

10.7524/AJE.1673-5897.20130224001

鲁疆,王占洋,袁玉婷,等. 氯化镉对斑马鱼胚胎的发育毒性[J]. 生态毒理学报, 2013, 8(3): 381-388

Lu J, Wang Z Y, Yuan Y T, et al. Developmental toxicity of cadmium chloride to zebrafish embryo [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2013, 8(3): 381-388 (in Chinese)

## 氯化镉对斑马鱼胚胎的发育毒性

鲁疆<sup>1</sup>, 王占洋<sup>1</sup>, 袁玉婷<sup>1</sup>, 许波<sup>2</sup>, 高永林<sup>2</sup>, 张波<sup>1</sup>, 郑秋生<sup>1,2</sup>, 王振华<sup>1,2,\*</sup>

1. 石河子大学药学院 新疆特种植物药资源教育部重点实验室 石河子 832002

2. 烟台大学生命科学学院 烟台 264005

**摘要:** 为探讨重金属 Cd 对斑马鱼胚胎发育的毒性效应, 将受精 1 h 后 (1 hpf) 的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的 CdCl<sub>2</sub> 溶液中, 观察 CdCl<sub>2</sub> 处理对胚胎死亡、孵化及幼鱼畸形的影响。采用吖啶橙 (AO) 染色, 定性观察胚胎细胞凋亡情况; 以活性氧 (ROS) 荧光探针 DCFH-DA 染色法检测胚胎 ROS 水平, TBA 比色法测定胚胎脂质过氧化水平, DTNB 比色法测定还原型谷胱甘肽 (GSH) 和氧化型谷胱甘肽 (GSSG) 水平。结果表明, 10.0 ~ 30.0 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 浓度依赖性地诱导斑马鱼胚胎死亡和幼鱼畸形, 胚胎孵化率亦降低。CdCl<sub>2</sub> 处理引起斑马鱼胚胎心脏水肿、尾部弯曲和胚胎发育阻滞。胚胎半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 为 18.9 mg·L<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0.973; 幼鱼半数致畸浓度 (EC<sub>50</sub>) 为 13.7 mg·L<sup>-1</sup>, R<sup>2</sup> = 0.967。20.0 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理组 ROS 水平、MDA 含量明显升高, GSH/GSSG 比值明显降低 (P < 0.01)。20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理后, 胚胎头部和尾部可见大量细胞凋亡。10 mg·L<sup>-1</sup> N-乙酰半胱氨酸 (NAC) 与 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 共同处理组斑马鱼胚胎的死亡率和畸形率明显降低, 孵化率明显升高, ROS 水平、MDA 含量以及 GSH/GSSG 比值趋于正常。以上结果说明, CdCl<sub>2</sub> 暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应可能与 CdCl<sub>2</sub> 诱导的氧化应激相关。

**关键词:** 氯化镉 (CdCl<sub>2</sub>); 发育毒理学; 氧化应激; 斑马鱼

文章编号: 1673-5897(2013)3-381-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Developmental Toxicity of Cadmium Chloride to Zebrafish Embryo

Lu Jiang<sup>1</sup>, Wang Zhanyang<sup>1</sup>, Yuan Yuting<sup>1</sup>, Xu Bo<sup>2</sup>, Gao Yonglin<sup>2</sup>, Zhang Bo<sup>1</sup>, Zheng Qiusheng<sup>1,2</sup>, Wang Zhenhua<sup>1,2,\*</sup>

1. School of Pharmacy/Key Laboratory of Xinjiang Endemic Phytomedicine Resources of Ministry of Education, Shihezi University, Shihezi 832002, China

2. School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China

**Received** 24 February 2013 **accepted** 13 March 2013

**Abstract:** To investigate the developmental toxicology of CdCl<sub>2</sub> to the embryonic stage of zebrafish. Zebrafish embryos (1 hour post fertilization, 1 hpf) were exposed to different concentrations of CdCl<sub>2</sub>. The survival and hatching of embryos and juvenile malformations were examined. Cell apoptosis in embryos was observed by the staining of acridine orange (AO). Embryonic reactive oxygen species (ROS) level was measured by fluorescent probe of DCFH-DA. Lipid peroxidation degree in embryos was measured by the TBA colorimetric method, as well as levels

收稿日期: 2013-02-24 录用日期: 2013-03-13

基金项目: 国家自然科学基金 (11175222); 教育部新世纪优秀人才支持计划 (NCET-10-0967); 兵团国际科技合作计划 (2011BC006); 兵团医药专项项目 (2011BA039)

作者简介: 鲁疆 (1986-) 男, 硕士, 研究方向为分子药理学, E-mail: ljswot@163.com;

\* 通讯作者 (Corresponding author) E-mail: zhenhuawang@tom.com

of reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSG) were assayed by DTNB colorimetric method. Results showed that exposure to CdCl<sub>2</sub> for 96 hours could cause severe lethality of embryo, malformation of juvenile and the failure of hatching in a concentration-dependent manner. CdCl<sub>2</sub> treatment caused malformation of heart, tail and growth retardation in embryos. The half lethal concentration (LC<sub>50</sub>) of CdCl<sub>2</sub> on zebrafish embryos was 18.9 mg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.973), and the half effective concentration (EC<sub>50</sub>) with respect to malformation was 13.7 mg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.967). ROS and MDA levels in zebrafish embryos increased significantly at exposure concentration of 20 mg·L<sup>-1</sup> or above (P < 0.01) with decreased ratio of GSH to GSSG. Cell apoptosis in the head and tail could be observed obviously after exposure. When an anti-oxidative reagent N-acetyl cysteine (NAC, 10 mg·L<sup>-1</sup>) and CdCl<sub>2</sub> (20 mg·L<sup>-1</sup>) were co-existed, the lethal and teratogenic effects ameliorated significantly, and levels of ROS, MDA and the ratio of GSH to GSSG due to exposure of CdCl<sub>2</sub> resumed to normal. Therefore, it can be concluded that exposure of cadmium chloride could cause lesions in the developmental stage of zebrafish embryos, which probably resulted from the oxidative stress.

**Keywords:** cadmium chloride; developmental toxicology; oxidative stress; zebrafish

镉(Cd)是一种常见的环境毒物,目前发现其对人体没有任何生理作用。Cd的生物半衰期长达10~35 y,可在体内长期蓄积产生毒性。Cd污染不仅影响农作物的生长发育、产品及质量,还通过食物链的形式在动物和人类体内大量蓄积,危害动物和人类的健康及生命安全。Cd可以对人体肝、肾、骨骼、及生殖等多个系统产生毒害作用。妊娠期的妇女接触Cd,不仅会受到Cd的毒性作用,而且Cd可以透过胎盘屏障损害胎儿神经系统发育,导致胎儿发育不良,新生儿体重下降。1971年国际环境会议将Cd列为环境污染中最危险的5种物质之一。随着工业化进程的加速,Cd暴露对人类健康的影响日益引起人们的关注<sup>[1-2]</sup>。我国目前至少有16个省(自治区、直辖市)报导过职业或环境Cd暴露对健康的不良影响。因而,开展Cd毒性研究具有巨大的现实意义和社会价值。大量实验表明,Cd的毒性机制与细胞受氧化胁迫相关<sup>[3-4]</sup>。氧化应激诱导脂质过氧化,是鱼类暴露Cd后众所周知的生物学效应<sup>[5-7]</sup>。Stohs和Bagchi研究表明<sup>[8]</sup>,Cd诱导产生的抗氧化状态的变化,可能通过提高超氧阴离子自由基的产生和脂质过氧化反应,也有可能减少酶和非酶的抗氧化剂。Cd很可能触发氧化还原反应,产生自由基和活性氧(ROS)(包括H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>-</sup>、·OH等),ROS的积累会损伤DNA、蛋白质和脂类<sup>[3]</sup>。ROS在信号通路传导和转录因子调控中发挥着重要作用<sup>[9]</sup>。适量的ROS很可能作为第二信使激活转录因子NF-κappa-B,但高浓度的ROS会损伤组织<sup>[10]</sup>。在正常情况下ROS和其他自由基会被抗氧化系统、抗氧化物酶(CAT、SOD、GPx、GST等)及非酶的抗氧化剂(GSH)清除<sup>[11-13]</sup>。如果ROS的量超过了抗

氧化系统的防御能力,氧化应激会导致鱼类组织细胞多种类型的损伤<sup>[14]</sup>。近期,大量研究开始关注Cd暴露后氧化应激对鱼类的影响<sup>[15-17]</sup>。胡蓉等<sup>[18]</sup>研究表明,Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>对鲫鱼胚胎发育和仔鱼均有毒害作用,且随Cd<sup>2+</sup>、Hg<sup>2+</sup>质量浓度的增大和染毒时间的延长,毒性效应不断增加。研究表明,Cd积累及其毒性效应会影响日本比目鱼的生长和抗氧化系统,减少中国沿海水域商业鱼类数量。Chow等<sup>[19]</sup>2008年研究表明,Cd诱导斑马鱼胚胎神经毒性抑制神经形成,从而减少神经元分化和轴突形成。Chow等<sup>[20]</sup>2009年研究表明,Cd暴露斑马鱼胚胎幼鱼视网膜分化细胞减少,视网膜神经节细胞轴突形成受损和视锥细胞缺乏,是引起眼球和视力受损的主要原因。Cd暴露后,鱼类将启动多种酶类和非酶的抗氧化机制来抵御氧化应激。例如,超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、还原型谷胱甘肽(GSH)及谷胱甘肽S-转移酶(GST),它们可以解除重金属暴露的毒性作用,清除ROS,从而预防鱼类受氧化损伤<sup>[21-22]</sup>。

斑马鱼(Danio rerio)是已经被人们广泛接受并用于研究胚胎发育、遗传分析、毒理学和多种人类疾病的理想模式生物<sup>[23-24]</sup>。经济合作与发展组织(OECD)在1996年将斑马鱼胚胎发育的方法列为测定单一化学毒物的标准方法之一,并制定了详细的操作指南<sup>[25]</sup>。运用斑马鱼检验环境化学物的致畸效应,具有成本低、影响因素少、可重复性好、易操作、灵敏度高以及可观察多项毒性指标的特点,并可以此判断污染物的致毒机理。

近些年来,国内外大量研究报道了Cd毒性在实验动物肝、肾、骨骼及神经系统中与金属硫蛋白<sup>[26-27]</sup>、

钙<sup>[28]</sup>、线粒体<sup>[29]</sup>及诱导氧化胁迫<sup>[30]</sup>的作用机理。但是关于Cd对胚胎发育的毒性及机制的相关报道极为少见,然而关于Cd诱导氧化应激对斑马鱼胚胎发育的影响仍未见报道。以斑马鱼为实验动物考察了氯化镉对斑马鱼胚胎发育的毒性作用,并初步探讨了氧化胁迫与Cd毒性的相关性,为进一步深入研究Cd发育毒性以及合理的临床干预提供参考依据。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 材料

AB系斑马鱼成鱼由国家斑马鱼模式动物北方中心惠赠,由本实验室繁育保存。

E3培养液含0.17 mmol·L<sup>-1</sup> KCl 5 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl 0.33 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub> 0.33 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub> pH 7.4。

CdCl<sub>2</sub>纯度为99.0%,上海中秦化学试剂公司;丙二醛(MDA)测定试剂盒,南京建成生物工程研究所;GSH和GSSG检测试剂盒均为碧云天生物技术研究所;N-乙酰半胱氨酸(NAC),麻醉剂Tricaine和活性氧荧光探针DCFH-DA均购自美国SIGMA公司;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 鱼卵的收集

成年斑马鱼饲养于独立养殖单元(北京爱生)水温(28.5±0.3)℃,盐度为450~500 μS, pH为7.0~7.5,光周期为14 h/10 h(光照/黑暗),每日喂3次活丰年虾。在收集胚胎的前一天晚,将1条雌鱼和1条雄鱼移入交配盒,用隔板将其隔开,第2天光照1 h后移去隔板,观察产卵时间。于产卵后1 h收集受精卵,用E3培养液轻轻冲洗3次后,置于E3培养液中,28.5℃恒温光照培养箱中培养。

#### 1.2.2 胚胎染毒实验

参照Vaughan等<sup>[31]</sup>的方法,收集受精后1 h(1 hpf)斑马鱼胚胎置于12孔细胞培养板中,10卵/孔,每孔加入2.0 mL含不同浓度CdCl<sub>2</sub>的E3培养液,每处理组设胚胎80枚,另取80枚卵孵育于不含CdCl<sub>2</sub>的E3培养液作为正常对照。随后加盖封闭,置于28.5℃恒温光照培养箱内,让胚胎继续发育。每24 h更换一半E3培养液,并观察胚胎发育状况,至96 hpf。以卵凝结或心脏停跳作为胚胎死亡终点,记录胚胎和/或幼鱼的死亡、畸形及幼鱼孵化情况,计算死亡率、孵化率和畸形率:胚胎死亡率(%)=(死亡胚胎数量/总胚胎数量)×100;胚胎孵化率(%)=(孵化的胚胎总数/总胚胎数量)×100;畸形率(%)=(畸形幼鱼数量/已孵化胚胎数量)×100。

#### 1.2.3 NAC干预实验

按1.2.2胚胎染毒方法,取1 hpf胚胎,胚胎暴露

于含20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub>或同时含有20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub>和10 mg·L<sup>-1</sup> NAC,或含有10 mg·L<sup>-1</sup> NAC的E3培养液,同时设空白对照组。以卵凝结或心脏停跳作为死亡终点,在体式显微镜下观察至96 hpf,记录胚胎和/或幼鱼的死亡数、畸形数及幼鱼的孵化数,计算死亡率、畸形率和孵化率。

#### 1.2.4 胚胎细胞凋亡观察

参照文献[32]的方法,收集1 hpf斑马鱼胚胎,按1.2.3方法处理至24 hpf,更换为含5 mg·L<sup>-1</sup>吖啶橙(AO)的E3培养液,28.5℃孵育20 min,以不含AO的E3培养液洗涤3次,每次5 min,加入含0.016 mol·L<sup>-1</sup> Tricaine的E3培养液处理1 min,麻醉胚胎后,在荧光显微镜(日本Nikon ECLIPSE 80i)下以蓝光激发,观察胚胎细胞凋亡情况并拍照。

#### 1.2.5 胚胎活性氧水平测定

按1.2.3方法处理1 hpf胚胎3 h,E3培养液清洗胚胎3次后,更换为含20 μmol·L<sup>-1</sup> DCFH-DA的E3培养液,于28.5℃孵育1 h,以E3培养液洗涤胚胎3次,吸净E3培养液,每处理选取20枚胚胎,加入预冷的200 μL E3培养液后,电动组织匀浆器匀浆,匀浆液于4℃、10 000 g下离心4 min,取200 μL上清液,加入96孔酶标板,于酶标仪(瑞士Tecan Infinite M200)测定荧光强度(激发波长485 nm,发射波长535 nm)。

#### 1.2.6 MDA含量测定

按1.2.3方法处理1 hpf胚胎3 h,每处理取胚胎20枚,转移到离心管中,以E3培养液洗涤胚胎3次,吸干表面液体,加入200 μL E3培养液,电动组织匀浆器匀浆,匀浆液于4℃、10 000 g下离心10 min。取上清,按试剂盒说明书方法测定MDA含量。

#### 1.2.7 GSH、GSSG指标测定

按1.2.3方法处理1 hpf胚胎3 h,每处理取20枚胚胎,转移到1.5 mL离心管中,冰浴E3培养液洗涤3次,吸干表面液体,匀浆,4℃放置10 min,4℃、10 000 g下离心10 min,取上清,按照试剂盒说明书测定GSH和GSSG值。

#### 1.2.8 统计学分析

所有实验均重复3次。实验数据采用平均值±标准差(mean±SD)表示,除特别说明外,结果均采用SAS 8.1统计软件进行单因素方差分析,P<0.05表示差异具有显著性统计学意义。

## 2 结果(Results)

### 2.1 氯化镉对斑马鱼胚胎发育的毒性效应

斑马鱼胚胎于54 hpf开始孵化出膜,对照组至

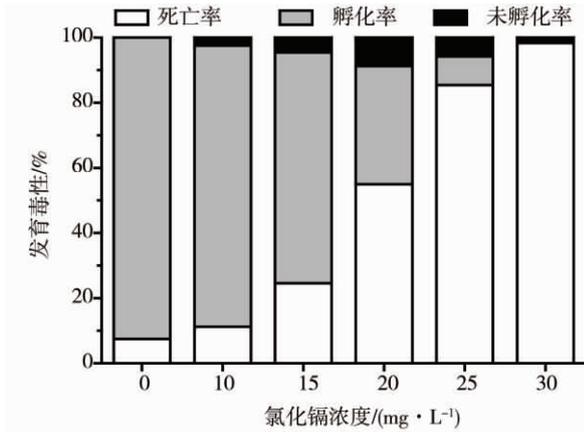


图1 氯化镉对斑马鱼胚胎的毒性效应

Fig. 1 Toxic effects of CdCl<sub>2</sub> on zebrafish embryos

78 hpf 孵化完全。10 ~ 30 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理后, 斑马鱼胚胎孵化率降低, 死亡率升高, 呈浓度依赖性。30 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理组至 96 hpf 时胚胎死亡率达 98.3%, 且未有胚胎孵化。各组斑马鱼胚胎死亡均发生于 24 hpf 之前。采用线性回归分析法计算出 CdCl<sub>2</sub> 处理至 96 hpf 对斑马鱼胚胎的半数致死浓度 (LC<sub>50</sub>) 为 18.9 mg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.973)。

### 2.2 氯化镉对斑马鱼胚胎发育的致畸作用

10 ~ 25 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 暴露对斑马鱼胚胎及幼鱼多个系统的发育产生明显影响, 主要表现为鱼卵发育阻滞、心脏水肿、卵黄囊水肿和脊柱弯曲等多种发育异常 (图3)。10 ~ 25 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理后, 幼鱼心脏水肿、脊柱弯曲及总畸形率升高 (图2, 图3)。采用线性回归分析法计算出 CdCl<sub>2</sub> 处理至 96 hpf 对斑马鱼胚胎的半数致畸浓度 (EC<sub>50</sub>) 为 13.7 mg·L<sup>-1</sup> (R<sup>2</sup> = 0.967)。

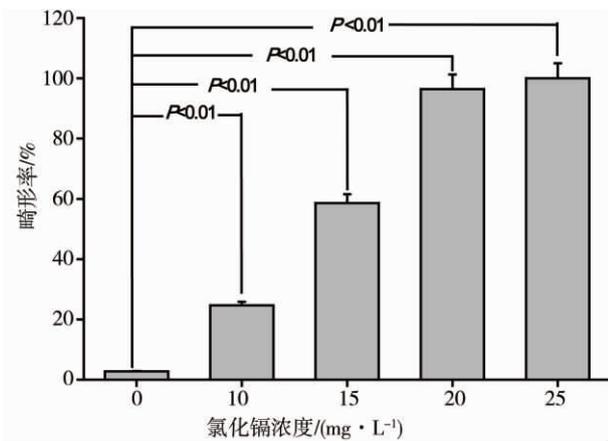


图2 氯化镉致斑马鱼胚胎的发育畸形率

Fig. 2 Developmental malformation rate of zebrafish embryos induced by CdCl<sub>2</sub>

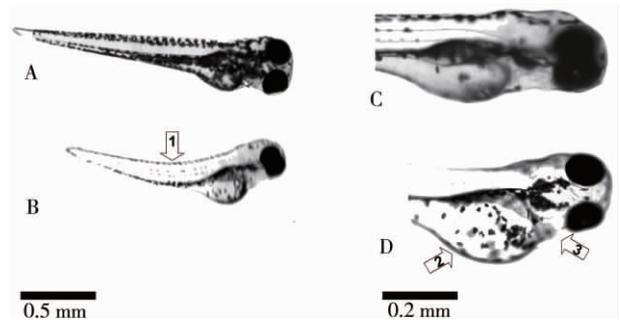


图3 氯化镉致斑马鱼胚胎发育的典型畸形特征  
注: A 和 C 为正常幼鱼; B 为鱼体短小和脊柱弯曲;  
D 为卵黄囊水肿和心脏水肿。

Fig. 3 Typical malformation of zebrafish embryos induced by CdCl<sub>2</sub>

### 2.3 抗氧化剂 NAC 对氯化镉发育毒性的干预作用

与对照组比较, 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 单独处理斑马鱼胚胎, 致胚胎死亡率 (图4) 和畸形率 (图5) 均明显增加 (P < 0.01); 采用 10 mg·L<sup>-1</sup> NAC 与 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 联合处理斑马鱼胚胎, 与单纯 CdCl<sub>2</sub> 处理组相比, 胚胎死亡率 (图4) 和畸形率 (图5) 均明显降低 (P < 0.01)。与对照组比较, 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 单独处理斑马鱼幼鱼体长 (图6) 明显缩短 (P < 0.05); 采用 10 mg·L<sup>-1</sup> NAC 与 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 联合处理斑马鱼胚胎, 与单纯氯化镉处理组相比, 斑马鱼幼鱼体长 (图6) 明显增长 (P < 0.05)。表明 NAC 对 CdCl<sub>2</sub> 所致的斑马鱼胚胎发育毒性有一定保护作用。

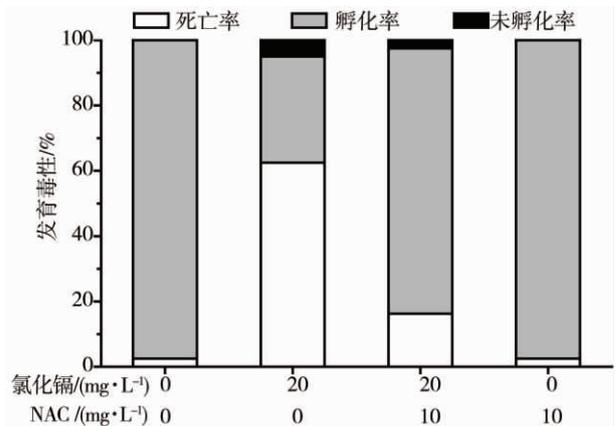


图4 NAC 干预氯化镉对斑马鱼胚胎的毒性效应

Fig. 4 NAC intervened toxic effect of CdCl<sub>2</sub> on zebrafish embryos

### 2.4 氯化镉导致斑马鱼胚胎细胞的异常凋亡

斑马鱼胚胎经吖啶橙染色后, 凋亡细胞呈现亮绿色荧光。正常组胚胎卵黄囊部位可见大量深染凋亡细胞, 其他部位仅见少量深染细胞 (图7A)。20 mg·L<sup>-1</sup>

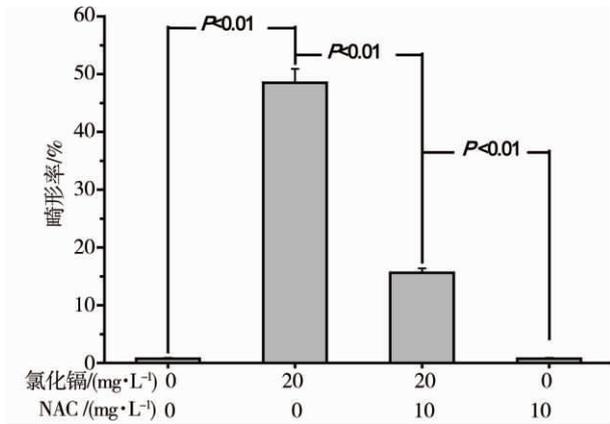


图 5 NAC 干预氯化镉致斑马鱼胚胎的总畸形率

Fig. 5 NAC intervened total aberration rate of zebrafish embryos caused by CdCl<sub>2</sub>

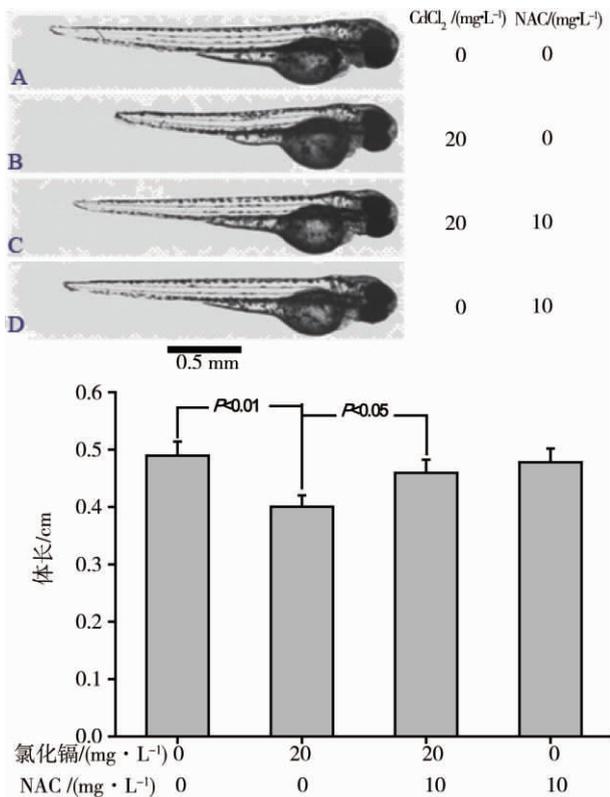


图 6 NAC 干预氯化镉对斑马鱼胚胎体长的影响

Fig. 6 NAC intervened short snout-vent length of zebrafish embryos caused by CdCl<sub>2</sub>

CdCl<sub>2</sub> 处理后,除卵黄囊部位见大量深染细胞外,头部和尾部亦可见大量深染细胞(图 7B),表明 CdCl<sub>2</sub> 处理可能对中枢神经系统发育有一定影响。采用 10 mg·L<sup>-1</sup> NAC 与 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 联合处理斑马鱼胚胎后,仅见少量凋亡细胞(图 7C),表明 NAC 对 CdCl<sub>2</sub> 诱

导的斑马鱼胚胎细胞凋亡有明显的抑制作用。

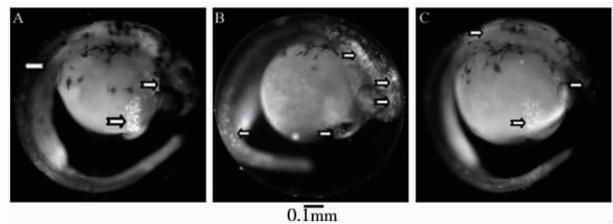


图 7 氯化镉对斑马鱼胚胎细胞凋亡的影响

注: A 为对照组; B 为 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理组;

C 为 10 mg·L<sup>-1</sup> NAC 与 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 联合处理组。

Fig. 7 Cell apoptosis of zebrafish embryos caused by CdCl<sub>2</sub>

### 2.5 氯化镉暴露导致斑马鱼胚胎氧化胁迫损伤

20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 处理斑马鱼胚胎后,胚胎 ROS 水平(图 8A)、胚胎脂质过氧化产物丙二醛(MDA)水平(图 8B)均明显高于对照组(P < 0.01),GSH/GSSG 水平明显低于对照组(P < 0.01)(图 8C),表明 CdCl<sub>2</sub> 处理致斑马鱼胚胎发生了氧化应激损伤。采用 10 mg·L<sup>-1</sup> NAC 与 20 mg·L<sup>-1</sup> CdCl<sub>2</sub> 共同处理斑马鱼胚胎,可明显下调胚胎组织中 ROS 和 MDA 水平(P < 0.05)(图 8A 和 B),上调 GSH/GSSG 水平(P < 0.05)(图 8C),表明 NAC 对 CdCl<sub>2</sub> 所致斑马鱼胚胎氧化应激损伤有一定保护作用。

### 3 讨论(Discussion)

Cd 是一种强的脂质过氧化作用诱导剂,脂质过氧化作用可导致细胞膜通透性增强,造成细胞内外的稳态失调,从而引起一系列损害。Cd 能够降低肝脏中谷胱甘肽含量,有效抑制 POD、SOD 和 CAT 活性,改变细胞内的抗氧化系统,使自由基不能及时被清除,造成机体内大量自由基积累。GSH 在清除细胞内 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>、O<sub>2</sub><sup>·-</sup> 和 LOOH 中扮演了重要角色,同时 GST 能够催化外源性毒物与 GSH 反应结合,以保护组织不受氧化胁迫损伤<sup>[33]</sup>。大量的 ROS 会激活 caspase 依赖型途径,诱导细胞凋亡。而 NAC 作为抗氧化剂易进入细胞,脱乙酰基后成为谷胱甘肽前体,能促进还原型谷胱甘肽的合成,而谷胱甘肽氧化-还原循环在机体内具有许多功能,是组织抗氧化损伤的重要内源性防御机制。

本研究表明,斑马鱼胚胎暴露于 CdCl<sub>2</sub> 96 h 后,胚胎的死亡率、畸形率均明显升高,CdCl<sub>2</sub> 处理可致胚胎凋亡细胞明显增多,幼鱼体型短小。幼鱼头部和尾部可见大量细胞凋亡,表明 CdCl<sub>2</sub> 处理可能对中枢神经系统发育有一定影响。Krumnschnabel 等<sup>[34]</sup>

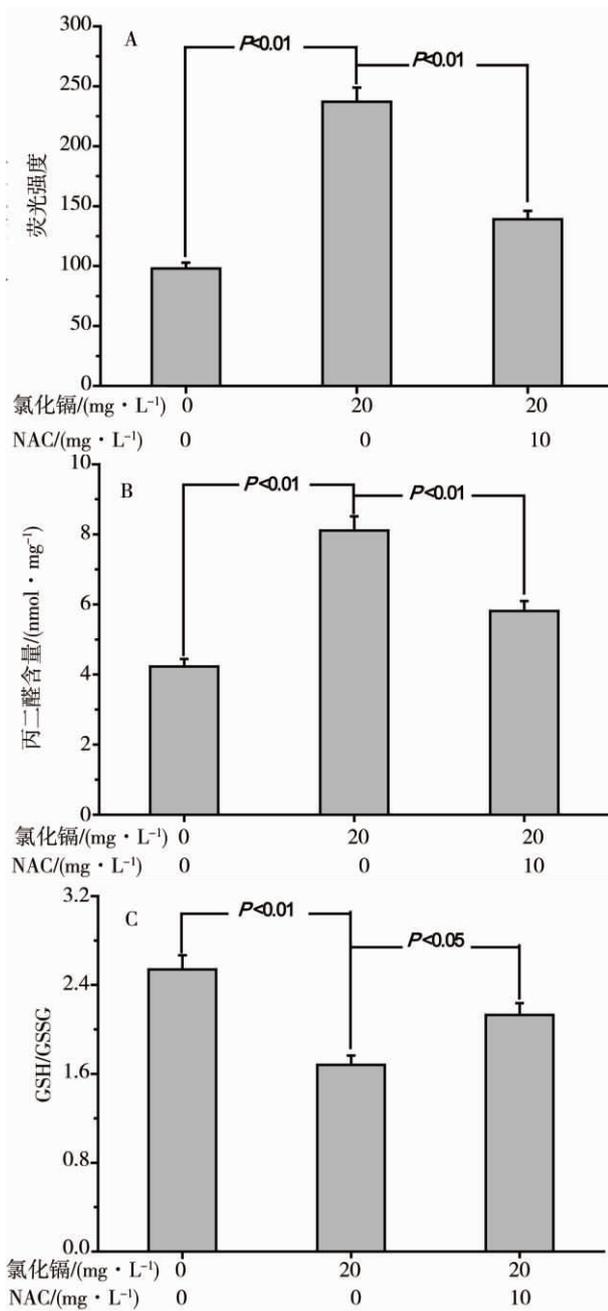


图8 氯化镉对斑马鱼胚胎氧化胁迫状态的影响

Fig. 8 Effect of CdCl<sub>2</sub> on oxidative stress status of zebrafish embryos

2010年研究发现,Cd可以诱导虹鳟鱼细胞坏死性凋亡。Risso-de Faverney等<sup>[35]</sup>2004年研究表明,Cd通过线粒体途径诱导虹鳟鱼肝细胞氧化胁迫,进而导致细胞凋亡。Chen等<sup>[36]</sup>研究发现,Cd诱导ROS产生,进而激活雷帕霉素(mTOR)信号通路,活化胰岛素生长因子受体(IGFR/PI3K),抑制腺苷活化蛋白激酶(PTEN/AMPK),导致神经细胞凋亡。

Long等<sup>[37]</sup>研究发现,ABCC5/MRP5是一种有机阴离子载体,参与机体防御和细胞信号转导。ABCC5在斑马鱼胚胎发育和解除重金属(Cd、Pb等)毒性中扮演了重要角色。显性失活的ABCC5会引起斑马鱼胚胎发育阻滞,而Cd、Pb和Hg等重金属暴露致斑马鱼胚胎ABCC5表达上调。本研究中,较CdCl<sub>2</sub>的单独处理组,NAC与CdCl<sub>2</sub>共同处理组中斑马鱼幼鱼体长明显增长,活性氧水平和MDA含量明显降低。这说明,Cd导致斑马鱼胚胎发育阻滞,可能与ROS诱导ABCC5表达相关。进一步研究表明,CdCl<sub>2</sub>染毒可致斑马鱼胚胎ROS水平和脂质过氧化水平明显升高,降低GSH/GSSG比率,证实CdCl<sub>2</sub>暴露可致胚胎发生严重的氧化应激损伤。细胞的正常代谢可产生各种ROS,过多的ROS会导致这一生理平衡失调,可引起细胞的氧化应激、蛋白质变性、脂质过氧化产物MDA增加以及DNA断裂<sup>[38-41]</sup>;MDA为体内脂质过氧化产物,GSH是体内含巯基的非蛋白化合物,具有保护酶分子和蛋白质免受内源或外源性氧化损伤,二者是评价细胞内氧化还原状态的重要指标。CdCl<sub>2</sub>可造成斑马鱼胚胎氧化应激,影响胚胎正常发育,甚至造成死亡。应用抗氧化剂NAC可明显拮抗CdCl<sub>2</sub>的发育毒性,胚胎孵化率显著升高,畸形率明显降低,胚胎凋亡细胞也明显减少,幼鱼体型增长;与氧化胁迫相关的胚胎ROS和MDA明显降低,而GSH/GSSG比值明显升高。以上数据表明,抗氧化剂NAC可以有效保护Cd暴露造成斑马鱼胚胎的发育毒性,进一步表明CdCl<sub>2</sub>对斑马鱼胚胎的发育毒性作用与氧化应激相关。Hsu等<sup>[42]</sup>近期发现,斑马鱼胚胎暴露于Cd中可致Cu/Zn超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)基因表达下调,进一步影响DNA错配修复基因的表达。然而,生物体内氧化还原平衡状态的调控依赖一套复杂的ROS生成和清除系统,Cd暴露是否仅仅作用于ROS清除系统,又或者也作用于ROS生成系统,尚待更完善的研究以揭示。

通讯作者简介:王振华(1973—),男,细胞生物学博士,副教授,主要研究方向为肿瘤药理学与分子药理学,发表研究论文40余篇,其中SCI收录10篇。

#### 参考文献:

- [1] Takenaka S, Karg E, Kreyling W G, et al. Fate and toxic effects of inhaled ultrafine cadmium oxide particles

- in the rat lung [J]. *Inhalation Toxicology*, 2004, 16 (s1): 83–92
- [2] Daston G P. Toxic effects of cadmium on the developing rat lung. II. Glycogen and phospholipid metabolism [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 1982, 9(1): 51–61
- [3] López E, Arce C, Oset-Gasque M J, et al. Cadmium induces reactive oxygen species generation and lipid peroxidation in cortical neurons in culture [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2006, 40(6): 940–951
- [4] Pathak N, Khandelwal S. Oxidative stress and apoptotic changes in murine splenocytes exposed to cadmium [J]. *Toxicology*, 2006, 220(1): 26–36
- [5] Roméo M, Bennani N, Gnassia-Barelli M, et al. Cadmium and copper display different responses towards oxidative stress in the kidney of the sea bass *Dicentrarchus labrax* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 48(2–3): 185–194
- [6] Pandey S, Ahmad I, Parvez S, et al. Effect of endosulfan on antioxidants of freshwater fish *Channa punctatus* Bloch: 1. Protection against lipid peroxidation in liver by copper preexposure [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 41(3): 345–352
- [7] Sayeed I, Parvez S, Pandey S, et al. Oxidative stress biomarkers of exposure to deltamethrin in freshwater fish, *Channa punctatus* Bloch [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56(2): 295–301
- [8] Stohs S J, Bagchi D. Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 1995, 18(2): 321–336
- [9] Flora S J, Mittal M, Mehta A. Heavy metal induced oxidative stress & its possible reversal by chelation therapy [J]. *Indian Journal of Medical Research*, 2008, 128(4): 501–523
- [10] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. *International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 2007, 39(1): 44–84
- [11] Basha P S, Rani A U. Cadmium-induced antioxidant defense mechanism in freshwater teleost *Oreochromis mossambicus* (Tilapia) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2003, 56(2): 218–221
- [12] Hansen B H, Rømma S, Garmo Φ A, et al. Induction and activity of oxidative stress-related proteins during waterborne Cd/Zn-exposure in brown trout (*Salmo trutta*) [J]. *Chemosphere*, 2007, 67(11): 2241–2249
- [13] Messaoudi I, Barhoumi S, Saïd K, et al. Study on the sensitivity to cadmium of marine fish *Salaria basilisca* [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2009, 21(11): 1620–1624
- [14] Barata C, Varo I, Navarro J C, et al. Antioxidant enzyme activities and lipid peroxidation in the freshwater cladoceran *Daphnia magna* exposed to redox cycling compounds [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(2): 175–186
- [15] Shi H, Sui Y, Wang X, et al. Hydroxyl radical production and oxidative damage induced by cadmium and naphthalene in liver of *Carassius auratus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2005, 140(1): 115–121
- [16] Atli G, Alptekin O, Tükel S, et al. Response of catalase activity to  $Ag^+$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Cr^{6+}$ ,  $Cu^{2+}$  and  $Zn^{2+}$  in five tissues of freshwater fish *Oreochromis niloticus* [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2006, 143(2): 218–224
- [17] Xu Z, Bai S. Effects of waterborne Cd exposure on glutathione metabolism in Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver [J]. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2007, 67(1): 89–94
- [18] 胡蓉, 谢玉华, 唐正义. 汞镉离子对鲫鱼胚胎发育和仔鱼的毒性效应 [J]. *安徽农业科学*, 2010, 38(34): 19446–19448, 19458
- Hu R, Xie Y H, Tang Z Y. Toxic effects of  $Hg^{2+}$  and  $Cd^{2+}$  on embryo development and larva fish of *Carassius auratus* [J]. *Journal of Anhui Agricultural Sciences*, 2010, 38(34): 19446–19448, 19458 (in Chinese)
- [19] Chow E S, Hui M N, Lin C C, et al. Cadmium inhibits neurogenesis in zebrafish embryonic brain development [J]. *Aquatic Toxicology*, 2008, 87(3): 157–169
- [20] Chow E S, Hui M N, Cheng C W, et al. Cadmium affects retinogenesis during zebrafish embryonic development [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 235(1): 68–76
- [21] Asagba S O, Eriyamremu G E, Igberaese M E. Bioaccumulation of cadmium and its biochemical effect on selected tissues of the catfish [J]. *Fish Physiology and Biochemistry*, 2008, 34(1): 61–69
- [22] Ruas C B, Carvalhou C S, de Araújo H S, et al. Oxidative stress biomarkers of exposure in the blood of cichlid species from a metal-contaminated river [J]. *Ecotoxicology Environmental Safety*, 2008, 71(1): 86–93
- [23] Hill A J, Teraoka H, Heideman W, et al. Zebrafish as a model vertebrate for investigating chemical toxicity [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 86(1): 6–19
- [24] Spitsbergen J M, Kent M L. The state of the art of the

- zebrafish model for toxicology and toxicologic pathology research—Advantages and current limitations [J]. *Toxicology Pathology*, 2003, 31( s1): 62–87
- [25] Braunbeck T, Böttcher M. OECD Guideline for the Testing of Chemicals [EB/OL]. (2006-05-30) [2013-11-21]. <http://www.oecd.org/chemicalsafety/testing/36817242.pdf>
- [26] Dar S, Shuja R N, Shakoori A R. A synthetic cadmium metallothionein gene (PMCd1syn) of Paramecium species: Expression, purification and characteristics of metallothionein protein [J]. *Molecular Biology Reports*, 2013, 40(2): 983–997
- [27] Onodera A, Tani M, Michigami T, et al. Role of megalin and the soluble form of its ligand RAP in Cd-metallothionein endocytosis and Cd-metallothionein-induced nephrotoxicity in vivo [J]. *Toxicology Letters*, 2012, 212(2): 91–96
- [28] Miura S, Takahashi K, Imagawa T, et al. Involvement of TRPA1 activation in acute pain induced by cadmium in mice [J]. *Molecular Pain*, 2013, 9(1): 7–16
- [29] Liu D, Yang J, Wang L. Cadmium induces ultrastructural changes in the hepatopancreas of the freshwater crab *Sinopotamon henanense* [J]. *Micron*, 2013, 47: 24–32
- [30] Chang K C, Hsu C C, Liu S H, et al. Cadmium induces apoptosis in pancreatic  $\beta$ -cells through a mitochondria-dependent pathway: The role of oxidative stress-mediated c-Jun N-terminal kinase activation [J]. *PLOS ONE*, 2013, 8(2): e54374, doi:10.1371/journal.pone.0054374
- [31] Vaughan M, van Egmond R. The use of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo for the acute toxicity testing of surfactants, as a possible alternative to the acute fish test [J]. *ATLA—Alternatives Laboratory Animals*, 2010, 38(3): 231–238
- [32] Chan P K, Cheng S H. Cadmium-induced ectopic apoptosis in zebrafish embryos [J]. *Archives of Toxicology*, 2003, 77(2): 69–79
- [33] van der Oost R, Beyer J, Vermeulen N P E. Fish bioaccumulation and biomarkers in environmental risk assessment: A review [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2003, 13(2): 57–149
- [34] Krumschnabel G, Ebner H L, Hess M W, et al. Apoptosis and necroptosis are induced in rainbow trout cell lines exposed to cadmium [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(1): 73–85
- [35] Risso-de Faverney C, Orsini N, de Sousa G, et al. Cadmium-induced apoptosis through the mitochondrial pathway in rainbow trout hepatocytes: Involvement of oxidative stress [J]. *Aquatic Toxicology*, 2004, 69(3): 247–258
- [36] Chen L, Xu B, Liu L, et al. Cadmium induction of reactive oxygen species activates the mTOR pathway, leading to neuronal cell death [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2011, 50(5): 624–632
- [37] Long Y, Li Q, Li J, et al. Molecular analysis, developmental function and heavy metal-induced expression of ABCC5 in zebrafish [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology B: Biochemistry and Molecular Biology*, 2011, 158(1): 46–55
- [38] Zenzes M T, Krishnan S, Krishnan B, et al. Cadmium accumulation in follicular fluid of women in vitro fertilization embryo transfer is higher in smokers [J]. *Fertility and Sterility*, 1995, 64(3): 599–603
- [39] Inoguchi T, Takayanagi R. Role of oxidative stress in diabetic vascular complications [J]. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 2008, 99(3): 47–55
- [40] Kelly K A, Havrilla C M, Brady T C, et al. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(7): 375–384
- [41] Liochev S I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging [J]. *Free Radical Biology and Medicine*, 2013, 60: 1–4
- [42] Hsu T, Huang K M, Tsai H T, et al. Cadmium (Cd)-induced oxidative stress down-regulates the gene expression of DNA mismatch recognition proteins MutS homolog 2 (MSH2) and MSH6 in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 126: 9–16

