

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190308001

付娟娟, 郭勇勇, 韩建, 等. 苯并芘和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯复合暴露对稀有鮡鲫的内分泌干扰效应研究[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(6): 93-103

Fu J J, Guo Y Y, Han J, et al. Endocrine disruption effects of benzo(a)pyrene and di-2-ethylhexyl phthalate on Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(6): 93-103 (in Chinese)

苯并芘和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯复合暴露对稀有鮡鲫的内分泌干扰效应研究

付娟娟^{1,2}, 郭勇勇^{1,*}, 韩建¹, 杨丽华¹, 周炳升¹, 李云峰³, 倪朝辉³

1. 中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点实验室, 武汉 430072

2. 中国科学院大学, 北京 100049

3. 中国水产科学研究院长江水产研究所, 武汉 430223

收稿日期: 2019-03-08 录用日期: 2019-05-21

摘要: 为评价典型有机污染物共存情况下对长江上游三峡库区特有珍稀鱼类的环境风险, 以稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)为对象, 研究了多环芳烃和酞酸酯的代表物苯并芘(BaP)和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)单独及复合暴露而引起的内分泌干扰效应。将成年稀有鮡鲫暴露于不同浓度的 BaP(0.1、1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、DEHP(10、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和 BaP+DEHP((0.1+10)、(1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)中 28 d 后, 测定了体质系数、性激素含量、下丘脑-垂体-性腺(HPG)轴和肝脏中与生殖相关基因的表达。结果表明: 在雌鱼中, 单独 BaP 或 DEHP 暴露对鱼体性激素含量、基因表达量无显著影响; BaP 和 DEHP 复合暴露时, 高浓度组睾酮(T)含量升高但雌二醇(E2)含量下降, *fish*、*vtg*、*cyp17* 和 *17 β -hsd* 基因表达量上调, *cyp19a* 则下调, 表现出协同毒性。因而雌鱼中性激素水平的改变可能与类固醇合成相关基因表达量的改变有关。而无论在单独暴露或是复合暴露情况下, 对雄鱼体内性激素无显著影响。以上检测到的激素或基因表达量的改变主要发生在高剂量的复合暴露组中, 而长江上游三峡库区水体中多环芳烃和酞酸酯含量低于暴露的最低浓度, 因此推测, 库区存在的多环芳烃和酞酸酯同时作用时不会对三峡库区上游水体中的鱼类产生生殖内分泌干扰效应。

关键词: 苯并芘; 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯; 稀有鮡鲫; 内分泌干扰效应; 风险评估

文章编号: 1673-5897(2019)6-093-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Endocrine Disruption Effects of Benzo (a) pyrene and Di-2-ethylhexyl Phthalate on Chinese Rare Minnow (*Gobiocypris rarus*)

Fu Juanjuan^{1,2}, Guo Yongyong^{1,*}, Han Jian¹, Yang Lihua¹, Zhou Bingsheng¹, Li Yunfeng³, Ni Zhaohui³

1. State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

3. Yangtze River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Wuhan 430223, China

Received 8 March 2019 accepted 21 May 2019

Abstract: The potential impact of environmental contaminants on endemic fish species that inhabit the Three

基金项目: 中国长江三峡工程开发总公司科研项目(07011034, 0799555); 南水北调中线输水水质预警与业务化管理平台(2017ZX07108-001)

作者简介: 付娟娟(1995—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: fujuanjuan@ihb.ac.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: yyguo@ihb.ac.cn

Gorge Reservoir (TGR) has raised increasing concern. In the present study, we investigated the combined endocrine disrupting effects of benzo(a)pyrene (BaP) and di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) on the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*), a type of endemic fish distributed in upstream of the Yangtze River. Adult rare minnows were exposed to BaP (0.1 or 1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), DEHP (10 or 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) or a mixture of both (BaP+DEHP: (0.1+10), or (1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 28 days. Results showed that no significant difference of sex hormones or gene transcription was observed by exposure to BaP, DEHP alone or combination in males. However, in the BaP+DEHP co-exposure ((1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) group, plasma concentrations of 17 β -estradiol (E2) and testosterone (T) in females were significantly altered, exerting synergy toxic effect. In addition, combined exposure to BaP and DEHP ((1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) caused increase of plasma T levels and T/E2 ratio in females compared to BaP or DEHP exposure alone, suggesting an additive effect when BaP is supplemented with DEHP. These altered sex hormones in females were accompanied by modified gene transcription of *fsb*, *vtg*, *cyp17*, *17 β -hsd* and *cyp19a*. It should be noted that the observed alterations of sex hormones and gene transcription occurred mostly in the high-dose combined exposure group ((1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), which are higher than the concentration detected in TGR surface water. Therefore, it is suggested that environment concentration of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalates alone or in combination might not disturb the endocrine system of the rare minnow in the TGR.

Keywords: benzo(a)pyrene; di-(2-ethylhexyl)phthalate; Chinese rare minnow; *Gobiocypris rarus*; endocrine disrupting effects; risk assessment

长江是亚洲第一长河,也是中国水量最丰富的河流,其水环境与中国人们生活息息相关。长期调查表明,长江水环境中存在多种有机污染物,例如,邻苯二甲酸酯(phthalic acid esters, PAEs)、多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAHs)和多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)等。

邻苯二甲酸酯(PAEs),又称酞酸酯,广泛应用于塑料制品、化妆品、油漆、食品包装、儿童玩具、润滑剂和农药等制造行业中。随着经济的发展,PAEs的产量和使用量不断增加,据估计全球PAEs的总产量已超过800万t^[1],而中国是PAEs的最大进口国,到2010年,中国的PAEs使用量高达136万t,到2015年,中国PAEs年均使用量增长了约7.7%^[2]。在酞酸酯中,邻苯二甲酸二乙基己酯(di-(2-ethylhexyl)phthalate, DEHP)是目前使用最为广泛的一种典型的增塑剂,在中国,DEHP年产量占PAEs总产量的80%以上^[3],因此是酞酸酯中最主要的增塑剂。目前,DEHP已在全球的非生物介质中以及野生动物和人类的血液、尿液中都不同程度的检出,是分布非常广泛的有机污染物,大量DEHP的毒性研究结果表明,DEHP具有生殖毒性、胚胎毒性、肝脏毒性、免疫毒性及致癌性等多种毒性^[4-6]。

多环芳烃(PAHs)是一类广泛存在于环境中的有机污染物,主要是石油、煤等化石燃料和木材、烟草等有机物在不完全燃烧过程中产生的^[7];另一方面,

在森林火灾和火山爆发等自然现象中也可产生PAHs。PAHs可以通过燃料排放和石油泄漏等途径直接进入水体中,也可以通过大气循环、迁移转化等间接途径污染水体。中国水环境中PAHs污染状况较为严重,在中国长江流域、珠江流域以及辽河流域等水体和沉积物中均检出不同含量的PAHs^[8-9],并且PAHs总量最高达到12.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[10]。苯并芘(benzo(a)pyrene, BaP)是PAHs中最具代表性的一种污染物,大量流行病学调查及可疑危险因素分析表明,BaP不仅是强致癌物,还是强致畸、致突变剂和内分泌干扰物。其不仅对呼吸系统、心血管系统和免疫系统等有损伤作用,而且与不良妊娠结局的发生密切相关^[11]。据诸多研究报道,BaP具有抗雌激素活性,会严重影响哺乳动物、水生动物等的生殖系统和繁殖^[12]。

在实际水环境中,污染物并非单一存在,所以单一物质的毒性研究已经不能完全反映其在环境中的风险。2种或多种物质混合后,常会发生毒性的改变,称为毒性的联合作用。因而联合毒性效应能够更加准确、真实地反应污染物的环境风险。联合作用的类型,一般分为协同作用、加和作用、独立作用和拮抗作用。当毒物联合作用的毒性大于其中各毒物成分单独作用毒性的总和时称协同作用;多种毒物同时存在时的毒作用为各毒物分别作用时毒作用的总和时称加和作用;而独立作用的毒性低于相加

作用,但高于其中单项毒物毒性;拮抗作用指的是毒物联合作用的毒性小于其中各毒物成分单独作用毒性的总和。对于预测联合毒性分析的数学模型,应用最广泛的有浓度加和模型(concentration addition, CA)和效应加和模型(response addition, RA)。其中,CA是混合物风险评价中使用最多的方法,特别是在混合物毒性未知的情况下;而RA是混合物每组分效应的加和,混合物中各组分被认为彼此独立作用且不影响其他物质的毒性,适用于独立联合作用。先前的研究结果显示,三峡库区的PAEs和PAHs的范围分别为1.96~7.81和0.23~0.99 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$,是最主要的2类有机污染物^[13-15]。笔者先前研究了PAHs的代表物BaP对稀有鮡鲫的内分泌干扰效应,结果表明,低剂量BaP暴露不会影响鱼体内激素和基因的水平^[16],但是对于长江水体中的多种有毒物质同时存在时对珍稀鱼类的影响还不清楚。基于PAHs和PAEs在长江上游水体中共同存在的客观事实,二者联合暴露更接近于上游珍稀特有鱼类的真实生存环境。因此,研究二者联合暴露的毒理学效应非常必要。

在毒理学研究中,浓度的设置是正式实验的关键,浓度范围一般介于无效应浓度和最大耐受浓度之间。但在不同的试验中浓度梯度的设置也存在着一些差别,例如在急性毒性试验中,污染物浓度水平的设置一般按照等对数间距设置;而在亚慢性试验中,污染物浓度水平的设置一般按几何级数设置。此外,在环境风险评价的研究中,低浓度的设置以实际环境剂量为参考,然后按几何级数递增。本实验选择了长江水域中2种典型的代表污染物DEHP和BaP,以实际环境中BaP和DEHP在长江上游中的含量为依据,各选取2个浓度来探讨2种污染物共存的情况下对稀有鮡鲫的内分泌干扰效应。笔者检测了稀有鮡鲫的形态学指标,血清中性激素水平,以及下丘脑-垂体-性腺轴(hypothalamic-pituitary-gonadal, HPG)相关基因和肝脏中卵黄蛋白原(vitellogenin, VTG)基因的转录水平,以评价BaP和DEHP对稀有鮡鲫潜在的内分泌干扰效应,为预测多种污染物共存条件下对长江上游鱼类的潜在影响提供科学依据。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料与试剂

苯并芘(BaP, CAS: 50-32-8)和邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP, CAS: 117-81-7)购自美国AccuStandard公司,助溶剂为二甲基亚砜(DMSO),购自美国

Amresco公司。内标化合物氘代苯并芘(d12-BaP)和氘代邻苯二甲酸二乙基己酯(d4-DEHP)分别购自美国Supelco和AccuStandard公司。RNA提取试剂(RNAiso Plus reagent)和逆转录试剂盒(PrimerScript RTreagent Kit)购自中国Takara公司。荧光定量试剂盒(SYBR Green PCR Kit)购自日本Toyobo公司。睾酮和雌二醇酶联免疫试剂盒(Testosterone EIA Kit和Estradiol EIA Kit)购自美国Cayman公司。其他所有试剂均为分析纯。

1.2 稀有鮡鲫的饲养和暴露实验

将稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)饲养在经活性炭过滤且充分曝气的自来水中,光暗周期为16 h:8 h,水温维持在(25±1)℃,饲养期间每天投喂饵料2次,饵料为小颗粒商品饵料和刚孵化的丰年虫幼虫。暴露实验开始前,将性成熟的稀有鮡鲫(7月龄)以半静态条件在装有20 L水的缸中驯养2周。每个缸中放置8条雌鱼和8条雄鱼,每天清除多余饵料和排泄物。适应期过后,稀有鮡鲫暴露于0、BaP(0.1、1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)、DEHP(10、100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)和BaP+DEHP((0.1+10)、(1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)的暴露液中28 d,暴露结束前一天下午停止喂食,使实验鱼空腹。暴露组和溶剂对照组中DMSO的终浓度为0.001%(体积比)。每个浓度包括3个平行缸,暴露期间每天更换1/2的暴露液。28 d后,用0.03%的MS-222将鱼麻醉,并用滤纸吸干,称量并记录体长和体重,断尾采血用于激素测定。准确分离脑、肝脏和性腺并称量,于液氮中瞬间冷冻,保存于-80℃中待测。各形态学指标的计算方法如下:

$$K = m/L^3 \times 100\% \quad (1)$$

$$\text{BSI} = m_B/m \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{GSI} = m_G/m \times 100\% \quad (3)$$

$$\text{HSI} = m_H/m \times 100\% \quad (4)$$

式中: K 为条件因子, m 为体重(g), L 为体长(cm),BSI为脑指数, m_B 为脑质量(g),GSI为性腺指数, m_G 为性腺质量,HSI为肝脏指数, m_H 为肝脏质量(g)。

1.3 化学分析

在暴露的第3天和第7天,分别从暴露缸中取换水后水样200 mL,保存于干净的玻璃瓶中,经0.7 μm 玻璃纤维滤膜过滤后收集过滤液,加入对应的内标化合物。水样中BaP及DEHP的抽提方法和分析方法参考之前的文献^[17-18]。DEHP用SILICA/PAS玻璃混合型SPE小柱富集(SPE小柱预先用二氯甲烷、乙腈和超纯水依次活化),流速控制在6~8

mL·min⁻¹。水样富集完毕,真空下将柱干燥 30 min,然后用乙腈洗脱,洗脱液一并收集到干净的玻璃瓶中,高纯氮气缓缓吹干,最后用 0.1 mL 丙酮溶解目标化合物,4 °C 保存待测。BaP 用 C18 填料的 SPE 小柱富集(SPE 小柱预先用二氯甲烷、甲醇和超纯水活化),待测水样以 5 mL·min⁻¹ 的流速流过已活化的 C18 小柱。水样富集完毕真空抽滤 30 min 使柱干燥。然后用二氯甲烷洗脱,洗脱液一并收集到干净的玻璃瓶中,高纯氮气缓缓吹干,最后用 0.1 mL 乙腈溶解目标化合物,4 °C 保存待测。本研究利用气相色谱质谱联用仪(Agilent 7890A-5975C)分析了对照组和各处理组暴露水体中 BaP 和 DEHP 的实际浓度。用程序空白和空白加标来进行质量控制,根据 d4-DEHP 和 d12-BaP 测定加标回收率分别在 89% ~ 106% 和 93% ~ 115% 之间。

1.4 性激素的抽提与测定

暴露结束后,MS-222(0.03%)麻醉实验鱼,断尾采血。每 2 条鱼的血混合一起作为一个平行样,每个浓度雌雄鱼各 4 个平行。在 4 °C、7 000 r·min⁻¹ 条件下离心 5 min,取上清 10 μL 用于性激素的检测。激素抽提法参照 Guo 等^[17]的方法。即每个样品(10 μL 血清)中加入 390 μL Milli-Q 水,涡旋混匀,向其中加入 2 mL 乙醚,混匀器混匀,于 4 °C、5 000 r·min⁻¹ 下离心 10 min,取上清。再用 2 mL 乙醚按上述方法抽提一次,将 2 次抽提后的上清液集中于一个干净离心管中,用氮气吹干后保存于 -80 °C。所得样品用试剂盒中 120 μL EIA buffer 溶解,按照 Cayman Chemical Company 公司的睾酮和雌二醇试剂盒说明书检测性激素含量,其中睾酮的检测

限为 6 pg·mL⁻¹,雌二醇的检测限为 19 pg·mL⁻¹。

1.5 实时荧光定量 PCR

雌雄鱼各不同组织(每个平行由 2 条鱼的样品合并而成)总 RNA 提取、纯化、定量及 cDNA 合成法参照 Wang 等^[19]的方法。为避免基因组 DNA 的污染,初提取物的总 RNA 用 RNase 和 DNaseI 进行消化并纯化。用分光光度计测定样品在 260 和 280 nm 下的吸光值,同时用 1% 的琼脂糖凝胶电泳进一步检测 RNA 的浓度,取 1 μg 总 RNA 进行反转录得到 cDNA,用 SYBR Green I 染料法对目标基因进行定量检测(ABI 7300, Applied Biosystem, USA)。反应体系为 20 μL,其中包括 SYBR Green PCR master mix (Toyobo, Japan) 10 μL、ROX 0.4 μL、5 μmol·L⁻¹ 正义和反义引物各 0.5 μL 及 cDNA 1 μL 和 7.6 μL ddH₂O。实时定量 PCR 程序为:95 °C 预变性 10 min;95 °C 变性 30 s,58 °C 复性 20 s,72 °C 延伸 1 min,40 个循环。内参基因选择 β -actin,内参及目标基因引物序列通过软件 Primer 5 (<http://www.premierbiosoft.com/primerdesign/>)设计,引物序列见表 1。所有样品的定量检测至少重复 3 次,每次 3 个平行。以 2^{-ΔΔCt} 法计算目标基因 mRNA 的相对表达量^[20]。

1.6 数据处理与分析

所有数据均用平均值±标准误表示。通过 Kolmogorov-Smirnov 方法检测数据的正态性,通过 Levene's 检验方法分析数据的方差同质性,数据满足方差同质性,使用 SPSS 13.0 软件(SPSS, Chicago, IL, USA)通过 Dunnett's 检验对数据进行单因素方差分析,当 P<0.05 时,即表示有显著性差异。

表 1 实时荧光定量 PCR 基因引物

Table 1 Primer sequences for the quantitative real-time polymerase chain reaction assays used in this study

基因 Gene	收录号 GenBank No.	引物序列 Primer sequences	
		正义 Forward	反义 Reverse
<i>β-actin</i>	EF597101.1	CTGCTATGTGGCTCTTGACT	CAGGTCCTTACGGATGTCG
<i>lh</i>	KC464361	AAGAGGGCTGTCCGAAAT	CCACCGGGTACGTGATAT
<i>fsH</i>	KC464360	AAGAGTTTACCGTAGCCC	CAGTCTGTGATGTCCGAGTT
<i>vtg</i>	JN004056.1	AGGGAGTATGCAGGACC	CTCAGTGTATGCCAAACCAAT
<i>cyp17</i>	JN858107.1	AGGGACCCGAGTCATTAT	GGGACAGACAAACCATCAC
<i>17β-hsd</i>	KF740472	GAGTGTGAGAGGGCTCCATAA	CCCAGCAGATTGACATCCAG
<i>cyp19a</i>	GU220394.1	GGCTACAAAGTGAAG	GAACGGCTGAAAGAAACGAC

2 结果 (Results)

2.1 暴露水中 BaP 和 DEHP 的实际含量

在2次收集(第3天和第7天)的水样中, BaP 和 DEHP 的含量无明显差异。暴露水中 BaP 和 DEHP 的实际浓度如表 2 所示。为了方便起见,后面仍用名义浓度表示。

2.2 形态学指标

稀有鮕鲫的形态学指标变化如表 3 所示。在雌性实验组中, BaP 和 DEHP 单独暴露对稀有鮕鲫的各形态学指标均未有明显影响,在 BaP 和 DEHP 复合暴露中,均显著增加了雌鱼的脑指数($P<0.05$);在雄性组中,只有在 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 显著增加了稀有鮕鲫的肝脏指数($P<0.05$)。

2.3 血浆中性激素水平

BaP 和 DEHP 单独暴露下,雌性和雄性稀有鮕鲫的性激素水平均未有显著性变化(图 1)。在雌鱼体内, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+ $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 复合暴露组血浆中睾酮(T)含量与对照组及各自单独处理组相比显著性升高(图 1(a)),但血浆中雌二醇(E2)含量与对照组相比显著性降低(图 1(b))。在复合暴露组中,雄性稀有鮕鲫血浆中的 T 和 E2 的水平均未有显著性改变(图 1(c), (d))。T/E2 是性激素异常的敏感指示指标,在雌鱼的 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+ $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 组中,血浆中 T/E2 与对照组和各自的单独处理组相比均显著性升高(图 1(e)),而雄鱼各浓度组与对照组相比都无显著性差异(图 1(f))。

2.4 基因表达

对稀有鮕鲫 HPG 轴和肝脏中相关基因进行了

检测,结果表明,与对照组相比,雌鱼中 *lh* 和 *17 β -hsd* 基因表达量在 BaP 和 DEHP 单独暴露时均无显著差异(表 4),单独 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 处理显著下调了 *cyp19a* 基因的表达(表 4),但显著升高了 *fsh* 和 *cyp17* 的表达量(表 4);与对照组相比,复合暴露的 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+ $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 组中, *fsh*、*vtg*、*cyp17* 和 *17 β -hsd* 基因表达量显著上调了 1.62、2.73、1.96 和 1.28 倍(表 4),*cyp19a* 则显著下调了 -1.56 倍(表 4)。

雄性稀有鮕鲫相关基因中, *fsh*、*cyp17*、*17 β -hsd* 和 *cyp19a* 的表达量在 BaP、DEHP 单独暴露以及二者复合暴露下均无显著性差异(表 5);*lh* 基因的表达量在 BaP 和 DEHP 单独暴露下均无显著性改变,而在二者复合暴露高浓度组中, *lh* 的表达量显著性下调了 -1.52 倍(表 5),*vtg* 基因的表达量在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 单独处理组和 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+ $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 复合处理组中显著性上调了 1.48 倍和 1.81 倍(表 5)。

3 讨论 (Discussion)

之前大多数研究集中在单一化合物对鱼类的毒理学效应,但在实际水环境中,化合物并不是单一存在,因而单一物质评价不能完全反映其在环境中的风险。在本研究中,笔者以中国特有模式鱼类稀有鮕鲫为研究对象,评价了长江上游水域主要典型污染物 BaP 和 DEHP 共同存在时的生殖内分泌干扰效应。实验检测了鱼体各形态学指标、体内性激素水平和 HPG 轴及肝脏中相关基因的表达量。实验结果表明, BaP、DEHP 单独暴露时对稀有鮕鲫性激素含量和基因表达基本上无显著影响,但两者复合

表 2 利用 GC-MS 检测各单独或复合暴露组中苯并芘 (BaP) 和邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯 (DEHP) 的浓度

Table 2 The measured concentrations of benzo(a)pyrene (BaP) and di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) in each single or co-exposure group by GC-MS analysis

暴露组别 Exposure groups	名义浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$ Nominal concentration/ $(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$	BaP	DEHP
Solvent control (SC)		<LOD	<LOD
BaP	0.1	0.03±0.01	—
	1	0.32±0.01	—
DEHP	10	—	3.37±0.21
	100	—	37.73±0.72
BaP+DEHP	0.1+10	0.03±0.01	3.28±0.17
	1+100	0.31±0.03	36.15±1.24

注:实验结果以平均值±标准误差表示;—表示没有检测,LOD 为检测限。

Note: Data are expressed as mean±SEM; — means not detected; LOD means limits of detection.

表3 稀有鮰暴露于不同浓度 BaP、DEHP 和 BaP+DEHP 中 28 d 后体质系数的变化
Table 3 Somatic indices of rare minnow after exposure to BaP, DEHP and BaP+DEHP

体质系数 Somatic indices	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$						1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		(0.1+10) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$		(1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	
	BaP	BaP	BaP	DEHP	DEHP	BaP+DEHP	BaP	DEHP	DEHP	DEHP	BaP+DEHP	BaP	DEHP	BaP+DEHP	BaP+DEHP	BaP+DEHP
雌鱼 Female																
体质系数	0	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	(0.1+10) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	(1+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$									
体长/cm Body length/cm	3.85±0.12	3.99±0.12	3.79±0.09	3.68±0.05	3.75±0.07	3.70±0.11	3.53±0.09									
体重/g Body weight/g	0.76±0.06	0.85±0.08	0.73±0.06	0.66±0.03	0.67±0.06	0.63±0.07	0.51±0.04									
条件因子 Condition factor	1.32±0.06	1.30±0.06	1.34±0.07	1.31±0.05	1.24±0.05	1.20±0.04	1.15±0.05									
脑指数(BSI) Brain somatic index (BSI)	1.38±0.07	1.09±0.09	1.60±0.15	1.59±0.10	1.53±0.11	1.83±0.16 *	2.04±0.18 *									
性腺指数(GSI) Gonadal somatic index (GSI)	8.02±1.78	8.51±1.71	8.87±2.04	11.39±2.41	12.61±1.51	6.87±1.86	5.89±1.66									
肝脏指数(HSI) Hepatic somatic index (HSI)	2.47±0.25	1.76±0.16	2.22±0.26	2.22±0.22	2.55±2.20	2.28±0.20	2.44±0.24									
雄鱼 Male																
体长/cm Body length/cm	3.75±0.09	3.58±0.05	3.57±0.09	3.58±0.04	3.52±0.05	3.59±0.08	3.63±0.09									
体重/g Body weight/g	0.64±0.03	0.56±0.02	0.57±0.05	0.51±0.02	0.52±0.03	0.56±0.03	0.58±0.05									
条件因子 Condition factor	1.24±0.08	1.23±0.04	1.23±0.03	1.12±0.04	1.18±0.04	1.21±0.04	1.18±0.05									
脑指数(BSI) Brain somatic index (BSI)	1.58±0.10	1.67±0.14	1.92±0.15	1.73±0.15	1.76±0.13	1.72±0.19	1.69±0.14									
性腺指数(GSI) Gonadal somatic index (GSI)	2.4±60.33	2.39±0.30	2.43±0.15	2.20±0.30	2.52±0.24	2.53±0.38	2.27±0.25									
肝脏指数(HSI) Hepatic somatic index (HSI)	1.78±0.14	2.15±0.23	2.71±0.19 *	2.05±0.21	2.74±0.23 *	1.88±0.20	2.19±0.17									

注: 实验结果以平均值±标准误差表示, 每个浓度 24 条鱼, * 表示 $P<0.05$, 实验组与对照组相比, 差异显著。

Note: Data are expressed as mean±SEM; there are 24 fish in each exposure concentration; * $P<0.05$ indicates the statistically significant differences compared to the control groups.

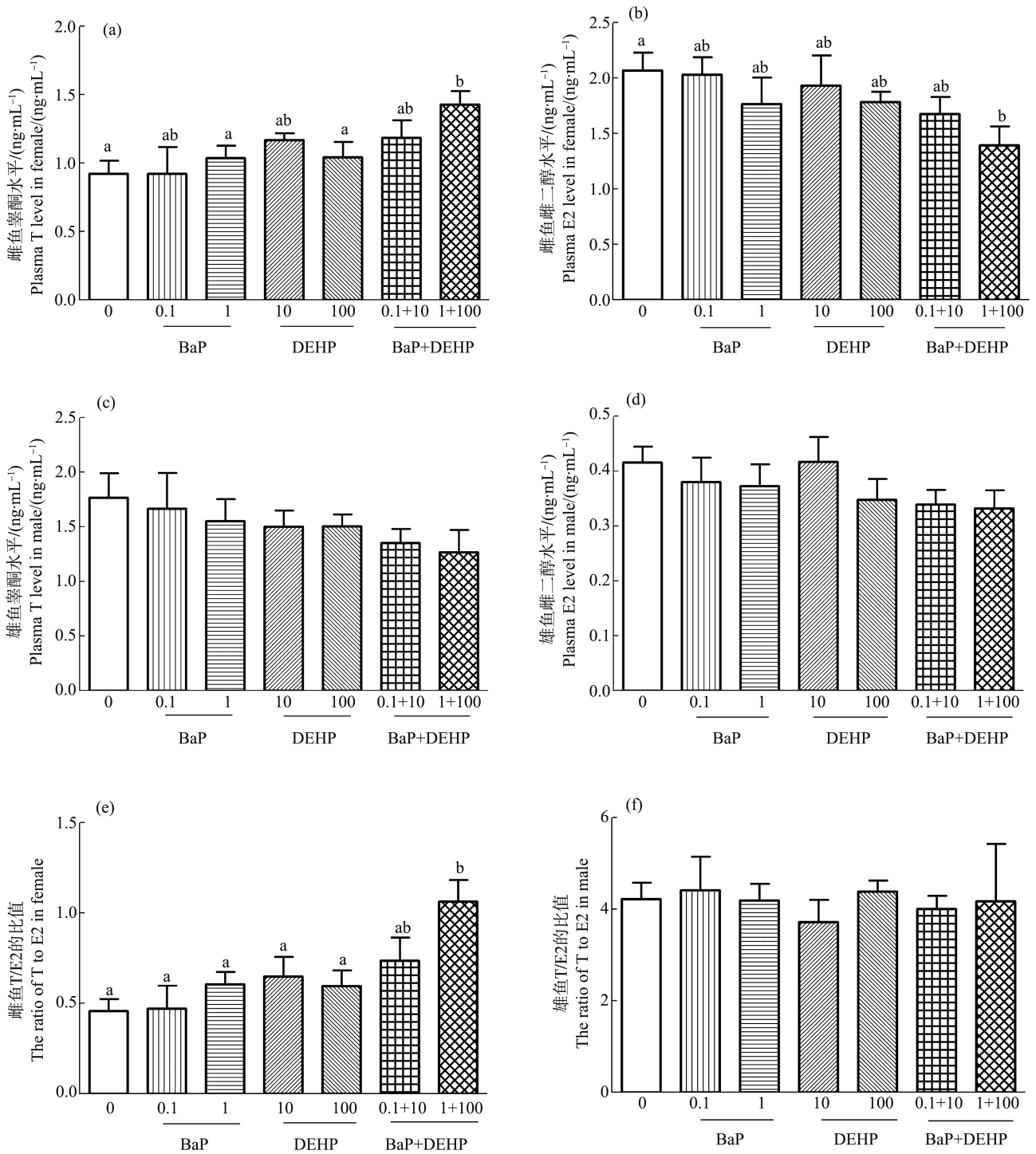


图 1 稀有鮕鲫暴露于不同浓度 BaP、DEHP 和 BaP+DEHP 中 28 d 血浆中睾酮 (T)、雌二醇 (E2) 水平和 T/E2 比值的变化
注:测定结果以平均值±标准误差表示,每个浓度 4 个平行样,平均数后上标不同字母表示处理组间差异显著(P<0.05)。

Fig. 1 Effects on levels of serum testosterone (T), 17β-estradiol (E2) and T/E2 ratio in rare minnows after exposure to BaP, DEHP and BaP+DEHP

Note: Data are expressed as mean±SEM; there are 4 replicates in each exposure concentration; different letters indicate the significant difference among the exposure groups (P<0.05).

暴露情况下,在高浓度复合暴露组显著改变了稀有鮕鲫体内性激素的水平及相关基因的表达,说明

BaP 和 DEHP 共同存在的情况下,显著增强了它们各自的毒性效应,表现为协同效应。

表4 稀有鮡鲫暴露于不同浓度 BaP、DEHP 和 BaP+DEHP 28 d 后雌鱼 HPG 轴和肝脏中相关基因的表达水平

Table 4 mRNA expression of related genes in HPG axis and liver of female rare minnows after exposure to BaP, DEHP and BaP+DEHP for 28 d

	0	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP	(0.1+10) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+DEHP	(1.0+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+DEHP
<i>lh</i>	1.01±0.11	1.00±0.06	1.09±0.10	1.15±0.04	1.11±0.02	1.12±0.03	1.07±0.12
<i>fsH</i>	1.01±0.07	1.00±0.99	1.05±0.11	1.07±0.15	1.45±0.08*	1.15±0.14	1.61±0.13*
<i>vtg</i>	1.01±0.06	1.15±0.03	1.16±0.02	1.48±0.09	1.82±0.08	1.28±0.03	2.73±0.27*
<i>cyp17</i>	1.00±0.04	1.04±0.11	1.18±0.06	1.16±0.12	1.28±0.08*	1.05±0.10	1.96±0.12*
<i>17β-hsd</i>	1.01±0.05	1.00±0.03	1.10±0.04	0.97±0.08	1.16±0.02	0.99±0.08	1.28±0.03*
<i>cyp19a</i>	1.01±0.07	0.90±0.06	0.88±0.03	0.81±0.03	0.76±0.05*	0.91±0.07	0.64±0.06*

注:实验结果以平均值±标准误表示,*表示 $P<0.05$ 。

Note: Data are expressed as mean±SEM; * $P<0.05$ indicate the statistically significant differences.

表5 稀有鮡鲫暴露于不同浓度 BaP、DEHP 和 BaP+DEHP 28 d 后雄鱼 HPG 轴和肝脏中相关基因的表达水平

Table 5 mRNA expression of related genes in HPG axis and liver of male rare minnows after exposure to BaP, DEHP and BaP+DEHP for 28 d

	0	0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP	1.0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP	(0.1+10) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP +DEHP	(1.0+100) $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+DEHP
<i>lh</i>	1.00±0.04	1.06±0.10	1.06±0.12	1.07±0.08	0.93±0.06	0.91±0.09	0.66±0.03*
<i>fsH</i>	1.00±0.04	1.20±0.09	1.16±0.11	1.05±0.07	1.05±0.08	1.19±0.09	1.09±0.15
<i>vtg</i>	1.00±0.03	0.99±0.14	1.01±0.12	1.36±0.17	1.48±0.09*	1.16±0.02	1.81±0.13*
<i>cyp17</i>	1.01±0.08	1.05±0.06	1.04±0.08	0.98±0.07	1.03±0.11	1.00±0.03	0.99±0.03
<i>17β-hsd</i>	1.00±0.04	0.99±0.03	1.02±0.08	0.98±0.06	0.92±0.07	1.01±0.12	0.96±0.04
<i>cyp19a</i>	1.00±0.04	0.91±0.02	0.91±0.08	0.87±0.11	0.80±0.07	0.80±0.04	0.78±0.06

注:实验结果以平均值±标准误表示,*表示 $P<0.05$ 。

Note: Data are expressed as mean±SEM; * $P<0.05$ indicates the statistically significant differences.

在毒理学研究中,性激素水平变化是评价生殖内分泌干扰效应的一个重要指标。在本实验中,稀有鮡鲫经过 28 d 暴露后,1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 暴露组的雌鱼血浆中睾酮含量显著升高但雌二醇含量显著降低,表现出性别特异性和浓度依赖关系。以往研究表明,BaP 和 DEHP 均是环境中普遍存在的内分泌干扰物,且二者对哺乳动物、鱼类等生物均具有生殖内分泌干扰效应^[11,21]。有研究人员用 50 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的 BaP 注射性成熟的虹鳟(*Oncorhynchus mykiss*),发现无论雌鱼还是雄鱼,血浆中雌二醇和睾酮含量均显著性降低^[22]。同样,石首鱼(*Micropogonias undulates*)经腹腔注射 BaP 后,血浆中睾酮和雌二醇含量也显著受到抑制^[23]。另外,笔者之前的研究表明,将稀有鮡鲫暴露于不同浓度的 BaP 28 d 后,3 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP 暴露后的雌雄鱼体内的雌二醇含量显著性降低^[16]。虽然本实验中 BaP 单

独暴露对稀有鮡鲫体内性激素水平没有影响,但是这有可能是 BaP 暴露浓度较低导致的,这也与笔者之前实验结果相符。对于 DEHP 的研究指出,将成年稀有鮡鲫暴露于环境相关剂量的 DEHP (3.6、12.8、39.4 和 117.6 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 中 21 d 后,在雌鱼中,睾酮含量升高,雌二醇含量降低,T/E2 比例增加^[19]。除此之外,笔者将成年稀有鮡鲫暴露于环境相关剂量的 DEHP (4.2、13.3 和 40.8 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 中 6 个月,结果显示,在雌鱼体内,雌二醇和睾酮的含量均显著性降低^[17]。此外,将雄性黑头呆鱼(*Pimephales promelas*)暴露于环境相关剂量(12 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 的 DEHP 28 d,明显降低了黑头呆鱼体内 E2 的水平^[24]。以上这些结果说明,DEHP 暴露打破了动物体内激素系统的平衡,产生了干扰效应。在本实验中,只有 BaP 和 DEHP 同时存在时,高浓度组的雌鱼体内睾酮和雌二醇含量才会显著性改变,表明在一定浓度范围内,二者

同时作用时会增强对稀有鮰鲫的生殖内分泌干扰效应,表现为协同效应。

在类固醇激素合成的过程中,一系列激素(如FSH、LH)和酶类(CYP17、17 β -HSD和CYP19a等)发挥着重要作用^[25]。鱼类的FSH主要是刺激性腺分泌雌二醇和睾酮等性类固醇激素,LH与排精和排卵有关^[26]。而类固醇合成酶对类固醇激素的产生同样是至关重要的,编码这些合成酶的基因上调或者下调,会导致类固醇激素(如T、E2)合成效率的升高或降低。本实验1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP中雌鱼*fsb*表达量显著上调可能是雌二醇显著降低的一种负反馈机制。此外,在本实验中还观察到1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BaP+100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP组中雌鱼性腺中的*cyp17*和*17 β -hsd*表达量显著上调,而*cyp19a*表达量则受到显著性抑制。在鱼类类固醇激素合成的过程中,*cyp17*编码的蛋白催化黄体酮转化为17 α -羟基黄体酮,继续催化转化为雄烷二酮,进而通过17 β -HSD转化为睾酮,而*cyp19a*编码的芳香化酶可以催化睾酮转化为雌二醇^[25]。因此,*cyp19a*基因表达量受到抑制可能会抑制睾酮向雌二醇的转化,导致血浆中睾酮水平的升高和雌二醇水平的降低,而*cyp17*和*17 β -hsd*基因表达的上调可能是机体对于雌二醇下降的一种补偿机制。先前有研究报道称,DEHP可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体(PPARs)的表达来抑制芳香化酶的活性,从而抑制E2的产生^[26]。但也有研究发现,DEHP和利谷隆复合暴露导致的雄性黑头呆鱼血清中睾酮含量降低并不是因为抑制了与类固醇生成相关的基因,也不是由于激活PPARs基因的表达,而是升高了类固醇激素分解代谢的水平如升高了肝脏中CYP3A4以及睾丸中磺基转移酶的表达水平^[24]。笔者先前的研究观察到稀有鮰鲫暴露DEHP 21 d后,雌鱼血浆中雌二醇含量降低,性腺中*cyp17*的表达量上调,而*cyp19a*的表达量下调^[9]。同样,在BaP单独暴露时,也发现雌性斑马鱼(*Danio rerio*)性腺中*cyp19a*基因表达显著下调的现象,并且肝脏中*vtg*表达量也显著受到抑制^[27]。以上结果说明,DEHP单独或与其他化合物共存的情况下,可能通过不同的作用模式对鱼类产生不良影响。在本研究中,BaP和DEHP复合暴露的情况下,可能通过抑制芳香化酶的活性导致T向E2转化效率的降低,从而导致T的升高和E2的下降,E2的下降通过机体自身的负反馈机制上调了*fsb*基因的表达,但具体的作用机理需

要后续进一步的研究。在鱼类中,卵黄蛋白原(VTG)是卵子发生,卵子成熟及卵黄合成中必不可少的营养物质,是雌激素效应敏感的生物标志物。本实验中观察到的雌鱼雌二醇含量降低而*vtg*基因表达量却显著升高的现象在之前的实验中也有观察到,例如,在长期低剂量DEHP暴露后,稀有鮰鲫雌鱼血浆中雌二醇含量下降,而*vtg*表达量上调,猜测这可能是由于这些具有雌激素活性的化合物直接作用于雌激素受体,从而诱导*vtg*基因表达^[17]。而在本次实验中,观察到除了高浓度的DEHP组和高浓度的复合暴露组中*lh*和*vtg*表达量改变之外,所有浓度组对雄性稀有鮰鲫基本无显著影响。

本研究得出以下结论:较高浓度的BaP和DEHP同时存在时,会改变雌性稀有鮰鲫血浆中睾酮和雌二醇含量,同时引起了HPG轴和肝脏中相关基因表达量的改变,而低剂量的复合暴露以及单独的BaP、DEHP处理并没有引起激素或相关基因的改变。这一结果说明,BaP和DEHP共同存在时,会改变它们各自的毒性,表现出协同效应;此外,由于长江上游水体中BaP和DEHP含量远低于本实验观察到的效应浓度,笔者推测,三峡库区上游水体中的BaP和DEHP并不会对该区域的鱼类产生生殖内分泌干扰效应。

致谢:本研究由中国长江三峡工程开发总公司科研项目(07011034,0799555)和南水北调中线输水水质预警与业务化管理平台项目(2017ZX07108-001)资助。

通讯作者简介:郭勇勇(1983—),男,免疫学硕士,实验师,主要研究方向为典型有机污染物的毒理学效应及环境风险评估。

参考文献(References):

- [1] Crinnion W J. The CDC fourth national report on human exposure to environmental chemicals: What it tells us about our toxic burden and how it assist environmental medicine physicians [J]. *Alternative Medicine Review*, 2010, 15(2): 101-109
- [2] 张璐璐,刘静玲,何建宗,等. 中国典型城市水环境中邻苯二甲酸酯类污染水平与生态风险评估[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(2): 421-435
Zhang L L, Liu J L, He J Z, et al. The occurrence and ecological risk assessment of phthalate esters (PAEs) in urban aquatic environments of China [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(2): 421-435 (in Chinese)

- [3] Gao D, Li Z, Wen Z, et al. Occurrence and fate of phthalate esters in full-scale domestic wastewater treatment plants and their impact on receiving waters along the Songhua River in China [J]. *Chemosphere*, 2014, 95: 24-32
- [4] Ejaredar M, Nyanza E C, Ten Eycke K, et al. Phthalate exposure and childrens neurodevelopment: A systematic review [J]. *Environmental Research*, 2015, 142: 51-60
- [5] Mariana M, Feiteiro J, Verde I, et al. The effects of phthalates in the cardiovascular and reproductive systems: A review [J]. *Environment International*, 2016, 94: 758-776
- [6] Mu X, Liao X, Chen X, et al. DEHP exposure impairs mouse oocyte cyst breakdown and primordial follicle assembly through estrogen receptor-dependent and independent mechanisms [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 298: 232-240
- [7] 朱利中, 松下秀鹤. 空气中多环芳烃的研究现状[J]. *环境科学进展*, 1997, 5(5): 18-29
Zhu L Z, Matsushita H. Progress in research on polycyclic aromatic hydrocarbons in air [J]. *Advances in Environmental Science*, 1997, 5(5): 18-29 (in Chinese)
- [8] 麦碧娴, 林峥, 张干, 等. 珠江三角洲河流和珠江口表层沉积物中有机污染物研究——多环芳烃和有机氯农药的分布及特征[J]. *环境科学学报*, 2000, 20(2): 192-197
Mai B X, Lin Z, Zhang G, et al. Organic contaminants in surface sediments from rivers of the Pearl River Delta and Estuary—The distributions and characteristics of PAHs and organochlorine pesticides [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2000, 20(2): 192-197 (in Chinese)
- [9] 许士奋, 蒋新, 王连生, 等. 长江和辽河沉积物中的多环芳烃类污染物[J]. *中国环境科学*, 2000, 20(2): 128-131
Xu S F, Jiang X, Wang L S, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) pollutants in sediments of the Yangtze River and the Liaohe River [J]. *China Environmental Science*, 2000, 20(2): 128-131 (in Chinese)
- [10] Meng Y, Liu X, Lu S, et al. A review on occurrence and risk of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in lakes of China [J]. *Science of The Total Environment*, 2019, 651(Pt 2): 2497-2506
- [11] 连立芬, 陈亚琼, 侯海燕. 苯并芘的生殖毒性机制研究进展[J]. *国际生殖健康/计划生育杂志*, 2013, 32(6): 450-453
Lian L F, Chen Y Q, Hou H Y. Reproductive toxicity of benzo(a)pyrene [J]. *Journal of International Reproductive Health/Family Planning*, 2013, 32(6): 450-453 (in Chinese)
- [12] Bolden A L, Rochester J R, Schultz K, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons and female reproductive health: A scoping review [J]. *Reproductive Toxicology*, 2017, 73: 61-74
- [13] Wang F, Xia X, Sha Y. Distribution of phthalic acid esters in Wuhan section of the Yangtze River, China [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2008, 154(1-3): 317-324
- [14] Feng C, Xia X, Shen Z, et al. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons in Wuhan section of the Yangtze River, China [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2007, 133(1-3): 447-458
- [15] Cui Z, Liu J, Li P, et al. Biomonitoring of detoxifying activity as measured by CYP1A1 induction in Yangtze and Jialing Rivers in Chongqing City in China [J]. *Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A*, 2009, 72(11-12): 782-788
- [16] 郭勇勇, 周炳升. 苯并芘对稀有鮕鲫的内分泌干扰效应研究[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(9): 3006-3012
Guo Y Y, Zhou B S. Endocrine disruption effects of benzo(a)pyrene on Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(9): 3006-3012 (in Chinese)
- [17] Guo Y, Yang Y, Gao Y, et al. The impact of long term exposure to phthalic acid esters on reproduction in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 203: 130-136
- [18] Li L, Dong L, Meng X, et al. Distribution and sources of polycyclic aromatic hydrocarbons and phthalic acid esters in water and surface sediment from the Three Gorges Reservoir [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 69: 271-280
- [19] Wang X, Yang Y, Zhang L, et al. Endocrine disruption by di-(2-ethylhexyl)-phthalate in Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2013, 32(8): 1846-1854
- [20] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [21] Martino-Andrade A J, Chahoud I. Reproductive toxicity of phthalate esters [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2010, 54(1): 148-157
- [22] Kennedy C J, Smyth K R. Disruption of the rainbow trout reproductive endocrine axis by the polycyclic aromatic hydrocarbon benzo[a]pyrene [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2015, 219: 102-111
- [23] Thomas P. Reproductive endocrine function in female At-

- lantic croaker exposed to pollutants [J]. Marine Environmental Research, 1988, 24: 179-183
- [24] Crago J, Klaper R. A mixture of an environmentally realistic concentration of a phthalate and herbicide reduces testosterone in male fathead minnow (*Pimephales promelas*) through a novel mechanism of action [J]. Aquatic Toxicology, 2012, 110-111: 74-83
- [25] Omura T, Morohashi K. Gene regulation of steroidogenesis [J]. The Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology, 1995, 53(1-6): 19-25
- [26] Lovekamp-Swan T, Davis B J. Mechanisms of phthalate ester toxicity in the female reproductive system [J]. Environmental Health Perspectives, 2003, 111(2): 139-145
- [27] Gao D, Lin J, Ou K, et al. Embryonic exposure to benzo(a)pyrene inhibits reproductive capability in adult female zebrafish and correlation with DNA methylation [J]. Environmental Pollution, 2018, 240: 403-411 ◆