

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2017.17137

重金属对罗氏沼虾血细胞活性和酯酶活力的影响

郭慧¹, 张秀霞², 郑佩华², 鲁耀鹏², 洗健安²

1. 广东海洋大学 水产学院, 湛江市海洋生态与养殖环境重点实验室, 广东 湛江 524025;

2. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海南 海口 571101

摘要: 为探讨不同重金属对罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)血细胞的细胞毒性, 取罗氏沼虾血淋巴, 离体状态下分别暴露于不同浓度(10^{-9} ~ 10^{-3} mol/L)的 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 环境中 6 h, 设置不添加重金属的对照组, 应用流式细胞术测定细胞活性和胞内非特异性酯酶活力。结果显示, 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L 的 Cd^{2+} 对细胞活性和酯酶活力均没有显著影响, Cd^{2+} 浓度达到 10^{-5} mol/L 时, 酯酶活力受到了显著的抑制, Cd^{2+} 浓度达到 10^{-4} 和 10^{-3} mol/L 时, 细胞活性和酯酶活力均显著下降; 10^{-9} ~ 10^{-6} mol/L 的 Hg^{2+} 对细胞活性和酯酶活力均没有显著影响, Hg^{2+} 浓度为 10^{-5} ~ 10^{-3} mol/L 时, 细胞活性和酯酶活力均显著下降; 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 的 Cu^{2+} 对细胞活性和酯酶活力均没有显著影响, Cu^{2+} 浓度为 10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 时, 细胞活性和酯酶活力均显著下降; 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 的 Zn^{2+} 对细胞活性和酯酶活力均没有显著影响, Zn^{2+} 浓度为 10^{-4} mol/L 时, 酯酶活力显著下降, Zn^{2+} 浓度为 10^{-3} mol/L 时, 细胞活性和酯酶活力均显著下降。 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 对细胞活性的毒性临界浓度分别为 10^{-4} mol/L、 10^{-5} mol/L、 10^{-4} mol/L 和 10^{-3} mol/L, 毒性强度由高到低依次为 Hg^{2+} 、 Cd^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 。Cd、Hg、Cu 和 Zn 这 4 种重金属对罗氏沼虾血细胞活性和酯酶活力均具有明显的剂量效应; 酯酶活力对重金属胁迫较细胞活性更为敏感, 可作为虾类细胞毒理学研究的重要指标。

关键词: 重金属; 罗氏沼虾; 血细胞; 细胞活性; 酯酶

中图分类号: S917; X171

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2017)05-1123-08

近年来, 随着工农业的快速发展, 水环境中的重金属污染在世界范围内日趋严重。据报道, 由于受到工业、农业和商业化学品的影响, 中国南海地区的海洋环境已遭受严重的重金属污染^[1-2]。工业废水、生活废水以及有害垃圾的排放、养殖生产中硫酸铜、硫酸亚铁粉等药物的不规范使用以及饲料中添加的 Cu、Zn 等重金属元素, 都使其中的重金属离子在水体中积累, 对水生生物的生长和发育构成了严重的威胁^[3]。重金属污染来源广泛, 具有遗传毒性、持久性和不可降解性^[4], 并且通过食物链对人体健康造成影响, 已成为目前生态健康的热点问题。

罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*), 又名

大头虾、马来西亚大虾, 是目前世界上重要的淡水养殖虾类之一^[5]。罗氏沼虾在水生态系统中分布较为广泛, 江河、湖泊等淡水和河口半咸水水域中均有分布, 对水环境中各种理化性质的变化反应较灵敏^[6]。因此, 利用罗氏沼虾研究水环境毒理学和生态风险评价具有重要的实用价值, 对保护人类和动物的生存与健康具有重要的意义。血细胞在甲壳动物的免疫功能中起着举足轻重的作用^[7], 研究重金属对罗氏沼虾血细胞的影响既具有重要的实践意义, 又可为进一步研究重金属对甲壳动物免疫功能的影响机制提供理论依据。酯酶是溶酶体酶类的一种, 广泛存在于各种细胞内, 一些研究表明, 酯酶活力对环境污染具有高度

收稿日期: 2017-03-20; 修订日期: 2017-05-02.

基金项目: 国家自然科学基金项目(31600321); 广东省自然科学基金项目(2015A030310438); 广东海洋大学创新强校工程科研项目(GDOU201605025); 广东海洋大学优秀青年骨干教师特别资助计划项目(HDYQ2015003); 广东海洋大学博士启动项目; 中国热带农业科学院基本科研业务费专项资金项目(1630052016011, 1630052016021).

作者简介: 郭慧(1986-), 女, 博士, 讲师, 主要从事水产动物健康养殖生态学研究. E-mail: guohuivivian@163.com

通信作者: 洗健安, 助理研究员. E-mail: xian-ja@163.com

的敏感性,不同的污染物及浓度都会对酯酶活力产生不同的影响,不同物种的酯酶活力对污染物的响应也存在一定的差异^[8-12]。本研究分析了罗氏沼虾血细胞酯酶活力对几种重金属的响应,旨在探讨酯酶活力作为罗氏沼虾细胞毒理学研究指标的可行性。

水产动物在细胞水平上的研究一直受限于显微镜技术,得不到拓宽和发展。流式细胞术(flow cytometry, FCM)是一种快速、准确、可多指标同时测定的细胞水平的检测方法^[13-14],在临床检验、环境评估等领域的应用十分广泛^[15-16]。近年来,学者们尝试将 FCM 应用到鱼类染色体倍型、精子质量、基因组大小测定的研究中^[17-19]。本研究应用 FCM 分析 4 种重金属离子(Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+})对罗氏沼虾血细胞活性和酯酶活力的影响,为今后进一步研究重金属对甲壳动物血细胞的细胞毒性与免疫毒性影响机制提供研究基础;同时也促进流式细胞术在水产动物中的应用,为水产动物细胞学研究提供新的平台和方向。

1 材料和方法

1.1 实验材料

罗氏沼虾购自广东省广州市番禺区某养殖场。在实验室循环水养殖系统中暂养 1 周,水体 pH 7.5,温度 23~26℃,一直保持曝气。暂养期间每天投喂两次商业饵料(粗蛋白 30%,粗脂肪 3%),实验前停食 1 d。选取附肢完整、无病患、处于蜕皮间期的健康个体作为实验用虾,平均体重为(10.89±1.42) g。

1.2 样品制备

先用 2.5 mL 的一次性注射器吸取 400 μL 预冷的抗凝剂(葡萄糖 20.5 g/L,柠檬酸钠 8 g/L,氯化钠 4.2 g/L, pH 7.5),然后从虾的围心腔抽取等量的血淋巴,每种重金属的胁迫实验取虾 5 尾,将血淋巴混合后再用预冷的抗凝剂调整细胞浓度约为 1×10^6 个/mL。5 尾虾的稀释的血淋巴分装到 8 个 1.5 mL 离心管中,每管 495 μL 。每种重金属的胁迫实验均重复 3 次。

1.3 离体重金属胁迫实验

参考其他虾类以及贝类的研究^[12, 14, 20-22],将

重金属浓度设置为 10^{-9} ~ 10^{-3} mol/L,以不添加重金属为对照组。分别以 $\text{CdCl}_2 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 、 HgCl_2 、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 作为 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 的来源。用超纯水配制浓度为 10^{-1} mol/L 的重金属储备液,再依次逐步稀释为 10^{-7} ~ 10^{-2} mol/L 的工作液。分别加 5 μL 不同浓度的重金属工作液至 495 μL 血细胞悬液中,得到重金属终浓度为 10^{-9} ~ 10^{-3} mol/L,对照组加入 5 μL 超纯水。在培养箱中 25℃ 孵育 6 h 后,分别取样检测。

1.4 细胞活性的测定

以碘化丙啶(PI, Sigma)作为荧光染料进行细胞活性测定。分别取胁迫 6 h 后的血细胞悬液 200 μL ,加入终浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PI,颠倒混匀后室温下避光孵育 10 min,再经 200 目筛网过滤后上流式细胞仪(FACSCalibur, BD)进行检测。以第二荧光通道(FL2)获取 PI 荧光量,结果以 PI 荧光量为横坐标,细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,以标尺划定死、活细胞的区域,分析死细胞区域的细胞比例,即为死亡率。

1.5 非特异性酯酶活力

采用非特异脂溶性底物二乙酸荧光素(molecular probes, FDA)作为荧光染料进行酯酶活力测定。分别取血细胞悬液 200 μL ,加入终浓度为 5 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 FDA,颠倒混匀后室温下避光孵育 30 min,再用 200 目筛网过滤后上流式细胞仪进行检测。以第一荧光通道(FL1)获取 FDA 荧光量,结果以 FDA 荧光量为横坐标、细胞数量为纵坐标的单参数直方图显示,分析细胞的 FDA 平均荧光量。

1.6 统计分析

结果为 3 次重复实验的平均值±标准差($\bar{x} \pm \text{SD}$),实验数据利用 SPSS 18.0 进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 确认为差异性显著。

2 结果与分析

2.1 Cd^{2+} 胁迫

不同浓度 Cd^{2+} 胁迫 6 h 后,罗氏沼虾的细胞活性和酯酶活力的影响如图 1 所示, 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L Cd^{2+} 对细胞存活率没有显著影响($P > 0.05$),存活率约为 85.9%~90.9%;当胁迫浓度为 10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 时,活细胞比例分别显著降低至 68.2%和 53.1% ($P <$

0.05)。Cd²⁺浓度为 10⁻⁹~10⁻⁶ mol/L 时, 对罗氏沼虾的酯酶活力无显著影响($P>0.05$), FDA 荧光强度为 61.4~64.8 A.U.; 胁迫浓度为 10⁻⁵~10⁻³ mol/L 时, 酯酶活力分别显著下降至 49.5、39.4 和 22.3 A.U.。

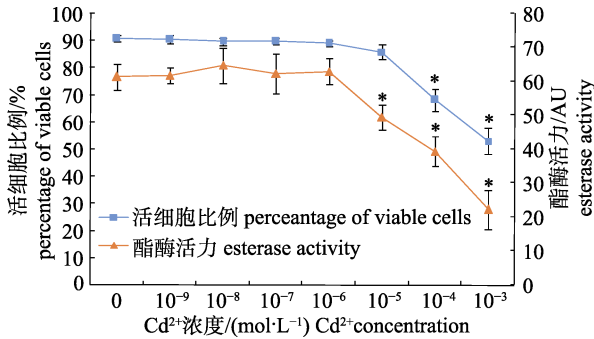


图 1 不同浓度 Cd²⁺胁迫 6 h 后罗氏沼虾的血细胞活性和酯酶活性

*表示胁迫组与对照组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 1 Hemocyte viability and esterase activity after 6 h exposure with different doses of Cd²⁺

*denotes significant difference between stress group and control group ($P<0.05$).

2.2 Hg²⁺胁迫

如图 2 所示, Hg²⁺胁迫浓度为 10⁻⁹~10⁻⁶ mol/L 时, 对罗氏沼虾细胞活性和酯酶活力均无显著影响($P>0.05$), 分别为 89.4%~91.2%和 58.4~63.3 A.U.; 胁迫浓度为 10⁻⁵~10⁻³ mol/L 时, 血细胞活性和酯酶活力均显著低于对照组($P<0.05$), 血细胞活性分别显著下降至 81.2%、61.4%和 41.4%, 酯酶活力分别下降至 45.5、34.3 和 20.0 A.U.。

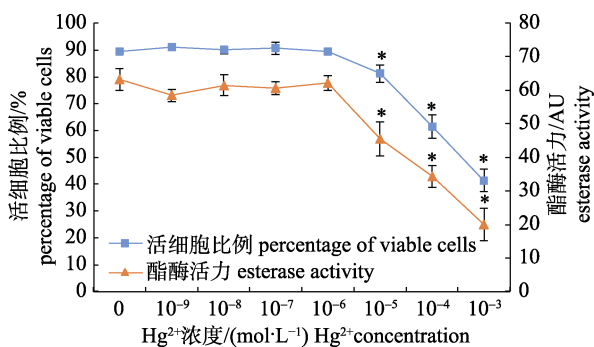


图 2 不同浓度 Hg²⁺胁迫 6 h 后罗氏沼虾的血细胞活性和酯酶活性

*表示胁迫组与对照组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 2 Hemocyte viability and esterase activity after 6 h exposure with different doses of Hg²⁺

*denotes significant difference between stress group and control group ($P<0.05$).

2.3 Cu²⁺胁迫

Cu²⁺胁迫 6 h 后, 罗氏沼虾的血细胞活性和酯酶活力如图 3 所示。与对照组相比, 在 Cu²⁺浓度为 10⁻⁹~10⁻⁵ mol/L 时, 血细胞活性和酯酶活力均无显著性变化($P>0.05$), 分别为 89.8%~91.4%和 59.8~63.5 A.U.。在浓度为 10⁻⁴~10⁻³ mol/L 时, 血细胞活性和酯酶活力显著下降($P<0.05$), 血细胞活性分别显著降低至 82.8%和 75.8%, 酯酶活力分别显著降低至 46.5 和 41.3 A.U.。

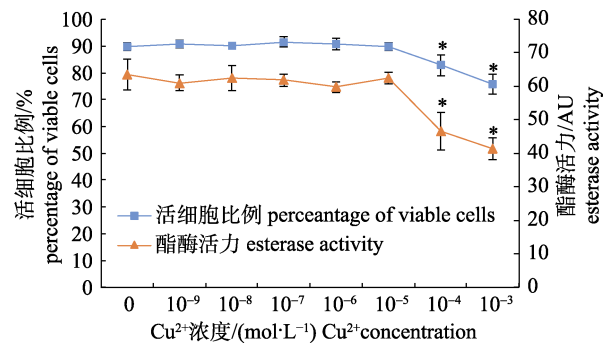


图 3 不同浓度 Cu²⁺胁迫 6 h 后罗氏沼虾的血细胞活性和酯酶活性

*表示胁迫组与对照组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Hemocyte viability and esterase activity after 6 h exposure with different doses of Cu²⁺

*denotes significant difference between stress group and control group ($P<0.05$).

2.4 Zn²⁺胁迫

如图 4 所示, Zn²⁺胁迫浓度为 10⁻⁹~10⁻⁴ mol/L

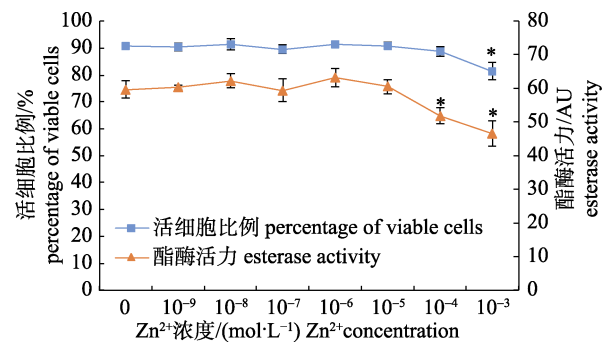


图 4 不同浓度 Zn²⁺胁迫 6 h 后罗氏沼虾的血细胞活性和酯酶活性

*表示胁迫组与对照组间差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Hemocyte viability and esterase activity after 6 h exposure with different doses of Zn²⁺

*denotes significant difference between stress group and control group ($P<0.05$).

时,对血细胞活性无显著影响($P>0.05$),为 88.8%~91.4%;浓度为 10^{-3} mol/L 时,活细胞比例显著降至 81.5% ($P<0.05$)。Zn²⁺浓度为 10^{-9} ~ 10^{-5} mol/L 时,对酯酶活力的影响不显著($P>0.05$),为 59.4~63.2 A.U.;浓度为 10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 时,酯酶活力分别显著降低至 51.8 和 46.5 A.U. ($P<0.05$)。

2.5 重金属的剂量效应

综合细胞活性和酯酶活力的结果,重金属的剂量效应可分为 3 大类(表 1),其中 10^{-5} mol/L 的 Cd²⁺和 10^{-4} mol/L 的 Zn²⁺组可产生中间类型的抑制效应:抑制酯酶活力,但对细胞活性没有显著影响。

3 讨论

3.1 重金属对血细胞活性的影响

血细胞是虾类和贝类免疫系统重要的组成成分,其防御机制包括凝血、抗菌活性、吞噬作用等^[23-24]。血细胞参数是评价机体免疫和生理状态的重要指标^[25-26],血细胞总数(total hemocyte count, THC)的下降将导致机体免疫功能和抗病能力的降低,甚至死亡。本研究结果显示,浓度为 10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 的 Cd²⁺和 Cu²⁺, 10^{-5} ~ 10^{-3} mol/L 的 Hg²⁺以及 10^{-3} mol/L 的 Zn²⁺,都使活细胞的比例显著下降,表明 Cd²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺对血细胞活性的毒性临界浓度分别为 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-3} mol/L;另外,当浓度达到最高的 10^{-3} mol/L 时, Cd²⁺、Hg²⁺、Cu²⁺、Zn²⁺胁迫组的活细胞比例分别为 53.1%、41.4%、75.8%和 81.5%,可见,4 种重金属对罗氏沼虾血细胞的毒性强度依次为: Hg²⁺>Cd²⁺>Cu²⁺>Zn²⁺。

重金属中的 Hg²⁺和 Cd²⁺不能被生物体利用,是一类积累在海洋生物组织中的高度有毒物质,可通过食物链对人类健康产生有害的影响^[27]。研

究表明,较低浓度的 Hg²⁺和 Cd²⁺都会对水生生物产生不利的影响^[28-29]。据报道,当 Hg²⁺和 Cd²⁺的浓度分别为 10^{-5} mol/L 和 10^{-4} mol/L 时,会导致杂色鲍(*Haliotis diversicolor*)的血细胞死亡率显著上升^[14],表明 Hg²⁺对杂色鲍血细胞的细胞毒性强于 Cd²⁺,与本研究罗氏沼虾的研究结果相似。Gagnaire 等^[21]研究了 Hg²⁺和 Cd²⁺对太平洋牡蛎(*Crassostrea gigas*)血细胞的影响,也得出了相似的研究结果。Jose 等^[30]将斑节对虾(*Penaeus monodon*)血细胞进行 Hg²⁺和 Cd²⁺离体胁迫 12 h,结果显示 Hg²⁺和 Cd²⁺浓度分别达到 15.63 μmol/L 和 125 μmol/L 时,血细胞活性的抑制率达到约 80%。对凡纳滨对虾(*Litopenaeus vannamei*)^[20]和斑节对虾^[31]的研究均显示,当 Cd²⁺浓度为 10^{-4} ~ 10^{-3} mol/L 时,血细胞活性受到显著抑制,与本研究罗氏沼虾的结果一致,表明各种虾类的血细胞对 Cd²⁺的耐受能力可能具有相似性。

Cu²⁺和 Zn²⁺是生物体必不可少的微量元素,具有重要的生理功能^[32-33],但积累超过一定范围时,会对机体产生毒性影响。从四种重金属对血细胞活性的影响来看,Zn²⁺表现出最低的细胞毒性,当浓度为 10^{-3} mol/L 时才对细胞活性产生显著抑制作用,说明相比其他重金属,罗氏沼虾对 Zn²⁺的耐受性更强。以往的研究则发现,杂色鲍血细胞对 Cu²⁺的耐受性更强,其 Cu²⁺和 Zn²⁺的毒性临界浓度分别为 10^{-3} 和 10^{-4} mol/L^[14]。欧洲鲍(*Haliotis tuberculata*)血细胞经 10 μmol/L(10^{-5} mol/L)的 Zn²⁺胁迫 24 h 后,细胞活性没有显著变化,但当浓度提高至 100 μmol/L(10^{-4} mol/L)和 1000 μmol/L (10^{-3} mol/L)时,细胞活性显著下降,其中浓度为 1000 μmol/L 时,活细胞比例仅为对照组的 30%~40%^[12]。这种差异可能是由于不同的物种对各金

表 1 重金属对罗氏沼虾血细胞的剂量效应

Tab. 1 The dose-dependent effects of heavy metals on *Macrobrachium rosenbergii* hemocytes

分类 term	mol·L ⁻¹			
	Cd ²⁺	Hg ²⁺	Cu ²⁺	Zn ²⁺
不影响细胞活性和酯酶活力 no effect on cell viability and esterase activity	10^{-9} ~ 10^{-6}	10^{-9} ~ 10^{-6}	10^{-9} ~ 10^{-5}	10^{-9} ~ 10^{-5}
不影响细胞活性,抑制酯酶活力 no effect on cell viability but decreased esterase activity	10^{-5}	—	—	10^{-4}
同时抑制细胞活性和酯酶活力 significantly decreased the cell viability and esterase activity	10^{-4} ~ 10^{-3}	10^{-5} ~ 10^{-3}	10^{-4} ~ 10^{-3}	10^{-3}

属离子的耐受性不同以及各金属离子发挥的生理功能不同导致的^[34]。研究认为, 氧化损伤是重金属共同的细胞毒性机制, 重金属胁迫会诱导细胞产生过量的活性氧(ROS), 这些 ROS 对细胞的蛋白质、核酸、脂类均会造成氧化损伤, 从而诱导细胞发生凋亡, 继而死亡^[31, 35-36]。各类重金属对细胞活性的影响存在差异, 其机制仍有待进一步研究。

3.2 重金属对酯酶活力的影响

有研究显示, 当重金属处于较低浓度时, 虽然从细胞活性上没有表现出细胞毒性, 但对血细胞具有一定的免疫抑制毒性, 如抑制吞噬活力^[22]。酯酶是一种广泛存在于各种细胞内的水解酶, 是溶酶体酶类的一种, 参与外源性物质及自身损伤组织的降解和清除^[37], 酯酶活力的高低反映了机体抵御病原体的能力, 是重要的细胞免疫指标^[10], 在遗传学和毒理学领域具有重要意义^[38]。MTT 法是常用检测细胞活力的方法, 其原理是活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶能使 MTT 还原为水不溶性的蓝紫色结晶甲瓖并沉积在细胞中, 而死细胞因琥珀酸脱氢酶失活而无此功能^[30]。应用 FDA 作为探针分析酯酶活力的原理与 MTT 法类似, 活细胞中酯酶活力强, 能够将进入细胞的 FDA 水解为发绿色荧光的荧光素, 因此荧光素的荧光强度与胞内酯酶活力成正比, 活力弱的细胞因酯酶活力低而表现出较低 FDA 荧光强度, 死细胞因酯酶失活而基本没有荧光。可见, 酯酶活力也可作为反映细胞活力的重要指标。当细胞的酯酶活力下降时, 被认为是细胞活力下降, 会导致细胞凋亡^[26]。本研究发现, 浓度为 $10^{-5} \sim 10^{-3}$ mol/L 的 Cd^{2+} 和 Hg^{2+} 、 $10^{-4} \sim 10^{-3}$ mol/L 的 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 均抑制了罗氏沼虾血细胞的酯酶活力, Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 抑制酯酶活力的临界浓度分别为 10^{-5} 、 10^{-5} 、 10^{-4} 和 10^{-4} mol/L; 当浓度达到 10^{-3} mol/L 时, Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 、 Cu^{2+} 和 Zn^{2+} 胁迫组的酯酶活力分别下降至 22.3、20.0、41.3 和 46.5 A.U.。从上述结果看来, 可基本分为两类: Cd^{2+} 和 Hg^{2+} , 酯酶抑制性较强; Cu^{2+} 和 Zn^{2+} , 酯酶抑制性较低。对斑节对虾的研究显示, Cd^{2+} 浓度为 10^{-4} mol/L 和 10^{-3} mol/L 时, 酯酶活力显著下降^[31]。本研究结果显示, Cd^{2+} 浓度

达到 10^{-5} mol/L 便会对罗氏沼虾血细胞酯酶活力产生抑制作用, 表明相比斑节对虾, 罗氏沼虾血细胞酯酶对 Cd^{2+} 更为敏感。欧洲鲍的研究则发现 Zn^{2+} 胁迫诱导了酯酶活力的提高, 笔者认为 Zn 是许多酶必不可少的组成部分, 包括一些酯酶, 如磷酸二酯酶等, Zn 的加入可能诱导了这些 Zn 相关酯酶的活力^[12]。但另外一些物种的研究则显示了重金属对酯酶活力的抑制性, 如螺 (*Littorina littorea*)^[39]、甲虫 (*Chrysomela lapponica*)^[10], 说明重金属对酯酶活力的影响可能存在物种差异性。

3.3 重金属的剂量效应

综合细胞活性和酯酶活力, 重金属的浓度毒性效应可归纳为 3 类(表 1), 其中较为特殊的是处于中间的类型: 只抑制酯酶活力, 而对细胞活性未产生显著影响。表明较低浓度的重金属虽然不足以导致血细胞快速死亡, 但会对血细胞产生免疫抑制作用, 此结果与贝类吞噬活力的研究结果相似; Hg^{2+} 和 Cu^{2+} 没有出现中间类型的毒性效应, 可能是由于本研究设置的浓度跨度较大所致。另外, 此结果也表明酯酶活力是较细胞活性更为敏感的指标, 可作为研究重金属细胞毒性作用的重要指标。

参考文献:

- [1] Ip C C, Li X D, Zhang G, et al. Trace metal distribution in sediments of the Pearl River Estuary and the surrounding coastal area, South China[J]. Environ Pollut, 2007, 147(2): 311-323.
- [2] Vane C H, Harrison I, Kim A W, et al. Organic and metal contamination in surface mangrove sediments of South China[J]. Mar Pollut Bull, 2009, 58(1): 134-144.
- [3] Kong X D, Chen C, Li Y L, et al. The toxic effects of Cu^{2+} , Zn^{2+} , and Pb^{2+} on the embryos and larvae of *Epinephelus septemfasciatus*[J]. Progress in Fisheries Science, 2014, 35(5): 115-121. [孔祥迪, 陈超, 李炎璐, 等. Cu^{2+} 、 Zn^{2+} 、 Pb^{2+} 对七带石斑鱼 (*Epinephelus septemfasciatus*) 胚胎和初孵仔鱼的毒性效应[J]. 渔业科学进展, 2014, 35(5): 115-121.]
- [4] Wang S L, Xu X R, Sun Y X, et al. Heavy metal pollution in coastal areas of South China: A review[J]. Mar Pollut Bull, 2013, 76(1-2): 7-15.
- [5] Chen J C, Gao T, Zhang J P, et al. Influences of breeding density and bait-casting strategy on growth and development

- of *Macrobrachium rosenbergii* larvae[J]. *Acta Agriculturae Jiangxi*, 2017, (1): 92–95. [陈建酬, 高腾, 张济培, 等. 养殖密度和投饵策略对罗氏沼虾幼体生长发育的影响[J]. *江西农业学报*, 2017, (1): 92–95.]
- [6] Wu W F, Chen L L, Li Y J, et al. Effects of tributyltin on the activities of immunologic enzyme in blood serum of the *Macrobrachium rosenbergii*[J]. *Journal of Guangdong Ocean University*, 2014, 34(3): 17–21. [吴维福, 陈雯雯, 李郁娇, 等. 三丁基锡对罗氏沼虾血清中免疫酶活性的影响[J]. *广东海洋大学学报*, 2014, 34(3): 17–21.]
- [7] Johansson M W, Keyser P, Sritunyaluksana K, et al. Crustacean hemocytes and haematopoiesis[J]. *Aquaculture*, 2000, 191(1–3): 45–52.
- [8] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Burgeot T, et al. Pollutant effects on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), hemocytes: Screening of 23 molecules using flow cytometry[J]. *Cell Biol Toxicol*, 2006, 22(1): 1–14.
- [9] Mazon L, Gonzalez G A, Estomba A, et al. Inhibition of esterases in the marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1998, 41(3): 284–287.
- [10] Zvereva E, Serebrov V, Glupov V, et al. Activity and heavy metal resistance of non-specific esterases in leaf beetle *Chrysomela lapponica* from polluted and unpolluted habitats[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2003, 135(135): 383–391.
- [11] Badonilles A, Gagnaire B, Thomasguyon H, et al. Effects of 16 pure hydrocarbons and two oils on haemocyte and haemolymphatic parameters in the Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg)[J]. *Toxicol in Vitro*, 2008, 22(6): 1610–1617.
- [12] Mottin E, Caplat C, Mahaut M L, et al. Effect of *in vitro* exposure to zinc on immunological parameters of haemocytes from the marine gastropod *Haliotis tuberculata*[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2010, 29(5): 846–853.
- [13] Wang K Y, Geng Y, Huang X L. Apoptosis of hepatic cell in common carp poisoned with olaquinox by flow cytometry (FCM)[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2005, 12(5): 648–651. [汪开毓, 耿毅, 黄小丽. 用流式细胞术检测喹乙醇诱导的鲤肝细胞凋亡[J]. *中国水产科学*, 2005, 12(5): 648–651.]
- [14] Xian J A, Miao Y T, Pan X B, et al. *In vitro* effects of heavy metal on cell viability of haemocyte from abalone *Haliotis diversicolor*[J]. *Sichuan Journal of Zoology*, 2013, 32(3): 415–418. [沈健安, 苗玉涛, 潘训彬, 等. 重金属对杂色鲍离体血细胞活性的影响[J]. *四川动物*, 2013, 32(3): 415–418.]
- [15] Liu X X, Huo, Z Z, Yun H, et al. Application of flow cytometry to rapid detection of bacteria[J]. *Microbiology China*, 2014, 41(1): 161–168. [刘新星, 霍转转, 云慧, 等. 流式细胞术在细菌快速检测中的应用[J]. *微生物学通报*, 2014, 41(1): 161–168.]
- [16] Wang S, Zhang M Y, Tong N S, et al. Application of flow cytometry in clinical examination[J]. *Laboratory Medicine and Clinic*, 2017, 3(14): 897–902. [王师, 张孟源, 童能胜, 等. 流式细胞术在临床检验中的应用[J]. *检验医学与临床*, 2017, 3(14): 897–902.]
- [17] Cheng L, Cao D C, Lu C Y, et al. Segregation patterns of microsatellite markers indicate triploid *Carassius auratus* generate aneuploid sperm[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2014, 21(6): 1089–1097. [程磊, 曹顶臣, 鲁翠云, 等. 微卫星分离模式显示雄性三倍体鲫产生非整倍体精子[J]. *中国水产科学*, 2014, 21(6): 1089–1097.]
- [18] Ji X S, Chen S L, Zhao Y, et al. Review of assessing sperm quality in fish[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2007, 14(6): 1048–1054. [季相山, 陈松林, 赵燕, 等. 鱼类精子质量评价研究进展[J]. *中国水产科学*, 2007, 14(6): 1048–1054.]
- [19] Gao J, Huang X H, Zeng H S, et al. Genome size for six commercially important fishes in China[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2010, 17(4): 689–694. [高静, 黄晓红, 曾华嵩, 等. 中国 6 种经济鱼类的基因组大小测定[J]. *中国水产科学*, 2010, 17(4): 689–694.]
- [20] Xian J A, Wang A L, Miao Y T, et al. Toxic effects of cadmium on haemocytes of *Litopenaeus vannamei* *in vitro*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2012, 33(1): 112–115. [沈健安, 王安利, 苗玉涛, 等. 镉对凡纳滨对虾离体血细胞的毒性影响[J]. *水生态学杂志*, 2012, 33(1): 112–115.]
- [21] Gagnaire B, Thomas-Guyon H, Renault T. *In vitro* effects of cadmium and mercury on Pacific oyster, *Crassostrea gigas* (Thunberg), haemocytes[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2004, 16(4): 501–512.
- [22] Brousseau P, Pellerin J, Morin Y, et al. Flow cytometry as a tool to monitor the disturbance of phagocytosis in the clam *Mya arenaria* hemocytes following *in vitro* exposure to heavy metals[J]. *Toxicology*, 2000, 142(2): 145–156.
- [23] Jiang W W, Fang J G, Li J Q, et al. Effects of temperature change on physiological and biochemical activities of *Haliotis discus hannai* Ino[J]. *Journal of Fishery Sciences of China*, 2017, 24(2): 220–230. [姜娓娓, 方建光, 李加琦, 等. 温度胁迫对皱纹盘鲍生理和生化活动的影响[J]. *中国水产科学*, 2017, 24(2): 220–230.]
- [24] Premruethai Supungul S K R P. Immune-related genes in hemocytes of the black tiger shrimp, *Penaeus monodon*, infected with *Vibrio harveyi*[J]. *Fish Sci*, 2002(68): 1083–1086.

- [25] Silva-Aciaras F, Moraga D, Riquelme C. Effect of copper on the immunomodulatory activities of haemocytes in juveniles of the abalone *Haliotis rufescens* cultivated under hatchery conditions[J]. *Aquaculture*, 2013, 410–411(2): 72–78.
- [26] Guo H, Xian J A, Wang A L. Effects of nitrite stress on haemocyte toxicity and p53 gene expression of *Litopenaeus vannamei*[J]. *Journal of Hydroecology*, 2015, 36(2): 61–67. [郭慧, 冼健安, 王安利. 亚硝酸盐对凡纳滨对虾血细胞毒性及 p53 基因表达的影响[J]. *水生态学杂志*, 2015, 36(2): 61–67.]
- [27] Storelli M M. Potential human health risks from metals (Hg, Cd, and Pb) and polychlorinated biphenyls (PCBs) via sea-food consumption: estimation of target hazard quotients (THQs) and toxic equivalents (TEQs)[J]. *Food Chem Toxicol*, 2008, 46(8): 2782–2788.
- [28] Atli G, Canli M. Metals (Ag^+ , Cd^{2+} , Cr^{6+}) affect ATPase activity in the gill, kidney, and muscle of freshwater fish *Oreochromis niloticus* following acute and chronic exposures[J]. *Environ Toxicol*, 2013, 28(12): 707–717.
- [29] Knazicka Z, Lukac N, Forgacs Z, et al. Effects of mercury on the steroidogenesis of human adrenocarcinoma (NCI-H295R) cell line[J]. *J Environ Sci Heal A*, 2012, 48(3): 348–353.
- [30] Jose S, Jayesh P, Mohandas A, et al. Application of primary haemocyte culture of *Penaeus monodon* in the assessment of cytotoxicity and genotoxicity of heavy metals and pesticides[J]. *Mar Environ Res*, 2011, 71(3): 169–177.
- [31] Xian J A, Wang A L, Miao Y T, et al. Flow cytometric analysis of *in vitro* cytotoxicity of cadmium in haemocytes from the tiger shrimp, *Penaeus monodon*[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2013, 90(1): 46–50.
- [32] Wang W N, Liang H, Wang A L, et al. Effect of pH and Zn^{2+} on subcultured muscle cells from *Macrobrachium nipponense*[J]. *Method Cell Sci*, 2000, 22(4): 277–284.
- [33] Abad-Rosales S M, Frías-Espéricueta M G, Inzunza-Rojas A, et al. Histological effects of Cu^{2+} to white shrimp *Litopenaeus vannamei* (Crustacea: Decapoda) juveniles at low salinities[J]. *Rev Biol Mar Oceanog*, 2010, 45(1): 99–105.
- [34] Lorenzon S, Francese M, Ferrero E A. Heavy metal toxicity and differential effects on the hyperglycemic stress response in the shrimp *Palaemon elegans*[J]. *Arch Environ Con Tox*, 2000, 39(2): 167–176.
- [35] Chang M, Wang W N, Wang A L, et al. Effects of cadmium on respiratory burst, intracellular Ca^{2+} and DNA damage in the white shrimp *Litopenaeus vannamei*[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2009, 149(4): 581–586.
- [36] Wang J, Wang Q, Li J, et al. Cadmium induces hydrogen peroxide production and initiates hydrogen peroxide-dependent apoptosis in the gill of freshwater crab, *Sinopotamon henanense*[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2012, 156 (3–4): 195–201.
- [37] Xian J A, Zhang X X, Guo H, et al. Cellular response of the tiger shrimp *Penaeus monodon* haemocytes after lipopolysaccharide injection[J]. *Fish Shellfish Immun*, 2016, 54: 385–390.
- [38] Rashid M A, Begum R A, Shahzahan R M. Tissue distribution of esterase isozymes and their responses to cypermethrin in three macrobrachium species[J]. *J Asiat Soc Bangladesh Sci*, 2012, 38(2): 227–235.
- [39] Mazón L I, Gonzalez G, Vicario A, et al. Inhibition of esterases in the marine gastropod *Littorina littorea* exposed to cadmium[J]. *Ecotoxicol Environ Safety*, 1998, 41(3): 284–287.

Effects of heavy metals on cell viability and esterase activity of hemocytes from the freshwater prawn, *Macrobrachium rosenbergii*

GUO Hui¹, ZHANG Xiuxia², ZHENG Peihua², LU Yaopeng², XIAN Jian'an²

1. Key Laboratory of Marine Ecology and Aquaculture Environment of Zhanjiang; College of Fisheries, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025, China;
2. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China

Abstract: To explore the toxic effects of several heavy metals on hemocytes from *Macrobrachium rosenbergii*, we evaluated the cell viability (CV) and esterase activity (EA) of the *M. rosenbergii* hemocytes after *in vitro* exposure to 10^{-9} – 10^{-3} mol/L heavy metals (Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} , compared with a control group without exposure to heavy metals) for 6 h by flow cytometry. The results showed no significant effects of 10^{-9} – 10^{-6} mol/L Cd^{2+} on CV and EA. 10^{-5} mol/L Cd^{2+} significantly inhibited EA. Both CV and EA significantly decreased after exposure to 10^{-4} mol/L and 10^{-3} mol/L Cd^{2+} . There were no significant effects of 10^{-9} – 10^{-6} mol/L Hg^{2+} on CV and EA, whereas 10^{-4} mol/L and 10^{-3} mol/L Hg^{2+} significantly decreased CV and EA. Concentrations of 10^{-9} – 10^{-5} mol/L Cu^{2+} had no significant effects on CV and EA; however, 10^{-4} – 10^{-3} mol/L Cu^{2+} significantly decreased CV and EA. Although 10^{-9} – 10^{-5} mol/L Zn^{2+} had no significant effects on CV and EA, 10^{-4} mol/L Zn^{2+} significantly decreased EA, whereas 10^{-3} mol/L Zn^{2+} significantly decreased CV and EA. The toxic critical concentrations of Cd^{2+} , Hg^{2+} , Cu^{2+} , and Zn^{2+} were 10^{-4} mol/L, 10^{-5} mol/L, 10^{-4} mol/L, and 10^{-3} mol/L, respectively. The toxicity of these four heavy metals on *M. rosenbergii* hemocytes ranked in the following order: $\text{Hg}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cu}^{2+} > \text{Zn}^{2+}$. The toxicity of heavy metals on *M. rosenbergii* hemocytes was dose-dependent. EA is more sensitive to heavy metal stress, and could be used as an indicator for toxicology studies.

Key words: heavy metal; *Macrobrachium rosenbergii*; hemocyte; cell viability; esterase

Corresponding author: XIAN Jian'an. E-mail: xian-ja@163.com.