

# 污染水域鲫鱼外周血细胞形态和数量的变化

任培丽 张迎梅\* 耿广琴 漆永梅

(兰州大学生命科学学院 兰州 730000)

**摘要:** 为探讨污染环境对鱼类外周血细胞形态及数量的影响, 本研究选择相对无污染的刘家峡水库和污染较严重的黄河白银段为研究地点, 以鲫鱼 (*Carassius auratus*) 为研究对象, 常规方法制血涂片, Giemsa 染色, 统计红细胞微核率、核异常率和各类血细胞数量, 并用带有数码采集头 (Motic B5 Professional Series) 的显微镜拍照各类细胞。结果表明, 与刘家峡水库相比, 黄河白银段鲫鱼红细胞数量显著减少 ( $P < 0.05$ ), 核异常率 ( $P < 0.05$ ) 和微核率 ( $P < 0.01$ ) 显著增加; 白细胞总数和淋巴细胞数量显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而嗜中性粒细胞 ( $P < 0.01$ ) 和血栓细胞 ( $P < 0.05$ ) 数量显著减少, 单核细胞数量虽有减少趋势但两地差异不显著 ( $P > 0.05$ )。表明黄河白银段污染对鲫鱼外周血细胞数量及红细胞微核率和核异常率具有显著的影响。

**关键词:** 鲫鱼; 外周血细胞; 红细胞微核; 核异常; 水污染

**中图分类号:** Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263(2008)0223-06

## Changes in Morphology and Quantity of Peripheral Blood Cells in *Carassius auratus* Collected from Polluted Water Area

REN PeiLi ZHANG YingMei\* GENG GuangQin QI YongMei

(School of Life Sciences, Lanzhou University, Lanzhou 730000, China)

**Abstract:** To study the influence of contaminated environment on the morphology and quantity of peripheral blood cells in *Carassius auratus*, the fishes were sampled from two different areas: Reservoir Liujiaxia (RL), a relatively unpolluted area, as a control site; Baiyin Section of the Yellow River (BSYR), a heavier polluted area compared to RL. Blood smears were prepared by normal method and stained with Giemsa. The erythrocyte micronuclei and nuclear abnormalities and the blood cells were counted and the cells were photographed by the microscope with Motic B5 Professional Series. The results showed that the number of erythrocytes was significantly lower ( $P < 0.05$ ) while the numbers of erythrocyte micronuclei ( $P < 0.01$ ) and nuclear abnormalities ( $P < 0.05$ ) were significantly higher in BSYR than that in RL; Total numbers of leucocytes ( $P < 0.05$ ) and lymphocytes ( $P < 0.05$ ) increased significantly, while the total numbers of thrombocytes ( $P < 0.05$ ) and neutrophils ( $P < 0.01$ ) decreased obviously in BSYR compared to those in RL; Monocytes had a tendency to decrease in BSYR but the difference did not reach a significant level ( $P > 0.05$ ) between the two sampling sites. The results suggest that the environmental contamination in BSYR has been causing obvious alterations in the numbers of peripheral blood cells, the frequencies of erythrocyte micronuclei, and nuclear abnormalities in *C. auratus*.

**Key words:** *Carassius auratus*; Peripheral blood cell; Erythrocyte micronuclei; Nuclear abnormality; Aquatic pollution

**基金项目** 国家自然科学基金项目 (No. 30470320);

\* 通讯作者, E-mail: ymzhang@lzu.edu.cn;

**第一作者介绍** 任培丽, 女, 硕士; 研究方向: 环境毒理学; E-mail: renpl04@lzu.cn.

收稿日期: 20070226, 修回日期: 20080123

外源化合物进入高等动物体后,通过血液参与机体循环输送到靶器官,可与血液中的细胞、功能蛋白等发生作用。因此,血液指标被广泛地用来评价鱼类的健康状况、营养状况及对环境的适应能力,是良好的生理、病理和毒理学指标<sup>[1,2]</sup>。鱼类外周血细胞变化(如数量、形态、遗传特性等)是机体在环境胁迫下敏感的特征性指标。前人的研究<sup>[3~5]</sup>大多集中在室内单一毒物(如铜离子、林丹等)对鱼类血液的影响,然而污染物多以低浓度混合形式暴露于水体之中,对生物机体及环境带来潜在的健康和生态危害,而以污染环境条件下野生种群为研究对象的报道甚少<sup>[6]</sup>。

本研究选择相对无污染的刘家峡水库和污染较严重的黄河白银段为研究样地,选择广泛分布的鲫鱼(*Carassius auratus*)为研究对象,比较两地鲫鱼外周血细胞数量、红细胞微核和核异常等指标的变化,旨在探索低浓度污染条件下鱼类外周血细胞形态及数量的变化规律和趋势,为鱼类血液学和遗传毒理学研究以及水污染的生物监测提供参考依据。

## 1 材料与与方法

**111 研究样地概况** 选择位于黄河兰州段上游偏西南约 75 km、相对无污染的刘家峡水库(Reservoir Liujiaxia, RL) (35b45cN, 103b3cE)为本研究的对照样地(图 1),其周围多为黄河沿岸滩涂草地,无工矿企业,基本无有机物、重金属类污染,水流平缓,水质透明度大于 100,水质为 0 类。选择位于黄河兰州段下游东北约 78 km、污染较严重的黄河白银段(Bainyin Section of the Yellow River, BSYR) (36b33cN, 104b11cE) (水川镇位于白银市城区南 20 km,黄河北岸)为研究样地(图 1),近年来,由于工农业的发展,来自上游兰州市和白银市的大量工农业废水、废渣和生活污水得不到有效控制及处理而直接排入黄河,致使该段黄河水质污染加重,主要污染物为总大肠杆菌、化学需氧量(chemical oxygen demand, COD)和总磷(total phosphonium, TP),水质属于中度污染的 0 或 0 类(参自/中国环境监

测水质月报 0 以及/黄河流域省界水体及重点河段水质质量状况通报 0 定期公布的两地黄河现状水质以及规划的水质类别)。

**112 动物材料** 2 龄以下鲫鱼,于 2006 年 6 月分别采自刘家峡水库(RL)和位于水川镇的黄河白银段(BSYR)。其中,刘家峡水库 10 尾,平均体长(1512 ? 113) cm,平均体重(12413 ? 2914) g;黄河白银段 10 尾,平均体长(1413 ? 112) cm,平均体重(11011 ? 2418) g。

**113 实验方法** 实验用鱼麻醉后断尾取血,将血液滴于 318% 柠檬酸钠浸润的洁净小培养皿中,待用。

### 11311 细胞计数

**红细胞计数:**用红细胞稀释液(NaCl 015 g, Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 215 g, HgCl 0125 g, 加蒸馏水至 100 ml)将血液稀释 400 倍,待白细胞完全溶解后,吸取红细胞悬液,用 Neubauer 计数板在显微镜下计数(每尾鱼做 5 个平行)。

**白细胞计数:**用白细胞稀释液(冰醋酸 115 ml, 1% 龙胆紫 1 ml, 加蒸馏水至 100 ml)将血液稀释 200 倍,待红细胞完全溶解后,吸取白细胞悬液,用 Neubauer 计数板在显微镜下计数(每尾鱼做 3 个平行)。

**11312 红细胞微核(micronucleus, MN)、核异常(erythrocyte nuclear abnormality, ENA)统计** 用消毒后的注射器吸取少许血液,在用酒精浸泡过的干净载玻片上均匀涂制单细胞层,自然风干后甲醇固定 15 min,用 pH 6.8 的 Giemsa (9B1) 染液染色 15 min,蒸馏水流水冲洗,自然晾干后镜检(每尾鱼做 3 张平行片)。在带有数码采集头的显微镜(Motic B5 Professional Series, 麦克奥迪实业集团有限公司生产)下,每张涂片随机拍摄 15 个视野,统计每个视野内的红细胞总数、含微核的红细胞数及核异常情况。

**11313 白细胞分类计数(differential leucocytes counts, DLC)<sup>[7]</sup>** 如 11312 中的方法每尾鱼制 3 张平行涂片,每张涂片油镜下随机观察 200 个白细胞,记录淋巴细胞(lymphocyte)、单核细胞(monocyte)、嗜中性粒细胞(neutrophil)和血栓细胞(thrombocyte)数量。

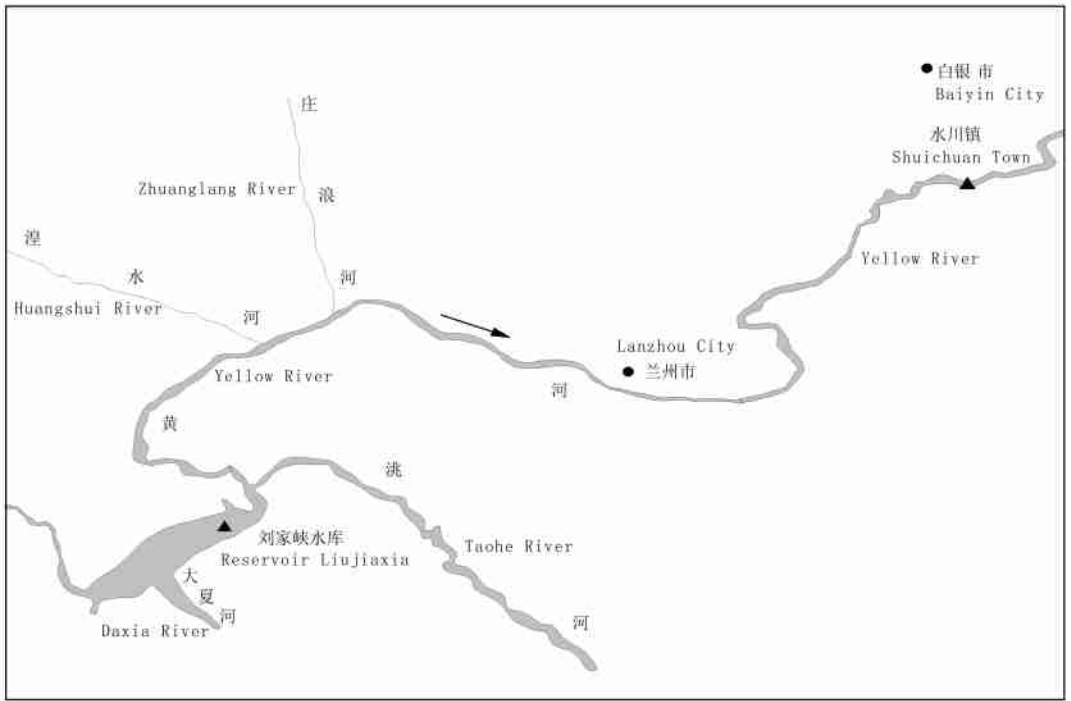


图 1 采样地示意图

Fig. 1 Map for sampling sites

w 示采样点。w Sampling sites.

114 统计学方法 利用 SPSS 1115 分析软件进行 t2 检验, 分析两样地各指标间的差异性。P < 0105, 差异显著; P < 0101, 差异极显著。

## 2 结果

### 211 污染对鲫鱼红细胞形态、数量、微核率及核异常率的影响

21111 形态 正常成熟的红细胞多呈椭圆形, 表面光滑, 核椭圆形或圆形, 多位于细胞中央 (图 2:A)。Giemsa 染色后, 细胞核呈蓝紫色, 细胞质呈较浅的橙黄色。统计中还发现了大量正在进行正常有丝分裂的红细胞和未成熟的幼红细胞, 前者分裂时细胞拉长, 中间出现缢痕, 同时核也向两极伸展, 呈哑铃形 (图 2: B), 后者呈圆形, 较大, 核圆形 (图 2: C)。微核 (图 2: D) 的染色特点与主核一致, 直径约为主核的 1/5~ 1/25, 在细胞质中的位置, 有些紧靠细胞核, 有些位于细胞质边缘, 有些甚至出现双微核现象 (图 2: E)。两样地鲫鱼红细胞的其他核异常情况

如图 2: F~ O 所示。

21112 数量、微核率及核异常率 与对照样地 RL 相比, BSYR 鲫鱼红细胞数量显著减少 (P < 0105) (图 3), 核异常率显著增加 (P < 0105) (图 4), 微核率极显著增加 (P < 0101) (图 4)。

### 212 鲫鱼白细胞分类及数量统计

21211 分类<sup>[7,8]</sup> 淋巴细胞是白细胞中最的一种, 光镜下可以分为小淋巴细胞和大淋巴细胞, 以小淋巴细胞为主。小淋巴细胞为圆形或不规则圆形, 有明显的伪足样突起 (图 5: A); 大淋巴细胞圆形, 表面有很多微绒毛样突起 (图 5: B)。两者核都较大, 占细胞的 2/3 以上, 有时可见胞质薄薄地包裹在核的外面。Giemsa 染色后, 细胞核被染成蓝紫色, 细胞质呈浅蓝色。

单核细胞在外周血中数量极少, 细胞不规则圆形, 边缘不光滑。核肾形或椭圆形, 占整个细胞的 1/3~ 2/3, 偏于细胞一侧与细胞膜相切。核中染色质分布疏松, 胞质丰富, 其中有大小不等的空泡 (图 5: C)。Giemsa 染色后, 细胞核被

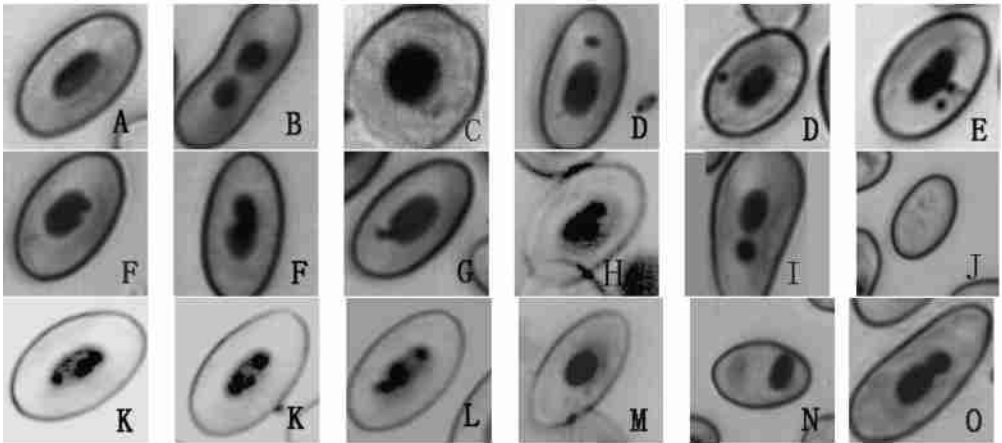


图 2 正常红细胞(A~ C)与核异常红细胞(D~ O) (@200)

Fig. 2 Normal erythrocytes (A- C) and erythrocytes with abnormal nuclei (D- O)

- A. 成熟红细胞; B. 均等缢裂; C. 幼红细胞; D. 微核; E. 双微核; F. 核质内凹; G. 核质外凸; H. 分叶核;  
 I. 小核; J. 无核; K. 核内空泡化; L. 核碎裂; M. 核固缩; N. 核位异常; O. 不均等缢裂。  
 A. Mature nuclei; B. Equally constricted nuclei; C. Immature nuclei; D. Micronuclei; E. Double micronuclei;  
 F. Notched nuclei; G. Blebbed nuclei; H. Lobed nuclei; I. Small nuclei; J. Absence of nuclei; K. Vacuolated nuclei;  
 L. Fragmented nuclei; M. Karyopyknosis; N. Abnormal location of nuclei; O. Unequally constricted nuclei.

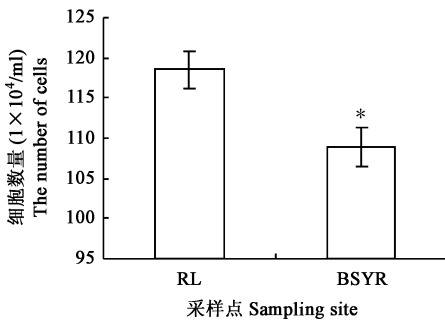


图 3 RL 和 BSYR 两地鲫鱼的红细胞数量

Fig. 3 Erythrocyte numbers of *C. auratus* from RL and BSYR

\* 示差异显著 ( $P < 0.05$ ).  
 \* ( $P < 0.05$ ) is significantly different.

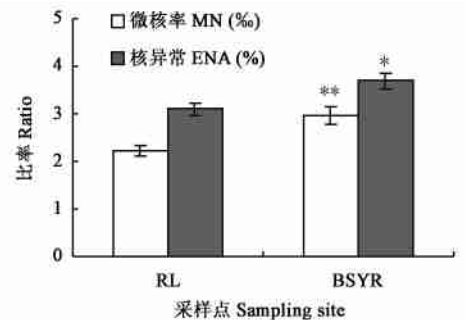


图 4 RL 和 BSYR 两地鲫鱼的微核率、核异常率

Fig. 4 Frequencies of erythrocyte micronuclei and nuclear abnormalities of *C. auratus* from RL and BSYR

\* 示差异显著 ( $P < 0.05$ );  
 \*\* 示差异极显著 ( $P < 0.01$ ) (下同).  
 \* ( $P < 0.05$ ) and \*\* ( $P < 0.01$ ) are significantly different (the same as follow).

染成蓝紫色, 细胞质呈浅蓝色。

嗜中性粒细胞是粒细胞中最的一种, 在外周血涂片中很容易找到。细胞呈圆形、卵圆形或不规则圆形, 边缘平整, 核形状多样, 有梭形(图 5: D)、圆形(图 5: E)、哑铃形(图 5: F)、半月形(图 5: G)等, 还可见分叶核(图 5: H)。核多偏于细胞一侧, 约占细胞的 1/3。Giemsa 染色后, 核被染成蓝紫色, 细胞质几乎不着色。

血栓细胞在血涂片上往往可见几个聚集在一起。细胞多呈纺锤形或圆形(图 5: I), 有些呈蝌蚪状(图 5: J)、长椭圆形(图 5: K)、纺锤形(图 5: L)等。核占细胞的绝大部分。Giemsa 染色后, 核被染成蓝紫色, 细胞质几乎不着色或呈很

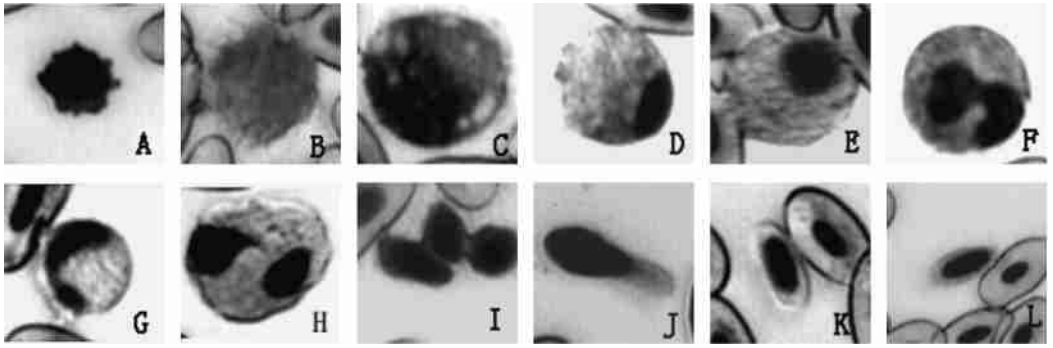


图 5 各种类型白细胞 (@1 050)

Fig. 5 Various types of leucocytes

- A. 小淋巴细胞: 示伪足样突起; B. 大淋巴细胞: 示微绒毛样突起; C. 单核细胞: 示细胞质空泡; D. 嗜中性粒细胞: 示梭形核;
- E. 嗜中性粒细胞: 示圆形核; F. 嗜中性粒细胞: 示哑铃形核; G. 嗜中性粒细胞: 示半月形核; H. 嗜中性粒细胞: 示双叶核; I. 成堆血栓细胞; J. / 蝌蚪状血栓细胞; K. / 长椭圆形血栓细胞; L. / 纺锤形血栓细胞。
- A. Small lymphocyte showing pseudopodia; B. Big lymphocyte showing microvilli-like protuberance; C. Monocyte showing cytoplasmic vacuoles; D. Neutrophil showing / spindle shape nuclei; E. Neutrophil showing round nuclei; F. Neutrophil showing / bell shape nuclei;
- G. Neutrophil showing / halfmoon shape nuclei; H. Neutrophil showing bilobed nuclei; I. Thrombocyte in a heap; J. / Tadpole shape thrombocyte; K. / Long ellipse shape thrombocyte; L. / Spindle shape thrombocyte.

淡的蓝色。

21212 数量 统计过程中将大淋巴细胞和小淋巴细胞合计为淋巴细胞, 因只发现 2 个嗜酸性粒细胞, 未发现嗜碱性粒细胞, 故仅对淋巴细胞、嗜中性粒细胞、血栓细胞和单核细胞 4 种类型的白细胞进行了分类计数。结果显示, 与 RL 相比, BSYR 鲫鱼白细胞总数显著增加 ( $P < 0.05$ ) (图 6), 但是除淋巴细胞显著增加外 ( $P < 0.05$ ), 嗜中性粒细胞 ( $P < 0.01$ ) 和血栓细胞 ( $P < 0.05$ ) 显著减少, 单核细胞虽有减少, 但两地差异不显著 ( $P > 0.05$ ) (图 7)。

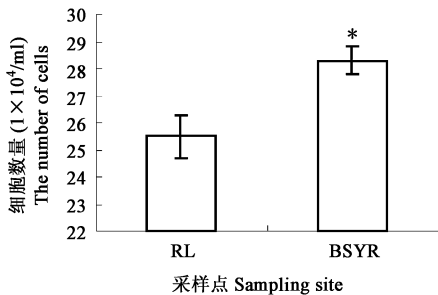


图 6 RL 和 BSYR 两地鲫鱼的白细胞总数  
Fig. 6 Leucocyte numbers of *C. auratus* from RL and BSYR

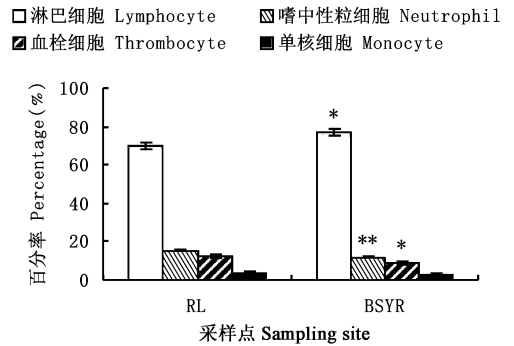


图 7 RL 和 BSYR 两地鲫鱼各类白细胞比例  
Fig. 7 The percentages of various leucocytes of *C. auratus* from RL and BSYR

规则, 所以对红细胞数量、微核率及核异常率都进行了统计; 白细胞形态多样, 核形状亦不规则, 因此仅对白细胞总数和各类白细胞的数量进行了分类计数, 未对其形态变化进行分类统计。

### 3 讨论

3.1 鲫鱼红细胞微核率及核异常率 一般认为微核的形成是由于外源物质的干扰, 染色体断裂, 在细胞分裂过程中无着丝点的染色体断片, 无法进入到子细胞中, 而在细胞核外产生微

鲫鱼外周血红细胞形态及其核形态比较

小的核;也有人认为微核是主核外凸形成的,原因是有些微核与主核有一细丝相连<sup>[9]</sup>。我们在阅片过程中也发现了有些微核与主核有细丝相连,推测可能是 BSYR 水质对细胞核产生了毒性,引起核外凸而形成微核。这与耿德贵等<sup>[10]</sup>的研究结果一致。有学者推测可能是由于主核有能力识别那些与核质不/融洽的异常的 DNA,导致核质外凸以/出芽的形式形成微核而消失<sup>[11,12]</sup>。两样地的核异常现象中(图 2),双微核、分叶核和核破碎仅见于 BSYR 样地,其他核异常为两样地所共有。核异常多样性可能反映了血细胞对环境变化的敏感性,一些核异常可能恰恰是环境作用的/后果<sup>[13]</sup>,因此核异常现象可以作为环境质量的监测指标。与对照 RL 相比,BSYR 微核率、核异常率升高(图 4),表明该河段水质对鱼类机体具有明显的遗传毒性效应。

**3.1.2 鲫鱼各类白细胞数量变化** 各类白细胞数量变化被认为是对环境胁迫最敏感的血液指标,而且与机体抵抗疾病有必然的联系,所以白细胞数量变化既是监测水环境质量的指标,又是评价鱼类健康状况、营养状况及其对环境适应性的重要指标<sup>[14-16]</sup>。研究结果表明,在污染较严重的 BSYR,淋巴细胞明显增多,可能是由于有毒物质刺激鱼类免疫系统引起的;嗜中性粒细胞减少可能是有关免疫器官生理活动增强的结果;血栓细胞有类似于人类血小板的凝血功能,其数量的减少,意味着鲫鱼的凝血功能受到影响。由于白细胞是重要的免疫相关细胞,在特异性和非特异性的、分子的和体液的免疫应答中有重要作用,故 BSYR 污染已对鲫鱼的免疫系统构成了一定程度的威胁。

研究证明,水环境污染对鱼类外周血细胞数量、形态及核异常方面都产生了显著影响。结果对采用鱼类血液作为环境监测指示物,评价水环境质量的生物学效应提供了参考依据。

## 参 考 文 献

[1] 张民,顾宇飞,顾颖等.低浓度五氯酚对鲫鱼血液细胞

毒性的体外研究.环境化学,2005,24(3):302~306

- [2] 周玉.鱼类血液学指标研究的进展.上海水产大学学报,2001,10(2):163~165
- [3] Dick P T, Dixon D G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson, following acute and chronic exposure to copper. *J Fish Biol*, 1985, 26: 475~481
- [4] Mgbenka B O, Oluah N S, Umeke I. Effect of gamma-linolenic acid (Lindane) on differential white blood cell counts of the African Catfish, *Clarias albopunctatus*. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2003, 71: 248~254
- [5] 南旭阳.铜离子对鲫鱼红细胞、白细胞和血红蛋白的影响.江西科学,2002,20(1):38~41
- [6] Llorente M T, Martos A, Casto A. Detection of cytogenetic alterations and blood cell changes in natural population of Carp. *Ecotoxicol*, 2002, 11: 27~34
- [7] 朱洪文,王浩,秦国强.鲫鱼外周血细胞显微和亚显微结构的观察.动物学研究,1985,6(2):147~153
- [8] 周玉,郭文场,杨振国等.欧洲鳊外周血细胞的显微和超微结构.动物学报,2002,48(3):393~401
- [9] 楼允东,吴萍.亚硝基胍对泥鳅红细胞微核及核异常的诱发.中国环境科学,1996,16(4):275~278
- [10] 耿德贵,刘文,韩燕等.除草剂盖草能对黄鳝外周血细胞微核和核异常的影响.徐州师范大学学报(自然科学版),2000,18(2):53~55
- [11] Shimizu N, Shimura T, Tanaka T. Selective elimination of acentric double minutes from cancer cells through the extrusion of micronuclei. *Mutat Res*, 2000, 448: 81~90
- [12] Takashima F, Hibiya T. An Atlas of Fish Histology, Normal and Pathological Features. Tokyo: Kodansha Ltd, 1995
- [13] Mallick P, Khud2Buksh A R. Nuclear anomalies and blood protein variations in fish of the Hooghly2Matlah river system, India, as an indicator of genotoxicity in water. *Environ Contam Toxicol*, 2003, 70: 1071~1082
- [14] Mcleay D J. Effect of a 12h and 28day exposure to Kraft pulp mill effluent on the blood and tissue of juvenile coho salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J Fish Res Bd Can*, 1973, 30: 395~400
- [15] Nussey G, Van Varen J H J, du Preez H H. Effect of copper on the differential white blood cell counts of the Mozambique tilapia (*Oreochromis mossambicus*). *Comp Biochem Physiol*, 1995, 11: 381~388
- [16] Hoole D. The effects of pollutants on the immune response of fish: implications for helminth parasites. *Parasitologia*, 1997, 39: 219~225