研究简报

三氯杀螨醇对大型 的毒性和环境雌激素效应

刘永梅 陈 伟 李敦海 刘永定
(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

REPRODUCTION TOXICITY AND ESTROGENIC EFFECTS OF DICOFOL TO *DAPHNIA MAGNA*

Liu Yong-Mei, CHEN-Wei, LI Durr-Hai and LIU Yong-Ding

(Institute of hydrobiology, The Chinese Academy of Science, Wuhan 430072)

关键词: 大型 ; 重组雌激素受体基因酵母; 三氯杀螨醇; 毒性效应; 雌激素活性
Key words: *Daphnia magna*; Recombinant gene yeast; Dicofol; Toxicity effects; Estrogenic effects
中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2004)03-0330-03

三氯杀螨醇是 DDT 被禁用以后出现的替代品, 在很多国家包括中国在内被广泛用作果树、棉花等的杀螨剂, 对高等动物的急性口服毒性很低, 但它的慢性毒性较大。已有报道显示由 DDT 合成而来的三氯杀螨醇可使美国红隼的蛋壳变薄[1], 与某些野生动物如佛罗里达湖中鳄鱼雌性化具相关性[2], 甚至导致人体某些恶性肿瘤[3]等。由于三氯杀螨醇性质非常稳定, 残留期长, 所以过去对该农药研究热点主要是在蔬菜、果品等食品中的残留及降解动态, 而对水生生物的毒性尚未见报道, 而且对其雌激素活性的报道仅限于小鼠子宫增重法[4]等活体实验方法, 周期长且由于生物个体差异等造成灵敏度低。而通过重组雌激素受体基因/β-半乳糖苷酶报道基因, 将其转入酵母细胞, 该重组基因酵母可作为环境雌激素检测中的基础测试方法, 具有简便、快捷, 且能通过测定由雌激素活性物质结合雌激素受体之后, 在蛋白质转录和合成过程中合成的β-半乳糖苷酶的活性来定量检测出暴露化学品的类雌激素活性[5—7]。本文用大型 和转基因酵母分别对三氯杀螨醇的环境毒性和雌激素活性进行了研究。

1 材料与方法

1.1 材料 所用的三氯杀螨醇标样系江苏扬农化工集团有限公司生产并惠赠, 用二甲亚砜(DMSO)配制; 雌二醇为 Sigma 公司产品; 大型 由本所提供, 培养方法参照孙美娟[9]等。实验用 1—2 龄的幼 。同一实验采用同一个母体的后代; 本实验所用转基因酵母是由曼彻斯特大学 Sumpter 教授提供。

1.2 方法 毒性实验按照文献中规定的 类毒性实验方法[9]进行。试验过程水温控制在 25±1℃。酵母菌种的培养及实验方法参照吴文忠[5]等报道, 并略有改进。将过夜培养物稀释至 OD_{600}为 0.5, 作为工作液。移取 995μL 菌液至 Epperndorf 管中, 分别加入 5μL DMSO(空白)和 5μL 用 DMSO 溶解的雌二醇(阳性对照)和 5μL 用 DMSO 溶解的样品, 然后于 130r/min, 30℃空气浴摇床培养 2h。培养结束后首先移出 800μL 于分光光度计(Ultrospec® 3000)上测定培养液的 OD_{600}(以培养基为空白)。然后向剩余 200μL 菌液中依次加入 620μL β-半乳糖苷酶检测缓冲液、50μL 氯仿和 200μL 检测底物溶液, 充分混合, 启动酶反应, 并于摇床中继续培养。待反应产生的黄色越来越强时, 加入终止液终止反应。15000r/min 离心 10min, 取上清于波长 420nm 处测其吸光度。酶反应过程对雌二醇约需 30min, 对三氯杀螨醇约需 50min。

1.3 数据处理 LD_{50}值采用概率单位法计算; 亚慢性毒性实验结果采用方差分析和多重比较的方法进行处理[9]。环境雌激素毒性计算方法: $y=[a\times x/(b+x)]+c$[10]

式中: y 为响应值(β-半乳糖苷酶的活性); x 为测定的"雌激素类物质"浓度; a 为 EC_{50}(g/L); b 为最大酶诱导活性; c 为最低检测限。

收稿日期: 2003-03-02; 修订日期: 2003-05-10
基金项目: 中国科学院知识创新工程重大项目(KZCX1-SW-12); 国家重大环境课题"滇池蓝藻水华污染控制技术研究"(K99-05-35-01); 973 项目(2002CB412300); 中国科学院方向性创新课题(220316)资助
作者简介: 刘永梅, 女, 河南唐河县人; 博士研究生
通讯作者: 刘永定, E-mail: liuyd@ihb.ac.cn

β-半乳糖苷酶活性的计算:

$$u = C_N / t \cdot V \cdot D \cdot OD_{600}$$

式中: t 为酶反应时间(min); V 为测定时培养细胞的体积(0.2mL); D 为测定 OD_{600} 时酵母的稀释因子; OD_{600} 为测定培养液在600nm 时的吸光度; C_N 为酶活测定中420nm 时邻硝基酚的浓度(μmol/L)。

$$C_N = 10^{-6}(A_s - A_B)/\varepsilon \cdot d$$

式中: A_s 为样品在420nm 的吸光度; A_B 为空白样品在420nm 的吸光度; d 为比色皿的光径(一般为1cm); ε 为酶测定缓冲溶液的摩尔吸光系数(一般为 $4.666 \times 10^3 cm^2/mol$)。

2　结果与讨论

2.1　急性毒性

根据急性毒性实验中各浓度组　的死亡率(未列出), 在概率单位-浓度对数关系图(图1)上分别求出不同时间的 LD_{50} 值, 结果列于表1。

表1　三氯杀螨醇对大型　急性中毒的 LD_{50} 值

Tab. 1　Value of LD_{50} of dicofol to *D. magna*

致毒时间 (h)	LD_{50} (mg/L)	95% 可置信限 (mg/L)
24	0.74	±0.12
48	0.37	±0.11
72	0.20	±0.09
96	0.07	±0.08

2.2　亚慢性毒性

从小于24h 幼　开始暴露, 至产完一代结束的实验中, 对照组和6.2、11.4、20.0μg/L 组均在暴露4d 的时候开始产卵, 而36.0、64.0和113.8μg/L组至第5d才开始产卵。各浓度组的子代在不加三氯杀螨醇培养时, 发育、成熟均比对照组慢。表2列出了经三氯杀螨醇暴露的大型　其亲代 P 和子代 F_1 的平均产卵数。

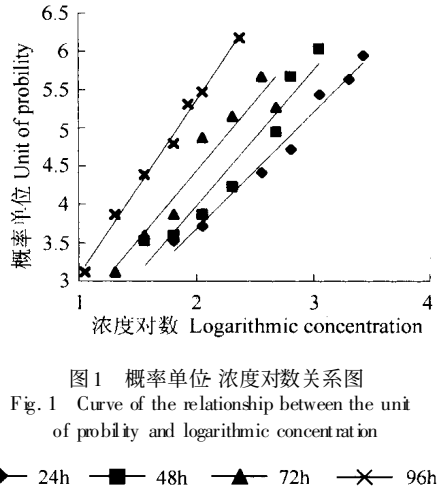


图1　概率单位-浓度对数关系图

Fig. 1　Curve of the relationship between the unit of probility and logarithmic concentration

为检验不同浓度的三氯杀螨醇对大型　繁殖数量差异的显著性, 对实验结果进行方差分析和 F 检验。在亲代繁殖实验中, 各浓度组间差异不显著($F < F_{0.01}$); 在 F_1 代繁殖实验中, 各浓度组间差异显著($F > F_{0.05}$)。通过对 F_1 代平均产数组间均数差异的比较, 若差异大于 D 值(D 为在5%水准处有显著性的差数, $D = Q\ S_{mean}$), 则表示差异显著。结果表明, 6.2、11.4、20.0μg/L 组与对照组无显著差异, 而36.0、64.0和113.8μg/L 组与对照组则有显著性差异。即在 F_1 代繁殖实验中, 三氯杀螨醇对大型　生殖的 NOEC 和 LOEC 分别是20.0和36.0μg/L, 说明在25±1°C 时, 三氯杀螨醇对大型　的慢性毒性阈限在20.0—36.0μg/L 之间。

表2　三氯杀螨醇对大型　繁殖的影响

Tab. 2　Effects of dicofol on the reproduction of *D. magna*

	实验动物	浓度(μg/L)						
		0	6.2	11.4	20.0	36.0	64.0	113.8
平均产卵数/只 (mean±S)	P	13±1.51	13±1.92	10±1.22	9.2±1.30	8.2±1.48	9.8±0.83	7.6±1.14
	F_1	13±1.48	14±0.89	13±1.14	13±1.30	6.4±1.51	5.4±1.14	4.4±1.52

2.3　环境雌激素活性

利用重组基因酵母测定三氯杀螨醇的雌激素活性, 同时以雌二醇作阳性对照, 其剂量-效应关系曲线如图2, 3所示。

根据实验结果计算, 雌二醇对酵母细胞的 EC_{50} 为 0.13×10^{-7} g/L, 而三氯杀螨醇对酵母细胞的 EC_{50} 则为 0.21×10^{-4} g/L, 约为前者的1600倍, 两者相差3个数量级。

2.4　结论

1) 有机氯农药三氯杀螨醇对水生生物大型　的存活和繁殖都有一定的毒性效应。

2) 根据亚慢性毒性实验的结果, 大型　经亲代的暴露, 在其子代繁殖中仍然能表现出抑制效应。如果这类农药大量的进入环境, 就可能通过生物富集放大和食物链网造成在动植物体内、甚至在人体内的积累, 并产生危害。

3) 本实验结果也进一步证实了三氯杀螨醇具有类雌激素活性, 是危害野生动物和人类健康的重要的环境类雌激素污染源之一。Vonier[11] 曾报道的三氯杀螨醇竞争结合雌激素受体所需浓度比雌二醇本身所需浓度约高6000倍; 赵炳顺[10] 等人报道的三氯杀螨醇使小鼠子宫增重的有效剂量约为雌二醇的4000倍, 而本研究利用重组基因酵母细胞测定三氯杀螨醇的有效剂量约为雌二醇的1600倍。同时, 转基

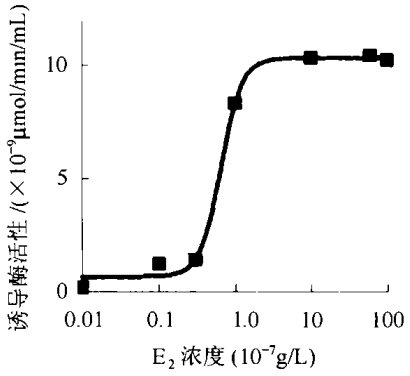


图 2 雌二醇雌激素活性剂量-效应曲线

Fig. 2 Dose response curve for E_2 in the yeast estrogen bioassay

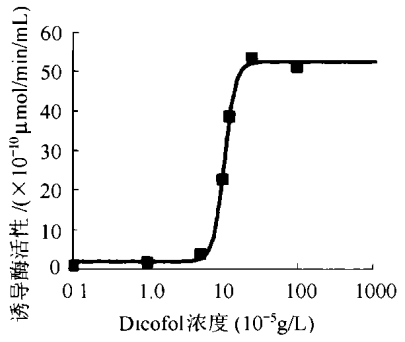


图 3 dicofol 雌激素活性剂量-效应曲线

Fig. 3 Dose response curve for dicofol in the yeast estrogen bioassay

因酵母作为一种筛选环境雌激素活性物质的实验方法, 具有快速、灵敏、易于操作且费用低廉等优点, 可望在我国被广泛地应用于环境雌激素毒性的预警和监测工作。

参考文献:

[1] Donald R, Clark J R, Spann J W, *et al*. Dicofol (Kelthane)-induced eggshell thinning in captive American kestrels [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1989, **9**(8): 1063—1069

[2] Margie P A, Testing deadline for encocrine disrupters. [J]. *Environ Sci & Tech*, 1996, **30**(12): 540A—544SA

[3] Qiu D R, Wu Z B. Effects of Environmental Estrogens on Animals and Humans [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1997, **21**(4): 365—374. [邱东茹. 吴振斌. 环境雌激素对动物和人体的影响及其作用机制. 水生生物学报, 1997, **21**(4): 365—374]

[4] Zhao B S, *et al*. Bioassay of estrogenic effect of dicofol using uterine weight method in mice [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, **20**(2): 244—247. [赵炳顺等. 小鼠子宫增重法检测国产三氯杀螨醇的雌激素生物活性. 环境科学学报, 2000, **20**(2): 244—247]

[5] Wu W Z, Wang J X, *et al*. Recombinant gene yeast for assaying environmental estrogen pollutants [J]. China Environmental Science, 2002, **22**(1): 60—63. [吴文忠, 王敬贤等. 重组基因酵母检测环境类雌激素污染物. 中国环境科学, 2002, **22**(1): 60—63]

[6] Rehmann K, Wu W Z, Chen J, *et al*. Xenooestrogens in unexpected places-First results from the application of a yeast estrogen assay on non aqueous environmental samples [J]. *Industrial Toxicology*, 1999, **307**: 129—131

[7] Routledge E J, Sumoter J P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen [J]. *Environ Toxical and Chem.*, 1996, **15**(3): 241—248

[8] Sun M J, Zhang Y Y, Cai J P. Preliminary study of breeding and biology of Daphnia magna HB, a high-tempreture-resistant species [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 1991, **15**(2): 166—173. [孙美娟, 张甬元, 蔡俊鹏. 一种耐高温大型 HB 的培养和生物学的初步研究. 水生生物学报, 1991, **15**(2): 166—173]

[9] Wang D M, Wang M X, Luo S Y, *et al*. Mannual of inspecting on hydrobiology [M]. Nanjing: Southeast university press, 1993. 44—45 [王德铭, 王明霞, 罗森源等. 水生生物监测手册. 南京: 东南大学出版社, 1993. 44—45]

[10] Rehman K, Schran K W, Ketterup A. Applicability of a yeast estrogen screen for the detection of oestrogen-like activities in environmental spmples [J]. *Chemosphere*. 1999, **38**(14): 3303—3312

[11] Vonier F M, Crain D A, Mclachlan J A, *et al*. Interaction of environmental chemicals with the estrogen progesterone receptors from the oviduct of the American alligator [J]. *Environ Health perspect*, 1996, **104**: 1318—1322