

利用水生动物精子体外检测污染物毒性的研究进展

Reviews on Application of Acute Cytotoxicity Assay Using Aquatic Animal Sperm *in vitro*

胡家会/HU Jia-hui, 张永忠/ZHANG Yong-zhong

聊城大学生命学院, 山东聊城 252059

School of Life Science, Liaocheng University, Liaocheng 252059, Shandong Province, China

[摘要] 介绍了近几年来水生动物精子在实验生态学和细胞毒理学研究中的应用。用水生动物精子可检测水体中多种污染物的细胞毒性,为水体污染物预测、预告研究提供了新的方法。

[关键词] 精子, 生物检测, 细胞毒性

[中图分类号] Q958

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-7857(2005)09-0066-03

Abstract: The applications of aquatic animal sperm in the experimental ecology and cytotoxicology in recent years are introduced. The cytotoxicities of many kinds of contamination is detected with aquatic animal sperm in the water, which provides a new method for forecasting the aquatic contamination.

Key Words: sperm, bioassay, cytotoxicity

CLC Number: Q958

Document Code: A

Article ID: 1000-7857(2005)09-0066-03

1 引言

随着工农业的迅猛发展,化学产品日益剧增,经各种途径进入水环境的有毒物质越来越多。水体中有毒物质的种类很多,约有70多万种,其中人造化学物质约10万多种,每年约有1000种的有毒物质产生并进入水环境^[1]。水生生态系统中的各种生物,在长期的进化过程中已经形成了一个相互依赖、互相制约的生命体系,任何一个种群或群落的异常变化都会显著影响其它种群或群落的变化,都有可能产生不可逆转的生态破坏。水体污染首当其冲的受害者是水生生物,水体生态系统破坏的最终受害者则是人类。水体污染造成的生态灾难有目共睹,给养殖业带来的经济损失极其惨重,也直接或间接威胁人类的健康和正常的生产活动。如1957年发生在日本的由甲基汞污染引起的著名水俣事件,共造成255人死亡,227人患了中枢神经系统疾病,超过万人感觉异常;美国1961-1976年间共发生过130起水污染事件,在过去的几十年里造成上万人发病或死亡。

生物体在亿万年的进化过程中,各细胞、组织和器官之间形成了一个相对稳定、

协调的内部代谢系统,当外界某种物质进入体内或使体内的成份含量发生改变时,将引起生物体的不良反应,这种反应可以通过一定的物理、化学或生物的方法进行检测。在污染物毒性检测的研究中,人们已经发现生物体对某种污染的特异反应,通过这种特异反应即可指示水体污染物的种类和水体的污染程度,起到及时预测和预报的作用。

应用体外细胞技术手段,研究环境中物理、化学和生物等多种有害因子对细胞损伤作用的特点与规律(称之为细胞毒理学, cytotoxicology),是体外生物检测中最成熟的技术之一。精子生物学的研究开始于19世纪,随着新方法的应用和研究的逐步深入,已从精子发生、形态与结构发展到分子生物学水平。多种形式的动物精液保存、人工受精的技术手段,也为精子体外检测在生产实践中应用提供了技术保障。本文重点介绍水生动物精子体外检测有毒物质细胞毒性的研究进展。

2 水体有毒物质的生物检测

生物检测(bioassay)就是利用活的生物

体、器官、组织或细胞对被检测物质引起的生物反应,根据反应类型和强度,测定出该物质生物活性大小的一种方法。过去应用鱼的活体检测水体污染物的毒性,因其费时,且费用高而转向用鱼细胞检测水体污染物的毒性。利用鱼细胞培养进行水体污染物检测有下列优点:①可以人为地控制研究条件,这是有机体实验所不易做到的;②研究的对象单一,只有一种组织细胞,而有机体是由复杂的多种组织所构成;③整个实验过程便于观察、检测和记录,能满足实验要求,而有机体的仔细观察与记录则困难得多;④可以一次提供大量的同一时期、条件相同、性状相似的细胞,可以把实验的误差最小化,而有机体的组织细胞是由各个时期的细胞所构成;⑤组织培养不需要大的实验设备及场所,研究的费用相对较低,一般也不会对环境造成二次污染等。进入20世纪70年代,人们开始用培养的鱼细胞对水体污染物进行毒性评价,取得了进展^[2-4]。

到20世纪90年代,人们开始通过配子、受精作用和早期发育的胚胎作为指示生物,能够敏感、快速而有效地进行急性毒

性检测和水体质量评价,克服了体内和细胞培养进行毒性检测的不足。用配子、受精作用评价和监测水体污染物细胞毒性的研究工作逐渐建立起来以后,开始主要用卵、受精过程和早期发育的胚胎进行检测污染物的毒性^[5-7],只是在最近几年才开始重视用动物的精子进行水体有毒物质的毒性检测,并应用到实验生态学、细胞毒理学研究中^[8-14]。

3 用卵、受精过程和早期胚胎检测污染物的细胞毒性

在1985年以前,人们重点研究水体污染物对鱼或其它水生动物的卵、受精过程和早期发育的胚胎的影响,用来监测各种有毒物质的生物毒性。如用海胆早期发育的胚胎检测石油污染所产生的生物影响;化学物质对海胆不同发育阶段的敏感性影响,有机氯农药爱耳德林(aldrin)、异狄氏剂(endrin)、狄氏剂(dieldrin)、七氯(heptachlor)和DDT对海胆(*Strongylocentrotus purpuratus*)胚胎发育的影响^[15];金属离子对海胆受精作用及胚胎早期不同发育阶段的毒性影响^[16];城市生活废水对海胆的受精作用、生存及发育的影响和工业污染物对海胆卵和受精作用的影响等^[17]。由于用海胆配子/受精作用和早期发育的胚胎检测和监测水体有毒物质的急性毒性,具有速度快、敏感度高和容易操作等特点,这种检测方法被美国环境保护局和加利福尼亚政府推荐^[18],并从此得到快速发展。

尽管动物的胚胎发育过程对有毒物质是敏感的,但用动物的胚胎发育来评价有毒物质的生物毒性有两个主要缺陷:发育通常要用24~96小时的时间;研究人员通常要对胚胎的死亡率做出主观的判断。1981年,Paul等人^[19]开始用动物的精子进行有毒物质的生物评价。用精子进行生物评价是对用卵、动物胚胎发育进行生物评价的扩展。用动物的精子进行有毒物质的生物评价,因精子细胞是唯一的,又没有类似卵膜的保护层,与卵和胚胎发育过程没有关系,故提高了对有毒性物质的敏感性;整个评价过程可以在几分钟或十几分钟而不是十几个小时或几天内完成,缩短了检测的周期。特别是从20世纪开始,人们重视用水生动物的精子来监测水体污染物的生物毒性。

4 用精子检测污染物的细胞毒性

早在1981和1987年,Paul等人^[19,20]就用不同浓度的氯化物处理过的下水道污水处理绿海胆(*S. droebachiensis*)的精子,通过受精率的变化来检测有毒物质的毒性取得成功,发现海胆的受精率与处理精子的时间和氯化物的浓度成反比,通过受精能力间接说明了有毒物质对精子细胞的毒性

影响。用水生动物的精子直接检测水体有毒物质的细胞毒性是最近几年才发展起来的技术。

4.1 检测有机农药的细胞毒性

1989年,Paul等人^[21]用3种海胆(*S. droebachiensis*, *S. perperatus*, *S. franciscanus*)的精子检测有机氯杀虫剂DDT、狄氏剂(dieldrin)、异狄氏剂(endrin)和硫丹(endosulfan)的细胞毒性,并对其毒性进行了比较研究,得知其毒性表现为:DDT>狄氏剂>硫丹>异狄氏剂,开创了用水生动物的精子直接检测有毒物质生物毒性的新方法。2005年,胡家会等^[22]用玫瑰无须鲷(*Puntius conchonius*)精子,检测有机磷农药水胺硫磷(isocarbophos)的细胞毒性,发现浓度为5 μ mol/L水胺硫磷明显抑制精子的运动;通过电子显微镜发现,水胺硫磷破坏了玫瑰无须鲷精子细胞膜的结构,使其线粒体膨胀和嵴变模糊、细胞核的电子密度变大、鞭毛有脱落现象等,对精子细胞造成直接损害。

4.2 检测有机硒的细胞毒性

TBT(Tributyltin)是一种有机硒衍生物,作为防污物质常用于水管及船舶,也用于许多工业过程中。在各种毒性检测中,TBT通常被作为一种模式有毒物质用于各种研究。2000年,Hamoutene等人^[9]用绿海胆、扇贝(*Placoptecten magellanicus*)和香鱼(*Malloctus villosus*)的精子作为指示生物,建立了一个新的生物化学评价体系,用来检测TBT的细胞毒性,发现TBT毒性的主要“靶器官”,TBT毒性通过影响海胆精子的线粒体而影响精子细胞的呼吸。2002年,Rurangwa等^[12]用鲤鱼(*Cyprinus carpio*)和非洲鲶鱼(*Clarias gariepinus*)的精子作为生物指示,研究TBT的急性毒性,发现:TBT(0.27~27 μ g/L)影响鲤鱼和鲶鱼精子的能量代谢;0.27 μ g/L的TBT显著降低鲶鱼精子的运动速度和缩短精子的运动时间;2.7~27 μ g/L的TBT引起ATP含量的迅速减少。此外,27 μ g/L的TBT使乳酸脱氢酶(LDH)的活性减少75%;一定浓度(5~10 μ mol/L)的TBT显著缩短青鱼(*Clupea harengus*)精子的存活率,用5 μ mol/L和10 μ mol/L的TBT处理6h后,精子的存活率分别降低到65%和10%;处理溶液中肌酸激酶(CK)的活性与TBT的浓度成正比,认为是随着TBT浓度的升高对细胞膜的结构造成的损害加重,从细胞内渗漏出的CK增多^[13]。用含有0.01~100 ng L⁻¹ TBT的饲料喂养斑马鱼(*Danio rerio*),30天后产生的精子同对照相比,精子的运动率明显下降,并对精子细胞产生不可逆转的损害^[23]。

4.3 检测重金属的细胞毒性

1989年,Paul等人^[20]用3种海胆的精子检测了5种重金属的细胞毒性,并对其毒性进行了比较。对海胆精子的毒性表现为:

铜、镉和铅对红海胆(red sea urchin)精子的毒性最大,银对绿海胆(green sea urchin)精子的毒性最大,锌对紫海胆(purple sea urchin)精子的毒性最大。总的来说,铅对海胆精子的毒性最大,锌对海胆精子的毒性最小,红海胆对重金属的毒性最敏感。1996年,Kime等^[24]用计算机辅助精子分析(CASA)系统,客观、定量地分析了镉和锌对鲶鱼(*Clarias gariepinus*)精子的细胞毒性,发现镉比锌对鲶鱼的精子有更大的毒性,且等量锌的存在能降低镉的毒性,认为镉和锌在精子细胞中有相同的结合部位。

4.4 检测其它有毒物质的细胞毒性

1997和2000年,Brocas等^[25]和Ciereszko等^[10]分别用牛的精子 and 黄鲈鱼(*Perch flavescens*)的精子研究了棉酚乙酸的细胞毒性,发现在实验浓度范围内棉酚乙酸抑制精子的运动和受精率,降低乳酸脱氢酶(LDH)的活性。研究发现,精子经棉酚的长期或短期作用,其形态发生改变、顶体和线粒体受到损害、鞭毛末端的微管结构也有损伤^[26]。2001年,Geffard等^[27]证实,两种海洋沉积物的细胞毒性可用海胆(*Paracentrotus ligidus*)和牡蛎(*Crassostrea gigas*)的精子进行检测,而这两种物质却对牡蛎的精子没有毒性。最近,Andersson等^[14]把猪的精子用于食品污染物检测,成功检测了杆菌(*Bacillus cereus*)所产生的有毒物质“cereulide”——一种引起呕吐的毒素,开拓了对食品有毒物质进行生物检测的新领域。

可见,从1989年开始用精子直接检测污染物毒性以来,相关研究并没有真正引起人们更多的注意,研究成果较少,主要集中在海洋生物,特别是海胆的精子研究。用淡水鱼的精子作为指示生物进行细胞毒性的研究更少。直到21世纪,用精子体外检测污染物生物毒性的研究才迅速开展起来。

5 结论

用水生动物精子快速评价水体污染物的细胞毒性,取料方便,敏感性强,可通过精子运动、细胞结构和酶活性等测试终点进行检测,是近几年国外刚刚发展起来的一种生物检测新技术。它有效克服了体内和细胞培养检测污染物毒性的不足,在实验生态学和细胞毒理学研究中得到较为广泛的应用,为水体污染物如有机磷、有机氯、有机硒和重金属等毒性的预测、预报研究提供了可靠方法。这种评价和检测方法有待进一步完善与提高,为国内环境毒理研究提供借鉴。这对推动国内生态毒理学研究方法的改进和研究水平的不断提高,将会产生积极的影响。

参考文献(References)

[1] 朱广香,马恒东.环境激素的危害及研究进

- 展简介 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2004, 1: 61~62
- [2] Huuskonen S E, Hahn M E, Lindstrom - Seppa P. A fish hepatoma cell line (PLHC-1) as a tool to study cytotoxicity and cypia induction properties of cellulose and wood chip extracts [J]. *Chemosphere*, 1998, 36: 2 921~2 937
- [3] Li H Y, Zhang S C. *in vitro* cytotoxicity of the organophosphorous pesticide parathion to FG-9307 cells [J]. *Toxicology in vitro*, 2001, 15: 643~647
- [4] Li H Y, Zhang S C. *in vitro* cytotoxicology of the organophorus pesticide ethylparathion to FG-9307 cells [J]. *Cell Biology and Toxicology*, 2002, 18: 235~241
- [5] Allen H. Effects of petroleum/L fractions on the early development of a sea urchin [J]. *Mar Pollut Bull*, 1971, 2: 138~140
- [6] Kobayashi N. Comparative sensitivity of varies developmental stages of sea urchins to some chemicals [J]. *Mar Biol*, 1980, 58: 163~171
- [7] McGibbon S, Moldan AGS. Routine toxicity testing of toxicants using a sea urchin gamol/Lete bioassay [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1986, 17(2): 68~72
- [8] Dinnel P A, Link J M, Stober Q J, et al. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides [J]. *Arch Environ Contam/L Toxicol*, 1989, 18: 748~755
- [9] Hamoutene D, Rahimtula A, Payne J. Development of a new biochemical assay for assessing toxicity in invertebrate and fish sperm [J]. *Water Research*, 2000, 34: 4 049~4 053
- [10] Ciereszko A, Dabrowsko K. *in vitro* effect of gossypol acetate on yellow perch (*Perca flavescens*) spermatozoa [J]. *Aquatic Toxicology*, 2000, 49: 181~187
- [11] Fernández-Alba A, Guil L H, López G D, et al. Toxicity of pesticides in wastewater: a comol/Lparative assessent of rapid bioassay [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2001, 426: 289~301
- [12] Rurangwa E, Biegnewska A, Slominskak E, et al. Effect of tributyltin on adenylate content and enzyme activities of teleost sperm: a biochemical approach to study the mol/Lechanisms of toxicant reduced spermatozoa motility [J]. *Comp Biochem and Physiology Part C*, 2002, 131: 335~344
- [13] Gryzb K, Rychlowski M, Biegnewska A, et al. Quantitative determination of creatine kinase release from herring (*Clupea harengus*) spermatozoa induced by tributyltin [J]. *Comp Biochem and Physiology Part C*, 2003, 134: 207~213
- [14] Andersson M A, Jaaskeainen E L, Shaheen R, et al. Sperm bioassay for rapid detection of cereulide -prodecing *Bacillus cereus* in food and related environments [J]. *International Journal of Food Microbiology*, 2004, 94: 175~183
- [15] Bresch H & Arendt U. Influence of different organochlorine pesticides on the developmLent of the sea urchin embryo [J]. *Environ Res*, 1977, 13: 121~128
- [16] Pagano G, Esposito A, Giordano G G. Fertilization and larval development of sea urchins following exposure of gametes and embryos to cadmium [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1982, 11: 47~55
- [17] Oshida P S, Goochey T K, Mearns A J. Biological monitoring of marine pollutants [M]. Vernberg F J, Calabrese A, Thurberg F P, Verngerg W B (eds), NY:Academic press, 1981. 389~403
- [18] Linfield L T, Martin M, Norton J. Bioassay species selection and recommended protocols [M]. CA: Calif. State Water Resources Control Board, Sacramento, 1985. 77~86
- [19] Dinnel P A, Stober Q J, DiJulio D H. Sea urchin sperm bioassay for seawage and chlorinated seawater and its relation to fish bioassays [J]. *Marine Environmental Research*, 1981, 5: 29~39
- [20] Dinnel P A, Stober Q J. Application of the sea urchin sperm bioassay to sewage treatment efficiency and toxicity in marine waters[J]. *Marine Environmental Research*, 1987, 21: 121~133
- [21] Dinnel P A, Link J M, Stober Q J, et al. Comparative sensitivity of sea urchin sperm bioassays to metals and pesticides [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1989, 18: 748~755
- [22] 胡家会, 张士瑞, 张永忠, 等. 水胺硫磷对玫瑰无须鲷精子的体外毒性作用[J]. 高技术通讯, 2005, 15(2): 104~107
- [23] Mcallister B G, Kim D E. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 65: 309~316
- [24] Kime D E, Ebrahimi M, Nysten K, et al. Use of computer assisted sperm analysis for monitoring the effects of pollution on sperm quality of fish; application to the effects of heavy metals [J]. *Aquatic Toxicology*, 1996, 36: 223~237
- [25] Brocas C, Rivera R M, Paula-Lopes F F, et al. Deleterious action of gossypol on bovine spermatozoa, oocytes, and fertilization [J]. *Biol Reprod*, 1997, 57: 901~907
- [26] Randell R D, Chase C C, Jr Wyse S J. Effects of gossypol and cottonseed products on reproduction of mammals [J]. *J Anim Sci*, 1992, 70: 1 628~1 638
- [27] Gefard O, Budzinski H, Augagneur S, et al. Assessment of sediment contamination by spermioxicity and embryotoxicity bioassays with sea urchins (*Paracentroyus licidus*) and oysters (*Crassostrea gigas*) [J]. *Environ Toxicol Chem*, 2001, 20: 1 605~1 611

(责任编辑 王 芷)

· 图片科技新闻 ·

美国“发现”号航天飞机圆满完成太空飞行任务



图1 宇航员进行太空行走



图2 位于地球上空的“发现”号

美国东部时间8月9日8时12分,“发现”号航天飞机在重返太空两周后成功着陆在美国加利福尼亚州爱德华兹空军基地。由于天气原因,着陆时间曾一再推迟。

不管是发射前,还是升空后,“发现”号的旅程都一波三折。在升空2分钟之后,航天飞机自带的一台摄像机突然拍摄到一大块脱落物从外挂燃料箱上飞出,紧接着,又有一小片不怎么引人注目的脱落物飞出。经过细致检查后,专家确信“发现”号基本安全,但它机腹上出现的两块异常突起仍然是安全隐患。

7月28日,“发现”号与国际空间站成功对接。此后,宇航员在7月30日、8月1日和8月3日共进行了3次太空行走。为了确保“发现”号航天飞机安全返回,宇航员在第3次太空行走中对机腹的两块异常突起进行了修复。实际上,航天飞机本身一直存在安全缺陷,因为它至今仍未有有效的救生方法。所以,美国宇航局只有两个选择:一是不飞,这样就要牺牲空间站的供应或者建设;一是在预算内实现最低风险的飞行。

在下一代太空飞行器的研制问题上,美国宇航局可能会放弃已经过时的航天飞机总设计原则,实现人货分离,以便更好地保障宇航员的生命安全。但下一代飞行器目前还仅仅处于设想阶段。

(本刊记者 黄永明)



图3 安全着陆后宇航员合影



图4 安全返回后的“发现”号沐浴在晨光中