

硫酸铜蓄积对日本鳊4种组织细胞超微结构的影响观察

丁爱侠, 王春琳

(宁波大学生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 通过蓄积毒性试验, 研究了安全质量浓度 ($0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 下硫酸铜 ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) 对日本鳊 (*Charybdis japonica*) 4种组织细胞 (肌肉、鳃、肝胰脏和心脏) 超微结构的影响。结果表明, 铜离子 (Cu^{2+}) 蓄积主要损伤的组织是鳃和肝胰脏, 其次是心脏和肌肉。鳃细胞的损伤表现为鳃丝水肿, 细胞器溶解, 角质层变薄, 线粒体、内质网的肿胀、解体; 肝胰脏细胞的主要损伤特征为肝管微绒毛减少, 线粒体水肿解体, 内质网扩张, 细胞核空泡化, 核膜水肿和脂肪滴增加; 心脏细胞的毒理变化为线粒体内嵴肿胀、瓦解, 肌原纤维不规则, 内质网溶解。 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 经过 16 d 蓄积后虽然没有导致日本鳊死亡, 但已经对其体内组织细胞的超微结构产生了不同程度的影响。

关键词: 日本鳊; 超微结构; 硫酸铜; 蓄积

中图分类号: Q 256

文献标志码: A

文章编号: 1673-2227-(2010)02-0021-08

Effects of accumulated copper sulfate on cellular ultrastructure in four tissues of *Charybdis japonica*

DING Aixia, WANG Chunlin

(College of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: With accumulate toxicity test, the effects of $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ copper sulfate accumulation on ultrastructure of cells in 4 tissues (heart, gill, muscle and hepatopancreas) of *Charybdis japonica* were studied. The results showed that the copper sulfate accumulation caused more damages to gill and hepatopancreas than to heart and muscle. The injured gill cells had a different ultrastructure, with endoplasmic reticulum dilated and vesiculated, mitochondrial cristae partially disintegrated, gill fibre cuticles denatured and dropped. The ultrastructural damages to hepatopancreatic cells were characterized by the decrease of microvilli, swelling and breaking up of mitochondria, expansion of endoplasmic reticulum, disruption and vacuolization of nucleus, tumefaction of nuclear membrane and increase of lipid droplets. As for the toxicological changes of myocardial cells, the mitochondria were swelling, having a lot of vacuolus and disintegrating, while the myofibrils were irregular with endoplasmic reticulum dissolved. Although the samples of *C. japonica*, which had been exposed to $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ copper sulfate for 16 days, were still alive, ultrastructural damages were found in the cells of gill, hepatopancreas, heart and muscle.

Key words: *Charybdis japonica*; ultrastructure; copper sulfate; accumulation

日本鳊 (*Charybdis japonica*) 隶属于梭子蟹科、浙江等地俗称“石奇角”、“石蟹”、“石蜆螃”
鳊属, 北方俗称“赤甲红”、“海红”、“沙蟹”等, 等。广泛分布于中国渤海、黄海、东海和南海沿岸

收稿日期: 2009-12-16; 修回日期: 2010-01-11

资助项目: 宁波市青年 (博士) 基金资助项目 (2003A62016)

作者简介: 丁爱侠 (1974-), 女, 硕士, 工程师, 从事经济动物生态学研究。E-mail: dingaixia@nbu.edu.cn

岛礁区及浅海水域,是东海海区一种重要的可食用海蟹^[1]。近年来,人们对日本蛸的需求量越来越大,而自然资源又极其有限,需求与供应的矛盾越来越突出。山东日照、江苏连云港等地已开始暂养和养殖生产^[2-3]。

硫酸铜(CuSO_4)是水产养殖中经常使用的一种消毒杀虫剂,主要用来毒杀原生动物和低等藻类。有关金属铜(Cu)对动物毒性的研究,主要集中在毒性试验和生物体的累积研究上^[4-8],而在亚细胞水平研究铜离子(Cu^{2+})对动物机体细胞造成的损伤迄今尚未见报道。文章通过研究日本蛸体内不同组织细胞在Cu蓄积后发生的超微病理变化,以期为水环境中Cu污染程度的评估以及正确使用消毒杀虫剂提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料和试剂

日本蛸[(6.5~7.0) cm × (4.5~5.0) cm]购自宁波市大世界农贸市场,暂养容器为塑料箱(75 cm × 40 cm × 15 cm),试验海水为宁波市鄞州区兴旺育苗场经过沉淀、过滤的自然海水,盐度22.4,水温10℃左右。 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 为分析纯晶,用蒸馏水配成母液,使用时根据需要稀释至所需质量浓度。

1.2 试验设计和方法

1.2.1 毒性试验 日本蛸购入后置于实验室暂养3 d后开始急性毒性试验,每日换水1次,并连续充气,使溶解氧保持在 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上。及时清除四肢不全个体和排泄物。根据预备试验设置5个浓度组($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 原液浓度)和1个对照组,浓度梯度为1.0、2.0、4.0、8.0和 $16.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$,并各设1个平行组。每只箱中随机放入20个日本蛸,试验期间不喂食,每12 h换同质量浓度药液1次,其他管理措施同暂养试验。分别记录24、48、72和96 h死亡和成活数,以直线内插法求出24、48、72和96 h半致死浓度(LC_{50}),并按照 $96 \text{ h } \text{LC}_{50} \times 0.1$ 计算出安全质量浓度。

药物积累试验是根据急性毒性试验的结果,把 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 对日本蛸的安全质量浓度($0.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)设置为试验浓度进行蓄积试验。试验设1个浓度组和1个对照组,16 d后终止试验。

1.2.2 样品处理 蓄积试验结束后迅速活体解

剖,选取肌肉、鳃、肝胰脏和心脏部分组织用2.5%戊二醛和1%锇酸双固定,梯度乙醇脱水,Epon812包埋,LKB超薄切片机切片,常规电镜切片染色,日立H-700型透射电镜观察摄影。

2 结果与分析

2.1 肌肉细胞的毒理变化

对照组肌原纤维致密,排列规则,明暗带清晰(图版I-1), Cu^{2+} 处理组肌原纤维形态同对照组(图版I-2)。对照组线粒体丰富,为椭圆形,内嵴发达,分布均匀,间质浓密(图版I-3)。处理组线粒体数目相对较少,大部分已经溶解,很难找到完整的线粒体,残存的线粒体内嵴明显水肿,有溶解现象并伴随空泡化(图版I-4)。对照组细胞核形态规则,核膜完整,核内异染色质较多(图版I-5~6)。处理组细胞核不规则,核外膜轻微水肿、外突,部分膜溶解(图版I-7~8)。

2.2 鳃丝细胞的毒理变化

对照组的鳃丝细胞结构致密(图版II-1), Cu^{2+} 处理组鳃细胞膨胀,间隔增大(图版II-2)。对照组鳃丝管壁角质层较厚(II-3),处理组鳃丝管壁的角质层部分脱落,管壁变薄(图版II-4)。对照组细胞质中线粒体丰富(图版II-5),处理组线粒体溶解情况比较严重,数目减少,结构不清楚,内嵴肿胀、排列无序,双层膜部分水肿、溶解(图版II-6)。对照组细胞核规则,核膜清楚,异染色质丰富、染色深(图版II-7)。处理组细胞核溶解现象严重,染色质染色变淡,空泡化明显,并伴随核膜断裂现象(图版II-8~9)。对照组内质网丰富(图版II-10),处理组内质网基本正常(图版II-11)。

2.3 肝胰脏细胞的毒理变化

对照组肝管微绒毛丰富、排列致密(图版III-1~2), Cu^{2+} 处理组肝管微绒毛相对减少(图版III-3)。对照组线粒体靠近微绒毛区分布,内嵴发达(图版III-4), Cu^{2+} 处理后的细胞线粒体部分解体(图版III-5)。对照组肝胰脏细胞中粗面内质网和滑面内质网十分丰富(图版III-6),处理组内质网相对丰富,但有轻微水肿、扩张现象(图版III-7)。对照组细胞核规则,结构完整,核膜清晰(图版III-8)。处理组细胞核核外膜轻微水肿、外突,染色质染色变淡,核仁弥散(图版

Ⅲ-9)。对照组脂肪滴电子密度均匀,数量较少(图版Ⅲ-10)。处理组脂肪滴少量增加(图版Ⅲ-11)。

2.4 心肌细胞的毒理变化

对照组心肌细胞排列规则、致密,明暗带清晰(图版Ⅳ-1~2), Cu^{2+} 处理组心肌原纤维排列疏松且不规则,纤维边缘不整齐,明暗带不清晰,部分纤维出现断裂(图版Ⅳ-3~4)。对照组线粒体结构完整(图版Ⅳ-5),处理组线粒体内嵴肿胀,排列不整齐,部分线粒体消失,空泡化(图版Ⅳ-6)。对照组细胞核规则,核膜清晰、完整,异染色质丰富,染色较深(图版Ⅳ-7),处理组细胞核不规则,异染色质染色较浅,并有断裂现象(图版Ⅳ-8),对照组核糖体丰富(图版Ⅳ-9),处理组核糖体减少(图版Ⅳ-10)。

3 讨论

关于重金属对鱼类和虾的急性毒性研究已有一些报道,但对蟹的研究相对较少^[9],关于重金属胁迫下甲壳类生物细胞超微结构变化的报道尚未见到。 CuSO_4 在日本鳊体内的蓄积试验结果表明,不同组织器官的损伤效应不同,相同器官中不同细胞器对 Cu^{2+} 胁迫的耐受性也存在差异。组织器官中鳃和肝胰脏的损伤最严重,细胞器中变化最大的是线粒体和内质网。

3.1 肌肉细胞的损伤效应

$0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 对肌肉细胞损伤的靶部位是线粒体,蓄积后线粒体局部瓦解、空泡化,其次是细胞核及细胞膜。这可能和Cu在肌肉细胞内的定位有关,除细胞液外,Cu在线粒体和细胞核中的分布最多。

3.2 鳃细胞的损伤效应

CuSO_4 蓄积致使鳃丝细胞多种细胞器变化,主要和重金属进入甲壳动物机体的途径有关。水体中重金属主要通过蟹的鳃上皮细胞进入血淋巴,再由血淋巴输送到全身各组织器官,所以,鳃是日本鳊体内受药物胁迫最敏感的器官之一^[10]。鳃细胞器中的敏感部位是线粒体、内质网和细胞核,线粒体表现为解体、空泡化、内嵴肿胀、溶解,内质网表现为数目减少、解体和空泡化,细胞核表现为核膜肿胀、染色质不规则。

3.3 肝胰脏细胞的损伤效应

根据对 Cu^{2+} 损伤效应的大小,把肝胰脏细胞中的细胞器排列为内质网>线粒体和微绒毛>脂肪滴和细胞核,这和汝少国等^[11]和冯涛等^[12]的研究结果类似。滑面内质网和粗面内质网分别承担降解有毒物质和分泌、合成蛋白的功能,内质网的严重损伤可影响到机体以上2种生物功能。线粒体、微绒毛和细胞核的损伤也会导致机体供能减少,破坏正常的遗传、代谢水平。

3.4 心肌细胞的损伤效应

日本鳊心肌细胞中线粒体和肌原纤维是 Cu^{2+} 胁迫的主要靶部位,其次是细胞核与核糖体。线粒体受到破坏导致肌原纤维断裂,不能正常供应能量,心脏便处于饥饿状态,不能正常收缩^[13]。细胞核是生物细胞遗传代谢的调控中心,细胞核受到的损害有可能在遗传基因水平上表现出来^[14]。心肌细胞比肌肉细胞受损害的程度更大,这可能和前者中线粒体和转氨酶的分布更为丰富有关^[15]。

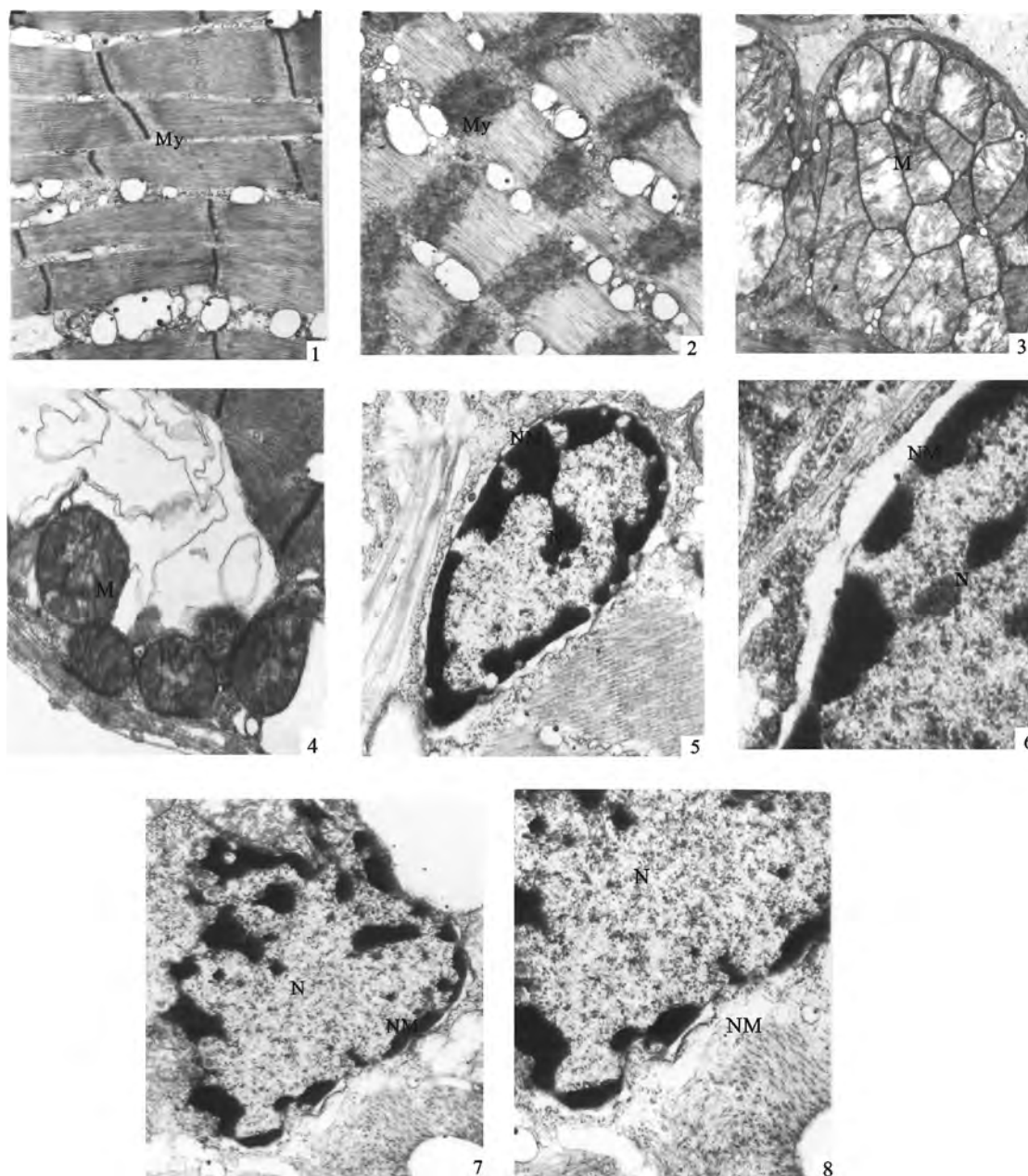
4 结语

随着工农业生产的发展,重金属产生的毒害问题日益突出,它不仅能在生物体内蓄积,还能通过水生生物链的放大作用对更高营养级的生物甚至人类造成危害^[16]。 CuSO_4 蓄积试验表明,安全质量浓度下的 CuSO_4 蓄积对日本鳊虽然没有致死作用,但对动物细胞超微结构的伤害并不是破坏某一种细胞器或某些细胞器,而是对细胞各种结构的整体损害,而且细胞中不同结构耐受重金属的能力也不相同。同时,国内外的一些研究也表明,重金属对甲壳动物机体的最早作用是从生物大分子开始,然后才逐步在细胞和器官水平反映出来^[17-19]。因此,可以把细胞超微结构的变化作为监测水环境污染的一个指标^[20],同时在养殖生产中必须把杀虫消毒药物的浓度控制在可能产生不良影响的浓度以下。

参考文献:

- [1] 俞存根,宋海棠,姚光展.东海日本鳊的数量分布和生物学特性[J].上海水产大学学报,2005,14(1):40-45.
- [2] 郑春波.日本鳊池塘暂养肥育增殖试验[J].中国水产,2008(11):62-63.
- [3] 徐国成,顾云场.日本鳊养殖技术研究[J].科学养鱼,2007(7):37-37.
- [4] 丛宁,袁莉民,沈伯平,等.硫酸铜对金鱼急性毒性及肝细胞

- 超微结构的影响 [J]. 扬州大学学报: 农业与生命科学版, 2005, 26 (2): 89-92.
- [5] 刘志礼, 李朋富. 螺旋藻富集铜锰的两个试验 [J]. 南京大学学报: 自然科学版, 1999, 35 (2): 244-251.
- [6] 林义章, 张淑媛, 林海生. 铜胁迫对小白菜叶肉细胞超微结构的影响 [J]. 中国生态农业学报, 2008, 16 (4): 948-951.
- [7] 计汪栋, 施国新, 杨海燕, 等. 铜胁迫对竹叶眼子菜叶片生理指标和超微结构的影响 [J]. 应用生态学报, 2007, 18 (12): 2727-2732.
- [8] 张红霞, 潘鲁青, 刘静. 重金属离子对日本鳊抗氧化酶 (SOD, CAT, Gpx) 活力的影响 [J]. 中国海洋大学学报, 2006, 36 (Sup): 49-53.
- [9] 米静洁, 袁慧, 王兰. 铜、镉、铬、铅对河南溪蟹的急性毒性作用 [J]. 安徽农业科学, 2008, 36 (17): 7273-7234.
- [10] LAWSON S L, JONES M B, MOATE R M. Effect of Copper on the ultrastructure of the gill epithelium of *Carcinus maenas* (Decapoda: Brachyura) [J]. Mar Poll Bull, 1995, 31 (1/3): 63-72.
- [11] 汝少国, 李永祺, 姜明, 等. 久效磷对中国对虾细胞超微结构的影响 I: 对肝胰脏和肌肉的毒性效应 [J]. 水产学报, 1996, 20 (1): 1-5.
- [12] 冯涛, 魏凤琴, 欧阳高亮, 等. 苯并 (a) 芘对大弹涂鱼肝细胞超微结构的影响 [J]. 应用生态学报, 2003, 14 (10): 1780-1782.
- [13] 王兰, 孙海峰. 镉对长江华溪蟹心肌细胞超微结构的影响 [J]. 水生生物学报, 2002, 26 (1): 8-11.
- [14] 徐勤松, 施国新, 杜开和, 等. Cd^{2+} 对菹草叶片保护酶活性和细胞超微结构的毒害影响 [J]. 水生生物学报, 2003, 27 (6): 584-588.
- [15] 金春华, 丁爱侠, 王春琳. 漂白粉蓄积对日本鳊 4 种组织超微结构的影响 [J]. 水产科学, 2005, 24 (5): 11-15.
- [16] 胡金朝, 郑爱珍, 等. 重金属胁迫对植物细胞超微结构的损伤 [J]. 商丘师范学院学报, 2005, 21 (56): 126-128.
- [17] DOWNS T M, SCHALLENBERG M, BURNS C W. Responses of lake phytoplankton to micronutrient enrichment: a study in two New Zealand lakes and an analysis of published data [J]. Aquat Sci, 2008, 70 (4): 347-360.
- [18] HADJOUJIA S, VIGNOLES C, DELUCHAT V, et al. Short term copper toxicity on *Microcystis aeruginosa* and *Chlorella vulgaris* using flow cytometry [J]. Aquat Toxicol, 2009, 94 (4): 255-264.
- [19] CLAUDE E B. Water quality in ponds for aquaculture [M]. Auburn: Auburn University Press, 1990: 56-56.
- [20] ARNOLD W R, SANTORE R C, COTSIFAS J S. Predicting copper toxicity in estuarine and marine waters using the biotic ligand model [J]. Mar Bull, 2005, 50 (12): 1634-1640.

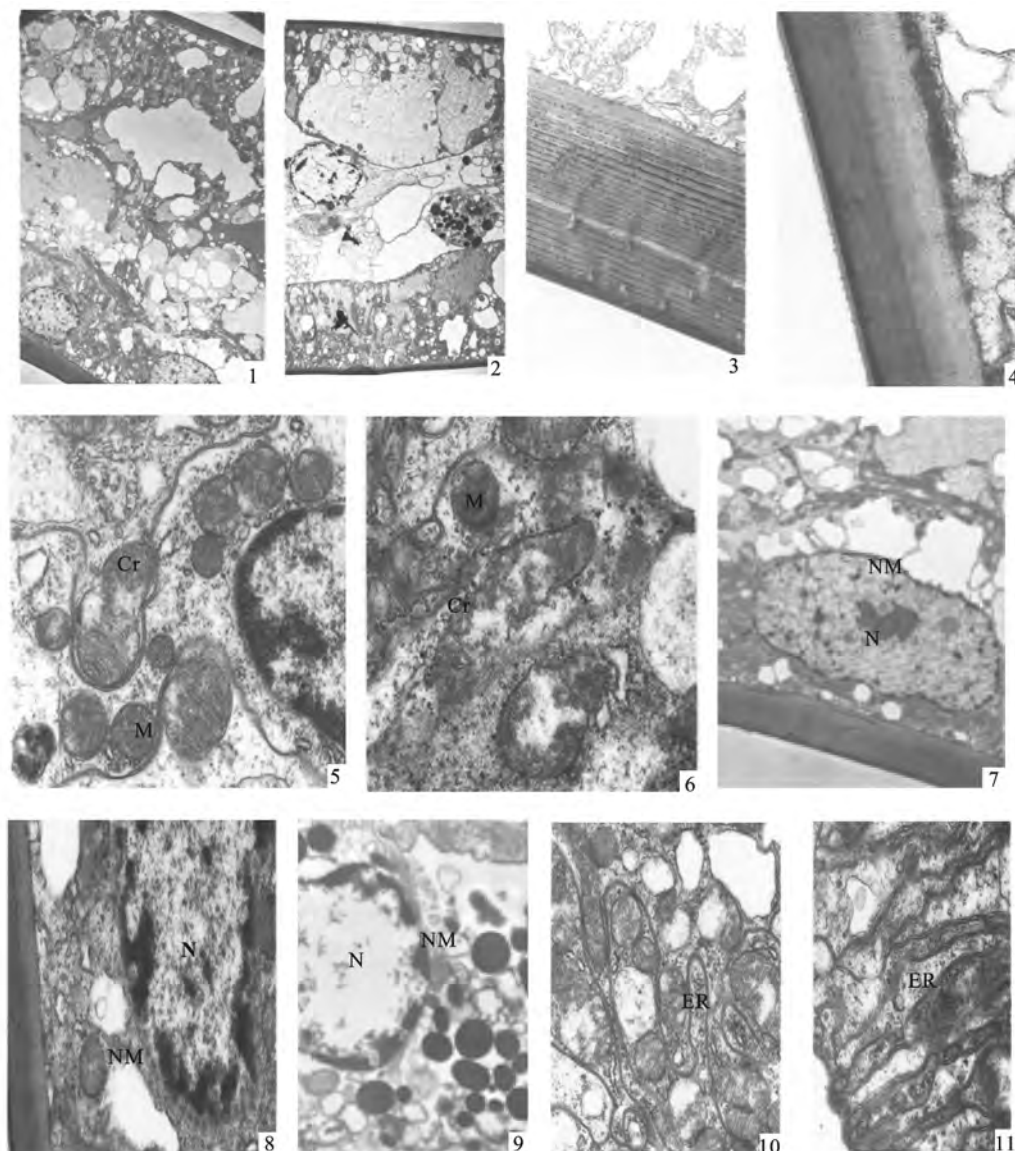


图版 I 肌肉细胞的毒理变化

1. 对照组肌原纤维, $\times 10\,000$; 2. 硫酸铜处理组肌原纤维, $\times 7\,500$; 3. 对照组线粒体, $\times 7\,500$;
4. 硫酸铜处理组线粒体部分溶解, 内嵴肿胀、空泡化, $\times 12\,000$; 5~6. 对照组细胞核, $\times 15\,000$, 及核膜, $\times 40\,000$;
7~8. 硫酸铜处理组细胞核不规则及核膜溶解, $\times 10\,000$, $\times 20\,000$

Plate I Toxicological changes in musculature cell

1. Myofibril (My) in control group, $\times 10\,000$; 2. My in treatment group (treated with copper sulfate), $\times 7\,500$; 3. Mitochondrial (M) in control group, $\times 7\,500$; 4. partly dissolved M; swelling cristae (Cr) and vesicles in musculature in treatment group, $\times 12\,000$;
5~6. Nucleus (N), $\times 15\,000$, and nucleus membrane (NM), $\times 40\,000$, in control group;
7~8. irregular N and dissolved NM in treatment group, $\times 10\,000$, $\times 20\,000$

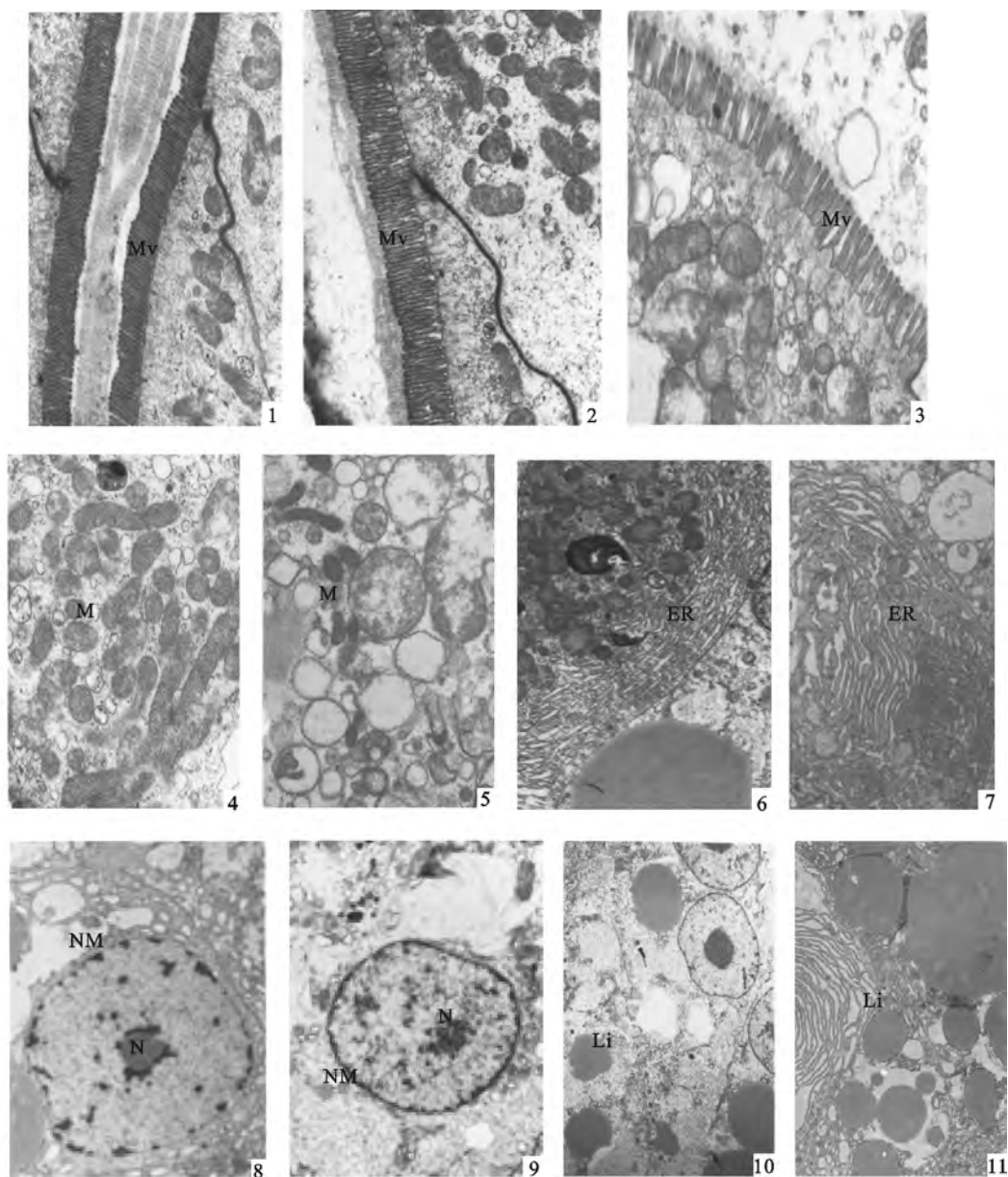


图版 II 鳃细胞的毒理变化

1. 对照组鳃丝细胞, $\times 2\ 000$; 2. 硫酸铜处理组鳃丝细胞, $\times 2\ 000$; 3. 对照组鳃丝管壁角质层, $\times 8\ 000$; 4. 硫酸铜处理组角质层变薄, $\times 30\ 000$; 5. 对照组丰富的线粒体及内嵴 $\times 15\ 000$; 6. 硫酸铜处理组线粒体部分溶解、内嵴肿胀, $\times 15\ 000$; 7. 对照组细胞核及结构完整的核膜, $\times 4\ 000$; 8~9. 硫酸铜处理组细胞核不规则、空泡化, 染色质变淡、部分溶解, $\times 10\ 000$, $\times 8\ 000$;
10. 对照组内质网, $\times 15\ 000$; 11. 硫酸铜处理组内质网, $\times 20\ 000$

Plate II Toxicological changes in gill cell

1. gill cells in control group, $\times 2\ 000$; 2. gill cells in treatment group (treated with copper sulfate), $\times 2\ 000$; 3. cuticle in control group, $\times 8\ 000$; 4. thinner cuticle in treatment group, $\times 30\ 000$; 5. large number of mitochondria (M) and cristae (Cr) in control group, $\times 15\ 000$;
6. partly dissolved M and swelling Cr in treatment group, $\times 15\ 000$; 7. Nucleus (N) and nuclear membrane (NM) in control group, $\times 4\ 000$;
- 8~9. irregular N which have vesicles, darkening and partly broken chromatin in treatment group, $\times 10\ 000$, $\times 8\ 000$;
10. Endoplasmic reticulum (ER) in control group, $\times 15\ 000$; 11. ER in treatment group, $\times 20\ 000$

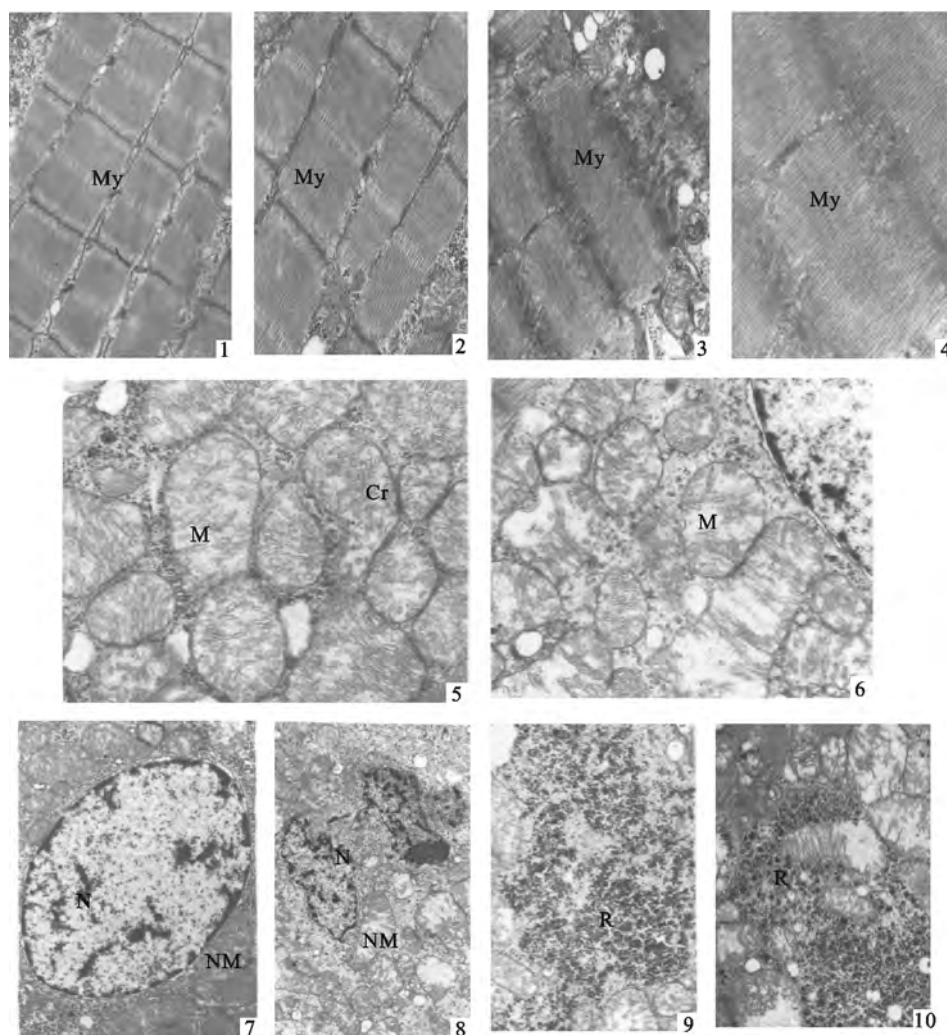


图版Ⅲ 肝胰脏细胞的毒理变化

- 1~2. 对照组中排列致密、极丰富的肝管微绒毛， $\times 8\,000$ ， $\times 10\,000$ ；3. 硫酸铜处理组中较稀疏的肝管微绒毛， $\times 10\,000$ ；
4. 对照组中极丰富的线粒体， $\times 10\,000$ ；5. 硫酸铜处理组中部分解体的线粒体， $\times 10\,000$ ；6. 对照组中丰富的内质网， $\times 3\,000$ ；
7. 硫酸铜处理组内质网， $\times 3\,000$ ；8. 对照组细胞核， $\times 6\,000$ ；9. 硫酸铜处理组细胞核核外膜轻微水肿，核仁不规则、染色质染色变浅，
部分溶解， $\times 6\,000$ ；10. 对照组中的脂肪滴，电子密度均匀，数目较少，形状规则， $\times 2\,500$ ；
11. 硫酸铜处理组中不规则的脂肪滴，数目有一定程度的增多， $\times 3\,000$

Plate III Toxicological changes in hepatopancreatic cell

- 1~2. large amount of regularly arranged microvilli (Mv) in control group, $\times 8\,000$, $\times 10\,000$; 3. relatively sparse Mv in treatment group (treated with copper sulfate), $\times 10\,000$; 4. abundant mitochondria (M) in control group, $\times 10\,000$; 5. partly dissolved M in treatment group, $\times 10\,000$;
6. Endoplasmic reticulum (ER) in control group, $\times 3\,000$; 7. ER in treatment group, $\times 3\,000$; 8. Nucleus (N) and nuclear outer membrane (NM) in control group, $\times 6\,000$; 9. changed N with the tumefaction of nuclear outer membrane, irregular nucleoli, darkening and partly broken chromatin in treatment group, $\times 6\,000$; 10. regular and relatively small amount of lipid droplets (Li) in control group, $\times 2\,500$;
11. irregular but increasing amount of Li in treatment group, $\times 3\,000$



图版IV 心肌细胞的毒理变化

- 1~2. 对照组中的肌原纤维, $\times 8\,000$, $\times 15\,000$; 3~4. 硫酸铜处理组中肌原纤维膨胀、疏松, 明暗带不清晰, $\times 8\,000$, $\times 15\,000$;
 5. 对照组中极丰富的线粒体和结构完整的内嵴, $\times 12\,000$; 6. 硫酸铜处理组中部分解体的线粒体, $\times 12\,000$;
 7. 对照组细胞核及核膜, $\times 8\,000$; 8. 硫酸铜处理组不规则细胞核及核外膜, $\times 6\,000$;
 9. 对照组中丰富的核糖体, $\times 6\,000$; 10. 硫酸铜处理组核糖体, $\times 6\,000$

Plate IV Toxicological changes in myocardial cell

- 1~2. Myofibril (My) in control group, $\times 8\,000$, $\times 15\,000$; 3~4. swelling and loose My with blurring light and dark bands in treatment group (treated with copper sulfate), $\times 8\,000$, $\times 15\,000$; 5. abundant mitochondrial (M) and cristae (Cr) in control group, $\times 12\,000$;
 6. partly dissolved M in treatment group, $\times 12\,000$; 7. Nucleus (N) and nuclear outer membrane (NM) in control group, $\times 8\,000$;
 8. irregular N and NM in treatment group, $\times 6\,000$; 9. abundant ribosomes (R) in control group, $\times 6\,000$;
 10. R in treatment group, $\times 6\,000$