

赤子爱胜蚓对氯氰菊酯暴露的生态毒性响应

开建荣^{1,2}, 宋玉芳^{1*}, 曹秀凤^{1,2}, 杨晓霞^{1,2}, 殷永超^{1,2}, 陈 朗^{1,2}

(1.中国科学院沈阳应用生态研究所 污染生态与环境工程重点实验室, 沈阳 110016; 2.中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要:以赤子爱胜蚓为供试生物,采用滤纸接触法及土壤培养法,通过急性毒性、生长毒性、再生繁殖毒性试验及 CYP3A4 酶活性毒性响应试验,进行了在不同生态响应水平上氯氰菊酯胁迫对蚯蚓的毒性效应研究,初步确定了急性毒性、生长繁殖和细胞酶活力指标的敏感性。结果表明:滤纸试验中氯氰菊酯对蚯蚓的 48 h LC₅₀ 和 72 h LC₅₀ 分别为 445.4、212.1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$,土壤试验中 7 d LC₅₀ 和 14 d LC₅₀ 分别为 121.6、80.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$;再生繁殖试验中低剂量氯氰菊酯刺激蚯蚓体重增长、短期内诱导蚯蚓产茧率,抑制蚯蚓幼体孵育。CYP3A4 酶活性毒性响应滤纸试验中氯氰菊酯对蚯蚓的 CYP3A4 酶活性产生明显诱导的浓度为 21.5 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$,在 214.8 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ 产生明显的抑制作用;土壤试验中 3 d 暴露后,10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 氯氰菊酯诱导蚯蚓体内 CYP3A4 活性显著升高,随着暴露时间延长,氯氰菊酯对 CYP3A4 活性的诱导作用始终存在,但诱导的高值浓度随暴露时间的延长而降低,CYP3A4 酶活力与土壤中氯氰菊酯浓度之间呈现明显的倒 U 型量-效响应曲线。研究表明,各指标敏感性表现为细胞酶活力>生长繁殖>急性毒性,同时也证明了 CYP3A4 可以作为土壤拟除虫菊酯风险评价的潜在敏感生物标记物。

关键词:蚯蚓;拟除虫菊酯;生态毒性;CYP3A4;内分泌干扰物

中图分类号:X503.223 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)02-0224-08 doi:10.11654/jaes.2013.02.003

Ecotoxic Responses of Earthworm *Eisenia fetida* Exposed to Cypermethrin

KAI Jian-rong^{1,2}, SONG Yu-fang^{1*}, CAO Xiu-feng^{1,2}, YANG Xiao-xia^{1,2}, YIN Yong-chao^{1,2}, CHEN Lang^{1,2}

(1.Key Laboratory of Pollution Ecology and Environmental Engineering, Institute of Applied Ecology, Chinese Academy of Sciences, Shenyang 110016, China; 2.Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract:Pyrethroid is widely used around the world, and contributed greatly to the agricultural development. But a large portion of pyrethroid used in agriculture ends up as residuals in the soil, making soil-dwelling organisms more vulnerable to pesticide intoxication. Earthworm is one of the most common soil organisms in most environments, and plays an important role in the functioning of soil ecosystems. The analyzing of P450 enzyme activity in earthworm is a newly developed practice for soil pollution risk assessment. The toxicology of cypermethrin on the earthworm *Eisenia fetida* was evaluated by measurements of the acute response, growth, reproduction and CYP3A4 activity of the earthworm incubated on filter paper and in soil. The acute response test showed that 48 h-LC₅₀ and 72 h-LC₅₀ by the filter paper contact-ing method were 445.5 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ and 212.1 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$, respectively, and 7 d-LC₅₀ and 14 d-LC₅₀ by the soil incubation method were 121.6 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 80.2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, respectively. A low dose of cypermethrin induced the growth of the earthworm and the cocoon production in short time but restrained the incubation of juveniles. The CYP3A4 activity of the earthworm on filter paper was induced by cypermethrin at 21.5 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$ and inhibited at 214.8 $\text{ng}\cdot\text{cm}^{-2}$. A 3-day exposure of cypermethrin at 10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ significantly induced the CYP3A4 activity of the earthworm in the soil, and the inducing effect remained but tended to be weaker with the prolonging of the exposure time. The low toxicity of cypermethrin on the earthworm was revealed by the LC₅₀, growth rate and cocoon production rate, with the sensitivity being in an order of enzymatic activity>growth and reproduction indicator>acute toxicity. However, the significant inverse U type dose-response relationship observed between the CYP3A4 activity and the concentration of cypermethrin reflected its endocrine disruption effect on the earthworm. This experiment also demonstrated CYP3A4 could be used as a potential biomarker to assess the ecological risk of pyrethroid pollution in soil.

Keywords: earthworm; pyrethroid; ecotoxicity; CYP3A4; EDCs

收稿日期:2012-09-15

基金项目:国家自然科学基金项目(20977094,40930739);国家科技支撑计划项目(2012BAD14B02-2)

作者简介:开建荣(1988—),女,硕士研究生,主要研究方向为土壤生态毒理学。E-mail:kaijianrong6688@163.com

* 通信作者:宋玉芳 E-mail:songyufang@iae.ac.cn

近年来,环境中发现了大量的具有内分泌干扰作用的合成化学品环境内分泌干扰物 EDCs (Environmental Endocrine Disruptors, EDCs), 它们多以低剂量长期暴露于环境中,显示了剂量小危害大的毒性特征^[1-2]。EDCs 对人类健康和生态系统的危害已经引起国际上日益广泛的关注^[3]。

拟除虫菊酯农药是土壤中普遍残留的典型内分泌干扰物^[4-5]。尽管早在 1998 年氯氰菊酯、氯菊酯和氰戊菊酯等农药就已被美国 EPA 列环境内分泌干扰物黑名单^[6],但在地表水和溪流河床底泥中,拟除虫菊酯类农药的检出率仍可达到约 40%^[7-9],在我国菜地土壤中拟除虫菊酯类农药检出率可达到 60%^[10-11]。目前,对拟除虫菊酯的毒性效应研究已有诸多报道,但是涉及到土壤中的生态毒理研究甚少^[12-13],土壤中较低浓度拟除虫菊酯的内分泌干扰毒性因缺乏对指示“毒性效应”有效的实验终点,很难做出准确的生态与健康风险评价^[1-2]。

环境中某些污染物可诱导或抑制 CYP (Cytochrome P450, 细胞色素 P450), 导致酶活性发生变化, 影响其自身和其他物质的代谢。CYP3A4 是 CYP450 中最重要的亚酶之一,它参与了大约 38 个类别共 150 多种药物(约占全部药物 50%)的代谢^[14],尤其对内分泌干扰物具有特殊的指示作用^[15-17]。有研究表明^[18],氯氰菊酯对雌、雄鼠 CYP3A 活力的影响具有器官特异性,增高部分器官 CYP3A 的活力,预示可能导致过量的活性氧损伤 DNA。因此,CYP3A4 活力可以作为土壤中内分泌干扰物毒性诊断的潜在敏感生物标记物。分布广泛、含量如此丰富的一种 CYP 酶,准确地评价其与污染物之间的响应关系将对环境污染的生态毒理研究具有重要的意义。

本实验以赤子爱胜蚓为供试生物,采用滤纸接触法和土壤培养法,进行了拟除虫菊酯诱导下的急性毒性、生长毒性和再生繁殖毒性试验及 CYP3A4 酶活性毒性响应实验。研究旨在通过不同生态响应水平上的系列指标与拟除虫菊酯类的毒性响应关系,初步确定指标敏感性、响应周期与拟除虫菊酯类毒性之间的量-效关系,确定 CYP3A4 是否具有更加敏感的内分

泌干扰毒性指示作用,为土壤污染生态毒理研究提供新方法和科学依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

化学试剂:NADPH、葡萄糖-6-磷酸、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、睾酮、6 β -羟基睾酮、牛血清蛋白,考马斯亮蓝,均购自 Sigma 公司,纯度不低于 99%。丙酮、磷酸二氢钾、磷酸氢二钾等购自沈阳市化工厂。氯氰菊酯原药购自南京盼丰化工有限公司,纯度为 95%。实验所用动物为赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*),购自沈阳农业大学,选用 2~3 月龄,体重 200~500 mg,带有环带的健康成蚓供试,实验前蚯蚓置于干净土壤中预培养 7 d 以适应供试土壤环境。

供试土壤:草甸棕壤,采自中国科学院沈阳应用生态试验站表层(0~20 cm)的清洁土壤,土壤最大持水量(WHC)为 32%,机械组成:砂土(>50 μm)22%、壤土(1~50 μm)64%、粘土(<1 μm)14%,土样采集后手动去掉植物,室温条件下风干,研磨过 20 目筛后备用,土壤其他理化性质详见表 1。

1.2 仪器及试验条件

低温超速离心机(日立 CP-80MX),光照培养箱(哈东联 HPG-280BX),紫外分光光度计(岛津 UV-255),HPLC(Waters 2695)等。

1.3 蚯蚓培养

1.3.1 急性毒性、生长毒性和再生繁殖毒性试验

滤纸试验按 OECD^[19]指南进行,在正式试验之前,先进行较大范围浓度(0.1、1、10、100、1000、10 000 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$)的预实验。根据预实验结果,正式试验浓度设置为 1 976.6、988.3、494.2、247.1、123.5、61.8、30.9 $\mu\text{g}\cdot\text{cm}^{-2}$ 。向底部($d=2.4\text{ cm}$)及侧壁(15 cm $\times$ 5 cm)分别铺有滤纸的烧杯中均匀滴加 2 mL 氯氰菊酯丙酮溶液,将染毒后的烧杯置于通风橱中过夜使丙酮完全挥发后将 2 mL 去离子水均匀地滴加在滤纸上,再将 1 条经 24 h 空肠的蚯蚓用去离子水冲洗干净并用滤纸擦干其体表水分后放入烧杯中。烧杯用扎有针孔的塑料膜封口后置于(20 $\pm$ 2) $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中避光培养,每个处

表 1 供试土壤的理化性质

Table 1 Physical and chemical properties of test soil

土壤类型	有机质/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全氮/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	全磷/ $\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	阳离子交换量/ $\text{cmol}\cdot\text{kg}^{-1}$	总氯氰菊酯/ $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$	pH
草甸棕壤	17.15	1.61	0.28	12.3	ND	6.20

ND:未检出。

理10个平行,以丙酮处理做空白对照。定期观察并记录蚯蚓的病理症状及行为,当刺激蚯蚓尾部无反应时确认蚯蚓已死亡,记录48、72 h 蚯蚓死亡率。

土壤试验按 OECD^[19]指南进行,在正式试验之前,先进行较大范围浓度(50、100、200 mg·kg⁻¹)的预实验。根据预实验结果,土壤中氯氰菊酯浓度设置为30、60、90、120、150 mg·kg⁻¹。将配制好的氯氰菊酯丙酮溶液慢慢撒入500 g 干净土样中搅拌均匀,将土样置于通风橱中反复慢抽风过夜使丙酮完全挥发,平衡2 d后,向各处理组的容器中加入10条经24 h 空肠处理的蚯蚓,调节土壤水分含量为土壤最大持水量的60%,于(20±2)℃恒温培养箱中培养14 d,每个处理3个平行。实验期间适当补充水分不添加牛粪。定期观察并记录蚯蚓的病理症状及行为,当刺激蚯蚓尾部无反应时确认蚯蚓已死亡,记录7 d 和14 d 蚯蚓死亡数,计算LC₅₀(Lethal Concentration 50,半致死浓度)。同时以丙酮处理作为空白对照,实验步骤同上。

根据土壤急性毒性实验结果及氯氰菊酯在环境中存在的低浓度的现状,生长繁殖试验中氯氰菊酯浓度设置为0.5、1、5、10、20、30 mg·kg⁻¹,染毒过程如土壤急性毒性试验。试验期间适当补充水分并添加牛粪(每周按每条蚯蚓0.5 g 的标准添加)。试验开始前及暴露6周后记录蚯蚓重量。暴露4周、6周后手动分离蚯蚓茧及蚯蚓幼体并记录其数目。同时以丙酮处理作为空白对照,实验步骤同上。

1.3.2 蚯蚓 CYP3A4 活性对氯氰菊酯毒性响应的动态试验

根据滤纸急性毒性及土壤急性毒性试验结果,滤纸接触试验中,氯氰菊酯投加浓度设置为2.1、21.5、107.4、214.8、644.5 ng·cm⁻²,实验步骤和方法同1.3.1中的滤纸实验。每个处理10个平行。于(20±2)℃培养箱中培养48 h 后,按照张薇等^[20]的方法,解剖提取蛋白。同时以丙酮处理做空白对照。

根据土壤急性毒性试验结果,土壤接触试验中氯氰菊酯浓度设置为0.5、1、5、10、20、30 mg·kg⁻¹,染毒过程、养分及土壤水分管理同1.3.1中的土壤实验。于试验暴露期的3、7、10、14、21、28 d 分别取蚯蚓,将挑选的蚯蚓转移到事先放有润湿滤纸的烧杯中,继续于20℃下培养24 h 空肠,按照张薇等^[20]的方法,解剖蚯蚓提取制备蚯蚓微粒体蛋白。每个处理3个平行。同时以丙酮处理做空白对照。

1.4 CYP3A4 酶活性的测定

CYP3A4 酶活性的测定参照 Sonderfan 等^[21]及

Zhang 等^[22]的方法并加以改进。以睾酮作为探针药物,代谢产物为6β-羟基睾酮。孵育体系(200 μL)包括0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲溶液(pH 7.4),60 μmol·L⁻¹ 睾酮,3.3 mmol·L⁻¹ MgCl₂,0.2~0.5 mg·mL⁻¹ 微粒体蛋白,3.3 mmol·L⁻¹ 葡萄糖-6-磷酸和0.4 U·mL⁻¹ 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶。空白样不加微粒体蛋白。混合体系30℃培养箱中预温育5 min 后加入20 μL NADPH(12 nmol·L⁻¹)启动反应,用移液枪多次抽吸混匀后,于30℃培养箱中温育30 min 后快速加入100 μL 预冷的甲醇终止反应,用涡旋振荡器混匀,样品经4000 r·min⁻¹ 离心15 min,取100 μL 上清液待测。CYP3A4 酶活性的测定采用 HPLC 法,以甲醇/超纯水(50/50, V:V)作为流动相,检测波长为254 nm,流速为1.5 mL·min⁻¹,6β-羟基睾酮保留时间为2 min。

1.5 数据分析

实验所得数据使用统计软件 SPSS 16.0 进行处理。使用 Probit 分析滤纸急性毒性试验及土壤急性毒性试验结果,以污染物暴露剂量为因子,对蚯蚓体重增长、产茧量及幼体数目进行单因素方差分析[One-way ANOVA, Dunnett's t-test(2-sided)],利用多重比较分析对各处理组的均值进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 蚯蚓对氯氰菊酯的急性毒性响应

2.1.1 滤纸实验

当受试蚯蚓暴露0.5 h 后,494.2 μg·cm⁻² 以下浓度处理组中部分蚯蚓沿烧杯壁爬向封口膜以企图躲避污染物毒害,988.3、1 976.6 μg·cm⁻² 处理组的蚯蚓立即显现出身体呈蜷缩弯曲的中毒症状;6 h 后,247.1 μg·cm⁻² 以下浓度处理组的蚯蚓攀附在烧杯壁上,988.3、1 976.6 μg·cm⁻² 处理组的蚓体伸长,体表颜色变暗,表皮失去光泽;24 h 后,30.9、61.8 μg·cm⁻² 处理组,未出现明显中毒症状,123.5、247.1、494.2 μg·cm⁻² 处理组蚯蚓蠕动迟缓,少数出现中毒症状,蚓体有黄色液体渗出,988.3、1 976.6 μg·cm⁻² 处理组的蚯蚓环带肿大,蚓体呈现糖葫芦状,甚至出现断节,蚓体变软并从环带处糜烂,有黄色液体渗出并出现死亡;48 h 后,30.9 μg·cm⁻² 处理组蚯蚓直至72 h 无死亡,61.8、123.5 μg·cm⁻² 有少数出现环带肿大糜烂的现象,494.2、988.31 μg·cm⁻² 处理组蚯蚓大部分死亡,976.6 μg·cm⁻² 处理组蚯蚓全部死亡。统计分析(表2)表明,滤纸接触试验中氯氰菊酯对蚯蚓的48 h、72 h LC₅₀ 值分别为445.5、212.1 μg·cm⁻²。

2.1.2 土壤实验

14 d 的试验过程中,丙酮处理对照组中蚯蚓存活良好;30 mg·kg⁻¹ 处理组的蚯蚓直至 14 d 体表湿润有光泽,没有中毒症状;60、90 mg·kg⁻¹ 处理组的蚯蚓 7 d 时变得瘦小,蠕动迟缓,直至 14 d 有少数蚯蚓死亡;120 mg·kg⁻¹ 处理组的蚯蚓 7 d 时环带肿大,体表变暗,蠕动力明显减弱,直至 14 d 半数以上蚯蚓死亡;150 mg·kg⁻¹ 处理组的蚯蚓被放入染毒容器中后表现为激烈挣扎,7 d 时大部分蚯蚓死亡,未死亡蚯蚓体表失去光泽,颜色变暗,蚯蚓环带肿大,直至 14 d 全部死亡。本实验结果(表 3)表明:氯氰菊酯对蚯蚓 7 d 和 14 d 的 LC₅₀ 分别为 121.6 mg·kg⁻¹ 和 80.2 mg·kg⁻¹,符合《化学农药环境安全评价实验准则》(农业部农药检定所,2004)中建议的低毒标准(7 d 或 14 d LC₅₀>10.0 mg·kg⁻¹)^[23]。

2.1.3 生长和再生繁殖毒性试验

由表 4 可见,在生长试验中蚯蚓对各剂量组氯氰菊酯胁迫均有响应。暴露 6 周后,氯氰菊酯处理组中蚯蚓体重增长率均明显高于对照组,结果表明氯氰菊酯暴露对蚯蚓体重增长表现出促进作用,当氯氰菊酯

为 1 mg·kg⁻¹ 时,促进作用达到最大。当氯氰菊酯浓度继续升高时,蚯蚓体重增长率逐渐降低。

由表 5 可见,氯氰菊酯胁迫暴露 4 周后,各氯氰菊酯处理组蚯蚓产茧量均高于对照组,暴露 6 周后,1 mg·kg⁻¹ 及 10 mg·kg⁻¹ 处理组中蚯蚓产茧量明显高于对照组,5 mg·kg⁻¹ 及 20 mg·kg⁻¹ 处理组低于对照组;暴露 4 周后,除 0.5 mg·kg⁻¹ 和 5 mg·kg⁻¹ 处理组中幼体数高于对照组外,其余处理组均明显低于对照组,暴露 6 周后,虽然各处理组中幼体数相对于 4 周有所升高,但除 5 mg·kg⁻¹ 处理组外的各氯氰菊酯处理组中幼体个数均小于对照组,并且随着氯氰菊酯浓度增大,幼体数逐渐较少。因此,蚯蚓生长繁殖不仅与土壤中氯氰菊酯浓度有关,也与暴露周期关系密切。从总体的趋势来看,氯氰菊酯污染对蚯蚓繁殖能力显示出短期诱导,长期抑制效应,而对蚯蚓幼体的孵育产生抑制作用。

2.2 氯氰菊酯对蚯蚓体内 CYP3A4 毒性的动态响应关系

2.2.1 滤纸实验

由图 1 可见,2.1 ng·cm⁻² 处理组,CYP3A4 酶活

表 2 采用滤纸法测定的氯氰菊酯对赤子爱胜蚓的急性毒性效应

Table 2 Acute toxicity of cypermethrin on *Eisenia fetida* by using filter paper contacting method

污染物	暴露时间	毒力回归式	LC ₅₀	LC ₅₀ 值 95%置信区间	相关系数 <i>r</i> ²
氯氰菊酯	48 h	$y=2.029x-5.375$	445.5 μg·cm ⁻²	287.1~751.7 mg·kg ⁻¹	0.959
	72 h	$y=1.418x-3.299$	212.1 μg·cm ⁻²	115.0~386.1 mg·kg ⁻¹	0.929

表 3 采用土壤法测定的氯氰菊酯对赤子爱胜蚓的土壤急性毒性效应

Table 3 Acute toxicity of cypermethrin on *Eisenia fetida* by using natural soil method

污染物	暴露时间	毒力回归式	LC ₅₀	LC ₅₀ 值 95%置信区间	相关系数 <i>r</i> ²
氯氰菊酯	7 d	$y=7.804x-16.271$	121.6 mg·kg ⁻¹	111.9~133.7 mg·kg ⁻¹	0.917
	14 d	$y=4.342x-8.267$	80.2 mg·kg ⁻¹	42.1~128.2 mg·kg ⁻¹	0.986

表 4 氯氰菊酯对单位蚯蚓体重的影响

Table 4 Summary of results from the growth response test

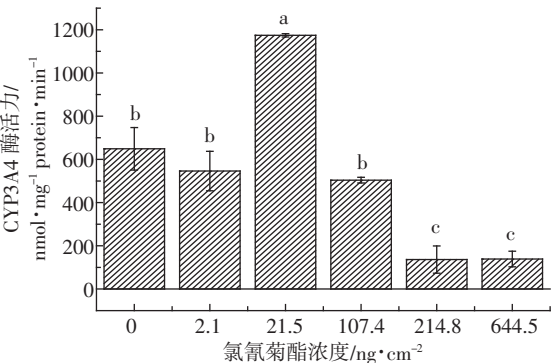
氯氰菊酯浓度/mg·kg ⁻¹	单位蚯蚓重量/mg		单位蚯蚓体重增长率/%
	0 周	6 周	
对照	295.1±1.8	300.5±0.04	1.8c
0.5	277.9±10.2	291.7±10.0	6.9bc
1	250.4±6.3	289.3±12.3	15.5a
5	253.8±2.9	280.0±4.7	10.3ab
10	264.2±4.7	286.5±12.8	8.4b
20	269.2±23.3	294.4±12.1	9.4b
30	288.7±32.1	311.5±35.8	7.9b

注:同列不同小写字母表示不同处理间差异显著($P<0.05$)。下同。

表 5 氯氰菊酯对蚯蚓产茧量及幼体数的影响
Table 5 Summary of results from the reproductive response test

氯氰菊酯浓度/mg·kg ⁻¹	蚯蚓总产茧量/个		蚯蚓幼体总量/只	
	4 周	6 周	4 周	6 周
对照	1.0±0.0	3.7±1.5a	8.0±3.6	11.7±3.5bc
0.5	2.3±1.5	3.7±2.1a	9.3±3.2	10.7±4.2bc
1	1.3±2.3	4.7±3.2a	5.7±1.2	10.3±2.5ab
5	2.7±2.1	3.1±1.5a	12.0±0.0	14.0±3.5c
10	4.3±1.5	4.7±3.5a	5.7±0.6	8.3±3.5ab
20	3.0±1.7	3.0±1.7a	3.3±1.2	7.3±2.9a
30	3.3±1.2	3.7±4.0a	4.0±1.0	8.0±2.0a

力与对照基本相当。当氯氰菊酯浓度增加到 21.5 ng·cm⁻² 时,CYP3A4 酶活力明显升高, 比对照增加了 80.9%, 单因素方差分析结果显示出极显著的诱导效应;此后,随着氯氰菊酯浓度增大,CYP3A4 酶活力逐渐降低,当氯氰菊酯浓度为 107.4 ng·cm⁻² 时,CYP3A4 酶活力回到对照组水平,CYP3A4 酶活力在 214.8、644.5ng·cm⁻² 时降低至对照的 20%左右,抑制作用明显。CYP3A4 酶活力与氯氰菊酯浓度间呈现出倒 U 型量-效响应特征。



图中小写字母表示不同处理间差异显著(P<0.05)
Error bars indicated standard errors(n=3). The same below

图 1 滤纸实验中蚯蚓体内 CYP3A4 酶活力
在氯氰菊酯胁迫下的响应

Figure 1 CYP3A4 enzyme activity in adult *Eisenia fetida* exposed to control filter paper and cypermethrin contaminated filter paper with five concentrations levels for 48 hours

2.2.2 土壤实验

由图 2 可见,土壤试验中蚯蚓体内 CYP3A4 活性与氯氰菊酯浓度之间的动态毒性效应同样明显。蚯蚓暴露 3 d 后,随着氯氰菊酯浓度依次从 0.5 mg·kg⁻¹ 增至 10 mg·kg⁻¹, 蚯蚓体内 CYP3A4 酶活力迅速增加, 分别为对照组的 1.2、1.5、1.8、2.5 倍。其中,氯氰菊酯 10 mg·kg⁻¹ 处理组,CYP3A4 酶活力达到最大值 11.5

nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹, 诱导效应显著;当氯氰菊酯浓度继续升高,CYP3A4 酶活力略有下降, 但仍高于对照组,分别为对照组的 1.7、1.2 倍,氯氰菊酯在短期内表现为诱导效应。整体上看,CYP3A4 酶活力与土壤中氯氰菊酯浓度间呈现明显的倒 U 型的量-效关系。

此后随氯氰菊酯浓度增高,CYP3A4 酶活力下降,表现出随暴露时间延长,诱导效应降低的趋势。7 d 后,CYP3A4 酶活性最大值由 3 d 暴露时的 11.5 nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹ 下降至 8.5 nmol·mg⁻¹ protein·min⁻¹,相应的最大诱导浓度值由 3 d 的 10 mg·kg⁻¹ 下降至 5 mg·kg⁻¹。CYP3A4 酶活力与氯氰菊酯浓度之间继续保持倒 U 型量-效特征。

14 d 后,各处理组中蚯蚓体内的 CYP3A4 酶活力总体下降, 呈现明显的被抑制效应;21 d 后,0.5~5 mg·kg⁻¹ 处理组 CYP3A4 酶活力与 14 d 基本相当, 但 10 mg·kg⁻¹ 处理组 CYP3A4 酶活力出现最大值;此后随氯氰菊酯浓度增高 CYP3A4 酶活力下降, 整个试验浓度范围内再次呈现倒 U 型量-效特征;28 d 后, CYP3A4 最大值前移至 0.5 mg·kg⁻¹ 处理组。

从同一处理浓度不同暴露时间(3、7、14、21、28 d)的动态-效应关系可见,CYP3A4 酶活力除了在 0.5 mg·kg⁻¹ 随暴露时间延长呈逐渐上升趋势, 其他处理组中 CYP3A4 酶活力均随暴露时间延长呈逐渐下降趋势。根据低浓度产生诱导刺激,高浓度产生诱导抑制的规律,即使在 0.5 mg·kg⁻¹ 的低浓度下,氯氰菊酯较长时间的土壤暴露仍具有一定的毒性,而在 1.0~30 mg·kg⁻¹ 的浓度范围内, 氯氰菊酯对 CYP3A4 活力产生明显抑制效应(P<0.05)。

3 讨论

在急性毒性试验中(表 2、表 3),蚯蚓死亡率与氯

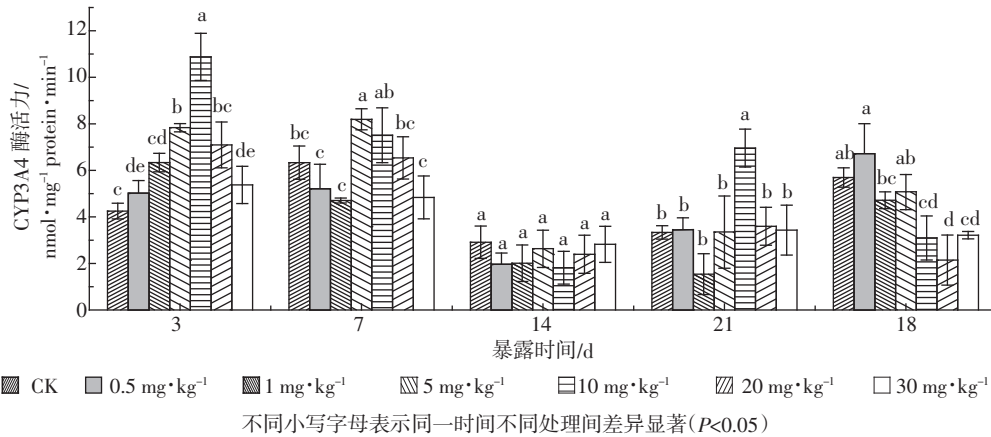


图2 土壤实验中蚯蚓 CYP3A4 在不同氯氰菊酯浓度下及不同暴露时间下的响应

Figure 2 CYP3A4 enzyme activity in adult *Eisenia fetida* exposed to control soil and cypermethrin contaminated soil with six concentrations levels for 4 weeks

氯氰菊酯浓度之间呈良好的线性关系。从再生繁殖试验可以得出氯氰菊酯暴露促进蚯蚓体重增长(表4),对蚯蚓的繁殖能力表现出短期诱导,长期抑制效应,对蚯蚓幼体的孵育产生抑制作用(表5)。因此,蚯蚓的死亡率、生长再生繁殖指标(体重增长率、产茧量、幼体数目)均可以作为对土壤中农药氯氰菊酯进行定量表征的生物标志。

以上实验结果表明,氯氰菊酯对蚯蚓具有明显的生态毒性。这一结果与其他学者结论相似^[24-27]。Zhou等^[24]发现蚯蚓在浓度为5、10、20、40、60 mg·kg⁻¹的氯氰菊酯染毒土壤中暴露8周后,氯氰菊酯低剂量处理组(5~20 mg·kg⁻¹)促进蚯蚓体重增长,高剂量组(40~60 mg·kg⁻¹)明显抑制蚯蚓体重增长、繁殖能力及蚯蚓幼体的生长发育。Elbetieha等^[25]给成年雄性大鼠投喂0、8571、17 143、34 286 mg·L⁻¹的氯氰菊酯溶液12周后,8571、17 143 mg·L⁻¹处理组中雄性大鼠生殖能力明显下降,雌鼠产仔数也显著下降。

氯氰菊酯暴露对蚯蚓幼体生长发育产生明显的抑制作用(表5)。这可能是蚯蚓幼体抵抗力较差所致,虽然土壤中氯氰菊酯的降解速率较快,但蚓茧长时间处于残留的氯氰菊酯和可能的代谢产物中,使蚓茧的孵育活动受到干扰抑制。这也可能是氯氰菊酯代谢产物的毒性所致,具体原因需要进一步研究。

从蚯蚓 CYP3A4 对氯氰菊酯毒性的动态响应实验中可以发现(图1、图2),氯氰菊酯在短期内可导致蚯蚓体内 CYP3A4 酶活性显著升高,CYP3A4 的升高表明氯氰菊酯在蚯蚓体内的转化诱发了 CYP3A4 的大量表达,这证明了第一阶段代谢酶 P450 在氯氰菊酯代谢过程中的重要作用,同时也证明了以 P450 亚

酶为指标可以敏感指示氯氰菊酯污染引起的量-效变化。这与其他学者结论相似^[17,28-29]。在不同污染物诱导下 P450 亚酶可以产生诱导上调或下调的响应,以应对污染物的胁迫。Husoy等^[29]研究发现当大鼠暴露于多氯乙炔(CEs)时,其肝脏中 CYP2E1 的表达量明显降低,其中二氯乙炔对其抑制最强。崔永等^[28]以 100、200 mg·kg⁻¹ 剂量,1次·d⁻¹,连续3d对小鼠腹腔注射染毒,实验结果表明氯氰菊酯可增高小鼠肝 CYP1A1、2B1、3A 的活性。

CYP3A4 暴露48h和3d后对氯氰菊酯胁迫产生了明显的量-效关系,相对于土壤过氧化氢酶^[30]在40 mg·kg⁻¹ 氯氰菊酯处理下15d表现出的激活作用及土壤淀粉酶^[13,31]在氯氰菊酯胁迫下3d的轻微激活和7d下的抑制作用,CYP3A4 的早期预警再次确证了 CYP3A4 对低剂量氯氰菊酯污染的敏感指示作用。

在 CYP3A4 对氯氰菊酯毒性的动态响应的土壤实验中(图2),当暴露时间延长至14d时,CYP3A4 逐渐降低,说明蚯蚓的生物代谢异常,受试生物受到一定程度的损伤,同时也表明了氯氰菊酯长期暴露风险加大的特征。有学者研究表明,氯氰菊酯的降解符合以及反应动力学方程 $y=C_0e^{-kt}$,其在土壤中的降解半衰期为15~30 d^[13,32],而氯菊酯、氯氰菊酯等代谢产物的毒性比其母体化合物的细胞毒性更大^[33],拟除虫菊酯产生了滞后的生态毒性效应。

从以上系列试验可见,不同水平等级和不同试验终点下,蚯蚓在氯氰菊酯胁迫下的反应不尽相同。急性毒性试验中,氯氰菊酯暴露7d和14d的LC₅₀值表明氯氰菊酯的低毒(>10.0 mg·kg⁻¹)等级特征,而在再生繁殖试验中,当氯氰菊酯远低于LC₅₀值就可以

观察到其对蚯蚓幼体发育产生滞后效应,说明急性毒性试验终点具有局限性,仅代表在个体水平上的毒性效应。而在与再生繁殖试验相同的浓度范围内,蚯蚓体内 CYP3A4 酶活力增加极显著,且随暴露期延长,蚯蚓体内 CYP 3A4 最大值出现的浓度依次降低。CYP3A4 酶活力与氯氰菊酯浓度之间倒 U 型量-效应曲线特征进一步证实了氯氰菊酯暴露下,蚯蚓在不同水平上的反应不同,对毒性响应的敏感性及风险提示水平也不同,其敏感度依次为细胞酶活力>生长繁殖>急性毒性。

4 结论

通过研究氯氰菊酯对赤子爱胜蚓的生态毒性作用及氯氰菊酯与 CYP3A4 之间的剂量-效应关系,初步确定了氯氰菊酯对蚯蚓的半致死剂量及生长、再生繁殖的影响,同时也确证了 CYP3A4 对低剂量氯氰菊酯污染的敏感指示作用。

本研究表明,以半致死量的急性毒性为试验终点可导致对氯氰菊酯等污染物的生态风险的低估,而导致生物生长度减缓、代谢过程受碍、行为改变和酶活性的变化等试验终点无疑是必要和重要的补充。

蚯蚓体内的 CYP3A4 活力指标或试验终点是潜在的生态毒理及内分泌干扰物毒性响应生物标记物。CYP3A4 活力对氯氰菊酯胁迫下呈现的倒 U 型量-效应曲线表明,CYP3A4 方法真实反映土壤中的污染物及代谢产物的潜在生态毒性及内分泌干扰效应,可成为土壤中氯氰菊酯等污染物生态风险评价的备选敏感生物标记物。

参考文献:

- [1] Stanko J P, Enoch R R, Rayner J L, et al. Effects of prenatal exposure to a low dose atrazine metabolite mixture on pubertal timing and prostate development of male long evans rats[J]. *Reproductive Toxicology*, 2010, 30(4): 540-549.
- [2] Cannon R E, Geist J, Pfeiff J, et al. Linking mechanistic and behavioral responses to sublethal esfenvalerate exposure in the endangered delta smelt *Hypomesus transpacificus* (Fam. Osmeridae)[J]. *BMC Genomics*, 2009, 10: 608.
- [3] Vomsaal F S, Timms B G, Montano M M, et al. Prostate enlargement in mice due to fetal exposure to low doses of estradiol or diethylstilbestrol and opposite effects at high doses [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1997, 94(5): 2056-2061.
- [4] Casida J E, Gammon D W, Glickman A H, et al. Mechanisms of selective action of pyrethroid insecticides[J]. *Annual Review of Pharmacology and Toxicology*, 1983, 23(1): 413-438.
- [5] Moore A, Waring C P. The effects of a synthetic pyrethroid pesticide on some aspects of reproduction in Atlantic salmon (*Salmo salar* L.)[J]. *Aquatic Toxicology*, 2001, 52(1): 1-12.
- [6] U S EPA. Endocrine disruptor screening and testing advisory commition (EDSAC) report[R]. Office of Prevention and Toxic Substances, US Environmental Protection Agency, Washington DC, 1998.
- [7] Holmes R W, Anderson B S, Phillips B M, et al. Statewide investigation of the role of pyrethroid pesticides in sediment toxicity in california's urban waterways[J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(18): 7003-7009.
- [8] Hintzen E P, Lydy M J, Belden J B. Occurrence and potential toxicity of pyrethroids and other insecticides in bed sediments of urban streams in central texas[J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(1): 110-116.
- [9] Domagalski J L, Weston D P, Zhang M, et al. Pyrethroid insecticide concentrations and toxicity in streambed sediments and loads in surface waters of the San Joaquin Valley, California, USA [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2010, 29(4): 813-823.
- [10] 吴晓晨, 安 琼, 董元华, 等. 苏南某市春季蔬菜中农药残留调查[J]. *农村生态环境*, 2004, 20(3): 49-52.
- [11] WU Xiao-chen, AN Qiong, DONG Yuan-hua, et al. Residues of pesticides in spring vegetables in southern Jiangsu, China[J]. *Rural Eco-environment*, 2004, 20(3): 49-52.
- [12] 尹可锁, 张雪燕, 徐汉虹, 等. 滇池周边农田中拟除虫菊酯农药残留研究[J]. *西南农业学报*, 2011, 24(4): 1367-1371.
- [13] YIN Ke-suo, ZHANG Xue-yan, XU Han-hong, et al. Study on characteristics of pyrethroid pesticides residues in dianchi lakeshed [J]. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 2011, 24(4): 1367-1371.
- [14] Zhang Q-Y, Dunbar D, Ostowska A, et al. Characterization of human small intestinal cytochromes P450[J]. *Drug Metabolism and Disposition*, 1999, 27(7): 804-809.
- [15] 周世萍, 段昌群, 刘宏程. 氯氰菊酯对土壤蔗糖酶、脲酶活性的影响[J]. *环境科学导刊*, 2008, 27(4): 14-16.
- [16] ZHOU Shi-ping, DUAN Chang-qun, LIU Hong-cheng. Impacts on sucrase and urease activity in soil by cypermethrin[J]. *Environmental Science Survey*, 2008, 27(4): 14-16.
- [17] Spatzenegger M, Jaeger W. Clinical importance of hepatic cytochrome-P450 in drug-metabolism[J]. *Drug Metabolism Reviews*, 1995, 27(3): 397-417.
- [18] 孙剑寒. 6 种食物非营养成分对孕烷 X 受体介导的 CYP3A4 转录调节作用研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2004: 30-35.
- [19] SUN Jian-han. Human pregnane X receptor-mediated transcriptional regulation of CYP3A4 by six food non-nutrients[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2004: 30-35.
- [20] Masuyama H, Suwakin, Tateishi Y, et al. The pregnane X receptor regulates gene expression in a ligand- and promoter-selective fashion[J]. *Molecular Endocrinology*, 2005, 19(5): 1170-1180.
- [21] Takeshita A, Koibuchin N, Oka J, et al. Bisphenol-A, an environmental estrogen, activates the human orphan nuclear receptor, steroid and xenobiotic receptor-mediated transcription[J]. *European Journal of En-*

- doocrinology, 2001, 145(4):513-517.
- [18] 王青秀, 吴纯启, 廖明阳. 细胞色素 P450 表达的诱导机制及其筛选方法的研究进展[J]. 国外医学药学分册, 2003, 30(1):43-46.
- WANG Qing-xiu, WU Chun-qi, LIAO Ming-yang. Advances in induction mechanism and screening method research on expression of Cytochrome P450[J]. *Foreign Medical Sciences Section on Pharmacy*, 2003, 30(1):43-46.
- [19] OECD, Organization for Economic Cooperation and Development. Test 207: Earthworm, acute toxicity tests[R]// Organization for Economic Cooperation and Development (Ed.), OECD Guidelines for Testing of Chemicals, 1984.
- [20] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 蚯蚓细胞色素 P450 生物标记物方法研究[J]. 环境科学, 2006, 27(8):1636-1642.
- ZHANG Wei, SONG Yu-fang, SUN Tie-heng, et al. Establishment of method for cytochrome P450 of earthworms (*Eisenia fetida*) as a biomarker[J]. *Environmental Science*, 2006, 27(8):1636-1642.
- [21] Sonderfan A J, Arlotto M P, Dutton D R, et al. Regulation of testosterone hydroxylation by rat-liver microsomal cytochrome-P-450[J]. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1987, 255(1):27-41.
- [22] Zhang T Y, Zhu Y X, Gunaratna C. Rapid and quantitative determination of metabolites from multiple cytochrome P450 probe substrates by gradient liquid chromatography-electrospray ionization-ion trap mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography B-Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences*, 2002, 780(2):371-379.
- [23] 刘伟, 朱鲁生, 王军, 等. 毒死蜱、马拉硫磷和氰戊菊酯对赤子爱胜蚓 (*Eisenia fetida*) 的急性毒性[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4):597-601.
- LIU Wei, ZHU Lu-sheng, WANG Jun, et al. Acute toxicological dosages of chlorpyrifos, malathion and fenvalerate on earthworm *Eisenia fetida* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2009, 4(4):597-601.
- [24] Zhou S P, Duan C Q, Michelle W H G, et al. Individual and combined toxic effects of cypermethrin and chlorpyrifos on earthworm[J]. *Journal of Environmental Sciences-China*, 2011, 23(4):676-680.
- [25] Elbetiehaa, Da'as S I, Khamas W, et al. Evaluation of the toxic potentials of cypermethrin pesticide on some reproductive and fertility parameters in the male rats[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2001, 41(4):522-528.
- [26] Hartnik T, Sverdrup L E, Jensen J. Toxicity of the pesticide alpha-cypermethrin to four soil nontarget invertebrates and implications for risk assessment[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2008, 27(6):1408-1415.
- [27] 李文艳, 杨宏莉, 蒋雪, 等. 氯氰菊酯和高效氯氰菊酯的生殖毒性研究进展[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(7):652-654.
- LI Wen-yan, YANG Hong-li, JIANG Xue, et al. Research progress on reproductive toxicity of cypermethrin and beta-cypermethrin[J]. *Journal of Environmental Health*, 2010, 27(7):652-654.
- [28] 崔永, 郭江峰, 徐步进, 等. 毒死蜱和氯氰菊酯对小鼠细胞色素 P450 的影响[J]. 环境与健康杂志, 2008, 25(9):789-792.
- CUI Yong, GUO Jiang-feng, XU Bu-jin, et al. Effect of chlorpyrifos and cypermethrin on cytochrome P450 activity in mice [J]. *Journal of Environmental Health*, 2008, 25(9):789-792.
- [29] Husoy A M, Myers M S, Goksoyr A. Cellular localization of cytochrome P450 (CYP1A) induction and histology in Atlantic cod (*Gadus morhua* L) and European flounder (*Platichthys flesus*) after environmental exposure to contaminants by caging in Sørkjorden, Norway[J]. *Aquatic Toxicology*, 1996, 36(1-2):53-74.
- [30] 鲁赫鸣, 闫颖, 王文思, 等. 农药对土壤过氧化氢酶活性的影响[J]. 东北师大学报(自然科学版), 2004, 36(4):93-97.
- LU He-ming, YAN Ying, WANG Wen-si, et al. Influence of two pesticides on hydrogen peroxidase activity in soil[J]. *Journal of Northeast normal University (Natural Science)*, 2004, 36(4):93-97.
- [31] 周世萍, 段昌群, 刘守庆, 等. 氯氰菊酯、毒死蜱两种农药单独及复合胁迫对土壤淀粉酶的影响[J]. 昆明理工大学学报(理工版), 2008, 33(4):74-76.
- ZHOU Shi-ping, DUAN Chang-qun, LIU Shou-qing. Effects of the individual and mixed treatments of cypmethrin and chlorpyrifos stress on amylase[J]. *Journal of Kunming University of Science and Technology (Science and Technology)*, 2008, 33(4):74-76.
- [32] 王智睿, 李会科, 梁俊, 等. 氯氰菊酯在苹果园土壤中的降解行为研究[J]. 西北林学院学报, 2009, 24(4):130-134.
- WANG Zhi-rui, LI Hui-ke, LIANG Jun, et al. Degradation dynamic of cypermethrin in apple orchard soil[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2009, 24(4):130-134.
- [33] 张颖. 典型拟除虫菊酯类农药潜在毒性的整合评价研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011:33-47.
- ZHANG Ying. Integrative assessment of potential toxicities of typical pyrethroids[D]. Hangzhou: Zhejiang University, 2011:33-47.