离子液体[C_8Mim]Cl对泥鳅毒性效应的研究

燕帅国,南 平,韩晨露,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:以泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)为受试动物,采用急性毒性、遗传毒性及生理毒性试验,研究了[C_8Mim]Cl对生物体的毒性效应。结果表明,[C_8Mim]Cl对泥鳅有一定的毒性,其对泥鳅24 h、48 h的LC_{50}分别为324.13 mg/L、262.77mg/L,安全浓度为51.80 mg/L;各处理组的微核率均高于对照组($P<0.05$),且随着处理浓度的升高和时间的推移,红细胞微核率都有明显的升高;处理组血清中的谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)活力均明显高于对照组($P<0.05$),且随离子液浓度升高以及时间的推移而增高;[C_8Mim]Cl对泥鳅有显著的毒性作用。

关键词:泥鳅;离子液体;毒性

中图分类号:Q355 **文献标志码**:A **文章编号**:1674-3075(2012)05-0119-04

离子液体(ionic liquid,ILs)是一类由有机阳离子和无机阴离子组成的室温下成液体的新型化学试剂,其常见的阳离子有季铵盐离子、季鏻盐离子、咪唑盐离子和吡咯盐离子等,阴离子有卤素离子、四氟硼酸根离子、六氟磷酸根离子等(Pretti et al, 2006)。本研究所采用的离子液体为氯化-1辛基-3-甲基咪唑([C_8Mim]Cl),其分子式为$C_{12}H_{23}ClN_2$,属亲脂性离子液体;因其不挥发、不易燃和热稳定等优势,离子液体一诞生即引起化工界的广泛关注并显示出广阔的应用前景,并因此曾被认为是对环境友好的"绿色溶剂"(Huddleston et al, 2001);然而,近几年的研究却显示离子液体对环境和生物体存在潜在风险,有些甚至有很强的生物毒性(柯明等,2007);因此其相关生物毒性研究越来越受到关注,可对生态环境影响与应用风险评价提供重要的理论指导。

微核也叫卫星核,是真核类生物中染色体畸变间期细胞的一种表现形式,呈圆形或椭圆形,游离于主核之外,大小在主核1/3以下。各种理化因子,如辐射、化学药剂对分裂细胞作用均可产生微核(徐建峰等,2005);另外,当机体暴露于污染的环境中时,酶活性的改变是反应生物体生理变化的一项灵敏指标;其中,谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)是广泛存在于动物线粒体中重要的氨基酸转氨酶,其活性变化可敏感地反应机体肝细胞受损伤的程度(陈鹏飞等,2005)。泥鳅(*Misgurnus anguillicaudatus*)是一种分布甚广的淡水鱼类,资源丰富,其对外界污染物反应灵敏,且易于在实验室饲养,因而是毒理学研究和环境监测的模式生物(陈细香等,2007)。本研究以泥鳅为受试对象,采用泥鳅外周血红细胞的微核以及谷丙转氨酶(GPT)和谷草转氨酶(GOT)两种酶作为生物标志物,探讨[C_8Mim]Cl对其遗传毒性和生理毒性的效应,进而为研究[C_8Mim]Cl对人类及其他生物体健康的危害提供一定的理论基础,同时也使人们对[C_8Mim]Cl的潜在生物毒性引起高度重视。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

泥鳅200尾,购自河南省新乡市宏达市场,健康状况良好,体重12~17 g,平均体长10~13 cm;试验前在曝气的自来水中驯养1周,每24 h换水1次,死亡个体及时捞出。氯化-1辛基-3-甲基咪唑[C_8Mim]Cl试剂购自上海成捷化学有限公司,GPT和GOT试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.2 试验方法

1.2.1 急性毒性试验 在预试验中,找出其96 h的最小全致死(100%死亡)浓度及最大全存活(0死亡)浓度,然后采用5个等比级数试验浓度,将[C_8Mim]Cl配制为164、213、278、360、468 mg/L共5个试验组(10尾/组)。每24 h换1次相同浓度的

收稿日期:2012-06-04

基金项目:国家自然科学基金(3071666);河南师范大学博士基金(No. 01046500120)。

通讯作者:常重杰,1965年生,男,教授,博导。E-mail:changzhongjie@tom.com

作者简介:燕帅国,1981年生,男,副教授,研究方向为动物遗传。E-mail:yanshuaiguo@163.com

[C_8Mim]Cl 水溶液。前 12 h 连续观察,随后 24 h、48 h 观察记录。采用改进寇氏法(Karber)计算出[C_8Mim]Cl 对泥鳅的半致死浓度(LC_{50})及安全浓度(杜启艳等,2008)。

1.2.2 微核检测试验 根据急性毒性的结果,设置 15、30、60 mg/L 共 3 个处理组和 1 个空白对照组,挑选体长和生长状况相似的泥鳅随机放入各试验组(15 尾/组)。处理各组每隔 24 h 更换 1 次相同浓度的处理液,空白对照组采用曝气的自来水,也是每个 24 h 更换 1 次。试验各组均在染毒后 4、8、12 d 随机取 2 尾泥鳅,断尾取血,制备血涂片并做好标记。荧光显微镜下观察并计数拍照。每张涂片随机观察 5 000 个红细胞,并统计有微核的细胞数,按惯用方法计算微核千分率:微核细胞千分率 = 带有微核的细胞数/观察的细胞总数 ×1 000。

1.2.3 酶活分析试验 本试验设计同 1.2.2,分别于染毒后 3、6、9 d 各取材 1 次,每个浓度组随机取 2 尾泥鳅,断尾取血,每尾泥鳅的血分别与 400 μL 抗凝剂混匀,3 500 r/min 离心 10 min 制备血清待测,GPT 和 GOT 酶活测定方法按照试剂盒说明书的操作步骤进行。

1.3 数据分析

所有试验数据均采用 SPSS 13.0 软件进行单因素方差分析(One-way ANOVA),用最小显著差数法(LSD)进行多重比较并作图。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。

2 结果与分析

2.1 [C_8Mim]Cl 对泥鳅的急性毒性

不同浓度[C_8Mim]Cl 溶液对泥鳅的急性毒性试验结果见表 1。在高浓度处理组中,处理鱼很快就出现异常现象,如水中侧翻打转,上下直窜,几小时候后反应迟钝,游动缓慢,逐渐丧失游动能力,最后出现浮头、翻白肚现象,直至死亡。其 24 h、48 h 的半致死浓度(LC_{50})分别为 324.13 mg/L、262.77 mg/L,安全浓度为 51.80 mg/L(表 1)。

2.2 [C_8Mim]Cl 对泥鳅红细胞微核率的影响

经[C_8Mim]Cl 溶液染毒后,部分外周血红细胞的外形呈现不规则形态,细胞核也出现各种异常现象,如核质变形、出现微核等;其中,微核位于细胞质中,为小球形,直径大约相当于主核 1/10 (图 1),不同浓度[C_8Mim]Cl 染毒后泥鳅红细胞微核率统计结果见表 2。结果表明,试验各组的微核率均高于对照组,各处理组与其对照组间存在显著差异($P<0.05$),且随着处理浓度的升高和时间的推移,红细胞微核率也呈现明显升高的趋势。

表 1 [C_8mim]Cl 对泥鳅的急性毒性试验结果

Tab. 1 Results of acute toxicity of [C_8Mim]Cl to *M. anguillicaudatus*

试验浓度/ mg·L^{-1}	死亡率/%		半致死浓度/mg·L^{-1}		安全浓度/ mg·L^{-1}
	24 h	48 h	24 h	48 h	
164	0	10			
213	0	20			
278	20	60	324.13	262.77	51.80
360	80	80			
468	90	100			

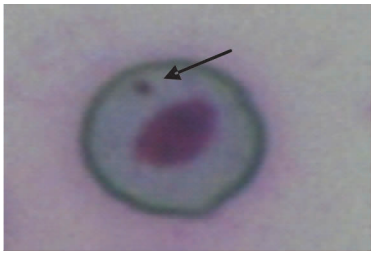


图 1 [C_8Mim]Cl 诱导泥鳅的微核血细胞

Fig. 1 Micronuclear cytological map of blood cells induced by [C_8Mim]Cl in *M. anguillicaudatus*

表 2 [C_8Mim]Cl 诱导泥鳅红细胞的微核率

Tab. 2 The Micronucleus blood cell rates of *M. anguillicaudatus* induced by [C_8Mim]Cl

试验浓度/ mg·L^{-1}	不同处理时间的红细胞微核千分率		
	4 d	8 d	12 d
0	0.688 ±0.175	0.673 ±0.884	0.686 ±0.262
15	4.850 ±0.212 *	6.115 ±1.959 *	9.300 ±1.273 *
30	6.850 ±0.021 *	10.535 ±0.233 *	13.470 ±2.220 *
60	10.495 ±1.407 *	12.790 ±1.824 *	14.900 ±0.141 *

注:* 表示与对照组相比差异显著($P<0.05$)。

Note: * indicated a significant difference compared with the control group ($P<0.05$).

2.3 [C_8Mim]Cl 对泥鳅血清 GOT、GPT 酶活力的影响

泥鳅血清中酶活力与不同浓度[C_8Mim]Cl 的关系如图 2 所示。经染毒 3、6、9 d 后取样,测得血清的酶活力均高于对照组,随着处理浓度的增高,同一时间泥鳅血清中 GPT 和 GOT 活力均呈上升趋势;同时,随着处理时间的延长,同一浓度泥鳅血清酶活力也在上升,即酶活力与染毒时间的长短呈正相关。经 SPASS 方差分析,各处理组与其对照组间存在显著差异或极显著差异($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。试验结果显示,离子液体[C_8Mim]Cl 对泥鳅具有较强的生理毒性影响,并表现出明显的时间效应和剂量效应。

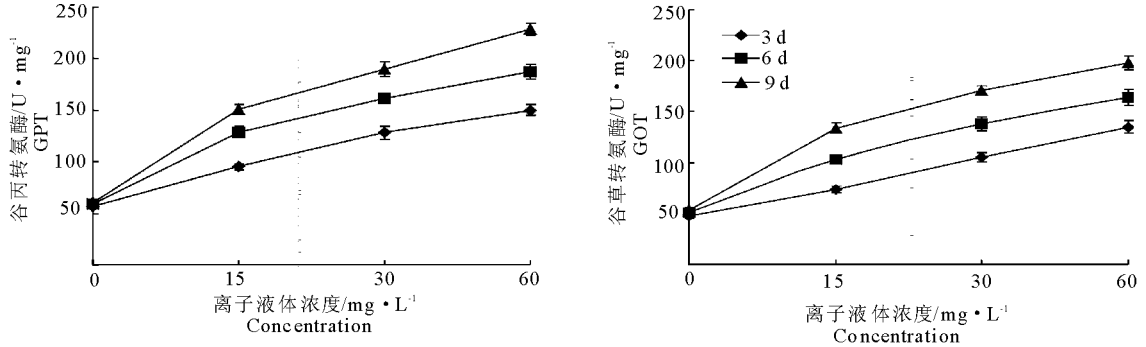


图 2　血清 GPT 和 GOT 酶活力与[C_8Mim]Cl 的关系

Fig. 2　Curve drawing of the relation between the activity of blood serum GPT & GOT in *M. anguillicaudatus* and [C_8Mim]Cl

3　讨论

3.1　离子液体与传统溶剂对泥鳅的生物毒性比较

急性毒性试验不仅是确定有毒化学物质毒性高低的主要技术方法,而且也是进行慢性毒性的基础和前提,其中获得该化学毒物对试验动物的半致死浓度(LD_{50}/LC_{50})则是急性毒性试验的中心任务(李效宇等,2010)。Ranke 等(2004)研究了咪唑类离子液体对细菌(*Vibrio fischeri*)的毒性作用,并与 4 种常用的传统溶剂甲醇、丙酮、乙腈和甲基叔丁基醚(MTBE)相应的半数效应浓度值(median effect concentration,EC_{50})比较,发现离子液体对 *Vibrio fischeri* 的毒性大于传统溶剂甲醇、丙酮和乙腈,而与 MTBE 相当;另外,南平等(2012a)研究发现,传统溶剂甲醇对泥鳅 24 h、48 h 的 LC_{50} 分别为461.23 mg/L、425.32 mg/L,安全浓度为176.82 mg/L。本试验结果表明,[C_8Mim]Cl 对泥鳅 24 h、48 h 的 LC_{50} 分别为 324.13 mg/L、262.77 mg/L,安全浓度为 51.80 mg/L(表 1),毒性稍高于传统有机溶剂甲醇等。因此,本研究结果显示[C_8Mim]Cl 对水生动物泥鳅具有明显的生物毒性。

3.2　微核试验是检测染色体损伤的有效方法

微核试验是检测染色体及其有丝分裂器损伤的一种遗传毒性试验方法。无着丝粒的染色体片段或因纺锤体受损而丢失的整个染色体,在细胞分裂后期仍留在子细胞的胞质内成为微核。有学者认为,微核的形成途径主要有两条:一是出现染色体断裂,进而产生微核;二是幼红细胞的正常分裂被扰乱,细胞不均等缢缩分裂,并表现出核质外凸、内凹和不均等缢缩等核变形现象,缢缩继续进行,则出现主核与微核之间有丝状相连,进而出现游离的微核(李宁宁等,2009)。本次研究也发现有核外突、核内凹、主核和微核相连等现象,并且在各试验组中均观察到了典型的微核存在,其微核率均高于对照组并存在显著的统计学差异,且随着离子液体浓度的升高和染毒时间的增长,处理组泥鳅的红细胞微核率均呈现增高趋势,表现出一定的剂量效应。该研究结果表明离子液体[C_8Mim]Cl 能引起染色体损伤,是一种较强的染色体断裂剂。

3.3　离子液体与血清 GPT 和 GOT 酶活的变化

谷草转氨酶(GOT)和谷丙转氨酶(GPT)是广泛存在于动物体内的两种重要的转氨酶,其活性高低反映出泥鳅体内氨基酸代谢情况,同时也可反映肝胰腺功能的状况。在正常情况下,动物肝组织的转氨酶只有少量释放到血浆中,因此血清中转氨酶活力很小;当机体中毒其肝组织受损或发生病变时,细胞膜的通透性加大,肝细胞内的转氨酶大量释放进入血浆,从而引起肝的 GOT 和 GPT 活性明显下降,而血液中的 GPT 和 GOT 活性则明显升高(南平等,2012b),与本次的研究结果一致。本试验中,随着[C_8Mim]Cl 浓度的增加和染毒时间的延长,泥鳅血清中 GOT、GPT 酶活力依次升高,且试验各组与对照组的 GOT、GPT 酶活力均有显著差异,表明经[C_8Mim]Cl 处理可诱导肝组织损伤,导致 GOT 和 GPT 大量进入血清中。该结果与微核分析结果相一致,均表明离子液体[C_8Mim]Cl 对泥鳅具有明显的生物毒性,且其毒性大小具有明显的剂量效应。

综上所述,离子液体[C_8Mim]Cl 对泥鳅具有显著的生物毒性作用,进而推测其可能也会对其他水生生物乃至人类造成一定的毒害作用;因此在生产实践中一定要谨慎使用,以避免其对人类等有机体的健康及其赖以生存的生态环境造成威胁。

参考文献

陈鹏飞,杨德强,邹红. 2005. 两种中草药组方对鲫鱼肝脏转氨酶的影响[J]. 饲料工业,26(6):28 – 31.

陈细香,卢昌义,黄荣昌. 2007. 五种洗发剂对泥鳅血红细胞微核及核异常的诱导[J]. 淡水渔业,37(5):19 – 22.

杜启艳,常重杰,南平, 等. 2008. 柠檬黄对泥鳅的急性毒性及遗传毒性实验[J]. 安徽农业科学, 36(15):6321 – 6323.

柯明,周爱国,宋昭峥,等. 2007. 离子液体的毒性[J]. 化学进展,19(5):671 – 679.

李宁宁, 党炳俊, 杜启艳, 等. 2009. 有机融雪剂对泥鳅的急性毒性以及红细胞微核研究[J]. 湖北农业科学, 48(9):24 – 26.

李效宇,曾师虎,张伟红,等. 2010. 离子液体溴化1-辛基-3-甲基咪唑对太行隆肛蛙蝌蚪的毒性及其抗氧化系统的影响[J]. 河南师范大学学报:自然科学版, 38(1):138 – 141.

南平,杨炀,王君,等. 2012a. 甲醛对泥鳅毒性的研究[J]. 河南农业科学,41(1):156 – 159.

南平,王君,豆晓飞,等. 2012b. 8-羟基喹啉对锦鲤毒性效应的研究[J]. 水生态学杂志,33(1):116 – 119.

徐建峰,王秀兰,张秋铃. 2005. 接触射线职业人群染色体畸变及微核率分析[J]. 中国公共卫生,21(7):875 – 875.

Huddleston J G, Visser A E, Willauer H D, et al. 2001. Characterizationand comparison of hydrophilic and hydrophobie room temperature ionic liquids incorporating the imidazolium cation[J]. Green Chem, 3:156 – 164.

Pretti C, Chiappe C, Pieraccini D, et al. 2006. Acute toxicity of ionic liquids to zebra fish (*Danio rerio*)[J]. Green Chem, (8): 238 – 240.

Ranke J, Mölter K, Stock F, et al. 2004. Biological effects of imidazolim ionic liquids with varying chainlengths in acute Vibrio fischeri and WsT-1 cell viability assays[J]. Ecotoxicol Environ Safe, 58:396 – 404.

(责任编辑 万月华)

A Study on the Toxicity Effect of [C_8Mim]Cl to *Misgurnus anguillicaudatus*

YAN Shuai-guo, NAN Ping, HAN Chen-lu, DU Qi-yan, CHANG Zhong-jie

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, P. R. China)

Abstract: In this study, the toxicity effect of [C_8Mim]Cl to loach (*Misgurnus anguillicaudatus*) was studied using the methods of acute toxicity test, genetic toxicity test, and physical toxicity test. The results of above tests showed that: [C_8Mim]Cl had a certain toxicity effect to loach, and the LC_{50} of 24 h, 48 h were 324.13 mg/L, 262.77 mg/L, and its safe concentration was 51.80 mg/L; the micronucleus rates of treatment groups were all higher than the control group, and there were significant differences ($P<0.05$) between the treatment groups and control group; the GPT and GOT activities of blood serum in the treatment groups were significantly higher than the control group ($P<0.05$), and the activities of GPT and GOT became more and more higher with the increase of treating concentrations and treating time of ion liquid. In conclusion: [C_8Mim]Cl had a significant toxicity effect on *M. anguillicaudatus*.

Key words: *Misgurnus anguillicaudatus*; [C_8Mim]Cl ; toxicity