

Cu^{2+} 急性毒性下银鲳幼鱼红细胞核异常和 抗氧化酶活性的变化

周健恺, 徐善良*, 邱成功, 陈 苹, 方增冰, 王腾飞
(宁波大学海洋学院,应用海洋生物技术教育部重点实验室,浙江 宁波 315211)

摘要:为探究 Cu^{2+} 对银鲳幼鱼的致毒效应,采用静态毒性实验方法,开展了 Cu^{2+} 对银鲳幼鱼的急性暴露实验,研究了不同浓度的 Cu^{2+} 对银鲳幼鱼外周血细胞微核率、核异常率和肝脏抗氧化酶(SOD、CAT、GPX)活性变化的影响。结果表明: Cu^{2+} 对银鲳幼鱼 48 和 96 h 的 LC_{50} 分别为 0.860 和 0.770 mg/L,安全质量浓度为 0.077 mg/L; Cu^{2+} 的浓度与银鲳幼鱼红细胞微核率及核异常率具有明显的剂量效应关系,在相同浓度 Cu^{2+} 胁迫下,核异常率又普遍高于微核率;不同浓度 Cu^{2+} 胁迫下银鲳幼鱼肝组织中的 SOD、CAT、GPX 活性均表现为低浓度被诱导而高浓度受抑制的规律,与 Cu^{2+} 浓度呈抛物线型剂量效应关系。研究认为红细胞微核率、核异常率与 SOD、CAT 和 GPX 活性的变化均可以反映银鲳幼鱼受伤害的程度,并可用作银鲳安全性风险评价的参考依据,其中 SOD 还可以灵敏地指示低浓度的早期 Cu^{2+} 污染。

关键词: 银鲳; Cu^{2+} ; 微核率; 核异常率; 抗氧化酶

中图分类号: S 917.4

文献标志码: A

铜既是鱼类生长发育所不可或缺的微量元素,也是水环境中极为常见的重金属,它不仅广泛存在于工业污染物中,而且在渔药(CuSO_4 等)中也很常见。已有研究表明适宜浓度的 Cu^{2+} 有利于鱼类生长发育^[1],但高浓度的 Cu^{2+} 会伤害鱼类的抗氧化系统^[2],且具有一定的遗传毒性^[3-4]。近年来,由于我国海洋中铜污染的加剧,以及水产养殖中 CuSO_4 等渔药的广泛使用导致生产中铜污染的安全事故时有发生。银鲳(*Pampus argenteus*)隶属鲈形目(Perciformes),鲷科(Stromateidae),鲷属(*Pampus*),是我国重要的经济鱼种之一,在我国黄海南部和东北部分布较为集中^[5]。虽然,国内已开展了银鲳人工养殖研究^[6],并已对银鲳的营养成分分析^[7]、繁殖生物学^[8]、饵料营养^[9]等方面有过研究,但未见关于 Cu^{2+} 对银鲳的急性致毒效应,以及由此引起的遗传毒性和抗氧化酶活性变化等方面的研究。因此本实验研究 Cu^{2+} 对银鲳的毒性效应具有一定的

实践意义,以期了解 Cu^{2+} 对银鲳幼鱼的安全浓度以及对抗氧化酶活性影响和血细胞的微核作用,为银鲳养殖中的安全用药提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材料及实验条件

银鲳幼鱼取自宁波岳井洋渔业开发有限公司银鲳养殖池,实验用鱼选择无病无伤、健康的个体,体长(5.3 ± 0.25) cm,体质量(3.5 ± 0.12) g。实验容器为容积 100 L 的聚乙烯塑料桶,实验前在桶中暂养 7 d,每天定时投喂日本林兼产业株式会社生产的 5#“鱼宝”饲料,实验前停食 1 d。实验用水为二级沙滤海水,pH 值为 8.21 ± 0.3 ,盐度为 20.3 ± 0.8 ,水温为(25 ± 1) $^{\circ}\text{C}$ 。

1.2 主要仪器和试剂

酶标仪(Multiskan FC 型);可见分光光度计(UV-2100 型);冷冻离心机(GL-166-11 型)。硫酸铜(分析纯);SOD 试剂盒、CAT 试剂盒、GPX 试剂盒(南京建成生物研究所)。

收稿日期:2014-02-27 修回日期:2014-05-14

资助项目:海洋公益性行业科研专项(201105009-3);国家星火计划引导项目(S2013C220066);宁波市重大攻关项目(2012C10020)

通信作者:徐善良,E-mail:xushanliang@nbu.edu.cn

1.3 实验方法

急性毒性实验参照《鱼类急性毒性试验方法》^[10],通过预实验,找出 24 h 全部死亡和 96 h 全部存活的 Cu²⁺ 浓度范围。然后在此范围内按等对数梯度设计 6 个 Cu²⁺ 浓度组 0.200、0.299、0.450、0.670、1.000 和 1.210 mg/L,设 1 个对照组,每个梯度设 3 平行,每平行 10 尾幼鱼,实验持续 96 h。每 24 h 更换新配置的实验药液,每隔 12 h 观察记录幼鱼的活动状况和中毒症状,并及时捞出死亡个体。判断死亡的标准为用玻璃棒触及尾部无反应。统计 48 和 96 h 的死亡情况。

红细胞微核及核异常观察 设计 6 个 Cu²⁺ 剂量组 0.200、0.299、0.450、0.670、1.000 和 1.210 mg/L 进行微核实验,以砂滤海水组作为对照,每个梯度设 3 平行,每平行 10 尾幼鱼,染毒 48 h 后,从各浓度组中取鱼 3 尾,断尾取血制备血涂片^[11],每尾鱼至少制作 5 张涂片,涂片晾干后,用卡诺固定液固定 15 min,瑞氏染色液染色 1 min,再用 Giemsa 染液染色 20 min,用水或磷酸缓冲液冲洗,自然晾干。置于高倍镜下观察,每片随机观察统计 2 000 个以上红细胞,记录具有微核及核异常的细胞数,并用电子目镜对典型的微核细胞、核变异的细胞进行拍照。微核率、核异常率、总核异常率均用千分率(‰)表示。

SOD、CAT 和 GPX 活性的测定 在微核实验取血结束后将鱼体迅速解剖,取其肝脏,准确称取组织重量,加入 9 倍体积 4 ℃ 预冷的 0.86% 的生理盐水,冰水浴制备成 10% 的匀浆,2 500 ~ 3 000 r/min 离心 10 min,取上清液用于测定。超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)和谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)的测定按照南京建成生物研究所的 SOD(酶标法)、CAT(可见分光法)试剂盒和 GPX(可见分光法)说明书测定。

1.4 数据分析及公式

所有数据均用平均值 ± 标准差(mean ± SD)表示,利用 SPSS 16.0 对所有数据进行分析,采用直线内插法求算 48 及 96 h 的半致死浓度(48 h LC₅₀ 及 96 h LC₅₀),安全浓度 SC = 96 h LC₅₀ × 0.1。采用单因子方差分析(One-Way ANOVA)的 Duncan's multiple 法对 SOD、CAT、GPX 活性进行组间差异显著性检验。定义 P < 0.05 为差异显著。

微核率 = 微核细胞数/观察红细胞总数 × 1 000‰

核异常率 = 核异常(微核除外)细胞数/观察

红细胞总数 × 1 000‰

总核异常率 = 微核率 + 核异常率

2 结果与分析

2.1 Cu²⁺对银鲳的急性毒性及安全浓度

银鲳幼鱼在不同浓度的 Cu²⁺ 水体中表现出不同程度的中毒症状,在最高浓度组,银鲳幼鱼在暴露 1 h 后就出现异常现象,首先表现为急速游动,上下乱窜,鳃盖闭合频率加快,2 h 后有 2 尾渐渐失去平衡的能力,在桶的中上层侧翻游动,游动越来越慢,12 h 后身体僵直,沉入桶底,此时鳃盖还在运动,偶尔又会挣扎游动,坚持几分钟后再次沉入桶底,如此反复几次,24 h 后 7 尾死亡。死鱼体色发白,口张开,鳃盖闭合,体表出现大量粘液分泌,部分个体有鳃出血现象,解剖后见肝脏肿大。

根据各实验组的受试鱼死亡统计,计算得到 48 和 96 h 死亡率和半致死浓度(LC₅₀)及安全浓度(SC)。结果表明除了对照组与最低浓度组在实验期间未出现死亡,其余浓度组银鲳幼鱼均出现死亡,死亡率随着 Cu²⁺ 浓度的加大与实验时间的延长而递增,呈较为明显的剂量—效应和时间—效应关系。用直线内插法得出 Cu²⁺ 对银鲳幼鱼的 48 和 96 h 半致死浓度(LC₅₀)分别为 0.860 和 0.770 mg/L,安全浓度为 0.077 mg/L(表 1)。

2.2 红细胞微核率及核异常率

通过对血涂片观察,统计银鲳幼鱼红细胞微核率及核异常率,对照组微核率仅为 1.07‰,核异常率为 4.72‰,随着 Cu²⁺ 浓度的增加,红细胞的微核率和核异常率均上升,当 Cu²⁺ 浓度达到 0.670 mg/L 时,红细胞微核率与核异常率均达到最大,细胞微核率达 13.23‰,为对照组的 12.36 倍,核异常率达 31.13‰,为对照组的 6.60 倍;此后 Cu²⁺ 浓度进一步增加,血细胞微核率与核异常率反而有所下降,但均显著高于对照组(表 2)。

银鲳正常的红细胞多椭圆形,长径为(8.58 ± 0.75) μm,短径为(6.26 ± 0.66) μm,其核一般在细胞正中央,核膜清晰,核径(3.02 ± 0.46) μm,核质比为 1.35 ± 0.43。具有微核的红细胞,长径为(8.83 ± 1.03) μm,短径为(5.33 ± 0.29) μm,核质比为 0.92 ± 0.13,形状更加扁圆,其微核位于细胞质中,与主核分开,染色性质与主细胞核一致,大小为主核的 1/5 ~ 1/4,也可见含有 2 个以上的微核。本实验观察到的核异常情况包括核质外凸、核质内凹、双核、核质断裂、小核等(图 1)。

表1 Cu^{2+} 对银鲳幼鱼急性毒性实验结果
Tab.1 Acute toxicity of Cu^{2+} on juvenile *P. argenteus*

质量浓度/(mg/L) concentration	死亡率/% mortality		半致死浓度/(mg/L) LC_{50}		安全质量浓度/(mg/L) safety concentration
	48 h	96 h	48 h	96 h	
0	0 ± 0	0 ± 0			
0.200	0 ± 0	0 ± 0			
0.299	0 ± 0	13.33 ± 5.77			
0.450	6.67 ± 5.77	33.33 ± 5.77	0.860	0.770	0.077
0.670	26.67 ± 5.77	40.00 ± 10.00			
1.000	66.67 ± 5.77	73.33 ± 5.77			
1.210	73.33 ± 5.77	96.67 ± 5.77			

表2 Cu^{2+} 胁迫48 h后银鲳幼鱼红细胞的微核率(‰)及核异常率(‰)
Tab.2 Erythrocyte micronucleus rates(‰) and nuclear abnormal rates(‰) of *P. argenteus* induced by Cu^{2+} in 48 h

Cu^{2+} 浓度/(mg/L) concentration of Cu^{2+}	观察细胞/个 cells	微核细胞/个 micronucleus cell	核异常细胞/个 nuclear abnormal cell	微核率/‰ micronucleus rates	核异常细胞率/‰ nuclear abnormal rates	核总异常率/‰ total nuclear abnormal rates
0	9 330	10	44	1.070	4.720	5.790
0.200	10 850	17	55	1.570	5.700	7.270
0.299	12 550	42	100	3.340	7.960	11.310
0.450	11 340	52	96	4.590	8.470	13.050
0.670	10 280	136	320	13.230	31.130	44.360
1.000	9 432	54	154	5.730	16.330	22.050
1.210	9 570	88	121	9.200	12.640	21.840

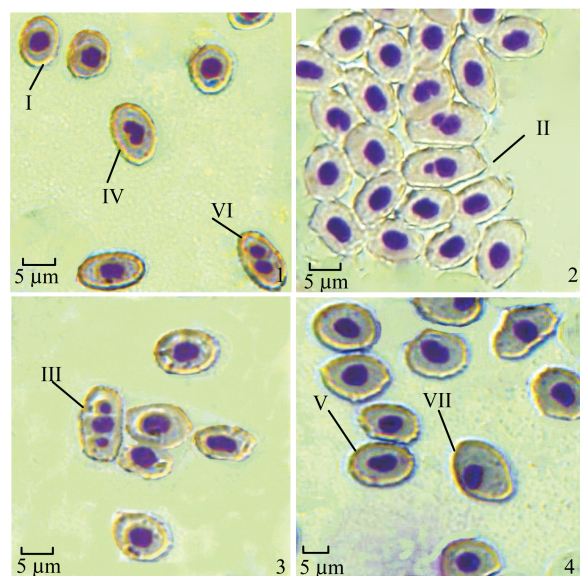


图1 Cu^{2+} 胁迫48 h后银鲳幼鱼红细胞微核及核异常
I. 正常红细胞; II. 单微核细胞; III. 双微核细胞; IV. 核质内凹; V. 核质外凸; VI. 双核; VII. 核位置异常

Fig.1 Micronucleus erythrocyte and nuclear abnormal erythrocyte of *P. argenteus* induced by Cu^{2+} in 48 h

I. normal erythrocyte; II. single micronucleus erythrocyte; III. double micronucleus erythrocyte; IV. nuclear concave erythrocyte; V. nuclear convex erythrocyte; VI. dual core erythrocyte; VII. nuclear abnormal position

2.3 Cu^{2+} 对银鲳肝组织SOD活性的影响

银鲳幼鱼肝脏SOD活性总体上表现为先升后

降的趋势,对照组平均值为43.96 U/mg;此后随着 Cu^{2+} 浓度的增加,SOD活性呈上升趋势,并在 Cu^{2+} 浓度为0.299 mg/L时达到最大值,为70.65 U/mg,显著高于其他浓度组($P < 0.05$)。之后SOD活性又随着 Cu^{2+} 浓度的增加而降低,在 Cu^{2+} 浓度为1.210 mg/L时达到最小值,为40.722 U/mg,但与对照组的差异不显著($P > 0.05$) (图2)。

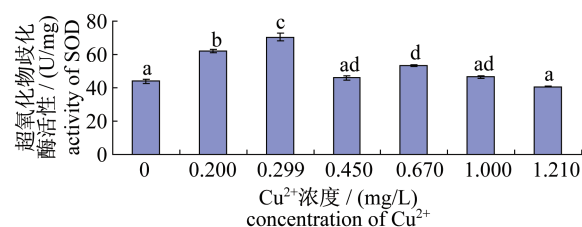


图2 不同浓度 Cu^{2+} 胁迫48 h后银鲳幼鱼肝组织SOD的活性

不同字母表示组间有显著性差异($P < 0.05$),下同

Fig.2 Effects of Cu^{2+} stress 48 h on activity of SOD in *P. argenteus*

bars with different letters differ significantly ($P < 0.05$), the same as the following

2.4 Cu^{2+} 对银鲳肝组织CAT活性的影响

银鲳幼鱼CAT活性总体上也表现为先升后降的趋势,对照组为417.28 U/mg;此后随着 Cu^{2+} 浓度的增加,CAT活性呈上升趋势,并在 Cu^{2+} 浓度为0.450 mg/L时达到最大值,为533.17 U/mg,与对

照组差异显著($P < 0.05$);之后随着 Cu²⁺ 浓度进一步增加 CAT 活性反而下降,并在 Cu²⁺ 浓度 1.210 mg/L 时达到最小值,为 234.24 U/mg,与对照组差异显著($P < 0.05$)(图 3)。

2.5 Cu²⁺对银鲳肝组织 GPX 活性的影响

总体上可以看出 Cu²⁺ 对银鲳幼鱼肝脏 GPX 活性具有显著的影响,大致也表现为先升后降的趋势,对照组为 77.83 U/mg;此后随着 Cu²⁺ 浓度的增加,除了 0.670 mg/L 组有略微的下降外其余各实验组 GPX 活性均呈上升趋势,并在 Cu²⁺ 浓度为 1.000 mg/L 时达到最大值,为 202.91 U/mg,显著高于其他浓度组($P < 0.05$),达到对照组的 2.61 倍;之后当 Cu²⁺ 浓度增加为 1.210 mg/L 时,GPX 活性降低到只有 31.09 U/mg,显著小于对照组($P < 0.05$)(图 4)。

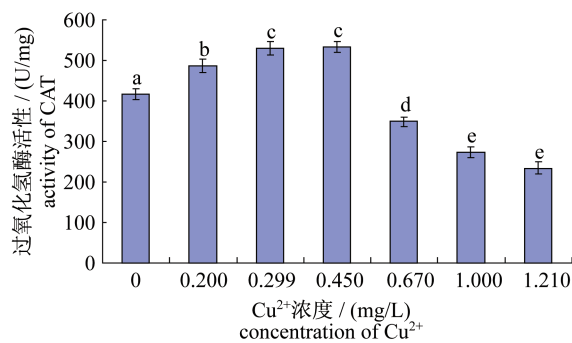


图 3 不同浓度 Cu²⁺ 胁迫 48 h 后银鲳幼鱼肝组织的 CAT 活性

Fig.3 Effects of Cu²⁺ stress 48 h on activity of CAT in *P. argenteus*

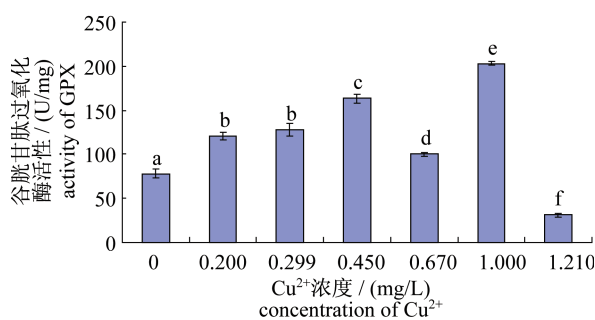


图 4 不同浓度 Cu²⁺ 胁迫 48 h 后银鲳幼鱼肝组织的 GPX 活性

Fig.4 Effects of Cu²⁺ stress 48 h on activity of GPX in *P. argenteus*

3 讨论

3.1 Cu²⁺对银鲳的致毒效应及安全浓度

铜是生物代谢活动中的必需元素之一,同时又

是一种毒性很强的重金属。陈光芸等^[12]报道 Cu²⁺ 具有凝固蛋白质和腐蚀作用,会导致生物体内酶活性与血红蛋白数量的下降,主要破坏鱼体的鳃与肝脏结构,本实验中银鲳幼鱼的中毒症状说明了这一点,刘福军等^[13]研究认为铜对鱼类毒害作用的一个重要途径就是影响鳃的离子交换作用,最终对渗透调节功能产生干扰破坏,进而使其功能紊乱。但 Granmo 等^[14]发现 Cu²⁺ 对鲑鱼 (*Gadus morhua*) 呼吸强度和呼吸速率影响不大,这表明同一重金属离子对不同物种的毒性效应不同,鱼类间的差异较大。本实验得出 Cu²⁺ 对银鲳 96 h LC₅₀ 为 0.770 mg/L,安全浓度为 0.077 mg/L,根据新化学物质对鱼类急性毒性危害分级标准可知^[15],Cu²⁺ 对银鲳幼鱼呈剧毒,因此在银鲳养殖中对 CuSO₄ 等药物的使用应控制在安全浓度范围以内。本实验得出的半致死浓度和安全浓度是在单一重金属污染状态下测得的,实际水环境更为复杂。因为重金属对鱼类的毒性受水环境中许多物理、化学以及生物因素的影响,包括 pH、无机阴离子、水的硬度、其他金属离子、络合物及鱼类分泌物等^[16]。

3.2 Cu²⁺对银鲳微核率及核异常率的影响

微核检测技术是检测有毒物质(如重金属、除草剂等)对生物细胞遗传损伤的一个非常有用指标。张瑞涛^[17]曾用鱼类微核实验法评价水域污染及鱼类的毒性效应,认为鱼类微核率可以迅速、可靠地反映机体染色体损伤、DNA 复制紊乱等异常状况。朱毅等^[18]研究发现 Cu²⁺ 能与带负电的核酸结合,引起核酸裂解,使正在进行细胞分裂的细胞染色体被阻断而产生微核,本实验结果表明:Cu²⁺ 能诱发银鲳外周血红细胞产生微核以及多种类型的核异常,具有明显的核损伤作用。随着 Cu²⁺ 浓度的增加,银鲳红细胞微核率、核异常率均上升,但随着 Cu²⁺ 浓度进一步增加,微核率、核异常率反而下降,这可能是由于 Cu²⁺ 浓度过高时,会抑制或终止细胞的正常分裂活动,甚至导致具有微核或核异常的细胞死亡^[19-20],而且研究还发现在最高浓度组多数血细胞的形状呈现多边形,这可能就是高浓度 Cu²⁺ 导致细胞死亡的前兆。此外微核率和核异常率的变化是同步的,均在 Cu²⁺ 浓度为 0.670 mg/L 时出现最大值,而且在相同浓度处理下,核异常率普遍高于微核率,张彩明等^[16]在研究 Cr⁶⁺ 对日本黄姑鱼 (*Nibea japonica*) 微核实验的过程中也发现了这个规律,

并认为这与鱼类自身 DNA 修复机制有关。关于微核成因一般认为是具有遗传毒性的物质所致,具有遗传毒性的物质又包括染色体断裂剂和纺锤体毒剂,染色体断裂剂打断染色体产生的无着丝粒片断形成小微核,而纺锤体毒剂则打断纺锤丝造成的一条或一组染色体滞后形成大微核^[21]。二者在本研究中均有被观察到,由此推断 Cu^{2+} 对染色体和纺锤体具有双重毒性。

3.3 Cu^{2+} 对银鲳 SOD、CAT 和 GPX 活性的影响

鱼体中最主要的抗氧化保护来自于 SOD、CAT 以及 GPX 等抗氧化酶,这些酶能维持胞内超氧阴离子 (O_2^-) 和过氧化氢 (H_2O_2) 水平的稳定^[22-23]。本实验中, Cu^{2+} 胁迫下银鲳幼鱼肝脏 SOD、CAT 和 GPX 活性变化规律大致相同,都呈先升高再降低的变化趋势,也就是毒性实验中较常见的抛物线型剂量效应关系,即表明低浓度的 Cu^{2+} 对抗氧化酶起诱导作用,而高浓度的 Cu^{2+} 对抗氧化酶起抑制作用,王凡等^[24]、胡蓉等^[25] 对牙鲆 (*Paralichthys olivaceus*) 和鲫 (*Carassius auratus*) 抗氧化酶的研究也得出同样的结果,Stebbing^[26] 把这种现象定义为生物的“毒物兴奋效应”,而鲁双庆等^[27] 则认为在低浓度时 Cu^{2+} 使鱼体产生的自由基会激活机体的抗氧化防御系统,诱导产生了更多的抗氧化酶,而当 Cu^{2+} 浓度进一步升高后,鱼体产生的活性氧自由基超过了自身的抗氧化抵御能力,因而对细胞产生了不可逆的伤害,细胞结构也受到了损伤,因此酶活性又逐渐回落。

SOD、CAT 和 GPX 的变化均为抛物线型剂量效应关系,谭树华等^[28] 指出抛物线顶点所对应的污染浓度可以认为是生物对污染物的耐受阈值,超过了这个耐受阈值相应酶的活性就开始降低,也是生物发生中毒反应的前兆^[29]。而本研究结果表明 SOD、CAT 和 GPX 各自对 Cu^{2+} 的耐受阈值各不相同,分别为 0.299、0.450 和 1.000 mg/L,可以发现 SOD 对 Cu^{2+} 的耐受阈值最低,即 SOD 对 Cu^{2+} 污染显示出较高的敏感性,可以较灵敏地指示出早期水体中低剂量的 Cu^{2+} 污染。李伟民等^[30] 在研究氯代硝基苯胺对鲫血清抗氧化酶时也得出类似的结果,贾秀英等^[31] 也指出 SOD 活性可以作为鱼类逆境生理的一个生化指标,因此在监测早期水体 Cu^{2+} 污染时选择 SOD 作为指示更好。

参考文献:

[1] Kucharz E J, Sierakowski S J. Effect of copper on

activation of human T cells[J]. Journal of Hygiene, Epidemiology, Microbiology, and Immunology, 1987,32(2):147-152.

[2] Yao Z F, Zhang L Z, Zhuang P, et al. Effects of antioxidant enzyme juvenile Chinese sturgeon [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2010, 17(4): 731-738. [姚志峰,章龙珍,庄平,等.铜对中华鲟幼鱼的急性毒性及对肝脏抗氧化酶活性的影响.中国水产科学,2010,17(4):731-738.]

[3] Zhu Y F, Hong W S, Lin J Z. Toxicity of Cu^{2+} to Juvenile Perch *Lateolabrax maculatus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2011, 6(3): 331-336. [朱友芳,洪万树,林金忠.铜离子对中国花鲈幼鱼的毒性研究.生态毒理学报,2011,6(3):331-336.]

[4] Zhang G S, Zhu D Y. Study on Micronuclei and Nuclear Abnormalities Induced by Cu^{2+} in *Hemiculter leucisculus* Erythrocytes [J]. Journal of Environment and Health, 2006, 23(6): 543-545. [张贵生,朱道玉.铜离子诱发鲮鱼红细胞微核及核异常的研究.环境与健康杂志,2006,23(6):543-545.]

[5] Zheng Y J, Chen X Z, Cheng J Y, et al. Continental shelf of the East China Sea biological resources and environment [M]. Shanghai: Shanghai Science and Technology Press, 2003: 379-388. [郑元甲,陈雪忠,程家骅,等.东海大陆架生物资源与环境.上海:上海科学技术出版社,2003:379-388.]

[6] Shi Z H, Wang J G, Gao L J, et al. Advances on the studies of reproductive biology and artificial breeding Technology in silver pomfret *Pampus argenteus* [J]. Marine fishery, 2005, 27(3): 246-250. [施兆鸿,王建钢,高露姣,等.银鲳繁殖生物学及人工繁育技术的研究进展.海洋渔业,2005,27(3):246-250.]

[7] Zhao F, Song C, Shi Z H, et al. Analysis and Evaluation of the Nutritional Components of Wild Young Silver Pomfret *Pampus argenteus* [J]. Acta Nutrimenta Sinica, 2008, 30(4): 425-426. [赵峰,宋超,施兆鸿,等.野生银鲳幼鱼主要营养成分的测定与评价.营养学报,2008,30(4):425-426.]

[8] Shi Z H, Gao L J, Xie Y L, et al. Comparison of reproductive characteristics between *Pampus argenteus* and *Pampus cinereus* in Zhoushan fishing ground [J]. Journal of Fishery of China, 2006, 30(5): 647-653. [施兆鸿,高露姣,谢营梁,等.舟山渔场银鲳和灰鲳繁殖特性的比较.水产学报,2006,30(5):647-653.]

[9] Shi Z H, Ma L B, Gao L J, et al. Feeding habits and

- growth characteristics of larva and juvenile of *Pampus argenteus* under artificial rearing condition [J]. *Marine Fisheries Research*, 2007, 28(4): 38 - 46. [施兆鸿, 马凌波, 高露姣, 等. 人工育苗条件下银鲳仔稚幼鱼摄食与生长特性. *海洋水产研究*, 2007, 28(4): 38 - 46.]
- [10] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 21814 - 2008, Testing methods for industrial wastewater-fish acute toxicity[S]. Beijing: Standards Press of China, 2008. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21814 - 2008, 工业废水的试验方法鱼类急性毒性试验. 北京: 中国标准出版社, 2008.]
- [11] Wu R J, Wu H P, Du H D. Induction of Micronucleus and Nuclear Anomalies in Erythrocytes of *Misgurnus anguillicadatus* by NaHSO₃ [J]. *Journal of Fujian Normal University: Natural Science Edition*, 2006, 22(2): 85 - 88. [吴若菁, 吴惠平, 杜惠东. 亚硫酸氢钠对泥鳅红细胞微核和核变形的诱导. *福建师范大学学报: 自然科学版*, 2006, 22(2): 85 - 88.]
- [12] Chen G Y, Zhang H F, Xu G C, et al. Acute toxicity of CuSO₄ and KMnO₄ to the larva of *Paracanthobrama guichenoti* [J]. *Journal of Aquaculture*, 2012(7): 27 - 30. [陈光芸, 张惠芬, 徐钢春, 等. 硫酸铜和高锰酸钾对似刺鲃幼鱼的急性毒性试验. *水产养殖*, 2012(7): 27 - 30.]
- [13] Liu F J, Zhang Y J, Wang M X. Chronic toxicity of copper to fish: A review [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2003, 27(3): 302 - 307. [刘福军, 张饮江, 王明学. 铜对鱼类慢性毒性研究进展. *水生生物学学报*, 2003, 27(3): 302 - 307.]
- [14] Granmo, Ekelund R, Sneli J, et al. Effects of antifouling paint components (TBTO, copper and triazine) on the early development of embryos in cod (*Gadus morhua* L.) [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2002, 44(10): 1142 - 1148.
- [15] General Administration of Quality Supervision, Inspection and Quarantine of the People's Republic of China. GB/T 21281 - 2007, Test method of fish acute toxicity for dangerous chemical products[S]. Beijing: Standards Press of China, 2007. [中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局. GB/T 21281 - 2007, 危险化学品鱼类急性毒性分级试验方法. 北京: 中国标准出版社, 2007.]
- [16] Zhang C M, Chen Y H, Wu C W, et al. Effects of Cr⁶⁺ on peripheral blood cell and antioxidant enzyme activity (SOD, CAT) of *Nibea japonica* [J]. *Journal of Oceanology and Limnology*, 2013, 44(2): 332 - 336. [张彩明, 陈应华, 吴常文, 等. Cr⁶⁺ 对日本黄姑鱼 (*Nibea japonica*) 外周血细胞及抗氧化酶 (SOD, CAT) 活性的影响. *海洋与湖沼*, 2013, 44(2): 332 - 336.]
- [17] Zhang R T. *Freshwater fisheries research* [M]. Beijing: Science Press, 1990: 16 - 20. [张瑞涛. 淡水渔业研究文集. 北京: 科学出版社, 1990: 16 - 20.]
- [18] Zhu Y, Hu X L. Heavy metals in fish toxicity research progress [J]. *Journal of Aquaculture*, 1998(2): 22 - 23. [朱毅, 胡小玲. 重金属对鱼类毒性效应研究进展. *水产养殖*, 1998(2): 22 - 23.]
- [19] Geng D G, Wang X Q, Liu S W, et al. Mutagenesis of Herbicide Fluroxypyr on cells of *Monopterus albus* [J]. *Journal of Environment and Health*, 2000, 17(2): 103 - 105. [耿德贵, 王秀琴, 刘士旺, 等. 除草剂使它隆对黄鳝细胞的致突变作用研究. *环境与健康杂志*, 2000, 17(2): 103 - 105.]
- [20] Xie Z H, Cai Y F, Chen G, et al. Induction of Micronuclei and Nuclear Anomalies in Erythrocytes of *Misgurnus anguillicaudatus* by Herbicide Acetochlor [J]. *Fisheries Science*, 2004, 23(6): 17 - 19. [谢志浩, 蔡亚非, 陈国, 等. 四种除草剂对泥鳅红细胞微核及核异常诱导. *水产科学*, 2004, 23(6): 17 - 19.]
- [21] Wang R F, He W S, Wu S F, et al. Mutagenicity and background content chemicals of water quality of source water and tap water in Kunming: II. The micronucleus test of tadpole erythrocyte and chromosomal aberration and SCEs test of CHO cell [J]. *Zoological Research*, 1996, 17(4): 469 - 475. [王蕊芳, 贺维顺, 吴世芳, 等. 昆明水源水和自来水水质致突变性及化学背景值: II. 蝌蚪红细胞微核和 CHO 细胞染色体畸变及 SCE 试验. *动物学研究*, 1996, 17(4): 469 - 475.]
- [22] Ferrante I, Ricci R, Aleo E, et al. Can enzymatic antioxidant defences in liver discriminate between wild and sea cage-reared Bluefin Tuna quality [J]. *Aquaculture*, 2008, 279(1-4): 182 - 187.
- [23] Mourente G, Díaz-Salvago E, Bell J G, et al. Increased activities of hepatic antioxidant defence enzymes in juvenile gilthead sea bream (*Sparus aurata* L.) fed dietary oxidized oil: Attenuation by dietary vitamin E [J]. *Aquaculture*, 2002, 214(1-4): 343 - 361.
- [24] Wang F, Zhao Y F, Lv J C, et al. Effect of Cu²⁺ on CAT, SOD, GSH-PX of *Paralichthys olivaceus* [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, 26(6): 836 - 838. [王凡, 赵元凤, 吕景才, 等. 铜对

- 牙鲢 CAT、SOD 和 GSH-PX 活性的影响. 华中农业大学学报, 2007, 26(6): 836 - 838.]
- [25] Hu R, Tang Z Y. Effect of Cadmium on Activities of Catalase and Superoxide Dismutase from Hepatopancreas of *Carassius auratus* [J]. Journal of Southwest University (Natural Science), 2011, 33(8): 94 - 98. [胡蓉, 唐正义. 镉对鲫鱼肝胰脏 CAT 和 SOD 活性的影响. 西南大学学报: 自然科学版, 2011, 33(8): 94 - 98.]
- [26] Stebbing A R. Hormesis—the stimulation of growth by low levels of inhibitors [J]. The Science of the Total Environment, 1982, 22(3): 213 - 234.
- [27] Lu S Q, Liu S J, Liu H Y, *et al.* Effects of Cu^{2+} on activities of protecting enzymes SOD, CAT and GSH-PX in liver tissue of *Monopterus albus* [J]. Journal of Fishery Sciences of China, 2002, 9(2): 138 - 141. [鲁双庆, 刘少军, 刘红玉, 等. Cu^{2+} 对黄鳝肝脏保护酶 SOD、CAT、GSH-PX 活性的影响. 中国水产科学, 2002, 9(2): 138 - 141.]
- [28] Tang S H, Luo S A, Liang F, *et al.* Effects of NaNO_2 on the activities of catalase in the liver of *Carassius auratus* [J]. Freshwater Fisheries, 2006, 35(5): 16 - 18. [谭树华, 罗少安, 梁芳, 等. 亚硝酸钠对鲫鱼肝脏过氧化氢酶活性的影响. 淡水渔业, 2006, 35(5): 16 - 18.]
- [29] Meng F P, Yu T. Review on bioaccumulation and toxicity of polybrominated diphenyl ethers in marine organisms [J]. Journal of Tropical Oceanography, 2010, 29(5): 1 - 9. [孟范平, 于腾. 多溴联苯醚在海洋生物中的富集及毒性效应评述. 热带海洋学报, 2010, 29(5): 1 - 9.]
- [30] Li W M, Ying D Q, Hu S Q, *et al.* Effects of chloric-nitroanilinated chemicals on antioxidant enzymes in serum of *Carassius auratus* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2002, 22(2): 236 - 240. [李伟民, 尹大强, 胡双庆, 等. 氯代硝基苯胺对鲫鱼 (*Carassius auratus*) 血清抗氧化酶的影响. 环境科学学报 2002, 22(2): 236 - 240.]
- [31] Jia X Y, Chen Z W. The effects of Cu^{2+} 、 Cd^{2+} on superoxide activities in *Carassius auratus* [J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2003, 27(3): 323 - 325. [贾秀英, 陈志伟. 铜、镉对鲫组织超氧化物歧化酶活性的影响. 水生生物学报, 2004, 27(3): 323 - 325.]

Effects of Cu^{2+} on acute toxicity, blood cell nuclear abnormal and antioxidant enzyme activity of *Pampus argenteus*

ZHOU Jiankai, XU Shanliang*, QIU Chenggong, CHEN Ping, FANG Zengbing, WANG Tengfei
(Key Laboratory of Applied Marine Biotechnology, Ministry of Education,
School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: An acute exposure experiment of copper on *Pampus argenteus* was carried out in a static biological test method. The abnormal rates of micronucleus and nucleus in peripheral blood cell, and the activities of antioxidant enzymes (SOD, CAT, GPX) in liver were determined under different copper concentrations. The results showed that the 48 h and 96 h median lethal concentrations of copper were 0.835 mg/L and 0.543 mg/L respectively, and the safe concentration of the metal was 0.054 mg/L. Copper was a drastic toxicant of *Pampus argenteus*, which indicated obvious dosage-effect relations with micronucleus rates and nuclear abnormal rates. Nuclear anomalies rates were generally higher than the micronucleus rates under the same concentration of copper; Activities of SOD, CAT and GPX changed greatly in the test groups which represented a tendency as increasing firstly and then decreasing from low concentration to high concentration. Antioxidant enzyme activity indicated parabolic dosage-effect relations. The changes of micronucleus rates, nuclear abnormal rates and the antioxidant enzyme activities (SOD, CAT, GPX) indicated the damage degree of *Pampus argenteus* by Cu^{2+} . The SOD can also sensitively indicate early copper pollution of low concentration.

Key words: *Pampus argenteus*; Cu^{2+} ; micronucleus rate; nuclear abnormal rate; antioxidant enzyme

Corresponding author: XU Shanliang. E-mail: xushanliang@nbu.edu.cn