

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00126

硫酸锌慢性毒性胁迫下克氏原螯虾的组织病理

王权¹, 王建国^{1,2}, 陆宏达², 熊良伟¹, 安健³

1. 江苏畜牧兽医职业技术学院 江苏 泰州 225300;

2. 上海海洋大学 水产与生命学院 上海 201306;

3. 连云港市海洋与水产科学研究所 江苏 连云港 222044

摘要: 将克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)成虾在 Zn^{2+} 质量浓度为 0、0.40 mg/L、4.04 mg/L 和 40.37 mg/L 的硫酸锌溶液中浸浴 21 d, 分别于第 7、14 和 21 天时每组随机抽取 5 只虾, 采集肝胰腺、鳃、触角腺、性腺、肌肉及消化道组织, 于 Bouin's 液中固定 24 h。采用石蜡切片和 HE 染色的方法, 观察其组织的病理变化, 从组织学水平研究硫酸锌对克氏原螯虾的慢性毒性作用。结果显示, 浸浴时各 Zn^{2+} 浓度组肝胰腺、触角腺细胞质中出现被染成红棕色的颗粒, 且颗粒的数量与浸浴浓度及时间成正相关。0.40 mg/L 组在浸浴期间各组织均未出现其他明显病变; 4.04 mg/L 组及 40.37 mg/L 组从浸浴第 7 天开始肝胰腺、触角腺、鳃组织出现出血、细胞坏死等病变, 随浸浴浓度增大和时间延长坏死细胞比例增大。40.37 mg/L 组第 14 天时精母细胞开始出现坏死; 第 21 天时精巢、卵巢严重出血, 精、卵细胞出现大面积坏死, 肝细胞大量坏死脱落, 肝小管结缔组织增生, 大量脱落的细胞塞满管腔使肝胰腺表面形成肉眼可见的红棕色颗粒状斑点。结果表明在 Zn^{2+} 质量浓度高于 4.04 mg/L 的硫酸锌浸浴 21 d 后, 克氏原螯虾肝胰腺、触角腺、鳃、性腺组织均出现不同程度的病变, 表明其代谢系统、呼吸系统、生殖系统等受到较严重的损伤, 因此长期暴露在 Zn^{2+} 质量浓度高于 4.04 mg/L 的环境中会严重威胁克氏原螯虾的生存和繁殖。

关键词: 克氏原螯虾; 硫酸锌; 胁迫; 组织病理; 慢性毒性

中图分类号: X52

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)01-0126-12

克氏原螯虾(*Procambarus clarkii*)俗称小龙虾, 原产自美洲, 20 世纪初传入中国, 是目前国内外市场极为热销的淡水虾类之一, 其养殖规模正逐年扩大, 逐渐成为研究和开发的热点^[1]。固着性的纤毛虫易寄生于其甲壳、附肢及鳃丝上, 严重时妨碍呼吸及蜕壳而造成大量死亡^[2-5], 寄生虫的寄生也严重影响其商品价值。硫酸锌是防治固着性纤毛虫病的常用渔药, 使用方式为 0.3~2.8 mg/L 泼洒或 200 mg/L 浸泡^[6]。另外, 锌是常用的化工原料, 也是主要的矿山溶出物之一, 可随各种废物、废水及矿物溶出大量进入江河及海洋, 每年世界排入海洋的锌高达 390 万 t^[7], 中国许多

河流锌含量严重超标^[8]。环境污染和防治疾病用药常会使养殖水体锌含量偏高, 由于锌是非降解性物质, 又易被生物富集, 对水生动物的毒性远大于人和温血动物^[7], 而虾蟹等甲壳动物对其毒性的敏感程度大于鱼类及贝类, 所以锌对甲壳动物的存活具有潜在威胁^[9]。研究表明, 暴露于 4.04 mg/L 以上 Zn^{2+} 质量浓度下, 克氏原螯虾一些非特异性免疫因子活性开始发生变化, 免疫功能受到干扰, 增加了被病原感染的风险^[10]。关于锌胁迫下克氏原螯虾组织病理变化的报道较少。因此本实验以不同浓度硫酸锌浸浴克氏原螯虾 21 d, 观察其肝胰腺、触角腺、鳃、精巢、卵巢、胃肠

收稿日期: 2011-03-30; 修订日期: 2011-05-30.

基金项目: 上海市重点学科建设项目(Y1101); 上海海洋大学研究生基金项目(A-2501-09-0000-87047).

作者简介: 王权(1972-), 男, 副教授, 从事水产养殖研究. E-mail: yyqwq@sohu.com

通信作者: 陆宏达, 教授. E-mail: hdlu@shou.edu.cn

道、肌肉等组织的病理变化,旨在探讨硫酸锌毒性的作用机制及量效关系,为虾蟹健康养殖及科学合理用药提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

本实验使用的克氏原螯虾体质量(30.82 ± 5.15) g, 捕自上海市芦潮港, 捕回后用橡皮筋将其第一螯足的钳指分别缠紧, 使其不能互相打斗残食而又能正常摄食。于水族箱中暂养 15 d, 每天定时投喂新鲜田螺肉 1 次, 换水量 1/2。养殖用水为经 3 d 曝气脱氯的自来水, 硬度约为 120 mg/L, pH 7.0 ~ 7.3。

1.2 实验方法

对克氏原螯虾进行急性毒性实验, 根据 24 h、48 h 及 96 h 的 LC_{50} 计算出安全浓度在 27.70 ~ 54.70 mg/L 之间(均以 Zn^{2+} 浓度表示), 根据此安全浓度和生产中的常用浓度^[6], 设置 0.40 mg/L、4.04 mg/L 和 40.37 mg/L 3 个浓度组, 对照组 Zn^{2+} 质量浓度设为 0 mg/L。准确称取 $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ (AR), 用曝气 72 h 的自来水配成各实验浓度的溶液 50 L, 每实验组随机放入活力旺盛的克氏原螯虾 20 只。持续充气, 每 24 h 更换实验溶液 1 次以维持药物浓度。实验水温为 18 ~ 22 °C, 溶解氧 6 ~ 8 mg/L。进行实验的 21 d 中, 养殖管理措施与暂养期间相同, 且无个体死亡。

1.3 样品处理

于暴露后第 7、14、21 天, 从实验组和对照组每组分别随机取出 5 只虾, 解剖取出肝胰腺、鳃、触角腺、性腺、胃、肠、肌肉置于新配制的 Bouin's 液(苦味酸:甲醛:冰醋酸=15:5:1)中固定 24 h, 移入 70%酒精保存。组织经系列酒精梯度脱水后, 二甲苯透明, 石蜡包埋, 切片厚度 4 ~ 6 μm , 组织切片用苏木精-伊红(HE)染色, 中性树脂封片后于 Olympus 显微镜下观察拍照。

2 结果与分析

2.1 肝胰腺的组织病理变化

克氏原螯虾的肝胰腺位于头胸部中央, 心脏

前方, 呈“X”状, 与胃及肠道相连。外被薄层结缔组织的膜, 实质部分由大而粗的管和分支出的若干二级小管组成。各小管由薄层的结缔组织被膜包裹与分隔, 被膜间有丰富的小血管。肝胰腺小管是其结构与功能的单位。管壁由单层柱状细胞构成, 一般称消化盲囊上皮细胞, 细胞饱满, 体积较大, 向管内突出。细胞核常位于基底部, 核内可见一较大的核仁, 细胞中偶见一些被染成棕褐色的颗粒, 随机取组织切片, 计算该细胞数量占消化盲囊上皮细胞总数的比例为(6.1 ± 3.6)%(图版 I -1)。

0.40 mg/L 组浸浴 21 d, 克氏原螯虾肝胰腺小管间界限清晰, 细胞饱满, 体积较大。一些细胞质中可见被染成棕褐色的颗粒, 略多于对照组, 数量占消化盲囊上皮细胞总数的(13.5 ± 2.9)%。棕色颗粒形状多样, 多数呈椭圆形, 也有一些近似圆形, 长(70.53 ± 15.81) μm , 宽(50.51 ± 7.76) μm 。颗粒成形前与周围细胞质界限模糊, 成形后具有明显界限(图版 I -2)。

4.04 mg/L 组暴露第 7 天, 肝胰腺小管界限清晰, 细胞饱满, 体积较大, 一些细胞质中可见棕色的颗粒, 数量略多于 0.40 mg/L 浸浴 21 d 的肝胰腺, 占消化盲囊上皮细胞总数的(18.4 ± 7.7)%(图版 I -3)。第 14 天细胞质中颗粒数量明显增多, 占消化盲囊上皮细胞总数的(26.3 ± 5.8)%。细胞体积膨大, 分泌泡体积增大, 充满嗜伊红成分, 部分细胞的细胞膜破损(图版 I -4)。第 21 天消化盲囊上皮细胞中出现棕色颗粒的细胞数量占(39.3 ± 2.4)%。颗粒物体积较大, 压迫细胞核, 核常被挤到细胞边缘。肝细胞出现空泡变性, 部分细胞界限模糊, 细胞开始解体, 并从管壁脱落进入管腔, 脱落的细胞其细胞核固缩(图版 I -5 ~ 6)。

40.37 mg/L 组浸泡第 7 天时 40%以上的消化盲囊上皮细胞出现棕褐色颗粒(图版 I -7)。第 14 天大量细胞出现坏死, 从肝胰腺小管壁脱落进入管腔, 管腔内含物中也含有棕色颗粒物质, 肝胰腺小管结构受到破坏, 仅残留着包被在管壁外周的一层结缔组织被膜(图版 I -8)。第 21 天解剖观察发现, 肝胰腺表面出现大量肉眼可见的棕色颗

粒状斑点(图版 I -9), 有的肝胰腺发黑、萎缩、变硬, 管腔中看似充满黑色杂质。组织切片观察可见肝胰腺小管末端充满大量嗜伊红的物质(图版 I -10 ~ 12)。许多小管的消化盲囊上皮几乎完全脱落, 结缔组织细胞大量增生, 分布在小管间, 多层细胞围成管状, 管内充满大量脱落的死细胞(图版 I -11 ~ 12)。增生部位细胞密度很大, 结缔组织细胞取代了消化盲囊上皮细胞。结缔组织细胞连成一片, 肝胰腺小管逐渐消失, 不再存在独立的结构单位。细胞增生处弥散大量血细胞, 肝出现充血。

2.2 触角腺的组织病理变化

克氏原螯虾触角腺呈圆盘状, 主要由端囊、迷路和肾管 3 个形态不同的区域组成。端囊位于触角腺前半部背面中央的椭圆形突起内, 端囊细胞排列紧密, 呈柱状, 顶端膨大, 含泡沫状或高度中空的细胞质, 核致密, 近圆形, 位于细胞基部, 细胞顶端无明确界限, 絮状的细胞质突起伸向腔室。迷路位于触角腺的边缘区域, 细胞呈柱状, 顶端具刷状缘和胞质外突, 核大而圆, 位于细胞的中部或基部。肾管位于触角腺中部, 细胞呈柱状或较扁平, 核大, 圆形或椭圆形, 位于细胞的中部或靠近细胞的顶端。肾管部分的血腔比端囊和迷路相对较大(图版 II -1)。

0.40 mg/L 组浸浴 14 d 触角腺的细胞形态与对照组相似, 没出现明显的异常变化。第 21 天细胞质中出现少量染成金色的近圆形的小颗粒(图版 II -2)。

4.04 mg/L 组浸浴 14 d 触角腺端囊、肾管、迷路细胞的细胞质中出现大量细小的金色或红棕色颗粒, 部分细胞膜破裂, 细胞出现坏死(图版 II -3)。第 21 天, 细胞质中的颗粒增多, 近圆形, 体积较大时略呈椭圆形, 直径(44.65 ± 15.00) μm , 小于肝胰腺中的颗粒, 有的仅能见到一个小斑点。细胞间隙模糊不清, 一些细胞坏死, 组织中有血细胞浸润, 组织出现充血。

40.37 mg/L 组浸浴第 7 天细胞质中出现大量染成棕色的颗粒, 局部出现少量细胞坏死和大颗粒血细胞(图版 II -4)。第 14 天许多细胞的细胞膜

出现破损, 细胞质外溢, 核仁向核膜靠近并突出核膜, 细胞大量坏死, 组织中出现大量大颗粒血细胞(图版 II -5)。第 21 天端囊、肾管、迷路的许多细胞的细胞膜破损, 大量细胞坏死、脱落, 使得组织中出现许多空洞, 组织中出现大量大颗粒血细胞(图版 II -6)。

2.3 鳃的组织病理变化

克氏原螯虾鳃呈树枝状, 由鳃膜、微血腔和呼吸上皮 3 部分组成。鳃膜很薄, 表面光滑, 与水直接接触; 呼吸上皮细胞紧贴鳃膜, 单层, 围成微血腔; 微血腔内有血淋巴液及血细胞(图版 III-1)。

0.40 mg/L 组浸浴第 21 天, 呼吸上皮细胞间界限分明, 核位于细胞中央, 结构清晰, 与对照相比鳃丝略显肿大, 仅少数鳃丝的局部鳃膜模糊, 表皮局部细胞出现脱落(图版 III-2)。

4.04 mg/L 浸浴第 7 天, 大部分呼吸上皮细胞排列整齐, 细胞间界限清晰。少数鳃丝边缘变得模糊, 少数细胞出现坏死, 局部的呼吸上皮细胞从鳃膜上脱离。第 21 天鳃丝肿大, 多处呼吸上皮细胞出现坏死, 并与鳃膜分离, 从鳃膜上脱落进入微血腔(图版 III-3)。

40.37 mg/L 浸浴第 7 天, 鳃丝水肿, 呼吸上皮细胞与鳃膜分离, 局部呼吸上皮细胞坏死脱落。第 14 天鳃丝肿大, 多处鳃膜开始坏死, 呼吸上皮细胞坏死并从鳃膜上脱落, 鳃丝结构凌乱(图版 III-4)。第 21 天大部分鳃丝萎缩。呼吸上皮细胞核肿大, 破裂, 消失。大量细胞坏死脱落, 微血腔中充满脱落坏死的细胞, 几乎见不到正常的鳃结构(图版 III-5 ~ 6)。

2.4 性腺的组织病理变化

雌、雄生殖腺均位于头胸甲下, 心脏和胃之间, 前肠上方处。精巢乳白色, 呈三叶状, 前端有细管与肝胰腺相连, 经两侧迂曲的输精管开口于第 5 对步足的基部内侧。精巢由若干精小叶组成, 精母细胞分布于精小叶四周的边沿, 精细胞及精子分布于精小叶中部, 切片中精子呈四方形。精巢中可见到精原细胞、正在分裂的精母细胞、精细胞及成熟精子(图版 IV-1)。

0.40 mg/L 组浸浴 21 d, 精巢细胞结构与对照组无明显差异(图版 IV-2)。4.04 mg/L 浸浴 21 d 时精巢局部的细胞出现坏死(约 5%), 核固缩, 染色质分布在核膜四周, 细胞核中出现空洞(图版 IV-3)。40.37 mg/L 浸浴 14 d 时精巢中坏死组织增多(约 20%), 21 d 时有近 30% 的精巢组织坏死, 组织中有大量血细胞浸润(图版 IV-4), 精巢严重充血。

卵巢呈 X 状, 前端分别有一细管和肝胰腺相连, 卵巢交汇处两条粗短的输卵管开口于第三对步足基部内侧。卵巢壁由致密的结缔组织膜包被, 滤泡细胞紧贴卵细胞, 包绕卵细胞 1 周(图版 IV-5)。0.40 mg/L 组浸浴 21 d, 卵细胞结构与对照组相似, 无明显异常(图版 IV-6)。4.04 mg/L 组浸浴 21 d 时, 一些卵黄与滤泡细胞分离, 局部滤泡细胞膜破损, 坏死脱落(图版 IV-7)。40.37 mg/L 组浸浴第 21 天, 滤泡细胞坏死, 并逐渐消失。卵细胞萎缩, 坏死, 卵黄外溢, 细胞核溶解消失, 相邻卵细胞出现融合, 卵巢组织的细胞间有大量血细胞浸润(图版 IV-8), 卵巢严重出血。

2.5 其他的组织病理变化

在本实验设置的浓度范围内, 肌肉和胃组织未发现明显的病理变化。肠上皮细胞完整, 肠道中有少许内含物(图版 V-1)。40.37 mg/L 组浸浴的第 14 天和 21 天, 在肠道的内含物中发现和肝胰腺中相似的被染成棕褐色的颗粒, 长(57.91 ± 11.86) μm , 宽(37.96 ± 9.43) μm , 显著小于肝胰腺中的颗粒($P < 0.01$, 图版 V-2)。

3 讨论

锌是机体的必需微量元素, 也是 200 多种酶的活性组分, 在维持细胞膜的稳定、DNA 的正常复制翻译等方面有重要作用。克氏原螯虾对锌需求量较高, 其肝胰腺、肌肉及甲壳中含有丰富的锌元素, 可通过新陈代谢调节体内锌的浓度, 因此对富锌环境有较强的适应能力^[11]。

3.1 克氏原螯虾对硫酸锌的解毒机理

实验结果显示, 硫酸锌浸浴后, 各浓度组肝胰腺细胞质中均出现被染成棕褐色的椭圆形颗粒, 硫酸锌浓度越大, 出现颗粒的时间越早、数量越

多; 触角腺端囊、迷路、肾管细胞中也逐渐出现被染成金色的近圆形的细小颗粒, 随硫酸锌浓度增大、浸浴时间延长, 颗粒数量增多, 颗粒颜色逐渐加深呈棕色。肝胰腺和触角腺中颗粒的数量与环境中硫酸锌浓度及浸浴时间呈正相关, 所以推断此现象是硫酸锌的浸浴造成的。

当环境中 Zn^{2+} 浓度超过 0.2 mg/L 时, 中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*) 溞状幼体肝胰腺中也发现有大量电子致密的颗粒^[12]。铜和铅等重金属作用下其他甲壳动物也有类似的颗粒出现^[13-14]。甲壳动物肝胰腺不仅具有消化功能, 还是重要的重金属解毒场所^[15]。本实验结果显示, 颗粒的多少与环境中硫酸锌的浓度密切相关, 推测这种颗粒的产生可能与克氏原螯虾的解毒功能有关。一些学者证实观察到的颗粒是金属蛋白复合体^[13-14]。锌能激活金属硫蛋白(MT 蛋白)基因的表达^[15], MT 蛋白富含半胱氨酸, 具有很强的锌结合能力, 是解除机体重金属毒性的重要物质^[16]。Martín-díaz 等^[17]报道在 3 mg/L 的 Zn^{2+} 溶液中浸浴 21 d 时, 克氏原螯虾肝胰腺中 MT 蛋白含量显著升高, 大量合成的 MT 蛋白可以与过量的锌结合, 解除锌对机体的毒性。另外有的学者发现, 大鼠巨噬细胞在 Zn^{2+} 浓度为 6.5 mg/L 的硫酸锌溶液中培养 24 h, 细胞质中出现由富含组氨酸的蛋白形成的富锌小泡, 可逆地富集多余的锌, 起到调节细胞内锌离子浓度的作用, 这种富锌小泡结合锌的速度比 MT 蛋白快很多, 并且可以聚集在一起形成囊泡状, 从细胞质中分离出来^[18]。本实验中观察到肝细胞质中散布着染成棕色的颗粒, 是金属蛋白复合体还是富锌小泡, 有待进一步研究确定。

触角腺具有渗透压调节功能^[19], 可以排出多余金属离子, 推测触角腺中的颗粒可能也与硫酸锌的解毒密切相关。触角腺中的颗粒和肝胰腺颗粒形成机理是否相似, 尚不能确定。

硫酸锌浸浴过程中, 大量锌进入体内, 大量分泌的金属结合蛋白富集多余的锌, 转化成为无毒的形式储存在细胞中, 这可能是其解毒的重要方式。随硫酸锌浸浴时间延长, 肝细胞会从肝管膜上脱落进入肝小管, 同时在肠道内含物中也发

现类似的颗粒。由此推测, 克氏原螯虾对锌的解毒释放过程可能是: 肝细胞富集锌形成富锌颗粒, 通过细胞解体的形式将富锌颗粒释放到肝管中, 再通过肝管排出肝胰腺, 进入肠道最后排出体外。这一推测可以通过测定组织中锌浓度的变化来证实; 另外肠道中棕色颗粒显著小于肝胰腺的棕色颗粒, 是否表明棕色颗粒被排出的过程中存在一定程度的再吸收, 这有待今后继续研究。

3.2 硫酸锌对克氏原螯虾的组织损伤

本实验结果显示, 克氏原螯虾经各浓度组硫酸锌溶液浸浴后, 肝胰腺、触角腺及肠道内含物中出现许多棕褐色或金黄色的颗粒, 4.04 mg/L 以上浓度浸浴 14 d 以上, 许多组织出现了不同程度的损伤, 其损伤程度剂量和时间呈明显的正相关关系。

4.04 mg/L 浸浴 21 d 及 40.37 mg/L 浸浴 14 d 时, 克氏原螯虾肝胰腺、触角腺、鳃及性腺细胞开始出现不同程度的坏死。肝胰腺细胞大量坏死后脱落进入管腔, 肝胰腺小管结构被破坏, 结缔组织增生, 管腔中充斥着嗜伊红的液体状物质或死亡的细胞, 所以在 40.37 mg/L 浸浴 21 d 时肝胰腺表面形成大量肉眼可见的棕褐色斑点状颗粒。当严重中毒时, 肝胰腺小管结构被破坏, 结缔组织大量增生, 包裹着脱落死亡的肝细胞、增生细胞及血细胞, 使肝胰腺发黑变硬, 肝胰腺的机能逐渐消失, 并逐渐萎缩。中国明对虾(*Fenneropenaeus chinensis*) 锌急性中毒时, 肝细胞也出现了大量坏死脱落的现象^[20]。Zn²⁺ 质量浓度高于 1 mg/L 时, 中华绒螯蟹溞状幼体肝胰腺细胞结构严重破坏^[12]。因此当环境中锌浓度长期高于克氏原螯虾肝胰腺的解毒能力时, 会严重破坏肝胰腺的结构。

4.04 mg/L 组浸浴 21 d, 触角腺组织中出现大量血细胞, 说明组织出现充血。40.37 mg/L 组浸浴 21 d 时, 触角腺细胞大量死亡, 其中端囊和迷路细胞损伤最严重。触角腺为克氏原螯虾的排泄器官, 其作用相当于哺乳动物的肾单位^[21], 维持体内水盐平衡和调节渗透压^[13, 22]。端囊具有过滤血淋巴液形成原尿的功能^[23], 如果端囊细胞大量

坏死, 代谢废物便不能及时被过滤清除。迷路上皮具有分泌机体代谢废物的功能^[21], 其坏死使代谢废物不能排出, 使机体受到毒害。

鳃不仅担负着气体交换的作用, 而且是虾蟹类过滤、清除病原及异物的重要器官^[24], 是环境中硫酸锌直接接触的器官。鱼类锌中毒时鳃组织遭到破坏^[25], 动脉血压降低^[26], 另外锌还对红血球具有溶血作用^[27]。本实验结果显示, 4.04 mg/L 浸浴第 21 天, 克氏原螯虾鳃丝出现肿大, 鳃膜和呼吸上皮细胞分离, 许多呼吸上皮细胞坏死、脱落; 而 40.37 mg/L 浸浴 21 d, 鳃丝细胞遭到严重破坏, 说明过量的硫酸锌会损伤虾的鳃。鳃组织破坏影响了气体交换, 使虾获得氧气的能力降低, 造成缺氧, 引发一系列生理生化改变, 从而影响机体的生命活动。硫酸锌浸浴显著降低了克氏原螯虾溶菌酶、溶血素、酸性磷酸酶等免疫相关酶的活性^[28], 鳃组织的破坏会导致该组织更容易被水霉等致病菌感染, 引发新的疾病, 因此用药造成的组织损伤对养殖十分不利, 要对这些易被忽视的潜在威胁充分引起重视。

锌对雄性脊椎动物生殖系统影响的研究表明, 服用 210 mg/kg 以上的锌后, 小鼠各期生精细胞发生退变, 生精小管出现损伤, 精子减少或无精子^[29], 造成生殖系统损伤, 使生殖功能降低^[30]。本实验中 4.04 mg/L 硫酸锌浸浴 21 d 后和 40.37 mg/L 浸浴 14 d 后, 精巢中精母细胞核中出现大量空洞, 核物质分布在核膜周围, 细胞大量坏死。结果说明生精细胞核是硫酸锌作用的靶位, 4.04 mg/L 以上浓度会严重影响雄性生殖系统的发育。在本实验中还观察到 40.37 mg/L 硫酸锌浸浴 21 d 后卵巢中卵细胞萎缩、坏死及结缔组织大量增生, Martín-Díaz 等^[17]报道克氏原螯虾在 3 mg/L Zn²⁺ 溶液中浸泡 21 d, 肝胰腺中卵黄蛋白原含量显著高于对照组, Kime 等^[31]证明卵黄蛋白原含量升高是卵巢损伤或被机体吸收的一种标志, 说明较高浓度硫酸锌对雌性克氏原螯虾生殖系统有较大的毒性, 尤其在繁殖期间会严重威胁种群的发展, 造成极大的经济损失。

虽然克氏原螯虾对富锌环境有较强的适应能

力,但也是有一定限度的,环境锌浓度超过其能适应的最大值也会对其造成一定损伤。从本研究的组织病理学实验结果可以看出,锌质量浓度 4.04 mg/L 以上持续浸浴 21 d, 克氏原螯虾的免疫功能开始受到影响,肝胰腺、触角腺、鳃、性腺组织开始出现不同程度的损伤,因此克氏原螯虾正常生存环境中锌安全浓度应低于 4.04 mg/L。

参考文献:

- [1] 赵明森. 江苏淡水优势种类养殖现状及其市场前景与发展对策分析[J]. 科学养鱼, 2007, 4: 1-2.
- [2] 郑美芬. 淡水小龙虾常见病害防治技术[J]. 齐鲁渔业, 2007, 24(6): 6-7.
- [3] 贾述竟. 对虾、河蟹育苗中防治钟虫病的有效方法[J]. 水产科学, 1999, 15(3): 36-38.
- [4] Wu H X, Feng M G. Mass mortality of larval *Eriocheir sinensis* (Decapoda: Grapsidae) population bred under facility conditions: possible role of *Zoothamnium* sp. (Peritrichida: Vorticellidae) Epiphyte[J]. J Invert Pathol, 2004, 86 (1): 59-60.
- [5] López-Téllez N A, Vidal-Martínez V M, Overstreet R M. Overstreet. Seasonal variation of ectosymbiotic ciliates on farmed and wild shrimps from coastal Yucatan, Mexico[J]. Aquaculture, 2009, 287: 271-277.
- [6] 杨先乐. 新编渔药手册[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 428-430.
- [7] 格鲁什科 Я М. 工业污水中的有毒金属及其无机化合物[M]. 北京: 科学出版社, 1979: 196-209.
- [8] 沈敏, 于红霞, 邓西海. 长江下游沉积物中重金属污染现状与特征[J]. 环境监测管理与技术, 2006, 18 (5): 15-18.
- [9] 王建国, 陆宏达. 硫酸锌对 4 种水生动物的急性毒性作用[J]. 淡水渔业, 2009, 39(6): 28-33
- [10] 谭树华, 何艳, 谢佳. 高浓度 Zn^{2+} 对克氏原螯虾几种免疫学相关指标的影响[J]. 生态与农村环境学报, 2007, 23(4): 67-71.
- [11] Paloma A, Marina O, María C, et al. The use of the red swamp crayfish (*Procambarus clarkia* Girard) as indicator of the bioavailability of heavy metals in environmental monitoring in the River Guadiana (SW, Spain)[J]. Sci Total Environ, 2006, 366: 380-390
- [12] 成永旭, 徐兆礼, 陈亚瞿. Zn^{2+} 对中华绒螯蟹溞状幼体肝胰腺超微结构的影响[J]. 动物学研究, 2000, 21(5): 343-347.
- [13] Icely J D, Nott J A. Accumulation of copper within the hepatopancreticaeca of *Corphium volutator* (Crustacea: Amphipoda)[J]. Mar Biol, 1980, 57: 193-199.
- [14] Roldan B M, Shivers R R. The uptake and storage of iron and lead in cells of the crayfish, *Orconectes propinquus*, hepatopancreas and antenna gland[J]. Comp Biochem Physiol, 1987, 86: 201-214.
- [15] 吴众望, 潘鲁青. 重金属离子对凡纳滨对虾肝胰脏 MT 含量的影响[J]. 水产学报, 2005, 29(5): 715-718.
- [16] 牛长缨, 姜勇, 雷朝亮, 等. 无脊椎动物金属硫蛋白的研究[J]. 动物学杂志, 2002, 37(1): 72-76.
- [17] Martín-Díaz M L, Tuberty S R, Mckenney C L, et al. The use of bioaccumulation, biomarkers and histopathology diseases in *Procambarus clarkii* to establish bioavailability of Cd and Zn after a mining spill[J]. Environ Monit Assess, 2006, 116: 169-184.
- [18] Wellenreuther G, Cianci M, Tucoulou R, et al. The ligand environment of zinc stored in vesicles[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2009, 380: 198-203.
- [19] 席貽龙, 刘登翠. 克氏原螯虾触角腺的组织学研究[J]. 安徽师大学报: 自然科学版, 1996, 19(1): 42-46
- [20] 张克俭. 锌和氨氮对对虾肝胰脏的毒性作用[J]. 水产学报, 1993, 17(1): 52-59.
- [21] 刘晓云, 徐卫, 包振民. 中国对虾触角腺组织结构和功能的初步研究[J]. 青岛海洋大学学报, 2003, 33(6): 854-860.
- [22] 周双林, 姜乃澄, 卢建平, 等. 甲壳动物渗透压调节的研究进展 I. 鳃的结构与功能及其影响因子[J]. 东海海洋, 2001, 19(1): 44-51.
- [23] Ueno M, Inoue Y. The fine structure of Podocytes in crayfish antennal glands[J]. J Electron Microsc, 1996, 45(5): 395-400.
- [24] 肖克宇. 水产动物免疫与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2007: 102-138.
- [25] Burton D T, Jones A H, Cairns J. Acute zinc toxicity to rainbow trout (*Salmo gairdneri*): Confirmation of the hypothesis that the death is related to tissue hypoxia[J]. J Fish Res Board Can, 1972, 29(10): 1463-1466.
- [26] Jarmo L, Mikko N, Heikki T. Arterial oxygen tension and the structure of the secondary lamellae of the gills in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) after acute exposure to zinc and during recovery [J]. Aquat Toxicol, 1995, 32(4): 321-331.
- [27] 姚再旺. 日本研究锌对硬头鲈的急性毒性[J]. 水产科技情报, 1984(1): 26.
- [28] 王建国, 陆宏达. 硫酸锌胁迫对克氏原螯虾非特异性免疫因子的影响[J]. 江苏农业学报, 2011, 27(1): 129-136.

- [29] 寇素茹, 谢雪, 兰段斐, 等. 锌对小鼠睾丸组织 NO 的含量及抗氧化作用的影响[J]. 现代预防医学, 2008, 35(19): 3855–3857.
- [30] 魏青, 范瑞泉, 杨杏芬. 锌对大鼠生殖毒性的影响[J]. 卫生研究, 2003, 32(6): 618–619.
- [31] Kime D E, Nash J P, Scott A P. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics[J]. Aquaculture, 1999, 177: 345–352.

Chronic toxicity of zinc sulphate in *Procambarus clarkii*

WANG Quan¹, WANG Jianguo^{1,2}, LU Hongda², XIONG Liangwei¹, AN Jian³

1. Jiangsu Animal Husbandry & Veterinary College, Taizhou 225300, China;

2. College of Fisheries and Life Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

3. Marine Fisheries Research Institute of Lianyungang, Lianyungang, 222042, China

Abstract: We evaluated the chronic toxicity of zinc sulphate in the crayfish *Procambarus clarkii*. Mature *P. clarkii* were exposed to 0, 0.40, 4.04, or 40.37 mg/L Zn^{2+} for 21 days. Each day, we randomly selected five crayfish in each group and collected samples of the hepatopancreas, gill, and muscle tissue from males and females and ovarian tissue from each female. The tissues were placed in Bouin's fixative for 24 h, sectioned in paraffin, and stained using H·E. We observed a number of brick red particles in the cytoplasm of cells from the hepatopancreas and antennal gland in animals exposed to Zn^{2+} . The number of these particles was positively correlated with the concentration of Zn^{2+} and exposure time. There was no obvious histopathology in the group exposed to 0.40 mg/L Zn^{2+} . We observed bleeding and necrosis in hepatopancreas, antennal gland, and gills in the group exposed to 4.04 mg/L after 7 d. The proportion of necrotic cells increased as the concentration of Zn^{2+} and time of exposure increased. We observed spermatocyte necrosis after 14 d in exposure to 40.37 mg/L Zn^{2+} . After 21 d, we observed bleeding of the spermary and ovary and necrosis of the ootid and spermatocyte cells. A large number of hepatocytes exhibited necrosis and had dropped from the hepatic ducts. The connective tissue exhibited hyperplasia, with large numbers of cells blocking the hepatic ducts, resulting in macroscopical bulky grains in the hepatopancreas of the group exposed to 40.37 mg/L. Our results suggest that exposure to 4.04 mg/L Zn^{2+} for 21 d causes pathological changes in the hepatopancreas, antennal gland, gills, and gonad tissue of *P. clarkii*. Given that zinc sulphate interferes with the metabolic, respiratory, and reproductive systems, chronic exposure is likely to threaten the survival of *P. clarkii* populations.

Key words: *Procambarus clarkii*; zinc sulphate; stress; histopathology; chronic toxicity

Corresponding author: LU Hongda. E-mail: hdlu@shou.edu.cn

图版 I 肝胰腺的组织病理

1. 对照组肝胰腺小管结构完整, 细胞饱满, (6.1±3.6)%细胞的细胞质中存在少量椭圆形棕色颗粒(♣). 2. 0.40 mg/L 组浸浴 21 d 肝胰腺小管充满分泌物, 结构完整, (13.5±2.9)%细胞的细胞质中出现棕色颗粒(♣). 3. 4.04 mg/L 组浸浴 7 d 肝胰腺小管结构完整, (18.4±7.7)%细胞的细胞质中出现棕色颗粒(♣). 4. 4.04 mg/L 组浸浴 14 d (26.3±5.8)%细胞的细胞质中出现棕色颗粒(♣), 局部细胞坏死脱落(▲). 5. 4.04 mg/L 组浸浴 21 d 消化盲囊上皮细胞质中出现棕色颗粒(♣), 管腔充满细胞碎片(▲)和随死细胞脱落的棕色颗粒. 6. 4.04 mg/L 组浸浴 21 d (39.3±2.4)%细胞的细胞质中出现棕色颗粒(♣), 细胞大量坏死脱落(▲). 7. 40.37 mg/L 组浸浴 7 d 40%以上的消化盲囊上皮细胞的细胞质中出现棕色颗粒(♣). 8. 40.37 mg/L 组浸浴 14 d 消化盲囊上皮细胞质中出现大量棕色颗粒(♣), 细胞大量坏死脱落(▲). 9. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 肝胰腺表面出现肉眼可见的棕色斑点(♣), 对照组(♣). 10. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 肝胰腺的管腔中充满嗜伊红物质(▲), 管腔结缔组织大量增生(♣). 11. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 肝胰腺中结缔组织大量增生(♣), 细胞坏死脱落(▲), 组织充血(▲). 12. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 结缔组织大量增生(♣), 消化盲囊上皮细胞坏死脱落(▲), 溶解物质被伊红染成红色.

Plate I Histopathology in hepatopancreas

1. The hepatic ducts cells of the control group had intact structure and brick red particulate matters(BRPM) were observed in cytoplasm of (6.1±3.6)% hepatopancreas cells(♣). 2. Exposed in 0.40 mg/L for 21 days, the hepatic ducts were full of secretions, their structures were intact, a little BRPM were observed in cytoplasm of (13.5±2.9)% hepatopancreas cells(♣). 3. Exposed in 4.04 mg/L for 7 days, the structures were intact, a little BRPM were observed in cytoplasm of (18.4±7.7)% hepatopancreas cells(♣). 4. Exposed in 4.04 mg/L for 14 days, lots of BRPM(♣) in cytoplasm of (26.3±5.8)% hepatopancreas cells and necrosis cells (▲) in part of hepatopancreas were observed. 5. A large number of BRPM(♣) were observed in hepatopancreas. Hepatic ducts were full of cells debris of necrosis cells (▲) and BRPM(♣). 6. Exposed in 4.04 mg/L for 21 days, a large number of BRPM(♣) were observed in (39.3±2.4)% hepatopancreas cells and necrosis cells (▲) were observed in hepatopancreas. 7. Exposed in 40.37 mg/L for 7 days, a large number of BRPM(♣) were observed in more than 40% hepatopancreas cells. 8. Exposed in 40.37 mg/L for 14 days, a large number of BRPM(♣) were observed in hepatopancreas. Many necrosis cells fell off (▲). 9. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, a large number of brown granular spots(♣) on hepatopancreas were observed, the control group(♣). 10. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, hepatic ducts were full of red matters(▲), hyperplasia cells (♣) were around hepatic ducts. 11. Hyperplasia cells (♣) were around hepatic ducts. Necrosis cells (▲) fell off into hepatic ducts. Some hemocytes dispersed in tissues(▲). 12. Necrosis cells (▲) fell off into hepatic ducts. Hepatic ducts were full of red matters, hyperplasia cells (♣) were around hepatic ducts.

图版 II 触角腺组织病理

1. 对照组触角腺细胞界限清晰, 结构完整. 2. 0.40 mg/L 组浸浴 21 d 细胞结构清晰, 部分细胞质中出现近圆形的棕色颗粒(♣). 3. 4.04 mg/L 组浸浴 14 d 许多细胞质中出现棕色颗粒(♣), 少量细胞坏死(♠). 4. 40.37 mg/L 组浸浴 7 d 许多细胞质中出现棕色颗粒(♣), 细胞出现坏死(♠), 出现大颗粒血细胞(♠). 5. 40.37 mg/L 组浸浴 14 d 细胞质中出现大量棕色颗粒(♣), 组织有大颗粒血细胞(♠), 细胞出现坏死(♠). 6. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 细胞大量脱落坏死(♠), 组织中出现大量大颗粒血细胞(♠).

Plate II Histopathology of antennal gland

1. Fine antennal gland cells had intact structure. Demarcation line of tissues was clear in control group. 2. Exposed in 0.40 mg/L for 21 days, there were a little circular red particulate matter (RPM) in antennal gland cells. 3. Exposed in 4.04 mg/L for 14 days, many RPM were observed in part of antennal gland cells (♣). A few necrosis cells (♠) were observed in antennal gland. 4. Exposed in 40.37 mg/L for 7 days, many RPM were observed in antennal gland cells (♣). A few necrosis cells (♠) were observed and large granular hemocytes dispersed in tissues of antennal gland (♠). 5. Exposed in 40.37 mg/L for 14 days, many RPM were observed in antennal gland cells (♣). Many necrosis cells (♠) were observed and some large granular hemocytes dispersed in tissues of antennal gland (♠). 6. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, a large number of necrosis cells were observed and fell off (♠). Some large granular hemocytes dispersed in tissues of antennal gland (♠).

图版III 鳃组织病理

1.对照组的鳃, 鳃膜(▲)、呼吸上皮细胞(♂)、微血管内血细胞(△). 2. 0.40 mg/L 组浸浴 21 d 鳃丝略显肿大, 部分鳃膜界限不清(♣)呼吸上皮细胞出现脱落(▲). 3. 4.04 mg/L 组浸浴 21 d 呼吸上皮细胞坏死, 从鳃膜脱落(▲). 4. 40.37 mg/L 组浸浴 14 d 鳃丝肿大, 鳃膜坏死(▲), 呼吸上皮细胞坏死脱落(△). 5. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 呼吸上皮细胞细胞核肿大(♣), 呼吸上皮细胞坏死脱落(▲)后呼吸上皮充满血细胞(△). 6. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 呼吸上皮细胞细胞核肿大(♣), 呼吸上皮细胞坏死脱落(▲), 微血管中充满脱落坏死的细胞.

Plate III Histopathology in gills

1. Gill membrane(▲), respiratory epithelium cells(♂) and haemocyte(△) cells had fine structure. The demarcation line of each tissue was clear in control group. 2. Exposed in 0.40 mg/L for 21 days, gills swelled slightly. The demarcation line of gill membrane was unclear(♣) and the respiratory epithelium cells fell off (▲) in little gill cells. 3. Exposed in 4.04 mg/L for 21 days, respiratory epithelium cells were necrotic and fell off demarcation line (▲). 4. Exposed in 40.37 mg/L for 14 days, gills swelled and gill membrane was necrotic (▲). Necrotic respiratory epithelium cells (△) were observed and departed from gill membrane. 5. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, nucleus of breathe epithelium swelled(♣). Respiratory epithelium was necrotic and fell off (▲) and instated by hemocytes(△). 6. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, nucleus of respiratory epithelium cells swelled(♣). Respiratory epithelium cells died and fell off (▲). Haemocyte was full of necrotic cells.

图版 IV 性腺组织病理

1. 对照组精小叶间界限清晰, 细胞分裂旺盛, 初级精母细胞(↑)、次级精母细胞(⇧)及精细胞(♂)均可见到。2. 0.40 mg/L 组浸浴 21 d 精小叶界限清晰, 精母细胞分裂旺盛(⇧), 精细胞正在形成(♂)。3. 4.04 mg/L 组浸浴 21 d 精小叶中精母细胞核出现空洞, 染色质贴近核膜分布(♂), 正常精母细胞(♂)。4. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 精巢中精小叶的细胞坏死(♂), 组织充血(△)。5. 对照组卵细胞核明显(♂), 充满卵黄(⇧), 周围由滤泡细胞包被(♂)。6. 0.40 mg/L 组浸浴 21 d 卵细胞核明显(♂), 充满卵黄(⇧), 周围由滤泡细胞包被(♂)。7. 4.04 mg/L 组浸浴 21 d 卵细胞与滤泡细胞分离(♂)。8. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 滤泡细胞脱落坏死(♂), 组织充血(△), 卵细胞出现融合(♂)。

Plate IV Histopathology in gonads

1. Seminiferous interlobulars of the control group had clear boundaries. Actively cell division was observed in lobulars. There were many primary spermatocytes(↑), secondary spermatocytes(⇧) and spermatids(♂) in lobulars. 2. Exposed in 0.40 mg/L for 21 days, seminiferous interlobulars had clear boundaries. Primary spermatocytes(⇧) and spermatids(♂) dividing actively were observed in lobulars. 3. Exposed in 4.04 mg/L for 21 days, necrotic primary spermatocytes were observed whose nucleus chromatin distributed closely to nuclear membrane(♂). Primary spermatocytes of the control group (♂). 4. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, some necrosis cells were observed in seminiferous lobulars(♂). There were many hemocytes (△) in lobulars. 5. Complete nucleus(♂) and much egg yolk(⇧) which was surrounded by follicular cells(♂) in oocyte of the control group. 6. Exposed in 0.40 mg/L for 21 days, there were complete nucleus(♂) and much egg yolk(⇧) which was surrounded by follicular cells(♂) in oocyte. 7. Exposed in 4.04 mg/L for 21 days, oocytes departed with follicular cells(♂). 8. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, necrosis follicular cells (♂) and fusion cells(♂) were observed. Some hemocytes dispersed in tissues (△).

图版 V 肠道组织病理

1. 对照组肠道中有少许内含物(♣), 肠上皮细胞完整(▲). 2. 40.37 mg/L 组浸浴 21 d 肠道内含物(♣)中含许多被染成棕色的颗粒物(♣), 肠上皮细胞完整(▲).

Plate V Histopathology in intestine

1. There were some inclusions in the intestine of the control(♣). Intestinal epithelium cells were complete(▲). 2. Exposed in 40.37 mg/L for 21 days, a large number of BRPMs(♣) were observed in inclusions of intestine. Intestinal epithelium cells were complete(▲).

《中国渔业质量与标准》征订启事

《中国渔业质量与标准》是由农业部主管、中国水产科学研究院主办的综合性学术刊物。

本刊宗旨是: 刊载我国渔业领域质量安全和标准等方面的政策法规、技术资讯及研究成果, 搭建渔业质量与标准工作沟通交流的平台, 提高渔业质量和标准水平, 促进渔业可持续发展。主要收录水产品质量安全研究和标准研究等方面的具有创新性和学术价值的研究论文、综述等。内设栏目包括质量安全监管、渔业标准化、学科建设、学术研究、检验与检测、质量认证、动态信息和国外研究等。

本刊现为季刊, 大 16 开, 每逢 3、6、9、12 月出版, 自办发行, 每期定价 18 元, 全年价 72 元, 加邮费全年定价共计 80 元。凡需订阅本刊者, 可直接与编辑部联系征订。

本刊地址: 北京丰台区永定路南青塔 150 号《中国渔业质量与标准》编辑部

邮 编: 100141

电话: 010-68690728

联系人: 穆迎春 许玉艳

热忱欢迎广大读者征订本刊, 并向关心、关注本刊发展的广大作者、读者致以衷心的感谢!