

三丁基锡对罗氏沼虾卵黄蛋白原(VTG) 表达和性腺发育的影响

吴维福¹ 李郁娇² 黎 东² 陈奕奕² 朱春华^{2*}

(¹ 广东省机械进出口股份有限公司, 广州 510080)

(² 广东海洋大学, 湛江 524088)

摘 要 将罗氏沼虾成虾浸浴于含三丁基锡(Tributyltin, TBT) (0.1、0.2、0.4mg/L)的水体中,研究 TBT 对其肝胰脏和性腺中卵黄蛋白原(VTG)表达和性腺发育的影响。结果表明,罗氏沼虾在 TBT 中浸浴 10d, TBT 能够诱导雌虾的肝胰腺 VTG 基因表达,而对卵巢 VTG 基因的表达则表现为抑制作用;TBT 对雄虾的肝胰腺 VTG 基因表达有抑制作用,而对精巢 VTG 基因的表达无明显影响。性腺组织切片显示, TBT 浸浴能够促进罗氏沼虾精巢的发育,且随浸浴剂量的增加对精巢发育的促进作用逐步增强,但 TBT 对罗氏沼虾卵巢发育无明显影响。

关键词 罗氏沼虾 三丁基锡 卵黄蛋白原 性腺

中图分类号 S917.4 **文献标识码** A **文章编号** 1000-7075(2013)04-0077-07

Effects of tributyltin on vitellogenin expression and gonad development of *Macrobrachium rosenbergii*

WU Wei-fu¹ LI Yu-jiao² LI Dong² CHEN Luan-luan² ZHU Chun-hua^{2*}

(¹ Guangdong Machinery IMP. & EXP. CO., LTD. Guangzhou 510080)

(² Fisheries College, Guangdong Ocean University, Zhanjiang 524025)

ABSTRACT Expression of vitellogenin (VTG) after exposure to tributyltin (TBT) was examined in hepatopancreas and ovarian of *Macrobrachium rosenbergii*. Results showed that the expression of VTG increased in the hepatopancreas of female *M. rosenbergii*, but decreased in the ovary. Expression of VTG in the hepatopancreas of male *M. rosenbergii* was inhibited by TBT, yet no significant effect was observed for TBT on the expression of VTG in the testis. Development of testis in *M. rosenbergii* was improved after exposure to TBT, but the effect of TBT on ovary development was not significant.

KEY WORDS *Macrobrachium rosenbergii* Tributyltin (TBT) Vitellogenin (VTG)
Gonad

环境内分泌干扰物(Endocrine Disrupter Chemicals, EDCs)是一类化学污染物,它能够干扰和调节生物发育过程,造成水生动物的性别畸变,对机体及其后代产生有害影响(Baker *et al.* 2001)。目前确定为 EDCs 的化合物约有数百种。有机锡是人工合成的有机化合物,在船舶、塑料、农药等行业都有重要用途。海洋环境中的有机锡化合物是一类典型的环境内分泌干扰物,以三丁基锡(Tributyltin, TBT)和三苯基锡(Triphenyltin, TPT)为主(Dowson *et al.* 1993)。TBT 具有高毒性、广谱性,是迄今为止人为引入海洋环境中毒性最大的化合物之一,水生生物对 TBT 有极强的富集能力,TBT 能对水生生物的生存、生长、发育以及繁殖造成不同程度的损伤(颜 天等 2001)。

TBT 对水生动物的影响研究主要集中在鱼类和贝类。李 琪等(2001)发现有机锡在太平洋牡蛎 *Crasostrea gigas* 体内的积累会阻碍卵黄蛋白的合成,产生雌雄同体,干扰钙代谢使贝壳畸形变厚。Bryan 等(2001)发现浸浴在 TBT 水环境中的腹足类雌性个体出现雄性性器官,雌性腹足类由于输卵管的阻塞而不能产卵。斑马鱼幼体浸浴在含 TBT 0.1ng/L 的水体中 70d 后,该群体中的雄鱼数量显著偏高(McAllister *et al.*

2003),TBT 可以使太平洋牡蛎、海湾扇贝 *Argopectens irradians* 等水生生物发生性别变异,甚至可能引起种群的衰退和消亡(Gibbs *et al.* 2003;Bryan *et al.* 1986)。水体中 TBT 超过 $1\mu\text{g/L}$ 即可引起沙螯虾性别畸变(周明江等 1994)。 $2\mu\text{g/L}$ 的氯化三苯基锡(TPTCl)能使黑褐新糠虾 *Neomysis awatschensis* 首次生育年龄延迟、产卵总数减少, $3\mu\text{g/L}$ 可能导致黑褐新糠虾种群衰亡(颜 天等 2000)。

罗氏沼虾 *Macrobrachium rosenbergii* 又名马来西亚大虾,原产于东南亚国家的河口半咸水和江河、湖泊等淡水水域中,是目前世界上养殖量最大的三大虾种之一,也是我国最主要的淡水虾养殖对象。对罗氏沼虾的研究,多集中在环境因子如盐度(朱春华 2005)、光照(林小涛等 1998)和水温(王昌顺等 2003)以及氨氮(王 玥 2004)等方面,而 EDCs 对罗氏沼虾的影响报道很少。吴 楠等(2007)研究表明, $100\mu\text{g/L}$ 的壬基酚(NP)能够诱导罗氏沼虾雌虾体内卵黄蛋白原的合成。朱春华等(2011a)采用 NP 处理罗氏沼虾幼虾 30d,当 NP 浓度达到 $135\mu\text{g/L}$ 时,无法鉴定性别的幼虾比例高达 12.36%,但是未发现间性性别。即使水环境中 TBT 含量很低($8\mu\text{g/L}$),也能对罗氏沼虾的鳃和肝脏造成损伤(朱春华等 2011b)。本实验研究 TBT 对罗氏沼虾卵黄蛋白原表达和性腺发育的影响,旨在评价罗氏沼虾作为水污染标志生物的可能性,为水环境的保护提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

罗氏沼虾购自广东湛江广华虾苗场,雄虾体长 $10\pm 0.5\text{cm}$,体重 25~30g;雌虾体长 $9\pm 0.5\text{cm}$,体重 15~20g,体色正常,健康活泼。实验用水采用深井水,TBT 无检出,试验时间为 2012 年 5~7 月。

1.2 实验方法

实验在 300L 玻璃钢桶中进行,TBT 浓度设置为 0.1、0.2、0.4mg/L 3 个梯度和对照组(0mg/L),各设两个平行。每组放置罗氏沼虾 20 尾,雌雄分开。实验期间昼夜充气,平均水温 $30\pm 1^\circ\text{C}$ 。每天早、晚各投饵 1 次,日换水量为 1/5,换水后保持实验浓度不变。分别在 3、5、10d 各取样 1 次,雌雄每次各随机取样 3 尾,取肝脏和性腺,超低温保存,进行相关实验。

1.3 卵黄蛋白原(VTG)表达

1.3.1 总 RNA 提取

使用 Invitrogen 公司的 Trizol 试剂盒进行总 RNA 的提取。用紫外可见分光光度计测量吸光值通过 $\text{OD}_{260/280}$ 判断总 RNA 纯度。1.5% 琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶图像分析仪观察。

1.3.2 引物设计

参照罗氏沼虾卵黄蛋白原(VTG)mRNA 序列(GenBank: AB056458.1)以及 18S rRNA 序列(GenBank:

AY461599.1)。应用 Primer 5.0 软件,依据同罗氏沼虾分类地位接近的几种虾相关基因的保守序列,设计 VTG 和 18S rRNA 特异性引物如下:

VTG 引物:Forward: 5'-CCGACCATGCATTCCTCCGTTGA-3'
Reverse: 5'-TGTTGCCAAGGGACTTCAGTAGAGC-3'
Size:251bp

18S rRNA 引物:Forward: 5'-TGTTACGGGTGACGGA-3'
Reverse: 5'-AATTACGCAGACTCGGAAGA-3'
Size:169bp

1.3.3 半定量 PCR

PCR 扩增体系:0.25 μ l Taq(5U/ μ l),2.5 μ l 10 \times PCR Buffer (Mg²⁺ Free),1.5 μ l MgCl₂ (25mmol/L),2 μ l dNTP Mixture(各 2.5mmol/L),2 μ l 模板 cDNA,上下游引物各 2 μ l,灭菌双蒸水 12.75 μ l。PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30s,35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物每管取 5 μ l 进行 1.5% TAE 琼脂糖凝胶电泳,UVP 凝胶电泳成像,Bio-Rad Quantity-one 软件计算条带光密度值,VTG 含量以 VTG 条带光密度和 18S rRNA 条带光密度的比值作半定量分析。

1.4 性腺组织学观察

解剖罗氏沼虾雌雄虾,取其性腺在波恩氏液中固定,苏木精-伊红染液,石蜡切片,显微观察和拍照。

1.5 数据处理

实验结果采用 SPSS 17.0 统计软件采用单因子方差分析(ANOVA)和 Duncan(D)分析,进行显著性水平检验。

2 结果

2.1 三丁基锡对罗氏沼虾 VTG 基因表达的影响

2.1.1 三丁基锡对罗氏沼虾雌虾的肝胰腺中 VTG 基因表达的影响

TBT 浸浴对罗氏沼虾雌虾的肝胰腺中 VTG 基因表达,有一定的促进作用。低剂量组(0.1mg/L)能够显著诱导雌虾的肝胰腺中 VTG 基因的表达($P < 0.05$),随着浸浴时间的延长,VTG 基因的表达量呈上升趋势;中剂量组(0.2mg/L)和高剂量组(0.4mg/L)VTG 基因表达量在浸浴早期与对照组相比差异明显。浸浴第 5 天后,中、高剂量组 VTG 基因表达量与对照组差异不显著(图 1)。

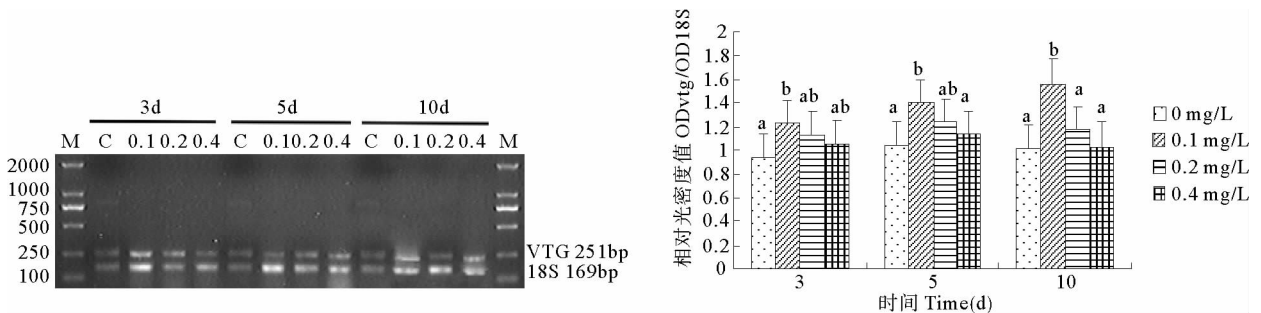


图 1 三丁基锡对罗氏沼虾雌虾肝胰腺中 VTG 及 18S rRNA 表达的 3 次半定量 RT-PCR 统计分析

Fig. 1 Semi-quantitative RT-PCR statistical analysis of the VTG and 18S rRNA expression in hepatopancreas of female *M. rosenbergii* exposed to TBT

2.1.2 三丁基锡对罗氏沼虾卵巢中 VTG 基因表达的影响

TBT 浸浴对罗氏沼虾卵巢中 VTG 基因的表达具有抑制作用,高剂量组(0.4mg/L)的抑制作用大于中剂

量组(0.2mg/L)和低剂量组(0.1mg/L)。浸浴第3天,中、低剂量组 VTG 基因表达量与对照组相比差异不明显,而高剂量组罗氏沼虾卵巢中的 VTG 基因表达量显著降低($P<0.05$)。浸浴第5天后,低剂量 TBT 对卵巢中的 VTG 基因表达量没有明显影响,而中、高剂量组卵巢中的 VTG 基因表达量与对照组相比,差异极显著($P<0.01$)(图2)。

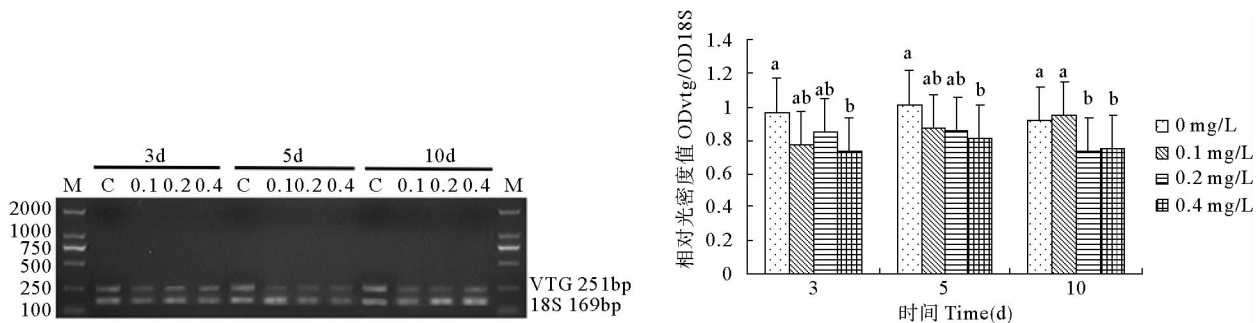


图2 三丁基锡对罗氏沼虾卵巢中 VTG 及 18S rRNA 表达的 3 次半定量 RT-PCR 统计分析

Fig.2 Semi-quantitative RT-PCR statistical analysis of the ovarian VTG and 18S rRNA expression of *M. rosenbergii* exposed to TBT

2.1.3 三丁基锡对罗氏沼虾雄虾肝胰腺中 VTG 基因表达的影响

TBT 浸浴对罗氏沼虾雄虾的肝胰腺中 VTG 基因表达没有明显影响。各剂量组雄虾的肝胰腺中 VTG 基因表达量与对照组比较差异均不显著,中、高剂量 TBT 对罗氏沼虾雄虾的肝胰腺中 VTG 基因表达由短暂促进后转为抑制(图3)。

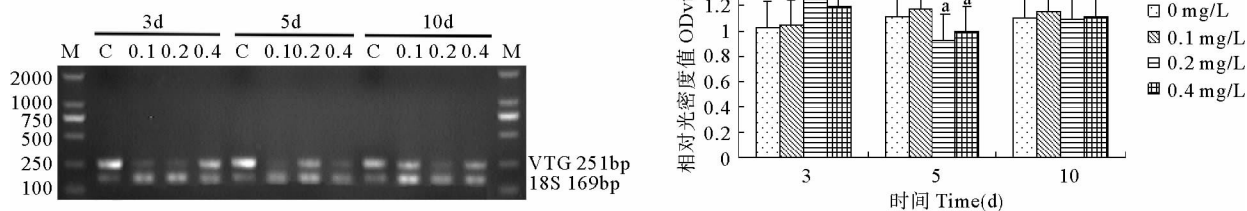


图3 三丁基锡对罗氏沼虾雄虾肝胰腺中 VTG 及 18S rRNA 表达的 3 次半定量 RT-PCR 统计分析

Fig.3 Semi-quantitative RT-PCR statistical analysis of the VTG and 18S rRNA expression in hepatopancreas of male *M. rosenbergii* exposed to TBT

2.1.4 三丁基锡对罗氏沼虾精巢中 VTG 基因表达的影响

TBT 浸浴对罗氏沼虾雄虾精巢中 VTG 基因的表达,各剂量组与对照组比较均无显著性差异(图4)。

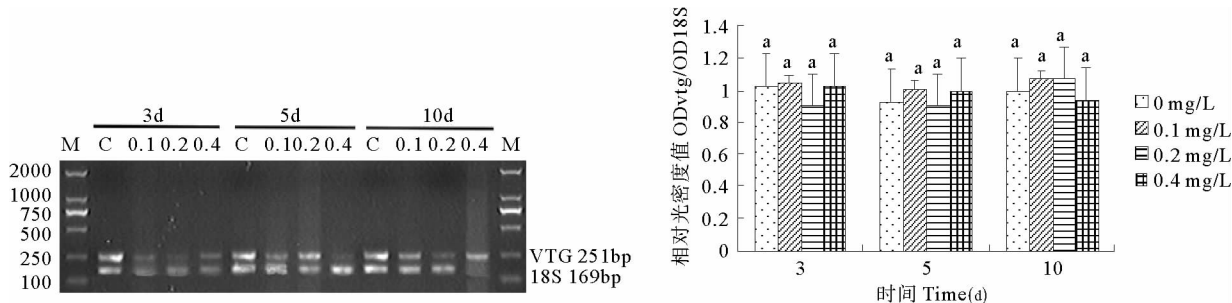


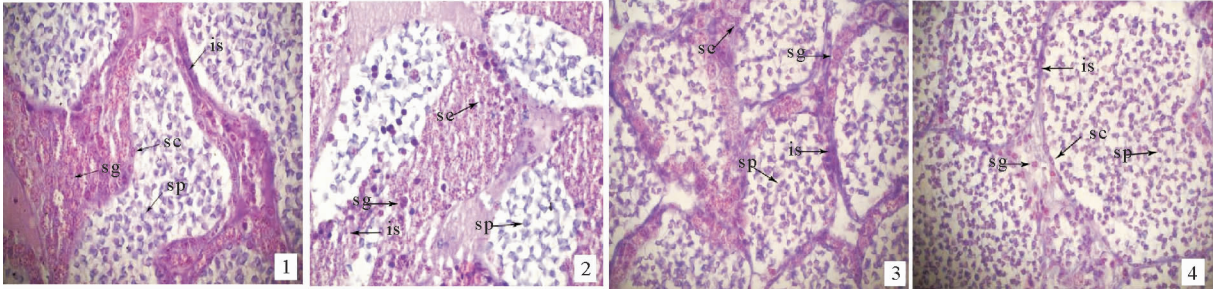
图4 三丁基锡对罗氏沼虾精巢中 VTG 及 18S rRNA 基因表达的 3 次半定量 RT-PCR 统计分析

Fig.4 Semi-quantitative RT-PCR statistical analysis of the VTG and 18S rRNA expression in testis of *M. rosenbergii* exposed to TBT

2.2 三丁基锡对罗氏沼虾性腺发育的影响

2.2.1 三丁基锡对罗氏沼虾精巢的影响

罗氏沼虾在 TBT 浸浴 10d,低剂量组(0.1mg/L)与对照组比较,精小叶中的精原细胞和精母细胞的数量增多,精子细胞数量无明显的差异。中、高剂量组(0.2、0.4mg/L)精小叶中精子细胞数量比对照组明显增多,特别是高剂量组的精小叶中完全充满精子细胞,与对照组比较,精子细胞的数量和密度达到峰值(图 5)。



sg: 精原细胞; sc: 精母细胞; sp: 精子细胞; is: 间质细胞;

1: 空白对照(×400); 2: 0.1mg/L TBT 浸浴 10d 罗氏沼虾精巢 (×400); 3: 0.1mg/L TBT 浸浴 10d 罗氏沼虾精巢 (×400); 4: 0.1mg/L TBT 浸浴 10d 罗氏沼虾精巢(×400);

Sg: Spermatogonia; sc: Spermatocytes; sp: Sperm; is: Interlobularseptum;

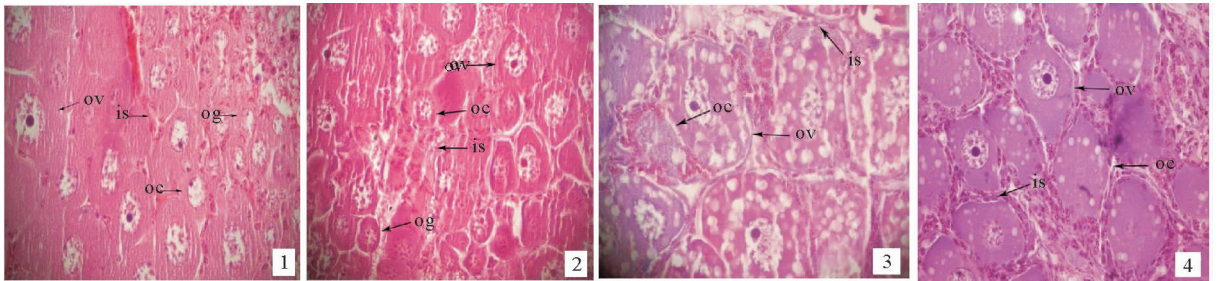
1. Control(×400); 2. 10d in 0.1mg/L TBT(×400); 3. 10 d in 0.2mg/L TBT(×400); 4. 10 d in 0.4mg/L TBT(×400)

图 5 TBT 对罗氏沼虾精巢影响(精巢纵切)

Fig. 5 Impact of TBT on testis of *M. rosenbergii* (longitudinal section of the testis)

2.2.2 三丁基锡对罗氏沼虾卵巢的影响

罗氏沼虾在 TBT 浸浴 10d,各剂量组卵巢组织结构正常,细胞均匀分布,卵母细胞发育基本同步。TBT 浸浴对罗氏沼虾卵巢的影响不显著(图 6)。



Og: 卵原细胞; oc: 卵母细胞; ov: 卵细胞; is: 间质细胞;

1: 空白对照(×200); 2: 0.1mg/L TBT 浸浴 10d 罗氏沼虾卵巢 (×200); 3: 0.2mg/L TBT 浸浴 10d 罗氏沼虾卵巢(×400); 4: 0.4mg/L TBT 浸浴 10d 罗氏沼虾卵巢(×400);

Og: Oogonium; oc: Oocyte; ov: Ovum; is: Interlobularseptum;

Control(×200); 2. 10 d in 0.1mg/L NP (×200); 3. 10 d in 0.4mg/L NP (×400); 4. 10 d in 0.4mg/L NP (×400)

图 6 TBT 对罗氏沼虾卵巢影响(精巢纵切)

Fig. 6 Impact of TBT on ovary of *M. rosenbergii* (longitudinal section of the ovary)

3 讨论

3.1 三丁基锡对罗氏沼虾 VTG 基因表达的影响

卵黄蛋白原(Vitellogenin,VTG)是一种特异的、存在于卵生无脊椎动物和低等脊椎动物雌性体内的一种

蛋白,是卵黄蛋白的前体,内源或外源性雌激素都能刺激卵生无脊椎动物的肝胰腺产生 VTG,然后由肝胰腺释放到血液中,通过血液循环运输到卵巢,促进卵巢的发育。VTG 对环境中的雌激素极为敏感,已成为筛选和检测环境雌激素污染的一种重要生物标志物(Kime *et al.* 1999)。

研究发现日本囊对虾 *Penaeus japonicus* 卵黄蛋白原 mRNA 在卵巢和肝胰腺都有表达,含有卵黄的雌虾的肝胰腺和卵巢中 VTG 含量急剧增加(Tsutsui *et al.* 2000),证明甲壳动物的 VTG 在肝胰腺和卵巢中都有合成。本研究证实 TBT 能够抑制卵巢 VTG 基因的表达,且高剂量对卵巢 VTG 基因表达的抑制效果大于中、低剂量。但 TBT 对罗氏沼虾雌虾的肝胰腺却表现出一定的诱导作用。分析可能是,肝胰腺中 VTG 表达与卵巢中 VTG 的表达是两个独立而又相互关联的过程,TBT 作为环境抗雌激素,可以抑制神经内分泌因子的释放,干扰雌激素与卵巢中雌激素相关受体的结合,抑制卵巢中 VTG 合成。肝胰腺是甲壳动物 VTG 外源合成的主要部位,直接受性腺抑制激素的调控。当在 TBT 干扰下,眼柄分泌的性腺抑制激素短暂受到抑制,诱导了肝胰腺中 VTG 的合成。高祥刚等(2006)指出,正常情况下日本沼虾 *Macrobrachium nipponense* 雄虾和仔虾体内 VTG 水平很低,几乎检测不到,但当仔虾或成熟的雄虾在受到外源性激素的影响时也会产生 VTG。本研究发现 TBT 对罗氏沼虾雄虾肝胰腺表现出一定的抑制作用,对精巢 VTG 基因的表达则没有影响,可能是雄虾体内卵黄蛋白原基因表达量较低或不表达,或者形成卵黄蛋白原的量较少。刘阿朋(2006)认为,三丁基锡氧化锡(TBTO)浸浴对稀有鮎鲫 *Gobiocypris rarus* 雄鱼体内卵黄蛋白原的合成没有影响。张纪亮(2007)研究也都发现 TBT 对褐菖鲉雄性体内 VTG 的影响不显著,也在一定程度上证实了上述结论。

3.2 三丁基锡对罗氏沼虾性腺的影响

范立民等(2009)研究了 TBT 对雄性奥里亚罗非鱼 *Oreochromis aureus* 精巢细胞凋亡的影响,发现随着 TBT 浓度的升高,罗非鱼精巢细胞凋亡率逐渐升高,剂量效应关系显著。运用组织学方法研究 TBT(1、10、100 $\mu\text{g/L}$ TBT)对褐菖鲉 *Sebastiscus marmoratus* 性腺发育的影响,结果显示 TBT 抑制褐菖鲉精巢和卵巢的发育(Zhang *et al.* 2007)。汤丽(2008)对疣荔枝螺 *Thais clavigera* 进行了 TBT 浸浴实验,结果发现浸浴 30d 后所有浸浴浓度组(0.5、1、2.5 $\mu\text{g/L}$)雌性个体均出现了性畸变现象,随着浸浴时间的延长,性畸变程度逐渐加重。也有研究发现 TBT 浸浴对水生动物性腺的发育没有影响。徐文菊等(2010)发现,TBT 浸浴对日本鳗鲡 *Auguilla japonica* 性腺的组织结构无明显影响,但对肝脏和脾脏的组织结构产生损伤,这种毒性效应与鱼体所处环境盐度有关。王蕾(2008)研究 TBT 浸浴对非洲爪蟾 *Xenopus laevis* 和红鲫 *Carassius auratus* 的性腺组织学切片观察,结果表明浸浴组与对照组精巢和卵巢结构均无明显差异。本研究中 TBT 浸浴对罗氏沼虾精巢发育具有促进作用,而对卵巢的影响效果不显著,分析可能是,水生动物因种类不同,或者是采用的浸浴剂量存在差异,也可能是作用时效不一,得到的结论各有不同。

参 考 文 献

- 王 玥. 2004. 两种主要环境因子对罗氏沼虾免疫功能的影响. 见: 浙江大学硕士研究生学位论文
- 王 蕾. 2008. 三丁基锡对非洲爪蟾和红鲫的毒性效应. 见: 华东师范大学硕士研究生学位论文
- 李 琪, 尾定诚, 森胜义, 王如才. 2001. 三丁基氧化锡(TBTO)对太平洋牡蛎性成熟的影响. 青岛海洋大学学报, 31(5): 701-704
- 朱春华. 2005. 低盐度条件下罗氏沼虾人工育苗试验. 水产养殖, 26(4): 19-22
- 朱春华, 薛海波, 李郁娇, 黄国钟, 刘易洋, 李广丽. 2011. 壬基酚(NP)对罗氏沼虾幼虾生长和性别分化的影响. 水产学报, 35(3): 365-369
- 朱春华, 薛海波, 李广丽. 2011. 三丁基锡(TBT)对罗氏沼虾的毒性效应. 生态学杂志, 30(3): 527-532
- 刘阿朋. 2006. 17 α -甲基睾酮和三丁基锡氧化物对稀有鮎鲫的影响. 见: 华中农业大学硕士研究生学位论文
- 吴 楠, 张 毅, 李惠云, 张高峰, 刘 青, 魏 华. 2007. 壬基酚和雌二醇干扰罗氏沼虾卵黄蛋白原 VTG 基因表达的效应. 动物学杂志, 42(4): 1-7
- 张纪亮. 2007. 三丁基锡对褐菖鲉性腺发育影响及其机制的初步研究. 见: 厦门大学硕士研究生学位论文
- 汤 丽. 2008. 香港和厦门海域疣荔枝螺(*Thais clavigera*)性畸变程度及相关内分泌干扰机制初探. 见: 厦门大学硕士研究生学位论文
- 范立民, 胡庚东, 甘居利, 马晓燕, 瞿建宏, 吴 伟, 陈家长. 2009. 氯化三丁基锡(TBTCl)对罗非鱼精巢细胞凋亡的影响. 生态与农村环境学报, 25(4): 83-88

- 徐文菊, 李远友, 夏小安, 王树启, 吴清洋, 徐树德. 2010. 三丁基锡和非对鳗鲡的毒性效应. 生态毒理学报, 5(2):229-236
- 高祥刚, 刘红, 徐佳念, 蔡生力. 2006. 日本沼虾卵黄蛋白原合成部位的初步研究. 生物技术通报, (z): 438-444
- 颜天, 李正炎, 李均, 周名江. 2001. 三苯基氯化锡对海湾扇贝摄食、附着和存活的影响. 水产学报, 25(3): 279-283
- Baker VA. 2001. Endocrine disrupters-testing strategies to assess human hazard. Toxicology in Vitro 425: 413-419
- Bryan GW, Gibbs PE. 1986. The decline of the gastropod *Nucella lapillus* around south-west England: evidence for the effect of tributyltin from anti-fouling paints. Mar Biol Assoc of the United Kingdom 66:611-640
- Dowson PH, Bubb JM, Lester JN. 1993. Temporal distribution of organotins in the aquatic environment: five years after the 1987 UK retail ban on TBT-based anti-fouling paints. Marine Pollution Bulletin 26: 487-494
- Gibbs PE, Pascoe PL, Burt GR. 1988. Sex change in the female dogwhelk, *Nucella lapillus*, induced by tributyltin from antifouling paints. Mar Biol Assoc of the United Kingdom 68: 715-731
- Kime DE, Nash P, Scott AP. 1999. Vitellogenesis as a biomarker of reproductive disruption by xenobiotics. Aquaculture 177: 345-352
- McAllister BG, Kime DE. 2003. Early life exposure to environmental levels of the aromatase inhibitor tributyltin causes masculinisation and irreversible sperm damage in zebrafish (*Danio rerio*). Aquatic Toxicology 65: 309-316
- Tsutsui N, Kawazoe I, Tohir A, et al. 2000. Molecular characterization of a cDNA encoding vitellogenin and its expression in the hepatopancreas and ovary during vitellogenesis in the Kuruma prawn, *Penaeus japonicus*. Zoological Science 17: 651-660
- Zhang JL, Zuo ZH, Chen YX. 2007. Effect of tributyltin at environmental levels on the development of ovary in female cuniver (*Sebastiscus marmoratus*). Aquatic Toxicology 3: 324-330
- *****

《渔业科学进展》编辑部声明

为扩大本刊及作者知识信息交流渠道,加强知识信息推广力度,本刊已许可中国学术期刊(光盘版)电子杂志社在 CNKI 中国知网及其系列数据库产品中,以数字化方式复制、汇编、发行、信息网络传播本刊全文。

该著作权使用费及相关稿酬,本刊均用于作者文章发表、出版、推广交流(含信息网络)以及赠送样刊之用途,不再另行向作者支付。凡作者向本刊提交文章发表之行为即视为同意我编辑部上述声明。

《渔业科学进展》编辑部

2013 年 8 月 20 日