草甘膦对热带爪蟾胚胎发育的影响

刘阿梅,林 姿,徐 曼,赵子慧,杨姗姗,陈培超* (温州大学生命与环境科学学院,浙江温州 325035)

摘要 [目的]探究草甘膦对热带爪蟾早期胚胎发育的影响及其敏感浓度。[方法]选择热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)作为模式生物,采用胚胎致畸试验(FETAX)测定草甘膦对热带爪蟾胚胎发育的致畸效应。[结果]草甘膦对爪蟾胚胎发育的半致畸浓度 10^{-5}mol/L,胚胎发育后期则表现出不同类型的畸形,如小眼、围心腔水肿、腹方化、双尾、尾部弯曲等表型。当草甘膦浓度达到 10^{-3} mol/L 时,它对热带爪蟾胚胎有极显著的毒害作用,并伴有较高的致畸率和死亡率,其中特异性的表型为腹方化。[结论]草甘膦对热带爪蟾胚胎产生的毒性效应,严重影响胚胎发育正常进行;农业中草甘膦使用不当,随着生物富集效应,草甘膦对人类健康和生态环境有潜在危害。

关键词 草甘膦;热带爪蟾;FETAX;胚胎发育
中图分类号 X174 **文献标识码** A
文章编号 0517-6611(2019)06-0078-04
doi:10.3969/j.issn.0517-6611.2019.06.024
开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Effects of Glyphosate on Embryonic Development in *Xenopus tropicalis*

LIU A-mei, LIN Zi, XU Man et al (College of Life and Environmental Science, Wenzhou University, Wenzhou, Zhejiang 325035)

Abstract [Objective] The effects of phosphine on the early embryo development of *Xenopus tropicalis* and its sensitive concentration were explored. [Method] *Xenopus tropicalis* was used as a model organism to determine the teratogenic effects of glyphosate on the development of *Xenopus tropicalis* embryos using embryonic teratogenicity experiments (FETAX). [Result] 10^{-5}mol/L glyphosate showed different types of malformations in the late developmental stage of embryonic development of *Xenopus tropicalis*, such as small eyes, periventricular edema, abdomen, double tail and tail curved. When the concentration of glyphosate reached 10^{-3}mol/L, it has a very significant toxic effect on *Xenopus tropicalis* embryos, accompanied by high teratogenicity and mortality, of which specific phenotype was the abdomen. [Conclusion] The toxic effects of glyphosate on *Xenopus tropicalis* embryos are inhibited. The improper use of glyphosate in agriculture, with the bioaccumulation effect, was potential damage to human health and ecological environment.

Key words Glyphosate; *Xenopus tropicalis*; FETAX; Embryo development

随着现代农业的飞速发展,农药的使用越来越广泛,它们对植物、动物和人类的危害越来越严重。一方面,它们可以直接进入生物体内,引起急性、慢性中毒和畸变,另一方面,通过径流、排污、挥发等途径进入土壤、大气和水体,引起各种生态环境下生物的死亡,并通过食物链的富集传递,影响人类食品安全[1-2]。

草甘膦(GPS)为广谱性有机磷除草剂,是世界上应用最广、用量最大的农药品种[3-5],随着对"抗草甘膦"作物的不断研究与种植,草甘膦的使用量必然不断增加。据预测,未来几年草甘膦的需求量将保持15%的增速,草甘膦对人类健康和生态毒性的潜在威胁日益凸显。有研究发现草甘膦对水生环境有潜在的威胁[6]。Relyea[7]指出使用草甘膦会造成蝌蚪大量死亡。草甘膦制剂(roundup)对金鱼的急性毒性(carassius auratus)的相关研究表明,草甘膦制剂与金鱼细胞的微核率、细胞核核异常及链断裂损伤等存在明显的浓度剂量效应关系[7-9]。有研究发现,人在工作中接触农药,包括接触草甘膦为活性剂的农达,即便通过孕妇配偶的男性接触,也可能导致生育问题[10]。除此之外,孕前接触草甘膦除草剂提高而后流产的风险,孕后接触草甘膦除草剂通常与晚期自然流产相关。另外,注射服用草甘膦后,观察到血液、肝脏与睾丸中氧化应激状态衰变,可能与繁殖性毒性关联[11]。而关于草甘膦是否会影响胚胎发育及其机制、早期胚胎对草甘膦的敏感浓度,却未见有详细报道,草甘膦的生态风险尚待揭示[12]。因此,我们利用热带爪蟾作为模式生物,研究草甘膦对早期胚胎发育的影响机制,热带虫蟾因其个体小、生长周期短,胚胎发育模式与人类相近,而且其基因组简单更适合作为模式生物用于人类基因的研究[13-14]。用不同浓度梯度的草甘膦处理热带爪蟾囊胚期的胚胎,通过检测胚胎死亡率、畸形率评价草甘膦对早期胚胎的发育毒性效应。同时,这些研究也将为环境评估中草甘膦安全浓度的设立标准提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 主要试剂。草甘膦(damas-beta)、人绒毛膜促性腺激素(HCG,宁波第二激素厂)、L-半胱氨酸以及二甲基亚砜(生工生物工程有限公司)、Nikon SMZ 1000 体视显微镜。0.1×MMR(0.1 mol/L NaCl、2.0 mmol/L KCl、1 mmol/L $MgSO_4$、2 mmol/L $CaCl_2$、5 mmol/L HEPES、0.1 mmol/L EDTA)。

1.1.2 试验材料。选自本实验室培养的性成熟的热带爪蟾及其胚胎。

1.2 试验方法

1.2.1 胚胎的获取。选取本实验室饲养的雌雄热带爪蟾多对,采用人工注射 HCG 的方法进行诱导产卵,用 2%半胱氨酸溶液去除卵外胶质膜,待发育到囊胚末期、原肠胚前期(stage9~10),对正常的胚胎进行染毒试验[15]。

1.2.2 胚胎的暴露试验(FETAX)。根据查阅资料及前期预试验,将草甘膦用二甲基亚砜(DMSO)溶解后稀释成 0、10^{-5}、10^{-4}、10^{-3}mol/L 4 个浓度,用 0.1×MMR 稀释成相应的浓度梯

基金项目 国家自然科学基金项目(31301148);浙江省新苗人才计划项目(KZS1512066)。
作者简介 刘阿梅(1990—),女,安徽阜阳人,硕士研究生,研究方向:发育毒理。*通信作者,副教授,博士,从事发育毒理研究。
收稿日期 2018-11-01

度，为了减少试验误差以及避免受精过程的不确定性，在囊胚期于显微镜下挑选发育正常的热带爪蟾胚胎，并从囊胚期开始染毒至原肠期结束（约 3 h）。用直径 10 cm 的培养皿作为染毒试验容器，加入 50 mL 草甘磷溶液，150 只 stage 9~10 发育良好的胚胎，每个浓度设置 3 个平行组，于恒温培养箱（26±0.5）℃黑暗培养 12 h，之后每 24 h 换一次液[14-15]。

1.2.3　显微观察。每间隔 6 h 记录各浓度组胚胎死亡、畸形的情况，用体视显微镜观察胚胎，并拍照和记录数据。

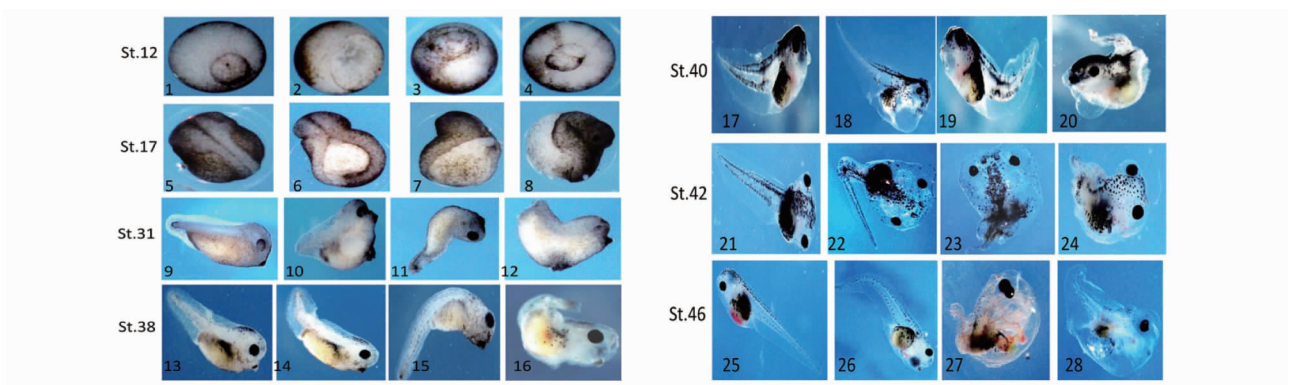
1.2.4　数据处理。运用 Spass13.0 统计软件进行数据统计和分析，采用 t 检验进行比较，统计学检验标准为 $P < 0.05$（*），$P< 0.01$（**）。

2　结果与分析

2.1　草甘膦处理热带爪蟾胚胎后形态观察　囊胚期与原肠胚时期是胚胎发育过程最关键的时期，在这 2 个时期，胚胎经历了三胚层的分化、细胞命运决定、细胞迁移等重要的生命过程，它是组织和器官原基形成的关键时期。假如，在这 2 个时期发育异常，将直接导致后期发育的正常进程。因此，挑选囊胚期（stage7~8）发育正常的胚胎，并进行不同梯度的草甘膦染毒试验，到 stage12（原肠胚末期）撤去草甘膦，并换上新鲜培养基继续培养 96 h。

当囊胚期与原肠胚期的胚胎进行草甘膦染毒处理后，爪蟾胚胎后期的发育受到不同程度的影响。胚胎在草甘膦处理后的毒性效应下，表现出不同程度的畸形现象（图 1）。其中图 1（1~4）为原肠胚期的胚胎（stage12），在草甘膦的作用下，此时期的胚胎表现出不同程度的发育迟缓（3~4），尤其表现在胚孔背唇不能闭合。图 1（5~8）为神经胚期胚胎（stage17），由于前期原肠期草甘膦染毒的影响，出现胚孔无法闭合（图 1），导致神经胚时胚胎不能正常形成神经板（6~8）。随着发育进程的继续，爪蟾胚胎的畸形率和死亡率继续在增加。在胚胎发育至尾牙期中期（stage31），图 1（9~12）表现出不同程度的腹方化与体节变短、断尾、眼睛发育异常以及脊柱弯曲等畸形表型。随着草甘膦毒性效应的积累，在胚胎发育至尾牙晚期 stage38，主要出现头部异常、脊柱弯曲和躯体色素减少等发育异常的症状[图 1（13~16）]。当胚胎发育至蝌蚪期时 stage40~46[图 1（17~28）]，草甘膦的毒性效应更为明显，出现大量围心腔水肿（18~19），尾巴弯曲（19，22，26），短尾和无尾，以及三角锥形大头等严重的畸形特征的表型现象（22，23，24，27，28），眼睛变小（18），以及心脏发育异常（27，28）。

同时，我们对胚胎染毒后的 24、48、72、96 h 等 4 个阶段胚胎的不同程度畸形进行统计（图 2），热带爪蟾的囊胚后期以及原肠胚期胚胎在受到草甘膦处理后，胚胎的正常发育的轨迹被扰乱，导致胚胎不同程度畸形，甚至死亡。主要表现发育迟缓、色素减少、脊柱和尾部弯曲、短尾和无尾、眼睛变小以及围心腔水肿等。表明，草甘膦对热带爪蟾胚胎产生严重的毒性效应，严重影响胚胎发育正常进行。



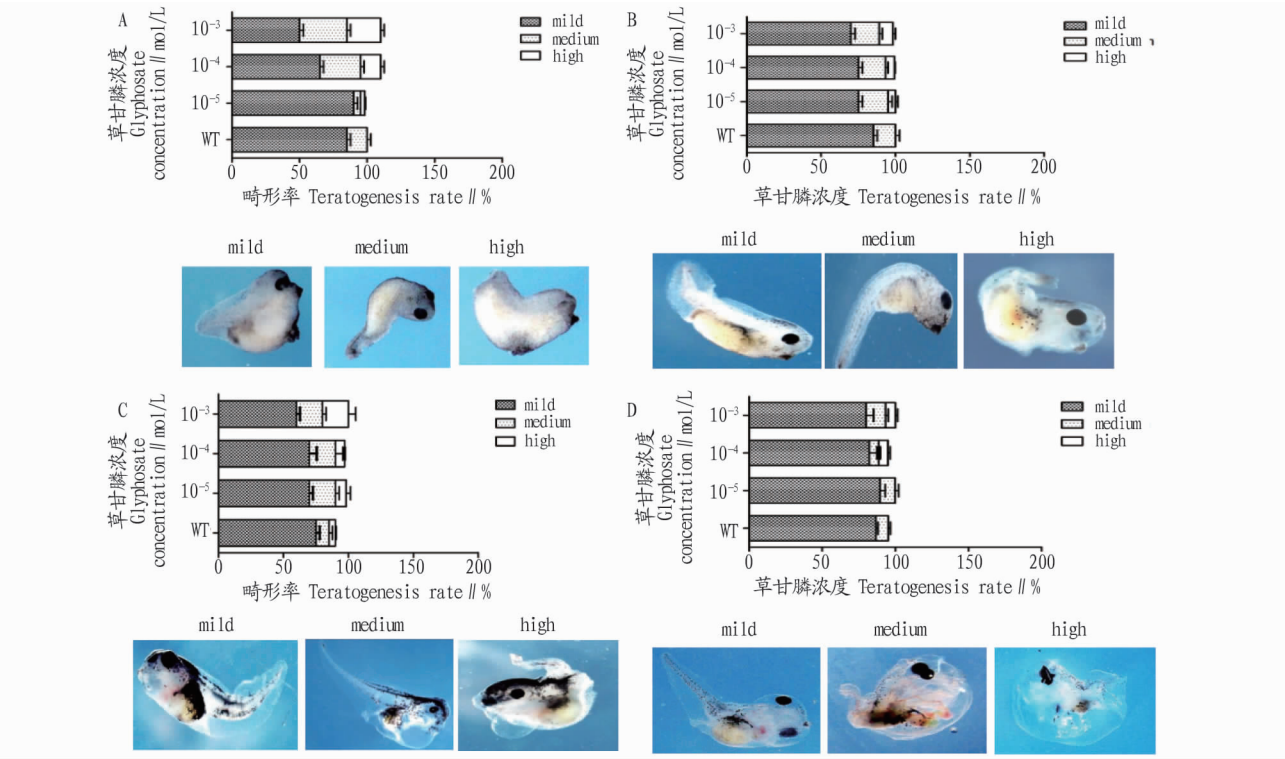
注：St12：stage12 原肠胚期胚胎（1~4）；1，对照组正常胚胎；3~4.实验组草甘膦处理后畸形胚胎；st17. stage17 神经胚期胚胎（5~8）；5.对照组正常胚胎，6~8.实验组草甘膦处理后畸形胚胎；st31.stage31 尾牙期中期胚胎，9.对照组正常胚胎，10~12.实验组草甘膦处理后畸形胚胎；st38.stage38 尾牙晚期胚胎（13~16）；13.对照组正常胚胎；14~16.实验组草甘膦处理后畸形胚胎；st40.stage40 蝌蚪期早期（17~20）；17.对照组正常胚胎；18~20.实验组草甘膦处理后的畸形胚胎；st42.stage42 蝌蚪期中期（21~24）；21.对照组正常胚胎；22~24.实验组草甘膦处理后的畸形胚胎后期胚胎；st46.stage46 蝌蚪期后期（25~28）；25.对照组正常胚胎；26~28.实验组草甘膦处理后的畸形胚胎

Note：St12.stage12 embryo at gastrula stage（1-4）；1.Normal fetus of control；3-4. Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group ；st17. Stage17 embryo at the neurula stage（5-8）；5.Normal fetus of control；6-8. Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group ；st31. stage31 embryo of middle tail period 9. Normal fetus of control；10-12. Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group .st38.stage38 embryo of late tail period （13-16）；13.normal fetus of control；14-16.Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group ；st40.stage40 early tadpole period（17-20）；17.Normal fetus of control；18-20.Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group ；st42.stage42 middle tadpole period （21-24）；21.Normal fetus of control；22-24.Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group ；st46.stage46 late tadpole period（25-28）；25.Normal fetus of control；26-28.Deformed embryo treated with glyphosate of experimental group

图 1　草甘膦对热带爪蟾胚胎发育的致畸效应

Fig.1　Teratogenic effects of glyphosate on embryonic development of *Xenopus tropicalis*

2.2　不同浓度的草甘膦对热带爪蟾胚胎发育畸形率和死亡率的影响　为探究草甘膦对胚胎毒性效应的剂量关系，草甘膦对热带爪蟾胚胎发育的总畸形率和死亡率的影响统计如图 3 所示。由图 3 可知，胚胎在 10^{-3} mol/L 草甘膦药物处理组的



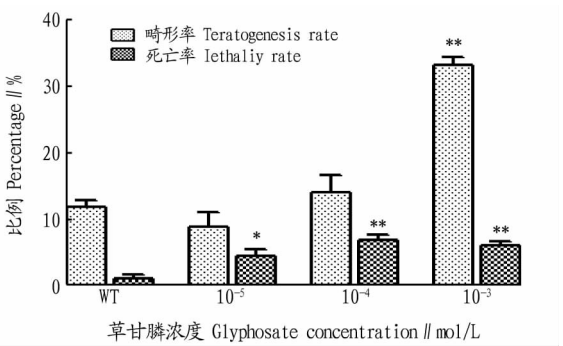
注:A、B、C、D 分别为胚胎染毒结束后的 stage31,stage38,stage40,stage46 等四个时期胚胎不同畸形程度百分比统计(n>100)

Note:A,B,C,and D are the percentages of different degrees of abnormality of embryos in stage 31,stage38,stage40,and stage46 after embryo exposure (n>100)

图 2 不同浓度草甘膦对不同时期胚胎的畸形程度进行统计

Fig.2 Statistics on the degree of malformation of embryos at different stages by different concentrations of glyphosate

畸形率与对照组呈显著差异($P<0.01$,其他处理浓度组中的畸形率没有明显差异($P>0.05$)。在胚胎死亡率的统计上,与对照组比较,草甘膦处理组死亡率明显上升($P<0.05$),尤其在10^{-3}mol/L组中死亡率显著增加($P<0.01$),神经胚期观察的10^{-3}mol/L草甘膦药物处理组死亡率呈显著差异($P<0.05$),在所有组别中,畸形率都明显大于死亡率,尤其在10^{-3}mol/L的草甘膦处理组中畸形率明显大于死亡率($P<0.01$)。



注:WT.对照组, 无显著性差异($P>0.05$);*. $P<0.05$;* *$P<0.01$

Note:WT.Control,no significant difference ($P>0.05$); * $P<0.05$; * * $P<0.01$

图 3 不同浓度草甘膦对热带爪蟾胚胎畸形率和死亡率的影响

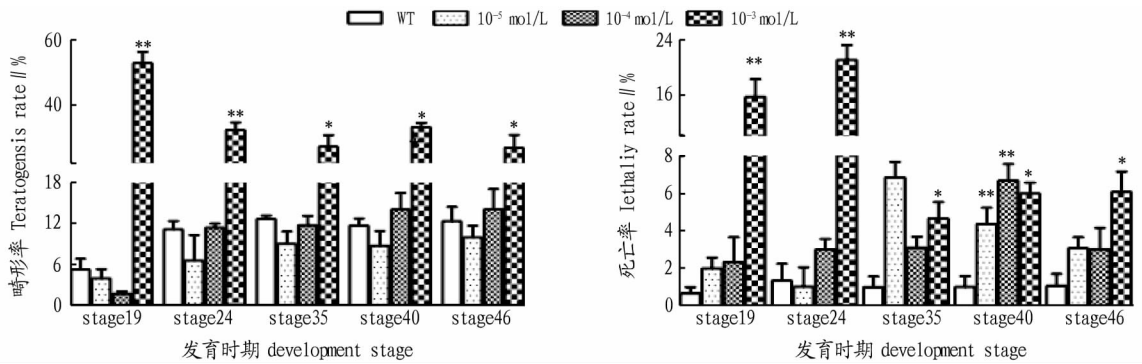
Fig.3 Effect of different concentrations of glyphosate on embryonic malformation rate and mortality of *Xenopus tropicalis*

2.3 草甘膦对不同时期热带爪蟾胚胎发育畸形率和死亡率的影响 胚胎发育是一个个体不断完善的动态过程,随着发育的进行,各部分组织和器官原基不断形成。由图 4 可知,不同时期胚胎的对照组与 10^{-3}mol/L 草甘膦处理组比较畸形率明显上升($P<0.05$ 和 $P<0.01$),同时在此处理组下,不同时期胚胎的畸形率随着发育的进行不断减小。处理组中不同时期胚胎的死亡率也是早期比晚期高。因此,统计草甘膦处理胚胎后不同时期的胚胎对于体内积累的毒素压力承受能力,分析不同时期胚胎的畸形率和死亡率的变化情况,评定胚胎抵御外界压力的能力。

3 讨论

3.1 草甘膦对热带爪蟾胚胎发育的影响 爪蟾胚胎致畸 YAA 试验(FETAX)是检测污染物发育毒性的常用检测方法[11],通过存活率、畸形率和抑制生长率等指标来表征化合物的毒性强弱[12-13],并在一定程度上反映受测污染物对机体的致畸机制[14,16]。试验表明,当草甘膦浓度达到 10^{-3}mol/L 时,它对热带爪蟾胚胎有极显著的毒性效应影响($P<0.01$)。伴随着较高的死亡率,草甘膦对胚胎还有大量的致畸作用,有小眼、围心腔水肿、尾部弯曲等畸形表型,其中表现出的腹方化是一种特异性的畸形表型。

这些结果可能是由于我们用草甘膦染毒对胚胎整个原肠期进行处理,使得草甘膦的毒性聚集干扰了胚胎原肠运动的进行。而原肠运动又是生命开始至关重要的一个环节[16],在此期间伴随着原肠细胞的时空定位指导组织和器官原基的形成,推动生命发生的有序进程。如果此过程被阻断,胚胎发育将产生缺陷如滞育、畸形甚至死亡。草甘膦处理热带爪蟾原肠期后,胚胎发育早期原肠末期导致胚孔不能闭合,神经胚期部分神经板不能正常形成,胚芽期后出现较



注:WT.对照组, 无显著性差异($P>0.05$);* $P<0.05$;* * $P<0.01$

Note:WT.Control,no significant difference ($P>0.05$);* $P<0.05$;* * $P<0.01$

图 4　草甘膦对不同时期胚胎的畸形率和死亡率的影响

Fig.4　Effect of glyphosate on malformation and mortality of embryos at different stages

为明显的小眼、围心腔水肿、尾部以及脊柱弯曲等畸形特征以及死亡现象。这些现象都可能是草甘膦积累毒性影响原肠运动中一些细胞命运决定基因的表达,从而影响胚胎发育。故而,接下来对于草甘膦致畸机制的研究,可从这一控制胚胎发育畸形表型基因着手。

除此之外,针对 10^{-5} mol/L 草甘膦处理的胚胎的畸形率与死亡率小于对照组的胚胎这种现象,说明 10^{-5} mol/L 和 10^{-3} mol/L 2 种浓度的草甘膦的致畸机制不同,在 10^{-5} mol/L 的浓度下,胚胎会受到某些因素的调控,使畸形率与死亡率比对照组低。可能的原因是胚胎抵御外界的能力在低浓度毒物暴露作用下升高的一种刺激反应,称此反应为"毒物兴奋效应"[17-18]。

3.2　草甘膦对于生态环境存在潜在危机　除草剂是最有效和经济的杂草防治方法,中国作为一个农业大国,在农业生产上应用除草剂,使主要农艺作物田中的杂草防治问题基本解决[19-20]。随着农业科学不断的发展,抗草甘膦作物研制成功,使草甘膦被广泛迅速应用于农业、园艺等作物杂草防治中。随着大量的使用,生物富集不断累加;通过食物链的各级消费者途径,无论是水生生物还是脊椎动物乃至人类体内都会不断残留。大量研究结果证明,草甘膦对生物会产生明显的毒性;草甘膦使用不当,很可能造成潜在生态危机。热带爪蟾的基因组与人类基因组有很多的共性,草甘膦对热带爪蟾胚胎发育产生明显的毒性作用,这可能警示它可能影响人类的生存发育状况。

4　结论

(1)草甘膦对热带爪蟾胚胎发育有显著的致毒作用;对胚胎死亡率、畸形率、体长造成影响,引起多种毒性效应。

(2)草甘膦对热带爪蟾的发育毒性可能是其干扰胚胎原肠运动过程中细胞命运决定基因的表达,致使胚胎发育不能正常进行。其次也可能是草甘膦影响胚胎内抗氧化相关基因的表达,导致胚胎抵御环境压力能力减弱。

(3)热带爪蟾的基因组与人类基因组有相当多的共性,更适合利用热带爪蟾做人类基因研究。因此,该试验结果可以在一定条件下推广至草甘膦对人类乃至其他脊椎动物的影响。

参考文献

[1] 汪健,付朝晖,徐茗,等.草甘膦的毒性及检测方法研究进展[J].中国工业医学杂志,2015,28(5):344-347.

[2] 周垂帆,李莹,张晓勇,等.草甘膦毒性研究进展[J].生态环境学报,2013,22(10):1737-1743.

[3] 朱国念,楼正云,孙锦荷.草甘膦对水生生物的毒性效应及环境安全性研究[J].浙江大学学报(农业与生命科学版),2000,26(3):309-312.

[4] HOKE R A,ANKLEY G T.Application of frog embryo teratogenesis assay-Xenopus to ecological risk assessment [J].Environmental toxicology and chemistry,2005,24(10): 2677-2690.

[5] American Society for Testing and Materials(ASTM). Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-Xenopus [M]//Annual book of ASTM standards.Philadelphia:ASTM,1998:826-836.

[6] CONTARDO-JARA V,KLINGELMANN E,WIEGAND C. Bioaccumulation of glyphosate and its formulation Roundup Ultra in *Lumbriculus variegatus* and its effects on biotransformation amd antioxidant enzymes[J].Environment pollution,2009,157(1):57-63.

[7] RELYEA R A. The lethal impact of Roundup on aquatic and terrestrial amphibians [J]. Ecological applications,2005,15(4): 1118-1124.

[8] 来松涛,魏于全,邓洪新,等.模式生物——爪蟾在生物医学上的应用[J].自然科学进展,2006,16(9):1074-1078.

[9] FORT D J,DEGITZ S J,TIETGE J,et al.The hypothalamic-pituitary-thyroid(HPT)axis in frogs and its role in frog development and reproduction [J].Crit Rev Toxicol,2007,37(1/2):117-161.

[10] NIEUEKOP P D,FABER J. Normal table of Xenopus laevis[R].Amsterdam: North Holland Publ Co,1994.

[11] BANTLE J A,FINCH R A,FORT D J,et al.Phase Ⅲ interlaboratory study of FETAX-part3. FETAX validation using 12 compounds with and without an exogenous metabolic activation system[J]. J Appl Toxicol,1999,19(6):447-472.

[12] FORT D J,ROGERS R L,PAUL R R,et al. Effects of pond water,sediment and sediment extract samples from New Hampshire,USA on early *Xenopus* development and metamorphosis; Comparison to native species [J].Journal of applied toxicology,2001,21(3):199-209.

[13] SHI H H,QIAN L J,GUO S Z,et al. Teratogenic effects of tetrabromobisphenol A on *Xenopus tropicalis* embryos [J]. Com Biochem Physiol C,2010,152(1):62-68

[14] 钱丽娟,刘青坡,郭素珍,等.爪蟾胚胎致畸实验(FETAX)在检测污染物发育毒性中的应用[J]. 安全与环境学报,2009,9(4):24-28.

[15] CHEN C Y,HATHAWAY K M,FOLT C L. Multiple stress effects of Vision® herbicide,pH,and food on zooplankton and larval amphibian species from forest wetlands [J]. Environmental toxicology and chemistry,2004,23(4): 823-831.

[16] 喻丹. 胚胎发育过程中细胞运动的分子机制:皮层蛋白介导斑马鱼和文昌鱼原肠化运动[D].青岛:中国科学院研究生院(海洋研究所),2005.

[17] 周琼芝. 低浓度 QACs 对小球藻生长及氮磷去除的毒物兴奋效应[D].湘潭:湘潭大学,2016.

[18] 张哲. 草甘膦对六种海洋微藻的毒性兴奋效应研究[D].青岛:中国海洋大学,2010.

[19] 张翼翾.全球抗草甘膦杂草的概况[J].世界农药,2018,40(3):38-45.

[20] 姜伟丽,马小艳,任相亮,等.转基因抗草甘膦棉栽培地生存竞争能力[J].生物安全学报,2018,27(1):59-62.