

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20221103001

胡浩泽, 王卢燕, 李烨青, 等. 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的慢性毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(1): 275-285

Hu H Z, Wang L Y, Li Y Q, et al. Chronic toxic effects of kresoxim-methyl during zebrafish early life stage [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(1): 275-285 (in Chinese)

醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的慢性毒性效应

胡浩泽^{1,2}, 王卢燕², 李烨青^{1,2}, 张昌朋², 赵学平², 张鑫¹, 蒋金花^{2,*}

1. 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 宁波大学食品与药学学院, 宁波 315800

2. 省部共建农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江省农业科学院农产品质量安全与营养研究所, 杭州 310021

收稿日期: 2022-11-03 录用日期: 2023-01-13

摘要: 为探究甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂(strobilurins)对水生生物早期生命阶段的慢性毒性, 以斑马鱼为模式生物, 测定了醚菌酯长期暴露对斑马鱼早期发育的亚致死效应。将斑马鱼胚胎持续暴露于不同浓度醚菌酯(0.000750 ~ 0.180 mg·L⁻¹) 34 d后, 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的144 h和34 d半致死浓度(LC₅₀)分别为0.141 mg·L⁻¹和0.0106 mg·L⁻¹。研究发现, 醚菌酯暴露34 d后, 0.00460, 0.0115和0.0288 mg·L⁻¹醚菌酯可显著降低仔鱼的体质量, 0.0115 mg·L⁻¹和0.0288 mg·L⁻¹醚菌酯能够降低仔鱼体长, 而0.180 mg·L⁻¹醚菌酯会增加仔鱼的体长和体质量。醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段体长的34 d-NOEC为0.00460 mg·L⁻¹, 34 d-LOEC为0.0115 mg·L⁻¹, 对早期生命阶段体质量的34 d-NOEC为0.00185 mg·L⁻¹, 34 d-LOEC为0.00460 mg·L⁻¹。在试验期间, 分别于1、3、7、14、21和34 d测定斑马鱼胚胎/仔鱼体内与线粒体能量代谢和氧化应激相关因子的活性和水平。研究发现, 醚菌酯长期暴露会导致斑马鱼早期生命阶段过氧化氢酶(CAT)活性升高, 过氧化物酶(POD)活性先升高后降低再升高, 超氧化物歧化酶(SOD)活性和丙二醛(MDA)含量先降低再升高。此外, 醚菌酯长期暴露期间, 斑马鱼体内钙离子(Ca²⁺)水平和钙离子腺苷三磷酸酶(Ca²⁺-ATP酶)活性受到不同程度的抑制, 三磷酸腺苷(ATP)水平先升高后降低。研究表明, 醚菌酯长期暴露会对斑马鱼早期生命阶段的生长指标和抗氧化系统产生一定的负面影响, 醚菌酯可能通过调控ATP和Ca²⁺水平、Ca²⁺-ATP酶活性, 干扰线粒体能量代谢进而诱导斑马鱼早期生命阶段产生氧化应激效应。

关键词: 醚菌酯; 斑马鱼; 慢性毒性; 早期生命阶段; 氧化应激

文章编号: 1673-5897(2024)1-275-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Chronic Toxic Effects of Kresoxim-methyl during Zebrafish Early Life Stage

Hu Haoze^{1,2}, Wang Luyan², Li Yeqing^{1,2}, Zhang Changpeng², Zhao Xueping², Zhang Xin¹, Jiang Jinhua^{2,*}

1. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, College of Food and Pharmacy, Ningbo University, Ningbo 315800, China

2. State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Institute of Agro-product Safety and Nutrition, Zhejiang Academy of Agricultural Sciences, Hangzhou 310021, China

Received 3 November 2022 accepted 13 January 2023

Abstract: In order to investigate the chronic toxicity of strobilurins to the early life stage of aquatic organisms, the

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(32072455)

第一作者: 胡浩泽(1998—), 男, 硕士研究生, 研究方向为农药环境安全评估, E-mail: huhaoze0130@163.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: jiangjh@zaas.ac.cn

sublethal effect of kresoxim-methyl on the early development of zebrafish after long-term exposure was determined. After continuous exposure of zebrafish embryos to different concentrations of kresoxim-methyl ($0.000750 \sim 0.180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) for 34 d, the median lethal concentrations (LC_{50}) of kresoxim-methyl for 144 h and 34 d of zebrafish early life stage was $0.141 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.0106 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. It was found that $0.00460 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, $0.0115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.0288 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kresoxim-methyl significantly decreased the body weight of larvae after 34 d exposure, $0.0115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.0288 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kresoxim-methyl decreased the body length of larvae, and $0.180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ kresoxim-methyl increased the body length and body weight of larvae. The 34 d-NOEC and 34 d-LOEC of kresoxim-methyl was $0.00460 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.0115 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for body length, and was $0.00185 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $0.00460 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ for body weight during zebrafish early life development, respectively. During the 34 d exposure, the activities and levels of factors related to mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in zebrafish embryos/larvae were measured at 1, 3, 7, 14, 21 and 34 d. Results showed that long-term exposure of kresoxim-methyl could increase the catalase (CAT) activity, the peroxide (POD) activity increased then decreased and then increased, the superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) content decreased first then increased during zebrafish early life development. It was found that the calcium ion (Ca^{2+}) level and the activity of calcium ion adenosine triphosphatase (Ca^{2+} -ATPase) was inhibited during the 34 d exposure of kresoxim-methyl, and the adenosine triphosphate (ATP) level was increased first then decreased. The results suggested long-term exposure to kresoxim-methyl caused negative effects on the growth indexes and antioxidant system during zebrafish early life development, kresoxim-methyl might interfere with mitochondrial energy metabolism by regulating the ATP and Ca^{2+} levels, and Ca^{2+} -ATPase activity, then induced oxidative stress during the early life stage of zebrafish.

Keywords: kresoxim-methyl; zebrafish; chronic toxic effect; early life stage; oxidative stress

甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂(strobilurins)是基于天然化合物 strobilurin A 开发的一类新型杀菌剂,对由卵菌纲、子囊菌纲、担子菌纲和半知菌纲等真菌引起的霜霉病、白粉病、稻瘟病、锈病具有良好的活性,适用于谷物、大豆、马铃薯、果树和蔬菜等多种作物的病害防治^[1]。strobilurins 可以通过与线粒体中复合物Ⅲ辅酶 Q 的氧化位点(Qo)结合,有效阻断细胞色素 b 和 c1 之间的电子传递进而干扰三磷酸腺苷(ATP)的合成以抑制真菌线粒体呼吸,从而表现出杀真菌活性^[2-3]。随着 strobilurins 使用量的增加,施用后可能会残留在空气、土壤或水中,然后会通过径流、渗透和大气漂移等多种途径进入到周围的生态系统中,进而危及环境生物和人类健康^[4-5]。研究表明, strobilurins 对蜜蜂、蚯蚓、鸟类等陆生生物以及大鼠、小鼠等相对安全,但对非靶标水生生物具有较高的毒性风险^[1-2,6]。现有研究表明, strobilurins 对水生生物的生长发育具有一定的致畸效应,能够导致水生生物线粒体功能紊乱,并通过调控水生生物抗氧化系统的关键酶,如过氧化氢酶(catalase, CAT)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和过氧化物酶(peroxide, POD)的活性或转录,或诱导活性氧(reactive oxygen species, ROS)和丙二醛(malondial-

dehyde, MDA),从而诱导氧化损伤和氧化应激^[7-10]。此外, strobilurins 还对水生生物具有潜在的免疫毒性或内分泌干扰作用^[11-12]。因此,该类杀菌剂对水生生物具有一定的毒性效应和风险。

醚菌酯是德国巴斯夫股份公司首先开发的一种 strobilurins,广泛应用于真菌病害的防治。研究发现,醚菌酯对水生生物具有高毒,对不同藻类、大型溞胚胎、草鱼幼鱼和斑马鱼不同生命阶段的半数致死浓度(median lethal concentration, LC_{50})分别为 $0.131 \sim 3.058$ 、 0.157 、 0.338 和 $0.034 \sim 0.61 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[12-14]。研究还发现,醚菌酯对水生生物的组织结构具有一定的致畸效应,醚菌酯短期暴露能够导致大型溞胚胎第二触角发育不全和体壳异常^[13]、造成斑马鱼胚胎出现心包水肿、卵黄囊水肿、脊椎弯曲等畸形症状^[7]、斑马鱼成鱼出现鳃损伤^[15],并且其长期暴露会引起大型溞繁殖力下降^[13]、干扰斑马鱼成鱼肝、卵巢和肠的正常生长发育^[16]。目前,大多数研究使用斑马鱼来研究 strobilurins 的毒性效应,发现斑马鱼早期生命阶段对该类杀菌剂最为敏感^[17]。研究发现,醚菌酯暴露 72 ~ 96 h 会引起斑马鱼胚胎抗氧化酶活性和相关基因表达的改变,从而导致线粒体功能障碍或细胞凋亡^[17];醚菌酯暴露斑马鱼胚胎 3、

6、10 d 后会影响斑马鱼仔鱼体内抗氧化和细胞凋亡相关基因的表达^[18]。然而,目前大多数醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的研究都集中在短期暴露的毒性影响,对于其长期暴露产生的慢性毒性和亚致死效应鲜有研究报道。因此,开展醚菌酯长期暴露对斑马鱼早期生命阶段的毒性效应,有利于揭示醚菌酯的慢性毒性风险。

斑马鱼(*Danio rerio*)是目前研究生态毒理和人类疾病发生机理的常用模式生物^[19]。现有研究表明,同种污染物对不同生命阶段斑马鱼的毒性效应差异较大,早期生命阶段对污染物的毒性效应较为敏感^[17,20-21]。因此,研究醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段毒性效应,对于评估其环境风险以及潜在的健康危害具有重要的意义。本试验选择斑马鱼为受试生物,将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的醚菌酯试验溶液 34 d 后,通过测定斑马鱼胚胎/仔鱼发育过程中孵化率、死亡率、体长和体质量等生长指标,评估醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的致死和亚致死效应。同时,通过分析不同暴露时期斑马鱼体内氧化应激相关指标活性或含量的变化,评估醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段抗氧化系统的影响,为进一步了解醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的毒性风险和作用机制提供参考依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料与仪器

醚菌酯原药(97%)购自江苏耕耘化学有限公司;二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)为分析纯,购自上海泰坦科技股份有限公司;CAT、POD、SOD、ATP、MDA、钙离子(Ca²⁺)和超微量钙离子腺苷三磷酸酶(Ca²⁺-ATP 酶)试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。

超高效液相色谱质谱联用仪(UPLC/Xevo TQ-MS,美国 Waters 公司);紫外可见分光光度计(UV-1800,日本岛津公司);酶标仪(SpectraMax M5,美国 Molecular Devices 公司);匀浆机(FastPrep-24,美国 MP 公司)。

1.2 供试生物

野生型成年斑马鱼(AB 品系)来自国家斑马鱼资源中心,在实验室长期驯养,本试验所用胚胎为其繁殖所得。每天定时投喂刚孵化的丰年虾(*Artemia naupli*)2 次,养殖系统的光/暗周期为 14 h/10 h,水温为(26±1)℃。将斑马鱼以 1 : 1 的性别比例饲养在繁殖系统中,隔天早上收集受精卵,放到装有曝气自

来水的培养皿,选取发育正常的健康受精卵用于后续暴露试验。

1.3 试验方法

1.3.1 暴露液配制

称取 0.2580 g 醚菌酯,用 DMSO 定容至 25.00 mL,得到 10 000 mg·L⁻¹的醚菌酯储备液。随后将醚菌酯储备液稀释配制成 1.00 mg·L⁻¹的醚菌酯母液,最后将 1.00 mg·L⁻¹醚菌酯母液用曝气自来水稀释成 0.000750、0.00185、0.00460、0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹的醚菌酯暴露液。同时设置 0.0180% (体积比)的 DMSO 试验溶液为助溶剂对照组,曝气自来水为空白对照组。

1.3.2 暴露液浓度测定

在暴露期间,测定试验溶液的实际浓度,每个样品取 5.00 mL 试验溶液,加入 10.00 mL 乙腈及 2.00 g 氯化钠到 50 mL 离心管中,充分振荡,待静置分层后,取上清液经 0.22 μm 滤膜过滤后上机测定。测定所用仪器为 UPLC/Xevo TQ-MS 液质联用仪;色谱条件:色谱柱型号为 ACQUITY UPLC BEH C18 (2.1 mm ×100 mm, 1.7 μm, 美国 Waters 公司),柱温为 40℃,流动相 A 为 0.1% 甲酸水溶液,流动相 B 为乙腈,体积比为 1 : 9,流速为 0.2 mL·min⁻¹,进样量为 2 μL。质谱条件:电喷雾离子源(ESI)为正离子模式,检测方式为多离子反应监测;电离源参数为:毛细管电压为 2.5 kV,锥孔电压为 15 V,脱溶剂温度为 400℃,脱溶剂流量为 800 L·h⁻¹,锥孔气流量为 50 L·h⁻¹,碰撞气流量为 0.15 mL·min⁻¹。浓度测定结果如表 1 所示,因测定浓度没有超过理论浓度的 20%,故试验过程中以理论浓度表示,并进行相关计算。

表 1 醚菌酯试验溶液浓度测定结果
Table 1 The kresoxim-methyl concentration measured in the exposure solutions

理论浓度/(mg·L ⁻¹) Theoretical concentration/(mg·L ⁻¹)	实测浓度/(mg·L ⁻¹) Measured concentration/(mg·L ⁻¹)
0.180	0.183±0.00398
0.0720	0.0723±0.00213
0.0288	0.0261±0.000523
0.0115	0.0113±0.000637
0.00461	0.00444±0.000140
0.00185	0.00169±0.0000483
0.000750	0.000710±0.0000247

注:数据以平均值±标准误差表示。
Note: The date are expressed as mean±SEM.

1.3.3 斑马鱼早期阶段试验

参照农业行业标准《化学农药 鱼类早期生活阶段毒性试验准则》(NY/T 4186—2022)^[22]。根据预试验结果,设置 0.000750、0.00185、0.00460、0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 共 7 个试验浓度,同时设置空白对照组和助溶剂对照组。将胚胎分配到 24 孔微孔板中,每个孔内含有 2 个胚胎和 2 mL 试验溶液,每个 24 孔微孔板为 2 个重复。一旦胚胎孵化率达到 90%,立即将仔鱼转移到含有 400 mL 试验溶液的烧杯中,每个烧杯为一个重复。处理组、空白对照组和溶剂对照组均设 4 个重复。试验采用半静态法,即每 24 h 更换一次试验溶液,以保持试验溶液的浓度和水质。在暴露期间,环境温度控制在(26±1.5)℃,光照/黑暗周期为 14 h/10 h。孵化后第 2 天开始每天饲喂煮熟的蛋黄 2 次,饲喂蛋黄 3 d 后,每天喂养刚孵化的丰年虾 2 次。每天观察并记录胚胎的孵化数与存活数,仔鱼出现畸形或异常行为的数量,并将死亡个体移走。每周测定一次所有试验容器中试验溶液的溶解氧、氢离子浓度指数(hydrogen ion concentration, pH)和温度。在试验结束时(胚胎孵化后 30 d),对所有存活的鱼进行称重(湿质量),测量个体长度。通过回归模型确定 LC₅₀,计算每个处理组体长体质量的变异系数(coefficient of variation, CV),体长重复内 CV(<43.7%)、重复间 CV(<11.7%)、体质量重复间 CV(<32.8%),确定最低可观察效应浓度(lowest observed effect concentration, LOEC)和无可观察效应浓度(no observed effect concentration, NOEC)。

1.3.4 生化分析

将斑马鱼胚胎持续暴露于 0.000750、0.00185、0.00460、0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 醚菌酯试验溶液 34 d。设置 3 个重复,每个处理组每个重复约 350 个胚胎。在试验暴露期间,分别于 1、3、7、14、21 和 34 d 取样,测定醚菌酯暴露后对斑马鱼体内不同生化指标的影响。准确称取各处理组的斑马鱼,放置到 2 mL 离心管中,按照质量(g):体积(mL)=1:9 的比例加入预冷的生理盐水,在冰浴条件下进行研磨匀浆,匀浆后的样品在 4℃、2 500 r·min⁻¹ 的条件下离心 10 min,取上清液进行生化分析。根据试剂盒说明书测定 SOD 活性、CAT 活性、POD 活性、Ca²⁺-ATP 酶活性、Ca²⁺ 含量、MDA 含量、ATP 含量。使用考马斯蓝蛋白试剂盒检测各处理的蛋白质含量,来计算各处理组的酶活。所有样本分 3 个重复进行分析,并使用紫外可见分光光度计和

酶标仪进行测定。

1.4 数据分析

实验数据用 SPSS 25.0 软件和 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析和制图。采用 Shapiro-Wilk 和 Levene 分别检验孵化率、死亡率、存活率、体质量和体长等指标的正态性和方差齐性。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和 Tukey's 多重比较检验处理组与对照组之间的显著性差异。试验结果均以平均数±标准误差(mean±SEM)表示。当 $P<0.05$ 或 $P<0.01$ 时,具有差异显著。

2 结果(Results)

2.1 醚菌酯对斑马鱼胚胎的致死和亚致死效应

不同浓度的醚菌酯试验溶液暴露斑马鱼胚胎 96 h 后,对胚胎的孵化率具有一定的影响。0.180 mg·L⁻¹ 醚菌酯可以显著降低胚胎的孵化率,斑马鱼胚胎的孵化率为 53.8% ($P<0.01$),其余醚菌酯处理组和对照处理组对胚胎孵化基本没有影响(图 1(a))。

研究发现,0.000750、0.00185、0.00460、0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 醚菌酯处理斑马鱼胚胎 96 h 后,斑马鱼的死亡率分别为 15.0%、7.50%、6.25%、11.3%、13.8%、12.5% 和 48.8% (表 2)。处理 144 h 后,对斑马鱼的死亡率分别为 15.0%、8.75%、8.75%、12.5%、13.8%、26.3% 和 61.3% (图 1(b)),计算可得,醚菌酯对斑马鱼胚胎的 144 h-LC₅₀ 为 0.141 mg·L⁻¹,95% 置信限为 0.0857~0.506 mg·L⁻¹。

2.2 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的致死和亚致死效应

斑马鱼孵化后至试验结束(96 h~34 d),0.000750、0.00185、0.00460、0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 醚菌酯组中斑马鱼的死亡率分别为 22.7%、33.8%、41.1%、43.0%、50.4%、78.8% 和 97.9%(图 2)。计算可得,醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段仔鱼/幼鱼的 34 d-LC₅₀ 为 0.0106 mg·L⁻¹,95% 置信限为 0.00384~0.0264 mg·L⁻¹。

在 34 d 试验结束时,测定了斑马鱼仔鱼的体质量,各处理的平均体质量为 10.0~17.9 mg,各处理组重复间的体质量 CV 为 3.85%~9.75% (表 3)。0.180 mg·L⁻¹ 醚菌酯可以显著增加斑马鱼仔鱼的体质量,而 0.00460、0.0115 和 0.0288 mg·L⁻¹ 醚菌酯能够降低斑马鱼仔鱼的体质量。因此,醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段体质量的 34 d-NOEC 为 0.00185 mg·L⁻¹,34 d-LOEC 为 0.00460 mg·L⁻¹。

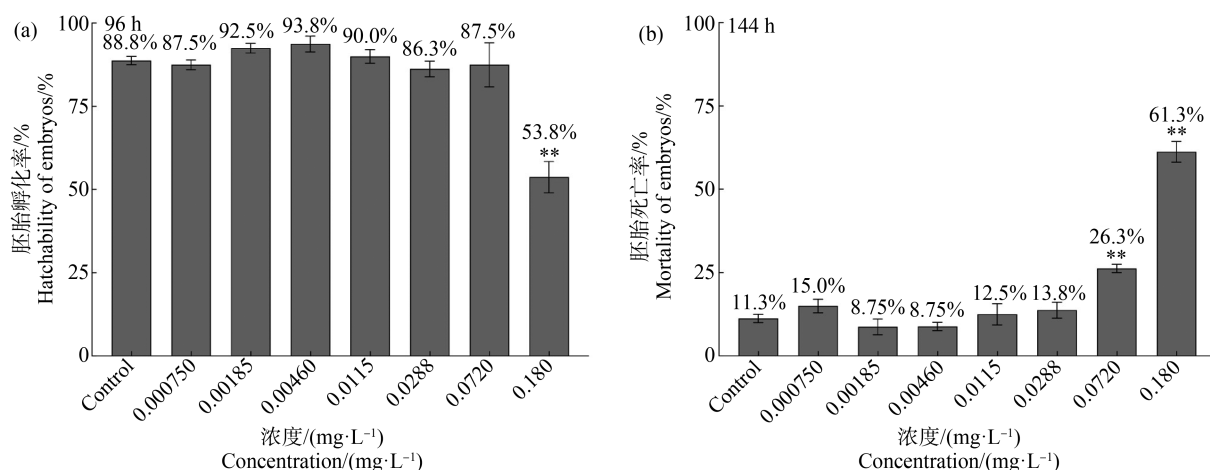


图 1 醚菌酯对斑马鱼胚胎孵化率 (a) 和死亡率 (b) 的影响

注:处理组与对照组相比具有显著差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

Fig. 1 Effects of kresoxim-methyl on the hatchability (a) and mortality (b) of zebrafish embryos

Note: Significant differences between treatments and controls, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

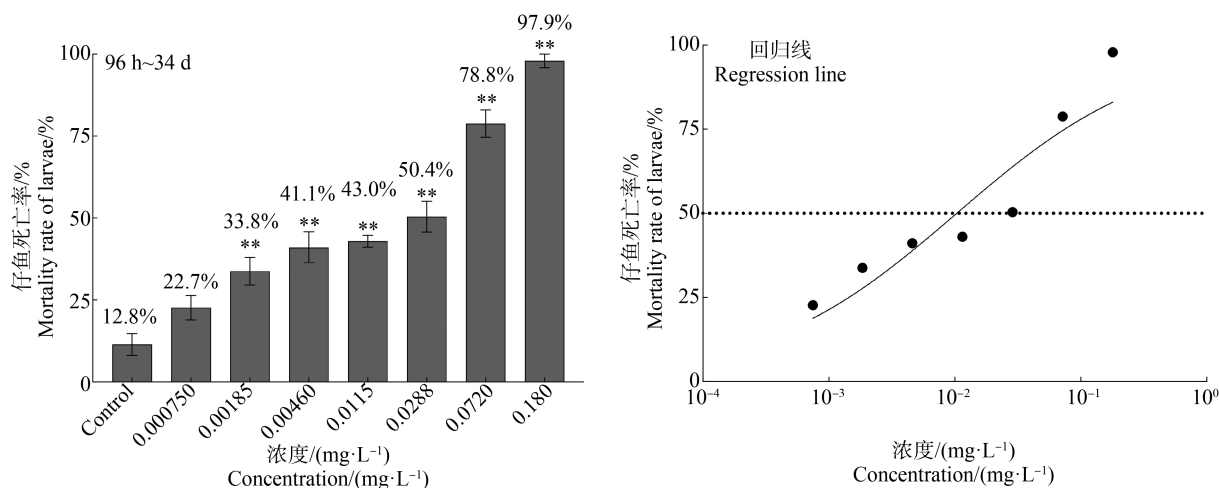


图 2 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段仔鱼死亡率的影响

注:处理组与对照组相比具有显著差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

Fig. 2 Effects of kresoxim-methyl on the mortality during zebrafish larvae development

Note: Significant differences between treatments and controls, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

试验结束时,各处理的平均体长为 10.5 ~ 13.4 mm,各处理组重复内的体长 CV 为 7.26% ~ 17.3%,各处理组重复间的体长 CV 为 0.77% ~ 8.99% (表 3)。结果表明,0.180 mg·L⁻¹ 醚菌酯可以显著增加斑马鱼仔鱼的体长,而 0.0115 mg·L⁻¹ 和 0.0288 mg·L⁻¹ 醚菌酯能够显著降低斑马鱼仔鱼的体长。因此,醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段体长的 34 d-NOEC 为 0.00460 mg·L⁻¹,34 d-LOEC 为 0.0115 mg·L⁻¹。

2.3 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段抗氧化系统的影响

在试验期间,分别于 1、3、7、14、21 和 34 d 测定

斑马鱼胚胎/仔鱼的 CAT 活性、POD 活性、SOD 活性以及 MDA 含量,分析醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段抗氧化系统的影响(图 3)。结果表明,处理第 1 天,各处理组指标与对照组相比均无显著性差异,随着醚菌酯暴露时间的延长,不同氧化指标呈现不同的趋势。

醚菌酯处理 3、7、14 和 21 d 后,0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 处理组的 CAT 活性明显增加,0.00460、0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 处理组的 CAT 活性在 34 d 后均显著增加(图 3(a))。醚菌酯处理 3 d 和 7 d 后,0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹

表 2 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段孵化和存活的影响

Table 2 Effects of kresoxim-methyl on hatchability and survival during zebrafish early life stage

浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration /(mg·L ⁻¹)	供试数 Embryo number	死亡数 Number of death			总死亡率/% Total mortality/%	结束时存活鱼 Number of alive fish at end	孵化后存活率/% Survival rate after hatching/%
		胚胎(96 h)	仔鱼(34 d)	总死亡数			
		Embryo (96 h)	Larvae (34 d)	Total death			
0.180	80	37	42	79	98.8	1	2.08
0.0720	80	10	54	64	80.0	16	23.6
0.0288	80	11	35	46	57.5	34	49.6
0.0115	80	9	31	40	50.0	41	57.0
0.00461	80	5	31	36	45.0	44	58.9
0.00185	80	6	25	31	38.8	49	66.2
0.000750	80	12	16	28	35.0	54	77.3
CK	80	9	9	18	22.5	62	87.2
DMSO	80	4	18	22	27.5	58	76.3

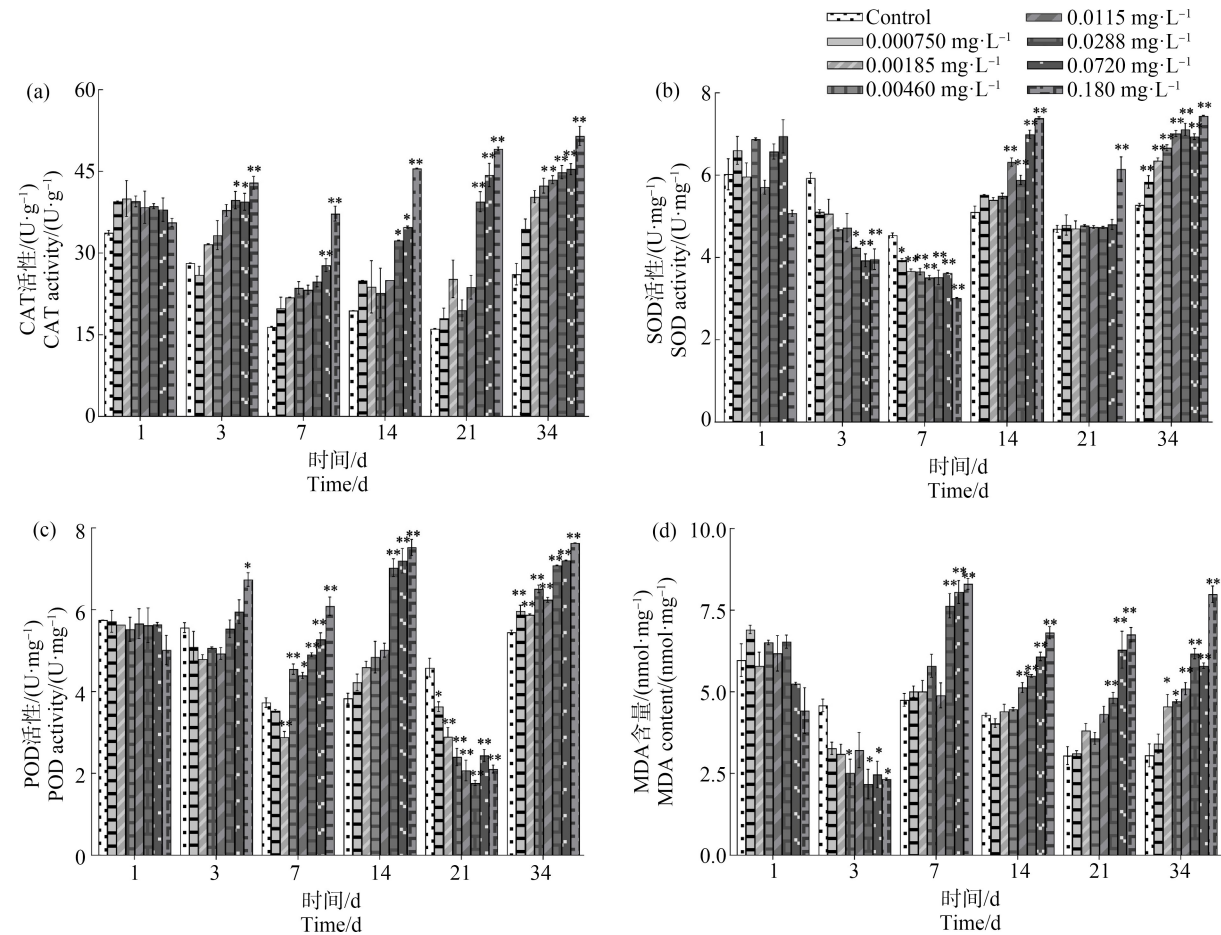


图 3 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段抗氧化系统的影响

注:醚菌酯暴露 1、3、7、14、21 和 34 d 后,CAT (a)、SOD (b)、POD (c)和 MDA (d)的活性变化;CAT 表示过氧化氢酶,SOD 表示超氧化物歧化酶,POD 表示过氧化物酶,MDA 表示丙二醛;结果以样本的平均值±标准误差表示;处理组与对照组之间有显著性差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of kresoxim-methyl on the antioxidant system during zebrafish early life stage

Note: The activities of CAT (a), SOD (b), POD (c), MDA (d) after kresoxim-methyl exposure for 1, 3, 7, 14, 21 and 34 d; CAT represents catalase, SOD represents superoxide dismutase, POD represents peroxidase, MDA represents malondialdehyde; the results are expressed as mean±SEM of triplicate samples; significant differences between treatments and controls, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

表 3 醚菌酯暴露 34 d 后对斑马鱼仔鱼体质量和体长的影响
Table 3 Effects of kresoxim-methyl exposure on body weight and body length of zebrafish larvae after 34 d

浓度/(mg·L ⁻¹) Concentration /(mg·L ⁻¹)	体质量(仔鱼) Weight (larvae)			体长(仔鱼) Length (larvae)			
	处理组/mg Treatment /mg	平均/mg Average /mg	重复间 CV/% CV between repeats/%	处理组/mm Treatment /mm	重复内 CV/% CV within repetition/%	平均/mm Average /mm	重复间 CV/% CV between repeats/%
0.180	17.9	17.9* *	—	13.4	—	13.4* *	—
0.0720	13.3	13.8	8.54	11.7	11.9	11.6	8.09
	15.4			11.9	17.3		
	13.8			11.7	12.2		
	12.6			11.0	15.9		
0.0288	10.6	10.9*	6.39	10.3	15.9	10.4* *	1.27
	11.0			10.5	12.6		
	11.8			10.3	14.7		
	10.2			10.4	15.1		
0.0115	10.3	10.3* *	5.73	10.4	12.7	10.5* *	2.67
	9.92			10.4	11.1		
	11.1			10.9	12.0		
	9.86			10.4	12.4		
0.00460	10.0	10.7*	4.61	10.7	8.00	10.9	5.38
	11.0			11.1	11.2		
	10.7			11.0	9.13		
	11.0			11.0	11.9		
0.00185	10.9	11.1	4.33	11.1	9.75	11.1	1.90
	10.7			10.9	10.7		
	11.8			11.4	11.8		
	10.8			11.0	10.8		
0.000750	11.0	11.3	5.24	11.2	12.5	11.2	0.77
	12.0			11.3	8.28		
	11.5			11.1	12.2		
	10.7			11.2	7.26		
CK	12.6	12.5	3.84	11.5	11.8	11.4	3.25
	11.9			11.2	14.2		
	12.6			11.2	11.5		
	13.0			11.8	10.0		
DMSO	12.3	11.8	4.60	11.6	11.8	11.4	2.07
	12.0			11.4	14.2		
	11.0			11.0	11.5		
	11.7			11.5	10.0		

注:处理组与对照组相比具有显著差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。
Note: Significant differences between treatments and controls, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

处理组的 SOD 活性显著降低。处理 14 d 后, 0.0115、0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 处理组的 SOD 活性明显增加。处理第 34 天,所有处理组的 SOD 活性均显著增加(图 3(b))。0.00460、0.0115、

0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 处理组的 POD 活性在处理第 7 天均显著增加。处理 14 d 后,0.0288、0.0720 和 0.180 mg·L⁻¹ 处理组的 POD 活性显著增加,各处理组 POD 活性在 21 d 均显著降低,处理 34

d 时的 POD 活性又显著增加(图 3(c))。研究还发现,0.0288、0.0720 和 0.180 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理 3 d 后,MDA 含量显著减少,而相应浓度醚菌酯处理 7、14、21 和 34 d 后,斑马鱼中的 MDA 含量均显著增加。

2.4 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段 Ca^{2+} 、 Ca^{2+} -ATP 酶和 ATP 的影响

在试验期间,分别于 1、3、7、14、21 和 34 d 测定斑马鱼胚胎/仔鱼的 Ca^{2+} 水平、 Ca^{2+} -ATP 酶活性以及 ATP 水平,分析醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段线粒体中能量代谢的影响(图 4)。结果表明,处理第 1 天,各处理组的 Ca^{2+} 水平与对照组相比无显著性差异,随着醚菌酯暴露时间的延长, Ca^{2+} 水平、 Ca^{2+} -ATP 酶活性以及 ATP 水平呈现不同的趋势。

醚菌酯处理 3、14 和 34 d 后,大部分处理组的 Ca^{2+} 水平均显著降低,而处理第 7 天和第 21 天,0.180 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的 Ca^{2+} 水平显著提高(图 4(a))。研究发现,醚菌酯处理期间,斑马鱼体内的 Ca^{2+} -ATPase 活性受到不同程度的抑制(图 4(b))。而醚菌酯处理斑马鱼胚胎 1、3 和 7 d 后,0.0720 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 0.180 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组的 ATP 水平与对照组相比均显著升高,而各处理组的 ATP 水平在 14、21 和 34 d 时均显著降低(图 4(c))。

3 讨论 (Discussion)

胚胎发育是鱼类生命过程中的一个重要阶段,与其他生命阶段相比,胚胎和仔鱼早期生命阶段对化学物质的反应更敏感^[17,20-21]。从试验结果可知,高浓度的醚菌酯暴露会导致斑马鱼胚胎发育时期孵化率显著降低并引起较多胚胎死亡,而其他处理组对斑马鱼胚胎的孵化率和死亡率无显著差异,这可能是因为胚胎孵化前,胚胎膜能够限制醚菌酯的通过,对胚胎具有屏障和保护作用。研究发现,醚菌酯暴露斑马鱼胚胎 34 d 后,各处理组显著增加了仔鱼的死亡率,并且呈现出一定的剂量-效应关系,这可能是因为仔鱼缺少外部胚胎膜保护,各种解毒器官还未发育完全,防御外界干扰能力弱,因此更容易遭受外界污染物的影响^[23-24]。先前研究表明,醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的 96 h-LC₅₀ 为 0.220 ~ 0.340 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,对斑马鱼成鱼的 96 h-LC₅₀ 为 0.440 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[17]。本研究发现,醚菌酯对斑马鱼胚胎的 144 h-LC₅₀ 为 0.141 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.0857 ~ 0.506 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),对斑马鱼早期生命阶段仔鱼/幼鱼的 34 d-LC₅₀ 为 0.0106 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (0.00384 ~ 0.0264 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),

进一步说明斑马鱼早期生命阶段对醚菌酯更加敏感,并且随着暴露时间的延长,醚菌酯对斑马鱼的毒性增强。

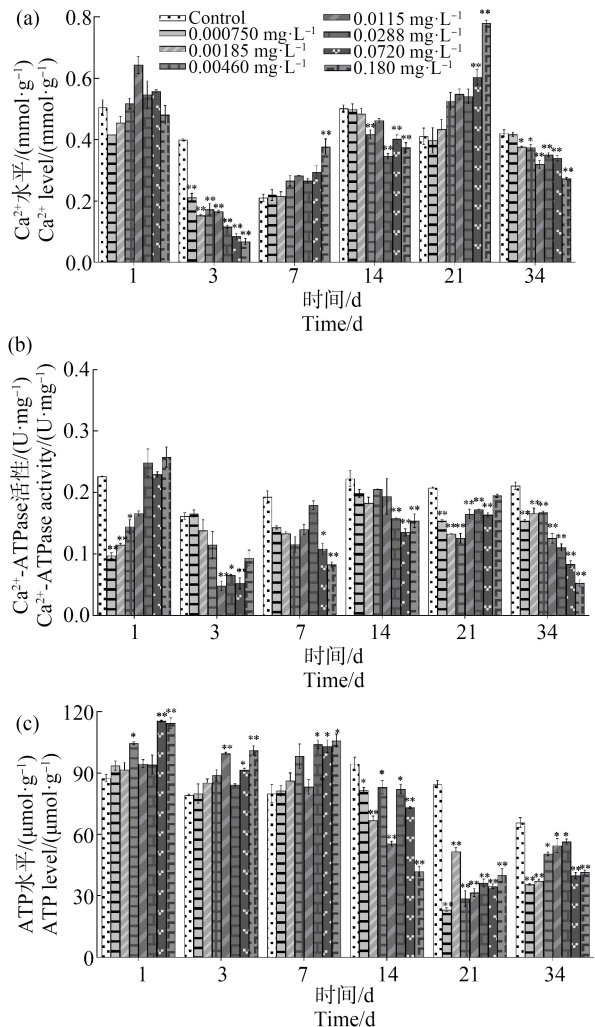


图4 醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段 Ca^{2+} 、 Ca^{2+} -ATP 酶和 ATP 的影响

注:醚菌酯暴露 1、3、7、14、21 和 34 d 后, Ca^{2+} 水平(a)、 Ca^{2+} -ATP 酶活性(b)和 ATP 水平(c)的变化; Ca^{2+} 表示钙离子, Ca^{2+} -ATP 酶表示超微量钙离子腺苷三磷酸酶,ATP 表示三磷酸腺苷;结果以样本的平均值 $\pm$ 标准误差表示;处理组与对照组之间有显著性差异,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$ 。

Fig. 4 Effects of kresoxim-methyl on Ca^{2+} , Ca^{2+} -ATPase and ATP during zebrafish early life stage

Note: The Ca^{2+} level (a), the activity of Ca^{2+} -ATPase (b) and ATP level (c) after zebrafish embryos exposed to kresoxim-methyl for 1, 3, 7, 14, 21 and 34 d; Ca^{2+} represents calcium ion, Ca^{2+} -ATPase represents ultramicro calcium ion adenosine triphosphatase, and ATP represents adenosine triphosphate; the results are expressed as mean $\pm$ SEM of triplicate samples; significant differences between treatments and controls, * means $P<0.05$, ** means $P<0.01$.

研究表明,醚菌酯暴露斑马鱼胚胎 34 d 后,对斑马鱼早期生命阶段的的孵化、死亡、体长和体质量等都产生了不利的影响。研究发现,浓度较低的醚菌酯(0.00460 、 0.0115 和 $0.0288 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)能够显著降低斑马鱼仔鱼的体质量或体长,浓度较高的醚菌酯($0.180 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)对斑马鱼早期生命阶段具有较高的致死毒性,试验结束时斑马鱼基本全部死亡(只剩一条),并且高浓度醚菌酯暴露可能会增加斑马鱼仔鱼的体质量和体长。现有研究表明,醚菌酯长期暴露会导致斑马鱼成鱼肝脏和肠道损伤,并且不同浓度的醚菌酯(0.870 、 87.0 和 $220 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)暴露都会干扰斑马鱼成鱼肝脏中的脂质代谢,降低脂质代谢物的水平^[16]。我们推测,醚菌酯长期暴露可能会引起斑马鱼早期生命阶段肝脏和肠道中的代谢异常,干扰斑马鱼体内的正常代谢和营养供应,进而导致斑马鱼体质量体长的降低。而高浓度醚菌酯能够增加斑马鱼仔鱼的体质量和体长,一方面是因为最高浓度组最后只有一条鱼存活,体质量体长统计存在一定的误差,同时鉴于先前报道农药长期暴露能够增加斑马鱼或老鼠的体质量并诱导部分器官重量增加^[25-26],推测高浓度醚菌酯长期暴露能够诱导斑马鱼早期生命阶段发育过程中肝脏等器官发生肿大,导致代谢失衡进而诱导体质量增加。研究表明,浓度较低的醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段没有明显的致死效应,但其长期暴露会对斑马鱼的生长发育产生显著影响。现有研究发现,不同河流中的醚菌酯残留浓度最高可达 $0.00290 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[27],因此在进行田间施用时,应尽量采取有效的防范措施,减少醚菌酯对鱼类早期生命阶段生长的慢性毒性影响。

生物体内存在氧化和抗氧化的调节机制,当受到外源污染物的刺激时,抗氧化系统水平发生变化,使生物体处于氧化应激状态^[28]。因此,可以通过测定抗氧化酶的活性来评判外源污染物对生物体的氧化损伤程度。在正常生理状态下,机体的 ROS 水平处于一种动态平衡,而一旦这种平衡被打破(ROS 大量生成),生物体会产生氧化应激反应,进而激活抗氧化防御系统来降低 ROS 水平^[10,29]。其中,抗氧化酶 POD、CAT 和 SOD 在细胞抗氧化系统中起着重要作用,POD 和 CAT 能分解或歧化 H_2O_2 ,SOD 能将细胞内氧自由基(O_2^-)转化为过氧化氢(H_2O_2)和分子氧(O_2)^[7-8]。此外,过量的 O_2^- 会发生脂质过氧化作用并增加 MDA 含量,而脂质过氧化是 ROS 在机体内引起的最常见的细胞损伤,因此,MDA 常作

为机体的脂质过氧化指标^[7-8]。先前研究发现,醚菌酯暴露可通过改变斑马鱼仔鱼和成年斑马鱼肝脏中 CAT、SOD 和 POD 活性、ROS 和 MDA 水平、或抗氧化相关基因的表达来诱导氧化应激^[7,12,18]。与这些研究一致,本研究发现,醚菌酯暴露斑马鱼胚胎/仔鱼 3 d 和 7 d 后,斑马鱼体内的 SOD 活性受到显著抑制,而在高浓度醚菌酯暴露下 POD 活性与 CAT 活性均显著增加,这可能是机体抗氧化系统被激活,消耗 SOD 来清除过量 ROS,从而减轻氧化损伤。高浓度醚菌酯暴露 7 d 后,斑马鱼仔鱼中 MDA 含量均显著增加,可能是由于机体内多余的 ROS 不能被抗氧化系统完全清除,氧化损伤作用加剧。在醚菌酯暴露 14、21 和 34 d 后,高浓度的醚菌酯显著增强了 SOD、POD 与 CAT 的活性,导致 MDA 含量显著增加,除了暴露 21 d 后抑制了 POD 的活性,这可能是由于 POD 活性被持续激活,而引起代偿失调,抗氧化系统遭到破坏,导致 POD 活性降低,表明机体的氧化损伤程度不断加剧,最终产生毒性效应。在整个试验期间,随着暴露时间的增长,斑马鱼中的生化指标会随着暴露时间增加受到不同程度的影响,而高浓度组比低浓度组更早受到显著影响,最后会对抗氧化系统造成不可逆的损伤,从而导致斑马鱼的死亡。与之相对的是,低浓度醚菌酯暴露不会直接造成斑马鱼死亡,但会显著改变 SOD、POD 与 CAT 活性和 MDA 含量,产生氧化损伤,进而对斑马鱼早期生命阶段的生长发育产生影响。综上所述,醚菌酯长期暴露会诱导斑马鱼早期生命阶段产生氧化应激反应,并且环境相关浓度醚菌酯对鱼类早期生长抗氧化系统的影响不容忽视。

线粒体在调节氧化应激反应中发挥着重要作用,当机体受到外界影响后产生的 ROS,会破坏生物体的抗氧化防御系统进而造成线粒体损伤^[30]。而 ATP 水平能有效反映出线粒体的功能状态^[31],研究发现,醚菌酯可以通过阻断线粒体内膜的电子传递链来抑制线粒体呼吸及其复合体活性,从而导致 ATP 生物合成减少^[17,32]。本研究发现,浓度较高的醚菌酯暴露斑马鱼胚胎 1、3 和 7 d 后,斑马鱼体内的 ATP 水平显著增加,这可能是机体通过增加 ATP 水平来抵御氧化应激;而在醚菌酯暴露 14、21 和 34 d 后,所有处理组均引起 ATP 水平显著降低,说明醚菌酯长期暴露可能影响斑马鱼早期生长发育过程中的线粒体功能。Bartlett 等^[2]发现线粒体呼吸复合体的中断可增加 ROS 的生成,最终导致细胞 Ca^{2+} 水平

升高,最终导致细胞凋亡。 Ca^{2+} 和 Ca^{2+} -ATP酶参与维持多种代谢途径的稳态,且细胞内 Ca^{2+} 水平主要通过钙通道、 Ca^{2+} -ATP酶等维持^[33-34]。Flampouri等^[35]发现醚菌酯能够诱导人类或小鼠细胞内 Ca^{2+} 水平升高。本研究发现,高浓度醚菌酯($0.180\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)暴露7 d和21 d后,斑马鱼仔鱼 Ca^{2+} 水平显著升高,这可能是细胞能量代谢发生障碍, Ca^{2+} -ATP酶活性下降,细胞 Ca^{2+} 内流增加,外排减少从而引起钙超载。研究发现,钙超载可通过激活氧化应激反应、损伤线粒体等途径引起细胞死亡^[33-34],而醚菌酯暴露3、14和34 d后,斑马鱼仔鱼 Ca^{2+} 水平显著降低,这可能是为了缓解钙超载和细胞死亡。研究还发现,醚菌酯短期暴露会降低斑马鱼仔鱼中的 Ca^{2+} 水平^[17],与先前研究一致,醚菌酯暴露斑马鱼胚胎3、7、14、21和34 d后,大部分处理组中的 Ca^{2+} 水平都显著下降,且不同浓度醚菌酯均能够不同程度降低 Ca^{2+} -ATP酶活性。此外, Ca^{2+} 作为第二信使,在调节多种生理过程中起着重要作用^[36],较低的 Ca^{2+} 水平会严重影响斑马鱼仔鱼中的脂质代谢^[37]。因此,推测醚菌酯可能通过降低斑马鱼体内ATP水平、 Ca^{2+} 水平和 Ca^{2+} -ATP酶活性,调控斑马鱼体内线粒体能量代谢、脂质代谢和氧化应激反应,进而对斑马鱼的早期生命阶段的生长发育产生影响。

综上所述,醚菌酯长期暴露对斑马鱼早期生命阶段的孵化率、死亡率、体长、体质量等发育相关指标都有显著影响,同时对斑马鱼早期生命阶段不同时期的SOD、POD与CAT抗氧化酶活性和MDA含量,以及ATP水平、 Ca^{2+} 水平、 Ca^{2+} -ATP酶活性都有显著影响。值得注意的是,环境浓度水平下的醚菌酯对斑马鱼早期生命阶段的线粒体能量代谢和氧化应激相关因子的活性和水平也有显著的影响,说明环境残留水平的醚菌酯对鱼类早期生命阶段的负面影响不可忽视。此外,在今后的工作中,还需要对斑马鱼中醚菌酯的代谢物进行更详细的研究,以了解其潜在的毒性机制。

通信作者简介:蒋金花(1985—),女,博士,副研究员,主要研究方向为农药毒理学与安全评价。

参考文献(References):

[1] 李慧,曹芳杰,邱立红. 甲氧基丙烯酸酯类杀菌剂对水生生物的生态毒理学研究进展[J]. 农药学报, 2019, 21(S1): 831-840

Li H, Cao F J, Qiu L H. Research progress on ecotoxicology of methoxyacrylate fungicides to aquatic organisms [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2019, 21(S1): 831-840 (in Chinese)

[2] Bartlett D W, Clough J M, Godwin J R, et al. The strobilurin fungicides [J]. Pest Management Science, 2002, 58(7): 649-662

[3] Balba H. Review of strobilurin fungicide chemicals [J]. Journal of Environmental Science and Health Part B, Pesticides, Food Contaminants, and Agricultural Wastes, 2007, 42(4): 441-451

[4] Wightwick A M, Bui A D, Zhang P, et al. Environmental fate of fungicides in surface waters of a horticultural-production catchment in southeastern Australia [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 62(3): 380-390

[5] Cao M C, Li S Y, Wang Q S, et al. Track of fate and primary metabolism of trifloxystrobin in rice paddy ecosystem [J]. The Science of the Total Environment, 2015, 518-519: 417-423

[6] Wang X H, Li X Y, Wang Y, et al. A comprehensive review of strobilurin fungicide toxicity in aquatic species: Emphasis on mode of action from the zebrafish model [J]. Environmental Pollution, 2021, 275: 116671

[7] Mao L G, Jia W, Zhang L, et al. Embryonic development and oxidative stress effects in the larvae and adult fish livers of zebrafish (*Danio rerio*) exposed to the strobilurin fungicides, kresoxim-methyl and pyraclostrobin [J]. The Science of the Total Environment, 2020, 729: 139031

[8] Li H, Cao F J, Zhao F, et al. Developmental toxicity, oxidative stress and immunotoxicity induced by three strobilurins (pyraclostrobin, trifloxystrobin and picoxystrobin) in zebrafish embryos [J]. Chemosphere, 2018, 207: 781-790

[9] Zhang C, Wang J, Zhang S, et al. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Chemosphere, 2017, 188: 510-516

[10] Liu L, Zhu B, Wang G X. Azoxystrobin-induced excessive reactive oxygen species (ROS) production and inhibition of photosynthesis in the unicellular green algae *Chlorella vulgaris* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2015, 22(10): 7766-7775

[11] Cao F J, Zhu L Z, Li H, et al. Reproductive toxicity of azoxystrobin to adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Pollution, 2016, 219: 1109-1121

[12] Wang Y H, Dai D J, Yu Y J, et al. Evaluation of joint effects of cyprodinil and kresoxim-methyl on zebrafish, *Danio rerio* [J]. Journal of Hazardous Materials, 2018, 352: 80-91

- [13] Cui F, Chai T T, Liu X X, et al. Toxicity of three strobilurins (kresoxim-methyl, pyraclostrobin, and trifloxystrobin) on *Daphnia magna* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36(1): 182-189
- [14] Liu L, Jiang C, Wu Z Q, et al. Toxic effects of three strobilurins (trifloxystrobin, azoxystrobin and kresoxim-methyl) on mRNA expression and antioxidant enzymes in grass carp (*Ctenopharyngodon idella*) juveniles [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2013, 98: 297-302
- [15] Li H, Hu S, Wang X Y, et al. Toxicological differences of trifloxystrobin and kresoxim-methyl on zebrafish in various levels of exposure routes, organs, cells and biochemical indicators [J]. Chemosphere, 2022, 306: 135495
- [16] Fang N, Zhang C P, Hu H Z, et al. Histology and metabolomics reveal the toxic effects of kresoxim-methyl on adult zebrafish [J]. Chemosphere, 2022, 309(Pt 2): 136739
- [17] Jiang J H, Wu S G, Lv L, et al. Mitochondrial dysfunction, apoptosis and transcriptomic alterations induced by four strobilurins in zebrafish (*Danio rerio*) early life stages [J]. Environmental Pollution, 2019, 253: 722-730
- [18] Jiang J H, Lv L, Wu S G, et al. Developmental toxicity of kresoxim-methyl during zebrafish (*Danio rerio*) larval development [J]. Chemosphere, 2019, 219: 517-525
- [19] 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): 498-503
- [20] Mu X Y, Pang S, Sun X Z, et al. Evaluation of acute and developmental effects of difenoconazole via multiple stage zebrafish assays [J]. Environmental Pollution, 2013, 175: 147-157
- [21] Jiang J H, Chen L Z, Wu S G, et al. Effects of difenoconazole on hepatotoxicity, lipid metabolism and gut microbiota in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Pollution, 2020, 265(Pt A): 114844
- [22] 中华人民共和国农业农村部. 化学农药 鱼类早期生活阶段毒性试验准则: NY/T 4186—2022 [S]. 北京: 中国农业出版社, 2022
- [23] Zhang C, Wang J, Zhang S, et al. Acute and subchronic toxicity of pyraclostrobin in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Chemosphere, 2017, 188: 510-516
- [24] 李祥英, 李志鸿, 张宏涛, 等. 吡唑醚菌酯对不同阶段斑马鱼的毒性效应评价[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(4): 234-241
- Li X Y, Li Z H, Zhang H T, et al. Evaluation of toxicity effects of pyraclostrobin via multiple stage zebrafish assays [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(4): 234-241 (in Chinese)
- [25] Teng M M, Qi S Z, Zhu W T, et al. Sex-specific effects of difenoconazole on the growth hormone endocrine axis in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2017, 144: 402-408
- [26] Wang Y H, Jin C Y, Wang D, et al. Effects of chlorothalonil, prochloraz and the combination on intestinal barrier function and glucolipid metabolism in the liver of mice [J]. Journal of Hazardous Materials, 2021, 410: 124639
- [27] Liess M, Von Der Ohe P C. Analyzing effects of pesticides on invertebrate communities in streams [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24(4): 954-965
- [28] Alturfan A A, Tozan-Beceran A, Schirli A O, et al. Resveratrol ameliorates oxidative DNA damage and protects against acrylamide-induced oxidative stress in rats [J]. Molecular Biology Reports, 2012, 39(4): 4589-4596
- [29] Maharajan K, Muthulakshmi S, Nataraj B, et al. Toxicity assessment of pyriproxyfen in vertebrate model zebrafish embryos (*Danio rerio*): A multi biomarker study [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 196: 132-145
- [30] Murphy M P. How mitochondria produce reactive oxygen species [J]. The Biochemical Journal, 2009, 417(1): 1-13
- [31] Green D R, Kroemer G. The pathophysiology of mitochondrial cell death [J]. Science, 2004, 305(5684): 626-629
- [32] Li X Y, Qin Y J, Wang Y, et al. Relative comparison of strobilurin fungicides at environmental levels: Focus on mitochondrial function and larval activity in early staged zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Toxicology, 2021, 452: 152706
- [33] Kumar V, Santhosh Kumar T R, Kartha C C. Mitochondrial membrane transporters and metabolic switch in heart failure [J]. Heart Failure Reviews, 2019, 24(2): 255-267
- [34] Hu H J, Song M K. Disrupted ionic homeostasis in ischemic stroke and new therapeutic targets [J]. Journal of Stroke and Cerebrovascular Diseases, 2017, 26(12): 2706-2719
- [35] Flampouri E, Mavrikou S, Mouzaki-Paxinou A C, et al. Alterations of cellular redox homeostasis in cultured fibroblast-like renal cells upon exposure to low doses of cytochrome bc1 complex inhibitor kresoxim-methyl [J]. Biochemical Pharmacology, 2016, 113: 97-109
- [36] Nunes P, Demareux N. The role of calcium signaling in phagocytosis [J]. Journal of Leukocyte Biology, 2010, 88(1): 57-68
- [37] Zhu B R, Wang Z N, Lei L, et al. Transcriptome reveals overview of Ca^{2+} dose-dependent metabolism disorders in zebrafish larvae after Cd^{2+} exposure [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2023, 125: 480-491 ◆