

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.16131

重铬酸钾对不同倍性泥鳅鳃细胞系的毒性效应

吴迪¹, 李霞^{1,2}, 秦艳杰¹, 白丽雯¹, 周诗珈¹

1. 大连海洋大学 辽宁省海洋生物资源恢复与生境修复重点实验室, 辽宁 大连 116023;

2. 大连海洋大学 农业部北方海水增殖重点实验室, 辽宁 大连 116023

摘要: 以二倍体和三倍体泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)鳃细胞系(DIMF 和 TRMF)为实验材料, 研究了重铬酸钾对细胞的氧化损伤、微核形成以及金属硫蛋白表达情况的影响, 旨在多角度探讨重铬酸钾对细胞系的毒性效应, 建立适合监测其污染情况的指标。采用 MTT 法测定了细胞的半数抑制浓度; 使用试剂盒测定了 3 种主要抗氧化酶活性; 吉姆萨染色后观察了细胞微核的变化, 并通过实时定量 PCR 方法测定了金属硫蛋白的表达情况。结果表明, 24 h 急性毒性实验两种细胞系的半抑制浓度分别为(25.3±1.2) μmol/L、(27.9±0.6) μmol/L, DIMF 对重铬酸钾的敏感性要高于 TRMF。当重铬酸钾浓度为 0~30 μmol/L 时, 二个细胞系的超氧化物歧化酶(SOD)活性随染毒浓度升高而升高。当重铬酸钾浓度为 0~20 μmol/L 时, 谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)活性逐渐升高, 浓度为 30~40 μmol/L 时, 其活力开始下降。两种细胞系的谷胱甘肽 S 转移酶(GST)活性随重铬酸钾浓度增大逐渐降低。二倍体细胞系氧化酶活性均低于三倍体。微核试验显示, 重铬酸钾可引起细胞核损伤, 形成微核。当重铬酸钾浓度为 40 μmol/L 时, DIMF、TRMF 微核率达到最大, 分别为 7.33‰和 8.00‰, DIMF 微核率要低于 TRMF。实时定量 PCR 结果显示, 对照组金属硫蛋白(MT)基因表达量很低, 但经重铬酸钾胁迫后, MT 基因表达量显著升高($P<0.01$)。

关键词: 重铬酸钾; 泥鳅细胞系; 酶活力; 微核率; 金属硫蛋白

中图分类号: X171

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)01-0173-07

近年来, 铬矿石的需求及应用不断增加, 含铬的废渣、废水、废气的排放量也逐年升高, 对环境造成很大的影响, 尤其是排放的废水, 会导致水体区域性的铬污染。铬的常见形态是三价铬 Cr^{3+} 和六价铬 Cr^{6+} 。一般认为 Cr^{3+} 毒性很低, 生物活性较高, 参与多种代谢活动, 是有机体所必需的微量元素; 但 Cr^{6+} 会造成消化道、呼吸道病变, 皮肤过敏、恶性肿瘤等^[1-2], 所以铬在毒理学研究中主要是指以铬酸根及重铬酸根形式存在的 Cr^{6+} 。由于铬的累积性和生物链浓缩富集的特点, 污染水域的鱼、虾等水生生物被人食用后, 会造成组织器官的损伤甚至死亡。在人类, 铬污染的毒性效应以及毒理学研究已有较多的报道^[3], 但对水生生物影响的研究相对哺乳动物较少, 主要

是利用泥鳅、鲤鱼等常见鱼类所做的工作^[4-6]。铬对细胞系的研究多集中于毒性敏感性或某种基因的表达量, 如 Tan 等^[7]比较了 6 种细胞系对重铬酸钾的敏感性, 结果表明鲤鱼上皮瘤细胞系对铬最为敏感; Torre 等^[8]通过实时定量 PCR 的方法发现重铬酸钾可使 PLHC-1 细胞系 ABC 转运蛋白基因表达量升高, 证实了铬与鱼类 ABC 转运蛋白的相互作用。但重铬酸钾对细胞毒性效应的系统研究尚未见报道。

已有的研究表明当生物体暴露在污染物环境中, 其体内防御系统如抗氧化酶系统会迅速激活^[9]; 金属硫蛋白(metallothionein, MT)可结合重金属离子, 快速清除羟自由基, 为一些金属依赖性酶类提供活性中心, 维护酶的功能完整性^[10]; 染色体

收稿日期: 2016-04-19; 修订日期: 2016-06-18.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31272650).

作者简介: 吴迪(1991-), 女, 硕士, 专业方向为海洋生物学. E-mail: 15842623565@163.com

通信作者: 李霞(1961-), 女, 教授. E-mail: lx@dlou.edu.cn

断裂出现微核^[11], 所以氧化酶活性、MT 表达量以及微核率等常作为研究环境污染的重要指标。

泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)在中国分布广泛, 存在着天然的多倍体形态, 是良好的急性毒性实验材料^[12-13]。本研究以大连海洋大学细胞工程实验室建立的二倍体、三倍体泥鳅鳃细胞系为实验材料, 研究了重铬酸钾对细胞的氧化损伤、微核形成以及金属硫蛋白表达情况的影响, 目的是多角度探讨重铬酸钾对细胞系的毒性效应, 建立适合监测其污染情况的一些指标, 并比较不同倍性之间的差异。

1 材料与方法

1.1 材料

二倍体、三倍体泥鳅鳃细胞系(DIMF、TRMF)是大连海洋大学细胞工程实验室 2012 年建立的, 传代至 60~80 代。细胞系所用的培养基均为含 20%胎牛血清的 DMEM/F12 培养液, 于 25℃、5% CO₂ 条件下培养。

实验所用培养基、胎牛血清、胰酶均为 Hyclone 公司生产; 重铬酸钾、四噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)、磷酸盐缓冲液(PBS)等购于上海生工生物工程有限公司; 酶学检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 实时定量所用试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 染毒处理 设置重铬酸钾浓度分别为 0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L、50 μmol/L、60 μmol/L、70 μmol/L、80 μmol/L、90 μmol/L, 取生长良好的 60~80 代 DIMF、TRMF, 以 1×10⁵ 个/mL 密度接种于 96 孔板或 25 mL 培养瓶中, 接种量分别为 0.2 mL 和 5 mL, 24 h 后, 弃去原培养基, 加入等体积不同浓度的重铬酸钾, 每个浓度设 3 个平行, 重铬酸钾浓度为 0 的作为对照组, 培养 24 h 用于后续实验。

1.2.2 MTT 测定半数抑制浓度 染毒 24 h 后, 加入 40 μL 的 5 mg/mL 的 MTT 于 96 孔板中, 孵育 4 h, 弃去培养基, 用 PBS 缓冲液快速清洗两次, 加入 150 μL DMSO 震荡 10 min, 在酶标仪 570 nm 处测定吸光值。其中重铬酸钾浓度为 0 的为阳性

对照组, 另设一组只加等体积培养基不加细胞的为阴性对照组。细胞存活率=(OD 实验组-OD 阴性对照组)/(OD 阳性对照组-OD 阴性对照组)×100%。

1.2.3 酶活力检测 按照南京建成生物技术公司的试剂盒说明书测定总蛋白质以及 SOD、GSH-Px、GST 活力变化。实验设 0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L 5 个浓度梯度。

1.2.4 微核率测定及统计 将细胞收集于离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, PBS 重悬沉淀, 滴片、推片、甲醇固定、姬姆萨染色、蒸馏水冲洗、自然晾干、中性树胶封片、油镜观察。微核率=带有微核的细胞数/细胞总数×1000‰。实验设 0 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L、30 μmol/L、40 μmol/L、50 μmol/L 6 个重铬酸钾浓度梯度。

1.2.5 金属硫蛋白(MT)测定 引物设计以泥鳅 β -actin 基因为内参, 参照李彩娟等^[14]设计引物如下:
 β -actin-F: 5'-GAACTCTTGCCACCATACCTG-3'
 β -actin-R: 5'-CCCAAGTCAATGCGTCAGAG-3'
MT-F: 5'-AATGTGAACTCTTTGTCCGAAC-3'
MT-R: 5'-GGAGGCAAGTGAAACCCAAC-3'

将对照和实验组细胞收集于离心管中, 1000 r/min 离心 5 min, 用 1 mL PBS 重悬细胞, 然后按照常规 TRIzol 方法提取细胞总 RNA, 检验 RNA 完整性、浓度和纯度, 用 DEPC 水调整 RNA 浓度为 500 ng/μL。按照全式金试剂盒说明, 反转录成 cDNA 第一条链, 以反转录出来的 cDNA 为标准品, 10 倍梯度稀释为模板; 按照全式金说明书, 分别制作内参基因 β -actin 和目的基因 MT 的标准曲线, 并进行 Real-time PCR。另设一组不加 cDNA 模板, 以 ddH₂O 补足的体系为阴性对照。反应体系为:

template	1 μL
forward primer	0.4 μL
reverse primer	0.4 μL
2×TransScript®Top Green qPCR SuperMix	10 μL
Passive Reference Dye(50×)	0.4 μL
ddH ₂ O	7.8 μL

反应条件为: 94℃预变性 30 s; 94℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 共 40 个循环。结果以 2^{-ΔΔC_T}法计算, 其中 ΔΔC_T=(样品 C_T-内参 C_T)-(对照 C_T-内参 C_T)。

1.2.6 数据处理 实验数据用 SPSS 17.0 软件分析, 测定数据用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)表示, 并用 Excel 作图。

2 结果与分析

2.1 半抑制浓度的测定

经重铬酸钾处理后, DIMF、TRMF 存活率变化规律如图 1 所示。两种细胞系存活率均随着重铬酸钾浓度的增加而逐渐降低, 存在着明显的剂量-效应关系。存活率与浓度的自然对数关系方程分别为: $y = -45.64 \ln x + 202.94 (R^2 = 0.991)$ 、 $y = -46.09 \ln x + 203.43 (R^2 = 0.988)$, 根据方程可求出 DIMF、TRMF 的半数抑制浓度 IC_{50} 分别为 $(25.3 \pm 1.2) \mu\text{mol/L}$ 、 $(27.9 \pm 0.6) \mu\text{mol/L}$ 。当重铬酸钾的浓度为 $90 \mu\text{mol/L}$ 时, 两种细胞全部死亡。

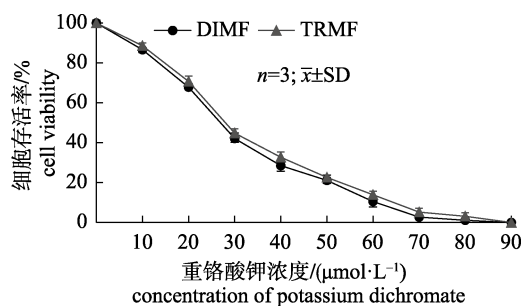


图 1 重铬酸钾对细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of potassium dichromate on cell viability

2.2 酶活力的测定

暴露于重铬酸钾 24 h 后, 两种细胞系的 SOD 活性变化如图 2 所示。当重铬酸钾浓度为 $0 \sim 30 \mu\text{mol/L}$

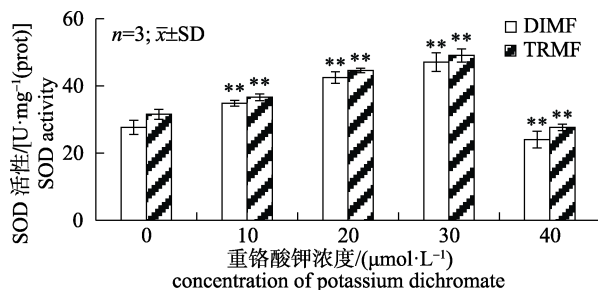


图 2 重铬酸钾对 SOD 活性的影响

**表示与对照组存在极显著性差异($P < 0.01$)。

Fig. 2 Effects of potassium dichromate on activity of SOD

** means extremely significant differences from the control group ($P < 0.01$).

时, 随重金属浓度逐渐升高, SOD 活性不断升高; 当重铬酸钾浓度为 $40 \mu\text{mol/L}$ 时, SOD 活性显著下降, 所有浓度组与对照组存在极显著性差异($P < 0.01$)。两个细胞系间比较, 每个浓度组 DIMF 的活性均低于 TRMF, 其中 $30 \mu\text{mol/L}$ 、 $40 \mu\text{mol/L}$ 浓度组 DIMF 的 SOD 活性显著低于 TRMF ($P < 0.05$)。

经重铬酸钾处理 24 h 后, DIMF 和 TRMF 中 GSH-Px 的活力随染毒浓度升高出现先升高后降低的趋势, 最大活性分别为 60.7 U/mg(prot) 、 66.7 U/mg(prot) 。铬浓度为 $20 \mu\text{mol/L}$ 、 $30 \mu\text{mol/L}$ 时, DIMF 的 GSH-Px 活性显著低于 TRMF ($P < 0.05$) (图 3)。

随着染毒浓度的增加, GST 活力变化如图 4 所示, 两种细胞系的 GST 活性均出现逐渐降低的

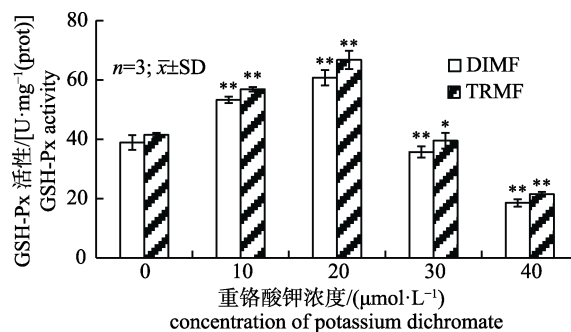


图 3 重铬酸钾对 GSH-Px 活性的影响

*表示与对照组存在显著性差异($P < 0.05$),

**表示与对照组存在极显著性差异($P < 0.01$)。

Fig. 3 Effects of potassium dichromate on activity of GSH-Px

* means significant differences from the control group ($P < 0.05$); ** means extremely significant differences from the control group ($P < 0.01$).

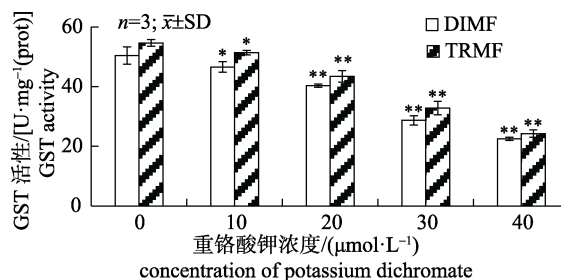


图 4 重铬酸钾对 GST 活性的影响

* 表示与对照组存在显著性差异($P < 0.05$), **表示与对照组存在极显著性差异($P < 0.01$)。

Fig. 4 Effects of potassium dichromate on activity of GST

* means significant differences from the control group ($P < 0.05$); ** means extremely significant differences from the control group ($P < 0.01$).

趋势。各浓度组 DIMF 的 GST 活力均低于 TRMF。

2.3 微核率的变化

重铬酸钾处理 24 h 后, 两个细胞系均出现微核, 微核位于细胞质中, 呈圆形, 颜色与细胞核相同, 如图 5 所示。微核率的变化见表 1, 从中可看出微核率随染毒浓度的升高出现先升高后降低的趋势, 重铬酸钾浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, 微核率最高, 分别为 7.33‰、8.00‰。DIMF 的微核率小于 TRMF, 未见显著性差异。

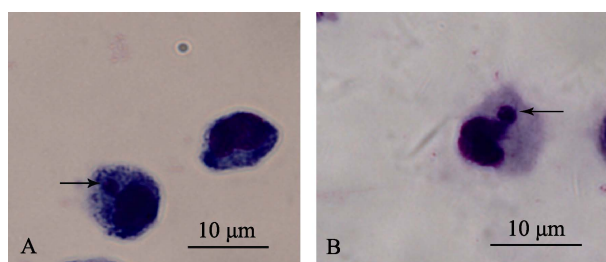


图 5 带有微核的 DIMF、TRMF 细胞
箭头所示为微核。

Fig. 5 DIMF (A) and TRMF (B) cell with micronucleus
Arrows show the micronucleus.

表 1 重铬酸钾对 DIMF 和 TRMF 微核率的影响
Tab. 1 The effects of potassium dichromate on the
micronucleus rates of DIMF and TRMF

$n=3; \bar{x} \pm \text{SD}$		
重铬酸钾浓度/ $(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ concentration of potassium dichromate	DIMF 微核率/‰ micronucleus rate in DIMF	TRMF 微核率/‰ micronucleus rate in TRMF
0	0.33 $\pm$ 0.33	0.33 $\pm$ 0.01
10	2.67 $\pm$ 0.67**	2.67 $\pm$ 0.33**
20	3.00 $\pm$ 1.45**	4.33 $\pm$ 0.67**
30	6.00 $\pm$ 0.88**	7.33 $\pm$ 1.00**
40	7.33 $\pm$ 0.67**	8.00 $\pm$ 0.57**
50	5.67 $\pm$ 0.88**	7.33 $\pm$ 0.33**

注: **表示与对照组存在极显著性差异($P<0.01$).

Note: ** means extremely significant differences from the control group ($P<0.01$).

2.4 real-time PCR 结果

MT mRNA 相对表达量的实验结果见图 6。对照组 *MT* 表达量很低, 经重铬酸钾刺激后表达量均极显著升高($P<0.01$), 在 30 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组最高, 之后下降。两个细胞系间表达量没有明显差异($P>0.05$)。

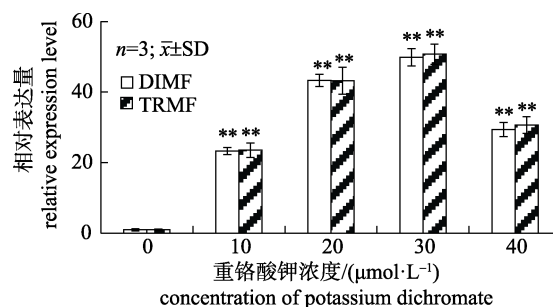


图 6 重铬酸钾对 *MT* 基因表达量的影响

**表示与对照组存在极显著性差异($P<0.01$).

Fig. 6 Effects of potassium dichromate on *MT* relative expression of DIMF and TRMF

** means extremely significant differences from the control group ($P<0.01$).

3 讨论

3.1 重铬酸钾对细胞存活率的影响

本研究中 DIMF、TRMF 半数抑制浓度分别为 (25.3 $\pm$ 1.2) $\mu\text{mol/L}$ 、(27.9 $\pm$ 0.6) $\mu\text{mol/L}$, 与谭凤霞等^[15]通过 MTT 法测定的重铬酸钾对 20 代稀有鲫 (*Gobiocypris rarus*) 鳃细胞 (RMF) 的半致死浓度 (21.0 $\pm$ 5.9) $\mu\text{mol/L}$ 相近, 但明显低于高晓莉等^[16]测定的重铬酸钾对泥鳅个体的半致死浓度 366.61 mg/L。作者认为, 个体鱼类自身具有排毒和免疫能力, 会掩饰一些毒性效应, 不能敏感地检测出有毒物质; 而细胞系由于直接和污染物接触, 反应更为迅速灵敏。本研究中所用的二倍体、三倍体泥鳅鳃细胞系对重铬酸钾的反应比较敏感, 可用于铬污染的监测和研究。

3.2 重铬酸钾对抗氧化酶活力的影响

SOD 是体内唯一的将自由基作为反应底物的抗氧化酶^[17], GSH-Px 可特异性地催化还原型谷胱甘肽 (GSH) 与过氧化氢 H_2O_2 的还原反应, 是分解 H_2O_2 的关键酶, 具有保护细胞膜的作用。本研究中发现, SOD 和 GSH-Px 活性均随染毒浓度的升高, 出现了先升高后降低的趋势, 符合 Stebbing^[18]的“毒物兴奋效应”, 即低浓度的重金属离子可促进细胞中的一些代谢活动, 而高浓度的重金属离子会产生抑制效应。谭凤霞^[19]检测了重铬酸钾对鲤鱼上皮瘤细胞系 (EPC) 中 SOD 活性的影响, 曾发现随着重铬酸钾浓度的升高, SOD 的活性表现为先升高后降低; 耿晓修等^[20]通过灌喂法研究六价铬对草鱼肝脏 GSH-Px 活性的影响, GSH-Px 活

性也随铬剂量的增加出现先升高后降低的结果。Pourahmada 等^[21]认为六价铬能通过细胞膜非特异性阴离子通道进入细胞, 在细胞内被还原成低价铬, 并在其还原过程中产生活性氧 ROS。本研究中 SOD 和 GSH-Px 的升高可能是用于清除自由基和过氧化氢, 减轻铬对细胞的毒害作用; 而高浓度组中, 细胞系中抗氧化酶系统受到损伤, 活性降低。GST 存在于各种组织细胞中, 具有消除体内自由基和解毒的双重功能, 使可溶性脂质物与 GSH 结合, 能防止脂质的过氧化^[22]。肖丹等^[23]发现受 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 影响, 罗非鱼离体肝血清中 GST 的活性随着 4 种金属离子浓度的升高总体呈下降趋势。本研究中, 两种细胞系 GST 活力均随 Cr^{6+} 浓度的增加而降低, 分析其原因, 认为一方面可能是反应底物 GSH 经过 GSH-Px 催化, 与 H_2O_2 发生还原反应, 含量降低, GST 无法诱导相关反应; 另一方面可能是过量的 Cr^{6+} 破坏了酶结构和功能。

3.3 微核率的改变

利用鱼类红细胞微核率的变化作为环境中重金属、农药的生物监测指标已有较多的报道^[4-5]。李倩等^[24]将泥鳅暴露在硫酸铜溶液中, 发现受 Cu^{2+} 胁迫后, 泥鳅外周血红细胞微核率出现先升高后降低的变化趋势, 与本研究所得出的两种细胞系的变化规律一致。在 0~40 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组微核率随重铬酸钾浓度升高而升高, 以后下降, 其原因可能是 Cr^{6+} 在细胞内被还原成低价铬的过程中, 遗传物质可能受到损伤, 促使细胞系的微核率升高; 而 Cr^{6+} 浓度过高时, 抑制细胞的正常分裂或使细胞核完全裂解, 造成微核率降低。本研究结果认为, 体外培养的细胞微核率的变化同样可作为环境污染物的检测指标。

3.4 MT 基因表达情况

金属硫蛋白(MT)是生物体内普遍存在的低分子量蛋白质, 富含半胱氨酸和巯基, 而巯基可以螯合重金属离子, 使其无法继续对生物体产生毒害, 从而实现解毒功能^[25]。作为良好的生物标志物, MT 对水环境中重金属污染的评估和研究多集中在个体水平, 利用培养的细胞所做的工作不多。王磊^[26]利用实时荧光定量 PCR 方法检测了镉

污染后泥鳅鳍组织中 MT 的表达量, 发现实验组表达量明显高于对照组; Cheuk 等^[27]研究发现六价铬可诱导斑马鱼尾鳍细胞系 MT 基因表达量的升高。本研究中, 对照组泥鳅鳍细胞系 MT 表达量与王磊^[26]所做的泥鳅鳍组织中 MT 表达量相近, 染毒后泥鳅鳍细胞系 MT 基因表达量显著升高, 但当重铬酸钾浓度为 40 $\mu\text{mol/L}$ 时, MT 表达量开始下降。分析认为, 当受到铬胁迫时, MT 在转录水平上大量表达, 结合过量铬离子, 降低铬对抗氧化酶的抑制作用, 以及铬的其他毒害作用, 但 Cr^{6+} 浓度过高时, 细胞受损严重, 无法再生成 MT。

3.5 两种细胞系之间的比较

总体上看, 二倍体细胞系的半致死浓度、酶活力都低于三倍体细胞系, 说明二倍体细胞系比三倍体细胞系对 Cr^{6+} 更为敏感。Li 等^[12]的研究表明, 三倍体细胞体积大于二倍体细胞, 体积大的细胞中各种物质相对较多, 更利于酶促反应的发生, 以抵抗外界不良环境, 显示出更高的抗耐性; 三倍体细胞系微核率高于二倍体细胞系, 分析认为三倍体细胞核大, 染色体数目多, 进而增加了细胞核受损的几率。两个细胞间 MT 的表达量差异不明显, 可能是由于一些基因沉默造成的, 两种倍性细胞在重铬酸钾胁迫下的不同表现, 为多倍体在毒理学方面的研究提供了依据。

参考文献:

- [1] Rowbotham A L, Levy L S, Shuker L K. Chromium in the environment: An evaluation of exposure of the UK general population and possible adverse health effects[J]. J Toxicol Environ Health B: Crit Rev, 2000, 3(3): 145-178.
- [2] Zhitkovich A. Chromium in drinking water: Sources, metabolism, and cancer risks[J]. Chem Res Toxicol, 2011, 24(10): 1617-1629.
- [3] Jin L F, Yuan Y M, Hu Y R, et al. Research progress in cytotoxicity and mechanism of hexavalent chromium[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 2013, 35(3): 387-392. [金立方, 袁翔, 胡伟瑞, 等. 六价铬的细胞毒理效应及其机制研究进展[J]. 中国细胞生物学学报, 2013, 35(3): 387-392.]
- [4] Liu J Y. Effects of Cr^{6+} on outer blood corpuscle microkernel in *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Hydroecology, 2011, 32(5): 119-121. [刘敬禹. Cr^{6+} 对泥鳅外周血细胞微核率的影响[J]. 水生态学杂志, 2011, 32(5): 119-121.]
- [5] Han J, Guo M, Niu H H, et al. Effects of heavy metal cadmium on micronucleus and nuclear abnormalities in oriental

- weather fish *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Fisheries Science, 2010, 29(12): 739–741. [韩杰, 郭萌, 牛花花, 等. Cd^{2+} 对泥鳅外周血红细胞微核及核异常的影响[J]. 水产科学, 2010, 29(12): 739–741.]
- [6] Liang F, Yang S G, Sun C. The acute toxicity of hexavalent chromium on *Pelteobagrus fulvidraco* fry and fingerling[J]. Journal of Agro-Environment, 2010, 29(9): 1665–1669. [梁峰, 杨绍贵, 孙成. 六价铬对黄颡鱼仔鱼和稚鱼的急性毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2010, 29(9): 1665–1669.]
- [7] Tan F X, Wang M, Wang W M, et al. Comparative evaluation of the cytotoxicity sensitivity of six fish cell lines to four heavy metals in vitro[J]. Toxicol Vitro, 2008, 22(1): 164–170.
- [8] Torre C D, Zaja R, Loncar J, et al. Interaction of ABC transport proteins with toxic metals at the level of gene and transport activity in the PLHC-1 fish cell line[J]. Chem-Biol Interact, 2012, 198(1–3): 9–17.
- [9] Wang G, LaPatra S, Zeng L, et al. Establishment, growth cryopreservation and species of origin identification of three cell lines from white sturgeon, *Acipenser transmontanus*[J]. Methods Cell Sci, 2003, 25(3–4): 211–220.
- [10] Lu H, Liu Z P, Zhao B Y. Progress on biological functions of metallothionein[J]. Progress in Veterinary Medicine, 2009, 30(1): 62–65. [路浩, 刘宗平, 赵宝玉. 金属硫蛋白生物学功能研究进展[J]. 动物医学进展, 2009, 30(1): 62–65.]
- [11] Geng L W, Lin Y H, Wang H T, et al. Polychromatocytes micronuclei of caps induced by chrome and their synergistic effect[J]. Chinese Journal of Fisheries, 2003, 16(2): 63–67. [耿龙武, 蔺玉华, 王海涛, 等. 铬对鲤嗜多染红细胞微核的诱变效应[J]. 水产学杂志, 2003, 16(2): 63–67.]
- [12] Li X, Ma C, Qin Y J, et al. Establishment and characterization of fin cell lines from diploid, triploid, and tetraploid oriental weather fish (*Misgurnus anguillicaudatus*) [J]. Fish Biol Biochem, 2015, 41(3): 661–672.
- [13] Li Y J, Sui Y, Zhao R, et al. Study on genosome constitution of natural diploid and tetraploid loach *Misgurnus anguillicaudatus* fin cells line[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2015, 46(4): 83–88. [李雅娟, 隋隼, 照睿, 等. 天然二倍体和四倍体泥鳅鳍细胞系染色体组构成研究[J]. 东北农业大学学报, 2015, 46(4): 83–88.]
- [14] Li C J, Wang L, Ling Q F. Effects of cadmium exposure on metallothionein gene expression of *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Hydroecology, 2014, 35(3): 88–93. [李彩娟, 王磊, 凌去非. 镉胁迫对泥鳅金属硫蛋白基因表达的影响[J]. 水生态学杂志, 2014, 35(3): 88–93.]
- [15] Tan F X, Yang F X, Wang W M, et al. A new fish cell line of fin established from rare minnow as versatile tool in ecotoxicology assessment of cytotoxicity of heavy metals[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2009, 33(4): 767–771. [谭凤霞, 杨方星, 王卫民, 等. 稀有鮡鲫鳍细胞系的建立及其作为测定重金属毒性模型的探讨[J]. 水生生物学报, 2009, 33(4): 767–771.]
- [16] Gao X L, Qi F S, Luo H Y, et al. Acute toxicity and joint toxicity experiment of copper, mercury, chromium on *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Reservoir Fisheries, 2003, 23(2): 63–64. [高晓莉, 齐凤生, 罗胡英, 等. 铜、汞、铬对泥鳅的急性毒性和联合毒性实验[J]. 水利渔业, 2003, 23(2): 63–64.]
- [17] Jin F F, Xu T, Qin S J, et al. Effects of cadmium on hepatopancreas mitochondrial antioxidant enzyme activity and lipid peroxidation level in freshwater crab *Sinopotamon yangtsekiense*[J]. Acta Hydrobiologica Sinica, 2011, 35(6): 1019–1024. [金芬芬, 徐团, 秦圣娟, 等. 镉对长江华溪蟹肝胰腺线粒体抗氧化酶活力和脂质过氧化水平的影响[J]. 水生生物学报, 2011, 35(6): 1019–1024.]
- [18] Stebbing A R. Hormesis-the stimulation of growth by low levels of inhibitions[J]. Sci Total Environ, 1982, 22(1): 213–234.
- [19] Tan F X. Establishment of three fish cell lines and research on the sensitivity of twelve fish cell lines to heavy metal toxicity[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. [谭凤霞. 三株鱼类细胞系的建立和十二株鱼类细胞系对重金属毒性的敏感性研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.]
- [20] Geng X X, Ding S H, Sun H C, et al. Effects of hexavalent chromium on SOD and GSH-Px activities in liver of *Ctenopharyngodon idellus*[J]. Journal of Southwest Agricultural University (Natural Science), 2006, 28(2): 333–336. [耿晓修, 丁诗华, 孙翰昌, 等. 六价铬对草鱼肝脏 SOD 和 GSH-Px 活力的影响[J]. 西南农业大学学报: 自然科学版, 2006, 28(2): 333–336.]
- [21] Pourahmada J, Rabieia M, Jokara F, et al. A comparison of hepatocyte cytotoxic mechanisms for chromate and arsenite[J]. Toxicology, 2005, 206(3): 449–460.
- [22] Bain P A, Kumar A. Cytotoxicity of binary mixtures of human pharmaceuticals in a fish cell line: Approaches for non-monotonic concentration–response relationships[J]. Chemosphere, 2014, 108: 334–342.
- [23] Xiao D, Wang H Y, Han D X. Responses of GSH and GST in liver of *Mossambica tilapia* under Hg^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} and Cd^{2+} stress in vitro[J]. Marine Environmental Science, 2014, 33(3): 345–350. [肖丹, 王海燕, 韩大雄. Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Cd^{2+} 胁迫下罗非鱼离体肝脏中 GSH 和 GST 的响应[J]. 海洋环境科学, 2014, 33(3): 345–350.]
- [24] Li Q, Hu T J, Wang Y C, et al. Effects of heavy metal copper on micronucleus and nuclear abnormalities in *Misgurnus anguillicaudatus*[J]. Journal of Aquaculture, 2011, 32(10): 44–47. [李倩, 胡廷尖, 王雨辰, 等. Cu^{2+} 对泥鳅外周血红细胞微核及核异常的影响[J]. 水产养殖, 2011, 32(10): 44–47.]
- [25] Liu W Q, Ni D J, Song L S, et al. Cloning and characterization of a metallothionein gene in bay scallop *Argopecten irradians*[J]. Oceanologia et Limnologia Sinica, 2006, 37(5):

- 444–449. [刘维青, 倪多娇, 宋林生, 等. 海湾扇贝 (*Argopecten irradians*) 金属硫蛋白基因的克隆与分析[J]. 海洋与湖沼, 2006, 37(5): 444–449.]
- [26] Wang L. Toxicological effects and metallothionein gene expression in *Misgurnus anguillicaudatus* during cadmium exposure[D]. Suzhou: Soochow University, 2008. [王磊. 镉胁迫对泥鳅的毒理效应及金属硫蛋白基因表达的影响[D]. 苏州: 苏州大学, 2008.]
- [27] Cheuk W K, Chan P C Y, Chan K M. Cytotoxicities and induction of metallothionein (MT) and metal regulatory element (MRE)-binding transcription factor-1 (MTF-1) messenger RNA levels in the zebrafish (*Danio rerio*) ZFL and SJD cell lines after exposure to various metal ions[J]. *Aquat Toxicol*, 2008, 89(2): 103–112.

Toxic effects of potassium dichromate on loach fin cell lines with different ploidies *in vitro*

WU Di¹, LI Xia^{1,2}, QIN Yanjie¹, BAI Liwen¹, ZHOU Shijia¹

1. Key Laboratory of Marine Bio-resource Restoration and Habitat RepARATION in Liaoning Province, Dalian Ocean University, Dalian 116023, China;
2. Key Laboratory of Mariculture, Ministry of Agriculture; Dalian Ocean University, Dalian 116023, China

Abstract: Waste water discharge containing chromium can lead to chromium polluted regional water. Because of the accumulation and enrichment of chromium, fish and other aquatic organisms can be injured seriously in polluted water, and chromium can cause toxic effects or death in humans if ingested. Chromium mainly refers to Cr^{6+} , which exists as a noncatalytic form or as potassium dichromate. Fish, such as loach and carp, are commonly used to detect chromium, but few reports have used fish cell lines. Previous studies have revealed that cells cultured *in vitro* are homogeneous, respond quickly, and are convenient to use. In this study, loach fin cell lines established from diploids and triploids (DIMF and TRMF) were used to assess the toxic effects of potassium dichromate *in vitro*. The purpose of this study was to establish suitable indicators to monitor chromium pollution. The concentration that inhibited 50% of the cells (IC₅₀) was determined using the thiazolyl blue (MTT) method, the activities of three main antioxidants were tested with kits, the changes in cell nuclei were observed after Giemsa staining, and expression of the metallothionein (MT) gene was measured by real-time polymerase chain reaction (PCR) analysis. The results showed that the 24-h IC₅₀ values of DIMF and TRMF were $(25.3 \pm 1.2) \mu\text{mol/L}$ and $(27.9 \pm 0.6) \mu\text{mol/L}$, respectively; the sensitivity of DIMF to potassium dichromate was higher than that of TRMF, and the sensitivities of the two cell lines were higher than those of loach *in vivo*. Superoxide dismutase (SOD) activities in the two cell lines increased as the potassium dichromate concentration was increased from 0 to 30 $\mu\text{mol/L}$. Glutathione peroxidase (GSH-Px) activities increased in the two cell lines as the potassium dichromate concentration was increased from 0 to 20 $\mu\text{mol/L}$; however, GSH-Px activities decreased when concentration was 30–40 $\mu\text{mol/L}$. Glutathione S-transferase (GST) activities in the two cell lines decreased gradually as the potassium dichromate concentration was increased. Overall, the enzymatic activities of DIMF were lower than those of TRMF. Potassium dichromate caused nuclear damage and micronuclei formed. The maximum rates of micronuclear formation in DIMF and TRMF were 7.33‰ and 8.00‰, respectively when the potassium dichromate concentration was 40 $\mu\text{mol/L}$. The rate of micronuclear formation was lower in DIMF than that in TRMF. The real-time PCR results showed that MT gene expression in the control group was very low, but increased significantly in response to potassium dichromate stress ($P < 0.01$). MT gene expression was maximal in response to 30 $\mu\text{mol/L}$ potassium dichromate and was 49.9- and 50.7-times higher than that of the control group, respectively. However, the difference between DIMF and TRMF was not significant.

Key words: potassium dichromate; loach fan cell lines; enzyme activity; micronucleus; metallothionein

Corresponding author: LI Xia. E-mail: lx@dlou.edu.cn