

文章编号:1000-5641(2011)04-0061-08

热带爪蟾胚胎对三丁基锡致畸作用响应的敏感时期

袁 静, 张小利, 玉 琳, 刘俊奇, 曹庆珍, 施华宏

(华东师范大学 环境科学系 上海城市化过程与生态恢复重点实验室, 上海 200062)

摘要: 采用 $200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化三丁基锡对热带爪蟾 (*Xenopus tropicalis*) 胚胎进行第1天、第2天、第3天和3d全暴露实验。结果表明, 第3天和3d全暴露组胚胎的存活率比对照组分别降低了10%和20%, 第2天、第3天和3d全暴露组的体长分别减少了30%、20%和39%。暴露组胚胎畸形率均在90%以上, 畸形类型主要包括眼睛变大、变小或变形、泄殖腔突出、鳍变窄或无鳍和尾巴弯曲等。其中, 第2天暴露组胚胎的眼比对照组的小, 而第3天暴露组胚胎的眼明显变大; 第1天暴露组胚胎的背鳍略有变窄, 第2天暴露组胚胎的鳍严重缺失并有尾尖残留或缺刻的现象, 第3天暴露组胚胎的背鳍和腹鳍均稍有变窄。由此可见, 三丁基锡引起的热带爪蟾胚胎眼和鳍的畸形表现出明显的暴露时段性特征。

关键词: 三丁基锡(TBT); 爪蟾; 胚胎; 致畸

中图分类号: Q948 **文献标识码:** A **DOI:** 10.3969/j.issn.1000-5641.2011.04.007

Sensitive periods of teratogenic effects of tributyltin on *Xenopus tropicalis* embryos

YUAN Jing, ZHANG Xiao-li, YU Lin, LIU Jun-qi,
CAO Qing-zhen, SHI Hua-hong

(Shanghai Key Laboratory of Urbanization Processes and Ecological Restoration, Department of Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: *Xenopus tropicalis* embryos were exposed to $200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ tributyltin chloride (TBTCl) during different periods in the experiment of three days. The percent of survival embryos decreased by 10% in the 3rd, 20% in 3 d treatment groups, respectively. The whole body length reduced by 30% in the 2nd day, 20% in the 3rd day and 39% in 3 d treatment groups, respectively. More than 90% embryos showed malformations in treatment groups. The main characteristic malformations were abnormal eyes, enlarged proctodaeum, narrow fins or absence of fins, bent tails, etc. Compared with the control, the eyes were smaller in the 2nd day and bigger in the 3rd day treatment groups, respectively. The dorsal fins were a little narrower in the 1st

收稿日期:2010-08

基金项目:国家自然科学基金(20877023);长江水环境教育部重点实验室开放基金(YRWEF06003)

第一作者:袁静,女,硕士研究生,研究方向为生态毒理学. E-mail: yuanj1986@126.com.

通讯作者:施华宏,男,副教授,研究方向为生态毒理学. E-mail: hhshi@des.ecnu.edu.cn.

day treatment group, both dorsal and ventral fins were much narrower with tail-tip residue or gap near the proctodaeum in the 2nd day treatment group, and the fins were slightly narrower in the 3rd day treatment group, respectively. The results suggest that the malformations in the eyes and fins were more sensitive to different exposure periods.

Key words: tributyltin (TBT); *Xenopus tropicalis*; embryos; teratogenesis

0 引 言

用于船舶防污漆的三丁基锡(TBT)被认为是人为引入海洋环境中毒性最大的物质. 国际海事组织(IMO)规定从 2003 年开始全面禁止在船体上涂含有 TBT 的防污漆^[1]. 然而,有机锡化合物仍被广泛应用于杀菌剂和防腐剂等,并对淡水生态系统造成影响^[2,3]. 我国部分内陆水域有机锡化合物调查的结果表明,多数水样中三丁基锡化合物的含量较高,其中上海黄浦江复兴东路轮渡码头水样中三丁基锡含量高达 $425.3 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4]. 因此,有必要加强 TBT 对淡水生物的生态毒性效应及其作用机理的研究.

TBT 是一种典型的环境内分泌干扰物,能引起腹足类的性畸变,对爪蟾产生甲状腺激素干扰效应^[5]. 爪蟾胚胎致畸实验是检测污染物发育毒性的有效方法^[6]. 我们前期的研究表明,采用环境浓度三丁基锡($50 \sim 400 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)对热带爪蟾(*Xenopus tropicalis*)胚胎进行 24、36 和 48 h 暴露能够导致胚胎眼睛异常、泄殖腔突出和鳍变窄等多种畸形现象^[7]. 在胚胎的发育过程中,各器官的分化和形成时期往往不同,这意味着污染物对胚胎各个部位产生致畸效应的敏感时期可能也不一样^[8-10].

本文采用 $200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯化三丁基锡对热带爪蟾胚胎进行 3 d 内不同时间段的暴露,通过观测胚胎的畸形特征,确定三丁基锡对胚胎致畸作用的敏感时期,以便更有效地评价三丁基锡的发育毒性并揭示其毒作用机理.

1 材料与方 法

1.1 主要试剂

氯化三丁基锡(97%)购自 Merck 公司,人绒毛膜促性腺激素(hCG)购自宁波第二激素厂,其余试剂均为国产分析纯.

1.2 胚胎的获取

挑选性成熟热带爪蟾 14 对,采用人工注射 hCG 的方法诱导产卵. 每只爪蟾都进行 2 次注射,待蛙抱对产卵结束后收集胚胎,从产卵较好的 3 对蛙的胚胎中,挑选出达到 NF11 ~ 12 阶段且发育正常的胚胎进行实验^[11].

1.3 胚胎的暴露实验

氯化三丁基锡用二甲基亚砜(DMSO)助溶,然后用 Ringer 溶液稀释成 $200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,现配现用. 在每个直径 90 mm 的玻璃培养皿内加 40 mL 溶液和 20 只发育正常的胚胎,放置于恒温培养箱中,温度控制在 $(25 \pm 0.5) \text{ }^\circ\text{C}$,为避免三丁基锡分解,培养箱 24 h 保持黑暗. 实验共设 1 个二甲基亚砜($<0.1\%$)对照组和 4 个不同时间段的暴露组(见图 1). 每组 4 盘,每 24 h 换液 1 次,并剔除死去的胚胎. 处理组在非暴露时段换成含二甲基亚砜的 Ringer 溶液,实验 3 d 后,将存活胚胎用 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ MS-222 麻醉处理后固定于 4% 的甲醛溶液中.

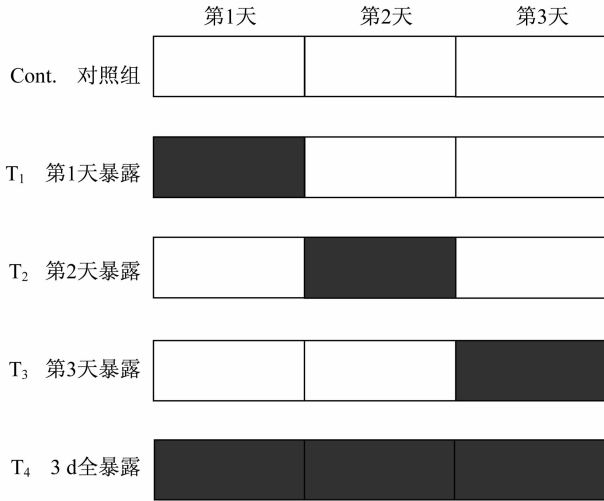


图 1 将热带爪蟾胚胎暴露于三丁基锡的实验设计方法

Fig. 1 The design method of experiment for *Xenopus tropicalis* embryos exposed to TBT

1.4 畸形的观察与分析

取出经固定的胚胎,在 Nikon 解剖镜下观察胚胎的发育状况,用 Nikon DS-SM 型显微镜照相系统进行拍照.在每盘中随机选取 5 个样品的图片,用 ACDSee10 软件测量胚胎的体长、尾长、鳍宽和肌节宽等,以其平均值作为该盘相应指标的值(见图 2),其中,鳍宽和肌节宽以尾中部的测量值表示.

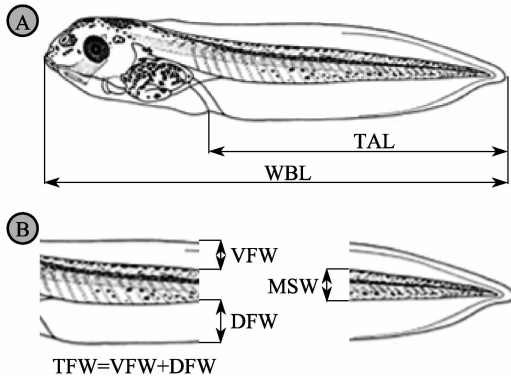


图 2 热带爪蟾胚胎体长(WBL)、尾长(TAL)、鳍宽(TFW)和肌节宽(MSW)的测量

Fig. 2 Types of growth index measurements for *Xenopus tropicalis* embryos

1.5 数据统计

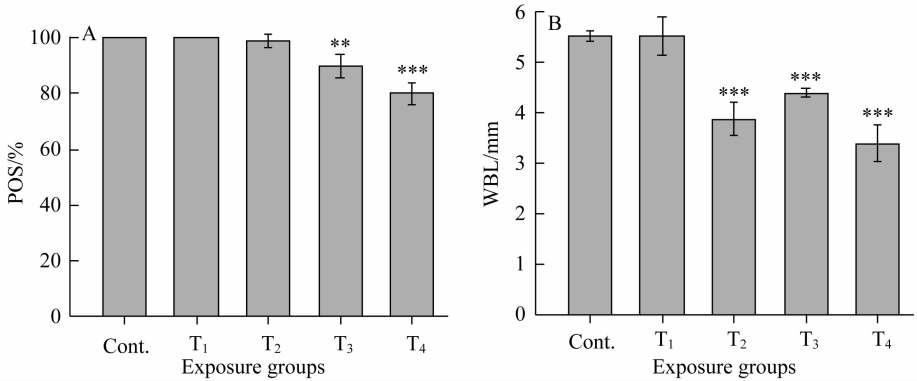
用 SPSS 16.0 进行数据的统计分析.以一盘中的胚胎为一个平行样,数据以平均值 ± 标准差(S. D.)表示, $n = 4$.用 Tukey-test 进行分析;用 OriginPro 8.0 作图.

2 结 果

2.1 对胚胎存活和生长的影响

暴露 3 d 后,对照组(Cont.)胚胎的存活率为 100%.与对照组相比,第 3 天暴露组(T₃)

和3 d全暴露组(T_4)的胚胎存活率分别降低了10%和20%;第2天暴露组(T_2)、第3天暴露组(T_3)和3 d全暴露组(T_4)胚胎的体长分别减少了30%、20%和39%(见图3)。

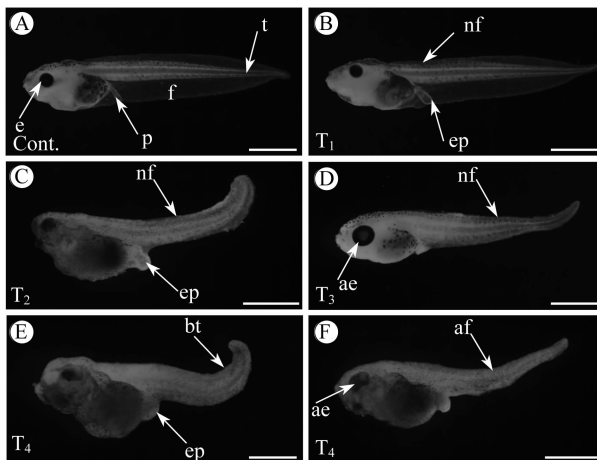


注:暴露方式参见图1;暴露组与对照组相比 ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

图3 不同时段三丁基锡($200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)暴露对热带爪蟾胚胎存活(POS)和体长(WBL)的影响
Fig. 3 Effects of TBT exposure during different periods on the percent of survival (POS) and whole body length (WBL) in *Xenopus tropicalis* embryos ($n = 4$)

2.2 三丁基锡对胚胎的致畸效应

对照组(Cont.)胚胎的总畸形率仅为3%,而暴露组胚胎的总畸形率均达90%以上。3 d后,正常胚胎眼睛呈圆形,色素较深且均匀分布;尾平直;鳍平展,无波形;泄殖腔左右两侧平行(见图4A)。与对照组相比,暴露组出现多种畸形现象,主要有眼睛变大或变小、躯干增大、泄殖腔突出、鳍变窄或无鳍以及尾巴弯曲等(见图4B~F)。



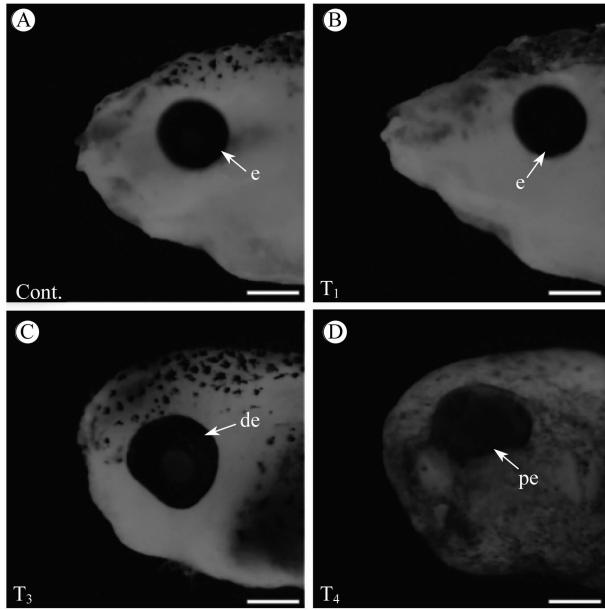
注:ae 眼睛畸形, bt 尾巴弯曲, e 眼睛, ep 泄殖腔突出, f 鳍, nf 鳍缺失, nf 窄鳍, p 泄殖腔, t 尾;
标尺 = 0.5 mm

图4 不同时段三丁基锡($200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)暴露对热带爪蟾胚胎的致畸效应

Fig. 4 Teratogenic effects of TBT exposure during different periods on *Xenopus tropicalis* embryos

总体而言,3 d全暴露组(T_4)胚胎畸形程度最严重。其中,眼睛和鳍的畸形表型在不同暴露时段表现出不同的特征。第1天暴露组(T_1)胚胎的眼睛与对照组没有明显区别(见图

5A和B),第2天暴露组(T_2)胚胎的眼睛主要表现为变小和色素减少等现象,第3天暴露组(T_3)胚胎的眼睛明显增大,同时伴随变形的情况(见图5C),而3d全暴露组(T_4)的胚胎主要表现为眼球突出,在部分样品也伴随色素减少和变形的现象(见图5D)。



注:de 眼睛变形,e 眼睛,pe 眼球突出;标尺 = 0.2 mm

图5 不同时段三丁基锡($200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCl)暴露对热带爪蟾胚胎眼部的致畸效应

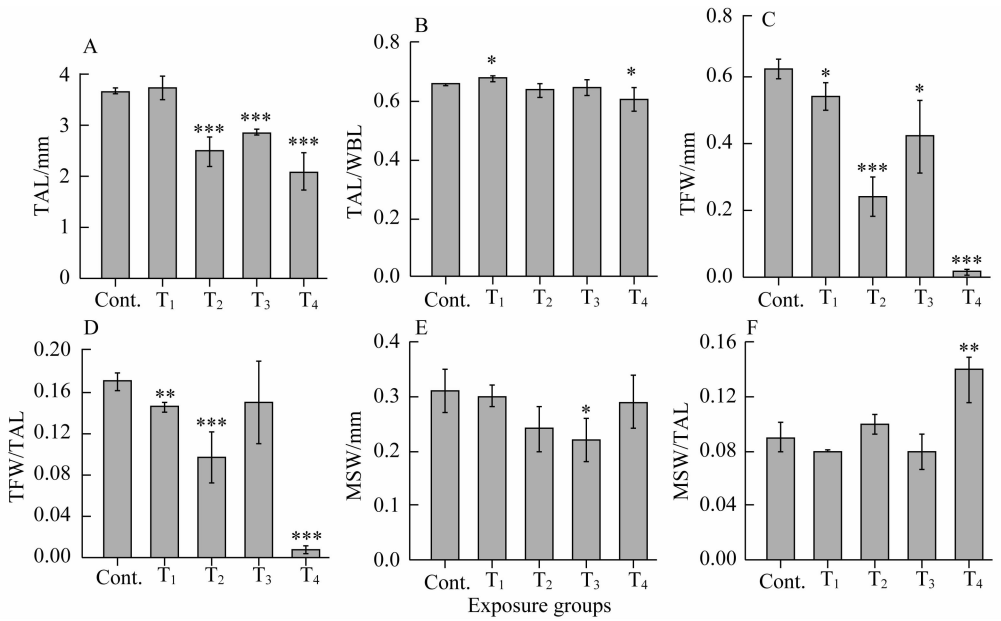
Fig. 5 Teratogenic effects of TBT exposure during different periods on the eyes of *Xenopus tropicalis* embryos

鉴于鳍在尾部比在躯干部更易于观测,本文选取了尾部的相关指标来评价鳍的变化.与对照组相比,第2、3天及3d全暴露组($T_{2,4}$)胚胎的尾长(TAL)分别减少了32%、22%和43%(见图6A),而尾长与体长的比(TAL/WBL)变化趋势比较小,仅在第1天和3d全暴露组($T_{1,4}$)有较明显的变化(见图6B).第1d暴露组(T_1)背鳍略有变窄(见图7A和B);第2d暴露组(T_2)胚胎的背鳍和腹鳍均严重变窄(见图6C),并在泄殖腔附近及尾部出现腹鳍缺刻和尾尖残留等现象(见图7C和D);第3天和3d全暴露组($T_{3,4}$)胚胎的背鳍和腹鳍也明显变窄(见图6C和7E),3d全暴露组(T_4)甚至出现背鳍和腹鳍全部消失的现象(见图7F).第2天和3d全暴露组($T_{2,4}$)胚胎的鳍宽与尾长的比均明显降低(见图6D).第3天暴露组(T_3)的肌节宽(MSW)降低了29%(见图6E),而3d全暴露组(T_4)胚胎的肌节宽与尾长的比(MSW/TAL)却增加了36%(见图6F)。

3 讨论

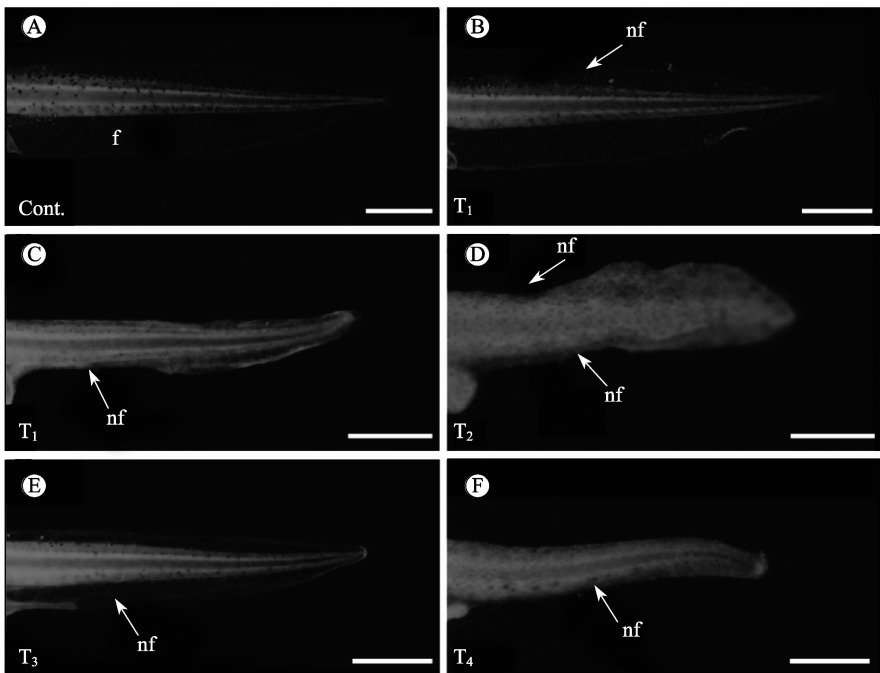
3.1 对存活和生长的影响

本文结果表明,三丁基锡第3天和3d全暴露明显降低了胚胎的存活率,除第1天外,其余时段暴露均明显抑制了胚胎的生长.由此可见,第3天是胚胎存活较为敏感的时段,而第1天对生长没有明显影响的原因可能是由于胚胎体轴延展时间较晚,胚胎到第2天才会出膜,出膜前的胚胎都处于蜷缩状态,导致第1天暴露对胚胎的体长几乎没有影响。



注: A 尾长(TAL), B 尾长与体长的比(TAL/WBL), C 鳍宽(TFW), D 鳍宽与尾长的比(TFW/TAL), E 肌节宽(MSW), F 肌节宽与尾长的比(MSW/TAL);暴露组与对照组相比 ** $P < 0.05$, *** $P < 0.001$
图 6 不同时段三丁基锡($200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)暴露对热带爪蟾胚胎尾部指标的影响

Fig. 6 Effects of TBT exposure during different period on the indices of tail in *Xenopus tropicalis* embryos



注: f 鳍, af 鳍缺失, nf 窄鳍;标尺 = 1.0 mm

图 7 不同时段三丁基锡($200 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)暴露对热带爪蟾胚胎尾鳍的致畸效应

Fig. 7 Teratogenic effects of TBT exposure during different period on the tail

fins of *Xenopus tropicalis* embryos

3.2 对胚胎的致畸效应

三丁基锡 3 d 全暴露能引起热带爪蟾胚胎产生多种严重的畸形现象,这些现象与以前研究中观察的畸形表型高度一致,而且相对于三丁基锡 24、36 和 48 h 暴露后引起的畸形现象更严重^[7].这主要由于暴露时间的延长,且暴露的延长时段仍为某些器官发育的关键期,如泄殖腔和鳍等^[12].尽管多种污染物均能导致爪蟾胚胎产生畸形现象,然而,其他污染物引起的畸形表型一般为水肿、尾巴弯曲、鳍皱折和皮肤色素减少等^[13-15],极少观察到泄殖腔突出或鳍变窄的现象.可见,三丁基锡能引起爪蟾胚胎特异性的畸形现象.

3.3 对眼和鳍致畸的敏感时期

尽管三丁基锡 3 d 全暴露能引起多种典型的畸形特征,但在分时段暴露中主要观察到眼睛和鳍的变化特征,而其他畸形表型的时段性特征不明显.这可能与各器官的发育模式有关.第 1 天暴露组(T_1)胚胎的眼睛与对照组没有明显差异,这一结果与以前暴露 24 h 后观察到眼睛色素减少等畸形现象的结果不同.这表明三丁基锡在第 1 天对眼睛的影响表现为发育抑制,一旦解除三丁基锡暴露后,眼睛的发育仍能恢复正常.第 3 天暴露能导致眼异常变大,以及 3 d 全暴露能导致眼球突出等畸形,这表明三丁基锡在第 3 天对眼发育的影响机制可能与第 1、2 天的不同.

暴露组尾长与体长的比与对照组没有明显变化,而鳍宽与尾长的比在多个暴露组显著减少,这表明三丁基锡对尾轴的延展没有影响,而对鳍的发育有特异性的抑制作用.三丁基锡 3 d 全暴露组(T_3)能引起鳍的彻底消失,而分时段暴露却导致胚胎背、腹和前、后部位鳍的特征性变化.有研究表明,背鳍由神经脊迁移转化形成,它始于 25 阶段;而腹鳍源于两个部分,第一部分始于胚胎发育的 27~32 阶段,由尾尖迁移到腹部形成腹鳍的一部分,第二部分开始分化的时间较晚,它由泄殖腔附近的中胚层发育而来,在 41 和 46 阶段完全形成^[12,16,17].在本实验中,对照组第 1、2 和 3 天胚胎的发育时段大约为 11~32,33~41 和 42~48 阶段,其中第 1 天为背鳍(包括尾尖)发育的重要时期,第 3 天为背鳍进一步扩展的时期,第 2 天为腹鳍形成的主要时期,而本文观察到,第 1 天暴露胚胎背鳍变窄,第 2 天暴露胚胎背、腹鳍严重缺失,以及第 3 天暴露胚胎背、腹鳍均略有变窄.由此可见,不同时间段的暴露对鳍的影响正好与鳍的发育模式相吻合.

4 结 论

本文通过采用三丁基锡对热带爪蟾胚胎进行不同时间段的暴露,观察到三丁基锡 3 d 全暴露能引起胚胎眼睛变大、变形、泄殖腔突出和鳍变窄或无鳍等多种严重的畸形现象.其中,第 2 天暴露组胚胎的眼比对照组的小,而第 3 天暴露组胚胎的眼明显变大;第 1 天暴露组胚胎的背鳍略有变窄,第 2 天暴露组胚胎的鳍严重缺失并有尾尖残留或缺刻的现象,第 3 天暴露组胚胎的背鳍和腹鳍均稍有变窄.本文为在胚胎致畸实验中筛选表型标志物提供了依据,同时为进一步研究三丁基锡的致畸机制提供了参考.

[参 考 文 献]

- [1] CHAMP M A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems [J]. Mar Pollut Bullet, 2003, 46(8): 935-940.
- [2] RÜDEL H E, MÜLLER J, STEINHANSES J, et al. Retrospective monitoring of organotin compounds in fresh-

- water fish from 1988 to 2003: results from the German environmental specimen bank [J]. *Chemosphere*, 2007, 66: 1884-1894.
- [3] SAYER C D, HOARE D J, SIMPSON G L, et al. TBT causes regime shift in shallow lakes [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40: 5269-5275.
- [4] JIANG G B, ZHOU Q F, LIU J Y, et al. Occurrence of butyltin compounds in the waters of selected lakes, rivers and coastal environments from China [J]. *Environ Pollut*, 2001, 115(1): 81-87.
- [5] 王蕾, 刘青坡, 郭素珍, 等. 三丁基锡对非洲爪蟾甲状腺组织结构的影响 [J]. *华东师范大学学报:自然科学版*, 2008(6): 75-81.
- WANG L, LIU Q P, GUO S Z, et al. Effects of tributyltin on thyroid histology of *Xenopus laevis* [J]. *Journal of East China Normal University: Natural Science*, 2008(6): 75-81.
- [6] American Society for Testing and Materials (ASTM). Standard guide for conducting the frog embryo teratogenesis assay-*Xenopus* (FETAX), E1439-91[G]// Annual Book of ASTM Standards, vol. 11.05. ASTM, Philadelphia, PA, 1998: 826-836.
- [7] GUO S Z, QIAN L J, SHI H H, et al. Effects of tributyltin (TBT) on *Xenopus tropicalis* embryos at environmentally relevant concentrations [J]. *Chemosphere*, 2010, 79(5): 529-533.
- [8] GONT L K, STEINBEISSER H, BLUMBERG B, et al. Tail formation as a continuation of gastrulation: the multiple cell populations of the *Xenopus* tailbud derive from the late blastopore lip [J]. *Development*, 1993, 119: 991-1004.
- [9] BECK C W, WHITMAN M, SLACK J M W. The role of BMP signaling in outgrowth and patterning of the *Xenopus* tail bud [J]. *Dev Biol*, 2001, 238: 303-314.
- [10] BEVAN C L, PORTER D M, PRASAD A, et al. Environmental estrogens alter early development in *Xenopus laevis* [J]. *Environ Health Perspect*, 2003, 111: 488-496.
- [11] NIEUEKOP P D, FABER J. Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin) [M]. Amsterdam: North Holland Publ Co, 1956.
- [12] TUCKER A S, SLACK J M W. Independent induction and formation of the dorsal and ventral fins in *Xenopus laevis* [J]. *Dev Dynam*, 2004, 230: 461-467.
- [13] FASCIO U, VAILATI G, VISMARA C. Comparative teratogenicity of chlorpyrifos and malathion on *Xenopus laevis* development [J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 70(3): 189-200.
- [14] BABA K, OKADA K, KINOSHITA T, et al. Bisphenol A disrupts notch signaling by inhibiting gamma-secretase activity and causes eye dysplasia of *Xenopus laevis* [J]. *Toxicol Sci*, 2009, 108(2): 344-355.
- [15] SAKE M. Developmental toxicity of *p, p'*-dichlorodiphenyltrichlorodthane, 2, 4, 6-trinitrotoluene, their metabolites, and benzoic [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2004, 23(4): 1065-1073.
- [16] TUCKER A S, SLACK J M W, JONATHAN M W, et al. The *Xenopus laevis* tail-forming region [J]. *Development*, 1995, 121: 249-262.
- [17] COLLAZO A, BRONNER-FRASER M, FRASER S E. Vital dye labelling of *Xenopus laevis* trunk neural crest reveals multipotency and novel pathways of migration [J]. *Development*, 1993, 118: 363-376.

[责任编辑 张 晶]