

DOP 对鲤鱼的遗传毒性及肝脏抗氧化系统的影响

李凤芝 (山东省单县杨楼镇孟寨中学, 山东单县 274300)

摘要 [目的] 研究邻苯二甲酸二辛酯(DOP)对鲤鱼的遗传毒性及抗氧化性能的影响,为评价DOP的生物学毒性及水环境生态风险提供理论依据。[方法] 应用吉姆萨染色和试剂盒方法,研究0.3、1.5、7.5 mg/L的DOP 24 h暴露对鲤鱼红细胞核异常率和肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性及丙二醛(MDA)含量的影响。[结果] 在DOP试验浓度范围内,红细胞微核率、核异常率和总核异常率均随着DOP浓度的升高而升高,且微核率在7.5 mg/L DOP组极显著高于对照组。SOD活性则表现为低促高抑。0.3 mg/L DOP组POD活性显著高于对照组,而1.5 mg/L DOP、7.5 mg/L DOP组POD活性无明显变化。MDA含量随着DOP浓度的升高而升高,且各浓度DOP组MDA含量均显著高于对照组。[结论] 一定浓度的DOP对鱼类具有遗传毒性,并能损伤抗氧化防御系统。

关键词 邻苯二甲酸二辛酯;鲤鱼;微核;核异常;超氧化物歧化酶;过氧化物酶;丙二醛

中图分类号 S965.116 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2016)28-0130-03

Effects of DOP on the Genetic Toxicity and Liver Antioxidant System in Carps

LI Feng-zhi (Mengzhai Middle School in Yanglou Town, Shan County, Shandong 274300)

Abstract [Objective] To study the effects of DOP on the genetic toxicity and oxidation resistance of carps, and to provide theoretical basis for evaluating the biological toxicity and ecological risk to water environments of DOP. [Method] The effects of exposing with DOP (0.3, 1.5, 7.5 mg/L) for 24 h on erythrocyte nuclei abnormal rate and activities of liver SOD and POD and the content of MDA by Giemsa staining and the kit method. [Result] In the experimental concentration range of DOP, rate of micronucleus, nuclear anomalies and total nuclear anomaly on the erythrocyte were increased with the increase of DOP concentration, and the rate of micronucleus in the 7.5 mg/L DOP group was significantly higher than that in the control group. SOD activity was promoted in low concentration and inhibited in high concentration. POD activity at 0.3 mg/L group was significantly higher, but it had no significant change at 1.5 and 7.5 mg/L DOP group compared with the control group. The content of MDA was increased with the increase of DOP concentration, and that in each DOP group was significantly higher than the control group. [Conclusion] A certain concentration of DOP has a genetic toxicity and can damage the antioxidant defense system of fish.

Key words Diethyl Phthalate (DOP); *Cyprinus carpio* Linnaeus (Carp); Micronucleus; Nuclear anomalies; SOD; POD; MDA

邻苯二甲酸二辛酯(Diethyl phthalate, DOP)是一种重要的酞酸酯类(PAEs)化合物,是生产上最常使用的一种塑料和橡胶增塑剂,同时,作为添加剂还被用于化妆品、造漆、染料和冷凝剂等领域^[1],由于DOP的广泛应用,在水体、土壤、大气和食品中均已检出DOP的存在^[2-4]。目前,DOP已被美国国家环保局(EPA)列为优先控制的6种PAEs有毒污染物之一,也被我国列为优先控制的3种PAEs环境污染物之一^[5]。目前,DOP的生物学毒性效应已成为研究热点。研究表明,DOP能缩短果蝇寿命,引发生殖细胞发生畸变^[6],导致小鼠红细胞微核率升高^[7],降低去甲肾上腺素和多巴胺的含量^[8],降低蚯蚓的成活率^[9],并具有生殖毒性^[10]。但是,目前DOP对生物是否具有遗传毒性尚缺少足够的证据。抗氧化系统是机体内重要的活性氧清除系统,当机体受环境污染胁迫时,其活性成分及其含量则发生改变,因此常作为污染物环境风险的早期预警指标^[11]。目前,我国江、河、湖泊和自来水中均已检测出DOP的存在,因此进一步开展PAEs对水生动物毒性的影响研究紧迫又必要。

鱼类是与水生态环境变化密切相关的水生动物,也是人类的重要食物来源。鲤鱼属于淡水鲤科鱼类,是水生态毒理学中最常应用的模式动物之一,也是我国最重要的经济鱼类。笔者以鲤鱼为受试动物,研究了DOP对鲤鱼红细胞微核率以及肝脏超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化物酶(POD)活性、丙二醛(MDA)含量的影响,旨在为探讨DOP对

水生动物的遗传毒性和抗氧化防御系统的影响以评价DOP的水环境污染风险提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 试验动物。鲤鱼,由菏泽市牡丹区鱼苗养殖场提供,体重(68.7 ± 6.4)g,室温条件下驯养14 d。

1.1.2 试剂和仪器。DOP(纯度99.5%,购自Sigma公司);吐温80(国产分析纯)、Giemsa染液以及SOD、POD、MDA、蛋白含量测定试剂盒,均购自南京建成生物工程研究所;紫外可见分光光度计(TU-1810,购自北京普析通用仪器有限责任公司);冰冻离心机(Eppendorf-5417R,德国);MOTIC显微成像系统;自制玻璃缸(120 cm × 60 cm × 80 cm)等。

1.2 方法

1.2.1 试验动物的处理。试验共分为4组,分别为对照(CK)组以及0.3 mg/L DOP组、1.5 mg/L DOP组和7.5 mg/L DOP组(CK组及各浓度DOP组均含2.5 mg/L吐温80),每组设3个平行,每组鲤鱼18尾,染毒在室温玻璃缸内进行,试验用水为曝气2 d的自来水,使用充氧机24 h充氧,溶氧量不低于6 mg/L, pH为6.5~7.0,染毒24 h。

1.2.2 血涂片的制作、染色及观察。染毒24 h,每组各随机选取鲤鱼3尾,断尾取血,制作血涂片,每尾鱼各制作3个血涂片,并按照试剂盒方法使用Giemsa染液对血涂片进行染色,自然晾干。然后,使用MOTIC显微成像系统在油镜下观察血涂片,每个涂片观察统计3 000个以上红细胞,记录微核及核异常的细胞数,并按照以下公式计算出微核率、核异常率及总核异常率:

基金项目 山东省自然科学基金项目(ZR2010CM046)。

作者简介 李凤芝(1968-),女,山东单县人,中学一级教师,从事生物学教学及生态学研究。

收稿日期 2016-08-21

微核率 = 微核总数 / 观察细胞总数 $\times 1\ 000\%$ (1)

核异常率 = 具有核异常的细胞总数 (不包括微核数) / 观察细胞总数 $\times 1\ 000\%$ (2)

总核异常率 = 微核率 + 核异常率 (3)

1.2.3 组织液的提取及生化指标的测定。染毒 24 h, 每组各随机选取鲤鱼 6 尾, 擦干后迅速解剖, 取肝脏, 并用 0.65% 的生理盐水将表面的血迹冲洗干净, 用吸水纸吸干水分后称重, 并按 $w(g): V(mL) = 1:6$ 的比例加入冰冷的 0.65% 生理盐水, 用玻璃匀浆器匀浆, 使用冰冻离心机 $4\ ^\circ\text{C}$ 下 $3\ 500\ \text{r}/\text{min}$ 离心 20 min, 取上清液置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱内备用。肝脏蛋白质含量、MDA 含量、SOD 活性和 POD 活性的测定均按照试剂盒说明进行。

1.3 数据处理 试验数据均以平均值 \pm 标准差表示, 并使用 SPSS 统计软件对试验数据进行单因素方差分析 (ANOVA), 采用最小显著差数法 (LSD) 进行多个样本均数间的两

两比较, $P < 0.05$ 表示差异显著, $P < 0.01$ 表示差异极显著。

2 结果与分析

2.1 DOP 对鲤鱼红细胞微核及核异常的影响 由表 1 可知, DOP 染毒 24 h, 红细胞微核率、核异常率及总核异常率均随着 DOP 染毒浓度的升高而升高, 但 0.3 mg/L DOP 组总核异常率显著高于对照 (CK) 组, 微核率及核异常率与对照组差异均不显著。1.5 mg/L DOP 组核异常率显著高于对照组 ($P < 0.05$), 总核异常率极显著高于对照 (CK) 组 ($P < 0.01$), 但微核率与对照组差异不显著。7.5 mg/L DOP 组微核率、核异常率及总核异常率均显著高于对照 (CK) 组 ($P < 0.05$), 且微核率和总核异常率均极显著高于对照 (CK) 组 ($P < 0.01$)。这说明较高浓度的 DOP 能诱导鲤鱼红细胞微核的发生, 具有遗传毒性。当 DOP 浓度较低时, 遗传毒性不明显, 但对细胞核具有致畸性。

表 1 DOP 对鲤鱼红细胞微核及核异常的影响

Table 1 Effects of DOP on erythrocyte micronucleus and nuclear abnormality of carps

DOP 浓度 DOP concentration mg/L	核异常率 Abnormal nucleus rate//%	微核率 Micronucleus rate//%	总核异常率 Total micronucleus rate//%
0 (CK)	3.28 \pm 0.26	0.42 \pm 0.07	3.70 \pm 0.30
0.3	4.10 \pm 0.24	0.54 \pm 0.13	4.64 \pm 0.21*
1.5	4.95 \pm 0.72*	0.66 \pm 0.23	5.61 \pm 0.86*
7.5	5.49 \pm 1.17*	1.36 \pm 0.32**	6.85 \pm 1.05**

注: * 表示与 CK 组差异显著 ($P < 0.05$), ** 表示与 CK 组差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * indicated significant differences ($P < 0.05$) compared with CK group; and ** indicated extremely significant differences ($P < 0.01$) compared with CK group.

2.2 DOP 对鲤鱼抗氧化性的影响 由表 2 可知, DOP 染毒 24 h, 0.3 mg/L DOP 组 SOD 活性高于对照组, 但差异不显著; 1.5 mg/L DOP 组 SOD 活性显著高于对照, 7.5 mg/L DOP 组 SOD 活性却显著低于对照, 总体上表现出低促高抑的特点。POD 活性也表现出低促高抑的特点, 但仅 0.3 mg/L DOP 组 POD 活性显著高于对照组 ($P < 0.05$), 1.5 mg/L DOP

组、7.5 mg/L DOP 组与对照组差异不显著。DOP 组 MDA 含量均高于对照组, 且随 DOP 浓度的升高而升高, 但 0.3 mg/L DOP 组与对照组差异不显著, 1.5 mg/L DOP 组、7.5 mg/L DOP 组 MDA 含量却显著高于对照组 ($P < 0.05$)。这说明较高浓度的 DOP 能影响鱼类的抗氧化系统, 并对肝细胞具有损伤作用。

表 2 DOP 对鲤鱼肝脏 SOD 活性、POD 活性和 MDA 含量的影响

Table 2 Effects of DOP on liver SOD and POD activities and MDA content in carps

DOP 浓度 DOP concentration mg/L	SOD 活性 SOD activity U/mg prot	POD 活性 POD activity U/mg prot	MDA 含量 MDA content nmol/mg prot
0 (CK)	64.16 \pm 5.74	1.06 \pm 0.08	2.01 \pm 0.08
0.3	81.50 \pm 9.71	1.75 \pm 0.09*	2.08 \pm 0.15
1.5	91.87 \pm 10.87*	1.17 \pm 0.11	2.39 \pm 0.09*
7.5	50.96 \pm 3.01*	0.94 \pm 0.06	3.02 \pm 0.30*

注: * 表示与 CK 组差异显著 ($P < 0.05$); ** 表示与 CK 组差异极显著 ($P < 0.01$)。

Note: * indicated significant differences ($P < 0.05$) compared with CK group; and ** indicated extremely significant differences ($P < 0.01$) compared with CK group.

3 讨论与结论

微核, 也称卫星核, 游离于主核之外, 为圆形或椭圆形小体, 大小为正常细胞核的 $1/30 \sim 1/4$, 是染色体畸变的一种表现形式, 一般认为微核是在有丝分裂后期丧失着丝粒的染色体断片或染色体在分裂过程中行动滞后产生的^[12]。微核率的大小与不良作用因子的剂量或辐射累积效应呈正相关。目前, 由于微核试验测试方法简单、灵敏, 已成为推测不良环境污染物对真核类生物是否具有遗传毒性的重要手段。核

异常主要表现为核外凸、核内陷、无丝分裂、核异形等, 是有毒因子对遗传物质具有毒性作用的表现形式。

该试验结果表明, 较低浓度的 DOP 并不能引起红细胞微核率的显著升高, 但能明显引起核异常的发生, 说明 DOP 对遗传物质细胞核具有一定的毒性, 而较高浓度的 DOP 却能极显著诱导微核率的发生, 说明较高浓度的 DOP 具有较强的遗传毒性, 这与张贵生^[12]和王蕊等^[13]报道的 DEHP 遗传毒性试验结果相一致, 其原因可能是 DOP 抑制了纺锤丝

的形成,也可能导致了染色体的断裂。李恒舟^[14]报道 DEHP 能导致蚯蚓体腔上皮细胞 DNA 断裂,DOP 的作用机制可能与 DEHP 相一致,具体机制还有待进一步研究。

一般认为,当机体受环境污染物胁迫时,自由基就会大量产生,并攻击细胞膜,使细胞膜发生脂质过氧化,从而导致细胞损伤,甚至细胞死亡^[15]。抗氧化防御系统是机体内重要的自由基清除系统,其中 SOD 和 POD 是抗氧化系统中重要的 2 种抗氧化酶类物质,SOD 在机体内主要是清除 $\cdot O_2^-$,同时生成 H_2O_2 ,而 POD 在机体内可清除 H_2O_2 。由此可见,SOD 和 POD 在维持机体内自由基动态平衡方面起着极其重要的作用^[16],其活性变化反映着机体抗氧化能力的强弱,同时也是反映机体是否受外界不良因子胁迫的生物指标。MDA 是机体组织细胞膜发生脂质过氧化的产物之一,其含量变化是评价细胞膜是否受损伤及抗氧化防御系统是否受破坏的指标之一^[17]。

该试验结果表明,DOP 对鲤鱼肝脏 SOD 活性表现为低浓度诱导高浓度抑制的特点,其原因可能是当 DOP 进入鲤鱼机体内后,引起 O_2^- 的大量产生,为防止机体组织免受氧化损伤,SOD 被大量诱导合成,以清除多余的 O_2^- ,所以 1.5 mg/L DOP 组 SOD 活性明显升高,但 DOP 浓度较高(7.5 mg/L)时,机体对于 SOD 活性的诱导跟不上机体内 O_2^- 增加的速度,超过了机体自身的调节范围,或者酶结构受到损伤,所以 SOD 活性受到明显抑制。这与吴红松^[18]报道的三聚氰胺对鲤鱼 SOD 活性的影响结果相一致。该试验结果表明,POD 活性在较低(0.3 mg/L)浓度 DOP 组显著高于对照,其机理可能与 SOD 的作用机理类似,但较高浓度时与对照组相比差异并不显著。秦洁芳^[19]报道 DBP 暴露 3 d,能明显抑制紫红笛鲷肝脏 POD 活性,这与该试验结果并不一致,原因可能是该试验中 DOP 对鲤鱼的染毒时间太短所致,也可能是 DBP 与 DOP 的毒性大小不同,具体机理还有待进一步研究。该试验中 1.5 mg/L DOP 组、7.5 mg/L DOP 组

MDA 含量显著高于对照组,说明较高浓度的 DOP 对抗氧化防御系统已造成一定程度的破坏,细胞膜已经受到了一定程度的损伤。

参考文献

- [1] 张娜,刘欣.邻苯二甲酸酯类化合物的研究进展[J].环境科学导刊,2009,28(3):25-28.
 - [2] 黄玉娟,陈永山,骆永明,等.气相色谱-质谱联用内标法测定土壤中 11 种酞酸酯[J].环境化学,2013,32(4):658-666.
 - [3] PARLETT L E, CALAFAT A M, SWAN S H. Women's exposure to phthalates in relation to use of personal care products[J]. Journal of exposure science and environmental epidemiology,2013,23(2):197-206.
 - [4] SÁNCHEZ-AVILA J, TAULER R, LACORTE S. Organic micropollutants in coastal waters from NW Mediterranean Sea: Sources distribution and potential risk [J]. Environment international,2012,46:50-62.
 - [5] 何秀婷,李潇,杨永涛,等.邻苯二甲酸酯对斑马鱼胚胎发育的联合毒性[J].中山大学学报(自然科学版),2010,49(5):101-112.
 - [6] 杨科锋,厉曙光,蔡智鸣,等.酞酸酯对果蝇生存天数影响及遗传毒性[J].中国公共卫生,2005,21(4):432-433.
 - [7] 蔡智鸣,杨科锋,厉曙光,等. DBP、DOP 对小鼠的联合遗传毒性[J].环境与职业医学,2002,19(3):197.
 - [8] 王明霞,赵淑华,杜琳琳,等.邻苯二甲酸二辛酯和氯仿联合染毒对雌性小鼠单胺类神经递质的影响[J].齐齐哈尔医学院学报,2015,36(36):5462-5463.
 - [9] 芮洋,邹建运,蔡信德,等.不同类型增塑剂的生物毒性初探[J].安徽农业科学,2013,41(34):13349-13351,13354.
 - [10] HAYASHI Y, ITO Y, NAKAJIMA T. Relationship of maternal malnutrition caused by Di (2-ethylhexyl) phthalate exposure with lifestyle disease in offspring [J]. Nihonseisigaku zasshi Japanese journal of hygiene,2012,67(1):22-25.
 - [11] 陈剑杰,曹瑾玲,罗永巨,等.氟对鲤鱼鳃组织免疫相关酶及 IL-1 β 表达影响[J].核农学报,2014,28(6):1092-1098.
 - [12] 张贵生.邻苯二甲酸二乙基己酯对鲤非特异性免疫的影响及遗传毒性[J].水生生物学,2014,38(4):729-736.
 - [13] 王蕊,李厚勇,郭启明,等.邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯致畸致突变实验研究[J].癌变·畸变·突变,2002,14(2):120-121.
 - [14] 李恒舟. DEHP 和 DBP 对蚯蚓的氧化损伤及遗传毒性效应[D].泰安:山东农业大学,2014.
 - [15] 张贵生. DEP 暴露对鲤鱼鳃、肾生化指标及组织结构的影响[J].核农学报,2016,30(3):605-612.
 - [16] 张竟亮,曹冬冬,易建勇,等.绿豆皮水提液对大鼠高温条件下体内抗氧化能力的影响[J].核农学报,2014,28(6):1040-1046.
 - [17] 李进寿,阮俊峰,耿宏,等.多效唑暴露对褐菖鲉脾脏抗氧化防御系统的影响[J].厦门大学报(自然科学版),2013,52(2):267-272.
 - [18] 吴红松.三聚氰胺对鲤鱼组织 SOD、POD 和 MDA 含量的影响[J].动物医学进展,2012,33(5):74-77.
 - [19] 秦洁芳.邻苯二甲酸酯类化合物对贻贝、红鳍笛鲷和紫红笛鲷的毒性效应[D].上海:上海海洋大学,2011.
- (上接第 127 页)
- [4] 任广伟,秦焕菊,史万华,等.我国烟蚜茧蜂的研究进展[J].中国烟草科学,2000(1):27-30.
 - [5] 邓建华,李天飞,吴兴富,等.烟草害虫生物防治技术的研究与应用进展[J].烟草科技,2007(7):45-48.
 - [6] 邓建华,吴兴富,宋春满,等.田间小棚繁殖烟蚜茧蜂的繁殖效果研究[J].西南农业大学学报,2006,28(1):66-69.
 - [7] 邓小刚,吴伟,杨松,等.烟蚜茧蜂:规模繁殖与应用[M].北京:中国环境科学出版社,2010.
 - [8] 吴兴富,赵立恒,魏佳宁,等.烟田烟蚜茧蜂的活动规律及对烟蚜的防治效果[J].西南农业大学学报,2000,22(4):327-330.
 - [9] 崔翔,胡小曼,李拂琳,等.烟蚜茧蜂繁殖及对烟蚜的防治效果探索[J].云南农业大学学报,2006,22(2):343-346.
 - [10] 李明福,张永平,王秀忠.滇西北高原烟蚜茧蜂繁育及田间防治蚜虫效果[J].中国农学通报,2011,26(S2):123-128.
 - [11] 商胜华,陈庆园,徐卯林,等.贵州烟区烟蚜发生及其预测模型的初步研究[J].植物保护,2010,36(5):86-91.
 - [12] 李宏光,刘春明,吴伟,等.漂浮育苗高效繁殖烟蚜茧蜂方法: CN102334468[P/OL]. [21012-02-01]. www. soopat. com / Patent/201110209370.
 - [13] 何伟,杨中义,张发明,等.一种漂浮育苗小棚饲养烟蚜茧蜂的方法: CN102388842[P/OL]. [2012-03-28]. www. soopat. com / Patent/201110221751.
 - [14] 蒋杰贤,王冬生,张沪同,等.桃蚜茧蜂繁殖与利用研究[J].上海农业学报,2003,19(3):97-100.
 - [15] 吴兴富.烟蚜茧蜂繁殖利用概述[J].中国农学通报,2007,23(5):306-308.
 - [16] 贾芳翌,易忠经,杨在友,等.不同蜂蚜比的蜂蚜同接对规模化繁殖烟蚜茧蜂的影响[J].中国烟草科学,2014,35(3):56-60.
 - [17] 杨硕媛,邓小刚,余砚碧,等.烟蚜茧蜂规模繁殖中烟蚜越冬寄主筛选[J].中国烟草科学,2011,32(4):81-83.
 - [18] 侯茂林,王福莲,方方浩.栽培措施对烟田前期烟蚜和烟蚜茧蜂种群数量的影响[J].昆虫知识,2004,41(6):563-565.
 - [19] 吴兴富,魏佳宁.温度对烟蚜茧蜂发育、生殖的影响[J].动物学研究,2000,21(3):192-198.
 - [20] 马丽娜,刘映红,王雅静,等.寄主植物对烟蚜生长发育和繁殖的影响[J].西南农业大学学报,2006,28(1):74-76.
 - [21] 蓝江林,贺福德.温度、光周期和相对湿度对棉蚜茧蜂 [*Lysiphlebia japonica* (Ashmead)] 发育及繁殖的影响[J].中国农学通报,2005,21(11):328-330.