

邻苯二甲酸酯对斑马鱼胚胎发育的联合毒性*

何秀婷, 李 潇¹, 杨永涛^{1,2}, 李凯彬³, 李桂英⁴, 聂湘平¹

1. 暨南大学水生生物研究所, 广东 广州 510632;
2. 济宁学院生命科学与工程系, 山东 曲阜 273155;
3. 中国水产科学研究院珠江水产研究所, 广东 广州 510380;
4. 中国科学院地球化学研究所, 广东 广州 510640)

摘 要: 通过 48 h 单一毒性试验和正交试验, 研究了邻苯二甲酸二甲酯 (DMP)、邻苯二甲酸二乙酯 (DEP)、邻苯二甲酸二正丁酯 (DBP) 和邻苯二甲酸二异辛酯 (DEHP) 4 种邻苯二甲酸酯类化合物暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应。结果表明: 这些化合物对斑马鱼胚胎发育有明显的抑制作用, 可以造成胚胎发育畸形甚至死亡, 具有特定最敏感的毒理学终点; 4 种邻苯二甲酸酯 (PAEs) 单独作用时毒性大小顺序依次为 DBP > DEHP > DEP > DMP; 在 4 种 PAEs 对斑马鱼胚胎发育的混合暴露正交试验中, DBP 和 DEHP 存在交互作用, 对其致死毒性和发育毒性影响最大; DBP 虽然对斑马鱼胚胎的致死毒性和发育毒性影响不明显, 但 DBP 可导致胚胎发育的严重畸形。

关键词: 邻苯二甲酸酯; 斑马鱼; 胚胎毒性; 联合毒性

中图分类号: X171.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0529-6579 (2010) 05-0101-06

Effects of Combined Toxicity of Phthalic Acid Esters on Zebrafish Embryonic Development

HE Xiuting¹, LI Xiao¹, YANG Yongtao^{1,2}, LI Kaibin³, LI Guiying⁴, NIE Xiangping¹

1. Institute of the Hydrobiology, Jinan University, Guangzhou 510632, China;
2. Department of Life Science and Engineering, Jining University, Qufu 273155, China;
3. Pearl River Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510380, China;
4. Institute of Geochemistry Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510640, China).

Abstract: In order to assess the effects of phthalic acid esters (PAEs) on aquatic environment and specials, toxicity of Dimethyl phthalate (DMP), Diethyl phthalate (DEP), Dibutyl phthalate (DBP) and Di-(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) to embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) was examined by means of 48 h exposure based on single and multicomponent orthogonal tests. Results showed that PAEs remarkably inhibited the embryonic development of zebrafish and caused embryo abnormality, even death. The most sensitive toxicological endpoints to four different congeners of PAEs had been identified. The toxicity of 4 PAEs to embryonic development of zebrafish was ranked as followed: DBP > DEHP > DEP > DMP. In the orthogonal toxicity experiment, joint effects of DBP and DEHP were the key factors for increasing lethal ratio and developmental toxicity of PAEs. For DBP, results revealed that it had little effects on the lethal and developmental toxicity comparing with other components, but it can cause serious deformity in the combined toxicity experiment.

Key words: phthalic acid esters; zabrafish; embryo toxicity test; combined toxicit

* 收稿日期: 2009-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (U0633006; 40673062); 科技部公益研究专项资助项目 (2004DIB1Z-029)

作者简介: 何秀婷 (1981 年生) 女, 博士生; 通讯作者: 聂湘平; E-mail: txpnie@jnu.edu.cn

邻苯二甲酸酯 (phthalic acid esters, PAEs) 是一类应用广泛的人工合成工业有机化合物, 主要用作增塑剂, 以提高产品的可塑性和强度, 也普遍用于农药、涂料、印染、油漆、化妆品、香料和生活用品的生产。由于 PAEs 极易迁移进入环境, 且难以降解, 随着塑料橡胶制品的广泛应用, 在大气、水体、土壤、生物体乃至人体都发现 PAEs 的存在^[1-2]。研究表明 PAEs 类化合物具有雌激素作用, 能够干扰人体内正常的内分泌从而影响生殖^[3-4]; 也有研究报道该类化合物存在致癌、致畸、致突变和致哮喘的作用^[5-6]。美国国家环保局 (US EPA) 将邻苯二甲酸二甲酯 (Dimethyl phthalate, DMP), 邻苯二甲酸二乙酯 (Diethyl phthalate, DEP), 邻苯二甲酸二正丁酯 (Dibutyl phthalate, DBP), 邻苯二甲酸丁基苄基酯 (Butylbenzyl phthalate, BBP), 邻苯二甲酸二正辛酯 (Din-octyl phthalate, DOP), 邻苯二甲酸二异辛酯 (Di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP) 6 种 PAEs 化合物列为优先控制的有毒污染物^[7], 我国也将 DEP、DMP 和 DOP 3 种 PAEs 化合物确定为环境优先控制污染物^[8]。目前, 对邻苯二甲酸酯类化合物的研究主要集中在单一污染物的毒性效应。而实际上这几种化合物常常是同时存在于环境中, 生物体更多是处在这些化合物的混合暴露中。本研究以斑马鱼为模式生物, 选择了 4 种养殖鱼体内被普遍检出的邻苯二甲酸酯类化合物^[9], 即 DMP、DEP、DBP 和 DEHP, 探讨它们在斑马鱼胚胎发育过程的单一毒性和联合毒性效应, 为这类物质风险管理提供有效的毒理学依据。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器

实验选用以 4 种邻苯二甲酸酯类: DMP、DEP、DBP 和 DEHP, 均为分析纯, 购于美国 Accu Standard, INC。助溶剂丙酮为国产分析纯。

试验仪器包括; 倒置光学显微镜、可控光、控温循环水族箱、光照恒温培养箱和 24 孔细胞培养板。

1.2 实验动物

将成年斑马鱼 (雌雄鱼数量比约为 2:1) 斑马鱼饲养在经活性炭过滤并充分曝气的水体内, 水体 pH 8.34, 总硬度为 28~32 dH, 保持 (26±1)℃, 光照/黑暗周期 14 h/10 h, 进行驯养。每日喂食 2 次经紫外消毒处理过的冷冻鱼食摇蚊幼虫 (来自非污染环境, 经检测四种受试化合物的含量低于检测限)。根据 Nagel 法收集受精卵^[10]。鱼卵收集后,

用水迅速清洗除去残留物, 在倒置显微镜下挑选出分裂正常的受精卵, 进行毒性试验。实验用水是曝气 24 h 以上的自来水。实验中空白对照组、溶剂对照组 (0.1% 丙酮) 及处理组各设置三个平行。

1.3 实验方法

1.3.1 单一毒性实验 按照 OECD^[11] 指南设计胚胎毒性试验。测试化合物的丙酮储备液用纯净水配制成水溶液, 母液中的丙酮体积分数不超过 0.3%, 受试液中丙酮的体积分数不超过 0.1%。开始实验前, 分别配制 4 种 PAEs 的 5 组质量浓度 (DMP: 2.50, 5.00, 10.0, 20.0, 40.0 mg/L; DEP: 0.75, 1.50, 3.00, 6.00, 12.0 mg/L; DBP: 0.075, 0.15, 0.30, 0.60, 1.20 mg/L; DEHP: 0.250, 0.50, 1.00, 2.00, 4.00 mg/L) 备用。选用 24 孔多孔板, 每孔的容积为 3 mL, 实验时每孔加入 2 mL 试液, 放一枚受精卵。每张多孔板为一个实验浓度组, 同时进行空白对照组和溶剂对照组 ($\varphi = 0.1\%$ 丙酮)。铝箔封面以避免蒸发改变实验浓度。将密封好的多孔板放在温度恒定为 (26±1)℃ 的光照培养箱中孵化。在倒置显微镜下观察胚胎发育, 记录发育过程中一些具有代表性的毒理学终点^[12], 并记录 48 h 胚胎死亡数, 用概率单位法计算 48 h LC₅₀ 值。

1.3.2 联合毒性试验 在已测得 48 h 半数死亡质量浓度 (LC₅₀) 的基础上, 每种化合物设定高、中、低 3 个实验质量浓度 (见表 1), 考虑到各因素之间可能存在的联合交互作用, 采用四因素三水平 L₂₇ (3⁴) 正交表把试验分为 27 组, 每组设 3 个平行, 测试各混合物对斑马鱼胚胎的毒性效应, 并记录各试验组 48 h 的胚胎死亡数、孵化数和畸形数。

表 1 4 种邻苯二甲酸酯混合暴露对斑马鱼胚胎发育影响的正交试验因素水平表

Table 1 Impacting factors and levels of orthogonal experiment of zebrafish embryonic development exposed to 4 phthalic esters acid mixed

因素	ρ (DMP)/ (mg·L ⁻¹)	ρ (DEP)/ (mg·L ⁻¹)	ρ (DBP)/ (mg·L ⁻¹)	ρ (DEHP)/ (mg·L ⁻¹)
水平 1	1.00	0.10	0.01	0.20
水平 2	2.50	0.30	0.05	0.40
水平 3	5.00	0.90	0.20	0.80

1.4 数据处理

单一毒性试验根据胚胎 48 h 的死亡数, 用概

率单位法计算 48 h 半致死质量浓度 (LC_{50-48})。联合毒性试验中考虑 4 种邻苯二甲酸酯类化合物混合暴露中单因素和两两交互作用对斑马鱼胚胎的毒性效应大小的影响,结果以平均死亡率、平均孵化率和平均致畸率表示。数据采用极差分析法筛选出对斑马鱼胚胎致死毒性、发育毒性和致畸毒性影响最大的水平组合。极差越大,代表 4 种 PAEs 的联合作用时该因素对斑马鱼胚胎毒性的影响越大;极差越小,代表 4 种 PAEs 的联合作用时该因素对斑马鱼胚胎的毒性的影响越小。

2 结果

2.1 单一毒性试验

根据各组 48 h 死亡率,以概率单位计算 LC_{50} 值,试验结果见表 2。

对暴露在邻苯二甲酸酯类溶液里的斑马鱼胚胎进行观察可以发现:暴露 4 h 后观察,部分胚胎发育出现异常,原本应该光滑的胚胎细胞表面出现了一些包状突起(见图 1: d),且多见于动物极,随着时间的延长,包状突起逐渐变大,导致出现细胞

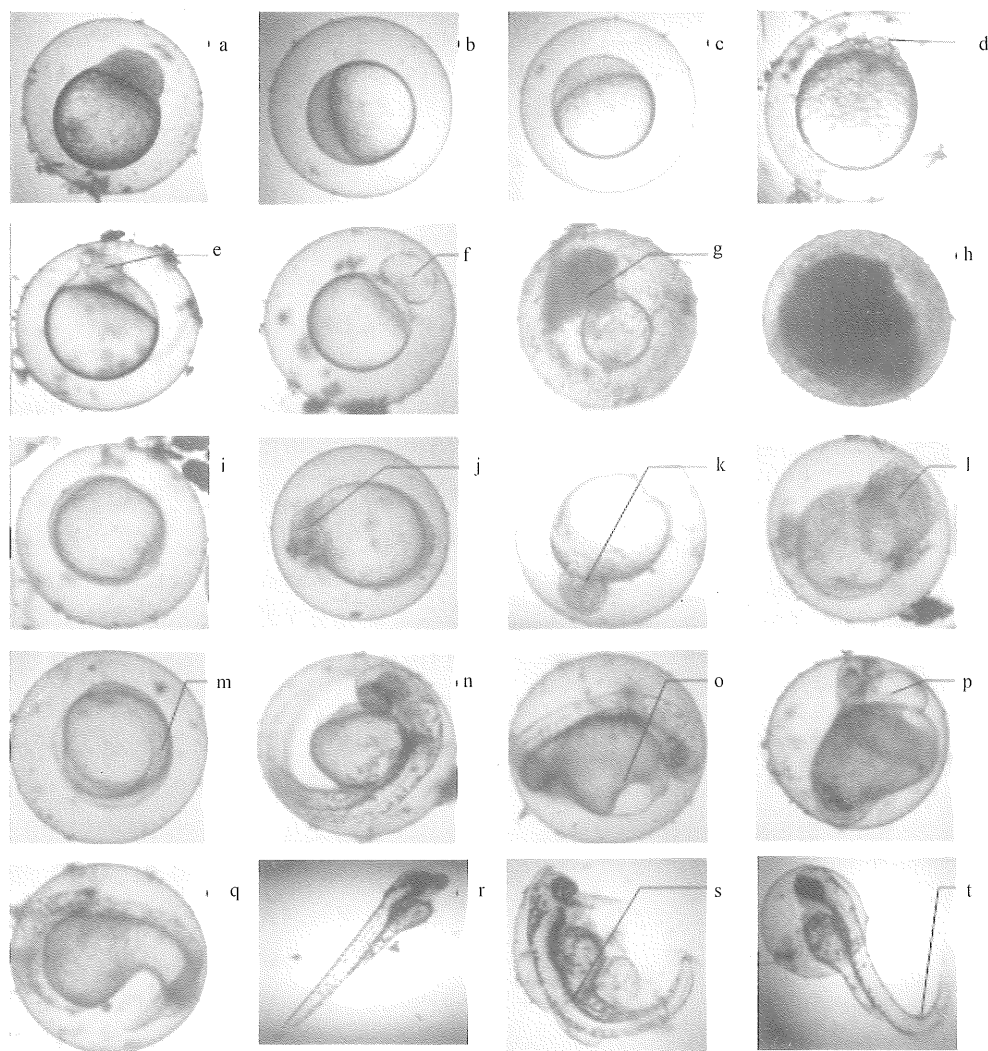


图 1 PAEs 暴露下斑马鱼胚胎不同发育时期形态变化图

Fig. 1 The appearance of zebrafish embryos exposed to PAEs at various growth time

a: 处于囊胚阶段的受精卵 (4 h); b、c: 正常发育的胚胎 (4~8 h); d: 细胞分裂异常的胚胎; e、f: 出现细胞自溶的胚胎; g: 自溶后开始凝集的胚胎; h: 凝集的卵; i: 原肠胚完成 (12 h); j、k、l: 卵黄囊突出的胚胎; m: 体节开始形成; n: 具有明显色素的正常发育胚胎 (48 h); o: 卵黄囊异常的胚胎; p: 具有心包囊水肿的胚胎 (48 h); q: 脊柱发育异常的胚胎; r: 正常孵化的幼体; s: 脊柱弯曲的幼体; t: 尾部弯曲的幼体

自溶现象(见图 1: e、f)。经过一段时间(一般不超过延长期)后导致卵凝集(见图 1: g)。

暴露 8 h 后观察,进入原肠胚期的胚胎细胞有部分出现卵黄囊分裂异常,形成卵黄外突,也会出

现胚胎细胞的自溶现象 (见图 1: j、k、l), 导致卵凝结。原肠胚期胚层运动的方式是外包, 胚胎因外包功能的缺失而妨碍前后体轴的形成, 而导致了以上异常的产生^[13]。

暴露 12 h 后观察, 胚胎处于分裂期, 肌节开始形成 (见图 1: m), 为器官形成的初级阶段, 暴露后的胚胎可能会出现尾部畸变和卵黄囊异常

(见图 1: o)。

暴露 24 h 和 48 h 后观察, 由于这个时期的胚胎处在成形期和孵化期, 尾部已经与卵黄囊分离, 且色素沉积较多 (见图 1: n), 很容易观察到形体、心脏和血液循环系统的发育, 可发现有部分胚胎出现心包肿大、心率缓慢、脊椎和尾部弯曲, 色素沉积减少等现象 (见图 1: p)。

表 2 四种邻苯二甲酸酯类对斑马鱼胚胎的 48 h LC₅₀ 值

Table 2 48 h LC₅₀ of 4 sorts of phthalic esters of zebrafish embryo acute toxicity test

PAEs	48 h LC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	回归方程	R ²	95% 可置信限 (48 h)
ρ(DMP)/(mg·L ⁻¹)	5.06	y=0.276 7x+4.805 3	0.947 9	2.96~10.57
ρ(DEP)/(mg·L ⁻¹)	0.89	y=0.193 3x+5.009 2	0.927 2	0.43~1.90
ρ(DBP)/(mg·L ⁻¹)	0.20	y=1.683 3x+6.185 3	0.900 7	0.10~0.38
ρ(DEHP)/(mg·L ⁻¹)	0.77	y=0.470x+5.054	0.916 5	0.44~1.35

2.2 联合毒性试验

4 种邻苯二甲酸酯混合暴露时对斑马鱼胚胎死亡率、孵化率和致畸率的影响正交试验结果如表 3 所示, 正交试验极差分析见图 2。

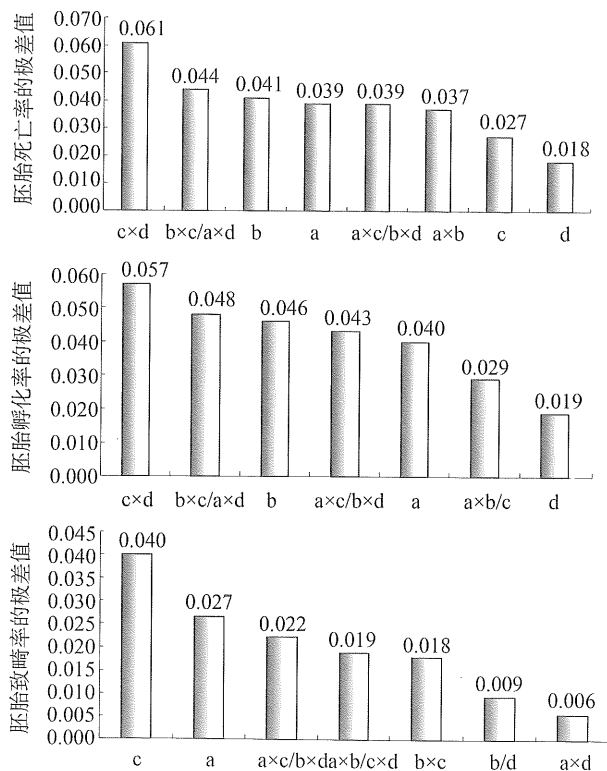


图 2 4 种 PAEs 混合暴露对斑马鱼胚胎发育正交试验的死亡率、孵化率和致畸率的极差分析

Fig. 2 Analysis of the lethal rate, hatch rate and teratogenic rate of zebrafish embryonic developments in orthogonal experiment of mixed exposure with 4 sorts of phthalic esters (a. DMP; b. DEP; c. DBP; d. DEHP)

2.2.1 PAEs 混合暴露对斑马鱼胚胎致死毒性影响

在 4 种邻苯二甲酸酯类化合物混合暴露中 DEP 对斑马鱼胚胎死亡率的影响最大, 其次是 DMP, 最小的是 DEHP。但通过正交试验分析, 混合暴露中 DBP 与 DEHP 的交互作用对斑马鱼胚胎致死毒性的影响最大。其次为 DBP 和 DEP 以及 DMP 和 DEHP 的交互作用。当 DEP、DMP、DBP 和 DEHP 分别以 0.10, 2.50, 0.20 和 0.80 mg/L 的质量浓度混合暴露时对斑马鱼胚胎死亡率的影响最大。

2.2.2 PAEs 混合暴露对斑马鱼胚胎发育毒性影响

在 4 种邻苯二甲酸酯类化合物混合暴露中, DEP 和 DMP 对斑马鱼胚胎死亡率的影响较大, DEHP 对胚胎死亡率的影响最小。正交试验分析表明 DBP 和 DEHP 的交互作用对斑马鱼胚胎孵化率的影响最大, 其次是 DEP 和 DBP 交互作用以及 DMP 与 DEHP 的交互作用。当 DEP、DMP、DBP 和 DEHP 分别以 0.10, 2.50, 0.01, 0.40 mg/L 的质量浓度混合暴露时对斑马鱼胚胎的发育毒性影响最大。

2.2.3 PAEs 混合暴露对斑马鱼致畸毒性影响

在 4 种邻苯二甲酸酯类化合物混合暴露中 DBP 对斑马鱼胚胎孵化率的影响最大, 其次是 DMP, 最小的是 DEP。而 4 种邻苯二甲酸酯交互作用对胚胎孵化率的影响不大。当 DEP、DMP、DBP 和 DEHP 分别以 0.90, 5.00, 0.20 和 0.40 mg/L 的质量浓度混合时对斑马鱼胚胎的致畸毒性影响最大。

3 讨论

根据 48 h 半致死质量浓度, 4 种邻苯二甲酸酯类化合物对斑马鱼胚胎的毒性大小依次为 DBP >

表 3 4 种邻苯二甲酸酯混合暴露对斑马鱼胚胎发育影响的正交试验及其结果¹⁾

Table 3 Design and results of orthogonal experiment of zebrafish embryonic development exposed to 4 phthalic acid esters mixed

实验 组号	$\rho(\text{DMP}) /$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{DEP}) /$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{DBP}) /$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	$\rho(\text{DEHP}) /$ ($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)	平均死 亡率/%	标准偏 差/%	平均孵 化率/%	标准偏 差/%	平均畸 形率/%	标准偏 差/%
1	1.0	0.1	0.01	0.2	32.0	18.9	67.0	20.8	3.00	2.89
2	1.0	0.1	0.05	0.4	33.0	10.4	67.0	10.4	3.00	2.89
3	1.0	0.1	0.2	0.8	35.0	8.66	63.0	7.64	5.00	0.00
4	1.0	0.3	0.01	0.4	27.0	2.89	68.0	7.64	5.00	0.00
5	1.0	0.3	0.05	0.8	23.0	7.64	75.0	8.66	3.00	2.89
6	1.0	0.3	0.20	0.2	32.0	2.89	68.0	2.89	7.00	2.89
7	1.0	0.9	0.01	0.8	32.0	12.6	67.0	12.6	5.00	5.00
8	1.0	0.9	0.05	0.2	23.0	12.6	73.0	14.4	7.00	7.64
9	1.0	0.9	0.20	0.4	23.0	2.89	77.0	2.89	12.0	7.64
10	2.5	0.1	0.01	0.4	38.0	15.3	57.0	18.9	7.00	5.77
11	2.5	0.1	0.05	0.8	25.0	5.00	75.0	5.00	3.00	5.77
12	2.5	0.1	0.20	0.2	32.0	7.64	68.0	7.64	12.0	2.89
13	2.5	0.3	0.01	0.8	35.0	8.66	65.0	8.66	5.00	5.00
14	2.5	0.3	0.05	0.2	27.0	7.64	73.0	7.64	7.00	7.64
15	2.5	0.3	0.20	0.4	43.0	25.2	57.0	25.2	10.0	10.0
16	2.5	0.9	0.01	0.2	25.0	8.66	75.0	8.66	3.00	5.77
17	2.5	0.9	0.05	0.4	30.0	8.66	70.0	8.66	3.00	2.89
18	2.5	0.9	0.20	0.8	32.0	5.77	68.0	5.77	12.0	7.64
19	5	0.1	0.01	0.8	37.0	2.89	63.0	2.89	5.00	5.00
20	5	0.1	0.05	0.2	32.0	2.89	68.0	2.89	8.00	14.4
21	5.0	0.1	0.20	0.4	20.0	8.66	78.0	10.4	12.0	2.89
22	5.0	0.3	0.01	0.2	22.0	11.6	77.0	10.4	10.0	8.66
23	5.0	0.3	0.05	0.4	32.0	12.6	68.0	12.6	8.00	5.77
24	5.0	0.3	0.20	0.8	27.0	7.64	73.0	7.64	7.00	2.89
25	5.0	0.9	0.01	0.4	23.0	7.64	77.0	7.64	5.00	5.00
26	5.0	0.9	0.05	0.8	27.0	5.77	73.0	5.77	12.0	10.4
27	5.0	0.9	0.20	0.2	32.0	10.4	67.0	12.6	7.00	5.77
空白对照					2.33	0.13	86.0	5.00	0.00	0.00
溶剂对照					4.27	0.32	82.3	2.89	0.00	0.00
死	m1	28.89	31.56	30.11	28.56					
亡	m2	31.89	29.78	28.00	29.89					
率	m3	28.00	27.44	30.67	30.33					
孵	m1	69.44	67.33	68.44	70.67					
化	m2	67.56	69.33	71.33	68.78					
率	m3	71.56	71.89	68.78	69.11					
畸	m1	5.556	6.444	5.333	7.037					
形	m2	6.889	6.889	6.000	7.222					
率	m3	8.222	7.333	9.333	6.296					

1) m1: 水平 1 平均值; m2: 水平 2 平均值; m3: 水平 3 平均值。

DEHP > DEP > > DMP, 不同种类 PAEs 的毒性效应各有不同, 这可能这与邻苯二甲酸酯链上的碳链长度有关, 碳链越长相对脂溶性越强, 对斑马鱼胚胎的毒性越大。有文献报道 4 种邻苯二甲酸酯类化合物对绿藻 *Selenastrum capricornutum* 的毒性大小为 DEHP > DBP > DEP > DMP^[14]。Naoki 等研究了虾 (Brine Shrimp) 卵分别在 DMP、DEP 和 DBP 的溶

液中孵化, 结果表明 3 种 PAEs 的毒性大小为 DBP > DEP > DMP^[15]; 与本研究的结果有相似之处。Yang 等^[16] 和 Liu 等^[17] 分别对鲍 (*Haliotis diversicolor supertexta*) 的胚胎进行酞酸酯类化合物毒性试验, 发现上述 4 种 PAEs 的毒性大小依次为 DBP > DMP > DEP > DEHP, 有研究认为由于 DEHP 侧链较长, 有较高的脂溶性, 使其难于渗透到胚胎细胞

中,因此表现出比其它 3 种 PAEs 毒性低^[18]。高质量浓度(大于或等于半致死质量浓度)的 PAEs 会造成斑马鱼胚胎在短时间内就凝结死亡;而较高的浓度(在不致死的情况下)会导致胚胎同时出现发育阻滞、色素沉积减少、心包水肿并伴有心率减慢、脊椎和尾部畸形、卵黄囊异常等毒性指标的 4 种以上;暴露在较低质量浓度(小于半致死质量浓度)PAEs 下的斑马鱼的胚胎只会出现以上毒性指标的一种或同时出现两种,一般多表现为为脊椎和尾部弯曲。

在混合暴露中,4 种邻苯二甲酸酯类化合物对斑马鱼胚胎致死毒性和发育毒性的影响相似,影响程度的大小依次为 DEP > DMP > DBP > DEHP,结果不同于单一毒性试验,这可能是由于混合暴露中各化合物之间存在协同或者拮抗的效应。

DBP 和 DEHP 在混合暴露中的交互作用对斑马鱼胚胎的致死毒性和发育毒性的影响相对较大,二者间可能发生协同作用导致毒性加强;同样 DBP 和 DEP、DMP 和 DEHP 间也会发生协同作用。

DMP 和 DBP 交互作用时对斑马鱼胚胎致死毒性的影响与 DMP 单因素的影响程度是相似,而对斑马鱼胚胎发育毒性的影响则比 DMP 单因素的影响都强,说明二者交互作用时,DMP 对斑马鱼胚胎致死毒性的影响起主导作用,但对斑马鱼胚胎发育毒性 DBP 和 DMP 表现为协同作用。

DEP 对斑马鱼胚胎致死毒性和发育毒性的影响比其它 3 种邻苯二甲酸酯的影响要大,当 DEP 分别和 DMP、DEHP、DBP 交互时,DEP 对联合毒性的影响起主导作用,只有当 DEP 和 DBP 交互作用时对斑马鱼胚胎致死毒性和发育毒性的影响会加强,表现为协同作用;而当 DEP 与 DMP 交互时,对斑马鱼胚胎致死毒性和发育毒性的影响比二者单因素的影响都要小,说明 DEP 和 DMP 之间存在拮抗作用。

当 DEHP 与其他几种 PAEs 交互作用时,往往会使其毒性变大。

4 种邻苯二甲酸酯类化合物联合作用对斑马鱼胚胎致畸毒性的影响结果不同于对其致死毒性和发育毒性的影响。DBP 和 DMP 在混合暴露中对斑马鱼胚胎致畸毒性的影响都很大,而正交分析表明二者交互时其影响程度降低,DBP 和 DMP 对胚胎致畸毒性表现为拮抗作用;DMP 和 DEHP 交互作用的情况与 DBP 和 DMP 交互作用的情况相同,二者之间也出现拮抗作用;相反,DEP 和 DEHP 对斑马鱼胚胎混合暴露致畸毒性的影响相对比较小,但正

交分析 DEP 和 DEHP 交互作用对胚胎致畸毒性的影响程度显著升高,说明二者之间存在协同作用。

在邻苯二甲酸酯类化合物混合暴露中,4 种不同的化合物酯对斑马鱼胚胎致死毒性、胚胎发育毒性和胚胎致畸毒性过程中会表现出协同或拮抗不同作用的影响,其确切机理还有待进一步的研究。复合污染物暴露产生的毒性效应较单一的污染物复杂,它们的毒性效应与介质及不同污染物的组合关系、污染物的浓度、暴露的对象和暴露方式等因素密切相关。

4 结 论

1) DMP、DEP、DBP 和 DEHP 对斑马鱼胚胎的 48 h LC₅₀ 值分别为 5.06、0.89、0.20 和 0.77 mg/L,毒性大小依次为 DBP、DEHP、DEP、DMP。

2) 在所设计的四因素三水平正交试验的浓度范围内,4 种 PAEs 混合暴露过程中,DBP 和 DEHP 交互作用对斑马鱼胚胎致死毒性和发育毒性影响最大,而 DEHP 影响却是最小。DBP 对斑马鱼胚胎的致死毒性和发育毒性的影响相对较小,但对斑马鱼胚胎的致畸毒性的影响很大,在混合暴露中 DBP 就会导致胚胎发育的严重畸形。而 DMP 和 DEHP 交互作用的影响最小。

参考文献:

- [1] MARIKO M; MUTSUKO H K, MAKOTO E. Potential adverse effects of phthalic acid esters on human health: A review of recent studies on reproduction[J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2008, 50: 37 - 49.
- [2] HUANG Pochin, TIEN Cheinjung, SUN Yihmin, et al. Occurrence of phthalates in sediment and biota: Relationship to aquatic factors and the biota-sediment accumulation factor[J]. *Chemosphere*, 2008, 73: 539 - 544.
- [3] HARRISSON P T C, HOLMES P, HUMIREY C D N. Reproductive health in humans and wildlife: are adverse trend associated with environmental chemical exposure [J]. *The Science of the Total Environment*, 1997, 205: 97 - 106.
- [4] LATINI G. Monitoring phthalate exposure in humans[J]. *Clinica Chimica Acta*, 2005, 361: 20 - 29.
- [5] SCOTTA. Industry slams its own study after it links asthma to phthalates [J]. *Chemical Week*, 2004, 106 (28): 13.
- [6] 王蕊,李厚勇,王子兰,等.邻苯二甲酸(2-乙基己基)酯致畸致突变实验研究[J]. *癌变·畸变·突变*, 2002, 14 (2): 120 - 121.

(下转第 112 页)

- role of protein metabolism[J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1990, 41: 187 - 223.
- [3] GUY C, KAPLAN F, KOPKA J, et al. Metabolomics of temperature stress[J]. *Physiol Plant*, 2008, 132(2): 220 - 235.
- [4] 吕庆芳, 丰锋, 张秀枝. 香蕉叶片组织细胞结构特性与耐寒性的关系[J]. *湛江海洋大学学报*, 2000, 20: 48 - 51.
- [5] 陈杰忠, 徐春香, 梁立峰. 低温对香蕉叶片中蛋白质及脯氨酸的影响[J]. *华南农业大学学报*, 1999, 20(3): 54 - 58.
- [6] SAMBROOK J, RUSSELL D W. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M]. 3rd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- [7] LIU H Y, DAI J R, FENG D R, et al. Characterization of a novel plantain *ASR* gene, *MpASR*, that is regulated in response to infection of *Fusarium oxysporum* f. sp. *cubense* and abiotic stresses[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, 52: 315 - 323.
- [8] 顾克余, 翟虎渠. 抑制性扣除杂交技术(SSH)及其在基因克隆上的研究进展[J]. *生物技术通报*, 1999, 2: 13 - 16.
- [9] CLEYNEN I, VAN DE VEN W J. The HMGA proteins: a myriad of functions[J]. *Int J Oncol*, 2008, 32(2): 289 - 305.
- [10] 孙歆, 雷韬, 袁澍, 等. 脱水素研究进展[J]. *武汉植物学研究*, 2005, 23(3): 299 - 304.
- [11] SHOWALTER A. Structure and function of plant cell wall proteins[J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 9 - 23.
- [12] KIM S H, KIM J Y, KIM S J, et al. Isolation of cold stress-responsive genes in the reproductive organs, and characterization of the *OsLti6b* gene from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 1097 - 1110.
- [13] FENG D R, LIU B, LI W Y, et al. Over-expression of a cold-induced plasma membrane protein gene (*MpRCI*) from plantain enhances low temperature-resistance in transgenic tobacco[J]. *Environmental and Experimental Botany*, 2009, 65: 395 - 402.
- [14] KEEGSTR A K, RAIKHEL N. Plant glycosyltransferases[J]. *Curr Opin Plant Biol*, 2001, 4(3): 219 - 224.
- [15] 侯夫云, 黄骥, 陆驹飞, 等. 水稻质体葡萄糖-6-磷酸脱氢酶基因的克隆与表达研究[J]. *遗传学报*, 2006, 5: 66 - 71.
- [16] 魏小春, 郑群, 刘俊杰. 豆科植物半乳甘露聚糖生物合成及调控研究进展[J]. *亚热带植物科学*, 2008, 37(1): 76 - 81.

(上接第 106 页)

- [7] 周文敏. 环境优先污染物[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1989: 11 - 13.
- [8] 金相灿. 有机化合物污染化学 - 有毒有机物污染化学[M]. 北京: 清华大学出版社, 1990: 266 - 275.
- [9] 李潇, 聂湘平, 潘德博, 等. 养殖鱼体邻苯二甲酸酯含量与分布特征[J]. *环境与健康杂志*, 2008, 25(3): 202 - 204.
- [10] SCHULTE C, NAGEL R. Test Acute Toxicity in the Embryo of Zebrafish, *Brachydanio rerio*, as an Alternative to the Acute Fish Test: Preliminary Results[J]. *Alternatives to Laboratory Animals*, 1994, 22: 12 - 19.
- [11] OECD (Organization for Economic Cooperation and Development). OECD TG212 Fish, short-term toxicity test on embryo and sac-fry stages[S]. Paris France: Europe Committee, 1998: 208 - 209.
- [12] 周宇, 于红霞, 丁翔, 等. 氯代苯类有机污染物对斑马鱼胚胎联合毒性效应的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2003, 22(3): 340 - 344.
- [13] AXEL O. The Use of a Refined Zebrafish Embryo Bioassay for the Assessment of Aquatic Toxicity[J]. *Research Note*, 2000, 29(7): 32 - 40.
- [14] ADAMS W J, BIDDINGER G. R, ROBILLARD K A. A summary of the acute toxicity of 14 phthalate esters to representative aquatic organism[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1995, 14(9): 1569 - 1574.
- [15] NAOKI S. Toxic effect of a normal series of phthalate esters on the hatching of shrimp eggs[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 1974, 30(1): 87 - 89.
- [16] YANG Zhihui, ZHANG Xiangjing, CAI Zhonghua. Toxic effect of several phthalate esters on the embryos and larvae of abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Chinese Journal of Oceanology and Limnology*, 2009, 27(2): 395 - 399.
- [17] LIU Ying, GUAN Yuntao, YANG Zhihui, et al. Toxicity of seven phthalate esters to embryonic development of the abalone *Haliotis diversicolor supertexta*[J]. *Ecotoxicology*, 2009, 18: 293 - 303.
- [18] STAPLES C A, ASAMS W J, PARKERTON J W, et al. Aquatic toxicity of eighteen phthalate esters[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 1997, 16(5): 875 - 891.