三丁基锡化合物对稀有鮈鲌的急慢性毒理研究*

周群芳 江桂斌** 刘稷燕
(中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085)

摘要 研究了三丁基锡氯化物(TBTCl)对稀有鮈鲌的急性(12 h)与慢性(7 或 14 d)毒理效应. 结果表明, 暴露后的稀有鮈鲌对水中三丁基锡具有显著的生物富集作用. 其性肉指数与肝肉指数在慢性暴露时有明显变化. 透射电子显微镜观察暴露鱼腮与肝脏超薄切片表明, 三丁基锡可引起腮与肝脏细胞超微结构的一系列显著变化, 证实了三丁基锡化合物对水生生物的毒性作用. 实验结果表明稀有鮈鲌是一种灵敏的实验鱼种, 其暴露体系可广泛用于有机金属化合物的毒性效应研究.

关键词 三丁基锡 稀有鮈鲌 毒理 透射电子显微镜

三丁基锡化合物是一种常见船舶防污涂料的防嗅剂, 它可有效抑制水生生物在船体上的附着从而延长船舶使用寿命. 这些化合物具有水溶性低[1], 对附着生物毒性强[2]的特征. 它们在防污涂料中缓慢释放, 有效使用期长, 这大大节省了水中器具的维护费用, 因而其使用日益广泛. 然而它对非目标敏感水生物的毒性作用也非常明显. 目前由于这种化合物的渗透与扩散而造成水域的污染已相当严重, 许多敏感水生物已受到一定程度的毒害. Bryan 等[3]曾揭示了三丁基锡对腹足纲软体动物的高毒性, 其中浓度低达 0.02 μg Sn/L 的三丁基锡就可诱导 *Nucella lapillus* 发生性畸变. 作为人类营养主要蛋白源的鱼类同样也是水域中高毒性三丁基锡化合物的受害者[4,5]. 寻找并建立一种灵敏有效的鱼类实验动物模型有助于揭示环境水平三丁基锡的潜在危险性.

本文通过在实验室中建立的稀有鮈鲌(*Gobiocypris rarus*)-水环境的三丁基锡暴露模拟体系, 研究了鱼体对外源毒物的富集作用及毒性效应, 为探讨三丁基锡通过食物链传递对人类可能产生的影响提供了毒理学数据和实验方法基础.

1 实验部分

1.1 仪器、试剂和实验材料

Shimadzu GC9A 气相色谱仪(日本); 色谱柱为 HP-1 熔融石英毛细管柱, 25 m × 0.32 mm ID, 固定相为聚二甲基硅氧烷, 液膜厚度为 0.17 μm; 柱温采用程序升温: 起始温度 50℃(保持 1 min), 以 10℃/min 的速率升温至 200℃(保持 5 min); 载气为高纯氮气, 柱口压力: 0.26 mPa. 进样器温度设置为 220℃; 检测器为实验室自制表面发射火焰光度检测器, 其中氢气为燃烧气体, 流速为 260 mL/min; 空气为助燃气, 流速为 90 mL/min. 测定时使用 394 nm 滤光片, 检测器温

2002-04-20 收稿, 2003-01-14 收修改稿
* 国家自然科学基金重点基金(批准号: 20137010)和中国科学院(KZCX2-414)资助项目
** 联系人, E-mail: gbjiang@mail.rcees.ac.cn

度控制在 160℃.

LKB-V 型切片机与 JEM-100cx 透射电子显微镜用于鱼腮与肝脏细胞超微结构的观察.

三丁基锡氯化物(TBTCl, 90%)与四丁基锡(TeBT, 96%)购自美国 Acros Organics (New Jersey). 将适量三丁基锡化合物溶于丙酮-水(1∶1)中以配置 1 mg TBTC l/mL 的储备液, 其中加入少量浓 HCl 以增强其稳定性. 将此储备液密封保存在 4℃冰箱中. 工作溶液为使用前用去离子水新鲜配置的 50 μg TBTC l/mL 溶液. 其他试剂均为分析纯.

稀有鮈鲫为 1 年龄鱼, 来自中国科学院武汉水生研究所.

1.2　实验设计

稀有鮈鲫在暴露前在本实验室驯化 1 周. 它们养殖在标准无病害环境下, 每天投喂市售线虫 2 次. 实验鱼生活水质参数如下: pH 为 6.9~7.9; 氧浓度为 5~7 mg/L; 硬度为 200 mg $CaCO_3$/L; 电导率为 650 μS/cm; 水温控制在 24.2~27.1℃范围内. 白天/黑夜循环时间是 12/12 h. 养殖密度为每升水中养殖 1 g 鱼. 每天更换总水量的 1/3 以确保适宜的水质和稳定的暴露浓度.

在慢性暴露实验中, 设置 50, 500 和 5000 ng TBTCl/L 三个浓度的暴露体系, 其中分别养殖 20 条鱼(雌雄比例为 1∶1), 暴露 1 周后取其中 10 条进行测试, 暴露 2 周后取其余 10 条进行测试. 在急性暴露实验中, 设置 50, 100 μg TBTCl/L 二个浓度, 分别养殖 20 条鱼(雌雄比例为 1∶1)直至其全部死亡. 另外 10 条鱼在净水中饲养作为对照组. 采样后鱼体称重, 并解剖鱼体取肝脏及性腺称重, 以获得肝肉指数及性肉指数. 另外, 典型慢性(5 μgTBT/L, 2 周)与急性(100 μg TBT/L)暴露鱼体腮与肝脏超薄切片以进行细胞学分析. 将鱼体冷冻保存用以测定其中丁基锡的含量.

1.3　鱼体中丁基锡分析

取各试验组匀浆鱼体肌肉组织 2 g(湿重), 加入 0.3 mL 内标四丁基锡(2 μg/mL), 混匀后再加入 10 mL 四氢呋喃(THF)-HCl(11∶1)溶液将所有丁基锡均转化为其相应的氯化物, 而后用 25 mL 0.01% tropolone-正己烷溶液和 10 mL 正己烷依次萃取 40 及 10 min. 合并的萃取液 25℃旋转浓缩到 2~3 mL 后加入 1 mL 2.0 mol/L (*n*-Pe)MgBr 在室温下振摇 15 min 以发生充分的丙基衍生反应. 过量格林试剂以 5 mL 0.5 mol/L H_2SO_4 溶液破坏除去, 加入 20 mL 正己烷萃取被分析物并用约 40 mL 去离子水洗涤. 相分离后的有机相浓缩到 1 mL, 并通过一用 10 mL 己烷预淋洗过的填充有无水 $NaSO_4$ (2 g)与 Florisil (1 g)的 Pyrex 柱干燥净化, 而后加入 10 mL 正己烷淋洗. 取 1 μL 淋出液进行气相色谱-表面发射火焰光度检测分析.

1.4　鱼肝细胞超微结构观察

取对照组稀有鮈鲫及 5 μg TBT/L(2 周)与 100 μg TBT/L 暴露组鱼腮与肝脏经戊二醛固定, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液洗涤, 系列丙酮溶液脱水、1%锇酸后固定, Epon 812 包埋, LKB 切片机超薄切片, 醋酸铀、柠檬酸铅染色, JEOL JEM-100cx 电子显微镜观察.

2　结果与讨论

2.1　实验鱼的选择

稀有鮈鲫(*Gobiocypris rarus*)是我国特有的一种小型鲤科鱼类, 属于鲃亚科(*Danionionae*), 鮈鲫属(*Gobiocypris*), 仅分布于四川汉源县境内. 这种鱼类具有个头小, 生命力强, 温度适应范围广, 饲养方便, 繁殖周期短, 分批产卵, 产卵批次多, 繁殖期长, 对化学毒物敏感等一系

列优点, 与世界上常用的小型实验鱼类相比具有相似的生物学特点[6], 有望成为一种理想的毒性试验材料而得到广泛运用.

2.2 实验鱼生活行为

在整个实验过程中, 实验鱼的生活行为得到了详细观察. 对照组实验鱼在全观察过程中行为无明显变化. 慢性暴露组实验鱼在投毒后 2 h 内较对照组稍有不适症状: 它们聚集在鱼缸角落中, 吻与鳃盖运动频率加快, 其中尤其以 5000 ng/L 暴露组症状最为明显, 约 24 h 后, 鱼体逐渐适应周围环境, 其活动恢复正常, 在整个暴露期间无死亡、行为或摄食量改变的现象发生. 急性暴露组实验鱼在投毒后不适症状相当明显: 在开始 2 h 中, 大多数鱼聚集伏于水底, 并有向鱼群中钻的倾向, 其鳃盖每 3~4 次正常运动后大幅度用力运动一次, 不摄食, 不游动; 投毒 2 h 后, 实验鱼身体逐渐开始失去平衡, 时有向上冲游症状, 时而冲向鼓气头, 而后无力自然落下; 取失去平衡的实验鱼 2 尾回放于清水中, 症状无缓解, 不久死亡; 100 μg/L 的实验鱼在 3.5 h 内全部死亡, 50 μg/L 的实验鱼在 7 h 内全部死亡.

2.3 肝肉指数与性肉指数

肝肉指数与性肉指数可通过如下公式计算:

$$\text{肝肉指数(性肉指数)} = \frac{\text{新鲜鱼体肝脏(性腺)重量}}{\text{新鲜鱼体总重量}} \times 100$$

结果显示在慢性中毒组中, 实验鱼体肝肉指数随暴露时间与暴露浓度的增加而呈现下降趋势, 其中暴露于 5 μg TBT/L 中 2 周的鱼体肝肉指数仅为对照组的 36%, 而在急性中毒中, 其肝肉指数无明显变化. 肝脏是鱼体内解毒的重要器官, 对于慢性中毒鱼体, 其肝脏长期暴露在毒物作用下, 因而将会受到严重破坏性影响. 而对于急性中毒鱼体, 其呼吸系统首先受到直接影响, 鱼体一般在其肝脏作出相应变化前就已窒息死亡, 因而其肝肉指数较对照组没有明显变化. 由此可见, 本实验得到的上述结论可得到合理解释. 另外, 由此可初步认为对于一般毒性实验, 肝肉指数可作为一个灵敏的响应指标用于评估污染物对实验动物的慢性毒性效应.

在三丁基锡急慢性暴露后性肉指数也出现了显著变化. 其中, 慢性暴露实验中雄性鱼性肉指数随暴露浓度与暴露时间的增加而增加, 雌性鱼性肉指数变化趋势则恰好相反. 有机锡化合物的雄性化效应[7,8] 可在一定程度上解释这一现象. 据报道[9]三丁基锡可干扰类固醇化合物的生物合成, 抑制雄性激素转化为雌激素, 从而导致三丁基锡暴露下的生物体内高水平雄性激素(雄烯二酮和睾丸激素)的富集, 因而在慢性暴露实验中, 鱼体中上述性激素的长期不平衡很有可能导致相应性器官的变异. 在急性中毒实验中, 鱼体在短时间内窒息死亡, 其性肉指数较对照组没有显著变化. 由上述实验结果可知, 性肉指数可作为环境激素对实验动物慢性暴露中的一个灵敏指标.

2.4 丁基锡在鱼体中的富集效应

暴露在各 TBT 浓度下的稀有鮈鲫体内富含高浓度的三丁基锡及其脱烷基的代谢或降解产物二丁基锡与一丁基锡, 其含量达几百乃至几千 ng Sn/g 水平. 当以相同单位比较时, 鱼体内丁基锡水平远高于相应的暴露浓度, 其生物富集因子高达 10^2~10^3, 这与以前报道的结果相吻合[10]. 并且, 在本实验慢性暴露实验中, 鱼体中富集的总丁基锡含量随暴露时间与暴露浓度的增加而呈线性增加趋势, 其中暴露 1 周的线性关系 R^2 = 0.9927; 暴露 2 周的线性关系 R^2 = 0.9996, 所以可推断在一定暴露浓度与时间范围内鱼体中丁基锡的富集是剂量相关的. 而在急

性暴露实验中, 实验鱼体中的总丁基锡含量可在很短时间内达到很高水平, 由于本文仅设置 2 个暴露实验组, 并且实验鱼在很短时间内全部死亡, 所以急性暴露浓度与鱼体内富集的丁基锡含量间的关系仍需进一步深入研究. 由于丁基锡是一种脂溶性很强的化合物, 它为鱼体摄入后很容易在鱼体脂肪中富集, 因而导致鱼体中高水平的丁基锡存在. 由此可见, 稀有鮈鲫体内的生物富集可作为一种灵敏的生物指示物来反映周围水环境中的丁基锡污染现状.

2.5　透射电子显微镜观察结果

慢性暴露鱼体与急性暴露死亡鱼体表观无显著变化. 暴露于 5000 ng TBT/L 下 2 周与暴露于 100 μg TBT/L 下急性死亡鱼体腮与肝脏细胞的显微变化通过透射电子显微镜得到了观察. 其被污染物诱导产生的一系列细胞结构变化详述如下.

鱼腮　空白对照组鱼腮细胞形态正常, 结构清晰, 无异常细胞器存在(见图 1(a)). 然而在 100 μg TBT/L 暴露组鱼腮中可观察到细胞核的碎裂(图 1(b)), 自食泡的形成(图 1(c)); 同样在 5 μg TBT/L 暴露组鱼腮液可见细胞核的变形(图 1(d)), 以及自食泡的形成.

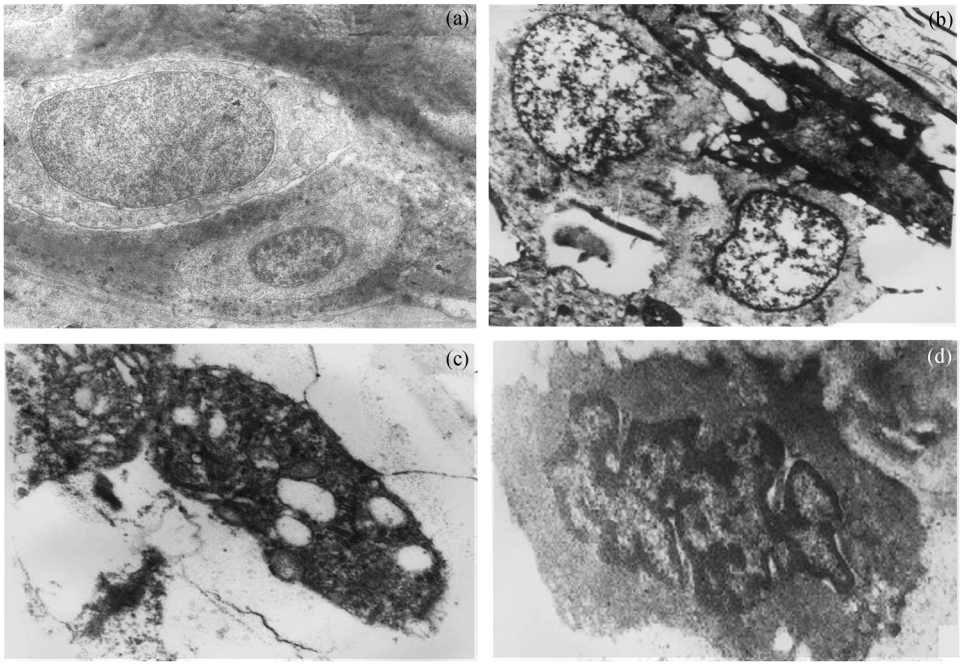


图 1　急性(100 μg TBT/L)与慢性(5 μg TBT/L)暴露组稀有鮈鲫腮细胞透射电子显微镜结构
(a) 对照组鱼腮细胞, 细胞形态正常, 结构完整, ×8100; (b) 急性暴露组鱼腮, 细胞核破裂, ×49000; (c) 急性暴露组鱼腮, 形成自食泡, ×24000; (d) 慢性暴露组鱼腮, 细胞核变形, ×17000

我们知道呼吸系统提供了鱼类与周围水环境最广的接触界面, 因此鱼腮通常是受污染物影响的第一个体系. 当发生急性暴露死亡时, 它通常是由于呼吸动态平衡失控. 循环体系为整个鱼体提供了必需的营养物质, 然而血流的速度和其分布主要建立在循环系统的动态平衡基础上, 因而呼吸系统受损同样可引发心血管系统对于污染物的响应, 由此将严重影响鱼体健康乃至危及生命. 从上述实验结果可见, 无论在急性还是慢性暴露条件下, 鱼腮细胞显微结构均发生了一系列相应的变化. 其中自食泡是在细胞老化或受损死亡条件下经常形成的一种特

征结构. 在暴露组中自食泡的高频出现有力证明了鱼腮在污染物三丁基锡存在下受到严重影响. 另外细胞核也是控制整个细胞生命活动的关键所在, 它提供了 DNA 和 RNA 转录和翻译的场所, 其受毒物影响而引起的碎裂或变形扭曲将严重影响其正常的生理功能, 同样这也确证了污染物对鱼腮细胞的直接毒害效应.

肝脏 空白对照组鱼肝脏细胞, 结构正常, 胞质均一, 内质网形态正常, 排列高度有序, 粗面内质网附着着许多核糖体颗粒, 线粒体丰富, 内外膜结构清晰, 嵴明显而且数量很多, 结构完整, 其显微结构如图 2(a)所示. 在 100 μg TBT/L 急性暴露条件下未见有显著的细胞显微结构变化. 然而, 在 5 μg TBT/L 慢性暴露实验组鱼肝细胞中则可发现一系列明显变化, 其细胞结构如图 2(b)所示. 其中最为显著的现象是细胞空泡化严重, 另外线粒体与粗面内质网存在很少.

众所周知, 肝脏是动物重要的解毒器官, 动物长期暴露于毒物的条件下, 必将引发肝脏的一系列病症, 本实验中上述肝脏细胞显微观察结果证实了这一点. 其中肝脏细胞空泡化是鱼类肝脏对各种化学毒物的常见响应. 肝脏细胞中空泡的增加表明肝细胞脂滴, 水或肝糖含量增加, 这与其他文献结论一致[11,12]. 与对照组鱼肝细胞相比, 线粒体与粗面内质网的明显减少也反应了三丁基锡对鱼体的毒性效应. 一些文献也报道了几种污染物如 PCB 或 PAH 暴露可引起粗面内质网的下降[13]. 对于急性中毒鱼体, 首先受影响的是鱼腮, 由于鱼腮结构破坏导致其呼吸系统正常功能受阻, 并由此引发循环系统的障碍, 最终导致死亡, 因而其肝脏尚未及作出相应反应, 实验结果也证明 100 μg TBT/L 急性暴露组鱼体肝脏的透射电子显微镜照片较对照组无显著差异. 因而根据上述结果分析可知鱼肝细胞可作为鱼体对外界毒物慢性长期作用的响应组织, 通过它们可灵敏监测周围水环境污染物对鱼体的毒性效应.

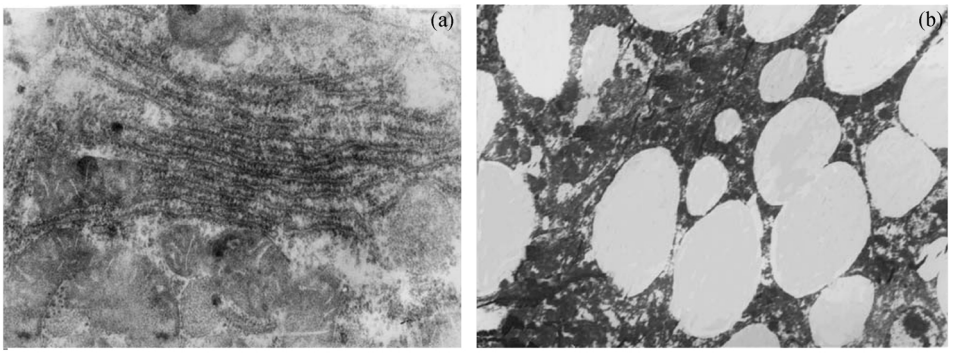


图 2 对照组与慢性(5 μg TBT/L)暴露组稀有鮈鲫肝细胞透射电子显微镜显微结构

(a) 对照组鱼肝细胞, 粗面内质网排列高度有序, 线粒体丰富, ×33000; (b) 慢性暴露组鱼肝细胞, 细胞空泡化, ×24000

2.6 稀有鮈鲫与其他实验鱼类暴露结果的比较

有关三丁基锡对鱼类的毒性研究已得到广泛报道. 流水体系中暴露于 0.5 或 2.0 μg/L 二(三丁基锡)氧化物的红鳟鱼(Oncorhynchus mykiss) 富集因子达 900, 并且其游泳轨迹不表现沿圆形水缸游的方向性[4], 脑部组织(中脑盖和视神经)的超微结构观察表明空泡化现象发生; 中脑盖纤维加黑, 有髓鞘和无髓鞘纤维区域的坏死. 中脑盖中的暗细胞数目的增加[14]. Oncorhynchus tshawytscha 的 6, 12 和 96 h LC_{50} 分别为 54, 20 和 1.5 μg TBTO/L, 测定死亡大马

哈鱼(Chinook Salmon)的肝脏, 脑子和肌肉组织中 TBT 浓度发现它们分别为 7.0, 3.5 和 0.52 μg TBT/g 湿重. 存活 4 d 的大马哈鱼的肝脏, 脑子和肌肉中 TBT 浓度为 4300, 1300 和 200 倍于暴露浓度[5]. 鲦鱼 Phoxinus phoxinus 受精卵在μg/L 的高三丁基锡浓度下孵化的幼体具有严重的骨骼畸形(尾部弯曲)现象. 大部分完全静止不动, 只有一小部分有肌肉收缩作用. 与对照组相比, 高剂量对照组的眼睛不透明[15]. 一般来说, 处于这种阶段的鱼对毒物比较敏感, 较易受诱导, 因而文献中通常采用了鱼类幼体或受精卵作为实验对象. 然而本研究所采用的为成年稀有鮈鲫, 实验结果表明这种实验鱼对环境污染物-三丁基锡也相当敏感, 它具有与国际常用的标准实验鱼类相当的生物富集能力, 其组织器官能在较短时间内对毒物作用产生响应, 超微结构变化显著. 由此可见, 稀有鮈鲫是一种灵敏的实验鱼类, 它可广泛用于其他各类毒性实验研究.

3　结论

本文通过建立稀有鮈鲫-三丁基锡水环境暴露体系, 观察到有机锡污染物对鱼类的慢性毒性作用与急性致死效应. 丁基锡在鱼体中的高富集作用也非常明显. 另外, 在慢性或急性暴露中, 丁基锡引起的鱼腮细胞或肝细胞内结构的一系列变化可进一步确证这种污染物对鱼体的伤害.

致谢　中国科学院武汉水生研究所为本实验提供了实验鱼种.

参　考　文　献

1　Maguire R J, Carey J H, Hale E J. Degradation of the tri-n-butyltin species in water. J Agric Food Chem, 1983, 31: 1060~1065

2　Hall L W Jr, Pinkney A E. Acute and sublethal effects of organotin compounds on aquatic biota: An interpretative literature evaluation. Crit Rev Toxicol, 1985, 14: 159~209

3　Bryan G W, Gibbs P E, Hummerstone L G, et al. The decline of the gastropod Nucella lapillus around south-west England: Evidence for the effect of tributyltin from antifouling paints. J Mar Biol Ass UK, 1986, 66: 611~640

4　Rita T, Heinz-Rudiger K, Jurgen F, et al. Evaluation of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ⅰ. Behaviour, weight increase, and tin content. Aquat Toxicol, 1994, 30: 189~197

5　Jeffrey W S, Frank P T. Toxicity of tri-*n*-butyltin to Chinook Salmon, *Oncorhynchus tshawytscha*, adapted to seawater. Aquaculture, 1987, 61: 193~200

6　王剑伟, 曹文宣. 稀有鮈鲫与鱼类实验动物. 鱼类学论文集(第六辑). 中国鱼类学会编辑.北京: 科学出版社, 1997. 144~152

7　Bryan G W, Gibbs P E, Burt G R. A comparison of the effectiveness of tri-n-butyltin chloride and five other organotin compounds in promoting the development of imposex in the dog-whelk *Nucella lapillus*. J Mar Biol Assoc UK, 1988, 68: 733~744

8　Smith B S. Tributyltin compounds induce male characteristics on female mud snails *Nassarius obsoletus* = *Ilyanassa obsoleta*. J Appl Toxicol, 1981, 1: 141~144

9　Oehlmann J, Schulte-Oehlmann U, Stroben E, et al. Androgenic effects of organotin compounds in molluscs. In: Umweltbundesamt ed. Expert Round. Endocrinically Active Chemicals in the Environment, UBA-Texte, 1996, 3: 111~118

10　Schwaiger J, Bucher F, Ferling H, et al. A prolonged toxicity study on the effects of sublethal concentrations of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO): Histopathological and histochemical findings in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Aquat

Toxicol, 1992, 23: 31~48

11 Wester P W, Canton J H. Histopathological study of *Poecilia reticulata* (guppy) after long-term exposure to bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) and di-*n*-butyltindichloride (DBTC). Aquat Toxicol, 1987, 10: 143~165

12 Wester P W, Canton J H, Van Iersel A A J, et al. The toxicity of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) and di-*n*-butyltindichloride (DBTC) in the small fish species *Oryzias latipes* (medaka) and *Poecilia reticulata* (guppy). Aquat Toxicol, 1990, 16: 53~72

13 Braunbeck T. Cytological alterations in isolated hepatocyte from rainbow induced by 4-chloroaniiline. Aquat Toxicol, 1992, 22: 57~65

14 Rita T, Heinz-Rudiger K, Karl-Heinz K, et al. Evaluation of bis(tri-*n*-butyltin)oxide (TBTO) neurotoxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). Ⅰ. Ultrastructural diagnosis and tin localization by energy filtering transmission eledtron microscopy (EFTEM). Aquat Toxicol, 1994, 30: 199~213

15 Karl F. Embryotoxic effects of tributyltin on the minnow Phoxinus phoxinus. Environ Pollut, 1992, 76: 187~194