

• 监测技术 •

doi:10.3969/j.issn.1674-6732.2011.03.006

烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎的毒性效应

刘在平, 张松林, 李运彩, 陈粉丽

(西北师范大学地理与环境科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要:采用斑马鱼胚胎发育技术, 观察邻甲酚、对甲酚、间甲酚和2,4-二叔丁基酚联合作用对斑马鱼胚胎的影响, 以研究烷基酚类化合物的毒性。结果表明, 4种受试物的联合对斑马鱼胚胎发育均有明显的抑制作用及不同程度的致死等效应。0hpf染毒主要表现为: 24 h后卵凝结和尾部无延展, 眼点发育受抑制及无主动活动; 48 h卵凝结和心率异常, 无黑色素和心包囊水肿; 72 h卵凝结和未孵化等效应。

关键词:烷基酚; 斑马鱼胚胎; 毒性效应

中图分类号: X835

文献标识码: A

文章编号: 1674-6732(2011)-03-0023-05

The Toxic Effects of Alkylphenol Compounds on Embryos of Zebrafish

LIU Zai-ping, ZHANG Song-lin, LI Yun-cai, CHEN Fen-li

(College of Geological and Environmental Science, Northwest Normal University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

ABSTRACT: The research adopted developmental technology of zebrafish embryos, observed effects of koinonia of *o*-cresol, *p*-cresol, *m*-cresol and 2,4-di-*ter*-butylphenol on zebrafish embryos in order to study the toxicity of alkylphenol compounds. Results showed that the koinonia of four compounds had obvious inhibition on zebrafish embryonic development and lethal effect in different degree. The embryos infected at 0hpf; at 24hpf oosperm coagulation, tail without extension, eye-spots developmental inhibition and no active movement were observed; at 48hpf oosperm coagulation of eggs, heart rate abnormalities, no melanin and pericardial sac edema were found, at 72hpf oosperm coagulation of embryos was observed and eggs were unfertilized.

KEY WORDS: alkylphenol; zebrafish embryos; toxic effects

0 引言

烷基酚类化合物(Alkylphenol Compounds, APs)是一种环境雌激素, 是生产烷基酚聚氧乙烯醚(Alkylphenol Ethethoxylates, APEOs)的原料, 也是APEOs降解的中间产物之一。APs在环境中的最终降解产物为CO₂和H₂O, 但这一过程非常缓慢, 且与母体APEOs相比, APs较难继续降解, 最终持久地存在于环境中^[1], 具有很高的毒性, 更宜在生物体内累积。有研究表明, APs与一些水生生物和哺乳类动物的种群退化及灭绝、生育力下降与丧失、雄性雌性化等生物效应有关^[2]。近年, 人们还发现APs是诱发某些肿瘤的环境内分泌干扰物。研究APs的毒性效应及其在环境中的迁移转化规律对其生态效应评价具有重要参考价值。

目前, 国内外已用鱼类、鼠类和水蚤等实验生物, 选取不同指标, 从宏观(个体与种群)到微观(细胞与分子), 对不同的烷基酚类化合物进行了毒性实验, 然而有关胚胎的毒性实验较少。关于烷基酚类化合物对水生动物的研究主要集中于单一化合物的毒性, 缺乏联合毒性作用的研究。而有毒有害物质对环境的污染往往是多种毒物的复合污染, 毒物共存可发生拮抗作用, 也可发生毒性

收稿日期: 2010-11-25

基金项目: 国家自然科学基金项目(51068025), 甘肃省自然科学基金项目(2007GS03614), 甘肃省教育厅基金项目(0801-08)。

作者简介: 刘在平(1977—), 男, 在读硕士, 从事环境化学研究工作。

剧增的协同作用。鉴于毒物组合及配比的复杂性,实验周期短、廉价、敏感和快速的环境生物技术在研究多种毒物间复杂联合作用机理上有一定的优越性,如斑马鱼胚胎发育技术等。斑马鱼胚胎不仅可指示水生环境中污染物的积累效应,而且能够指示不同层次上污染的毒性效应,为可持续水生生态系统管理提供重要的生物指示,在测定复合污染物毒性、分析毒物的致畸效应方面前景广阔。

以对甲酚为基础,然后与邻甲酚、间甲酚和 2,4-二叔丁基酚相互混合来研究其对斑马鱼胚胎的影响。为 APs 的安全使用及水生生物毒理实验研究提供有价值的参考资料,为控制有毒有害化学品提供技术支持。

1 材料与方法

1.1 实验生物

斑马鱼亲鱼购自兰州市雁滩花鸟鱼虫市场,其行为活泼,反应灵敏,无畸形,逆水性强,购入后饲养在装有经活性炭过滤并充分曝气(大于 24 h)的自来水的鱼缸中,溶解氧大于 4 $\mu\text{g/L}$,用加热棒控制温度为 28.5 $^{\circ}\text{C}$,采用自然光照射,光周期为 14 h / 10 h (昼/夜)。每日早晚各喂食一次经紫外消毒处理过的红线虫,每次喂食 5 min 后将剩余的饵料和粪便及时吸出,每日换水 1/3。

实验前将亲鱼(雌雄斑马鱼数量比约为 1:2)在鱼缸中分开饲养 3 d 以上,繁殖前一天晚上将雌雄斑马鱼置于同一个鱼缸内,在鱼缸底部放置隔离网(或者铺上玻璃珠),以防斑马鱼自食其卵,次日凌晨给光让其产卵受精。利用虹吸法收集鱼卵,用重组水迅速清洗受精卵以除去其间混有的杂质和污物。

1.2 受试化合物

苯酚:AR,天津市化学试剂一厂;邻甲酚:纯度 > 99%,兰州市长兴石油化工厂;对甲酚:纯度 > 99%,兰州市长兴石油化工厂;间甲酚:AR,国药集团化学有限公司;2,4-二叔丁基酚:AR,天津市光复精细化工研究所。所选 5 种有机物比较稳定,挥发性不强,在水溶液内基本不发生水解、氧化和光解等反应,符合水生毒理学实验要求。助溶剂丙酮:CP,天津市化学试剂厂,丙酮体积分数不超过 0.1%,对斑马鱼胚胎发育无任何

影响^[3]。

1.3 实验用水

为避免实验过程中所用的自来水中含有对斑马鱼胚胎发育产生影响的物质,整个实验过程中的实验用水,包括稀释水和清洁用水,均为统一配制、充氧饱和、温度保持 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 的重组水。重组水成分见表 1。

表 1 重组水组分

C/(mmol · L ⁻¹)						
NaCl	KCl	Na ₂ HPO ₄	KH ₂ PO ₄	CaCl ₂	MgSO ₄	NaHCO ₃
13.7	0.54	0.025	0.044	1.30	1.00	0.42

1.4 实验器材

多功能光照培养箱:MLR-350 H 型,日本三洋公司;生物显微镜:SFC-18 系列,厦门麦克奥迪公司,Motic;24 孔细胞培养皿:Biousing Biotech Co, Ltd Wuxi, JS, P. R. C.;超声波清洗器:KQ 5200 DB 型,昆山市超声仪器公司;移液枪,加热棒(温度可调);等等。

1.5 实验方法

按照 SCHULTE 等和 OECD 指导设计胚胎毒性实验。选用 24 孔培养板,每孔的容积为 3 mL,每一孔中加入 2 mL 实验液,放入一枚受精卵。每张多孔板中,20 孔为一实验浓度,其余 4 孔为空白对照,用铝箔封面以避免实验溶液挥发浓度降低。将密封好的多孔板放在温度为 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 的光照培养箱中孵化^[4,5]。

正式实验前,进行预备试验,观察正常胚胎的发育过程并确定浓度梯度,用以正式实验所需浓度。开始可选择较大范围的质量浓度系列,如 1 000,100,10,1,0.1 $\mu\text{g/L}$ 。空白对照组的个体致死或致畸率控制在 10% 以内。每个浓度放入 5 枚胚胎,静态 0 hpf (hours past fertilization) 染毒,不设平行,实验持续 72 h。每日至少记录 2 次各容器内的凝结卵的个数,及时取出凝结的胚胎。每次预实验均根据胚胎的反应调整浓度范围,最后求得 24 h 100% 死亡浓度和 72 h 无死亡浓度,进而确定化合物的实验浓度。

正式实验浓度包括 24 h 100% 致死和 72 h 全不致死的浓度,按等对数间距确定 5 个实验浓度,同时设置重组水为空白对照。

1.6 数据处理方法

用 SPSS 17.0 软件计算半致死浓度值 (LC_{50})。用毒性单位分析法、图解法和相加指数法评价烷基酚类化合物的联合毒性^[6]。

2 结果与分析

2.1 中毒症状

重点观察并记录以下各毒理学终点时产生胚胎致死和致畸的效应:24 h 卵凝结、自溶和尾部无延展;48 h 卵凝结和心率;72 h 卵凝结和未孵化,代表致死性;24 h 眼点及主动活动;48 h 色素和水肿;72 h 畸形,代表致畸性。

胚胎刚接触最高浓度溶液时即出现眼点发白、卵凝结(图 1a)、自溶(图 1b)等现象。

0 hpf 染毒后 4 h,空白对照组正常发育的胚胎肉眼观察仍为无色透明,而暴露胚胎出现卵凝结等致死性指标,囊胚发育停止;8 h 时暴露胚胎外包活动阶段异常;12 h 暴露胚胎原肠胚终止,胚孔关闭、体节发育停滞(图 1c)。

24 h 暴露胚胎出现卵凝结、自溶和尾部不延展(图 1d)等致死性指标,20 s 内不主动活动、眼点未发育等亚致死性指标;28 h 肉眼观察发白的胚胎,显微镜下观察多已自溶,部分发生了卵凝结。显微镜下观察发现,毒性浓度越大的试液中,卵凝结胚胎的颜色越深。对比观察还发现,暴露胚胎发育普遍早于未用于实验而放置在培养皿中用于观察正常发育的胚胎;36 h 暴露胚胎出现卵凝结、自溶和心率异常等致死性指标,心率、血液循环异常等亚致死性指标。显微镜下观察发现:出现眼点,有体节,数秒内主动活动,暴露胚胎已有心跳和血液循环。此时死亡的胚胎数几乎不再增加。

48 h 暴露胚胎出现卵凝结、心率不正常、胚胎自溶,黑色素细胞发育异常、耳石不发育、卵黄囊水肿(图 1e)、心包囊水肿(图 1f)等指标。仍未凝

结或自溶的暴露胚胎出现心率不等、色素无沉积、心包囊水肿等畸形症状。空白对照组已陆续有小斑马鱼破壳而出。毒性过大的试液中的眼观发白的卵凝结或自溶的胚胎均已死亡,不再孵化。对比空白对照组胚胎,暴露胚胎孵化期明显延迟。秒表计数发现,随着试液浓度不同,心率有每分钟 81,105 次不等;发现有个别暴露胚胎存在无色素现象;还有的出现心包囊水肿。0 hpf 染毒胚胎死亡率随时间和浓度增大而有所增加,表现为 24 h 后死亡率降低,48 h 后趋于稳定。

72 h 暴露胚胎出现未孵化、死亡、心率异常等致死性指标。观察发现,之前的卵凝结、自溶的死亡胚胎均无孵化,肉眼观察发白;低浓度和对照组未死亡的胚胎均已完成孵化,部分表现出孵化延迟现象,部分畸形的胚胎不动。

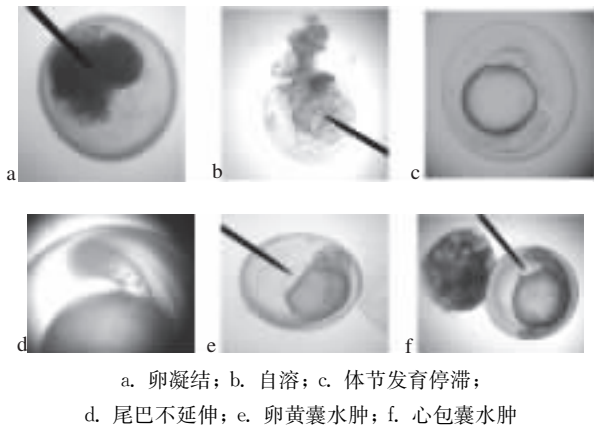


图 1 暴露胚胎致死和亚致死效应

2.2 实验结果

由混合物联合毒性及其配比关系得到各组分毒性。烷基酚类化合物的联合毒性实验结果见表 2,毒性评价见表 3。由表 2 可知,同一时刻,对甲酚和 2,4-二叔丁基酚联合其毒性最强,因为在所有联合中其 LC_{50} 最小,如 24 hpf LC_{50} 为 22.336 $\mu\text{g/L}$ 。此外,随着时间的延长,各联合组毒性也增强,表现出时间-效应关系。

表 2 烷基酚类化合物的联合毒性实验结果 $\mu\text{g/L}$

联合	毒性	LC_{50}		
		24 hpf	48 hpf	72 hpf
对+邻	联合	27.290(25.619~29.070)	27.290(25.619~29.070)	22.650(21.069~24.342)
对甲酚	组分	13.563(12.732~14.447)	13.563(12.732~14.447)	11.257(10.471~12.098)
邻甲酚	组分	13.727(12.887~14.623)	13.727(12.887~14.623)	11.393(10.598~12.244)

续 表

联合	毒性	LC ₅₀		
		24 hpf	48 hpf	72 hpf
对十间	联合	32. 509(30. 244~34. 943)	29. 444(26. 782~32. 371)	23. 878(21. 719~26. 252)
对甲酚	组分	15. 226(14. 165~16. 366)	13. 791(12. 544~15. 162)	11. 184(10. 172~12. 296))
间甲酚	组分	17. 283(16. 079~18. 577)	15. 653(14. 238~17. 209)	12. 694(11. 547~13. 956)
对+2,4	联合	22. 336(21. 158~23. 579)	21. 038(19. 929~22. 209)	18. 923(17. 290~20. 711)
对甲酚	组分	20. 905(19. 803~22. 069)	19. 690(18. 652~20. 786)	17. 111(16. 182~19. 384)
2,4-二叔丁基酚	组分	1. 431(1. 355~1. 510)	1. 348(1. 277~1. 423)	1. 212(1. 108~1. 327)
对十间+邻	联合	40. 832(34. 242~48. 690)	25. 942(24. 026~28. 010)	25. 53(23. 324~27. 938)
对甲酚	组分	12. 145(10. 185~14. 482)	7. 716(7. 146~8. 331)	7. 594(6. 938~8. 310)
间甲酚	组分	16. 396(13. 750~19. 551)	10. 417(9. 648~11. 247)	10. 251(9. 367~11. 218)
邻甲酚	组分	12. 291(10. 307~14. 656)	7. 809(7. 232~8. 431)	7. 685(7. 021~8. 410)

对甲酚+邻甲酚与对甲酚+间甲酚的联合毒性作用 3 种方法评价结果一致,即 24 h 均表现出协同作用,48 h 均表现出相加作用,72 h 均表现出协同作用;对甲酚+2,4-二叔丁基酚组合在 24 ~ 72 h 内,毒性单位分析法与相加指数法评价结果一致,均为拮抗作用,而毒性单位图解法评价为小于相加作用(表 3)。由此可见,当不同的单一污染物相互联合时会表现出与单一时不同的作用方式。因此,在研究污染物毒性时要尽可能考虑周全。

表 3 毒性单位分析法、图解法和相加指数法评价烷基酚类的联合毒性

组合方式	时间/h	分析法 Σ(TU)	分析法 评 价	图解法 对甲酚(TU)	图解法 (TU)	图解法 评 价	相加指数 AI	AI 法 评价
对甲酚+ 邻甲酚	24	0. 677	协同	0. 398	0. 279	协同	0. 477	协同
	48	1. 010	相加	0. 504	0. 506	相加	-0. 010	相加
	72	0. 856	协同	0. 428	0. 428	协同	0. 168	协同
对甲酚+ 间甲酚	24	0. 941	协同	0. 447	0. 494	协同	0. 063	协同
	48	1. 032	相加	0. 512	0. 520	相加	-0. 032	相加
	72	0. 850	协同	0. 425	0. 425	协同	0. 176	协同
对甲酚+2,4-二 叔丁基酚	24	1. 381	拮抗	0. 614	0. 767	小于相加	-0. 381	拮抗
	48	1. 467	拮抗	0. 732	0. 736	小于相加	-0. 167	拮抗
	72	1. 324	拮抗	0. 651	0. 673	小于相加	-0. 324	拮抗
对甲酚+间甲酚 +邻甲酚	24	1. 075	拮抗				-0. 075	拮抗
	48	0. 921	协同				0. 086	协同
	72	0. 921	协同				0. 086	协同

2.3 致毒机理初探

毒物可分为惰性化合物、次惰性化合物、反应性化合物和特殊反应性化合物,每一种毒物都有各自的毒物作用方式。烷基酚类化合物属于次惰性化合物,对生物体呈极性麻醉机制,其总毒性高于基本毒性;惰性化合物,对生物体呈非极性麻醉作用,为基本毒性。麻醉性化合物对斑马鱼胚胎染毒机理:化合物通过吸收、扩散等方式进入胚

胎,要对胚胎产生毒害作用,首先必须通过胚胎细胞膜才能对胚胎中的靶器官发生作用,而细胞膜是由磷脂双分子层组成的,所以亲脂性化合物比亲水性化合物更容易通过这一层细胞膜,通常化合物的辛醇-水分配系数(lg*P*)越大,就越容易通过细胞膜,对斑马鱼胚胎的毒性也越大。化合物不断通过生物运转作用于靶器官,从而在靶器官内的浓度不断增大,当浓度达到临界浓度时即呈现出毒性作用,此为基本毒性。若化合物分子进

一步通过氢键作用与靶器官内生物大分子如蛋白质键合,使蛋白质变性而致毒,这就是极性麻醉机制,其总毒性高于其基本毒性。

实验选取烷基酚类化合物的 $\lg P$ 较大(1.46~2.06),其脂溶性较大而水溶性比较小,有机物都较容易进入生物膜,所以 $\lg P$ 与毒性相关性很强。上述化合物在斑马鱼胚胎靶器官内富集到一定浓度(临界浓度),即呈现毒性作用,所以这类化合物的生物富集因子(BCF)在致毒机理中也很重要。

3 结论

3.1 毒性效应分析

联合毒性效应评价中,对甲酚+邻甲酚一组在24 h内表现为协同作用,48 h内表现为相加作用,48 h后又表现为协同作用;对甲酚+间甲酚一组在24 h内表现为协同作用,48 h内表现为相加作用,48 h后又表现为协同作用;对甲酚+邻甲酚一组与对甲酚+间甲酚一组表现出相同的联合毒性作用方式。对甲酚+2,4-二叔丁基酚一组在72 h内表现为小于相加或拮抗作用;对甲酚+间甲酚+邻甲酚一组在24 h内表现为拮抗作用,24 h后又表现为协同作用。

3.2 受试烷基酚类化合物致毒机理分析

极性烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎的致毒过程先要经历一个化合物在两相(水相和生物相)间

的分配过程,进入生物相的受试化合物较多,与生物大分子键合的机会大,因此极性麻醉性毒性也大。

3.3 烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎毒性

采用斑马鱼胚胎发育技术,发现邻甲酚、间甲酚、对甲酚和2,4-二叔丁基酚4种烷基酚类化合物对斑马鱼胚胎发育均有明显抑制作用,可使得胚胎发育畸形甚至死亡,具有特定的毒理学终点。染毒时刻的不同对胚胎造成的毒性效应也不同。

[参考文献]

- [1] 邓茂先,陈祥贵. 环境内分泌干扰物研究进展[J]. 国外医学:卫生分册,2000,27(2):65-68.
- [2] 卞倩,王心如. 烷基酚类物质的生殖发育毒效应及其作用机制[J]. 卫生研究,2004,33(3):357-360.
- [3] 王思锋,王希敏,侯海荣,等. 有机溶剂对血管生成斑马鱼模型的适用性研究[J]. 实验动物与比较医学,2008,28(4):238-242.
- [4] SCHULTE C, NAGEL R. Test acute toxicity in the embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results [J]. AT-LA, 1994, 22: 12-19.
- [5] OECD. OECD Guideline for Testing of Chemicals: Fish, Embryo Toxicity Test with the Zebrafish (*B. Rerio*) [R]. Paris: OECD TG212, 1996: 62-76.
- [6] WHO. Technic Report [R]. 1981:8-9.

(本栏目编辑 熊光陵)

(上接第22页)

法简单快速,溶液经检查和调整后,一次就能达到等当点,无需再做空白测定。经地表水、地下水和总硬度标准样品的比对测定,缓冲溶液改进配制方法与原方法测定结果无显著差异,可以满足环境样品监测分析的需要。

[参考文献]

- [1] 国家环境保护总局《水和废水监测分析方法》编委会. 水和废水监测分析方法[M]. 4版. 北京:中国环境科学出版社,2002:412-418.

- [2] 魏复盛. 水和废水监测分析方法指南[M]. 中册. 北京:中国环境科学出版社,1994:389-395.
- [3] 李慧敏,李宗善,陈喜玲,等. 总硬度测定缓冲溶液配制方法的改进实验[J]. 环境科学和技术,2005,28(增刊):51-52.
- [4] 徐晓红. 总硬度测定中缓冲溶液及指示剂配制的改进[J]. 化学工程与装备,2008(1):75-76.
- [5] 中国环境监测总站《环境水质监测质量保证手册》编写组. 环境水质监测质量保证手册[M]. 2版. 北京:中国环境科学出版社,1994:246-305.