

EE2 与 DBP 对斑马鱼胚胎发育的联合毒性研究

陈朋宇¹, 刘磊¹, 李松², 许楠^{1*}, 徐一峰¹, 范重阳¹

(1. 北京大学深圳研究生院环境与能源学院 城市人居环境科学与技术重点实验室, 广东 深圳 518055; 2. 北京大学深圳研究生院 化学生物学与生物技术学院 化学基因组学实验室, 广东 深圳 518055)

摘要:基于斑马鱼胚胎技术和等毒性配比法,研究了乙炔雌二醇(EE2)与邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对斑马鱼的联合胚胎毒性,主要观察并比较了斑马鱼 96 h 内胚胎发育情况、死亡率和孵化率,并分别采用相加指数法、毒性单位分析法和毒性单位图解法分析比较了 EE2 和 DBP 组合在不同时间和浓度对斑马鱼胚胎发育的效应类型。结果表明:斑马鱼的胚胎发育对 EE2 和 DBP 的毒性作用较为敏感,均表现出显著的浓度依赖性和时间的累加效应,可以造成胚胎发育畸形(尾畸、水肿、脊柱弯曲、孵化延迟等)甚至死亡;DBP 的毒性作用高于 EE2,DBP 和 EE2 的 96 h-LC₅₀ 分别为 2.219 mg·L⁻¹ 和 3.975 mg·L⁻¹;EE2 和 DBP 组合在不同时间和浓度有不同的效应类型,在 80 h 时二者之间表现出拮抗作用,96 h 时则表现出协同作用。

关键词:乙炔雌二醇(EE2);邻苯二甲酸二丁酯(DBP);斑马鱼;胚胎;毒性

中图分类号:X503.225 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2013)06-1099-07 doi:10.11654/jaes.2013.06.003

Joint Toxicity of EE2 and DBP to Embryonic Development of Zebrafish (*Brachydanio rerio*)

CHEN Peng-yu¹, LIU Lei¹, LI Song², XU Nan^{1*}, XU Yi-feng¹, FAN Chong-yang¹

(1. Key Laboratory for Urban Habitat Environmental Science and Technology, School of Environment and Energy, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China; 2. Laboratory of Chemical Genomics, School of Chemical Biology and Biotechnology, Peking University Shenzhen Graduate School, Shenzhen 518055, China)

Abstract: In studying the joint toxicity of ethynylestradiol (EE2) and dibutyl phthalate (DBP) on the embryonic development of zebrafish, a 1:1 ratio of EE2 and DBP was used. The primary research objective was to observe and compare the embryonic development, mortality, and hatchability behaviors of zebrafish embryos within a 96-hour time frame. Furthermore, using a trifold technique of additive index method, toxic unit analytical method, and toxicity unit graphic method, we analyzed the effects of EE2 and DBP on zebrafish in varying doses and under varying time conditions. The results illustrated that zebrafish embryos were sensitive to the toxic effects of EE2 and DBP, thus demonstrating a significant sensitivity to both concentration of the dose and accumulation of time. The embryos begun to develop defects as well (e.g., tail defects, edema, spine curvature, delayed hatching). The toxicity of DBP was higher than that of EE2; the 96-hour median lethal concentration (LC₅₀) of DBP and EE2 were 2.219 mg·L⁻¹ and 3.975 mg·L⁻¹, respectively. The joint-dose of DBP and EE2 produced an antagonistic effect on mortality of zebrafish at 80 hours but a synergistic effect at 96 hours.

Keywords: ethynylestradiol; dibutyl phthalate; zebrafish; embryo; toxicity

乙炔雌二醇(Ethynylestradiol, EE2)作为一种人工合成雌激素,主要用于口服避孕药或促进家畜生长。由于 EE2 半衰期长及生物富集作用,鱼体内 EE2 含

量比自然环境中高 332 倍^[1],且 EE2 的雌激素作用比 E2 和 E1 强 10~50 倍^[2]。邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)是一种重要的邻苯二甲酸酯类化合物,已被美国环保署(EPA)列为优先控制的有毒污染物之一。已有研究在大气、水体、土壤、生物体内甚至人体血液发现了邻苯二甲酸酯(Phthalic acid esters, PAEs)^[3-4]。作为一种外源性雌激素,尽管邻苯二甲酸酯的内分泌干扰效应相对较弱,但由于使用量大,难

收稿日期:2012-12-06

基金项目:深圳市科技计划项目(CXB201105100085A)

作者简介:陈朋宇(1990—),男,河南濮阳人,硕士研究生,研究方向为水污染防治与水生态毒理。E-mail:Chen_9875@126.com

*通信作者:许楠 E-mail:xunan@pkusz.edu.cn

以降解,在生物中积累浓度高,能够干扰人体正常内分泌从而影响生殖^[5],所造成的危害也不容小觑。

斑马鱼作为一种新型模式生物,因其与人类基因组的高度同源性而经常被用作毒理学试验。斑马鱼胚胎具有光学透明性,可清楚地观察到各个发育阶段,有助于实现观察体内病变过程和体节发育中的毒性影响。另外斑马鱼还具有饲养成本低、繁殖力高等优点。

已有文献同时研究了 DBP 和 EE2 各自对斑马鱼肝过氧化物酶体、繁殖力和发育情况的影响^[6],但目前尚未见 EE2 和 DBP 对斑马鱼胚胎发育的联合毒性的相关研究。邻苯二甲酸酯和雌激素是在环境中普遍存在的两类主要内分泌干扰物质,因此揭示其共存条件下对水生生物的联合毒性具有重要的环境意义。本文通过研究 EE2 和 DBP 对斑马鱼胚胎的联合毒性,深入探讨不同种类内分泌干扰物对生物体的复合毒性作用模式,明确其在环境中的潜在危害。

1 材料与方法

1.1 试验用斑马鱼

野生型(Wild type, WT) *Tuebingen* 品系,由北京大学深圳研究生院遗传与发育实验室惠赠。斑马鱼的养殖和繁殖参照文献中标准方法^[7],鱼房内光周期 14:10(光照 14 h, 黑暗 10 h),将雌雄成年斑马鱼分开饲养。繁殖前夜,将雌雄鱼以 1:1 的比例移入产卵缸,并用隔板分开。次日清晨,移去隔板,半小时收集胚胎。用养鱼水将胚胎清洗干净后,转入一次性消毒平板培养皿中,放入 28.5 °C 恒温箱中孵化。

1.2 试剂及仪器

5 g·L⁻¹ DBP(美国 Sigma 公司),4 °C 保存。实验开始前,以体积分数为 0.5% 的二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)为助溶剂配制溶液,分别稀释到 1.5、2.0、2.5、3.5、4.0 mg·L⁻¹ 备用(各 50 mL)。

5 g·L⁻¹ EE2(美国 Sigma 公司),4 °C 保存。实验开始前,以体积分数为 0.5% 的 DMSO 为助溶剂配制溶液,分别稀释到 2.0、3.0、3.5、4.5、6.0 mg·L⁻¹ 备用(各 50 mL)。

实验用水均为统一配制的重组水(GB/T 13267—1991^[8], ISO 7346/2:1996^[9]),每 1 L 水中含有 294.0 mg·L⁻¹ CaCl₂·2H₂O, 123.3 mg·L⁻¹ MgSO₄·7H₂O, 63.0 mg·L⁻¹ NaHCO₃ 和 5.5 mg·L⁻¹ KCl。

正置显微镜(Zeiss Imager. A1, AxioCam MRm camera, 德国 ZEISS 公司);体视显微镜(Zeiss Stemi 2000-C, 北京普瑞赛司仪器有限公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 单一毒性试验

挑选 6 hpf (Hours post fertilization) 胚盾期正常发育的胚胎,选用 96 孔板染毒,实验组(暴露浓度设置参照文献[10–13])和对照组[包括溶剂对照组(体积分数为 0.5% 的 DMSO)和空白对照组]均各放 8 个孔,每孔各加入 200 μL 试液和 3 枚随机选取的正常胚胎,每组 3 个平行,(28±1)°C 温箱中孵化,实验持续 96 h。每日更换一半药液。

1.3.2 联合毒性试验

首先通过预实验确定正式实验所需浓度范围,在预实验的基础上,按等毒性配比设 5 个实验浓度(EE2/mg·L⁻¹+DBP/mg·L⁻¹: 1.44+0.8、1.8+1、2.16+1.2、2.52+1.4、2.88+1.6),同时设置溶剂对照组(体积分数为 0.5% 的 DMSO)和空白对照组。试验方法及 LC₅₀ 值计算方法同单一急性毒性试验。在求得联合毒性 EC₅₀ 值及 95% 置信限的基础上,根据每组的 LC₅₀ 值,利用 Marking 相加指数法^[14]、毒性单位分析法^[15]和毒性单位图解法^[16]分别进行评价。

1.4 观察指标

观察并比较受精后 6~96 h 胚胎发育情况,记录受精后 6~96 h 死亡率、孵化率。

1.5 数据分析方法

所有数据均进行正态性、方差齐性检验以及必要的数转换(如平方根、对数转换等),用 SPSS 16.0 进行分析。为比较死亡率和孵化率等数据,采用单向方差分析(One way analysis of variance)后 LSD 检验的方法来判断是否有显著性差异,显著差异值被设定为 α=0.05。

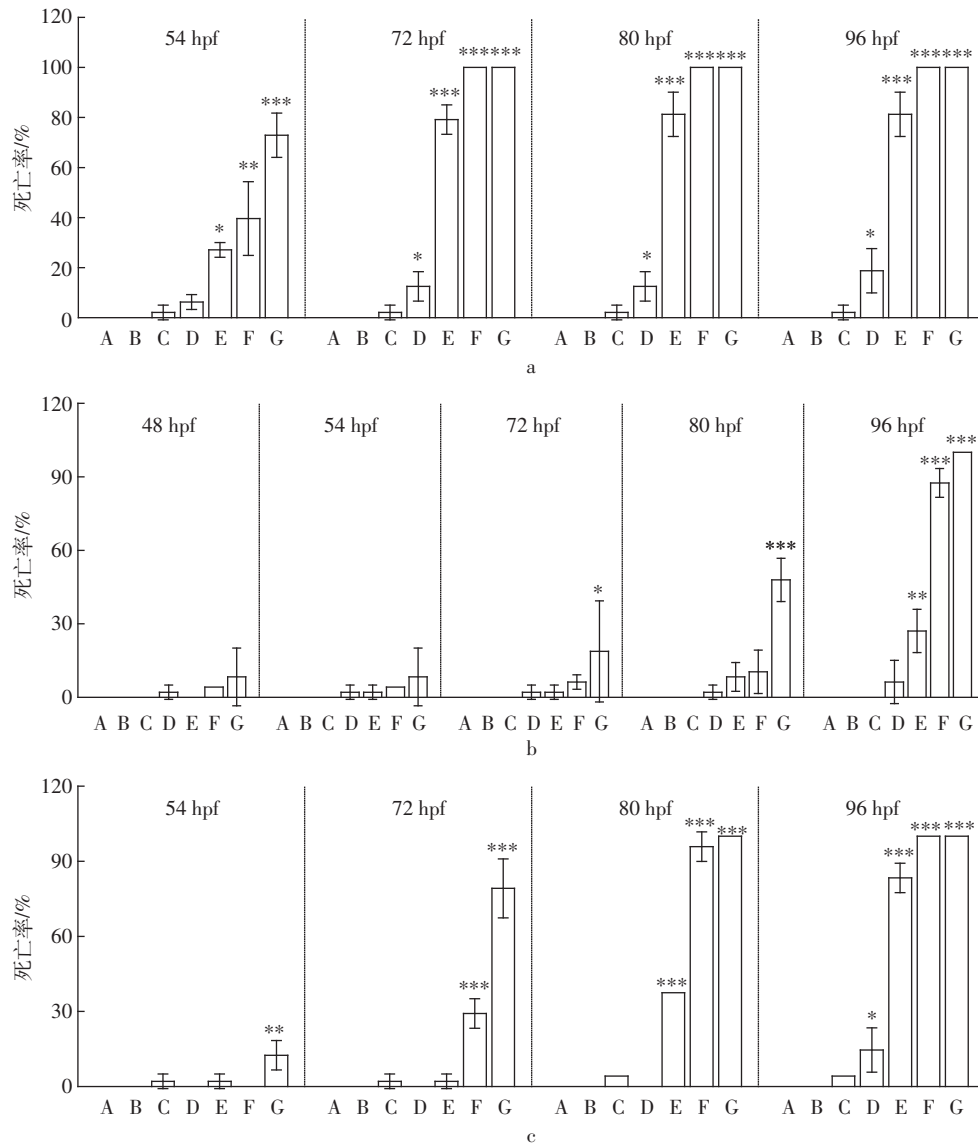
采用概率单位法计算 LC₅₀。数据作图一律采用 Origin 8.0 软件完成。

2 结果与分析

2.1 DBP、EE2 单一暴露及联合暴露对斑马鱼胚胎死亡率的影响

不同浓度 DBP、EE2 单独及共同暴露时,胚胎死亡率结果如图 1 所示。

DBP 单独暴露时,1.5 mg·L⁻¹ 剂量组胚胎即开始出现死亡。同一暴露时间,随 DBP 浓度的增加,胚胎死亡率增加,DBP 浓度对胚胎死亡率呈现明显剂量-效应关系。对于同一暴露浓度,胚胎死亡率均随暴露时间延长呈整体增大趋势。采用概率单位法求得 DBP 对胚胎的 96h-LC₅₀ 为 2.219 mg·L⁻¹,95% 置信区间



A 是空白对照组, B 是溶剂对照组。a 图是 DBP 单独暴露组, 其中 C: $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, D: $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, E: $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, F: $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, G: $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; b 图是 EE2 单独暴露组, 其中 C: $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, D: $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, E: $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, F: $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, G: $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; c 图是联合暴露组 (EE2/DBP), 其中 C: 1.44/0.8, D: 1.8/1, E: 2.16/1.2, F: 2.52/1.4, G: 2.88/1.6。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs A (空白对照)。下同

A is water control and B is solvent control. Figure a shows exposure to DBP, where C: $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, D: $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, E: $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, F: $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, G: $4.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Figure b shows exposure to EE2, where C: $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, D: $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, E: $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, F: $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, G: $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; Figure c shows exposure to a binary mixture (EE2/DBP), where C: 1.44/0.8, D: 1.8/1, E: 2.16/1.2, F: 2.52/1.4, G: 2.88/1.6。* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs A (water control). The same below

图 1 DBP 和 EE2 单独暴露及复合暴露对斑马鱼胚胎死亡率的影响

Figure 1 Influence of exposure to DBP, EE2 or a binary mixture of DBP and EE2 to mortality of zebrafish embryos

(Confidence interval, CI) 为 $2.127 \sim 2.318 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 回归方程为 $y = 15.206x - 5.264$, 故其安全浓度为 $0.22 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。96 h 无可见效应浓度 NOEC (No observed effect concentration) = $1.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 96 h 最低可见效应浓度 LOEC (Lowest observed effect concentration) = $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 与之前 Scholz 等^[12]、李文英等^[13]的结果接近。

EE2 单独暴露时, $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 剂量组未见胚胎死亡, 即使浓度增大到 $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 在 96 h 之前死亡率

也没有显著增大, 但暴露时间延长至 96 h 时, $4.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $6.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度组致死率急剧上升。这说明在高浓度时随暴露时间延长, 致死率呈急剧增大趋势。EE2 对胚胎的 96 h-LC₅₀ 为 $3.975 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 95% CI 为 $3.807 \sim 4.151 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 回归方程为 $y = 10.599x - 6.352$, 96 h-NOEC = $3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 96 h-LOEC = $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 与之前佟军威等^[10]、Versonnen 等^[11]的结果大体一致。

DBP、EE2 共同暴露的情况下, 在 54 h 时, 各

EE2 与 DBP 浓度组合对胚胎致死效应均不明显,最高剂量(G 组)胚胎致死率也仅为 12.50%;但随暴露时间延长,死亡率随暴露浓度的增大呈一定剂量效应关系。EE2+DBP 组合对胚胎的 96 h-LC₅₀ 为 3.027 mg·L⁻¹,95% CI 为 2.857~3.198 mg·L⁻¹,回归方程为 $y=19.184x-9.229$,96 h-NOEC=2.24 mg·L⁻¹,96 h-LOEC=2.8 mg·L⁻¹。

2.2 DBP、EE2 单一暴露及联合暴露对斑马鱼胚胎孵化率的影响

不同浓度 DBP、EE2 单独及共同暴露时,胚胎孵化率结果如图 2 所示。

DBP 单独暴露时,48 h 时胚胎即开始孵化,54 h

之前,不同浓度暴露均对胚胎的孵化有较为明显的促进作用,72 h 时较低浓度(1.5~2.5 mg·L⁻¹)的 DBP 组的孵化率也高于空白对照组。但随着 DBP 浓度的升高以及孵化时间的延长,斑马鱼的孵化率整体呈浓度依赖性降低,高浓度暴露组(3.5~4.0 mg·L⁻¹)孵化率显著降低。由此可见,DBP 低浓度暴露可促进胚胎提前孵化,而在高浓度条件下能使孵化率显著降低。96 h-NOEC=2.5 mg·L⁻¹,96 h-LOEC=3.5 mg·L⁻¹。

EE2 单独暴露对胚胎孵化率的影响与 DBP 大体一致,48 h 时胚胎已开始孵化,当浓度小于 4.5 mg·L⁻¹ 时,72 h 之前不同浓度暴露均能对胚胎的孵化有较为明显的促进作用,且这种促进作用会随着浓度的增

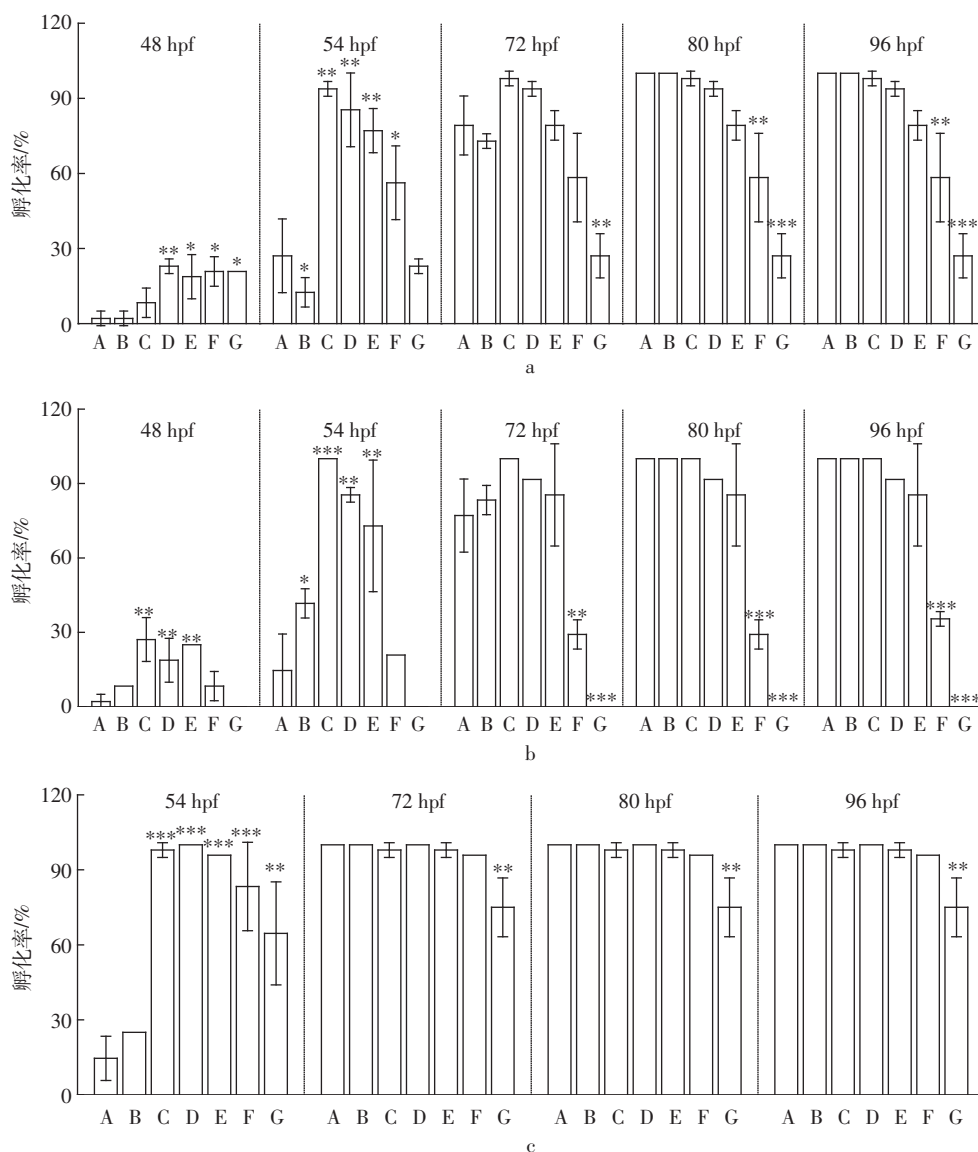


图 2 DBP 和 EE2 单独暴露及复合暴露对斑马鱼胚胎孵化率的影响

Figure 2 Influence of exposure to DBP, EE2 or a binary mixture of DBP and EE2 to cumulative hatching of zebrafish embryos

大而降低。高浓度条件下($4.5\sim 6.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$),孵化率显著降低。 $96\text{ h-NOEC}=3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $96\text{ h-LOEC}=4.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

DBP、EE2 共同暴露时, 54 h 空白对照组和溶剂对照组的孵化率仅为 14.58% 和 25.00% ,而加入各浓度的 EE2+DBP 组合的胚胎孵化率均显著高于空白对照组,孵化率最高可达 100% 。这说明在 54 h 时,EE2 与 DBP 组合对斑马鱼的孵化率有极为显著的促进作用,而随着作用时间的延长以及 EE2 与 DBP 组合浓度的增大,这种促进作用逐渐减弱,在组合浓度大于 $2.16/1.2$ 时,甚至表现出了一定的抑制作用。 $96\text{ h-NOEC}=3.92\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, $96\text{ h-LOEC}=4.48\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

2.3 DBP、EE2 单一暴露及联合暴露对斑马鱼胚胎发育的影响

96 h 时不同浓度的 DBP、EE2 暴露对斑马鱼的胚胎发育影响如图 3 所示。

DBP、EE2 单独暴露时,空白对照组和溶剂对照组均未见明显畸形和致死现象,而实验组胚胎发育出现了异常,如尾部弯曲、囊心腔肿大、脊柱弯曲、体长变短等。畸形程度随暴露剂量的增大而加重。

DBP、EE2 联合暴露时,空白对照组和溶剂对照组的胚胎发育正常,没有明显差异,而当 EE2 与 DBP 组合浓度达到 $1.44/0.8$ 时,斑马鱼就会出现囊心腔肿大现象;当达到 $1.8/1$ 时,就会出现脊柱畸形、囊心腔肿大

等畸形现象,当达到 $2.16/1.2$ 时,畸形程度加重,畸形范围增大。这说明 EE2 与 DBP 组合对斑马鱼的胚胎发育有较为显著的影响,随着浓度的增大而显著增强。

2.4 DBP、EE2 等毒性效应联合作用

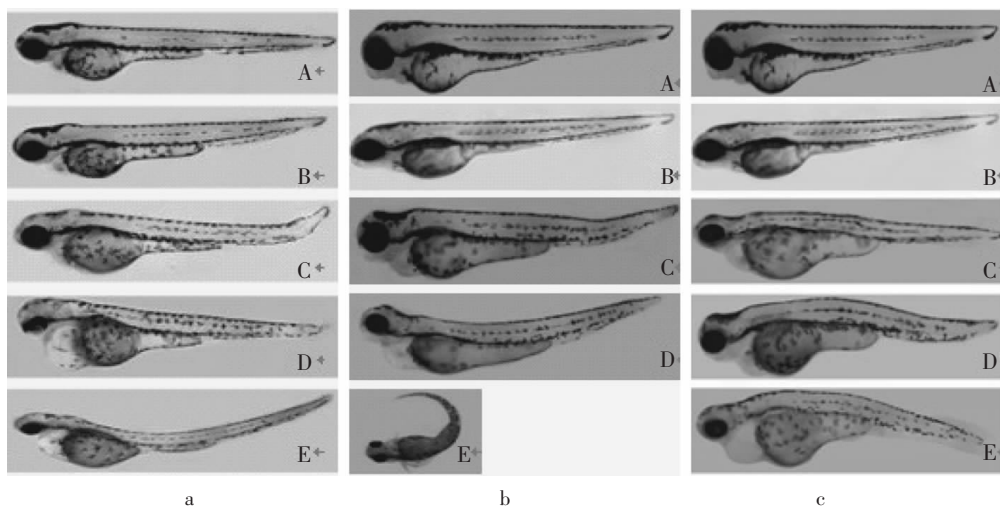
在单一急性毒性试验基础上,按等毒性配比进行试验,测得 80 h 和 96 h 时 DBP 和 EE2 复合暴露对斑马鱼胚胎的 LC_{50} ,分别采用不同评价方法判断两化合物的联合作用类型,结果如表 1 和图 4 所示。不同评价方法对于 DBP 和 EE2 的联合作用类型判断结果一致。EE2 和 DBP 组合在不同时间和浓度有不同的效应类型,在 80 h 时二者之间表现出拮抗作用, 96 h 时则表现出协同作用。

3 讨论

3.1 DBP、EE2 对斑马鱼胚胎的单一毒性

本实验的结果显示,DBP、EE2 的存在对斑马鱼的胚胎发育造成一定的影响,且随着暴露浓度的增大,胚胎死亡率均呈浓度依赖性升高。而对于同一暴露浓度,斑马鱼的致死率随作用时间的延长均呈整体增大趋势。

斑马鱼的胚胎发育需要细胞增殖、迁移、分化和不同起源的细胞之间的相互作用,与多种基因的表达与调控有关。DBP 脂溶性较强,容易通过绒毛膜,可能通过影响相关基因的表达,甚至造成 DNA 损伤,从而



A 是空白对照组,B 是溶剂对照组。a 图是 DBP 单独暴露组,其中 C: $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,D: $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,E: $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;b 图是 EE2 单独暴露组,其中 C: $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,D: $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,E: $3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;c 图是联合暴露组(EE2/DBP),其中 C: $1.44/0.8$,D: $1.8/1$,E: $2.16/1.2$

A is water control and B is solvent control. Figure a shows exposure to DBP, where C: $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,D: $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,E: $2.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Figure b shows exposure to EE2, where C: $2.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,D: $3.0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$,E: $3.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; Figure c shows exposure to a binary mixture(EE2/DBP), where C: $1.44/0.8$,D: $1.8/1$,E: $2.16/1.2$

图 3 96 h DBP 和 EE2 单独暴露及复合暴露下斑马鱼胚胎发育形态

Figure 3 The appearance of zebrafish embryos exposed to DBP, EE2 or a binary mixture of DBP and EE2 at 96 h

表 1 DBP 和 EE2 等毒性配比的联合毒性

Table 1 Joint toxicity of DBP and EE2 with 1:1 toxicity ratio to zebrafish embryos

时间/h	混合 $LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$	各组分 $LC_{50}/mg \cdot L^{-1}$		相加指数		毒性单位	
		EE2	DBP	AI	作用	TU	结果
80	3.375	2.160	1.215	-0.091	拮抗	1.091(0.543+0.548)	拮抗
96	3.027	1.937	1.090	0.021	协同	0.979(0.487+0.492)	协同

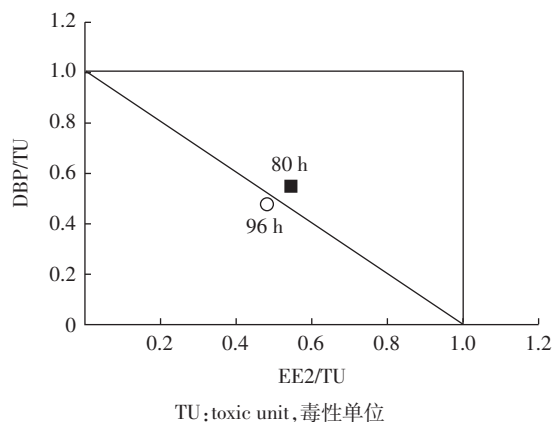


图 4 DBP 和 EE2 联合作用图解

Figure 4 Diagram for joint toxicity of DBP and EE2

破坏细胞增殖和凋亡平衡;或通过竞争干扰胚胎细胞增殖、分化而发挥内分泌干扰效应,破坏胚胎的内分泌系统,从而造成胚胎畸形甚至死亡^[17]。EE2 具有较强的雌激素作用,在胚胎发育早期可明显干扰胚胎发育调控基因的表达,扰乱胚胎发育规律,进而导致胚胎发育畸形和死亡^[10]。

DBP、EE2 也均能影响胚胎的正常孵化。在 72 hpf 前,实验组的斑马鱼胚胎孵化率基本达最大值,而空白组孵化率很低,之后随着孵化时间的延长,斑马鱼的孵化率整体呈浓度依赖性降低,这与之前林玲等^[18]的结果一致。这种现象可能由于这两种物质可以影响渗透压,刺激胚胎孵化;或是吸附于胚胎表面,改变外膜生理生化特性,促使斑马鱼提早脱膜;或提高胚胎体内溶膜酶的活性,使孵化率提前达到峰值,确切机理还有待深入研究。而在本实验中,提早脱膜的斑马鱼发育会受到不同程度的影响,出现各种畸形,过高的暴露浓度会使斑马鱼在孵化前致死,因而最终统计结果表明,孵化率随暴露浓度增加呈降低趋势。

3.2 DBP、EE2 对斑马鱼胚胎的联合毒性

不同浓度的 EE2 与 DBP 组合共同作用对死亡率 and 孵化率的影响为二者单一作用的复合效应。在作用初期,各浓度的 EE2 与 DBP 组合对死亡率影响不大,与 EE2 单独作用结果较一致,但是随着浓度的增大

和暴露时间的延长,死亡率的升高较为明显,这也与二者的作用结果一致;EE2 与 DBP 组合对胚胎的孵化有极为显著的促进作用,但随着作用时间的延长以及 EE2 与 DBP 组合浓度的增大,这种促进作用逐渐减弱,也与二者单独作用结果相似。

EE2 和 DBP 组合在不同的时间和浓度的效果类型不一致。在 80 h 时二者之间表现出拮抗作用,96 h 时则表现出协同作用。拮抗作用可由竞争点位理论^[19]来解释,物质在进入机体后首先形成离子活性形式,然后与生物大分子的电负中心发生结合。EE2 在等毒性溶液中的浓度较高,分子量与 DBP 接近,但相对脂溶性较小[EE2、DBP 的辛醇-水分配系数($\lg K_{ow}$)分别为 4.15^[20]、5.6^[21]],较 DBP 更容易渗透到胚胎细胞中^[12],这样细胞内 EE2 活性离子的浓度就要大得多。大量 EE2 活性离子占据有限结合位,从而降低了 DBP 活性离子的结合机会。EE2 的毒性小于 DBP,因而混合物的毒性降低,联合毒性表现为拮抗效应。而随着时间延长,联合作用效应变为 96 h 的协同作用,可能是因为当两种物质的活性离子共同存在时,绒毛膜遭到破坏,通透性增加,因而毒性增强,产生协同作用^[19]。Warne 等^[22]研究指出,随着混合物中化合物种类增加,混合毒性可能加强,本实验结果与该结论一致。

4 结论

(1)斑马鱼的胚胎发育对 EE2 和 DBP 的毒性作用较为敏感。

(2)DBP 的 96 h- LC_{50} 为 2.219 $mg \cdot L^{-1}$, 低于 EE2 的 3.975 $mg \cdot L^{-1}$,说明对于斑马鱼来说,DBP 的毒性作用高于 EE2,且二者均表现出显著的浓度依赖性和时间累加效应。

(3)EE2 和 DBP 对斑马鱼胚胎的发育影响现象取决于所使用的浓度和暴露时间。

(4)EE2 和 DBP 组合在不同时间和浓度有不同效果类型。在 80 h 时二者之间表现出拮抗作用,96 h 时则表现出协同作用。

参考文献:

- [1] Lai K M, Scrimshaw M D, Lester J N. Prediction of the bioaccumulation factors and body burden of natural and synthetic estrogens in aquatic organisms in the river systems[J]. *Science of the Total Environment*, 2002, 289(1-3): 159-168.
- [2] Thorpe K L, Cummings R I, Hutchinson T H, et al. Relative potencies and combination effects of steroidal estrogens in fish[J]. *Environmental Science & Technology*, 2003, 37(6): 1142-1149.
- [3] Huang P C, Tien C J, Sun Y M, et al. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(4): 539-544.
- [4] Matsumoto M, Hirata-Koizumi M, Ema M. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 50(1): 37-49.
- [5] Harrison P T C, Holmes P, Humfrey C D N. Reproductive health in humans and wildlife: Are adverse trends associated with environmental chemical exposure?[J]. *Science of the Total Environment*, 1997, 205(2-3): 97-106.
- [6] Ortiz-Zarragoitia M, Trant J M, Cajaraville M P. Effects of dibutylphthalate and ethynylestradiol on liver peroxisomes, reproduction, and development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(9): 2394-2404.
- [7] Westernfield M. The zebrafish book[M]. Eugene: University of Oregon Press, 1995: 16-21.
- [8] GB/T 13267—1991, 水质: 物质对淡水鱼(斑马鱼)急性毒性的测定方法[S].
GB/T 13267—1991, Water quality: Determination of the acute toxicity of substance to a freshwater fish (*Danio rerio* Hamilton-Buchanan) [S].
- [9] ISO 7346/2: 1996, Water quality: Determination of the acute lethal toxicity of substances to a freshwater fish [*Brachydanio rerio* Hamilton-Buchanan (Teleostei, Cyprinidae)] - Part 2: Semi-static method[S].
- [10] 佟军威, 张靖溥, 孟杰. 17 α -乙炔雌二醇对斑马鱼胚胎发育的致畸作用及其基因靶位[J]. 药学报, 2011, 46(1): 50-57.
TONG Jun-wei, ZHANG Jing-pu, MENG Jie. Teratogenesis and gene targets of 17 α -ethynylestradiol on embryonic development in zebrafish[J]. *Acta Pharmaceutica Sinica*, 2011, 46(1): 50-57.
- [11] Versonnen B J, Arijis K, Verslycke T, et al. In vitro and in vivo estrogenicity and toxicity of o-, m-, and p-dichlorobenzene[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2003, 22(2): 329-335.
- [12] Staples A, Adams W J, Parkerton T F, et al. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16(5): 875-891.
- [13] 李文英, 熊丽, 刘荣, 等. 邻苯二甲酸二丁酯(DBP)对斑马鱼(*Brachydanio rerio*)生理生化特性的影响[J]. 生态毒理学报, 2007, 2(1): 117-122.
LI Wen-ying, XIONG Li, LIU Rong, et al. Effects of DBP on physiological and biochemical characteristics of *Brachydanio rerio* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2007, 2(1): 117-122.
- [14] Marking L L. Method for assessing additive toxicity of chemical mixtures[J]. *Aquatic Toxicology and Harzard Evalution, ASTM. STP Publication*, 1977, 634: 99-108.
- [15] Marking L L, Dawson V K. Method of assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemicals[J]. *US Fish Wildl Serv Invest Fish Control*, 1975, 67: 1-8.
- [16] 修瑞琴, 傅迎春, 许永香. 硒与氟离子对美丽猛水蚤的联合毒性[J]. 环境科学, 1995, 16(1): 26-28.
XIU Rui-qin, FU Ying-chun, XU Yong-xiang. Joint toxicity of selenium and fluoride to *N. spuipeis* [J]. *Environmental Science*, 1995, 16(1): 26-28.
- [17] Liu Y, Guan Y, Yang Z, et al. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *haliotis diversicolor supertexta* [J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18(3): 293-303.
- [18] 林玲, 王玉柱, 丁训诚, 等. 邻苯二甲酸二丁酯对斑马鱼胚胎发育毒性的研究[J]. 卫生研究, 2008, 37(3): 278-280.
LIN Ling, WANG Yu-zhu, DING Xun-cheng, et al. Embryotoxicity of di-n-butyl phthalate to zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryos [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2008, 37(3): 278-280.
- [19] 端正花, 郑敏, 朱琳. 五氯酚和双酚A联合作用对斑马鱼胚胎发育的毒性[J]. 中国环境科学, 2006, 26(增刊): 121-124.
DUAN Zheng-hua, ZHENG Min, ZHU Lin. Toxicity of joint action of pentachlorophenol and bisphenol A on the growth of zebrafish (*Brachydanio rerio*) embryo [J]. *China Environmental Science*, 2006, 26(Suppl): 121-124.
- [20] Ying G G, Kookana R S, Dillon P. Sorption and degradation of selected five endocrine disrupting chemicals in aquifer material[J]. *Water Research*, 2003, 37(15): 3785-3791.
- [21] Staples C A, Peterson D R, Parkerton T F, et al. The environmental fate of phthalate esters: A literature review[J]. *Chemosphere*, 1997, 35(4): 667-749.
- [22] Warne M S J, Hawker D W. The number of components in a mixture determines whether synergistic and antagonistic or additive toxicity predominate—the funnel hypothesis[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 1995, 31(1): 23-28.