

文章编号: 1004-7271(2003)02-0174-05

·综述·

三丁基锡致软体动物性畸变机制

The mechanism for tributyltin-induced imposex in mollusca

韩雅莉, 周小鹏, 李兴暖

(汕头大学理学院生物系, 广东 汕头 515063)

HAN Ya-li, ZHOU Xiao-peng, LI Xing-nuan

(Department of Biology, Institute of Science, Shantou University, Shantou 515063, China)

关键词: 三丁基锡, 软体动物, 性畸变, 机制

Key words: tributyltin; mollusca; imposex; mechanism

中图分类号: S917 文献标识码: A

有机锡 (organotin) 是至少含有一个 Sn-C 共价键的金属有机化合物, 因能有效防止海洋软体动物在水下船体的附生, 而被广泛作为舰、船体及海洋水下设施涂料添加剂大量引入海洋。这类化合物的长期使用, 不仅对海洋目标生物产生高效杀灭作用, 而且对其它水生底栖动物, 也造成了极大影响^[1-4]。有机锡的半衰期较长, 极易与悬浮颗粒物结合成为更为稳定的沉积物, 对经济水产和海洋生态环境构成严重威胁。螺类等软体动物对有机锡有很强的富集能力, 近年来调查发现污染严重区域螺类出现生长缓慢、畸形, 以及性畸变 (imposex) 等异常现象, 大量实验也证实了这种现象的确与有机锡污染密切相关。因而近年来对于 TBT 致性畸变机理越来越引起国内外学者的广泛关注^[5]。

1 软体动物的性畸变

所谓‘性畸变’就是指软体动物出现了生殖器官畸形和雌性性器官逆转等异常现象, 就是说雌体内出现了不应有的雄性生殖器官, 包括阴茎、输精管和前列腺等, 被称为假两性 (pseudohermaphroditism) 或性畸变^[6]。性畸变雌性个体的输卵管往往被雄性生殖器官堵塞, 阻碍了受精和卵囊的释放, 致使大量雌性成体不育, 种群退化、数量锐减, 严重的甚至出现区域性绝种。

1970 年 Blaber^[7]首先注意到这类现象, 他发现三丁基锡 (Tributyltin, TBT) 污染水域内雌性螺类视触角后面有一个类似阴茎的突出物, 认为这是一种性畸变的现象, 这一发现引起了学者广泛注意。至此之后到上个世纪 80 年代初 Bryan 等人陆续在英国西海岸发现多种螺类存在性畸变现象。大量的研究发现性畸变现象普遍存在于 TBT 污染水域的其它软体动物中^[8-9]。到 1991 年已经记录了 63 属 118 种前鳃亚纲动物有性畸变现象^[10], 包括疣荔枝螺 (*Thais clavigera*)、黄口荔枝螺 (*T. luteostoma*)、蛎敌荔枝螺 (*T. gradata*)、甲虫螺 (*Cantharus cecillei*)、花枕宝贝 (*Cypraea eglantina* Duclou), 泥东风螺 (*Babylonia lutosus*)、瓜螺 (*Cymbium melo*)、红螺 (*Rapana bezoar*)、带鹑螺 (*Tonna olearium*)、*Ocenebra erinacea*、*Crepidula fornicata* 和 *Linorina littorea* 等^[5, 11-16]。研究证实性畸变是造成多种螺类种群数量明显减少的元凶^[8-9]。

收稿日期: 2002-06-17

基金项目: 国家自然科学基金 (30271033); 广东省重大科技兴海项目 (A200005F02)

作者简介: 韩雅莉 (1959-), 女, 北京市人, 教授, 博士, 从事贝类发育与分子免疫学研究。E-mail: Ylhan@stu.edu.cn

2 性畸变的引发机制

目前普遍认为性畸变是由 TBT 引发的,大量调查和实验研究也证实软体动物的性畸变现象与有机锡类化合物污染有直接关系^[8-10]。但有关 TBT 引起性畸变的机理尚未完全清楚,目前主要有以下几种观点。

2.1 TBT 抑制神经内分泌因子的释放

与其他生物一样软体动物的神经系统兼有一定的内分泌功能,脑神经节可以释放某些因子,它们可以直接或间接控制动物体内类固醇激素的产生和代谢活动。在正常情况下,雌性动物体内神经内分泌因子能控制雄激素的大量产生,使雌性动物只发育雌性生殖器官,抑制阴茎等雄性器官的产生。当 TBT 在螺类脑神经节中大量积累后,就会扰乱神经内分泌系统的正常活动,抑制这种神经内分泌因子从脑神经节中的释放,导致接触 TBT 的雌性软体动物出现性畸变^[10,17]。

Fe 'ral.C 等人将性未成熟履螺属(*Crepidula fornicata*)的阴茎形成区通过组织培养方法放在含有 TBT (0.2 $\mu\text{g}/\text{L}$)的培养液中进行培养,结果雌性螺类的这部分组织发育成为阴茎,发现有趣的是阴茎的发育与神经系统的发育是同步的。在没有 TBT 的培养条件下进行实验则不会产生上述现象。当将雌性动物足神经节与雄性脑侧神经节一同进行培养,结果雌性动物也会产生阴茎。根据这些实验的结果,他们推断是由于 TBT 干扰了雌性动物脑侧神经节产生的退化因子的释放而引起的性变异,因为正常雌性动物体内的退化因子,具有阻止足神经节分泌控制雄性动物阴茎生长的作用^[17]。随后 Bryan 和 Bright 证明螺(*N. Lapillus*)的神经系统对 TBT 具有高度亲和性^[18],他们的实验也印证 Fe 'ral.C 等人的推测。

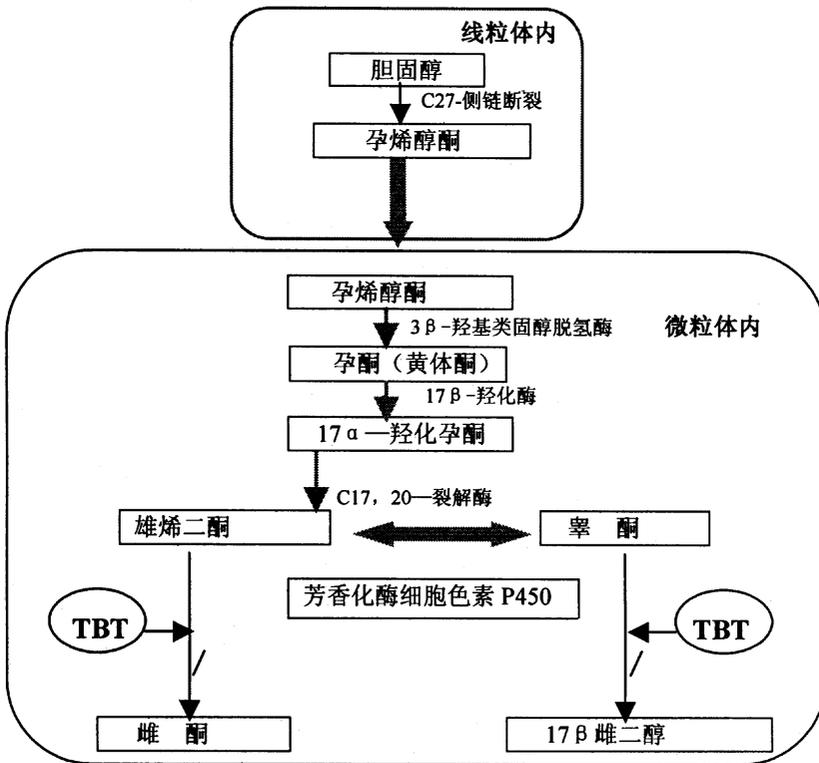


图 1 TBT 对类固醇激素生物合成的作用

Fig.1 Scheme of biosynthesis of steroid hormones with possible target of TBT

2.2 TBT 干扰性激素的生物合成

在脊椎动物体内,性激素合成和转化途径是胆固醇先转化为雄烯二酮,后者又进一步转化为睾酮和

雌酮,其中芳香化酶细胞色素 P450 可以催化雄烯二酮转化为睾酮和雌酮或转化为 17 β -雌二醇^[19](图 1)。雌激素和雄激素的化学结构非常相近,其生化合成途径也相同,在雄性或雌性体内都含有这两类激素,只是在两者的比例上的不同。因而它们的生物合成过程中任何一步被阻断都会导致另一类激素水平的升高或降低,会使生物个体产生副性征的改变,在某些鱼类中甚至会出现性的逆转现象。目前已知软体动物和脊椎动物一样含有同样的类固醇类激素,而且软体动物固醇类激素形成途径也和脊椎动物相似^[20]。因此这一假设认为 TBT 的作用可能并不是象睾酮和雄激素受体结合而引起雌性生物雄性化,而是通过抑制固醇类激素生物合成过程中的酶的作用使雄二酮或睾酮不能转化成雌酮或雌二醇,在体内得到积累,最终导致软体动物性畸变和雌雄间性现象。

2.3 TBT 对芳香化酶细胞色素 P450 的抑制

芳香化酶是脊椎动物体内雌激素生物合成的限速酶^[21],它属于细胞色素 P450 家族,故又称芳香化酶细胞色素 P450。它催化雄激素连续 3 次的脱氢作用,使类固醇的 A 环芳香化,除去 C10 位上的甲基(C19),在 C3 发生羟化而生成 C18 雌激素^[22]。芳香化酶细胞色素 P450 在促进脊椎动物性别形成过程中有着极其重要的作用。Piferer 用一批雌鲑鱼卵为材料,待卵孵化 3d 达到卵黄囊期,将其置于 10mg/L 非类固醇芳香化酶抑制剂(4-benzonitrile monohydrochloride)的环境中处理 2h,结果 22% 的幼鱼发育为雄鱼,雄性成年后出现正常的副特征,也能够产生有活力的精子,可以使卵子正常受精,其后代是正常的^[22]。进一步的实验,用芳香化雄激素——17 α -甲基睾丸酮(17 α -methyltestosterone, MT)处理雌性幼鱼后,约有 23% 的雌性个体发育为雄性;当用 MT 和芳香化酶抑制剂混合处理雌性幼鱼后,则有 97% 个体发育为雄性。这一实验结果表明:当没有芳香化酶抑制剂时,雄激素可被芳香化酶催化转化为雌激素,雌激素抑制雄性器官的产生。由于软体动物类固醇生物化学作用机理和鱼类的相似^[22],因而认为软体动物体内芳香化酶被抑制后也会产生类似鲑鱼那样的性别转化现象。事实上,目前已经研究证明在双壳类软体动物体内,多功能氧化酶系能够催化雄激素芳香化而使之转化为雌激素^[23],并发现这类酶能将 TBT 转化为二丁基锡(DBT)。

Spooner 和 Stroben 也都提出了 TBT 通过抑制芳香化酶而致腹足类动物性畸变的假设^[24-25]。Spooner 将正常成年雌性狗岩螺(*N. lapillus*)置于 98ng/L TBT 液体中养 42d,结果雌螺都长出了阴茎,在整个试验过程中,他们每隔一定时间检测螺体提取液中类固醇激素含量水平,经 TBT 处理的螺体内孕酮和 17 β -雌二醇水平无显著变化,28d 后螺体内睾酮浓度却显著提高,这种状态持续到第 42d。这一结果表明,由于 TBT 的作用使芳香化酶催化睾酮转化 17 β -雌二醇的过程受阻,睾酮积累引起雄性化现象^[23]。为了证实提高睾酮含量会导致性畸变产生的推测,Spooner 分别将不同剂量的睾酮注入成年雌性螺狗岩螺体内,然后在无污染的海水中暂养 42d,结果注入 0.01、0.1 和 10 μ g 睾酮的螺都出现了性畸变特征,其中注入量较高两组螺出现了阴茎长度显著增加的现象^[26]。以后 Spooner 等的工作被德国研究人员进一步证实^[26-29]。其中 Bettin 等^[19]将成年雌性两种螺(*N. Lapillus* 和 *N. reticulatus*)置于 12~244ng/L TBT 环境下养 5~6 个月,2 个月内被处理的两种动物都产生了性畸变现象,睾酮水平也显著提高,他们还发现两个不同种螺的性畸变程度有微弱差别,他们分析这是由于动物体内雄激素受体量有所不同,所以对 TBT 的反应有所差别。这一推测解释了为什么生活于同样 TBT 污染环境下,有些种类软体动物会出现性畸变而有些种类却不会。

Bettin 在另一个实验中也证明了 TBT 是通过抑制芳香化酶使睾酮含量提高而起作用的。他们首先将螺置于 122 ng/L TBT 和 1.25mg/L 雄性激素受体拮抗药——醋酸氯羟甲烯孕酮(cyproterone acetate)的混合环境下养殖 5 个月,结果没有发现性畸变^[19]。他认为这是由于雄激素受体被拮抗物所封闭,不能和雄激素结合,将螺置于 TBT 和 17 β -雌二醇或雌酮以 1:1 比例混合下养殖,结果性畸变也被抑制。这可能是由于雄、雌激素的比例达到了一个合理的水平。为了证明芳香化酶细胞色素 P450 催化雄激素转变为雌激素的作用,Bettin 等做了阻断芳香化酶细胞色素 P450 作用的实验,他将螺置于一种类固醇芳香化酶抑制剂(1-methyl-1 A-androstadiene-3,17-dione)的海水中养殖,检测了 3 个月对在对照组螺体内的 TBT 和 DBT 浓度。在这段期间给它们喂含低浓度 TBT 的食物,虽然没有发现显著的性畸变现象,但是 3 个

月后动物体内 TBT 积累浓度达到 $31.0 \sim 40.3 \mu\text{g}/\text{kg}$ (干重), DBT 量为 $74.1 \sim 82.5 \mu\text{g}/\text{kg}$, 而 TBT 浓度明显低于开始处理时浓度 ($87.3 \sim 107.8 \mu\text{g}/\text{kg}$), 这表明螺在一定范围内能将 TBT 降解为 DBT。如果将螺持续置于浓度达到 $500 \text{ng}/\text{L}$ 睾酮的水中, 3 个月后动物体内 TBT 积累量大大增加, 却检测不到 DBT, 睾酮似乎能够完全抑制 TBT 降解为 DBT。Bettin 等^[19]认为 TBT 具有与睾酮竞争芳香化酶细胞色素 P450 酶系统的作用。这一系列试验证实, 在睾酮水平正常情况下, 大剂量 TBT 会竞争性抑制芳香化酶细胞色素 P450, 阻断了睾酮向 17β -雌二醇的转化, 当睾酮积累到某一水平时就会导致性畸变。Schulte-Oehlmann 和 Bettin 用淡水螺 (*M. cornuarietis*) 做试验也得到相同的结果: 他们将螺养殖在 $122 \text{ng}/\text{L}$ 和 $488 \text{ng}/\text{L}$ TBT 环境下 6 个月, 其机体睾酮水平显著提高, 而 17β -雌二醇的水平却稍有下降, 表明 TBT 抑制了芳香化酶^[27]。

2.4 睾酮分泌抑制假说

Ronis 和 Masori^[28]用一种荔枝螺 (*L. littorea*) 做了体内外实验, 提出了另一种假设。他们用切除掉性腺的螺的消化腺作为研究材料, 研究 TBT 对微粒体细胞色素 P450 的含量的影响。他们分别用 $0, 1, 10$ 和 $100 \mu\text{M}$ 的 TBT 处理微粒体, 25°C 下 60min 后分别检测在有或无尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸 (NADPH) 存在下 $7 \text{mM}^{14}\text{C}$ -睾酮的代谢情况。测定结果表明, 依赖于细胞色素 P450 的睾酮的代谢活动受到了 TBT 的一定影响。在有 NADPH 的 $100 \mu\text{M}$ TBT 处理组, 芳香化酶活力 $30\% \sim 40\%$ 受到抑制, 但是在没有 NADPH 情况下, 由睾酮形成雄烯二酮的量随 TBT 浓度的增加而明显增加。在 NADPH 存在的情况下, 睾酮可由还原酶催化下形成更为活跃的 5α -二羟睾酮, 这一过程被 $100 \mu\text{M}$ TBT 部分抑制。

体内实验是向去除性腺的螺 (*L. littorea*) 体内注入 $7 \text{nmol}^{14}\text{C}$ -睾酮后, 将其置于 $0, 0.5$ 或 $5 \mu\text{M}$ TBT 海水中暂养 42h 。分别测定动物体内性激素水平, 发现注射组 24h 内体内睾酮量有瞬间提高, 而 42h 后 TBT 在动物体内的浓度却没有积累到最高水平。对用磷脂酶、 β -葡萄糖醛酸酶和 β -葡萄糖苷酶分别与海水和组织匀浆液孵育, 然后测定其睾酮和其代谢物分析。大约有 $60\% \sim 80\%$ 的睾酮与硫结合, 少量与葡萄糖结合, 没有发生葡萄糖醛酸化作用。与睾酮、 6α -羟睾酮和结合的硫类化合物与一些 5α -睾酮的还原代谢途径有关。 $5 \mu\text{M}$ TBT 处理后, 睾酮结合硫类物质在海水中的浓度显著减少, 而组织匀浆抽提液中睾酮及其代谢物水平明显提高。表明较高浓度的 TBT 提高了组织中睾酮及其代谢物含量。实验的结果支持这一假说^[28]。TBT 确实能够减少雄激素与硫的结合, 然而还很难充分解释这是致性畸变的唯一原因, 因为实验所使用的 TBT 浓度往往比污染环境中的浓度要高很多倍, 而且不能使 TBT 在生物体内的浓度保持某一稳定水平。已经证明螺类生活在高 TBT 浓度下一个多月后才能检测出体内睾酮水平的提高。因此 Ronis 和 Mason 的假说仍需要进一步的证据。

Gibbs 等^[8]通过对 TBT 严重污染的英国东南地区狗岩螺种群研究得出了更为有趣的解释, 他们发现幸存动物大多数都是雄性对 TBT 无抗性的遗传缺陷者, 即所谓的 Dumpton's 综合症 (DS)。具有 DS 的雄性个体只有发育不健全的生殖管道 (阴茎缺乏、很小或只具有不完备生殖管道), 精子的发生停滞, 无生育能力。而在 TBT 污染的情况下, 有些 Dumpton's 综合症的雌性动物没有产生性畸变或仅仅表现出微弱的雄性化, 因此具备生育能力, 它们能够与没有出现 DS 的雄性动物进行繁殖, 从而保证了种群的存留。对于这些现象的解释是受 DS 影响个体都具有遗传缺陷, 这样的两性动物睾酮的合成都有所减少, 进一步研究还发现这是由于增加了芳香化酶或加速雄激素的硫结合而造成的。

3 结论

综上所述, 虽然目前试验没有完全结论性的证明 TBT 是通过抑制芳香化酶而阻碍睾酮向雌二醇转化的机制而引起性畸变现象, 但这种推断还是给出一个关于性畸变现象的较为合理解释; TBT 触发神经内分泌调节因子作用似乎不是引发性畸变的根本原因, 但是这种调节也不能完全被排除; Ronis 和 Mason 的实验也能够解释 TBT 致性畸变的现象, 仍需更多的实验支持。但他们的工作给今后的研究奠定了基础。

参考文献：

- [1] Hall L W , Pinkney A E . Acute and sublethal effects of organotin compounds in acbiota : aninter pretative literature evaluatiore[J]. Rev Toxicol , 1985 ,(14): 159 - 209 .
- [2] Martin R C , Dixon D G , Maguire R J , et al . Acute toxicity , uptake , depuration and tissue distribution of tri-n-butyltin in rainbow trout , *Salmo gairdneri* [J]. Aquat Toxicol , 1989 , 15 : 37 - 52 .
- [3] Fent K , Meier W . Tri-butyltin-induced effects on early life stages of minnows *Phoxinixus* , *Archs enviro*[J]. Contam Toxicol , 1992 , 22 : 428 - 438 .
- [4] Vishwa kiran . Record of imposex in *Cronia konkanensis* from Indian waters . *Marin*[J]. Enviromental Research 1999 , 48 : 123 - 130 .
- [5] Li Lian Liu , lu Juan Suen . Organotins promotins promoting the development of imposex in the oyster drill *Thais clavigera*[J]. J Fish Soc Taiwan , 1996 , 23(2): 149 - 154 .
- [6] Smith B S . Sexuality in the American mud snail , *Nassarius obsoletus* Say [J]. Proc malac Soc Lond , 1971 , 39 - 377 .
- [7] Blaber S J M . The occurrence of a penis-like outgrowth behind the right tentacle in spent females of *Nucellalapillus*(L.) [J]. Proc malac Soc Lond , 1970 , 39 : 231 - 233 .
- [8] Gibbs P E . A male genital defect in the dog-whelk , *Nucella Lapillus*(Neogastropoda) , favouring survival in a TBT- polluted area [J]. J Mar Biol Assoc UK , 1993 , 73 : 667 - 678 .
- [9] Oehlmann J , Bettin C . TBT-induced imposex and the role of steroids in marine snails [J]. Malacol Rev Suppl , 1996 , 6(Molluskan reproduction) : 157 - 161 .
- [10] Fioroni P , Oehlmann J . The pseudohermaphroditism of prosobra morphological aspects [J]. Zool Anz , 1991 , 226 : 1 - 6 .
- [11] Gibbs P E , Pascoe P L , Burt G R , et al . Sex change in the female dog-whelk , *Nucella lapillus* , induced by tributyltin from antifouling paints [J]. J Mar Biol Ass U K , 1988 , 68 : 715 - 731 .
- [12] Horiguchi T . Shiraishi H , Shimizu M , et al . Imposex and organotin compounds in *Thais clavigera* and *T bronniin* Japar [J]. J Mar Biol Ass U K , 1994 , 74 : 651 - 669 .
- [13] ToshihiroHoriguchi , Hiroaki Shiraishi . Effects of triphenyltin chloride and five other organotin compounds on the development of imposex in the rock shell , *Thais clavigera* [J]. Environmental Pollution , 1997 , 95 : 85 - 91 .
- [14] Oehlmann B B , Minchin D . Imposex in *Nucella lapillus* and intersex in *Littorea* : interspecific comparison of two TBT-induced effects and their geographical uniformity [J]. Hydrobiologia , 1998 , 378 : 199 - 213 .
- [15] Graham Blackmore . Imposex in *Thais clavigera* as an indicator of TBT bioavailability in coastal waters of HongKong [J]. J Moll Stud , 2000 , 66 : 1 - 8 .
- [16] 施华宏 , 黄长江 . 海产腹足类性畸变现象的形态特征 [J]. 台湾海峡 , 2001 , 20(4) : 552 - 555 .
- [17] Fe 'ral C , Le Gall S . The influence of a pollutant factor(tributyltin) on the neuroendocrine mechanism responsible for the occurrence of a penis in the female of *Ocenebra erinacea* ir [C]. Mulluskan neuro-endocrinology . Oxford NY : North-Holland , 1983 , 137 - 175 .
- [18] Bryan G W , Bright D A . Uptake , tissue distribution and metabolism of ¹⁴C- labelled tributyltin (TBT) in the dog-whelk , *Nucella lapillus* [J]. J Mar Biol Ass UK , 1993 , 73 : 889 - 912 .
- [19] Bettin C , Oehlmann J , Stroben E , et al . TBT-induced imposex in marine neogastropods is mediated by an increasing androgen Level [J]. Helgol Meeresunters , 1996 , 50 : 299 - 317 .
- [20] Harada N , Yamada K , Saito K , et al . Structal characterization of the human estrogen synthetase (aromatase) gene [J]. Biophys Res Commun , 1990 , 166 : 365 - 372 .
- [21] Toda K , Terashima M , Kawamoto T , et al . Struntural and functional characterization of human aromatase P450 gene [J]. Eur J Biochem , 1990 , 193 : 559 - 565 .
- [22] Piferer F , Zanuy S , Carrillo , et al . Brief treatment with an aromatase inhibitor during sex differentiation Causes chromasomally female salmon to develop as normal , functional males [J]. J Exp Zool , 1994 , 270 : 255 - 262 .
- [23] Kirchin M A , Wiseman A , Livingstone D R . Studies on the mixed-function oxygenase system of the marine bivale *Mytilus edulis* [J]. Mar Environ Res , 1988 , 24 : 117 - 118 .
- [24] Spooner N , Goad L J . Steroid and imposex of the dog whelk *Nucella lapillus* [C]. Proceedings , 3rd International Organotin Symposium , Monaco , 1990 .
- [25] Spooner N , Gibbs PE , Bryan G W , et al . The effect of tributyltin upon steroid titres in the female dogwhelk , *Nucella lapillus* and the development of imposex [J]. Mar Environ Res . 1991 , 32 : 37 - 49 .
- [26] Stroben E , Oehlmann J , Bettin C , et al . TBT-induced imposex and the role steroids in marine snail [C]. In Proceedings , Tenth World Meeting of the Organotin Environment Programme Association , Berlin , 1991 .
- [27] Schulte-Oehlmann . Toxicokinetic and dynamic aspects of TBT-induced imposex in *Hydrobia ulvae* compared With intersex in *Littorina littorea* [J]. Hyreobiologia , 1998 , 378 : 215 - 225 .
- [28] Oehlmann J , Stroben E . Tributyltin biomonitoring using prosobranchs as sentinel organisms [J]. Fresenius J Anal Chem , 1996 , 354 : 540 - 545 .
- [29] Ronis M J , Mason A Z . The matabolism of testosterone by the periwinkle (*Littorina littorea*) in vitro and in vivo effects of tributyltin [J]. Mar Enviro Res , 1996 , 42 : 161 - 166 .