

铜砷单一污染对蚯蚓体腔细胞的影响

李帅章, 孙振钧, 王 冲

(中国农业大学资源与环境学院, 北京 100094)

摘 要:蚯蚓是土壤污染的重要指示者。本实验的主要目标就是要研究重金属对蚯蚓以及参与防御反应的体腔细胞的影响。人工土壤用 4 个浓度的铜与砷染毒,然后把成熟的赤子爱胜蚓在其中分别放置 2、7 与 14 d。结果表明,随着金属离子浓度的增大与时间的增加,蚯蚓的生长率不断降低。中性红保持时间与重金属的剂量有一定的联系,浓度越高,中性红保持时间越短,随着时间的增加甚至会减少为 0。黏附细胞吞噬活性与细胞吞饮作用也受到重金属的影响而减弱,这也说明重金属对蚯蚓中与免疫相关的体腔细胞影响较大。或许,免疫功能的破坏导致蚯蚓在重金属污染的土壤中生活动力较差。

关键词:铜;砷;体腔细胞;中性红保持时间;饱饮能力;塑料黏附

中图分类号:X503.223 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2008)06-2382-05

Effects of Mono-contamination of Cu and As on Coelomocytes of Earthworm *Eisenia foetida*

LI Shuai-zhang, SUN Zhen-jun, WANG Chong

(College of Resource and Environmental Science, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Based on the Artificial Soil Test(OECD-guideline No.207)with earthworm as the indicator, since earthworms are sensitive bio-indicators of soil pollution, the effects of heavy metals on earthworms(*Eisenia foetida*)and their coelomocytes involved in the defensive reactions were studied at individual and cell level. Earthworms were exposed to a range of increasing soil copper and arsenic concentrations in a mesocosm experiment for 2, 7 and 14 days. The results showed that, with the increasing concentrations of the heavy metals and the exposure time, the growth of *Eisenia foetida* was reduced gradually. Under normal conditions, the average neutral red retention was 94.3 min. After inducement, the assay demonstrated a clear dose-response, with the increase of heavy metals concentration, the retention time accordingly decreased and even reduced to zero. NRR closely related to the metal concentration and exposure time. In addition, significant impairment of pinocytosis and plastic adherence were revealed for coelomocytes, which in turn clarified the great impact of heavy metals on the coelomocytes related to immunity. Perhaps the impairment of immune functions contributed to the poor survival of *Eisenia foetida* in heavily polluted soils with heavy metals.

Keywords: copper; arsenic; coelomocytes; neutral red retention; pinocytosis; plastic adherence

蚯蚓在土壤的物理、化学和生物过程中扮演重要的角色。它们是生态系统中的关键种并被广泛用作环境污染的生物指示者^[1]。中性红保持时间分析在环境风险评定与常规检测中有潜在的作用,因为它能准确地在没有引起蚯蚓实际的生理损害前预测生态损害^[2]。中性红保持时间已经被确定作为蚯蚓对污染物响应的生物标记,如重金属铜^[2], 锌^[3], 镍^[4], 铅和镉^[5]。具有免疫活性的体腔细胞和它们的生存能力是用来评估

免疫毒性风险的一种最有前途的分析方法^[1]。本实验的研究就是要检测不同金属不同污染程度的土壤对赤子爱胜蚓的影响。我们研究了蚯蚓生长率、体腔细胞溶酶体中性红保持时间以及具免疫活性的体腔细胞活性。

1 试验材料与方法

1.1 试验材料

试验动物:赤子爱胜蚓(*Eisenia foetida*)是国际蚯蚓毒性试验标准蚓种同时也是最常用的,具有中等敏感性。试验前用人工土预养 48 h。选择 3 月龄以上、有明显环带、体重 300~500 mg 之间的大小比较一致的

收稿日期:2007-11-20

作者简介:李帅章(1982—),男,山东烟台人,硕士研究生,主要从事毒理学与蚯蚓分子生态学研究。E-mail:shuaizhangli@yahoo.cn

通讯作者:孙振钧 E-mail:sun108@cau.edu.cn

健康成熟个体。

供试土壤:人工土壤,按照 OECD(1984)标准,进行人工土壤的配制,成分见表 1。

表 1 试验人工土壤的主要成分

Table 1 Main components of the artificial soil in the experiment			
人工土壤主要成分	石英砂	高龄土	草炭
重量百分数/%	70	20	10

不同的原材料 pH 不同,最终影响到人工土壤的 pH,容易对结果产生影响^[3]。因此试验中加入 CaCO₃来调节土壤的 pH 值为 6.0,然后加入土壤干重 35%的水,用手将其混匀。

1.2 试验设计

将染毒的人工土放入塑料盆中,每盆 500 g,所用的金属化合物分别为硫酸铜和砷酸氢二钠,设对照、4 种浓度的重金属污染 5 个处理,(其中铜离子浓度为 200、400、600、800 mg·kg⁻¹;砷离子浓度为 10、30、40、80 mg·kg⁻¹),每个处理 3 个重复。每个盆接种蚯蚓 9 条。在 20℃下进行培养。在诱导 2、7 以及 14 d 分别取样进行测定。

1.3 试验方法

体重变化:取出蚯蚓,吐泥 48 h 后称其体重。诱导后的体重减去诱导前的体重然后除以诱导前的体重即为蚯蚓的生长率。

中性红保持时间:称取 0.02 g 中性红溶于 1 mL 的二甲基亚砷中,然后取 10 μL 溶于 2.5 mL Ringer’s 液中,作为中性红工作液。测定时,先取 20 μL 蚯蚓体腔液放在显微镜载玻片上,放置并滑动 30 s 使细胞黏附在载玻片上,加入等体积的中性红工作液混合,盖上盖玻片 400 倍光学显微镜下观察,每 2 min 观察一次,不观察时放于人工气候箱中,直到半数以上的细胞变为红色。这个时间间隔被记录为中性红保持时间^[2,4]。

体腔细胞的获得与处理:取成熟的赤子爱胜蚓放在湿滤纸吐尽肠道污物后(一般 48 h),用 0.01 mol·L⁻¹的 pH7.2 的 PBS 缓冲液反复冲洗干净。加入 3 mL 含有 2.5 mmol·L⁻¹ EGTA(防止细胞凝集)的 PBS,用自制的 5 V 电压瞬间刺激蚯蚓,用移液器收集黄色分泌液。然后加入 12 mL 的 Hank’s 液洗两次。提取的体细胞含有组织黄细胞以及白细胞与巨噬细胞,组织黄细胞是没有吞噬活性的。在 4℃条件下离心 20 min,转速为 250 g·min⁻¹,所得的沉淀为体细胞,然后加入一

定量的 1640 细胞液调整细胞浓度为 1×10⁶ 个·mL⁻¹。台盼蓝染色法估计细胞存活率^[6]。

黏附活性:利用塑料黏附法测定免疫细胞活性。细胞液在 96 孔板中孕育 1 h 后,把没有吸附的细胞除去。用 10%甲醇固定,吸出染液。加入 0.1 mL 0.1% 结晶紫染液,室温放置 20 min,轻轻甩去染色液,用蒸馏水洗涤各孔,将培养板倒置于吸水纸上洗干水分,自然干燥或烘干。测定前,每孔加 0.1 mL 酸性酒精提取结晶紫,最后稀释到 2.5 mL。充分振荡后在 570 nm 下测定吸光度^[7]。

吞饮能力:在 96 空板中,细胞与 500 μg·mL⁻¹ 的中性红在 1640 细胞液中孕育 1 h,然后把没有发生黏附的细胞以及剩余的中性红除去。用 1640 细胞液把吸附细胞的孔洗两遍,用 0.1 mL 酸性酒精(3%盐酸溶解在 95%的酒精中)把被吞引的中性红从细胞中提取出来,最终稀释到 2.5 mL。最后在 540 nm 下测定吸光度^[7]。

1.4 数据处理

采用 Excel,SPSS 分析软件(SPSS12.0)。

2 试验结果

2.1 铜与砷对蚯蚓生长的影响

2.1.1 铜对蚯蚓生长率的影响

在整个培养过程中,蚯蚓的活性受到 Cu 污染的影响较大。所有处理中蚯蚓鲜重均比培养前都有不同程度的下降(表 2)。对照中蚯蚓的体重变化不明显,生长率从-1.02%降到-1.11%,而后又升高到-0.84%。而经过 Cu 诱导后,蚯蚓的生长率随着浓度的增加而不断下降。但是当 Cu 浓度为 600 mg·kg⁻¹ 时,其蚯蚓生长率分别为-13.7%、-22.4%与-27.6%,较 400 mg·kg⁻¹ Cu 诱导后的蚯蚓生长率要高。当 Cu 离子浓度为 800 mg·kg⁻¹ 时,诱导 14 d 后蚯蚓的生长率最低,可达到-48%。

2.1.2 砷对蚯蚓生长率的影响

由表 3 可以看出,分别经过 2、7 与 14 d 的诱导后,对照中蚯蚓的体重差异不显著,而经过 As 诱导后,蚯蚓体重变化极显著。生长率也随着 As 浓度的增加而不断下降。相对于对照来说,污染后蚯蚓的生长率差异显著。当 As 分别为 30 与 40 mg·kg⁻¹ 时,其生长率很相近。这也说明,蚯蚓对重金属有一定的耐受性。诱导 14 d 后,生长率分别为-24%与-23.6%。但是 Cu 浓度约是 As 的 10 倍,由于浓度不相同,所以哪种金属对蚯蚓生长率的影响更为明显还无法做出明确

表 2 铜污染对蚯蚓生长的影响

Table 2 Effect of copper on the earthworms growth

处理 Treatments	项目 Items	Cu添加浓度水平 Cu addition rate/mg·kg ⁻¹				
		0	200	400	600	800
2 d	培养前蚯蚓鲜重/g·pot ⁻¹	3.58±0.14a	3.6±0.08a	3.56±0.15a	3.71±0.10a	3.66±0.12a
	培养后蚯蚓鲜重/g·pot ⁻¹	3.55±0.12b	3.2±0.11b	2.78±0.17B	3.2±0.09b	2.74±0.13B
	蚯蚓生长率/%	-1.02	-11.2	-21.7	-13.7	-25.2
7 d	培养后蚯蚓鲜重/g·pot ⁻¹	3.54±0.12b	3.0±0.06b	2.58±0.21b	2.88±0.16B	2.37±0.15B
	蚯蚓生长率/%	-1.11	-16.5	-27.5	-22.4	-35.4
14 d	培养后蚯蚓鲜重/g·pot ⁻¹	3.56±0.15a	2.95±0.07b	2.44±0.2B	2.69±0.12B	1.9±0.14B
	蚯蚓生长率/%	-0.84	-18	-31.4	-27.6	-48

注:同一列不同小写字母表示不同处理间的差异显著($P<0.05$),大写字母表示极显著($P<0.01$)。
Note:Different small letters in the same column denote significant differences between treatments($P<0.05$),capital letters denote very significant($P<0.01$).

表 3 砷污染对蚯蚓生长的影响

Table 3 Effect of arsenic on the earthworms growth

处理 Treatments	项目 Items	As添加浓度水平 As addition rate/mg·kg ⁻¹				
		0	10	30	40	80
2 d	培养前蚯蚓鲜重/g	4.69±0.12a	4.48±0.09a	4.68±0.06a	4.57±0.14a	4.65±0.13a
	培养后蚯蚓鲜重/g	4.67±0.12a	4.03±0.08b	4.11±0.1b	3.89±0.2b	3.67±0.15b
	蚯蚓生长/%	-0.5	-10	-12.2	-14.9	-18.9
7 d	培养后蚯蚓鲜重/g	4.64±0.13a	3.94±0.07b	3.85±0.11b	3.63±0.2B	3.53±0.16B
	蚯蚓生长/%	-1.07	-12	-17.7	-20.6	-24.1
14 d	培养后蚯蚓鲜重/g	4.63±0.1a	3.74±0.06b	3.58±0.11B	3.47±0.18B	3.23±0.15B
	蚯蚓生长/%	-1.28	-16.6	-23.6	-24	-30.6

注:同一列不同小写字母表示不同处理间的差异显著($P<0.05$),大写字母表示极显著($P<0.01$)。
Note:Different small letters in the same column denote significant differences between treatments($P<0.05$),capital letters denote very significant($P<0.01$).

的判断。

2.2 铜砷对细胞溶酶体中性红保持时间(NRR)的影响

根据中性红的保持时间可反映土壤污染对蚯蚓的毒害效应。NRR 指标对污染物敏感因而可作为早期预警生物标志物。从图 1、图 2 可以看出,对照中性红保持时间基本没有什么变化,约为 94.3 min。重金属诱导 2 d 后,中性红保持时间就有明显的变化,当 Cu 浓度为 200 mg·kg⁻¹ 时,NRR 就降为 74.5 min;As 为 10 mg·kg⁻¹ 时,NRR 为 77.8 min。随着时间的增加,不同浓度诱导的蚯蚓中性红保持时间都有不同程度的减少,但 Cu 诱导后中性红保持时间下降的更加明显。As 诱导 2 d 与 7 d 时,NRR 变化不显著。当 Cu 浓度为 800 mg·kg⁻¹ 时,中性红时间降为 0;As 浓度为 80 mg·kg⁻¹ 时,NRR 最低为 9.5 min。这也说明虽然 As 毒性比 Cu 强,但是当量较大时,其对蚯蚓的影响也是较明显的。中性红保持时间与重金属的剂量以及诱导时间有一定的相关性。

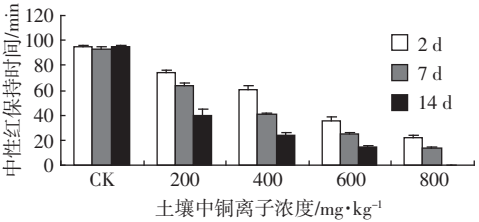


图 1 铜诱导 2、7 以及 14 d 对中性红保持时间的影响
Figure 1 Effect of copper on the neutral red retention time after 2, 7 and 14 days

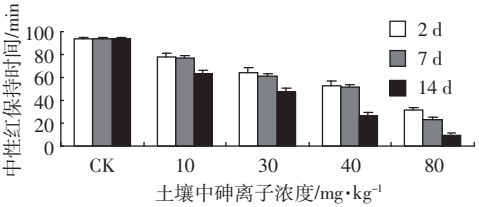


图 2 砷诱导 2、7 以及 14 d 对中性红保持时间的影响
Figure 2 Effect of arsenic on the neutral red retention time after 2, 7 and 14 days

2.3 铜砷对细胞粘附活性的影响

本试验利用体腔细胞的黏附活性并且通过细胞吸收结晶紫来测定其活性。由图 3、图 4 可以看出,重金属对蚯蚓体腔细胞活性有抑制作用。对照中,细胞的活性变化不显著,吸收的结晶紫量约为 4.29 μg 。诱导 2 d 时,细胞活性还未受到较大的影响,但是已经呈下降趋势。当 Cu 为 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,吸收的结晶紫量已降为 $2.89\text{ }\mu\text{g}$;而 As 为 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,吸收的结晶紫为 $3.8\text{ }\mu\text{g}$ 。Cu 诱导后蚯蚓的细胞黏附活性变化更为显著,最小值为 $0.28\text{ }\mu\text{g}$;经过 As 诱导后,最小值为 $0.82\text{ }\mu\text{g}$ 。由此可以看出,细胞黏附活性同重金属剂量以及诱导时间密切相关。

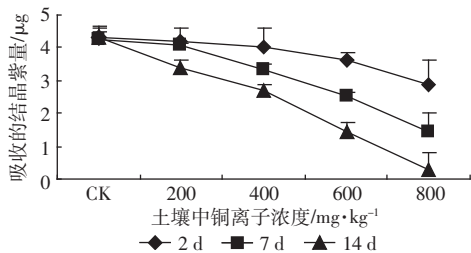


图 3 铜诱导对细胞活性的影响

Figure 3 Effect of copper on the cell activity

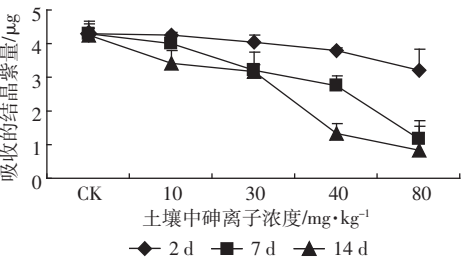


图 4 砷诱导对细胞活性的影响

Figure 4 Effect of arsenic on the cell activity

2.4 铜砷对体腔细胞吞饮活性的影响

细胞的吞饮作用是胞吞作用的一种。它是非选择性的连续摄取细胞外基质中液滴的内吞过程。吞入的物质通常是液体或溶解物。本试验用细胞吞饮中性红染料来测定细胞的吞饮活性。研究表明,重金属对蚯蚓体腔细胞的吞饮活性也有抑制作用。受重金属作用的蚯蚓细胞活性相对对照下降较明显。对照细胞活性随着时间的增加基本没有变化,吞饮的中性红量约为 $1.53\text{ }\mu\text{g}$ 。铜诱导后,细胞吞饮能力降低的幅度较大。当 Cu 为 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,诱导 2 d 后吸收的中性红量就降为 $0.62\text{ }\mu\text{g}$;当 As 为 $80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,诱导 2 d 时中

性红降为 $0.96\text{ }\mu\text{g}$ 。诱导 14 d 后,Cu 诱导的细胞吞饮中性红量降到最低,为 $0.27\text{ }\mu\text{g}$;而 As 诱导后,最低为 $0.55\text{ }\mu\text{g}$ 。重金属污染对体腔细胞的吞饮作用也有一定的影响,见图 5、图 6。

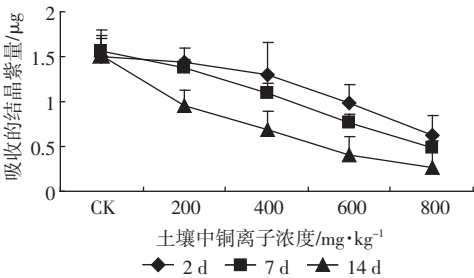


图 5 铜诱导对细胞吞饮活性的影响

Figure 5 Effect of copper on the pinocytosis

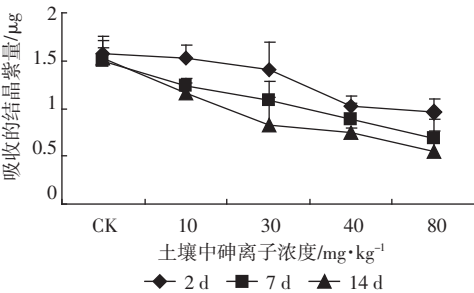


图 6 砷诱导对细胞吞饮活性的影响

Figure 6 Effect of arsenic on the pinocytosis

3 讨论与分析

重金属的污染明显抑制了蚯蚓的生长,其对重金属的耐受能力不仅与重金属的种类、质量分数有关,还与培养的天数有关。比较加 Cu 和加 As 的处理可知:Cu 处理蚓质量降低幅度要大于 As 处理,但是 Cu 和 As 的浓度不一样,因此无法确定那一种对蚯蚓的毒害要大。Fordsmand 等^[8]发现,溶酶体稳定性与 Cu 的形态和有效性密切相关,赤子爱胜蚓在土壤 Cu 浓度仅为 $40\sim80\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时 NRR 就发生显著变化。本试验中,用的铜离子浓度较高,所以在很短的时间内,中性红保持时间变化就极为显著($P<0.001$)。而且当铜离子浓度为 $800\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 时,从蚯蚓的体腔液中没有找到完整的溶酶体,细胞瞬间全部变红。

有关环境污染(包括重金属)对体腔细胞调节的蚯蚓免疫功能研究也很多^[9]。例如,Fugère 等^[10]研究表明,重金属(镉,锌)对体腔细胞吞噬活性有显著的抑制作用。另外,Burch 等^[11]证明了铜离子对体腔细胞生存能力与吞噬活性的影响。因而,本试验中体腔细胞

活性受到铜离子与砷离子的影响是正常的。Joanna Homa 等^[12]研究了污染土壤与无污染土壤对蚯蚓体腔细胞活性的影响,结果表明:污染严重的土壤中蚯蚓体腔细胞的活性受到了抑制,摄取中性红与结晶紫的量较无污染土壤中蚯蚓细胞的活性明显减少。本试验的结果同以上试验基本吻合。

参考文献:

- [1] Bunn K E, Thompson H M, Tarrant K A. Effects of agrochemicals on the immune systems of earthworms [J]. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 1996, 57: 632–639.
- [2] Clause Svendsen, Jason M Weeks. Relevance and applicability of a simple earthworm biomarker of copper exposure[J]. *Ecotoxicology and environmental safety*, 1997, 36: 72–79.
- [3] Spurgeon D J, Svendsen C, Rimmer V R, et al. Relative sensitivity of life-cycle and biomarker responses in fouzine [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2000, 19: 1800–1808.
- [4] Scott–Fordsmand J J, Weeks J M, Hopkin S P. Toxicity of nickel to the earthworm and the applicability of the neutral red retention assay[J]. *Ecotoxicology*, 1998, 7: 291–295.
- [5] Reinecke S A, Reinecke A J. Lysosomal response of earthworm coelomocytes induced by long-term experimental exposure to heavy metals[J]. *Pedobiologia*, 1999, 43: 585–593.
- [6] Ellen Kauschkel, Kazuo Komiyama, Itaru Moro. Evidence for perforin-like activity associated with earthworm leukocytes[J]. *Zoology*, 2001, 104: 13–24.
- [7] Plytycz B, RóŜ ·anowska M, Seljelid R. Quantification of neutral red pinocytosis by small numbers of adherent cells: comparative studies[J]. *Folia biologica(Kraków)*, 1992, 40: 3–9.
- [8] Scott Fordsmand J J, Weeks J M, Hopkin S P. Importance of contamination history for understanding toxicity of copper to earthworm *Eisenia fetida* (Oligochaeta: Annelida), using neutral redretention assay[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2000, 19(7): 174–178.
- [9] Kurek A, Homa J, Plytycz B. Earthworm coelomocytes: convenient model for basic and applied sciences[C]//Beschlin A, Bilej M, Cooper E L (Eds.). A new model for analyzing antimicrobial peptideswith biomedical applications. IOS Press, Ohmsha, 2002. 38–46.
- [10] Fugère N, Brousseau P, Krzystyniak K, et al. Heavy metal-specific inhibition of phagocytosis and different in vitro sensitivity of heterogeneous coelomocytes from *Lumbricus terrestris* (Oligochaeta) [J]. *Toxicology*, 1996, 109: 157–166.
- [11] Burch S W, Fitzpatrick L C, Goven A J, et al. In vitro earthworm *Lumbricus terrestris* coelomocyte assay for use in terrestrial identification evaluation[J]. *Bulletin of Environmental Contamination Toxicology*, 1999, 62: 547–554.
- [12] Joanna Homa, Maria Niklinska and Barbara Plytycz. Effect of heavy metals on coelomocytes of the earthworm *Allolobophora chlorotica* [J]. *Pedobiologia*, 2003, 47: 640–645.
- [13] Koen Lock, Colin R Janssen. Effects of clay and organic matter type on the ecotoxicity of zinc and cadmium to the potworm *Enchytraeus al-bichus* [J]. *Chemosphere*, 2001, (44): 1669–1672.