DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2010.04.001
河南农业科学

煤矿塌陷区水污染对鱼类肝细胞 DNA 的损伤

闫永峰[1*]，王兵丽[1,2]
（1.商丘师范学院 生命科学系，河南 商丘 476000；2.厦门大学 生命科学学院，福建 厦门 361004）

摘要：采用单细胞凝胶电泳(SCGE)技术，初步研究了永城煤矿塌陷区水污染对鱼类肝细胞 DNA 的损伤。结果表明：塌陷区鱼类肝细胞 DNA 损伤程度极显著高于对照组（$P<0.01$），说明当地采煤塌陷区的水污染较严重，对鱼类肝细胞造成了损伤。

关键词：单细胞凝胶电泳；采煤塌陷区；鱼类；肝细胞；DNA 损伤
中图分类号：S949　Q958　　文献标识码：A　　文章编号：1004－3268(2010)04－0109－03

Study on DNA Damage of Fish's Liver Cells Induced by Polluted Water of Coalmine Subsidence Area

YAN Yong-feng[1*], WANG Bing-li[1,2]
(1. Department of Life Science, Shangqiu Normal University, Shangqiu 476000, China;
2. Department of Life Science, Xiamen University, Xiamen 361004, China)

Abstract: In order to analyze the fish DNA damage cause by water pollution in the subsidence area, the DNA damage percentage of fish's liver cells were investigate by single cell gel electrophoresis (SCGE). The results showed that the fishes DNA damage degree of subsidence area are obviously excessive than that of unpolluted area ($P<0.01$). This indicates that the warter of Yongcheng subsidence area is seriously polluted.

Key words: SCGE; Coalmine subsidence area; Fish; DNA damage; Liver cells

煤矿采空塌陷是人为引发的地质环境问题，给矿区群众的生活和公共财产造成了巨大损失。采煤塌陷后形成的自然鱼塘和经简单治理形成的鱼塘，因为煤矸石长期堆放、淋溶和外界污染引入等造成了水体不同程度的污染[1]。其中煤矸石和煤矿排出水中的重金属具有潜在的遗传毒性，能导致生物体的 DNA 损伤[2]。但在塌陷区用煤矸石铺池塘养鱼的情况非常普遍，煤矸石经过浸溶后，重金属经水体进入鱼体，通过在鱼体内的积聚效应，对鱼类产生毒性。相关研究表明，当人类食用了含有大量有毒重金属的水生生物时，重金属就有可能对人体产生影响[3]。因此，重金属作为一类主要的污染物对鱼类的毒害作用，日益受到人们的关注。鱼类也是仅次于昆虫和甲壳类动物的一类灵敏监测生物，而且分布广泛，取材容易，是理想的毒性实验材料[3]。

目前，国内外一些对于污染毒理的研究主要是通过在实验室对鱼类进行染毒处理，研究其急性毒性或单一金属的毒性[4-6]，这难以确切反映自然环境下的水质污染对水生生物的总体效应。对自然环境下的鱼直接进行采样分析，能够更好地反映自然界污染对鱼类 DNA 造成的影响，但目前以污染环境条件下野生种群为研究对象的报道甚少[7]。近年来，单细胞凝胶电泳技术在国际上广泛用于环境毒理学、人类遗传学、DNA 损伤与修复、肿瘤治疗评价、细胞凋亡等方面[8,9]，但用此方法对塌陷区水污染鱼类肝细胞 DNA 损伤的研究还未见报道。鉴此，对永城煤矿塌陷区水污染对鱼类肝细胞 DNA 的损伤进行了研究，旨在对塌陷区鱼类的物种保护、

收稿日期：2009－11－20
基金项目：河南省科技发展计划重点科技攻关项目(082102350040)；河南省教育厅自然科学研究计划项目(2009B180020)
作者简介：闫永峰(1967－)，男，河南杞县人，副教授，博士，主要从事动物生态学研究。E－mail：yanyf01@sina.com

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

水质检测和环境评价提供帮助。

1 材料和方法

1.1 样地概况

选择相对无煤矿污染的商丘市黄河故道中的天沐湖(34°35′N, 115°41′E)为对照样地。商丘市黄河故道西起民权县, 东至虞城县, 全长 134 km, 总面积约 152 000 hm^2。其周围无工矿企业, 基本无煤矿、有机和重金属类污染。

选择煤矿污染较严重的永城塌陷区积水区(33°57′N, 116°21′E)为研究样地。此采煤塌陷区面积近 30 hm^2, 塌陷区积水经简单治理形成天然渔塘。积水主要来自矿井排水、矿区生产废水、地表渗水和降雨, 其中矿井排水是主要污染水源, 包括煤矸石淋浴水、地表渗水、岩石孔隙水、地下含水层疏放水以及煤矿生产中防尘、灌浆、充填污水等。

1.2 供试鱼及分组

供试鱼为永城煤矿塌陷区和商丘市黄河故道天沐湖自然生长的鲫鱼(*Carassius auratus*), 采用无伤害采集法获得, 共采集 50 条, 随机分为 5 组, 每组 10 条, 每组数据均取其平均值。

1.3 样品处理

肝脏取出后用磷酸缓冲液(PBS, pH 7.4)洗净, 剪至糜状滴加 PBS(pH 7.4)研磨, 过 0.048 mm 筛收集细胞, 悬浮于 PBS(pH 7.4)中, 调节细胞密度为(1~5)× $10^{4\sim6}$个/mL(血细胞计数板最中央每小格 0.5 个细胞), 台盼蓝染色、镜检, 细胞存活率 90%以上, 即可进行以下操作。

1.4 SCGE 试验方法

将载玻片用砂纸磨出痕迹, 以便凝胶附着。将 37℃正常溶点的 0.6%琼脂糖液(溶于不含 Ca^{2+}、Mg^{2+}的 PBS, 需要沸水加热)75~100μL 铺展到预热的磨痕载玻片上, 作为第 1 层凝胶, 盖上盖玻片, 在 4℃条件下凝固 10 min 以上。取 10μL 约含 1000 个细胞的 PBS 和 75μL 0.6%的低熔点琼脂糖(LMA)在 37℃条件下混匀, 制成细胞悬浮液。取下第 1 层凝胶的盖玻片, 加入制备好的细胞悬液 85μL, 铺展到载玻片上作为第 2 层, 4℃条件下凝固至少 10 min, 凝固后再铺 0.6%琼脂糖 100μL 作为第 3 层, 使载玻片上琼脂糖呈"三夹层"式。

4℃条件下凝固后去掉盖玻片, 将载玻片浸入新配制的 4℃预冷细胞裂解液, 裂解 2 h。裂解后将玻片晾干, 并列置于水平电泳槽的阳极端, 电泳缓冲液盖过胶面约 2.5 mm, 静置 20 min 解链。之后接通电源, 电泳条件 25 V, 300 mA, 时间 25 min。通过调节液面调节电压。

电泳结束后, 用 0.4 mol/L Tris—HCl(pH 7.5)洗涤 3 次, 每次 5 min, 晾干载玻片, 无水乙醇处理 30 min(可增加荧光强度), 每片滴加 50μL EB(0.5 mg/L), 染色 15~20 min, 然后用蒸馏水洗涤, 盖上盖玻片在荧光显微镜下观察。6 h 内检测完毕, 时间过长将导致荧光淬灭。

使用 100 W 汞灯作为荧光光源, 在荧光显微镜下, 损伤的细胞 DNA 呈现由圆形、致密红色核心(彗头)和朝向阳极的尾端 DNA 碎片(彗尾)构成的"彗星"。荧光显微镜下, 每片随机观察约 100 个细胞, 依据 DNA 在"彗星细胞"尾部的量对 DNA 损伤程度进行分级: 0 级, 无损伤, 损伤低于 5%; A 级, 轻度损伤, 损伤 5%~19%; B 级, 中度损伤, 损伤 20%~39%; C 级, 重度损伤, 损伤 40%~94%; D 级, 完全损伤, 损伤超过 95%[10]。

1.5 数据处理

用 Excel 统计数据, 采用 SPSS 12.0 软件处理数据, 通过独立样本 *t* 测验分析 2 组数据间的差异。

2 结果与分析

2.1 天沐湖和塌陷区鲫鱼的形态差异

由表 1 和表 2 可知, 两样地鲫鱼在体长、体质量两方面差异都不显著($P>0.05$), 说明塌陷区水污染对鲫鱼的生长无明显影响。

表 1 天沐湖和塌陷区鲫鱼体长 cm

采集地	组别 1	2	3	4	5	*t* 值	*P* 值
天沐湖	10.3	10.6	11.2	9.8	10.1	1.5855	0.0759
塌陷区	12.1	10.6	11.5	10.2	10.9		

表 2 天沐湖和塌陷区鲫鱼体质量 g

采集地	组别 1	2	3	4	5	*t* 值	*P* 值
天沐湖	23.4	21.1	20.2	19.7	20.8	0.9488	0.1852
塌陷区	29.9	24.2	25.8	15.7	21.7		

2.2 彗星差异

从表 3 中可以看出, 塌陷区鱼类的 DNA 的损伤率明显高于对照组, *t* 测验表明二者差异极显著($P<0.01$)。说明由于用煤矸石铺设鱼塘以及鱼塘周边的煤矸石淋溶液和煤矿排出水的污染, 造成鱼塘的水质受到严重污染, 污染物通过食物链在生物体内富集, 对水生生物尤其是鱼类产生毒害作用, 造

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

成其肝细胞 DNA 的损伤。

表 3 天沐湖和塌陷区鲫鱼肝细胞的 DNA 损伤程度

采集地	总细胞数/ 个	彗星数/ 个	DNA 损伤率/ %
天沐湖	358	32	8.939
塌陷区	406	207	50.985

3 讨论

天沐湖的鲫鱼生活于天然水体中，受污染程度较低，理论上其 DNA 损伤率应为零。而采自塌陷区的鱼，由于煤矸石淋溶液和煤矿排出水的污染，而且其水体是封闭性的，污染物只进不出，水体受到严重污染，从而作用于水中的生物个体[9,11]，导致鱼类的 DNA 损伤。本研究结果表明，塌陷区鱼类 DNA 损伤的程度明显高于对照组。一旦人们食用了这些含有大量有毒的水生生物（如鱼虾、贝类）后，有毒物质就会在人体相关功能器官内积累，严重的会使人慢性中毒，影响人体正常发育[3]。所以煤矿塌陷区在给当地居民带来公共财产巨大损失的同时，更存在着潜在的健康隐患。但塌陷区水体中具体哪些物质和元素对鱼类的肝细胞 DNA 造成损伤以及造成 DNA 损伤的机制，还有待进一步的研究。

肝脏作为动物的解毒器官，相对于其他部位更容易聚集和储存毒性物质，造成污染物的浓度和含量都远远高于其他部位[12]。在低浓度污染或慢性致毒过程中，检测肝细胞的 DNA 损伤相对其他部位更加灵敏，因此，可以用肝细胞的 DNA 损伤来更好地监测采煤塌陷区水污染的状况。

单细胞凝胶电泳技术（SCGE）又称彗星试验，是一种快速、简便、廉价和较敏感的、可以在单个细胞水平上检测诱变物引起 DNA 单链断裂损伤的技术。目前 SCGE 已广泛应用于检测过氧化、紫外线、电离辐射、化学物质以及吸烟、老化引起的遗传损伤研究[13]。用这种方法研究塌陷区水污染对鱼类 DNA 的损伤，一方面对鱼类养殖、塌陷区环境的综合防治等将起到一定的指导意义；另一方面还能快速、灵敏、客观地反映塌陷区水污染对生物体长期的毒理学效应，并对煤矿塌陷区水污染生物监测评价体系的建立有重要意义。

参考文献：

[1] 律文智，张锦瑞，王艳彦. 采煤塌陷区重金属污染水体修复技术探讨及展望[J]. 环境科学与管理，2007，32(1)：49-50.

[2] 胡晓磐，时夕金，周建华. 重金属混合物对鲫淋巴细胞 DNA 损伤的研究[J]. 水利渔业，2005，25(1)：11-12.

[3] 张迎梅，王叶菁，虞闰六，等. 重金属 Cd^{2+}，Pb^{2+} 和 Zn^{2+} 对泥鳅 DNA 损伤的研究[J]. 水生生物学报，2006，30(4)：399-402.

[4] 范丽君，周忠良，陈东华，等. $HgCl_2$ 与 $CdCl_2$ 对河蟹精子 DNA 损伤的单细胞凝胶电泳检测研究[J]. 华东师范大学学报：自然科学版，2007(4)：95-100.

[5] Dick P T，Dioxon D G. Changes in circulating blood cell levels of rainbow trout *Salmo gairdneri* Richardson，following acute and chronic exposure to copper[J]. J Fish Biol，1985，26：475-481

[6] Mgbenka B O，Oluah N S，Umeike I. Effect of gamma-lin 20(Lindane) on differential white blood cell counts of the African catfish，*Clarias albopunctatus*[J]. Bull Environ Contam Toxicol，2003，71：248-254.

[7] Llorente M T，Martos A，Castńo A. Detection of cyto-genetic alternations and blood cell changes in natural population of Carp[J]. Ecotoxicol，2002，11：27-34.

[8] 周国勤，杜宣，吴伟. 应用单细胞凝胶电泳技术评价复合微生态制剂的遗传毒性[J]. 农业环境科学学报，2005，24(z1)：236-239.

[9] 闫永峰，任培丽，赵文军. 永城煤矿塌陷区水污染对鲫鱼外周血细胞数量的影响[J]. 河南农业科学，2009(10)：128-131.

[10] 朱文文，王晓涛. DNA 损伤检测——单细胞凝胶电泳技术的研究[J]. 微量元素与健康研究，2007，24(3)：6-7.

[11] 桂和荣，王和平，方文慧，等. 煤矿塌陷区水域环境指示微生物——蓝藻的研究[J]. 煤炭学报，2007，32(8)：848-853.

[12] 黄德军. 黄河兰州段水质污染对花背蟾蜍的毒理学影响[D]. 兰州：兰州大学，2008.

[13] 胡振东，宋效刚，欧翠丽，等. 用黄豆微核技术监测煤矿塌陷区水体污染的研究[J]. 淮北煤炭师范学院学报，2006，27(1)：58-61.

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net