

赵丽娟, 牛志丹, 闫素月, 等. 氯吡嘧磺隆和镉复合对斑马鱼肝脏的影响[J]. 环境化学, 2022, 41(1): 395-397.

ZHAO Lijuan, NIU Zhidan, YAN Suyue, et al. The effect of halosulfuron methyl and cadmium on the liver of zebra fish[J]. Environmental Chemistry, 2022, 41(1): 395-397.

氯吡嘧磺隆和镉复合对斑马鱼肝脏的影响*

赵丽娟¹ 牛志丹¹ 闫素月¹ 程亚青¹ 张洪² 史晓晶¹

(1. 忻州师范学院生物系, 忻州, 034000; 2. 山西省分析科学研究院, 太原, 030006)

摘要 为了探究污染物镉和氯吡嘧磺隆复合污染对非靶标生物斑马鱼的毒性作用, 通过急性毒性试验, 获得镉和氯吡嘧磺隆对斑马鱼的 LC_{50} 。以 LC_{25} 作为0水平, 设置9个处理组进行试验, 检测不同处理组斑马鱼96 h死亡率、斑马鱼肝脏中CAT、MDA和羧酸酯酶CarE。检测结果表明, 镉和氯吡嘧磺隆对斑马鱼存在交互作用, 当水体中镉浓度为 $3.12\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 氯吡嘧磺隆浓度为 $14.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 两种物质复合对斑马鱼的毒性效应最大。将毒性效应最大处理组的斑马鱼肝脏代谢物进行采样分析, 研究结果表明, 镉和氯吡嘧磺隆复合造成斑马鱼肝脏核苷酸、乙醛酸、能量、氨基酸等代谢途径异常, 多种代谢物含量显著下降。研究结果可为水环境中氯吡嘧磺隆和镉复合污染的生态风险评价和早期预警提供依据。

关键词 氯吡嘧磺隆, 镉, 酶活性, 代谢物。

The effect of halosulfuron methyl and cadmium on the liver of zebra fish

ZHAO Lijuan¹ NIU Zhidan¹ YAN Suyue¹ CHENG Yaqing¹
ZHANG Hong² SHI Xiaojing¹

(1. Department of Biology, Xinzhou Teachers University, Xinzhou, 034000, China; 2. Shanxi Academy of Analytical Science, Taiyuan, 030006, China)

Abstract In order to explore the toxic effects of the combined pollution of cadmium and pesticides (Halosulfuron methyl) on non-target organisms zebra fish, the acute toxicity test was conducted to obtain the lethal concentration of cadmium and halosulfuron methyl on zebra fish (LC_{50}). With LC_{25} as the 0 level, set up 9 treatment groups for testing to detect 96-hour mortality of zebra fish, catalase (CAT), malondialdehyde (MDA) and carboxylesterase (CarE) in liver of zebra fish, the results showed that cadmium and halosulfuron methyl have an interaction effect on zebra fish. There was the most effects on zebra fish, when the concentration of cadmium was $3.12\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, the concentration of halosulfuron methyl was $14.03\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ in the water. Analysis metabolites in liver of zebra fish in the treatment group with the most toxic effects showed that the combination of cadmium and halosulfuron methyl caused abnormal metabolic pathways such as nucleotides, glyoxylic acid, energy, and amino acids in the liver of zebra fish, with the content of metabolites were significantly decrease. The research results can provide a basis for the ecological risk assessment and early warning of the combined pollution of halosulfuron methyl and cadmium in the water environment.

Keywords halosulfuron methyl, cadmium, enzyme activity, metabolites.

氯吡嘧磺隆为磺酰脲类的主要品种之一, 使用剂量低, 除草效果好, 被广泛用于多种作物的杂草防除。由于其在碱性土壤中的降解较慢, 导致残留在土壤中的除草剂会随着雨水淋溶进入水体, 对水环境中的鱼类产生毒性效应。Cd为工业重金属污染物, 长期暴露会导致神经、生殖、发育、遗传毒性、免疫和淋巴网状效应^[1], 《GB 3838-2002地表

* 忻州师范学院院级项目(2018KY13), 忻州师范学院学术带头人, 忻州师范学院博士科研启动金和山西省高等学校科技创新计划项目(2020L0547)资助。

水环境质量标准》中第五类水要求检出标准低于 $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。在我国污染严重水域中镉的浓度高达 $4.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。有研究发现, 氯吡嘧磺隆和啉虫脒复合污染时, 可造成斑马鱼 DNA 和 RNA 损伤, 神经传递物质的不平衡等^[2]。

本研究以氯吡嘧磺隆和镉作为研究对象, 分析其在水中复合对斑马鱼的联合毒性效应。通过分析不同处理组斑马鱼致死率和肝脏多种酶活性变化, 获得两种污染物复合效应最大的比例, 进而分析该处理组斑马鱼肝脏代谢物的变化, 以期厘清氯吡嘧磺隆和镉对斑马鱼的联合毒性机制。

1 材料和方法

1.1 实验材料

99.0% 的 CdCl_2 (天津科密欧化学试剂有限公司), 75% 氯吡嘧磺隆水分散粒剂 (江苏省农用激素工程技术研究中心), 斑马鱼 (AB 品系), 体长均在 $3.0 \text{ cm}\pm 0.5 \text{ cm}$, 斑马鱼在 $25 \text{ }^\circ\text{C}\pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$ 下驯化。

1.2 仪器和试剂

752 紫外分光光度计, 上海菁华科技仪器有限公司; 过氧化氢酶 (CAT) 活性检测试剂盒、MDA 含量测定试剂盒、CarE 酶活性检测试剂盒: 索莱宝生化试剂盒事业部。气相色谱-质谱联用: 赛默飞世尔 Trace1310 串联 TSQ8000; BSTFA : TMCS=99 : 1, 美国 Supelco。

1.3 实验方法

1.3.1 氯吡嘧磺隆和镉单一急性毒性暴露试验

准确称取氯吡嘧磺隆和镉 (精确至 0.0001 g), 分别配置两种物质的系列浓度标准溶液。参照《化学农药环境安全性评估测试指南-第 12 部分: 鱼类急性毒性测试》(GB/T 31270.12-2014)^[3] 进行预试验, 控制溶液浓度使斑马鱼的死亡率在 15% 至 85% 区间。

1.3.2 氯吡嘧磺隆和镉联合急性毒性试验

将氯吡嘧磺隆和镉配制成混合污染物, 采用两因素三水平正交组合设计, 结合单因子试验测定结果设置不同的浓度, 并观察染毒 96 h 斑马鱼的死亡率。依据 96 h 斑马鱼死亡率, 评价两种物质的联合效应。

1.3.3 不同处理组斑马鱼相关酶活性变化

取 96 h 存活的斑马鱼, 每个重复 15 条, 每个处理 3 次重复。在冰浴状态下将肝脏混匀后称取 0.1 g 的样品, 并用 0.8% 氯化钠水溶液研磨提取。将提取液在 $4 \text{ }^\circ\text{C}$, $10000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液用于检测 CAT, MDA 和 CarE, 检测方法依据索莱宝试剂盒方法进行。

1.3.4 斑马鱼肝脏代谢物分析

称取肝脏组织 30 mg , 加入液氮研磨粉碎, 放入离心管, 加 0.5 mL 甲醇 : 水 (1 : 1, $V : V$) 溶液, 超声提取 30 min。转速 $1000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$, $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 离心 15 min, 取 $100 \mu\text{L}$ 上清液放入 2 mL 进样小瓶中, 氮气吹干。加入 $50 \mu\text{L}$ 盐酸甲氧胺吡啶溶液 ($20 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$, 含内标二十四烷 $0.1 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$), $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 90 min, 再加入 $50 \mu\text{L}$ BSTFA+1% TMCS, $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 反应 30 min。冷却后, 进行 GC-MS 分析。

色谱: 赛默飞 TR-5MS 毛细管柱 ($0.32 \text{ mm}\times 30 \text{ m}$, $0.25 \mu\text{m}$); 进样口温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$; 载气 (He) 流速 $1.0 \text{ mL}\cdot\text{min}^{-1}$, 不分流。升温程序: 初始温度 $50 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 1min; 以 $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $100 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 1min; 再以 $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ 升至 $320 \text{ }^\circ\text{C}$, 保持 1 min。溶剂延迟时间为 5 min, 进样量 $1 \mu\text{L}$ 。

质谱: 电子轰击 (EI) 离子源; 电子能量 70 eV ; 传输线温度 $280 \text{ }^\circ\text{C}$; 离子源温度 $200 \text{ }^\circ\text{C}$; 质量扫描范围 m/z 50—650。

1.4 数据处理

采用 DPS、SPSS 和 Origin 软件统计试验结果, 并分析氯吡嘧磺隆和镉对斑马鱼的急性毒性联合效应, 建立回归模型。采用解卷积技术并结合 GMD 数据库, 对代谢物进行定性和定量分析。

2 结果与讨论

2.1 氯吡嘧磺隆和镉的单一因子毒性和联合毒性

依据预实验结果, 采用 DPS 软件的生物测定剂量效应法计算得出镉和氯吡嘧磺隆的 LC_{50} 分别为 $7.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $14.17 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$; LC_{25} 分别为 $5.12 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $12.03 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 毒性回归方程分别为: $y=2.6877x+2.7264$, $R^2=0.9813$, $y=2.2167x+2.4476$, $R^2=0.9679$ 。依据毒性试验结果计算得出氯吡嘧磺隆和镉对斑马鱼的半致死浓度 (LC_{50}), 选择 LC_{25} 作为变量中值 0 水平, 步长为 $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, 根据二因素三水平组合设计, 设置变量水平为 -1、0、1 得出 9 个处理组浓度 (表 1)。利用 origin 进行非线性曲面拟合, 建立数学回归模型。得到回归方程模型, 两因素对斑马鱼致死率、CAT、MDA 和 CarE 影响的相互关系式见表 2。

表 1 二因素三水平组合设计

Table 1 Universal design of two-factor three-level combination

	1	2	3	4	5	6	7	8	9
镉/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	3.12	3.12	3.12	5.12	5.12	5.12	7.12	7.12	7.12
氯吡嘧磺隆/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	10.03	12.03	14.03	10.03	12.03	14.03	10.03	12.03	14.03

统计模型的形式为 $y=ax_1+bx_2+cx_1^2+dx_2^2+ex_1x_2$, a, b, c, d 和 e 为拟合常数, P 值均为 0.000。从方程可以看出, 双因素模型能较好的拟合镉和氯吡嘧磺隆对斑马鱼的急性毒性。模型中的各因素经过无量纲线性变换, 因此可根据各系数

的绝对值大小判定氯吡嘧磺隆和镉对斑马鱼的毒性大小, 模型中一次项和二次项的顺序均为 $X_1 > X_2$, 由此可得出镉对斑马鱼的毒性效应大于氯吡嘧磺隆, 这与单一效应的结果一致。

采用 SPSS 分析两因素之间的交互作用, 通过主体间效应的 P 值, 可以得出两因素对死亡率、CAT、CarE 存在交互作用 ($P < 0.01$), 对 MDA 则不存在交互作用 ($P = 0.381$)。

表 2 氯吡嘧磺隆和镉对斑马鱼毒性的二元回归关系

Table 2 Binary regression relationship between the toxicity of chlorpyrifosulfuron and cadmium to zebrafish

判定指标	a	b	c	d	e	R ²
机率值	-2.0765	1.14151	0.11932	-0.04316	0.6604	0.85013
CAT	6.27616	-2.32009	0.83973	0.74004	-1.27059	0.84788
MDA	2.52245	-0.78453	-0.26585	0.03726	0.00713	0.96893
CarE	-80.25304	33.68476	6.12097	-1.36684	1.05843	0.84131

2.2 肝脏代谢物变化

通过酶活性试验可得出, 当镉浓度为 $3.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯吡嘧磺隆浓度为 $14.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的混合处理组酶活性变化最为显著。通过 GC-MS 斑马鱼肝脏代谢物进行分析, 共检测到代谢物 53 种, 与对照组相比, 显著上升的物质有 4 种, 3 种物质没有显著变化, 下调的物质有 46 种。

从代谢途径来看, 共检测到嘌呤类代谢通路中的 7 种物质, 鸟苷、肌苷、腺苷含量均显著下降; 鸟嘌呤、黄嘌呤和次黄嘌呤含量显著上升; 腺嘌呤含量没有显著变化。检测到嘧啶代谢通路中的 4 种物质, 尿苷、尿嘧啶、胸腺嘧啶含量显著下降; 胞嘧啶含量没有显著变化。检测到糖酵解和三羧酸循环途径中的代谢物有 10 种, 分别为蔗糖、葡萄糖、果糖、5-磷酸木酮糖、麦芽糖、丙酮酸、乳酸、苹果酸、柠檬酸、富马酸, 与对照组相比, 除富马酸没有显著变化, 麦芽糖显著上升外, 其余均显著下降。共检测到 17 种氨基酸, 分别为缬氨酸、肌氨酸、亮氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甘氨酸、丙氨酸、蛋氨酸、天冬氨酸、5-羟基色氨酸、谷氨酸、苯丙氨酸、鸟氨酸、赖氨酸、酪氨酸。除缬氨酸、肌氨酸、亮氨酸、脯氨酸含量显著上升外; 其余氨基酸含量均显著下降。检测到磷脂和鞘磷脂代谢通路中的 5 种物质, 分别为磷酸、乙醇胺、磷酸乙醇胺、肌醇、胆固醇, 所有物质含量均显著下降。检测出与维生素代谢相关的物质 2 种, 分别为烟酸和 α 生育酚, 两种物质均显著下降。检测到经丙酮酸代谢形成的癸酸、谷氨酸代谢形成的 γ -氨基丁酸和牛磺酸的含量均显著下降。此外, 还有十六烷酸、十八酸、组胺、腐胺、肌酐等物质的含量也显著下降。

本研究发现两种污染物复合处理造成斑马鱼肝脏中鸟苷、肌苷、腺苷、尿苷、尿嘧啶、胸腺嘧啶含量显著下降, 而鸟嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤含量显著上升, 表明两种物质引起斑马鱼氧化应激反应。农药和重金属胁迫时, 会导致生物体内活性氧的产生, 生物体产生氧化应激反应, 进而引起细胞紊乱导致不同生物分子的变化, 包括 DNA^[4]。核碱基损伤是 DNA 氧化损伤、修复和一般细胞氧化应激的标志物^[5], 其中对氧化应激反应最为敏感的碱基是鸟嘌呤。特别是出现在转录结合位点的鸟嘌呤和胞嘧啶含量丰富的序列更容易受到损伤。鸟嘌呤含量显著上升, 可有效的刺激斑马鱼免疫反应, 对肝脏起保护作用。研究发现乙醛酸途径中的两种物质乙醇胺和磷酸乙醇胺含量均显著下降, 乙醇胺是磷酸乙醇胺的前体物质, 磷酸乙醇胺又是磷脂酰乙醇胺的前体物质, 磷脂酰乙醇胺是膜脂质的主要成分之一。万钱芬^[6]研究发现, T-2 毒素会导致大鼠脏器中乙醇胺含量降低, 与 T-2 毒素影响细胞完整性进而影响功能有关。本研究结果表明, 乙醇胺和磷酸乙醇胺含量的降低会抑制后续胆碱的代谢, 进而使得丝氨酸、甘氨酸、苏氨酸(三种氨基酸含量均显著下降)代谢, 以及磷脂和鞘磷脂代谢(肌醇、磷酸、胆固醇含量均显著下降)异常。

3 结论

本研究分析了镉和氯吡嘧磺隆复合污染的 9 个处理组斑马鱼致死率、肝脏 CAT、MDA 及 CarE 的变化。采用 origin 进行非线性曲面拟合, 建立数学回归模型, 对回归模型进行失拟性 F 检验和回归方程显著性分析。结果显示, 双因素模型能较好的拟合镉和氯吡嘧磺隆对斑马鱼的急性毒性。对两个因素进行交互作用分析, 结果表明镉和氯吡嘧磺隆对斑马鱼致死率、CAT 和 CarE 存在交互作用 ($P < 0.01$), 对 MDA 没有交互作用 ($P = 0.381$)。且两种物质共存时, 镉的毒性效应最大。根据各指标检测结果可得, 水中镉浓度 $3.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯吡嘧磺隆 $14.03 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 两种物质的交互效应最大。该剂量复合处理引起斑马鱼核苷酸、乙醛酸、磷脂、氨基酸等代谢异常, 多种代谢物含量显著下降。

参考文献 (References)

- [1] 温常雷. DEHP和Cd复合作用对斑马鱼的毒性效应[D]. 泰安: 山东农业大学, 2018.
- [2] ZHANG H, ZHAO L J. Influence of sublethal doses of acetamiprid and halosulfuron-methyl on metabolites of zebra fish (*Brachydanio rerio*) [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 191: 85-94.
- [3] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 中华人民共和国推荐性国家标准: 化学农药环境安全评价试验准则 第12部分: 鱼类急性毒性试验 GB/T 31270.12—2014[S]. 北京: 中国标准出版社, 2015.
- [4] BA X Q, BOLDOGH I. 8-Oxoguanine DNA glycosylase 1: Beyond repair of the oxidatively modified base lesions [J]. *Redox Biology*, 2018, 14: 669-678.
- [5] GHOSH R, MITCHELL D L. Effect of oxidative DNA damage in promoter elements on transcription factor binding [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, 27(15): 3213-3218.
- [6] 万钱芬. T-2毒素影响动物代谢组的NMR研究[D]. 武汉: 中国科学院大学, 2015.