

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200706001

王倩, 杨扬, 李梅. 磷酸三正丁酯对蚯蚓的生态毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(1): 126-136

Wang Q, Yang Y, Li M. Toxic effects of tri-*n*-butyl phosphate on earthworm *Eisenia fetida* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(1): 126-136 (in Chinese)

磷酸三正丁酯对蚯蚓的生态毒性效应

王倩¹, 杨扬^{1,2}, 李梅^{1,3,*}

1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210023

2. 南京农业大学资源与环境科学学院, 南京 210095

3. 南京大学环境学院, 环境科学与工程国家级实验教学示范中心, 南京 210023

收稿日期: 2020-07-06

录用日期: 2020-09-21

摘要: 有机磷酸酯(OPEs)作为一种新型的阻燃剂和增塑剂, 在环境中普遍存在, 尤其在土壤中常被检出, 因此其环境和健康风险亟待评估。为探究 OPEs 对土壤生物的毒性效应, 选取磷酸三正丁酯(TnBP)作为受试物, 以赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为指示生物, 采用人工土壤法研究不同浓度 TnBP 对蚯蚓生长、抗氧化酶系统、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性、体腔细胞 DNA 损伤及 8-羟基脱氧鸟苷(8-OHdG)含量的影响。结果表明, TnBP 暴露对蚯蚓生长无明显抑制作用, 但 TnBP 胁迫可引起蚯蚓体内抗氧化酶活性增强, 脂质过氧化产物丙二醛含量显著上升, 表明蚯蚓受到氧化损伤; 彗星试验结果显示, 彗尾 DNA 含量和 Olive 尾矩均显著上升, 表明 TnBP 暴露能够引起蚯蚓体腔细胞 DNA 损伤; 8-OHdG 含量也显著增加, 其水平与暴露浓度存在明显的剂量-效应关系, 提示 TnBP 暴露可引起蚯蚓体腔细胞氧化性 DNA 损伤; AChE 活性受到的影响则较为微弱。综上, 本研究阐明了 TnBP 暴露对蚯蚓的毒性效应并为进一步研究 OPEs 对土壤的生态风险评估提供科学依据。

关键词: 磷酸三正丁酯; 赤子爱胜蚓; 氧化应激; DNA 损伤; 土壤生态风险

文章编号: 1673-5897(2021)1-126-11

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Toxic Effects of Tri-*n*-butyl Phosphate on Earthworm *Eisenia fetida*

Wang Qian¹, Yang Yang^{1,2}, Li Mei^{1,3,*}

1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

2. College of Resources and Environmental Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

3. State Experimental Teaching Demonstration Centre for Environmental Science and Engineering, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210023, China

Received 6 July 2020

accepted 21 September 2020

Abstract: As a group of emerging flame retardants and plasticizers, organophosphate esters (OPEs) are ubiquitous in the environment, especially in soil, therefore, their environmental and health risks need to be assessed urgently. To evaluate the potential toxicity of OPEs to soil ecosystem, we investigated the effects of different concentrations of tri-*n*-butyl phosphate (TnBP) on earthworms (*Eisenia fetida*) in artificial soil. The growth rate, activities of antioxidant system and acetylcholinesterase (AChE), levels of malondialdehyde (MDA), DNA damage as well as its

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(41571468, 41773115); 江苏省科技支撑项目(BE2016736)

第一作者: 王倩(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境毒理学, E-mail: 1970208324@qq.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: meili@nju.edu.cn

products 8-hydroxydeoxyguanosine (8-OHdG) content were measured after exposure to 0, 0.1, and 1 mg·kg⁻¹ TnBP in the artificial soil for 3, 7, and 14 days. The results showed that 14-day exposure of TnBP did not significantly inhibit the growth of *E. fetida*, while the antioxidant enzymes activity and MDA content significantly increased, indicating that TnBP could induce oxidative damage in earthworm. Comet assay showed that both the tail DNA content and the Olive tail moment values in all treated groups were significantly higher than those in the control group. Furthermore, the presence of TnBP also induced the increase of 8-OHdG and exhibited a concentration-related response, suggesting that TnBP-induced DNA damage might be attributed to oxidative DNA lesions. The impacts of TnBP on AChE activity were relatively weak. In conclusion, this study demonstrated that TnBP had biochemical toxicity on earthworms, which sheds light on the toxicological effects of TnBP on earthworms and provides a scientific basis for further study of OPEs on soil ecological risk assessment.

Keywords: TnBP; *Eisenia fetida*; oxidative stress; DNA damage; soil ecological risk

自2009年联合国环境规划署召开会议以来,溴代阻燃剂已在全球范围内被禁用^[1]。有机磷酸酯(OPEs)因具有低烟、低卤、低成本以及阻燃性能好等特点,逐渐成为溴系阻燃剂的替代品^[2-3]。近年来,在家具、建筑材料、纺织品、塑料制品和电子产品等方面得到了广泛应用^[4],其产量持续增长。由于OPEs主要以物理添加而非化学键合方式加入到材料中,因此在使用、处置和回收过程中极易通过挥发、浸出和磨蚀作用而迁移至周围环境^[5],造成我国OPEs污染日益严重。OPEs普遍分布在水体^[6-7]、大气^[8]、室内灰尘^[9]和沉积物^[10]中,并可在生物体内积累到较高水平,最高可达15 000 ng·g⁻¹脂质重量^[11]。值得一提的是,有研究在北极的水体和沉积物中发现了OPEs的存在^[12]。大量毒性试验结果表明,OPEs能引起包括发育毒性、生殖毒性、神经毒性、内分泌干扰和致癌性等一系列生态毒理学效应^[13-14]。如磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP)和磷酸三(1,3-二氯异丙基)酯(TDCIPP)可轻易进入血液、肝脏、肾脏和睾丸,并诱发肿瘤^[15],已被证明具有神经毒性和致癌性^[16]。另有研究发现屋尘中的TDCIPP水平与男性甲状腺激素(THs)水平降低和催乳激素水平升高密切相关^[17]。可见,OPEs可能对生态环境和人体健康造成危害,因此研究OPEs的毒性效应具有重要意义。

根据取代基的不同,OPEs可分为氯代类、烷基类和芳香类^[18-19]。其中,烷基取代OPEs是主要类型,在世界范围内的野生动植物甚至人体内均有检出^[20-21],在欧洲一些地区,鱼体内烷基类OPEs浓度与多溴二苯醚相当^[22]。常见的烷基类OPEs包括磷酸三(2-丁氧基乙基)酯(TBOEP)、磷酸三乙基酯(TEP)、磷酸三(2-乙基己基)酯(TEHP)和磷酸三正丁

酯(TnBP)^[23]。TnBP是其中最常用的一种,被美国环境保护局(US EPA)划归为高产量(HPV)化学品^[24]。据估计,全球TnBP的年产量为3 000~5 000 t,主要用作增塑剂、润滑剂和阻燃剂^[25]。同样地,因使用广泛,TnBP也在多种环境介质中被大量检出。如从欧洲国家、菲律宾、加拿大和中国收集的海洋和淡水鱼体内均检测出TnBP,总含量范围为1.43~6 000 ng·g⁻¹脂质重量^[23]。有研究分析了24个从中国东北辽河收集到的地表沉积物样品,发现辽河TnBP污染严重^[26]。此外,土壤作为陆地生态系统的基础,其TnBP污染同样不容忽视。有研究表明,土壤是疏水性有机化合物TnBP的重要贮存介质。邓旭等^[27]在中国成都市区/郊区土壤中检测出较高水平的TnBP。Cui等^[3]收集并分析了67份来自中国广州亚热带城市道路绿化带、稻田、公园、商业和居民区的土壤样品,发现广州市郊土壤中的OPEs浓度范围为0.041~1.37 mg·kg⁻¹,且所有样品中均有TnBP检出。He等^[28]检测了中国重庆市街道粉尘中OPEs的含量,发现其浓度范围为0.35~1.37 mg·kg⁻¹。Wang等^[29]在大连收集了49个表层土壤样品,并对其浓度和组成进行鉴定,发现土壤中TnBP较为丰富,占总OPEs的28.5%±15.6%。几项毒理学研究表明TnBP可能对动物和人体健康产生多种不利影响。如TnBP可降低亚洲淡水蛤(*Corbicula fluminea*)中抗氧化酶和热激蛋白相关基因的水平^[30]。Hou等^[31]研究发现,TnBP可在稀有鮡鲫(*Gobiocypris rarus*)肾脏、卵巢和肝脏中蓄积。高丹等^[32]考察了TnBP对斑马鱼胚胎的急性和慢性毒性,发现胚胎孵化率、存活率、心率和体长与受试物浓度呈负相关,而异常率则呈正相关。

鉴于TnBP分布广泛且具有一定毒性,可能对

生态系统造成巨大威胁,因此其潜在风险值得关注。相较于水生生态系统,TnBP在土壤生态系统中的研究非常有限,目前仅局限于TnBP在土壤环境中的检测^[1],而其造成的土壤环境风险尚未得到恰当评估,对土壤生物的毒性效应也知之甚少。蚯蚓作为“生态系统的工程师”,对维持土壤生态系统功能有着不可替代的作用,且处于食物链底端,已成为对陆地环境有毒物质进行生态风险评价的重要指示生物^[31]。综上,本文选择用量大且应用范围广泛的TnBP为研究对象,选取土壤模式生物赤子爱胜蚓(*Eisenia fetida*)为受试生物,通过TnBP对蚯蚓的急性暴露实验,以蚯蚓的生长、抗氧化酶、乙酰胆碱酯酶活性和遗传毒性指标的响应变化,来探究TnBP对蚯蚓的毒性效应,进而为后续进行土壤生态风险评估提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验材料

磷酸三正丁酯(tri-*n*-butyl phosphate, TnBP)为化学纯,CAS号为126-73-8,购自苏州泰普瑞精细化学品有限公司;石英砂(CAS No.14808-60-7)、高岭土(CAS No.1332-58-7),纯度均为99%,碳酸钙(CaCO_3),为分析纯,均购于南京化学试剂有限公司;牛粪购自内蒙古锡林郭勒草原有限公司,经烘干过20目筛备用;生理盐水即0.9%的氯化钠(NaCl)溶液, NaCl (CAS No.7647-14-5)为分析纯,购自南京化学试剂有限公司。

赤子爱胜蚓(*E. fetida*)由江苏省句容蚯蚓养殖基地提供,挑选环带明显且无损伤,体重介于0.3~0.6 g的成蚓,试验前于清洁人工土壤中驯化24 h,供试验用。

1.2 试验方法

采用人工土壤法研究TnBP对蚯蚓的毒性效应。人工土壤配制参照经济合作与发展组织(OECD)推荐的标准方法^[34],并做适当改进。具体配制过程如下:称取350 g石英砂,100 g高岭土以及50 g过20目筛的干牛粪于培养缸中,充分混匀。加入175 mL经蒸馏水稀释为不同浓度的TnBP溶液,混匀后使各处理组最终浓度分别为0、0.1、1和10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$,各培养缸中含水量为35%,并用 CaCO_3 调节pH至 6.0 ± 0.5 。每个处理6个平行,置于恒温恒湿培养箱稳定7 d,随后,每缸放入10条经清洁人工土壤驯化24 h后的蚯蚓培养14 d,用锡箔纸封口并扎小孔透气。培养箱温度设置为 $(20\pm2)^\circ\text{C}$,湿度保

持80%左右,光照条件设为12 h光照和12 h黑暗一个循环(光照强度为400~800 lux)。于第3天、第7天和第14天,分别记录蚯蚓体重、死亡数及中毒症状,并在每个玻璃培养瓶中随机取出3条用于后续分析。

1.3 体重变化率测定

在第3天、第7天和第14天时将不同处理组蚯蚓的平均体重与第0天进行比较,采用如下公式计算体重变化率:

$$\text{体重变化率} = (W_t - W_0) / W_0 \times 100\% \quad (1)$$

式中: W_t 为第 t 天蚯蚓的平均体重(mg), W_0 为第0天蚯蚓的平均体重(mg)。

1.4 生化指标测定

1.4.1 酶液制备

将经过染毒处理的蚯蚓清肠24 h,每组选择3条进行组织液制备。将蚯蚓洗净、称重,放入10 mL圆底离心管中,按重量(g):体积(mL)=1:4比例加入生理盐水,冰浴条件下机械匀浆,3 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 4 $^\circ\text{C}$ 离心10 min,取上清液即为20%酶液,一部分用于丙二醛(MDA)含量测定,另一部分再分别稀释得到10%和5%组织匀浆,用于超氧化物歧化酶(SOD)活性、过氧化氢酶(CAT)活性、乙酰胆碱酯酶(AChE)活性和8-羟基鸟苷(8-OHdG)含量测定。

1.4.2 酶活性测定方法

蛋白含量采用BCA(bicinchoninic acid)法蛋白定量试剂盒(南京建成提供)进行测定。SOD、CAT和AChE活性均采用南京建成生物工程研究所提供的试剂盒,按说明进行测定。其中,SOD活性以450 nm下吸光值计算,酶活性单位定义为反应体系中SOD抑制率达50%的酶量;CAT活性以405 nm处吸光值计算,单位为 $\text{U}\cdot\text{mg}^{-1}\text{prot}$;AChE活性以412 nm处吸光值计算,以水解反应体系中1 μmol 基质为1个活力单位。测定时每个处理设3组平行,每个平行重复测定3次。

1.4.3 MDA含量和8-OHdG含量测定方法

MDA含量和8-OHdG含量按照试剂盒方法进行测定,试剂盒由南京建成生物工程研究所提供。MDA含量测定过程中,酶液直接用于测试,于波长532 nm处测定吸光度值;8-OHdG含量测定时将酶液稀释为10%的组织匀浆进行,于波长450 nm处测定吸光度值。

1.5 DNA损伤

在暴露的第3天、第7天和第14天,随机从各

处理组取出 3 条蚯蚓,清肠 24 h 后洗净,参考 Eyambe 等^[51]方法提取蚯蚓体腔细胞,制备单细胞凝胶电泳胶板,经裂解、解旋后,在电压 25 V,电流 300 mA 条件下避光电泳 20 min。中和碱性后,染色,置于荧光显微镜下观察,并用数码相机拍照。用 Comet Assay Software Project (CASP)分析软件进行分析,选取尾 DNA 含量(Tail DNA%)和 Olive 尾矩(Olive tail moment, OTM)2 个参数作为 DNA 损伤的指标,每张片子分析 50 个细胞。

1.6 数据分析

数据处理采用软件 SPSS18.0 进行统计分析,并用 OriginPro 2015 软件绘图。所有实验结果采用平均数±标准差(Means±SD)表示,利用 Student's t- test 检验 2 组样品所测指标平均数的差异是否具有统计学显著性,以 $P<0.05$ 作为显著性标志。

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 TnBP 暴露对蚯蚓死亡和体重的影响

赤子爱胜蚓暴露于 TnBP 后第 3 天、第 7 天和第 14 天的死亡与生长情况如表 1 所示。由表 1 可知,TnBP 暴露期间,蚯蚓未观察到明显的死亡现象(死亡率均未超过 5%),说明在人工土壤环境下,本实验设置浓度范围对蚯蚓不具有明显致死效应,TnBP 急性毒性较弱。而不同浓度的 TnBP 处理组中,蚯蚓体重随暴露时间延长而持续增加,并在第 14 天达到试验周期体重的最大值,体重增长率变化范围为 34.6% ~ 81.1%(图 1),表明人工土壤的营养条件满足蚯蚓的生长需求,且 TnBP 急性毒性较低,未对蚯蚓生长产生明显抑制。Yang 等^[36]的研究也有类似结果,暴露于 TCEP 和 TCP 的蚯蚓未出现明显死亡,且蚯蚓体重随时间的延长持续增加。

2.2 TnBP 暴露对蚯蚓抗氧化酶活性的影响

抗氧化防御系统相关酶作为抵御外来污染物氧化胁迫的关键酶系,对维持细胞稳定起着重要作用,主要包括 SOD 和 CAT 等^[37]。SOD 能够清除细胞内

的超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$),在抗氧化防御系统中占有重要地位,CAT 则通常负责将 H_2O_2 转变成 H_2O 和 O_2 ,是清除 H_2O_2 的重要酶类^[38]。二者的变化反映了污染物胁迫下蚯蚓体内发生的解毒反应过程。

已有研究表明,OPEs 会对蚯蚓抗氧化酶活性产生影响^[30]。TnBP 暴露后蚯蚓体内抗氧化酶 SOD 和 CAT 活性的变化情况如图 2 所示。由图 2(a)可知,蚯蚓暴露 3 d 后,各 TnBP 处理组 SOD 活性均有所增加但差异不显著($P>0.05$);暴露的第 7 天 SOD 活性的变化没有明显规律,其原因可能是当受到 TnBP 胁迫时,蚯蚓体内抗氧化酶的调控较为复杂,除 SOD 可抵御过多的氧自由基外,还有其他的抗氧化

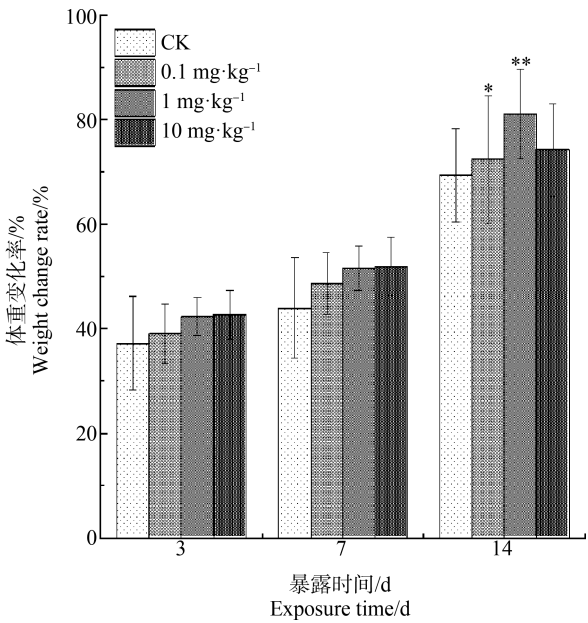


图 1 不同暴露时间 TnBP 对蚯蚓体重变化率的影响

注: * $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 表示不同暴露时间各处理组与对照组相比具有显著性差异。

Fig. 1 Effects of TnBP exposure on weight change rate of earthworms under different time

Note: *, ** indicating significant differences between treatment and control group under different time at $P<0.05$, $P<0.01$ level.

表 1 磷酸三正丁酯 (TnBP) 暴露下蚯蚓死亡率

Table 1 The mortality of earthworms after exposure to tri-*n*-butyl phosphate (TnBP)

TnBP 浓度/(mg·kg ⁻¹)	3 d 死亡率/%	7 d 死亡率/%	14 d 死亡率/%
Concentration of TnBP/(mg·kg ⁻¹)	Mortality of 3 d/%	Mortality of 7 d/%	Mortality of 14 d/%
0	0	0	0
0.1	2.5	0	2.5
1	0	0	0
10	0	2.5	2.5

酶也参与发生反应,如 CAT 等^[39]。而高浓度($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)暴露组中 SOD 活性与对照组相比在第 7 天略有降低,但差异不显著,可能是蚯蚓个体差异所致。随暴露时间增加到 14 d,在较高浓度组($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)SOD 活性显著上升($P<0.05$),SOD 活性被激活,表明 TnBP 持续暴露对抗氧化酶系统造成损伤。根据 Mittler^[40]的观点,当蚯蚓受到 TnBP 胁迫,将引起体内产生过量 $\text{O}_2 \cdot$,从而诱导 SOD 活性显著增加以削减和清除能引起氧化损伤的有害物质。这与 Wang 等^[41]的研究结果类似,蚯蚓在除草剂三唑磺草酮(QYR301)胁迫下,体内产生大量活性氧自由基(ROS),SOD 活性同样被诱导。由图 2(b)可知,蚯蚓在 TnBP 暴露第 3 天,各处理组 CAT 活性较对照均显著上升,CAT 短期内即产生效应,表明 CAT 在抗氧化酶系统中具有重要的地位。而随着浓度升高,高浓度($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)暴露组 CAT 活性较前一浓度有所降低,推测可能是由于抗氧化酶系统的复杂性导致高浓度下更多的氧化产物激发其他抗氧化酶的活性参与抗氧化的过程。在暴露的第 7 天和第 14 天,各处理组 CAT 活性与浓度呈现明显的正相关。总体来看,各处理组 CAT 活性显著升高的趋势是一致的,在整个试验周期,CAT 活性均显著高于对照组,并在第 14 天仍然维持较高水平,这与郑丽萍等^[42]的结果类似,经 14 d 暴露,高浓度处理组 CAT 活性仍表现为强诱导效应,表明蚯蚓通过诱导 CAT 活性升高以清除蚯蚓体内因 TnBP 胁迫产生的 ROS^[43]。

当遭受污染物胁迫时,蚯蚓体内抗氧化酶受到非常复杂的调控,往往不是单一的酶发挥作用,并且其活性变化与暴露剂量和时间均密切相关^[44],SOD 和 CAT 活性的上升是对 TnBP 暴露所产生 ROS 的直接响应,用于清除污染物产生氧化胁迫导致的过量自由基,以适应环境变化,保障机体各种生理功能有条不紊地进行。Chen 等^[2]研究了 2 种常见有机磷酸酯阻燃剂,磷酸三苯酯(TPP)和磷酸三(2-氯乙基)酯(TCEP)对 5 周龄雄性小鼠氧化应激的影响,发现经 TPP 和 TCEP 处理后,肝脏中 SOD 活性增强,CAT 的活性则以剂量依赖性方式增加,与本实验结果一致。Meng 等^[45]也发现经 TPP 处理可以增强胎贝血细胞 SOD 和 CAT 的活性,以及它们各自基因的转录水平。

2.3 TnBP 暴露对 MDA 含量的影响

氧化应激可能导致细胞膜损伤和其他毒性作用^[46]。MDA 作为一种由自由基引发的次级脂质氧化产物,其含量反应了生物机体脂质受氧化损伤的程度^[47]。在正常生理状态下,蚯蚓体内 MDA 含量较低,而当外源污染物胁迫产生的氧自由基,在体内抗氧化防御系统清除不及时,会导致机体 MDA 含量明显升高。不同浓度 TnBP 暴露下,蚯蚓体内 MDA 含量变化如图 3 所示。由图 3 可知,随着暴露时间的增加,MDA 含量逐渐累积,且在暴露的第 7 天和第 14 天,蚯蚓体内 MDA 含量较对照组显著上升($P<0.05$),为对照组的 1.44 ~ 1.67 倍;而随着 TnBP

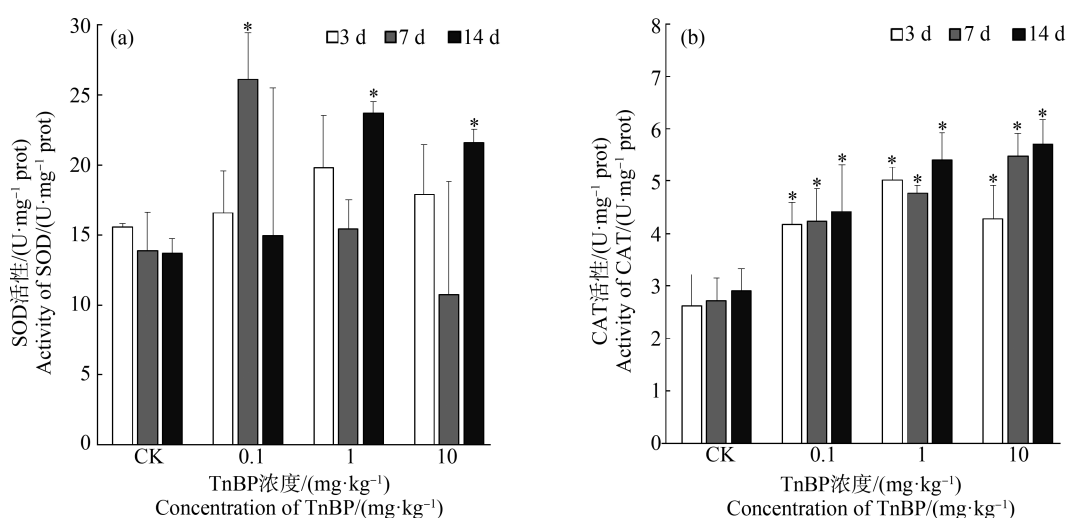


图2 TnBP 暴露下蚯蚓组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性(a)和过氧化氢酶(CAT)活性(b)

注: * 表示与相同暴露时间的对照组相比具有显著性差异, $P<0.05$ 。

Fig. 2 The superoxide dismutase (SOD) (a) and catalase (CAT) (b) activity of earthworms under TnBP exposure

Note: * indicating significant differences between treatment group and control group under the same exposure time at the $P<0.05$ level.

浓度升高,除在第 3 天高浓度组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)MDA 含量较前一浓度出现下降趋势外,其他各组 MDA 含量均随 TnBP 浓度的升高而上升,并与对照组相比差异显著,表明 SOD 和 CAT 活性虽在 TnBP 暴露下有所增强,但不能保护蚯蚓免受过氧化影响,蚯蚓受到一定程度的氧化损伤,导致体内次级脂质过氧化产物 MDA 含量上升。第 3 天 MDA 含量的下降可能是高浓度胁迫下短期内激发了多种抗氧化酶的防御,使得氧化损伤作用较低浓度组有所缓解。与此类似,Chen 等^[2]研究了 TPP 暴露对小鼠氧化应激状况的影响,结果显示,经 TPP 暴露后,小鼠肝脏 MDA 含量显著增加,并存在一定剂量依赖性,与本研究结果一致。在本试验中,TnBP 暴露引起蚯蚓明显的脂质过氧化效应,且总体来说,随着浓度升高,蚯蚓受氧化损伤的程度加重。

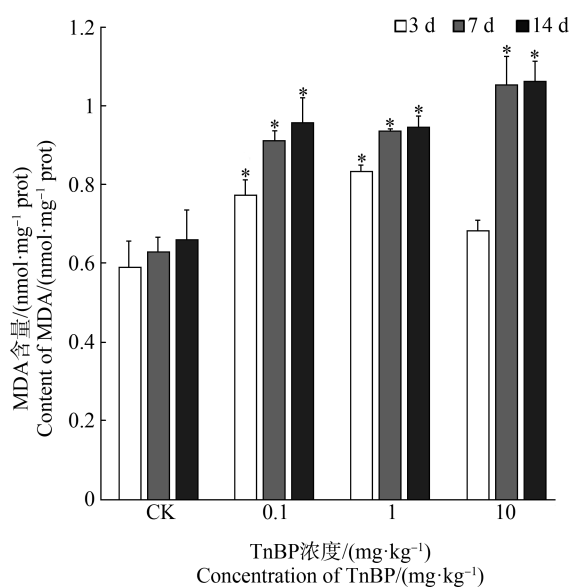


图 3 TnBP 暴露下蚯蚓组织中丙二醛 (MDA) 含量

注: * 表示与相同暴露时间的对照组相比具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Fig. 3 The malondialdehyde (MDA) contents of earthworms under TnBP exposure

Note: * indicating significant differences between treatment group and control group under the same exposure time at the $P < 0.05$ level.

2.4 TnBP 暴露对蚯蚓 DNA 损伤的影响

彗星试验,又名单细胞凝胶电泳技术,是目前检测污染物对生物体遗传毒性常用方法之一^[48]。已有研究证实 OPEs 暴露能引起蚯蚓体腔细胞的 DNA 损伤^[36],表明 OPEs 具有遗传毒性^[49]。3 种不同浓度 TnBP 暴露下蚯蚓体腔细胞中 Tail DNA 含量和 OTM 的变化如图 4 所示。结果显示,在暴露的第 3

天和第 7 天,低浓度 TnBP 处理组($0.1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$)蚯蚓体腔细胞中 Tail DNA 含量和 OTM 较对照变化不显著($P > 0.05$),而在暴露的第 14 天,Tail DNA 含量与对照组相比显著上升($P < 0.05$),提示体腔细胞中 DNA 受到损伤。当浓度升高至 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 和 $10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 时,在暴露第 3 天,Tail DNA 含量和 OTM 出现显著上升并随浓度的增加呈现上升趋势,这可能是因为随着浓度的升高,TnBP 胁迫下在蚯蚓体内产生的 ROS 及其他中间产物增加,造成细胞 DNA 损伤程度的加大。这些结果与 Yan 等^[50]的一致,该研究报道了 TnBP 暴露会引起河蚬(*Corbicula fluminea*)DNA 损伤,且由 TnBP 诱导的 DNA 损伤程度以剂量依赖性方式增加。相似地,Chen 等^[51]的研究也表明 TDCIPP 暴露会造成稀有鮎鲫肝脏中 DNA 的损伤,并呈剂量依赖性。随着暴露时间的增长,高浓度组($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) Tail DNA 含量在第 7 天最高,为 22.13%,在第 14 天呈下降趋势,其原因可能是在高浓度 TnBP 胁迫下,蚯蚓的自我修复机制发挥作用^[52],OTM 则在 $1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 暴露 14 天时达到最高值。

有研究表明 ROS 引起的氧化应激可导致 DNA 损伤^[53],OPEs 诱导的 DNA 损伤与氧化应激之间的关联已在流行病学^[54]和动物实验^[49]中有所报道。推测在本试验中,TnBP 暴露造成蚯蚓体细胞 DNA 损伤可能也是通过氧化应激引起的。近年来,因鉴定了 8-OHdG 水平与氧化性 DNA 损伤和癌症发病率之间的相关性,8-OHdG 已被广泛用作氧化应激和致癌的生物标记物,其含量变化通常作为描述 ROS 对 DNA 损伤程度的指标。本研究分析了不同浓度 TnBP 暴露下,蚯蚓体内 8-OHdG 含量的变化(图 5)。由图 5 可知,在暴露的第 3 天,蚯蚓体内 8-OHdG 含量无明显积累,而到第 7 天和第 14 天时,即使在低浓度 TnBP 暴露条件下,8-OHdG 的水平也显著上升,且其含量与 TnBP 暴露浓度存在明显的剂量-效应关系。由此可见,TnBP 暴露虽会引起蚯蚓体内抗氧化酶活性上升,但却不能完全清除 ROS,从而造成 DNA 损伤。Chen 等^[51]在研究 OPEs 遗传毒性时发现,TDCIPP 暴露会引起稀有鮎鲫肝脏细胞中 8-OHdG 含量显著上升,且 TDCIPP 诱导的 DNA 损伤归因于氧化性 DNA 损伤,与本研究结果一致。相同浓度各处理组在整个染毒周期 8-OHdG 含量呈现先减小后增加的趋势,可能是因为经 14 d 暴露虽然 8-OHdG 在蚯蚓体内有所累积,但其含量的增加并非是一个简单的线性曲线,机体自身对 DNA 损

伤具有修复作用,因而在第 7 天含量有所下降,但却不能被完全修复,这导致在第 14 天继续增加^[55]。

2.5 TnBP 暴露对蚯蚓 AChE 活性的影响

AChE 是催化神经递质乙酰胆碱的一种关键酶^[56],数十年来,其活性被广泛认为是神经毒性的生

物标志物^[57]。本研究发现 TnBP 暴露对蚯蚓 AChE 活性影响较为微弱,在第 7 天 AChE 活性似乎略有下降,但无统计学意义(图 6)。Sun 等^[58]在研究 TnBP 对斑马鱼的神经毒性时,也未发现 AChE 活性变化,但 TnBP 可影响斑马鱼幼鱼行为,通过非乙酰胆

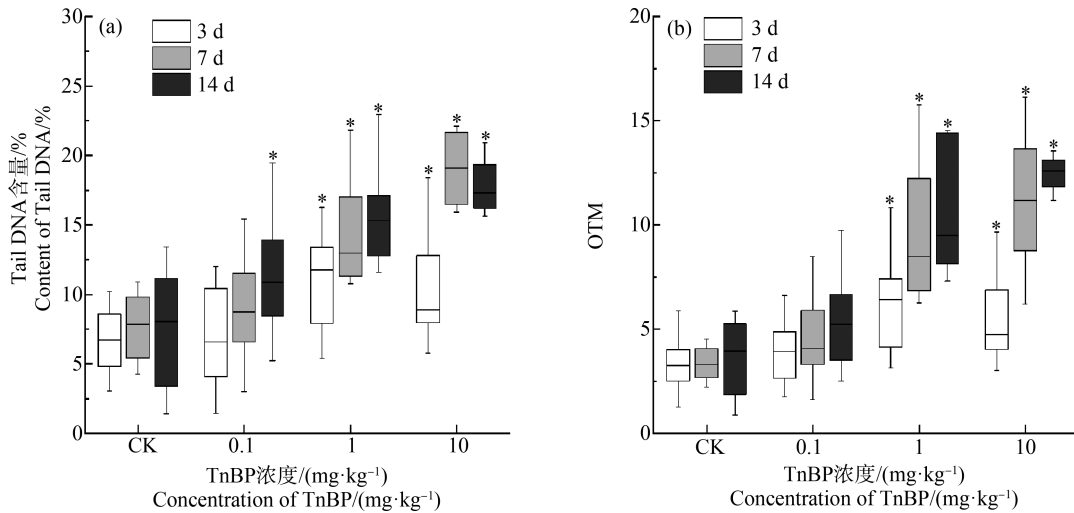


图 4 TnBP 暴露下蚯蚓脱氧核糖核酸 (DNA) 损伤: Tail DNA 含量 (a) 和 Olive 尾矩 (OTM) (b)

注: * 表示与相同暴露时间的对照组相比具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Fig. 4 Tail DNA (a) and Olive tail moment (OTM) (b) of earthworms under TnBP exposure

Note: * indicating significant differences between treatment group and control group under the same exposure time at the $P < 0.05$ level.

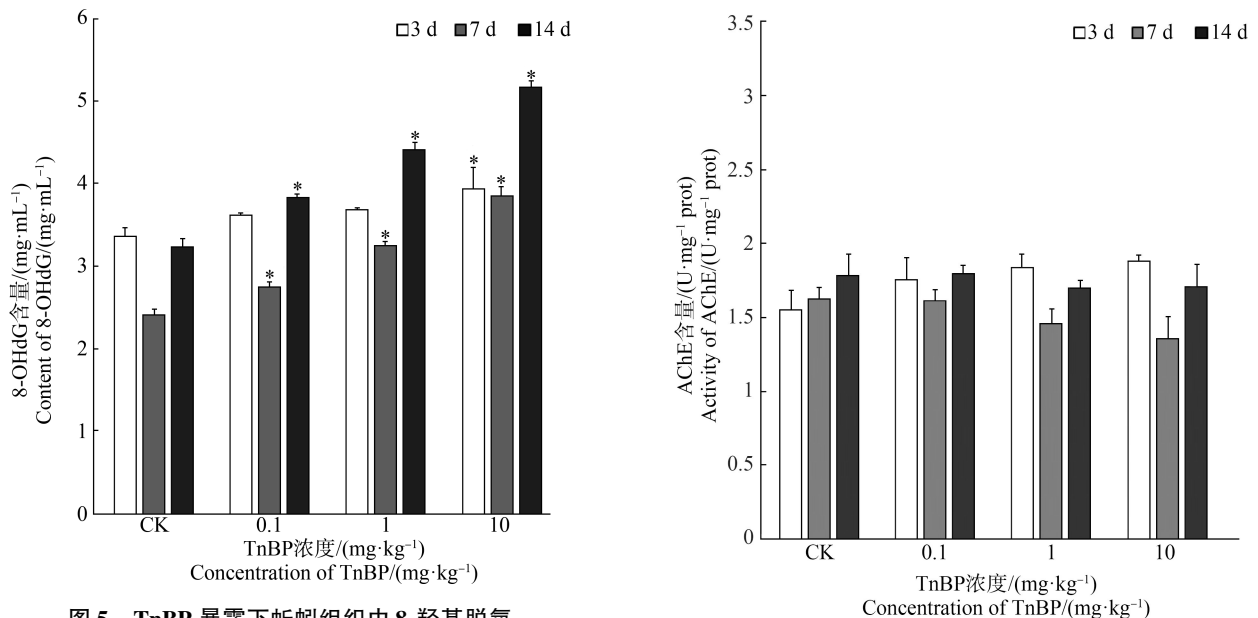


图 5 TnBP 暴露下蚯蚓组织中 8-羟基脱氧鸟苷 (8-OHdG) 含量

注: * 表示与相同暴露时间的对照组相比具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Fig. 5 The 8-hydroxyguanosine (8-OHdG) contents of earthworms under TnBP exposure

Note: * indicating significant difference between treatment group and control group under the same exposure time at the $P < 0.05$ level.

图 6 TnBP 暴露下蚯蚓组织中乙酰胆碱酯酶 (AChE) 活性

注: * 表示与相同暴露时间的对照组相比具有显著性差异, $P < 0.05$ 。

Fig. 6 The acetylcholinesterase (AChE) activity of earthworms under TnBP exposure

Note: * indicating significant differences between treatment group and control group under the same exposure time at the $P < 0.05$ level.

碱途径使幼鱼游泳速度下降,产生神经毒性,并抑制幼鱼神经发育关键基因髓磷脂碱性蛋白基因(*mbp*)和突触蛋白基因(*syn2a*)的表达;类似地,顾杰等^[59]研究发现,TPP、2-乙基己基二苯基磷酸酯(EHDPP)和TCEP暴露能显著抑制斑马鱼幼鱼 *mbp* 和 *syn2a* 的转录,通过氧化应激和下调神经发育关键基因的转录,从而导致神经毒性。Jiang 等^[60]的研究结果表明,TnBP 能对蚯蚓产生神经毒性。在本研究中,TnBP 暴露对蚯蚓 AChE 活性影响较为微弱,可能是因为 TnBP 也是通过非乙酰胆碱途径诱导神经毒性,其具体影响机制有待进一步探究。

综上所述,不同浓度 TnBP 暴露对蚯蚓死亡与生长没有显著影响,但可诱导蚯蚓体内 SOD 酶活性和 CAT 酶活性增强,可能通过非乙酰胆碱途径诱导神经毒性,即使是低浓度 TnBP 暴露,也能导致蚯蚓体内 MDA 含量显著增加,引起蚯蚓脂质过氧化与 DNA 损伤。这些结果有助于了解 TnBP 暴露对蚯蚓的毒性效应及毒性作用机理,丰富了 OPEs 污染对土壤生物影响的认识,并为评估土壤生态系统中 OPEs 的风险提供了重要信息。

通讯作者简介:李梅(1971—),女,博士,教授,主要研究方向为环境毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Hou R, Xu Y P, Wang Z J. Review of OPFRs in animals and humans: Absorption, bioaccumulation, metabolism, and internal exposure research [J]. Chemosphere, 2016, 153: 78-90
- [2] Chen G L, Jin Y X, Wu Y, et al. Exposure of male mice to two kinds of organophosphate flame retardants (OPFRs) induced oxidative stress and endocrine disruption [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2015, 40(1): 310-318
- [3] Cui K Y, Wen J X, Zeng F, et al. Occurrence and distribution of organophosphate esters in urban soils of the subtropical City, Guangzhou, China [J]. Chemosphere, 2017, 175: 514-520
- [4] Wang X Q, Meng X J, Li F, et al. The critical factors affecting typical organophosphate flame retardants to mimetic biomembrane: An integrated *in vitro* and *in silico* study [J]. Chemosphere, 2019, 226: 159-165
- [5] Someya M, Suzuki G, Ionas A C, et al. Occurrence of emerging flame retardants from e-waste recycling activities in the northern part of Vietnam [J]. Emerging Contaminants, 2016, 2(2): 58-65
- [6] Cequier E, Marcé R M, Becher G, et al. A high-throughput method for determination of metabolites of organophosphate flame retardants in urine by ultra performance liquid chromatography-high resolution mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2014, 845: 98-104
- [7] Bollmann U E, Möller A, Xie Z Y, et al. Occurrence and fate of organophosphorus flame retardants and plasticizers in coastal and marine surface waters [J]. Water Research, 2012, 46(2): 531-538
- [8] Yang F X, Ding J J, Huang W, et al. Particle size-specific distributions and preliminary exposure assessments of organophosphate flame retardants in office air particulate matter [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(1): 63-70
- [9] Wang Q W, Lam J C W, Man Y C, et al. Bioconcentration, metabolism and neurotoxicity of the organophorous flame retardant 1, 3-dichloro 2-propyl phosphate (TDCPP) to zebrafish [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 158: 108-115
- [10] Cao S X, Zeng X Y, Song H, et al. Levels and distributions of organophosphate flame retardants and plasticizers in sediment from Taihu Lake, China [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2012, 31(7): 1478-1484
- [11] Wei G L, Li D Q, Zhuo M N, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure [J]. Environmental Pollution, 2015, 196: 29-46
- [12] Gao X Z, Xu Y P, Ma M, et al. Distribution, sources and transport of organophosphorus flame retardants in the water and sediment of Ny-Alesund, Svalbard, the Arctic [J]. Environmental Pollution, 2020, 264: 114792
- [13] 高小中, 许宜平, 王子健. 有机磷酸酯阻燃剂的环境暴露与迁移转化研究进展[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 56-68
- [14] Gao X Z, Xu Y P, Wang Z J. Progress in environment exposure, transport and transform of organophosphorus flame retardants [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 56-68 (in Chinese)
- [15] Yang J W, Zhao Y Y, Li M H, et al. A review of a class of emerging contaminants: The classification, distribution, intensity of consumption, synthesis routes, environmental effects and expectation of pollution abatement to organophosphate flame retardants (OPFRs) [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2019, 20(12): E2874
- [16] Chen Y Y, Chen Y J, Zhang Y H, et al. Determination of HFRs and OPFRs in PM_{2.5} by ultrasonic-assisted extraction combined with multi-segment column purification

- and GC-MS/MS [J]. *Talanta*, 2019, 194: 320-328
- [16] Wang Q Z, Zhao H X, Xu L, et al. Uptake and translocation of organophosphate flame retardants (OPFRs) by hydroponically grown wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 174: 683-689
- [17] Meeker J D, Stapleton H M. House dust concentrations of organophosphate flame retardants in relation to hormone levels and semen quality parameters [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(3): 318-323
- [18] 许宜平, 王子健, 陈睿, 等. 有机磷酸酯的暴露、毒性机制及环境风险评估[M]. 北京: 科学出版社, 2019: 5
- [19] Zhong M Y, Wu H F, Mi W Y, et al. Occurrences and distribution characteristics of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in the sediments of the Bohai and Yellow Seas, China [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 615: 1305-1311
- [20] He C, Wang X Y, Tang S Y, et al. Concentrations of organophosphate esters and their specific metabolites in food in southeast Queensland, Australia: Is dietary exposure an important pathway of organophosphate esters and their metabolites? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(21): 12765-12773
- [21] Greaves A K, Su G Y, Letcher R J. Environmentally relevant organophosphate triesters in herring gulls: *In vitro* biotransformation and kinetics and diester metabolite formation using a hepatic microsomal assay [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2016, 308: 59-65
- [22] Aznar-Alemany Ò, Aminot Y, Vilà-Cano J, et al. Halogenated and organophosphorus flame retardants in European aquaculture samples [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 612: 492-500
- [23] Hou R, Huang C, Rao K F, et al. Characterized *in vitro* metabolism kinetics of alkyl organophosphate esters in fish liver and intestinal microsomes [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(5): 3202-3210
- [24] United States Environmental Protection Agency (US EPA). HPV Chemical Hazard Characterizations 2014 [R]. Washington DC: US EPA, 2014
- [25] van der Veen I, de Boer J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis [J]. *Chemosphere*, 2012, 88(10): 1119-1153
- [26] Luo Q, Gu L Y, Wu Z P, et al. Distribution, source apportionment and ecological risks of organophosphate esters in surface sediments from the Liao River, Northeast China [J]. *Chemosphere*, 2020, 250: 126297
- [27] 邓旭, 印红玲, 何婉玲, 等. 有机磷酸酯在成都市市/郊区剖面土壤及农作物中的分布及迁移[J]. *环境化学*, 2019, 38(3): 679-685
- Deng X, Yin H L, He W L, et al. Distribution and migration of OPEs in soil profile and crops in urban and suburban areas of Chengdu [J]. *Environmental Chemistry*, 2019, 38(3): 679-685 (in Chinese)
- [28] He M J, Yang T, Yang Z H, et al. Occurrence and distribution of organophosphate esters in surface soil and street dust from Chongqing, China: Implications for human exposure [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2017, 73(3): 349-361
- [29] Wang Y, Li Z Y, Tan F, et al. Occurrence and air-soil exchange of organophosphate flame retardants in the air and soil of Dalian, China [J]. *Environmental Pollution*, 2020, 265: 114850
- [30] Yan S H, Wu H M, Qin J H, et al. Halogen-free organophosphorus flame retardants caused oxidative stress and multixenobiotic resistance in Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*) [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 225: 559-568
- [31] Hou R, Yuan S W, Feng C L, et al. Toxicokinetic patterns, metabolites formation and distribution in various tissues of the Chinese rare minnow (*Gobiocypris rarus*) exposed to tri(2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP) and tri-*n*-butyl phosphate (TNBP) [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 668: 806-814
- [32] 高丹, 同帆, 张圣虎, 等. 4种典型有机磷阻燃剂对斑马鱼胚胎毒性及风险评价[J]. *生态与农村环境学报*, 2017, 33(9): 836-844
- Gao D, Tong Z, Zhang S H, et al. Toxicity of four typical organic phosphorus flame retardants to zebrafish embryo and risk assessment [J]. *Journal of Ecology and Rural Environment*, 2017, 33(9): 836-844 (in Chinese)
- [33] Asensio V, Rodríguez-Ruiz A, Garmendia L, et al. Towards an integrative soil health assessment strategy: A three tier (integrative biomarker response) approach with *Eisenia fetida* applied to soils subjected to chronic metal pollution [J]. *Science of the Total Environment*, 2013, 442: 344-365
- [34] Organization for Economic Cooperation and Development (OECD). Test No. 207: Earthworm, acute toxicity tests [R]. Paris: OECD, 1984
- [35] Eyambe G S, Goven A J, Fitzpatrick L C, et al. A non-invasive technique for sequential collection of earthworm (*Lumbricus terrestris*) leukocytes during subchronic immunotoxicity studies [J]. *Laboratory Animals*, 1991, 25(1): 61-67

- [36] Yang Y, Xiao Y, Chang Y Q, et al. Intestinal damage, neurotoxicity and biochemical responses caused by tris(2-chloroethyl) phosphate and tricresyl phosphate on earthworm [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 158: 78-86
- [37] Kelly K A, Havrilla C M, Brady T C, et al. Oxidative stress in toxicology: Established mammalian and emerging piscine model systems [J]. *Environmental Health Perspectives*, 1998, 106(7): 375-384
- [38] 刘文军, 高健鹏, 王冠颖, 等. DEHP 对土壤蚯蚓氧化胁迫及 DNA 损伤的研究[J]. *土壤学报*, 2017, 54(5): 1170-1180
- Liu W J, Gao J P, Wang G Y, et al. Oxidating stress and DNA damage of DEHP to soil earthworms [J]. *Acta Pedologica Sinica*, 2017, 54(5): 1170-1180 (in Chinese)
- [39] 沈洪艳, 焦晓会, 武彤. 头孢噻肟钠对斑马鱼 SOD 活性、MDA 含量及 DNA 损伤的影响[J]. *环境科学学报*, 2015, 35(8): 2626-2632
- Shen H Y, Jiao X H, Wu T. Effects of cefotaxime sodium on SOD activity, MDA content and DNA damage in zebrafish [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2015, 35(8): 2626-2632 (in Chinese)
- [40] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance [J]. *Trends in Plant Science*, 2002, 7(9): 405-410
- [41] Wang H Z, Zhang X L, Wang L P, et al. Biochemical responses and DNA damage induced by herbicide QYR301 in earthworm (*Eisenia fetida*) [J]. *Chemosphere*, 2020, 244: 125512
- [42] 郑丽萍, 冯艳红, 赵欣, 等. 氯丹和灭蚁灵污染场地土壤对蚯蚓的毒性效应研究[J]. *农业环境科学学报*, 2010, 29(10): 1924-1929
- Zheng L P, Feng Y H, Zhao X, et al. Toxicity effects of chlordane and mirex contaminated soil on earthworm (*Eisenia foetida*) [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2010, 29(10): 1924-1929 (in Chinese)
- [43] 张薇, 宋玉芳, 孙铁珩, 等. 土壤低剂量茚污染对蚯蚓若干生化指标的影响[J]. *应用生态学报*, 2007, 18(9): 2097-2103
- Zhang W, Song Y F, Sun T H, et al. Effects of low dosage pyrene pollution on biochemical characters of earthworm (*Eisenia fetida*) in soil [J]. *Chinese Journal of Applied Ecology*, 2007, 18(9): 2097-2103 (in Chinese)
- [44] 姜锦林, 单正军, 周军英, 等. 常用农药对赤子爱胜蚓急性毒性和抗氧化酶系的影响[J]. *农业环境科学学报*, 2017, 36(3): 466-473
- Jiang J L, Shan Z J, Zhou J Y, et al. Influence of commonly used pesticides on acute toxicity to earthworm *Eisenia fetida* and alteration of antioxidant enzyme activities [J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2017, 36(3): 466-473 (in Chinese)
- [45] Meng X J, Li F, Wang X Q, et al. Toxicological effects of graphene on mussel *Mytilus galloprovincialis* hemocytes after individual and combined exposure with triphenyl phosphate [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2020, 151: 110838
- [46] Ou Z J, Li J H. The geochemically-analogous process of metal recovery from second-hand resources via mechanochemistry: An atom-economic case study and its implications [J]. *Waste Management*, 2016, 57: 57-63
- [47] Wang Z F, Cui Z J, Liu L, et al. Toxicological and biochemical responses of the earthworm *Eisenia fetida* exposed to contaminated soil: Effects of arsenic species [J]. *Chemosphere*, 2016, 154: 161-170
- [48] 王民生. 碱性单细胞微量凝胶电泳测试技术简介[J]. *癌变·畸变·突变*, 1996, 8(2): 112-115
- [49] Chen H Y, Wang P P, Du Z K, et al. Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*) induced by tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate [J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 194: 37-45
- [50] Yan S H, Wang Q, Yang L H, et al. Comparison of the toxicity effects of tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCIPP) with tributyl phosphate (TNBP) reveals the mechanism of the apoptosis pathway in Asian freshwater clams (*Corbicula fluminea*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(11): 6850-6858
- [51] Chen R, Hou R, Hong X S, et al. Organophosphate flame retardants (OPFRs) induce genotoxicity *in vivo*: A survey on apoptosis, DNA methylation, DNA oxidative damage, liver metabolites, and transcriptomics [J]. *Environment International*, 2019, 130: 104914
- [52] 郑晓奇, 史雅娟, 吕永龙, 等. 全氟辛烷磺酸对赤子爱胜蚓的抗氧化酶、代谢酶和 DNA 损伤的影响[J]. *环境科学学报*, 2013, 33(11): 3153-3159
- Zheng X Q, Shi Y J, Lv Y L, et al. Effects of perfluorooctane sulfonate on antioxidant and metabolic enzymes and DNA damage of earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 2013, 33(11): 3153-3159 (in Chinese)
- [53] 平令文, 李现旭, 张翠, 等. DEP 对蚯蚓抗氧化酶系的影响及 DNA 损伤[J]. *环境科学*, 2018, 39(10): 4825-4833
- Ping L W, Li X X, Zhang C, et al. Oxidative stress and DNA damage induced by DEP exposure in earthworms [J]. *Environmental Science*, 2018, 39(10): 4825-4833 (in Chinese)

- Chinese)
- [54] Lu S Y, Li Y X, Zhang T, et al. Effect of E-waste recycling on urinary metabolites of organophosphate flame retardants and plasticizers and their association with oxidative stress [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(4): 2427-2437
- [55] 裘著革, 李官贤, 孙咏梅, 等. 烹调油烟雾诱导核酸氧化损伤及其标志物 8-羟基脱氧鸟苷的形成机制[J]. *环境与健康杂志*, 2003, 20(5): 259-262
- Xi Z G, Li G X, Sun Y M, et al. Oxidative damage of DNA and formation of its biomarker 8-hydroxydeoxyguanosine induced by heated cooking oil vapors [J]. *Journal of Environment and Health*, 2003, 20(5): 259-262 (in Chinese)
- [56] Eaton D L, Daroff R B, Autrup H, et al. Review of the toxicology of chlorpyrifos with an emphasis on human exposure and neurodevelopment [J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2008, 38(Supl.2): 1-125
- [57] Tilton F A, Bammler T K, Gallagher E P. Swimming impairment and acetylcholinesterase inhibition in zebrafish exposed to copper or chlorpyrifos separately, or as mixtures [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2011, 153(1): 9-16
- [58] Sun L W, Xu W B, Peng T, et al. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2016, 55: 16-22
- [59] 顾杰, 吴江, 王宏烨, 等. 有机磷酸酯对斑马鱼的早期神经毒性作用研究[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(5): 152-158
- Gu J, Wu J, Wang H Y, et al. Neurotoxicity of organophosphate esters on the early life stages of zebrafish [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(5): 152-158 (in Chinese)
- [60] Jiang X F, Yang Y, Liu P, et al. Transcriptomics and metabolomics reveal Ca^{2+} overload and osmotic imbalance-induced neurotoxicity in earthworms (*Eisenia fetida*) under tri-*n*-butyl phosphate exposure [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 748: 142169 ◆