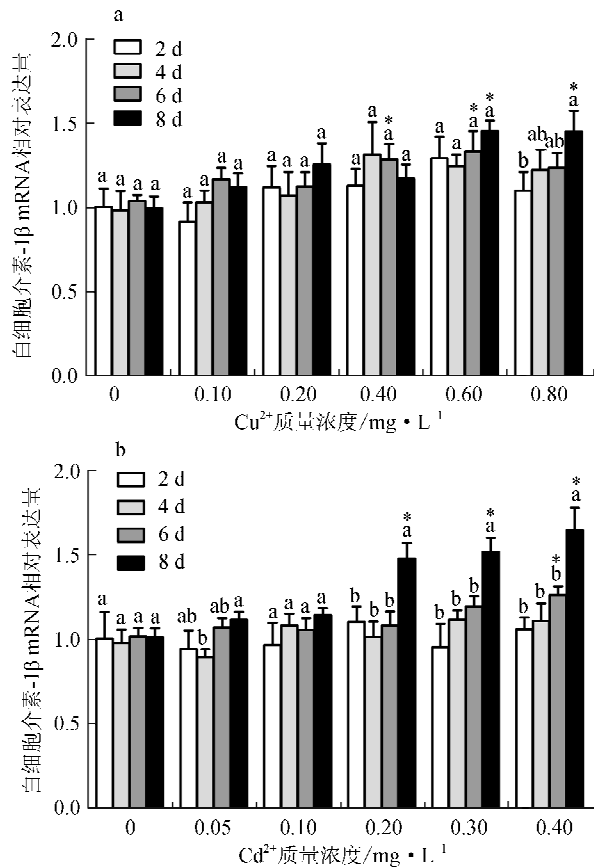


图1 不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露对草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达的影响

不同小写字母代表同一暴露质量浓度的不同暴露时间组之间差异显著($P < 0.05$),相同小写字母表示差异不显著($P > 0.05$); *代表同一暴露时间的不同暴露质量浓度组与对照组相比差异显著($P < 0.05$),其他同图。

2.2 铜和镉对草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达的影响

在0.10 mg/L Cu^{2+} 暴露下,8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量显著高于2 d暴露组($P < 0.05$);在0.40 mg/L Cu^{2+} 暴露下,8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量显著高于2、4、6 d暴露组($P < 0.05$);在0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露下,4、6、8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量显著高于2 d暴露组($P < 0.05$);在0.20 mg/L Cu^{2+} 暴露下,2、4、6、8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量均无显

著差异($P > 0.05$)(图2a)。在4、6 d时,0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$);在8 d时,0.40、0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。

在0.05 mg/L Cd^{2+} 暴露下,8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量显著高于4 d暴露组($P < 0.05$);在0.10 mg/L Cd^{2+} 暴露下,6、8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量显著高于2、4 d暴露组($P < 0.05$);在0.20、0.30 mg/L Cd^{2+} 暴露下,6 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量显著高于2、4 d暴露组($P < 0.05$);在0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露下,2、4、6、8 d暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量均无显著差异($P > 0.05$)(图2b)。在2、4 d时,0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$);在6、8 d时,0.05、0.10、0.20、0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$)。

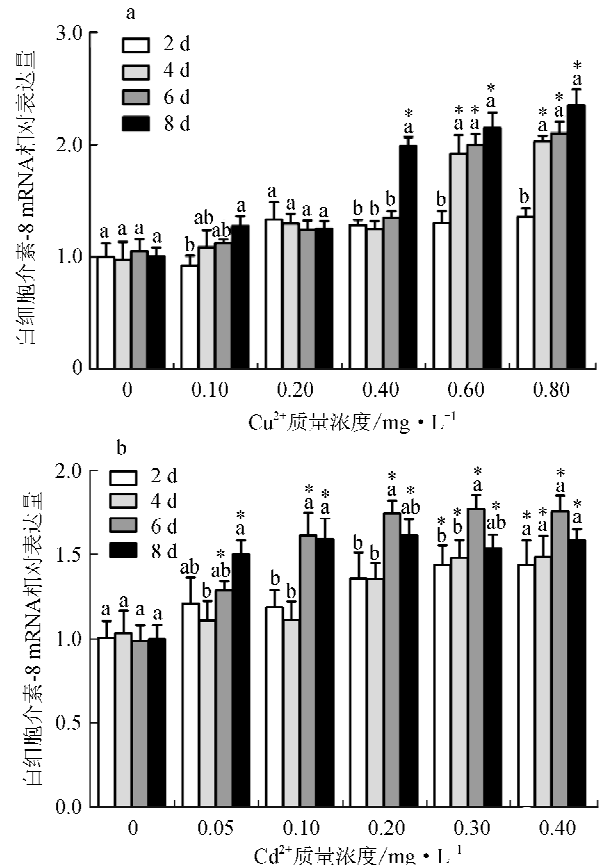


图2 不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露对草鱼肾脏中白细胞介素-8基因表达的影响

2.3 铜和镉对草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达的影响

在 0.60 mg/L Cu^{2+} 暴露下,8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量显著高于 2、4、6 d 暴露组($P < 0.05$);在 0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露下,6、8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量显著高于 2 d 暴露组($P < 0.05$);0.10、0.20、0.40 mg/L Cu^{2+} 暴露下,2、4、6、8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量均无显著差异($P > 0.05$)(图 3a)。在 6 d 时,0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量显著高于对照组($P < 0.05$);在 8 d 时,0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量显著高于对照组($P < 0.05$);在 2、4 d 时,各质量浓度 Cu^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量与对照组相比均无显著差异($P > 0.05$)。

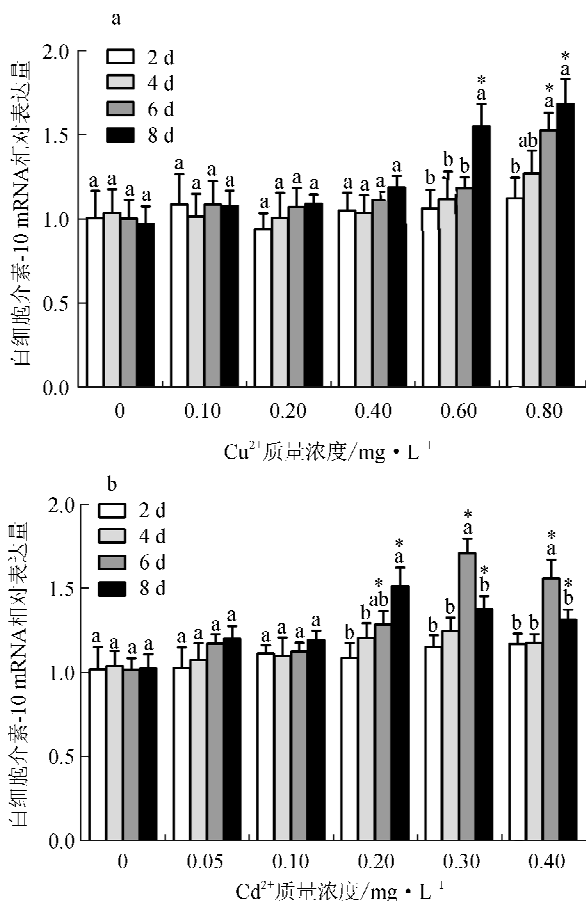


图3 不同质量浓度 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露对草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达的影响

在 0.20 mg/L Cd^{2+} 暴露下,8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量显著高于 2、4 d 暴露组($P < 0.05$);在 0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露下,6 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量均显著高于 2、4、8 d 暴露组($P < 0.05$);在

0.05、0.10 mg/L Cd^{2+} 暴露下,2、4、6、8 d 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量均无显著差异($P > 0.05$)(图 3b)。在 6、8 d 时,0.20、0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$);在 2、4 d 时,各质量浓度 Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量与对照组相比均无显著差异($P > 0.05$)。

3 讨论

近年来,水产养殖业暴发性病害的相继发生引起了养殖鱼类的大规模死亡,造成了渔业生产的巨大经济损失。病害发生的原因之一就是工农业生产过程中排放的大量污水使得养殖水域污染不断加重,水环境质量逐年恶化。因此,研究水体污染物包括水环境中的重金属对养殖鱼类的免疫毒性及其毒性机制,对养殖水环境保护和鱼类病害防治均有重要的意义。肾脏是鱼类重要的免疫器官,外界病原和污染物的刺激会使肾脏产生相应的免疫细胞和免疫因子,从而对鱼体进行免疫调节。白细胞介素是鱼体中的一类重要的免疫因子,它是由多种细胞产生并作用于多种细胞的一类细胞因子,由于最初是由白细胞产生又在白细胞间发挥作用,所以由此得名。迄今,已发现有 33 种白细胞介素参与免疫调节、造血、炎症反应等过程^[10]。近年来,白细胞介素作为鱼类重要的免疫细胞因子,已得到广泛研究,相继在各种鱼类中克隆得到了白细胞介素-1^[11]、白细胞介素-2^[12]、白细胞介素-4^[13]、白细胞介素-8^[14] 和白细胞介素-10^[15] 的全长基因,这些白细胞介素在鱼类的免疫调节中均发挥着重要的作用。

3.1 草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因在铜和镉胁迫下的表达变化

白细胞介素-1 是在局部和全身炎症反应中起关键作用的细胞因子,是重要的炎症和一般起始反应的介质,在级联反应中可调控其他细胞因子的表达。在哺乳动物中已发现 11 种白细胞介素-1 家族成员,包括白细胞介素-1 α 、白细胞介素-1 β 、白细胞介素-1 ra 、白细胞介素-18、白细胞介素-1F5 和白细胞介素-33 等^[16],但目前在鱼类中只发现了白细胞介素-1 β 和白细胞介素-18^[17]。本试验研究了 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露对草鱼肾脏白细胞介素-1 β 基因表达的影响。结果发现,当 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露到第 8 d 时,0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露组、0.20、0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露组的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$),说明长时

间高质量浓度的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露,对草鱼的肾脏造成了一定的损伤,引起了草鱼肾脏细胞的炎症反应,其炎症细胞因子白细胞介素-1 β 的基因表达量显著升高,从而促进肾脏细胞的免疫调节。

3.2 草鱼肾脏中白细胞介素-8 基因在铜和镉胁迫下的表达变化

白细胞介素-8 是典型的促炎症因子,也是一种 CXC 型趋化性细胞因子,对中性粒细胞、嗜碱性粒细胞和 T 细胞有趋化作用,同时具有刺激血管生成、促有丝分裂和免疫调节等作用^[18]。白细胞介素-8 调节炎症反应,对感染组织有一定的恢复作用^[19]。本试验中,草鱼肾脏中白细胞介素-8 基因表达量在较高质量浓度和较长时间的 Cu^{2+} 暴露下(0.40 mg/L, 8 d; 0.60 mg/L, 4、6、8 d; 0.80 mg/L, 4、6、8 d)显著高于对照组($P < 0.05$),而在 Cd^{2+} 暴露下,在暴露时间较长(6、8 d)时,各质量浓度组的白细胞介素-8 基因表达量均显著高于对照组($P < 0.05$),但在高质量浓度 Cd^{2+} (0.30、0.40 mg/L)暴露下,在仅暴露 2、4 d 时,白细胞介素-8 基因表达量就已显著高于对照组($P < 0.05$)。以上结果说明,白细胞介素-8 基因的表达对 Cd^{2+} 的暴露要比对 Cu^{2+} 的暴露更加敏感,这可能是由于 Cd^{2+} 对草鱼的毒性要比 Cu^{2+} 强, Cd^{2+} 的暴露比 Cu^{2+} 暴露对草鱼肾脏的损伤更快更严重,从而引起草鱼肾脏细胞更加灵敏的炎症反应。

3.3 草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因在铜和镉胁迫下的表达变化

白细胞介素-10 又称细胞因子合成抑制因子,参与炎症反应并能缓解炎症,对机体具有保护作用,在硬骨鱼中具有免疫调节作用^[20]。白细胞介素-10 mRNA 的表达增加可抑制炎症反应,缓解炎症疾病,有助于治疗炎症^[21]。本试验中,高质量浓度和长时间的 Cu^{2+} 暴露(0.60 mg/L, 8 d; 0.80 mg/L, 6、8 d),以及高质量浓度(0.20、0.30、0.40 mg/L)和长时间(6、8 d)的 Cd^{2+} 暴露均使草鱼肾脏中白细胞介素-10 基因表达量显著高于对照组($P < 0.05$),这可能是肾脏细胞为了抑制和缓解 Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 暴露对肾脏所造成的炎症反应而大量合成白细胞介素-10 所致。

3.4 草鱼肾脏中白细胞介素基因表达量与铜和镉的胁迫时间的关系

在本研究中,在 0.80 mg/L Cu^{2+} , 0.30、0.40 mg/L Cd^{2+} 暴露下的草鱼肾脏中白细胞介素-1 β 基因表达量,以及在 0.60、0.80 mg/L Cu^{2+} 暴露下的草鱼肾脏中白细胞介素-8 和白细胞介素-10 基因表

达量,均随着暴露时间的增加而逐渐升高,在第 8 d 时达到最大值,且在第 8 d 时的基因表达量均显著高于第 2 d 时($P < 0.05$)。这些结果说明在高质量浓度的 Cu^{2+} 暴露下的白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 基因表达量,以及在高质量浓度 Cd^{2+} 暴露下的白细胞介素-1 β 基因表达量,均与暴露时间呈现出一定的正相关关系,其表达量具有一定的时间依赖性。这可能是因为 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露的时间越长,草鱼肾脏受到的损伤越严重,其炎症反应也越强烈,肾脏细胞产生的各种促炎症因子和细胞因子合成抑制因子也越多。

4 结 论

总之,本研究利用实时荧光定量 PCR 初步分析了草鱼在水体铜和镉胁迫下,其肾脏中的免疫细胞因子——白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 的基因表达量的变化,试验结果表明,高质量浓度和长时间的 Cu^{2+} 和 Cd^{2+} 暴露会使草鱼肾脏中的白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 基因表达量显著增加,且高质量浓度的 Cu^{2+} 暴露下的白细胞介素-1 β 、白细胞介素-8 和白细胞介素-10 以及高质量浓度 Cd^{2+} 暴露下的白细胞介素-1 β 基因表达量具有一定的时间依赖性。本研究结果为后续深入研究重金属对鱼类的免疫毒性机制,提高环境污染条件下的鱼类抗病力奠定了基础。

参考文献:

- [1] 刘福军,张饮江,王明学. 铜对鱼类慢性毒性研究进展[J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 302-307.
- [2] 王利,汪开毓. 铜在鲤体内的蓄积及毒性的研究[J]. 淡水渔业, 2008, 38(4): 45-48.
- [3] 骆晓燕,谢勇平,方展强. 镉暴露对食蚊鱼生长发育的影响[J]. 天津农业科学, 2013, 19(10): 1-6.
- [4] 黄应平, Mandal P, 靖锦杰, 等. 镉暴露对鲢幼鱼游泳行为影响的研究[J]. 淡水渔业, 2016, 46(6): 33-38.
- [5] 任洪涛,张春暖,林霖. Mo^{6+} 对草鱼组织器官及抗氧化酶活性的影响[J]. 水产科学, 2017, 36(3): 317-322.
- [6] 朱玉娇,刘永,胡成钰. Pb^{2+} 胁迫对草鱼过氧化氢酶和髓过氧化物酶的影响[J]. 南昌大学学报:理科版, 2012, 36(2): 176-179.
- [7] 华涛,周启星. Cd-Zn 对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的联合毒性及对肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性的影响[J]. 环境科学学报, 2009, 29(3): 600-606.
- [8] 王少博,王维民,都亚楠,等. 重金属镉和铬对草鱼苗的急性和慢性毒性效应[J]. 兰州大学学报:自然科学版, 2007, 43(4): 60-64.
- [9] 侯丽萍,马广智. 镉与锌对草鱼种的急性毒性和联合

- 毒性研究[J]. 淡水渔业, 2002, 32(3): 44-46.
- [10] 高珊, 余涛, 周景祥, 等. 鱼类白介素及其受体的研究[J]. 水产学杂志, 2014, 27(3): 62-64.
- [11] 何江帅, 卢强, 李伟, 等. 鲤鱼白介素-1 β 全长 cDNA 克隆、鉴定及其差异表达分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(12): 7301-7304.
- [12] Bird S, Zou J, Kono T, et al. Characterisation and expression analysis of interleukin 2 (IL-2) and IL-21 homologues in the Japanese pufferfish, *Fugu rubripes*, following their discovery by synteny[J]. Immunogenetics, 2005, 56(12): 909-923.
- [13] 潘萍萍. 鱼类白细胞介素 4 及其受体 IL-4R α 的分子鉴定与功能研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2010.
- [14] Wang T T, Song X H, Bao G M, et al. Molecular characterization, expression analysis, and biological effects of interleukin-8 in grass carp *Ctenopharyngodon idellus* [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2013, 35(5): 1421-1432.
- [15] Seppola M, Larsen A N, Steiro K, et al. Characterization and expression analysis of the interleukin genes, IL-1 β , IL-8 and IL-10, in Atlantic cod (*Gadus morhua* L.) [J]. Molecular Immunology, 2008, 45(4): 887-897.
- [16] Huising M O, Stet R J, Savelkoul H F, et al. The molecular evolution of the interleukin-1 family of cytokines; IL-18 in teleost fish [J]. Developmental and Comparative Immunology, 2004, 28(5): 395-413.
- [17] 王艺, 胡秀彩, 吕爱军. IL-1 β 在鱼类皮肤免疫应答中的作用机制[J]. 水产科学, 2012, 31(8): 507-510.
- [18] 李瑶, 吕德官, 陈临溪. IL-8 及其受体药物与疾病的研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(3): 310-314.
- [19] Rahimkhani M, Mordadi A, Varmazyar S, et al. Evaluation of urinary interleukin-8 levels in patients with spinal cord injury [J]. Recent Patents on Anti-infective Drug Discovery, 2014, 9(2): 144-149.
- [20] Wei H, Yang M, Zhao T, et al. Functional expression and characterization of grass carp IL-10; an essential mediator of TGF- β 1 immune regulation in peripheral blood lymphocytes [J]. Molecular Immunology, 2013, 53(4): 313-320.
- [21] da Silva L M, Quintans-Júnior L J, de Santana W A, et al. Anti-inflammatory effects of carvacrol: evidence for a key role of interleukin-10 [J]. European Journal of Pharmacology, 2013, 699(1): 112-117.

Effects of Copper and Cadmium on Expression of Three Interleukin Genes in Kidney of Grass Carp *Ctenopharyngodon idellus*

JIANG Hongxia, LING Jiebin, YE Kaijia, LI Xuejun

(College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: In this study, quantitative Real-time fluorescence PCR was applied to detect expressions of three interleukins (interleukin-1 β , interleukin-8 and interleukin-10) genes in kidney of grass carp *Ctenopharyngodon idellus* exposed to different concentrations of Cu²⁺ (0.10, 0.20, 0.40, 0.60 and 0.80 mg/L) or Cd²⁺ (0.05, 0.10, 0.20, 0.30 and 0.40 mg/L) for 2, 4, 6 and 8 days, respectively, in order to investigate the effect of copper (Cu) and cadmium (Cd) pollutions in water on the immune system of grass carp. The results showed that there was significantly increase in expressions of interleukin-1 β , interleukin-8 and interleukin-10 genes in kidney of grass carp exposed to high concentrations of Cu²⁺ (0.60 and 0.80 mg/L) and Cd²⁺ (0.20, 0.30 and 0.40 mg/L) long periods (8 days) compared with the control group ($P < 0.05$). The expression level of interleukin-1 β gene in grass carp exposed to 0.80 mg/L Cu²⁺ or 0.30 and 0.40 mg/L Cd²⁺, and interleukin-8 and interleukin-10 genes in grass carp exposed to 0.60 and 0.80 mg/L Cu²⁺ were all shown to be increased with prolonged exposure time, significantly higher on day 8 than those on day 2 ($P < 0.05$). The findings indicated that high concentrations of Cu²⁺ and Cd²⁺ exposure for long period induced inflammation in kidney of grass carp, which provide the foundation for further research on mechanism of immune toxicity of heavy metals to fish.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; kidney; interleukin; gene expression; copper; cadmium