

草鱼实验性镉中毒的肝、肾病理学研究^{*}

冯 健, 刘永坚, 田丽霞, 王 勇, 刘栋辉, 梁桂英

(中山大学水生经济动物研究所 // 水生经济动物良种繁育广东省重点实验室, 广东 广州 510275)

摘 要: 用 200 尾 (10.8 ± 1.2) g 的草鱼作实验性镉中毒实验。实验分为 4 组, 每组 50 条。实验各组水中镉含量分别为: $1/10 LC_{50}$ 组 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1/50 LC_{50}$ 组 $16 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $1/100 LC_{50}$ 组 $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 对照组为 $< 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, 实验期 120 d。研究内容为草鱼镉中毒时肝、肾生化指标与病理变化。结果表明: ①草鱼镉中毒的 24 h- LC_{50} 为 $800 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$; ②各组草鱼的死亡率分别是 64%, 24%, 20%, 4%; ③实验各组草鱼肝胰脏、肾脏镉含量(湿质量)较对照组极显著升高 ($P < 0.01$); ④实验各组草鱼血浆中谷草转氨酶、碱性磷酸酶、胆固醇、甘油三酯、葡萄糖均较对照组明显地升高, 而总蛋白则下降明显 ($P < 0.05$); ⑤实验各组草鱼血清中钙、磷、镁含量显著减少 ($P < 0.05$); ⑥病理学变化主要为: 肝胰脏和肾脏严重受损, 发生颗粒变性、水泡变性和脂肪变性并溶解坏死。透射电镜下, 肝细胞、肾小管上皮细胞内线粒体肿胀、嵴断裂、溶解; 肾小球基底膜节段性增厚。

关键词: 草鱼; 镉中毒; 肝胰脏; 肾脏

中图分类号: S941.91 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) S2-0226-05

镉作为重要工业添加剂, 广泛用于多种工业产品中。据估计, 我国 1982 年排入水域的镉约为 204 t, 预计 20 世纪末随污水排放的镉每年约达 770 多 t^[1]。镉是一种重金属元素, 可在人和动物体内蓄积下来, 并达到较高的浓度, 从而发生远期效性和慢性中毒作用, 引起人和动物中毒。1972 年 FAO 与 WHO 联合专家委员会在关于食品污染的毒性报告中, 镉仅次于黄曲霉和砷而被列为第三位研究的食品污染物^[2]。1984 年联合国环境规划署提出的具有全球意义的 12 种危险物中, 镉被列为首位^[2]。

地面水是环境毒物的最大储存库, 水环境中的镉可以经食物链富集可达相当高的浓度。藻类富集 11~20 倍, 鱼类富集 $10^3 \sim 10^5$ 倍, 贝类富集 $10^5 \sim 10^6$ 倍, 如非污染区螺贝类镉含量为 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$, 污染区螺贝类含量可高达 $420 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[4]。在家畜、家禽实验性镉中毒研究中, 其主要病理学损害为中毒性肝病和间质性肾炎。然而, 镉对鱼类肝胰脏、肾脏毒性研究则鲜有报道。本文系统研究了镉对草鱼的肝胰脏、肾脏功能的影响, 提供诊断与防治鱼类镉中毒的依据。

1 材料与方法

1.1 试验鱼与基础日粮组成

200 尾均体质量为 (10.8 ± 1.2) g 的草鱼由中

山大学水生经济动物研究所鱼场提供。饲料日粮配方由豆粕、小麦、鱼油、玉米油、统糠、复合维生素、复合矿物盐组成, 其营养成分(w)为粗蛋白 23%、粗脂肪为 4%、糖为 40%、粗纤维为 24%、粗灰分为 9%, 镉含量为 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。投饲为体质量 2%, 每天投喂 2 次, 分别为 9:00 和 16:00。每 2 周称量 1 次, 调整投饲量。

1.2 试验分组与水质条件

试验草鱼分 4 组, 每组 50 尾, 饲养于 $3 \text{ m} \times 2 \text{ m} \times 1.5 \text{ m}$ 的水泥池中, 暂养 1 周。4 组草鱼水中镉含量分别为 80, 16, $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $< 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每 2 周换水 1 次, 饲养期为 120 d。其水质条件为水温 (27.2 ± 3.0) $^{\circ}\text{C}$, 溶解氧为 (7.35 ± 0.36) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, pH 7.03 ± 0.4 , 氨氮为 (0.59 ± 0.19) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 总硬度为 1.51 ± 0.16 , 钙含量为 (25.8 ± 0.2) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 亚硝酸盐为 (0.154 ± 0.05) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 硝酸盐为 (0.110 ± 0.014) $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 主要试剂与仪器

氯化镉晶体 ($\text{CdCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), 分析纯, 广州化学试剂厂, 编号 990401 2。全谱直读等离子体原子发射光谱仪, IRIS Advantage (HR)。检测依据为国家教委的“感耦等离子体原子发射光谱仪方法通则”与“Y/T015-1996 法”。血中生化指标使用“日立”(Hitachi)全自动生化分析仪测定, 其方法参

* 收稿日期: 2003-03-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (2001382)

作者简介: 冯健 (1958 年生), 男, 博士, 副教授; E-mail: fengjian08@163.com

考日立血生化分析指南。

1.4 样品采集和分析

饲养期 (120 d) 结束时每组取鱼 6 条, 分别采取血清、血浆、肾脏、肝胰脏、背肌、基础日粮与水样。采用湿法消化处理各样品, 使用等离子分光光度计测定其中镉含量, 使用“日立”(Hitachi)全自动生化分析仪测定血清、血浆中酶和其它生化指标。采取肝胰脏、肾脏等组织器官, 用 10% 甲醛缓冲液固定, 制作石蜡切片, HE 染色。取肝胰脏、肾脏各两例病料, 用 $\varphi=2.5\%$ 戊二醛固定, 超薄切片, 醋酸双氧铀及柠檬酸铅染色, 透射电镜观察。

1.5 数据处理

试验鱼组间显著性变化采用 Newman Keuls's 试验。数据统计分析采用 Dumcan's 多重比较法, 显著水平采用 0.05。

2 结 果

2.1 急性镉中毒

用 90 尾体质量 (10.8 ± 1.0) g 的作急性镉中毒实验, 共分 9 组, 每组 10 条。放置于不同镉含量水体的 0.25 m^3 水族箱内, 观察 1 d, 用寇氏法求得其草鱼 24 h-LC_{50} 为 $0.800\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 死亡率与临床症状

$1/10\text{ LC}_{50}$ 组在第 9 d 开始发病, 死亡。其发病、死亡在实验第 2、3、4 周达到高峰。到实验结束时, 共死亡 32 尾鱼, 死亡率达 64%。 $1/50\text{ LC}_{50}$ 、 $1/100\text{ LC}_{50}$ 组在整个实验中无明显的死亡高峰, 每组各死亡 12、10 尾, 死亡率为 24%、20%。对照组死亡 2 尾, 死亡率为 4%。

临床症状: $1/10\text{ LC}_{50}$ 、 $1/50\text{ LC}_{50}$ 、 $1/100\text{ LC}_{50}$ 组中发病草鱼主要表现为少游动, 离群, 不采食, 皮肤发黑, 反应迟钝, 死亡前转圈游动, 从第 2 周起 $1/10\text{ LC}_{50}$ 组实验鱼出现脊椎弯曲现象, 从第 4 周起 $1/50\text{ LC}_{50}$ 、 $1/100\text{ LC}_{50}$ 组实验鱼出现脊椎弯曲现象, 对照组未见异常。

2.3 临床生化指标的变化

2.3.1 各试验组鱼肝胰脏、肾脏、肌肉的镉含量测定 结果表明: $1/10\text{ LC}_{50}$ 、 $1/50\text{ LC}_{50}$ 、 $1/100\text{ LC}_{50}$ 组较对照组有显著 ($P<0.05$) 或极显著 ($P<0.01$) 增高(表 1)。

2.3.2 各试验组草鱼血清、血浆生化指标测定 结果表明: $1/10\text{ LC}_{50}$ 、 $1/50\text{ LC}_{50}$ 、 $1/100\text{ LC}_{50}$ 组草鱼血浆中谷草转氨酶、碱性磷酸酶、胆固醇、葡萄糖均较对照组明显地升高, 而总蛋白、血清中钙、磷、镁含量较对照组则下降明显 ($P<0.05$) (表 2)。

表 1 试验各组肝胰脏、肾脏、肌肉和脊椎骨中镉含量 (湿质量)¹⁾

Tah 1 Content of Cd in hepatopancreas, kidney, muscle and vertebra mg·kg⁻¹

组别	1/10 LC ₅₀ 组	1/50 LC ₅₀ 组	1/100 LC ₅₀ 组	对照组
肝胰脏	41.294±5.140 ^C	9.275±2.131 ^B	8.528±1.762 ^B	0.491±0.102 ^a
肾脏	188.437±21.316 ^C	57.268±6.799 ^B	47.545±4.318 ^B	0.903±0.128 ^a
肌肉	0.413±0.095 ^C	0.125±0.011 ^d	0.086±0.009 ^b	0.065±0.008 ^a

1) * 同一行数据右上角不同上标小写字母代表有显著差异 ($P<0.05$), 大写字母代表有极显著差异 ($P<0.01$)

表 2 试验各组鱼血浆、血清的生化指标¹⁾

Tah 2 Biochemical index of blood senum, plasma and concent of Cd in vetebra

项 目	1/10 LC ₅₀ 组	1/50 LC ₅₀ 组	1/100 LC ₅₀ 组	对照组
谷草转氨酶/($\text{u}\cdot\text{L}^{-1}$)	382±58 ^C	327±52 ^C	166±43 ^b	80±26 ^a
碱性磷酸酶/($\text{u}\cdot\text{L}^{-1}$)	190±31 ^b	166±26 ^b	130±28 ^b	87±16 ^a
甘油三酯/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	4.8±1.6 ^B	3.5±0.8 ^B	1.3±0.4 ^a	0.8±0.2 ^a
胆固醇/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	6.74±1.46 ^b	5.28±0.76 ^a	4.53±0.61 ^a	5.04±1.04 ^a
葡萄糖/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	10.1±1.1 ^b	8.9±0.9 ^b	8.5±0.2 ^b	6.7±0.3 ^a
总蛋白/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	22±7 ^b	26±8 ^b	29±7 ^b	37±9 ^a
血钙/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.62±0.33 ^b	1.73±0.35 ^b	1.92±0.39 ^b	2.59±0.47 ^a
血磷/($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	3.10±0.42 ^b	2.03±0.51 ^b	4.09±0.49 ^c	5.36±1.51 ^a
血镁/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	1.08±0.23 ^b	1.06±0.26 ^b	1.08±0.19 ^b	1.84±0.51 ^a

1) 同一行数据右上角不同上标小写字母代表有显著差异 ($P<0.05$), 大写字母代表有极显著差异 ($P<0.01$)

2.4 病理变化

2.4.1 病理剖解 实验各组死亡与发病鱼体病变主要表现为:体表有红色出血点,体腔内有大量的淡黄色澄清的液体渗出,肝胰脏萎缩呈半透明土黄色,质地脆弱,胆囊充盈肿大,肠系膜水肿(图 1:1),消化道空虚无食糜,脑积水增多。 $1/10\text{ LC}_{50}$ 组草鱼 75% 出现脊椎弯曲, $1/50\text{ LC}_{50}$ 、 $1/100\text{ LC}_{50}$ 组草鱼有 36% 左右出现脊椎弯曲(图 1:2)。

2.4.2 病理组织学变化 实验各组草鱼典型病理变化为肝胰脏中肝细胞严重颗粒变性、脂肪变性,部分肝细胞溶解坏死,胰腺细胞萎缩,酶原颗粒减少,为中毒性肝病(图 1:3);肾脏肾小球与肾小管上皮细胞肿胀,浊肿与水泡变性,肾间质中有一些巨噬—淋巴细胞浸润,为间质性肾炎(图 1:4)。心肌与骨骼肌纤维水肿间隙增宽,排列紊乱,局部为肌纤维均质红染的蜡样变性,局部出血(图 1:7)。脑水肿,出现神经原的“卫星现象”与噬神经元现象(图 1:8)。

2.4.3 透射电镜观察 肝细胞和肾小管上皮细胞线粒体严重肿胀,其嵴断裂、溶解,肝细胞内糖原颗粒大量减少,脂滴显著增多(图 1:9)。肾小球血管基底膜节段性增厚(图 1:10)。

3 小结和讨论

本实验使用同一水平镉含量的日粮和不同水平镉含量水体饲喂草鱼 120 d,发现草鱼肝胰脏、肾脏镉含量主要受水体镉含量的影响,主要通过鳃吸收镉并呈现明显的富集现象,为水体镉含量的几十至几百倍。随着水体中镉含量的增高,草鱼的病变程度与死亡率亦明显上升。这与 Conto 等在鲤鱼和 Brown 等在虹鳟鱼试验结果相似^[3,5]。实验表明,镉在草鱼肾脏、肝胰脏积累最多,而肌肉积累较少。因为肝与肾是主要的解毒和排泄器官。当动物吸收镉时,一部分可以排泄出体外,但其排泄功能是有限的,约占吸收量的 20%,另一部分肝脏可以通过血液转运出肝外,其余的积聚于肝脏和肾脏,而且能在肝肾细胞内与巯基蛋白(MT)结合,形成对镉有储存、传递和解毒作用的镉金属硫蛋白(Cd-MT),Cd-MT 主要存在于肾小管细胞内。当 MT 有足够贮量时,可通过与镉结合而保护肾小管不受损害^[4]。但另一方面它与镉结合可能在肾脏长期贮存,达到对肝胰脏、肾脏的毒性临界效应浓度,从而首先引起肝和肾功能障碍,加重毒性反应^[6]。

肝细胞线粒体中谷草转氨酶较多,当机体镉中毒时,肝胰脏受损,细胞膜通透性增高或破坏,细胞中的酶进入血清中,血清中的谷草转氨酶含量增高。

肝胰脏是蛋白质、糖类和脂类代谢最活跃的器官。而且它不仅合成本身的蛋白质,还合成大量血浆蛋白质。肝胰脏受损造成蛋白质合成障碍,总蛋白减少。血浆胆固醇与游离脂肪酸的酯化作用减弱,血浆胆固醇总量增多,甘油三脂蓄积。胰岛素减少,胰高血糖素增多葡萄糖含量增多。糖利用障碍,造成血糖浓度增高,造成肝细胞严重颗粒变性与脂肪变性,并在此基础上部分肝细胞发生溶解坏死,造成肝脏中毒性肝病。这与家禽、家畜实验性镉中毒的病变相似^[7-9]。碱性磷酸酶在肾脏肾小管上皮细胞含量较多,碱性磷酸酶的活性随着水中镉含量上升。肾脏肾小球与肾小管上皮细胞肿胀与水泡变性,肾小球与肾小管上皮细胞的受损可导致细胞壁膜透性的增高,血浆蛋白在肾小球、肾小管基底膜沉着,导致肾间质中巨噬—淋巴细胞浸润,引起间质性肾炎。草鱼镉中毒的生化指标和病理学结果均显示,镉在体内通过复杂的生物学而发挥毒性的作用,造成肝胰脏和肾脏功能和结构的损害,草鱼肝胰脏、肾脏是镉中毒的主要靶器官,镉对草鱼肝胰脏和肾脏的毒性作用是草鱼发病和死亡的主要原因。

综上所述,草鱼在被镉污染的水环境中,主要通过鳃吸收镉并在体内明显富集。镉在体内不断集聚并通过复杂的生物化学作用而起毒性作用,进而损害其机体组织。草鱼镉中毒时,其主要靶器官为肝胰脏、肾脏。早期表现为肝实质细胞变性、坏死的中毒性肝病,后期引起弥漫性间质性肾炎,严重时出现肝肾功能衰竭,发病死亡。所以,阻断镉对养殖水质的污染,是预防鱼类镉中毒,保证鱼类健康生长,避免水产品污染的重要措施。

参考文献:

- [1] 李光辉,贺普霄. 畜禽微量元素性疾病[M]. 合肥:安徽科学技术出版社,1998:233—239.
- [2] LI G H, HE P X. The diseases of trace elements in domestic animals[M]. Hefei: Anhwei Tech Publ Comp, 1998:233—239.
- [3] 王宗元. 动物营养代谢和中毒病[M]. 北京:中国农业出版社,1997:204.
- [4] WANG Z Y. The diseases of animal nutrition and poisoning[M]. Peking: China Agricul Publ Comp, 1997:204.
- [5] CONTO C C, PETIT RAMEL M, et al. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues[J]. Comp Biochem and Phys, 1999,122:345—352.
- [6] ALLEN P. Chronic accumulation of cadmium in edible tissues of *Oreochromis aureus* (Steindachner): Modification by mercury and lead[J]. Arch Environ Contam Toxicol, 1995,29:8—14.

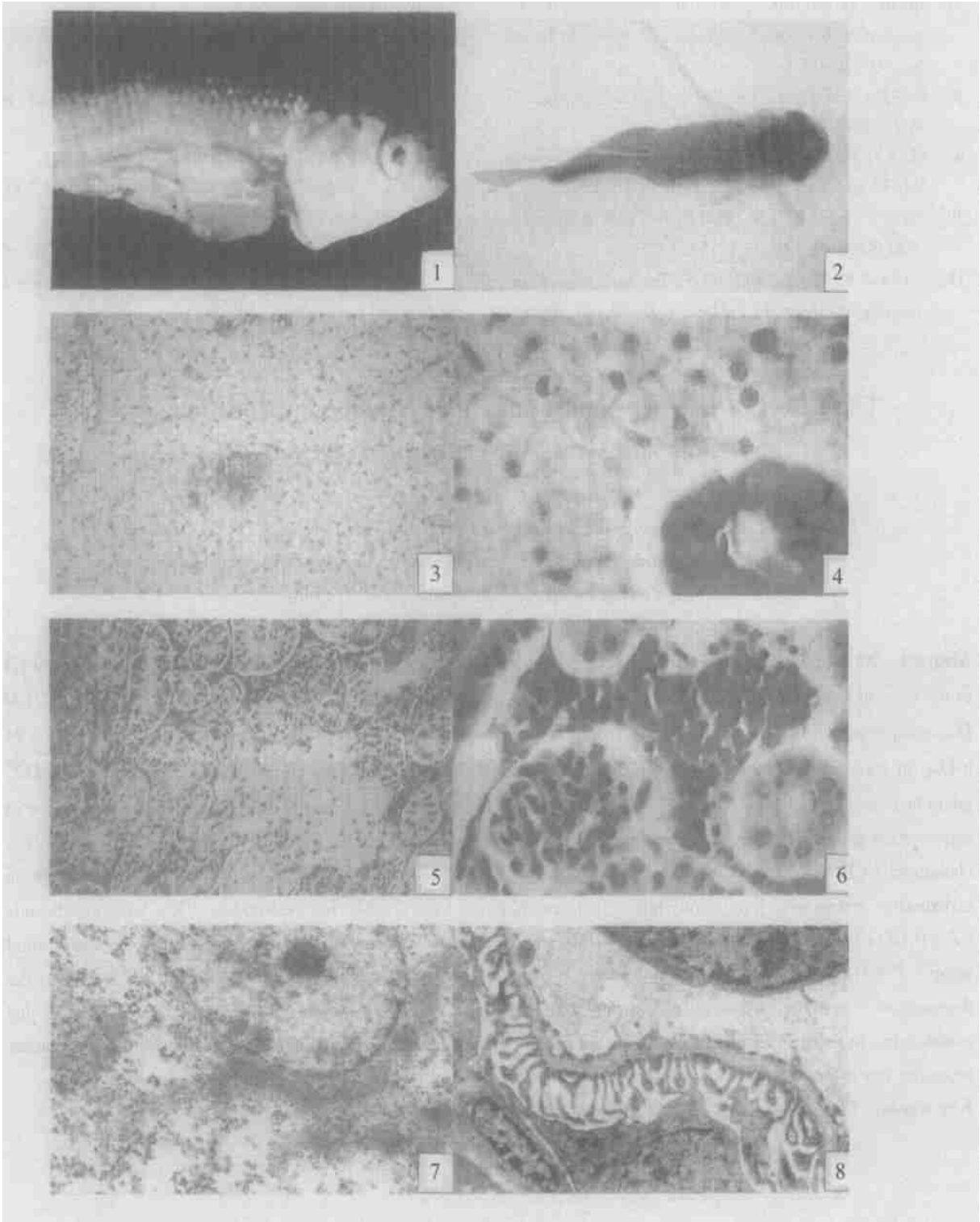


图 1 草鱼镉中毒的肝、肾病理变化

Fig. 1 The effect of experimental cadmium poisoning on hepatopancreas and kidney in grass cap *Ctenopharyngodon idella*
1. 肝脏萎缩呈土黄色, 胆囊肿胀; 2. 草鱼脊椎骨弯曲、畸形; 3. 胰腺萎缩, 肝细胞肿大, 染色变浅 HE $\times$ 100;
4. 肝细胞水泡变性与溶解坏死 HE $\times$ 400; 5. 肾小球上皮细胞透明变性, 肾间质巨噬细胞浸润 HE $\times$ 200;
6. 肾小管上皮细胞颗粒变性, 间质中有大量淋巴—巨噬细胞浸润 HE $\times$ 400;
7. 肝细胞内线粒体肿胀, 嵴断裂、溶解 $\times$ 20000; 8. 肾小球血管基底膜性节段性增厚 $\times$ 20000

[7] BROWN V, SHURBEN A M, et al. ioconcentration of trace metals in rainbow trout: A field study[J] . Ecotoxicol Environ Saf, 1995, 31: 33— 41.

[8] 顾学箕. 中国医学百科全书—毒理学[M] . 上海: 上海科学技术出版社, 1981: 5— 73.

[9] GU X Q. China medicine cyclopaedia-toxicology[M] . Shang-hai: Shanghai Tech Publ Comp, 1981: 5— 73.

[10] 刘宗平, 马卓, 陈万芳. 镉对绵羊的毒理学研究[J] . 畜牧兽医学报, 1996, 27(6) : 546— 555.

[11] LIU Z P, MA Z, CHEN W F. The study of cadmium toxicology in sheep[J] . Chinese J Animal and Vet Sci, 1996, 27(6) : 546— 555.

[12] 冯健, 岳秀英, 冯泽光. 肉鸡实验性镉中毒的病理学研究[J] . 畜牧兽医学报, 2001, 32(5) : 468— 475.

[13] FENG J, YUE X Y, FENG Z G. The pathology of experimental cadmium poisoning in meat chicken[J] . Chinese J Animal and Vet Sci, 2001, 32(5) : 468— 475.

[14] 岳秀英, 冯健, 冯泽光. 雏鸭实验性镉中毒的病理学研究[J] . 畜牧兽医学报, 2001, 32(2) : 162— 169.

[15] YUE X Y, FENG J, FENG Z G. The pathology of experimental cadmium poisoning in duckling[J] . Chinese J Animal and Vet Sci, 2001, 32(2) : 162— 169.

The Effect of Experimental Cadmium Poisoning on Hepatopancreas and Kidney in Grass Cap *Ctenopharyngodon idella*

FENG Jian, LIU Yong jian, TIAN Li xia, WANG Yong, LIU Dong hui, LIANG Gui ying
(Institute of Aquatic Animal and Key Lab. of Breed on Aquatic Seed in Guangdong ,
Sun Yat sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: 200 Grass carps with (10. 8 g±1. 2) g were made experimental cadmium (Cd) poisoning. The content of Cd in the water of each experimental group was: the 1/10 LC₅₀ group 80 μg·L⁻¹, the 1/50 LC₅₀ group 16 μg·L⁻¹, the 1/100 LC₅₀ group 8 μg·L⁻¹, the control group < 1 μg·L⁻¹. This experiment lasted 120 days. The results indicated ① the 24 h LC₅₀ in grass cap was 800 μg·kg⁻¹ weight; ②the mortality rates in 1/10 LC₅₀ group, 1/50 LC₅₀ group, 1/100 LC₅₀ group and control group were: 64%, 24%, 20%, 4%; ③ the contents (wet) of Cd on hepatopancreas, kidney in experimental groups were very significantly higher than control group (P< 0. 01) ; ④ the contents of glucose (GLU), cholesterol (CHOL) glutamic oxalacetic transaminase (GOT), alkalinephosphatease (ALP) on blood plasma in experimental groups were significantly higher than control group (P< 0. 05), but total protein (TP) lower significantly (P< 0. 05); ⑤the contents (wet) of Ca, P, Mg on serum in experimental groups were significantly lower than control group (P< 0. 05); ⑥The pathology showed: hepatocytes and nenal tubule, globule epithelial cells were granular degeneration, hydriopic degeneration and fatty degeneration, dissolved necrosis. Ultrastural changes showed that mitochondria in hepatocytes and kidney epithelial cells were swollen with disintegration and lysis of cristae, endoplasmic reticulum was hyperplastic and fragedmented. The thickness of basal membrane of the kidney glomerulus was found.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; cadmium poisoning; hepatopancreas; kidney