

DOI: 10.3724/SP.J.1118.2016.15102

3 种多环芳烃对条纹锯鲷胚胎发育及早期仔鱼的毒性效应

孔祥迪^{1,2}, 刘莉^{1,2}, 李炎璐², 于欢欢^{1,2}, 陈超²

1. 上海海洋大学 水产与生命学院, 上海 201306;

2. 中国水产科学研究院 黄海水产研究所, 山东 青岛 266071

摘要: 为探讨不同多环芳烃(PAHs)对海水鱼类早期生长发育的毒性效应及作用机制, 分别比较研究了多环芳烃中的 3 环菲(Phe)、4 环芘(Py)、5 环苯并芘(Bap)单一暴露与 α -萘黄酮(ANF)联合暴露对条纹锯鲷(*Centropristis striata*)胚胎发育及早期仔鱼的毒性效应。对其胚胎中的细胞色素酶(EROD)活性、发育畸形(以心脏畸形为准)、孵化率和早期仔鱼死亡率等指标进行测定分析, 结果显示: (1)Bap、Py 的浓度与 EROD 活性之间的剂量效应关系比 Phe 明显, 3 种 PAHs 对条纹锯鲷胚胎中 EROD 活性的诱导能力由高到低依次为 Bap、Py、Phe, 其活性的最大值均出现在各物质的最高浓度组, 其活性分别为对照组的 857.52%、514.21%、280.50%; 在 ANF 影响下, EROD 的活性诱导被抑制, 最高浓度组的活性分别为对照组的 189.27 %、278.55 %、195.40 %。(2)综合考虑孵化率、畸形指数和早期仔鱼死亡率等指标, 3 种 PAHs 对胚胎发育及早期仔鱼的毒性由高到低依次为 Bap、Py、Phe, 3 种物质的浓度与受精卵的孵化率呈明显负相关, 与畸形指数和仔鱼死亡率呈明显正相关; 在 ANF 影响下, Bap 和 Py 处理组的毒性效应得到明显抑制, Phe 与 ANF 联合暴露处理组的毒性效应与单一暴露处理相比无相关性($P>0.05$)。研究表明, 3 种 PAHs 对条纹锯鲷的作用机制存在一定差异, Phe 为非特异性麻醉毒性机制, Bap 和 Py 可能通过 AHR 途径和 CYP1A 活性诱导两种机制共同作用。

关键词: 条纹锯鲷; 多环芳烃; 胚胎; 仔鱼; 毒性效应

中图分类号: X171

文献标志码: A

文章编号: 1005-8737-(2016)01-0241-09

多环芳烃(PAHs)的分子中含有两个或两个以上苯环, 是一种典型的具有持久污染性的碳氢化合物, 尤其是在工业化程度较高地区的河口、沿海港湾和码头等近岸环境较为常见, 主要来源于溢油和污染物排放^[1]。PAHs 具有难分解、可长距离扩散、生物富集能力强、致突变性和干扰内分泌等特性。当这些污染物广泛分布于水体、沉积物和水生生物体内, 会对水生生物尤其是水域生态系统造成较为严重的破坏和威胁。鱼类对外来有害物质较为敏感, 尤其是在胚胎发育阶段对污染物的毒性效应最为敏感, 组织器官和生理方面易受到破坏^[2-3], 有研究表明, PAHs 暴露可诱导

鱼类胚胎出现一系列异常症状, 包括卵黄囊肿大、心腔畸形及心脏功能紊乱、脊椎弯曲、头颌发育不全等, 并且造成胚胎后续发育及较高的早期仔鱼死亡率^[4-5]。

条纹锯鲷(*Centropristis striata*)隶属于鲈形目(Perciformes)、石斑鱼亚科(Epinephelinae), 俗称为美洲黑石斑, 在美洲东部沿海是重要的捕捞养殖对象, 亦可作为观赏鱼类^[6]。黑石斑为广温广盐性, 生存水温在 4~33℃, 盐度在 5~36, 适应能力强, 生长快, 是海水养殖业中具有重要开发价值的理想养殖品种^[7]。目前, 针对条纹锯鲷的研究有营养成分分析^[8-9]、消化道形态结构^[10]、胚胎

收稿日期: 2015-03-16; 修订日期: 2015-06-26.

基金项目: 科技部国际合作项目(2012DFA30360); 国家科技支撑项目(2011BAD13B01).

作者简介: 孔祥迪(1988-), 男, 硕士研究生, 从事海水鱼类繁育与养殖技术研究. E-mail: xiangdikong@163.com

刘莉(1988-), 并列第一作者.

通信作者: 陈超, 研究员. Tel: (0532) 85844459; E-mail: ysfriechencao@126.com

发育^[11]和海水网箱养殖实验^[12]等,但 PAHs 对其毒性效应方面的研究未见报道。探讨 PAHs 对条纹锯鲂早期发育阶段的毒性效应及作用机制,熟悉条纹锯鲂对 PAHs 胁迫的反应水平,可为溢油对水体生态环境影响的评估提供科学参考。

PAHs 分为两种:一种为低分子量芳烃,具有 2~3 个苯环,如三环芳烃菲(Phe),作用机制是非极性麻醉,即依靠其疏水性通过非特异性扩散进入生物组织,引起组织细胞的损坏;第二类是高分子量芳烃,具有 4~7 环,如四环芳烃芘(Py)、五环芳烃(Bap),其作用原理是对芳香烃受体 AHR 进行激活,从而对有关 PAH 的代谢酶类的基因表达进行调控,如细胞色素 P4501A (CYP1 A)^[13]。菲(Phe)、芘(Py)和苯并芘(BaP)都可对 AHR 和 CYP1A 进行激活和诱导,但相对强度存在差异,由大到小依次为 Bap、Py、Phe。 α -萘黄酮(ANF)是一种 CYP1A 特异性抑制剂,在一定浓度下可显著降低 CYP1A 活性及蛋白表达^[14]。因此,本研究选取 Phe、Py、BaP 和 ANF 进行联合暴露实验,以探讨各化合物对条纹锯鲂胚胎发育的毒性效应;并在 ANF 降低 CYP1A 活性的基础上,探讨 Phe、Py、BaP 3 种芳烃与 ANF 联合作用对条纹锯鲂胚胎发育的毒性,试图揭示不同环数芳烃的毒性作用方式,以及各 PAHs 物质在与 CYP1A 抑制剂联合作用下的毒性效应。

1 材料与方法

1.1 受精卵的获取

实验于 2014 年 3 月在福建连江县下屿永隆水产综合场进行。对挑选的亲鱼注射 2000 IU/kg 的人绒毛膜促性腺激素(HCG)进行催产,雄鱼注射剂量为雌鱼的 1/2。48 h 后使用性腺成熟度好的亲鱼,以 3 : 1 的雌雄比例获得卵子和精子,进行人工授精。将受精卵置于消过毒的加有海水的塑料桶中,约 5 min 后取上浮的好卵放入孵化桶中进行孵化培育,水温 (21±0.5)℃,微流水充气。当胚胎发育至原肠中期时,用手抄网将其捞出放入加海盐的海水中,盐度为 35(孵化及实验

用水为自然海水,盐度 32),静止 5~10 min 后取上浮的受精卵用于实验。

1.2 实验药品及配制

Phe、Py、Bap、ANF 和 7-乙氧基-3-异吩恶唑酮(ERF)均购自于 Sigma 公司,药品用助溶液丙酮配制成一定浓度的储备液,实验时再稀释成各种浓度的实验用液(表 1),设空白对照和丙酮对照 2 个对照组。

表 1 PAHs 浓度梯度设计

Tab. 1 The design of the PAHs concentration gradient

药品 drug	PAHs 质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) concentration of PAHs			
苯并芘 Bap	2	4	8	20
芘 Py	10	20	40	100
菲 Phe	50	100	200	500

实验前,结合已有相关实验,在预实验前提下确定各 PAHs 的浓度梯度。实验时,将受精卵分别单独暴露于各浓度的 PAHs 中,及联合暴露于各浓度 PAHs 与 100 $\mu\text{g/L}$ 的 ANF 混合溶液中;细胞色素酶(EROD)活性测定实验时,分别暴露于含有 ERF(21 $\mu\text{g/L}$ in DMSO)的各浓度 PAHs 及各浓度 PAHs 与 ANF 的混合溶液中。实验在 1000 mL 的烧杯中进行,每个烧杯中放入 100 粒受精卵,每组 3 个平行。实验采用静水法,12 h 更换 50 % 的实验液。实验中使用显微镜观察各处理组的胚胎发育情况,每 4 h 用吸管吸取死卵,观察并记录受精卵的胚胎发育情况、初孵仔鱼数、24 h 和 48 h 时的仔鱼死亡数。并拍照保存受损胚胎和仔鱼畸形状态。

1.3 EROD 的活性测定

参照文献^[15]的方法,对 EROD 的活性进行测定。当胚胎发育至孵化时选取 10~15 个受精卵进行荧光定量分析。CYP1A 催化 7-乙氧基-异吩恶唑酮(ERF)转化成为荧光代谢产物异吩恶唑酮,后者经代谢后富集在胚胎的膀胱内,其中的异吩恶唑酮量与 CYP1A 活性成正比,通过荧光显微镜拍摄,使用荧光分析软件(NIS-Elements BR 4.10)对图像中胚胎膀胱处的荧光密度(area meanIntensity)进行采集分析,以此来表示胚胎中 EROD 活性,以暴露组与空白组的对比数来表示 EROD 活性的相对诱导量。

1.4 畸形指数的评价

对胚胎发育畸形的评价采用畸形指数法^[16-17]。随机选取各处理组中的 10~15 个发育至即将孵出的胚胎, 观察其受损情况, 对机体部位的畸形症状(如心脏延长、卵黄囊肿大、脊椎弯曲等)进行拍照、分析, 发现心脏畸形是对毒理反应最为明

显的表现。因此, 以心脏延长为主要畸形指标, 对其心脏轮廓进行测量, 其周长数据代表畸形程度并根据数据范围分布对其进行赋值, 0、1、2 和 3 分别代表正常、轻度、中度和严重畸形水平(图 1)。

畸形指数(DI)=(n 个胚胎的畸形赋值之和/ $n \times$ 最大赋值) $\times 100$

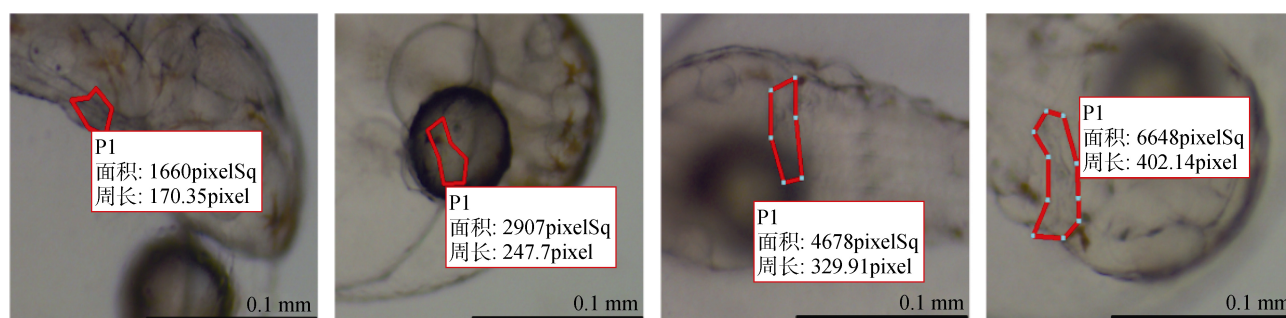


图 1 条纹锯鲷胚胎发育心脏畸形分级及赋值

A. 正常; B. 轻度畸形; C. 中度畸形; D. 严重畸形。

Fig. 1 Heart malformation classification and assignment of embryo development in *Centropomus striata*

A. Normal; B. Mild deformity; C. Moderate deformity; D. Severe deformity.

1.5 数据处理

实验结果取各组的平均值。使用 SPSS 17.0 软件对实验所得的数据进行 ANOVA 分析和 Duncan 多重比较, 结果用平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm SD$)来表示, 并用字母标记统计值的方法来表示其差异性, 字母相同表示数值间差异不显著($P>0.05$), 字母不同则表示数据差异显著($P<0.05$)。

2 结果与分析

2.1 PAHs 对条纹锯鲷胚胎 EROD 活性的影响

2.1.1 菲(Phe) 溶剂丙酮组的 EROD 活性(98.47%)与空白处理组(100%)相比基本没有差异, 表明助溶剂丙酮对胚胎 EROD 活性无显著影响。Phe 对胚胎 EROD 活性的影响见图 2, 胚胎体内的 EROD 活性随 Phe 浓度的上升而不断增加, 但趋势较缓, 在 Phe 质量浓度高于 100 $\mu\text{g/L}$ 时, EROD 活性才显著高于对照组($P<0.05$), 最高 Phe 浓度时的 EROD 相对诱导量为 280.5%; 当 Phe 与 ANF 联合作用时, 胚胎内的 EROD 活性受到的抑制不明显, 联合暴露组和单一暴露组间无显著差异($P>0.05$)。通过数据分析可发现, Phe 对 EROD 活

性的诱导能力较弱。

2.1.2 芘(Py) Py 单一暴露时对胚胎体内的 EROD 活性诱导较为显著, 各处理组与对照组均差异显著($P<0.05$, 图 2), 最高浓度时的 EROD 活性相对诱导量为 514.21%; 当与 ANF 联合暴露时, EROD 活性诱导水平被明显抑制, 各联合暴露组与单一暴露组间呈显著差异($P<0.05$)。Py 具有较强的 EROD 活性诱导能力。

2.1.3 苯并芘(Bap) Bap 对 EROD 活性的诱导较 Phe 和 Py 都强, 在初始浓度为 2.0 $\mu\text{g/L}$ 时, Bap 单一暴露对 EROD 的诱导就与对照组差异显著($P<0.05$), 最高浓度时 EROD 活性相对诱导量为 857.52%; 与 ANF 联合暴露时, EROD 活性诱导被明显抑制, 各联合暴露组与单一暴露组间呈极显著差异($P<0.05$), 最高浓度组的 EROD 相对诱导量为 189.2%(图 2)。条纹锯鲷胚胎中异吩噻唑酮的荧光影像如图 3 所示。

2.2 PAHs 对条纹锯鲷胚胎及早期仔鱼的毒性效应

2.2.1 PAHs 对胚胎及早期仔鱼的毒理表现 在 PAHs 单独暴露对条纹锯鲷胚胎和早期仔鱼的毒性实验中, 通过各处理组与对照组的对比分析及

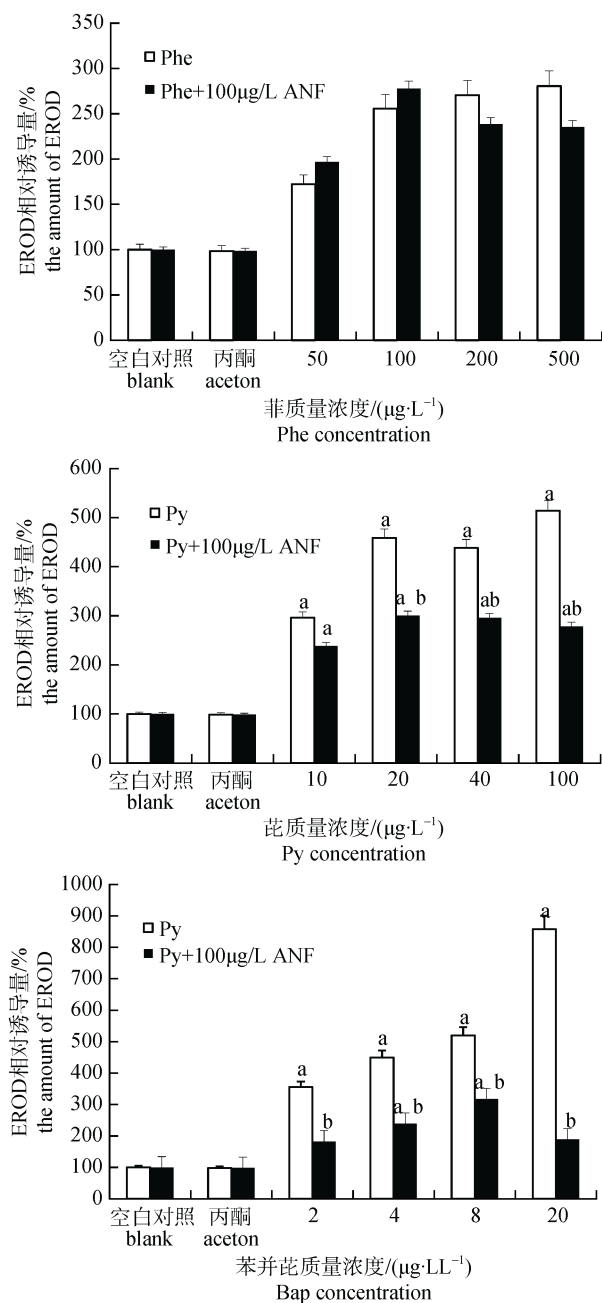


图 2 3 种 PAHs 单一暴露和分别与 ANF 联合暴露对条纹锯鲷胚胎细胞色素酶(EROD)活性的影响

“a”表示暴露组与对照组间显著差异($P < 0.05$); “b”表示单一暴露组和联合暴露组间显著差异($P < 0.05$).

Fig. 2 Three PAHs single exposure and the PAH+ANF combined exposure effect on embryonic ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity in *Centropomus striatus*

“a” denotes significant difference between exposed group and control group ($P < 0.05$); “b” denotes significant differences between single exposure group and the combined exposure group ($P < 0.05$).

其胚胎发育和仔鱼生长状况的比较观察发现 3 种 PAH 均会对胚胎和仔鱼产生一系列的毒性效应: 心腔肿大、尾芽弯曲、仔鱼不能出膜而死亡。死亡受精卵呈白色不透明状, 沉在烧杯底部渐渐解体糜烂; Phe 处理组与对照组的仔鱼出膜时间相同步, Bap、Py 处理组的仔鱼出膜时间出现延迟, 其浓度越高, 时间延迟越严重; 即使破膜出来的仔鱼, 大多数活力较差, 畸形鱼占比例较高, 经过一段时间, 仔鱼渐渐沉降于烧杯的底部, 身体蜷缩弯曲畸形明显, 大量死亡, 添加物浓度越高, 其表现越明显。

PAHs 和 ANF 联合暴露与 PAHs 单独暴露相比, Bap、Py 处理组的仔鱼出膜时间与对照组同步, 没有出现延迟, 胚胎发育及早期仔鱼的毒理反应与 PAHs 单独暴露时都相似, 受毒害程度相对较轻。

2.2.2 PAHs 对胚胎及仔鱼的毒性影响 Phe、Py、Bap 3 种多环芳烃对条纹锯鲷胚胎发育及早期仔鱼的毒性影响如表 2 和表 3 所示。助溶剂丙酮组与空白对照组在孵化率、畸形指数、24 h 死亡率和 48 h 死亡率指标差异不显著($P > 0.05$), 说明所用的助溶剂丙酮对条纹锯鲷胚胎发育及早期仔鱼的毒性效应不明显。

在 Phe 影响下, 条纹锯鲷胚胎发育的畸形指数升高, 孵化率下降, 在初始浓度 50 µg/L 时, 畸形指数为 22.33 ± 2.52 , 与对照组(0.00 ± 0.00)差异显著($P < 0.05$); 孵化率为 $(88.25 \pm 0.49)\%$, 与对照组 [$(91.82 \pm 2.64)\%$] 差异不显著($P > 0.05$)。在最高浓度 500 µg/L 时, 畸形指数和孵化率分别为 $(70.33 \pm 0.58)\%$ 和 $(72.56 \pm 2.21)\%$, 与对照组均差异显著, 初孵仔鱼的活力较差, 最高浓度组的仔鱼 48 h 死亡率为 $(32.57 \pm 4.98)\%$; Phe 和 ANF 联合作用对条纹锯鲷胚胎发育及早期仔鱼的毒性影响和 Phe 单一暴露时较接近, 最高浓度组时的畸形指数、孵化率、48 h 仔鱼死亡率分别为 $(85.67 \pm 4.04)\%$ 、 $(71.49 \pm 0.07)\%$ 、 $(26.62 \pm 2.71)\%$, 与对照组差异显著($P < 0.05$)。

Py 单一暴露时, 其浓度与胚胎发育的畸形指数和仔鱼的死亡率呈正相关, 与孵化率呈负相关。在初始浓度 10 µg/L 时, 畸形指数和孵化率分别为 32.33 ± 2.52 、 $(53.93 \pm 1.26)\%$, 均与对照组

差异显著($P<0.05$), 在最高浓度 500 $\mu\text{g/L}$ 时, 两者分别为 80.00 ± 0.00 和 $(31.43\pm0.99)\%$, 初孵仔鱼的活力较差, 最高浓度组的仔鱼在 24 h 时完全死亡, 死亡率为 $(100.00\pm0.00)\%$; Py 与 ANF 联合

暴露与 Py 单一暴露相比, 条纹锯鲷胚胎发育和早期仔鱼的毒性效应出现缓解, 最高浓度组的畸形指数、孵化率、48 h 仔鱼死亡率分别为 73.58 ± 6.68 、 $(78.09\pm2.53)\%$ 、 $(24.28\pm4.00)\%$ 。

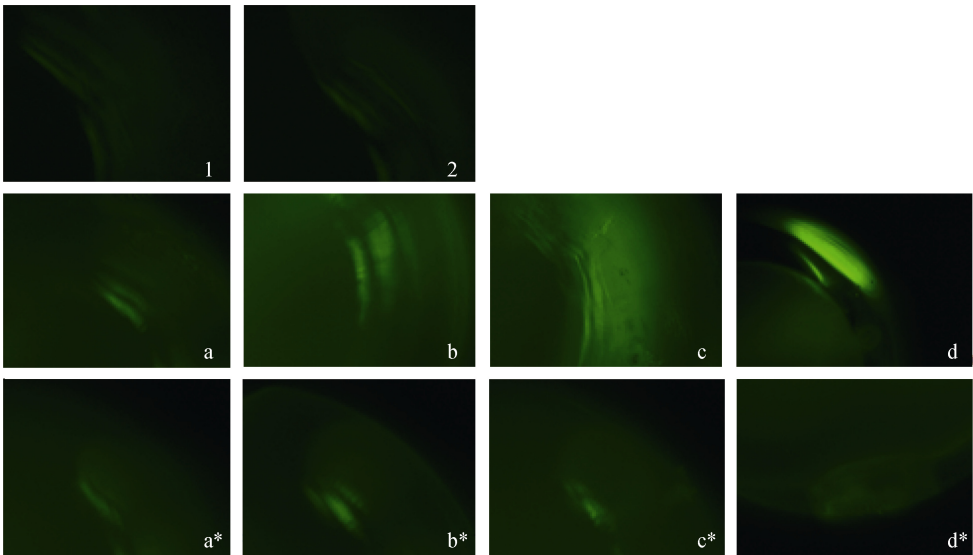


图 3 条纹锯鲷胚胎中异吩噻嗪酮的荧光影像(以 Bap 为例)

1. 空白; 2. 丙酮; a-d: 2、4、8、20 $\mu\text{g/L}$ Bap 单一暴露; a*-b*: 2、4、8、20 $\mu\text{g/L}$ Bap 与 ANF 联合暴露.

Fig. 3 Fluorescence images of embryosin resorufin in *Centropomus striatus* (in the case of Bap)

1. Blank control group; 2. Acton group; a-d. Groups under single exposure of 2, 4, 8, 20 $\mu\text{g/L}$ Bap; a*-b*. Groups under combined exposure of 2, 4, 8, 20 $\mu\text{g/L}$ Bap and 100 $\mu\text{g/L}$ ANF.

表 2 PAHs 单一暴露对条纹锯鲷鱼的毒性影响

Tab. 2 Toxic effect of PAHs single exposure on *Centropomus striatus*

PAHs	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ concentration	孵化率/% hatching rate	畸形指数 abnormality index	死亡率/% mortality	
				24 h	48 h
丙酮 acton	1 $\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$	89.97 ± 1.55^a	4.40 ± 1.91^a	4.56 ± 1.28^a	8.64 ± 0.87^a
对照组 contrast	0	91.82 ± 2.64^a	0.00 ± 0.00^a	2.55 ± 1.47^a	2.23 ± 0.40^a
	50	88.25 ± 0.49^a	22.33 ± 2.52^b	10.65 ± 2.53^b	17.86 ± 0.33^{bc}
菲 Phe	100	84.81 ± 1.17^{ab}	42.33 ± 2.52^c	21.34 ± 4.00^c	22.38 ± 6.26^c
	200	78.39 ± 5.28^{bc}	68.33 ± 3.51^d	21.04 ± 2.14^c	22.75 ± 3.00^c
	500	72.56 ± 2.21^c	70.33 ± 0.58^d	22.72 ± 1.55^c	32.57 ± 4.98^d
芘 Py	10	53.93 ± 1.26^b	32.33 ± 2.52^b	52.81 ± 0.83^b	43.85 ± 3.18^b
	20	34.93 ± 0.92^c	46.05 ± 6.76^c	87.54 ± 0.56^c	69.67 ± 4.04^c
	40	29.56 ± 1.87^d	60.33 ± 4.51^d	91.63 ± 3.10^c	100.00 ± 0.00^d
	100	31.43 ± 0.99^{cd}	80.00 ± 0.00^e	100.00 ± 0.00^d	—
苯并芘 Bap	2	73.47 ± 0.71^b	8.20 ± 4.11^b	17.65 ± 1.43^b	26.93 ± 0.85^b
	4	59.07 ± 3.30^c	41.22 ± 1.83^c	23.94 ± 0.28^b	49.48 ± 7.32^c
	8	44.45 ± 4.45^d	51.34 ± 1.16^d	55.18 ± 4.54^c	67.80 ± 3.90^d
	20	28.60 ± 9.63^e	48.00 ± 0.00^d	84.93 ± 3.20^d	94.03 ± 6.27^e

注: 丙酮组与对照组做独立性 T 检验, 对照组分别与菲、芘、苯并芘处理组间做多重比较, 不同字母表示组间差异显著($P<0.05$).

Note: Independence T test between acetone and control groups. Multiple comparison among control and Phe, Py, Bay treatments. Different letters denote significant difference ($P<0.05$).

表 3 PAHs 与 ANF 联合暴露对条纹锯鲈鱼的毒性影响
Tab. 3 Toxic effect of combined exposure of PAHs and ANF on *Centropomus striata*

PAHs+100μg/L ANF	质量浓度/(μg·L ⁻¹) concentration	孵化率/% hatching rate	畸形指数 abnormality index	死亡率/% mortality	
				24 h	48 h
丙酮 acton	1 ml/L	90.28±2.74 ^a	5.71±0.27 ^a	6.23±0.92 ^a	7.35±0.29 ^a
对照组 contrast	0	95.69±1.05 ^a	0.00±0.00 ^a	2.06±0.42 ^a	2.57±0.38 ^a
	50	83.48±3.48 ^b	51.46±1.70 ^b	14.67±4.51 ^b	12.70±2.08 ^b
菲 Phe	100	73.05±0.35 ^c	56.73±3.34 ^b	22.33±1.53 ^c	18.59±0.32 ^c
	200	73.79±1.21 ^c	81.33±2.31 ^c	26.00±1.00 ^c	23.77±0.70 ^d
	500	71.49±0.07 ^c	85.67±4.04 ^c	32.33±1.53 ^d	26.62±2.71 ^d
芘 Py	10	79.91±4.20 ^b	45.67±1.15 ^b	6.55±0.45 ^b	7.52±1.06 ^b
	20	76.63±5.05 ^b	60.82±5.84 ^c	12.60±0.53 ^c	15.04±2.18 ^c
	40	80.70±3.27 ^b	75.02±5.00 ^d	15.76±0.57 ^c	18.24±0.86 ^c
	100	78.09±2.53 ^b	73.58±6.68 ^d	19.87±2.99 ^d	24.28±4.00 ^d
苯并芘 Bap	2	76.83±1.68 ^b	26.56±0.51 ^b	9.03±1.57 ^b	9.66±1.35 ^b
	4	75.23±0.59 ^b	40.29±0.70 ^c	9.69±0.93 ^b	12.69±1.44 ^{bc}
	8	71.38±0.51 ^b	60.03±0.05 ^d	14.11±0.12 ^c	16.88±1.63 ^{cd}
	20	64.65±0.32 ^c	67.00±8.54 ^d	17.95±0.17 ^d	22.21±4.21 ^d

注：丙酮组与对照组做独立性 T 检验，对照组分别与菲、芘、苯并芘处理组间做多重比较，不同字母表示组间差异显著(P<0.05)。
Note: Independence T test between acetone and control groups. Multiple comparison among control and Phe, Py, Bay treatments. Different letters denote significant difference (P<0.05).

Bap 单一暴露时，其浓度与胚胎发育畸形指数、仔鱼死亡率呈正相关，与孵化率呈负相关；在初始浓度 2 μg/L 时，畸形指数为 8.20±4.11、孵化率为 (73.47±0.71)%，均与对照组差异显著(P<0.05)，在最高浓度 20 μg/L 时，两者分别为 (48.00±2.00)和(28.60±9.63)%，初孵仔鱼活力较差，最高浓度组的仔鱼在 24 h、48 h 的死亡率分别为 (84.93± 3.20)%和(94.03±6.27)%；Bap 与 ANF 联合暴露与 Bap 单一暴露相比，条纹锯鲈胚胎发育和早期仔鱼的毒性效应出现缓解，最高浓度组时的畸形指数、孵化率和 24 h 仔鱼、48 h 仔鱼死亡率分别为 67.00±8.54、(64.64±0.32)%、(17.95±0.17)%和 (22.21±4.21)%。

3 讨论

3.1 菲(Phe)

已有研究表明，Phe 作为一种典型的三环 PAHs 化合物，是一种较弱的 AHR 激动剂和较低的 CYP1A 诱导剂，预测其毒性机制为非特异性麻醉作用^[18-19]。

本实验发现，当 Phe 单一暴露时，随着其浓

度的增加，条纹锯鲈胚胎体内的 EROD 活性升高，但趋势较缓，不够明显，最高浓度 500 μg/L 时的 EROD 相对活性为 280.50，仅比初始浓度 50 μg/L 时增加了 62.82%。随着 Phe 浓度的增加，胚胎发育及早期仔鱼的毒性效应逐渐显现，最高浓度组与初始浓度组相比，受精卵孵化率下降了 17.80%，畸形指数(以心脏畸形为准)和 48 h 仔鱼死亡率分别增加了 214.96%、82.36%。当 Phe 与 ANF 联合作用时，EROD 活性受到抑制，受精卵孵化率及仔鱼死亡率都得到一定缓解，但不显著。值得注意的是，各浓度处理组的畸形指数都反而增加，如 500 μg/L 浓度组，当与 ANF 联合暴露时其畸形指数增加了 21.81 %。结果表明，Phe 对 CYP1A 活性的诱导效应很弱，对条纹锯鲈胚胎及早期仔鱼的毒性效应主要是非特异性的麻醉毒性机制。这与 Hawkins 等^[20]对虹鳟的研究结果相一致。

3.2 芘(Py)

本实验中，Py 单一暴露时可显著诱导条纹锯鲈胚胎体内的 EROD 活性，孵化率明显下降，畸形指数及 24 h 仔鱼死亡率较高，如处理浓度为 100 μg/L 时，三者数值分别为 31.43±0.99、(80.00±

0.00)%、(100±0.00)%; 当 Py 与 ANF 联合暴露时, EROD 活性被显著抑制, 胚胎发育及早期仔鱼的毒性效应得到明显抑制, 与 Py 单一暴露时相比, 最高浓度组的孵化率提高了 50%, 24 h 仔鱼死亡率下降了近 80%。但是, 畸形指数与 CYP1A 抑制剂 ANF 间没有显示出明显的剂量效应关系, Py 浓度较低时, 与 ANF 结合后畸形指数增加, Py 浓度较高时, 其值则降低。结果表明, Py 对条纹锯鲃胚胎及早期仔鱼的毒性作用涉及非特异性的麻醉毒性和 AHR 途径及 CYP1A 活性诱导两种机制, 当 CYP1A 被 ANF 抑制后, Py 不能被 CYP1A 分解成毒性更强的代谢物质, 因此, 条纹锯鲃的孵化率、仔鱼存活率得到提高; Py 不能被分解代谢, 增加了其在体内的保留积累时间, 也增强了 Py 结合并激活 AHR 的途径, 由于 Py 处理浓度不同, 两种机制的表达存在差异, 因此, 胚胎发育畸形率会出现不同程度的增加或降低。

本研究中, Py 导致条纹锯鲃早期发育阶段的围心腔和卵黄囊水肿、脊柱弯曲等毒性效应十分明显, 这与 Py 对斑马鱼胚胎发育影响的研究结果一致^[21]。Incardona 等^[22]指出, Py 对斑马鱼的发育毒性可能由 AHR 途径并诱导特异 CYP1A 表达而产生, 与本研究的结论也存在共同之处。Wassenberg 等^[16]对斑马鱼的研究中, 当 Py 与 ANF 联合暴露时, 孵化率降低, 畸形指数增加, 其毒性效应比 Py 单一暴露时更大, 其结果与本研究有一定的差异, 分析其原因: 实验条件、鱼种等因素不同, 非特异性的麻醉毒性和 AHR 途径及 CYP1A 活性诱导两种机制的表达强度不同所造成的, 具体原因有待进一步研究。

3.3 苯并芘(BaP)

BaP 对鱼类早期发育的毒性机制与其致癌性相似, 即 CYP1A 酶通过催化氧化反应而产生具有强活性的中间代谢物, 从而引发一系列毒性效应。上述假设如果成立, CYP1A 活性诱导被抑制将缓解 BaP 对胚胎的毒性效应。

本实验发现, BaP 单独处理时对条纹锯鲃胚胎体内的 EROD 活性诱导显著, 孵化率、畸形指数及仔鱼死亡率也都受到较大影响; 当 BaP 与

ANF 一起作用时, EROD 活性受到显著抑制, 早期发育的毒性效应得到明显缓解, 与 BaP 单一暴露时相比, 最高浓度组的孵化率提高了 40%; 48 h 仔鱼死亡率下降了近 70%, 但畸形指数增加。结果表明, CYP1A 活性诱导与孵化率、仔鱼存活率间存在明显的剂量效应关系, 其毒性机制是 CYP1A 活性被诱导, 分解产生毒性更强的中间代谢物; CYP1A 被抑制并没有缓解 BaP 对胚胎发育的致畸效应。即: 当 CYP1A 诱导被抑制时, 虽然减少了有毒物质的生成, 同时也延长了 BaP 在体内的残留时间, 提高了 BaP 与 AHR 持久结合的能力, 从而以 AHR 途径产生毒性。

Wills 等^[17]在 BaP 对 Killifish 的研究中指出, FL 作为 CYP1A 抑制剂, 提高了 BaP 在胚胎体内的累积浓度, 且 BaP 与 FL 共同作用具有很强的协同致毒性, 这和本研究的结论相一致。但 Matson 等^[23]指出当 CYP1A 活性被抑制的情况下, CYP1s 的其他酶系可能将发挥主要作用, 虽然对 BaP 的活化代谢效率较低, 但生成的代谢物毒性可能会更强。因此, BaP 与 ANF 混合物的作用方式非常复杂, CYP1A 活性被抑制可能转变了 BaP 的代谢方式或增加了其在体内的存留时间, 从而提高 BaP 与 AHR 的结合能力和持久性, 进而产生上述结果。

对研究结果综合分析发现: 菲、芘、苯并芘 3 种多环芳烃对条纹锯鲃胚胎及早期仔鱼阶段的发育具有很大的影响, 而且其毒性效应的强度大小和作用方式存在一定的不同。综合考虑 EROD 活性、孵化率、畸形指数和早期仔鱼死亡率等指标, 3 种 PAHs 对胚胎发育及早期仔鱼的毒性由高到低依次为 BaP、Py、Phe。EROD 活性的诱导(CYP1A)与受精卵孵化率和仔鱼存活率具有相关性, 但与发育畸形之间的关系较为复杂; 且在 ANF 影响下, BaP 和 Py 处理组的毒性效应得到明显抑制, Phe 处理组的毒性效应与单一暴露处理相比无相关性。因此, ANF 与 PAHs 类物质联合作用, 并不是简单的相叠加, 而是存在复杂的协同作用, 其作用机制也存在不同。因此, 在对现实环境做 PAHs 毒性风险评价时, 不能依据 CYP1A 诱导这

一单一指标, 要综合考虑不同物质之间可能存在的协同作用。

参考文献:

- [1] Wang X H, Zheng J S. POPs pollution in marine environment and its analysis and monitoring technology[M]. Beijing: China Ocean Press, 2011: 13–20. [王新红, 郑金树. 海洋环境中的 POPs 污染及其分析监测技术[M]. 北京: 海洋出版社, 2011: 13–20.]
- [2] Peterson R E, Theobald H M, Kimmel G L. 1993. Developmental reproductive toxicity of dioxins and related compounds: Cross-species comparisons[J]. Crit Rev Toxicol, 1993, 23: 283–335.
- [3] Walker M K, Peterson R E. Aquatic toxicity of dioxins and related chemicals[M]//Schechter A. Dioxins and Health. New York: Plenum, 1944: 347–387.
- [4] White P A, Robitaille S, Rasmussen J B. Heritable reproductive effects of benzo[a]pyrene on the fathead minnow(*Pimephales promelas*)[J]. Environ Toxicol Chem, 1999, 18: 1843–1847.
- [5] Billiard S M, Hahn M E, Franks D G, et al. Binding of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) to teleost aryl hydrocarbon receptors[J]. Comp Biochem Physiol B, 2002, 133: 55–68.
- [6] Lei J L, Lu J W. The breed predominance and culture prospects of *Centropomus striata* Linnaeus[J]. Marine Fisheries Research, 2007, 28(5): 110–115. [雷霖霖, 卢继武. 美洲黑石斑鱼的品种优势和养殖前景[J]. 海洋水产研究, 2007, 28(5): 110–115.]
- [7] Chu Y W. Seedling and cultivation technology of *Centropomus striata*[J]. Shandong Fishery, 2004, 21(1): 12. [褚衍伟. 美洲黑石斑鱼的育苗与养成技术[J]. 齐鲁渔业, 2004, 21(1): 12.]
- [8] Qiu J H, Lin X. Analysis of nutrient and evaluation of nutritional value for *Centropomus striata*[J]. Journal of Hydroecology, 2009, 2(6): 107–112. [邱金海, 林星. 美洲黑石斑鱼营养成分分析与营养价值评价[J]. 水生态学杂志, 2009, 2(6): 107–112.]
- [9] Dang R, Zhu J Q, Qiu X Z. Analysis of flesh content and nutrient components in the muscle of *Centropomus striata*[J]. Journal of Marine Sciences, 2010, 28(2): 60–66. [党冉, 竺俊全, 邱新志. 美洲黑石斑鱼含肉率及肌肉营养成分分析[J]. 海洋学研究, 2010, 28(2): 60–66.]
- [10] Li H Y, Zhu J Q, Chen F, et al. The morphology of the digestive tract of *Centropomus striata*[J]. Journal of Biology, 2011, 28(4): 31–46. [李海燕, 竺俊全, 陈飞, 等. 美洲黑石斑鱼消化道的形态结构[J]. 生物学杂志, 2011, 28(4): 31–46.]
- [11] Jia R J, Wang L, Zhao C M. Preliminary studies on embryonic development and morphology of the yolk-sac larvae of *Centropomus striata* Linnaeus[J]. Progress in Fishery Sciences, 2012, 33(4): 11–17. [贾瑞锦, 王鲁, 赵从明, 等. 条纹锯胎发育及卵黄囊仔鱼形态变化的观察[J]. 渔业科学进展, 2012, 33(4): 11–17.]
- [12] Zhou M T. Experiment on sea cage culture of induced *Centropomus striata*[J]. Modern Fisheries Information, 2011, (8): 28–29. [周明涛. 引进美洲黑石斑鱼海水网箱养殖实验[J]. 现代渔业信息, 2011, (8): 28–29.]
- [13] Incardona J P, Day H L, Collier T K, et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 217(3): 308–321.
- [14] Mu J L, Wang X H, Jin F, et al. Effects of phenanthrene, pyrene and benzo(a) pyrene individual exposure and co-exposure with α -naphthoflavone on the embryonic development of marine medaka(*Oryzias melastigma*)[J]. ACTA Oceanologica Sinica, 2012, 34(6): 142–148. [穆景利, 王新红, 靳非, 等. 菲、芘、苯并(a)芘单一暴露及分别与仅一萘黄酮 (ANF) 联合暴露对海水青鳉 (*Oryzias melastigma*) 胚胎发育毒性效应的比较研究[J]. 海洋学报, 2012, 34(6): 142–148.]
- [15] Cong W, Wang X H. Response of EROD activity of the *Pagrus major* during embryonic development exposed to benzo(a)pyrene[J]. Journal of Xiamen University: Natural Science, 2007, 46(1): 120–122. [丛伟, 王新红. 苯并(a)芘对真鲷胚胎 EROD 活性影响的测定[J]. 厦门大学学报: 自然科学版, 2007, 46(1): 120–122.]
- [16] Wassenberg D M, Di Giulio R T. Synergistic embryotoxicity of polycyclic aromatic hydrocarbon aryl hydrocarbon receptor agonists with cytochrome P4501A inhibitors in *Fundulus heteroclitus*[J]. Environ Health Perspect, 2004, 112: 1658–1664.
- [17] Wills L P, Zhu S, Willett K L, et al. Effect of CYP 1A inhibition on the biotransformation of benzo[a]pyrene in two populations of *Fundulus heteroclitus* with different exposure histories[J]. Aquat Toxicol, 2009, 92(3): 195–201.
- [18] Incardona J P, Collier T K, Scholz N L. Defects in cardiac function precede morphological abnormalities in fish embryos exposed to polycyclic aromatic hydrocarbons[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2004, 196: 191–205.
- [19] Van Wezel A P, Opperhuizen A. Narcosis due to environmental pollutants in aquatic organisms: Residue-based toxicity, mechanisms, and membrane burdens[J]. Crit Rev Toxicol

- col, 1995, 25(3): 255–279.
- [20] Hawkins S A, Billiard S M, Tabash S P, et al. Altering cytochrome P4501A activity affects polycyclic aromatic hydrocarbon metabolism and toxicity in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*)[J]. Environ Toxicol Chem, 2002, 21: 1845–1853.
- [21] Teraoka H, Dong W, Tsujimoto Y, et al. Induction of cytochrome P450-1A is required for circulation failure and edema by 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo P- dioxin in zebrafish[J]. Biochem Biophysical Res Commun, 2003, 304(2): 223–228.
- [22] Incardona J P, Day H L, Collier T K, et al. Developmental toxicity of 4-ring polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish is differentially dependent on AH receptor isoforms and hepatic cytochrome P4501A metabolism[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2006, 217(3): 308–321.
- [23] Matson C W, Timme-Laragy A R, Di Giulio R T. Fluoranthene, but not benzo[a]pyrene, interacts with hypoxia resulting in pericardial effusion and lordosis in developing zebrafish[J]. Chemosphere, 2008, 74(1): 149–154.

Toxic effects of three polycyclic aromatic hydrocarbons on early embryonic and larval development of *Centropristis striata*

KONG Xiangdi^{1,2}, LIU Li^{1,2}, LI Yanlu², YU Huanhuan^{1,2}, CHEN Chao²

1. College of Fisheries and Science, Shanghai Ocean University, Shanghai 201306, China;

2. Yellow Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Qingdao 266071, China

Abstract: We conducted this study to determine the toxicity mechanism of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) on the early development of the marine fish *Centropristis striata*. We analyzed individual exposure to phenanthrene (Phe), pyrene (Py), and benzo(a)pyrene (BaP) and co-exposure of each with α -naphthoflavone (ANF) to assess their toxic effects on early embryonic and larval development of *C. striata*. The results showed a clear dose-response relationship between BaP and Py concentration and ethoxyresorufin-O-deethylase (EROD) activity compared with that of Phe. The effects of the PAHs on EROD activity were in the order BaP (857.52% of control) > Py (514.21%) > Phe (280.50%). Maximum EROD activity occurred at the highest concentration compared with that of the control group. EROD activity was inhibited (189.27%, 278.55%, and 195.40% of the control) when ANF was added to BaP, Py, and Phe, respectively. Toxicity of the PAHs to hatching rate, deformity index, and early embryo and larval mortality was in the order of BaP > Py > Phe. PAH concentration and the percentage of fertilized eggs and hatching rate were negatively correlated but PAH concentration was positively correlated with larval mortality and the deformity index. BaP and Py showed reduced toxicity when combined with ANF. These results show that PAHs with different ring structures have obvious toxic effects, although there were differences in the mechanisms among them.

Key words: *Centropristis striata*; PAHs; embryo; larvae; toxic effect

Corresponding author: CHEN Chao. Tel: 0532-85844459; E-mail: ysfrichenchao@126.com