

Ca²⁺ 与 Pb²⁺ 相互作用对斑马鱼胚胎毒性效应的影响

陈中智, 朱琳*, 姚琨, 王秀娟, 丁俊男

(南开大学环境科学与工程学院, 环境污染过程与基准教育部重点实验室, 天津 300071)

摘要: 为探明 Ca²⁺ 浓度增加是否会使鱼类早期发育阶段对铅毒性的敏感性升高, 以及 Ca²⁺ 单独减弱铅毒性的浓度范围, 选用斑马鱼胚胎作为实验材料, 记录在不同的水化学参数条件下, 胚胎发育过程中一些具有代表性的毒理学终点, 采用相对易于观察且敏感的指标——72 h 孵化率进行分析. 用 Visual MINTEQ2.5.2 软件进行溶液中离子的化学形态分析. 结果表明, 当 Ca²⁺ 浓度从 0.25 mmol/L 增加到 2.00 mmol/L 时, 导致了以自由铅离子活度 ($\{Pb^{2+}\}$) 和溶解态铅总浓度 ($[Pb]_T$) 表示的 72 h EC₅₀ 的增加 (表现为发育延迟), 两者之间存在良好的线性关系. 通过这一线性关系, 可以对 Ca²⁺ 浓度对铅毒性的影响进行预测. 这一结果支持了生物配体模型 (BLM) 概念的假设, 说明在胚胎的表面, 铅离子与钙离子可能在传输和毒性作用位点上存在竞争作用. 而当 Ca²⁺ 浓度从 2.00 mmol/L 增加到 4.00 mmol/L 时, 72 h EC₅₀ ($\{Pb^{2+}\}$) 和 72 h EC₅₀ ($[Pb]_T$) 并没有显著的增加.

关键词: 斑马鱼; 胚胎; 铅; 钙; 毒性; 生物配体模型 (BLM)

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)04-1205-05

Interaction Between Calcium and Lead Affects the Toxicity to Embryo of Zebrafish (*Danio rerio*)

CHEN Zhong-zhi, ZHU Lin, YAO Kun, WANG Xiu-juan, DING Jun-nan

(Key Laboratory of Pollution Processes and Environmental Criteria, Ministry of Education, College of Environmental Science and Engineering, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: This study tested the hypothesis that increased Ca²⁺ content increases the sensitivity of the developing embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) to Pb. And the aim of the study was to investigate the extent to which calcium can individually mitigate lead ion toxicity based on the concept of biotic ligand model (BLM). Embryos of the zebrafish were exposed to various Pb concentrations. Chemical characteristics of water and representative toxicological endpoints of zebrafish embryo were recorded. And general growth retardation as a major toxicological endpoint was used for analysis at 72 h due to its sensitivity and facility. The BLM software of Visual MINTEQ (Version 2.5.2) was employed to calculate the chemical speciation in the solution. The results showed that when Ca²⁺ concentration increased from 0.25 mmol/L to 2.00 mmol/L, the toxicity of lead on embryos of zebrafish (*Danio rerio*) decreased markedly after 72 h. And a large part of these decrease can be explained by the positive linear relations between EC₅₀ ($\{Pb^{2+}\}$)/EC₅₀ ($[Pb]_T$) (expressed as lead ion activity/dissolved total concentration) and activity/total concentration of Ca²⁺, through which the influence of Ca²⁺ on toxicity could be predicted. The results support the assumptions of the BLM and associated with competition between lead and calcium for binding on transport and toxic action sites on biological surfaces. However, when Ca²⁺ concentration increased from 2.00 mmol/L to 4.00 mmol/L, the toxicity of lead on embryos of zebrafish (*Danio rerio*) seemed to be constant at 72 h.

Key words: zebrafish (*Danio rerio*); embryo; lead; calcium; toxicity; biotic ligand model (BLM)

铅是自然界中一种常见的污染物, 能够通过多种方式进入水体, 比如地质风化和火山活动, 或者通过像吸烟、燃煤及使用汽油、电池和涂料等各种人类活动进入^[1]. 虽然水中铅的浓度通常不会超过 0.6 μmol/L^[2], 但以前也有过达到 4.3 μmol/L 的报道^[3]. 人类活动导致的水体污染是鱼类产生铅中毒的主要原因. 铅对于生物来说是一种非必需元素, 即使很小的剂量也能够对生物产生毒性^[4]. 目前, 关于成鱼的铅富集模型正在开发^[5], 近期对于成鱼的研究表明, Pb²⁺ 与 Zn²⁺ 和 Cd²⁺ 类似, 主要抑制活性 Ca²⁺ 在鱼鳃富集位点的吸收^[6,7].

然而, 有研究表明, 通过分析鱼类胚胎毒性数据

和鱼类急性毒性数据, 发现胚胎数据与其相应的成鱼数据的 LC₅₀ 之间并没有相关性^[8], 说明以成体鱼毒性数据为基础建立的模型可能并不适用于鱼类胚胎. 在德国, 自 2005 年起, 鱼类胚胎毒性实验已经被强制用于日常污水的监测. 由于斑马鱼鱼卵易收集, 随时可得, 鱼卵透明度高, 发育迅速, 特征明显, 便于观察, 且敏感性高于成鱼, 斑马鱼胚胎毒性试验已经

收稿日期: 2008-05-08; 修订日期: 2008-06-30

基金项目: 国家重点基础研究发展规划 (973) 项目 (2004CB418504)

作者简介: 陈中智 (1982~), 男, 博士研究生, 主要研究方向为环境生物与生态毒理学, E-mail: coleterchen@gmail.com

* 通讯联系人, E-mail: zhulin@nankai.edu.cn

成为一种成鱼急性毒性试验的有效替代手段.本研究采用斑马鱼胚胎作为实验材料,通过单因子浓度控制的方法,探讨了 Ca^{2+} 对于 Pb^{2+} 在鱼类胚胎早期发育阶段毒性的影响,以及 Ca^{2+} 和 Pb^{2+} 在胚胎竞争位点 (BL) 上的竞争作用,对生物配体模型 (biotic ligand model, BLM) 的假设进行了验证,也对模型的推广及其在生态风险评价和联合效应中的应用提供理论参考.

1 材料与方法

1.1 实验生物

斑马鱼 (*Brachydanio rerio* 或 *Danio rerio*) 是常见的暖水性 ($21 \sim 32^\circ\text{C}$) 观赏鱼,鲤科,体长为 $4 \sim 5 \text{ cm}$. 饲养亲鱼的用水为经活性炭过滤的自来水.氧饱和度 $> 80\%$,驯养光周期为 $14 \text{ h}/10 \text{ h}$ (昼/夜),照度 1000 lx . 开灯刺激产卵.鱼种购于天津市和平区营口道花鸟鱼虫市场,在实验室水质控制条件下驯养 1 个月后即可用于鱼卵采集.用于本试验鱼卵采集的成鱼已在本实验室饲养 6 个月以上.为防止成鱼掠食鱼卵,用不锈钢丝网覆盖收集器.玻璃或塑料仿植物体固定在丝网上.给光 $20 \sim 30 \text{ min}$ 后完成交配和产卵,将鱼卵收集器取出.必须在前 1 d 尽可能晚时,或第 2 d 开灯之前将收集器放入缸内.

1.2 化学试剂

$\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 、 $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、 KCl 及 NaHCO_3 均为国产分析纯试剂,3-(*N*-吗啡啉)丙磺酸 (MOPS) 为进口分装 (自 Beyotime 购得).

1.3 实验设计

先将 CaCl_2 、 MgSO_4 、 KCl 及 NaHCO_3 配制成储备液.向经过活性炭过滤的去离子水中加入不同体积的储备液制得实验溶液.在每一组实验中,用配制好的实验溶液稀释 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 来获得相应浓度的铅离子.为了区别 Ca^{2+} 对于 Pb^{2+} 毒性的独立影响,采用单变量控制,保持其它元素的浓度不变.选择钙离子浓度的变化范围与自然界中实际水体的浓度范围相近.由于 MOPS 缓冲液不与金属络合^[9],且对金属毒性影响很小^[10].故加入 750 mg/L 的 MOPS 作为缓冲液,使得实验前后 pH 值的变化不超过 ± 0.2 .为了获得近似平衡的条件,所有的溶液在进行毒性实验之前于 26°C 条件下放置 1 d.各测试溶液的部分水化学参数见表 1.

1.4 毒性实验

毒性实验按照 OECD 建议的方法进行^[11].在给光 30 min 后取出收集器并收集鱼卵,用蒸馏水迅速

清洗鱼卵以除去残留物,用立体显微镜挑选发育正常的受精卵进行实验.选用 24 孔细胞培养板作为染毒器具,每孔容积为 2.5 mL ,实验时每孔加入 2 mL 试液.放入一枚受精卵,每块多孔板中,20 孔为同一实验浓度,其余 4 个孔为空白对照.每次试验选取 5 个浓度,最高浓度与最低浓度之差不小于 1 个对数单位.空白对照卵为 $4 \times 5 = 20$ 个,染毒卵为 $20 \times 5 = 100$ 个.用生胶带密封以避免蒸发导致实验浓度改变.将密封好的 24 孔板放在温度为 $(26 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的人工气候箱中孵化,整个实验最长持续 144 h .空白对照中能够正常孵化 (无畸形) 的比率 $> 90\%$.

1.5 数据处理与统计

在倒置显微镜下观察胚胎发育,参照文献^[12]中斑马鱼可以观察的毒理学终点和不同类型指标,记录发育过程中一些具有代表性的毒理学终点.本研究采用相对易于观察且敏感的指标——72 h 孵化率作为分析的毒理学终点,用软件 SPSS 13.0 按照概率单位法^[13]计算半数效应浓度 (72 h EC_{50}).根据以前本实验室对全部阴阳离子浓度进行的随机测定,表明实际浓度的变化不超过文中所报道浓度的 $\pm 10\%$.因此,主要的阴阳离子浓度由加入离子的总量计算得出.用 Visual MINTEQ2.5.2 软件进行溶液中离子的化学形态分析,软件计算中考虑了空气中 CO_2 与水溶液的平衡及其对离子形态的影响,设其在空气中的分压为 38.5 Pa .

2 结果与分析

铅暴露的高浓度组与对照相比,胚胎的孵化率有明显的降低,这可能是铅对其发育过程有影响.有些延迟孵化的个体在观察的时间内发育不完全,能够孵化的个体也多出现畸形、平衡能力及游泳能力降低等现象.固定铅浓度,在不同 Ca^{2+} 浓度下,斑马鱼胚胎的 72 h 孵化率明显不同 (图 1),说明 Ca^{2+} 的存在会显著影响 Pb 的生物毒性.在本实验范围内,以溶解态铅总浓度 ($[\text{Pb}]_{\text{T}}$) 表示的 EC_{50} 的变化范围为 $3.98 \sim 46.95 \mu\text{mol/L}$ (表 1); 而以自由铅离子活度 (游离铅离子浓度) ($\{\text{Pb}^{2+}\}$) 表示的 EC_{50} 的变化范围为 $1.66 \sim 17.79 \mu\text{mol/L}$.二者变化范围均在 10 倍左右,说明不管是用溶解态铅总浓度或者自由铅离子活度预测铅的毒性均有局限性.当 Ca^{2+} 浓度从 0.25 mmol/L 增加到 2.00 mmol/L 时,导致了以自由铅离子活度和溶解态铅总浓度表示的 72 h EC_{50} 的升高 (表现为发育延迟率的降低,或 72 h 孵化成功率上升),

两者之间存在良好的线性关系(图 2). 这一结论支持了 BLM 概念的假设^[14], 说明在胚胎表面, 铅离子与钙离子可能在穿膜和毒性作用位点的富集上存在竞争作用. 当 Ca²⁺ 浓度从 2.00 mmol/L 增加到 4.00 mmol/L 时, 72 h EC₅₀ {Pb²⁺} 和 72 h EC₅₀ [Pb]_T 并没有显著的升高, 这可能是因为当 Ca²⁺ 活度较大时, 可作用的位点已经完全被钙占据, 多余的钙便无法再起到保护作用.

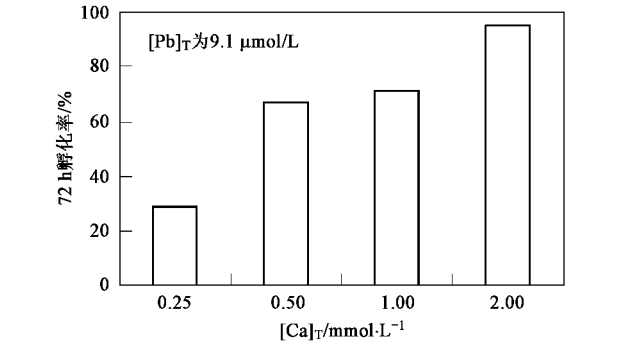


图 1 不同 Ca²⁺ 浓度下的 72 h 孵化率

Fig.1 Rate of hatched embryo at 72 h exposed to different Ca²⁺ concentrations

3 讨论

暴露于污染环境中的鱼卵可以比成鱼更敏感地反映其生物学效应, 因此, 非常有必要在毒理学研究中反映这一阶段. 但 Gellert 等^[15]已经清楚地证实, 在斑马鱼胚胎发育的早期阶段, 胚胎对废水的敏感性会逐渐降低, 这是由于卵膜对于外部污染的通透性逐渐降低, 特别是前 4 h. 上述结论表明, 在利用斑马鱼早期生命阶段进行生态风险评价时, 应当尽早将其暴露于污染物中. 因此, 在本研究中, 斑马鱼胚胎在产出 1 h 之内, 保护性卵膜还没有完全硬化时, 将其暴露于含铅试液, 并保证各组的起始暴露时间一致.

对于大多数其他金属来说, Ca²⁺ 的活性都会影响金属的毒性^[16~18]. 但是, Ca²⁺ 的活性如何影响铅对鱼类早期的胚胎发育阶段毒性的机制尚不明确. 镉对斑马鱼毒性的研究表明, Ca 的竞争不仅发生在仔鱼和成鱼阶段, 也发生在更早的阶段^[19], Ca 的竞争在所有鱼类的几乎整个生活史都有发生. 对镉毒性的研究表明, 根据上皮的 Ca 通道在脊椎动物中普

表 1 实验中的部分化学参数及以溶解态铅总浓度 [Pb]_T 和自由铅离子活度 {Pb²⁺} 表示的斑马鱼胚胎 72 h EC₅₀¹⁾

生物测试	pH	Ca ²⁺	Mg ²⁺	Na ⁺	K ⁺	EC ₅₀ [Pb] _T ¹⁾	EC ₅₀ {Pb ²⁺ } ¹⁾
		/mmol·L ⁻¹	/mmol·L ⁻¹	/mmol·L ⁻¹	/mmol·L ⁻¹	/μmol·L ⁻¹	/μmol·L ⁻¹
1	6.66	0.25	0.50	0.77	0.078	3.98(2.20 ~ 6.78)	1.66(0.92 ~ 2.82)
2	6.56	0.40	0.50	0.77	0.078	9.92(5.93 ~ 15.75)	4.53(2.71 ~ 7.20)
3	6.63	0.50	0.50	0.77	0.078	11.61(8.45 ~ 16.60)	4.86(3.53 ~ 6.95)
4	6.67	1.00	0.50	0.77	0.078	19.66(12.93 ~ 28.13)	7.77(5.11 ~ 11.13)
5	6.54	2.00	0.50	0.77	0.078	36.44(32.18 ~ 45.61)	14.71(12.99 ~ 18.42)
6	6.50	3.00	0.50	0.77	0.078	46.95(33.88 ~ 65.95)	17.79(12.82 ~ 25.02)
7	6.61	4.00	0.50	0.77	0.078	41.00(30.78 ~ 53.58)	14.42(10.82 ~ 18.86)

1) 括号内的数据表示 95% 置信区间

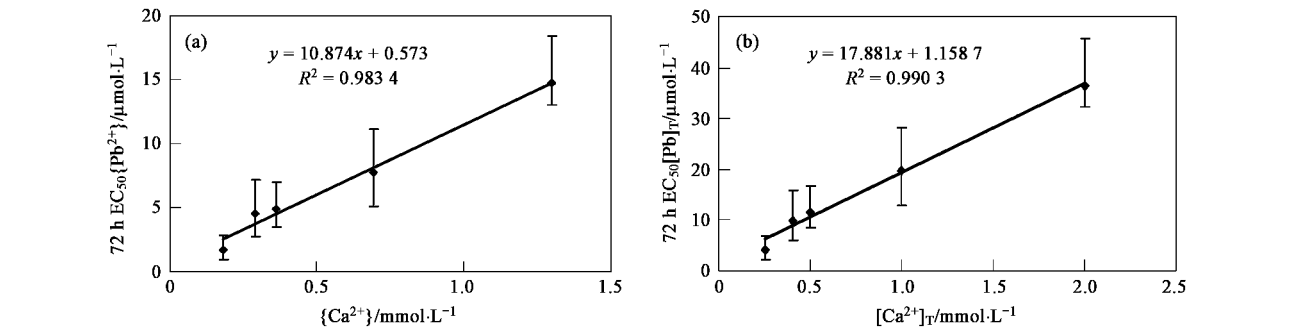


图 2 斑马鱼胚胎 72 h EC₅₀ {Pb²⁺} 和 72 h EC₅₀ [Pb]_T 随 Ca 活度/浓度的变化(误差限为 95% 致信区间)

Fig.2 72 h EC₅₀ {Pb²⁺} and 72 h EC₅₀ [Pb]_T for Zebrafish (*Danio rerio*) as a function of the activity and concentration of Ca²⁺

遍存在这一事实,说明 Ca 的竞争在大多数鱼类中是一种普遍现象,并且对于大多数鱼类 $\lg K_{CaBL}$ 的值应该非常近似.由于鱼类和水蚤的常数也很类似,说明对于整个无脊椎类动物,Ca 的竞争都可能是一种普遍现象^[20].

Slaveykova 等^[21]的研究表明,Ca²⁺ 对单细胞绿藻 (*Chlorella vulgaris*) 中 Pb²⁺ 的吸收产生了竞争抑制.并且推断,无论对于何种生物,Pb²⁺ 在生物配体的富集位点可能在性质上都是相似的.有研究指出,淡水中的虹鳟鱼对于水中铅的吸收机制与 Ca²⁺ 相同,铅与其他钙的拮抗剂(如镉、锌和钴)相似^[6].

斑马鱼对很多测试物质的敏感性与 BLM 的模型生物——虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 很相近^[22].而且,由斑马鱼胚胎得到的毒性数据,与黑头呆鱼 (*Pimephales promelas*, BLM 的另一模型生物)胚胎得到的毒性数据具有可比性^[23].生物的不同生长阶段对毒物的敏感性不同,胚胎-仔鱼阶段的毒性实验通常比幼鱼成鱼的实验更加敏感(或敏感性相似)^[24].如果以 72 h 延迟孵化作为毒理学终点,开发出胚胎 BLM,有利于建立更加严格的水质标准,以保护鱼类发育的所有生命阶段.由于卵膜有一定保护作用,产出到水中卵的卵膜开始逐渐硬化,就可以阻塞污染物进入胚胎的通路.已经证实,鱼卵会对重金属产生积累^[25],并且如果在保护性的卵膜变硬之前暴露于有毒物质中,会对胚胎的健康产生严重的影响.进一步的研究应该集中于,是否可能根据特殊污染物的穿膜机制来预测金属在接触面行为及生理上产生的效应,并严格论证将卵膜作为胚胎早期发育阶段生物配体的合理性.可以考虑铅与 Ca²⁺-ATPase 相互作用的机制,以及 Ca²⁺ 传输蛋白(如钙调素)对细胞内铅的作用.在斑马鱼发育的早期阶段,因为个体较小,确定个体的 Ca²⁺-ATPase 可能比较困难,可采用测定多个胚胎平均酶活的方法.

4 结论

在实验的水化学条件下,当 Ca²⁺ 浓度从 0.25 mmol/L 增加到 2.00 mmol/L 时,导致了 72 h EC₅₀ {Pb²⁺} 和 72 h EC₅₀ [Pb]_T 的升高,呈现出保护效应,表现为延迟孵化率的降低,两者之间存在良好的线性关系.而当 Ca²⁺ 浓度从 2.00 mmol/L 增加到 4.00 mmol/L 时,72 h EC₅₀ {Pb²⁺} 和 72 h EC₅₀ [Pb]_T 并没有显著的升高.

参考文献:

[1] World Health Organization. Inorganic lead. Environmental health

criteria 165 [S]. Geneva: International Programme on Chemical Safety, 1995.

[2] Demayo A, Taylor M C, Taylor K W, *et al.* Toxic effects of lead and lead compounds on human health, aquatic life, wildlife, plants, and livestock[J]. Crit Rev Environ Control, 1982, **12**(4): 257-305.

[3] USEPA. Environmental Criteria and Assessment Office, U. S. Environmental Protection Agency. Air Quality Criteria for Lead [S]. EPA 600/8-83-028, June 1986.

[4] Burden V M, Sandheinrich M B, Caldwell C A. Effects of lead on the growth and δ -aminolevulinic acid dehydratase activity of juvenile rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss* [J]. Environ Pollut, 1998, **101** (2): 285-289.

[5] Macdonald A, Silk L, Schwartz M, *et al.* A lead-gill binding model to predict acute lead toxicity to rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Comp Biochem Physiol C, 2002, **133**(1-2): 227-242.

[6] Rogers J T, Wood C M. Characterization of branchial lead-calcium interaction in the freshwater rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. J Exp Biol, 2004, **207**(5): 813-825.

[7] Rogers J T, Richards J G, Wood C M. Ionoregulatory disruption as the acute toxic mechanism for lead in the rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Aquat Toxicol, 2003, **64**(2): 215-234.

[8] German Federal Environment Agency. Fish embryo toxicity assays [R]. UBA Contract No. 203 85 122, Heidelberg, 2006, 8.

[9] Kandedegara A, Rorabacher D B. Noncomplexing tertiary amines as “better” buffers covering the range of pH 3-11. Temperature dependence of their acid dissociation constants [J]. Anal Chem, 1999, **71**(15): 3140-3144.

[10] 李连祯, 罗小三, 周东美. 土壤溶液中 Ca²⁺ 降低 Cd²⁺ 对赤子爱胜蚓的毒性 [J]. 中国环境科学, 2007, **27**(5): 681-685.

[11] OECD. Fish Embryo Toxicity (FET) Test [S]. OECD Guideline for the testing of chemicals draft proposal for a new guideline: OECD draft guideline, 2006.

[12] 朱琳, 史淑洁. 斑马鱼胚胎发育技术在毒性评价中的应用 [J]. 应用生态学报, 2002, **13**(2): 252-254.

[13] 张毓琪, 陈叙龙. 环境生物毒理学 [M]. 天津: 天津大学出版社, 1993. 266-269.

[14] Santore R C, Di Toro D M, Paquin P R, *et al.* Biotic ligand model of the acute toxicity of metals. 2. Application to acute copper toxicity in freshwater fish and *daphnia* [J]. Environmen Toxicol Chem, 2001, **20** (10): 2397-2402.

[15] Gellert G, Heinrichsdorff J. Effect of age on the susceptibility of zebrafish eggs to industrial wastewater [J]. Water Res, 2001, **35**(15): 3754-3757.

[16] De Schamphelaere K A C, Heijerick D G, Janssen C R, *et al.* Refinement and field validation of a biotic ligand model predicting acute copper toxicity to *Daphnia magna* [J]. Comp Biochem Physiol C, 2002, **133**(1-2): 243-258.

[17] Heijerick D G, De Schamphelaere K A C, Janssen C R, *et al.* Predicting acute zinc toxicity for *Daphnia magna* as a function of key water chemistry characteristics: Development and validation of a biotic ligand model [J]. Environmen Toxicol Chem, 2002, **21**(6):

1309-1315.

[18] Meyer J S, Santore R C, Bobbitt J P, *et al.* Binding of nickel and copper to fish gills predicts toxicity when water hardness varies, but free-ion activity does not[J]. Environmen Sci Technol, 1999, **33**(6): 913-916.

[19] Meinelt T, Playle R C, Pietrock M, *et al.* Interaction of cadmium toxicity in embryos and larvae of zebrafish (*Danio rerio*) with calcium and humic substances[J]. Aquat Toxicol, 2001, **54**(3-4): 205-215.

[20] De Schampelaere K A C, Janssen C R. Bioavailability and chronic toxicity of zinc to juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*): Comparison with other fish species and development of a biotic ligand model[J]. Environmen Sci Technol, 2004, **38**(23): 6201-6209.

[21] Slaveykova V I, Wilkinson K J. Physicochemical aspects of lead bioaccumulation by *Chlorella vulgaris*[J]. Environmen Sci Technol, 2002, **36**(5): 969-975.

[22] Fogels A, Sprague J B. Comparative short-term tolerance of zebrafish, flagfish, and rainbow trout to five poisons including potential reference toxicants[J]. Water Res, 1977, **11**(9): 811-817.

[23] Braunbeck T, Botcher, Hollert H, *et al.* Towards an alternative for the acute fish LC₅₀ test in chemical assessment: The fish embryo toxicity test goes multi-species - an update[J]. ALTEX, 2005, **22**(2): 87-102.

[24] Dave G, Xiu R. Toxicity of mercury, copper, nickel, lead, and cobalt to embryos and larvae of zebrafish, *Brachydanio rerio*[J]. Archiv Environ Contam Toxicol, 1991, **21**(1): 126-134.

[25] Finn R N. The physiology and toxicology of salmonid eggs and larvae in relation to water quality criteria[J]. Aquat Toxicol, 2007, **81**(4): 337-354.