

草鱼实验性镉中毒的骨骼病理学研究^{*}

冯 健, 王 勇, 刘永坚, 田丽霞, 梁桂英

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

摘 要: 200尾 (10.8 ± 1.2) g 的草鱼分为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的骨骼病理学变化。结果表明: ①草鱼镉中毒的24 h LC_{50} 为 $800 \mu\text{g/L}$; ②各组草鱼的死亡率分别是64%, 24%, 20%, 4%; ③实验各组草鱼脊椎骨镉含量(湿质量)较对照组极显著升高 ($P < 0.01$), 脊椎骨中钙含量(湿质量)较对照组显著减少 ($P < 0.05$); ④实验各组草鱼血浆中碱性磷酸酶较对照组明显地升高、血清中钙、磷、镁含量较对照组显著减少 ($P < 0.05$); ⑤骨骼病理学变化主要为: 1/10 LC_{50} 组、1/50 LC_{50} 组、1/100 LC_{50} 组草鱼75%、36%、36%出现脊椎弯曲、鳃丝塌陷且骨化不全。透射电镜下, 增生的成骨细胞胞体短而粗, 细胞质丰富, 其中有清楚的细胞器。

关键词: 草鱼; 镉中毒; 骨骼; 病理学

中图分类号: X171.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2003) 05-0063-04

镉(Cadmium)是1817年由Soromeyer在德国从不纯的氧化锌样品中发现的, 1931年Fox和Ramage首次在动物体内检出镉。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, 20世纪末随污水排放的镉每年约达770多 $\text{t}^{[1]}$ 。地面水是环境毒物的最大储存库, 水环境中的镉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 $420 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1[2]}$ 。镉在人和动物体内半衰期长, 人和动物缺乏一种有效地保持镉平衡的控制装置, 镉可在体内蓄积下来, 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。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^[3]。

骨软化症是人类镉中毒的主要病症, 但镉对鱼类骨骼毒性研究则鲜有报道。本文系统研究了镉对草鱼骨骼的病理学的影响。

1 材料与方法

1.1 试验鱼与基础日粮组成

200尾均质量为(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(%)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 $0.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 。投饲为体质量的2%, 每天投喂2次, 分别为9:00和16:00。每2周称量一次, 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, 暂养一周。4组草鱼水中镉含量分别为 $80 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $16 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$, $8 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $< 1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。每2周换水一次, 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9904012。全谱直读等离子体原子发射光谱仪, IRIS Advantage (HR), 检测依据: 国家教委:“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, 其方法参考日立血生化分析指南。

* 收稿日期: 2002-12-03

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目(20027223)

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

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、脊椎骨、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。采取脊椎骨、鳃等组织器官, 用 $\varphi=10\%$ 甲醛缓冲液固定, 制作石蜡切片, H. E 染色。取脊椎骨各两例病料, 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, 作透射电镜观察。

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 Duncan's 多重比较法, 显著水平采用 0.05, 极显著水平采用 0.01。

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 $0.800\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.2 死亡率与临床症状

1/10 LC_{50} 组在第 9 天开始发病, 死亡。其发

病、死亡在实验第 2—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 LC_{50} 、1/100 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%。

发病症状: 1/10 LC_{50} 、1/50 LC_{50} 、1/100 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 LC_{50} 组实验鱼出现脊椎弯曲现象, 从第 4 周起 1/50 LC_{50} 、1/100 LC_{50} 组实验鱼出现脊椎弯曲现象。1/10 LC_{50} 组草鱼 75% 出现脊椎弯曲, 1/50 LC_{50} 、1/100 LC_{50} 组草鱼有 36% 左右出现脊椎弯曲, 对照组未见异常。

2.3 临床生化指标的变化

2.3.1 各试验组鱼脊椎骨的镉含量测定 结果表明: 1/10 LC_{50} 、1/50 LC_{50} 、1/100 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 LC_{50} 、1/50 LC_{50} 、1/100 LC_{50} 组草鱼血浆中碱性磷酸酶较对照组明显地升高, 而血清中钙、磷、镁含量较对照组则下降明显 ($P<0.05$) (表 2)。

表 1 试验各组脊椎骨中镉、钙含量(湿质量)¹⁾
Tab 1 Content of Cd in hepatopancreas, kidney, muscle and vertebra(wet)

组 别	1/10 LC_{50} 组	1/50 LC_{50} 组	1/100 LC_{50} 组	对照组
$w(\text{Cd})/10^{-3}$	18.892 ± 2.310^C	4.140 ± 0.852^B	3.257 ± 0.792^B	0.101 ± 0.028^a
$w(\text{Ca})/10^{-3}$	33.74 ± 2.11^b	33.93 ± 3.12^b	33.98 ± 2.95^b	38.88 ± 2.43^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⁾
Tab 2 Biochemical index of blood serum, plasma

项 目	1/10 LC_{50} 组	1/50 LC_{50} 组	1/100 LC_{50} 组	对照组
碱性磷酸酶/($\text{u}\cdot\text{L}^{-1}$)	190 ± 31^{bc}	166 ± 26^b	130 ± 28^b	87 ± 16^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 ± 0.31^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 尸体剖解 实验各组死亡与发病鱼体病变主要表现为: 脊椎弯曲, 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

(图 1: 2)。

2.4.2 病理组织学变化 腮组织排列紊乱, 鳃丝塌陷, 鳃丝有膨大的软骨组织增生和骨化不全现象 (图 1: 3)。脊椎骨化不全, 大量软骨细胞增生、堆积, 骨细胞明显减少 (图 1: 4)。

2.4.3 透射电镜观察 幼稚成骨细胞体积短而粗,

细胞浆丰富，其中有大量清楚的线粒体、内质网与核糖体等细胞器，细胞核体积大，结构清晰，细胞

中无钙盐沉着和细胞器钙化现象(图 1: 5, 1: 6)。

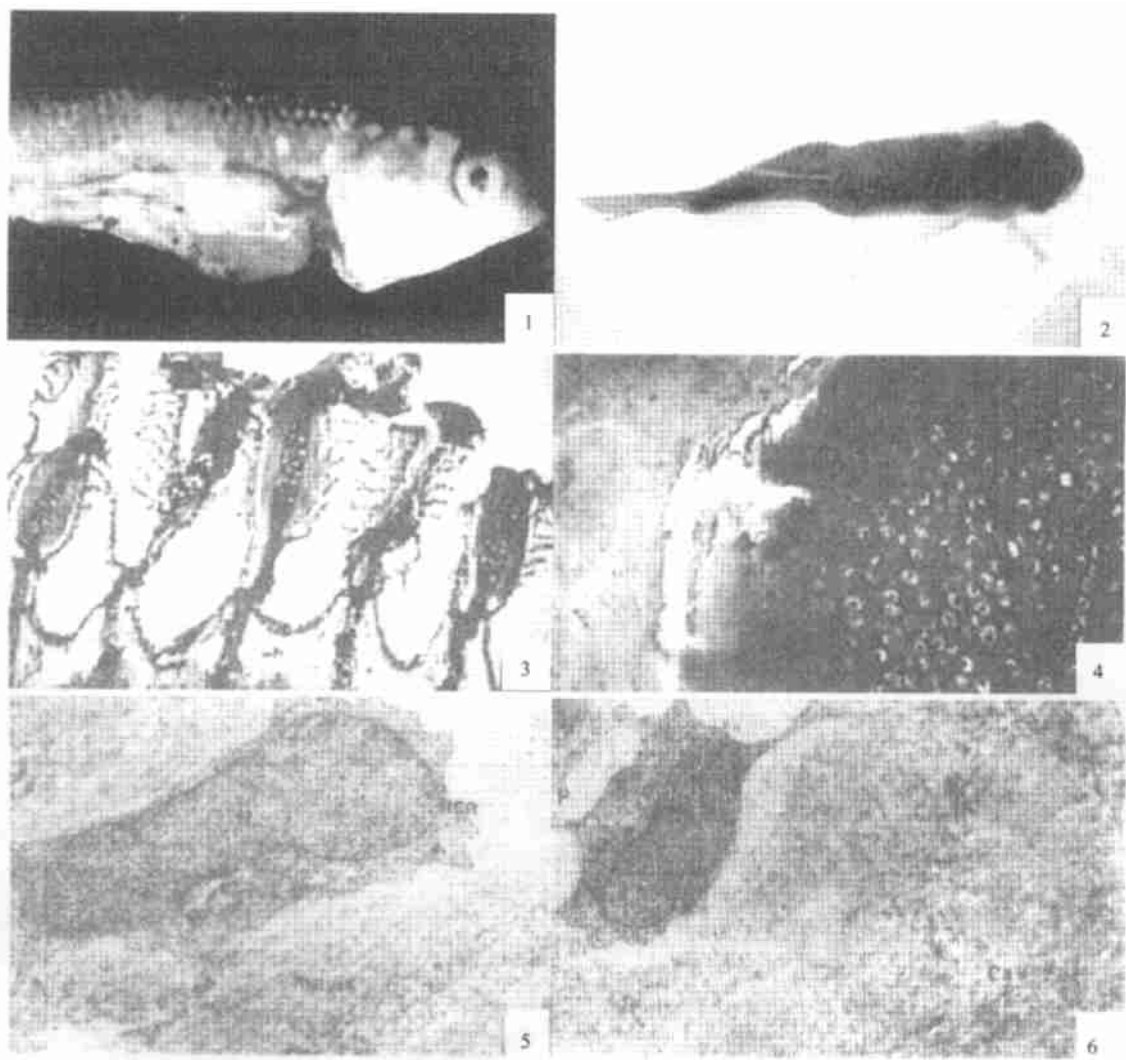


图 1 草鱼镉中毒的病理变化

Fig 1 The pathologic change of Cd poisoning in grass carp

1: 肝胰脏萎缩呈土黄色，胆囊肿胀；2: 脊椎骨弯曲、畸变；3: 丝膨大，软骨细增生；4: 椎骨内骨化不全，软骨细增生堆积；5: 幼稚的成骨细胞中，胞核与细胞体积大，细胞器丰富， $\times 9\,000$ ；6: 成熟的骨细胞中，胞核与细胞体积小，细胞器结构不清，多发生钙化， $\times 9\,000$

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、脊椎骨和背肌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积现象，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 等鲤鱼和 Brown 等虹鳟鱼试验结果相似^[24]。

在人类镉中毒病中，骨化不全与骨质疏松所引起的“痛痛症”是最典型的症状和病理学变化。本

研究表明，草鱼骨系统亦是镉中毒的主要靶器官之一，试验表明在镉中毒时，骨骼中钙含量显著下降 ($P<0.05$)，而镉的含量极显著增高 ($P<0.01$)。在骨代谢中，钙和磷的吸收与排泄起着关键作用。钙，磷吸收程度的高低，直接影响到骨骼的生成。在高镉的水体环境中，导致草鱼骨骼中蓄积大量镉，骨中钙沉积减少，进而引起严重的骨化不全病变。这可能与钙调节蛋白和 Ca^{2+} 通道有关。据推测， Cd^{2+} 也可顺利通过 Ca^{2+} 通道进入膜内，阻止甚至置换出细胞内 Ca^{2+} ，使细胞不能吸收和利用 Ca^{2+} ，但 Cd^{2+} 又不具备 Ca^{2+} 的生物活性，从而使

组织细胞发生缺 Ca^{2+} 性机能紊乱。此外镉致骨骼变化与肾小管功能异常引起肾中 V^{D3} 活性障碍有关^[5]。镉损害肾脏,使肾近曲小管重吸收障碍而引起肾功能不良。尿浓缩机能减弱,因而引起肾功能障碍,导致尿钙和尿磷增加。钙磷吸收不足,使草鱼机体钙、磷含量处于严重负平衡状态。由于机体血钙水平下降,会促进甲状旁腺素的分泌,甲状旁腺会引起强烈的骨改造,使破骨细胞和成骨细胞增生并且活性增高,释放的碱性磷酸酶增多,阻碍骨骼正常的成熟,导致脊椎弯曲、鳃丝塌陷且骨化不全^[6-8]。

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积。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,进而损害其骨骼组织。草鱼脊椎弯曲与畸形并不仅仅由于钙磷缺乏;当镉中毒时,也会造成钙磷代谢障碍而引起相同的病理学变化。

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] CONTO C C, PETIT-RAMEL M, BROWN A, et al. Kinetics of cadmium accumulation and elimination in carp *Cyprinus carpio* tissues[J] . Comp Biochem and Phys(Part C), 1999, 122: 345—352.

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

[5] 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.

[6] 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.

[7] 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.

[8] 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.

Study of Pathology by Experimental Cadmium Poisoning
on Skeleton in Grass Carp *Ctenopharyngodon idella*

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

Abstract: Two hundred grass carps with a weight of (10. 8±1. 2) g were experimentally poisoned by cadmium (Cd) and kept poisoned for 120 days. The content of Cd in water for each experimental group was: 80 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1/10 LC_{50} group, 16 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1/50 LC_{50} group, 8 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for 1/100 LC_{50} group, < 1 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ for control group, respectively. The results indicated that: ① The 24h— LC_{50} in grass carp was 800 $\mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1}$ weight. ②The mortality rates in 1/10 LC_{50} group, 1/50 LC_{50} group, 1/100 LC_{50} group and control group were: 64%, 24%, 20%, 4%. ③ The contents (wet) of Cd on vertebra in experimental groups were much significantly higher than that of control group ($P < 0. 01$) and the contents (wet) of Ca on vertebra were significantly lower than that of control group ($P < 0. 05$). ④ The contents of alkalinephosphatase (ALP) on blood plasma and Ca, P, Mg on serum in experimental groups were significantly lower than those in control group ($P < 0. 05$); ⑤The skeleton pathology showed: cyrtosis, gill sinked, osteodysplasty in experimental grass carps. Ultrastural changes indicated that there were rich cytoplasmic matrix, clear organelles in large hyperplastic osteoblasts.

Key words: *Ctenopharyngodon idella*; cadmium poisoning; skeleton; pathology