

助溶剂甲苯和二甲基亚砆对斑马鱼胚胎发育的 复合毒性效应^{*}

李 佳¹ 周 珍¹ 胡 芹² 王 玥¹ 梁 勇^{1, 3**}

(1 江汉大学医学院, 武汉, 430056; 2 华中农业大学资源与环境学院, 武汉, 430070;
3 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京, 100085)

摘 要 研究了甲苯和二甲基亚砆 (DMSO) 对斑马鱼胚胎生长、发育的毒性效应。实验结果表明: 低剂量的甲苯 (0.05%) 单一暴露对斑马鱼胚胎发育有一定毒性, DMSO (0.45%) 对斑马鱼胚胎无明显毒性; 但甲苯与 DMSO 具有较强的复合毒性效应, 随着 DMSO 含量的增加, 与甲苯单一暴露组相比, 斑马鱼胚胎死亡率显著增加、胚胎孵化率下降、胚胎发育迟缓并生成大量畸形; 但甲苯以及甲苯和 DMSO 复合物对人胚肾 HEK-293 细胞株和人胃癌 SGC-7901 细胞株的活力均没有明显效应。DMSO 可通过提高甲苯在水中的分散性, 增加甲苯的神经毒性, 但对离体实验模型无显著效应, 故在选择不同生物模型评估有机污染物毒性效应时, 需考虑不同类型助溶剂所产生的复合效应, 以减少实验误差。
关键词 甲苯, 二甲基亚砆, 斑马鱼, 毒性。

常用的助溶剂二甲基亚砆 (DMSO)、丙酮、乙醇等在常用的浓度下, 对环境毒理学常用的模式动物如鱼类、两栖类等没有明显的毒性效应^[1]。为评估二噁英、多氯联苯、多溴联苯醚中某些高氯代、高溴代异构体的生物效应, 在常规的 DMSO 溶剂中, 会适当添加少量的甲苯、正己烷等极性低的有机溶剂, 以增加其溶解性^[2-5], 但这些已知具有较高毒性的溶剂与其它助溶剂之间是否存在相互作用, 并对实验结果造成偏差, 需要加以评估。

甲苯作为一种常见的有机溶剂, 其脂溶性高, 挥发性较强, 可通过鳃、体表进入鱼体, 能轻易透过血脑屏障, 进而抑制乙酰胆碱酯酶活性, 并造成神经系统功能损伤、影响神经系统发育, 具有明显的神经毒性效应^[6-7]。斑马鱼胚胎发育毒性技术是国际认可的评价化学品毒性效应的标准方法^[1, 8-10]。

在本研究中, 选取低剂量的甲苯 (0.05%) 和不高于 0.45% 的 DMSO, 研究助溶剂单一、复合暴露后, 对斑马鱼胚胎发育的毒性效应; 同时, 为进一步验证斑马鱼胚胎毒性实验结果, 选择人胚肾 293 细胞株和人胃癌 7901 细胞株, 研究助溶剂对离体细胞活力的影响, 以综合评价其毒性效应。

1 实验方法

1.1 实验材料

将性成熟斑马鱼 (*Danio rerio*, AB 系) 雌雄分缸, 饲养于流水养殖系统。水温保持在 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 左右, 光照/黑暗周期控制在 12 h/12 h。暴露实验开始前两天将雌雄以 1:2 配对, 自然交配产卵。取受精 1 hpf (hour post-fertilization) 以内受精卵进行暴露实验。

1.2 暴露实验

挑选正常发育的受精卵, 3 hpf 开始染毒进行暴露实验。实验于直径为 7 cm 的玻璃表面皿中进行, 所用水均取自系统曝气水。试验浓度为: 0 (对照组)、0.05% 甲苯、0.45% DMSO、0.1% (DMSO + 甲苯)、0.3% (DMSO + 甲苯) 和 0.5% (DMSO + 甲苯) (V/V)。其中, 3 种助溶剂复合物 (DMSO + 甲苯) 分别由甲苯与 DMSO 按不同体积比 (1:1, 1:5, 1:9) 混合配制而成, 各助溶剂复合物试验组中甲

2009 年 2 月 10 日收稿。

苯的浓度均为 0.05%，DMSO 浓度分别为 0.05%，0.25%，0.45%。每个试验浓度均设 3 个平行组，每个平行组含 25 粒卵。同样的暴露实验重复两次。暴露实验每天定时更新一半染毒溶液，同时挑出死亡个体。水温保持在 $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ 左右，光照/黑暗周期控制在 12 h/12 h。

在特定时间段(受精后 12 h、36 h、60 h、84 h、108 h、132 h、156 h 等)对染毒斑马鱼胚胎死亡数、孵化数进行统计。观察胚胎的形态变化，如：发育停滞、心包水肿、卵黄水肿、脊柱卷曲等畸形状况。

1.3 细胞毒性实验

MTT 比色法测定细胞活力。人胚肾 HEK-293 细胞株和人胃癌 SGC-7901 细胞株分别使用 DMEM 培养基和 RPMI1640 培养基进行培养。用 0.25% 胰蛋白酶消化处于对数生长期的细胞，加入新鲜培养基轻轻吹打制成细胞悬液，用血细胞记数板计算细胞密度，用培养基稀释到 $1 \times 10^5 \text{个} \cdot \text{mL}^{-1}$ ，然后以每孔 5×10^3 个接种到 96 孔板，每孔含 200 μL 培养基。37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中培养 12 h，细胞贴壁后，吸去培养基，分别加入含 0 (对照组)、0.05% 甲苯、0.45% DMSO、0.1% (DMSO + 甲苯)、0.3% (DMSO + 甲苯) 和 0.5% (DMSO + 甲苯) (V/V) 的含 1% 胎牛血清的无酚红培养基 180 μL ，分别暴露 24 h 和 48 h。暴露结束后每孔加入 $5 \text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ MTT 溶液 20 μL 继续培养 4 h。小心吸尽孔内培养液，然后每孔加入 150 μL DMSO，轻轻振荡 5 min，使结晶物充分溶解，在酶标仪上于 490 nm 波长处测定各孔吸光度值 (A)。每个试验组设置 8 个平行孔。

采用 SPSS10.0 分析全部数据，实验结果用平均值 $\pm$ 标准误差表示。

2 结果与讨论

2.1 甲苯和 DMSO 对斑马鱼胚胎发育的影响

甲苯和 DMSO 复合暴露对斑马鱼胚胎的致死效应如图 1A 所示。与对照组相比，随着暴露时间的延长，0.45% DMSO 单一暴露组对斑马鱼胚胎没有显著致死效应，0.05% 甲苯单一暴露组的胚胎死亡率为 12% (156 hpf)，0.1% (DMSO + 甲苯) 助溶剂复合物对斑马鱼胚胎的死亡率无明显效应；但 0.3% (DMSO + 甲苯) 和 0.5% (DMSO + 甲苯) 助溶剂复合物可明显提高斑马鱼胚胎的死亡率，暴露到 156 hpf 时，0.3% (DMSO + 甲苯) 助溶剂复合物可造成 39% 的斑马鱼胚胎死亡，而 0.5% (DMSO + 甲苯) 暴露组斑马鱼胚胎死亡率为 74%，这表明，随着助溶剂复合物中 DMSO 含量的增加，斑马鱼胚胎的死亡率显著上升。

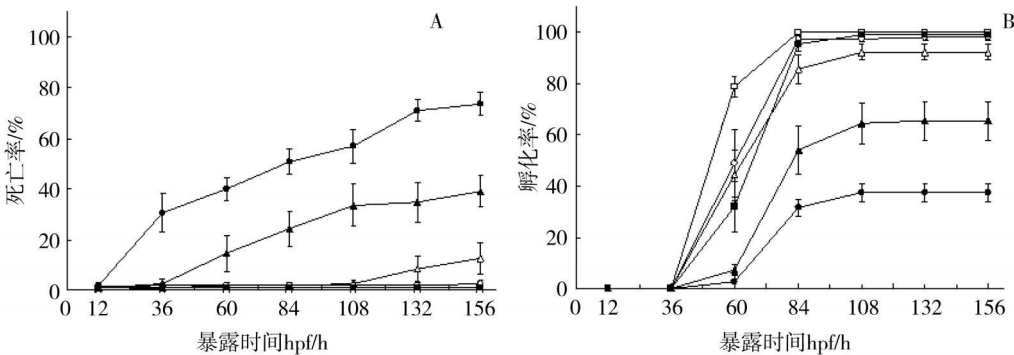


图 1 甲苯和 DMSO 复合暴露对斑马鱼胚胎死亡率 (A) 和孵化率 (B) 的影响

□-对照 △-0.05%甲苯 ○-0.45%DMSO ■-0.1% (DMSO+甲苯) ▲-0.3% (DMSO+甲苯) ◆-0.5% (DMSO+甲苯)

Fig 1 Effects of toluene and DMSO combined exposure on mortalities (A) and hatching rate (B) of zebrafish embryos

甲苯和 DMSO 各暴露组对斑马鱼胚胎孵化率的影响如图 1B 所示。对照组斑马鱼胚胎 48 hpf 时开始出膜，胚胎发育到 60 hpf 时，80% 的胚胎均已正常孵化出膜，84 hpf 时，所有对照组胚胎均已孵化出膜，胚胎孵化率为 100%。与对照组相比，DMSO 单一暴露组、0.1% (DMSO + 甲苯) 助溶剂复合物

暴露组的斑马鱼胚胎总孵化率均无显著差异，0.05% 甲苯暴露组的胚胎孵化率为 92%，但各暴露组斑马鱼胚胎在 60hpf 和 84hpf 时的孵化率均显著低于对照组，说明 DM SO 和甲苯均可阻碍斑马鱼正常胚胎发育。另外，与对照组以及甲苯、DM SO 单一暴露组相比，0.3% (DM SO + 甲苯) 和 0.5% (DM SO + 甲苯) 助溶剂复合物暴露组的胚胎孵化率显著降低，暴露到 108hpf 时，0.5% (DM SO + 甲苯) 暴露组的胚胎孵化率仅为 37%。

上述结果说明，DM SO 和甲苯对斑马鱼胚胎发育存在明显的复合毒性效应，随着助溶剂复合物中 DM SO 比例的增加，DM SO 和甲苯复合物可显著降低斑马鱼胚胎孵化率并造成大量斑马鱼胚胎死亡。

在实验过程中，我们还发现甲苯以及甲苯和 DM SO 复合物可造成斑马鱼胚胎发育迟缓并造成大量的畸形。如图 2 所示，与对照组 (图 2A、C) 相比，0.05% 甲苯、0.1% (DM SO + 甲苯)、0.3% (DM SO + 甲苯) 和 0.5% (DM SO + 甲苯) 实验组的斑马鱼胚胎均出现不同程度的发育停滞 (图 2B)，并可观察到心包、卵黄水肿 (图 2D、E)、尾巴弯曲 (图 2F) 等畸形现象。甲苯、DM SO 阻碍斑马鱼胚胎发育并造成斑马鱼胚胎发育畸形的具体数据如表 1 所列。与 DM SO、甲苯复合物对斑马鱼胚胎孵化率、死亡率的结果相同，随着助溶剂复合物中 DMSO 比例的增加，DM SO、甲苯复合物可显著阻滞斑马鱼胚胎的正常发育，并造成大量的胚胎畸形。

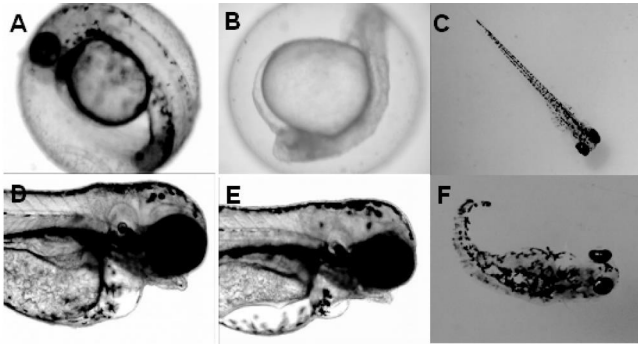


图 2 甲苯和 DM SO 复合暴露组斑马鱼胚胎畸形现象
A. 正常鱼卵 B. 发育停滞 C. 正常鱼体 D. 心包水肿 E. 心包、卵黄水肿 F. 尾巴弯曲

Fig 2 Morphological development of normal and malformed embryos in toluene and DM SO combined exposure groups

表 1 甲苯和 DMSO 复合暴露对斑马鱼胚胎发育的影响 (n = 75) (单位: 个)

Table 1 Combined effect of toluene and DMSO exposure on development of zebrafish embryos (n = 75)

发育畸形	0.45% DMSO	0.05% 甲苯	0.1% (DM SO + 甲苯)	0.3% (DM SO + 甲苯)	0.5% (DM SO + 甲苯)
发育停滞	0	8	0	23	27
心包水肿	0	8	0	21	12
卵黄水肿	0	1	0	11	1
尾巴弯曲	0	5	0	16	26

注：1个斑马鱼胚胎可同时具有几种畸形现象。

甲苯以及甲苯和 DM SO 复合物对斑马鱼胚胎发育的毒性结果表明，低剂量的甲苯 (0.05%) 单一暴露对斑马鱼胚胎具有较小毒性，但甲苯与 DM SO 混合物对斑马鱼胚胎具有很强的复合毒性效应。甲苯的神经毒性效应主要表现为抑制生物体内乙酰胆碱酯酶活性，并干扰神经系统的正常发育，但其急性毒性较低，大鼠经口 LD₅₀ 为 5500 mg • kg⁻¹，LC₅₀ 为 17020 mg • m⁻³，小鼠经口 LD₅₀ 为 8000 mg • kg⁻¹，LC₅₀ 为 25900 mg • m⁻³ [12]，而 DM SO 在低于 0.5% 的浓度下基本没有毒性效应，被认为是适用于生物分析的有机溶剂 [12]。实验结果也表明，低剂量的甲苯 (0.05%) 可降低斑马鱼胚胎的孵化率，并可造成胚胎发育畸形，这与甲苯可干扰斑马鱼胚胎神经系统发育相关。由于甲苯在水中的分散性差，静置一段时间后，在液面表层聚集成一些小的油滴，而未出膜和刚出膜的斑马鱼胚胎不能在水中自由游泳，故甲苯进入斑马鱼胚胎体内的途径主要是吸附在斑马鱼胚胎卵壳上，并进一步渗透进入斑马鱼体内，结果造成部分斑马鱼胚胎发育迟缓并出现严重的畸形。DM SO 作为一种水溶性的化合

物，同时能溶解甲苯，显著提高甲苯在水中的分散性。甲苯和 DMSO 复合暴露实验中，当 DMSO 和甲苯的比例为 1:1 时，助溶剂混合物对斑马鱼胚胎的死亡率、孵化率均无明显作用，也未观察到斑马鱼胚胎发育畸形，在表面皿表层无甲苯油滴的形成。但与之相对应的是，进一步增加 DMSO 和甲苯复合暴露中 DMSO 的比例 (5:1 和 9:1)，斑马鱼胚胎的孵化率下降，出膜时间延迟，发育停滞，并出现多种严重的畸形，胚胎的死亡率显著升高。可能的原因是：尽管甲苯对鱼类的毒性较大，但在单一暴露条件下，由于甲苯在水中的分散性很差，低浓度的甲苯较少进入胚胎或幼鱼体内，相应产生的毒性较低，但随着溶液中 DMSO 含量的升高，甲苯在水溶液中的分散性增加，进而促进了斑马鱼胚胎及幼鱼通过卵壳、体表、鳃等对甲苯的吸收，最终产生非常明显的毒性效应。

2.2 甲苯和 DMSO 对体外培养细胞活力的影响

甲苯和 DMSO 对人胚肾 HEK-293 细胞和人胃癌 SGC-7901 细胞的活力影响如图 3 所示。与斑马鱼胚胎发育毒性实验结果不同的是，甲苯和 DMSO 单一、复合暴露 24h 和 48h 后，对人胚肾 HEK-293 细胞和人胃癌 SGC-7901 细胞的活力均未造成显著影响，这说明甲苯以及甲苯、DMSO 复合物对体外培养的细胞株没有明显的毒性效应。

甲苯作为一种脂溶性的毒物，主要作用位点是神经系统，对神经细胞如海马细胞等具有一定的毒性效应，但对其它种类的细胞株影响较小^[10]。实验结果表明，DMSO 和甲苯复合暴露可显著抑制斑马鱼胚胎发育，但甲苯、DMSO 单一、复合暴露对人胚肾 HEK-293 细胞以及人胃癌 SGC-7901 细胞的细胞活力均无明显效应，这也从侧面反映了甲苯主要通过干扰神经系统发育而造成斑马鱼胚胎发育异常及死亡。

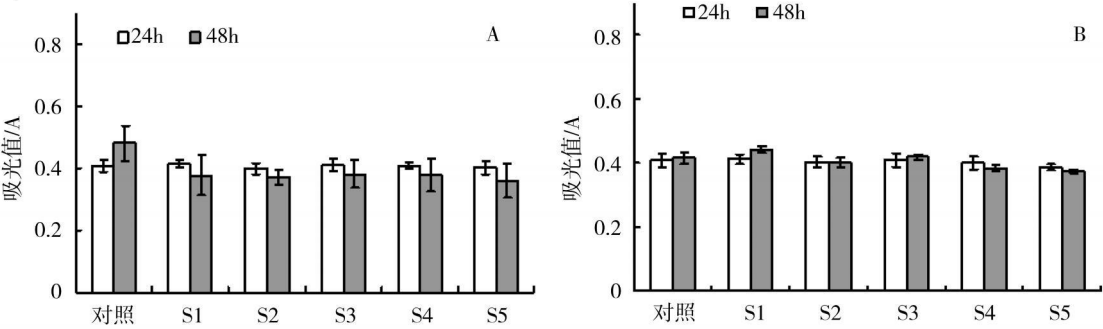


图 3 甲苯和 DMSO 对 HEK-293 (A) 和 SGC-7901 (B) 细胞活力的影响

S1: 0.05% 甲苯, S2: 0.45% DMSO, S3: 0.1% (DMSO + 甲苯), S4: 0.3% (DMSO + 甲苯), S5: 0.5% (DMSO + 甲苯)

Fig 3 Effects of toluene and DMSO combined exposure on cell activation of HEK 293 (A) and SGC 7901 (B)

3 结论

实验结果证实 DMSO 可通过增加甲苯在水中的分散性，显著提高低浓度甲苯 (0.05%) 对斑马鱼胚胎的毒性效应，DMSO 和甲苯存在明显的复合毒性效应。利用离体实验模型评估 DMSO 和甲苯的毒性效应时，因助溶剂本身的靶分子、致毒机制不同，对人胚肾 HEK-293 细胞和人胃癌 SGC-7901 细胞两种细胞株的毒性较低，并不影响最终的实验结果及分析。故在选择不同生物模型评估有机污染物毒性效应时，需考虑不同类型助溶剂所产生的复合效应。

参 考 文 献

[1] Hallare A, Nagel K, Koller H et al, Comparative Embryotoxicity and Proteotoxicity of Three Carrier Solvents to Zebrafish (*Danio rerio*) Embryos. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2006, **63** (3) : 378—388

[2] Asari M, Takatsuki H, Yanazaki M et al, Waste Wood Recycling as Animal Bedding and Development of Bio-monitoring Tool Using the CALUX Assay. *Environment International*, 2004, **30** (5) : 639—649

[3] Scippo M, Eppe G, De P E et al, DR-CALUX Screening of Food Samples Evaluation of the Quantitative Approach to Measure Dioxin Furans and Dioxin-Like PCBs. *Talanta*, 2004, **63** (5) : 1193—1202.

[4] Van W N, Windal J, Vanderperren H et al., Validation of the CALUX Bioassay for PCDD /F Analyses in Human Blood Plasma and Comparison with GC-HRMS. *Talanta*, 2004, **63** (5) : 1157—1167

[5] Hamers T, Van Schaandenburg M D, Felzel E C et al., The Application of Reporter Gene Assays for the Determination of the Toxic Potency of Diffuse Air Pollution. *The Science of the Total Environment*, 2000, **262** (1—2) : 159—174

[6] 颜士勇, 印木泉, 韦毅等, 甲苯对原代培养海马神经细胞的毒性研究. 卫生研究, 2004, **33** (1) : 18—22

[7] Dange A Jit D, Masurekar Vasant B, Toluene Toxicity: Effects of Sublethal Levels on Enzyme Activities in Seawater Adapted Tilapia (*Sarotherodon Mossambicus* Peters) . *Journal of Biosciences*, 1981, **3** (2) : 129—134

[8] McGrath P, Li C Q, Zebrafish: A Predictive Model for Assessing Drug-Induced Toxicity. *Drug Discovery Today*, 2008, **13** (9—10) : 394—401

[9] Pang C, *In-vivo* Zebrafish Assays for Toxicity Testing. *Current Opinion in Drug Discovery and Development*, 2005, **8** (1) : 100—106

[10] Zodrow JM, Stegeman J J, Tanguay R L, Histological Analysis of Acute Toxicity of 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) in Zebrafish. *Aquatic Toxicology*, 2004, **66** (1) : 25—38

[11] 颜士勇, 甲苯神经毒性的生物学机制研究进展. 海军医学杂志, 1999, **20** (1) : 22—27

[12] Jay A, Effects of Organic Solvents and Solvent-Atrazine Interactions on Two Algae: *Chlorella Vulgaris* and *Selenastrum Capricornutum*. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 1996, **31** (1) : 84—90

COMBINED TOXICITY OF DM SO AND TOLUENE ON DEVELOPMENT OF ZEBRAFISH (*DANIO RERIO*) EMBRYOS

LI Jia¹ ZHOU Zhen¹ HU Qin² WANG Yue¹ LIANG Yong^{1, 3}

(1 School of Medicine, Jiangnan University, Wuhan, 430056, China; 2 College of Resources and Environment, Huazhong Agricultural University, Wuhan, 430070, China; 3 State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China)

ABSTRACT

The present study examines the effects of cosolvent toluene and dimethyl sulfoxide (DM SO) on zebrafish embryos. The results showed that single exposure with low-dose toluene (0.05% V/V) had low toxicity to the zebrafish embryonic development, while DM SO (0.45% V/V) by itself produced no observable effect. But the two solvents together showed strong synergistic toxicity. Compared to the toluene single-exposure control group, with the increase of DMSO concentration, the embryos showed significant reduction in survival and hatching rate, retarded embryonic development and pronounced abnormalities. On the contrary, no such effect was recorded with human embryonic kidney (HEK-293) cell line and human gastric cancer (SGC-7901) cell line. The results suggested that DM SO could enhance the neurotoxicity of toluene by increasing the dispersion in water, but there is no remarkable effect on the *in vitro* model. Based on the study, when using of different biological models to assay the toxicity of organic compounds, the combined effects of cosolvents should be considered to minimize experimental error.

Keywords toluene, DM SO, zebrafish, toxicity.