

莠去津和茚对斑马鱼胚胎的联合毒性效应研究

王北南, 宋晓, 贺琳娟, 钱永忠, 邱静

引用本文:

王北南, 宋晓, 贺琳娟, 等. 莠去津和茚对斑马鱼胚胎的联合毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(10): 2086–2094.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0261>

您可能感兴趣的其他文章

Articles you may be interested in

斑马鱼胚胎经丙草胺暴露后对其仔鱼致畸效应的研究

刘迎, 姜蕾, 潘波, 林勇

农业环境科学学报. 2017, 36(3): 481–486 <https://doi.org/10.11654/jaes.2016-1418>

敌草快对斑马鱼组织损伤及慢性肝脏损害作用

沈文静, 张潇, 赵子昂, 方再光, 谢曦, 王蓉, 胡文婷

农业环境科学学报. 2021, 40(5): 949–956 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0043>

氧化锌和二氧化钛纳米颗粒对淡水绿藻的单一及联合毒性研究

王壮, 金世光, 张帆, 王德高

农业环境科学学报. 2021, 40(10): 2095–2105 <https://doi.org/10.11654/jaes.2021-0319>

六溴环十二烷对斑马鱼的甲状腺激素干扰效应研究

刘小燕, 刘珊, 张丽娟, 韩倩, 陈棉彪, 黄楚珊, 魏东洋, 胡国成

农业环境科学学报. 2017, 36(11): 2192–2198 <https://doi.org/10.11654/jaes.2017-0509>

腐植酸影响扑草净对斑马鱼的急性毒性研究

赵倩, 王灿灿, 袁旭姣, 朱琳

农业环境科学学报. 2015(4): 653–659 <https://doi.org/10.11654/jaes.2015.04.007>



关注微信公众号, 获得更多资讯信息

王北南, 宋晓, 贺琳娟, 等. 莠去津和茚对斑马鱼胚胎的联合毒性效应研究[J]. 农业环境科学学报, 2021, 40(10): 2086–2094.

WANG B N, SONG X, HE L J, et al. Joint toxicity of atrazine and fluorene on zebrafish embryos[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2021, 40(10): 2086–2094.



开放科学 OSID

莠去津和茚对斑马鱼胚胎的联合毒性效应研究

王北南, 宋晓, 贺琳娟, 钱永忠, 邱静*

(中国农业科学院农业质量标准与检测技术研究所, 农业农村部农产品质量安全重点实验室, 北京 100081)

摘要:为了研究莠去津和茚的联合毒性效应,以斑马鱼作为模式生物,进行胚胎发育暴露实验、联合毒性模型预测和靶向氨基酸代谢组学研究。结果表明,在联合暴露 120 h 后的斑马鱼仔鱼中均观察到异常发育情况,会引起斑马鱼胚胎卵黄囊异常和脊柱弯曲,其毒性作用方式分别为拮抗作用和协同作用,且无论低高剂量下,二元联合暴露比单一暴露时毒性风险更高。靶向代谢组学研究发现,污染物主要通过干扰甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸代谢等途径影响斑马鱼仔鱼的氨基酸代谢。研究表明,莠去津和茚的联合暴露对斑马鱼胚胎的神经发育、氧化应激、抗炎机制、能量代谢、免疫和细胞凋亡机制等生理功能可能产生影响,进而影响其生长发育,且卵黄囊异常是较为敏感的毒性指标。

关键词:莠去津;茚;斑马鱼;氨基酸代谢组学;联合毒性

中图分类号:X171.5 文献标志码:A 文章编号:1672-2043(2021)10-2086-09 doi:10.11654/jaes.2021-0261

Joint toxicity of atrazine and fluorene on zebrafish embryos

WANG Beinan, SONG Xiao, HE Linjuan, QIAN Yongzhong, QIU Jing*

(Institute of Agricultural Quality Standards and Testing Technology, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory of Agricultural Product Quality and Safety, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Beijing 100081, China)

Abstract: To study the combined toxicity effects of atrazine and fluorene, zebrafishes were used as model organisms to carry out embryo development exposure experiments, combined toxicity model prediction, and targeted amino acid metabolomics research. The results showed that abnormal development was observed in zebrafish larvae after 120 h of joint exposure, leading to abnormal embryo yolk sac and curvature of the spine. The toxic action modes exhibited antagonistic and synergistic effects. Regardless of doses, the dual combined exposure had a higher risk of toxicity than single exposure. Targeted metabolomic studies found that pollutants mainly affect the amino acid metabolism of zebrafish larvae by interfering with the metabolism of glycine, serine, threonine, and histidine. The study showed that the combined exposure of atrazine and fluorene might interfere with physiological functions of zebrafish embryos, such as neural development, oxidative stress, anti-inflammatory mechanisms, energy metabolism, and immunity and apoptosis mechanisms, which in turn affects growth and development, with abnormal yolk sac being an indicator of toxicity.

Keywords: atrazine; fluorene; zebrafish; amino acid metabolomics; joint toxicity

近年来,随着经济的发展和工业化进程的加快,工、农、畜牧、水产等行业中人类活动的加剧使得水体中涌现了大量新型有机污染物。水是生命之源,水体

中的污染物通过长距离迁移和食物链富集作用最终将会进入人体,对人体健康造成极大的威胁,已经成为研究重点^[1]。

收稿日期:2021-03-04 录用日期:2021-05-31

作者简介:王北南(1996—),女,山东东营人,硕士研究生,从事食品加工与安全研究。E-mail:monan1996@163.com

*通信作者:邱静 E-mail:qiuqing@caas.cn

基金项目:国家重点研发计划项目(2017YFC1600705)

Project supported: The National Key Research and Development Program of China (2017YFC1600705)

莠去津是一种三嗪类除草剂,在20世纪50年代投入商业化,目前已经成为世界上第二大消费使用的除草剂^[2]。由于其用量大、具有中等水溶性且对土壤吸附性低,通常残留于水环境中^[3],已经在世界各地的水体中被发现。20世纪70年代对灌溉尾水回收坑内的土壤及水检测发现,莠去津残留相较于其他农药更频繁、更持久,其中在水中检测到的最大含量为 $1\,074.1\ \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[4],相关调查显示,发展中国家比发达国家地表水中的莠去津浓度更高^[5]。莠去津具有发育毒性、内分泌和抗氧化系统干扰效应,以及生殖毒性等,会诱导大鼠的红细胞氧化损伤^[6],引起斑马鱼胚胎谷胱甘肽S-转移酶(GST)活性增强^[7],引起胎鼠^[8]、美洲蟾蜍、林蛙及非洲爪蟾幼体^[9]生长发育迟缓,降低斑马鱼卵的孵化率^[10],诱导仔鼠的下丘脑以上神经元损伤等^[11]。多环芳烃(PAHs)是一类稠环芳香族化合物,广泛存在于石油、煤炭中,目前也是水体中一类典型的持久性有机污染物。多环芳烃难以降解,具有远距离迁移性和生物积累性^[12],其中茚(Flu)是美国环保总局优先控制的16种多环芳烃之一。我国水体环境中检出率较高的多环芳烃是茚、萘、菲,其中再生水中茚检出量最高^[13]。茚目前已被证实具有神经毒性、抗氧化酶系统干扰效应等,会影响SOD、CAT的活性从而严重影响斑马鱼抗氧化酶系统^[14],导致斑马鱼非极性麻痹作用,细胞中毒并失去活性^[15],同时,茚及其代谢物会到达大鼠脑室,引起大鼠产生焦虑等行为障碍^[16]。

斑马鱼成本低、繁殖周期短、胚胎透明且发育同步,与人类基因组具有高度同源性,具有敏感的发育阶段,已成为毒理学研究中重要的模型生物^[17]。在开展斑马鱼相关研究时,代谢组学技术通过研究生物机体整体代谢情况的变化,在解释低剂量环境污染物对生物体响应机制方面发挥了重要作用^[18]。水体环境中的污染物通常以混合物形式存在,多环芳烃和三嗪类除草剂作为水体中常见的有机污染物,其混合污染情况已经受到了人们的重视^[19]。与单一污染物相比,混合污染物可能导致生物体内更复杂的毒性加和、协同增强等相互作用^[20],而目前针对莠去津和茚等水体污染物的联合毒性研究相对较少。因此,本文研究了莠去津和茚对斑马鱼胚胎的联合毒性,利用模型预测污染物在表型异常上联合作用方式,并基于靶向代谢组学技术,探讨其对氨基酸代谢的扰乱影响,筛选毒性敏感代谢物,从而解析污染物对斑马鱼胚胎的毒性机制,以期评估水体混合污染风险和水产品质量安

全监测预警提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 斑马鱼胚胎的获得与培养

控制野生AB型雌雄斑马鱼成鱼(购自国家斑马鱼资源中心,China Zebrafish Resource Center, CZRC)的日夜节律:昼14 h,夜10 h,采卵前一天20:00—21:00点将雌雄斑马鱼成鱼隔开,次日上午8:00—9:00点使性成熟的雌雄斑马鱼成鱼以1:1比例自然交配,受精后3 h时,收集受精卵并用胚胎培养液清洗,选择处于同一发育阶段且发育正常的胚胎置于培养液中,于28.5℃的条件下恒温控光培养,待后续实验研究。胚胎培养液为净化水,其理化性质为:温度 $(28\pm 1)\text{ }^{\circ}\text{C}$, pH 7.0 ± 0.1 , 硬度 $75\sim 200\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 电导率 $(500\pm 1)\ \mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$ 。

1.2 试剂与仪器

莠去津和茚标准品(纯度 $\geq 98\%$)购自天津阿尔特塔科技有限公司,由于暴露于0.1%二甲基亚砜(DMSO,纯度99.9%,购自北京百灵威科技有限公司)不会影响实验结果,因此将莠去津和茚溶于DMSO中,配制为 $25\,000\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备溶液, $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ 避光储存,用胚胎培养液稀释该储备液以获得系列浓度污染物暴露溶液。甲醇(Fisher,色谱级)购自北京化标源科技有限公司。甲基纤维素(Sigma-Aldrich)购自北京雁栖湾生物技术有限公司。

实验仪器包括显微镜(SZX2-ILLT,奥林巴斯,日本)、人工气候箱(RXM智能型,宁波江南仪器厂,中国宁波)、液相色谱-三重四极杆/线性离子阱质谱仪(QTRAP 6500+,美国SCIEX公司)、高速冷冻离心机(ST 16R,美国ThermoFisher公司)、多管涡旋振荡仪(SCDEALL VX-III,北京踏锦科技有限公司)、超声仪(昆山超声仪器有限公司)、超声波仪(Q800R3,美国Qsonica公司)。

1.3 斑马鱼胚胎的暴露

于6孔板中加入3 mL胚胎培养液,每孔加入30个斑马鱼胚胎,加入3 μL 不同浓度污染物暴露溶液(保证DMSO浓度小于0.1%);另设置添加胚胎培养液、0.1% DMSO的处理组,分别为空白对照组、溶剂对照组,每个处理设置3个平行重复。根据预实验结果,莠去津和茚对斑马鱼胚胎的120 h-LC₅₀(半致死浓度)分别为 $11.90\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $15.07\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,单一暴露溶液浓度设置为 $1/16\text{LC}_{50}$ 、 $1/8\text{LC}_{50}$ 、 $1/4\text{LC}_{50}$ 、 $1/2\text{LC}_{50}$ 和LC₅₀(表1)。持续培养120 h,每24 h观察并记录斑马

表1 单一暴露时莠去津和茚暴露溶液浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Table 1 Concentrations of atrazine and fluorene exposed to a single exposure($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

污染物 Pollutant	1/16 LC_{50}	1/8 LC_{50}	1/4 LC_{50}	1/2 LC_{50}	LC_{50}
莠去津	0.74	1.49	2.98	5.95	11.90
茚	0.94	1.88	3.77	7.54	15.07

鱼的死亡情况以及斑马鱼胚胎的组织病变情况,移除死鱼和脱落的胚胎膜;培养结束后,用甲基纤维素凝胶将仔鱼固定在玻璃片上,用照相显微镜观察统计斑马鱼的死亡情况及各组织器官发育情况。

1.4 靶向氨基酸代谢组学分析

样品前处理方法参考文献[21],并在此基础上进行优化。收集20条处理120 h后的斑马鱼仔鱼至2 mL冻存管中,用胚胎培养液清洗3遍,吸干水分,用液氮快速冷冻后,放置于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 环境下保存,每个处理组设置6个平行处理。样品解冻后,加入180 μL 预冷的甲醇水混合溶液(体积比为10:8), $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ 下进行超声波破碎处理,然后加入300 μL 甲醇和280 μL 超纯水,涡旋振荡1 min,使目标物充分溶出。加入400 μL 二氯甲烷,除去脂肪和其他脂溶性杂质。超声提取10 min,在 $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 转速下离心10 min,取上清液过0.22 μm 滤膜,上机检测。本实验采用的仪器方法参考文献[22]。

1.5 数据处理

实验数据使用SPSS 17.0软件处理,组间采用单因素方差(ANOVA)分析,组内采用Tamhane's T2检验,显著性水平为 $P<0.05$,数据表示为平均值 $\pm$ 标准偏差。使用Origin 9.0进行热图绘制、非线性拟合计算污染物的受试动物半数产生效应变化的浓度(EC_{50})等。分别采用药物相互作用研究中常用的浓度相加(CA)法、毒理作用(IA)法和联合指数(CI)法3种模型对莠去津和茚二元联合效应进行预测和拟合优度估计。CA模型基于混合成分具有相同或相似的作用位点和作用模式(MOA),近年来,已在混合物对生态环境和人类健康风险评估中广泛应用[23]。IA模型则适用于具有不同MOA的二元混合物[24]。CA模型和IA模型均假设混合物组分之间无相互作用,而CI模型则不依赖于MOA,可以定性地评估混合物之间的相互作用,并定量地评估相互作用的程度,因而被广泛用于联合毒性研究,CI等于1、小于1和大于1分别表示加和作用、协同作用和拮抗作用[25]。在医学上,剂量减少指数(DRI)表示为了达到相同作用水平,联合使用两种药物相比单独使用时每种药物剂量减少的倍

数,DRI值越大,剂量减少越多[26]。使用CompuSyn软件计算CI值和DRI值。使用SIMCA-P 14.1进行多元数据统计分析和差异代谢物的筛选[变量重要性投影(VIP) >1 , $P<0.05$]。使用MetaboAnalyst (<https://www.metaboanalyst.ca>)在线软件进行代谢通路分析。

2 结果与分析

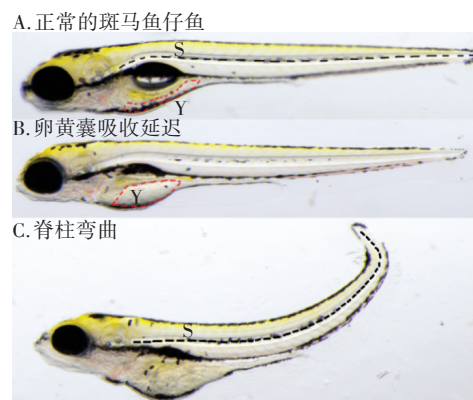
2.1 莠去津和茚对斑马鱼胚胎的毒性比较

受精后3 h的斑马鱼胚胎分别暴露于莠去津和茚120 h后,仔鱼出现了组织器官发育异常情况,均能观察到卵黄囊异常(主要表现为卵黄囊吸收延迟/水肿)和脊柱弯曲异常(图1)。根据异常发生率与暴露溶液浓度的非线性拟合,计算出莠去津对斑马鱼仔鱼120 h卵黄囊异常和脊柱弯曲的 EC_{50} 分别为12.39 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和23.43 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,茚为3.10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和13.89 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。由此可见,这两个毒性指标中,在低浓度即有较强毒性效应的卵黄囊异常更为敏感,且茚的毒性明显高于莠去津。

分别以莠去津和茚对斑马鱼仔鱼产生卵黄囊异常和脊柱弯曲的1/8 EC_{50} 、1/4 EC_{50} 、1/2 EC_{50} 、 EC_{50} 、2 EC_{50} 浓度混合两种污染物(表2),并暴露处理受精后3 h斑马鱼胚胎120 h后观察发现,随着二元混合物浓度的增大,两个毒性指标的发生率均增加(图2)。在中低浓度下,联合暴露引起仔鱼卵黄囊异常的发生率显著高于脊柱弯曲,而在高浓度下情况则相反。这表明在中低浓度下,卵黄囊异常是更为敏感的联合毒性指标。

2.2 莠去津和茚的联合作用方式

利用模型预测不同浓度下二元混合物引起的斑



S为脊柱S indicates spine, Y为卵黄囊Y indicates yolk sac

图1 受精3 h后正常、卵黄囊吸收延迟、脊柱弯曲的斑马鱼仔鱼

Figure 1 Zebrafish larvae with normal fertilised after 3 h, delayed yolk sac absorption, curved spine

表2 联合暴露时莠去津和茚的浓度($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)Table 2 Concentrations of fluorene and atrazine in binary mixed exposure solution($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

污染物 Pollutant	暴露浓度 Concentration	卵黄囊异常 Abnormal yolk sac	脊柱弯曲 Spinal curvature
莠去津	1/8EC ₅₀	1.55	2.93
	1/4EC ₅₀	3.10	5.86
	1/2EC ₅₀	6.20	11.72
	EC ₅₀	12.39	23.43
	2EC ₅₀	24.78	46.86
茚	1/8EC ₅₀	0.39	16.74
	1/4EC ₅₀	0.78	33.47
	1/2EC ₅₀	1.55	66.95
	EC ₅₀	3.10	133.89
	2EC ₅₀	6.20	267.78

马鱼胚胎异常率,并与实际试验观察值进行比较,结果见图3。由图可知,不同模型针对混合物预测评估能力具有一定差异,CI模型的剂量-效应关系与实际试验观察值较为吻合,预测能力优于CA和IA模型,因此本研究选用CI模型对莠去津和茚的联合作用方式进行预测。

总体而言,CI值随着混合物浓度的升高而增大(图4),表明毒性效应不断增强。对于卵黄囊异常,CI值随着浓度增加由小变大,当混合浓度为 $0.489\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、效应为20%时,CI=1,此后混合浓度再增大时,联合作用由协同转为拮抗作用。而对于脊柱弯曲,CI值变化趋势则相反,由拮抗作用转变为协同作用,当混合浓度为 $13.495\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、效应为35%时,CI=

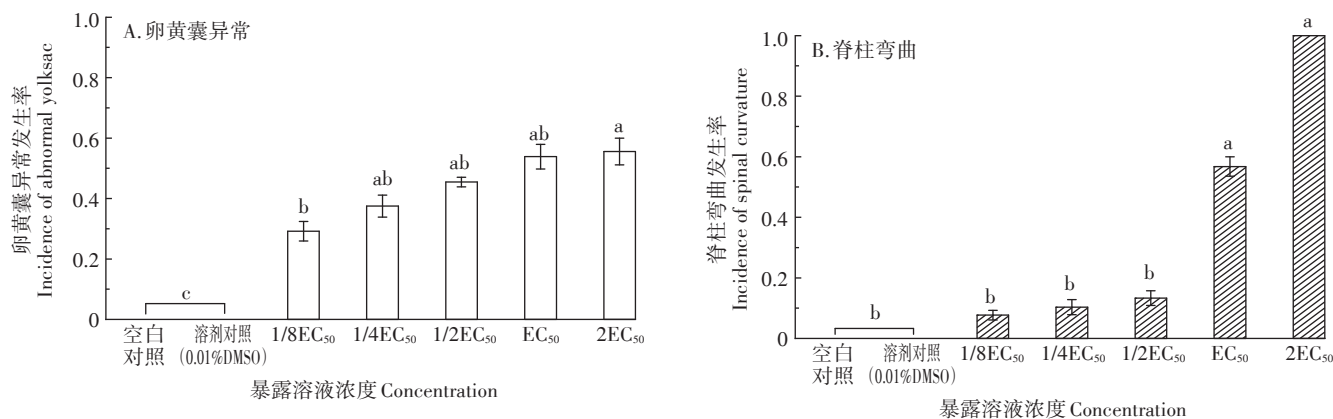


图2 莠去津和茚对斑马鱼仔鱼的联合毒性

Figure 2 Combined toxicity of fluorene and atrazine to zebrafish larvae

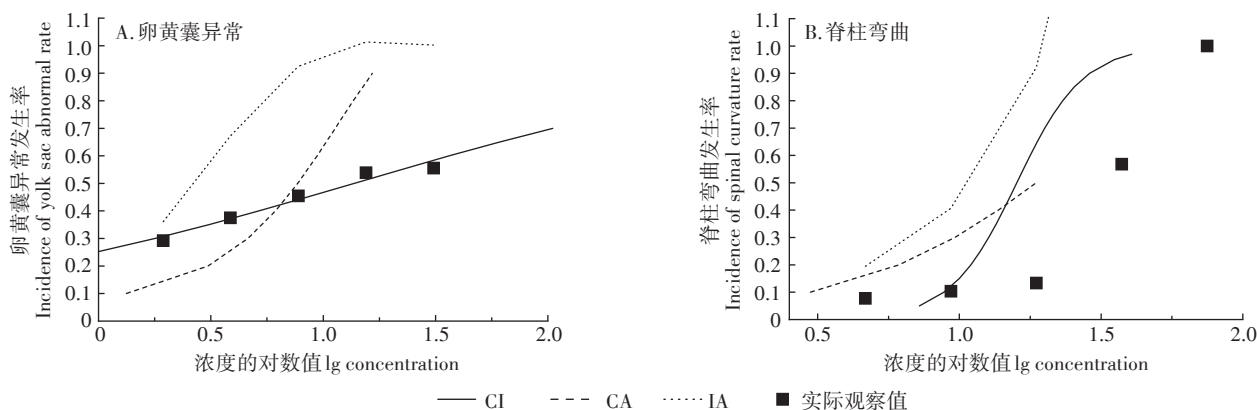


图3 利用CA、IA和CI模型预测莠去津和茚二元混合物引起斑马鱼胚胎卵黄囊异常和脊柱弯曲的浓度效应曲线及实际试验观察值

Figure 3 Using CA, IA and CI models to predict zebrafish embryos caused by a binary mixture of atrazine and fluorene concentration-effect curve of abnormal yolk sac and curvature of the spine, and actual experimental observation value

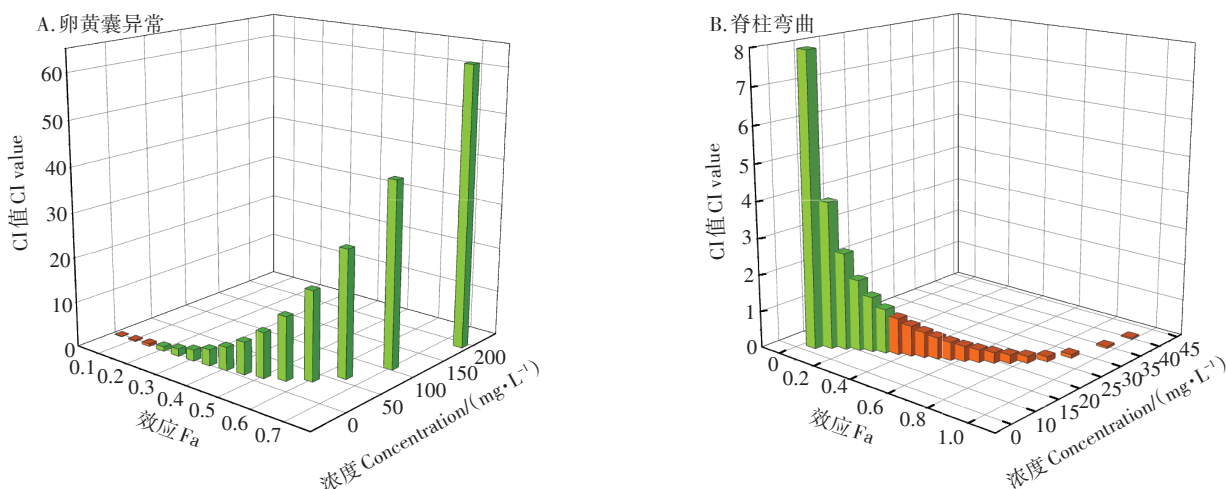


图4 基于CI指数模型分析得出的联合毒性强度及性质

Figure 4 Combined toxicity strength and type based on the CI index model

1. 可见高剂量水平下,二元混合物引起脊柱弯曲的风险加剧。

通过联合毒性作用的效应,即受影响分数(Fa)与剂量减少指数(DRI)绘制相互作用中值图(图5),发现对于联合暴露引起的卵黄囊异常和脊柱弯曲,分别当 $Fa < 0.2$ 和 $Fa > 0.3$ 时,莠去津和茚的所有 $\lg(DRI)$ 值均大于0(图5),即二元混合暴露比单一暴露在更低的剂量即可导致同样的毒性效应。随着卵黄囊异常效应的减小或脊柱弯曲效应的增加,莠去津和茚的DRI值都显著提高,表明不管是低剂量还是高剂量下,二元混合物都比单一作用时毒性风险更高。

2.3 靶向氨基酸代谢组学分析

对空白对照组、莠去津和茚单一暴露组(1/2LC₅₀)以及联合暴露组(按1/2LC₅₀毒性单位1:1混合二元污

染物)的斑马鱼仔鱼中22种氨基酸进行分析(图6),首先通过主成分分析(PCA)得到PCA-X得分图,结果显示处理组和空白对照组之间分布均可完全分开,表明污染物的暴露处理在氨基酸代谢水平上对斑马鱼仔鱼产生了一定影响。然后使用正交偏最小二乘判别法(OPLS-DA)分析,由OPLS-DA得分图可知,暴露组与对照组空间分布差异更大,且莠去津单一暴露组、联合暴露组与对照组的分离情况更好,说明二者联合可能对斑马鱼仔鱼的氨基酸代谢有更大的干扰。由单一以及联合暴露组、空白对照组的22种氨基酸代谢物热图(图7)可知,暴露处理引起了部分氨基酸代谢物的含量改变,两个污染物单一暴露之间存在一定差异。与空白对照组相比,莠去津单一暴露和联合暴露主要引起了斑马鱼仔鱼氨基酸代谢物的上

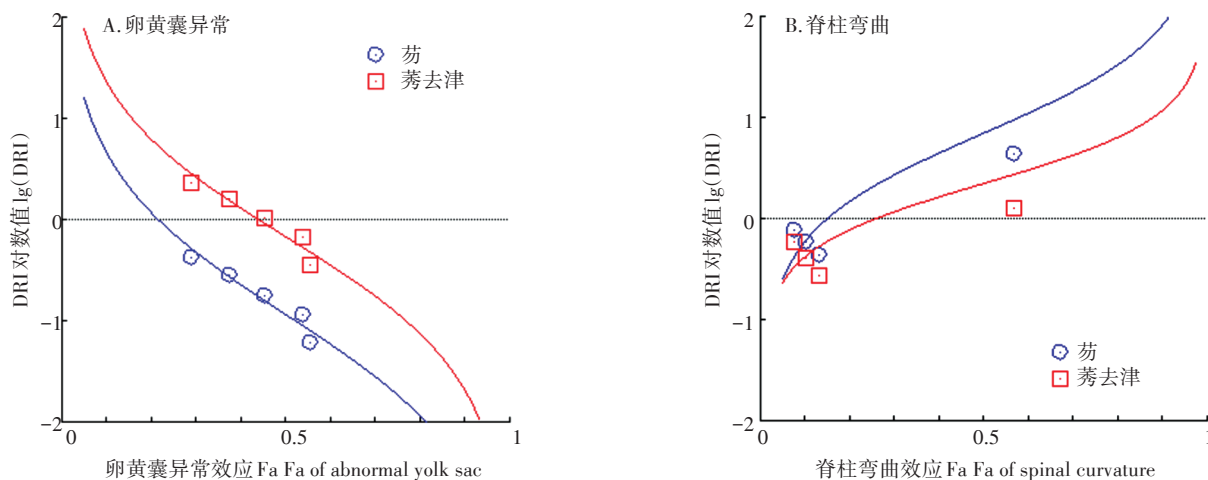


图5 莠去津与茚相互作用中值图

Figure 5 Median graph of the interaction between atrazine and fluorene

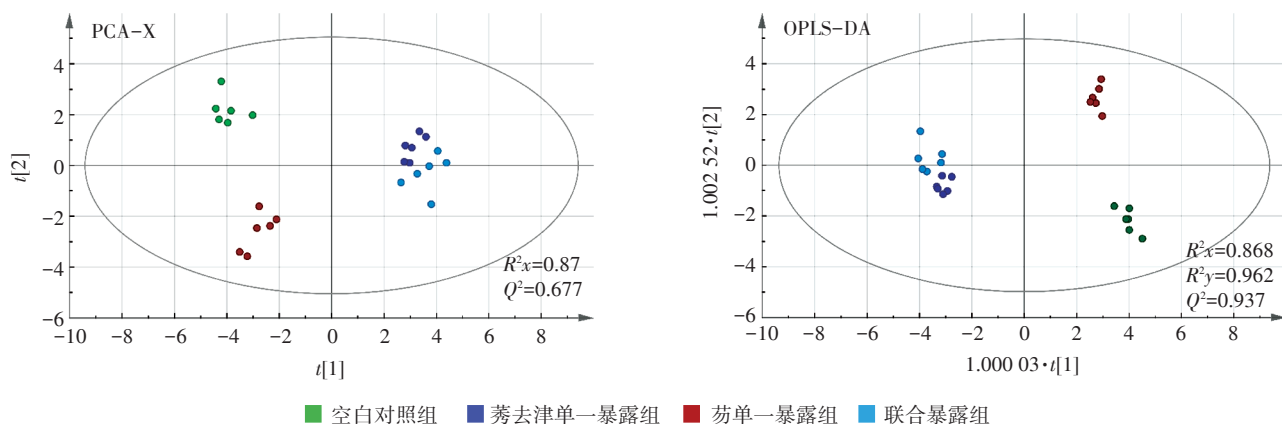


图6 莠去津、茚单一以及联合暴露组和空白对照组的斑马鱼仔鱼氨基酸PCA-X得分图

Figure 6 Amino acid PCA-X scores of zebrafish larvae of atrazine, fluorene single, combined exposure group and blank control group

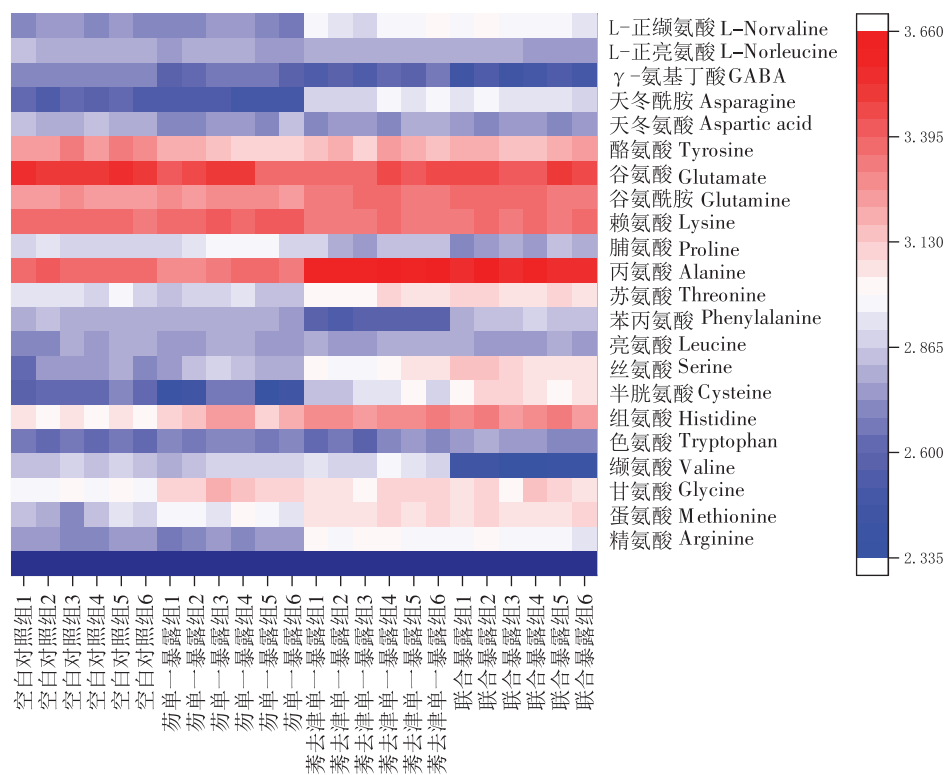


图7 莠去津、茚单一以及联合暴露组和空白对照组的斑马鱼仔鱼22种氨基酸代谢物热图

Figure 7 Heat map of 22 amino acid metabolites in zebrafish larvae of atrazine, fluorene single, combined exposure group and blank control group

调(L-正缬氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丙氨酸、苏氨酸、丝氨酸、半胱氨酸、组氨酸、甘氨酸、蛋氨酸、精氨酸),而茚单一暴露则主要引起部分氨基酸下调(L-正缬氨酸、L-正亮氨酸、γ-氨基丁酸、天冬酰胺、天冬氨酸、酪氨酸、谷氨酸、丙氨酸、苏氨酸、半胱氨酸、精氨酸)。

为了筛选出能更好地反映污染物影响的差异代谢物,将对照组分别与暴露组进行比较,在OPLS-DA

分析结果中筛选VIP>1.0且P<0.05的差异代谢物。与对照组相比,莠去津单一暴露后的斑马鱼仔鱼出现了9种发生显著性变化的代谢物,包括天冬酰胺、半胱氨酸、丝氨酸、蛋氨酸、精氨酸、组氨酸、丙氨酸、苯丙氨酸和正缬氨酸;茚单一暴露后筛选到甘氨酸、色氨酸、蛋氨酸、γ-氨基丁酸、谷氨酸、丙氨酸、酪氨酸、天门冬氨酸、组氨酸、天冬酰胺、一磷酸腺苷和苏氨酸12种差异代谢物;联合暴露后筛选出苯丙氨酸、缬氨酸

酸、甘氨酸、谷氨酸、一磷酸腺苷和酪氨酸6种差异代谢物。进一步进行代谢通路分析(图8),发现污染物暴露均影响了苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成;单一暴露均影响了甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸代谢。莠去津单一暴露和联合暴露均影响了苯丙氨酸代谢和氨酰基-tRNA的生物合成;茚单一暴露和联合暴露均影响了D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢。除此之外,莠去津单一暴露还影响了半胱氨酸和蛋氨酸的代谢;茚单一暴露还影响了丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢和精氨酸生物合成;联合暴露还影响了谷胱甘肽、乙醛酸、二羧酸的代谢。

3 讨论

本研究对水体中典型有机污染物莠去津和茚对斑马鱼胚胎的联合毒性进行了探索。研究结果表明,当受精后3 h斑马鱼胚胎单一暴露于莠去津或茚120 h后,均观察到明显的卵黄囊吸收延迟、水肿和脊柱弯曲等异常发育情况,因此选择这两个毒性终点进行后续的联合毒性研究。卵黄是斑马鱼开始进食前的营养来源,而卵黄囊异常(如水肿)是斑马鱼发育毒性筛查中常见的指标,包括多环芳烃在内的多种有毒物质已被证明可引起斑马鱼胚胎的卵黄囊水肿^[27]。卵

黄囊水肿可能是由水渗透屏障失衡引起的^[28],而水渗透调节由鳃和消化系统维持^[29],卵黄囊吸收延迟表明斑马鱼在营养吸收方面出现问题,这可能造成进一步的生长发育阻滞等干扰,相似的现象也在非洲爪蟾和受精后72 h斑马鱼胚胎中被观察到^[15,30]。脊柱弯曲可能是由骨骼发育不良或神经系统被破坏引起的,且通常会导致斑马鱼运动受损^[31]。卵黄囊异常是中低浓度下二元联合暴露更为敏感的联合毒性指标,说明莠去津和茚的毒性可能干扰斑马鱼胚胎的鳃和消化系统的生长发育,进而造成其他发育畸形。

本研究发现,CA和IA模型的预测值均高于实验值,表明莠去津和茚之间可能存在相互作用。CI指数随二元混合物浓度的变化在两个毒性指标上呈现不同的趋势,在低剂量水平下,二元混合物倾向于引起卵黄囊异常,高剂量水平下则倾向于引起脊柱弯曲。在相同类型的毒性指标上,莠去津和茚的作用是不同的,因此,当二者以一定的浓度比例混合时,它们可能会相互作用。随着混合暴露剂量的增加,卵黄囊异常毒性作用由协同转为拮抗,而脊柱弯曲毒性则出现相反的趋势,可见不同剂量下的联合毒性作用表现形式不同。污染物间的联合作用方式往往比较复杂,例如,有研究表明,同样是典型水体污染物的全氟辛

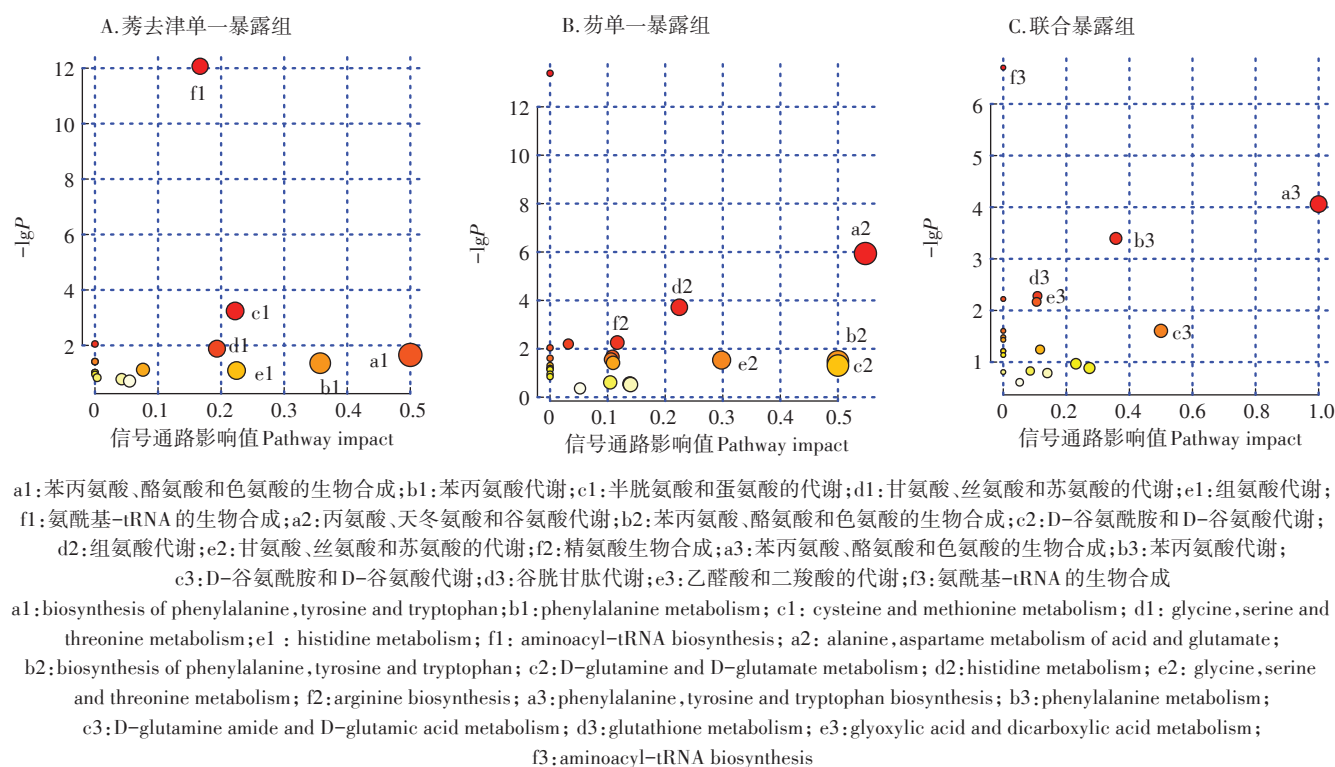


图8 暴露组斑马鱼仔鱼差异代谢物的代谢通路分析

Figure 8 Metabolic pathway analysis of differential metabolites in zebrafish larvae of exposure group

酸和全氟辛烷磺酸表现出更加复杂的相互作用,从协同作用转变为拮抗作用,最后又转变为协同作用^[32]。当多种农药残留污染共同产生“1+1>2”的协同作用时,混合污染物的生态毒理效应和风险评估更应当引起重视,其复杂的毒性机理也有待深入研究。

靶向氨基酸代谢组分析结果表明,莠去津和茚的单一和联合暴露均对斑马鱼仔鱼的氨基酸代谢产生了一定干扰,造成部分氨基酸上调或下调。在22种氨基酸中筛选出差异常代谢并进行代谢通路分析,发现联合和单一暴露对代谢通路的影响也有异同。其中,单一污染物暴露均影响了甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸代谢,这可能反映了斑马鱼仔鱼体内的氧化应激、磷脂的合成、能量代谢及抗炎反应受到一定影响。莠去津单一暴露和联合暴露处理还影响了氨酰基-tRNA的生物合成,说明细胞合成蛋白质的功能可能受损。茚单一暴露和联合暴露均影响了D-谷氨酰胺和D-谷氨酸代谢,谷氨酸是一种重要的神经递质,并参与谷氨酰胺的合成,而谷氨酰胺具有免疫调节和提高抗氧化能力的作用^[33],因此谷氨酰胺和谷氨酸代谢受干扰可能会影响斑马鱼仔鱼神经系统和免疫系统发育。另外,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成在联合和单一暴露后均受到干扰,这3种芳香族氨基酸参与斑马鱼的神经发育,苯丙氨酸是酪氨酸的前体物质,而酪氨酸和色氨酸是多种神经递质的前体,如多巴胺、五羟色氨酸、血清素和褪黑素,它们的代谢紊乱会影响神经递质的传递^[34-35],因此苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成受干扰引起的神经系统受损可能是斑马鱼仔鱼出现脊柱弯曲的原因。除此以外,莠去津单一暴露还影响了半胱氨酸和蛋氨酸的代谢,表明斑马鱼仔鱼的机体防御机制和细胞凋亡机制可能受到影响;茚单一暴露还影响了丙氨酸、天冬氨酸、谷氨酸代谢和精氨酸生物合成,可能反映斑马鱼仔鱼体内氧化应激受到影响,神经元、免疫和激素合成受损;联合暴露还影响了谷胱甘肽、乙醛酸、二羧酸的代谢等途径,表明联合暴露可能使斑马鱼仔鱼氧化应激、能量代谢等生理功能受到干扰。这些因素可能是莠去津和茚造成斑马鱼仔鱼出现卵黄囊异常和脊柱弯曲等异常的原因,但由于相关代谢物功能上的复杂性,其联合毒性作用机制还需进一步研究。

4 结论

(1)莠去津和茚单一暴露120 h后均会引起斑马鱼仔鱼的卵黄囊异常和脊柱弯曲,其中卵黄囊异常这

一指标更为敏感,且茚的毒性明显高于莠去津。

(2)二元混合暴露在引起卵黄囊异常和脊柱弯曲中分别呈现出拮抗作用和协同作用,中低浓度下卵黄囊异常可能是联合毒性的敏感指标,而高剂量水平下引起脊柱弯曲的风险更高。无论低剂量还是高剂量,二元混合物都比单一作用时毒性风险更高。

(3)靶向氨基酸代谢组分析及氨基酸差异代谢物的筛选和通路分析结果表明,污染物暴露干扰了斑马鱼仔鱼甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和组氨酸代谢等途径,表明其神经发育、氧化应激、抗炎机制、能量代谢、免疫和细胞凋亡机制等生理功能可能受到干扰,进而影响了生长发育。

参考文献:

- [1] LI D, ZHANG L, ZHANG Y, et al. Maternal exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) causes liver toxicity through PPAR- α pathway and lowered histone acetylation in female offspring mice[J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(18):18866-18875.
- [2] SIMRANJEET S, VIJAY K, ARUN C, et al. Toxicity, degradation and analysis of the herbicide atrazine[J]. *Environmental Chemistry Letters*, 2018, 16:211-237.
- [3] RENATA M, DAIANA S, HELOISE B, et al. Occurrence, impacts and general aspects of pesticides in surface water: A review[J]. *Process Safety and Environmental Protection*, 2020, 135:22-37.
- [4] KADOUM A M, MOCK D E. Herbicide and insecticide residues in tail-water and pit bottom soil from irrigated corn and sorghum fields[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1978, 26:45-50.
- [5] YING P, WENDI F, MARTIN K, et al. Screening hundreds of emerging organic pollutants (EOPs) in surface water from the Yangtze River Delta (YRD): Occurrence, distribution, ecological risk[J]. *Environmental Pollution*, 2018, 241:484-493.
- [6] BHATTI J S, SIDHU I P S, BHATTI G K. Ameliorative action of melatonin on oxidative damage induced by atrazine toxicity in rat erythrocytes[J]. *Molecular & Cellular Biochemistry*, 2011, 353(1/2):139-149.
- [7] WIEGAND C, PFLUGMACHER S, GIESE M, et al. Uptake, toxicity, and effects on detoxication enzymes of atrazine and trifluoroacetate in embryos of zebrafish[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2000, 45(2):122-131.
- [8] 吕耀中, 杨光, 赵剑. 莠去津原药大鼠致畸毒性试验[J]. *农药*, 2018, 57(2):117-119. LÜ Y Z, YANG G, ZHAO J. Teratogenicity test of atrazine on rats[J]. *Agrochemicals*, 2018, 57(2):117-119.
- [9] 孙胜男, 张治斌, 王倩, 等. 阿特拉津和毒死蜱对东北林蛙的急性毒性研究[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2017(5):205-208. SUN S N, ZHANG Z B, WANG Q, et al. Acute toxicity of atrazine and chlorpyrifos to rana chensinensis[J]. *Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine*, 2017(5):205-208.
- [10] 郝明娇, 王静慧, 王丰, 等. 除草剂阿特拉津对斑马鱼胚胎毒性的研究[J]. *科技视界*, 2018(22):68-69. HAO M J, WANG J H,

- WANG F, et al. Study on the toxicity of herbicide atrazine to zebrafish embryos[J]. *Science & Technology Vision*, 2018(22):68-69.
- [11] 赵菁, 刘剑, 张敏, 等. 除草剂阿特拉津的免疫毒性及其对大鼠免疫功能的影响[J]. 吉林大学学报(医学版), 2018, 44(6):1163-1168. ZHAO J, LIU J, ZHANG M, et al. Immunotoxicity of herbicide atrazine and its effect on immune function of rats[J]. *Journal of Jilin University(Medicine Edition)*, 2018, 44(6):1163-1168.
- [12] 汪如婷, 雒晓芳, 田丹妮, 等. 铜绿假单胞菌对萘和非降解特性研究[J]. 中国酿造, 2015, 34(10):82-85. WANG R T, LUO X F, TIAN D N, et al. Research on the degradation characteristics of naphthalene and phenanthrene by *Pseudomonas aeruginosa*[J]. *China Brewing*, 2015, 34(10):82-85.
- [13] 王春花, 梁丽君, 张静姝, 等. 某城市再生水中多环芳烃健康风险评估研究[J]. 环境与健康杂志, 2010, 27(9):800-803. WANG C H, LIANG L J, ZHANG J S, et al. Health risk assessment of PAHs in reclaimed water in a city[J]. *Journal of Environment and Health*, 2010, 27(9):800-803.
- [14] VIJAYAVEL K, GOMATHI R D, DURGABHAVANI K, et al. Sublethal effect of naphthalene on lipid peroxidation and antioxidant status in the edible marine crab *Scylla serrata*[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2004, 48(5):429-433.
- [15] 刘翔宇, 孙力平, 陈旭, 等. 茚对斑马鱼不同发育阶段毒性效应的比较[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(2):284-290. LIU X Y, SUN L P, CHEN X, et al. Comparison of fluorene toxic effect on different stages of zebrafish[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(2):284-290.
- [16] PEIFFER J, COSNIER F, GROVA N, et al. Neurobehavioral toxicity of a repeated exposure (14 days) to the airborne polycyclic aromatic hydrocarbon fluorene in adult Wistar male rats[J]. *Toxicology Letters*, 2010, 8:223-224.
- [17] PECQUET A M, MAIER A, KASPER S, et al. Exposure to perfluorooctanoic acid (PFOA) decreases neutrophil migration response to injury in zebrafish embryos[J]. *BMC Research Notes*, 2020, 13:408.
- [18] 耿柠波, 张海军, 王菲迪, 等. 代谢组学技术在环境毒理学研究中的应用[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(3):26-35. GENG N B, ZHANG H J, WANG F D, et al. A review on the application of metabolomic approaches in environmental toxicology[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(3):26-35.
- [19] STANISŁAW B, PATYK O, EWA B. Degradation of soil environment in the post-flooding area: Content of polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) and s-triazine herbicides[J]. *Journal of Environmental Science and Health*, 2003, 38(6):799-812.
- [20] HAGENAARS A, VERGAUWEN L, BENOOT D, et al. Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(6):844-856.
- [21] CHAI T, CUI F, YIN Z, et al. Chiral PCB 91 and 149 toxicity testing in embryo and larvae (*Danio rerio*): Application of targeted metabolomics via UPLC-MS/MS[J]. *Scientific Reports*, 2016, 6:33481.
- [22] 刘平香. 基于代谢组学的大蒜生长贮藏过程中特征成分变化研究[D]. 北京: 中国农业科学院, 2020. LIU P X. Distinct changes of characteristic compounds in garlic during growth and storage based on metabolomics[D]. Beijing: Chinese Academy of Agricultural Sciences, 2020.
- [23] ROBERT L, JAN W, TANIA H, et al. Polar herbicides, pharmaceutical products, perfluorooctanesulfonate (PFOS), perfluorooctanoate (PFOA), and nonylphenol and its carboxylates and ethoxylates in surface and tap waters around Lake Maggiore in Northern Italy[J]. *Analytical and Bioanalytical Chemistry*, 2007, 387(4):1469-1478.
- [24] GRECO W R, BRAVO G, PARSONS J C. The search for synergy: A critical review from a response surface perspective[J]. *Pharmacological Reviews*, 1995, 47(2):331-385.
- [25] ROLF A, THOMAS B, WOLFGANG B, et al. Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: Mixtures composed of similarly acting chemicals[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2000, 19(9):2341-2347.
- [26] WANG Y, WU Y, CHEN J, et al. Single and joint toxicity assessment of four currently used pesticides to zebrafish (*Danio rerio*) using traditional and molecular endpoints[J]. *Chemosphere*, 2018, 192:14-23.
- [27] SANT K E, TIMME-LARAGY A R. Zebrafish as a model for toxicological perturbation of yolk and nutrition in the early embryo[J]. *Current Environmental Health Reports*, 2018, 5(1):125-133.
- [28] HAGENAARS A, VERGAUWEN L, BENOOT D, et al. Mechanistic toxicity study of perfluorooctanoic acid in zebrafish suggests mitochondrial dysfunction to play a key role in PFOA toxicity[J]. *Chemosphere*, 2013, 91(6):844-856.
- [29] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish[J]. *Human Molecular Genetics*, 1995, 203(3):253-310.
- [30] JACQUELINE L, SCAHILL. Effects of atrazine on embryonic development of fathead minnows (*Pimephales promelas*) and *Xenopus laevis* [J]. *BIOS*, 2008, 79(4):139-149.
- [31] FRAYSSE B, MONS R, GARRIC J. Development of a zebrafish 4-day embryo-larval bioassay to assess toxicity of chemicals[J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2006, 63(2):253-267.
- [32] DING G, ZHANG J, CHEN Y, et al. Combined effects of PFOS and PFOA on zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. *Archives of environmental contamination and toxicology*[J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2013, 64(4):668-675.
- [33] MELDRUM B S. Glutamate as a neurotransmitter in the brain: Review of physiology and pathology[J]. *The Journal of Nutrition*, 2000, 130(4):1007-1015.
- [34] HARMER C J, MCTAVISH S F B, CLARK L, et al. Tyrosine depletion attenuates dopamine function in healthy volunteers[J]. *Psychopharmacology*, 2001, 154(1):105-111.
- [35] RODAN L H, GIBSON K M, PEARL P L. Clinical use of CSF neurotransmitters[J]. *Pediatric Neurology*, 2015, 53(4):277-286.