

四环素和砷对斑马鱼的联合毒性及机制

李欢,张静丽,张诗雨,石明浩,谢年,周柔静,刘苏* (中国药科大学工学院环境科学教研室,江苏南京 211198)

摘要: 选取斑马鱼为模式生物,研究 TET(四环素)和 As(砷)对斑马鱼的联合毒性.结果表明,50 μ g/L TET 和 100 μ g/L As 的联合暴露显著增加斑马鱼体内氧化应激(*GPx*)、炎症因子(*TNF- α*)和凋亡因子(*C-jun*)相关基因表达,造成肠道和肝脏组织更严重的损伤.50 μ g/L TET 和 100 μ g/L As 联合暴露呈现的协同毒性效应与 *P-gp* 基因被抑制介导的 As 在肠道和肝脏蓄积量[(704.15 \pm 24.50)ng/g 和(458.35 \pm 24.25ng/g)]显著增加有关.此外,发现肠道的通透性及微生物群落结构的变化对 TET 和 As 协同毒性无明显影响.

关键词: 四环素(TET); 砷(As); 斑马鱼; 联合毒性

中图分类号: X174 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2021)07-3371-10

Combined toxicity and underlying mechanism of tetracycline and arsenic on zebrafish. LI Huan, ZHANG Jing-li, ZHANG Shi-yu, SHI Ming-hao, XIE Nian, ZHOU Rou-jing, LIU Su* (Department of Environmental Science, School of Engineering, China Pharmaceutical University, Nanjing 211198, China). *China Environmental Science*, 2021,41(7): 3371~3380

Abstract: Zebrafish was selected as the model organism to explore the combined toxicity of TET and As on aquatic organisms. The results showed that the combined exposure of 50 μ g/L TET and 100 μ g/L As significantly increased gene expression of oxidative stress (*GPx*), inflammatory factors (*TNF- α*) and apoptosis factors (*C-jun*), and caused severer damage to the intestine and liver in zebrafish. The synergistic toxicity of 50 μ g/L TET and 100 μ g/L As was related to the inhibition of *P-gp* gene, which significantly increased the accumulation of As in intestinal tract and liver [(704.15 \pm 24.50)ng/g and (458.35 \pm 24.25ng/g)]. In addition, the results of this study indicated that the changes of intestinal permeability and microbial community structure had little effect on the synergistic toxicity of TET and As. The results of this study provided basic data for the evaluation of the combined effects of TET and As.

Key words: TET; As; zebrafish; combined toxicity

近年来抗生素被广泛应用于疾病防治、农业生产、畜牧及水产养殖等领域^[1],在使用的过程中,大部分抗生素被生物体排出体外,造成了其在环境中的大量积累,其中,四环素类(TCs)抗生素因成本低、抗菌谱广而成为动物医疗中应用最广泛的抗生素之一^[2].尽管环境水体中 TCs 的检出浓度很低,但由于其在养殖业和畜牧业中被长期频繁使用,残留在环境中的 TCs 总量大,对水生生态系统和人体健康构成极大的潜在威胁.研究表明,TCs 及其代谢产物在水体中不仅会诱导生物产生抗性基因,还会对水生生物及人类产生潜在的毒性效应^[3].其中,盐酸四环素(TET)作为重要的 TCs 之一,在环境中分布范围广、积累浓度高且不易降解,更应值得关注^[4-5].TET 能够抑制或诱导还原型谷胱甘肽(GSH)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)的活性,并对鱼类造成严重的 DNA 损伤和免疫毒性^[6].因此,TET 在水生环境中的大量残留带来的潜在风险不容忽视.

在实际水环境中,TET 往往与一种或多种毒害

污染物共存,污染物共存的多样性使得复合污染物的形态和毒性效应更为复杂^[7].研究表明,TET 可能会影响其他共暴露污染物的毒性效应.例如,TET 与 Cu 联合暴露时会发生络合反应,降低 Cu 的生物可利用度,进而显著降低 Cu 对斑马鱼胚胎的发育毒性,表现出拮抗作用^[1].TET 和纳米二氧化钛(TiO₂-NPs)联合暴露时会增加 TiO₂-NPs 与大肠杆菌细胞接触的面积,抑制细胞内外的物质运输,导致细胞的代谢中断或死亡,表现出明显的协同作用^[8].砷(As)是一种高毒的环境污染物,广泛存在于世界各地的环境水体中^[9].As 的广泛分布极大地增加了其与 TET 共存的可能性.As 的过量摄入会显著增加人群健康风险^[10],氧化应激被认为是 As 对水生生物和哺乳动物产生毒性最重要的致毒机制^[11].TET 的重要致毒机制之一也是通过诱导氧化应激效应对斑马鱼等水生生物造成损伤^[12].TET 和 As 联合暴露时是否会通

收稿日期: 2020-12-21

基金项目: 中国药科大学基本科研业务费重点项目(2632020ZD12)

* 责任作者, 讲师, suliu@cpu.edu.cn

过诱导氧化应激对水生生物产生更为严重的损伤尚不清楚.鉴于此,有必要对 TET 和 As 的联合毒性进行评估.

由于斑马鱼具有发育快、繁殖力强和遗传同源性高等优势,是研究环境污染物毒性效应和环境风险的重要模式物种^[13],在污染物的联合毒性研究中也被广泛使用.因此,为探究 TET 和 As 联合暴露下对水生生物的毒性效应,本文选用斑马鱼作为模式生物,结合组织病理学、基因表达、As 的含量测定和肠道微生物群落结构的变化来评估 TET 和 As 的联合毒性效应,旨在为 TET 和 As 的环境风险评价提供基础数据.

1 材料和方法

1.1 实验动物和暴露实验设计

实验使用 4 月龄、健康状态良好的雄性斑马鱼,购于中国科学院水生生物研究所(武汉),使用容积为 14L 并配有 LED 灯和曝气装置的鱼缸进行饲养,每缸饲养 60 条斑马鱼.养殖水选用经紫外灯照射、除氯 24h 的自来水,水温控制(26 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,pH 值控制在 7~8,明暗周期为 14h/10h.每天早晚投喂丰年虾幼虫(丰年虾卵在海盐水中曝气孵化 24h 后使用分离器过滤得到).驯化 1 周后,斑马鱼随机分为 4 组,暴露方案见表 1.根据文献调研,我国多地地表水和地下水中 TET 和 As 的检测浓度已达到 $10\sim 50\mu\text{g/L}$ ^[8]和 $10\sim 100\mu\text{g/L}$ ^[10],结合早期对 TET 和 As 毒性评估时使用的暴露浓度^[4,14],本实验设置 TET 和 As 的暴露浓度分别为 50 和 $100\mu\text{g/L}$.实验中 TET 购于上海源叶生物科技有限公司.As(III) (As(III)ICP-MS 标准液)购

于上海安谱实验科技股份有限公司.在实验过程中,每天更换 1/3 左右养殖水.暴露 21d 后,对斑马鱼进行冰冻处死,使用直尺和分析天平分别记录斑马鱼的体长和体重.随后对斑马鱼进行解剖,采集肠道、肝脏和肠内容物样品.剪取部分肠道和肝脏放入提前装有 1mL 福尔马林(4%甲醛)固定液(西陇科学股份有限公司)的 EP 管中.将剩余肠道、肝脏和肠道内容物放置于冻存管内使用液氮速冻后置于 -80°C 冰箱保存用于后续分析.

表 1 实验暴露方案

Table 1 Exposure strategy used in this study

序号	组别	As 暴露浓度($\mu\text{g/L}$)	TET 暴露浓度($\mu\text{g/L}$)
1	CK	0	0
2	TET	0	50
3	As	100	0
4	TET+As	100	50

1.2 组织病理学检测

将斑马鱼肠道和肝脏组织在 10%福尔马林缓冲液中固定 24h,用 70%、80%、90%、100%乙醇逐级脱水,将脱水后的组织先后浸渍于无水乙醇、二甲苯混合液及纯二甲苯中进行透明处理,随后经石蜡包埋,垂直切成 $4\mu\text{m}$ 切片黏附于载玻片上烘干备用.切片在着色前用二甲苯脱蜡,然后经乙醇溶液水化处理.使用苏木精-曙红(HE)染色,在 100、200 和 400 倍光学显微镜下观察和拍照,记录不同暴露组斑马鱼的组织病理学变化.

1.3 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测

表 2 目标基因的 qPCR 引物序列

Table 2 qPCR primer sequence of target gene

基因	正向引物序列(5'-3')	反向引物序列(5'-3')
<i>β-actin</i>	GTCCTGTACGCCTCTGGTCG	GCCGGACTCATCGTACTCCTG
<i>Claudin</i>	CACCACATCGACCTGTATG	TACCGGCTATTCTGCCTTIG
<i>Occludin</i>	CAAAATCAGGCAAAGGCTTC	AACAATAGTGGCGATGAGCA
<i>p53</i>	CAGGCCATCCTACAAT	ATTCTTCGCTTCACCA
<i>CAT</i>	TGAGGCTGGGTCATCAGATA	AAAGACGGAAACAGAAGCGT
<i>GPx</i>	ACCTGTCCGCGAAACTATTG	TGACTGTTGTGCCTCAAAGC
<i>TNF-α</i>	GGAGAGTTGCCTTTACCCT	CCTGGGTCTTATGGAGCGTG
<i>C-jun</i>	GGAGGCGATACGGGAGT	GTCACGTTCTTGGGACACAG
<i>P-gp</i>	AAAGCACAAAGGCAAAAAGG	TGTCAAACCACGACATCTGC
<i>MRP2</i>	TCAGCGAGTACACGGAGATG	GCACCTGTTCGACCCACTAT

斑马鱼肠道和肝脏组织样本的 RNA 提取使用 RNA 提取试剂盒(Takara, 日本)进行,利用超微量分光光度计(Thermo NanoDrop 2000, 美国)检测总 RNA 的纯度和浓度,以 OD_{260}/OD_{280} 作为 RNA 纯度的指标.对 RNA 进行逆转录合成 cDNA,逆转录试剂盒为 PrimeScriptRT reagent kit(TaKaRa, 日本).以 cDNA 为模板进行 RT-qPCR 反应.RT-qPCR 扩增条件如下:95℃ 预变性 30s;95℃ 变性 10s,60℃ 退火 30s,循环反应 40 次;循环完成后,将温度升至 95℃,持续 15s,然后升至 60℃,持续 1min,最后加热至 95℃,以获得聚合酶链式反应产物的溶解曲线.以 β -action 作为内参,使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法进行数据的相对定量分析,比较各组目的基因表达的差异.目的基因与内参引物序列如表 2 所示.

1.4 16S rRNA 测序及生物信息学分析

每组中随机选取 6 条斑马鱼的肠道内容物作为 1 个样本.采用 DNA 提取试剂盒(FastDNA® Spin Kit, MP Biomedicals, USA)提取样本中的 DNA.使用 PCR 纯化试剂盒(QIAquick PCR Purification Kit, QIAGEN, Germany)对得到的 PCR 产物进行纯化.PCR 扩增体系为:2*taq PCR mix:25 μ L Primer F (10 μ mol/L):1 μ L; Primer R(10 μ mol/L):1 μ L; gDNA: 2~10 μ L; ddH₂O:补足 50 μ L 体系 PCR 扩增程序:1、95℃ 5min; 2、94℃ 1min; 3、57℃ 45s; 4、72℃ 1min, 2~4 步 34 个循环; 5、72℃ 10min; 6、16℃ 5min. 选取 16S V3-4 区域进行扩增,该区域引物序列为:341F:CCTAYGGGRBGCASCAG; 806R:GGAACACNNGGGTATCTAAT.将纯化后的 PCR 产物在 Ion S5TMXL 高通量测序平台上测序.对原始数据进行拼接、过滤和处理以除去低质量的干扰数据.将预处

理后的测序数据利用 QIIME 软件作进一步的物种分类,对所有样品测序数据的 Effective Tags 以 97% 的相似性将序列聚类成为 OTU,并对 OTU 的代表序列进行物种注释.

1.5 电感耦合等离子体质谱(ICP-MS)分析

将液氮速冻后的肠道和肝脏新鲜样品放入冻干机中冷冻干燥.称量约 25mg 的冻干样本,并加入 2mL36%的硝酸与 2mL 40%的双氧水.经加热消解、赶酸和超纯水稀释定容至 1mL.组织提取液过 0.22 μ m 滤膜,利用 ICP-MS (Agilent 7700,安捷伦科技有限公司)在 KED 模式下测定 As 含量.

1.6 数据分析

运用 GraphPad prism 7.0 软件对实验所得数据进行统计分析,对照组和实验组之间的差异采用单因素方差分析.实验所有数据以(平均值 \pm 标准偏差)来表示.所有的统计结果中以 $P<0.05$ 视为具有显著性差异.

2 结果分析

2.1 TET 或/和 As 对斑马鱼表型特征的影响

如图 1 所示,与对照组相比,TET 或 As 的单独暴露未导致明显的体长变化.而 TET 和 As 联合暴露处理导致斑马鱼的体长显著地降低($P<0.05$).此外,与 TET 或 As 单独暴露时相比,TET 和 As 联合暴露时体长的减小也存在显著性差异($P<0.05$).与对照组相比,所有实验组的体重均无显著性变化($P>0.05$),而与 TET 组相比,TET 和 As 的联合暴露显著地改变了斑马鱼的体重($P<0.05$).结果表明 TET 和 As 的联合暴露显著加重了其单独暴露时对斑马鱼体长和体重的影响.

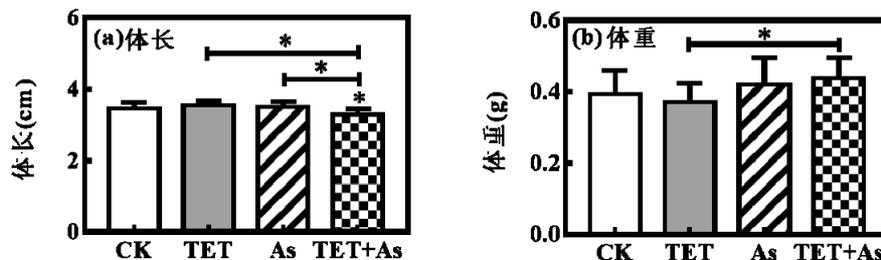


图 1 TET 或/和 As 的暴露对斑马鱼体长和体重的影响

Fig.1 Effects of TET or/and As exposure on body length and weight of zebrafish

2.2 TET 或/和 As 对肠道和肝脏组织病理学的影响

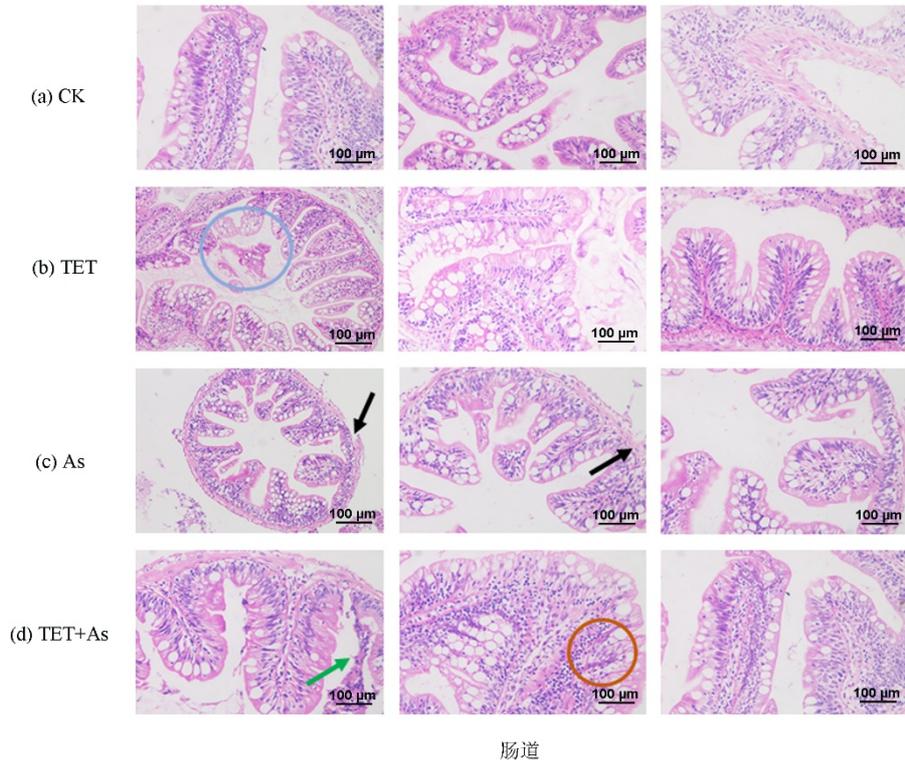


图2 斑马鱼肠道 HE 染色切片

Fig.2 HE staining section of zebrafish intestine

组织学变化包括上皮细胞脱落(蓝色圆圈),肠壁破裂(黑色箭头),炎性细胞浸润(绿色箭头),淤血(橙色圆圈)

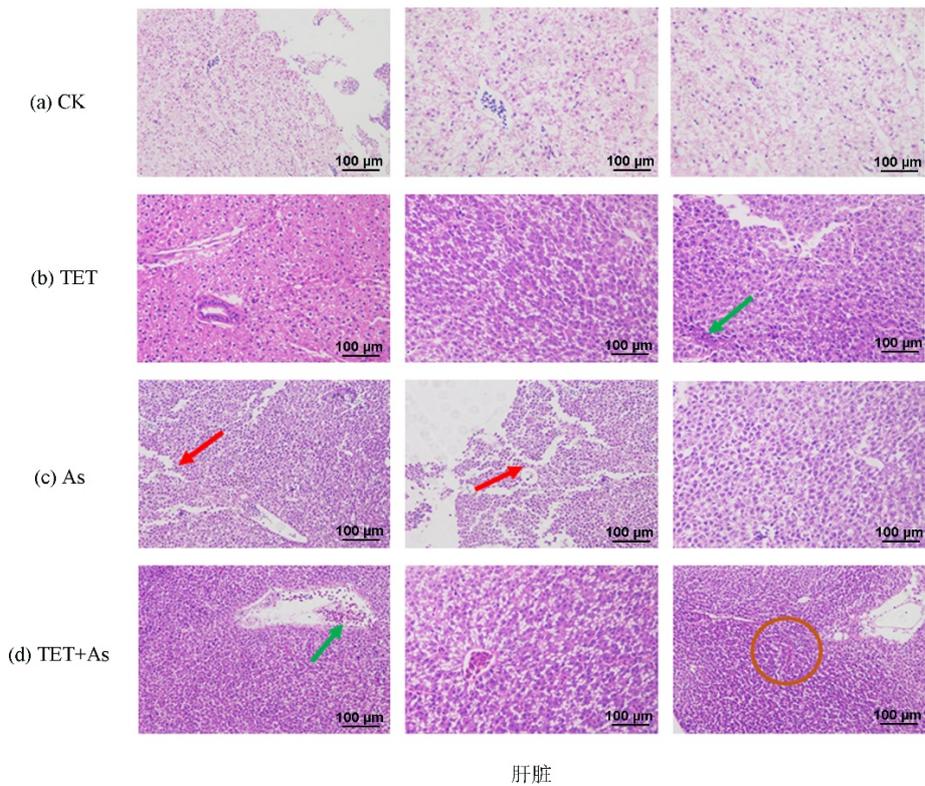


图3 斑马鱼肝脏 HE 染色切片

Fig.3 HE staining section of zebrafish liver

组织学变化包括炎性细胞(绿色箭头),肝索紊乱、窦间隙扩大(红色箭头),淤血(橙色圆圈)

利用 HE 染色观察肠道和肝脏的组织病理学变化.如图 2 所示,在对照组中肠绒毛整体形态比较完整,肠上皮细胞排列规则整齐,无明显的损伤.在 TET 组发现了轻微的肠粘膜上皮细胞脱落现象(蓝色圆圈).As 组出现了轻微的肠壁破裂的现象(黑色箭头).TET+As 组出现了明显的炎性细胞浸润(绿色箭头)并伴有出血的现象(橙色圆圈).肝脏的镜检结果与肠道相似,如图 3 所示,对照组的肝脏排列规则整齐,未见明显的病变现象.而在 TET 组中,观察

到了少量炎性细胞浸润的现象(绿色箭头).在 As 组中出现了肝索紊乱、窦间隙扩大的现象(红色箭头).在 TET 和 As 联合暴露组中观察到扩张的肝血窦中浸润大量炎性细胞(绿色箭头),局部血管周围出现出血的现象(橙色圆圈).组织病理学结果表明,TET 和 As 的联合暴露显著加重了其单独暴露时对肠道和肝脏组织的损伤.

2.3 TET 或/和 As 对肠道和肝脏重要功能基因表达的影响

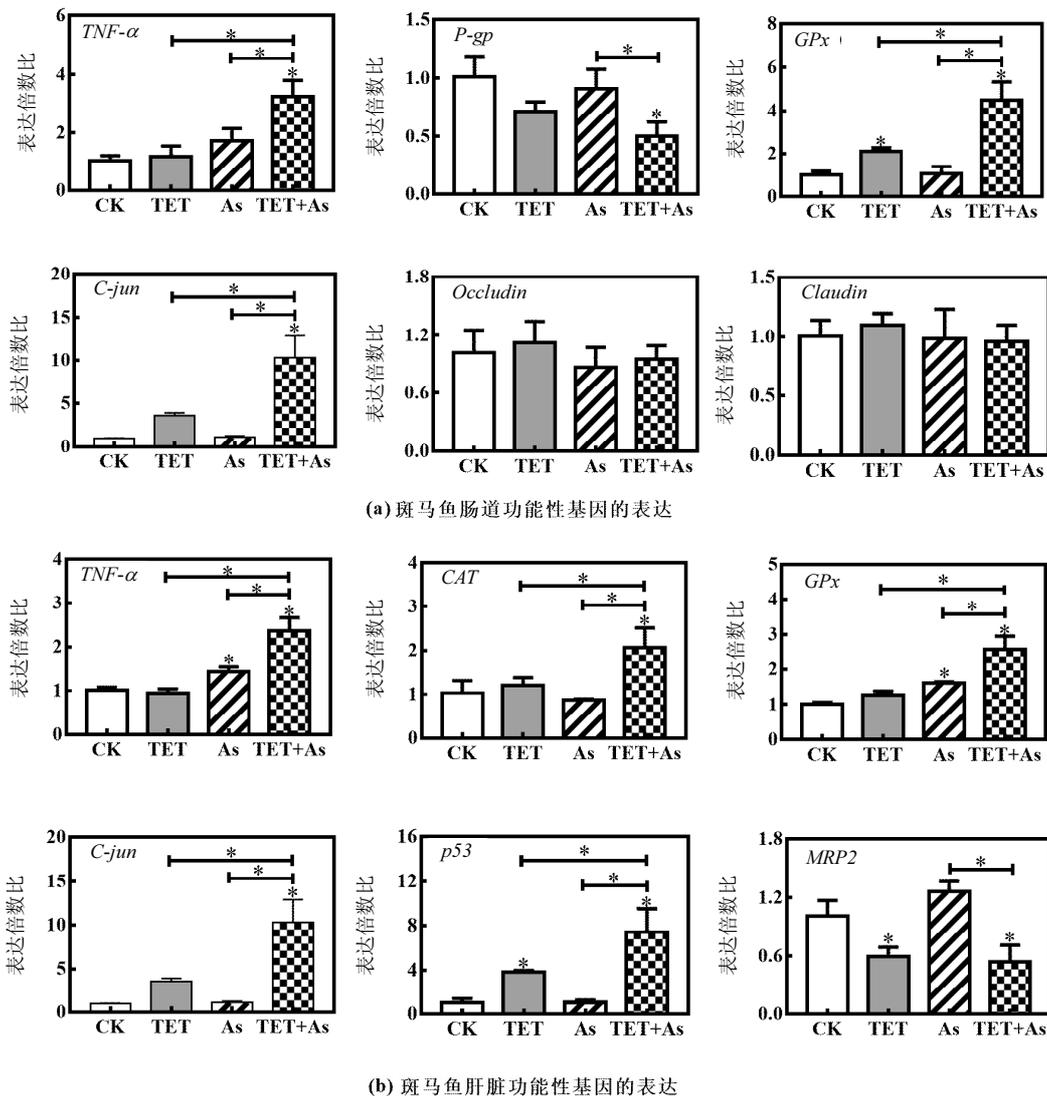


图 4 斑马鱼肠道和肝脏功能基因的表达

Fig.4 Expression of intestinal and liver functional genes in zebrafish

肠道的功能性基因表达结果如图 4(a)所示.与对照组相比,肿瘤坏死因子(*TNF-α*)的表达水平在 TET 组和 As 组均没有显著变化,而在 TET+As 组 *TNF-α* 的表达水平显著地上调 3.05 ± 0.55 倍 ($P < 0.05$).与 TET 和 As 的单独暴露相对比,TET 和 As 的

联合暴露也明显地增加了 *TNF-α* 的表达水平 ($P < 0.05$).P-糖蛋白(*P-gp*)基因的表达在 TET 组和 As 组均没有显著差异,而在 TET 和 As 联合暴露组中显著地下调,与 As 组相比,TET 和 As 联合暴露组中 *P-gp* 的表达也显著地下调.与 TET 和 As 的单独暴露相对

比,谷胱甘肽过氧化物酶(*GPx*)和原癌基因(*C-jun*)的表达在 TET+As 组中均显著上调.紧密连接蛋白(*Claudin-1*, *Occludin*)基因的表达在所有实验组中均无显著性差异($P>0.05$).肠道基因检测的结果表明 TET 和 As 的联合暴露会显著地加重其单独暴露时对肠道造成的损伤且这种损伤与肠道通透性的相关性不大.

肝脏的功能基因表达结果如图 4(b)所示,与对照组相比,As 和 TET+As 组中的 *TNF- α* 的表达水平显著上调($P<0.05$),分别上调了(1.42 ± 0.25)和(2.45 ± 0.45)倍.与 TET 和 As 的单独暴露相对比,TET 和 As 的联合暴露显著地增加了 *TNF- α* 的表达($P<0.05$).过氧化氢酶(*CAT*)和 *GPx* 的表达在 TET 组均没有显著性变化,而 TET+As 组中 *CAT* 和 *GPx* 基因的表达显著上调.此外,*C-jun* 和肿瘤抑制基因(*p53*)的表达水平在 TET+As 组中也显著增加($P<0.05$).与 TET 和 As 的单独暴露相对比,TET 和 As 的联合暴露明显地增加了 *CAT*、*GPx*、*C-jun* 和 *p53* 的表达水平($P<0.05$).*MRP2*(多药耐药相关蛋白

-2)基因的表达在 TET 和 TET+As 组中均显著地下调,与 As 组相比, TET 和 As 的联合暴露显著地下调了 *MRP2* 的表达水平.上述结果表明 TET 和 As 的联合暴露也会显著增加 TET 和 As 单独暴露时对斑马鱼肝脏的损伤.

2.4 TET 对 As 在肠道和肝脏分布的影响

利用 ICP-MS 检测 As 在斑马鱼肠道和肝脏的分布.肠道中 As 的浓度如图 5(a)所示,与对照组相比,As 和 TET+As 组中 As 的浓度均显著性增加($P<0.05$),分别达到($461.68\pm 20.35\text{ng/g}$)和($704.15\pm 24.50\text{ng/g}$).与 TET 组和 As 组相比,TET 和 As 的联合暴露显著地增加了 As 在斑马鱼肠道中的积累.肝脏中 As 的浓度如图 5(b)所示,与对照组相比,As 和 TET+As 组中 As 的浓度均显著性增加($P<0.05$),分别为(322.39 ± 22.28),(458.35 ± 24.25)ng/g.此外,与 TET 和 As 单独暴露时相比,TET 与 As 的联合暴露也显著性增加了 As 的积累($P<0.05$).对 As 在肠道和肝脏化学检测的结果表明 TET 和 As 的共暴露增加了肠道和肝脏中 As 的积累.

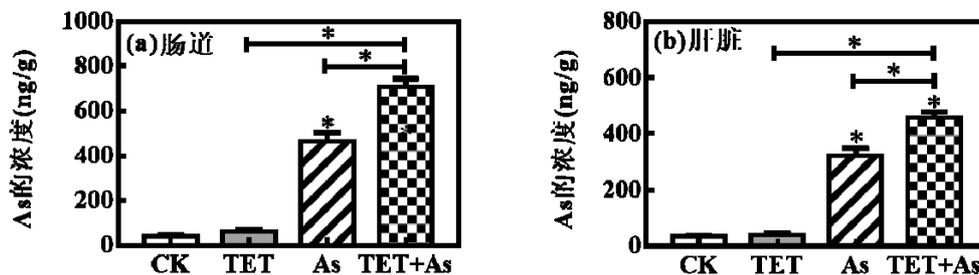


图 5 砷在肠道和肝脏中的浓度

Fig.5 The concentration of As in intestine and liver

2.5 TET 或/和 As 对肠道微生物群落的影响

基于 OTU 水平,对样本进行主成分分析(PCA)来确定不同暴露组间微生物群落的分布特征,其中每一个点表示一个斑马鱼肠道内容物样本,相同颜色的点表示来自同一个处理组,两点之间的距离越近表明两样品间的群落构成差异越小.如图 6(a)所示,TET 组、As 组和对照组相比均有明显的区分,而 TET+As 组与对照组差异性不大,这表明 TET 和 As 的单独暴露对肠道微生物群落结构具有显著地影响,但 TET 和 As 的联合暴露对肠道微生物群落的结构影响较小.如图 6(b)所示,与对照组相比,TET 和 As 的单独暴露分别引起 5825 和 3869 种不同微生物发

生变化,而 TET 和 As 联合暴露仅引起 623 种不同的微生物发生变化.该结果也表明 TET 或 As 的单独暴露显著地扰乱了肠道微生物群落结构,而 TET 和 As 的联合暴露对肠道微生物群落的影响较小.为观察斑马鱼肠道微生物在门(phylum)水平上的相对丰度,选取在门水平上的丰度信息,生成相对丰度堆积图.结果如图 7 所示,可以发现变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(actinobacteria)和厚壁菌门(Firmicutes)是斑马鱼肠道中的绝对优势菌.与对照组相比,TET 的暴露导致变形菌门的丰度从 38%上调至 87%,As 的暴露导致放线菌门的丰度从 15%上调至 52%,TET 和 As 的联合暴露与对照组无明显差异.经典

聚类分析(图 7a)的结果也表明 TET 组和 As 组与对照组相比有明显的区别,此外,TET 组与对照组

相比相距较远,这表明 TET 是影响肠道微生物群落变化的主要因素.

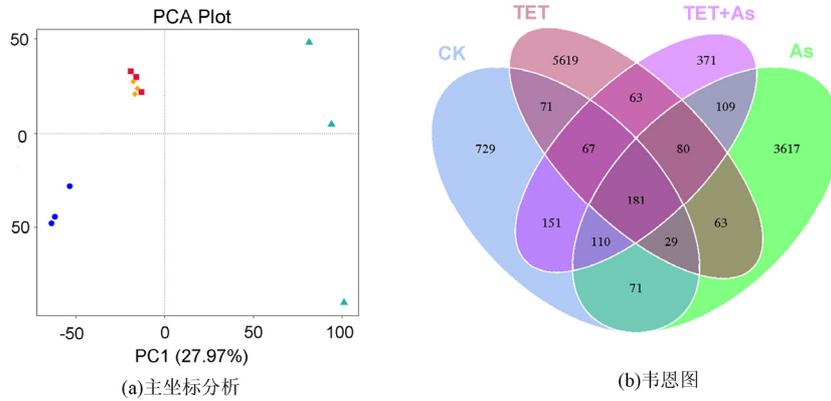


图 6 斑马鱼肠道微生物的主坐标分析和韦恩图

Fig.6 Principal coordinate analysis and venn diagram of zebrafish intestinal microorganism

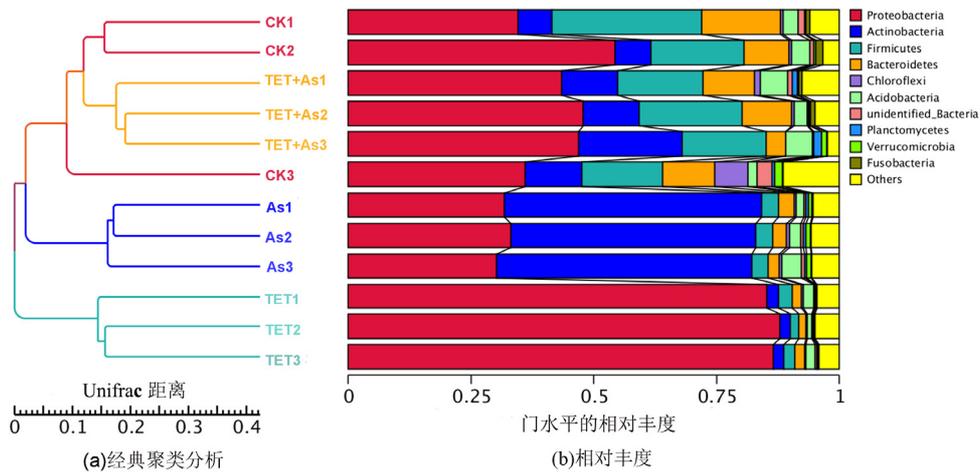


图 7 斑马鱼肠道微生物经典聚类分析和相对丰度

Fig.7 Classical cluster analysis and relative abundance of intestinal microorganism

3 讨论

TET 和 As 在水环境中的广泛分布对环境 and 人体健康存在严重风险.尽管 TET 和 As 各自的毒性效应已有不少文献报道,但关于 TET 和 As 同时暴露的联合毒性效应及其机制的研究鲜有报道.本研究以斑马鱼为模式生物,研究了 50μg/L TET 和 100μg/L As 的单一暴露和联合暴露对斑马鱼肠道和肝脏的影响.结果表明 50μg/L TET 的暴露能够轻微地导致斑马鱼肠绒毛结构破坏,肝脏炎性细胞浸润.100μg/L As 的暴露可引起斑马鱼肠壁破裂,肝索紊乱和窦间隙扩大.此外 TET 和 As 的单一暴露均能够诱导斑马鱼肠道和肝脏一定程度的氧化损伤并诱导肠道微

生物群落发生显著的变化.与 TET 和 As 的单一暴露相比,TET 和 As 的联合暴露能够显著增加氧化应激、炎症因子和凋亡因子相关基因的表达,加重肠黏膜的纤毛损伤和出血,诱导肝脏血管周围出血和炎性细胞浸润.此外还发现两者的联合暴露显著增加了 As 在肠道和肝脏的累积,这可能是造成 TET 和 As 对斑马鱼肠道和肝脏的协同毒性的主要原因.

TET 进入水环境导致的生态毒性效应已经引起人们的高度关注.据报道,20μg/L TET 能够造成斑马鱼胚胎或幼虫体长缩短、孵化延迟和卵黄囊面积增加等^[13].100μg/L TET 的暴露可造成肠道微生物群落结构紊乱,以及肝脏脂肪积累^[15].本研究中也发现了相似的结论,50μg/L TET 能够显著地增加斑马

鱼肠道中变形菌门的丰度,并诱导肝脏组织出现少量炎性细胞(图3,图7).有研究认为,氧化应激是污染物导致动物体内诱发毒性和疾病发生的重要机制.在抗氧化防御系统中,CAT和SOD是抵抗ROS的第一道防线,SOD能够催化 O_2^- 转变成 H_2O_2 ,最后在CAT或GPx的作用下转变成 H_2O ^[16].GPx是一种重要的抗氧化酶,可作为环境污染物诱导氧化应激的生物标志物^[17].本研究发现TET暴露能显著增加肠道中GPx基因的表达,这可能由于TET的暴露诱导斑马鱼肠道产生过量的ROS,激活氧化系统,从而使GPx表达上调.以上数据证实了TET对斑马鱼的生态毒性.

研究表明,As会在白粉鱼的肝、肾和肠等脏器中积累,并对肝、肾和肠道造成病理学损伤^[14].本研究证实100 μ g/L As的暴露能够显著诱导斑马鱼肝脏炎症因子(*TNF- α*)的表达上调,破坏肠道上皮细胞进而造成组织病理损伤.As诱导生物毒性的潜在机制被认为与氧化应激有关^[11].As可以诱导ROS的增加,破坏蛋白质和DNA或与构成细胞膜的脂肪发生化学反应,产生更具破坏性的脂质自由基,进而破坏细胞膜的完整性和功能^[17].本研究表明As的暴露能够显著上调斑马鱼肝脏中GPx基因的表达,进一步证实了氧化应激在As诱导斑马鱼毒性中的作用.

TET和As的共暴露进一步加剧了对斑马鱼毒性的复杂性.本研究发现,与TET和As的单一暴露相比,TET和As的联合暴露对斑马鱼的肠道和肝脏的毒性效应具有协同作用.As与环境污染物的协同效应在其他研究中也有报道.例如,As和阿特拉津都具有潜在的致畸性和遗传毒性,并可引起斑马鱼胚胎的氧化应激,联合暴露时形成毒性更强的中间代谢物,造成对斑马鱼的更高毒性^[18].As和甲基化硒化合物联合暴露时,能够阻断部分甲基化形式的解毒过程(如甲基化),引起氧化应激水平的提高,表现出明显的协同毒性^[19].本研究表明TET和As联合暴露能够明显地增加氧化应激、炎症因子和凋亡因子的表达,对斑马鱼的肠道和肝脏造成更严重的损伤.

As的毒性在TET和As的协同毒性中发挥着重要的作用.As的毒性效应与其形态有着密切联系,通常认为As(V)的毒性远远低于As(III)^[20-21].早期的研究表明肠道微生物群落的变化可能会导致As的

毒性发生改变.例如,某些肠道微生物能够将As(III)主动代谢为As(V),从而导致As的毒性发生改变^[22].本研究发现TET和As暴露能够明显地影响斑马鱼肠道中变形菌门和放线菌门等优势菌群的丰度,而TET和As的联合暴露对肠道微生物群落结构影响不大,这个结果表明肠道微生物群落的变化并非是造成TET和As的协同毒性的原因.微生物群落的变化与环境污染物的毒性效应的表征并非完全一致,这一现象在文献中曾被报道,如口服纳米银(AgNPs)诱导小鼠肠道和肝脏严重的炎症和氧化损伤,而小鼠肠道微生物群的组成、结构和多样性并未发生明显变化^[23].推测这可能与PCA分析方法有关,首先PCA是建立在微生物DNA提取的基础上进行分析,据文献报道目前肠道微生物提取效率有限,部分微生物并未被提取到^[24],其次,PCA的分析是研究肠道菌群的整体差异,忽略了特异性^[25],本研究中肠道和肝脏具体毒性指标属于特异性指标,相对于整体微生物群落的变化指标属于不同的体系,这可能是导致TET和As联合暴露下微生物菌群的变化与毒性效应表征不一致的原因.另外,斑马鱼肠道微生物优势菌群主要有厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门等,当起毒性作用的属于少部分微生物时,由于其变化在整个微生物群中所占的比例很小,导致其在PCA中没有体现出来时,可能也会导致微生物的结果和联合毒性的结果不同^[26].据以往文献报道,生物有效性的变化对污染物的毒性也有显著的影响,如纳米二氧化钛(TiO_2)的加入能够显著增强斑马鱼幼鱼对铅的生物累积和吸收,并增强铅对中枢神经系统的发育毒性,导致斑马鱼幼鱼甲状腺内分泌和神经系统的紊乱^[27].Cu会增加氟喹诺酮类化合物(FQS)在斑马鱼肠道和肝脏中的积累,进而造成严重的损伤^[28].本研究中TET的存在显著地增加了As在肠道和肝脏的积累,进而诱导对肠道和肝脏更严重的损伤.肠道通透性对污染物在生物体内的积累有显著的影响.正常的肠道黏膜屏障能够有效阻止污染物进入机体,保护机体不受外界的伤害^[29].然而据报道肠道通透性的破坏会显著地增加污染物在肠道和肝脏中的积累,进而对肠道和肝脏造成一定的损伤^[30].Occludin是一种肠上皮紧密连接蛋白,在肠屏障中发挥重要作用,它对于维持肠粘膜通透性至关重要^[31].本研究发现Occludin基因的表达水平在各实

验组中均无显著性差异,这表明 TET 和 As 的协同毒性可能与肠道通透性的变化无关。*P-gp* 是位于小肠粘膜上皮细胞的膜转运蛋白,能够将进入细胞的外源化学物以主动转运的方式泵出细胞外,对进入细胞内的物质生物利用度有显著影响^[32]。前人的研究表明 *mdr1a/1b* 双基因敲除的小鼠由于 *P-gp* 蛋白的活性受到抑制,会导致 As 的排出受到限制,组织中的 As 蓄积增加,显著地加剧了 As 的急性毒性^[33]。本研究发现 TET 和 As 的联合暴露能够明显下调 *P-gp* 基因在肠道的表达。基于以上分析,推测 TET 和 As 的联合暴露导致斑马鱼肠道中 *P-gp* 基因的活性受到抑制,使 As 的外排量减少,增加了 As 在肠道的积累,部分 As 通过血液循环到达肝脏,对肠道和肝脏造成严重的损伤。

4 结论

4.1 TET 和 As 的单一暴露可导致斑马鱼肠绒毛结构破坏,肝脏炎性细胞浸润,并诱导斑马鱼肠道和肝脏一定程度的氧化损伤。

4.2 与 TET 和 As 的单一暴露相比,TET 和 As 的联合暴露对斑马鱼的肠道和肝脏均产生明显的协同毒性,这可能与 *P-gp* 基因被抑制介导的 As 蓄积增加有关。

参考文献:

- [1] 章 强,辛 琦,强丽媛,等.铜及其与四环素的联合暴露对斑马鱼胚胎的毒性效应 [J]. 生态毒理学报, 2015,10(5):35-46.
Zhang Q, Xin Q, Qiang L Y, et al. Developmental toxicity of Cu and tetracycline on zebrafish embryos (*Danio rerio*) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015,10(5):35-46.
- [2] Gallo A, Landi R, Rubino V, et al. Oxytetracycline induces DNA damage and epigenetic changes: a possible risk for human and animal health? [J]. PeerJ, 2017,5(5):e3236
- [3] Qiao M, Ying G G, Singer A C, et al. Review of antibiotic resistance in China and its environment [J]. Environment International, 2018,110(1): 160-172.
- [4] Grenni P, Ancona V, Barra Caracciolo A. Ecological effects of antibiotics on natural ecosystems: A review [J]. Microchemical Journal, 2017,136:25-39.
- [5] 李旭辉,蒙耿剑,朱伟刚,等.DGT 分析水中四环素类抗生素自由溶解态浓度 [J]. 中国环境科学, 2020,40(9):4058-4064.
Li X H, Meng G J, Zhu W G, et al. Determination of the freely dissolved concentration of tetracyclines in water with diffusive gradients in thin-films technology(DGT) [J]. Chinese Environmental Science, 2020,40(9):4058-4064.
- [6] Isidori M, Lavorgna M, Nardelli A, et al. Toxic and genotoxic evaluation of six antibiotics on non-target organisms [J]. Science of the Total Environment, 2005,346:87-98.
- [7] 李旭飞,巫晓丹,孙昊宇,等.抗生素和纳米银对大肠杆菌耐药性的联合效应 [J]. 中国环境科学, 2020,40(11):5045-5054.
Li X F, Wu X D, Sun H Y, et al. Joint effects of antibiotics and silver nanoparticles on resistance of *Escherichia coli* [J]. Chinese Environmental Science, 2020,40(11):5045-5054.
- [8] Mohapatra, Soudamini. Persistence and dissipation kinetics of trifloxystrobin and tebuconazole in onion and soil [J]. Journal of Environmental Science & Health Part B, 2014,49(7):513-520.
- [9] 曾辉平,王繁烁,于亚萍,等.壳聚糖海藻酸钠铁锰泥吸附剂制备与除 As(V)研究 [J]. 中国环境科学, 2020,40(3):1146-1155.
Zeng H P, Wang F S, Yu Y P, et al. Preparation of chitosan-alginate adsorbent contained Fe-Mn sludge and its potential for As(V) removal [J]. Chinese Environmental Science, 2020,40(3):1146-1155.
- [10] 邓安琪,董兆敏,高 群,等.中国地下水砷健康风险评估 [J]. 中国环境科学, 2017,37(9):3556-3565.
Deng A Q, Dong Z M, Gao Q, et al. Health risk assessment of arsenic in groundwater across China [J]. Chinese Environmental Science, 2020,40(3):1146-1155.
- [11] Hou Y Y, Xue P, Courtney G, et al. Association between arsenic suppression of adipogenesis and induction of CHOP10 via the endoplasmic reticulum stress response [J]. Environmental Health Perspectives, 2013,121(2):237-243.
- [12] Zhang Q, Cheng J, Xin Q. Effects of tetracycline on developmental toxicity and molecular responses in zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. Ecotoxicology, 2015,24(4):707-719.
- [13] Howe K, Clark M D, Torroja C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome [J]. Nature, 2013,496(7446):248-248.
- [14] Pedlar R M, Ptashynski M D, Evans R, et al. Toxicological effects of dietary arsenic exposure in lake whitefish (*Coregonus clupeaformis*) [J]. Aquatic Toxicology, 2002,57(3):167-189.
- [15] Keerthisinghe, Tharushi P W, Feng W, et al. Long-term exposure to TET increases body weight of juvenile zebrafish as indicated in host metabolism and gut microbiome [J]. Environment International, 2020, 139:105705.
- [16] Yu P B. Cellular defense against damage from reactive oxygen species [J]. Physiological Reviews, 1994,74:134-162.
- [17] Bollini A, Huarte M, G. Hernández, et al. Arsenic intoxication, a hemorheologic view [J]. Clinical Hemorheology And Microcirculation, 2010,44(1):3-17.
- [18] Adeyemi J A, Airton B, Fernando. Teratogenicity, genotoxicity and oxidative stress in zebrafish embryos (*Danio rerio*) co-exposed to arsenic and atrazine [J]. Comparative Biochemistry And Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology, 2015,172-173:7-12.
- [19] Kraus R J, Ganther H E. Synergistic toxicity between arsenic and methylated selenium compounds [J]. Biological Trace Element Research, 1989,20(1/2):105-113.
- [20] Ratnaik, R N. Acute and chronic arsenic toxicity [J]. Postgraduate Medical Journal, 2003,79(933):391-396.
- [21] 王亚茹,潘 晓,于清男,等.共生细菌对盐生小球藻亚砷酸盐代谢的影响 [J]. 中国环境科学, 2019,39(10):4303-4312.

- Wang Y R, Pan X, Yu Q N, et al. Effect of a symbiotic bacterium on the accumulation and transformation of arsenite by *Chlorella salina* [J]. *Chinese Environmental Science*, 2019,39(10):4303-4312.
- [22] Styblo M, Libia V, Germolec D R, et al. Comparative toxicity of trivalent and pentavalent inorganic and methylated arsenicals in rat and human cells [J]. *Archives of Toxicology*, 2000,74(6):289-299.
- [23] Wilding L A, Bassis C M, Walacavage K, et al. Repeated dose (28-day) administration of silver nanoparticles of varied size and coating does not significantly alter the indigenous murine gut microbiome [J]. *Nanotoxicology*, 2016,10(5):513-20.
- [24] Kashinskaya E N, Andree K B, Simonov E P, et al. DNA extraction protocols may influence biodiversity detected in the intestinal microbiome: a case study from wild prussian carp, *carassius gibelio* [J]. *Fems Microbiology Ecology*, 2017,93(2):<https://doi.org/10.1093/femsec/fiw240>.
- [25] 赵鑫,王佳,邢宇,等.ERIC-PCR 和 PCR-DGGE 技术分析壳聚糖对抗生素引起肠道菌群失调小鼠的影响 [J]. *中国微生态学杂志*, 2017,29(12):20-23.
- Zhao X, Wang J, Xing Y, et al. ERIC-PCR and PCR-DGGE analysis of the effect of chitosan on mice with intestinal dysbacteriosis caused by antibiotics [J]. *Chinese Journal of Microecology*, 2017,29(12):20-23.
- [26] Jin Y X, Wu S S, Zeng Z Y, et al. Effects of environmental pollutants on gut microbiota [J]. *Environmental Pollution*, 2017,222:1-9.
- [27] Miao W, Zhu B, Xiao X, et al. Effects of titanium dioxide nanoparticles on lead bioconcentration and toxicity on thyroid endocrine system and neuronal development in zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015,161:117-126.
- [28] Zhao H, Quan W, Bekele T G, et al. Effect of copper on the accumulation and elimination kinetics of fluoroquinolones in the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2018,156(6):135-140.
- [29] Stephen, M, Timothy L Z, David L S, et al. The intestinal microbiome, barrier function, and immune system in inflammatory bowel disease: a tripartite pathophysiological circuit with implications for new therapeutic directions [J]. *Therapeutic Advances in Gastroenterology*, 2016,9(4):602-625.
- [30] Tinkov A A, Gritsenko V A, Skalnaya M G, et al. Gut as a target for cadmium toxicity [J]. *Environmental Pollution*, 2018,235(4):429-434.
- [31] Ahn C, Shin D H, Lee D, et al. Expression of claudins, occludin, junction adhesion molecule A and zona occludens 1 in canine organs [J]. *Molecular Medicine Reports*, 2016,14(4):3697-3703.
- [32] Ogihara T, Kamiya M, Ozawa M, et al. What kinds of substrates show P-glycoprotein-dependent intestinal absorption? comparison of verapamil with vinblastine [J]. *Drug Metabolism & Pharmacokinetics*, 2006,21(3):238-244.
- [33] Liu J, Liu Y, Powell D A, et al. Multidrug-resistance *mdr1a/1b* double knockout mice are more sensitive than wild type mice to acute arsenic toxicity, with higher arsenic accumulation in tissues [J]. *Toxicology*, 2002,170(1/2):55-62.

作者简介: 李欢(1994-),男,安徽阜阳人,中国药科大学硕士研究生,主要从事环境毒理学方向研究.发表论文 1 篇.

《中国环境科学》核心影响因子学科排名实现五连冠

根据中国科学技术信息研究所 2016 年 10 月 12 日发布的《2016 年版中国科技期刊引证报告(核心版)》,中国环境科学学会主办的《中国环境科学》2015 年核心影响因子 1.812,在环境科学技术及资源科学技术学科排名继续位居第一,在统计的 1985 种中国核心科技期刊中排名 38 位.自 2011 年以来,《中国环境科学》影响因子排名一直保持学科榜首.