

海胆配子及胚胎发育模型在农药类环境激素筛选中的应用

Application of sea urchin gamete and embryo models in the screening of pesticides having environmental hormone effects

姚 丹, 汝少国

(中国海洋大学 海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

中图分类号: Q132.4, X503.225

文献标识码: A

文章编号: 1000-3096(2009)08-0093-04

我国农药生产和使用量较大, 农药污染问题日益突出, 薛秀玲等^[1]报道福建省闽江口和泉州湾的缢蛏和牡蛎样品中的敌敌畏、甲胺磷平均质量分数分别为 0.80×10^{-9} 和 2.58×10^{-9} (湿质量), 检出率较高。已经筛选出的环境激素黑名单中农药占 50% 以上^[2], 但是国内外关于农药环境激素效应筛选的理想海洋生物模型研究尚较少。海胆隶属棘皮动物, 进化上介于无脊椎动物和脊椎动物之间, 海胆胚胎通体透明, 有丝分裂同步; 早期发育胚胎对大多数有机污染物都极为敏感^[3~5]; 微量甚至痕量的污染物就对海胆配子和胚胎具有显著的毒性效应; 早期发育时间较短且发育初期的毒性效应在发育晚期得以放大^[6]; 海胆早期神经系统的发育与人类具有相似性, 部分研究结果可外推到人^[7]。因此, 海胆胚胎是筛选污染物环境激素效应的理想模式生物之一。目前, 美国、法国、意大利等国家相继以海胆配子和胚胎为模型, 筛选海洋环境中的金属、去污剂及有机污染物的毒性。作者综述了近十几年来海胆受精和胚胎模型在农药类环境激素筛选中的应用与研究进展。

1 海胆受精模型的研究与应用

海胆的受精模型即受精前或受精过程中将配子暴露于农药, 通过统计受精率来表征污染物的毒性作用, 已成为国际上一种常规、简单的毒性试验生物测定方法^[8]。海胆配子对甲氧滴滴涕、林丹、狄氏剂和二嗪农等农药类环境激素极为敏感^[9~11]。100 $\mu\text{mol/L}$ 狄氏剂、林丹暴露精子后, 受精率显著降低; 卵子经农药暴露后, 受精率均无显著影响, 但多精入卵比率显著增高, 且农药对配子受精率和受精质量的干扰作用具有时间和剂量效应关系。

受精率降低的一方面原因是精子运动速率降低或停止, 精子运动是依靠鞭毛的旋转摆动, 林丹可能是通过干扰精子鞭毛运动导致受精率降低的; 受精率降低的另一个原因是农药干扰了海胆精子的顶体

反应。Silvestroni 等^[12]报道林丹也会通过影响人类精子的顶体反应从而影响受精率。Danielle 2004 年报道卵子和精子对农药的反应和敏感性是不同的, 卵子即使在较高浓度林丹暴露后, 仍然能和正常精子受精, 不会影响卵子的受精率, 但多精入卵的比率有所增高, 而且能影响受精卵的发育, 延迟甚至阻碍第一次有丝分裂, 改变早期胚胎发育进程^[13]。海胆受精模型作为化学污染物生物毒性的测定方法, 得到了美国 EPA (Environment protection agency) 的推荐使用^[14], 并逐步发展成熟。然而, 受精模型的生物检测方法受到温度、pH、盐度、精卵比例、精子暴露时间、实验材料和海胆品种等因素的干扰, 故配子受精模型的检测方法还有待进一步完善。

2 海胆胚胎模型的研究与应用

海胆是对环境变化极为敏感的生物模型。Kobayashi^[15], Trieff^[16] 和 Pagano^[17] 分别证明: 当海胆胚胎接触到有毒污染物后, 发育都会受到抑制。在 20 世纪七八十年代, 海胆胚胎发育模型就已成为海水质量检测的重要工具之一。主要通过观察发育的延迟和统计畸形个体的百分率来表征污染物的毒性效应, 但是这种检测方法有其不足之处: 它们在一个稳定系统中持续暴露 48~96 h, 毒剂的浓度、化学特性和生物利用度及胚胎的敏感性都会随着时间的延长而发生变化^[18], 结果缺乏准确性和可靠性。因此, 有待于从细胞及分子水平上筛选出理想的生物标志物, 农药对海胆胚胎发育干扰机制研究是筛选理想生物标志物的基础。

收稿日期: 2007-11-10; 修回日期: 2007-12-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30671618)

作者简介: 姚丹(1981-), 女, 黑龙江齐齐哈尔人, 硕士, 研究方向: 遗传毒理学; 汝少国, 通信作者, 教授, 博士生导师, E-mail: rusg@ouc.edu.cn

海胆的早期胚胎发育主要包括卵裂、囊胚、原肠胚、棱柱幼虫和长腕幼虫 5 个典型的发育时期^[19]。不同农药对海胆各发育阶段胚胎的毒性不同,即使同一发育阶段的胚胎对不同种农药的敏感性也不尽相同。

2.1 农药对海胆卵裂的影响

目前的研究结果表明,狄氏剂、林丹、甲氧滴滴涕、地亚农、抗蚜威和西维因等农药能够影响海胆早期有丝分裂^[15~17]。然而,它们作用的靶标不尽相同,其中林丹通过扰乱钙离子稳态从而延缓有丝分裂^[15];狄氏剂和甲氧滴滴涕能够影响促有丝分裂因子 MPF 活性^[16];而甲氧滴滴涕、林丹和狄氏剂都通过延迟 DNA 的合成从而延迟有丝分裂^[15]。

2.1.1 对钙离子稳态的影响

细胞内游离钙离子的增加(Ca_i)与海胆受精卵^[20]及其他类型细胞^[21]的周期活动密切相关,包括核的迁移、核膜破裂、分裂中期-后期的转变和细胞浆移动。 Ca_i 发生在受精和有丝分裂时期^[22],在受精过程中钙离子的流入诱导质膜与顶体周围膜的融合,使顶体释放出一系列的水解酶,从而启动顶体反应;有丝分裂期间,胞内钙离子的浓度调节着构成微丝和微管的肌动蛋白和微管蛋白的聚合-解聚平衡,从而影响装配。因此,微管动力学也受到钙离子的调控,钙离子稳态受到影响将直接导致早期有丝分裂的延迟。

Pesando 等^[6]的研究结果表明:狄氏剂使海胆未受精卵中钙离子的流入显著增加,但地亚农、抗蚜威和西维因等农药对钙离子稳态没有影响;林丹通过改变磷脂酰肌醇二磷酸的水解来间接调节细胞内 Ca_i 的释放^[23]。林丹对 Ca_i 或多聚磷酸肌醇代谢的这种干扰作用已经在许多其他生物模型中有过相关报道,这些生物模型包括巨嗜细胞、红血球、小鼠肾周围小管细胞组织培养物、HL-60 细胞、分离出的突触体和人的精子^[6]。另外,Pesando 等^[6]认为海胆未受精卵子质膜的钙吸收对林丹、狄氏剂和甲氧滴滴涕不敏感,但通过内质网膜的钙吸收对狄氏剂和林丹较为敏感。

2.1.2 对促有丝分裂因子的影响

促有丝分裂因子——MPF (mitosis-promoting factor)是由周期蛋白及其依赖的激酶(CDK)组成的异二聚体蛋白,它通过诱导染色质凝聚及核膜破裂而启动细胞进入有丝分裂。Pesando 等^[6]提出狄氏剂、甲氧滴滴涕和林丹都能够延迟海胆胚胎的有丝分裂,但这 3 种杀虫剂的作用靶标不同。MPF 是狄氏剂和甲氧滴滴涕作用的靶标之一。狄氏剂对第一

个有丝分裂周期中 MPF 的活性高峰期没有影响,但延迟了第 2 个分裂周期中 MPF 的活性高峰期;甲氧滴滴涕能够延迟第 1、2 个有丝分裂周期中 MPF 的活性高峰期;而林丹对有丝分裂周期中 MPF 的活性没有影响,说明 MPF 并不是林丹作用的靶标之一。Pesando 等^[6]进一步研究表明狄氏剂和甲氧滴滴涕对 MPF 的影响并不是干扰了周期蛋白的合成,而可能是干扰了调控 MPF 的另一个组成部分——p34cdc2 的磷酸化途径。

2.1.3 对 DNA 合成的影响

DNA 合成的速率决定了有丝分裂的速率,农药对 DNA 合成的影响主要表现为 DNA 合成的延迟。Bresch 等^[24]研究结果表明甲氧滴滴涕暴露的受精卵与对照组相比,DNA 合成量明显减少;林丹对 DNA 合成也有显著的延迟作用。这一点与 Pesando 等^[6]的研究结果是一致的。Pesando 等^[6]通过³H-胸苷标记证明甲氧滴滴涕、狄氏剂和林丹这 3 种杀虫剂导致了 DNA 结合的延迟,其中用林丹和甲氧滴滴涕处理的胚胎中 DNA 的合成量仅为对照的一半,狄氏剂处理的胚胎中 DNA 的合成速率也有所降低。

总之,绝大多数农药在一定剂量条件下都会影响海胆胚胎的有丝分裂。一种农药可作用于多个靶标,如狄氏剂既影响钙离子稳态,又延迟 DNA 的合成;不同农药作用的靶标也不尽相同,如林丹对 MPF 活性没有影响,而甲氧滴滴涕却延迟了 MPF 的活性。另外,农药能否干扰早期有丝分裂还取决于受精卵膜对农药的通透性,Pesando 等^[6]证明受精后暴露狄氏剂、西维因和抗蚜威的胚胎早期有丝分裂都没有受到延迟;然而,这些物质暴露未受精卵后,受精得到的胚胎第 1、2 次有丝分裂受到了显著的延迟。

2.2 农药对海胆囊胚的影响

孵化是海胆早期发育的一个重要阶段,是使胚胎从保护性的受精膜中游离出来的过程。受精膜主要由孵化酶分解,孵化酶由合子基因合成,是早期囊胚孵化阶段必须的转录产物之一,在 8 细胞阶段到早期囊胚阶段瞬间转录完成。已有研究表明,毫摩尔数量级的草甘磷对海胆形态发生的干扰作用,主要是草甘磷延迟了孵化酶转录^[25],一个 1 257 bp 长度片段的孵化酶在草甘磷暴露条件下,转录被延迟了 2 h,且转录抑制率与草甘磷浓度具有剂量-效应关系。

草甘磷对海胆孵化的抑制作用是可逆的,Julie 等^[25]报道用 8 mmol/L 草甘磷从处理桑椹胚阶段至受精后 24 h 的胚胎,其孵化完全受到了抑制,然后换

为无草甘磷的培养液,100%的胚胎在24 h内重新完成了孵化。

2.3 农药对原间质细胞(PMC)迁移速率及迁移模式的干扰

原间质细胞(PMC)迁移对海胆原肠消化道的形成及细胞分化乃至组织器官的形成都是至关重要的。Tsui等^[26]研究表明1 μmol/L地亚农会影响PMC在胚胎内的迁移速率,100 μmol/L地亚农使PMC迁移紊乱无序;地亚农造成胚胎原间质细胞迁移延迟的原因,可能是乙酰胆碱酯酶活性受到了抑制,地亚农和狄氏剂能够抑制海胆早期胚胎发育过程中乙酰胆碱酯酶的活性。

2.4 农药对幼虫腕长及体长的干扰

农药不但扰乱PMC的迁移而且对长腕幼虫的腕长也有干扰作用。100 μmol/L抗蚜威或西维因使骨针变细,但不会影响腕的长度^[27];然而,Pesando等^[6]报道较高浓度的狄氏剂能造成严重的幼虫发育延迟,并产生椭圆形形状的胚胎。

2.5 农药对海胆神经系统的扰乱

乙酰胆碱酯酶(AChE)是海胆神经系统的重要组分,其底物乙酰胆碱是神经冲动传输中的传递介质,神经冲动传输过程中释放大量的乙酰胆碱,乙酰胆碱只有迅速被AChE水解为无活性的乙酸和胆碱,才能保证神经信号在生物体内的正常传递。由于有机磷农药与酶的作用速率高于天然底物,能够模仿乙酰胆碱与AChE作用形成磷酸化乙酰胆碱酯酶,使AChE失活。Marc等^[27]研究结果表明,在海胆胚胎发育的早期阶段就有一种高亲和力的胆碱递质。Pesando等^[6]报道在海胆原肠胚阶段暴露抗蚜威、二嗪农和狄氏剂,到长腕幼虫阶段发现抗蚜威对乙酰胆碱酯酶的活性没有产生干扰作用,而二嗪农和狄氏剂表现出了显著的活性抑制作用,且能影响AChE的活性分布,狄氏剂暴露造成了表达乙酰胆碱酯酶的细胞数量减少和活性分布异常。

海胆发育过程中的神经递质除了乙酰胆碱外,还有血清素、去肾上腺素和多巴胺等,它们作为生物信号控制着细胞复制和分化的时间、细胞凋亡和组织的形成,因此,农药可以通过对神经递质的作用,影响到海胆胚胎的发育或导致胚胎发育的畸形。

3 研究展望

由于海洋环境中的有机污染物存在多样性和复杂性,仅仅研究单一有机污染物的毒性效应并不能反映环境污染的实际状况,因此,今后应考虑低浓度的几种农药联合毒性对海胆胚胎发育的干扰作用。

另外,海胆胚胎不同发育阶段对农药的敏感性不同,同一发育阶段的海胆胚胎对不同类型的农药敏感性也是不同的,因此,应当利用海胆胚胎在形态学、细胞、分子水平上不同的指标和标志物来评价农药的毒性和环境激素效应。总之,海胆的胚胎发育在细胞和分子水平以及基因表达等方面已经有了较深入的研究,海胆的早期发育已被证明是评价化学物质毒性和环境激素效应的一个强有力的生物模型^[28,29];另外,生态毒理学家已经建立了较标准化的应用海胆胚胎和幼虫为模式生物来评价海洋生态环境质量的方法^[30~32]。但是,作为模型生物的细胞和分子水平上的生物标志物的研究尚不多,也不够深入。因此,海胆在海洋污染物检测领域的应用前景广阔。

参考文献:

- [1] 薛秀玲,袁东星.福建沿海养殖贝类多种农药残留的含量及来源分析[J].海洋环境科学,2004,23(2):40-42.
- [2] 吕潇,李慧冬,杜红霞,等.农药类内分泌干扰物的研究进展[J].华中农业大学学报,2006,25(1):94-100.
- [3] Graillet C, Pagano G G. Stage-specific effects of teratogens on sea urchin embryogenesis [J]. **Teratogen Carcinogen Mutagen**, 1993, 13: 1-14.
- [4] Pagano G, Cipollaro M, Corsale G, et al. pH-induced changes in mitotic and developmental patterns in sea urchin embryogenesis. I. Exposure of embryos [J]. **Teratogenesis Carcinogenesis and Mutagenesis**, 1985, 5: 101-112.
- [5] Dinnel P A, Stober Q J, DiJulio D H. Sea urchin sperm bioassay for sewage and chlorinated sea water and its relation to fish bioassay [J]. **Marine Environmental Research**, 1981, 5: 29-39.
- [6] Pesando D, Huitorelb P. Biological targets of neurotoxic pesticides analysed by alteration of developmental events in the Mediterranean sea urchin *Paracentrotus lividus* [J]. **Marine Environmental Research**, 2003, 55: 39-57.
- [7] Morale A, Coniglio L, Angelini C, et al. Biological effects of a neurotoxic pesticide at low concentrations on sea urchin early development [J]. **A teratogenic Assay Chemosphere**, 1998, 37(14-15): 3001-3010.
- [8] Pagano G, Cipollaro M, Corsale G. Comparative toxicities of benzene, chlorobenzene, and dichlorobenzenes to sea urchin embryos and sperm [J]. **Bull Environ Contam Toxicol**, 1988, 40: 481-488.
- [9] Alm H, Tiemann U, Torner H. Influence of organochlorine pesticides on maturation and postfertilization development of bovine oocytes on vitro [J]. **Reprod Toxicol**, 1998, 12: 559-563.

- [10] Bresch H, Arendt U. Influence of different organochlorine pesticides on the development of the sea urchin embryo [J]. **Environ Res**, 1977, 13: 121-128.
- [11] Arnold S, Klotz D M, Collins B M. Synergistic activation of estrogen receptor with combinations of environmental chemicals [J]. **Science**, 1996, 272: 1489-1492.
- [12] Silvestroni L, Fiorini R, Palleschi S. Partition of the organochlorine insecticide lindane into the human sperm surface induces membrane depolarization and Ca^{2+} influx [J]. **Biochem**, 1997, 321: 691-698.
- [13] Suwalski M, Benites M, Villena F, *et al.* Interaction of the organochlorine pesticide dieldrin with phospholipids bilayers [J]. **Z Naturforsch**, 1997, 52c: 450-458.
- [14] Dinnel P A, Link J M, Stober Q J. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides [J]. **Arch Environ Contam Toxicol**, 1989, 18: 748-755.
- [15] Kobayashi N. Bioassay data for marine pollution using echinoderms[A]. Cheremisnoff P P. Encyclopedia of Environment Control Technology [C]. Houston: Gulf Publ Co. 1995, 9: 539-609.
- [16] Trieff N M, Romana L A, Esposito A, *et al.* Effluent from bauxite factory induces developmental and reproductive damage in sea urchin [J]. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 1995, 28: 173-177.
- [17] Pagano G, His E, Beiras R, *et al.* Cytogenetic developmental and biochemical effects of aluminium, iron, and their mixture in sea urchin [J]. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 1996, 31: 466-474.
- [18] Paul A D, Jeanne M L, Quantin J S. Improved methodology for a sea urchin sperm cell bioassay for marine waters [J]. **Archives of Environmental Contamination and Toxicology**, 1987, 16: 23-32.
- [19] 廖玉麟. 海胆生物学概况 [J]. **水产科学**, 1982 (3): 1-8.
- [20] Poenie M, Alderton J, Tsien R Y, *et al.* Changes of free calcium levels with stages of the cell division cycle [J]. **Nature**, 1985, 315: 146-149.
- [21] Hepler P K. Calcium transients during mitosis; observations in flux [J]. **Cell Biol**, 1992, 109: 2567-2573.
- [22] Whitaker M, Larman M G. Calcium and mitosis Semin [J]. **Cell Dev Biol**, 2001, 12: 53-58.
- [23] Fonovich de Schroeder T, Pechen de D'Angelo A M. The turnover of phospholipid fatty acyl chains is activated by the insecticide Dieldrin in *Bufo arenarum* oocytes [J]. **Biochem Mol Toxicol**, 2000, 14: 82-87.
- [24] Bresch H, Arendt U. Influence of different organochlorine pesticides on the development of the sea urchin embryo [J]. **Environ Res**, 1977, 13: 121-128.
- [25] Julie M, Mulner-Lorillon O, Robert B. Glyphosate-based pesticides affect cell regulation [J]. **Biology of the Cell**, 2004, 96: 245-249.
- [26] Tsui M T, Chu L M. Aquatic toxicity of glyphosate-based formulations: comparison between different organisms and the effects of environmental factors [J]. **Chemosphere**, 2003, 52-58.
- [27] Marc J, Mulner-Lorillon O, Durand G, *et al.* Embryonic cell cycle for risk assessment of pesticides at the molecular level [J]. **Environ Chem Lett**, 2003, 1: 8-12.
- [28] Kobayashi N. Fertilized sea urchin egg as an indicator material for marine pollution bioassay, preliminary experiments [J]. Publications of Seto Marine Biology Laboratory, 1971, 18(6): 379-406.
- [29] Kobayashi N. Marine pollution bioassay by using sea urchin eggs in the Tanbe Bay, Wakayama prefecture, Japan, 1970 ~ 1987 [J]. **Marine Pollution Bulletin**, 1991, 23: 709-713.
- [30] Dinnel P, Link J, Stober Q. Improved methodology for sea urchin sperm cell bioassay for marine waters [J]. **Archives of Environmental Contamination Toxicology**, 1987, 16: 23-32.
- [31] Green J D, Mwatibo J M, Swartz W J. The effects of methoxychlor on early sea urchin development [J]. **Environ Res**, 1997, 72: 56-64.
- [32] Mwatibo J M, Green J D. Effects of methoxychlor pre-exposure on sea urchin gametes [J]. **Bull Environ Contam Toxicol**, 1997, 58: 589-595.

(本文编辑:张培新)