

洛克沙肿对鲫鱼暴露胁迫的毒性效应

孙永学, 陈杖榴, 陈展飞, 刘志昌

(华南农业大学 广东省兽药研制与安全评价重点实验室, 广东 广州 510642)

摘要:进行了洛克沙肿对鲫鱼的急性毒性试验,通过急性暴露胁迫对抗氧化系统的影响进行了探讨. 试验发现,洛克沙肿对鲫鱼的急性毒性较低,24 h LC_{50} 为 181.69 mg/L,48 h LC_{50} 和 96 h LC_{50} 均为 176.57 mg/L. 30、45 mg/L(以 As 计)洛克沙肿连续暴露 5 d,鲫鱼脑和肝乳酸脱氢酶受到显著抑制($P < 0.05$)并呈剂量-效应关系. 鱼脑和肝的丙二醛含量显著升高($P < 0.05$). 鲫鱼脑、肝和鳃组织的超氧化物歧化酶活性在初期显著升高($P < 0.05$),但在试验后期随剂量增高而受到显著抑制($P < 0.05$). 鱼脑谷胱甘肽-S-转移酶受到极显著的抑制($P < 0.01$). 结果表明:洛克沙肿对鲫鱼巯基酶和抗氧化功能有明显抑制,鱼脑和肝脏氧化损伤最明显,呈现剂量-效应关系.

关键词:洛克沙肿; 鲫鱼; 急性毒性; 抗氧化系统

中图分类号:S859

文献标识码:A

文章编号:1001-411X(2004)03-0101-04

Toxic effects of roxarsone on *Carassias auratus*

SUN Yong-xue, CHEN Zhang-liu, CHEN Zhan-fei, LIU Zhi-chang

(Guangdong Provincial Key Lab for Veterinary Pharmaceutics and Safety Evaluation,
South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

Abstract: Toxic effects of roxarsone were investigated when carp (*Carassias auratus*) was exposed to roxarsone solution of 30 and 45 mg/L for 2 and 5 days. Roxarsone showed low toxicity to carp, but the margin of safety was narrow, the LC_{50} were as follows: 24 h LC_{50} 181.69 mg/L, 48 and 96 h LC_{50} 176.57 mg/L. The activities of LDH in carp brain and carp liver were inhibited significantly ($P < 0.05$) and showed dose-effect relationship. The contents of MDA in carp brain and carp liver increased significantly in all treated groups ($P < 0.05$). Initially the activities of SOD in carp brain, liver and gill were enhanced significantly ($P < 0.05$) and then inhibited markedly with increasing doses. The activities of GSH-ST in carp brain were inhibited strikingly ($P < 0.01$). These results showed roxarsone could inhibit enzyme with sulfhydryl group and the ability of antioxidation. The oxidative damage to carp were remarkable and showed dose-effect relationship.

Key words: roxarsone; carp; acute toxicity; antioxidation system

有机砷类促生长添加剂洛克沙肿(3-硝基-4-羟基苯砷酸)在畜禽应用后,大部分以原形随粪尿排出体外^[1,2],直接或以施肥方式进入周围的土壤、地下或地表水中,其通过水体污染或经生物富集和食物链方式进而对人类健康的危害应引起人们的关注. 本试验以养殖场周边鱼塘和河流中常见的鲫鱼为对象,通过洛克沙肿对鲫鱼暴露的毒性效应研究,探讨

和建立洛克沙肿所致水环境砷污染的生物检测,为进一步评价有机砷添加剂的环境生态毒性提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 动物

鲫鱼 *Carassius auratus*, 100 尾, 体长(8.0 ± 0.5)

收稿日期:2003-12-24

作者简介:孙永学(1969-),男,副教授,博士. 通讯作者:陈杖榴(1937-),男,教授.

基金项目:国家自然科学基金重点项目(30130140)

cm, 体质量(20 ± 2.0) g, 雌雄兼有, 由中国水产科学院珠江水产研究所提供。室内水池饲养, 自来水静置脱氯 2 d, 水温(21 ± 2) °C, pH 6.5 ± 0.5, 气泵充氧, 溶解氧(D.O)为 7.5 ~ 8.5 mg/L, 饲养密度为每 10 L 水中放养 3 ~ 4 尾鱼。

1.2 药物与试剂

洛克沙肿, $w = 96.3\%$, $w(\text{As}) = 28.5\%$, 批号 0008010, 由山西省太原基耀动物保健品公司提供。乳酸脱氢酶、超氧化物歧化酶、丙二醛、谷胱甘肽-S 转移酶测试盒均由江苏省南京建成生物工程研究所提供。其他常用试剂均为分析纯级。

1.3 洛克沙肿对鲫鱼的急性毒性试验

按文献[3], 水箱中加入 20 L 配制好的洛克沙肿溶液, 设 5 组, 每组投放 10 尾鲫鱼, 观察 24、48、96 h 死亡数, 用急性毒性概率单位法求出各半数致死浓度(LC₅₀)^[4], 用 Turabell 公式求洛克沙肿安全浓度^[5]。

1.4 洛克沙肿对鲫鱼的暴露胁迫试验

以洛克沙肿 0、30 和 45 mg/L(以 As 计)为试验组, 于第 2、5 d 每组随机取 6 尾鱼, 采集脑、鳃和肝脏组织。取约 0.25 g 组织剪碎, 按比例(m/V)加预冷匀浆缓冲液介质(4 °C)制成 25 mg/mL 匀浆液, 3 000 r/min 离心 10 min 后, 取适量上清液进行各种测定或在 -18 °C 保存待测。

1.5 检测内容

1.5.1 组织蛋白含量测定 采用 Folin 酚法^[6], 制备标准曲线方程, 将脑、鳃和肝 25 mg/mL 匀浆液作 1:10 稀释后测定光密度值 D_{λ} , 由标准曲线方程和稀释倍数求出该匀浆液的蛋白含量(mg/mL)。

1.5.2 乳酸脱氢酶(LDH)活力测定 各取脑、鳃和肝匀浆液 20 μ L, 按 LDH 测试盒方法测定。

1.5.3 抗氧化系统指标测定 各取脑、鳃和肝匀浆液适量, 按丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)测

试盒方法测定, 其中对各组织 SOD 指标求出总 SOD、Cu, Zn-SOD 和 Mn-SOD 活力。

1.5.4 谷胱甘肽-S 转移酶(GSH-ST)酶活力测定 各取脑、鳃和肝组织匀浆液 0.1 mL, 按 GSH-ST 测试盒方法测定。

1.6 统计学分析

利用统计学方差分析和 DMRT 法^[7], 比较试验组与对照组间及试验组相互之间差异显著性。

2 结果与分析

2.1 洛克沙肿对鲫鱼的急性毒性试验

鲫鱼急性中毒症状为: 兴奋、浮头、鱼眼混浊发白、呼吸加快、侧卧乏力、昏迷和死亡。各组在 24、48 和 96 h 的死亡数和死亡率见表 1。求得 24 h LC₅₀ 为 181.69 mg/L, 其 95% 可信限为 177.64 ~ 185.84 mg/L; 48 和 96 h LC₅₀ 为 176.57 mg/L, 其 95% 可信限为 172.53 ~ 180.71 mg/L。由 Turabell 公式求得洛克沙肿对鲫鱼安全质量浓度为: 50.03 mg/L。

2.2 洛克沙肿对鲫鱼组织中 LDH 活性影响

从表 2 可见, 鱼脑 LDH 活性在第 2、5 d 时呈极显著下降($P < 0.01$); 而鳃 LDH 活性在第 5 d 时极显著升高($P < 0.01$), 两剂量组间差异不显著($P > 0.05$); 肝 LDH 活性在第 2 d 时各组间无显著性差异, 在第 5 d 时与对照组比较分别表现为显著($P < 0.05$)和极显著下降($P < 0.01$), 呈剂量-效应关系。

2.3 洛克沙肿对鲫鱼组织中 MDA 含量的影响

从表 3 可见, 鱼脑 MDA 含量在第 2 d 时呈极显著升高($P < 0.01$); 鳃 MDA 含量在两剂量组均表现上升但差异不显著($P > 0.05$); 肝 MDA 含量在第 2、5 d 时均呈极显著升高($P < 0.01$), 呈现明显的剂量-效应关系。

表 1 洛克沙肿对鲫鱼的急性毒性试验

Tab. 1 The acute toxicity of roxarsone in carp

ρ (洛克沙肿 roxarsone) /(mg·L ⁻¹)	24 h		48 h		96 h	
	死亡数/总数 death/total	死亡率 mortality / %	死亡数/总数 death/total	死亡率 mortality / %	死亡数/总数 death/total	死亡率 mortality / %
0	0/10	0	0/10	0	0/10	0
148.7	0/10	0	1/10	10	1/10	10
163.6	2/10	20	2/10	20	2/10	20
180.0	4/10	40	5/10	50	5/10	50
198.0	8/10	80	9/10	90	9/10	90
217.8	10/10	100	10/10	100	10/10	100

2.4 洛克沙肿对鲫鱼组织中 SOD 活性的影响

鱼脑 SOD 活性在第 2 d 时, T-SOD、Cu、Zn-SOD 和 Mn-SOD 均表现升高显著 ($P < 0.05$) 或极显著 ($P < 0.01$); 但第 5 d 时高剂量组 T-SOD 和 Cu、Zn-SOD 呈极显著下降 ($P < 0.01$)。低剂量组鱼鳃 T-SOD 和 Cu、Zn-SOD 活性在第 2、5 d 时均表现极显著升高 ($P < 0.01$); 第 5 d 时, 高剂量组 T-SOD 呈极显著降低 ($P < 0.01$)。鱼肝 SOD 活性在第 2 d 时低剂量组 T-SOD 和 Cu、Zn-SOD 表现为极显著升高 ($P < 0.01$), 第 5 d

时高剂量组则均呈极显著降低 ($P < 0.01$)。

2.5 洛克沙肿对鲫鱼组织中 GSH-ST 活性的影响

从表 4 可见, 两试验组鱼脑 GSH-ST 活性在第 2、5 d 时均受到极明显的抑制。鱼鳃 GSH-ST 活性在第 2 d 时, 高剂量组呈显著降低 ($P < 0.05$); 第 5 d 时两试验组 GSH-ST 活性均出现降低。鱼肝 GSH-ST 活性在第 2 d 时, 低、高剂量组分别表现升高和降低, 但差异均不显著 ($P > 0.05$); 第 5 d 时高剂量组呈极显著降低 ($P < 0.01$)。

表 2 洛克沙肿对鲫鱼组织中 LDH 活性的影响¹⁾

Tab. 2 The effects of roxarsone on LDH in carp tissues ($\bar{x} \pm S. E, n = 6$) U/g

器官 organ	第 2 d the second day			第 5 d the fifth day		
	0 mg/L	30 mg/L	45 mg/L	0 mg/L	30 mg/L	45 mg/L
鱼脑 brain	3 919.1 ± 102.0a	2 625.2 ± 87.7b	1 966.0 ± 218.8c	2 675.7 ± 115.7a	2 157.0 ± 92.6b	2 183.4 ± 174.2b
鱼鳃 gill	392.4 ± 15.0a	370.7 ± 15.2a	431.8 ± 28.0a	354.1 ± 26.2a	473.5 ± 9.8b	538.8 ± 33.4b
鱼肝 liver	286.9 ± 14.8a	249.8 ± 18.2a	280.1 ± 4.9a	262.1 ± 10.8a	207.4 ± 21.2b	195.2 ± 16.8b

1) 表中同行数据后相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

表 3 洛克沙肿对鲫鱼组织中 MDA 含量的影响¹⁾

Tab. 3 The effects of roxarsone on MDA in carp tissues ($\bar{x} \pm S. E, n = 6$) nmol/mg

器官 organ	第 2 d the second day			第 5 d the fifth day		
	0 mg/L	30 mg/L	45 mg/L	0 mg/L	30 mg/L	45 mg/L
鱼脑 brain	6.42 ± 0.29a	9.04 ± 0.40b	9.45 ± 0.42b	6.62 ± 0.12a	7.48 ± 0.56a	8.20 ± 0.52b
鱼鳃 gill	8.30 ± 0.34a	9.59 ± 0.92a	8.60 ± 0.18a	7.11 ± 0.26a	7.52 ± 0.66a	8.04 ± 0.26b
鱼肝 liver	3.65 ± 0.10a	5.00 ± 0.32b	6.86 ± 0.35b	4.25 ± 0.16a	6.90 ± 0.28b	8.79 ± 0.29b

1) 表中同行数据后相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

表 4 洛克沙肿对鲫鱼组织中 GSH-ST 活性的影响¹⁾

Tab. 4 The effects of roxarsone on GSH-ST in carp tissues ($\bar{x} \pm S. E, n = 6$) U/mg

器官 organ	第 2 d the second day			第 5 d the fifth day		
	0 mg/L	30 mg/L	45 mg/L	0 mg/L	30 mg/L	45 mg/L
鱼脑 brain	21.27 ± 1.52a	-14.00 ± 8.29b	-12.19 ± 9.47b	20.85 ± 3.48a	-11.60 ± 7.76b	-18.07 ± 8.57b
鱼鳃 gill	37.54 ± 1.67a	41.49 ± 2.86a	28.74 ± 3.15b	38.49 ± 1.53a	36.00 ± 5.29a	20.54 ± 2.16b
鱼肝 liver	87.77 ± 5.91a	92.07 ± 3.84a	81.71 ± 2.82a	69.13 ± 3.94a	60.36 ± 2.53a	29.81 ± 1.44b

1) 表中同行数据后相同字母表示差异不显著 ($P > 0.05$), 不同字母表示差异显著 ($P < 0.05$)

3 讨论

毒性试验是水体污染的生物检测类型之一, 由受试生物的中毒反应可确定或评价毒物的毒性^[8]。本试验中 24 h 时毒性稍强, 48 和 96 h LC_{50} 维持同一水平, 表明洛克沙肿的毒性时间效应不明显。按有关水环境化学危害物分级标准 (OECD, 1998), 鲫鱼 96 h LC_{50} 为 176.57 mg/L, 以 As 计则为 48.44 mg/L, 可表述为洛克沙肿源性砷在水生态系统中属急性 III 化学物质。

有关砷对 LDH 活性影响报道不一, 接触砷大量

蓄积可与 LDH 巯基结合而使其活性降低^[9]。本试验中鱼脑 LDH 活性呈极显著降低, 而肝 LDH 活性仅在后期表现降低。鱼鳃 LDH 活性初期无变化, 但后期表现极显著升高, 可认为洛克沙肿可能对鱼鳃 LDH 具有刺激诱导作用。鱼脑 LDH 活性的显著抑制可作為鲫鱼洛克沙肿暴露的敏感指标之一。

近年来, 抗氧化系统脂质过氧化学说在阐述砷毒作用机理上已引起关注。鲫鱼各组织 MDA 含量均呈现不同程度的升高, 提示洛克沙肿暴露可引起抗氧化系统的损害, 其中鱼肝脏氧化损伤最明显, 呈现剂量-效应关系, 这与无机砷对小鼠肝脏氧化损伤结

果相一致^[10]。SOD 为一种含二硫键的金属抗氧化酶,存在 Cu, Zn-SOD 和 Mn-SOD, 均能催化活性强的超氧阴离子成为 H₂O₂。鲫鱼脑、鳃和肝 SOD 活性在初期可能产生代偿性作用以增强对机体氧自由基的清除,后期可能由于破坏 SOD 二硫键而表现为显著抑制。

GSH-ST 是一类具有消除过氧化物和解毒双重功能酶。本试验中鱼脑 GSH-ST 受到极显著抑制,而鱼鳃和肝脏 GSH-ST 在初期活性反而增强,可能仅为暂时性代偿作用。结果表明鱼脑 GSH-ST 活性变化为一级敏感指标。

洛克沙肿对鲫鱼巯基酶和抗氧化功能的明显抑制作用,尤其在脑和肝组织中的抑制作用出现早,预示可为水体砷污染的生物监测的建立提供依据。

参考文献:

- [1] RICE D A, KENNEDY S, McMURRAY C H. Experimental 3-nitro-4-hydroxyphenylarsonic acid toxicosis in pigs[J]. Research in Veterinary Science, 1985, 39:47-51.
- [2] JACKSON B P, BERTSCH P M, SEAMAN J C. Determination of arsenic speciation in poultry wastes by IC-ICP-MS[J]. Environmental Science and Technology, 2001, 35(24): 4 868-4 873.
- [3] 南京大学环境科学系环境生物学教研室. 环境生物学实验技术和方法[M]. 南京:南京大学出版社, 1989. 54-68.
- [4] 刘毓谷. 卫生毒理学基础[M]. 第2版. 北京:人民卫生出版社, 1999. 66-76, 78-80.
- [5] 黎祖福, 王洪涛, 柳连平. 鱼苗对几种鱼病的毒性反应[J]. 水产科学, 1989, 8(2):18-21.
- [6] LOWRY O H. Protein measurement with the folin phenol reagent[J]. J Biol Chem, 1951, 193:265.
- [7] 杨茂成. 兽医统计学[M]. 北京:中国展望出版社, 1990. 63-93.
- [8] 黄先玉, 刘沛然. 水体污染生物检测的研究进展[J]. 环境生物进展, 1999, 7(4):14-18.
- [9] 陆春伟, 李富君, 孙贵范, 等. 地砷病患者部分生化指标的测定[J]. 中国公共卫生, 1999, 15(8):741-742.
- [10] 李富君, 孙贵范, 陆春伟, 等. 砷对小鼠肝脏氧化损伤的实验研究[J]. 工业卫生与职业病, 1999, 25(3):145-148.

【责任编辑 柴 焰】