

苯胺对黑斑蛙蝌蚪外周血红细胞的遗传毒性效应

边高鹏^{①②} 焦海华^① 明洁^③

① 长治学院生物科学与技术系 长治 046011; ② 太行山生态与环境研究所 长治 046011;

③ 西北农林科技大学林学院 杨凌 712100

摘要: 为从不同遗传终点检测苯胺对黑斑蛙 (*Rana nigromaculata*) 蝌蚪红细胞的遗传毒性, 将黑斑蛙蝌蚪暴露于 0、3.45、17.26、34.53、69.06 $\mu\text{g/L}$ 不同浓度的苯胺 96 h 后, 显微镜下观察红细胞形态和数目的变化, 采用微核试验测定红细胞微核率, 通过彗星试验测定彗星尾长和尾距的变化。从 17.26 $\mu\text{g/L}$ 浓度组开始出现红细胞变形拉长和细胞膜破裂, 且随着苯胺浓度的增加而增多。另外, 各浓度组蝌蚪红细胞数目随着苯胺溶液浓度的增加而逐渐减少, 且与空白对照相比差异显著 ($P < 0.01$)。微核试验结果显示, 各浓度处理组微核率均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 但由于苯胺所致的红细胞破裂和 Heinz 小体的影响, 微核率和浓度之间并未出现明显的浓度-效应关系。彗星试验结果显示, 不同浓度苯胺处理组与空白对照组相比, 蝌蚪红细胞尾长和尾距均显著增加 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$), 并与处理浓度之间存在显著的浓度-效应关系。上述结果表明, 苯胺可诱发黑斑蛙蝌蚪红细胞的染色体、DNA 损伤, 具有较强的遗传毒性效应; 苯胺最高浓度处理组 69.06 $\mu\text{g/L}$ 蝌蚪红细胞 DNA 损伤水平与 5 mg/L 环磷酰胺相近, 显现明显的 DNA 损伤, 因此建议渔业水质标准对水体中苯胺限量的规定不应高于此值。

关键词: 苯胺; 微核试验; 彗星试验; 黑斑蛙蝌蚪; 遗传毒性

中图分类号: Q494 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2015) 06-886-09

Genotoxic Effects of Aniline on Peripheral Blood Erythrocytes in Black-spotted Pond Frog (*Rana nigromaculata*) Tadpoles

BIAN Gao-Peng^{①②} JIAO Hai-Hua^① MING Jie^③

① Department of Biological Sciences and Technology, Changzhi College, Changzhi 046011; ② Ecological and Environmental Research Institute of Taihang Mountain, Changzhi 046011; ③ College of Forestry, Northwest Agriculture and Forest University, Yangling 712100, China

Abstract: To explore the genotoxicity of aniline on the erythrocytes of black-spotted pond frog (*Rana nigromaculata*) tadpoles, black-spotted pond frog tadpoles were exposed to different concentrations of 0, 3.45,

基金项目 中国科学院环境生物技术重点实验室开放研究基金项目 (No. EBT2013A001), 长治学院科研项目 (No. 2010112);

第一作者介绍 边高鹏, 男, 硕士; 研究方向: 动物毒理学; E-mail: biangaopeng@163.com。

收稿日期: 2015-01-27, 修回日期: 2015-07-09 DOI: 10.13859/j.cjz.201506008

17.26, 34.53 and 69.06 $\mu\text{g/L}$ aniline respectively for 96 h; in the meantime some tadpoles were exposed to 5 mg/L cyclophosphamide as a positive control. The blood samples were collected from each tadpole by the docking method. The changes of the erythrocytes in morphology and number were observed by optical microscopy, the micronuclei frequency of the erythrocytes was assessed by micronucleus test (MNT), the tail length and the tail moment of the erythrocytes were measured by comet assay (CA). The morphological observation showed that the erythrocytes began to be deformed and lengthened, the erythrocyte membrane began to be broken (Fig. 1) in 17.26 $\mu\text{g/L}$ group, with the increase in a aniline-dose-dependent manner. Erythrocyte number analysis showed that in all treatment groups the erythrocyte numbers were decreased gradually with the increase of the concentration of aniline, and there was significant difference compared with the blank control group ($P < 0.01$) (Table 1). The results of MNT showed that the micronuclear frequency in all treatment groups were significantly higher than that of the blank control group ($P < 0.05$) (Fig. 1, Table 2), but as a result of the influence of cell rupture and Heinz corpuscle resulted from aniline, there was no obvious concentration-effect relation between the micronuclear frequency and the aniline concentration. The results of CA showed that both the tail length and the tail moment in all treatment groups were significantly increased compared with the blank control group ($P < 0.05$, $P < 0.01$) (Fig. 2, Table 3); moreover, there was obvious concentration-effect relation among different treatment concentrations. The results aforementioned suggest that aniline may induce chromosome and DNA damage in the erythrocytes of black-spotted pond frog tadpole, indicating a strong genotoxic effect. Furthermore, the level of DNA damage at the highest concentration (69.06 $\mu\text{g/L}$) of aniline was similar to that of 5 mg/L cyclophosphamide (the positive control), therefore it is recommended that the upper limit of aniline content in water body set by the water quality standard for fisheries should not be higher than this value.

Key words: Aniline; Micronucleus test; Comet test; *Rana nigromaculata* tadpoles; Genotoxicity

苯胺 (Aniline) 俗称阿尼林油, 是一种有毒的芳香胺, 有强烈气味, 化学式为 $\text{C}_6\text{H}_7\text{N}$ 。纯品为无色油状液体, 稍溶于水, 易溶于有机溶剂, 为生产香料、塑料、医药、服装、聚氨酯材料及橡胶助剂的一种重要有机化工原料。2013年我国的苯胺年产量已达到270万吨(姜盛红等 2013), 在生产中大量含有苯胺和苯胺化合物的废水未加处理就排放到环境中, 通过地表径流、淋溶、干湿沉降等方式进入地表水体, 从而对水生生态环境造成潜在的污染威胁。

苯胺可以引发对水生生物的毒性效应, 如导致罗非鱼 (*Oreochromis mossambicus*) 消化功能障碍, 觅食行为受到干扰 (Bhunja et al. 2003); 锯缘青蟹 (*Scylla serrata*) 螯肢乱剪, 口吐黏液, 最后死亡 (许章程等 2000)。对水生藻类不仅抑制其生长, 而且会破坏细胞的形

态和结构, 表现为细胞颜色变淡, 色素体模糊等 (陈传平等 2007, 孙茜等 2009)。鉴于苯胺已经成为水体中常见的难以降解的有害污染物, 国家环保局将其列为水体中优先控制污染物黑名单, 在我国的地表水环境质量标准 (GB3838-2002) 规定中限量为100 $\mu\text{g/L}$, 但与水产养殖业密切相关的渔业标准却没有规定。

苯胺的遗传毒理学研究在水生生物领域相对匮乏, 只有苯胺诱导大型溞 (*Daphnia magna*) 胚胎发育 (Abe et al. 2001) 及虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 卵子致突变和致畸作用的毒性报道 (Abram et al. 1982), 对两栖类遗传毒理学方面的研究更是相对空白。微核试验以染色体损伤为测试终点, 因其简便易行, 在检测水体环境污染因子的致突变效应中得到广泛应用 (Hyaes 2003, 苑宇哲等 2005); 而

彗星试验作为检测DNA损伤的方法,同样有着快速、灵敏、设备简单,试剂花费少等优点,目前已成为研究污染物遗传毒性的基本方法之一(刘宛等 2005)。黑斑蛙(*Rana nigromaculata*)是我国分布最广的两栖动物之一(费梁 1999),作为本土两栖类模式生物,在化学品急性毒性研究中已得到广泛应用(苏红巧等 2013)。本研究以黑斑蛙蝌蚪外周血红细胞为研究对象,采用微核及彗星试验两种不同的测试方法,从细胞和分子水平综合分析苯胺的遗传毒性,以期揭示其毒性机理,同时也为建立相应的水产渔业标准提供依据。

1 材料与方 法

1.1 实验动物

黑斑蛙受精卵采集于山西省晋城市沁水县柿庄镇沁河上游水流清澈、周围无任何污染源的河流中,带回实验室水族箱中孵化。待蝌蚪发育至变态期 Gosner (1960) 31 期(后肢发育旺盛期)左右时,挑选长度(2.80 ± 0.22) cm、体重(0.35 ± 0.05) g ($n = 100$) 的蝌蚪进行水体暴露实验,整个实验过程用水均为曝气 72 h 以上的自来水。

1.2 方 法

1.2.1 动物染毒方法 依据国家环保局(2002)所规定的急性生物毒性测定方法,采用静态水质接触染毒法对黑斑蛙蝌蚪染毒,测得苯胺溶液 96 h 半致死浓度(LC₅₀)为 345.29 μg/L。将 31 期蝌蚪分为 6 组,分别放入 1/100、1/20、1/10、1/5 LC₅₀ 的苯胺溶液,即浓度为 3.45、17.26、34.53、69.06 μg/L 的 4 种浓度苯胺溶液中染毒 96 h,每组设置两个平行处理,同时设空白对照和 5 mg/L 环磷酸胺阳性对照(Campana et al. 2003)。苯胺溶液有一定的挥发性,因此在蝌蚪染毒过程中为保持苯胺溶液浓度的一致,现配现用,每隔 24 h 更换一次新的溶液,每次更换后的溶液用高铁酸钾氧化处理后再作废液处理。

1.2.2 红细胞计数方法 用蒸馏水清洗蝌蚪并

用滤纸吸干体表的水分,然后断尾,用毛细吸管准确吸取 1 μl 血液,同时观察血液的颜色。仔细擦净沾染在管外的血液,将毛细吸管插入盛有 9 μl 红细胞稀释液的离心管底部,轻轻吹出其中的血液,摇振 1 ~ 2 min,充分混匀稀释的血液,血球计数板进行计数。

1.2.3 微核试验 按边高鹏等(2014)的微核试验方法制得蝌蚪红细胞悬液,用吸管充分吹打,然后分成两份,一份取 25 μl 细胞悬液滴在载玻片一端,推片法制成血涂片,风干后甲醇固定 15 min,染色方法采用 0.02% 吖啶橙染色 15 min (Ossana et al. 2013),ImageA2 荧光显微镜(德国蔡司公司)观察;另一份用于彗星试验的测定。每个浓度组观察 10 只蝌蚪,每只蝌蚪观察 1 000 个细胞左右,微核呈橘红色,形状呈较规整圆形或椭圆形,边缘光滑,其折光性和染色特性与主核较为相似,在观察时如有多个微核的细胞统一记为一个微核细胞。微核率按照如下公式计算:微核率 = (微核细胞数/观察细胞总数) × 1 000%。

1.2.4 彗星试验 参照薛良义等(2006)的彗星试验方法,并结合本实验室条件加以改进。在洁净的普通载玻片上涂抹一层均匀的常熔点琼脂糖,即第一层胶。分别取微核试验中所制的细胞悬液 25 μl 和低熔点琼脂糖 75 μl,混匀后立即取 10 μl 混合液滴加于载玻片一侧,均匀推片,为使细胞得到有效的保护和防止脱胶,待第二层胶凝固后,在其上再加第三层胶。4℃ 裂解 1 h 后,碱性电泳缓冲液(pH 13.0)解旋 30 min,在 23 V、300 mA 的条件下,DYY-6C 型电泳仪(北京六一仪器厂)电泳 25 min。经中和后用溴化乙锭(ethidium bromide, EB)染色 1 ~ 2 min,用蒸馏水洗去多余的染液后滤纸吸干,在 ImageA2 荧光显微镜下观察并用蔡司显微数码成像系统进行图像采集。每组观察蝌蚪 10 只,每个个体至少观察 100 个细胞。最后用 CASP 软件分析测量 DNA 迁移的两项参数。尾长(TL)定义为沿电泳方向“彗星”尾部最远端与头部中心的距离;尾矩(TM)定义为尾部

DNA 占总 DNA 百分比与尾长的乘积。

1.3 数据处理

实验所得数据均采用平均值 \pm 标准误表示, 利用 SPSS17.0 软件进行数据处理和分析, 各染毒浓度组与对照组数据的比较采用单因素方差分析方法, 各浓度组之间的多重比较采用 Duncan's 法。

2 结果与分析

2.1 不同浓度苯胺对蝌蚪血液和红细胞数目的影响

黑斑蛙蝌蚪正常血液颜色鲜红, 而经不同浓度苯胺染毒后, 观察到蝌蚪血液颜色随染毒浓度的增加逐渐变暗, 在浓度最高的 69.06 $\mu\text{g/L}$ 处理组, 蝌蚪血液几乎完全呈现灰褐色。此外在显微镜下观察到, 从 17.26 $\mu\text{g/L}$ 浓度组开始出现部分红细胞变形拉长, 细胞核偏移到一侧 (图 1a), 部分细胞膜破裂, 内容物释放 (图

1b), 随着苯胺浓度的增加, 变形和破裂的细胞逐渐增多。另外, 各浓度组蝌蚪红细胞数目随着苯胺溶液浓度的增加而逐渐减少, 且与空白对照相比差异显著 ($P < 0.01$); 通过对各浓度组红细胞数目的多重比较显示, 除 3.45 与 17.26 $\mu\text{g/L}$ 浓度组外, 其余各组间差异显著 ($P > 0.01$) (表 1)。

2.2 不同浓度苯胺对蝌蚪红细胞微核率的影响

荧光显微镜下观察正常成熟红细胞核一般为椭圆形, 呈现橘红色, 细胞质呈现浅绿色 (图 1c)。苯胺处理各浓度组红细胞的细胞质中均出现与主细胞核完全脱离的微核, 不仅有大小为主核 1/10 左右的小型微核 (图 1d), 还有大小为主核 1/3 左右的大型微核 (图 1e)。不同浓度的苯胺溶液处理 96 h 后, 各浓度处理组微核率均显著高于空白对照组 ($P < 0.05$), 3.45、17.26、34.53 $\mu\text{g/L}$ 3 个浓度组的微核率随着苯胺溶液

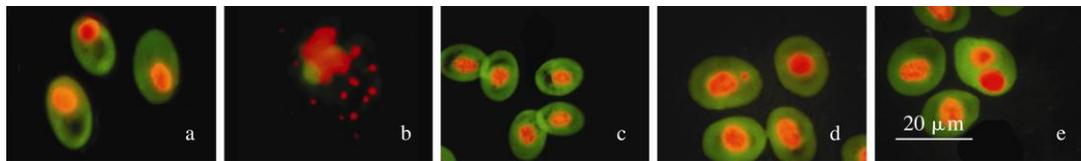


图 1 黑斑蛙蝌蚪红细胞微核和变形红细胞

Fig. 1 Photomicrographs with micronuclei and deform erythrocytes in the black-spotted pond frog tadpoles

a. 变形红细胞; b. 破碎红细胞; c. 正常; d. 小微核; e. 大微核。

a. Deform erythrocytes; b. Shattered erythrocytes; c. Normal cells; d. Small micronuclei; e. Big micronuclei.

表 1 不同浓度的苯胺对蝌蚪红细胞数目的影响

Table 1 Effect of different concentrations of aniline on the number of erythrocytes in the black-spotted pond frog tadpoles

苯胺浓度 Aniline concentration ($\mu\text{g/L}$)	红细胞数目 Total number of cells ($\times 10^{10}$ cells/L)
0	$9.42 \pm 1.14^{\text{aA}}$
3.45	$8.06 \pm 1.01^{\text{bB}}$
17.26	$6.94 \pm 1.29^{\text{cB}}$
34.53	$4.98 \pm 0.84^{\text{dC}}$
69.06	$3.25 \pm 0.90^{\text{eD}}$

同列数据上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 上标不同大写表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letter (upper labeled) in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$), and different capital letter indicated extremely significant differences ($P < 0.01$).

浓度的增加而升高,但在浓度最高的69.06 $\mu\text{g/L}$ 处理组微核率反而下降。对各浓度处理组微核率多重比较分析,各组间差异并不显著 ($P > 0.05$),表明苯胺染毒浓度与微核率并不存在明显的浓度-效应关系(表2)。

2.3 不同浓度苯胺对蝌蚪红细胞的DNA损伤

在荧光显微镜下,黑斑蛙蝌蚪正常红细胞细胞核,在电泳时细胞核DNA因其分子量大停留在细胞核基质中,未见有明显的拖尾现象(图2a);不同浓度苯胺染毒的蝌蚪红细胞,形成明显的拖尾(图2b~e)。3.45 $\mu\text{g/L}$ 苯胺浓度处理组黑斑蛙蝌蚪红细胞的尾长和尾距与空白对照组相比差异显著 ($P < 0.05$),17.26、34.53、69.06 $\mu\text{g/L}$ 3个苯胺染毒浓度组及环磷酰胺阳性对照组黑斑蛙蝌蚪红细胞尾长、尾距与空白对照组相比差异均极显著 ($P < 0.01$)(表3);同时随着苯胺浓度的升高,黑斑蛙蝌蚪细胞的尾长、尾距均逐渐增加,苯胺染毒浓度与尾长呈较明显的线性相关 ($R^2 = 0.855$, $P < 0.05$),与尾距呈二次曲线相关 ($R^2 = 0.954$, $P < 0.05$),表明苯胺染毒浓度与尾长、尾距有较明确浓度-效应关系。此外,各浓度组之间的多重比较分析显示(表3):17.26 $\mu\text{g/L}$ 与34.53 $\mu\text{g/L}$ 两个浓度组尾长和尾距的差异并不显著 ($P > 0.05$),

而其余各组间尾长和尾距差异显著 ($P < 0.01$)。

3 讨论

两栖动物蝌蚪皮肤较薄,具有较强的渗透能力,且在变态前有外鳃暴露于水环境中,对环境污染物较为敏感,因此常被作为环境生物监测的指示物种。且处于31期发育期的蝌蚪,为蝌蚪后肢发育旺盛期,细胞分裂旺盛,环境诱变物引起的遗传毒性可以较快地体现(王懿等 2011)。

3.1 苯胺溶液对蝌蚪血液及红细胞数目的影响

黑斑蛙蝌蚪正常血液呈现的红色是由红细胞中的血红蛋白所决定的。当血液中的血红蛋白被苯胺氧化为高铁血红蛋白,就会呈现红褐色;且随苯胺染毒浓度的增加,由于红细胞中高铁血红蛋白累积增多,血液的颜色逐渐变暗,至最高浓度组则完全呈现灰褐色。

苯胺还可致人体及哺乳动物血液红细胞的变形能力下降,在脾巨噬细胞的作用下破裂,发生溶血性贫血(闫永建等 2014)。本研究也发现,随着苯胺浓度的增加,蝌蚪血液中发生变形和破裂的红细胞数目增多,可能由于苯胺引起红细胞血红蛋白分子中的巯基发生变性,

表2 不同浓度的苯胺对黑斑蛙蝌蚪红细胞微核率的影响

Table 2 Effect of different concentrations of aniline on micronucleus rate in erythrocytes of the black-spotted pond frog tadpoles

苯胺浓度 Aniline concentration ($\mu\text{g/L}$)	观察细胞总数 Total number of cells	微核数 Micronucleus number	微核率 Micronucleus frequency (%)
0	9 492	19	2.09 \pm 0.29 ^{ab}
3.45	9 676	39	4.07 \pm 0.25 ^{ab}
17.26	11 482	51	4.64 \pm 0.55 ^{ab}
34.53	10 875	53	4.98 \pm 0.30 ^{ab}
69.06	9 912	41	4.13 \pm 0.20 ^{ab}
环磷酰胺 (5 mg/L) Cyclophosphamide	11 464	121	10.56 \pm 0.31 ^{aA}

同列数据上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 上标不同大写表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letter (upper labeled) in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$), and different capital letter indicated extremely significant differences ($P < 0.01$).

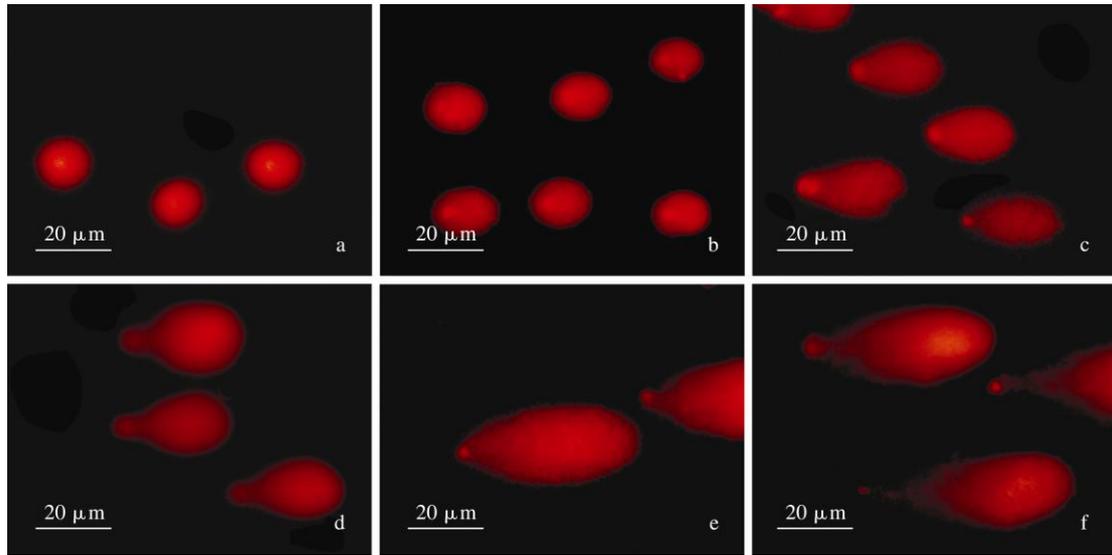


图 2 不同浓度苯胺处理后黑斑蛙蝌蚪红细胞彗星电泳图像

Fig. 2 Fluorescence photographs of comet electrophoresis in erythrocytes of the black-spotted pond frog tadpoles treated with different concentrations of aniline

a. 正常细胞; b. 3.45 µg/L; c. 17.26 µg/L; d. 34.53 µg/L; e. 69.06 µg/L; f. 环磷酰胺。
a. Normal cells; b. 3.45 µg/L; c. 17.26 µg/L; d. 34.53 µg/L; e. 69.06 µg/L; f. Cyclophosphamide.

表 3 不同浓度苯胺对黑斑蛙蝌蚪红细胞尾长和尾矩的影响

Table 3 Effect of different concentrations of aniline on the comet tail length and tail moment in erythrocytes of the black-spotted pond frog tadpoles

苯胺浓度 Aniline concentration (µg/L)	细胞总数 Total number of cells	尾长 Tail length (µm)	尾矩 Tail moment (µm)
0	1 010	12.13 ± 0.36 ^{eD}	5.17 ± 0.57 ^{eD}
3.45	1 320	39.86 ± 6.73 ^{dD}	20.74 ± 3.56 ^{dD}
17.26	1 163	76.44 ± 12.92 ^{cC}	52.07 ± 12.18 ^{cC}
34.53	1 461	83.98 ± 13.24 ^{cC}	59.89 ± 4.88 ^{cC}
69.06	1 089	116.68 ± 17.02 ^{bB}	89.63 ± 15.15 ^{bB}
环磷酰胺 (5 mg/L) Cyclophosphamide	1 157	138.94 ± 31.93 ^{aA}	96.38 ± 29.81 ^{aA}

同列数据上标不同小写字母表示差异显著 ($P < 0.05$), 上标不同大写表示差异极显著 ($P < 0.01$)。

Different lowercase letter (upper labeled) in the same column indicated significant differences ($P < 0.05$), and different capital letter indicated extremely significant differences ($P < 0.01$).

形成沉积于细胞膜上的赫恩滋小体 (Heinz), 这些小体使得细胞膜脆性增大, 细胞变形能力降低而发生破裂 (徐新波等 2000)。也可能由于苯胺所诱导产生的自由基 (屈景凯等 2012), 使膜蛋白分子交联并裂解为碎片, 膜受损而发生破裂 (陈文鹤等 2001)。

3.2 苯胺溶液对蝌蚪红细胞微核率的影响

微核的形成是由于细胞受到外界致突变物质对染色体和纺锤体的遗传毒性损伤。Bomhard (2003) 采用 0、300、400、500 mg/kg 苯胺盐酸盐单次灌胃 PVG 大鼠 (*Rattus norvegicus*) 24 h 后, 各剂量组骨髓嗜多染红细

胞微核率显著高于对照组，并随染毒剂量的增加而增加；而在灌胃48 h后，微核率与对照组相比虽增加，但差异不显著，未呈现剂量效应。Witt等（2000）报道以500、1 000和2 000 ppm苯胺盐酸对B6C3F1小鼠（*Mus musculus*）慢性染毒90 d后，各处理组小鼠外周血微核率相比对照组，虽增加但并不显著，且无明确的剂量效应关系。本研究以3.45、17.26、34.53、69.06 $\mu\text{g/L}$ 的苯胺染毒96 h后，也发现各浓度处理组微核率均显著高于空白对照组，且并未出现明显的浓度-效应关系。推测可能有两方面原因：其一，随着苯胺浓度的增加，红细胞的破裂增多，意味着已经产生微核的红细胞也随之大量破裂，因此微核率未随苯胺浓度的增加而显著地升高，在浓度最高的69.06 $\mu\text{g/L}$ 处理组微核率反而出现降低；其二，苯胺诱导形成的Heinz小体，不仅会导致细胞变形能力下降，还可能会延缓或抑制细胞有丝分裂，导致微核率降低。

3.3 苯胺溶液对蝌蚪红细胞DNA损伤的影响

DNA链断裂的损伤是一种较为严重的遗传损伤，通常难以彻底修复。Sekihashi等（2002）和Sasaki等（1999）分别采用100和1 000 mg/kg苯胺对DDY小鼠灌胃后，引起小鼠各个内脏器官的显著的DNA损伤。本研究结果也表明，3.45、17.26、34.53、69.06 $\mu\text{g/L}$ 4个苯胺染毒浓度组均能引起黑斑蛙蝌蚪DNA显著的断裂损伤，且呈较明显浓度-效应关系，显现出明显的遗传毒性效应。彗星试验结果未受红细胞破裂和Heinz对细胞分裂抑制作用的显著影响，推测可能由于彗星试验检测适时DNA损伤，无需等到有丝分裂之后观测，只要细胞没有破裂就可以检测得到（封少龙等 2004）。在17.26 $\mu\text{g/L}$ 和34.53 $\mu\text{g/L}$ 两个浓度组蝌蚪红细胞的尾长和尾矩的差异不显著，推测在苯胺中等染毒浓度时，由于蝌蚪体内自稳机制作用，使得蝌蚪红细胞DNA损伤维持在相对稳定状态，不随苯胺浓度增加而增加，但随着染毒浓度增加，在达到最大浓度69.06 $\mu\text{g/L}$ 时，稳态消失，从而导致

DNA损伤的大幅增加。

苯胺通过蝌蚪的皮肤和鳃吸收后进入体内后，由于其亲脂性特性，与脂质膜结合直接进入细胞，一部分在细胞内以原型态形式存在，其引起DNA损伤，此结论仅局限于理论上的推测（赵晓红等 2000）；另一部分在在肝微粒体细胞色素P450单加氧化酶的催化下，苯胺氨基上的一个氢被氧化形成羟基，发生N-羟化反应形成苯基羟胺（Harrison et al. 1987），其上的羟基由于氨基的诱导效应，易于断裂形成羟自由基。这一点已经在实验中得到了证实，Khan等（1998）以0.025、0.050、0.100和0.200 mmol/kg不同剂量苯基羟胺饲喂SD大鼠（*Rattus norvegicus*）24 h后，发现脾的丙二醛含量相比对照组显著升高，其含量反映机体脂质过氧化程度，代表自由基的活性。由此推测苯基羟胺在大鼠脾细胞内形成大量羟自由基，造成对细胞膜和DNA损伤。

另有研究表明，苯胺和苯基羟胺均可引发小鼠和大鼠脾的总铁含量和自由铁含量增加，形成在光镜下可见的含铁血黄素的棕黄色折光颗粒（Khan et al. 1999, Pauluhn 2004）。推测苯胺所引发的破碎红细胞被脾的巨噬细胞摄入后，血红蛋白降解，释放 Fe^{3+} ， Fe^{3+} 与细胞中其他蛋白质聚合形成不稳定的铁蛋白聚合体即含铁血黄素，这样超氧阴离子可以通过亲水通道进入其内核，将 Fe^{3+} 还原为 Fe^{2+} ，从而使贮藏铁释放出来，转运至血液，造成铁过载。 Fe^{2+} 继而可能会通过Fenton反应产生羟自由基，这可能也是苯胺导致蝌蚪红细胞DNA损伤的另外原因之一。

参 考 文 献

- Abe T, Saito H, Niikura Y, et al. 2001. Embryonic development assay with *Daphnia magna*: application to toxicity of aniline derivatives. *Chemosphere*, 45(4/5): 487-495.
- Abram F S H, Sims I R. 1982. The toxicity of aniline to rainbow trout. *Water Research*, 16(8): 1309-1312.
- Bhunja F, Saha N C, Kaviraj A. 2003. Effects of aniline: an aromatic

- amine to some freshwater organisms. *Ecotoxicology*, 12(5): 397–404.
- Bomhard E M. 2003. High-dose clastogenic activity of aniline in the rat bone marrow and its relationship to the carcinogenicity in the spleen of rats. *Archives of Toxicology*, 77(5): 291–297.
- Campana M A, Panzeri A M, Moreno V J, et al. 2003. Micronuclei induction in *Rana catesbeiana* tadpoles by the pyrethroid insecticide lambda-cyhalothrin. *Genetics and Molecular Biology*, 26(1): 99–103.
- Gosner K L. 1960. A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes of identification. *Herpetologica*, 16(3): 183–190.
- Harrison J H, Jollow D J. 1987. Contribution of aniline metabolites to aniline-induced methemoglobinemia. *Molecular Pharmacology*, 32(3): 423–431.
- Hyaes T, Haston K, Tsui M, et al. 2003. Atrazine-induced hermaphroditism at 0.1 ppb in American leopard frogs (*Rana pipiens*): Laboratory and field evidence. *Environmental Health Perspectives*, 111(4): 568–575.
- Khan M F, Green S M, Ansari G A S, et al. 1998. Phenylhydroxylamine: role in aniline-associated splenic oxidative stress and induction of subendocardial necrosis. *Toxicological Sciences*, 42(1): 64–71.
- Khan M F, Wu X H, Alcock N W, et al. 1999. Iron exacerbates aniline-associated splenic toxicity. *Journal of Toxicology and Environmental Health*, 57(3): 173–184.
- Ossana N A, Salibián A. 2013. Micronucleus test for monitoring the genotoxic potential of the surface water of Luján River (Argentina) using erythrocytes of *Lithobates catesbeianus* tadpoles. *Ecotoxicology and Environmental Contamination*, 8(1): 67–74.
- Pauluhn J. 2004. Subacute inhalation toxicity of aniline in rats: analysis of time-dependence and concentration-dependence of hematotoxic and splenic effects. *Toxicological Sciences*, 81(1): 198–215.
- Sasaki Y F, Fujikawa K, Ishida K, et al. 1999. The alkaline single cell gel electrophoresis assay with mouse multiple organs: Results with 30 aromatic amines evaluated by the IARC and U.S. NTP. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis*, 440(1): 1–18.
- Sekihashi K, Yamamoto A, Matsumura Y, et al. 2002. Comparative investigation of multiple organs of mice and rats in the comet assay. *Mutation Research*, 517(1/2): 53–75.
- Witt K L, Knapton A, Wehr C M, et al. 2000. Micronucleated erythrocyte frequency in peripheral blood of B6C3F1 mice from short-term, prechronic, and chronic studies of the NTP carcinogenesis bioassay program. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 36(3): 163–194.
- 边高鹏, 刘瑞祥. 2014. 漳泽水库水体污染对黑斑蛙蝌蚪遗传毒性的野外调查研究. *生态毒理学报*, 9(6): 1126–1132.
- 陈传平, 张庭廷, 何梅, 等. 2007. 苯胺、苯酚对淡水藻类生长的影响. *应用生态学报*, 18(1): 219–223.
- 陈文鹤, 郭黎. 2001. 红细胞膜结构与红细胞变形能力. *上海体育学院学报*, 25(4): 34–39.
- 费梁. 1999. 中国两栖动物图鉴. 郑州: 河南科学技术出版社, 150.
- 封少龙, 孔志明, 王五香, 等. 2004. 应用微核试验和单细胞凝胶电泳技术来检测农药对青蛙蝌蚪及成体的遗传毒性. *水生生物学学报*, 28(1): 52–57.
- 国家环保局, 《水和废水监测分析方法》编委会. 2002. 水和废水监测分析方法. 4版. 北京: 中国环境科学出版社, 725–729.
- 姜盛红, 吴丽梅, 金红, 等. 2013. 苯胺生产技术与市场分析. *化工科技*, 21(4): 80–84.
- 刘宛, 李培军, 周启星, 等. 2005. 环境污染条件下生物体内 DNA 损伤的生物标记物研究进展. *应用与环境生物学报*, 11(2): 251–255.
- 屈景凯, 刘艳冬, 宋祥福, 等. 2012. 苯胺对小鼠肝脏的急性毒性作用. *实验动物与比较医学*, 32(6): 538–540.
- 苏红巧, 张银凤, 秦占芬, 等. 2013. 黑斑蛙与非洲爪蟾蝌蚪急性毒性试验方法敏感性的比较. *生态毒理学报*, 8(5): 785–790.
- 孙茜, 唐红枫, 陶征宇, 等. 2009. 苯胺对四种淡水藻类的毒性. *湖北农业科学*, 48(9): 2118–2120.
- 王懿, 李丕鹏, 陆宇燕, 等. 2011. 复合肥对花背蟾蝌蚪红细胞微核及核异常的影响. *生态学杂志*, 30(12): 2843–2848.
- 徐新波, 梁英凤, 孙成明, 等. 2000. 急性苯胺中毒血液中变性珠蛋白小体的检测. *中华劳动卫生职业病杂志*, 18(2): 71.
- 许章程, 王初升, 郑文庆. 2000. 苯胺对锯缘青蟹的毒性效应. *中国环境科学*, 20(1): 54–56.
- 薛良义, 李卢, 聂松平. 2006. 苯酚和对苯二酚对鲫鱼细胞DNA损

- 伤的研究. 水生生物学报, 30(2): 241-243.
- 闫永建, 宋平平, 张凤林, 等. 2014. 102 例急性苯的氨基、硝基化合物中毒临床分析. 中国职业医学, 41(3): 297-300.
- 苑宇哲, 徐士霞, 姚春生, 等. 2005. 阿特拉津对弹琴蛙 (*Rana adenopleura*) 蝌蚪微核和核异常的影响. 应用与环境生物学报, 11(3): 333-336.
- 赵晓红, 牛静萍, 李兴玉, 等. 2000. 苯胺类化合物的遗传毒性及其定量构效关系. 卫生毒理学杂志, 14(4): 218-220.