

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200316001

齐澈力木格, 尹晓宇, 李嘉伟, 等. 母体暴露环境浓度盐酸四环素对 F1 代斑马鱼胚胎骨骼发育的影响[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 235-244  
Qi C, Yin X Y, Li J W, et al. Parental tetracycline hydrochloride exposure and resultant offspring cartilage toxicity [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 235-244 (in Chinese)

## 母体暴露环境浓度盐酸四环素对 F1 代斑马鱼胚胎骨骼发育的影响

齐澈力木格, 尹晓宇, 李嘉伟, 董文静, 陈浩, 王欢, 楚文庆, 杨景峰, 于建华<sup>#</sup>, 董武<sup>\*</sup>

内蒙古民族大学动物科学技术学院, 内蒙古自治区毒物监控及毒理学重点实验室, 通辽 028000

收稿日期: 2020-03-16 录用日期: 2020-05-13

**摘要:** 抗生素被广泛应用于兽药和饲料添加剂中, 尤其是四环素等广谱抗生素, 长期滥用于养殖业中。四环素是目前用量最大、应用范围最广泛的一种抗生素。抗生素在体内蓄积, 或者以原型随粪便排入环境中, 造成环境污染。实验用斑马鱼为模式动物来评价低浓度四环素对斑马鱼下一代(F1)发育的毒性影响。选取4月龄亲代斑马鱼(F0), 分别给予0.1、1和100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, TCH)处理30 d后, 实施交配后获得F1代斑马鱼胚胎。结果表明, F1代胚胎随母体TCH暴露浓度的升高而孵化率降低、畸形率和死亡率增加。同时斑马鱼幼鱼下颌骨长度、下颌弓长度变长、下颌骨宽度和舌骨角长度缩短。进一步检测与幼鱼骨骼发育相关基因表达, 发现TCH抑制了 *runx1*、*sox9a*、*sox10* 和 *col2a1a* mRNA 的表达。以上研究结果表明, TCH的残留和污染可能会影响斑马鱼胚胎的发育, 尤其是对胚胎软骨发育有影响。

**关键词:** 盐酸四环素; 斑马鱼胚胎; F1代; 毒性; 软骨发育

文章编号: 1673-5897(2021)2-235-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Parental Tetracycline Hydrochloride Exposure and Resultant Offspring Cartilage Toxicity

Qi Chelimuge, Yin Xiaoyu, Li Jiawei, Dong Wenjing, Chen Hao, Wang Huan, Chu Wenqing, Yang Jingfeng, Yu Jianhua<sup>#</sup>, Dong Wu<sup>\*</sup>

College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia Key Laboratory of Toxicant Monitoring and Toxicology, Tongliao 028000, China

Received 16 March 2020 accepted 13 May 2020

**Abstract:** Antibiotics are widely used as veterinary drugs and feed additives, especially for broad-spectrum antibiotics such as tetracycline, which have been abused in the breeding industry. Tetracycline is the antibiotics with the

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(21567019, 81360508); 内蒙古民族大学特色交叉学科群建设项目(MDXK008); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2018MS08033); 内蒙古草原英才2020年度滚动支持(董武); 内蒙古毒物监测及毒理学重点实验室开放项目(MDK2019074, MDK2019076); 内蒙古民族大学研究生科研创新项目(NMDSS1860); 蒙药研发国家地方联合工程研究中心开放基金资助项目(MDK2019051)

**第一作者:** 齐澈力木格(1990—), 女, 硕士研究生, 研究方向为毒理学, E-mail: qichelimuge@163.com

**\* 通讯作者 (Corresponding author),** E-mail: dongwu@imn.edu.cn

**# 共同通讯作者 (Co-corresponding author),** E-mail: yihyj926@163.com

largest dosage and the widest application. Antibiotics accumulate in the body or are excreted into the environment via feces as a prototype, causing environmental pollution. This experiment used zebrafish as a model organism to evaluate the effects of low concentration of tetracycline on the transgenerational (F1) zebrafish. Parent zebrafish (F0, approximately 4-month-old) were exposed to 0.1, 1 and 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of tetracycline hydrochloride (TCH) for 30 d. The F1 generation zebrafish embryos were obtained. The results showed that the F1 generation embryos had a decreased hatching rate and an increased malformation rate and mortality rate, all of which were concentration-dependent. In addition, the zebrafish juvenile had longer mandible and mandibular arch and more narrow mandible and shorter hyoid bone. Furthermore, transcriptional expression of *runx1*, *sox9a*, *sox10* and *col2a1a* (genes related to skeletal development of juvenile fish) were inhibited by exposure to TCH. This study demonstrates that TCH showed a transgenerational effect by affecting the development of zebrafish embryos, especially the development of embryonic cartilage.

**Keywords:** tetracycline hydrochloride; zebrafish embryo; F1 generation; toxicity; cartilage development

近年来,随着医药行业的迅速发展,抗生素被更广泛地应用,但同时也出现很多安全问题。抗生素的滥用会造成抗药性,给人类健康带来威胁,同时也带来了严重的环境问题<sup>[1]</sup>。目前,世界上生产的抗生素已达 200 多种,其中,至少有 50% 的抗生素用于畜牧业、养蜂业和水产养殖业<sup>[2]</sup>。在禽畜养殖行业中,为了控制生产成本,部分养殖户会通过过量抗生素的使用来减少禽畜的发病率,或者在饲料中添加抗生素以提高饲料转化率,加快畜禽生长<sup>[3]</sup>。四环素类抗生素(tetracyclines, TCs)是一类广谱抗菌药物,主要包括金霉素(chlorotetracycline, CTC)、土霉素(oxytetracycline, OTC)、四环素和强力霉素。由于 TC 的大量使用,人们在农场废水中检测到 TC 的残留<sup>[4-5]</sup>,其中,金霉素高达  $3.99 \sim 107.14 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、四环素也达到  $0.13 \sim 1.78 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[6-7]</sup>。抗生素并不完全被动物吸收,超过 85% 以原始状态直接排放到环境中或作为代谢物形式随粪便排入环境中<sup>[8]</sup>。由于长期使用和持续排放到环境中,造成动物肠道菌群的变化,影响体重<sup>[9]</sup>。抗生素在环境中的迁移推动了抗性基因的传播<sup>[10]</sup>,这对人类的健康和生态系统的稳定构成了潜在的风险<sup>[11-12]</sup>。

四环素类抗生素除了抗菌作用外,还被报道可阻止骨吸收。例如,强力霉素和二甲胺四环素已被证明通过阻断基质金属蛋白酶-9(mmp-9)活性来抑制破骨细胞形成<sup>[13]</sup>。四环素类抗生素及其衍生物对破骨细胞形成抑制作用机制尚不完全清楚<sup>[14]</sup>。四环素类似物,特别是替加环素通过阻断 mmp-9 介导的组蛋白 H3 来抑制破骨细胞的形成,并提示 mmp-9 的抑制可能为糖皮质激素诱导的骨质疏松症的治疗提供新的策略<sup>[15-16]</sup>。这对人和动物的正常骨发育势

必造成不良影响。

软骨发育是骨骼形成过程中最早的发育形态<sup>[17-18]</sup>。在胚胎发育过程中,间充质细胞分化产生骨软骨前体和软骨细胞。无论是硬骨鱼还是哺乳动物,软骨细胞的成熟都伴随着软骨细胞形态、生物合成活性和能量代谢的重大变化<sup>[19]</sup>。随着软骨的成熟,软骨细胞发生肥大,导致细胞直径和体积增大<sup>[17]</sup>。*runx* 是决定成骨细胞和早期分化的转录因子<sup>[20]</sup>。当 *runx2* 某些功能丧失后,软骨的内骨化进程会被推迟<sup>[21]</sup>。骨骼发育中 *sox9* 家族基因是成骨细胞/软骨细胞关联基因,其表达被认为是转基因小鼠中软骨细胞分化的早期标志物<sup>[22]</sup>。在软骨早期发育中 *sox9a* 的表达被促进,而软骨发育后期 *sox9a* 的表达被抑制。*sox9a* 则主要参与早期软骨细胞的增殖分化进程<sup>[23-24]</sup>。*sox9a* 还作为 *col2a1* 的调控因子,具有至关重要的作用<sup>[25-26]</sup>。目前,在小鼠、兔子和狗等动物上有一些关于氟喹诺酮类抗生素(fluoroquinolones antibiotics, FQs)软骨毒性的报道,但在鱼上还没有关于软骨毒性的研究,更没有关于其遗传毒性的报道<sup>[27]</sup>。斑马鱼是研究骨骼软骨和脊索形成的极好的遗传模型<sup>[28-31]</sup>。斑马鱼因其具有发育迅速、胚胎透明、便于操作和观察、对药物极其敏感,及可利用资源极其丰富等诸多的优势,被广泛应用。

本研究使用斑马鱼为动物模型,通过母体的盐酸四环素暴露实验,观察四环素对 F1 代斑马鱼胚胎软骨发育的影响并探讨其作用机制。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验试剂

盐酸四环素(tetracycline hydrochloride, TCH)购于北京索莱宝科技有限公司, CAS 号为 64-75-5,分

子式为  $C_{22}H_{24}N_2O_8 \cdot HCl$ , 分子量为 480.90, 纯度为  $\geq 98\%$  标准品; 总 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒等购自美国 Sigma 公司。

### 1.2 斑马鱼 F0 亲代处理

斑马鱼 (*Danio rerio*) (AB 系), 饲养于斑马鱼养殖系统(北京爱生科技发展公司)中, 保持饲养水温 ( $28 \pm 1$ )  $^{\circ}C$ , 并在自然环境下保持光照: 黑暗时间为 14 h : 10 h。从繁育群体中挑出数量、条件一致的雌雄成年斑马鱼(4 个月), 将雄性和雌性分离并观察 1 周, 通过确认可存活的胚胎来确定个体的生殖状态。将选定的鱼转移到实验缸, F0 亲代斑马鱼经 TCH 处理 30 d, 最终确定为 4 组, 分别为空白对照组、 $0.1 \mu g \cdot L^{-1}$  (低浓度组)、 $1 \mu g \cdot L^{-1}$  (中浓度组) 和  $100 \mu g \cdot L^{-1}$  (高浓度组)。5 ~ 7 d 换水换药, 每天喂食 2 次鱼饲料和丰年虫。在实验前一天傍晚, 随机选取 1 : 1 雌雄鱼放在同一斑马鱼专用孵化缸中混养过夜, 次日见光产卵。

### 1.3 斑马鱼 F1 代胚胎处理

斑马鱼 F0 亲代经 TCH 处理 30 d 后合缸, 实施繁育实验。受精后 1.5 hpf 进行产卵数及受精卵数统计, 并将 F1 代斑马鱼胚胎移入  $28^{\circ}C$  Heratherm IGS180 恒温孵化箱 (Thermo Fisher Scientific, 美国) 中培养。分别于受精后 8、24、48、72、96 和 120 hpf 取样并观察, 记录胚胎均匀性、孵化率、死亡率和畸形率等形态学数据(每组进行 3 次以上的平行及重复实验)。

### 1.4 胚胎及幼鱼形态学评估

形态学评估采用 Brannen 等<sup>[32]</sup>改进的量表对斑马鱼幼鱼的身体形态进行评分。分别观察 8、24、48、72、96 和 120 hpf 的 F1 代胚胎的形态变化。每组 10 粒卵, 分为正常、轻度、中度和严重异常 4 组。进一步分析对胚胎各个器官发育的影响。评分结构包括卵黄囊、心囊、心脏血池和脊索弯曲程度等。形态学评估分数在幼鱼形态结构的正常发育情况下为 4 分, 轻度畸形为 3 分, 中度畸形为 2 分, 重度畸形为 1 分, 评分时器官缺失为 0 分, 未发现异常的正常发育幼鱼最高得分为 16 分。评分时若幼鱼死亡得分为 0, 最后进行统计分析。

### 1.5 阿尔新蓝软骨染色方法及测量方法

取受精后 72、96 和 120 hpf 的幼鱼 10 条, 用 4% 的中性缓冲多聚甲醛(PFA)于  $4^{\circ}C$  下固定并过夜, 样本用  $1 \times$  磷酸盐缓冲溶液(PBS)冲洗 2 次, 在 0.1% 阿尔新蓝染液(阿利新蓝 8GX : 80% 乙醇 :

20% 乙酸)室温染色 12 h 以上, 用体积分数为 95%、90%、80%、70%、50% 和 20% 的酒精脱水各 30 min, 用蒸馏水清洗 30 min, 用质量分数为 1% 的氢氧化钾和体积分数为 30% 的双氧水混合后处理 1 h, 然后用质量分数为 0.05% 的胰酶处理 1 h, 并实时观察, 在 70% 的甘油中观察及保存。然后用 ImageJ 对幼鱼头部下颌骨长度(A)、角舌骨长度(B)、下颌骨宽度(C)和下颌弓长度(D)进行软骨长度测量(图 1)。

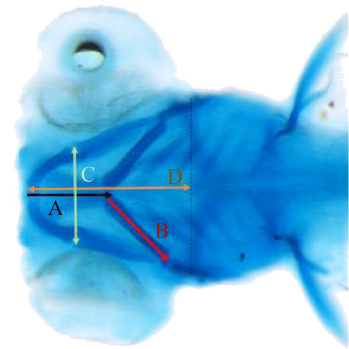


图 1 斑马鱼胚胎头部软骨染色长度测量示意图

注: A 下颌骨长度; B 角舌骨长度; C 下颌骨宽度; D 下颌弓长度。

Fig. 1 Schematic diagram of measuring the length of cartilage staining on the head of zebrafish embryo

Note: A indicates mandibular length; B indicates angular hyoid length; C indicates mandibular width; D indicates mandibular arch length.

### 1.6 总 RNA 的提取及实时荧光定量 PCR(qRT-PCR)

使用 Trizol 试剂处理完整的胚胎, 从整体斑马鱼胚胎中提取总 RNA (Grand Island 公司; 12183-555)。使用 Nano Drop2000c (Thermo Fisher Scientific, 美国) 测定提取的总 RNA 浓度。纯化的总 RNA 使用 cDNA 反转录试剂盒 (Applied Biosystems Inc.) 反转录成 cDNA, 反应方法按照厂家说明书进行, cDNA 样本使用前保存在  $-20^{\circ}C$  条件下。使用 TaqMan 进行基因表达测定和基因表达分析 (Applied Biosystems Inc.)。反转录加入 0.2 ng cDNA 后进行反应与 TaqMan Universal PCR Master Mix 混合, 并使用 7900HT 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied Biosystems, 美国) 进行 PCR 检测, 采用 Sequence Detection System 2.0 软件分析, 实验方法与步骤基本与 Dong 等<sup>[33]</sup>描述的相同。内参基因为  $\beta$ -Actin, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  方法计算基因表达的相对变化(表 1)。

表1 实时荧光定量PCR引物

Table 1 Real-time fluorescence quantitative

PCR primers		
引物名称 Primer name	序列(5' ~ 3') Sequence (5' ~ 3')	长度/bp Size/bp
<i>runx1</i>	F: CAATGACCTGCGTTTCGTGG	173
	R: GCTTTACTGCTTCATCCGGC	
<i>col2a1a</i>	F: GTGTGTGATTCCGGGGACTGT	143
	R: TTTGCACCAAGTGACCCGAT	
<i>sox10</i>	F: CGACTTCGGTAACGTGGACA	104
	R: GGCCATTGGGTGGGAGATAC	
<i>sox9a</i>	F: AATCTCCTCGACCCTACCT	191
	R: TTCTTGAAGTCTCCGAGCGT	
<i>β-Actin</i>	F: ACATCAGCATGGCTTCTGCT	106
	R: GAAGTCCTCTCGGGGAAAGC	

### 1.7 数据统计

所有数据均以平均值±SEM表示,使用 Graph-Pad Prism software 进行统计分析。差异显著性使用单因素方差分析。 $P<0.05$  的情况下被认为是统计学上的差异显著。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 TCH 对 F1 代胚胎的影响

#### 2.1.1 TCH 对 F1 代斑马鱼胚胎均匀性的影响

斑马鱼 F0 亲代经 TCH 处理 30 d 后,引起 F1

代胚胎外胚层前缘和组织的均匀性出现不均匀现象,发育至 8 hpf 时观察并统计分析。F1 代斑马鱼的胚胎均匀性随着 TCH 浓度的升高而下降(图 2)。胚胎均匀性比例在浓度为  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  时与空白对照组相比降低至 58.62% ( $P<0.01$ )。100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组与空白对照组相比降低至 48.27% ( $P<0.001$ )。

#### 2.1.2 TCH 对 F1 代斑马鱼幼鱼发育影响

TCH 处理 F0 亲代斑马鱼 30 d 后,其 F1 代幼鱼出现各种形态发育异常,主要包括脊柱弯曲、头部变形、卵黄浮肿、心囊浮肿、尾部弯曲,或缺失等(图 3)。F1 代斑马鱼胚胎卵黄浮肿率、心囊浮肿率、卵黄浮肿面积和心囊浮肿面积随着 TCH 浓度的升高而增加( $P<0.05$ )。在 48 hpf 时,卵黄浮肿率在 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组比空白对照组上升了 23.33% ( $P<0.001$ ),卵黄浮肿面积与空白对照相比增加了 3.47 倍 ( $P<0.01$ )。心囊浮肿率在 100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组比空白对照组上升了 33.33% ( $P<0.01$ ),心囊浮肿面积比空白对照组相比增加了 11.76 倍 ( $P<0.01$ )。

#### 2.1.3 TCH 对 F1 代的形态学评估

TCH 处理亲代 F0 斑马鱼 30 d 后,F1 代斑马鱼胚胎畸形率随着浓度的升高而增加,中浓度组( $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )相比空白对照组畸形率上升了 13.33% ( $P<0.05$ ),高浓度组( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )与空白对照组相比畸形率上升了 26.67% ( $P<0.001$ )(图 4(a))。对其形态学进

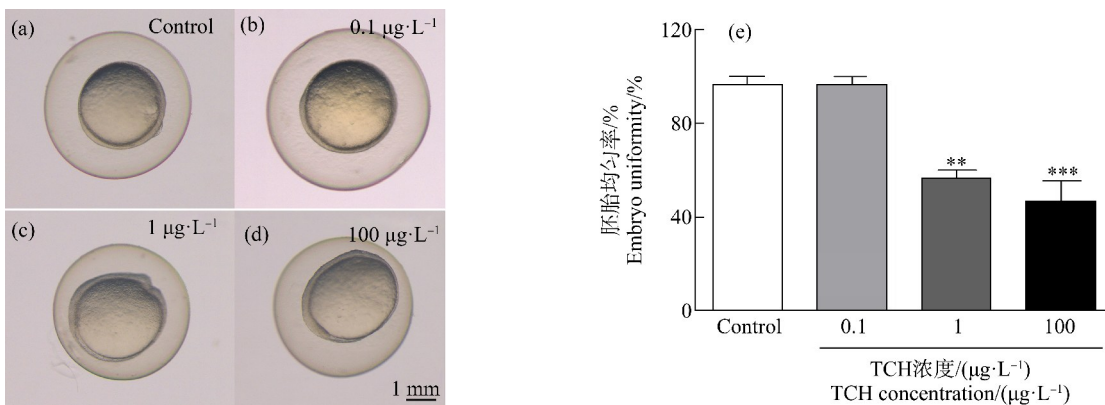


图2 盐酸四环素(TCH)对F1代斑马鱼胚胎均匀性的影响

注:TCH引起F1代斑马鱼胚胎外胚层前缘和组织出现不均匀性;受精卵发育到8 hpf时进行镜下观察,(a)空白对照组,(b)  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组,(c)  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组,(d)  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  浓度组;星号表示暴露组与对照组之间的显著差异(\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ );数据表示为平均值±SEM;标尺=1 mm。

Fig. 2 Effect of tetracycline hydrochloride (TCH) on the uniformity of F1 generation zebrafish embryos

Note: TCH causes heterogeneity in the front edge and tissue uniformity of ectoderm in F1 zebrafish embryos; the fertilized egg was observed under the microscope when it reached 8 hpf; (a) blank control group; (b)  $0.1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration groups; (c)  $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration groups; (d)  $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  concentration groups; the asterisk indicates the significant difference between the exposed group and the control group (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ); data are expressed as mean±SEM; bar = 1 mm.

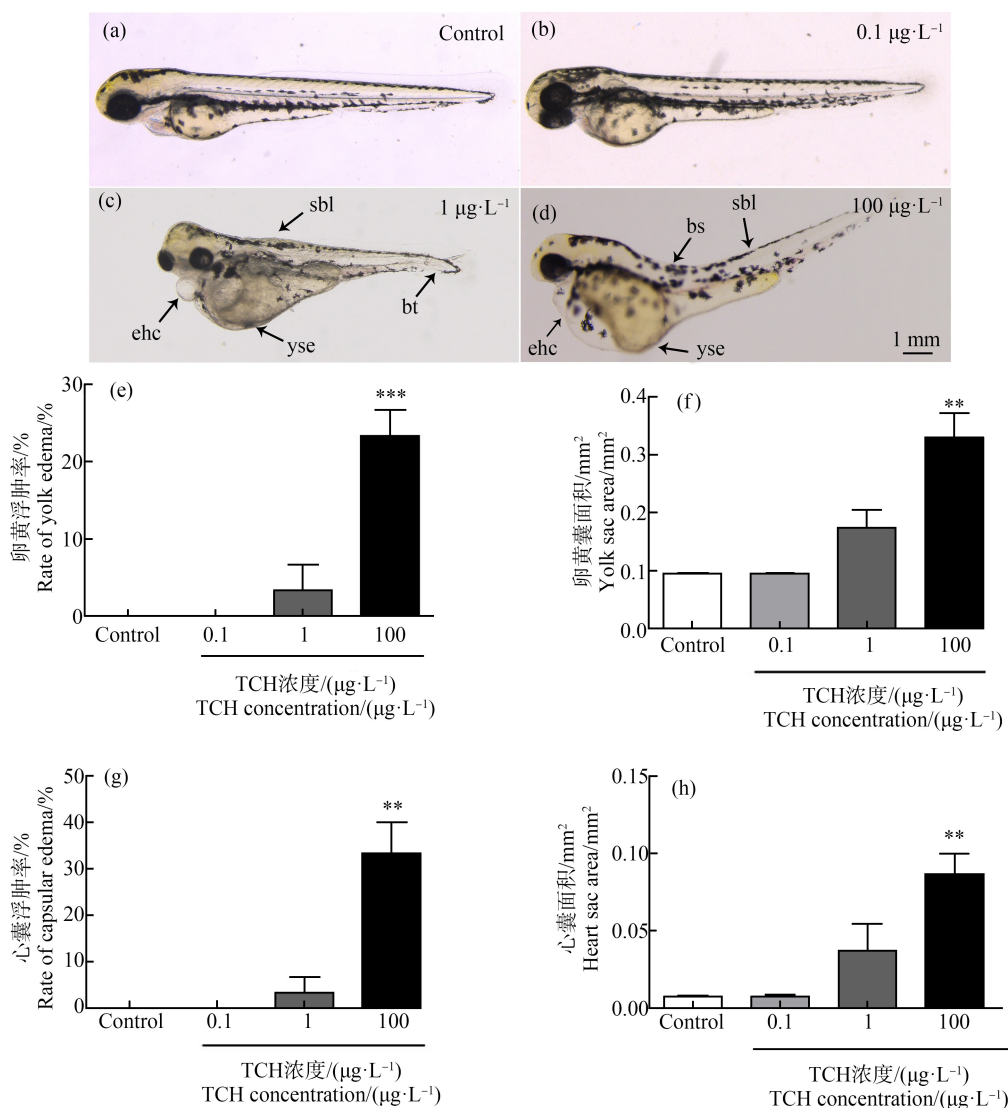


图 3 TCH 引起 F1 代斑马鱼幼鱼卵黄和心囊浮肿

注: TCH 处理亲代 F0 斑马鱼 30 d 后, 实施交配获得 F1 代, 并观察其形态发育异常; bs 为脊柱弯曲; ehc 为心囊水肿; yse 为卵黄囊水肿; sbi 为体长缩短; bt 为尾部弯曲; 星号表示暴露组与对照组之间的显著差异 (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ); 数据表示为平均值  $\pm$  SEM; 标尺 = 1 mm。

Fig. 3 TCH causes yolk and pericardial edema in F1 generation zebrafish larvae

Note: The parent zebrafish (F0) is treated with TCH for 30 d, then mated to obtain F1 generation and the morphological abnormalities in the F1 generation juveniles were observed; after 30 d of parental zebrafish treatment with TCH, bs represents spinal curvature; ehc represents cardiac capsule edema; yse represents yolk sac edema; sbi represents shortened body length; bt represents the tail bends; the asterisk indicates the significant difference between the exposed group and the control group (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ ); data are expressed as mean  $\pm$  SEM; bar = 1 mm.

行评估发现, 中浓度组 ( $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下降至对照组的 70.81% ( $P < 0.05$ ), 高浓度组 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 下降至对照组的 50% ( $P < 0.001$ ) (图 4(b))。

## 2.2 TCH 对 F1 代幼鱼头部软骨的影响

为检测 TCH 对斑马鱼 F1 代胚胎骨骼的影响, 经阿尔新蓝软骨染色, 观察到头面软骨的变形 (图 5)。头部软骨的下颌骨长度随着 TCH 浓度的升高而变长, 胚胎发育至 72、96 和 120 hpf 时, 随着 TCH 浓度升高有变长趋势, 但无显著差异 ( $P > 0.05$ ) (图 6

(a))。角舌骨长度随着 TCH 浓度的升高而缩短。在 96 hpf 时  $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$  浓度组缩短至对照组的 87.56% ( $P < 0.05$ ), 在 72 hpf 和 120 hpf 时虽与对照组相比没有显著差异性, 但有明显的缩短趋势 (图 6(b))。下颌骨宽度随着 TCH 浓度的升高而缩短, 在 72 hpf 时高浓度组 ( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 缩短至对照组的 76.91% ( $P < 0.05$ ), 胚胎发育至 96 hpf 和 120 hpf 时虽与对照组相比没有显著差异性, 但有缩短趋势 ( $P > 0.05$ ) (图 6(c))。下颌弓长度随着 TCH 浓度的升高而变长, 胚

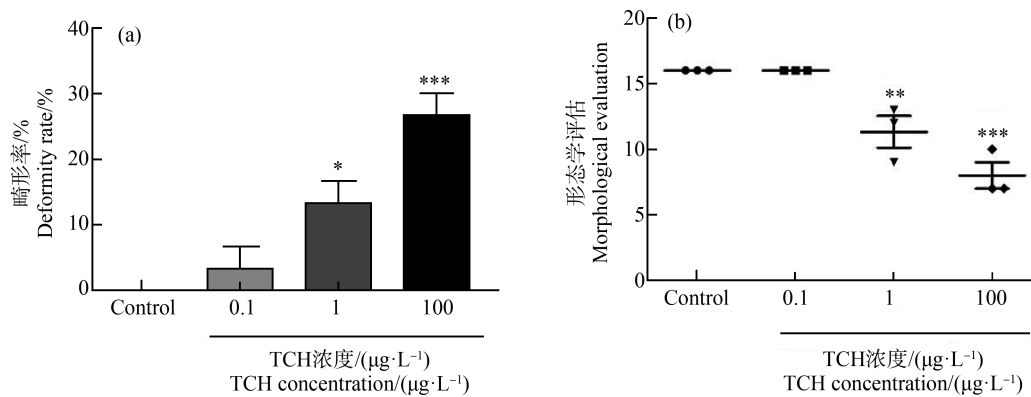


图4 TCH对F1代斑马鱼胚胎发育的影响

注: TCH处理亲代F0斑马鱼30d后交配获得F1代,并实施形态学观察到120 hpf; (a)胚胎畸形率, (b)形态学评估; 星号表示暴露组与对照组之间的显著差异(\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ ); 数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

Fig. 4 Effects of TCH on embryo development of F1 generation of zebrafish

Note: The parent zebrafish were treated with TCH for 30 d, then mated to obtain F1 generation, and the morphology was observed until 120 hpf; (a) embryo deformity rate, (b) morphological evaluation; the asterisk indicates the significant difference between the exposed group and the control group (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ); data are expressed as mean $\pm$ SEM.

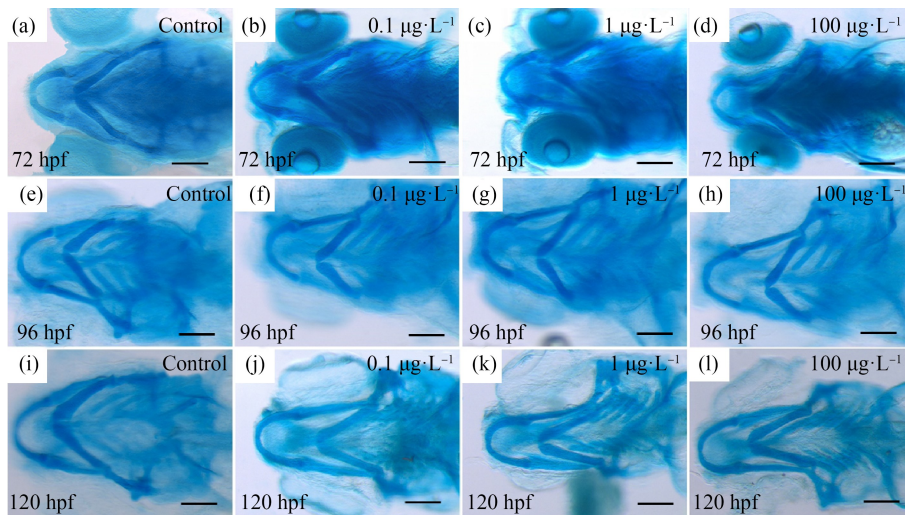


图5 TCH对斑马鱼F1代幼鱼软骨的影响

注: F0亲代斑马鱼在TCH暴露30d后,收集F1代胚胎,发育至72、96和120 hpf时分别进行阿尔新蓝软骨染色,并在镜下观察;标尺=100  $\mu\text{m}$ 。

Fig. 5 Effects of TCH on F1 lava cartilage of zebrafish

Note: F0 parental zebrafish were treated with TCH for 30 d, and F1 generation embryos were collected; when F1 developed to 72, 96 and 120 hpf, they were stained with Alcian blue and observed under the microscope; bar = 100  $\mu\text{m}$ .

胎发育到72、96和120 hpf时下颌弓长度虽与对照组相比没有显著差异,但整体有明显变长趋势( $P>0.05$ ) (图6(d))。

### 2.3 TCH对F1代骨骼相关基因表达的影响

为探究软骨畸形出现的机制,对相关软骨关联基因,如*runx1*、*sox9a*、*sox10*和*col2a1a*进行了检测。结果表明,*runx1*基因的表达在72 hpf时,高浓度组( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )降低至对照组的61.76% ( $P<0.05$ )。

高浓度组与空白对照组相比,基因表达量有降低趋势(图7(a)~图7(d))。72 hpf和96 hpf时,*sox9a*基因在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组分别降低至对照组的84.99%和69.07% ( $P<0.05$ )。48 hpf时,*sox10*基因在中浓度组( $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )降低至空白对照组的77.45% ( $P<0.05$ ),高浓度组( $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )降低至对照组的67.03% ( $P<0.01$ ),在120 hpf时, $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组分别降低至对照组的76.45%和73.70%

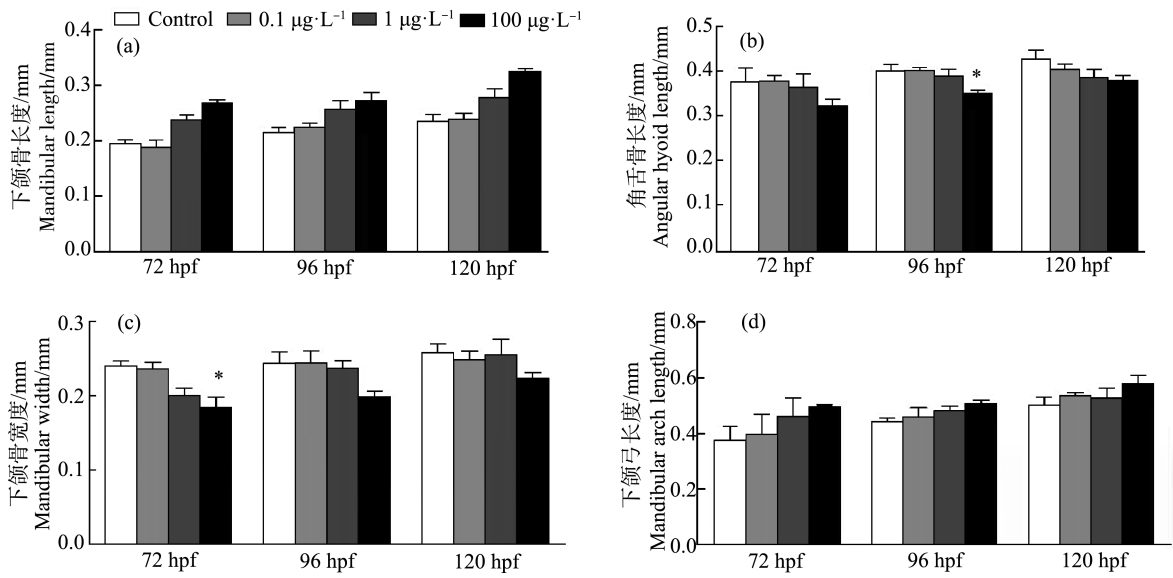


图 6 TCH 对 F1 代斑马鱼幼鱼头部软骨的影响

注:胚胎发育至 72、96 和 120 hpf 时进行阿尔新蓝软骨染色,并镜下观察;用 ImageJ 对幼鱼颅部软骨测量;(a)下颌骨长度,(b)角舌骨长度,(c)下颌骨宽度,(d)下颌弓长度;星号表示暴露组与对照组之间的显著差异(\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ );数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

Fig. 6 Effects of TCH on the head cartilage of F1 zebrafish larvae

Note: Alcian blue cartilage staining are carried out when the embryo developed to 72, 96 and 120 hpf, and the samples were observed by microscopy; the cranial cartilage of juvenile fish was measured by ImageJ; (a) mandibular length, (b) angular hyoid length, (c) mandibular width, (d) mandibular arch length; the asterisk indicates the significant difference between the exposed group and the control group (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ); data are expressed as mean $\pm$ SEM.

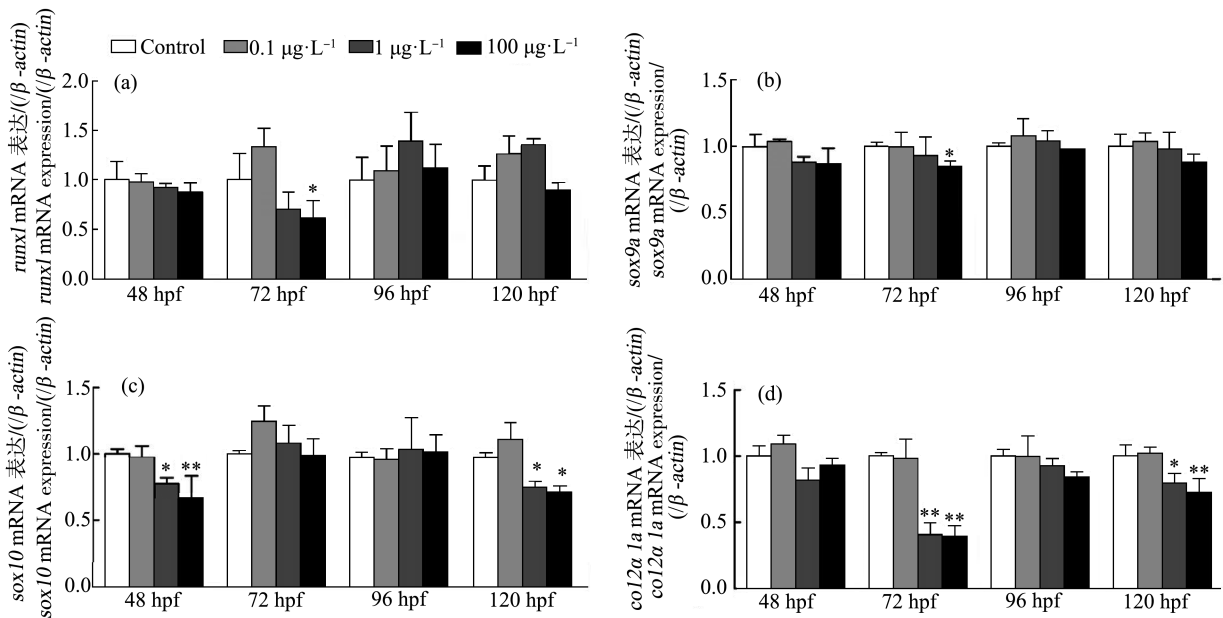


图 7 TCH 对 F1 代斑马鱼胚胎骨骼发育相关基因表达的影响

注:当胚胎发育到 48、72、96 和 120 hpf,使用 RT-PCR 检测 *runx1*、*sox9a*、*sox10* 和 *col2a1a* mRNA 表达;每组包含 10 个胚胎,每组 3 个重复;星号表示暴露组与对照组之间的显著差异(\* $P<0.05$ 、\*\* $P<0.01$ 、\*\*\* $P<0.001$ );数据表示为平均值 $\pm$ SEM。

Fig. 7 Effect of TCH on the gene expression of skeletal development in F1 zebrafish larvae

Note: mRNA expressions of *runx1*, *sox9a*, *sox10* and *col2a1a* were detected by RT-PCR when the embryo developed to 48, 72, 96 and 120 hpf, respectively; each group contained 10 embryos, each with three replicates; the asterisk indicates the significant difference between the exposed group and the control group (\* $P<0.05$ , \*\* $P<0.01$ , \*\*\* $P<0.001$ ); data are expressed as mean $\pm$ SEM.

( $P < 0.05$ )。72 hpf 时, *col2α1a* 基因在中浓度组( $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )降低至对照组的 40.65% ( $P < 0.05$ ); 高浓度组( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )下降至对照组的 39.52% ( $P < 0.01$ ); 胚胎发育至 120 hpf 时, 中浓度组( $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )降低至对照组的 79.78% ( $P < 0.05$ ); 高浓度组( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )下降至对照组的 72.69% ( $P < 0.01$ )。

### 3 讨论 (Discussion)

研究表明, 当成年斑马鱼分别经不同浓度 TCH 暴露 30 d 后, F1 代的胚胎均匀性随着浓度的升高而下降。其孵化率随着 TCH 浓度的升高而降低, 存活率随浓度升高而下降。亲代斑马鱼 TCH 暴露 30 d 后, F1 代斑马鱼幼鱼在各个 TCH 暴露组都出现不同程度畸形, 如心囊水肿、卵黄囊水肿和脊索弯曲等。统计分析表明, F1 代斑马鱼幼鱼经 TCH 暴露后, 总畸形率都显著增高。经软骨染色发现, TCH 造成 F1 代斑马鱼幼鱼下颌骨长度、下颌弓长度、下颌骨宽度和下颌角骨长度的变化, 并随着 TCH 浓度升高而出现不同程度的变长或缩短现象。这可能与 TCH 能够显著抑制斑马鱼 F1 代胚胎骨骼相关基因有关。

孵化是斑马鱼胚胎发育的关键时期。延迟孵化可能是由于斑马鱼胚胎发育迟缓或胚胎无法打破绒毛膜而造成<sup>[34]</sup>。四环素能够影响斑马鱼的胚胎死亡率, 且浓度越高死亡率越高<sup>[35]</sup>, 卵黄囊是胚胎唯一的营养来源, 在胚胎发育早期起着重要的作用。随着胚胎的发育, 卵黄囊的体积逐渐缩小<sup>[36]</sup>。本实验结果显示, TCH 处理 F0 亲代斑马鱼 30 d 后, 其 F1 代胚胎孵化率降低, 死亡率升高, 幼鱼卵黄吸收缓慢, 心囊浮肿严重, 畸形率显著上升, 最终影响斑马鱼胚胎发育进程。这与本实验结果一致, 表明斑马鱼 F0 亲代经 TCH 处理后, 对 F1 代胚胎发育存在显著性影响。

头部软骨长度指示着软骨发育的程度。FQs 类抗生素会在幼犬中引起软骨损伤, 尤其是在负重滑膜关节软骨中<sup>[37]</sup>。另外, Goto 等<sup>[38]</sup>给幼年大鼠短期饲喂氧氟沙星, 会增加关节软骨中氧氟沙星的最大浓度值。实验研究发现, TCH 造成 F1 代幼鱼下颌骨宽度和角舌骨长度与对空白对照组相比均缩短, 且下颌骨变长, 夹角变小, 两侧有缩短的趋势, 可能是 TCH 处理后斑马鱼头部的部分软骨发育受到抑制作用, 软骨发育减缓, 才导致软骨长度缩短。和亲本经 TCH 暴露而影响 F1 代软骨发育相比, F0 代胚胎经 TCH 暴露的实验表明, 除了高浓度( $100 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )

造成严重的骨骼发育延迟和畸形外, 低浓度( $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) TCH 没有造成软骨发育的显著变化。

有研究表明, *sox9a* 可以参与软骨细胞分化, 而当软骨发育到一定时间, *sox9a* 会受到明显抑制作用<sup>[39-40]</sup>。*col2α1* 是编码胶原蛋白 II 的基因, *col2α1a* 基因在很多器官组织中都有表达, 例如大脑、眼睛和心脏等, 但它表达量最高的地方是在软骨<sup>[41-42]</sup>。*col2α1a* 基因在组成细胞外骨架中具有重要作用, *col2α1a* 基因的缺失会导致骨骼发育不良, 在小鼠中表现为骨骼发育畸形, 在人的症状上表现为内骨骼畸形、骨骼变短和缺失脑骶生长板等软骨成长不全症<sup>[43-44]</sup>。本实验研究结果表明, TCH 处理后的斑马鱼 F1 代胚胎对骨骼相关基因的转录表达也有影响。由此初步认为由于软骨组织的产生增加或减少, *runx1*、*sox9a*、*sox10* 和 *col2α1a* mRNA 表达水平升高或下降可能是斑马鱼下颌骨、下颌弓长度加长, 角舌骨、下颌骨宽度缩短及脊索和尾部弯曲的原因, 但还需进一步研究确认。

综上所述, F0 亲代斑马鱼经 TCH 处理 30 d 后, 对 F1 代胚胎发育产生显著的影响。TCH 造成 F1 代胚胎孵化周期延长, 孵化率和死亡率升高。TCH 对 F1 幼鱼软骨的发育造成显著影响, 畸形率升高, 且骨骼发育相关基因的表达水平显著下降。提示环境中 TCH 对下一代软骨发育有毒性影响, 建议加强四环素类抗生素饲料添加的监管。

通讯作者简介: 董武(1969—), 男, 博士, 教授, 主要研究方向为环境毒理学。

共同通讯作者简介: 于建华(1981—), 女, 博士, 副教授, 主要研究方向为环境毒理学。

### 参考文献 (References):

- [1] Faria M, Lopez M A, Fernandez-Sanjuan M, et al. Comparative toxicity of single and combined mixtures of selected pollutants among larval stages of the native freshwater mussels (*Unio elongatulus*) and the invasive zebra mussel (*Dreissena polymorpha*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2010, 408(12): 2452-2458
- [2] Boxall A B, Fogg L A, Blackwell P A, et al. Veterinary medicines in the environment [J]. *Reviews of Environmental Contamination and Toxicology*, 2004, 180: 1-91
- [3] 魏维芮. 浅谈我国抗生素的滥用问题及对策[J]. *化工管理*, 2018(3): 92, 94
- [4] Ben W, Qiang Z, Adams C, et al. Simultaneous determi-



- nation of sulfonamides, tetracyclines and tiamulin in swine wastewater by solid-phase extraction and liquid chromatography-mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2008, 1202(2): 173-180
- [5] 徐永刚, 宇万太, 马强, 等. 环境中抗生素及其生态毒性效应研究进展[J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(3): 11-27  
Xu Y G, Yu W T, Ma Q, et al. The antibiotic in environment and its ecotoxicity: A review [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2015, 10(3): 11-27 (in Chinese)
- [6] 雷慧宁. 规模化猪场废水处理工艺中抗生素和重金属残留及其生态风险[D]. 上海: 华东师范大学, 2016: 26  
Lei H N. Antibiotic and heavy metal residues and ecological risks in large-scale pig farm wastewater treatment process [D]. Shanghai: East China Normal University, 2016: 26 (in Chinese)
- [7] Yu X, Wu Y, Deng M, et al. Tetracycline antibiotics as PI3K inhibitors in the Nrf2-mediated regulation of oxidative stress in zebrafish larvae [J]. *Chemosphere*, 2019, 226: 696-703
- [8] Meyer M T, Bumgarner J E, Varns J L, et al. Use of radioimmunoassay as a screen for antibiotics in confined animal feeding operations and confirmation by liquid chromatography/mass spectrometry [J]. *Science of the Total Environment*, 2000, 248(2-3): 181-187
- [9] Keerthisinghe T P, Wang F, Wang M, 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
- [10] Qiu W, Sun J, Fang M, et al. Occurrence of antibiotics in the main rivers of Shenzhen, China: Association with antibiotic resistance genes and microbial community [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 653: 334-341
- [11] Yuan J, Ni M, Liu M, et al. Occurrence of antibiotics and antibiotic resistance genes in a typical estuary aquaculture region of Hangzhou Bay, China [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2019, 138: 376-384
- [12] Zhu Y G, Johnson T A, Su J Q, et al. Diverse and abundant antibiotic resistance genes in Chinese swine farms [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2013, 110(9): 3435-3440
- [13] Franco G C, Kajiya M, Nakanishi T, et al. Inhibition of matrix metalloproteinase-9 activity by doxycycline ameliorates RANK ligand-induced osteoclast differentiation *in vitro* and *in vivo* [J]. *Experimental Cell Research*, 2011, 317(10): 1454-1464
- [14] Kim Y, Kim J, Lee H, et al. Tetracycline analogs inhibit osteoclast differentiation by suppressing MMP-9-mediated histone H3 cleavage [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(16): 4038
- [15] Dorman G, Cseh S, Hajdu I, et al. Matrix metalloproteinase inhibitors: A critical appraisal of design principles and proposed therapeutic utility [J]. *Drugs*, 2010, 70(8): 949-964
- [16] Vandoooren J, Knoop S, Aldinucci Buzzo J L, et al. Differential inhibition of activity, activation and gene expression of MMP-9 in THP-1 cells by azithromycin and minocycline versus bortezomib: A comparative study [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0174853
- [17] Dong W, Hinton D E, Kullman S W. TCDD disrupts hypural skeletogenesis during medaka embryonic development [J]. *Toxicological Sciences*, 2012, 125(1): 91-104
- [18] Zhang G, Eames B F, Cohn M J. Chapter 2. Evolution of vertebrate cartilage development [J]. *Current Topics in Developmental Biology*, 2009, 86: 15-42
- [19] Karsenty G. Transcriptional control of skeletogenesis [J]. *Annual Review of Genomics and Human Genetics*, 2008, 9: 183-196
- [20] Flores M V, Lam E Y, Crosier P, et al. A hierarchy of Runx transcription factors modulate the onset of chondrogenesis in craniofacial endochondral bones in zebrafish [J]. *Developmental Dynamics*, 2006, 235(11): 3166-3176
- [21] Enomoto H, Furuichi T, Zanma A, et al. *Runx2* deficiency in chondrocytes causes adipogenic changes *in vitro* [J]. *Journal of Cell Science*, 2004, 117: 417-425
- [22] Bell D M, Leung K K, Wheatley S C, et al. SOX9 directly regulates the type-II collagen gene [J]. *Nature Genetics*, 1997, 16(2): 174-178
- [23] Lefebvre V, Huang W, Harley V R, et al. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene [J]. *Molecular and Cellular Biology*, 1997, 17(4): 2336-2346
- [24] Sekiya I, Tsuji K, Koopman P, et al. SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6 [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275(15): 10738-10744
- [25] Bridgewater L C, Lefebvre V, de Crombrughe B. Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1998, 273(24): 14998-15006
- [26] Goldring M B, Peng H, Ijiri K, et al. ESE1 inhibits COL2A1 promoter activity via Sox9 and CBP [J]. *Matrix Biology*, 2006, 25(S1): S90
- [27] 何加发. 诺氟沙星对稀有鮡鲫雌性亲本胚胎及子代骨骼发育的影响[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2019: 1

- He J F. The influence of embryo and bone development treated with norfloxacin in rare minnow *Gobiocypris rarus* offspring [D]. Yangling: Northwest A&F University, 2019: 1 (in Chinese)
- [28] Crump J G, Swartz M E, Eberhart J K, et al. Moz-dependent Hox expression controls segment-specific fate maps of skeletal precursors in the face [J]. *Development*, 2006, 133(14): 2661-2669
- [29] Dutton J R, Antonellis A, Carney T J, et al. An evolutionarily conserved intronic region controls the spatiotemporal expression of the transcription factor Sox10 [J]. *BMC Developmental Biology*, 2008, 8: 105
- [30] Halpern M E, Hatta K, Amacher S L, et al. Genetic interactions in zebrafish midline development [J]. *Developmental Biology*, 1997, 187(2): 154-170
- [31] Renn J, Winkler C, Schartl M, et al. Zebrafish and medaka as models for bone research including implications regarding space-related issues [J]. *Protoplasma*, 2006, 229(2-4): 209-214
- [32] Brannen K C, Panzica-Kelly J M, Danberry T L, et al. Development of a zebrafish embryo teratogenicity assay and quantitative prediction model [J]. *Birth Defects Research Part B, Developmental and Reproductive Toxicology*, 2010, 89(1): 66-77
- [33] Dong W, Wang F, Fang M, et al. Use of biological detection methods to assess dioxin-like compounds in sediments of Bohai Bay, China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 173: 339-346
- [34] Osman A G, Wuertz S, Mekkawy I A, et al. Lead induced malformations in embryos of the African catfish *Clarias gariepinus* (Burchell, 1822) [J]. *Environmental Toxicology*, 2007, 22(4): 375-389
- [35] 梁伟放, 赵建国, 柳贤德. 四环素对斑马鱼胚胎发育及CAT和SOD活性的影响[J]. *热带农业工程*, 2017, 41(1): 17-20
- Liang W F, Zhao J G, Liu X D, et al. Effect of tetracycline on zebrafish embryonic development and CAT and SOD activities [J]. *Tropical Agricultural Engineering*, 2017, 41(1): 17-20 (in Chinese)
- [36] Jonsson M E, Kubota A, Timme-Laragy A R, et al. Ahr2-dependence of PCB126 effects on the swim bladder in relation to expression of CYP1 and cox-2 genes in developing zebrafish [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2012, 265(2): 166-174
- [37] Yabe K, Satoh H, Ishii Y, et al. Early pathophysiologic feature of arthropathy in juvenile dogs induced by ofloxacin, a quinolone antimicrobial agent [J]. *Veterinary Pathology*, 2004, 41(6): 673-681
- [38] Goto K, Yabe K, Suzuki T, et al. Chondrotoxicity and toxicokinetics of novel quinolone antibacterial agents DC-159a and DX-619 in juvenile rats [J]. *Toxicology*, 2010, 276(2): 122-127
- [39] Bi W, Deng J M, Zhang Z, et al. Sox9 is required for cartilage formation [J]. *Nature Genetics*, 1999, 22(1): 85-89
- [40] Akiyama H, Chaboissier M C, Martin J F, et al. The transcription factor Sox9 has essential roles in successive steps of the chondrocyte differentiation pathway and is required for expression of Sox5 and Sox6 [J]. *Genes & Development*, 2002, 16(21): 2813-2828
- [41] Cheah K S, Au P K, Lau E T, et al. The mouse Col2a-1 gene is highly conserved and is linked to Int-1 on chromosome 15 [J]. *Mammalian Genome*, 1991, 1(3): 171-183
- [42] Wood A, Ashhurst D E, Corbett A, et al. The transient expression of type II collagen at tissue interfaces during mammalian craniofacial development [J]. *Development*, 1991, 111(4): 955-968
- [43] Li S W, Khillan J, Prockop D J. The complete cDNA coding sequence for the mouse pro alpha 1(I) chain of type I procollagen [J]. *Matrix Biology*, 1995, 14(7): 593-595
- [44] Cheah K S, Lau E T, Au P K, et al. Expression of the mouse alpha 1(II) collagen gene is not restricted to cartilage during development [J]. *Development*, 1991, 111(4): 945-953

