

Toxic Effects in Zebrafish Embryos Following Exposure to PAM

Xiuming Cao¹, Jianing Xie², Xiaofeng Wan³

¹Center for Life Science and Environment Science, Harbin University of Commerce, Harbin, 150076

²Workstation for Post-doctoral Scientific Research, Drug Research Center of Harbin University of Commerce, Harbin, 150076

³Natural Anti-tumor Drug Engineering Research Center of Ministry of Education, Heilongjiang Harbin, 150076

Email: xiuming23@hotmail.com

Abstract: In order to provide more information for aquatic risk about PAM, 24 h, 48 h and 96 h acute toxicity of PAM to adult zebrafish (*Brachydanio rerio*) were tested, and the variance of LDH and SDH activity in zebrafish under sublethal concentrations was investigated. The results showed that PAM is low-toxic. 24h, 48h, 96h LD50 for PAM were 452.47 mg · L⁻¹, 411.70 mg · L⁻¹ and 335.33 mg · L⁻¹. In the case of LDH and SDH test, the induction of LDH and SDH activity was observed during the 40t-test, and inhibition effects observed. Moreover, induction effect on LDH and SDH was significant. In general, the results showed difference in acute toxicity to zebrafish and a pronounced difference in effects on LDH and SDH activity in zebrafish.

Keywords: PAM; aquatic; zebrafish (*Brachydanio rerio*); toxic effect; SDH; LDH

聚丙烯酰胺对斑马鱼的急性毒性、亚急性毒性的研究

曹秀明¹, 谢佳宁², 万晓峰³

¹哈尔滨商业大学生命科学与环境科学研究中心, 黑龙江 哈尔滨, 中国, 150076

²哈尔滨商业大学药物研究所博士后科研工作站, 黑龙江 哈尔滨, 中国, 150076

³抗肿瘤天然药物教育部工程研究中心, 黑龙江 哈尔滨, 中国, 150076

Email: xiuming23@hotmail.com

摘要: 为探讨聚丙烯酰胺(PAM)对水生生物的毒性, 采用急性毒性试验、亚急性毒性试验和生化测定方法, 研究了PAM对模式生物斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 的致死效应。PAM对斑马鱼的24 h和96 h的LD50分别为452.47 mg · L⁻¹、411.70 mg · L⁻¹和335.33 mg · L⁻¹。属于低毒物。不同浓度下斑马鱼的死亡率与暴药浓度、时间成正比。PAM对斑马鱼琥珀酸脱氢酶和乳酸脱氢酶的活性影响, 在40d的测定时间范围内都表现出诱导效应, 但对乳酸脱氢酶的诱导效应更为显著。

关键词: PAM; 斑马鱼; 毒性效应; 琥珀酸脱氢酶; 乳酸脱氢酶

1 引言

聚丙烯酰胺(PAM)是一类重要的水溶性高分子聚合物, 其水溶液是均一清澈的高粘度液体^[1]。PAM作为一种有机絮凝剂被广泛应用于油田中, 但其对环境的影响引起了人们的担忧^[2]。目前, PAM对水生生态系统尤其是鱼类的毒性效应尚缺乏深入了解和研究。因此, 本实验以斑马鱼为受试水生生物, 研究其在水环境中的生态毒性效应, 以及PAM暴露对斑马鱼肝和腮琥珀酸脱氢酶(SDH)和乳酸脱氢酶(LDH)活性的影响, 来判断PAM对水生生物的影响。为PAM的水环境修复标准的制定和污染控制提供基础数据和科学依据, 并

对其生态风险进行评估。斑马鱼斑马鱼(*Danio rerio*)是属于辐鳍亚纲(Actinopterygii)鲤科(Cyprinidae)短担尼鱼属(*Danio*)的一种硬骨鱼类, 对毒性物质反应敏感, 结构变化显著^[3], 是国家环保总局推荐的水质-物质急性毒性试验受试鱼类^[4]。

2 材料与方法

2.1 受试生物与实验药剂

试验生物: 斑马鱼 (*Brachydanio rerio*) 购于哈尔滨市动力区花鸟鱼市场。平均体长 2.5cm, 平均体重 0.25g 雌雄不限。在 (24±2) °C 水族缸内, 驯养 7 天,

每天喂食并清理鱼缸, 试验前 24h 停止喂食, 驯养期间未出现鱼体死亡情^[5]。

实验试剂: 聚丙烯酰胺(山东腾达化工有限公司), 琥珀酸脱氢酶(SDH)试剂盒, 乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(试剂盒购自南京建成生物工程研究所)。

2.2 实验用水

试验用水为曝气充氧除氯 24h 以上的自来水, 水温(24±2)°C, pH 值为 7.0 左右, 溶解氧≥8.6mg·L⁻¹。

3 斑马鱼毒性试验

3.1 斑马鱼急性毒性试验方法

斑马鱼急性毒性试验参照 OECD203 的标准测试方法^[6]。进行适当调整。首先进行预试验, 得到斑马鱼全部存活和全部死亡的浓度范围, 然后在此范围内按照几何级数梯度设置 5 个浓度, 分别设置为 225.0、300.0、352.9、415.2 和 488.5mg·L⁻¹。同时设空白对照。试验在 3.5L 容器中进行, 试液体积为 3L, 每个容器放 10 尾鱼, 12h 换掉一半的水, 以维持试液浓度同时保证试液溶解氧含量。光暗比 16h:8h, 温度(24±2)°C, 试验周期分别为 24h、48h、96h, 试验期间不喂食, 每次换水记录斑马鱼死亡情况及其中毒症状, 并及时捞出死鱼。试验重复三次, 记录平均结果^[7]。

3.2 斑马鱼亚急性毒性试验方法

通过急性毒性试验的实验结果来确定亚急性毒性试验组 PAM 的染毒浓度分别为 1/5, 1/15, 1/45 96hLD50, 即 67.01 mg·L⁻¹, 22.36 mg·L⁻¹ 和 7.45 mg·L⁻¹。同时设置空白对照组。试验在 3.5L 容器中进行, 试液体积为 3L, 每个容器放 10 尾鱼, 24h 换掉一半的水, 以维持试液浓度同时保证试液溶解氧含量。光暗比 16h:8h, 温度(24±2)°C, 试验周期为 40 天。观察记录实验结果。

3.3 PAM 对斑马鱼肝和鳃 SDH 和 LDH 活性的影响

3.3.1 生化指标测定

斑马鱼肝脏和鳃 SDH 和 LDH 活力的测定, 均按试剂盒说明书步骤进行操作。蛋白测定用考马斯亮蓝法。

3.3.2 数据分析

数据经 SPSS15.0 统计软件进行方差分析, 数据用均数±标准偏差($\bar{x} \pm s$)表示。P<0.05 认为存在显著差异(*), P<0.01 存在极显著差异(**)。

4 结果

4.1 急性毒性实验结果

PAM 对斑马鱼的急性毒性试验结果见表 1。

Table 1 Effect of PAM on survivorship of zebrafish
表 1 不同浓度 PAM 处理下的斑马鱼存活情况

组别	PAM 浓度 (mg·L ⁻¹)	24h 死亡率 (%)	48h 死亡率 (%)	96h 死亡率 (%)	存活率 (%)
1	225.0	10	20	0	80
2	300.0	10	20	40	60
3	352.9	20	40	70	30
4	415.2	20	50	90	10
5	488.5	40	70	100	0
对照组	0	0	0	0	100

对表 1 结果进行处理, 采用单位概率回归分析法计算半致死浓度 LC50。24h 的 LC50 为 452.45 mg·L⁻¹、48h 的 LC50 为 411.70 mg·L⁻¹、96h 的 LC50 为 335.33 mg·L⁻¹。

在 PAM 对斑马鱼的急性毒性效应试验中, 空白对照组未出现异常症状, 当 PAM 浓度超 225mg·L⁻¹ 的增时, 斑马鱼即开始游动困难, 慢慢浮于水上, 同时伴呼吸困难。随着 PAM 浓度加, 斑马鱼死亡率逐渐升高; 当其浓度到达 488.5mg·L⁻¹ 时, 斑马鱼全部死亡。观察死亡鱼体发现, 斑马鱼身体色变浅, 腹部肿胀, 腮部有明显充血症状。试验表明, 斑马鱼暴毒浓度越大, 暴露时间越长中毒症状越严重。

4.2 亚急性毒性实验结果

在 40 天暴毒时间内, 随着暴毒浓度的升高可观察到斑马鱼的活动减慢, 呼吸减慢。常见其浮于水面, 厌食现象也比较明显。不同浓度 PAM 对斑马鱼鳃结果的影响, 见表 2。

4.3 酶活性的影响结果

如图 2 所示, 暴露不同浓度 PAM 对斑马鱼肝脏和鳃 SDH 活性均造成了影响。随着暴露浓度的增高 SDH 的活性也增高且与对照组均存在显著性差异(P<0.05), SDH 增高预示着线粒体损伤加重。PAM 对斑马鱼鳃造成的损伤要大于肝脏。如图 3 所示, 暴露不同浓度 PAM 对斑马鱼肝脏和鳃 LDH 活性均造成了影响。随着暴露浓度的增高 LDH 的活性也增高且与对照组均存在极显

著性差异 ($P < 0.01$)。

Table 2 Effect of PAM on the cheeks of zebrafish
表 2 PAM 暴露对斑马鱼腮结果的影响

组别	PAM 浓度 ($\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)	现象描述
对照	0	鱼腮鲜红，鳃丝结构完整清晰，鳃片排列整齐，外层呼吸上皮细胞膜平滑 (a).
1	7.45	鱼腮呈暗红色，鳃丝中有黑色物质，鳃组织变化并不十分明显 (b)
2	22.36	鳃组织中有黑色物质沉积，有出血现象，组织变化比较明显 (c)
3	67.01	鱼腮较粗糙，鳃丝中有黑色物质最多，鳃丝有明显的出血现象 (d)

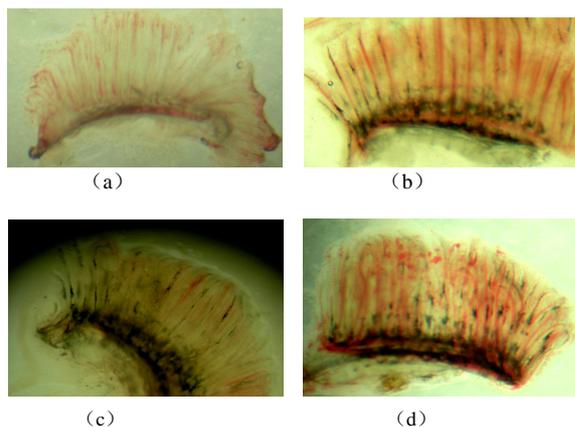


Fig 1 Effect of PAM on the cheeks of zebrafish
图 1 PAM 暴露对斑马鱼腮的影响

图示: a 对照组斑马鱼腮 b 1号组斑马鱼腮 c 2号组斑马鱼腮 d 3号组斑马鱼腮

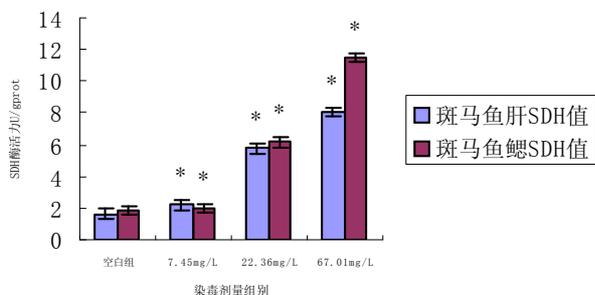


Fig 2 Effect of PAM on activity of SDH ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
图 2 PAM 对斑马鱼肝和腮 SDH 活性的影响

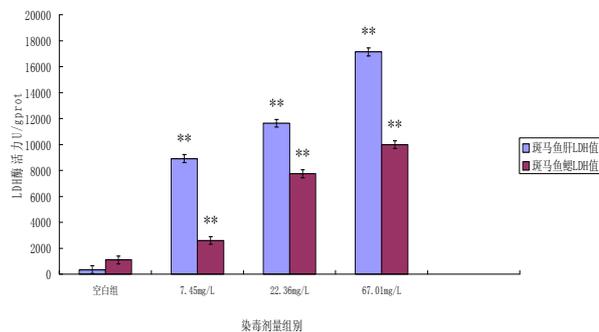


Fig 3 Effect of PAM on activity of LDH ($\bar{x} \pm s, n = 6$)
图 3 PAM 对斑马鱼肝和腮 LDH 活性的影响

5.讨论

在 PAM 暴露斑马鱼急性毒性试验结果中，由图 1 可知随着 PAM 浓度的升高斑马鱼的鳃丝表面有明显的有毒物蓄积现象。在图 1 中可看到对照组斑马鱼鳃丝鲜红，给药组的鳃丝上有黑色物质。随着浓度的增加，黑色物质也越来越多。实验中斑马鱼鳃丝和鳃小片发生病变及堵塞，严重影响鱼的呼吸功能，这也解释了斑马鱼在 PAM 液中的一些表现症状：呼吸困难，张口扩鳃，常浮于水面上。这说明随着 PAM 浓度的增高，在一定的时间内，PAM 使暴露的斑马鱼有了一定的病理反应。

一般认为，线粒体内膜含有呼吸链和氧化磷酸化系统的全部酶，而SDH是三羧酸循环中唯一与线粒体内膜结合的酶，它直接与呼吸链联系，因而被称为三羧酸循环的限速酶和线粒体的标志酶，常与线粒体的损伤同时出现，并且与线粒体数量平行升降。由于斑马鱼肝和腮的耗氧量很大，线粒体对缺氧极为敏感，在暴露PAM时，线粒体肿胀破裂引起靶组织该酶活性升高。本研究结果表明，暴露PAM后，3个剂量组中斑马鱼肝和腮SDH的活性显著升高，预示机体有氧代谢能力下降和机体组织器官受损。从图2可以看出，PAM浓度越高，对斑马鱼肝和腮SDH活性的影响越严重，这个结果也和斑马鱼腮形态变化相符合。

LDH 是机体能量代谢中一种重要的酶存在于各个组织器官中。当机体各组织器官病变时，其组织器官本身的 LDH 值会增高。如图 3 所示，在无染毒情况下斑马鱼肝脏和腮各自显示了不同 LDH 酶含量，这说明乳酸脱氢酶在肝脏和腮组织间存在着明显的组织特异性。PAM 对斑马鱼肝脏和腮 LDH 活性作用总体趋势是从低剂量组到高剂量组活性有所上升。总之，无论是肝脏还是腮各实验组均与对照组有极显著差异。具体表现为 PAM 对肝的损伤大于腮。已知 LDH 是糖元分解酶系中

的重要酶类之一，在机体能量代谢中起十分关键的作用。此结果表明，肝脏在机体遇到不良条件，如中毒情况下，在加强能量代谢及解毒功能上发挥更积极而主动的作用。而鳃是蓄积器官，抵御不良环境比肝脏弱得多。这种组织间对 PAM 敏感性差异可能主要与不同浓度重 PAM 在体内积累的多少、毒性大小以及生理差异有密切的关系。本实验的结果也表明，PAM 积累对斑马鱼肝脏和鳃造成的形态学变化与 LDH 活性水平存在相应的关系。因此可通过检测不同机体不同组织内 LDH 活性初步判断组织受损或病变程度。

虽然目前尚未有报道说 PAM 为有毒物，但是 PAM 确实对斑马鱼产生了毒性。因为 PAM 在自然环境中不易降解，所以一旦对水体造成污染就会富集在水生生物体内。这样随着食物链的传播最终会给人类带来危害。但是在一些条件下如化学降解、热降解等，会降解成丙烯酰胺^[8]。然而，丙烯酰胺对机体会造成生殖毒性、神经毒性等^[9]。由于我国目前还有限制 PAM 用量的明确规定，因此 PAM 的使用给环境及人类带来的潜在危害并未受到广泛的认识。但是，我希望通过该试验可以引起大家对安全使用 PAM 的重视。

致 谢

本实验在哈尔滨商业大学季宇彬教授的支持与帮助下顺利完成,在此表示感谢。

References (参考文献)

[1] Gao Qinghe,Sui Xin,Wang Baohui.Study on the Applied Environment and Ecotoxicological Behavior of Polyacrylamide

- in Oilfield[J].*Environmental Protection of Oil & Gas Fields* ,2004 14(4) ,P32-34.(Ch)
 高清河 隋欣 王宝辉,应用聚丙烯酰胺的环境与生态行为研究.油气田环境保护,2004年12月32-34
- [2] Schmuck G,AhrHJ,Schluter G.Rat cortical neuron cultures:an in vitro model for differentiating mechanisms of chemically induced neurotoxicity[J].*In Vitro Mol Toxicol*,2000,13:37-50.
- [3] Scholz S, Fischer S, Gündel U, The zebrafish embryo model in environmental risk assessment--applications beyond acute toxicity testing[J].*Environ Sci Pollut Res Int*. 2008 Jul;15(5).P394-404.
- [4] Li Weimin,Ying Daqiang,Li Shiyin.Acute Toxicity of Chloroanilines to Zebra Fish and 3D-QSAR Analysis[J].*Research of Environmental Sciences* . 2002, 15(2).P6-8.(Ch)
 李伟民,尹大强,李时银等.氯代苯胺对斑马鱼的急性毒性及 3D-QSAR 分析[J].环境科学研究,2002,15(2):6-8.
- [5] Li Lijun,Liu Zhenqian,Xu Guodong,Shu Yang,Cao Yuzhen,Qi Weihua. Study on acute-toxicity of six kind industrial wastewaters to zebrafish[J].*Ecologic Science* . 2006 25(1) . P43-47 .(Ch)
 李丽君,刘振乾,徐国栋,等.工业废水的鱼类急性毒性效应研究[J].生态科学,2006,25(1):43-47.
- [6] OECD.203 Fish,Acute Toxicity Test[S].1992.
- [7] Hu Junxi,Wu Xianwei,Zhang Wen-jing. Histopathological Alterations of Brachydanio rerio in Methomyl Exposure. [J].*Journal of Zhangzhou Teachers College(Natural Science Edition)* . 2009 33(2) . P107-111 (Ch)
 胡俊西,武向伟,庄文静.灭多威暴露下斑马鱼的组织学变化.漳州师范学院学报(自然科学版)2009年第2期,107-111
- [8] Zhu Linyong,Chang Zhiying,Li Miaozen,Wan Erjian. Oxidative Degradation of partially Hydrolyzed Polacrylamide in Aqueous solution.Influence of Temperature[J].*Polymer Materlals Science & Engineering*,2000,16(1) .P113-116. (Ch)
 朱麟勇,常志英,李妙贞,王尔鉴.部分水解聚丙烯酰胺在水溶液中的氧化降解.高分子材料与工程,2000,16(1):113-116
- [9] Zhan Yali,Guo Yaohui,Yan Guangxu.Study on Degradation of Partially Hydrolyzed Polyacrylamide.[J]*Polymer Bulletin* 2004, 2 :P70-73. (Ch)
 詹亚力,郭绍辉,闫光绪.部分水解聚丙烯酰胺降解研究进展.高分子通报,2004,2:70-73