

镉诱导鲫肝细胞内 Ca^{2+} -ATP 酶与金属硫蛋白的表达

吴婷婷, 魏华*, 郭敏, 曹娜, 李国鹏

(上海海洋大学水产与生命学院, 上海 201306)

摘要: 研究了镉诱发鲫肝细胞相关的胞内游离钙离子变化, 以及 Ca^{2+} -ATP 酶及金属硫蛋白表达量的变化。试验分为对照组、5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$ CdCl_2 5 个组。 Ca^{2+} 用 Fura-2/AM 方法检测, 试验后 24 h 用荧光倒置显微镜观察细胞内游离钙离子变化; 分光光度法检测 Ca^{2+} -ATP 酶; 石墨炉—原子分光光度法检测了细胞内镉离子浓度; 免疫酶联法 (ELISA) 检测了金属硫蛋白 (MT) 含量。结果显示, 镉可导致细胞存活率下降, 具有一定的毒性。镉离子引起胞内 Ca^{2+} 荧光强度和 Ca^{2+} -ATP 酶活性增加 ($P < 0.01$)。随镉浓度升高, 处理组 Ca^{2+} -ATP 酶浓度活性分别是对照组的 4.52、6.73、6.68、7.19、6.18 倍; 暴露 24 h 后各组细胞内镉离子均有上升, 其中 5 $\mu\text{mol/L}$ 组最高, 达 $(2.045 \pm 0.322) \mu\text{mol/L}$; 各处理组金属硫蛋白 (MT) 含量增高 ($P < 0.01$), 且 5 $\mu\text{mol/L}$ 低浓度组 MT 增幅最大, 达 17.15%。结果提示, 镉诱导下细胞内 Ca^{2+} 升高, MT 表达量上升, 且 MT 可整合进入细胞内的镉离子, 这种整合可能是降低镉毒理作用的机制之一。

关键词: 肝细胞; 镉; Ca^{2+} -ATP 酶; 金属硫蛋白

中图分类号: Q 955; S 917

文献标志码: A

镉是一种危害较大的环境污染物, 被美国毒物与疾病登记署 (ATSDR) 列为第八位危害人体健康的有毒物质^[1]。工业生产所产生的镉广泛存在于大气、水、土壤中, 由于其生物半衰期较长, 可在水生生物及农作物体内富集。20 世纪 60 年代, 日本富山县的镉中毒事件是世界有名的公害事件之一^[2], 事发后调查发现, 当地居民长期食用受污染的“镉米”造成的。急性镉中毒可导致肺水肿、内脏出血、重型肝炎、睾丸损伤, 严重可致死。长期接触镉, 将造成骨、肾脏及免疫系统的损害^[3]。在大鼠的急性镉染毒实验中发现, 肝脏组织是体内最初镉积累和产生毒性的主要部分, 远远超过了睾丸和心脏组织的积累程度^[4]。研究表明, 在哺乳动物, 镉可诱发胞内钙离子升高, 通过 IP_3 信号通路引发细胞的毒性效果^[5-6]。但是, 镉等金属离子 (锌、汞、银等) 也可诱发胞内一种小分子富含巯基的金属硫蛋白 (metallothionein, MT) 产生, MT 又可以与金属离子结合, 降低镉等金属离子浓度, 减轻毒性效应^[3]。目前 MT 减轻金属毒理作用的机制正引

起学者高度重视。肝脏是脊椎动物维持生命活动和代谢稳态的重要器官之一, 是经消化道吸收的、毒物的毒作用首当其冲的部位, 具有浓缩和代谢转化外源化学物的能力, 在排泄外源化学物及其代谢产物中起重要作用, 是研究急性毒理作用的敏感器官^[7]。利用原代培养细胞进行毒理研究, 具有简便、快速、可减少诸多干扰因素、因果关系明显的优势。本试验选择鲫原代培养肝细胞为模型, 研究镉对鲫肝细胞的毒害及细胞内 Ca^{2+} -ATP 酶和 MT 的表达量的变化。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验用鲫购于上海临港新城古棕路市场, 鱼体长 $(21.74 \pm 0.93) \text{ cm}$, 体质量为 $(237.81 \pm 17.52) \text{ g}$, 水温 $(23.29 \pm 0.05) \text{ }^\circ\text{C}$, pH (8.61 ± 0.04) 暂养一周后用于后续试验。

1.2 试剂和仪器

新生牛血清、青链霉素、0.25% 胰蛋白酶均购

收稿日期: 2011-03-17 修回日期: 2011-04-14

资助项目: 上海市水生生物重点学科建设项目 (08dz1206002)

通讯作者: 魏华, E-mail: hwei@shou.edu.cn

于 Invitrogen 公司,MI99 液体培养基(Thermo),氯化镉和台盼蓝购自国药控股股份有限公司, Ca^{2+} -ATP 酶测定试剂盒(南京建成生物工程研究所),镉金属硫蛋白 ELISA 试剂盒(Blue Gene),Fura-2/AM(Biotium),CCK-8 试剂盒(碧云天),贴壁型细胞培养板(BD Falcon)。二氧化碳培养箱(Thermo 6600),酶标仪(BioTek Elx800),倒置显微镜(Motica-AE21),荧光倒置显微镜(Olympus IX71),石墨炉原子分光光度计(普析通用 TAS-990),紫外可见光分光光度计(普析通用 T6—新世纪)。

1.3 试验方法

鲫肝细胞的分离与纯化 将暂养的鲫用高锰酸钾浸泡 30 min,断鳃弓放血。粗剪刀沿侧线剪开腹腔,暴露内脏。取出肝组织,浸泡在 0.1% 葡萄糖洗必泰 30 min 对组织块消毒,用 4 °C D-Hank 氏液漂洗干净,然后将组织剪碎成 1 mm³ 的小块,并用 D-Hank 氏液洗至无血污。加入 5 倍体积的 0.25% 胰蛋白酶,28 °C 水浴消化 10 min,其间不停地晃动,收集消化液并用 200 目不锈钢滤网过滤,添加新鲜酶液重复 3 次。将过滤的消化液 1 000 r/min 离心 5 min,弃上清,加入 D-Hank 氏液清洗再离心,重复 2 次。最后一次加入 MI99 培养液(内含 10% 小牛血清,10 U/mL 青霉素 10 µg/mL 链霉素)清洗 1 次。用上述培养液重悬细胞,台盼蓝排除法评价细胞活性,活细胞数达到总细胞数 95% 用于后续实验^[8]。

细胞原代培养与氯化镉暴露 细胞密度调整为 1×10^6 /mL,24 孔板每孔加入 1 mL 细胞液,96 孔板每孔加入 100 µL,操作时反复吹打,避免细胞沉降造成密度不均。96 孔板最外一圈加入缓冲液,二氧化碳培养箱 28 °C 培养 24 h。对原代培养 24 h、48 h 的正常肝细胞进行观察并拍照。

试验设对照组与处理组共 5 组,每组 4 个平行。将灭菌的氯化镉溶液加入孔内,各组孔内最终浓度分别为 5、10、15、20 µmol/L,对照组不作处理,完成后将培养板转移至二氧化碳培养箱内 28 °C 培养 24 h,用于后续观察和检测。

WST-8 法测定细胞活性 加入氯化镉继续培养 24 h 后,每孔加入 10 µL CCK-8 试剂,同时做培养液空白对照,于培养箱中继续孵育 2 h。用酶标仪测定 OD 值,其中测量波长为 450 nm,参考波长为 630 nm。实验结果用细胞存活率表示,细胞

存活率(%) = (实验组 OD 值 - 空白孔 OD 值) / (对照组 OD 值 - 空白孔 OD 值) × 100

Ca^{2+} 荧光染色与相片采集 试验使用的 Fura-2/AM 是一种可以穿透细胞膜的荧光染料。其进入细胞后可被胞内的酯酶水解成 Fura-2, Fura-2 具有较强的亲水性,不易透过细胞膜,并且可与游离钙离子特异性结合,在特定波长的紫外光源下激发产生荧光,可在荧光显微镜下直接观察,荧光强度可表示 Ca^{2+} 的多少。

用 DMSO 溶解 Fura-2/AM 至 2 mmol/L 遮光保存。去除细胞上层培养基,并用无 Ca^{2+} 的 D-Hank 氏液反复清洗 3 次,加入 20 µL 含有 Fura-2/AM 溶液的新生牛血清 28 °C 避光孵育 20 min (Fura-2/AM 的最终浓度为 5 µmol/L)。弃染液,用不含 Ca^{2+} 的 D-Hank 氏液清洗 3 次,荧光倒置显微镜下采集影像,为防止染料淬灭,拍摄时间控制在 2 h 内。

镉离子浓度的测定 使用石墨炉—原子分光光度计检测镉离子浓度。

参数设置:波长 228.8 nm,干燥:120 °C,升温 15 s,保持 25 s;灰化:400 °C,升温 10 s,保持 20 s;原子化:1 500 °C,升温 20 s,保持 7 s^[9]。

配置 1、5、10、15、20、40 µmol/L 氯化镉标准溶液,每个浓度设 4 个平行。96 孔板每孔吹打至细胞脱落,1 000 r/min 离心 5 min 后弃上清,加入 0.2% Triton 溶液 100 µL,充分吹打、混匀,进行测量,测量时手动进样,样品量为 10 µL,并记录原子吸光度,结果为处理组 OD 值 - 对照组 OD 值。

Ca^{2+} -ATP 酶的测定 ATP 酶可分解 ATP 生成 ADP 和无机磷,通过测定无机磷的含量来判断 ATP 酶活性的高低。将 24 孔培养板内细胞反复吹打,至完全脱落,3 500 r/min 离心 10 min,弃上清,留下层细胞,用不含磷 D-Hank 氏液重悬至 1×10^6 /mL 的。-20 °C 反复冻融 3 次,用考马斯亮蓝试剂测定组织蛋白,并进行酶活检测。

酶活检测包括酶促反应和定磷,操作方法依照试剂盒说明书。波长 636 nm,光径 0.5 cm,测量各管吸光度。

金属硫蛋白的 ELISA 检测 金属硫蛋白 ELISA 法依据间接免疫定量技术,微孔板中包被有 MT 特异单克隆抗体。当标准品或样品加入微孔板孔内,MT 会同包被结合。再加入辣根过氧

化物标记酶(HRP)可以特异性结合MT成“三明治”型,MT被固定在微孔板上,洗脱掉未结合的标记酶,这样通过标记酶HRP的显色反应可间接得出MT的含量。

将细胞吹打至脱落后,4 000 r/min离心10 min,取上清。将50 μL 的标准品及样品加入包被的酶标板孔内,样品孔加入10 μL 生物素。然后各孔中加入100 μL 酶标记液,将酶标板用封口胶密封后,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育反应1 h。反应结束后用洗涤液充分清洗酶标板3~5次。待孔内彻底干透,加入显色剂A、B液各50 μL ,室温下避光反应10 min。最后加50 μL 终止液终止反应,并在波长450 nm的酶标仪上读取各孔的OD值。

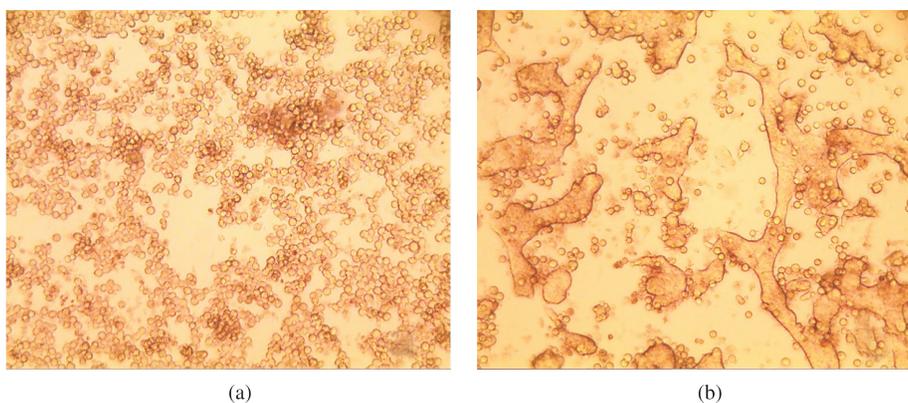


图1 鲫肝细胞形态

(a) 培养24 h的细胞; (b) 培养48 h的细胞(放大倍数 10×10)。

Fig. 1 Micrograph of hepatocytes

(a) cell cultured for 24 h; (b) cell cultured for 48 h(magnification times 10×10).

2.2 氯化镉对肝细胞活性的影响

肝细胞经过不同浓度的氯化镉处理24 h后,在所有试验浓度(5、10、15、20 $\mu\text{mol/L}$)范围内,细胞活性受到抑制。随着氯化镉浓度的增加,OD值呈下降趋势,细胞存活率降低(图2),具有一定的浓度一效应关系。

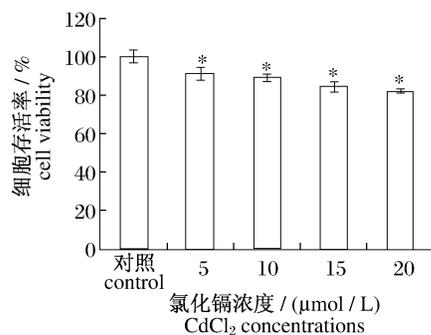


图2 氯化镉对肝细胞存活率的影响

Fig. 2 Effect of cadmium chloride on hepatocyte viability

1.4 数据处理

结果用Excel 2007和SPSS 17.0统计软件进行处理,在 $P=0.05$ 的置信水平对 Ca^{2+} -ATP酶活性、游离镉离子浓度及MT含量的变化情况进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),结果数据均为4个样品的平均值。

2 结果与分析

2.1 原代培养细胞形态观察

倒置显微镜下进行细胞形态学观察,从图1-a中可以看出,细胞透光性强且呈圆形,培养24 h后贴壁正常,培养48 h后的细胞紧密相靠,出现连成片的岛状连接(图1-b)。

2.3 氯化镉诱发肝细胞 Ca^{2+} 的升高

采用Fura-2/AM作为荧光染料,在荧光倒置显微镜下通过滤光镜观察氯化镉诱发 Ca^{2+} 的升高,并采集影像^[10]。 Ca^{2+} 的升高程度可通过荧光强度定性显示。图3中b、c、d、e 4个处理组的荧光强度均高于对照a,表明氯化镉诱发胞内 Ca^{2+} 升高。

2.4 氯化镉诱发 Ca^{2+} -ATP酶活力增加

不同浓度的氯化镉作用下,鲫肝细胞 Ca^{2+} -ATP酶活性发生明显变化(图4)。对照组酶活力为17.52 U/mg prot,处理组 Ca^{2+} -ATP酶活力分别是对照组的6.73、6.68、7.19、6.18倍,均差异极显著($P<0.01$)。结果显示,氯化镉暴露24 h后,鲫肝细胞中 Ca^{2+} -ATP酶活力极显著高于对照组水平。镉诱导胞内游离钙离子浓度增加,钙离子同钙调蛋白(CaM)形成的复合物与 Ca^{2+} -

ATP 酶结合,将 Ca^{2+} -ATP 酶由非活性转化为活性状态,活性 Ca^{2+} -ATP 酶便可将多余的钙离子

运送至钙库储存,维持胞内钙离子稳态。

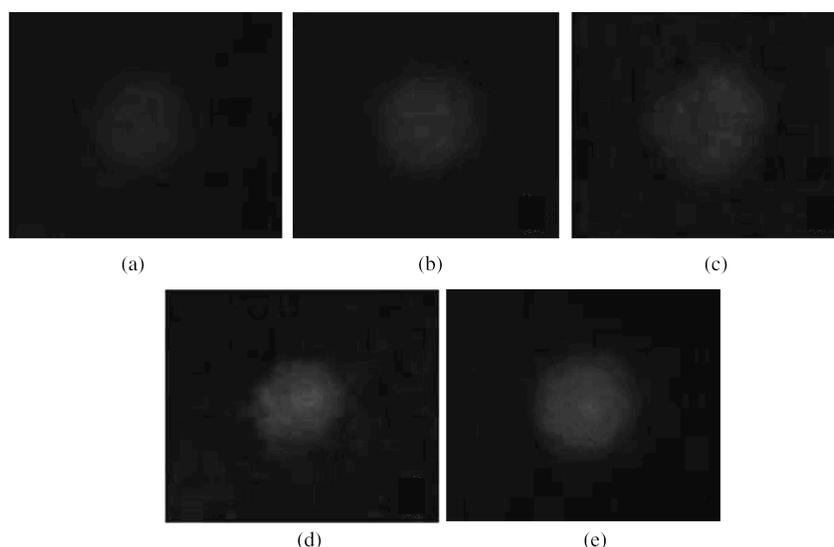


图3 氯化镉对肝细胞内 Ca^{2+} 的影响

(a) 对照组; (b) 5 $\mu\text{mol/L}$ 处理组; (c) 10 $\mu\text{mol/L}$ 处理组; (d) 15 $\mu\text{mol/L}$ 处理组; (e) 20 $\mu\text{mol/L}$ 处理组(放大倍数 10×20)。

Fig. 3 Effects of cadmium chloride on Ca^{2+} level in hepatocytes

(a) control group; (b) treatment group of 5 $\mu\text{mol/L}$; (c) treatment group of 10 $\mu\text{mol/L}$; (d) treatment group of 15 $\mu\text{mol/L}$; (e) treatment group of 20 $\mu\text{mol/L}$ (magnification times 10×20).

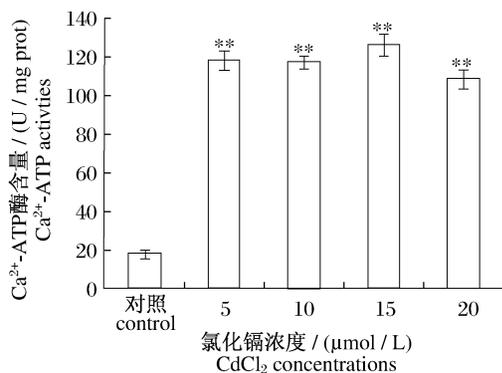


图4 氯化镉对肝细胞 Ca^{2+} -ATP 酶活力的影响

Fig. 4 Effects of cadmium chloride on Ca^{2+} -ATPase activities in hepatocytes

Ca^{2+} -ATP 酶活力单位定义:每小时每毫克组织蛋白的组织中 Ca^{2+} -ATP 酶分解 ATP 产生 1 μmol 无机磷的量 ($\mu\text{mol Pi/mg prot/h}$)。

细胞中 Ca^{2+} -ATP 酶活力 (U/mg prot) = (测定管 OD 值 - 对照管 OD 值) / (标准管 OD 值 - 空白管 OD 值) \times 标准管浓度 (0.02 $\mu\text{mol/mL}$) $\times 6 \times 2.8$ / 匀浆蛋白含量 (mg prot/mL), 其中,6 为定义上每小时酶的活力,2.8 为反应体系中的稀释倍数。

2.5 氯化镉诱发金属硫蛋白表达量的升高

用间接 ELISA 方法测定了 CdCl_2 暴露 24 h 后鲫肝细胞中 MT 含量的变化。图 5 表明氯化镉诱导细胞内 MT 含量升高,其中 5 $\mu\text{mol/L}$ 组 MT 含量为 (1.938 \pm 0.017) $\mu\text{g/L}$; 10 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (1.853 \pm 0.041) $\mu\text{g/L}$; 15 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (1.801 \pm 0.022) $\mu\text{g/L}$; 20 $\mu\text{mol/L}$ 组为 (1.798 \pm 0.06) $\mu\text{g/L}$, 而对照组 MT 含量为 (1.64 \pm 0.013) $\mu\text{g/L}$, 处理组与对照组均呈极显著差异 ($P < 0.01$)。且 5 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组 MT 增加量达 0.281 $\mu\text{g/L}$, 增加幅度为 17.15%。

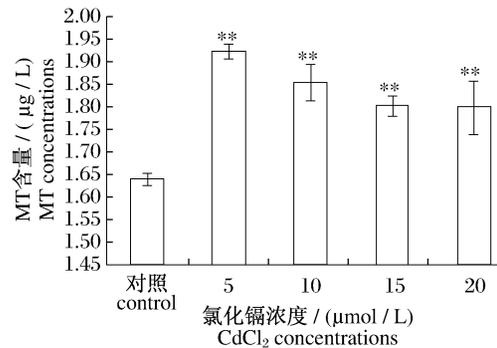


图5 氯化镉对金属硫蛋白含量的影响

Fig. 5 Effects of cadmium chloride on metallothionein activities in hepatocytes

MT 标准品线性良好, 回归方程为 $Y = 0.073X + 0.244$, 相关系数 $R^2 = 0.996$, 最低检测限为 $0.01 \mu\text{g/L}$ 。标准品浓度范围为 $0.5 \sim 10 \mu\text{g/L}$, 回收率为 95.45% 。

2.6 细胞内镉离子浓度

图 6 表明, 氯化镉处理 24 h 后, 各组胞内镉离子浓度均有不同程度的升高, 其中 $5 \mu\text{mol/L}$ 组胞内镉离子浓度最高, 达 $(2.045 \pm 0.322) \mu\text{mol/L}$, 这种变化同 MT 含量有一定的相关性。低浓度 $5 \mu\text{mol/L}$ 组, MT 含量最大(图 5), 镉离子浓度最高, 而 $10 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 组胞内镉浓度低于 $5 \mu\text{mol/L}$ 组。氯化镉标准溶液浓度在 $5 \sim 20 \mu\text{mol/L}$ 范围内线性良好, 回归方程 $Y = 0.198X + 7.100$ 相关系数 $R^2 = 0.990$ 。通过回归方程, 得到氯化镉暴露 24 h 后细胞内镉离子浓度。

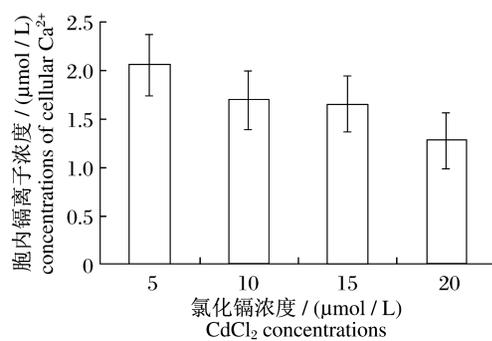


图 6 氯化镉暴露 24 h 后细胞内镉离子浓度

Fig. 6 The concentration of cadmium in hepatocytes treated with cadmium chloride for 24 h

3 讨论

3.1 氯化镉对肝细胞内钙离子的影响

Ca^{2+} 作为一种重要的第二信使, 存在于多种的细胞反应中。生理状态下, 肝细胞内游离 Ca^{2+} 浓度为 $0.1 \sim 0.4 \mu\text{mol/L}$, 不到细胞总钙的 0.1% , 大多数以蛋白结合形式存在于胞浆和内质网、线粒体等钙库中。多数哺乳动物肝细胞外游离 Ca^{2+} 浓度高于 2 mmol/L , 胞内外浓度相差 $3 \sim 4$ 个数量级^[11-12]。在缺氧、毒物、氧化应激性等因素作用下, 细胞 ATP 缺乏, 胞膜受损, 伴随 Ca^{2+} 内流、钙库大量地释放 Ca^{2+} , 致使钙超载。钙超载将引起细胞骨架蛋白和磷脂双分子层损害, 造成胞膜泡形成及破裂, 该现象是肝细胞致死性损伤的普遍特征^[13]。

镉的刺激可激活 G 蛋白, 诱发 IP_3 途径打开

Ca^{2+} 通道, 使钙离子进入胞质中^[14,16]。 Cd^{2+} 同样能使三磷酸肌醇受体 I (inositol trisphosphate receptor I, $\text{IP}_3 \text{ R I}$) 的表达量增加^[17-18], 进一步诱导 Ca^{2+} 的释放^[19]。

采集的荧光影像中, 处理组荧光强度明显高于对照组, 显示胞内游离钙离子浓度升高。谢卓艺^[20]认为这种升高的钙离子主要来源细胞内部, 由内质网/肌浆网释放。随着 Ca^{2+} 升高, 平衡被打破, 则需要通过 $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ 交换、 Ca^{2+} -ATP 酶以及线粒体的协同转运来降低细胞内游离钙离子浓度。其中的 Ca^{2+} -ATP 酶是一种钙调蛋白 (CaM) 依赖性酶, 受胞浆内和内质网/肌质网腔内的 Ca^{2+} 同时调控, 负责清除 Ca^{2+} , 维持稳态。4 组处理中, Ca^{2+} -ATP 酶活性均显著增加, 达 6 倍以上。其中 $20 \mu\text{mol/L}$ 的酶活力较其他 3 组有所降低, 高浓度氯化镉有抑制 Ca^{2+} -ATP 酶的作用, 与谢卓艺^[20]的实验结果相一致, 由于 Cd^{2+} 同 Ca^{2+} 半径十分接近, Cd^{2+} 可直接在 Ca^{2+} -ATP 酶上的钙结合位点部分或全部取代 Ca^{2+} , 抑制 Ca^{2+} 的转运, 也可通过钙通道激活三磷酸肌醇 IP_3 的形成和钙流动, 使细胞内钙浓度增高。

3.2 氯化镉对肝细胞金属硫蛋白的影响

MT 是一类低分子量蛋白 ($6 \sim 7 \text{ ku}$)、富含半胱氨酸的金属结合蛋白家族, 在金属代谢以及解毒方面起重要作用^[21]。生物体内镉主要以 Cd-MT 形式存在, 镉在肝脏体内诱导合成 MT, 并与之结合形成的 Cd-MT 结合物, 经血液运输至肾脏, 通过胞饮方式进入肾小管, 最后在溶酶体内被降解, 并释放游离态镉^[22]。

陈敏等^[23]在对小鼠急性毒性试验时发现, 镉主要蓄积在肝脏, 证实了肝脏是镉急性中毒损伤的主要靶器官。在肝脏中, 金属硫蛋白富含的巯基可强烈螯合镉离子, 从而诱导 MT 形成结合物, 具有应急保护作用。YAMADA 等^[24]观察到体外用 $0.1 \sim 0.5 \text{ mmol/L CdSO}_4$ 诱导外周淋巴细胞 (PBL), MT mRNA 水平与镉浓度呈剂量-一效应关系; 任绪义等^[25]对大鼠的肝脏和睾丸支持细胞的 MT 检测发现, 镉处理 1 h 后, 肝脏 MT mRNA 有明显诱导表达, 3 h 达峰值。在翻译水平, 肝脏中 MT 随着镉离子浓度的增加而明显增加, 处理 24 h 后 MT 增加了 3.9 倍, 睾丸支持细胞中 MT 却有所下降。提示 Cd^{2+} 对 MT mRNA 的诱导表达具有时间依赖性和组织特异性, Cd^{2+} 能诱导睾

丸的 MT 转录,但没有促进其 MT 的合成,推测 MT 合成的调控可能在翻译水平^[25]。已有学者观察到淋巴细胞 MT 基因的基础 mRNA 水平和镉诱导后水平有个体差异,这种差异能否成为用来表示个体对镉的易感性,还需进一步研究^[21]。

本实验中暴露 24 h 后(图 6)各组细胞内镉离子浓度有不同程度升高,并且与 MT 的升高相关,表明进入细胞的镉离子可被 MT 螯合,其螯合程度与 MT 浓度相关。通过圆二色性和晶体结构研究发现,MT 分子中不含 α -螺旋和 β -折叠,构象更稳定。分子前半部的 β 结构域,后半部的 α 结构域,彼此单独呈球状,两者通过氨基酸残基连接使整个分子呈哑铃状,在这两个结构域中多肽链盘绕着金属离子形成 3 个回折以适合结合金属。 β 区含有 9 个半胱氨酸残基,可结合 3 个原子的 Cd; α 区含有 11 个半胱氨酸残基,可结合 4 个原子的 Cd。Cd 以二价状态和 4 个半胱氨酸的巯基结合,形成 $[\text{金属}^{2+}(\text{Cys}^-)_4]^{2-}$ 复合物而使整个分子带负电,降低了游离金属离子浓度和消除了金属氧化性^[26]。

结果表明,镉诱导下细胞内 Ca^{2+} 升高,MT 表达量上升,且 MT 可螯合进入细胞内的镉离子,这种螯合可能是降低镉毒理作用的机制之一。

参考文献:

- [1] ATSDR. Toxicological profile for cadmium [M]. Atlanta, Georgia, 1999;1-397.
- [2] 佚名. 痛痛病[J]. 世界环境, 2010(4):7.
- [3] CURTIS D, KLAASSEN, LIU J, *et al.* Metallothionein protection of cadmium toxicity[J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2009, 238(3):215-220.
- [4] 陈龙,周娟,高伟,等. 镉负荷大鼠一氧化氮和肿瘤坏死因子- α 释放在介导多器官机能活动障碍中的作用[J]. 生理学报, 2003, 55(5):535-540.
- [5] 仇慎峰,杨永年,唐玲芳,等. 钙拮抗剂对 HSB-2 细胞摄取镉的影响[J]. 卫生毒理学杂志, 1997, 11(3):155-157.
- [6] 谢黎虹,许梓荣. 重金属镉对动物及人类的毒性研究进展[J]. 浙江农业学报, 2003, 15(6):376-381.
- [7] 庄志雄. 靶器官毒理学[M]. 北京:化学工业出版社, 2006.
- [8] 张毅,张高峰,魏华. 壬基酚对鲫鱼原代肝细胞增殖和抗氧化功能的影响[J]. 应用生态学报, 2009, 20(2):352-357.
- [9] 赵多,金永平. 石墨炉原子吸收法测定动物肝脏中的铅和镉[J]. 现代科学仪器, 1999(1):73-74.
- [10] 王莎莎,陈龙,夏树开,等. 镉诱发肝细胞毒性和胞内 Ca^{2+} 变化及硒的保护作用研究[J]. 分子细胞生物学报, 2006, 39(4):350-356.
- [11] 张永刚. 肝细胞钙超载与肝细胞损伤[J]. 国外医学生理病理科学与临床分册, 1997, 17(3):255-258.
- [12] 王炳芳. Ca^{2+} 与肝细胞增殖[J]. 国外医学消化系疾病分册, 1994, 14(2):80-82.
- [13] THÉENOD F, FRIEDMANN J M, KATSEN A D, *et al.* Up-regulation of multidrug resistance P-glycoprotein via nuclear factor- κ B activation protects kidney proximal tubule cells from cadmium- and reactive oxygen species-induced apoptosis [J]. Biological Chemistry, 2000, 275(3):1887-1896.
- [14] LIEVREMONT J P, HILL A M, TRAN D, *et al.* Intracellular calcium stores and inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor in rat liver cells [J]. Biochemical, 1996, 314:189-197.
- [15] JOUAVILLE L S, ICHAS F, MAZAT J R. Modulation of cell calcium signals by mitochondria [J]. Molecular and Cellular Biochemistry, 1998, 184(1-2):371-376.
- [16] RAWSON N E, JI H, FRIEDMAN M I. 2, 5-Anhydro-D-mannitol increases hepatocyte calcium: implications for a hepatic hunger stimulus [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 2003, 1642(1-2):59-66.
- [17] LI M, KONDO T, ZHAO Q L, *et al.* Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways[J]. Biological Chemistry, 2000, 275, 39702-39709.
- [18] HAMICK D J, JAYARAMAN T, MA Y, *et al.* The human type I inositol 1, 4, 5-trisphosphate receptor from T lymphocytes [J]. Biological Chemistry, 1995, 270(6):2833-2840.
- [19] FASOLATO C, IRMOCENTI B, POZZAN T. Receptor-activated Ca^{2+} influx: how many mechanisms for how many channels? [J]. Pharmacological Sciences, 1994, 15(3):77-83.
- [20] 谢卓艺. 镉诱导下活性氧自由基、细胞内钙离子和细胞凋亡三者间的关系[D]. 兰州:兰州大学, 2008.
- [21] 常秀丽. 金属硫蛋白及其在镉接触评价中的应用[J]. 国外医学卫生学分册, 2004, 31(1):32-36.

- [22] NORDBERG G F. Cadmium metabolism and toxicity: experimental studies on mice [J]. *Environmental Physiology Biochemistry*, 1972, 2: 7-36.
- [23] 陈敏, 谢吉民, 程晓农, 等. 镉对小鼠肝脏的毒作用机理探讨[J]. *江苏大学学报: 医学版*, 2002, 12(4): 321-323.
- [24] YAMADA H, KOIZUM S. Lymphocyte metallothionein-mRNA as a sensitive biomarker of cadmium exposure [J]. *Industrial Health*, 2001, 39(1): 29-32.
- [25] 任绪义, 周雍, 张建鹏, 等. 镉暴露大鼠睾丸支持细胞金属硫蛋白表达的时相研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2003, 30(6): 965-968.
- [26] 田晓丽, 郭军华. 金属硫蛋白的研究进展[J]. *国外医学药学分册*, 2005, 32(2): 119-124.

Ca²⁺-ATPase and metallothionein expressing induced by cadmium in the primary cultured hepatocytes of crucian carp (*Carassius auratus*)

WU Ting-ting, WEI Hua*, GUO Min, CAO Na, LI Guo-peng

(College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China)

Abstract: Cadmium is one of environment heavy metal pollutants which is ranked the eighth in the top toxic substances harmful to human health by the Agency for Toxic Substances and Disease Registry (ATSDR). Cadmium is easy to be absorbed by aquatic organisms and to be deposited in the body. We studied the performance of the Ca²⁺-ATPase and metallothionein in primary cultured hepatocytes of *Carassius auratus*. Hepatocytes were incubated with cadmium chloride at 5, 10, 15 and 20 μmol/L for 24 h. Fluo-2/AM fluorescent labeling is used to show the Ca²⁺ level. The activity of Ca²⁺-ATPase was measured by spectrophotometry graphite, cadmium by atomic adsorption spectroscopy and metallothionein (MT) by ELISA. Fluorescence intensity of Ca²⁺ was higher in the treatment groups than in control group; the activity of Ca²⁺-ATPase was significantly increased ($P < 0.01$). Ca²⁺-ATPase activity in treatment group were 4.52, 6.73, 6.68, 7.19, 6.18 times higher than that in the control group respectively. MT expression level was significantly increased in each treatment group ($P < 0.01$), and MT content of 5 μmol/L group increased by 17.15% ($P < 0.01$). The results indicate that cadmium increases levels of Ca²⁺ and MT in hepatocytes of *Carassius auratus*, and MT chelated cadmium in hepatocytes, which may be one of the mechanisms that reduce the cadmium toxicological influence.

Key words: hepatocyte; cadmium; Ca²⁺-ATPase; metallothionein

Corresponding author: WEI Hua. E-mail: hwei@shou.edu.cn