

镉 铅对家蚕茧质及血细胞 DNA 损伤的影响

朱玉芳¹, 吴 康¹, 崔勇华¹, 郑小坚¹, 许雅香¹, 汪宏其²

(1. 苏州大学生命科学学院, 江苏 苏州 215006; 2. 江苏省浒关蚕种场, 江苏 苏州 215151)

摘 要: 利用 4 龄起家蚕, 添食不同浓度的 Pb²⁺、Cd²⁺ 重金属离子, 研究其对家蚕茧质和 DNA 损伤的影响。结果表明, 受 Pb²⁺、Cd²⁺ 影响, 实验组家蚕的全茧量、茧层量、茧层率均低于清水对照组; 凝胶电泳显示, DNA 链发生明显的梯状断裂现象。

关键词: Pb²⁺; Cd²⁺; 家蚕; 茧质; DNA

中图分类号: X503. 2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000 – 0267(2002)06 – 0502 – 03

Effects of Cadmium and Lead on Cocoon Quality and DNA of Blood Cell in Silkworm (*Bombyx mori*)

ZHU Yu-fang¹, WU Kang¹, CUI Yong-hua¹, ZHENG Xiao-jian¹, XU Ya-xiang¹, WANG Hong-qi²

(1. College of Life Sciences, Suzhou University, Suzhou 215006, China; 2. Farm of Silkworm Eggs Production, Xuguan, Jiangsu, Suzhou 215151, China)

Abstract: Damage of cadmium and lead to DNA chain and the effects on cocoon quality were studied in silkworm under exposure of different cadmium and lead concentrations. The result demonstrated that cadmium and lead both deceased the weights of all cocoon and cocoon shell and cocoon shell rate in the silkworm. In addition, other evidence showed that DNA chain was clearly broken into pieces and DNA band appeared obviously by DNA agarose gel eletrophoresis.

Keyword: Pb²⁺; Cd²⁺; silkworm; cocoon quality; DNA

近年来, 随着全球工业(特别是采矿、冶炼、电镀、印染等工业)的迅猛发展, “三废”排放问题日趋严重, 其中 Pb²⁺、Cd²⁺、Hg²⁺ 等重金属离子的污染问题倍受关注^[1-4]。Cd²⁺ 等毒性重金属通过大气沉降雨水冲刷后可被桑叶叶面吸收, 其次, 大量的含重金属的污水排入河流和农田灌溉区, 通过桑树根的吸收, 也会有一定量的重金属离子被运输并累积于叶片部位, 如用这种桑叶育蚕, 必将影响家蚕的生长。国外, 增井博之(日)曾调查过污染重金属在蚕体组织器官内的蓄积量及进行过毒性的研究^[5]。国内一些学者用除草剂^[6]、苯酚^[7]、有机磷农药^[8]、氟化物^[9] 对家蚕的生长、产量及其生理、生化特性也进行了研究, 但目前重金属对家蚕的生长、产量及毒性机理方面的研究却少见报道。本研究拟通过添食不同浓度的重金属离子, 了解不同重金属对家蚕产量的影响及对 DNA 的损伤作用, 这对家蚕养殖、重金属污染物防治的实践将起到一定的指导意义, 并为进一步探讨家蚕重金属中毒机制积累科学资料。

收稿日期: 2002 – 07 – 15

基金项目: 苏州市科委自然科学基金资助项目(SNZ – 0221)

作者简介: 朱玉芳(1966—), 女, 江苏武进市人, 硕士, 讲师, 从事动物生物学的教学和科研工作。

1 材料和方法

1. 1 材料

1. 1. 1 供试蚕品种

皓月(原种), 由苏州浒关蚕种场原种分场提供。

1. 1. 2 试剂

CdCl₂·5H₂O、Pb(NO₃)₂(分析纯, 上海试剂二厂), Tris、EDTA·2Na、氯仿、NaAc、蔗糖(分析纯, 上海生化试剂公司), 蛋白酶 K、RNaseA、饱和酚 pH8. 0、SDS(上海生工公司), 琼脂糖(上海植物生理研究所), 溴酚蓝、无水乙醇、95% 乙醇、HCl、NaOH、硼酸等其它常用试剂均为国产分析纯。

1. 1. 3 实验溶液

细胞裂解液(10 mmol·L⁻¹ EDTA, 10 mmol·L⁻¹ Tris – HCl, 150 mmol·L⁻¹ NaCl, 10 μg·mL⁻¹ 蛋白酶 K, 0. 4% SDS); TE 缓冲液(10 mmol·L⁻¹ Tris – HCl pH8. 0, 10 mmol·L⁻¹ EDTA pH8. 0); TBE 电极缓冲液(Tris 54 g, 硼酸 27. 5 g, 20 mL 0. 5 mol·L⁻¹ 的 EDTA pH8. 0, 定容至 1 000 mL)。

1. 1. 4 仪器和设备

台式高速冷冻离心机(Biofuge primo R 型, Her-

aeus 公司); 凝胶成像系统(美国 Gene 公司); 微型电泳槽(H6-1 型, 上海精益有机玻璃厂); 台式水浴恒温振荡器(SH z88-1 型)。

1.2 方法

1.2.1 蚕的饲养及重金属添食试验

1—3 龄家蚕, 原种蚕室内 25 ℃ 桑叶育, 饲养管理, 4 龄起蚕后, 将家蚕分成 5 区, 每区设 3 个重复, 以 600 mg · L⁻¹ Pb²⁺(1 区)、500 mg · L⁻¹ Pb²⁺(2 区)、30 mg · L⁻¹ Cd²⁺(3 区)、20 mg · L⁻¹ Cd²⁺(4 区) 溶液均匀喷洒桑叶, 连续添食。以清水喷洒桑叶作为对照(5 区), 在室温下饲养, 直至上簇。

1.2.2 全茧量 茧层量 茧层率

家蚕上簇 9 d 后, 采茧, 称重, 则为全茧量; 削茧, 倒出蚕蛹, 将茧壳称重, 则为茧层量; 茧层量占全茧量的百分比, 即为茧层率。

1.2.3 蚕血的采取

在 5 龄熟蚕上簇前, 剪破添食和对照共 5 区家蚕的腹足, 立即将血液(体液)滴入 1.5 mL 的 Eppendorf 管中, 4 ℃、3 000 r · min⁻¹、10 min, 弃上清, 沉淀即为蚕血球(血细胞)。

1.2.4 DNA 的提取

蚕血细胞中加入细胞裂解液, 37 ℃ 水浴振荡 15min, 再加入蛋白酶 K 至终浓度 100 μg · mL⁻¹, 水浴振荡消化 3h。加入等体积的酚和氯仿(1:1), 轻轻温和地颠倒离心管数次, 4 ℃、10 000 r · min⁻¹、10 min, 取上清, 再重复抽提 1 次后, 加入 1/10 体积的 3 mol · L⁻¹ 醋酸钠和 2.5 倍体积的 95% 冰乙醇, 4 ℃、12 000r · min⁻¹、10 min, 取其沉淀溶于 200μLTE 中, 加入无 DNA 酶的 RNA 酶至终浓度 100 μg · mL⁻¹, 37 ℃ 水浴 30 min, 即为蚕血细胞 DNA, 立即于 4 ℃ 保存, 并迅速进行琼脂糖电泳检测。

1.2.5 琼脂糖凝胶电泳

配制 1% 的琼脂糖凝胶, 并加入终浓度 0.5 μg · mL⁻¹ 的 EB(溴化乙锭), DNA 的加样量为 20 μL, 电极缓冲液为 1 × TBE, 电压 100 V, 冰浴电泳 30—40 min。

1.2.6 扫描拍照

电泳结束后, 先在紫外透射分析仪下观察凝胶条带, 然后把它移至凝胶成像系统中, 用紫外光进行成像, 拍照。

2 结果和分析

2.1 全茧量茧层量茧层率调查情况

见表 1。

表 1 Pb²⁺、Cd²⁺影响下的家蚕茧质情况

Table 1. Effects of cadmium and lead on cocoon quality in silkworm

项目	Pb ²⁺ /mg · L ⁻¹		Cd ²⁺ /mg · L ⁻¹		清水对照
	600	500	30	20	
全茧量/g	1.25	1.28	1.05	1.19	1.51
茧层量/g	0.30	0.33	0.24	0.28	0.40
茧层率/%	24	25.78	22.8	23.5	26.5

由表 1 可以看出, 添食 Pb²⁺、Cd²⁺组家蚕的全茧量、茧层量、茧层率均低于清水对照, 且受同一重金属离子影响, 随其浓度增加, 全茧量、茧层量、茧层率反而呈下降趋势。在允许浓度范围内, 家蚕受 Pb²⁺的影响小于 Cd²⁺。

2.2 家蚕血细胞 DNA 损伤结果

不同浓度、不同重金属离子对家蚕 DNA 断裂损伤的影响见电泳图 1。从图中可以看出, 经过 2 个龄期的重金属添食处理, Pb²⁺浓度在 600 mg · L⁻¹、500 mg · L⁻¹, Cd²⁺浓度在 30 mg · L⁻¹、20 mg · L⁻¹ 时均能诱导家蚕血球 DNA 链发生断裂现象, 其琼脂糖凝胶电泳中出现明显的阶梯状的降解条带(见图中 1、2、3、4 号泳道), 而清水对照未见 DNA 断裂(5 号泳道)。



1. 添食 600 mg · L⁻¹ Pb²⁺ 2. 添食 500 mg · L⁻¹ Pb²⁺
3. 添食 30 mg · L⁻¹ Cd²⁺ 4. 添食 20 mg · L⁻¹ Cd²⁺
5. 清水对照

图 1 添食不同重金属离子的家蚕血球 DNA 琼脂糖凝胶电泳图谱

Figure 1 Photograph of agarose gel of silkworm blood cell DNA under different metal treatment

3 讨论

当用不同浓度的重金属处理后, 重金属离子能与带负电的核酸结合, 导致核酸的破坏裂解。本研究中国家蚕在 4—5 龄熟蚕期间摄入的 Pb²⁺、Cd²⁺重金属离子, 经肠的吸收, 一部分随血液循环到达各组织器官, 另一部分进入血浆和蚕血细胞。利用血细胞提取 DNA, 通过琼脂糖凝胶电泳时, 在电泳图谱上可见

DNA 链明显断裂且片段化 (而不是无规则拖尾断裂), 呈现清晰的梯状条带(ladder)。

家蚕的生活史需经历卵、幼虫、蛹、成虫四个阶段, 为典型的完全变态昆虫。由卵孵化为 1 龄幼虫经 4 次蜕皮成为 5 龄幼虫, 直至上簇, 在这短短的 20 多天内, 体重成万倍增加, 既完成蚕体的成长发育, 并且为丝腺发育、吐丝、营茧奠定丰厚的物质基础, 此阶段新陈代谢极为旺盛。在重金属离子进入血液, 破坏 DNA 结构时, 妨碍了血液机能的正常发挥, 即影响物质的输送、贮存、转变, 对异物的防御和清除, 保持水分平衡, 调节渗透压等生理功能, 这必然影响蛋白质、氨基酸、脂肪、糖类核酸的合成和分解代谢。丝蛋白合成所需的甘氨酸、丙氨酸、丝氨酸等氨基酸, 主要来自血液中的游离氨基酸, 其次一部分来自蚕体的蛋白质和氨基酸代谢。因此丝腺的正常发育所需的各种物质及丝蛋白生成的原料得不到保障, 最终影响蚕茧的产量。当然, 影响家蚕产丝量的原因还有许多, 如重金属破坏丝腺细胞的结构、各种代谢酶活力的变化、丝素基因转录酶活性的影响等等, 有待进一步研究。基于我们的试验, 建议家蚕养殖户及蚕种生产单位的桑树种植地应远离冶炼、电镀、印染等重金属排放区, 以避免造成不必要的经济损失。

在本研究中, 我们发现 Pb、Cd 诱导家蚕血细胞 DNA 发生梯状断裂, 这是细胞凋亡的现象之一。Corcoran 研究提出 DNA 损伤是引发细胞凋亡的开始^[10]。任何 DNA 的损伤如果没有得到正确的修复, 就可导致 DNA 的损伤, 发生突变。在镉、铅的作用下, DNA 断裂损伤之所以加强, 是因为在损伤 DNA 的同

时又损伤了 DNA 的修复系统。重金属诱导家蚕细胞凋亡的形态结构及其他生化方法的检测, 将成为我们继续深入研究的内容。

参考文献:

- [1] 陈其晨, 张克俭, 徐关文. 重金属对鱼类毒性的综合研究[J]. 水产学报, 1988, **12**(1): 21-33.
- [2] 王 夔, 等. 生命科学中的微量元素[M]. 北京: 中国计量出版社, 1991. 450-499.
- [3] Yang Xiao - Fang, Wang Shu - Yi, Zhao Ren - Cheng, et al. Changes in tissue metals after cadmium inoxidation and intervention with chlorpromazine in male rates[J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2000, **13**: 19-25.
- [4] 计时华. 人尿中镉金属硫蛋白的测定[J]. 中国环境科学, 1991, **11**(1): 72-74.
- [5] 增井博之(日). 关于重金属对无菌蚕毒性的研究[J]. 江苏蚕业, 1996, **3**: 57-61.
- [6] 陈小平, 等. 常用除草剂对家蚕的毒性试验[J]. 广西蚕业, 2000, **37**(3): 7-8.
- [7] 管竞芳, 等. 大气苯酚对蚕桑污染毒性[J]. 农村生态环境, 1994, **10**(2): 19-21.
- [8] 陈小平, 等. 家蚕对常用有机磷农药的毒性反应研究[J]. 西南农业大学学报, 1996, **18**(6): 6-8.
- [9] 钟仰进, 林健荣, 廖富苹等. 氟化物引起家蚕的组织病变[J]. 华南农业大学学报, 1994, **15**(1): 18-21.
- [10] Corcoran T P, Fix L, Jones D P, et al. Apoptosis: Molecular control point in toxicity[J]. *Toxicol Applied Pharmacol*, 1994, **128**: 169-181.

致谢: 本研究得到 981401 班学生周劲松和胡明的大力帮助, 在此表示衷心的感谢。

欢迎订阅《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)

《农业环境科学学报》(原《农业环境保护》)是由农业部主管、中国农业生态环境保护协会主办的全国性学术期刊, 是中国科学引文数据库核心期刊, 列于被引频次最高的中国科技期刊 500 名之内并编入《中国学术期刊(光盘版)》。本刊主要刊登农业生态环境保护领域的科研新成果、新理论, 防治污染、保护生态的新技术和新方法。包括研究报告与简报、专论与综述。读者对象为从事农、林、牧、乡镇企业、环保、卫生、城建等工作的科技人员、院校师生。

《农业环境科学学报》为双月刊, 大 16 开, 128 页, 每本定价 12.00 元, 全年定价 72.00 元。国内外公开发行, 全国各地邮局征订, 邮发代号 6-64。如读者在当地邮局漏订, 可通过邮局汇款至本刊编辑部补订。此外, 编辑部存有 2000 年以前的各卷合订本(1999 年以前每本 50 元, 2000 年每本 80 元), 欢迎选购。编辑部地址: 300191 天津市南开区复康路 31 号 电话: (022) 23674336 传真: (022) 23367139 电子信箱: caep@public.tpt.tj.cn