

文章编号:1000 - 0615(2005)01 - 0055 - 05

镉对鲫外周血单个核细胞凋亡的诱导

丁磊¹, 吴康¹, 张伟明², 黄鹤忠¹

(1. 苏州大学农业科技学院, 江苏 苏州 215006;

2. 苏州市水产研究所, 江苏 苏州 215107)

摘要:以 Cd^{2+} 浓度 $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 腹腔注射染鲫, 以富含 T、B、NK 细胞及单核细胞的鲫外周血单个核细胞 (PBMC) 为效应细胞, 用亚显微形态分析、单细胞凝胶电泳 (SCGE)、DNA 凝胶电泳和流式细胞术 (FCM) 等方法进行 Cd^{2+} 诱导鲫 PBMC 凋亡的研究。电镜显示染镉细胞的染色质边聚、中聚并向胞浆突出和断裂, 胞浆内细胞器结构不清晰并见许多大小不等的空泡; 对照细胞的核呈马蹄形, 染色质分布均匀, 胞浆内细胞器结构清晰可辨。SCGE 显示染镉细胞呈现 DNA 边聚化的彗星小头及 DNA 片段移动形成的彗星尾, 对照细胞的核骨架边缘清晰; 染镉处理 14、17 和 21d 的细胞凋亡率分别为 19.4%、16.4% 和 5.6%, 明显高于对照组 (1.1%) ($P < 0.05$)。DNA 凝胶电泳显示染镉细胞出现 180~220bp 整数倍的 DNA 梯状带, 14 和 17d 的梯状带较 21d 明显; 对照细胞的 DNA 为一条带。FCM 显示染镉细胞的亚二倍体峰清晰可见, 对照细胞的亚二倍体峰几乎看不见; 染镉处理 14、17 和 21d 的亚二倍体峰细胞量分别为 17.5%、23.6% 和 8.2%, 明显高于对照组 (1.4%) ($P < 0.05$)。因此, 体内染镉可诱导鲫 PBMC 凋亡并在 14~17d 达到峰值, 21d 时则可能由于 DNA 的损伤修复而得以缓解, 由此推测镉诱导鲫 PBMC 凋亡是其致细胞病变死亡的重要表现形式之一, 低浓度镉致鲫免疫系统损伤, 极有可能通过直接诱导免疫细胞凋亡而实现。

关键词: 镉; 鲫; 外周血单个核细胞; 凋亡

中图分类号: S917

文献标识码: A

Cadmium-induced apoptosis to peripheral blood mononuclear cells in crussian carp, *Carassius auratus*

DING Lei¹, WU Kang¹, ZHANG Wei-ming², HUANG He-zhong¹

(1. College of Agricultural Science and Technology, Suzhou University, Suzhou 215006, China;

2. Suzhou Fisheries Institute, Suzhou 215107, China)

Abstract: At present, cadmium-induced damage to fish immune system especially immune cells is hardly seen in references. In the paper, the author studied for the first time the cadmiumly-induced apoptosis to peripheral blood mononuclear cell (PBMC). In the paper, the author studied for the first time the cadmiumly-induced apoptosis to peripheral blood mononuclear cell (PBMC) of crussian carp *Carassius auratus* (mainly T cell, cell and monocyte) by electron microscopy, single cell gel electrophoresis (SCGE), DNA gel electrophoresis and flow cytometry (FCM). At the beginning of our procedure, fish sample (400g even purchased from Suzhou Xiangcheng District aquafarm) were randomly assigned to glass aquaria (100cm × 60cm × 50cm) at five of each. All the culture conditions were kept for 4 weeks including continuously aeration, twice diets daily (08:00 and 14:00) at the rate of 3% body weight, half to two-thirds of daily water exchange, 23 to 27 temperature range, and over $5\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ dissolved oxygen content. Then, the test fish were intraperitoneally injected with Cd^{2+} at $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, and the control is Cd^{2+} free. After injection on the 14th, 7th, 21st day, 5mL blood samples (within $150\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$ heparin) from the fish tail vein were mixed with equal volume PBS ($0.01\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, pH7.2), these diluted blood was gently covered by 5mL Ficoll-Paque, the band containing mainly PBMC between plasma and isolation solution was observed after being centrifuged at $1500\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ for 10 min, then collected the PBMC from this band, and

收稿日期: 2003-06-13

资助项目: 科技部农业科技成果转化基金 (No. 02EFN213200220); 江苏省科技发展项目 (No. BS2002016); 江苏省苏州市科技局资助项目 (No. SNT0405); 苏州大学青年教师基金 (No. Q3113401)

作者简介: 丁磊 (1965 -), 男, 上海市人, 讲师, 主要从事动物病理生理学研究。E-mail: Dinglei4444@hotmail.com

washed twice in PBS, counted and adjusted to a density of 1×10^7 ind \cdot mL⁻¹ in RPMI-1640 plus 10% FBS. Under electron microscope, the treated cells appeared chromatin marginating, condensating and extruding into cytoplasm, unclear structure of organelles and large vacuoles in cytoplasm, while the normal did evenly-distributed chromatin in U shape nuclei and intact organelles. By SCGE, the treated cells exhibited comet head of DNA margination and comet tails of DNA migration, while the normal did full nuclear skeleton; the apoptotic rate was calculated according to the fraction of the apoptotic cells to the total cells at 14, 17 and 21d were 19.4%, 16.4%, 5.6% respectively, which were significantly higher than that of the normal (1.1%) ($P < 0.05$). By DNA gel electrophoresis, the treated cells had typical nucleosome bands (180 - 220bp integer fold) 14, 17 and 21d respectively, and these ladder bands at 14d and 17d were more apparent than those of 21d, while the normal had only an DNA band. In FCM, the treated cells showed aneuploid peaks, while the normal didn't; the number of cells in aneuploid peak were calculated according to the fraction of cells in aneuploid peak to the total cells at 14, 17 and 21d were 17.5%, 23.6% and 8.2% respectively, which were significantly higher than that of the normal (1.4%) ($P < 0.05$). The above evidences was suggested that cadmium could induce apoptosis of PBMC at this dose *in vivo*, and its apoptosis rate could reach summit valve in 14 - 17d and then drop at 21d. So apoptosis of lower dose cadmium-stressed PBMC is likely to play a key role in the damage of cadmium to the immune system of *C. auratus*.

Key words: cadmium; *Carassius auratus*; peripheral blood mononuclear cell; apoptosis

镉是多靶效应的毒物。来自矿石、冶金、电镀和染料等行业的含镉废水可被鱼类等水生生物所吸收蓄积^[1,2]。有关研究表明,镉对鱼类具有免疫毒性^[3-5],但其毒性机制尚未十分清楚。细胞凋亡是1972年Keer等发现并命名的一种受基因调控且不同于细胞坏死的细胞主动自杀方式,机体通过细胞凋亡来消除损伤、衰老和突变的细胞以维持稳态,当组织细胞凋亡发生异常时可导致机体的损伤^[6]。试验以一定的Cd²⁺浓度腹腔注射染鲫,以富含T、B、NK及单核细胞的鲫外周血单个核细胞(PBMC)为效应细胞,用电镜观察、单细胞凝胶电泳(SCGE)、DNA凝胶电泳和流式细胞仪(FCM)分析等方法建立了镉诱导鲫PBMC的凋亡模型,为阐明镉致鱼类免疫系统损伤的分子毒理学机制提供了研究资料。

1 材料和方法

1.1 材料

供试鲫 鲫(400g ind⁻¹)购自无污染源的苏州相城区水产养殖总场,经2%NaCl消毒后在100cm×60cm×50cm水族箱中驯养4周,然后随机分配到各水族箱中,每箱5尾。试验期间日投饲率约3%,每日换水排污1次,每次换水1/2~2/3,水温23~27℃,溶氧保持在5mg L⁻¹以上。

试剂 正常熔点琼脂糖(NMA)、溴化乙锭(EB)、EDTA·Na₂、Triton X-100和Tris皆为Amresco公司产品;proK和RaaseA为Sigma公司产品;十二烷基肌氨酸钠为东京化成工业株式会社产品;低熔点琼脂糖(LMA)为Gibco公司产品;DMSO为E. Merck公司产品;其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 试验鲫的染镉处理

以0.1LD₅₀即Cd²⁺浓度为1.25mg·kg⁻¹Cd²⁺对鲫腹腔注射染镉^[7],在第5d时以相同剂量进行第2次注射,对照鲫则注射等量生理盐水。

1.3 PBMC的提取

在第14、17、21d分别取抗凝鲫血用PBS(0.01mol L⁻¹,pH7.2)等比稀释后沿离心管壁滴加在等体积淋巴细胞分离液液面上,2000r·min⁻¹离心10min,吸取界面处的PBMC,1500r·min⁻¹离心洗涤2次后稀释至 1×10^7 ind·mL⁻¹,4℃保存。每组5尾。

1.4 检测方法

电镜观察 PBMC经2.5%戊二醛固定后送苏州大学电镜室检测,HITACHT-600电镜下观察拍照。

SCGE观察 按Singh等^[8]方法进行。以凋亡率(AR)为评价指标,AR=边集化彗星头及较大彗星尾的细胞/观察细胞总数。每个样本随机选取100个细胞。

DNA提取与凝胶电泳分析 将细胞裂解液(10mmol·L⁻¹Tris-HCl,150mmol·L⁻¹NaCl,10mmol L⁻¹EDTA,0.4%SDS,0.02g·L⁻¹proK)加到PBMC中,65℃水浴15min,加proK至终浓度为0.1g L⁻¹,37℃水浴3h,等体积饱和酚-氯仿抽提2次(4℃,12000r·min⁻¹,10min),取上清液加0.1倍体积3mol L⁻¹的NaAc(pH7.4)和2.5倍体积冻乙醇,-20℃静置30min,离心(4℃,12000r·min⁻¹,10min)取沉淀于TE(10mmol L⁻¹Tris-HCl,1mmol L⁻¹EDTA,pH8.0)中,加RNaseA至终浓度为0.1g L⁻¹,37℃水浴30min,按上法加NaAc和冻乙醇,-20℃静置30min,离心(4℃,12000r·

min^{-1} , 10min) 取 DNA 于 TE 后放入加样缓冲液中。用 TBE ($89\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris 碱, $89\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硼酸, $2\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA, pH8) 配制 1% 的 NMA 凝胶 (含 $0.001\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EB), TBE 中点样并电泳 (4, 80V, 40min), 在 Genegenius 凝胶成像系统 (Syngene 公司) 中分析拍照。

FCM 分析 PBMC 经 70% 冷乙醇固定 24 h, 用 PBS 离心洗涤后加 RNaseA 至终浓度为 $0.1\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 37 静置 1h, 加 PI 至终浓度为 $0.05\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, Epics XL 流式细胞仪 (COULTER 公司) 检测。以亚二倍体峰细胞量 (AP) 为评价指标, $\text{AP} = \text{亚二倍体峰细胞} / \text{观察细胞总数}$ 。

1.5 数据分析

用单因素方差分析染镉组不同时间段的 AR 间以及 AP 间的差异 (AR 和 AP 的数据均需经 $\sin^{-1}X^{1/2}$ 处理), 多重比较用 Duncan's 法, 以 $P < 0.05$ 为差异显著性判定标准。

2 结果

2.1 镉诱导鲫 PBMC 凋亡的电镜分析

对照组和染镉组鲫 PBMC 的电镜超薄切片如图 1 所示。由结果可知, 正常 PBMC 的核呈典型的马蹄形, 染色质分布均匀, 胞浆内细胞器结构清晰可辨, 超微结构未见异常变化; 染镉组 PBMC

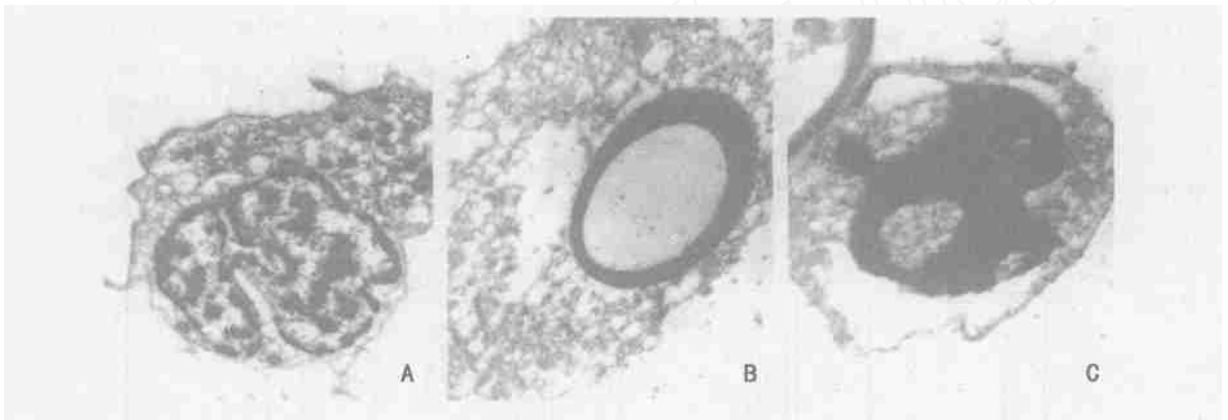


图 1 染镉前后鲫 PBMC 的电镜图象

Fig. 1 Electron micrographs of PBMC before or after being induced by Cd^{2+} in $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

A: 对照 ($10000\times$); B: 染色质边聚, 细胞质内的空泡 ($12000\times$);

C: 染色质中聚并向细胞质突出, 细胞质内的空泡 ($17000\times$)

A: control ($10000\times$); B: showing margination of chromatin, the large vacuoles appeared in cytoplasm ($12000\times$);

C: showing condensation of chromatin, chromatin extruding into cytoplasm, the large vacuoles appeared in cytoplasm ($17000\times$)

的形态结构则出现了凋亡细胞的一系列特征, 如染色质边聚、中聚并向细胞质突出和断裂, 胞浆内细胞器结构不清晰并见许多大小不等的空泡等。

2.2 镉诱导鲫 PBMC 凋亡的 SCGE 分析

SCGE 图像 对照组和染镉组鲫 PBMC 的 SCGE 图象如图 2 所示。由结果可知, 正常 PBMC 的形态正常, 边缘清晰; 染镉组 PBMC 因 DNA 断裂成小片段, 电泳时 DNA 片段离开细胞核向阳极迁移, 呈现 DNA 边聚化的彗星小头及 DNA 片段移动形成的彗星尾。

AR 对照组和染镉组鲫 PBMC 的 AR 如表 1 所示。由结果可知, 14d 和 17d 的 AR 明显大于对照组和 21d 的 AR ($P < 0.05$)。

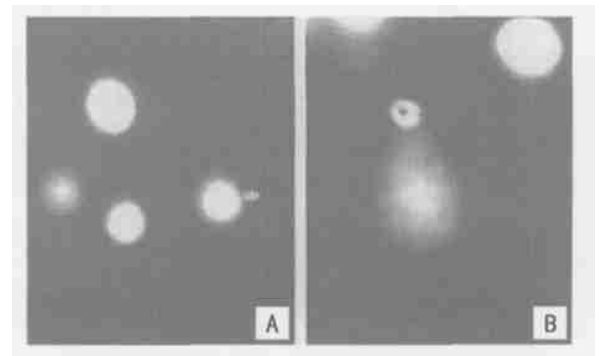


图 2 染镉前后鲫 PBMC 的 SCGE 图象

Fig. 2 SCGE image of PBMC before or after being induced by Cd^{2+} in $1.25\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$

A: 对照 ($400\times$); B: 边聚化的彗星小头及较大的彗星尾 ($400\times$)

A: control ($400\times$); B: showing margination of the small comet head, the large comet tail ($400\times$)

表1 染镉前后鲫 PBMC的 AR变化

Tab.1 AR induced by Cd²⁺ in PBMC of *C. auratus*

时间(d) time	0 (control)	14	17	21
AR(%)	1.1 ^c	19.4 ^a	16.4 ^a	5.6 ^b

注:每组数据为平均值(n=5),上标不同的同行值表示差异有显著性(P<0.05)

Notes:Date in each group are mean (n=5), the values with different superscripts in the same row with different significantly (P<0.05)

2.3 镉诱导鲫 PBMC 凋亡的 DNA 分析

对照组和染镉组鲫 PBMC 的 DNA 梯状带如图 3 所示。由结果可知,正常 PBMC 的 DNA 未见降解现象;染镉组 PBMC 的 DNA 发生了特异性降解而出现典型的梯状带;14d 和 17d 的梯状带较 21d 的明显。

2.4 镉诱导鲫 PBMC 凋亡的 FCM 分析

亚二倍体峰 对照组和染镉组鲫 PBMC 的亚二倍体峰如图 4 所示。由结果可知,正常 PBMC 的亚二倍体峰基本看不见;染镉组 PBMC 的亚二倍体峰清晰可见。

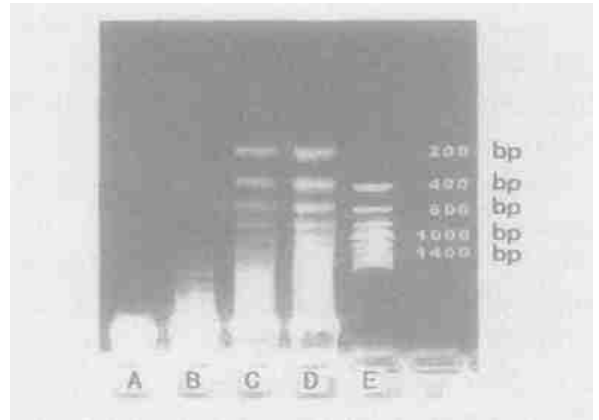


图3 染镉前后鲫 PBMC 的 DNA 断裂分析

Fig.3 Electrophoretic analysis of DNA extracted from PBMC induced by Cd²⁺ in 1.25mg·kg⁻¹ at different times
A:对照; B:染镉 21d; C:染镉 14d; D:染镉 17d;
E: 200bp DNA Ladder marker
A:control; B:Cd²⁺ for 21d; C:Cd²⁺ for 14d;
D:Cd²⁺ for 17d; E:200bp DNA Ladder marker

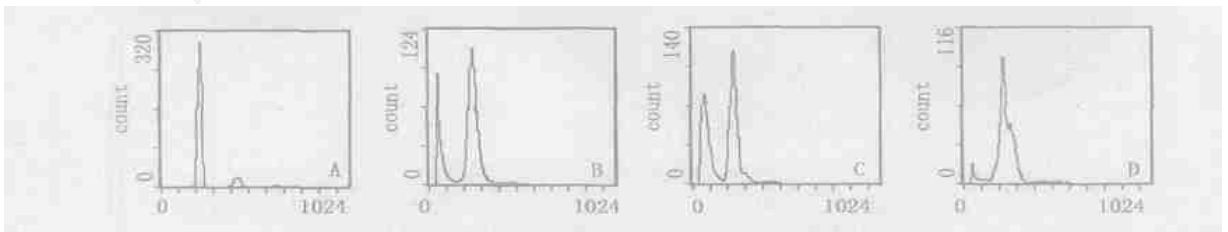


图4 染镉前后鲫 PBMC 的 DNA 含量分布直方图

Fig.4 DNA contents histograms of PBMC before or after being induced by Cd²⁺ in 1.25mg·kg⁻¹ at different times
A:对照; B:染镉 14d; C:染镉 17d; D:染镉 21d
A:control; B:Cd²⁺ for 14d; C:Cd²⁺ for 17d; D:Cd²⁺ for 21d

AP 对照组和染镉组鲫 PBMC 的 AP 如表 2 所示。由结果可知,14d 和 17d 的 AP 明显大于对照组和 21d 的 AP(P<0.05),表现出一定的时间-效应关系。

表2 染镉前后鲫 PBMC 的 AP 变化

Tab.2 AP induced by Cd²⁺ in PBMC of *C. auratus*

时间(d) time	0 (control)	14	17	21
AP(%)	1.4 ^c	17.5 ^a	23.6 ^a	8.2 ^b

注:每组数据为平均值(n=5),上标不同的同行值表示差异有显著性(P<0.05)

Notes:Date in each group is mean (n=5), the values with different superscripts in the same row with different significantly (P<0.05)

3 讨论

细胞凋亡后,由于染色质的断裂使染色质团块向连接在核纤层上的染色质端粒运动而出现了染色质边聚现象,同时部分核纤层也受到破坏,失去核骨架支撑部分的核膜向外突起形成小泡,切割后的染色质也随核内物质向仍与细胞核相连的小泡内转移,出现了染色质向胞浆突出的现象,当核的整个结构不足以维系成长后的小泡时,凋亡小体就从核上脱离,最终被释放出来,此外胞浆还出现大量的空泡等现象^[9];由于 DNA 被核酸内切酶分解成 180~220bp 或其倍数的寡聚核苷酸片段,因此 SCGE 呈现边聚化的彗星小头及较大的

彗星尾^[10,11],DNA 凝胶电泳呈现梯状带^[12];由于 DNA 断裂成小片段而被抽提出细胞,因此这些细胞的 DNA 含量比正常二倍体细胞低,在 FCM 的 DNA 含量分布直方图上就会呈现亚二倍体峰^[13]。

本试验中,染镉后鲫 PBMC 也呈现了细胞凋亡的形态学变化(图 1)和典型生化特征(图 2、图 3),尤其是 FCM 检测出了亚二倍体峰(图 4)进一步佐证了形态学观察和生化检测结果。其中,SCGE 显示 14、17 和 21d 的 AR 分别为 19.4%、16.4%和 5.6%;FCM 显示 14、17 和 21d 的 AP 分别为 17.5%、23.6%和 8.2%;14d 和 17d 的 DNA 梯状带也较 21d 的 DNA 梯状带明显。这一切均表明体内染镉可以诱导鲫 PBMC 凋亡并在 14~17d 达到峰值,21d 时则可能由于 DNA 的损伤修复而得以缓解。

镉诱导鲫 PBMC 凋亡的机制可能有四点。一是镉既能通过 Ca^{2+} 通道进入细胞内,代替 Ca^{2+} 发出信号,发挥 Ca^{2+} 的作用,又能使细胞内 Ca^{2+} 浓度增加,从而激活 Ca^{2+} 依赖性核酸内切酶,在核小体连接处将 DNA 链切成 180~220bp 或其倍数的 DNA 片段^[14,15]。二是镉可诱导原癌基因 *c-myc*、*c-fos*、*c-jun* 表达增强,继而诱导凋亡^[16,17];此外,*Caspase* 基因族在细胞凋亡中起关键作用,而镉引起的凋亡至少部分是由 *Caspase* 所介导^[18]。三是金属硫蛋白(MT)在镉引起细胞凋亡方面起着重要作用,如 Cd-MT 能激活核酸内切酶,从而导致 DNA 的断裂^[19]。四是镉能引起细胞过氧化损伤,诱发脂质过氧化物的产生,而后者是较强的凋亡诱导物,从而导致细胞凋亡^[20,21]。尽管上述这些因素在镉诱导的细胞凋亡中具有重要的作用,但细胞凋亡的调控是一个网络系统,受多种因素的影响,因此镉诱导鲫 PBMC 凋亡的详细机制仍需深入探讨。

值得我们注意的并不是高浓度镉对鱼类等水生生物的急性毒害作用而是中低浓度镉长期胁迫的慢性毒性作用。这种作用极有可能通过细胞凋亡或细胞癌诱变等方式导致水生生物生长缓慢和抗逆性下降。

本院 2003 届毕业生王得强、王刚、刘长飞和 2003 级研究生孙菊燕参加了该项目的研究,在此表示衷心感谢!

参考文献:

- [1] 刘长发,陶 澍,龙爱民. 金鱼对铅和镉的吸收蓄积[J]. 水生生物学报,2001,25(4):344-349.
- [2] 王 兰,扬秀清,王 茜,等. 镉在河蟹五种组织器官的积累及对酯酶同工酶的影响[J]. 动物学报,2001,47(专刊):96-100.
- [3] 董书芸,胡前胜,余贵英,等. 水环境镉对鲫鱼免疫毒性的研究[J]. 中国公共卫生,2001,17(3):226-228.
- [4] 丁 磊,黄鹤忠,吴 康,等. 镉对鲫非特异性免疫力的影响[J]. 农业环境科学学报,2004,23(1):64-66.
- [5] 丁 磊,吴 萍,蔡春芳,等. 镉对鲫血清溶菌酶和过氧化物酶的影响[J]. 农业环境科学学报,2004,23(2):243-245.
- [6] Kerr J F R, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implication in tissue kinetics[J]. Br J Cancer, 1972, 26:239-257.
- [7] 丁 磊,蔡春芳,吴 萍,等. 镉对鲫血红蛋白的影响[J]. 水利渔业,2002,22(3):10-11.
- [8] Singh N P, McCoy M T, Tice R R, et al. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damages in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988, 175(1):184-191.
- [9] Wyllie A H. Glucocorticoid-induced thymocyte apoptosis is associated with endogenous endonuclease activation[J]. Nature, 1980, 284:555-556.
- [10] Olive P L, Frazer G, Ban ǎh J P. Radiation-induced apoptosis measured in TK6 human B lymphoblast cells, using the comet assay[J]. Radiat Res, 1993,136:130-136.
- [11] Marstestredet R, Wiger R, Brunborg G, et al. Apoptosis in HL-60 cells induced by 3-chloro-dichloromethyl-5-hydroxy-2 [5H]-furanone(MX)[J]. Chem Biol Interact, 1997, 106:89-107.
- [12] Hale A J, Smith C A, Sutherland L C, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death[J]. Eur J Biochem, 1996, 236(1):1-26.
- [13] Huschtscha L I, Jeiter T M, Andersom W A, et al. Identification of apoptotic and necrotic human leukemic cells by flow cytometry[J]. Exp Cell Res, 1994, 212:161-165.
- [14] Lohmann R D, Beyersmann D. Cadmium and Zinc mediated changes of the Ca^{2+} -dependent endonuclease in apoptosis[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 190:1097-1103.
- [15] Azzouzi B E, Tsangaris G T, Pellegrini O, et al. Cadmium induces apoptosis in a human T cell line[J]. Toxicology, 1994, 88:127-139.
- [16] Jin P, Ringertz N R. Cadmium induces transcription of protooncogenes *c-jun* and *c-myc* in rat L6 myoblasta[J]. J Biol Chem, 1990, 265(24):14061-14064.
- [17] Masami I, Chiharu T. *c-myc* is not involved in cadmium-elicited apoptosis pathway in porcine kidney LLC-PK1 cells[J]. Life Science, 1998, 63(14):1195-1204.
- [18] Kim M S, Kim B J, Woo H N, et al. Cadmium induces caspase-mediated cell death: suppression by Bcl-2 [J]. Toxicology, 2000,145(1):27-37.
- [19] Hamada T, Sasaguri T, Tanimoto A, et al. Apoptosis of human kidney 293 cells is promoted by polymerized cadmium-metalllothionein[J]. Biochem Biophys Res Commun, 1996, 219:829-834.
- [20] Koixumi T, Yokota T, Shirakura H, et al. Potential mechanism of cadmium-induced cytotoxicity in rat hepatocytes: inhibitory action of cadmium on mitochondrial respiratory activity [J]. Toxicology, 1994, 92:115-125.
- [21] Shaikh Z A, Vu T T, Zaman K. Oxidative stress as a mechanism of chronic cadmium-induced hepatotoxicity and renal toxicity and protection by antioxidants [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1999, 154(3):256-263.