

# 硫酸铜对三角帆蚌肝脏和鳃的毒害 TOXICITY OF COPPER SULFATE TO LIVER AND GILL OF *HYRIOPSIS CUMMINGII*

肖永清

(中山医科大学生物教研室, 广州 510089)

XIAO Yong-Qing

(Department of Biology of SUMS, Guangzhou 510089)

石安静

(四川大学生命科学院, 成都 610064)

SHI An-Jing

(College of Life Sciences of Sichuan University, Chengdu 610064)

关键词 三角帆蚌, 硫酸铜, 肝脏, 鳃, 毒害

KEYWORDS *Hyriopsis cummingii*, Copper sulfate, Liver, Gill, Toxicity

硫酸铜常用于淡水珍珠养殖中的蚌病防治[张元培 1994], 铜是生物体的必需微量元素, 但当其浓度超过机体调节范围时, 在体内累积过多, 将会引起机体的酶活性[Zervas 等 1990]、生化成分[Sathyanathan 等 1988]、免疫系统[Kucharz 和 Sierakowski 1988]等方面的一系列变化, 对其生长、生存造成危害[Ewing 等 1982]。一般认为肝脏是解毒的器官, 而鳃与水体外环境和机体内环境接触密切, 也常被作为水生生物铜毒害的重要研究对象, 但多集中在海洋生物[Miller 和 Mackay 1982], 国内外还未见有关于铜对淡水蚌的肝脏和鳃的毒害的报道, 本文以淡水珍珠养殖常用的三角帆蚌为对象, 对此进行了研究。

## 1 材料与方 法

三角帆蚌(*Hyriopsis cummingii* Lea)取自四川安岳珍珠养殖场(已有珍珠), 于本地养蚌池中暂养 2 个月, 使其适应当地环境。实验设计四个组; 即用池水配制 0.5mg/L、1.0mg/L、1.5mg/L(对应的组编号为 1、2、3)的硫酸铜( $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  国产分析纯)及一个对照组, 每组 4 只蚌, 在微流水状态下饲养[吴宗文等 1994], 时间选在适于蚌生长的 4~5 月(第一次实验)和 9~10 月(第二次实验), 为期 35 天。另取蚌用 1.5mg/L 的硫酸铜处理 7 天、15 天, 设置对照。

硫酸铜处理 35 天的各组蚌: ① 取肝脏、鳃, Bouin 氏液固定, 制备石蜡切片, H. E 染色; 中性甲醛固定, 制备石蜡切片, 用 Lev 和 Spicer 的 Alcian-PAS 方法染色, 酸性粘液染成蓝色或蓝紫色, 中性粘液红色, 混合型粘液紫色; ② 取肝脏冷甲醛 4℃固定, 制备石蜡切片, 用略加改进的 Gomori 的方法作酯酶染色, 酯酶活性部位呈黑色; ③ 取肝脏, 3%戊二醛双固定, 脱水, 环氧树脂包埋, 作超薄切片, 铀-铅双染, 日立 H600-4 型透射电镜下观察。

1.5mg/L 硫酸铜处理 7 天和 18 天的蚌及对照取肝脏、鳃、外套膜于 105℃烘干至恒重, 用 3:1 的优级纯浓  $\text{HNO}_3 \cdot \text{HClO}_4$  消解, Tarrell-Ash 公司 ICAP-900(N+M)型等离子光谱仪测定组织中铜元素含量。

## 2 结果

在第一次处理4周时,II组的蚌全部死亡,在第二次处理5周时,II组的蚌闭壳肌松弛、缩足反应微弱,又濒临死亡,而其它各组蚌尚存活。

### 2.1 光镜观察结果

#### 2.1.1 肝脏

三角帆蚌肝脏实为一对大的消化盲囊,其分泌管具有旺盛的分泌活动,是主要功能部位[肖永清和石安静1998],通过H.E染色、Alcian-PAS方法、酯酶染色,可以观察到各组蚌的肝分泌管细胞的形态、粘液及酯酶活性变化:对照组细胞形态高矮不一,中、上部有许多分泌泡(图版I-1),含有丰富的中性粘液(图版I-3)和活性很强的酯酶(图版I-5)。I组细胞空化较多,中性粘液分布不匀,混合型粘液增多;酯酶活性较强,但有扩散,从细胞基底到游离端都有(图版I-6)。II组的细胞空化与核固缩的程度加深,甚至脱落、解体于腔中(图版I-2),围成管腔的细胞多处于同一高度;细胞内多为混合型粘液,几乎无酯酶活性显示(图版I-7)。III组的管腔内多见细胞残体、泡状物及血细胞密布其中;细胞内酸性、混合型粘液塞满了管腔(图版I-4);酯酶活性极弱,仅在细胞中、上部,以及腔中有弥漫的酶活性物质显示(图版I-8)。

#### 2.1.2 鳃

通过H.E染色、Alcian-PAS方法,可观察各组蚌鳃的形态和粘液也有所变化:对照组的鳃丝表面被有纤毛,鳃丝朝外部分的细胞密集,胞质与核着色均深,角质柱着深蓝色;鳃丝内表皮下结缔组织中颗粒血细胞丰富,还储积有大量的钙球体;内表皮有许多粘液细胞,含有丰富的酸性及混合型粘液(图版I-9)。I组的鳃丝角质柱不规则,内表皮中多有血细胞侵入,有的细胞核固缩;粘液细胞数目减少。II组的情况多似I组。III组的鳃丝结缔组织中染成红色的正常血细胞减少,而呈棕色的血细胞较多;粘液细胞也减少,其中有的已空化(图版I-10)。

### 2.2 肝分泌管细胞超微结构变化

对照组的细胞,核异染色质较少,核外有丰富的糙面内质网、线粒体(图版II-1)、高尔基体(图版II-2),分泌泡种类较多,常见有糖原颗粒与其它颗粒或分泌物包被在一起(图版II-3),其大小、电子密度不一。I组的细胞,核异染色质增多、电子密度加大,线粒体基质浅淡不匀(图版II-4),糙面内质网分布零乱且脱粒,其环绕形成的分泌泡中的内含物少(图版II-5)。III组的细胞,线粒体肿大,嵴零乱,基质电子密度很不均匀,胞质内含物稀疏不匀(图版II-6),糙面内质网大量脱粒,其环绕形成的分泌泡中的内含物少(图版II-7),还可观察到入侵的血细胞(图版II-8)。

### 2.3 硫酸铜处理后组织中的铜含量变化

对照组肝脏和鳃的铜含量明显高于外套膜。经1.5mg/L硫酸铜处理后,铜在三种组织中都有累积,并随处理时间的延长而增加(表1)。

## 3 讨论

三角帆蚌的肝脏可分泌多种消化酶,酯酶被认为是多种无脊椎动物的一种重要消化酶[潘鲁青和王克行1996]。铜处理影响了肝细胞酯酶分泌,1.0mg/L及以上浓度则使酯酶活性几乎丧失,表明肝脏消化功

表1 硫酸铜(1.5mg/L)处理7天和18天蚌的肝脏、外套膜、鳃中的铜含量( $\mu\text{g/g}$ 样品干重)

Tab.1 Copper concentrations in liver, mantle, gill of *Hyriopsis cummingii* exposed to 1.5mg/L copper sulfate for 7 and 18 days( $\mu\text{g/g}$  dry weight sample)

| 组织  | 对照    | 处理7天  | 处理18天 |
|-----|-------|-------|-------|
| 肝脏  | 47.98 | 57.71 | 72.41 |
| 鳃   | 30.63 | 61.16 | 185.3 |
| 外套膜 | 6.640 | 13.77 | 20.26 |

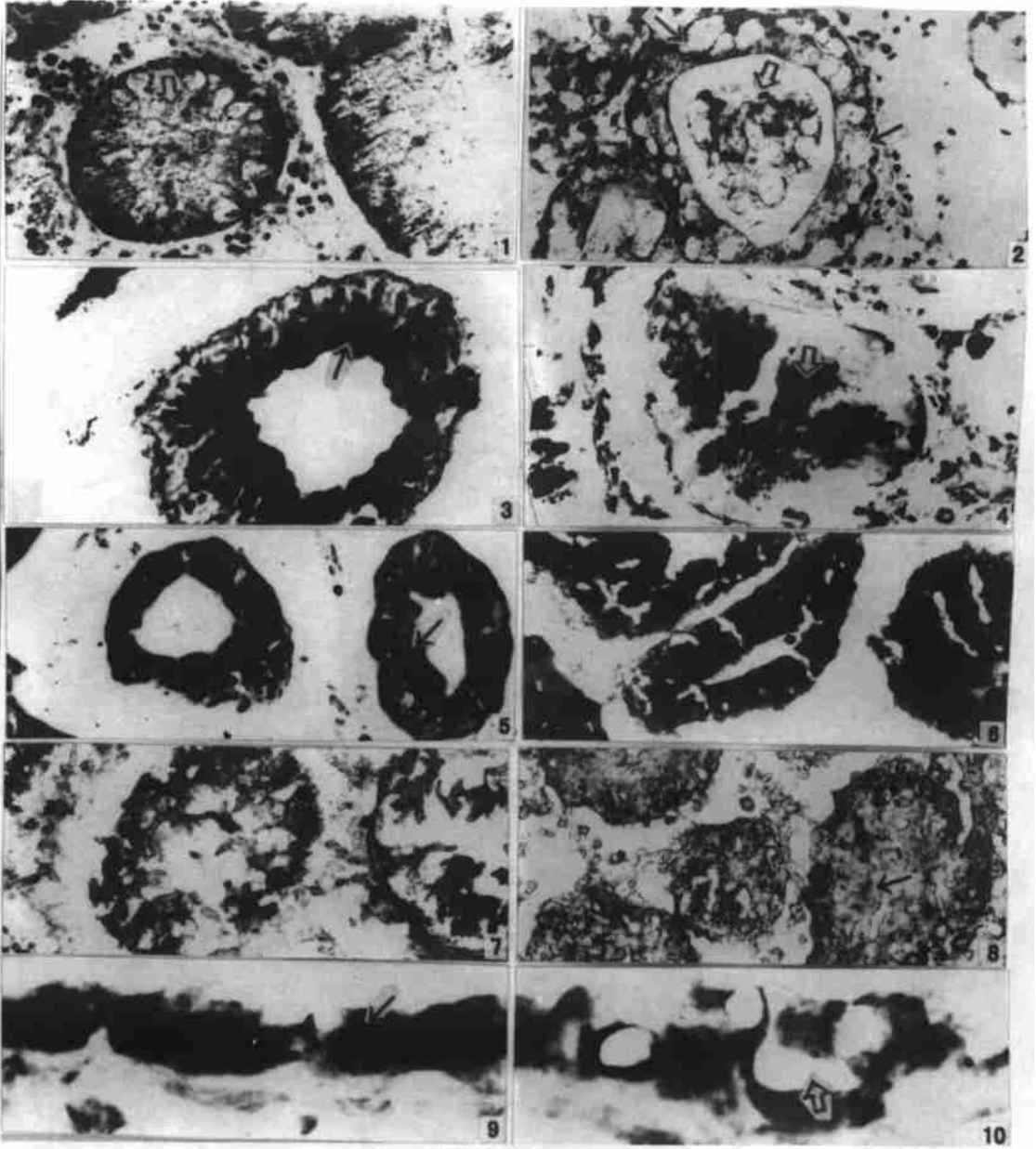
能受到严重损害。Calabrese 等[1984] 也指出, 铜对紫贻贝的消化盲囊的组织结构有严重的损害。本研究中, 正常肝分泌管细胞线粒体、糙面内质网、高尔基体发达, 分泌物种类十分丰富; 铜处理后, 上述细胞器损伤严重, 细胞内含物减少, 粘液物质分布紊乱、有变酸倾向, 均反映了硫酸铜对肝脏结构和功能的损害, 表明肝脏是铜作用的重要靶器官之一, 这可能是导致蚌死亡的主要原因。

有研究认为, 短期铜处理, 鳃的粘液细胞不被损坏, 但会释放其内含物, 且后来新生成的粘液也随即被释放; 用铜离子电极的电位来研究粘液对铜离子活性的影响表明, 粘液是铜的强螯合剂, 粘液分泌的速度能改变铜的胁迫 Miller 和 Mackay 1982]。本研究中, 铜处理引起蚌鳃的粘液细胞数目减少, 甚至萎缩、空化。空化表明粘液已经释放, 粘液释放可能用以束缚高浓度的铜以减少其对细胞的损害, 而较高浓度的铜作用较长时间, 将导致粘液细胞的损坏。表明它可能在重金属解毒中也起着重要作用。

本实验发现, 正常蚌体中肝脏和鳃中的铜浓度均大大高于外套膜, 可能是铜储存或吸收的场所; 而铜处理后, 铜在蚌的肝脏、外套膜、鳃中都有累积, 并随着处理时间的延长而有增加。现多认为, 重金属能诱导一类含硫蛋白(metallothionein)的合成[Edward 1991], 硫蛋白与铜结合, 防止毒性形态(多为离子态)的铜在机体组织中聚积。但是当硫酸铜连续处理, 铜浓度超过机体的调节范围后, 就会破坏机体铜运输系统, 使细胞的膜系统、相关的一些酶等的正常活动遭到破坏, 引起机体组织形态、生理、生化、免疫等方面的一系列病变, 甚至导致死亡。

## 参 考 文 献

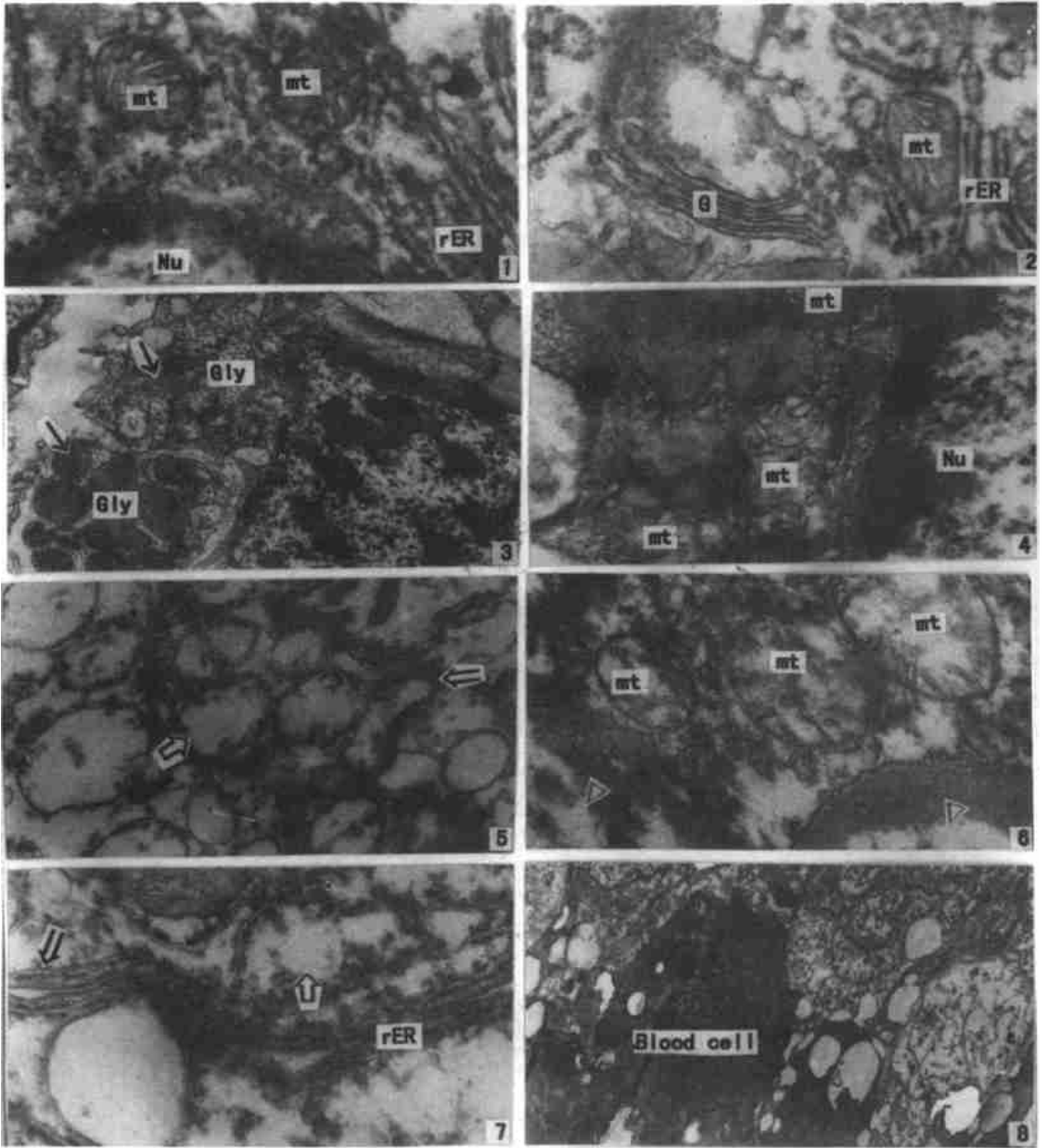
- 张元培. 1994. 淡水珍珠养殖技术. 北京: 中国科学技术出版社. 118~132
- 吴宗文, 石安静, 江述秋等. 1994. "三小一多"和微流水养殖育珠措施. 四川大学学报(自然科学版), 31(专辑): 56~58
- 肖永清, 石安静. 1998. 三角帆蚌肝脏的显微与超微结构. 四川大学学报(自然科学版), 35(1): 102~106
- 潘鲁青, 王克行. 1996. 中国对虾幼体消化酶活力的实验研究. 水产学报, 21: 27~31
- Calabrese A, Macinnes J R, Nelson D A, et al. 1984. Effects of long-term exposure to silver or copper on growth, bioaccumulation and histopathology in the blue mussel *Mytilus edulis*. Mar Environ Res, 11: 253~274
- Edward D H. 1991. Copper transport: An overview. Proc Soc Exp Biol Med, 196(2): 130~140
- Ewing M S, Ewing S A, Zimmer M A. 1982. Sublethal copper and susceptibility of channel catfish to experimental infections with *Ichthyophthirius multifiliis*. Bull Environ Contam Toxicol, 28: 674~681
- Kucharz E J, Sierakowski S J. 1988. Effects of copper on activation of human T cells. Microbiol Immunol, 32(2): 147~152
- Miller T G, Mackay W C. 1982. Relationship of secreted mucus to copper and acid toxicity in rainbow trout. Bull Environ Contam Toxicol, 28: 68~74
- Sathyanathan S, Muralidharan N S, Chacko J, et al. 1988. Sublethal effects of copper and mercury on some biochemical constituents of the estuarine clam *Villorita cyprinoides* Var. *cochinensis* (Hanley). Bull Environ Contam Toxicol, 40(4): 510~516
- Zervas G, Noikolaou E, Mantzios A, et al. 1990. Comparative study of chronic copper poisoning in lambs and young goats. Anim Prod, 50(3): 32~36



图版I Plate I

1~8 肝分泌管细胞 H. E 染色示对照组(1)细胞有许多分泌泡(↑); II 组(2)空化的细胞(↑), 脱落、解体成团的细胞(↑)。Alcian-PAS 方法示对照组(3)丰富的中性粘液(↑)在细胞中、上部; III组(4)混合型粘液(↑)塞满管腔。酯酶染色示对照组(5)酯酶(↑)活性很强; I 组(6)酯酶扩散; II 组(7)几乎不见酯酶活性部位; III组(8)酯酶活性很弱。

1~2、5~8, × 165; 3~4 × 198; 9~10 × 528。



图版II Plate II

1~8 肝分泌管细胞超微结构 对照组(1~3)丰富的糙面内质网(rER)、线粒体(mt)、高尔基体(G)在核(Nu)附近,糖原颗粒(Gly)与其它分泌物(↑); I组(4~5)线粒体基质不匀,糙面内质网脱粒(⇓),内含物(⇓)少; III组(6~8)线粒体肿大、基质不匀,糙面内质网大量脱粒(⇓),分泌物稀疏(△),内含物(⇓)少,血细胞(Blood cell)入侵(图版II, 8)。

1, 2, 4,  $\times 36\ 000$ ; 3,  $\times 10\ 000$ ; 5,  $\times 19\ 000$ ; 6, 7,  $\times 29\ 000$ ; 8  $\times 2\ 900$ 。