

文章编号:1000-0615(2007)05-0568-07

久效磷对金鱼精巢超显微结构和特征性酶活性的影响

房燕, 汝少国, 邢欣, 姜明
(中国海洋大学海洋生命学院, 山东 青岛 266003)

摘要:用0.01、0.10、1.00 mg · L⁻¹久效磷暴露金鱼21 d, 测定了精巢乳酸脱氢酶(LDH)、酸性磷酸酶(ACP)、碱性磷酸酶(ALP)的活性, 并观察了精巢显微和超显微结构的变化。结果表明: 久效磷暴露21 d, 精巢小叶基膜断裂, Leydig氏细胞水肿, 小叶间质扩大, 支持细胞核膜溶解, 胞质内脂滴和髓磷脂象数量增多。1.00 mg · L⁻¹久效磷造成了生殖腺指数的显著下降, 对精巢发育有一定程度的延迟作用。随着久效磷暴露浓度的升高, LDH, ACP, ALP的活性逐渐下降, 0.10、1.00 mg · L⁻¹久效磷暴露组精巢LDH, ACP的活性下降显著, 而各暴露组的精巢ALP活性呈现不显著下降趋势。推测久效磷可能通过损伤精巢超显微结构和降低LDH, ACP和ALP活性, 干扰精巢能量代谢, 造成对雄性金鱼的生殖毒性。

关键词: 金鱼; 久效磷; 乳酸脱氢酶; 磷酸酶; 超显微结构; 精巢

中图分类号: X 503.225

文献标识码: A

The influence of monocrotophos on microstructure, ultrastructure and characteristic enzyme in goldfish (*Carassius auratus*) testis

FANG Yan, RU Shao-guo, BING Xin, JIANG Ming

(Marine Life Science College, Ocean University of China, Qingdao 266003, China)

Abstract: After 21 days' exposure of adult male goldfish (*Carassius auratus*) to monocrotophos (0.01, 0.10, 1.00 mg · L⁻¹), we measured activities of lactate dehydrogenase (LDH), acid phosphatase (ACP), alkaline phosphatase (ALP) in testis and observed micro-ultrastructure of testis by light and electron microscopy separately. It was found that the gonado-somatic (GSI) decreased significantly, ground membrane dissolved, Leydig's cell swelled and interstitial tissue enlarged, as a result of exposure to monocrotophos at the concentration of 1.00 mg · L⁻¹. Monocrotophos induced dissolution of nuclear membrane of the Sertoli's cell, and the increase of lipid droplet and myelin-like figure number in Sertoli's cell. The activities of LDH, ACP and ALP in testis decreased gradually, as the exposure concentration of monocrotophos increased. Exposure to monocrotophos at concentrations of 0.10 and 1.00 mg · L⁻¹ resulted in the decrease of LDH and ACP activities in testis. However, the ALP activity did not decrease significantly at various exposure concentrations. It is supposed that the energy metabolism was interrupted as a result of the changes of micro-ultrastructure and the decrease of LDH, ACP, ALP activities in goldfish

收稿日期: 2006-12-27

资助项目: 国家自然科学基金资助项目(30671618)

作者简介: 房燕(1983-), 女, 山东郓城人, 硕士研究生, 从事内分泌扰乱化学物质研究。Tel: 0532-82031962, E-mail: fly12689@163.com

通讯作者: 汝少国, E-mail: rusg@mail.ouc.edu.cn

testis, which caused the reproductive toxicity effect.

Key words: goldfish; monocrotophos; lactate dehydrogenase(LDH); phosphatase; ultrastructure; testis

久效磷(monocrotophos)是一种高毒的有机磷农药,生产和使用量较大,据康跃惠等^[1]报道广州某水源地久效磷的含量高达 $0.165 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,严重超过国家饮用水标准 $0.10 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,可见我国久效磷污染问题已十分严重。因此,我国陆续开展了久效磷的毒性效应及其作用机制研究工作。魏渲辉等^[2]和闫建国等^[3]报道了久效磷对鱼类 Na^+/K^+ -ATP酶、乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和磷酸酶活性等生理、生化指标的影响。Banu等^[4]报道久效磷除具有急性、慢性毒性外还有遗传毒性,邴欣等^[5]以金鱼卵黄原蛋白为生物标志物确定了久效磷具有环境雌激素活性,其结果表明久效磷可能对鱼类具有生殖毒性作用。但是,到目前为止,关于久效磷对鱼类生殖毒性及其作用机制的研究还未见报道。精巢中乳酸脱氢酶(LDH)、碱性磷酸酶(ALP)、酸性磷酸酶(ACP)是参与调控精巢不同的生理过程和指示精巢正常机能的特征性酶^[6]。本文以金鱼精巢LDH、ACP、ALP3种特征性酶活变化,结合精巢的超显微结构和生殖腺指数的变化,探讨了久效磷对鱼类的生殖毒性及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

久效磷,化学名称:O,O-二甲基-O-[1-甲基-2-(甲基氨基甲酰)]乙基磷酸酯,分子式: $\text{C}_7\text{H}_{14}\text{O}_5\text{NP}$ 。试验用久效磷为青岛农药厂生产的40%水溶性制剂,以40%水溶性制剂作为原液,配制 $1 \text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 久效磷农药储备液, 4°C 避光保存,每周更新储备液一次。

金鱼(*Carassius auratus*)购自青岛市南山市场,在中国海洋大学生态毒理实验室驯养2周后进行试验。金鱼体长(8.53 ± 0.83)cm,体重(24.05 ± 2.74)g。

1.2 久效磷暴露试验

久效磷农药暴露试验 按邴欣等^[5]报道的方法,用 $0.01 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $0.10 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $1.00 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的久效磷农药暴露金鱼21d,同时设对照组。

显微和超微样品制备 活体解剖金鱼,称

量生殖腺重量,并取中部生殖腺,大小为 $0.5 \text{cm} \times 0.5 \text{cm} \times 0.2 \text{cm}$,Bouin氏液固定24h后更换成70%乙醇,样品经过常规乙醇脱水,石蜡包埋和组织切片(厚 $6 \sim 7 \mu\text{m}$),常规苏木精-伊红(H-E)染色,Olympus-BH2显微镜观察并照相。将中部生殖腺切成小于 0.5mm^3 的组织块,用2.5%戊二醛($0.1 \text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液配制,pH 7.4)固定3h(4°C),然后用1%锇酸后固定2h。经乙醇梯度脱水,Epon812包埋后,LKB-NOVA超薄切片机切片($50 \sim 80 \text{nm}$),柠檬酸铅和醋酸铀双染色,日立H-7000透射电子显微镜观察并摄影。

生殖腺指数(GSI) 样本为每组10尾,计算公式为: $\text{GSI}(\%) = (\text{生殖腺重}/\text{体重}) \times 100$ 。

1.3 生殖腺酶活性测定

参照Malbrouck等^[7]的方法,用玻璃匀浆器将精巢和预冷至 4°C 的匀浆缓冲液按照1:5(g:mL)的比例于冰水浴中匀浆,匀浆液在 4°C 离心30min(15000g),取上清液用于测定精巢酶活性。匀浆缓冲液为 $50 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris-HCl、 $150 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ KCl、 $5 \text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA,pH 7.4。

乳酸脱氢酶(LDH)活性测定 采用乳酸脱氢酶连续监测法^[8]。

碱性磷酸酶(ALP)和酸性磷酸酶(ACP)活性测定 参照磷酸苯二钠法^[9],ALP的活性单位定义为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$ 即每mg蛋白质在 37°C 与底物作用15min,产生1mg酚为1U;ACP的活性单位定义为 $\text{U} \cdot \text{mg}^{-1} \text{pro}$ 即每mg蛋白质在 37°C 与底物作用60min,产生1mg酚为1U。

蛋白含量测定 酶液中的蛋白质含量测定采用考马斯亮蓝法,用小牛血清蛋白(BSA)作为标准。

1.4 数据处理

数据结果表示为5次重复的平均值 \pm 标准差,并应用Spss 10.0对试验数据做方差分析,处理组和对照之间的差异采用 t 检验进行分析, $P < 0.05$ 为差异显著; $P < 0.01$ 为差异极显著。

2 结果与分析

2.1 久效磷对精巢显微结构的影响

对照组精巢发育良好,精小叶基膜完整,小叶

腔内充满精子(图版 I-1)。久效磷暴露 21 d, 0.01 mg · L⁻¹ 暴露组, Leydig 氏细胞肿胀(图版 I-2); 0.10 mg · L⁻¹ 暴露组, Leydig 氏细胞肿胀, 基膜溶解, 小叶间质扩大(图版 I-3); 1.00 mg · L⁻¹ 暴露组, Leydig 氏细胞肿胀并游离, 基膜溶解, 小叶间质进一步扩大(图版 I-4)。

2.2 久效磷对精巢超微结构的影响

对照组精巢支持细胞核膜完整(图版 II-1), 0.01 mg · L⁻¹ 暴露组, 支持细胞核膜局部溶解, 胞质内脂滴和髓磷脂象数量增多(图版 II-2), 0.10 mg · L⁻¹ 暴露组, 支持细胞核膜溶解更加严重, 胞质内脂滴和髓磷脂象数量增多加剧, 坏死的精子数量明显增多(图版 II-3)。

2.3 久效磷对雄性金鱼生殖腺指数的影响

久效磷暴露 21 d, 对照组和各暴露组雄性金鱼 GSI 的变化见图 1, 可见随暴露浓度的升高 GSI 逐渐降低, 经显著性检验, 1.00 mg · L⁻¹ 暴露组与对照组相比差异显著($P < 0.05$), 而 0.01、0.10 mg · L⁻¹ 暴露组差异并不显著($P > 0.05$)。结果表明 1.00 mg · L⁻¹ 久效磷对金鱼精巢发育有一定程度延迟作用。

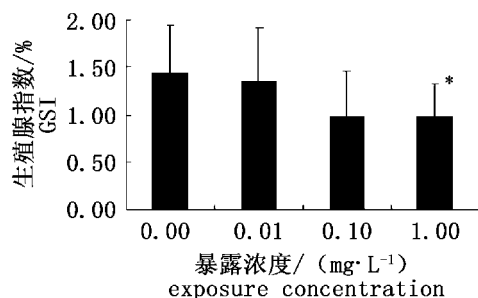


图 1 久效磷对生殖腺指数的影响(* $P < 0.05$)

Fig. 1 The effect of monocrotophos on GSI of male goldfish

2.4 久效磷对精巢乳酸脱氢酶活性的影响

久效磷暴露 21 d, 对照组和 0.01、0.10、1.00 mg · L⁻¹ 暴露组精巢 LDH 的活性分别为(4 567.58 ± 399.42)、(4 264.99 ± 862.89)、(3 566.76 ± 640.52)、(3 365.73 ± 318.81) U · mg⁻¹ pro(图 2)。可见, 随着暴露浓度的升高, LDH 活性逐渐下降, 其中 0.10 mg · L⁻¹ 暴露组下降显著($P < 0.05$), 1.00 mg · L⁻¹ 暴露组下降极显著($P < 0.01$)。

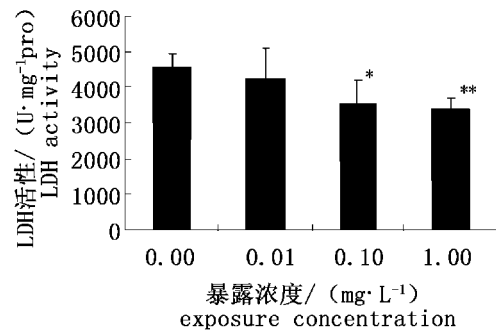


图 2 久效磷对乳酸脱氢酶活性的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 2 The effect of monocrotophos on LDH activity in testis of goldfish

2.5 久效磷对精巢酸性和碱性磷酸酶活性的影响

久效磷暴露 21 d, 对照组精巢 ACP 活性为(465.61 ± 76.75) U · mg⁻¹ pro, 各暴露组分别为(399.89 ± 50.55)、(304.20 ± 32.67)、(268.46 ± 31.60) U · mg⁻¹ pro(图 3)。结果表明 0.10、1.00 mg · L⁻¹ 暴露组 ACP 活性与对照组相比, 下降极显著($P < 0.01$)。但是随着久效磷暴露浓度升高, 精巢 ALP 活性变化并不显著($P > 0.05$), 对照组和 0.01、0.10、1.00 mg · L⁻¹ 暴露组精巢 ALP 活性分别为(29.97 ± 10.80)、(25.66 ± 4.02)、(24.00 ± 4.47)、(16.70 ± 7.17) U · mg⁻¹ pro(图 4)。

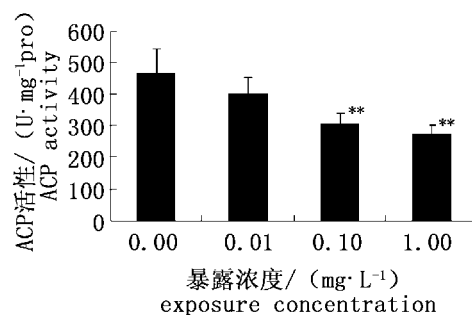


图 3 久效磷对酸性磷酸酶活性的影响(** $P < 0.01$)

Fig. 3 The effect of monocrotophos on ACP activity in testis of goldfish

3 讨论

GSI 是检测污染物生殖毒性的常用指标, GSI 变化可以指示性腺或下丘脑、垂体的机能。Gimeno

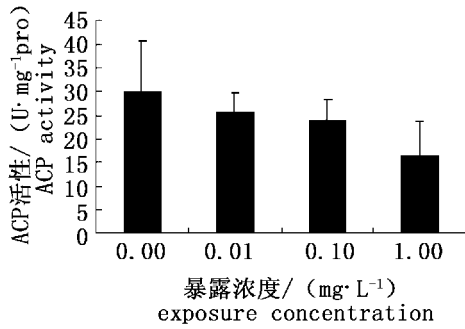


图4 久效磷对碱性磷酸酶活性的影响

Fig.4 The effect of monocrotophos on ALP activity in testis of goldfish

等^[10]用 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 17β -雌二醇(E_2)暴露性成熟雄性鲤1个月,发现鲤的GSI显著下降。Jobling等^[11]用烷基酚暴露性成熟雄性虹鳟21d后发现,GSI显著下降,表明烷基酚对虹鳟精巢的发育具有延迟作用。本文研究结果表明, $1.00 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的久效磷暴露雄性金鱼21d,GSI与对照相比显著下降,表明久效磷对精巢的发育也具有延迟作用。

久效磷造成的精巢发育的延迟,主要表现为久效磷对精巢结构和生理、生化功能的损伤。久效磷暴露21d,精巢小叶基膜断裂、Leydig氏细胞水肿,且随着暴露浓度的升高,损伤越严重。Kinnberg等^[12]分别用 $960 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 壬基酚和 $96 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ E_2 暴露性成熟新月鱼(*Xiphophorus maculatus*)28d后发现,精巢支持细胞水肿、变形,精小囊基膜破裂。Nielsen等^[13]用 $200 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 17α -乙炔雌二醇(EE_2)暴露孔雀鱼(*Poecilia reticulata*)108d,孔雀鱼间质扩大,支持细胞水肿。Islinger等^[14]用 $25 \text{ng} \cdot \text{L}^{-1}$ EE_2 暴露斑马鱼21d,也观察到与本试验精巢超微结构变化相似的现象。由此可见,久效磷对鱼类精巢结构的损伤作用和壬基酚、 E_2 和 EE_2 较为相似。

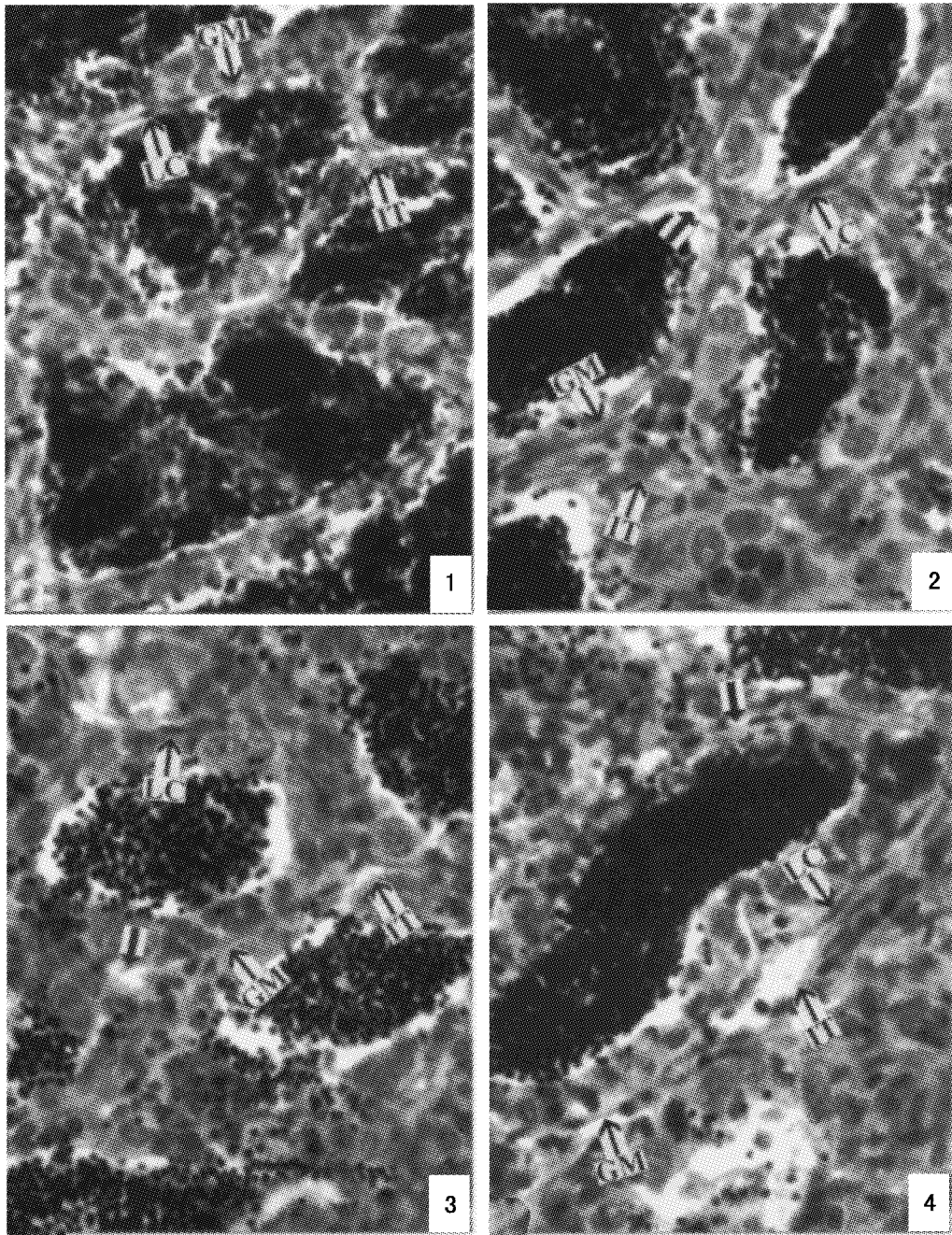
久效磷对精巢生理、生化功能的影响,主要表现为精巢LDH、ACP和ALP3类特征性酶活性的变化,且这3类酶活性是指示外源化学物质产生组织损伤的常用指标。精巢特征性酶活性是保证精子正常发生的重要条件,LDH主要参与精巢能量的代谢,是生精细胞成熟的标志酶之一;ACP是衡量精巢是否有生精障碍的指标;ALP与精巢生精细胞的分裂及葡萄糖向各级生精细胞的转运有关^[6],是与膜组织结合的酶类,其活性下降是

细胞膜尤其是输精管膜受损的表征^[15]。Rao^[16]用 $1.15 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 久效磷暴露莫桑比克罗非鱼(*Oreochromis mossambicus*)30d,造成肝脏LDH,ACP和ALP活性下降。贾秀英等^[17]对蟾蜍分别进行铅和镉的腹腔染毒7d,造成了蟾蜍精巢LDH活性的显著下降。Corpas等^[18]用含有铅的食物喂食怀孕的母狗至分娩,并继续以含铅食物喂食出生的雄性小狗21d,发现小狗ALP,ACP显著下降。本文研究结果表明, 0.01 、 0.10 、 $1.00 \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 久效磷暴露金鱼21d,金鱼精巢LDH,ACP活性显著下降,ALP活性呈不显著下降趋势。酶活性的下降指示该酶所参与的生理过程的衰退^[19]。综合文献分析认为,LDH活性的显著下降提示久效磷可能抑制精巢糖酵解过程,干扰精巢能量代谢;ACP的显著下降,表明精巢产生生精障碍;ALP的下降表明精巢膜组织结构的损伤。由此可见,精巢LDH,ACP和ALP活性的变化与精巢结构的变化结果是一致的。因此,我们推测从组织结构和生理、生化水平上,久效磷可能是通过损伤精巢组织结构和降低LDH,ACP和ALP活性,干扰精巢能量代谢,造成对雄性金鱼的生殖毒性。但久效磷生殖毒性更深入水平的机制还不清楚,有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 康跃惠,张干,盛国英,等.固相萃取法测定水源水中的有机磷农药[J].中国环境科学,2000,20(1):1-4.
- [2] 魏焯辉,汝少国,姜明,等.久效磷对美国红鱼鳃 Na^+/K^+ -ATP酶活性和超显微结构的影响[J].应用生态学报,2003,14(12):2289-2294.
- [3] 闫建国,汝少国,王蔚.久效磷对黄鳝乙酰胆碱酯酶、羧酸酯酶和磷酸酶活性的影响[J].安全与环境学报,2006,6(3):61-63.
- [4] Banu S B, Danadevi K, Rahman F M, et al. Genotoxic effect of monocrotophos to sentinel species using comet assay[J]. Food and Chemical Toxicology, 2001, 39:361-366.
- [5] 邴欣,汝少国,姜明,等.久效磷对雄性金鱼的生殖毒性研究[J].中国海洋大学学报,2004,34(69):69-74.
- [6] Jiang Q G, Yu Y Q. The theory and method of male reproduction toxicity[M]. Beijing Medical University and Chinese Xiehe Medical University Press, 1994:225.

- [7] Malbrouck C, Trausch G, Devos P, *et al.* Hepatic accumulation and effects of microcystin-LR on juvenile goldfish *Carassius auratus* L [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C*, 2003, 135:39 – 48.
- [8] 陶义训, 冯仁丰, 孙 荫, 等. 实用医学检验学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1996: 431 – 432.
- [9] Liu S Q, Jiang X L, Mou H J, *et al.* Effects of immunopoiysacchaeide on LSZ, ALP, ACP and POD activities of *Penaeus Chinensis* serum [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 1999, 30 (3): 278 – 283.
- [10] Gimeno S, Komen H, Jobling S, *et al.* Demasculinisation of sexually mature male common carp, *Cyprinus carpio*, exposed to 4-tert-pentylphenol during spermatogenesis [J]. *Aquatic Toxicology*, 1998, 43:93 – 109.
- [11] Jobling S, Sheahan D, Osborne J A, *et al.* Inhibition of testicular growth in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to estrogenic alkylphenolic chemicals [J]. *Environ Toxicol Chem*, 1996, 15:194 – 202.
- [12] Kinnberg K, Korsgaard B, Bjerregaard P. Concentration-dependent effects of nonylphenol on testis structure in adult platyfish *Xiphophorus maculatus* [J]. *Marine Environmental Research*, 2000, 50:169 – 173.
- [13] Nielsen L, Baatrup E. Quantitative studies on the effects of environmental estrogens on the testis of the guppy, *Poecilia reticulata* [J]. *Aquatic Toxicology*, 2006, 80:140 – 148.
- [14] Islinger M, Willimski D, Völkl A, *et al.* Effects of 17 α -ethinylestradiol on the expression of three estrogen-responsive genes and cellular ultrastructure of liver and testis in male zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2003, 62:85 – 103.
- [15] Ghorpade N, Mehta V, Khare M. Toxicity study of diethyl phthalate on freshwater fish *Cirrhina mrigala* [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, 53:255 – 258.
- [16] Rao V J. Biochemical alterations in euryhaline fish, *Oreochromis mossambicus* exposed to sub-lethal concentrations of an organophosphorus insecticide, monocrotophos [J]. *Chemosphere*, 2006, 65:1814 – 1820.
- [17] 贾秀英, 董爱华. 镉、铅对蟾蜍精巢毒作用的酶学研究 [J]. *生态学报*, 2004, 24(10):2329 – 2333.
- [18] Corpas I, Castillo M, Marquina D, *et al.* Lead intoxication in gestational and lactation periods alters the development of male reproductive organs [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2002, 53:259 – 266.
- [19] Misshra R, Shukla P S. Impact of endosulfan on lactate dehydrogenase from the freshwater catfish *Clarias batrachus* [J]. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 1997, 57:220 – 234.

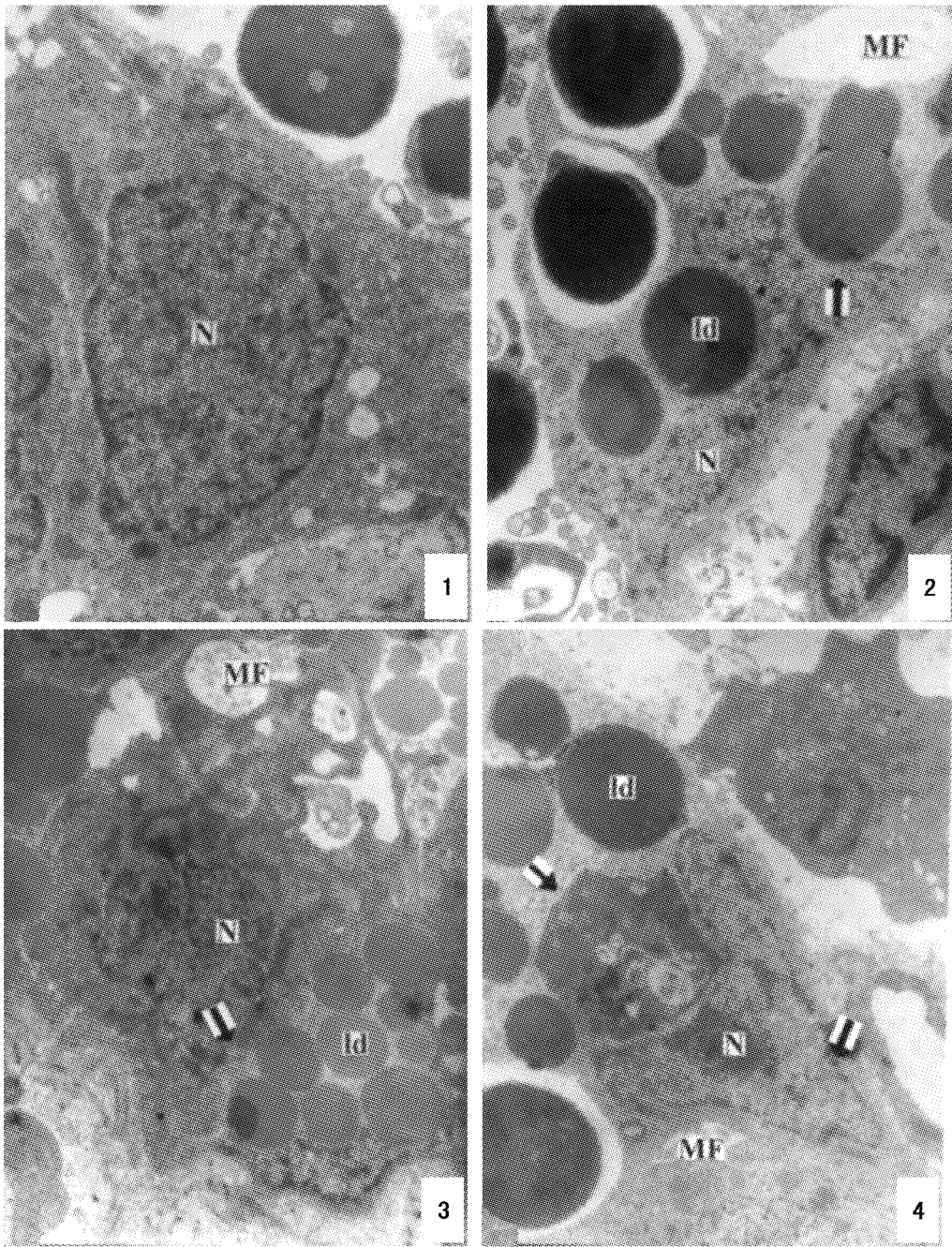


图版 I

1. 对照组,精小叶基膜完整,×6 500; 2. $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组,Leydig 氏细胞肿胀,×6 500; 3. $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组,Leydig 氏细胞肿胀,基膜溶解,小叶间质扩大,×6 500; 4. $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组,Leydig 氏细胞肿胀并游离,基膜溶解,小叶间质进一步扩大,×6 500
GM: 基膜, LC: Leydig 氏细胞, IT: 小叶间质, \uparrow : 基膜溶解

Plate I

1. control, complete ground membrane of lobules, ×6 500; 2. exposure concentration of $0.01 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, swelled Leydig's cell, ×6 500; 3. exposure concentration of $0.10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, swelled Leydig's cell, dissolved ground membrane and enlarged interstitial tissue, ×6 500; 4. exposure concentration of $1.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, further swelled Leydig's cell, dissolved ground membrane and enlarged interstitial tissue, ×6 500
GM: ground membrane, LC: Leydig's cell, IT: interstitial tissue, \uparrow : dissolved ground membrane



图版 II

1. 对照组,精巢支持细胞核膜完整, $\times 12\ 000$; 2. $0.01\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组,支持细胞核膜部分溶解,胞质内脂滴和髓磷脂象数量增多, $\times 9\ 800$; 3. $0.10\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组,支持细胞核膜溶解更加严重,胞质内脂滴和髓磷脂象数量增多加剧, $\times 7\ 000$; 4. $0.10\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组,坏死精子, $\times 10\ 000$; N: 细胞核; ld: 脂滴; MF: 髓磷脂象; ♠: 核膜溶解; ♯: 坏死的精子

Plate II

1. control, the complete nuclear membrane of the Sertoli's cell, $\times 12\ 000$; 2. exposure concentration of $0.01\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, dissolved nuclear membrane of the Sertoli's cell, and increased number of lipid droplet and myelin-like figure, $\times 9\ 800$; 3. exposure concentration of $0.10\ \text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$, further dissolved nuclear membrane of the Sertoli's cell, and more increase number of lipid droplet and myelin-like figure, $\times 7\ 000$; 4. sperm necrosis, $\times 10\ 000$; N: nuclear; ld: lipid droplet; MF: myelin-like figure; ♠: dissolved nuclear membrane; ♯: sperm necrosis