

文章编号:1000-0615(2012)04-0522-07

DOI:10.3724/SP.J.1231.2012.27749

重金属离子 Cd^{2+} 对泥蚶鳃及肝脏细胞显微和超微结构的影响

陈彩芳¹, 沈伟良², 霍礼辉³, 刘浩明⁴, 林志华^{1*}

(1. 浙江万里学院生物与环境学院, 浙江 宁波 315100;

2. 宁波市海洋与渔业研究院, 浙江 宁波 315100;

3. 宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315100;

4. 中国海洋大学水产学院, 山东 青岛 266003)

摘要: 研究了镉(Cd)的各个不同暴毒浓度(5, 15, 45, 90 $\mu\text{g/L}$)对泥蚶鳃和肝脏组织显微结构的影响, 及高浓度暴毒情况下对泥蚶鳃和肝脏组织超微结构的影响。实验处理时间为96 h。结果发现, 随着暴毒浓度的升高, 鳃丝内腔隙肿胀, 内有血细胞堆积, 最后鳃丝出现断裂融合, 其上的呼吸上皮细胞脱落, 超微结构发现鳃上皮细胞中出现黑色嗜钺性物质, 且次级溶酶体和线粒体数量都增加, 最后细胞内出现空泡现象; Cd对肝脏显微结构的影响不大, 仅出现了黄色沉积物, 超微结构表明, 肝细胞内亦出现了嗜钺性物质, 次级溶酶体亦大量增加, 这些现象与鳃丝内出现的情况一致, 且肝细胞核还出现变形皱缩, 甚至产生空泡, 细胞出现了不可逆的损伤。最为敏感的线粒体和内质网没有出现损伤现象, 研究推测可能是由于机体内Cd诱导产生的抗氧化活性酶作用的结果。

关键词: 泥蚶; 镉; 鳃; 肝; 超微结构

中图分类号: X 503.225; S 917

文献标志码: A

重金属污染是“十一五”凸显的重大环境问题。国家“十二五”首个规划剑指“重金属污染”, 并以镉(Cd)、铅(Pb)、汞(Hg)、铬(Cr)和类金属砷(As)等生物毒性强且污染严重的重金属元素为第一类规划对象。我国近海海域面积广阔, 由北至南涉及沿海11个省份。随着沿海地区经济发展和海洋资源的加快开发, 近岸海域普遍受到Cd和Pb等重金属的污染。重金属多为非降解型有毒物质, 易被生物富集并有生物放大效应, 严重威胁人类和水生生物的生存。目前关于Cd对水生生物的研究主要集中在急性毒性^[1-4], 生理生化指标影响^[4-7]等方面, 对鳃和肝脏等组织的显微超微结构影响却很少见报道^[8]; 且研究动物多集中在鱼类、甲壳类、固着型双壳贝类, 对近岸滩涂埋栖型贝类的相关研究很少。

泥蚶(*Tegillarca granosa*)是我国重要的传统经

济贝类, 也是浙江省最主要的滩涂养殖特色品种。近年来, 泥蚶产品质量检测经常发现存在Cd和Pb等重金属含量超标现象, 这是因为海洋双壳贝类由于其自身用于代谢的混合氧化系统存在缺陷, 导致其体内化合物的释放比鱼类和甲壳类等要慢很多, 从而造成其体内保持较高的重金属富集程度。上述富集特性, 以及贝类特有的营固着和附着或埋栖性的生活习性使得它们成为环境监测的理想指示生物。如河口生态系统中的软体动物牡蛎通常被选作重金属污染的指示物种^[9]。

本实验研究了短期重金属Cd暴毒对泥蚶鳃和肝脏细胞超微结构的影响, 在亚细胞水平上探讨其对泥蚶鳃和肝脏结构影响的原因及其制毒解毒机制, 以为滩涂贝类生态毒理学研究提供基础资料。

收稿日期: 2011-09-25 修回日期: 2011-12-19

资助项目: 国家科技支撑计划(2009BADB7B02); 国家贝类产业技术体系(CARS-48); 宁波市自然科学基金(2011A610016);

浙万院省重中之重学科开放基金(KF2011005); 浙江省大学生科研创新团队项目

通讯作者: 林志华, E-mail: zhihua9988@126.com

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验用泥蚶采集于宁波象山县泗洲头镇养殖场, 所选泥蚶健康无病、壳体完整、壳表干净、无损伤, 实验动物壳长为 (30.54 ± 0.62) mm, 壳高为 (23.29 ± 1.08) mm。采用象山港的自然海水暂养 7 d, 海水盐度 19, 温度 (20 ± 1) °C, 连续充气, 日换水量 50%, 并适量投喂藻类。

1.2 实验方法

实验设计及日常管理 实验用 $\text{Cd}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 配置 100 mg/L 的 Cd^{2+} 母液, 成倍稀释母液加入 5 L 养殖用水中配制相应 Cd^{2+} 浓度。养殖用水中 Cd^{2+} 浓度为 0.03 $\mu\text{g/L}$ 。基于环境监测权威数据及前期重金属暴毒预实验, 设计 4 个重金属浓度梯度, 分别为 5、15、45、90 $\mu\text{g/L}$ 。所有浓度梯度均设 3 个平行组, 并以不添加任何重金属离子组为对照组。暴毒期间不投喂。

重金属 Cd 暴毒实验于 2010 年 11 月进行, 各浓度梯度组放置 50 只泥蚶, 实验期间管理同暂养期间, 但日换水量为 100%, 消除重金属附壁等作用导致实验用水中重金属浓度降低。取样时间为 96 h, 所有浓度组泥蚶鳃及肝脏组织均进行光镜观察, 高浓度组 (45、90 $\mu\text{g/L}$) 泥蚶组织样品还用于电镜观察。每次随机从各浓度组抽取 3 只泥蚶样品, 对于高浓度组泥蚶将其组织样品一分为二, 一部分用作光镜观察, 相对应的余下部分用作电镜观察。

光镜样品的制备与观察 用于光镜观察的泥蚶组织用 Bouin 氏液固定, 石蜡包埋, 切片厚度为 7 μm ; 采用传统的苏木精-曙红染色法 (H.E) 染色, BK5000 显微镜观察并拍照。

电镜样品的制备与观察 用于电镜观察的鳃及肝脏组织则用 2.5% 戊二醛固定液前固定 3 h (4 °C), 1% 锇酸后固定 2 h, 之后进行乙醇梯度脱水, 环氧树脂 812 包埋, RMC POWER-TOME XL 超薄切片机切片, 最后超薄切片用柠檬酸铅和醋酸双氧铀染色, 日立透射电镜 H-7650 观察和拍摄。

2 结果

2.1 重金属离子 Cd^{2+} 对泥蚶鳃显微和超微结构的影响

泥蚶具两片状的瓣鳃, 在外套腔中, 位于内脏块腹面, 身体左右两侧均有。鳃由鳃瓣组成, 每个

鳃瓣由鳃小瓣构成, 每个鳃小瓣由许多与身体纵轴垂直的鳃丝靠丝间联结连接而成。鳃丝表面的呼吸上皮细胞在外缘排列比较整齐, 细胞及细胞核较大, 核多呈椭圆形 (图版 I-1)。鳃丝内腔充盈着结缔组织。

由显微结构观察表明, 在低浓度组, 鳃丝脱离软骨组织, 且鳃丝内开始出现腔隙 (图版 I-2); 到高浓度组 45 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理 96 h 时, 鳃丝内腔隙变得更大, 腔隙内血细胞堆积 (图版 I-3); 到 90 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理 96 h 时, 鳃丝与软骨组织脱离得更加严重, 鳃丝融合、断裂, 呼吸上皮细胞脱落 (图版 I-4)。

超微结构表明, 45 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理 96 h 时, 鳃上皮细胞中开始出现嗜碱性物质, 次级溶酶体和线粒体都较对照组开始增多 (图版 II-2,3); 90 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理 96 h 时, 次级溶酶体继续增加, 且细胞内出现空泡现象 (图版 II-4), 次级溶酶体和线粒体都较对照组开始增多 (图版 II-4)。

2.2 重金属离子 Cd^{2+} 对泥蚶肝脏显微和超微结构的影响

肝脏是瓣鳃纲软体动物的主要消化腺, 由许多圆形或不规则形状肝小管组成 (图版 III-1)。各浓度组重金属 Cd 对泥蚶肝脏的显微结构影响不大, 仅见高浓度组肝细胞内有黄色物质沉积 (图版 III-2)。

超微结构观察得出, 45 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理 96 h 时, 肝细胞内沉积大量黑色嗜碱性物质 (图版 IV-2), 且细胞内次级溶酶体也随之出现 (图版 IV-3); 90 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理 96 h 时, 肝细胞内沉积的黑色嗜碱性物质和溶酶体继续大幅增加 (图版 IV-4,5), 且细胞核出现变形皱缩, 甚至产生空泡, 细胞开始凋亡 (图版 IV-4, 6)。

3 讨论

3.1 Cd^{2+} 对泥蚶鳃结构和功能的影响

鳃是双壳贝类的呼吸滤食器官, 直接与水环境接触, 具有气体交换和调节离子平衡的重要作用。鳃的损坏往往破坏其呼吸作用, 打破体内离子平衡, 甚至导致生物体的死亡^[10-11]。本研究结果表明, 随着重金属 Cd 浓度的增加, 显微结构表明其鳃丝内腔隙显著增大, 腔隙内血细胞堆积, 直至鳃丝相互融合、断裂, 呼吸上皮细胞出现脱落。这与其他贝类中的研究结果相一致; Sunila^[12] 对暴毒于 Cd 等重金属下的紫贻贝 (*Mytilus edulis*) 进行显微观察发现, 其

鳃首先开始发生炎症反应,伴随着鳃血腔膨大,血细胞聚集。重金属对贝类鳃造成的鳃丝融合、断裂的损伤作用也在*Mytilus galloprovincialis*^[13]和*M. edulis*^[14]中有所报道。超微结构发现,随着暴毒浓度的增加,鳃上皮细胞出现黑色嗜碱性物质和次级溶酶体,且线粒体有一定程度的增多,细胞内也出现了空泡现象。我们推测嗜碱性物质为重金属在贝体内的累积,且出现的次级溶酶体,对重金属累积具有一定的解毒作用。在牡蛎内也得到了类似的结论, Cd^{2+} 在溶酶体内聚集,溶酶体对重金属积累会产生不溶性颗粒,之后通过滞留或者细胞分泌从而解毒,因此,将积累的 Cd^{2+} 输送到溶酶体,通过解毒功能减轻潜在的毒性^[15]。本实验还发现,在 Cd^{2+} 作用下泥蚶鳃腔内出现充血现象、线粒体增加,可能是对呼吸作用受到抑制的一种补偿反映。

3.2 Cd^{2+} 对泥蚶肝脏结构和功能的影响

肝脏是双壳贝类的主要消化腺,能参与机体解毒及排泄过程,是重金属等污染物在机体内代谢最活跃的器官。一般情况下,水体中 Cd^{2+} 经由鳃摄入鱼体后,经血液循环到达肝脏等器官并重新分布积累,当 Cd^{2+} 浓度积累到一定程度后,超过了肝脏的解毒能力,就会对肝细胞及其超微结构产生不同程度影响^[8]。本实验结果可以看出,重金属离子 Cd^{2+} 对肝脏的毒害作用大于其对鳃的毒害作用。 Cd^{2+} 对泥蚶肝细胞的影响表现为随着暴毒重金属浓度的升高,显微结构下有黄色物质沉积,超微结构发现嗜碱性物质和溶酶体均增加,且细胞核出现变形,核凹陷甚至出现空泡。这与 Cd^{2+} 对弹涂鱼肝脏的结果相一致^[8], Cd^{2+} 引起弹涂鱼肝细胞内溶酶体数量增加,整个细胞核变形,核物质外泄,细胞出现不可逆的损伤。软体动物溶酶体是重金属存储的重要细胞器,特别是在富含溶酶体的肝胰腺组织,溶酶体数量的增加,与解毒机制密切相关^[15]。当重金属离子浓度不断增加,一旦超过肝细胞的自身修复补偿能力,肝细胞损伤将不可逆转,严重时会导致生物体死亡。

一般情况下,线粒体和内质网是生物体肝细胞内最为敏感的功能细胞器^[8,16]。将弹涂鱼暴露于100 mg/L Cd^{2+} 处理10 d后发现其细胞器受到了不同程度的损伤,线粒体扭曲变形,内质网膨胀,细胞核变形,核膜肿胀,而1000 mg/L Cd^{2+} 处理10 d后发现其肝细胞内所有的细胞器均受到严重影响,

细胞质内容物大量泄露,胞浆空泡化,细胞器极少,残存细胞器的结构不完整^[8]。对斑马鱼(*Danio rerio*)进行 Cd^{2+} 暴毒实验1 d和7 d后,发现其肝脏内SOD和CAT活性先升高,但随着暴露时间及暴露浓度的增加,诱导效应降低^[6]。前者与中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)肝脏SOD在 Cd^{2+} 暴露下的表达趋势相一致^[17],后者与克氏原螯虾(*Procambarus clarrii*)肝胰腺触角腺CAT在 Cd^{2+} 暴露下的结果一致^[18]。而生物体在逆境中产生的大量自由基,主要靠这些抗氧化防御酶的清除,使机体维持较低而有效地自由基浓度,防止自由基对蛋白、脂类、DNA等大分子的损伤^[6]。本实验中,肝脏各细胞器没有发现损伤现象,推测是由于处理时间短及低剂量暴毒浓度有关,可能没有超出其体内的抗氧化防御系统的能力,且在短期内, Cd^{2+} 对SOD及CAT这些抗氧化活性酶具有诱导作用,使得机体对抗逆境的能力提高。

本实验中泥蚶并没有发生死亡现象,实验推测这可能与处理时间过短有关。一定浓度范围内的短期暴毒实验或者环境污染,虽将不会引起水生生物的死亡,但是对生物体的各功能器官及生理代谢过程肯定会有一定的影响。

参考文献:

- [1] 刘天红,孙福新,王颖,等. 无机镉对栉孔扇贝(*Chlamys farreri*)急性毒性研究及其安全评价[J]. 食品研究与开发, 2010, 31(4): 161-165.
- [2] 李玉环,林洪. 镉对海湾扇贝的急性毒性研究[J]. 海洋水产研究, 2006, 27(6): 80-83.
- [3] 闫沁远,祁建红. Cd对孝感地区鲫鱼的急性毒性及安全浓度试验[J]. 湛江师范学院学报, 2008, 29(3): 77-80.
- [4] 于丰军. 铅和镉两种重金属对中华绒螯蟹的毒性效应研究[D]. 上海: 华东师范大学, 2005.
- [5] 吕永红. 重金属离子对菲律宾蛤仔呼吸代谢的影响[J]. 齐鲁渔业, 2008, 25(6): 22-24.
- [6] 宋志慧,王庆伟. Cu^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cr^{6+} 胁迫对斑马鱼抗氧化酶活性的影响[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(8): 4739-4741.
- [7] 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[J]. 水生生物学报, 2006, 30(4): 399-403.
- [8] 刘冰,周忠良. 镉对弹涂鱼肝细胞超微结构影响的初步观察[J]. 水产学报, 2007, 31(1): 29-33.
- [9] 陈春,周启星. 金属硫蛋白作为重金属污染生物标志物的研究进展[J]. 农业环境科学学报, 2009, 28(3): 425-432.
- [10] Ghate H V, Mulherkav L. Histological changes in the gill of two freshwater prawn species exposed to copper

- sulphate[J]. *Indian Journal of Experimental Biology*, 1979, 17: 838–840.
- [11] Tuurala H, Nikinmaa M, Soivio A. Gill damage as a determinant of residual oxygen concentration in the sealed jar test[J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1985, 34: 385–389.
- [12] Sunila I. Acute histological responses of the gill of the mussel, *Mytilus edulis*, to exposure by environmental pollutants[J]. *Journal of Invertebrate Pathology*, 1988, 52(1): 137–141.
- [13] Domouhtsidou G P, Dimitriadis V K. Ultrastructural localization of heavy metals (Hg, Ag, Pb, and Cu) in gills and digestive gland of mussels, *Mytilus galloprovincialis*(L.) [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2000, 38: 472–478.
- [14] Sunila I. Histopathology of mussels (*Mytilus edulis* L.) from the Tvärminne area, the Gulf of Finland (Baltic Sea)[J]. *Annales Zoologici Fennici*, 1987, 24: 55–69.
- [15] Sokolova I M, Ringwood A H, Johnson C. Tissue specific accumulation of cadmium in subcellular compartments of eastern oysters *Crassostrea virginica* Gmelin [J]. *Aquatic Toxicology*, 2005, 74: 218–228.
- [16] 刘晓晖. 温度和铜对鲤鱼肝脏细胞超微结构的影响[D]. 哈尔滨: 东北师范大学, 2006.
- [17] 潘鲁青, 任加云, 吴众望. 重金属离子对中华绒螯蟹肝胰脏和鳃丝SOD, CAT活性的影响[J]. *中国海洋大学学报*, 2004, 34(2): 189–194.
- [18] 呼光富, 李忠, 梁宏伟, 等. 镉对克氏原螯虾肝胰脏触角腺及鳃中SOD和CAT活性的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2009, 28(9): 1806–1811.

Effects of cadmium on the microstructure and ultrastructure of gill and hepatopancreas in *Tegillarca granosa*

CHEN Cai-fang¹, SHEN Wei-liang², HUO Li-hui³, LIU Hao-ming⁴, LIN Zhi-hua^{1*}

(1. College of Biological and Environmental Sciences, Zhejiang Wanli University, Ningbo 315100, China;

2. Ningbo Academy of Ocean and Fishery, Ningbo 315100, China;

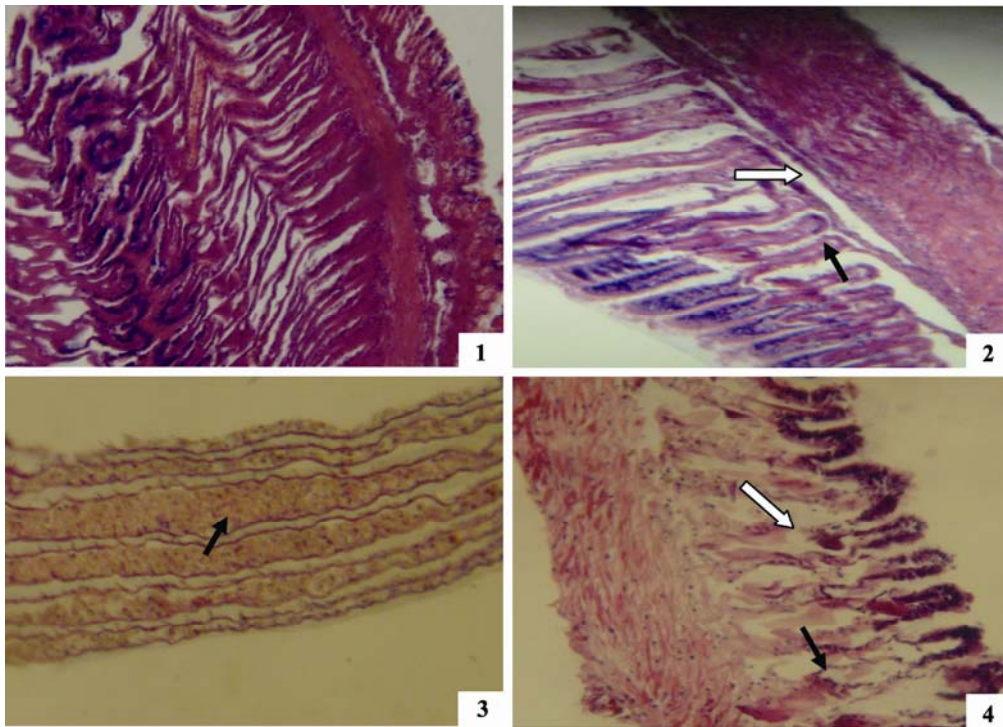
3. Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315100, China;

4. College of Fisheries, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: The aim of this paper is to investigate the toxic influence of cadmium on the histopathological alterations of gill and hepatic cells in *Tegillarca granosa* exposed to various concentrations of cadmium (5 $\mu\text{g/L}$, 15 $\mu\text{g/L}$, 45 $\mu\text{g/L}$, 90 $\mu\text{g/L}$). The experiment lasted for 96 hours. The results are as follows: as the metal concentration rose, the gill cavity swelled, in which stored lots of haemocytes; finally the gill broke and dissolved, where the epithelia cells dropped; the findings of ultrastructure showed that there was granular osmiophilic material in gill epithelia cells, moreover, the number of secondary lysosome and mitochondrion increased, and the cells became vacuolated. The influence of cadmium on the microstructure of hepatic cells was not obvious, only turning up some yellow sediment. However, its ultrastructure results indicated that the granular osmiophilic material was also present, and the secondary lysosome increased as well, consistent with the cases in gill; Furthermore, the nucleus of hepatic cells deformed and shrank, even showed vacuoles, suggesting the cells were irreversibly damaged. But the two most sensitive organelle, mitochondrion and endoplasmic reticulum, were normal, so we infer that the results may be caused by antioxidant enzymes, which were induced by cadmium.

Key words: *Tegillarca granosa*; cadmium; gill; hepatopancreas; ultrastructure

Corresponding author: LIN Zhi-hua. E-mail: zhihua9988@126.com

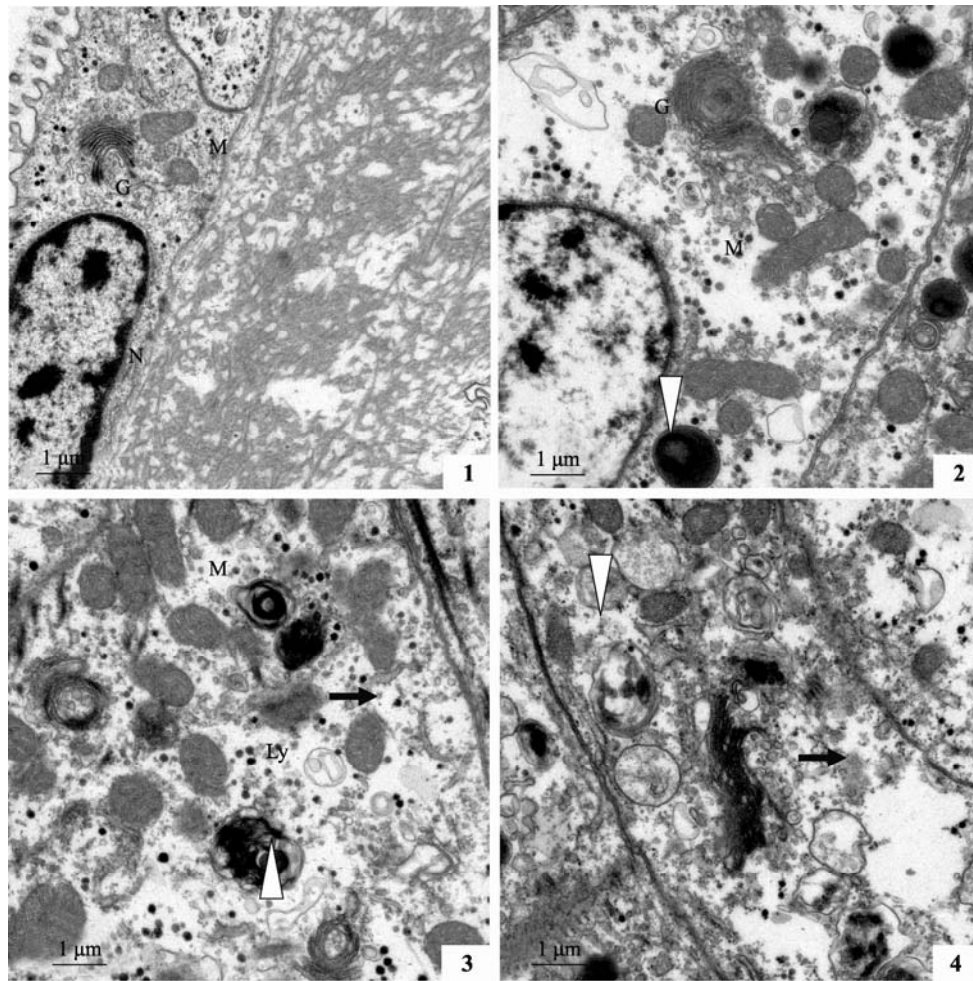


图版 I Cd^{2+} 对泥蚶鳃丝显微结构的影响

1.对照组鳃结构($\times 400$); 2.低浓度组泥蚶鳃丝结构($\times 400$), 白箭头示鳃丝脱离软骨组织, 黑箭头示鳃丝出现空腔; 3.45 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理96h泥蚶鳃丝结构($\times 400$), 箭头示血细胞堆积; 4.90 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} 处理96h泥蚶鳃丝结构($\times 400$), 白箭头示鳃丝断裂融合, 黑箭头示鳃上皮细胞脱落。

Plate I Effects of Cd^{2+} on gill microstructure in *T. granosa*

Microstructure of gill in control group($\times 400$); 2. Microstructure of gill in low concentration group($\times 400$), white arrow shows gill isolating from the cartilage tissue, black arrow shows gill cavity swelling; 3. Microstructure of gill exposed to 45 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} for 96 h($\times 400$), the arrow shows haemocytosis assembling; 4. Microstructure of gill exposed to 90 $\mu\text{g/L}$ Cd^{2+} for 96 h($\times 400$), white arrow shows gill breaking and dissolving, black arrow shows epithelia cells dropping.

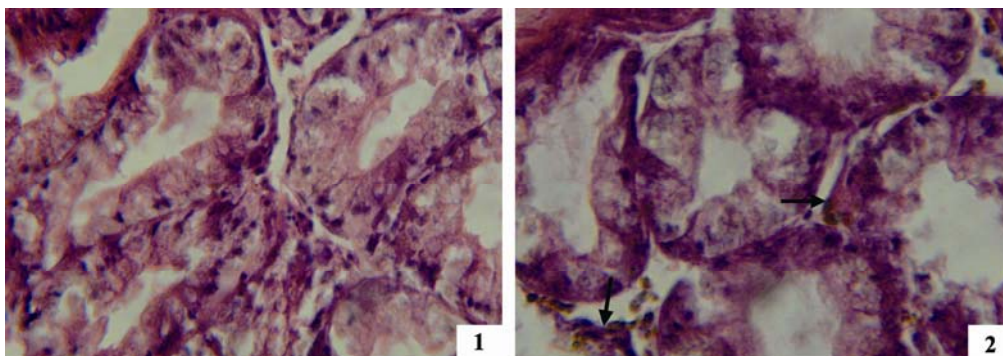


图版 II Cd²⁺对泥蚶鳃丝超微结构的影响

1.对照组鳃超微结构(×25000); 2.45 μg/L Cd²⁺处理96 h泥蚶鳃上皮细胞出现嗜铁性物质(×30000, 箭头所示);3.45 μg/L Cd²⁺处理96 h泥蚶鳃上皮细胞线粒体(黑箭头所示)和次级溶酶体(白箭头所示)均增加(×30000); 4.90 μg/L Cd²⁺处理96 h泥蚶鳃上皮细胞出现空泡现象(黑箭头所示)及次级溶酶体增加(白箭头所示)(×30000)(G: 高尔基体, M: 线粒体, N: 细胞核, Ly: 溶酶体)。

Plate II Effects of Cd²⁺ on gill ultrastructure in *T. granosa*

1. Ultrastructure of gill in control group(×25000); 2. Granular osmiophilic material of gill epithelia cells in 45 μg/L Cd²⁺ group exposed for 96 h (×30000, the arrow shows); 3. Mitochondrion (black arrow shows) and secondary lysosome (white arrow shows) of gill epithelia cells increasing in 45 μg/L Cd²⁺ group exposed for 96 h (×30000); 4. Vacuoles (black arrow shows) and secondary lysosome (white arrow shows) increasing in gill epithelia cells in 90 μg/L Cd²⁺ group exposed for 96 h (×30000)(G: golgi complexe, M: Mitochondrion, N: nucleus, Ly: lysosome).

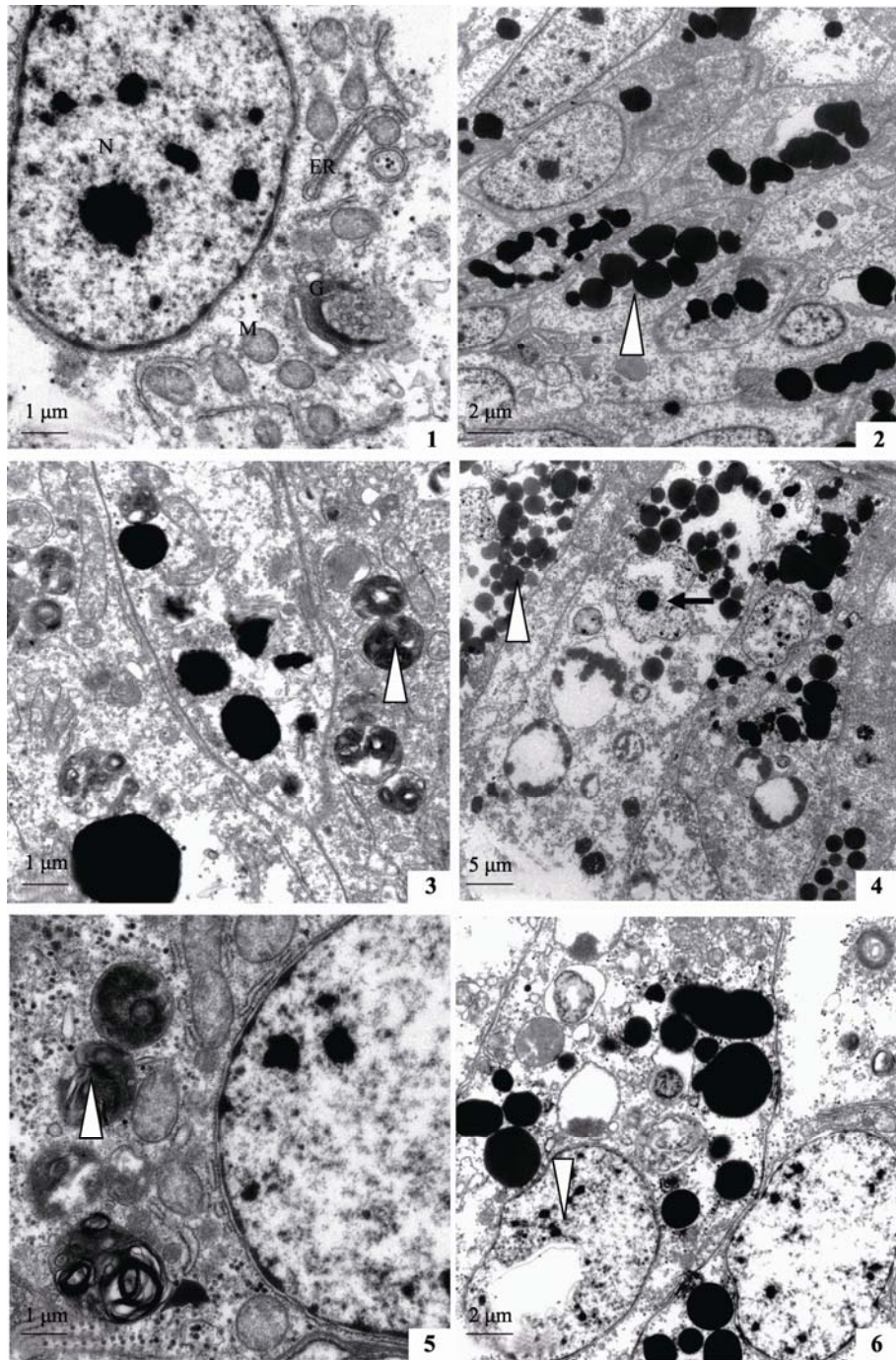


图版 III Cd²⁺对泥蚶肝脏显微结构的影响

1. 对照组肝脏结构(×400); 2. 高浓度组泥蚶肝细胞内有黄色物质沉积(×400, 箭头所示)。

Plate III Effects of Cd²⁺ on hepatopancreas microstructure in *T. granosa*

1. Microstructure of hepatopancreas in control group(×400); 2. Yellow sediment in hepatic cells in high concentration group (×400, the arrow shows).



图版IV Cd^{2+} 对泥蚶肝脏超微结构的影响

1. 对照组肝细胞超微结构($\times 25000$); 2. $45 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 处理96 h泥蚶肝细胞出现嗜铁性物质($\times 8000$, 箭头所示); 3. $45 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 处理96 h泥蚶肝细胞出现次级溶酶体($\times 20000$, 箭头所示); 4. $90 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 处理96 h泥蚶肝细胞继续沉积大量嗜铁性物质(白箭头所示), 细胞核皱缩出现空泡(黑箭头所示)($\times 5000$); 5. $90 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 处理96 h泥蚶肝细胞内次级溶酶体数量增加($\times 30000$, 箭头所示); 6. $90 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ 处理96 h泥蚶肝细胞细胞核皱缩出现空泡($\times 12000$, 箭头所示)(ER: 粗面内质网, N: 细胞核, M: 线粒体, G: 高尔基体)

Plate IV Effects of Cd^{2+} on hepatopancreas ultrastructure in *T. granosa*

1. Ultrastructure of hepatopancreas in control group($\times 25000$); 2. Granular osmiophilic material of hepatic cells in $45 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ group exposed for 96 h ($\times 8000$, the arrow shows); 3. Secondary lysosome of hepatic cells increasing in $45 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ group exposed for 96 h ($\times 20000$, the arrow shows); 4. Lots of granular osmiophilic material (white arrow shows) and nucleus shrinking even vacuolating (black arrow shows) in hepatic cells in $90 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ group exposed for 96 h ($\times 5000$); 5. Secondary lysosome increasing in hepatic cells in $90 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ group exposed for 96 h ($\times 30000$, the arrow shows); 6. Nucleus shrinking, even vacuolating in hepatic cells in $90 \mu\text{g/L Cd}^{2+}$ group exposed for 96 h ($\times 12000$, the arrow shows)(ER: endoplasmic reticulum, N: nucleus, M: Mitochondrion, G: golgi complex)