DOI:10.15933/j.cnki.1004-3268.2012.11.041

河南农业科学,2012,41(11):143-146
Journal of Henan Agricultural Sciences

苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎发育的毒性研究

王　君,肖　静,王琼琼,杜启艳,常重杰*
(河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007)

摘要:为研究水体中苏丹红Ⅲ的毒性作用,以苏丹红Ⅲ为诱变剂,以泥鳅胚胎为试验材料,选择泥鳅胚胎发育的4个不同时期(胚胎隆起期、原肠胚中期、神经胚期、尾芽期)为开始处理时间,用0.085 g/L (1/12 LC_{50},24 h)、0.057 g/L(1/18 LC_{50},24 h)、0.038 g/L(1/27 LC_{50},24 h)、0.025 g/L(2/81 LC_{50},24 h)、0.017 g/L(4/243 LC_{50},24 h) 等5个质量浓度梯度,探讨了苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎发育的影响。结果表明:苏丹红Ⅲ对泥鳅各发育时期的孵化率均产生影响;最低质量浓度组(0.017 g/L)的孵化率与对照组(自来水处理)相比无明显差异;原肠胚中期和神经胚期对苏丹红Ⅲ最为敏感,在次低质量浓度组(0.025 g/L)即开始表现出差异。尾芽期时,在中质量浓度组即0.038 g/L时即开始表现出差异。苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎具有明显的致畸作用,胚胎的主要致畸症状包括体态异常、胚体浑浊或解体等。苏丹红Ⅲ对尾芽期胚胎的致畸作用表现最为明显,在最低质量浓度组(0.017 g/L)时即与对照组具有极显著差异;胚胎隆起期,在中质量浓度组(0.038 g/L)时,开始与对照组产生差异;原肠胚中期和神经胚期,只有最低质量浓度组(0.017 g/L)与对照组无差异,其余组与对照组有极显著差异。4个不同处理时期的半数有效致畸质量浓度(EC_{50})分别为0.056、0.044、0.039、0.049 g/L。苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎的发育有明显的抑制、致畸、致死作用,表现出明显的毒性,这可为苏丹红Ⅲ的合理使用提供依据。

关键词:苏丹红Ⅲ;泥鳅;胚胎发育;毒性
中图分类号:S948　　**文献标志码**:A　　**文章编号**:1004-3268(2012)11-0143-04

Toxicity of Sudan Red Ⅲ on Embryos of *Misgurnus anguillicandatus*

WANG Jun, XIAO Jing, WANG Qiong-qiong, DU Qi-yan, CHANG Zhong-jie*
(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: To study the toxic effects of Sudan Red Ⅲ on the embryos of *Misgurnus anguillicandatus*, four different embryonic development periods including blastoderm, mid-gastrulation, neurula stage, and tail bud stage were treated with Sudan Red Ⅲ at the concentrations of 0.085 g/L (1/12 LC_{50}, 24 h), 0.057 g/L (1/18 LC_{50}, 24 h), 0.038 g/L (1/27 LC_{50}, 24 h), 0.025 g/L (2/81 LC_{50}, 24 h), and 0.017 g/L (4/243 LC_{50}, 24 h), respectively. The results showed that the hatching rate of all the developmental stages was affected by Sudan Red Ⅲ. The hatching rate of the lowest concentration group (0.017 g/L) had no significant difference compared with the control group while mid-gastrula and neurula were most sensitive to Sudan Red Ⅲ. The hatching rate began to show the differences from the control group in 0.025 g/L. For the tail bud stage, the hatching rate showed differences in 0.038 g/L group. Sudan Red Ⅲ had significant teratogenic effects to loach embryos, and the major teratogenic symptoms include abnormal posture, such as curved body, arched or curved tail, embryoid bodies turbidity or disintegration. Sudan Red Ⅲ had most obvious teratogenic effect to the tail bud stage embryos, and deformity rates had significant differences

收稿日期:2012-05-22
基金项目:国家自然科学基金项目(30771666)
作者简介:王　君(1980-),女,河南郑州人,在读硕士研究生,研究方向:动物遗传学。E-mail:597752649@qq.com
*通讯作者:常重杰(1965-),男,河南禹州人,教授,博士,主要从事动物遗传学研究。E-mail:changzhongjie@tom.com

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

with the control group in the lowest dose group (0.017 g/L). In embryonic bulge stage, deformity rates showed differences with the control group in 0.038 g/L concentration group. In mid-gastrula and neurula stages, each concentration group had a very significant difference, except for the lowest dose group (0.017 g/L). Half effective teratogenic concentration(EC_{50}) of four different treatment periods were 0.056, 0.044, 0.039 g/L, and 0.049 g/L, respectively. This study shows that Sudan Red Ⅲ has significant inhibition, teratogenic and lethal effects to loach embryo development, providing a basis for the rational use of Sudan Red Ⅲ.

Key words: Sudan Red Ⅲ; *Misgurnus anguillicandatus*; embryonic development; toxicity

苏丹红是一种人工合成的红色染料，常作为一种工业染料起增色作用，但加在食品中被食用后，产生的代谢产物为致癌物[1-2]。苏丹红系列化合物主要包括苏丹红Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ 4种，其中苏丹红Ⅱ、Ⅲ、Ⅳ为苏丹红Ⅰ的化学衍生物。苏丹红Ⅲ为双偶氮染料，被列为三类致癌物质，其初级代谢产物4-氨基偶氮苯被列为二类致癌物，即可能对人类产生负面影响[3]。但是，由于对其危害的研究资料并不十分完整，部分国家仍然准许在一些诸如辣椒酱等食品中合法添加，以增加其商品属性，从而引起较大的争议[4]。

研究资料表明，鱼类的胚胎是其整个生活史中对各种药物最为敏感的时期，因此，可以利用鱼类胚胎的敏感性来评价多种化合物及各种环境的毒性影响[5-7]。已经有不少用水生生物胚胎（如斑马鱼、金鱼、草鱼、鲤鱼、黑鲷、鲩状黄姑鱼）为试验材料进行毒性试验的报道[8-9]，可见，选用水生生物胚胎为试验材料进行毒性试验研究具有很大的可靠性。泥鳅属鲤形目，鳅科，具有取材容易、对环境适应力强、耐受性强等优点，是毒理学试验的理想材料。本研究以泥鳅为试验材料，初步探讨苏丹红Ⅲ对其胚胎的毒性影响，以期为研究苏丹红Ⅲ的毒理作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料

成体泥鳅（体质量15～20 g，体长8～13 cm），购于河南新乡市鸿达农贸市场。试验前驯养1周，每天更换1次暴晒24 h的水，选取大小相近、健康活泼的个体备用。苏丹红Ⅲ由上海试剂三厂生产。绒毛膜促性素（HCG）为市购所得。

1.2 试验方法

受精卵的制备：在生殖季节，选取性成熟雌雄大鳞副泥鳅。雌雄泥鳅的选择见文献[10－11]中的方法。选择卵巢轮廓明显、外观呈纺锤形的雌性大鳞副泥鳅10尾，背部肌肉注射鱼用HCG 800 IU/尾；雄性泥鳅5尾，注射剂量减半。10～14 h后，轻压雌鳅腹部，立即将卵收集于不同的培养皿中，干法受精[12]。

参照成体急性毒性的试验结果（本实验室未发表资料），使用暴晒24 h的自来水，分别配制0.085 g/L（1/12 LC_{50}，24 h）、0.057 g/L（1/18 LC_{50}，24 h）、0.038 g/L（1/27 LC_{50}，24 h）、0.025 g/L（2/81 LC_{50}，24 h）、0.017 g/L（4/243 LC_{50}，24 h）等5个质量浓度梯度的苏丹红Ⅲ溶液，作为处理组。使用暴晒24 h的自来水作为对照组，对照组中不添加苏丹红Ⅲ；每组均设3个平行样。分别于胚胎发育的胚胎隆起期、原肠胚中期、神经胚期、尾芽期[13-14]投入不同质量浓度的苏丹红Ⅲ溶液100 mL，发育正常卵100枚，直至孵出仔鱼，试验容器采用直径12 cm的培养皿，每日更换1次溶液，及时剔除死亡个体。利用解剖显微镜连续观察受精卵发育状况并及时拍照、记录，计算出胚胎各个时期的半数有效致畸浓度（EC_{50}）。

1.3 数据统计分析

所有数据均采用SPSS 16.0软件进行单因素方差分析（One-Way ANOVA），用最小显著差数法（LSD）进行多重比较，同时利用Excel 2003进行分析作图，数据结果用平均数±标准差表示。显著性差异以 P 值表示，$P<0.05$（*）表示差异显著；$P<0.01$（**）表示差异极显著。

采用改进寇氏法（Karber）[15-17]，计算苏丹红Ⅲ对胚胎致畸的 EC_{50}。计算公式如下：

$$\lg EC_{50}=Xm-i(\Sigma p-0.5)$$

。式中：i 为相邻两组的质量浓度对数差值，Σp 为各组死亡率总和，Xm 为最大质量浓度的对数值。

2 结果与分析

2.1 苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎孵化率的影响

苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎孵化率的影响结果如表1所示。与对照组相比，在最高质量浓度组（0.085 g/L），各发育时期的孵化率均受到苏丹红Ⅲ的显著影响；最低质量浓度组（0.017 g/L）的孵化率与对照组相比无明显差异。然而，各发育时期对苏丹红Ⅲ的敏感程度有较明显差异，例如，胚胎隆起期，对苏丹红Ⅲ有较高的耐受性，只有最高质量浓度组与对

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

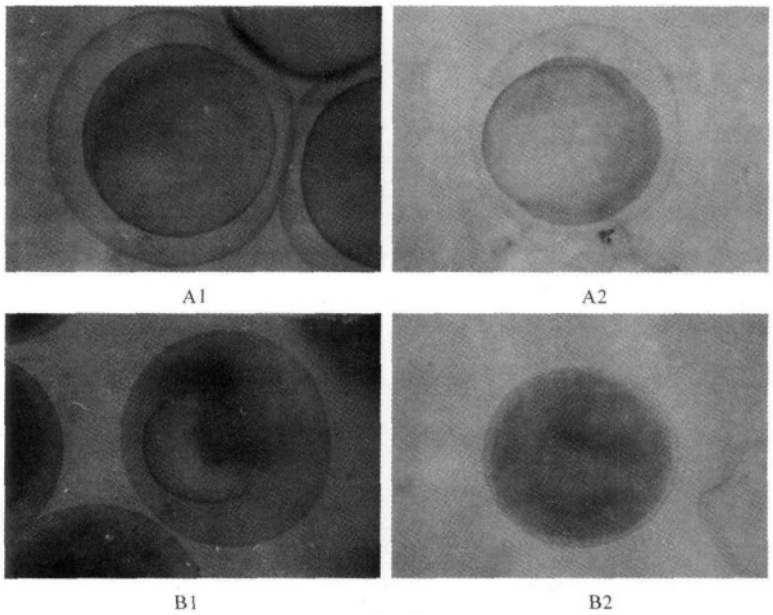
照组相比表现出明显差异;尾芽期时,在中质量浓度组即 0.038 g/L 时即开始表现出差异;原肠胚中期和神经胚期对苏丹红Ⅲ最为敏感,在次低质量浓度组(0.025 g/L)时即开始表现出差异。

表 1　不同处理下泥鳅各发育时期胚胎孵化率　%

苏丹红Ⅲ溶液质量浓度/(g/L)	开始处理时间			
	胚胎隆起期	原肠胚中期	神经胚期	尾芽期
0(CK)	96.0±2.83	94.5±3.54	96.5±2.12	94.0±2.83
0.017	95.0±1.42	92.5±3.54	93.5±3.54	91.5±3.54
0.025	92.0±2.83	87.0±1.41*	82.0±1.41**	88.0±2.83
0.038	91.5±2.12	86.0±2.83*	80.5±2.12**	81.0±4.24*
0.057	91.5±0.71	85.5±2.12*	79.0±1.41**	78.5±4.95**
0.085	88.0±2.83*	82.5±3.54**	73.0±2.83**	73.5±2.12**

2.2　苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎畸形率的影响

苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎具有明显的致畸作用,其胚胎的主要致畸症状表现有:体态异常,如弯体、弓背或弯尾等;胚体浑浊或自行解体等(图 1)。统计数据见表 2。与对照组相比,苏丹红Ⅲ对尾芽期胚胎的致畸作用最为强烈,即便是在最低质量浓度组(0.017 g/L),也与对照组具有极显著的差异;胚胎隆起期,对苏丹红Ⅲ稍有耐受性,在中质量浓度组时,开始与对照组产生显著差异;原肠胚中期和神经胚期,只有最低质量浓度组(0.017 g/L)与对照组无显著差异,其余组别与对照组均有极显著差异。4 个不同处理时期的 EC_{50} 分别为 0.056、0.044、0.039、0.049 g/L。



A1、A2 为正常胚胎,B1、B2 为畸形胚胎

图 1　苏丹红Ⅲ对泥鳅胚发育的影响

表 2　不同处理下泥鳅各发育时期胚胎畸形率　%

苏丹红Ⅲ溶液质量浓度/(g/L)	开始处理时间			
	胚胎隆起期	原肠胚中期	神经胚期	尾芽期
0(CK)	1.0±1.41	2.0±1.41	3.0±1.41	2.0±1.41
0.017	3.0±1.41	5.5±2.12	7.5±0.71	16.0±2.83**
0.025	11.5±6.36	25.0±5.66**	34.5±7.78**	27.0±2.83**
0.038	24.5±6.36**	46.0±5.66**	56.0±1.41**	37.0±4.24**
0.057	47.0±5.66**	58.5±6.37**	66.5±4.95**	46.0±2.83**
0.085	66.5±4.95**	75.0±5.66**	75.0±1.41**	60.0±2.83**

3　讨论

用不同质量浓度的苏丹红Ⅲ分别在泥鳅胚胎的不同发育时期进行处理,通过比较胚胎的孵化率和畸形率可以评估苏丹红Ⅲ对胚胎发育的影响。在泥鳅胚胎孵化率研究中发现,胚胎隆起期对苏丹红Ⅲ

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

的耐受性最高，除最高质量浓度组外，孵化率没有显著变化，这一时期胚胎的畸形率相对其他时期来说，也有一定程度的耐受性。这一现象可能与卵膜的保护作用有关，胚胎周围卵膜有选择透过性及对毒物的天然屏障作用。原肠胚期和神经胚期，胚胎进行着旺盛的细胞分裂，此时胚胎已经具备三胚层，奠定主要系统的基础，因此，此时胚胎容易受到外界生化物质的影响，孵化率明显降低。在泥鳅胚胎畸形率研究中发现，各处理时期对泥鳅胚胎均有致畸作用，尤其在原肠胚中期和神经胚期畸形率达到 75%左右(0.085 g/L 苏丹红Ⅲ处理)。原因可能是这 2 个相距较近的时期，恰好处在胚胎高度分化时期，当高度分化的胚胎某部分发生异常变化后，会导致将来发育个体的某些组织或器官异常，形成畸形个体[9]。尾芽期，尽管其畸形率并不是最高的，但却是对苏丹红Ⅲ最为敏感的时期，在最低质量浓度组即表现出与对照的显著差异，究其原因，此时是许多器官原基形成的时期，例如体节和神经管等，因此易受外界物质的影响。

胚胎是反映环境中有害因素影响的敏感生物标志物之一，开展胚胎毒性研究对环境保护、物种质量和数量的保证具有重要意义[18]。近年来，对胚胎毒性研究的报道日益增多，充分显示这种方法的灵敏性和可靠性[19]；而有毒物质对胚胎毒性的作用机制错综复杂，有关这方面的研究虽已进行了几十年，并且还在逐步深入，但还没有一个完整、系统的理论体系[18,20]。苏丹红Ⅲ对泥鳅胚胎的毒性机制以及胚体内的代谢变化等也有待进一步探讨。

参考文献：

[1] 刘彩云，唐守嵘，邵建宁，等. 液相色谱-质谱法测定辣椒中的苏丹红Ⅰ[J]. 中国酿造，2009(10)：144-146.

[2] 任乃林，李红. 线性扫描极谱法测定辣椒粉中的苏丹红Ⅳ[J]. 食品与机械，2010，26(1)：70-73.

[3] 肖洋，李祝. 高效液相色谱法测定辣椒制品中苏丹红Ⅰ染料的不确定度分析[J]. 食品工程，2009(2)：54-56.

[4] 何荣，廖林川，颜有仪，等. 血液中苏丹红染料的高效液相色谱分析[J]. 分析测试学报，2008，27(7)：751-754.

[5] Mckim J M. Evaluation of tests with early life stage of fish for predicting long-term toxicity[J]. J Fish Res Board Can，1977，34(8)：1148-1154.

[6] 贾秀英. 镉对泥鳅幼鱼的急性和亚急性毒性研究[J]. 环境污染与防治，2001，23(5)：227-228.

[7] McKim J M，Eaton J G，Holcombe G W M，*et al*. Toxicity to embryos and larvae of eight species of freshwater fish-Ⅱ：Copper[J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology，1978：19(1)：608-616.

[8] 熊力，马永鹏，毛思予，等. 五氯酚对稀有鮈鲴胚胎毒性效应研究[J]. 中国环境科学，2012，32(2)：337-344.

[9] 柳学周，徐永江，兰功刚. 几种重金属离子对半滑舌鳎胚胎发育和仔稚鱼的毒性效应[J]. 海洋水产研究，2006，27(2)：33-42.

[10] 黄山君，孙微涛，郑松勇. 泥鳅全人工繁殖技术及胚胎发育研究[J]. 淡水渔业，1994，24(1)：33-36.

[11] 翟洪民. 泥鳅雌雄亲鱼的选择[J]. 渔业致富指南，2005(2)：32.

[12] 杜启艳，南平，燕帅国，等. 豫北地区大鳞副泥鳅胚胎发育的观察[J]. 河南师范大学学报：自然科学版，2007，35(2)：146-149.

[13] 张明宇. 泥鳅的胚胎发育与生长[J]. 生物学通报，1999，34(3)：20-22.

[14] Kimmel C B，Ballard W W，Kimmel S R，*et al*. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. Developmental Dynamics，1995，203(3)：253-310.

[15] 惠秀娟. 环境毒理学[M]. 北京：化学工业出版社，2003.

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

[17] Li Y，Wang W M. Toxicity and teratogenic effects of busulfan in early developing embryo and larva of *Zebrafish*(Danio Rerio)[J]. Ecological Science，2008，27(5)：368-375.

[18] 靳洪涛，李万芳. TCDD 对斑马鱼胚胎发育毒性机制的研究进展[J]. 癌变·畸变·突变，2008，20(6)：500-502.

[19] 林建清，王新红，钟建兴，等. 利用鱼卵胚胎发育毒性试验评价城市废水的处理效果[J]. 台湾海峡，2008，27(3)：329-333.

[20] 杨奇，王建华. 胚胎毒性研究进展[J]. 动物医学进展，2001，22(2)：29-31.

?1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net