·论 著·

2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎发育的毒性作用研究

李雪青，邢鸣鸾，王晓峰

浙江省疾病预防控制中心环境与健康所，浙江 杭州 310051

摘要：目的 观察2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎发育的毒性作用。**方法** 选取AB系野生型斑马鱼交配产卵，置于含Holt Buffer缓冲溶液的培养皿中培养。设置0.4、0.8、1.0、1.2、1.6、2.0 μg/mL 6个剂量组，溶剂对照组和助溶剂对照组，每组20枚胚胎，暴露48、72和96 hpf（受精后小时），观察胚胎发育情况，计算胚胎死亡率、半数致死浓度（LC_{50}）和畸形率。**结果** 暴露48、72和96 hpf时，2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎的LC_{50}分别为1.668、1.043和0.895 μg/mL，随着时间延长逐渐下降。72 hpf后，当浓度达到2.0 μg/mL时斑马鱼全部死亡。在0.4～2.0 μg/mL范围内，48、72和96 hpf的斑马鱼死亡率随2,4-二硝基氯苯浓度增加而上升（均$P<0.05$），48 hpf的斑马鱼胚胎畸形率随着2,4-二硝基氯苯浓度增加而上升（$P<0.05$）。斑马鱼胚胎暴露于2,4-二硝基氯苯主要导致卵黄囊水肿、心包囊肿和脊柱弯曲等多种发育畸形。**结论** 2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎具有致死和致畸作用，并影响斑马鱼的发育。

关键词：2,4-二硝基氯苯；斑马鱼胚胎；毒性作用

中图分类号：R994.6 **文献标识码：**A **文章编号：**2096-5087（2021）02-0121-04

Developmental toxicity of 2,4-dinitrochlorobenzene in zebrafish embryos

LI Xueqing, XING Mingluan, WANG Xiaofeng

Department of Environment and Health, Zhejiang Provincial Center for Disease Control and Prevention, Hangzhou, Zhejiang 310051, China

Abstract: Objective To investigate the developmental toxicity of 2, 4-dinitrochlorobenzene in zebrafish embryos. **Methods** AB wild-type male and female zebrafish were selected to mate and spawn, then the eggs were cultured with Holt buffer solution. Six dose groups (0.4, 0.8, 1.0, 1.2, 1.6, 2.0 μg/mL), a solvent control group and a cosolvent control group, were set up with 20 embryos each. Malformations and death of embryos were observed at 48, 72 and 96 hpf (hours post fertilization), the mortality and 50% lethal concentration (LC_{50}) were also calculated. **Results** At 48, 72 and 96 hpf, the LC_{50} of 2,4-dinitrochlorobenzene on zebrafish embryos were 1.668, 1.043 and 0.895 μg/mL, respectively, with a downward trend. After 72 hpf, when the concentration reached 2.0 μg/mL, all the zebrafish died. In the range of 0.4-2.0 μg/mL, the mortality of zebrafish at 48, 72 and 96 hpf increased with the increase of 2, 4-dinitrochlorobenzene concentration (all $P<0.05$); the malformation rate of zebrafish embryos at 48 hpf increased with the increase of 2,4-dinitrochlorobenzene concentration ($P<0.05$). Zebrafish embryos exposed to 2,4-dinitrochlorobenzene led to yolk sac edema, pericardial edema and spinal curvature. **Conclusion** 2, 4-dinitrochlorobenzene can affect the development of zebrafish embryos, which will lead to lethal and teratogenic effects.

Keywords: 2,4-dinitrochlorobenzene; zebrafish embryos; lethal effects; toxicity

2,4-二硝基氯苯是医药、农药、染料和合成材料中重要的精细化工中间体，化学性质稳定，在自然条件下难被降解，极易进入土壤和水体环境中，在工业生产和日常生活中可经呼吸道和皮肤接触进入人体，具有致敏、致癌、致畸、致突变和遗传毒性，已被我国列为优先控制的有机污染物[1-2]。研究发现，2,4-二硝基氯苯在动物致敏试验中会引发红斑和水肿等变态反应[3]，被国内外广泛应用于建立致敏动物模型，可致动物变应性接触性皮炎[4-6]。斑马鱼作为水生生物模型被应用于生态毒理学、药物毒理学、疾病健康效应和环境生态监测等研究领域[7]。氯苯类化合物对斑马鱼胚胎发育具有毒性效应，并且苯环上氯离子越多其毒性越强[8]。本研究

DOI：10.19485/j.cnki.issn2096-5087.2021.02.004

基金项目：浙江省医药卫生科技计划项目（2017KY294）

作者简介：李雪青，硕士，主管技师，主要从事职业卫生与环境有害因素检测工作

通信作者：王晓峰，E-mail：xfwang@cdc.zj.cn

探索 2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎的致畸作用及发育毒性，现报道如下。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　主要仪器和试剂　Axio Imager A2 荧光显微镜（德国卡尔·蔡司股份公司），Stemi 508 体视显微镜（德国卡尔·蔡司股份公司），2,4-二硝基氯苯（99.6%，德国 Dr. Ehrenstorfer 公司），二甲基亚砜（DMSO，美国 Sigma 公司），甲基纤维素（美国 Sigma 公司），氯化钠、氯化钾、碳酸氢钠、氯化钙等试剂均为分析纯。

1.1.2　实验动物及饲养条件　实验用 AB 系野生型斑马鱼，购于国家斑马鱼资源中心，在实验室驯养 1 个月，保持每日 14 hpf（hours post fertilization，受精后小时）光照和 10 hpf 黑暗，室内恒温 28.5 ℃，并每日喂食草履虫 2 次[9]。实验用水为较高硬度水，经过曝气，水温（26±1）℃，pH 值 7.0～8.0，盐度 0.25‰～0.75‰，水体的溶解氧水平不低于 6.0 mg/L，水体硬度大于 100 mg/L，水循环系统每日自动更新 1/5 的系统水，采用智能全自动计时器定时开关室内日光灯（光照：黑暗=14 h：10 h），每周换水 2 次且每次换 1/2，使用滤水装置，及时清除杂物。

1.2　方法

1.2.1　斑马鱼胚胎　在繁殖前一天傍晚选取健康、性成熟、活泼的斑马鱼雄鱼和雌鱼放入盛有养殖水的交配盒中，用隔板隔开，进行遮光处理。参照文献[10]，雌雄鱼 1∶1 放置于交配盒 8 hpf 后抽去隔板，让雌雄鱼交配产卵并记录产卵时间。所产受精卵会从内缸底部漏下，进入外缸，避免成鱼接触和吃掉受精卵。收集受精卵，用配制好的 Holt Buffer 缓冲溶液（NaCl 3.5 g、KCl 0.05 g、$NaHCO_3$ 0.025 g、$CaCl_2$ 0.1 g，加入双蒸水充分溶解，定容至 1 L）清洗后，置于含 Holt Buffer 缓冲溶液的培养皿中培养。随后计数并取样本置于凹槽玻璃片上滴加 3% 甲基纤维素进行固定促进成像。显微镜下检查是否有不合格的胚胎，即死亡、未受精、形态学有缺陷和发育不同步的胚胎，将健康的鱼卵移入恒温培养箱用于后续实验。

1.2.2　斑马鱼胚胎急性毒性试验　根据《斑马鱼急性毒性（FET）测试》[11] 和《斑马鱼：药物安全性和毒性评估方法》[12-13]。结合预实验结果，在最高无效应浓度和最低全效应浓度之间，以等差级数方式，设置 0.4、0.8、1.0、1.2、1.6 和 2.0 μg/mL 共 6 个剂量组，同时设置溶剂对照组和助溶剂对照组（0.1% DMSO），每个浓度设置 3 个平行，每组 20 枚胚胎。采用 24 孔细胞培养板进行实验，每孔注入测试液 2 mL 并放入 1 枚正常受精卵，置于（27±1）℃下照光孵化，光/暗比为 14/10 hpf，每隔 24 hpf 换液一次，及时捞出死鱼卵。观察暴露 48、72 和 96 hpf 各组斑马鱼胚胎的死亡和存活情况，计算死亡率和半数致死浓度（LC_{50}），死亡率（%）=（死亡数/胚胎总数）×100%。LC_{50} 采用 Prism 6.0 软件计算。

1.2.3　斑马鱼胚胎发育试验　在体视显微镜下观察 48、72 和 96 hpf 胚胎发育情况，记录胚胎存活数和畸形数，计算胚胎畸形率，畸形率（%）=（畸形数/胚胎总数）×100%。选取具有代表性的表型胚胎荧光显微镜下拍照，观察其致畸效应。斑马鱼胚胎发育畸形主要包括头部和眼点发育不全、心脏发育畸形、体节及体轴发育畸形、尾部折叠、黑素细胞减少和心包囊肿等[14]。

1.3　统计分析

采用 SPSS 17.0 软件统计分析，定性资料采用相对数描述，组间比较采用 χ^2 检验，趋势分析采用趋势 χ^2 检验。检验水准 α=0.05。

2　结　果

2.1　2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎发育的致死作用

48 hpf 时，1.2、1.6 和 2.0 μg/mL 剂量组斑马鱼胚胎开始出现死亡，死亡率分别为 8.3%、35.0% 和 75.0%。72 hpf 时，0.8 和 1.0 μg/mL 剂量组斑马鱼胚胎开始出现死亡，死亡率分别为 6.7% 和 35.0%；1.2 和 1.6 μg/mL 剂量组斑马鱼胚胎接近全部死亡，死亡率分别为 90.0% 和 98.3%；2.0 μg/mL 剂量组斑马鱼胚胎全部死亡。96 hpf 时，0.8、1.0 和 1.2 μg/mL 剂量组斑马鱼胚胎死亡率分别为 30.0%、70.0% 和 95.0%，1.6 μg/mL 剂量组斑马鱼胚胎全部死亡。0.4 μg/mL 剂量组和对照组在观察时间内发育正常，无死亡现象。48、72 和 96 hpf 时，2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎的 LC_{50} 分别为 1.668、1.043 和 0.895 μg/mL，随着时间延长逐渐下降。在 0.4～2.0 μg/mL 范围内，48、72 和 96 hpf 的斑马鱼死亡率随着 2,4-二硝基氯苯浓度增加而上升（$\chi^2_{趋势}$=148.632、237.917 和 205.292，均 P<0.001）。见表 1。

2.2　2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎发育的致畸作用

各组斑马鱼胚胎发育形态变化见图 1。2,4-二硝基氯苯诱发胚胎畸变主要类型见图 2。72 hpf 时，1.6、1.2 和 1.0 μg/mL 组斑马鱼胚胎大量死亡，未死亡胚胎出现畸形，卵黄囊水肿，体节及体轴发育畸形；0.8 μg/mL 组斑马鱼胚胎开始出现畸形。96 hpf 时，

表1 斑马鱼胚胎染毒期间死亡情况

组别	胚胎个数	48 hpf		72 hpf		96 hpf	
		死亡个数	死亡率（%）	死亡个数	死亡率（%）	死亡个数	死亡率（%）
溶剂对照组	60	0	0	0	0	0	0
助溶剂对照组	60	0	0	0	0	0	0
0.4 μg/mL剂量组	60	0	0	0	0	0	0
0.8 μg/mL剂量组	60	0	0	4	6.7	18	30.0
1.0 μg/mL剂量组	60	0	0	21	35.0	42	70.0
1.2 μg/mL剂量组	60	5	8.3	54	90.0	57	95.0
1.6 μg/mL剂量组	60	21	35.0	59	98.3	60	100.0
2.0 μg/mL剂量组	60	45	75.0	60	100.0	60	100.0

1.2 和 1.0 μg/mL 组斑马鱼胚胎大量死亡，未死亡胚胎出现畸形；0.8 μg/mL 组斑马鱼胚胎大部分出现畸形，其中以体节及体轴发育畸形为主；0.4 μg/mL 组和对照组斑马鱼胚胎发育均正常无畸形。48 hpf 时，胚胎发育进入孵化期，仔鱼背鳍腹鳍长成，完成孵化，1.6、1.2 和 1.0 μg/mL 组斑马鱼胚胎出现畸形，包括骨骼畸形伴有头部、眼点发育不全和心包囊肿等。由于 72 和 96 hpf 胚胎大量死亡，畸形情况无法准确统计，因此选取 48 hpf 时胚胎畸形情况进行分析。在 0.4～2.0 μg/mL 范围内，48 hpf 的斑马鱼畸形率随着 2,4-二硝基氯苯浓度增加而上升（$\chi^2_{趋势}$=55.080，P<0.001）；1.0、1.2 和 1.6 μg/mL 组斑马鱼胚胎出现畸形，畸形率分别为 8.3%、45.0% 和 58.3%；2.0 μg/mL 组斑马鱼胚胎大量死亡，未死亡胚胎均出现畸形。见表 2。

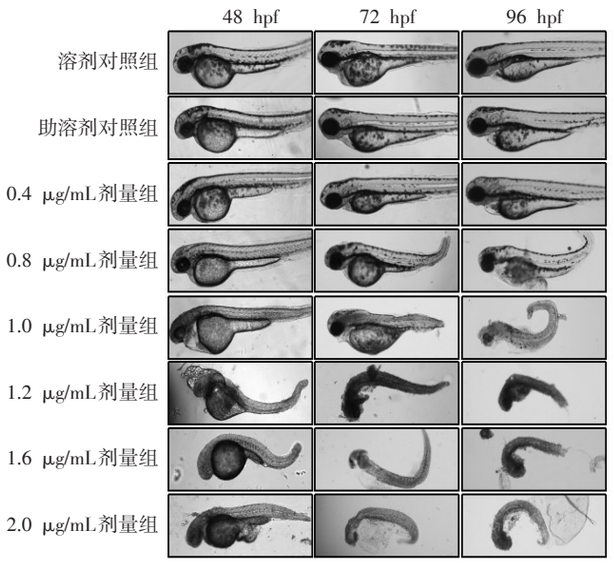
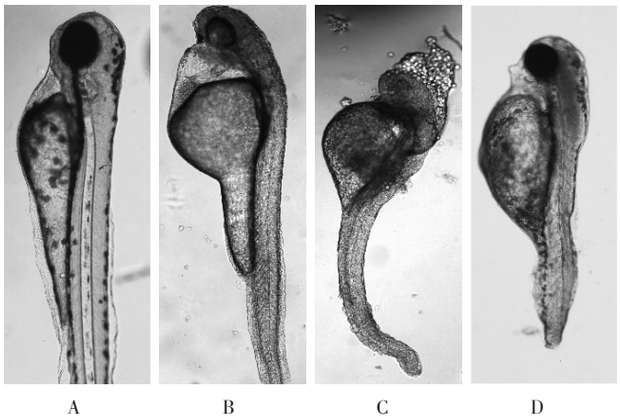


图1 斑马鱼胚胎发育形态

3 讨 论

实验结果显示，72 hpf 后，在高浓度 2,4-二硝基氯苯暴露下，斑马鱼胚胎死亡率很高，当浓度达到 2.0 μg/mL 时斑马鱼全部死亡，提示 2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎发育有明显的致死效应。48 hpf 后随着暴露浓度的增加和暴露时间的延长，斑马鱼胚胎死亡率呈不同程度增加，且有明显的剂量和时间依赖性。因此，2,4-二硝基氯苯的毒性在斑马鱼体内存在蓄积效应，随着时间延长，毒性增加。

斑马鱼胚胎发育与哺乳动物非常相似，包括早期胚胎发育、心血管发育、体节和骨骼发育等[15-17]。在胚胎发育早期，斑马鱼胚胎暴露于 2,4-二硝基氯苯时主要导致卵黄囊水肿、心包囊肿和骨骼畸形等多种发育畸形，这些畸形是评价斑马鱼胚胎发育毒性的重要指标。在各种畸形中，以 48 hpf 时心包囊肿发生时期最早，说明 2,4-二硝基氯苯对斑马鱼心血管系统发育有明显影响，可能导致心脏功能障碍。72 phf 时斑马鱼幼鱼出现卵黄囊水肿情况，刘艺等[18]



注：A为正常仔鱼；B为心包囊肿的仔鱼；C为骨骼畸形伴有头部和眼点发育不全的仔鱼；D为卵黄囊水肿的仔鱼。

图2 2,4-二硝基氯苯诱发的斑马鱼胚胎畸变主要类型

表 2　48 hpf 斑马鱼胚胎畸形情况

组别	胚胎个数	畸形个数	畸形率（%）
溶剂对照组	60	0	0
助溶剂对照组	60	0	0
0.4 μg/mL剂量组	60	0	0
0.8 μg/mL剂量组	60	0	0
1.0 μg/mL剂量组	60	5	8.3
1.2 μg/mL剂量组	60	27	45.0
1.6 μg/mL剂量组	60	35	58.3
2.0 μg/mL剂量组	60	15	23.3

将卵黄囊水肿作为芦荟大黄素诱导斑马鱼肝毒性发生的观察指标之一，因此卵黄囊水肿说明 2,4-二硝基氯苯可能对斑马鱼幼鱼肝脏具有毒性作用。李淑华等[19]研究发现长期接触硝基氯苯的作业工人肝脏 B 超异常率明显高于对照组。有研究表明，水肿会引起生物体代谢障碍，损害器官功能，是生物体抵御外界有毒物质入侵的一种反应[20]。随着暴露时间的延长，脊柱明显畸形，尾部弯曲，说明 2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎骨骼发育有着明显的致畸效应。

综上所述，2,4-二硝基氯苯对斑马鱼胚胎具有致死和致畸作用。斑马鱼胚胎畸形率和死亡率随着 2,4-二硝基氯苯浓度增加而上升，发育畸形主要表现为卵黄囊水肿、心包囊肿和脊柱弯曲等，对骨骼发育、心脏和肝脏具有毒性作用。在生产和使用过程中，应严格控制 2,4-二硝基氯苯进入自然环境，限制其使用范围及浓度，并对从事相关行业的职业暴露人群做好个人防护，从环保角度评估其风险，提出相应管理方案。

参考文献

[1] 王晓燕，尚伟．水体有毒有机污染物的危害及优先控制污染物［J］．首都师范大学学报，2002，23（3）：73-78.

[2] 李雪青，邢鸣鸾，高向景，等．气相色谱法测定工作场所空气2,4-二硝基氯苯及工人皮肤暴露剂量［J］．预防医学，2017，29（2）：214-216.

[3] 李倩，姜丝涛，李鲁美．迷迭香酸对硫酸铜致斑马鱼胚胎毒性的抑制作用［J］．动物学杂志，2019，54（1）：99-107.

[4] 蔡霈，文晓柯，欧阳波，等．地肤子总黄酮对二硝基氯苯致大鼠接触性皮炎的抗炎作用［J］．中国医药导报，2019，16（20）：17-20.

[5] SUNG Y Y，KIM S H，YANG W K，et al.Bleomycin aggravates atopic dermatitis via lung inflammation in 2,4-dinitrochlorobenzene-induced NC/Nga mice［J］.Front Pharmacol，2018，9：578.

[6] CHOI J H，JIN S W，LEE G H，et al.Orostachys japonicus ethanol extract inhibits 2,4-dinitrochlorobenzene-induced atopic dermatitis-like skin lesions in NC/Nga mice and TNF-α/IFN-γ-induced TARC expression in HaCaT cells［J］.Toxicol Res，2020，36（2）：99-108.

[7] 周程，吴南翔，范宏亮，等.TCS 和 PCB153 联合暴露对斑马鱼肝脏 SOD 和 MDA 的影响［J］．预防医学，2019，31（4）：330-334.

[8] TRUONG L，HARPER S L，TANGUAY R L.Evaluation of embryotoxicity using the zebrafish model［J］.Methods Mol Biol，2011，691：271-279.

[9] 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.

[10] 夏勇，董晓岚，孟真，等．五氯酚钠的发育毒性和遗传毒性研究［J］．预防医学，2016，28（11）：1081-1090.

[11] OECD.OECD Guidelines for the Testing of Chemicals［S］．2013.

[12] HALDI M，HARDEN M，D'AMICO L，et al.Developmental toxicity assessment in zebrafish［M］// MCGRATH P.Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity.New York：John Wiley & Sons，Inc，2011.

[13] MCGRATH P. Use of emerging models for developmental toxicity testing［M］// MCGRATH P.Zebrafish: methods for assessing drug safety and toxicity.New York：John Wiley & Sons，Inc，2011.

[14] YANG L X，HO N Y，ALSHUT R，et al.Zebrafish embryos as models for embryotoxic and teratological effects of chemical［J］.Reprod Toxicol，2009，28（2）：245-253.

[15] MCCOLLUN C W，DUCHARME N A，BONDESSON M，et al.Developmental toxicity screening in zebrafish［J］.Birth Defects Res C Embryo Today，2011，93（2）：67-114.

[16] TAO W，CHENG X W，QIONG W，et al.Evaluation of Tanshinone IIA developmental toxicity in zebrafish embryos［J］.Molecules，2017，22（4）：1-8.

[17] 陈宏降，刘佳楠，阮洪生，等．鱼腥草、三白草地上部分和根茎醇提物对斑马鱼成鱼和胚胎的毒性研究［J］．中成药，2020，42（6）：1633-1636.

[18] 刘艺，王瑞昕，游龙泰，等．芦荟大黄素诱导斑马鱼肝毒性及作用机制研究［J］．环球中医药，2020，13（1）：18-22.

[19] 李淑华，张玉兰，陈淑艳，等．长期硝基氯苯作业工人肝脏 B 超改变的观察［J］．中国职业医学，2003，30（2）：51.

[20] 陈粉丽，张松林，陈红梅，等．氯代苯类化合物对斑马鱼胚胎的单一急性毒性［J］．环境与职业医学，2010，27（8）：472-475.

收稿日期：2020-07-09　**修回日期**：2020-10-23　**本文编辑**：田田