

## 3-甲基胆蒎对斑马鱼组织病理效应的初步研究

杨蓉<sup>1</sup>, 聂芳红<sup>2</sup>, 孔庆波<sup>3</sup>, 谢英明<sup>1</sup>, 林红英<sup>1</sup>, 陈进军<sup>1</sup>

(1. 广东海洋大学农业生物技术研究所, 广东 湛江 524088; 2. 广东海洋大学食品科技学院, 广东 湛江 524088;

3. 中国刑事警察学院警犬技术系, 辽宁 沈阳 110034)

**摘要:** 分别用 25、50、100、200 和 400  $\mu\text{g/L}$  的 3-甲基胆蒎 (3-MC) 对斑马鱼进行水浴染毒, 于第 7 天和第 14 天采集各染毒组和对照组活鱼的肝、鳃、心、肠和肾, 进行病理组织学检查。结果发现, 一定剂量的 3-MC 能导致肝细胞变性, 胞浆内出现脂肪滴, 严重时肝细胞坏死解体, 界限模糊; 心肌细胞萎缩坏死; 肠粘膜上皮细胞纹状缘不整齐, 有的脱落; 鳃丝结构异常, 鳃小片表面粗糙, 上皮细胞不完整; 肾小管上皮细胞肿胀, 细胞界限不清, 管腔内均质红染。供试斑马鱼的病理组织变化与 3-MC 的作用剂量和作用时间存在一定的关系。

**关键词:** 3-甲基胆蒎; 毒性; 病理组织学; 斑马鱼

中图分类号: R994.6

文献标志码: A

文章编号: 1673-9159(2008)04-0091-04

## Preliminary Studies on Histopathological Changes in Zebrafish Exposure to 3-Methylcholanthrene

YANG Rong<sup>1</sup>, NIE Fang-hong<sup>2</sup>, KONG Qing-bo<sup>3</sup>, XIE Ying-ming<sup>1</sup>, LIN Hong-ying<sup>1</sup>, CHEN Jin-jun<sup>1</sup>

(1. Institute of Agricultural Biotechnology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

2. School of Food Science & Technology, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524088, China;

3. Dept. of Police Dog Technology, Criminal Police College of China, Shenyang 110034, China)

**Abstract:** A range of zebrafish (*Danio rerio*) were exposed to 3-methylcholanthrene (3-MC) by water pollution at the doses of 25  $\mu\text{g/L}$ , 50  $\mu\text{g/L}$ , 100  $\mu\text{g/L}$ , 200  $\mu\text{g/L}$  and 400  $\mu\text{g/L}$ , respectively. On the 7<sup>th</sup> day and 14<sup>th</sup> day of exposure to 3-MC, the liver, gill, heart, intestine and kidney of the fish were collected to observe histopathological changes. It was found that the hepatocytes were denaturalized with fat drops in the cellular plasma and even showed necroses or disaggregation and obscure cellular borderlines, that there were atrophies and necroses in cardiac cells, that the villuses of the enteric epithelia were out of order and even fallen off, that the secondary lamella of the gill became coarse and some of the epithelia were lost, and that the epithelia of the renal tubules were swollen and the cellular borderlines were not clear, with even red dye in some tubules. It was also found that there were, to some extent, dose-effect and time-effect relationships between the histopathological changes and 3-MC.

**Key words:** 3-methylcholanthrene, toxicity, histopathology, zebrafish (*Danio rerio*)

3-甲基胆蒎 (3-methylcholanthrene, 3-MC) 属于二噁英类化合物(dioxin-like compounds, DLCs)

的范畴, 其分子式为 $\text{C}_{12}\text{H}_{16}$ , 由五个环组成, 为黄色多核结晶体, 不溶于水, 可溶于苯, 是细胞色素

收稿日期: 2008-05-8

基金项目: 广东省自然科学基金项目“几种 DLCs 对斑马鱼 CYP1A 的生化毒理学机理研究”(05011789); 广东省国际合作项目“斑马鱼生物学标志 CYP1A 在 DLCs 环境污染监测中的应用研究”(2007B050200023)

第一作者: 杨蓉 (1981-), 女, 在读硕士研究生, 主要研究方向为高效无公害饲料。

通讯作者: 陈进军 (1967-), 博士, 教授, 研究方向为动物毒理学。E-mail: jjchen777@yahoo.com.cn

P4501A的诱导剂,并经CYP1A代谢为活性中间物而致癌<sup>[1]</sup>。斑马鱼(*Danio rerio*)属于辐鳍亚纲(Actinopterygii)鲤科(Cyprinidae)短担尼鱼属(*Danio*)的一种硬骨鱼,鱼体型纤细,体侧具有像斑马一样的暗蓝与银色相间的条纹,成鱼体长3~4 cm,有的可达5 cm<sup>[2]</sup>。斑马鱼在pH中性,水温25~31℃之间即能正常发育,因其个体小、胚体透明、繁殖快、饲养廉价等特点,在国际上被普遍用为标准实验鱼<sup>[3,4]</sup>。本研究用3-MC对斑马鱼进行水浴染毒,观察其病理组织学变化,找出敏感器官,为探讨3-MC的毒性机理奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

3-甲基胆蒎(3-methylcholanthrene, 3-MC)为SUPELCO公司产品,二甲基亚砜(DMSO)为分析纯,购自广东光华化学厂有限公司。

斑马鱼(*Danio rerio*),购自湛江市水族市场,健康无病,体长2.8~3.5 cm,体重0.3~0.4 g,在水族箱适应性饲养1周后用于实验。养殖用水为自然曝气2 d的自来水,温控制在25~28℃之间,饲料为斑马鱼专用饲料。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 斑马鱼分组** 将斑马鱼随机分成6个组,第1组为对照组,第2至第6组为实验组。每组16尾鱼,雌雄各半。

**1.2.2 染毒** 根据急性毒性试验情况,用终浓度不超过体积分数0.1%的DMSO将3-MC助溶,然后按25、50、100、200和400 μg/L的浓度分别对第2、3、4、5和6组斑马鱼进行水浴染毒。

**1.2.3 组织切片的制备** 石蜡制片按常规制作。在染毒的第7天和第14天,分别取活鱼的心、肝、肠、鳃、肾,置于Bouin氏液中固定,用流水冲洗,经过各级乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡包埋,切片(厚5 μm),苏木精-伊红(HE)染色,贴片,固封。

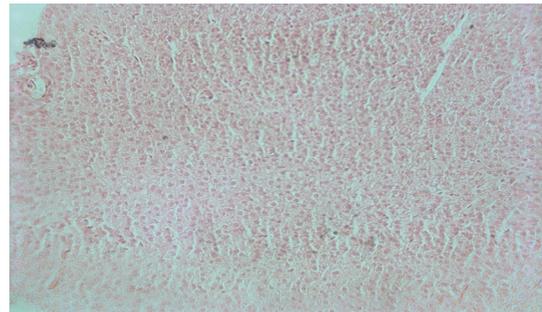
**1.2.4 显微病理观察** 将所制备的切片在E200型Nikon ECLIPSE生物显微镜下观察并拍照,读片。

## 2 结果

### 2.1 肝脏的病理组织学变化

对照组的肝细胞呈多角形,形状变化不大,胞质均匀、清晰,细胞界限清楚,细胞核圆球形或不

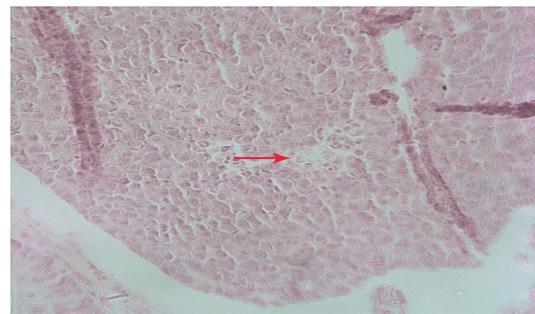
规则形,位于中央,核内有一个或两个核仁,也有少数肝细胞含有二个或三个细胞核。细胞间的窦状隙明显,肝细胞排列成明显的索状结构。在染毒第7天,肝组织中可见有少量炎性细胞浸润,肝细胞变性;而高剂量组中,肝细胞坏死,肝窦隙扩张,坏死的肝细胞解体,细胞界限不清(图1、图2)。第14天的组织切片中,肝细胞坏死增多,同时胞浆内出现了小泡性的脂滴(图3)。



肝细胞广泛性轻度颗粒变性

图1 染毒7d后的肝脏(25 μg/L, HE)

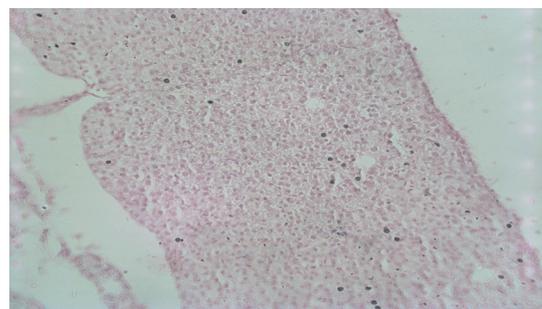
Fig.1 The liver exposed to 3-MC for 7 days



坏死的肝细胞界限模糊,溶解,细胞解体

图2 染毒7d后的肝脏(400 μg/L, HE)

Fig.2 The liver exposed to 3-MC for 7 days



肝细胞肿大,胞浆内出现大量微细颗粒

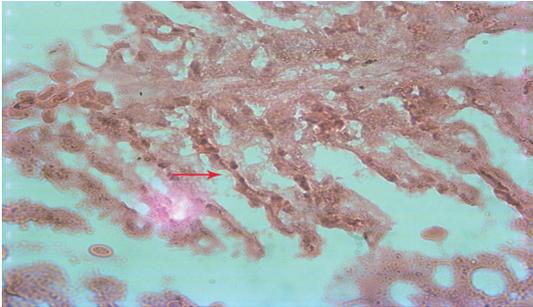
图3 染毒14d后的肝脏(25 μg/L, HE)

Fig.3 The liver exposed to 3-MC for 14 days

### 2.2 鳃的病理组织学变化

对照组鳃丝结构清晰,鳃小片外表面呼吸上皮细胞结构完整、表面平滑舒展。染毒第7天后,各实验组斑马鱼的鳃丝结构异常,模糊不清,高剂量

组中可见少量炎性细胞浸润,鳃小片表面呼吸上皮细胞不完整,表面不平滑舒展。第14天染毒组中,有的表皮细胞断失,柱细胞异形,鳃小片上皮细胞坏死脱落,柱细胞原有结构消失(图4)。



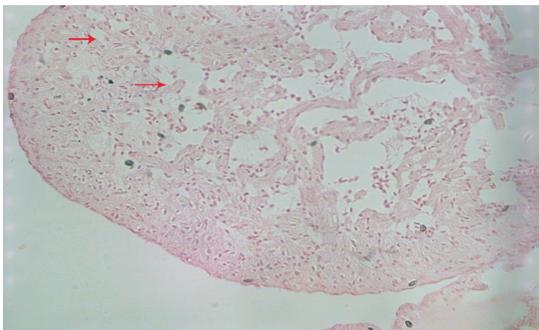
鳃丝结构模糊不清,鳃小片上皮细胞坏死脱落

图4 染毒14d后的鳃(400 μg/L, HE)

Fig.4 The gill exposed to 3-MC for 14 days

### 2.3 心脏的病理组织学变化

对照组心肌细胞清晰,细胞核居中。第7天染毒组中,心肌细胞有不同程度的变性、萎缩、坏死,第14天染毒组中,心肌细胞出现空泡,坏死处心肌肌浆溶解,出现大量炎性细胞聚积(图5)。



心肌纤维断裂,大片萎缩,坏死,肌浆溶解或消失

图5 染毒14d后的心脏(400 μg/L, HE)

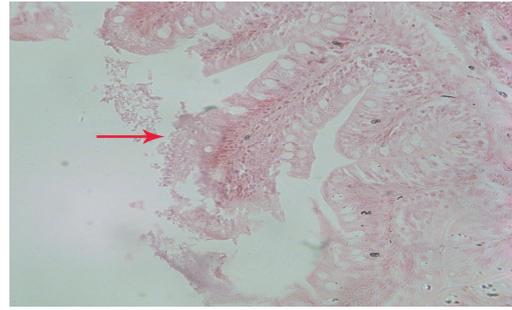
Fig.5 The heart exposed to 3-MC for 14 days

### 2.4 肠的病理组织学变化

对照组斑马鱼肠上皮为单层柱状细胞,游离端具排列整齐的纹状缘,细胞间夹有数量较多的杯状细胞。第7天染毒组中,肠绒毛上皮细胞不同程度的变性、坏死,脱落。第14天染毒组中,杯状细胞增多,肠绒毛上皮细胞坏死,脱落,纹状缘消失(图6)。

### 2.5 肾脏的病理组织学变化

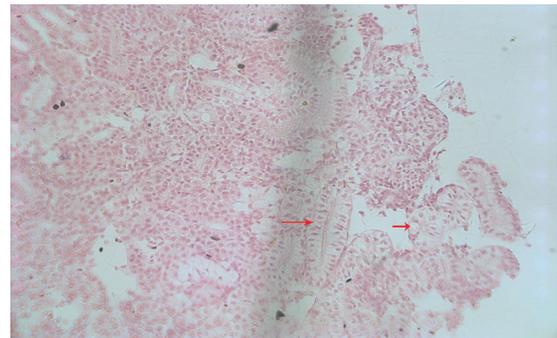
在染毒后第7天,随剂量的增加,肾小管上皮细胞出现肿胀,细胞界限不清,有的管腔中有均质红染;第14天染毒组中,肾小管上皮细胞出现空泡样变和脂滴,有的肾小管上皮细胞坏死,管腔变窄或不规则(图7)。



肠绒毛上皮细胞变性、坏死、脱落

图6 染毒14d后的肠(400 μg/L, HE)

Fig.6 The intestine exposed to 3-MC for 14 days



肾小管上皮细胞肿胀,管腔变窄,个别管腔红染

图7 染毒14d后的肾脏(400 μg/L, HE)

Fig.6 The kidney exposed to 3-MC for 14 days

## 3 讨论

3-MC 具有较强的毒性作用,是一种环境化学致癌物,经呼吸或饮食进入体内,具有强亲脂性及难降解性,不仅在水体沉积物中积累,而且可以随食物链营养级的提高而被富集放大。3-MC 进入体内后与芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)结合,诱导与毒物代谢有关的细胞色素 P450 1A(cytochrome P4501A, CYP1A)的基因表达及蛋白质的合成,进而引起一系列毒性反应<sup>[5-9]</sup>。

Norrgrent 和 Engwall 用 PCBs 对虹鳟鱼幼鱼进行注射后取肝脏进行超微结构观察,发现肝细胞核萎缩,脂滴增多,线粒体的内嵴脱落,肝脏呈现明显的病变状态<sup>[10,11]</sup>。Zodrow 等将 2,3,7,8-四氯二苯对二噁英按 70 ng/g 给斑马鱼腹腔注射 1 次,5 d 后,发现肝细胞肥大,有脂肪沉积;腮片细胞肥大,有脂肪沉积<sup>[12]</sup>。

经水质接触染毒更加接近化学物污染鱼体的自然情景,可以避免因注射化学物而对鱼体造成捕捉应激,并使染毒更加方便。本实验首次对经水质接触染毒而暴露于 3-MC 的斑马鱼制作组织切片,初步观察了 3-MC 对斑马鱼各器官的影响,发现

3-MC 可广泛引起斑马鱼组织器官的变化,其中以肝脏、鳃和心脏的病变最为明显。肝脏主要表现为肝细胞变性,随着时间的延长,以坏死为主,其中有炎细胞浸润,泡浆内脂肪滴增多;3-MC 在鳃部所引发的毒性表现为鳃部有大量的污物,鳃丝结构异常,鳃丝外层上皮细胞受损,这说明 3-MC 严重地影响了鱼类的呼吸机能,引发呼吸障碍;3-MC 对斑马鱼的心脏毒性表现在心肌细胞变性、萎缩,出现脂肪滴,严重时坏死,说明斑马鱼的心血管系统对 3-MC 也有较高的敏感性。另外,随着 3-MC 浓度的增大,作用时间的延长,斑马鱼器官的病变更加明显,对机体器官的损伤越严重。

### 参 考 文 献

- [1] 吴中亮. 毒理学辞典[M]. 武汉: 湖北科学技术出版社, 2005:135.
- [2] 李清斐, 李卫华. 斑马鱼及其在环境毒理学中的应用[J]. 环境与职业医学, 2005, 22(5): 460-463 .
- [3] Vitozzi L, De A G. A critical review of comparative acute toxicity data on freshwater fish[J]. *Aquat Toxicol*, 1991, 19: 167-204 .
- [4] Ensenbach U, Nagel R . Toxicity of complex chemical mixtures: acute and long-term effects on different life stages of zebrafish[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 1995, 30:151-157.
- [5] Lee C J, Janine R H, Vivien K F T, et al. Regulation of constitutive mouse hepatic cytochromes P450 and growth hormone signaling components by 3-methylcholanthrene[J]. *Drug Metab Dispos*, 2006, 34:1530-1538.
- [6] Riddick D S, Huang Y, Harper P A, et al. 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-p-dioxin versus 3-methylcholanthrene: comparative studies of Ah receptor binding, transformation, a comparative anatomy induction of CYP1A1[J]. *J Biol Chem* 1994, 269: 12118-12128.
- [7] Waxman D J, Ko A, Walsh C. Regioselectivity and stereoselectivity of androgen hydroxylations catalyzed by cytochrome P-450 isozymes purified from phenobarbital-induced rat liver[J]. *J Biol Chem*, 1983, 258: 11937-11947.
- [8] Jones E J, Riddick D S. Regulation of constitutive rat hepatic cytochromes P450 by 3-methylcholanthrene[J]. *Xenobiotica*, 1996, 26: 995-1012.
- [9] Reisdorph R, Lindahl R. Constitutive and 3-methylcholanthrene-induced rat ALDH3A1 expression is mediated by multiple xenobiotic response elements[J]. *Drug Metab Dispos*, 2007, 35: 386-393.
- [10] Norrgren L, Andersson T, Biork M. Liver morphology and cytochrome p450 activity in fry of rainbow trout after microinjection of lipid-soluble xenobiotics in the yolk-sac embryos[J]. *Aquat Toxicol*, 1993, 2: 307-316.
- [11] Engwall M, Brunstrom B, Brewer A, et al. Cytochrome P4501A induction by a coplanar PCB, a PAH mixture, and PCB-contaminated sediment extracts following microinjection of rainbow trout sac-fry[J]. *Aquat Toxicol*, 1994, 30: 311-324.
- [12] Zodrow J M, Stegeman J J, Tanguay R L. Histological analysis of acute toxicity of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin(TCDD)in zebrafish[J]. *Aquat Toxicol*, 2004, 66(1): 25-38.