

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2012.00283

Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼早期胚胎发育阶段的单一与联合毒性

梁秋燕, 谢勇平, 方展强

华南师范大学生命科学学院, 广东省高等学校生态与环境科学重点实验室, 广东 广州 510631

摘要: 研究了重金属 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼(*Danio rerio*)早期胚胎发育阶段的单一与联合毒性效应。分别用不同质量浓度的 Zn²⁺和 Cd²⁺对受精后 24 h(24 hpf)的受精卵进行染毒实验, 统计了斑马鱼胚胎 48 hpf 的卵凝结和心律, 72 hpf 的卵凝结、孵化率和畸形率等指标。结果显示, Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎各不同发育阶段的影响不同, 镉的毒性比锌大。斑马鱼胚胎对 Zn²⁺和 Cd²⁺最敏感的毒理学终点均为 72 hpf。Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎 72 hpf 的发育毒性比 48 hpf 的发育毒性大。Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比为 1:1 时, 对斑马鱼胚胎的联合毒性趋向于毒性剧增的协同作用。Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比为 1:2 时, 对斑马鱼的联合毒性由 48 hpf 的协同作用转为 72 hpf 的拮抗作用。Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比为 2:1 时, 对斑马鱼的联合毒性在凝结时为协同作用, 在孵化时为拮抗作用。结果表明, Zn²⁺和 Cd²⁺在不同毒性单位配比下, 对斑马鱼胚胎的联合毒性不完全相同。即使在同一毒性单位配比下, Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎不同毒理学终点的联合毒性也不完全相同。此外还发现, 联合作用不仅与化合物的剂量有关, 还与染毒时间相关。

关键词: Zn²⁺; Cd²⁺; 早期胚胎; 联合毒性; 斑马鱼

中图分类号: S94

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2012)02-0283-11

锌和镉是水体中常见的重金属污染物, 目前, 针对 Zn²⁺和 Cd²⁺对水生动物的毒性研究已做了大量的工作^[1-2], 但大多集中在较高等的水生动物的成年个体的研究, 对斑马鱼胚胎的重金属毒性研究, 尤其是重金属联合毒性的研究并不多见。化学污染物的联合作用非常复杂, 不能简单根据其单一毒性来推测联合效应。因此, 混合物联合作用的研究具有非常重要的实际意义, 它能为环境标准的制定和生态风险评价提供更可靠的依据, 从而反映环境的质量。近年来斑马鱼(*Danio rerio*)的胚胎毒性实验以其特有的优势逐步替代传统成鱼急性实验, 成为生态毒理学研究的一种重要方法^[3-6]。OECD 在 1966 年将斑马鱼胚胎发育方法列入测定单一化学品毒性的标准方法之一, 并制定了详细的操作指南^[7]。斑马鱼生活周期短, 常年

产卵且产卵量多, 胚胎透明易于观察^[8-10], 具有成本低、影响因素少、可重复性和灵敏度高等优势, 而且斑马鱼胚胎生命早期发育阶段通常对毒性作用最敏感, 已被广泛应用于评估化学污染物的毒性^[11]。

本研究以斑马鱼作为实验动物, 在室内条件下, 研究重金属 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼早期胚胎发育的单一和联合毒性效应。对暴露于不同组分和不同浓度化合物中的鱼卵, 通过观察其不同发育时期的形态变化, 记录各发育过程中具有代表性的毒理学终点, 48 hpf 的凝结和心律, 72 hpf 的凝结、孵化率和畸形率, 研究 Zn²⁺和 Cd²⁺混合物对斑马鱼胚胎早期发育的联合毒性作用, 为水体环境中 Zn²⁺和 Cd²⁺的生态风险评价与水质基准和标准的制定提供科学依据, 同时也为当地的环保部

收稿日期: 2011-08-31; 修订日期: 2011-09-20.

基金项目: 国家科技支撑计划项目(2009BADB2B0401-02); 广东省科技计划项目(2009B030600006).

作者简介: 梁秋燕(1988-), 女, 华南师范大学 2007 级本科生, 从事水生动物生态毒理研究.

通信作者: 方展强, 教授. E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn

门提供污染治理的科学依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

实验鱼购自广州花地湾花鸟鱼市, 饲养在充分曝气的自来水中, 水温保持 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$, 每天喂食 2 次红虫, 以提高产卵数量及质量。驯养 1 个月达到性成熟后进行实验, 驯养期间活动均正常, 无病, 死亡率低于 5%。光照/黑暗周期控制为 14 h : 10 h。实验前 1 天的 22:00 将产卵器放入鱼缸内, 选取健康的雌鱼和雄鱼按 1 : 2 的比例放入产卵器并用隔板分开放置。实验当天 8:00 给光, 将隔板抽出, 使雌、雄鱼完成交配和产卵, 1 h 后将鱼卵用虹吸管小心取出, 用蒸馏水迅速清洗鱼卵以除去粪便等杂物, 洗净的鱼卵在培养皿中孵化至受精后 24 h (twenty-four-hour post-fertilization, 24 hpf), 用于暴露实验。

1.2 实验药品

$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $\text{CdCl}_2\cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$ 均为广州化学试剂厂的产品(AR), 用蒸馏水分别配成含有 Zn^{2+} 为 10 000 mg/L 和含有 Cd^{2+} 为 8 000 mg/L 的母液, 然后再稀释成实验所需要的各浓度。

1.3 仪器设备

玻璃鱼缸, 网罩, 大烧杯, 产卵器, 24 孔细胞培养板, 倒置显微镜。

1.4 毒性实验

1.4.1 斑马鱼胚胎实验 挑选发育正常的 24 hpf 胚胎, 进行毒性实验。参照 Schulte^[12]等的研究结果和 OECD 指导^[7]的基础设计实验, 选用 24 孔细胞培养板为染毒实验容器, 每孔容积为 3 mL, 实验时先加入化合污染物, 再加蒸馏水补充至 2 mL, 每孔放 10 枚受精卵, 最后将细胞培养板放在温度恒定为 $(26\pm 1)^{\circ}\text{C}$ 的培养箱中孵化。在倒置显微镜下观察胚胎发育, 记录发育过程中具有代表性的毒理学终点^[13]。

1.4.2 化合物单一毒性 EC_{50} 根据预实验的结果, 设置 6 个浓度梯度, 每个浓度设置 4 个平行, 同时进行空白对照实验, 每浓度放受精卵 10 枚, 在倒置显微镜下观察胚胎发育。染毒后, 肉眼观察为

白色或倒置显微镜下观察为黑色的卵被判断为死亡个体, 从培养板中及时挑出。记录发育过程中 48 hpf 卵凝结数, 48 hpf 心律明显减慢的胚胎数, 72 hpf 的卵凝结数、孵化数和畸形数, 参考戴桂馥等的方法^[14], 计算 R_1 、 R_2 、 R_3 和 R_4 , 其公式如下:

$$R_1=(A/B)\times 100\%; R_2=(C/D)\times 100\%;$$

$$R_3=(E/B)\times 100\%; R_4=(F/D)\times 100\%$$

式中, R_1 为卵凝结率, R_2 为心律明显减慢的胚胎占存活胚胎的比例, R_3 为孵化率, R_4 为畸形率; A 为卵凝结数, B 为处理受精卵数, C 为心律明显减慢的胚胎数, D 为存活胚胎数, E 为仔鱼数, F 为畸形鱼数。

若对照组出现不正常的卵, 则按以下公式进行校正:

$$R_5=(R_1-R_9)/(1-R_9); R_6=(R_2-R_{10})/(1-R_{10});$$

$$R_7=R_3/R_{11}; R_8=(R_4-R_{12})/(1-R_{12})$$

式中, R_5 为校正后的卵凝结率, R_6 为校正后的心律明显减慢的胚胎占的比例, R_7 为校正后的孵化率, R_8 为校正后的畸形率; R_9 为对照组中的卵凝结率, R_{10} 为对照组中心律明显减慢的胚胎占的比例, R_{11} 为对照组中卵孵化率, R_{12} 为对照组中畸形率。

参照周永欣和章宗涉的方法^[15], 将 R_1 、 R_2 、 R_3 、 R_4 或者 R_5 、 R_6 、 R_7 、 R_8 转换概率单位, 计算出实验液浓度对数, 求出概率单位与实验浓度对数的回归方程。求出各半数有效浓度(EC_{50})及其 95%的置信区间。

1.4.3 联合毒性实验 按单一毒性最终 LC_{50} 值进行毒性 1 : 1 或浓度 1 : 1 的联合毒性实验较为简便^[16], 本实验参照这种方法, 以单一化合物 72h 卵凝结毒性 EC_{50} 值为一个毒性单位, 按毒性 1 : 1、1 : 2、2 : 1 以及浓度 1 : 1、1 : 2、2 : 1 的比例混合, 构成二元混合体系。根据预实验的结果, 按等比间距设置 6 个不同的实验浓度, 采用和单一毒性实验相同的方法, 测得各时间的 EC_{50} 及其 95%的置信区间。

1.4.4 联合毒性评价方法 修瑞琴等^[17]在 Marking^[18]的相加指数法的基础上, 提出了“水生毒理联合效应相加指数法”, 该方法目前在国内外水生毒理学联合毒性实验研究中的应用较为广泛,

当单一毒性和联合毒性实验完成得到 EC₅₀ 值后, 用公式(1)求得生物毒性相加作用之和(S):

$$S = \frac{A_m}{A_1} + \frac{B_m}{A_2} \quad (1)$$

式中: A₁、A₂ 分别为 A、B 毒物的毒性(EC₅₀); A_m、B_m 分别为混合物毒性中各毒物的毒性(EC₅₀), 然后用以下公式将 S 转换成相加指数(AI)。

当 S = 1 时: AI = (1/S) - 1.0;

当 S > 1 时: AI = S(-1) + 1.0

最后用相加指数 AI 评价毒物的联合效应。

AI > 0 时大于相加作用, 即协同作用; AI < 0 为小于相加作用, 即拮抗作用; AI = 0 为相加作用。

1.5 数据统计与分析

采用 Excel 2003 对数据进行各种检验和比较。

2 结果与分析

2.1 重金属对斑马鱼胚胎的单一毒性

2.1.1 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的急性暴露实验

Zn²⁺和 Cd²⁺各设 7 个实验浓度(包括 1 个对照

组), 在暴露期间观察并记录斑马鱼胚胎各浓度组死亡和各时间段发育受抑制情况, 其结果见表 1。同时, 在实验中观察到斑马鱼胚胎正常发育和非正常发育的照片, 如图版 I-1~15 所示。

Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎不同毒理学终点的毒性实验数据的线性回归分析结果如表 2 所示。由表 2 可见, 斑马鱼胚胎对 Zn²⁺最敏感的毒理学终点为 72 hpf 孵化, EC₅₀=10.30 mg/L; 对 Cd²⁺最敏感的毒理学终点也是 72 hpf 孵化, EC₅₀=7.17 mg/L。Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的 48 hpf 卵凝结的 EC₅₀分别为 591.05 mg/L 和 421.52 mg/L; 72 hpf 卵凝结的 EC₅₀分别为 24.22 和 25.82 mg/L。可见, 随暴露时间的延长, Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼毒性增加。另外, 斑马鱼胚胎的 48 hpf 卵凝结的 EC₅₀值远比 72 hpf 卵凝结大, 表明 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的 48 hpf 的发育毒性较小, 原因是斑马鱼胚胎暴露的时间短并且具有卵膜保护着。斑马鱼胚胎的 72 hpf 畸形没有 EC₅₀ 值, 表明在实验设置的浓度范围内, Zn²⁺和 Cd²⁺使斑马鱼胚胎致畸毒性

表 1 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎不同毒理学终点的毒性

Tab. 1 Toxicity of zinc and cadmium on zebrafish embryos in different endpoints

金属离子 metal ion	质量浓度/ (mg·L ⁻¹) concentrations	48 hpf		72 hpf			%
		卵凝结率 condensation rate of egg	心律极低率 very low rate of heart	卵凝结率 condensation rate of egg	孵化率 hatchability	畸形率 malformation rate	
Zn ²⁺	0 对照	0	0	0	100	0	
	4	0	5	5	77.5	7.84	
	20	0	7.5	52.5	25	5.26	
	40	5	13.16	67.5	17.5	0	
	80	10	22.22	80	0	25	
	160	17.5	24.24	100	0	-	
	320	37.5	48	100	0	-	
Cd ²⁺	0 对照	0	0	0	100	0	
	4	0	2.5	0	95	2.5	
	20	0	12.5	0	70	0	
	40	5	21.05	7.5	50	13.51	
	80	7.5	27.03	42.5	27.5	30.43	
	160	15	29.41	87.5	10	0	
	320	25	40	100	0	-	

注: “-”表示该孔的 10 枚受精卵已死亡, 无法统计斑马鱼胚胎畸形数和畸形率。

Note: “-” indicates that the hole 10 eggs have been killed and uncounted number of zebrafish embryos malformations and malformation rate.

表 2 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎不同毒理学终点的毒性实验数据的线性回归分析
Tab. 2 Linear regression analysis of toxicity of zinc and cadmium on zebrafish embryos

金属离子 metal ion	项目 item	48 hpf		72 hpf		
		凝结 condensation	心律 rhythm	凝结 condensation	孵化 incubation	畸形 deformity
Zn ²⁺	概率单位-浓度对数回归方程 probit-concentration on the regression equation	$y = 1.445x + 0.995$	$y = 0.7945x + 2.7085$	$y = 1.9397x + 2.315$	$y = -1.7552x + 6.7774$	-
	相关系数(R ²) correlation coefficient (R ²)	0.9806	0.9028	0.9714	0.9745	-
	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	591.05* (360.71-968.48)	765.96* (367.89-1594.73)	24.22* (17.94-32.71)	10.30* (7.39-14.35)	-
Cd ²⁺	概率单位-浓度对数回归方程 probit-concentration on the regression equation	$y = 1.0896x + 2.1421$	$y = 0.6276x + 3.4981$	$y = 4.3019x - 1.0742$	$y = -1.284x + 6.0984$	-
	相关系数(R ²) Correlation coefficient (R ²)	0.9892	0.9626	0.9992	0.9639	-
	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	421.52* (166.90-1064.26)	247.22* (110.64-552.39)	25.82* (20.42-32.65)	7.17* (4.55-11.29)	-

注：“-”表示无法对此毒性终点进行统计；“*”数据通过所选浓度建立的回归方程后求得。

Note: “-” indicates that this toxicity can not be the end of statistics; means “*” Data obtained through the establishment of the regression equation by selecting concentration.

非常小，因此，无法对此终点的数据进行统计。

2.1.2 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的毒性比较 实验结果显示，Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎各不同发育阶段的影响是不同的。Cd²⁺在 48 hpf 凝结，48 hpf 心律和 72 hpf 孵化的 EC₅₀ 值均小于 Zn²⁺，而 72 hpf 凝结的 EC₅₀ 值稍微比 Zn²⁺大，表明 Cd²⁺的毒性比 Zn²⁺大。图 2 显示，斑马鱼胚胎对 Zn²⁺和 Cd²⁺最敏感的毒理学终点相同，均为 72 hpf 孵化，但 Cd²⁺在 72 hpf 孵化的毒性远比 Zn²⁺大。Zn²⁺和 Cd²⁺在 72 hpf 凝结、孵化的 EC₅₀ 远比 48 hpf 凝结、心律小，表明 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎 72 hpf 的发育毒性比 48 hpf 的发育毒性大。

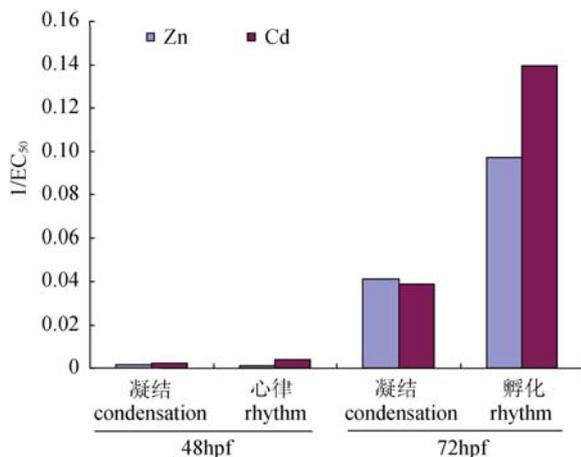


图 2 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎各毒理学终点的单一毒性
Fig. 2 Single toxicities of zinc and cadmium on zebrafish embryos in different endpoints

2.2 重金属对斑马鱼胚胎的联合毒性效应

2.2.1 Zn²⁺和 Cd²⁺在浓度单位配比下对斑马鱼胚胎的联合毒性 单一化合物毒性实验显示，Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼致畸毒性非常小，进行联合毒性实验时未对此终点进行观察。在此基础上以相同条件对 Zn²⁺和 Cd²⁺按 1 : 1、1 : 2 和 2 : 1 的浓度比例混合，构成二元混合体系进行了联合毒性实验，其结果见表 3。

采用了“水生毒理联合效应相加指数法”对联合毒性实验结果进行评价，其结果见表 4。结果显示，Zn²⁺和 Cd²⁺在浓度单位配比为 1 : 1 时，对斑马鱼胚胎的联合作用在 48 hpf 凝结、48 hpf 心律和 72 hpf 孵化表现为毒性剧增的协同效应，其中 Cd²⁺的毒性分别是单独存在时的 5、3.3 和 2.7 倍。Cd²⁺的存在，Zn²⁺的毒性也分别是其单独存在时的 7、10 和 3.8 倍。Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的联合作用在 72 hpf 凝结则呈现毒性下降的拮抗作用，两者的 EC₅₀ 值都是 24.34 mg/L，与其单独存在时的 EC₅₀ 值分别是 24.22 mg/L 和 25.82 mg/L 相近。虽然 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼的联合作用在 72 hpf 凝结的拮抗作用稍弱，但本混合体系(1 : 1)对斑马鱼胚胎的联合作用趋向于毒性剧增的协同效应。

Zn²⁺和 Cd²⁺在浓度单位配比为 1 : 2 时，对斑马鱼胚胎的联合作用在 48 hpf 凝结、48 hpf 心律

表 3 Zn²⁺和 Cd²⁺在浓度单位配比下对斑马鱼胚胎的联合毒性
Tab. 3 Joint toxicities of zinc and cadmium on zebrafish embryos in the concentration unit ratio %

Zn ²⁺ : Cd ²⁺	Zn ²⁺ / (mg·L ⁻¹)	Cd ²⁺ / (mg·L ⁻¹)	48 hpf		72 hpf	
			卵凝结率 condensation rate of egg	心律极低率 very low rate of heart	卵凝结率 condensation rate of egg	孵化率 hatchability
1 : 1	2	2	0	22.5	0	37.5
	4	4	0	22.5	5	35
	8	8	2.5	28.20	10	32.5
	16	16	5	44.74	55	15
	32	32	15	44.12	62.5	5
	64	64	47.5	52.38	72.5	0
1 : 2	2	4	0	2.5	7.5	62.5
	4	8	0	5	12.5	52.5
	8	16	5	5.26	52.5	47.5
	16	32	7.5	10.81	90	10
	32	64	30	21.43	92.5	2.5
	64	128	57.5	52.94	95	0
2 : 1	4	2	0	22.5	0	37.5
	8	4	0	30	0	35
	16	8	2.5	28.20	62.5	15
	32	16	5	34.21	67.5	0
	64	32	7.5	43.24	75	0
	128	64	30	46.43	80	0
对照 control	0	0	0	10	0	80

表 4 Zn²⁺和 Cd²⁺在浓度单位配比下对斑马鱼胚胎的联合毒性作用评价
Tab. 4 Evaluations of joint toxic effects of zinc and cadmium on zebrafish embryos in the concentration unit ratio

Zn ²⁺ : Cd ²⁺	观察指标 outcome measure	Zn ²⁺ /混合 EC ₅₀ (mg·L ⁻¹) Zn ²⁺ /mixed EC ₅₀	Cd ²⁺ /混合 EC ₅₀ (mg·L ⁻¹) Cd ²⁺ /mixed EC ₅₀	S	AI	作用类型 role type
1 : 1	48hpf					
	凝结 condensation	84.0 (51.01-138.32)	84.00 (51.01-138.32)	0.34	1.93	+
	心律 rhythm	74.53 (37.93-146.45)	74.53 (37.93-146.45)	0.40	1.51	+
	72hpf					
	凝结 condensation	24.34 (18.27-32.44)	24.34 (18.27-32.44)	1.95	-0.95	-
	孵化 hatchability	2.68 (1.77-4.06)	2.68 (1.77-4.06)	0.63	0.58	+
1 : 2	48hpf					
	凝结 condensation	56.27 (35.03-90.38)	112.54 (70.06-180.77)	0.36	1.76	+
	心律 rhythm	65.18 (49.93-85.08)	130.36 (99.86-170.16)	0.61	0.63	+
	72hpf					
	凝结 condensation	8.19 (5.29-12.69)	16.38 (10.57-25.38)	0.97	0.03	+
	孵化 hatchability	5.78 (4.48-7.48)	11.56 (8.95-14.95)	2.17	-1.17	-
2 : 1	48hpf					
	凝结 condensation	404.75 (200.03-819.00)	202.38 (100.1-409.50)	1.16	-0.16	-
	心律 rhythm	354.79 (154.06-817.08)	177.40 (77.03-408.54)	1.18	-0.18	-
	72hpf					
	凝结 condensation	4.47 (1.86-10.77)	2.24 (0.93-5.38)	0.27	2.69	+
	孵化 hatchability	4.21 (2.72-6.53)	2.11 (1.36-3.27)	0.70	0.42	+

注: “+”表示协同作用,“-”表示拮抗作用。

Note: “+” means synergy;“-” means antagonism.

和 72 hpf 凝结表现为毒性剧增的协同效应, 其中 Cd^{2+} 的毒性是单独存在时的 3.7、1.9 和 1.6 倍。 Cd^{2+} 的存在, Zn^{2+} 的毒性也分别是单独存在时的 10.5、11.8 和 3.0 倍。混合物对斑马鱼胚胎的联合作用在 72 hpf 孵化表现为毒性下降的拮抗作用, 其 EC_{50} 值分别是 5.78 和 11.56 mg/L, 与单独存在时分别是 10.30 和 7.17 mg/L 不同, Zn^{2+} 的毒性是单独存在时的 1.8 倍, Cd^{2+} 的毒性则下降 1.6 倍。综合比较 4 个毒性终点, 该混合体系(1:2)对斑马鱼胚胎的联合作用属于毒性剧增的协同效应。

Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在浓度单位配比为 2:1 时, 对斑马鱼胚胎的联合作用在 48 hpf 凝结和 48 hpf 心律表现为毒性下降的拮抗作用, 且 AI 绝对值比较小, 说明拮抗作用比较弱。 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在 48 hpf 凝结的 EC_{50} 值(分别是 404.75 mg/L 和 202.38 mg/L), 低于其单独存在时的 EC_{50} 值 591.05 mg/L 和 421.52 mg/L; Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在 48 hpf 心律的 EC_{50} 值分别是 354.79 mg/L 和 177.40 mg/L, 也低于其单独存在时的 EC_{50} 值(分别是 765.96 mg/L 和 247.22

mg/L)。由此可见, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在 48 hpf 凝结和 48 hpf 心律都比单独存在时的毒性明显增强。 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在 72 hpf 凝结和 72 hpf 孵化表现为毒性增强的协同效应, 特别是 72 hpf 凝结的 AI 值为 2.69, 表现出很强的协同作用。本混合体系(2:1)对斑马鱼胚胎的联合作用属于毒性剧增的协同效应。

综上所述, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在浓度单位配比 1:1、1:2 和 2:1 时, 对斑马鱼胚胎的联合作用都属于毒性剧增的协同效用。

2.2.2 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在毒性单位配比下对斑马鱼胚胎的联合毒性 在单一化合物毒性实验的基础上, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 以各自单一毒性 72 hpf 凝结的 EC_{50} 值为一个毒性单位, 按毒性单位比为 1:1、1:2 和 2:1 的比例混合, 构成二元混合体系, 进行联合毒性实验, 测得 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎的联合作用时 48 hpf 卵凝结率、48 hpf 心律极低率、72 hpf 卵凝结率和 72 hpf 孵化率的平均值, 其结果见表 5。

Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在毒性单位配比下对斑马鱼胚胎

表 5 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在毒性单位配比下对斑马鱼胚胎的联合毒性
Tab. 5 Joint toxicities of zinc and cadmium on zebrafish embryos in the toxic unit ratio

Zn^{2+}	Cd^{2+}	Zn^{2+} (mg·L ⁻¹)	Cd^{2+} (mg·L ⁻¹)	48 hpf		72 hpf	
				卵凝结率 condensation rate of egg	心律极低率 very low rate of heart	卵凝结率 condensation rate of egg	孵化率 hatchability
1	1	2.422	2.582	0	0	0	82.5
		4.844	5.164	2.5	0	10	65
		9.688	10.328	5	0	45	50
		19.376	20.656	10	11.11	85	12.5
		38.752	41.312	12.5	8.57	97.5	7.5
		77.504	82.624	33.3	10	100	3.33
1	2	2.422	5.164	0	0	0	76.67
		4.844	10.328	0	0	10	53.33
		9.688	20.656	3.33	0	46.67	36.67
		19.376	41.312	6.67	10.71	63.33	26.67
		38.752	82.624	16.67	8	100	0
		77.504	165.248	63.33	9.09	100	0
2	1	4.844	2.582	0	0	2.5	87.5
		9.688	5.164	0	2.5	20	72.5
		19.376	10.328	2.5	2.56	60	37.
		38.752	20.656	2.5	2.56	92.5	12.5
		77.504	41.312	20	3.13	100	0
		155.008	82.624	35	15.38	100	0
对照	control	0	0	0	0	0	100

的联合毒性作用评价结果见表 6。结果显示, Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比为 1 : 1 时, 对斑马鱼胚胎的联合作用在 72 hpf 凝结表现为毒性剧增的协同效应, Zn²⁺和 Cd²⁺的毒性分别是单独存在时的 2.3 倍。Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的联合作用在 48 hpf 凝结和 72 hpf 孵化则表现为毒性下降的拮抗作用。在 48 hpf 凝结测试中, Zn²⁺和 Cd²⁺的 EC₅₀ 值分别为 262.20 mg/L 和 297.52 mg/L, 低于单独存在时 EC₅₀ 值的 591.05 mg/L 和 421.52 mg/L, 显然, 混合后其毒性比原来增强; 此外, 混合物在 48 hpf 凝结的 AI 绝对值很小, 表明拮抗作用比较弱。72 hpf 凝结时, 混合物中 Zn²⁺和 Cd²⁺的 EC₅₀ 值分别为 10.30 mg/L 和 7.17 mg/L, 与单独存在时的 EC₅₀ 值分别是 7.5 mg/L 和 8.0 mg/L 相比, Cd²⁺的毒性稍变弱, 而 Zn²⁺的毒性提高。综合评价确认混合体系(1 : 1)对斑马鱼胚胎的联合作用更趋向于

毒性剧增的协同效应。

Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比为 1 : 2 时, 对斑马鱼胚胎的联合作用在 48 hpf 凝结表现为毒性剧增的协同效应, AI 值为 1.06; 72 hpf 凝结和 72 hpf 孵化则表现为毒性下降, AI 的绝对值分别为 0.61 和 1.58, 混合物对斑马鱼的毒性由 48 hpf 的协同作用转为 72 hpf 的拮抗作用。结果显示, 联合作用不仅仅只与化合物的剂量有关, 还与染毒时间的有关。

Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比为 2 : 1 时, 对斑马鱼胚胎的联合作用在 48 hpf 凝结和 72 hpf 凝结测试时表现为毒性剧增的协同效应; 72 hpf 孵化时则为拮抗作用, 显示对斑马鱼孵化有解毒作用。

综上所述, Zn²⁺和 Cd²⁺在不同毒性单位配比下, 对斑马鱼胚胎的联合毒性不完全相同。即使在同一毒性单位配比下, Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚

表 6 Zn²⁺和 Cd²⁺在毒性单位配比下对斑马鱼胚胎的联合毒性作用评价

Tab. 6 Evaluations of joint toxic effects of zinc and cadmium on zebrafish embryos in the toxic unit ratio

Zn ²⁺ : Cd ²⁺	观察指标 outcome measures	Zn ²⁺ /混合 EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹) Zn ²⁺ /mixed EC ₅₀	Cd ²⁺ /混合 EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹) Cd ²⁺ /mixed EC ₅₀	S	AI	作用类型 role type
1 : 1	48hpf 凝结 condensation	262.20 (207.39-642.42)	297.52 (114.08-684.86)	1.15	-0.15	-
	心律 rhythm	-	-	-	-	-
	72hpf 凝结 condensation	10.56 (16.87-12.80)	11.25 (9.28-13.64)	0.87	0.15	+
	孵化 hatchability	7.50 (5.58-19.56)	8.00 (5.94-10.76)	1.84	-0.84	-
1 : 2	48hpf 凝结 condensation	71.80 (53.19-96.92)	153.08 (113.40-206.64)	0.48	1.06	+
	心律 rhythm	-	-	-	-	-
	72hpf 凝结 condensation	13.02 (9.97-17.00)	27.76 (21.26-36.25)	1.61	-0.61	-
	孵化 hatchability	6.54 (4.65-9.19)	13.94 (9.92-19.60)	2.58	-1.58	-
2 : 1	48hpf 凝结 condensation	263.23 (178.25-388.72)	140.31 (95.01-207.20)	0.78	0.28	+
	心律 rhythm	-	-	-	-	-
	72hpf 凝结 condensation	13.68 (10.66-17.56)	7.29 (5.68-9.36)	0.85	0.18	+
	孵化 hatchability	14.80 (11.26-19.46)	7.89 (6.00-10.37)	2.54	-1.54	-

注: “-”表示无法对此毒性终点进行统计。“+”表示协同作用,“-”表示拮抗作用。

Note: “-”indicates that this toxicity can not be the end of statistics. “+” means synergy; “-” means antagonism.

胎不同毒理学终点的联合毒性也不完全相同。混合物对斑马鱼胚胎 48 hpf 心律的联合毒性显示,随着浓度增加,48 hpf 心律极低率并未随着浓度有明显的递增趋势,48 hpf 心律极低率都在 10% 左右,表明其对斑马鱼 48 hpf 心律的毒性不强,因此无法对此终点进行统计。

3 讨论

3.1 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎的毒性作用

本实验结果表明, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎的毒性作用与毒物的种类、浓度和接触时间的长短有关;随着重金属浓度的升高、染毒时间的延长,斑马鱼胚胎的死亡率升高,心律极低,并产生一定数量的畸形个体,且抑制胚胎的正常孵化,特别是高浓度溶液中死亡率随时间的增加而明显升高。因此,在鱼类的产卵场、繁殖场等鱼苗生产基地,应严格控制有毒工业废水、废渣的排放,以保证鱼类正常的胚胎发育和仔鱼的生长。

3.2 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎的单一毒性

本实验 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎的单一毒性实验结果表明, Cd^{2+} 毒性大于 Zn^{2+} 。这与陈孝煊等^[19]研究红螯虾苗对 4 种重金属离子的耐受性以及侯丽萍^[20]研究镉离子对草鱼鱼种 SOD 和 ATPase 的影响及毒性研究得到毒性 $Cd^{2+} > Zn^{2+}$ 的结果是一致的。但王银秋等^[1]在研究重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性以及卢健民等^[21]研究重金属对草鱼胚胎毒性时却发现 Zn^{2+} 的毒性大于 Cd^{2+} 。由此可见,重金属对不同生物的影响是不一样的,这是因为不同生物,不同的发育阶段,不同的实验温度,水质和重金属的不同形态等其他实验条件对生物重金属的中毒水平也有较大的影响^[22]。

3.3 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼的联合毒性

本实验中, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在浓度单位配比下,对斑马鱼的联合毒性更趋向于毒性剧增的协同效应,其结果与王银秋等^[1]以鲫鱼(*Carassius auratus*)和泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*),王莹^[16]以水螅为实验材料所得结果是一致的,但与江敏等^[23]以罗氏沼虾(*Macrobrachium rosenbergii*)仔虾为实验材料的结果相反。这种现象也存在于植物中,周

启星等^[24]在研究作物籽实中 Cd 与 Zn 的交互作用及其机理得到的结论是: 锌和镉间的交互作用与作物种类有关,在玉米籽实中, Cd、Zn 之间表现为相互抑制作用,即 Zn 抑制了玉米籽实中 Cd 的吸收和运转, Cd 对玉米籽实中 Zn 的吸收和运转也有阻碍作用;而在大豆籽实中, Cd、Zn 之间表现为协同作用,土壤中 Cd 的增加有促进植株吸收 Zn 的功能,而土壤中 Zn 的增加对植株吸收 Cd 有激发作用。可见,化合物之间的联合作用很复杂,即使是同系物,如 Cd 和 Zn, 联合作用结果往往也有很大差异;同时,受试生物不同,其对化合物的敏感性及其化合物对其的联合作用效应也不尽相同。因此,通常不能以其联合作用结果进行外推,要针对具体的生物,通过严格毒性进行判定。

3.4 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 单位配比对斑马鱼的毒性作用

本实验中, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 在浓度单位和毒性单位配比都是 1 : 1 时,对斑马鱼胚胎各毒性终点的联合作用不相同;在浓度单位和毒性单位配比都是 1 : 2 时,对斑马鱼胚胎 48 hpf 凝结表现为毒性剧增的协同效应,而对 72 hpf 孵化表现为毒性下降的拮抗作用,对 48 hpf 心律、72 hpf 凝结毒性则不相同;在浓度单位和毒性单位配比 2 : 1 时,对斑马鱼胚胎 72 hpf 凝结表现为毒性剧增的协同效应,而对 48 hpf 凝结、48 hpf 心律和 72 hpf 孵化的联合毒性则各不相同。由此可见,混合物的联合毒性非常复杂,仅用单一毒物的含量去判断水污染的毒性危害是不切实际的。重金属的联合作用还随着时间变化而存在不同的表现方式。可能原因是: Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 共存时,细胞膜的通透性增加,因而毒性增强,产生了协同作用; Cd^{2+} 的浓度大,随着时间的增加,可以占据细胞表面的结合位点,降低了 Zn^{2+} 的结合机会,从而使毒性下降,显示出拮抗作用。由此可知,重金属的联合毒性与污染物的剂量,暴露时间等有关。

3.5 Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎联合毒性的毒理学终点

本实验中, Zn^{2+} 和 Cd^{2+} 对斑马鱼胚胎的联合毒性在不同毒理学终点毒性有差异。这与周宇等^[25]对氯化苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效

应的研究结果是一致的。周宇测定了 13 个毒理学终点, 而本实验则根据实验条件重点测定了 48 hpf 凝结、48 hpf 心律、72 hpf 凝结、72 hpf 孵化和 72 hpf 畸形 5 个毒理学终点, 也基本能较准确地判断 Zn²⁺和 Cd²⁺对斑马鱼胚胎的联合毒性结果, 当然在有条件的情况下应该设置尽可能多个毒理学终点。此外, 本实验按浓度单位配比和毒性单位配比进行实验时, 采用的卵不是同一批的卵, 即使设置了对照实验, 对实验结果也会有一定的影响。尽可能采用同一批卵将提高实验结果的准确性。

3.6 关于重金属联合毒性效应评价

本实验采用修瑞琴等^[17]提出了“水生毒理联合效应相加指数法”对联合毒性实验结果进行评价, 即 AI > 0 时大于相加作用, 即协同作用; AI < 0 为小于相加作用, 即拮抗作用; AI=0 为相加作用。实验中, AI=0 这种情况出现的可能性极低, 所以实验中联合毒性结果是协同作用或者拮抗作用, 这种方法用于评价联合毒性不够全面。邓铁柱^[26]在研究乙草胺、丁草胺与重金属对发光菌及斑马鱼胚胎的联合毒性效应时, 采用毒性单位法、相加指数法和混合毒性单位法对联合毒性结果进行评价, 得到的结论有差异。因此, 采用多种不同的评价方法进行综合评价是有必要的。大多数的联合毒性研究都局限于 2 种化合物之间, 极少数研究在 3 种化合物之间, 即使 3 种化合物也是按浓度单位配比或毒性单位配比为 1 : 1 : 1 进行实验的, 然而环境中的物质往往是多种同时存在的, 且浓度各不相同, 因此, 深入地探究 2 种以上物质的联合影响并讨论其相互作用机理, 更具实际意义。

参考文献:

[1] 王银秋, 张迎梅, 赵东芹. 重金属镉、铅、锌对鲫鱼和泥鳅的毒性[J]. 甘肃科学学报, 2003, 15(1): 35-38.
 [2] 闰沁远, 祁建红. Cd 对孝感地区鲫鱼的急性毒性及安全浓度实验[J]. 湛江师范学院学报, 2008, 29(3): 77-80.
 [3] 朱琳, 史淑洁. 斑马鱼在胚胎发育技术在毒性评价中的应用[J]. 应用生态学报, 2002, 13(2): 252-254.
 [4] 王佳佳, 徐超, 屠云杰, 等. 斑马鱼及其胚胎在毒理学中的

实验研究与应用进展[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(2): 123-135.
 [5] Nagel R, Dar T. The embryo test with the zebrafish *Danio rerio* - a general model in ecotoxicology and toxicology[J]. *Altex*, 2002, 19(Suppl 1): 38-48.
 [6] 全珊珊, 吴新荣. 斑马鱼, 人类疾病研究的理想模式动物[J]. 生命的化学, 2008, 28(3): 260-263.
 [7] OECD. Guideline for testing of chemicals: fish, embryo toxicity test with the Zebra fish(*B. rerio*)[S]. Paris: OECDTG 212, 1996: 62-76.
 [8] Hallare A V, Kohler H-R, Riebskorn R. Developmental toxicity and stress protein responses in zebrafish embryos after exposure to *diclofenac* and its solvent, DMSO[J]. *Chemosphere*, 2004, 56: 659-666.
 [9] Reimers M J, Flockton A R, Tanguay R L. Ethanol- and acetaldehyde-mediated developmental toxicity in zebra fish[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2004, 26: 769-781.
 [10] Berry J P, Gantar M, Gibbs P D L, et al. 2007. The zebra fish(*Danio rerio*)embryo as a model system for identification and characterization of developmental toxins from marine and freshwater microalgae[J]. *Compar Biochem Physiol, Part C*, 145: 61-72.
 [11] van Leeuwen C J, Adema D M M, Hermens J. Quantitative structure-activity relationships for fish early life stage toxicity[J]. *Aqu Toxicol*, 1990, 16: 321-334.
 [12] Schulte C, Nagel R. Test acute toxicity in the embryo of zebra fish, *Brachydanio rerio*, as an alternative to the acute fish test: preliminary results[J]. *ATLA*, 1994, 22: 22-19.
 [13] Strmac M, Braunbeck T. Effects of triphenyltin acetate on survival, hatching success, and liver ultrastructure of early life stages of zebra fish(*D. rerio*)[J]. *Ecotoxicol Envir Safety*, 1999, 44: 25-39.
 [14] 戴桂馥, 吴健, 张凤秋, 等. 紫外线照射对金鱼孵化率的影响[J]. 中国水产科学, 2005, 12(5): 657-660.
 [15] 周永欣, 章宗涉. 水生生物毒性实验方法[M]. 北京: 北京农业出版社, 1989.
 [16] 王莹, 郝家胜, 陈娜, 等. 铅、镉和锌 3 种重金属离子对水螅的联合毒性研究[J]. 生命科学研究, 2006, 10(1): 91-94.
 [17] 修瑞琴, 许永香, 傅迎春, 等. 水生毒理联合效应相加指数法[J]. 环境化学, 1994, 13(3): 269-271.
 [18] Marking L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures. *Aquatic toxicology and hazard evaluation*[C]. ASTM STP Publication, 1977, 634: 99-108.
 [19] 陈孝焯, 吴志新, 操玉涛, 等. 红螯螯虾苗对四种重金属离子的耐受性[J]. 华中农业大学学报, 1999, 18(5): 476-

- 478.
- [20] 侯丽萍. 镉离子对草鱼鱼种 SOD 和 ATPase 的影响及毒性研究[D]. 广州: 华南师范大学, 2003.
- [21] 卢健民, 简玉华, 李怀明, 等. 重金属对草鱼胚胎及鲤鱼苗的毒性研究[J]. 水产学杂志, 1995, 8(1): 55-62.
- [22] 隋国斌, 杨凤, 孙丕海, 等. 铅、镉、汞对皱纹盘鲍幼鲍的急性毒性实验[J]. 大连水产学院学报, 1999, 14(1): 22-26.
- [23] 江敏, 臧维玲, 姚庆祯, 等. 四种重金属对罗氏沼虾仔虾的毒性作用[J]. 上海水产大学学报, 2002, 11(3): 203-207.
- [24] 周启星, 高拯民. 作物籽实中 Cd 与 Zn 的交互作用及其机理的研究[J]. 农业环境保护, 1994, 13(4): 148-151.
- [25] 周宇, 于红霞, 丁翔, 等. 氯代苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效应的研究[J]. 农业环境科学学报, 2003, 22(3): 340-344.
- [26] 邓铁柱. 乙草胺、丁草胺与重金属对发光菌及斑马鱼胚胎的联合毒性效应研究[D]. 长春: 东北师范大学, 2006.

Individual and joint toxicity of Zn^{2+} and Cd^{2+} during the early embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*)

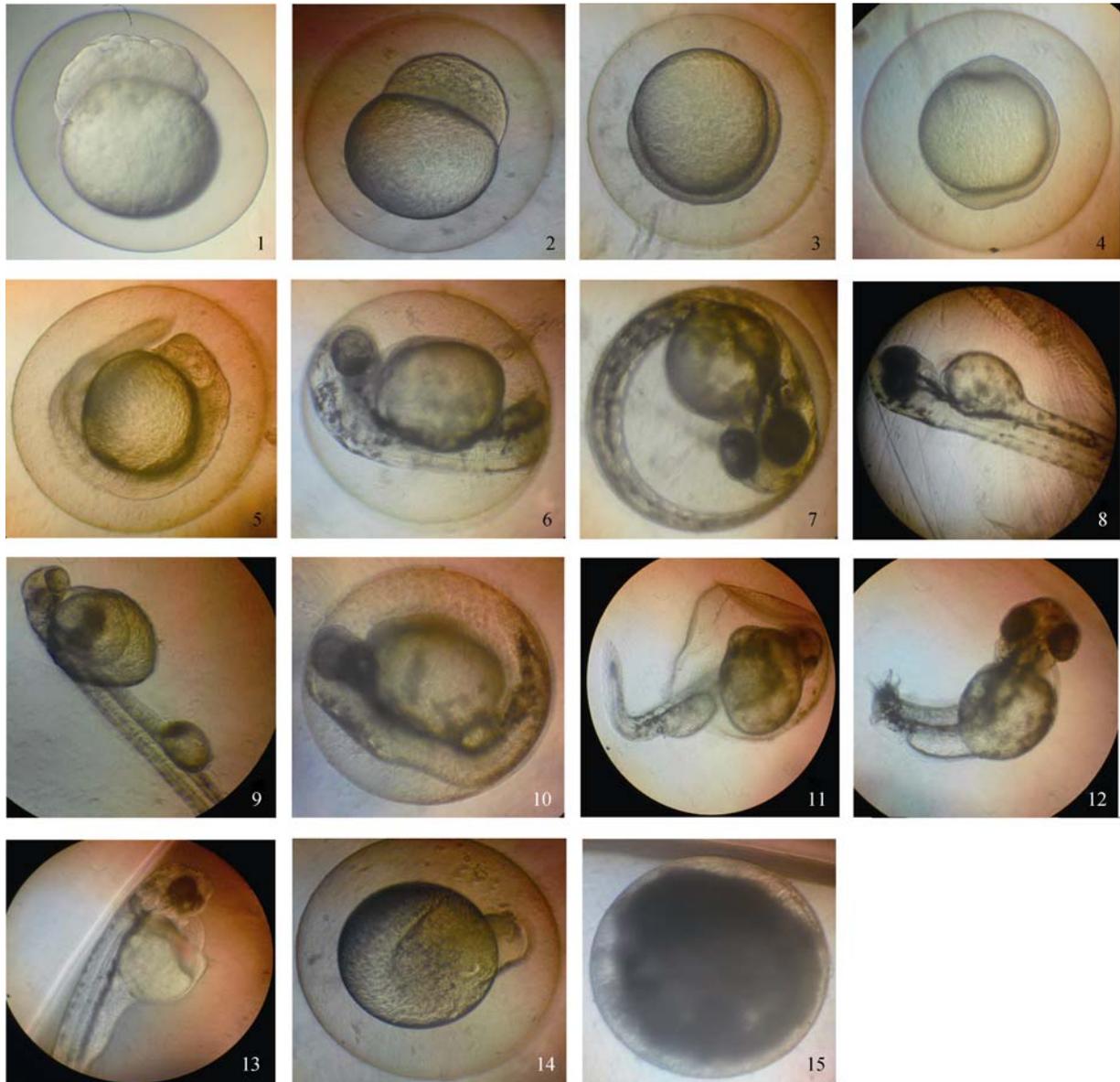
LIANG Qiuyan, XIE Yongping, FANG Zhanqiang

Key Laboratory of Ecology and Environmental Science in Guangdong Higher Education, College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

Abstract: We evaluated the individual and joint toxicity of zinc and cadmium during the early embryonic development of the zebrafish (*Danio rerio*). Embryos were exposed to various concentrations of Zn^{2+} and Cd^{2+} 24 h post-fertilization (24 hpf). We monitored the number of embryonic coagulated eggs and the rhythm of the heart at 48 hpf and the number of embryonic coagulated eggs, hatching rate, and malformation rate at 72 hpf. The effects of Zn^{2+} and Cd^{2+} differed among the stages of development. In general, Zn^{2+} was more toxic than Cd^{2+} . The embryos were most sensitive to Zn^{2+} and Cd^{2+} toxicity at 72 hpf. Regardless of the ratio of Zn^{2+} and Cd^{2+} during joint exposure (1 : 1, 1 : 2 or 2 : 1), the two chemicals tended to act synergistically. However, the joint toxicity was dependant on the endpoints and the ratio of each metal. For example, at equal concentrations of Zn^{2+} and Cd^{2+} (1 : 1), the effect tended to be synergistic. However, at a ratio of 1 : 2 ($Zn^{2+}:Cd^{2+}$) the effect was synergistic at 48 hpf but antagonistic at 72 hpf. Furthermore, at a ratio of 2 : 1 ($Zn^{2+}:Cd^{2+}$) the effect on egg coagulation was synergistic whereas the effect on the rate of hatching was antagonistic. Thus, our results suggest that joint toxicity is affected by both the concentration of each chemical and the exposure time.

Key words: Zn^{2+} ; Cd^{2+} ; early embryos; joint toxicity; *Danio rerio*

Corresponding author: FANG Zhanqiang. E-mail: fangzhq@scnu.edu.cn



图版 I 正常发育和非正常发育斑马鱼胚胎(10×10)

1. 卵裂期, 1.5 hpf, 蒸馏水; 2. 囊胚期, 3 hpf, 蒸馏水; 3. 原肠胚期, 8 hpf, 蒸馏水; 4. 体节期, 12 hpf, 蒸馏水; 5. 成型期, 24 hpf, 蒸馏水; 6. 正常胚胎, 48 hpf, 蒸馏水; 7. 未孵化胚胎, 72 hpf, $c(Zn^{2+})$ 为 20 mg/L; 8. 正常孵化的胚胎, 72 hpf, 蒸馏水; 9. 卵黄收缩不全, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ 为 0.4 mg/L; 10. 尾部缩短, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ 为 12 mg/L; 11. 尾部弯曲及卵黄收缩不全, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ 为 24 mg/L; 12. 尾部畸形, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ 为 0.4 mg/L; 13. 心包和卵黄水肿, 72 hpf, $c(Zn^{2+})$ 和 $c(Cd^{2+})$ 均为 8 mg/L; 14. 卵裂不正常的卵, 3 hpf, 蒸馏水; 15. 凝结的卵, 24 hpf, $c(Zn^{2+})$ 为 160 mg/L。

Plate I Normal and abnormal zebrafish embryo (10×10)

1. Cleavage-stage, 1.5 hpf, distilled water; 2. Blastocyst stage, 3 hpf, distilled water; 3. Gastrula, 8 hpf, distilled water; 4. Somite stage, 12 hpf, distilled water; 5. Forming period, 24 hpf, distilled water; 6. Normal embryo, 48 hpf, distilled water; 7. Unhatched embryos, 72 hpf, $c(Zn^{2+})$ of 20 mg/L; 8. Normal embryo hatching, 72 hpf, distilled water; 9. Incomplete yolk contraction, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ of 0.4 mg/L; 10. Tail shortening, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ of 12 mg/L; 11. Contraction of the tail bending and incomplete yolk, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ of 24 mg/L; 12. Tail deformity, 72 hpf, $c(Cd^{2+})$ of 0.4 mg/L; 13. Pericardial and yolk edema, 72 hpf, $c(Zn^{2+})$ of 8 mg/L and $c(Cd^{2+})$ of 8 mg/L; 14. Abnormal egg cleavage, 3 hpf, distilled water; 15. Condensation of the egg, 24 hpf, $c(Zn^{2+})$ of 160 mg/L.