

# 铜对草鱼生长及肾脏中免疫相关基因表达的影响

江红霞<sup>1</sup>, 叶凯甲<sup>1</sup>, 凌洁彬<sup>1</sup>, 王李博<sup>2</sup>, 孔祥会<sup>1</sup>, 李学军<sup>1</sup>

(1. 河南师范大学 水产学院, 河南 新乡 453007; 2. 邓州市水产管理站, 河南 邓州 474150)

**摘要:**为了探讨水体重金属铜对草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)的生长和免疫的毒性作用,分别将草鱼在不同质量浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  溶液中暴露 30、60 和 90 d,检测了草鱼的均重和增重率的变化,以及草鱼肾脏中 6 种免疫相关基因表达的变化.结果表明:与对照组相比,各质量浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露均使草鱼在 30、60 和 90 d 后的均体质和增体质量率下降;0.40 和 0.60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$  质量浓度  $\text{Cu}^{2+}$  暴露 60 和 90 d 后, *IL-1 $\beta$* , *CCL4* 和 *TNF- $\alpha$*  基因在草鱼肾脏中的表达量均极显著升高( $P < 0.01$ ),而 *IFN- $\gamma$*  和 *IgM* 基因在草鱼肾脏中的表达量均显著或极显著下降( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); $\text{Cu}^{2+}$  暴露 30、60 和 90 d 后,草鱼肾脏中 MT 基因表达量均随着  $\text{Cu}^{2+}$  质量浓度的增加先升高后下降,在  $\text{Cu}^{2+}$  质量浓度为 0.10  $\text{mg/L}$  时达到最大值.综上,高质量浓度和长时间的  $\text{Cu}^{2+}$  暴露阻碍了草鱼的生长,引起了草鱼肾脏细胞的炎症反应,降低了草鱼的免疫功能.

**关键词:**草鱼;铜;生长;免疫相关基因;基因表达

**中图分类号:**Q786

**文献标志码:**A

在现代工业的迅速发展,由于工业废水的不合理排放,水体重金属污染日益严重,由此所导致的水环境问题也越来越受到人们的普遍关注.铜(Copper, Cu)是水体重金属污染物之一,水体中过量的 Cu 会对水生无脊椎动物、两栖动物和鱼类等水生生物产生较强的毒性<sup>[1]</sup>.在水产养殖中, Cu 是鱼类必需的微量元素之一,也是水产养殖中的常用药物,例如可以用  $\text{CuSO}_4$  防治鱼病,也可用作除藻剂,杀死水中的丝状藻类等浮游植物<sup>[2]</sup>.但铜类杀菌药物的过量使用和工业重金属的排放常常造成养殖水体重金属铜污染,并通过生物富集和生物放大效应对水生态系统产生重要影响,特别是对鱼类有较强的毒性作用,例如会损伤鱼类的神经生理功能,破坏嗅觉器官的结构以及内分泌等<sup>[3-4]</sup>.

草鱼(*Ctenopharyngodon idellus*)是我国的四大家鱼之一,也是我国养殖产量最大的淡水鱼类,我国每年产量均居于世界前列.但由于水体环境的污染和集约化精养模式的发展,草鱼养殖过程中生长受阻,疾病频发,给渔民带来了大量的经济损失,并严重威胁着我国草鱼养殖业的可持续发展.有关养殖水环境重金属污染包括铜污染对草鱼的毒性效应的研究已有不少的报道<sup>[5-9]</sup>,但水环境重金属 Cu 对草鱼生长的影响和对草鱼免疫系统的破坏,以及对其免疫基因表达的影响都尚未见报道.本试验主要研究了水体中不同浓度 Cu 暴露对草鱼生长性能的影响,以及对草鱼肾脏组织中 6 种免疫基因——白细胞介素  $1\beta$  (interleukin  $1\beta$ , *IL-1 $\beta$* )、干扰素- $\gamma$  (interferon  $1$ , *IFN- $\gamma$* )、CC 型趋化因子配体 4 (Chemokine(C-C motif) ligand 4, *CCL4*)、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , *TNF- $\alpha$* )、免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, *IgM*) 和金属硫蛋白 (metallothionein, *MT*) 基因表达的影响,以期为阐明重金属 Cu 对草鱼的生长和免疫的毒性作用,以及水体 Cu 对鱼类的毒性作用机制提供参考.

**收稿日期:**2018-06-20; **修回日期:**2019-05-10.

**基金项目:**河南省科技厅重点科技攻关项目(192102110081);河南省教育厅科学技术重点研究项目(13A240509);河南师范大学个人科研项目结余经费资助专项(20180531);河南师范大学博士科研启动经费项目(qd17142).

**作者简介:**江红霞(1974—),女,河南确山人,河南师范大学副教授,博士,研究方向:水生生物遗传资源, E-mail: jianghongxia2007@126.com.

**通信作者:**孔祥会,教授,博士,主要从事水产动物学研究, E-mail: xhkong@htu.cn;李学军,教授,博士,主要从事水产动物物种质资源与遗传育种研究, E-mail: xjli@htu.cn.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料及饲养管理

试验鱼[体长(8.0±2.0)cm、体质量(10.0±2.0)g]购自新乡市水产市场,在实验室暂养7 d后进行试验。暂养和试验所用容器均为200 L(100 cm×50 cm×40 cm)的塑料水箱,每箱放水100 L,每箱随机分配20尾鱼。暂养和试验期间均使用小型增氧机增氧,溶解氧质量浓度大于9 mg·L<sup>-1</sup>;水温为(26±2)℃;pH值7~8;光暗周期为12 L:12 D。每日投喂市售商品饲料2次,并及时清除残饵及粪便。

### 1.2 重金属处理

将分析纯CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O用去离子水配制成1 g·L<sup>-1</sup>的母液。由于国家渔业水质标准中Cu<sup>2+</sup>的质量浓度≤0.01 mg·L<sup>-1</sup>,按照国家渔业水质标准允许质量浓度的5倍、10倍、20倍、40倍和60倍分别设置了5个处理组,Cu<sup>2+</sup>的浓度分别为0.05 mg·L<sup>-1</sup>、0.10 mg·L<sup>-1</sup>、0.20 mg·L<sup>-1</sup>、0.40 mg·L<sup>-1</sup>和0.60 mg·L<sup>-1</sup>。对照组中不添加CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O,Cu<sup>2+</sup>的质量浓度视为0 mg·L<sup>-1</sup>。对照组和每个处理组均设3个平行,每个平行20尾鱼。试验期间,每2 d换水1次,使Cu<sup>2+</sup>的质量浓度保持稳定。并分别在暴露30 d、60 d和90 d后在每个平行中随机采集5尾鱼,测量其体质量,然后在冰盘上进行解剖,取出其完整的肾脏(包括头肾和中肾),液氮速冻后置于-80℃保存。

### 1.3 生长指标的测量

常规生物学方法测量体质量,计算每30 d的增体质量率,增体质量率=(W<sub>2</sub>-W<sub>1</sub>)/W<sub>1</sub>。式中W<sub>2</sub>为30 d后平均每尾末体质量;W<sub>1</sub>为30 d前初始尾均体质量。

### 1.4 肾脏组织RNA提取

草鱼肾脏组织总RNA的提取按试剂盒Total RNA kit II(Omega公司)的说明书进行。RNA的质量浓度和纯度的测定利用NanoDrop 2000c微量紫外分光光度计(Thermo,美国),RNA完整性的检测采用1.5%琼脂糖凝胶电泳法。

### 1.5 实时荧光定量PCR(QPCR)

各样品的总RNA的反转录反应使用PrimeScript®RT reagent Kit with gDNA Eraser(TaKaRa)试剂盒。将反转成的第一链cDNA置于-20℃冰箱保存。QPCR的特异性引物(表1)采用Primer Premier 5.0软件设计,引物设计所依据的基因模板序列来源于NCBI cDNA数据库。使用SYBR® Premix Ex Taq™ II(TaKaRa,大连)反应体系在CFX96实时荧光PCR检测仪(Bio-Rad,USA)上进行QPCR。25 μL的反应体系为:SYBR®Premix Ex Taq II 12.5 μL,上、下游引物各1.0 μL,cDNA模板2.0 μL,ddH<sub>2</sub>O 8.5 μL;反应程序为:95℃预变性30 s;95℃ 5 s,60℃ 30 s,共40个循环。以β-actin为内参基因,每个样本设置3个重复,利用2<sup>-ΔΔCt</sup>法分析实验样本中6种免疫基因的相对表达量。

### 1.6 数据处理

实验数据以平均值±标准差(Mean±SD)表示,采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计学检验,利用SPSS20.0软件进行数据的统计分析。统计学显著性差异水平设定为P<0.05为显著性差异。

## 2 结果

### 2.1 Cu<sup>2+</sup>暴露对草鱼生长的影响

Cu<sup>2+</sup>暴露对草鱼生长性能的影响见表1。各试验组草鱼在养殖30、60、90 d后的均体质量均低于对照组;Cu<sup>2+</sup>暴露30 d后,各试验组的均体质量与对照组相比均无显著差异(P>0.05);Cu<sup>2+</sup>暴露60 d后的0.40 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>试验组和Cu<sup>2+</sup>暴露90 d后的0.10和0.20 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>试验组草鱼均体质量分别显著低于对照组(P<0.05),而Cu<sup>2+</sup>暴露60 d后的0.60 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>试验组和Cu<sup>2+</sup>暴露90 d后的0.40和0.60 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>试验组草鱼均体质量均极显著低于对照组(P<0.01)。各试验组草鱼0~30 d、30~60 d和60~90 d增体质量率均低于对照组;0.20、0.40和0.60 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>试验组草鱼0~30 d增体质量率以及0.05、0.10、0.20和0.60 mg·L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup>试验组草鱼60~90 d增体质量率均显著低于对照组(P<0.05),而0.60 mg·

$L^{-1} Cu^{2+}$  试验组草鱼 30~60 d 增体质量率以及  $0.40 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组草鱼 60~90 d 增体质量率均极显著低于对照组 ( $P < 0.01$ ).

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

Tab.1 Primer sequences for QPCR

引物名称	引物序列 (5' - 3')	NCBI 登录号	产物长度/bp
IL-1 $\beta$ -F	AAGCAGCGGATCTCCTCGT	JQ692172.1	93
IL-1 $\beta$ -R	AAGAACCCCTTGAACCCA		
IFN- $\gamma$ -F	CCAAAAGCGAGATGACCCA	FJ695520.1	182
IFN- $\gamma$ -R	ATTAGCCGCAAGACCAAACCTAT		
CCL4-F	CTGCTTCTCGCTTCGTCATC	EU918199.2	83
CCL4-R	TGGTCCAATACGCATTCCTTC		
TNF- $\alpha$ -F	ACGCTCAACAAGTCTCAG	EU047718.1	252
TNF- $\alpha$ -R	CTGGCTGTAGACGAAGTAA		
IgM-F	CATCTCCGCCGAAGTCAAT	DQ417927.1	165
IgM-R	ACGCTGGATACTGCACGAAA		
MT-F	TGTTTCGTTTGTACTTCGTCATCG	KC256783.1	144
MT-R	GCATTGTTTTCCCTCTTTAGCCT		
$\beta$ -actin-F	CCTTCTTGGGTAGGAGTCTTG	M25013.1	221
$\beta$ -actin-R	AGAGTATTTACGCTCAGGTGGG		

表 2 不同质量浓度  $Cu^{2+}$  对草鱼生长性能的影响

Tab.2 Effects of different concentrations of  $Cu^{2+}$  on growth performance of grass carp

$Cu^{2+}$ 质量浓度/ ( $mg \cdot L^{-1}$ )	初始均 体质量/g	30 d 均体 质量/g	0~30 d 增 体质量率/%	60 d 均 体质量/g	30~60 d 增 体质量率/%	90 d 均 体质量/g	60~90 d 增 体质量率/%
0.00	10.30 $\pm$ 0.87	13.43 $\pm$ 0.91	30.56 $\pm$ 2.74	15.39 $\pm$ 0.93	16.63 $\pm$ 2.29	18.53 $\pm$ 0.82	20.53 $\pm$ 4.32
0.05	10.38 $\pm$ 0.60	13.03 $\pm$ 0.40	29.57 $\pm$ 4.28	15.16 $\pm$ 0.83	15.87 $\pm$ 6.45	17.64 $\pm$ 0.76	13.41 $\pm$ 1.44*
0.10	10.46 $\pm$ 0.43	12.92 $\pm$ 0.69	23.62 $\pm$ 7.32	14.74 $\pm$ 0.85	14.13 $\pm$ 2.98	16.86 $\pm$ 1.01*	14.40 $\pm$ 1.03*
0.20	10.37 $\pm$ 1.10	12.17 $\pm$ 0.99	17.56 $\pm$ 2.89*	14.49 $\pm$ 0.35	16.44 $\pm$ 4.21	16.52 $\pm$ 0.82*	14.01 $\pm$ 2.98*
0.40	10.60 $\pm$ 1.53	12.26 $\pm$ 0.95	16.46 $\pm$ 9.08*	14.14 $\pm$ 0.69*	15.88 $\pm$ 1.19	15.85 $\pm$ 0.79**	12.13 $\pm$ 3.80**
0.60	10.76 $\pm$ 0.57	12.19 $\pm$ 0.55	13.63 $\pm$ 10.62*	12.75 $\pm$ 0.56**	4.60 $\pm$ 0.15**	14.40 $\pm$ 0.87**	13.21 $\pm$ 2.46*

注:同列数字上“\*”表示与对照组相比差异显著( $P < 0.05$ ),“\*\*”表示与对照组相比差异极显著( $P < 0.01$ ).

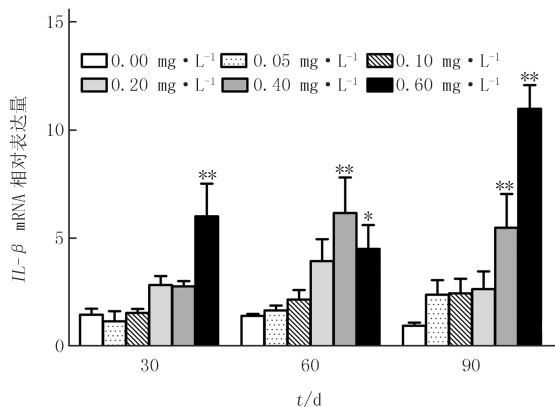
## 2.2 $Cu^{2+}$ 暴露对草鱼肾脏中 $IL-1\beta$ 基因表达的影响

由图 1 可以看出, $Cu^{2+}$  暴露 30 d 后,草鱼肾脏中的  $IL-1\beta$  基因表达量与对照组相比在 0.05、0.10、0.20 和  $0.40 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中无显著变化( $P > 0.05$ ),而在  $0.60 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中极显著上升( $P < 0.01$ ); $Cu^{2+}$  暴露 60 d 后,草鱼肾脏中的  $IL-1\beta$  基因表达量与对照组相比在 0.05、0.10 和  $0.20 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中无显著变化( $P > 0.05$ ),而在 0.40 和  $0.60 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中分别极显著( $P < 0.01$ )和显著( $P < 0.05$ )上升; $Cu^{2+}$  暴露 90 d 后,草鱼肾脏中的  $IL-1\beta$  基因表达量与对照组相比在 0.05、0.10 和  $0.20 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中无显著变化( $P > 0.05$ ),而在 0.40 和  $0.60 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中极显著上升( $P < 0.01$ ).

## 2.3 $Cu^{2+}$ 暴露对草鱼肾脏中 $IFN-\gamma$ 基因表达的影响

由图 2 可以看出, $Cu^{2+}$  暴露 30 d 和 60 d 后,草鱼肾脏中的  $IFN-\gamma$  基因表达量与对照组相比在 0.05 和  $0.10 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中无显著变化( $P > 0.05$ ),而在 0.20、0.40 和  $0.60 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中极显著下降( $P < 0.01$ ); $Cu^{2+}$  暴露 90 d 后,草鱼肾脏中的  $IFN-\gamma$  基因表达量与对照组相比在  $0.05 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中无显著变化( $P > 0.05$ ),而在  $0.10 mg \cdot L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中显著下降( $P < 0.05$ ),在 0.20、0.40 和

0.60 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中极显著下降 ( $P < 0.01$ ).



“\*”表示与对照组相比差异显著 ( $P < 0.05$ ), “\*\*”表示与对照组相比差异极显著 ( $P < 0.01$ ), 下同。

图 1 不同浓度 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *IL-1β* 基因表达的影响  
Fig.1 Effects of different concentrations of Cu<sup>2+</sup> on the expression of *IL-1β* gene in kidney of grass carp

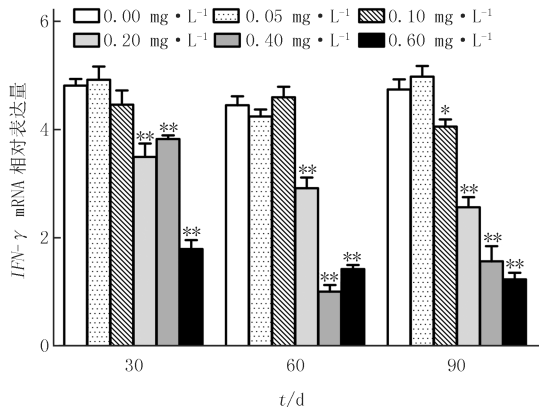


图 2 不同浓度 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *IFN-γ* 基因表达的影响  
Fig.2 Effects of different concentrations of Cu<sup>2+</sup> on the expression of *IFN-γ* gene in kidney of grass carp

### 2.4 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *CCL4* 基因表达的影响

不同质量浓度 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *CCL4* 基因表达的影响见图 3. Cu<sup>2+</sup> 暴露 30 d 后, 各试验组草鱼肾脏中的 *CCL4* 基因表达量与对照组相比均无显著差异 ( $P > 0.05$ ); Cu<sup>2+</sup> 暴露 60 d 和 90 d 后, 草鱼肾脏中 *CCL4* 基因表达量与对照组相比在 0.05、0.10 和 0.20 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中均无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 但在 0.40 和 0.60 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中均极显著上升 ( $P < 0.01$ ).

### 2.5 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *TNF-α* 基因表达的影响

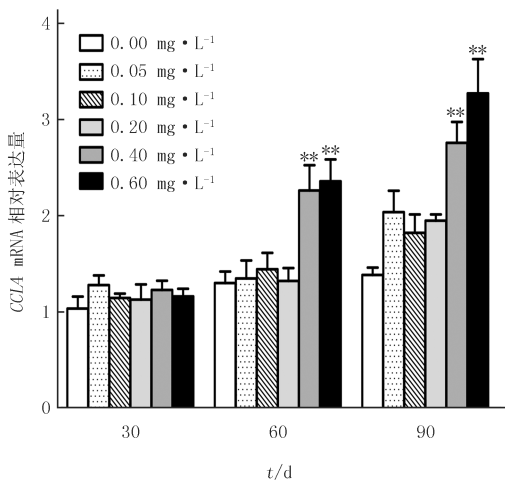


图 3 不同浓度 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *CCL4* 基因表达的影响  
Fig.3 Effects of different concentrations of Cu<sup>2+</sup> on the expression of *CCL4* gene in kidney of grass carp

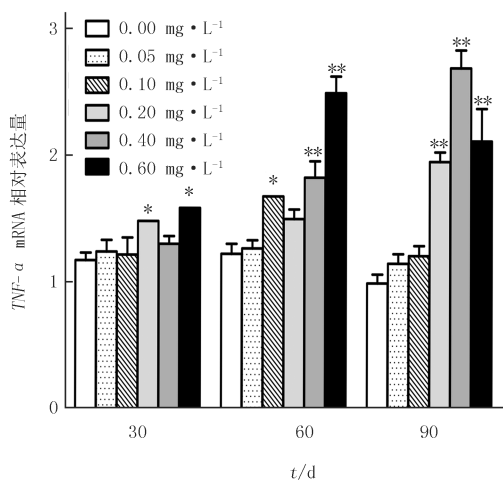


图 4 不同浓度 Cu<sup>2+</sup> 暴露对草鱼肾脏中 *TNF-α* 基因表达的影响  
Fig.4 Effects of different concentrations of Cu<sup>2+</sup> on the expression of *TNF-α* gene in kidney of grass carp

由图 4 可见, Cu<sup>2+</sup> 暴露 30 d 后, 草鱼肾脏中的 *TNF-α* 基因表达量与对照组相比在 0.05、0.10 和 0.40 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 而在 0.20 和 0.60 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中显著上升 ( $P < 0.05$ ); Cu<sup>2+</sup> 暴露 60 d 后, 草鱼肾脏中的 *TNF-α* 基因表达量与对照组相比在 0.05 和 0.20 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 而在 0.10 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中显著上升 ( $P < 0.05$ ), 在 0.40 和 0.60 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中极显著上升 ( $P < 0.01$ ); Cu<sup>2+</sup> 暴露 90 d 后, 草鱼肾脏中的 *TNF-α* 基因表达量与对照组相比在 0.05 和 0.10 mg · L<sup>-1</sup> Cu<sup>2+</sup> 试验组中无显著变化 ( $P > 0.05$ ), 而在 0.20、0.40 和 0.60 mg ·

$L^{-1} Cu^{2+}$  试验组中极显著上升( $P < 0.01$ ).

## 2.6 $Cu^{2+}$ 暴露对草鱼肾脏中 $IgM$ 基因表达的影响

由图5可以看出,  $Cu^{2+}$  暴露30 d后, 各试验组草鱼肾脏中的  $IgM$  基因表达量与对照组相比均无显著差异( $P > 0.05$ );  $Cu^{2+}$  暴露60 d后, 草鱼肾脏中的  $IgM$  基因表达量与对照组相比在0.05、0.10和0.20  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中无显著差异( $P > 0.05$ ), 而在0.40和0.60  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中分别极显著( $P < 0.01$ )和显著( $P < 0.05$ )下降;  $Cu^{2+}$  暴露90 d后, 草鱼肾脏中的  $IgM$  基因表达量与对照组相比在0.05、0.10和0.20  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中无显著差异( $P > 0.05$ ), 而在0.40和0.60  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中显著下降( $P < 0.05$ ).

## 2.7 $Cu^{2+}$ 暴露对草鱼肾脏中 $MT$ 基因表达的影响

不同质量浓度  $Cu^{2+}$  对草鱼肾脏中  $MT$  基因表达的影响见图6.  $Cu^{2+}$  暴露30、60和90 d后, 草鱼肾脏中  $MT$  基因表达量随着  $Cu^{2+}$  浓度的增加均呈现出先升高后下降的趋势, 且均在  $Cu^{2+}$  质量浓度为0.10  $mg \cdot L^{-1}$  时达到最大值.  $Cu^{2+}$  暴露30和60 d后, 草鱼肾脏中  $MT$  基因表达量与对照组相比在0.05、0.20、0.40和0.60  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中均无显著变化( $P > 0.05$ ), 而在0.10  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中均极显著上升( $P < 0.01$ );  $Cu^{2+}$  暴露90 d后, 草鱼肾脏中的  $MT$  基因表达量与对照组相比在0.05、0.20和0.40  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中无显著变化( $P > 0.05$ ), 而在0.10和0.60  $mg \cdot L^{-1}$   $Cu^{2+}$  试验组中分别极显著上升( $P < 0.01$ )和显著下降( $P < 0.05$ ).

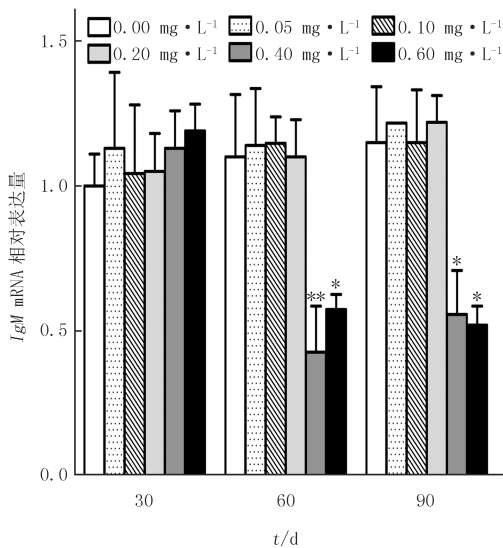


图5 不同质量浓度  $Cu^{2+}$  暴露对草鱼肾脏中  $IgM$  基因表达的影响

Fig.5 Effects of different concentrations of  $Cu^{2+}$  on the expression of  $IgM$  gene in kidney of grass carp

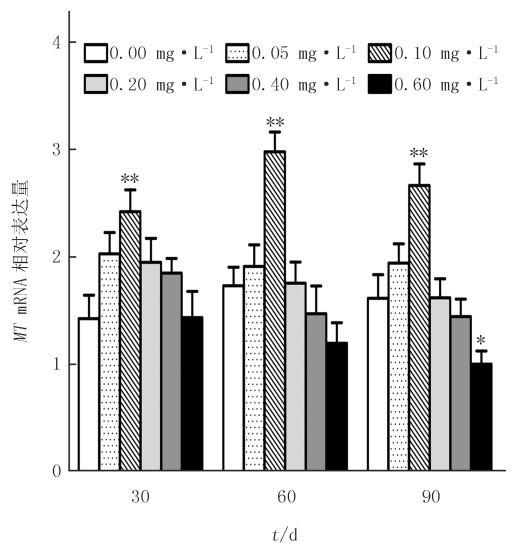


图6 不同质量浓度  $Cu^{2+}$  暴露对草鱼肾脏中  $MT$  基因表达的影响

Fig.6 Effects of different concentrations of  $Cu^{2+}$  on the expression of  $MT$  gene in kidney of grass carp

## 3 讨论

本试验结果表明, 不同质量浓度的  $Cu^{2+}$  暴露使草鱼在养殖30、60、90 d后的均体质量, 0~30 d、30~60 d和60~90 d增体质量率均下降, 这说明  $Cu^{2+}$  暴露降低了草鱼的生长性能.  $Cu^{2+}$  暴露对鱼类生长的影响已有诸多报道, 例如, Hansen等<sup>[10]</sup>将虹鳟鱼(*Oncorhynchus mykiss*)分别暴露在不同质量浓度的  $Cu^{2+}$  溶液中56 d, 发现虹鳟鱼的体质量随着  $Cu^{2+}$  暴露质量浓度的增加而逐渐下降. James等<sup>[11]</sup>将金鱼(*Carassius auratus*)和剑尾鱼(*Xiphophorus helleri*)分别暴露在不同质量浓度的  $Cu^{2+}$  溶液中100 d, 研究结果表明这两种鱼的体长和体质量均随着  $Cu^{2+}$  暴露质量浓度的增加而逐渐下降, 体长和体质量的增长率也在高质量浓度  $Cu^{2+}$  暴露下显著下降. Liu等<sup>[12]</sup>将矛尾复鰕虎鱼(*Synechogobius hasta*)在不同质量浓度的  $Cu^{2+}$  溶液中暴露15 d, 发现矛尾复鰕虎鱼的均体质量、增体质量率和生存率与对照组相比均下降. Jiang等<sup>[13]</sup>的实验也发现淇

河鲫(*Carassius carassius*)暴露在  $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  溶液中 20 d 后,其体长和体质量与对照组相比均显著下降.本试验与上述研究结果一致,说明超过国家渔业水质标准浓度的水体  $\text{Cu}^{2+}$  具有阻碍鱼类生长的毒性作用.

IL-1 $\beta$  是一种由单核细胞、巨噬细胞、朗氏细胞等多种细胞产生的一种重要的促炎细胞因子,可以诱导淋巴细胞、相关组织细胞、血管内皮细胞和炎症反应效用细胞的生长和发育,在炎症过程中起着重要的作用<sup>[14]</sup>.CCL4 是趋化因子(chemokine,CC)家族的一员,具有诱导邻近的应答细胞定向趋化的能力,能在受体介导下吸引单核细胞、T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞在炎症部位聚集、活化以及修复组织损伤<sup>[15-16]</sup>.TNF- $\alpha$  是机体在病原体入侵时,由激活的巨噬细胞、淋巴细胞以及其它免疫细胞产生的促炎细胞因子,在抵抗细菌、病毒和寄生虫感染的过程中起着重要介质的作用<sup>[17]</sup>.这 3 种细胞因子均与生物体的炎症反应有关.在本研究中,这 3 种细胞因子在草鱼肾脏中的基因表达量均在  $0.40$  和  $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  暴露 60 和 90 d 后与对照组相比极显著升高,IL-1 $\beta$  和 TNF- $\alpha$  这两种促炎细胞因子的基因表达量的显著升高说明了长期的高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  暴露对草鱼的肾脏造成了一定的损伤,引起了草鱼肾脏细胞的炎症反应,而趋化因子 CCL4 的基因表达量的显著升高,则可以吸引单核细胞、T 淋巴细胞和嗜酸性粒细胞在炎症部位聚集、活化,从而促进草鱼肾脏组织损伤的修复.水体重金属污染能够造成水生生物的炎症反应已被多项研究所证实,例如,Nørregaard 等<sup>[18]</sup>和 Khan 等<sup>[19]</sup>的研究发现水体重金属污染会造成杜父鱼(*Myoxocephalus* spp.)和无齿蚌(*Anodonta cygnea*)鳃组织的炎症反应;Yin 等<sup>[20]</sup>的研究发现斑马鱼在不同浓度的 Cr,Cd,Pb 和 Cu 溶液中暴露 48、72 和 96 h 后,其鳃中的炎症相关因子 IL-1 $\beta$ 、IL-8 和 TNF- $\alpha$  的基因表达量与对照组相比均显著升高.本研究的长期  $\text{Cu}^{2+}$  暴露对草鱼肾脏炎症相关因子基因表达量的影响的结果与 Yin 等<sup>[20]</sup>的短期  $\text{Cu}^{2+}$  暴露对斑马鱼鳃的研究结果基本一致,进一步证实了水体 Cu 污染对水生生物的不同器官均有一定的致炎毒性.

IFN- $\gamma$  为 II 型干扰素,具有抗病毒作用,可以抑制病毒的复制和细胞的增殖(如肿瘤细胞等),同时具有较强的免疫调节功能<sup>[21]</sup>.IgM 是分子量最大的免疫球蛋白,具有强大的杀菌、激活补体、免疫调理和凝集作用,也是鱼类最先表达的抗体,在体液免疫尤其是抵抗细菌性抗原侵扰方面起着重要作用<sup>[22-23]</sup>.在本研究中,IFN- $\gamma$  和 IgM 在草鱼肾脏中的基因表达量均在  $0.40$  和  $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  暴露 60 和 90 d 后与对照组相比显著或极显著下降,说明长期的高浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  暴露对草鱼的免疫系统造成了一定的损害,使草鱼的抗菌、抗病毒能力和免疫调节能力下降.而 Yin 等<sup>[20]</sup>的研究则表明斑马鱼在不同质量浓度的  $\text{Cu}^{2+}$  溶液中暴露 72 和 96 h 后,其鳃中的 IFN- $\gamma$  基因表达量与对照组相比显著上升.这可能是因为 Yin 等<sup>[20]</sup>的研究中  $\text{Cu}^{2+}$  暴露时间较短,而本研究的  $\text{Cu}^{2+}$  暴露时间较长,鱼类在短期  $\text{Cu}^{2+}$  暴露下的 IFN- $\gamma$  基因表达量的上升有利于提高它们的抗病毒和免疫调节能力,是它们在重金属污染的水体中提高生存能力的需要,但在长期的  $\text{Cu}^{2+}$  暴露下, $\text{Cu}^{2+}$  毒性的积累会损害鱼类的免疫系统,从而使 IFN- $\gamma$  基因表达量下降.另外,Ghazy 等<sup>[24]</sup>在对埃及尼罗罗非鱼(*Oreochromis Niloticus*)肝脏中免疫相关基因表达的变化中发现,水体重金属污染使尼罗罗非鱼肝脏中的 IFN- $\gamma$  和 IgM 基因表达量均下降,这与本研究的结果一致,进一步说明了长期的重金属暴露会造成鱼类的免疫系统的破坏.本研究也提示了如果养殖水体出现长期的重金属污染,养殖的鱼类可能会由于免疫系统的损伤而使抗病能力下降,继而暴发病害,给养殖业造成巨大的经济损失,因此在水产养殖中要谨防水体重金属污染,尤其是不要过量使用铜类杀菌药物.

MT 是一种普遍存在于动植物和微生物体内的富含半胱氨酸的蛋白质,对金属离子有很强的螯合力,从而减轻重金属对生物体的毒害作用,同时它还参与微量元素的代谢,有增强生物体免疫力的作用<sup>[25]</sup>.研究表明,重金属能够诱导生物体内 MT 基因的表达,其表达水平随重金属浓度的增加通常呈现出典型的倒“U”字型<sup>[26]</sup>,例如虹鳟鱼肝脏和肾脏中的 MT 基因表达量随着镉暴露浓度的增加先升高后下降<sup>[27-28]</sup>,中华绒螯蟹(*Eriocheir sinensis*)体内的 MT 基因表达量随着铜暴露浓度的增加也先升高后下降,呈现出倒“U”字型<sup>[29]</sup>.在本研究中,草鱼肾脏中的 MT 基因表达量也随着  $\text{Cu}^{2+}$  浓度的增加先升高后下降,甚至在  $0.60 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Cu}^{2+}$  暴露 90 d 后,MT 基因表达量与对照组相比显著下降.这些结果与前人的研究结果一致,也就是说,低浓度的重金属会诱导草鱼 MT 基因的表达,从而在一定范围内增强了机体的解毒功能和免疫适应能力,但随着重金属浓度的增加,当重金属水平超出了 MT 的结合能力时,过量的重金属就会对鱼体产生毒害作用,导致 MT 基因表达水平的降低<sup>[26]</sup>.

综上所述,高质量浓度和长时间的  $\text{Cu}^{2+}$  暴露降低了草鱼的增重率,阻碍了草鱼的生长;引起了草鱼肾脏细胞的炎症反应,使草鱼肾脏细胞中的炎症因子  $\text{IL-1}\beta$ ,  $\text{TNF-}\alpha$  和趋化因子  $\text{CCL4}$  的基因表达量上升;同时草鱼肾脏细胞中的  $\text{IFN-}\gamma$ ,  $\text{IgM}$  和  $\text{MT}$  基因表达量下降,使草鱼的抗菌、抗病毒能力、解毒功能以及免疫适应能力均下降.总之,水环境中过量的  $\text{Cu}^{2+}$  对草鱼有生长和免疫毒性,但其毒性机制还需要进一步的深入研究.

### 参 考 文 献

- [1] Chen Jiannchu, Lin Chiahsin. Toxicity of copper sulfate for survival, growth, molting and feeding of juveniles of the tiger shrimp, *Penaeus monodon* [J]. Aquaculture, 2001, 192: 55-65.
- [2] Eyckmans M, Celis N, Horemans N, et al. Exposure to waterborne copper reveals differences in oxidative stress response in three freshwater fish species [J]. Aquatic Toxicology, 2011, 103: 112-120.
- [3] 刘福军, 张饮江, 王明学. 铜对鱼类慢性毒性研究进展 [J]. 水生生物学报, 2003, 27(3): 302-307.
- [4] 王利, 汪开毓. 铜在鲤鱼体内的蓄积及毒性的研究 [J]. 淡水渔业, 2008, 38(4): 45-48.
- [5] 任洪涛, 张春暖, 林霖.  $\text{Mo}^{6+}$  对草鱼组织器官及抗氧化酶活性的影响 [J]. 水产科学, 2017, 36(3): 317-322.
- [6] Zhu Qinglin, Luo Zhi, Zhuo Meiqin, et al. In vitro exposure to copper influences lipid metabolism in hepatocytes from grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) [J]. Fish Physiology and Biochemistry, 2014, 40(2): 595-695.
- [7] Wang Wanbin, Chen Sha, Wu Min, et al. Predicting copper toxicity to *Hypophthalmichthys molitrix* and *Ctenopharyngodon idellus* based on biotic ligand model [J]. Environmental Sciences, 2014, 35(10): 3947-3951.
- [8] 朱玉娇, 刘永, 胡成钰.  $\text{Pb}^{2+}$  胁迫对草鱼过氧化氢酶和髓过氧化物酶的影响 [J]. 南昌大学学报(理科版), 2012, 36(2): 176-179.
- [9] 华涛, 周启星. Cd-Zn 对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*) 的联合毒性及对肝脏超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的影响 [J]. 环境科学学报, 2009, 29(3): 600-606.
- [10] Hansen JA, Lipton J, Welsh PG, et al. Relationship between exposure duration, tissue residues, growth, and mortality in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) juveniles sub-chronically exposed to copper [J]. Aquatic Toxicology, 2002, 58: 175-188.
- [11] James R, Sampath K, Jothilakshmi S, et al. Effects of copper toxicity on growth, reproduction and metal accumulation in chosen ornamental fishes [J]. Ecohydrology and Hydrobiology, 2008, 8(1): 89-97.
- [12] Liu XJ, Luo Z, Xiong BX, et al. Effect of waterborne copper exposure on growth, hepatic enzymatic activities and histology in *Synechogobius hasta* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2010, 73: 1286-1291.
- [13] Jiang Hongxia, Kong Xianghui, Wang Shuping, et al. Effect of copper on growth, digestive and antioxidant enzyme activities of juvenile Qihe crucian carp, *Carassius carassius*, during exposure and recovery [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2016, 96: 333-340.
- [14] Bird Steve, Zou Jun, Wang Tiehui, et al. Evolution of interleukin- $1\beta$  [J]. Cytokine Growth Factor Reviews, 2002, 13: 483-502.
- [15] Glass W G, Rosenberg H F, Murphy P M. Chemokine regulation of inflammation during acute viral infection [J]. Current Opinion in Allergy and Clinical Immunology, 2003, 3(6): 467-473.
- [16] Ebert L M, Scharli P, Moser B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues [J]. Molecular Immunology, 2005, 42(7): 799-809.
- [17] Horiuchi T, Mitoma H, Harashima S, et al. Transmembrane  $\text{TNF-}\alpha$ : structure, function and interaction with anti-TNF agents [J]. Rheumatology, 2010, 49(7): 1215-1228.
- [18] N rregaard R D, Dang M, Bach L, et al. Comparison of heavy metals, parasites and histopathology in sculpins (*Myoxocephalus* spp.) from two sites at a lead-zinc mine in North East Greenland [J]. Environmental Research, 2018, 165: 306-316.
- [19] Khan M I, Khisroon M, Khan A, et al. Bioaccumulation of heavy metals in water, sediments, and tissues and their histopathological effects on *Anodonta cygnea* (Linea, 1876) in Kabul River, Khyber Pakhtunkhwa, Pakistan [J]. BioMed Research International, 2018, 6: 1-10.
- [20] Yin Jian, Wang Aiping, Li Wanfang, et al. Time-response characteristic and potential biomarker identification of heavy metal induced toxicity in zebrafish [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2018, 72: 309-317.
- [21] 毛明光, 刘石柱, 张培军. 鱼类干扰素功能及信号转导研究 [J]. 海洋科学, 2008, 32(2): 85-90.
- [22] Reddy P S, Corley R B. The contribution of ER quality control to the biologic functions of secretory IgM [J]. Immunology Today, 1999, 20: 582-588.
- [23] Klimovich V B, Samoilovich M P, Klimovich B V. Problem of J-chain of immunoglobulins [J]. Journal of Evolutionary Biochemistry and Physiology, 2008, 44(2): 151-166.
- [24] Ghazy H A, Abdel-Razek M A S, Nahas A F E, et al. Assessment of complex water pollution with heavy metals and pyrethroid pesticides on transcript levels of *metallothionine* and immune related genes [J]. Fish and Shellfish Immunology, 2017, 68: 318-326.
- [25] Brouwer M, Brouwer T H. Biochemical defense mechanisms against copper-induced oxidative damage in the blue crab, *Callinectes sapidus* [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1998, 351(2): 257-264.

- [26] Hogstrand C, Haux C. Binding and detoxification of heavy metals in lower vertebrates with reference to metallothionein[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Comparative Pharmacology*, 1991, 100(1/2): 137-141.
- [27] Bonham K, Gedamu L. Induction of metallothionein and metallothionein mRNA in rainbow-trout liver following cadmium treatment[J]. *Bioscience Reports*, 1984, 4(8): 633-642.
- [28] Olsson P E, Larsson A, Maage A, et al. Induction of metallothionein synthesis in rainbow trout, *Salmo gairdneri*, during long-term exposure to waterborne cadmium[J]. *Fish Physiological and Biochemistry*, 1989, 6(4): 221-229.
- [29] Ren Fei, Jiang Hui, Sun Jiangling, et al. Cloning, characterization, expression, and copper sensitivity of the metallothionein-1 gene in the Chinese mitten crab, *Eriocheir sinensis*[J]. *Molecular biology reports*, 2011, 38(4): 2383-2393.

## Effects of copper on growth and expression of immune-related genes in kidney of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*)

Jiang Hongxia<sup>1</sup>, Ye Kaijia<sup>1</sup>, Ling Jiebin<sup>1</sup>, Wang Libo<sup>2</sup>, Kong Xianghui<sup>1</sup>, Li Xuejun<sup>1</sup>

(1. College of Fisheries, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Dengzhou Fisheries Management Station, Dengzhou 474150, China)

**Abstract:** To investigate the toxic effect of waterborne copper on the growth and immunity of grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*), grass carps were exposed in different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  solutions for 30, 60 and 90 days, then the weight and weight gain rate, the expression changes of six immunity-related genes in kidney of grass carps were measured. The results showed that: Compared with the control group, the average weights and weight gain rates all decreased under different concentrations of  $\text{Cu}^{2+}$  exposures for 30, 60, and 90 days; After exposure to 0.40 and 0.60  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{Cu}^{2+}$  for 60 and 90 days, the expression levels of *IL-1 $\beta$* , *CCL4*, and *TNF- $\alpha$*  genes in kidney of grass carp were extremely significantly increased ( $P < 0.01$ ), however, the expression levels of *IFN- $\gamma$*  and *IgM* genes were significantly or extremely significantly decreased ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ); After 30, 60 and 90 days of  $\text{Cu}^{2+}$  exposures, the *MT* gene expression in kidney of grass carp increased at first and then decreased with the increasing of  $\text{Cu}^{2+}$  concentration, and reached the maximum value at the  $\text{Cu}^{2+}$  concentration of 0.10  $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ . In conclusion, high concentration and long time  $\text{Cu}^{2+}$  exposure hindered the growth of grass carp, caused inflammatory reaction of kidney cells, and weakened the immune function of grass carp.

**Keywords:** *Ctenopharyngodon idellus*; copper; growth; immune-related gene; gene expression

[责任编辑 王凤产 杨浦]