

有机磷农药对鱼类的毒性效应及内分泌扰乱作用*

TOXIC AND ENDOCRINE DISRUPTING EFFECTS OF ORGANOPHOSPHORUS PESTICIDES ON FISH

魏渲辉 汝少国** 姜明 魏建功 李永祺

(青岛海洋大学海洋生命学院 266003)

有机磷农药是一类高效、低残留的农药,20世纪80年代以来被广泛应用于农林业。据华小梅和单正军1996统计,在过去20年里,有机磷农药的生产量和使用量急剧增长,目前已经成爲当今使用最广谱的农药。有机磷农药的使用为农林业的增产丰收立下了汗马功劳,但所使用的农药会随雨水冲刷等途径而进入河流、湖泊和海洋,造成水体农药污染,对水生生物造成威胁。本文综述了国内外有关有机磷农药对海淡水鱼类的毒性及内分泌扰乱作用研究的最新进展。

1 鱼类对有机磷农药的敏感性

农药的分子结构及脂溶性不同,导致不同农药对同一种鱼类的毒性不同。如二甲基硫代磷酸酯类农药的毒性要低于二乙基硫代磷酸酯类农药。原因是两种农药对乙酰胆碱酯酶的抑制能力不同,而且前者可以被生物转化酶(谷胱甘肽-S-转移酶)转甲基而脱毒,而後者的分子较大阻断了这种转化作用^[1]。

同一农药对不同鱼类和同一种鱼类的不同发育阶段的毒性也不同。其原因是农药在不同鱼体内的分布、激活和解毒等过程比较复杂。一般来说,鱼类的不同发育阶段对有机磷农药的敏感性由强到弱的顺序为幼鱼>仔鱼>卵。卵对有机磷农药的敏感性较差,可能是因为其卵壳蛋白具有保护作用。

2 有机磷农药对鱼类的毒性效应

2.1 有机磷农药对鱼类乙酰胆碱酯酶的抑制作用

鱼类乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE, EC: 3.1.1.7)主要存在于神经组织和血细胞中,有机磷农药可使AChE活性中心的丝氨酸羟基磷酸化,从

而抑制其活性。但是研究表明只有磷酸酯类农药可以直接抑制AChE活性,而硫代磷酸酯类农药则不能起直接抑制作用,需被混合功能氧化酶氧化脱硫后才能发挥抑制作用。另外,有机磷农药还可抑制体内AChE的从头合成途径来降低酶活性^[2]。有机磷农药对同种鱼类的不同组织和不同鱼类的同种组织AChE的抑制作用不同。如Straus等^[3]发现对氧磷对斑鲳脑和肌肉的AChE半数抑制浓度(IC₅₀)分别为31.6 nmol/L和528.9 nmol/L,而对食蚊鱼(*Gambusia affinis*)脑和肌肉AChE的IC₅₀分别为20.8 nmol/L和1.2 nmol/L,这种不同主要源于酶本质的不同,即不同来源的AChE对有机磷农药的亲性和被磷酸化的速率以及酶的数量不同。

有机磷农药除抑制AChE活性外,还可影响鱼体内AChE的分子形式。哺乳动物体内共有6种分子形式:球形单体G₁,二聚体G₂,四聚体G₄及四聚体通过二硫键首尾相连形成A₄,A₆和A₂三种形式。Nemcsok等^[4]发现鲤鱼(*Cyprinus carpio*)体内只有G₁,G₄和A₂三种形式AChE,当用杀扑磷处理后G₁形式下降,G₄形式上升,肝脏G₁形式上升4倍,而G₄则明显下降。Szegetes等^[5]发现鲤鱼的心脏和肌肉中不含G₁形式的酶,而经杀扑磷处理后出现了G₁形式的酶,并且G₄和A₂两种形式的酶数量也减少。这是因为杀扑磷

* 国家自然科学基金资助项目39870580号。

** 通讯作者:汝少国, nsg@public.qd.sd.cn

第一作者:魏渲辉,出生于1973年,现北京大学博士生,从事污染生态学研究。

收稿日期:2001-08-30;修回日期:2002-04-15

改变了 AChE 的“聚合与解离”特性,或者抑制 AChE 的从头合成途径^[6]。

2.2 有机磷农药对鱼类组织器官的毒性效应

2.2.1 有机磷农药对鱼肝细胞超显微结构的影响 Dutta 等^[7]发现马拉硫磷处理囊鳃鲂 (*Heteropneustes fossilis*) 后,较轻的损伤表现为部分细胞膨胀,胞质液泡化,细胞核固缩,较严重时肝细胞典型形态消失,两个或三个细胞发生膜的破裂和融合,部分细胞坏死,核膜破裂溶解。Balint 等^[6]发现杀扑磷处理后,鲤鱼肝脏的超微结构变化有核固缩,线粒体和粗糙内质网膨胀,出现大量脂滴和胆色素,严重时细胞膜及细胞器膜破裂溶解。

2.2.2 有机磷农药对鱼鳃细胞超显微结构的影响 鳃显微结构的主要变化表现为鳃上皮细胞坏死和破裂以及鳃的防御反应,鳃的防御反应包括粘液细胞分泌大量粘液,氯细胞增殖,鳃小片上皮细胞脱离基膜并出现水肿,鳃小片血管内出现血细胞淤积,毛细血管管腔膨胀及白细胞浸出。超微结构变化包括鳃小片上皮细胞之间的紧密连接受损,与支持细胞之间的毛细血管管腔增大,氯细胞与基膜间隙增大,线粒体嵴局部溶解。在扫描电镜下可观察到粘液细胞开口增加并变大,鳃小片上皮出现许多裂隙、隆起和凹陷^[8]。

2.3.1 有机磷农药对血液各生化参数的影响 当鱼类暴露于有机磷农药中时,由于肾组织的损伤,促使红细胞生成素的活性发生改变,从而使红细胞数量减少,体积增大,红细胞比容降低,血红蛋白含量降低^[9]。在暴露初期,会激发体内的免疫反应,因此往往使得白细胞数量增加^[9],而随着时间的延长,造血系统出现机能障碍,从而使其数量减少。如亚致死浓度的马拉硫磷使华生小鲤 (*Cyprinion watsoni*) 血清总蛋白明显降低。通过电泳发现囊鳃鲂在马拉硫磷的不同暴露时间,血清蛋白的某些组分在量上出现了一些变化,这可能是组织损伤造成的^[10]。

3 有机磷农药对鱼类的内分泌扰乱作用

3.1 对甲状腺激素的扰乱

有机磷农药可以通过神经系统的介导来影响激素的稳态。如马拉硫磷可通过促进囊鳃鲂甲状腺外甲

状腺素 (T_4) 的单脱碘作用,造成血液三碘甲状腺原氨酸 (T_3) 含量明显上升而 T_4 含量下降, T_3/T_4 比值明显上升,在产卵期,这种作用尤为明显。稻丰收可使翠鳃碘过氧化物酶降低,血液中 T_4 含量降低, T_3 含量上升^[11]。但马拉硫磷却抑制胡鲂肾脏 T_4 的分泌,刺激甲状腺 T_4 的合成,抑制血中 T_4 到 T_3 的转化。这种不同可能源于农药分子结构的不同。

3.2 对性激素的扰乱

有机磷农药可通过影响卵巢中类固醇激素合成途径的芳构化作用或通过影响性成熟雌鱼的胆固醇含量而直接影响性激素的合成。如马拉硫磷虽然不影响囊鳃鲂胆固醇的合成,但明显影响酯化胆固醇的水解,从而会影响到性激素的合成。有机磷农药还可以抑制丘脑分泌促性腺激素释放激素 (GnRH),降低血中促性腺激素 (GTH) 含量,从而间接影响卵巢类固醇的生成作用。这两种作用的结果导致了血液中雌二醇,雌酮和 17α 羟基孕酮含量的下降,使生殖机能受损。此外,有机磷农药还可以影响雄性激素的生成。如 Bagchi 等^[12]曾报道啶硫磷可以抑制胡鲂雄性激素合成过程中的两种关键酶 (3β -羟基类固醇脱氢酶和 17β -羟基类固醇脱氢酶),从而影响了雄性激素的合成。

3.3 对生殖能力的影响

有机磷农药胁迫条件下,鱼类的生殖能力会受到影响。有机磷农药可使卵母细胞变小,数量变少,甚至出现粘连与融合,闭锁卵母细胞比例增加。同时造成卵黄脂和 PAS 阳性滤泡层的缺乏,或者滤泡层变得松散并破裂,导致卵黄发生作用停止。有机磷农药还可使生精上皮退化,生精小管收缩^[12]。有机磷农药还会影响雄性个体的生殖行为,如 Moore 和 Waring^[13]的研究表明二嗪磷可降低大西洋鲑 (*Salmo salar*) 雄鱼体内的性激素含量,并降低雄鱼对前列腺素 $F_{2\alpha}$ 的反应性。

4 有机磷农药对鱼类代谢活动的影响

4.1 代谢方式的转变

在亚致死浓度有机磷农药胁迫下,鳃组织遭受破坏使气体交换受到影响,呼吸器官的肌肉麻痹使血流量降低,造成体内相对的缺氧状态,与此相适应,体内的氧化代谢系统发生了变化,体内各组织中有氧代谢的酶类 (如异柠檬酸脱氢酶、琥珀酸脱氢酶和苹果酸脱氢酶) 活性降低,而乳酸脱氢酶 (LDH) 活性升高^[14]。

4.2 对糖类代谢的影响

有机磷农药胁迫条件下,鱼类会处于生理应激状态,此时需要大量的能量,因此体内糖类被动员。有机磷农药可能通过肾上腺素的作用增加肝脏糖原磷酸化酶 a 活性^[15],从而使肝糖原和肌糖原含量急剧下降^[15]。但由于鳃结构的破坏会造成体内相对缺氧状态,因此糖的利用方式主要是通过糖酵解的方式来迅速提供能量,因而会产生大量的乳酸。由于肝组织的损伤,肌肉中产生的乳酸不能有效地运输到肝中异生成糖,因此肝脏、肌肉和血液中乳酸的含量会明显升高,各组织中的乳酸脱氢酶活性相应地升高。

4.3 对脂类代谢的影响

有机磷农药胁迫条件下可以改变鱼类体内的脂类代谢活动,一部分脂类作为能源物质被动员,从而使体内脂类水解能力增强。如 Rao 等^[16]曾报道翠鳢暴露于稻丰收后,脂酶活性上升,使得总脂含量下降,游离脂肪酸含量增加,亚致死浓度的磷胺还可使翠鳢脑、肾和肝中胆固醇含量降低。

4.4 对 DNA, RNA 和蛋白质含量的影响

亚致死浓度的有机磷农药一般使肝脏 DNA, RNA 和蛋白质含量下降, RNA/ DNA 比值也降低。蛋白质含量的降低可能是 RNA 含量降低使蛋白质的合成受到抑制,或者是蛋白酶水解作用增强造成的。如 Joyce 等^[17]发现敌百虫可使胡鲈肝蛋白酶活性升高,导致蛋白质含量下降,蛋白质被水解,所形成的氨基酸一般被转氨酶(谷丙转氨酶和谷草转氨酶)催化生成酮酸,从而进入三羧酸循环被完全氧化分解。如 Begum^[18]的研究表明经乐果处理后的胡鲈肝脏中谷丙转氨酶和谷草转氨酶的活性明显上升。由于游离氨基酸的含量仅仅是蛋白质水解和氨基酸转氨两个过程的中间代谢物,因此有机磷农药中毒的鱼肝脏中游离氨基酸含量升高或降低不能作为毒性指标。

5 有机磷农药对鱼类的毒性动力学

5.1 有机磷农药在鱼体内的生物浓缩

鱼体在暴露于有机磷农药的过程中,鳃是主要的吸收位点,农药被吸收后进入血液,因此对于各种组织器官而言,鳃和血液中农药的浓度在几个小时内就可达到稳态,然后再被其他组织器官吸收。由于不同器官中脂类含量和对有机磷农药的代谢率不同,有机

磷农药在鱼体不同器官中的生物浓缩是不同的。如 Szepletcs 等^[15]发现用 2 mg/L 杀扑磷处理 5 d 后,鲤鱼的肝脏中农药含量最高,其次为卵,而肌肉中未检测到。Barron 等^[19]也发现斑鲃可以快速吸收毒死蜱,其在体内的分布为脂肪中含量最多,肌肉中含量最少。鱼类对有机磷农药的生物浓缩因子与农药的脂溶性(以辛醇/水分配系数表示)有一定的相关性。如 Tsuda 等^[20]曾通过研究得出 *Gnathopogon caeruleus* 对各种农药 7 d 内的生物浓缩因子分别为:敌敌畏,0.8;杀扑磷,18;亚胺硫磷,36;而这三种农药的辛醇/水分配系数分别为 1.41, 2.42 和 2.78,通过对 18 种有机磷农药的分析发现这种相关性可高达 0.9085。

5.2 有机磷农药在鱼体内的生物转化

混合功能氧化酶:混合功能氧化酶在硫代磷酸酯类农药的生物转化中起主要作用,它将该类农药脱硫氧化成磷氧(P=O)类似物。混合功能氧化酶主要存在于肝脏微粒体上,主要组分是细胞色素 P450。

谷胱甘肽-S 转移酶(EC 2.5.1.18):谷胱甘肽-S 转移酶可以催化脂溶性的亲电物质与 GSH 结合,这是二甲基磷酸酯类有机磷农药的一个重要转化途径,在该反应中移去一个甲基,生成甲基谷胱甘肽和相应的脱甲基磷硫化合物。而对于二乙基硫代磷酸酯类农药来说,该反应被阻断。通过序列分析可以鉴别出 5 种形式的谷胱甘肽-S 转移酶:一种是微粒体 GST,它是膜结合形式的三聚体酶;另外四种都为可溶性的二聚体酶,分别称为 α , μ , π 和 θ 。

UDP 葡萄糖醛酸转移酶(EC 2.4.1.17):该酶定位于内质网上,它催化内源性的 UDP 葡萄糖醛酸与内源或外源的亲电或亲核物质结合,从而使极性较小的物质结合成为可溶性的结合体,易于通过胆汁排出。如 Barron 等^[21]发现,毒死蜱在斑鲃体内主要代谢产物为葡萄糖苷酸的结合体,最后通过尿和胆汁排出。

羧酸酯酶(EC 3.1.1.1):羧酸酯酶属于丝氨酸酯酶,主要存在于肝脏。磷酸酯类农药可以直接和羧酸酯酶共价结合使其磷酸化,硫代磷酸酯类农药则在氧化脱硫后才与该酶结合。由于鱼类羧酸酯酶对磷酸酯类农药的敏感性高于乙酰胆碱酯酶,因此有机磷农药先竞争性地与羧酸酯酶结合,从而有效地保护了乙酰胆碱酯酶免受其害。另外,羧酸酯酶还可以催化降解

含羧酸酯的磷酸酯类农药。如马拉硫磷被混合功能氧化酶氧化脱硫后形成马拉氧磷,它不但可以和羧酸酯酶共价结合,还可以被其水解^[22]。因此羧酸酯酶对马拉硫磷起到双重的解毒功能。由于此酶特异性比较低,它除了能水解马拉硫磷外,还可以水解其他某些有机磷化合物,因此它也是一些有机磷农药的解毒酶。

6 有机磷农药的生物检测研究与展望

由于有机磷农药结合的靶酶是鱼体内神经和肌肉组织 AChE, 所以人们认为有机磷农药对鱼类的毒性主要缘于对 AChE 的抑制, 因此可以用脑或肌肉 AChE 的抑制(体内或体外)来检测水体有机磷农药和氨基甲酯类农药的污染程度。由于鱼类可以耐受 AChE 的抑制高达 70%~90%, 并且不同的鱼类和组织中的 AChE 对有机磷农药的敏感性不同。因此在利用 AChE 活性作为有机磷农药污染的生物检测时要充分考虑到鱼的种类、年龄以及农药的种类。但有机磷农药的很多毒性并非能用胆碱机制来解释。因此, 有机磷农药引起 AChE 的抑制并非是鱼类死亡的唯一原因。很多研究表明鱼的真正死亡原因为窒息死亡。由于鳃的肌肉麻痹和胆碱能诱导的心动过缓以及鳃血管的积郁导致血流关闭, 最终导致鱼类窒息死亡。因此可以通过鳃组织的变化来检测有机磷农药污染。许多研究表明有机磷农药可抑制鱼类各组织的 ATP 酶活性, 并且具有时间和剂量效应关系。如乐果可抑制胡鲠鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶和 Mg^{2+} -ATP 酶活性, 杀螟硫磷可以抑制欧洲鳗鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶活性, 敌百虫可以抑制鲤鱼鳃 ATP 酶活性。因此利用鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶这一生理生化指标监测鱼类的生理状态从而监测水体污染是一个很有前途的方法。本实验室已经成功地从鱼鳃 Na^+/K^+ -ATP 酶的活性和抗体标记两方面进行了水体有机磷农药污染的生物标记研究。

参考文献

- 1 Sultatos L.G., Costa L.G. and Murphy S.D.. Factors involved in the differential acute toxicity of the insecticides chlorpyrifos and methyl chlorpyrifos in mice, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1992, 65:144~152
- 2 Némcsok J., Rakonczay Z., Kása P., Asztalos B. and Szabo A.. Effects of methidathion on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in carp, as revealed by density gradient

- centrifugation, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1990, 37: 140~144
- 3 Straus D.L. and Chambers J.E.. Inhibition of acetylcholinesterase and aliesterases of fingerling channel catfish by chlorpyrifos, parathion, and S,S,S-tributyl phosphorotrithioate (DEF), *Aquat. Toxicol.*, 1995, 33: 311~324
- 4 Némcsok J., Rakonczay Z., Kása P., Asztalos B. and Szabo A.. Effects of methidathion on distribution of molecular forms of acetylcholinesterase in carp, as revealed by density gradient centrifugation, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1990, 37: 140~144
- 5 Szegletes T., Balint T., Szegletes Zs. and Némcsok J.. Changes caused by methidathion in activity and distribution of molecular forms of carp (*Cyprinus carpio* L.) AChE, *Pestic. Biochem. Physiol.*, 1995, 52:71~79
- 6 Balint T., Szegletes T., Szegletes Zs., Halasy K. and Némcsok J.. Biochemical and subcellular changes in carp exposed to the organophosphorus methidathion and the pyrethroid deltamethrin, *Aquat. Toxicol.*, 1995, 33: 279~295
- 7 Dutta H.M., Adhikari Singh, N.K.S., Roy P.K. and Munshi J.S.D.. Histopathological changes induced by malathion in the liver of a freshwater catfish, *Heteropneustes fossilis* (Bloch), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1993, 51:895~900
- 8 Ceron J.J., Ferrando M.D., Sancho E., Gutierrez Panizo C. and Andreu Moliner E.. Effects of diazinon exposure on cholinesterase activity in different tissues of European eel (*Anguilla anguilla*), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1996, 35:222~225
- 9 Santhakumar M., Balaji M. and Ramudu K.. Effect of sublethal concentrations of monocrotophos on erythropoietic activity and certain hematological parameters of fish *Anabas testudineus* (Bloch), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1999, 63:379~384
- 10 Dutta H.M., Dogra J.V.V., Singh N.K., Roy P.K., Nasar S.S.T., Adhikari S., Munshi J.S.D. and Richmonds C.. Malathion induced changes in the serum proteins and hematological parameters of an indian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1992, 49:91~97
- 11 Bhattacharya S.. Target and nontarget effects of anticholinesterase pesticides in fish, *Sci. Total Environ.*, 1993, Sup.:859~866
- 12 Bagchi P., Chatterjee S., Ray A. and Deb C.. Effect of quinalphos, organophosphorus insecticide, on testicular steroidogenesis in fish, *Clarias batrachus*, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1990, 44:871~875

- 13 Moore A. and Waring C.P.. Sublethal effects of the pesticides diazinon on olfactory function in mature male Atlantic salmon parr, *J. Fish Biol.*, 1996, **48**(4) : 758 ~ 775
- 14 Subburaju S. and Selvarajan V.R.. Physiological and biochemical approaches to the toxicological assessment of environmental pollution. Utrecht, Netherlands: Royal Netherlands Chemical Society, 1990.
- 15 Ceron J.J., Sancho E., Ferrando M.D., Gutierrez C. and Andreu E.. Changes in carbohydrate metabolism in the eel *Anguilla anguilla*, during short term exposure to diazinon, *Toxicol. Environ. Chem.*, 1997, **60**:201 ~ 210
- 16 Rao K.S.P., Rao K.R.S.S., Sahib I.K.A. and Rao K.V.R.. Combined action of carbaryl and phenthoate on tissue lipid derivatives of murel, *Channa punctatus* (Bloch), *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 1985, **9**(1) : 107 ~ 111
- 17 Joyce S., Rani V. and Janaiah C.. Ammonia metabolism in freshwater teleost, *Clarias batmchus* on exposure to trichlorfon, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1991, **46**: 731 ~ 737
- 18 Begum G. and Vijayaraghavan S.. In vivo toxicity of di methioate on proteins and transaminases in the liver tissue of fresh water fish *Clarias batmchus* (Linn), *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 1995, **54**:370 ~ 375
- 19 Barron M.G., Plakas S.M., Wilga P.C. and Ball T.. Absorption, tissue distribution and metabolism of chlorpyrifos in channel catfish following waterborne exposure, *Environ. Toxicol. Chem.*, 1993, **12**(8) :1 469 ~ 1 476
- 20 Tsuda T., Aoki S., Kojima M. and Fujita T.. Accumulation and excretion of organophosphorous pesticides by willow shiner, *Chemosphere*, 1992, **25**(12) :1 945 ~ 1 951
- 21 Barron M.G., Plakas S.M. and Wilga P.C.. Chlorpyrifos pharmacokinetics and metabolism following intravascular and dietary administration in channel catfish, *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 1991, **108**(3) :474 ~ 482
- 22 Chambers J.E.. Bioactivation of organophosphorus insecticides in mammalian target and non target tissue. In: Hodgson E., Roe R.M., Motoya ma N. (eds.). Pesticides and future: toxicological studies of risks and benefits. Reviews in pesticide toxicology I. NC: North Carolina State University, 1991, p83 ~ 90