

丙线磷对中华大蟾蜍早期胚胎发育的影响

侯立静, 杨晓梅, 马 跃, 翟玉梅

(山东大学生命学院, 山东 济南 250100)

摘 要:用 3 种不同浓度的丙线磷分别处理中华大蟾蜍的处于受精卵、8-细胞、囊胚晚期、原肠晚期 4 个不同时期的早期胚胎 5 h。结果发现,丙线磷对中华大蟾蜍的早期胚胎发育有致死致畸效应,各个时期其发育异常比例随丙线磷浓度的增加而升高,在其发育过程中出现了两种异常类型:原肠外突和畸形神经胚,并且各个时期对丙线磷的敏感性不同,其中原肠晚期的胚胎对丙线磷最为敏感,同等浓度下,发育异常比例最高,这与原肠晚期胚胎的发育特点有关。

关键词:丙线磷; 中华大蟾蜍; 胚胎发育; 原肠外突; 畸形

中图分类号:X503.22 **文献标识码:**A **文章编号:**1672-2043(2005)04-0682-04

Effects of Ethoprophos on Early-stage Embryonic Development of Bufo bufo gargarizans

HOU Li-jing, YANG Xiao-mei, MA Yue, ZHAI Yu-mei

(School of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

Abstract: Early embryos of Bufo bufo gargarizans at four different development stages, fertilized eggs, 8-cell stage, late blastula stage and late gastrula stage, were treated separately with different concentrations of ethoprophos, 0.01 mg·mL⁻¹, 0.05 mg·mL⁻¹ and 0.10 mg·mL⁻¹ to research the development of the embryos. After treating 5 h, the embryos were removed into water for further culture. While, the control embryos were cultured in water all the time. The results showed that the abnormal ratios of embryos were related with the concentration of ethoprophos. When treated with 0.01 mg·mL⁻¹, 0.05 mg·mL⁻¹ and 0.10 mg·mL⁻¹ ethoprophos, the abnormal ratios of embryos were 7.69%, 14.40% and 11.27%, respectively, at fertilized eggs stage, being 7.69%, 14.89%, and 26.50% at 8-cell stage, being 4.12%, 16.88% and 19.01% at late blastula stage, being 5.19%, 25.04% and 31.94% at late gastrula stage. Ethoprophos could make the embryos exogastrulate or die and lead to deformed neurula which could grow into deformed tadpoles. There were seven forms of deformed tadpoles: the head crewcutted and the head like a gourd, the tale too short or curved, the stomach full of abdominal fluid, the shape very irregular and the body like a bird. The embryos at different stages showed different sensitivity to ethoprophos. The abnormal ratio of embryos was highest at the late gastrula stage compared with other stages when the embryos treated with 0.05 mg·mL⁻¹ and 0.10 mg·mL⁻¹ of ethoprophos. The late gastrula period was the most sensitive stage, which may be related with the development characters of embryo. Ethoprophos possessed distinct deformative and lethal effects on early-stage embryonic development of Bufo bufo gargarizans.

Keywords: ethoprophos; Bufo bufo gargarizans; embryonic development; exogastrula; teratosis

丙线磷(Ethoprophos)是一种非内吸性的有机磷酯杀虫剂,作用特点为触杀,无熏蒸和内吸作用。目前主要用来防治短体线虫等多种根结线虫,并对地下害虫中鳞翅目、鞘翅目的幼虫和直翅目、膜翅目的一些种类有效,适用于各种经济作物和观赏植物,已在许多国家几十种农作物上使用。在我国也大量生产和广泛使用,并获得了相当好的杀虫效果^[1,2]。但有机磷

农药有相对较长的半衰期,而且对相当多的非靶生物及人类都有一定的负面影响,其潜在的遗传毒性和长期效应日益受到重视。据报道我国使用的杀虫剂中 70 %以上是有机磷农药,其残留已给环境和人们的健康带来了不可估量的危害。农药残留通过食物链作用在生物体内累积而引起的致畸、致癌、致突变危害,也已引起了人们的广泛关注。在渔业生产中也常用有机磷农药剂来杀灭体外寄生虫等敌害生物。在其生产和使用过程中,大量成分复杂的有毒废水进入水环境,对水生生物造成危害,破坏水域生态环境。近十年来

收稿日期:2004-10-05

作者简介:侯立静(1981—),女,山东大学生命学院硕士研究生。

联系人:杨晓梅,E-mail:yxm411@sdu.edu.cn

近岸水域受有机磷农药的污染不断导致了大批的鱼虾贝死亡事故。有机磷废水已开始成为人们普遍关注的污染物之一^[3,4]。

当前各污染水体中两栖类动物种群有逐年减少的趋势。丙线磷可长期残留于土壤中,并随降水等进入各种水体,在一定的浓度范围内,引起水体中生物发育异常,特别是一些无脊椎动物(如软体动物等)和脊椎动物(如鱼类和两栖类动物等)。有机磷农药对水生生物影响的研究已有大量报道,但还未见有对两栖动物类研究方面的报道,因此本文主要研究了有机磷类农药丙线磷对中华大蟾蜍早期胚胎发育的影响,这为改善农药的施用,保护两栖动物类,维护生态平衡提供了理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

实验用中华大蟾蜍(*Bufo bufo gargarizans*)取自山东济南郊区,早期胚胎为自然产出卵,或注射 LRH-A (促黄体素释放激素类似物)催情获得的受精卵。

1.2 药品

某公司提供的丙线磷原药,其对雌雄性大鼠经口 LD₅₀ 为 92.6 mg·kg⁻¹,经皮 LD₅₀ 为 681 mg·kg⁻¹。原药浓度为 10 mg·mL⁻¹,用自来水将其稀释为 0.01、0.05、0.10 mg·mL⁻¹ 3 种浓度的溶液待用。

1.3 方法

中华大蟾蜍的胚胎在室温下用曝气后的自来水培养于 90 mL 培养皿中,每个培养皿中放置 100~200 个胚胎。对处于受精卵、8-细胞、囊胚晚期、原肠晚期等 4 个不同时期的胚胎进行药物处理,每个实验组选取 450~650 个胚胎,分别用 0.01、0.05、0.10 mg·mL⁻¹

的丙线磷药液各 150 mL 处理 5 h。然后用曝气后的自来水清洗 4~5 次,最终置于曝气后的自来水中在室温下继续培养,每天换水 2 次。对照组改用曝气后的自来水处理。观察中华大蟾蜍胚胎发育情况,记录并拍照。

2 结果

2.1 经丙线磷处理的受精卵发育情况

从表 1 的数据可以看出,在经丙线磷处理的受精卵发育过程中胚胎出现的异常比例:0.05 mg·mL⁻¹ 时为 14.40%, 0.10 mg·mL⁻¹ 时为 11.27%, 与对照组 3.27% 相比有显著性差异。研究中还发现经丙线磷处理的受精卵发育较对照组缓慢,在发育早期可观察到明显的比对照组迟缓一个发育时期,即实验组胚胎发育到原肠早期,对照组已发育到原肠中期。在经丙线磷处理的 8-细胞时期胚胎、囊胚晚期胚胎和原肠晚期胚胎发育过程中也观察到比对照组发育迟缓的现象。这与杨晓梅等^[5]用乙草胺处理中华大蟾蜍早期胚胎得到的结果相似。

2.2 经丙线磷处理的 8-细胞时期胚胎的发育情况

从表 2 的数据可看出,随着丙线磷浓度的增加,经丙线磷处理的 8-细胞时期胚胎发育异常发育比例在 7.69%~26.50% 范围变化。0.10 mg·mL⁻¹ 浓度组发育异常比例 26.50% 与对照组 3.27% 相比差异非常显著,且明显高于 0.10 mg·mL⁻¹ 丙线磷处理的受精卵发育异常比例 11.27%。由此可见,8-细胞胚胎对丙线磷敏感程度明显高于受精卵。此期丙线磷浓度为 0.05 mg·mL⁻¹ 时发育异常比例为 14.89%, 与 0.10 mg·mL⁻¹ 的丙线磷相比对中华大蟾蜍胚胎的毒性有显著差异。

表 1 经丙线磷处理的受精卵发育结果

Table 1 Development results of fertilized ovum treated with ethoprophos

丙线磷浓度/mg·mL ⁻¹	处理胚胎总数	原肠外突	神经胚畸形	发育异常胚胎数(比例/%)	发育正常胚胎数(比例/%)
0	672	12	10	22(3.27)	650(96.73)
0.01	546	15	27	42(7.69)	504(92.31)
0.05	521	9	66	75(14.40)	446(85.60)
0.10	497	18	38	56(11.27)	441(88.73)

表 2 经丙线磷处理的 8-细胞胚胎的发育结果

Table 2 Development results of 8-cell embryo treated whit ethoprophos

丙线磷浓度/mg·mL ⁻¹	处理胚胎总数	原肠外突	神经胚畸形	发育异常胚胎数(比例/%)	发育正常胚胎数(比例/%)
0	672	12	10	22(3.27)	650(96.73)
0.01	546	18	24	42(7.69)	504(92.31)
0.05	611	35	56	91(14.89)	520(85.11)
0.10	468	45	79	124(26.50)	344(73.50)

2.3 经丙线磷处理的囊胚晚期胚胎的发育情况

这一时期胚胎经丙线磷处理后,随着丙线磷浓度的增加,发育异常比例呈上升趋势,分别为 4.12%、16.88% 和 19.01%。0.10 mg·mL⁻¹ 浓度组异常比例相对 8-细胞时期同种情况下有所降低,但仍较受精卵期高。在这一时期 0.05、0.10 mg·mL⁻¹ 两种浓度丙线磷对中华大蟾蜍胚胎的毒性差异并不大。见表 3。

表 3 经丙线磷处理的囊胚晚期胚胎的发育情况

Table 3 Development results of late blastula embryo treated whit ethoprophos

丙线磷浓度/mg·ml ⁻¹	处理胚胎总数	原肠外突	神经胚畸形	发育异常胚胎/%	发育正常胚胎/%
0	672	12	10	22(3.27)	650(96.73)
0.01	558	5	18	23(4.12)	535(95.88)
0.05	545	20	72	92(16.88)	435(83.12)
0.10	631	51	69	120(19.01)	411(80.99)

表 4 经丙线磷处理的原肠晚期胚胎的发育结果

Table 4 Development results of late gastrula embryo treated whit ethoprophos

丙线磷浓度/mg·ml ⁻¹	处理胚胎总数	发育停于原肠期	神经胚畸形	发育异常胚胎/%	发育正常胚胎/%
0	672	12	10	22(3.27)	650(96.73)
0.01	482	5	20	25(5.19)	357(94.91)
0.05	567	34	108	142(25.04)	415(74.96)
0.10	504	54	107	128(31.94)	376(68.06)

经丙线磷处理后,各个时期胚胎发育异常情况基本一样。主要包括两种情况:一是胚胎发育停于原肠胚,在受精卵、8-细胞期、囊胚晚期表现为产生原肠外突。原肠外突是由于原肠作用异常致使植物极细胞反包动物极细胞,内部物质经不正常的胚孔突出造成的;另一种情况是产生畸形胚胎,胚胎畸形在神经胚阶段开始表现出来,畸形神经胚可继续发育成各种畸形蝌蚪,但不能经变态发育形成蟾蜍。畸形胚胎与正常胚胎在形态上有很大的差异,例如胚胎外形呈小头、短尾、胚体弯曲的及腹水等。根据畸形胚胎的外形可分为以下几类:(1) 头部畸形,头部顶端呈平切状

2.4 经丙线磷处理的原肠晚期胚胎的发育情况

原肠晚期胚胎对丙线磷的影响又变得相对敏感,其敏感程度高于其他 3 个时期。0.10、0.05 mg·mL⁻¹ 丙线磷处理的胚胎都产生了较高比例的原肠外突和畸形神经胚,发育异常比例分别为 25.04% 和 31.94%,与对照组相比有极显著差异。见表 4。

2.5 经丙线磷处理后各时期胚胎所产生的畸胎类型

(图 1a),头部的中间即眼睛后有环状的缢痕使头部呈葫芦状(图 1b);(2)尾部畸形,尾部向左或向右弯曲(图 1c),尾部短小(图 1d);(3)腹部有积水(图 1e);(4)体形不规则(图 1f);(5)身体呈小鸟状(图 1g)。

3 讨论

丙线磷是一种触杀性有机磷农药,含磷酸酯结构,其中毒机制主要是抑制乙酰胆碱酯酶(AChE),使其失去水解乙酰胆碱(ACh)的能力,造成胆碱能神经末梢释放的 ACh 大量蓄积,从而影响神经系统的正常

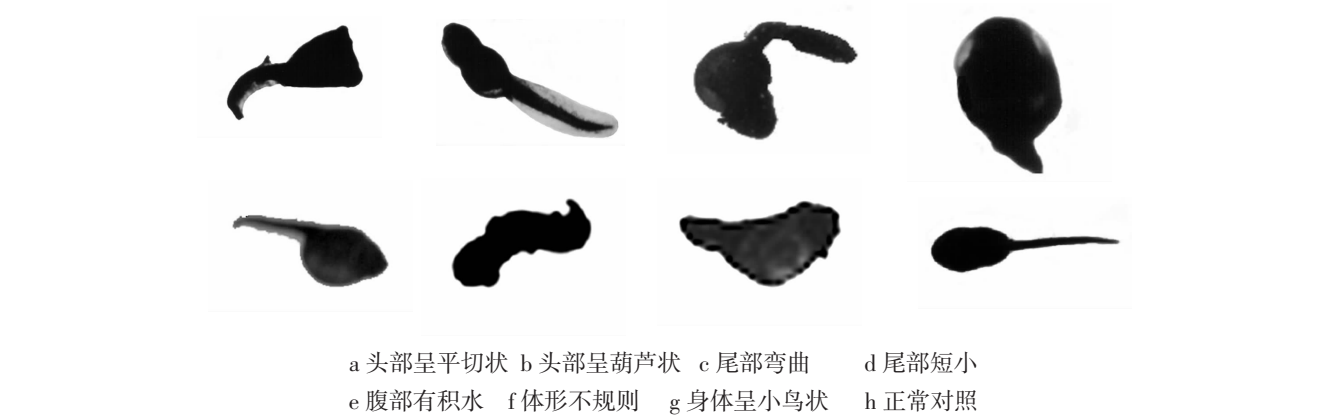


图 1 经丙线磷处理后的中华大蟾蜍早期胚胎产生的畸胎类型

Figure 1 The teratosis forms of Bufo bufo gargarizans treated with ethoprophos

活动。有研究表明,AChE 很可能是一种能分泌到胞外调控细胞增殖与轴突生长的蛋白酶。目前认为,AChE 在神经系统及肌肉组织的发育过程中起着重要作用,在神经系统发育关键时期抑制 AChE 活性,会影响细胞生长、分化和脑的正常功能^[6]。

另外,有机磷农药可导致直接以 DNA 为靶的损伤。孙运光报道^[7],有研究证实有机磷农药在代谢过程中产生的亲电物可以通过攻击染色体 DNA 上的亲核位点与染色体作用,使 DNA 受到损伤或发生断裂。

研究结果显示,丙线磷对中华大蟾蜍早期胚胎的致死致畸效应主要有两种,一是产生原肠外突,使胚胎停止发育;一是产生畸形神经胚,可继续发育而形成畸形蝌蚪。这与丙线磷的作用机理息息相关。原肠作用是动物胚胎发生中一个非常重要的时期,囊胚晚期各种细胞经过复杂的形态发生活动,由外部按一定的时空顺序进入胚胎内部并分布到相应的部位,形成三胚层的胚胎,为器官的形成奠定基础^[8]。本实验证明,由于丙线磷干扰了 DNA 致使这一发育过程中所需的某些特异性的蛋白质或酶无法合成,从而导致原肠作用紊乱,致使植物极细胞反包动物极细胞,内部物质经过不正常的胚孔突露出来,形成似菜花的各种形状,胚胎停止发育。畸形神经胚的形成主要有两个原因:一是丙线磷抑制了乙酰胆碱酯酶活性,造成神经肌肉系统发育不正常;二是阻断了从原肠晚期到神经胚期这一过渡阶段及神经胚期阶段某些特异性蛋白质或酶的合成。

从以上经丙线磷处理的几个时期胚胎的发育情况可以看出,丙线磷对中华大蟾蜍早期胚胎发育有着明显的致畸致死效应,影响程度与丙线磷浓度呈正相关,并随着胚胎发育时期的变化而不同。在所选取的4个时期中,同等浓度下受精卵时期对丙线磷的敏感性相对较低,其次为囊胚晚期、8-细胞期,原肠晚期最为敏感。

在受精卵时期,各浓度丙线磷对中华大蟾蜍胚胎的发育异常比例均低于15%。异常比例低的可能原因在于:(1)受精卵有外胶膜保护,丙线磷若作用于受精卵有一个缓慢的渗透过程;(2)卵裂期指导蛋白质合成的 mRNA 来源于卵母细胞贮存的信息,属卵源性 mRNA,胚胎基因组尚未表达。卵裂期没有旺盛的 DNA 转录活动, DNA 处于伸展状态的时间相对较短,因此受药物影响的程度也相对较低^[5]。

受精卵时期用 $0.05 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 丙线磷处理 2 h 后,就明显观察到胚胎外包的胶膜由清亮变为灰暗不透

明,这也证明了丙线磷为一种触杀性农药。

8-细胞时期和囊胚晚期胚胎经丙线磷处理后,产生大量的神经胚畸形。8-细胞时期仍属于卵裂期,胚胎表达的仍是卵源性 mRNA,但随着胚胎的发育,胶膜的保护作用逐渐消失,故丙线磷对 8-细胞时期胚胎的致死致畸效应强于受精卵时期。在两栖类,囊胚期胚胎基因组开始表达, DNA 开始活动,但这一时期胚胎顶壁形成 2~4 层细胞,又由于内部原肠作用的开始,而对外部的环境相对不是非常敏感。

从分析的结果可以看出,中华大蟾蜍早期胚胎对丙线磷最敏感时期是原肠晚期,主要表现为产生大量的畸形胚胎。可能的原因是由于原肠胚期主要是为构建内部的器官作准备,胚胎除了单纯的细胞分裂和外形的改变之外,在原肠形成之后胚胎的发育需要大量的特异蛋白质,而蛋白质的合成需要大量酶的作用。这些酶有可能为丙线磷提供较多的靶位点。这一时期,胚胎的基因组活跃表达, DNA 活动旺盛,处于伸展状态的 DNA 多且伸展时间长,丙线磷造成大量 DNA 损伤。另外,此时神经系统正处于发育阶段,乙酰胆碱酯酶已在胚胎内部具有非常重要的作用,而丙线磷恰恰抑制了乙酰胆碱酯酶的活性。

本研究表明,丙线磷对中华大蟾蜍早期胚胎发育有明显的致畸致死效应。所以,限制农药的适用范围,规范农药的使用方法,对于保护野生动物,维持生态平衡以及药物对蛙的胚胎发育、变态的影响等理论研究将有积极意义。

参考文献:

- [1] 陈万义.农药生产与合成[M].北京:化学工业出版社,2000.44-55.
- [2] 王奎堂,徐汉虹,张毅宁.农药丙线磷的合成[J].华中农业大学学报,2000,19(4):339-341.
- [3] 王振中,张友梅,李忠武,等.有机磷农药对土壤动物毒性的影响研究[J].应用生态学报,2002,13(12):1663-1666.
- [4] 杨先乐,湛嘉,黄艳平.有机磷农药对水生生物毒性影响的研究进展[J].上海水产大学学报,2002,11(4):378-382.
- [5] 杨晓梅,谭志军,苑怡,等.乙草胺对中华大蟾蜍(*Bufo bufo gar-garizans*)早期胚胎发育的影响[J].动物学报,2001,47(专刊):125-130.
- [6] 李涛.国外有机磷农药神经发育毒性研究[J].国外医学卫生学分册,2001,28(5):257-260.
- [7] 孙运光.有机磷农药的遗传毒性研究[J].国外医学卫生学分册,2000,27(6):349-352.
- [8] 张红卫,王子仁,张士瑾,等.发育生物学[M].北京:高等教育出版社,2001.71-78.