

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20210327001

周宇森, 张焕新, 钟玮, 等. 多环芳烃类污染物对斑马鱼胁迫效应的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(2): 109-117

Zhou Y M, Zhang H X, Zhong W, et al. Advances in research on stress effects of polycyclic aromatic hydrocarbons on zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(2): 109-117 (in Chinese)

多环芳烃类污染物对斑马鱼胁迫效应的研究进展

周宇森¹, 张焕新^{1,*}, 钟玮², 孔强^{1,#}

1. 山东师范大学地理与环境学院, 济南 250000

2. 山东省济南市生态环境局章丘分局, 济南 250200

收稿日期: 2021-03-27 录用日期: 2021-05-08

摘要: 伴随着现代工业的飞速发展, 不同环境介质中污染物的种类、污染范围和污染强度也在不断改变。作为一种强生物损伤性物质, 多环芳烃类污染物备受关注。鉴于生态环境中多环芳烃的污染问题日益凸显, 对其毒性效应机制研究的概括和总结尤为重要。因此笔者综述了多环芳烃类污染物对斑马鱼不同生物结构层次的毒性效应研究进展, 总结并比较了不同多环芳烃类污染物的毒性效应机制和毒性强度。同时就目前斑马鱼在水环境污染评价、水质综合毒性测定方面的应用进行了概述和展望。研究多环芳烃类污染物对斑马鱼的急性毒性作用和富集作用及其分子机制将对开展水环境中突发有机污染的早期预警及水环境安全评估、人体健康评估具有重要意义。

关键词: 多环芳烃(PAHs); 斑马鱼; 致毒机制; 水环境安全评估

文章编号: 1673-5897(2022)2-109-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Advances in Research on Stress Effects of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Zebrafish

Zhou Yumiao¹, Zhang Huanxin^{1,*}, Zhong Wei², Kong Qiang^{1,#}

1. College of Geography and Environment, Shandong Normal University, Jinan 250000, China

2. Zhangqiu Branch of Jinan Ecological Environment Bureau, Shandong Province, Jinan 250200, China

Received 27 March 2021 accepted 8 May 2021

Abstract: With the rapid development of modern industry, the types, scope, and intensity of pollutants in different environmental media are also constantly changing. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) contained in pollutants have attracted much attention as a type of strong biologically damaging substance. PAHs mainly exist in air and water, easily entering into the human body. Because of their fat-soluble properties, they are difficult to be eliminated after entering into the human body, which causes great harm to human body. A certain amount of PAHs usually exists in natural environment such as atmospheric environment, water environment, and soil environment. The existence of PAHs is more obvious in some areas with dense populations, developed industries, and frequent traffic. Since the pollution of PAHs in the ecological environment is becoming increasingly prominent, the research on the

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(61902368); 山东省自然科学基金优秀青年基金(ZR2020YQ41); 山东省重点研发计划(公益类科技攻关)(2019GSF109103)

第一作者: 周宇森(1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: zhouyumiao0802@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: qshdzhhx@126.com

共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: kongqiang@sdu.edu.cn

mechanism of their toxicity is particularly important. In recent years, with the frequent appearance of health problems caused by PAHs, the toxic mechanism of PAHs has attracted more and more attention. The morphology of zebrafish during its growth and development is quite similar to that of human, and the signal pathways and genes involved at the cellular and molecular levels generally have a high degree of homology. With the deepening and specificity of water pollution research, the contribution of zebrafish, as a model organism, is increasing, and its applications are becoming more and more extensive as well. This paper reviews the research progress of the toxic effects of PAHs on zebrafish at different biological structure levels, summarizes the acute toxic effects of different PAHs on adult zebrafish and their embryos, so as to compare the mechanisms of toxic effects and toxic intensities of different PAHs pollutants. In this paper, we will focus on the research progress in the areas of behavior, physiology, biochemistry, and molecular mechanisms of zebrafish exposed to PAHs pollutants. At the same time, the application of zebrafish in the evaluation of water environment pollution and the determination of comprehensive water quality toxicity is summarized and prospected. PAHs in the water environment will enter aquatic organisms through bioaccumulation and continue to accumulate, thus changing the biological effects of organisms and causing harm to organisms. The study of the acute toxicity and enrichment of PAHs on zebrafish as well as its molecular mechanism will be of great significance to the early warning of sudden organic pollution in water environment, and the assessment of water environment safety and human health.

Keywords: polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs); zebrafish; toxic mechanism; assessment of water environment safety

自然环境中的多环芳烃(PAHs)主要是由矿质燃料如煤、石油等有机高分子化合物在不完全燃烧时产生的^[1]。水域中,PAHs的入侵途径主要有工农业废水排放、大气污染物沉降、固体废物渗沥和土壤环境迁移等,对水生生物构成一定的威胁。采用模式生物斑马鱼(*Danio rerio*)作为受试生物可以快速有效地揭示 PAHs 对水生生物的毒性效应及其机理。作为易于使用的体内模型,斑马鱼及其胚胎和幼鱼正越来越多地被用于评估污染物毒性作用,并对机体损伤的各种机制具有良好的预测能力^[2]。而对于环境污染物的毒性表征,生物组学方法(如高通量测序、微阵列和核磁共振)已被广泛应用于确定分子水平上的变化^[3]。通过研究 PAHs 对斑马鱼的毒理效应,可为评估 PAHs 对水生生物的生态毒性效应提供依据,这为降低水体 PAHs 的毒性效应,减少和治疗污染物对人类健康的损伤提供关键信息。此综述系统描述了 PAHs 的毒性作用机制,更为直观地评价了环境中污染物的生态风险,为进一步探究水体有机污染物对水生生物及人类健康的影响提供理论依据。

近年来国内外关于 PAHs 污染对于模式生物的生理毒性研究逐渐增多。通过不同途径将斑马鱼暴露于 PAHs 类污染物中可获得大量的毒理学数据,明晰了此类污染物对于斑马鱼胁迫效应的具体损伤

机制,这对于丰富污染物毒性效应数据、发展毒理学应用以及对人类疾病的发现和治疗都有独特的意义。时至今日,关于 PAHs 暴露对于斑马鱼抗氧化防御机制的文献已不在少数,但缺少系统性的归纳、分析和解释。于此,本文旨在前人研究基础之上,重点综述不同种类不同浓度的 PAHs 暴露对于斑马鱼及其幼鱼和胚胎的毒性效应和实质性表征,分析短期和少量长期作用效果的差异及组织结构的显著变化等,解释和阐明 PAHs 毒性发生发展的分子机制,最后对该领域研究的必要性和研究前景进行阐释。

1 PAHs 胁迫对斑马鱼行为、生长发育和组织结构的影响 (Effects of PAHs stress on the behavior, growth and tissue structure of zebrafish)

生物的行为反应以及致死致畸等效应是生物体面对外界环境刺激时体内生理变化的外在响应^[4],斑马鱼大脑在功能和形态上与哺乳动物的大脑相似,且对污染物外在反应响应敏感、迅速,因此经常被应用于生态毒理学的研究中。

1.1 行为学的影响

受到 PAHs 的胁迫后,斑马鱼的神经、代谢和免疫将通过运动系统的支配对应激、逆转和位移等行为学指标产生影响。Mohanty 等^[5]研究了 PAHs 对斑马鱼行为学和抗氧化防御机制的胁迫,最终得知

斑马鱼暴露于水中的苯并[a]芘(B[a]P)后,发生了趋暗行为的逆转,这可能与斑马鱼脑室周围灰色区(PGZ)的神经形态学改变有关。Das等^[6]经过较长时间记录发现,长期暴露于B[a]P中会显著损害斑马鱼的运动、活动能力,其主要表现为总移动距离和速度的减少。Vignet等^[7]通过饲喂的手段使斑马鱼和不同浓度PAHs组分长期接触,发现暴露组的斑马鱼相较于对照组表现出较高的活动性、较低的探索活动水平和较高的焦虑水平。除此之外,其他因素也会影响PAHs对斑马鱼的毒性表现,Aparna和Patri^[8]发现水体过度拥挤产生的应激效应可调节B[a]P诱导的斑马鱼行为改变,导致成年斑马鱼大脑主导学习和记忆缺陷的组织出现病理学改变。

1.2 生长发育的影响

PAHs对于斑马鱼的生长发育毒性是较为常规的有机污染物毒性指标,斑马鱼与PAHs接触后会引发致死效应或敏感部位如心血管、消化道和生殖器官等的损伤。在此主要介绍PAHs暴露后短期产生的急性毒性效应对斑马鱼生长发育过程中组织结构的影响。

斑马鱼暴露于PAHs中后,产生急性应激毒性效应是最普遍的表型现象之一,且对于斑马鱼的幼鱼和胚胎的病理损伤作用更为明显。为了揭示特征污染物对斑马鱼的内在毒性作用机制,一般以生物标志物作为指示参数来测定污染物对斑马鱼的亚致死或致畸效应^[9]。如Alves等^[10]分析了加油站油水分离器排放的废水中所含的PAHs对于斑马鱼的毒性作用,发现 $21.8 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 萘(Nap)暴露96 h,对50%的斑马鱼幼鱼都产生了明显的有效毒害作用。Perrichon等^[11]将斑马鱼胚胎及幼鱼暴露于2种含PAHs的化石燃油组分(brut阿拉伯轻质燃料油和Erika重燃料油)中后,发现暴露于Erika组分中的斑马鱼在生命早期阶段就产生了高度的应激反应。Li等^[12]发现GM-2分散剂可以增强原油对斑马鱼的损伤效应,这是由于GM-2分散剂增加了原油对斑马鱼的暴露量。蔡吉榛等^[13]为探究近海域沉积物中含氯多环芳烃(CIPAHs)的生物学毒性作用,将斑马鱼胚胎暴露于含有2种不同浓度PAHs的湛江水体底泥沉积物提取物中,并且发现胚胎的致死效应和致畸程度与提取物中CIPAHs浓度呈现正相关。

还有其他研究表明,光照能够诱导PAHs对斑马鱼的氧化损伤作用增强。例如Willis和Oris^[14]研究发现,施加高强度的紫外线(UV)辐射后,水中一

定浓度(如蒽(Ant) $1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的PAHs对斑马鱼毒性显著增加。更有文献表明石油暴露对斑马鱼产生毒性的物质可能不止PAHs,González-Doncel等^[15]发现对斑马鱼产生的有效毒性作用与直接的石油暴露有关,且毒性机制不仅是PAHs单独暴露的作用机制,这需要进一步确定是哪些石油成分引发了与单独PAHs暴露不同的毒性效果。

自然环境中的PAHs不止以原始形态存在,其易受到其他氧化作用如光化学氧化和微生物转化等生成酮、酚、酯和羧酸等氧化产物,为此,Diamante等^[16]对暴露于羟基化PAHs中的斑马鱼胚胎进行观察,最终发现其产生的发育毒性使斑马鱼存活率显著下降并观察到循环缺陷,同时血红蛋白水平下降明显。

1.3 对于组织结构的影响

PAHs暴露一段时间后由于其持久性和生物蓄积性等固有特性,会在斑马鱼的组织中逐渐积聚进而产生负面影响。当暴露的水环境中含有一定浓度的PAHs时,被斑马鱼吸入、吞食或接触吸收的PAHs会在其组织和器官中不断蓄积,对组织产生影响进而出现不良反应。Zhai等^[17]的研究表明,斑马鱼对PAHs的吸收主要发生于头部和消化道内,且附着于悬浮颗粒上的PAHs更容易被斑马鱼的组织吸收并产生生物富集效应。当悬浮颗粒浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,斑马鱼对芘(Pyr)和氟蒽(Flu)的吸收速率常数分别增加了16.4%~109.3%和21.8%~490.4%。Xie等^[18]将斑马鱼暴露于 $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ B[a]P 15 d后,发现斑马鱼肠道内常见的致病菌如葡萄球菌显著增多,导致斑马鱼肠道微生物失调并引发炎症,此外,B[a]P显著提高了斑马鱼白介素*il1 β* 的mRNA的转录水平,其中*il6*、*il8*、*il10*和*ifnphil*转录水平显著升高。Vignet等^[19]通过饲喂使斑马鱼暴露于PAHs中,并在个体、组织和分子水平上分析了生殖性状的差异性,组织学分析显示暴露组斑马鱼表现出明显的卵巢发育成熟缺陷。Hicken等^[20]使斑马鱼胚胎直接暴露于含有极低浓度PAHs($\Sigma \text{PAH} = 2.4 \times 10^{-2} \sim 3.6 \times 10^{-2} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)原油中,当胚胎短暂暴露时会引起亚致死、反应延迟等效应,而胚胎暴露近1 a后,成年后的斑马鱼的心脏形状出现了细微变化,心血管输出量减少,游泳能力显著下降。

综上所述,PAHs确实可以对鱼类正常的组织结构产生干扰,并通过不同的成分触发不同的途径,从而产生不同的影响。

2 PAHs胁迫对于斑马鱼生理生化指标的影响 (Effects of PAHs stress on physiological and biochemical indexes of zebrafish)

当水环境受到各种有毒物质污染,尤其是PAHs汇入时,如何在短时间内检测、评估其污染效应成为生态毒理学的重点问题之一,模式生物的生理生化毒性效应检测作为一种优良研究手段应运而生。PAHs对斑马鱼产生胁迫效应时,生物本身会通过反馈调节相关酶的活性,进而调节代谢速率;或通过激素调节影响生物的脂质代谢过程,因此酶活性和脂质代谢的改变往往作为研究胁迫效应的基础指标。

2.1 代谢酶和抗氧化酶活性的改变

自然环境中的PAHs常以复杂混合物的形式出现,一些混合物已被证明在斑马鱼及其胚胎中有扰乱代谢的作用,导致其体内的代谢酶活性变差而引起协同发育毒性。Wang等^[21]发现成年斑马鱼体内PAHs浓度与代谢酶活性存在相互作用关系。随着PAHs浓度的增加,细胞色素P450(CYPs)和总超氧化物歧化酶(T-SOD)活性开始升高,当PAHs浓度达到峰值时,活性下降到最低状态。Timme-Laragy等^[22]发现在斑马鱼模型中,含PAHs的复杂混合物的毒性是由芳香烃受体2(AHR2)介导的,并通过抑制cyp1a酶活性而增强毒性效应,cyp1a基因表达被抑制后会改变斑马鱼的正常代谢,进而对斑马鱼的生存和发育过程产生影响。Wincent等^[23]的研究结果表明,含氧多环芳烃(oxy-PAHs)混合物作为一种强有力的Ahr激活剂,可以诱导斑马鱼体内的谷胱甘肽硫转移酶(GST)活性改变,同时表现出显著的发育毒性。Kim等^[24]将斑马鱼幼鱼暴露于一定浓度($2.5 \times 10^4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的伊朗重质原油含水馏分(WAFs)中5 d,发现其甲状腺内过氧化氢酶活性水平显著下降,甚至破坏了斑马鱼幼鱼的甲状腺功能。除此之外仍有少量联合毒性的研究,如谭敏卿^[25]首次研究了菲(PHE)与高氯酸钠对斑马鱼的联合毒性效应,发现2种物质均导致斑马鱼胚胎的畸形率、死亡率升高,心率和孵化率降低且对SOD的影响为先抑制后诱导,并得出PHE与高氯酸钠对斑马鱼的联合毒性作用为拮抗。此数据为二者联合毒性研究提供重要依据。

所以当外界环境中的PAHs对斑马鱼产生胁迫效应时,其体内会产生大量的自由基,进而刺激自身抗氧化防御机制酶发挥作用,对机体进行保护。据

上述可知,斑马鱼体内代谢酶活性的改变是抵御PAHs毒性作用的重要表征。

2.2 对脂质代谢的影响

暴露于PAHs时,斑马鱼的肝脏炎症总是伴随着脂质氧化,PHE是一种典型的PAHs,会导致斑马鱼脂质代谢紊乱。如Mai等^[26]将斑马鱼暴露于PHE($0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)中15 d,GO富集分析表明PHE诱导了脂质转运体活性、脂质转运和跨膜转运相关基因的表达变化,引起脂肪消化吸收通路富集,导致肝脏细胞肥大、血液积聚、白细胞增多及巨噬细胞数量增加。

斑马鱼作为仅次于小鼠的一种优秀的体内模型在当下研究中应用甚广,但体外模型的建立仍有很大的研究空间。Ning等^[27]首次利用体外模型评估了PAHs类对脂质代谢的作用,结果表明,5种硝基多环芳烃(NPAHs)暴露组中有4种组分表现出明显的靶向雌激素受体 α (ER α)激动活性,并诱导HepG2细胞分泌17 β -雌二醇(E₂)。由此证明NPAHs通过ER α 信号通路诱导潜在的脂质毒性。

这些研究为持久性有机污染物诱导的功能蛋白酶和脂质代谢干扰作用提供了新的视角,并为更好地理解PAHs的环境风险提供了思路。

3 PAHs对斑马鱼胁迫效应分子机制的研究进展 (Research progress on molecular mechanism of PAHs stress effect on zebrafish)

分子机制是指生物机体结构组成部分的相互关系,以及其间发生的各种变化过程的物理、化学性质和相互关系^[28]。在实验室条件下,可利用分子、细胞生物学等研究手段阐明胁迫毒性发生发展的分子机制,筛选出生物标志物,确定污染物致癌致畸效应干预的靶点,于此可对机体损伤修复提供分子依据。评估环境污染物对于斑马鱼的毒性效应时采用全基因组的差异表达基因分析,其数据可以很好地阐明暴露的毒性效应及其相关的机制^[29]。

3.1 转录组学

与环境相关的PAHs对斑马鱼胁迫效应的研究不仅需要聚焦于其致癌作用,更需要了解其引起的发育毒性作用的细胞分子机制。比如在脊椎鱼类动物细胞中,PAHs多集中在脂滴中,可触发生物转化、氧化应激和炎症等基因的上调。

研究基因分子的差异化多采用实时荧光定量PCR技术(qPCR)。如Bui等^[30]使吸附于纳米烟尘颗粒上的PAHs与斑马鱼直接接触8 d以上,应用高通

量测序和 qPCR 得出与生物转化、氧化应激和谷胱甘肽相关的代谢通路的调控基因如 *Hmox1* 和 *Nqo1* 上调,荧光分析的结果表明 PAHs 主要积累于斑马鱼的脂质细胞中并导致其胚胎发育异常。Shankar 等^[11]将斑马鱼暴露在 16 种常见 PAHs 中,结合发育毒性表型终点和全基因组转录组学对胁迫 48 hpf 斑马鱼胚胎的 16 种 PAHs 进行毒性分类,确定 mRNA 表达水平的下游变化,发现暴露组 *cyp1a* 转录水平显著升高并主要激活了 *Ahr2*,这会导致斑马鱼尾鳍发育畸形而进一步阻碍其运动行为。Garcia 等^[21]也证明了这种由 PAHs 暴露引起的基因差异性表达,发现在 PAHs 暴露组的斑马鱼中,可调节软骨发育的 *slincR* 基因被 *sox9b* 5' UTR 抑制转录,导致斑马鱼体外出血,并发现 *slincR* 基因出现上调,而导致斑马鱼软骨发育异常继而出现颅面畸形。这些研究都表明 PAHs 的毒性作用机制是触发应激基因表达差异。

差异基因的凸显可能会进一步导致各种胚胎发育缺陷。McIntyre 等^[31]发现含 PAHs 浓度相对较高($9 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.6 \times 10^{-3} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的雨水会驱动斑马鱼胚胎的心环缺陷和心房反流,这些可见缺陷的严重程度与解毒酶 *cyp1a* 的表达以及与心脏收缩功能缺陷通路相关的基因(*nppb*>*myl6*>*myl7*)相对应,斑马鱼心脏发育异常以及小眼、孵化延迟和鱼鳔的异常膨胀等表型可以证明鱼类生命早期阶段对 PAHs 的毒性影响非常敏感。Fang 等^[34]也同样使用了 qPCR 技术进行胁迫效应分析,将斑马鱼幼鱼和胚胎暴露于含 B[a]P 的水环境 3.3 hpf 时,B[a]P 激活了包括机体死亡、生长衰竭、先天性心脏病、出血和头部形态异常等发育途径,产生显著性差异的基因如 *als2a*、*cep70* 和 *mycbp2* 主要富集于细胞形态控制和染色体凝聚通路中,以上基因表达使斑马鱼幼鱼呈现出死亡率增加、孵化延迟、心脏水肿和头部形态发育异常。所以实验期间斑马鱼在基因、转录变异和外显子水平上发生了显著的转录组变化,且这些变化可能导致长期不利的生理后果,而探究 PAHs 对于斑马鱼的长期作用效果的相关研究还有待完善。

还有一些研究也进一步证实了 PAHs 的暴露会引起表观遗传的改变。由于 *pdx-1 β* 是细胞分化至关重要的启动子,Yun 等^[35]通过转录组学和 qPCR 对低浓度 9 芴酮(9-FLO)暴露后 24 hpf 时斑马鱼胚胎中 *pdx-1* 启动子区 8 个 CpG 位点的甲基化水平进行了评估,发现在斑马鱼胚胎时期低浓度 oxy-

PAHs 的暴露会使 *pdx-1* 启动子区域的 DNA 甲基化程度增加,因此得出 9-FLO 毒性作用是通过调控 DNA 甲基化、增加葡萄糖水平和降低心率来破坏胰腺器官的发育。

总的来说,在任何污染物引发的鱼类发育与生殖健康的风险评估中,采用分子的方法更有利于帮助研究人员研究胁迫相关的关键调控因子,从而提高研究效率。

3.2 代谢组学

环境代谢组学是一种相对较新的分子技术,可用于评估化学暴露的生物后果。代谢物模式的变化可用于表征由化学物质引起的毒性反应,代谢组学分析可以是有针对性的,对已知的代谢物进行定量,也可以是无针对性的,对所有已知和未知的代谢物进行综合分析。如 Elie 等^[61]采用了一种非靶向代谢组学方法来检测斑马鱼(*Danio rerio*)的体内代谢谱,将斑马鱼暴露于苯并[a]蒽(BAA)和苯并[a]蒽-7,12-二酮(BAQ)中,通过多因素、单因素和通路富集分析并基于 KEGG 数据库路径研究斑马鱼代谢物的变化,发现 BAA 和 BAQ 暴露主要会扰动氨基酸代谢,差异代谢物富集在:谷胱甘肽代谢,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢,半胱氨酸和蛋氨酸代谢,初级新陈代谢,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸代谢以及氨酰生物合成等通路中。以上代谢通路改变会引起 DNA 氧化损伤、诱导心脏功能发育和血管供氧障碍。

也有一些研究同样证明了 PAHs 会对斑马鱼代谢产生干扰作用。如 Sogbanmu 等^[71]将 Nap、PHE、Pyr 和 B[a]P 等 PAHs 的单独暴露效果进行比较,发现 PHE 对斑马鱼代谢具有显著的有害影响,并在处理后 72 hpf 出现了高水平的致畸效应,如组织水肿增加、出血和发育异常等。Fujita 等^[81]将含有 PAHs 的稀释沥青的沉积物衍生水溶性组分(SDWSF)对斑马鱼进行暴露,并利用代谢组学研究 SDWSF 的胚胎毒性机制,使用单变量和多变量分析统计出 9 个代谢产物,其中有 5 种是标准氨基酸,即丙氨酸、谷氨酰胺、赖氨酸、苏氨酸和酪氨酸,其他 4 种分别是甜菜碱、牛磺酸、肌苷和甘油,在 100% SDWSF 处理下,这些代谢产物的丰度均发生了显著变化,由此可见含 PAHs 的混合物会对斑马鱼代谢通路产生影响,继而引发死亡、心包水肿和卵黄囊水肿等毒性效应。在斑马鱼的受试组织肝脏中细胞分子的损伤程度一般可以通过测定 DNA 的甲基化程度来实现。陈宏姗等^[91]将斑马鱼雌鱼和胚胎暴露于 Nap,实验

数据表明 Nap 有明显的发育毒性并出现浓度依赖性,甲基化敏感扩增多态性(MSAP)方式检测得出 DNA 甲基化程度在肝脏中的严重性明显高于肌肉组织,且肝脏中低浓度($8.4 \times 10^{-5} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)和高浓度($8.4 \times 10^{-1} \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组的基因组总甲基化水平分别比对照组高出了 12.88% 和 8.16%,可见 PAHs 可通过扰乱斑马鱼物质代谢使 DNA 甲基化,从而造成中枢神经、肝脏和脑发育异常。

以上多采用无针对性代谢物分析,这种方法可以用图形描述模式的任何显著差异,这使获得有关毒性机制、途径和暴露生物标记物的信息成为可能。

4 斑马鱼在生态毒理学中应用的必要性及研究展望 (The necessity and research prospect of zebrafish's application in ecotoxicology)

人类对环境的污染负荷已经对生物构成了严重威胁,研究污染物对生物的具体毒性作用机制以及修复机理刻不容缓。已有大量报道表明,暴露于环境毒物如 PAHs 中时,很可能会引起生物个体抗氧化防御系统的病理性改变。由于人类寿命长且后代数量相对较少,因此很难直接了解 PAHs 暴露的潜在和世代相传的影响,而斑马鱼作为一个标志性的模型生物,具有培养简单、毒性评价指标多样化等典型特点,其胚胎和幼鱼可作为高通量分子筛选的实验模式生物,既弥补了细胞模型的单一性,又弥补了啮齿动物模型的受试时间长、养殖周期长等不足,并且被广泛应用于环境污染物的毒性效应研究,特别是环境中持久性有机污染物毒性作用评估。斑马鱼作为近 10 年来研究生态毒理机制的理想体内模型生物,先前的研究表明,斑马鱼与人类基因组有 70% ~ 80% 的同源序列^[40],二者的乙酰胆碱酯酶(AchE)也有 62% 的相似氨基酸序列^[41]。斑马鱼也表现出与人类一样的抗氧化保护系统,以对抗环境中的有毒物质^[42]。由于一些 PAHs 与身体组织的脂溶性亲和力,某些 PAHs 与氧化应激之间的相互联系代谢是斑马鱼多种病理过程中的决定性调节因子之一。PAHs 不仅在斑马鱼的胚胎中具有发育毒性,而且还影响其心脏的发育和相关基因的表达。PAHs 细胞代谢产生的次生代谢产物通过改变斑马鱼的抗氧化防御状态,破坏其细胞膜脂质和细胞蛋白。因此掌握 PAHs 对斑马鱼的毒性作用机制和斑马鱼体内研究的优势性可进一步减弱 PAHs 及其新合成物或化合物的商业使用对人体健康造成的潜在危害。

通过本文的归纳分析可以看出,斑马鱼暴露于 PAHs 时,具体表现如下。(1)其运动能力会被明显抑制,其效应在短时间低剂量时主要表现在游泳速度加快、转体频繁、活动范围变化、焦虑性增强等;随着暴露时间的增长或污染物浓度提高会表现出明显的抑制作用。(2)斑马鱼亚致死和致畸效应及正常组织结构的变化与 PAHs 浓度响应呈正相关的趋势。(3) PAHs 使体内活性氧自由基浓度升高,通过激活体内防御机制产生氧化应激反应、器官炎症反应、器官功能蛋白和脂质代谢的紊乱,这往往会破坏其正常的机体功能而产生不可逆后果。(4)通过芳香烃受体介导途径,刺激下游包含氧化应激在内的基因转录水平显著升高,并诱导不同代谢通路基因表达或者改变代谢产物。

各界学者已在 PAHs 对斑马鱼毒性胁迫效应的研究中取得了显著成果,但现阶段对于斑马鱼的毒性暴露研究多集中在单个遗传品系的响应机制,许多野生型品系和数千个突变品系的响应机制研究较少;研究技术多集中在高通量分析^[43]、行为跟踪^[44]和质谱分析^[45]等,而 PAHs 暴露后预测斑马鱼靶向基因或者直接将基因型与化学暴露改变的表型联系起来的前沿技术报道较少;转录组学研究中有关 PAHs 暴露对斑马鱼差异基因遗传的跨代效应以及它们对新生代发育的影响机制数据较少。综上,对未来 PAHs 对于斑马鱼的胁迫效应研究提供以下 3 个参考方向:斑马鱼的品系、暴露条件、生物利用度或 PAHs 附着载体的改变可能会影响毒性效应强度,记录多品系野生斑马鱼暴露结果或有针对性地选择暴露方式更贴近于实际污染环境,更有助于进一步分析 PAHs 对斑马鱼种群的短期和长期影响;毒理学研究的主要目标是能够在短时间内筛查许多化合物,并能准确预测其对人类的毒性,新技术和平台的开发对于识别目标器官并生成关于化学作用机理的假设非常重要,如通过 CRISPR-Cas9 基因组修饰技术^[46]预测斑马鱼基因型变化,以将筛选和行为测试的数据与不良结局途径框架中的作用与发生机制联系起来,此外,DNA 纳米技术^[47]可使斑马鱼获得更精确的基因荧光标记,也有广阔研究前景;分子机制研究具有更灵敏更经济、更可转移至斑马鱼的潜力,为了最好地利用斑马鱼作为模式生物,了解与人类有关的 PAHs 毒性发生机理,需要弄清 PAHs 暴露引发的胚胎差异基因在斑马鱼亲本的起源和本体发育中的作用信息,使斑马鱼毒理学领域朝着脊椎动物

毒理学领域的最新水平发展。

通讯作者简介:张焕新(1991—),男,博士,副教授,主要研究方向为生态毒理学。

共同通讯作者简介:孔强(1983—),男,博士,教授,主要研究方向为修复生态学。

参考文献 (References):

- [1] 吴明红,陈缪璐,陈祖怡,等.多环芳烃在上海近郊大气颗粒物(PM_{2.5}和PM₁₀)中的污染特征、来源及其健康风险评估[J].上海大学学报:自然科学版,2014,20(4):521-530
Wu M H, Chen L L, Chen Z Y, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in atmospheric particulate matter (PM_{2.5} and PM₁₀) from a suburban area in Shanghai: Levels, sources and risk assessment [J]. Journal of Shanghai University: Natural Science Edition, 2014, 20(4): 521-530 (in Chinese)
- [2] Vascotto S G, Beckham Y, Kelly G M. The zebrafish's swim to fame as an experimental model in biology [J]. Biochemistry and Cell Biology, 1997, 75(5): 479-485
- [3] 赵文昌,程金平,谢海,等.环境中多环芳烃(PAHs)的来源与监测分析方法[J].环境科学与技术,2006,29(3):105-107,121
Zhao W C, Cheng J P, Xie H, et al. PAHs: Sources, pathway and their monitoring and analysis [J]. Environmental Science & Technology, 2006, 29(3): 105-107, 121 (in Chinese)
- [4] 黄东龙,周勤.水体突发性重金属污染胁迫下斑马鱼的行为反应分析[J].环境监测管理与技术,2011,23(4):27-31
Huang D L, Zhou Q. Behavior response analysis of zebrafish *Danio rerio* under sudden heavy metal stress [J]. The Administration and Technique of Environmental Monitoring, 2011, 23(4): 27-31 (in Chinese)
- [5] Mohanty R, Das S K, Singh N R, et al. *Withania somnifera* leaf extract ameliorates benzo[a]pyrene-induced behavioral and neuromorphological alterations by improving brain antioxidant status in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Zebrafish, 2016, 13(3): 188-196
- [6] Das S K, Aparna S, Patri M. Chronic waterborne exposure to benzo[a]pyrene induces locomotor dysfunction and development of neurodegenerative phenotypes in zebrafish [J]. Neuroscience Letters, 2020, 716: 134646
- [7] Vignet C, le Menach K, Lyphout L, et al. Chronic dietary exposure to pyrolytic and petrogenic mixtures of PAHs causes physiological disruption in zebrafish: Part II: Behavior [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2014, 21(24): 13818-13832
- [8] Aparna S, Patri M. Benzo[a]pyrene exposure and overcrowding stress impacts anxiety-like behavior and impairs learning and memory in adult zebrafish, *Danio rerio* [J]. Environmental Toxicology, 2020, 36(3): 352-361
- [9] 王明亮,丁永芳,印鑫,等.斑马鱼在毒理学中的应用研究进展[J].中国实验动物学报,2020,28(3):390-396
Wang M L, Ding Y F, Yin X, et al. Research progress regarding the application of zebrafish in toxicology [J]. Acta Laboratorium Animalis Scientia Sinica, 2020, 28(3): 390-396 (in Chinese)
- [10] Alves R N, Mariz C F Jr, de Paulo D V, et al. Toxicity of effluents from gasoline stations oil-water separators to early life stages of zebrafish *Danio rerio* [J]. Chemosphere, 2017, 178: 224-230
- [11] Perrichon P, le Menach K, Akcha F, et al. Toxicity assessment of water-accommodated fractions from two different oils using a zebrafish (*Danio rerio*) embryo-larval bioassay with a multilevel approach [J]. Science of the Total Environment, 2016, 568: 952-966
- [12] Li X S, Ding G H, Xiong Y J, et al. Toxicity of water-accommodated fractions (WAF), chemically enhanced WAF (CEWAF) of Oman crude oil and dispersant to early-life stages of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2018, 101(3): 314-319
- [13] 蔡吉榛,罗显桥,林红英,等.湛江近海域沉积物含氯多环芳烃对斑马鱼胚胎的毒性研究[J].广东海洋大学学报,2013,33(1):72-76
Cai J Z, Luo X Q, Lin H Y, et al. Toxicity of chlorinated polycyclic aromatic hydrocarbons extracted from Zhanjiang coastal sediment to zebrafish embryo [J]. Journal of Guangdong Ocean University, 2013, 33(1): 72-76 (in Chinese)
- [14] Willis A M, Oris J T. Acute photo-induced toxicity and toxicokinetics of single compounds and mixtures of polycyclic aromatic hydrocarbons in zebrafish [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2014, 33(9): 2028-2037
- [15] González-Doncel M, González L, Fernández-Torija C, et al. Toxic effects of an oil spill on fish early life stages may not be exclusively associated to PAHs: Studies with Prestige oil and medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquatic Toxicology, 2008, 87(4): 280-288
- [16] Diamante G, do Amaral e Silva Müller G, Menjivar-Cervantes N, et al. Developmental toxicity of hydroxylated

- chrysene metabolites in zebrafish embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 189: 77-86
- [17] Zhai Y W, Xia X H, Xiong X Y, et al. Role of fluoranthene and pyrene associated with suspended particles in their bioaccumulation by zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2018, 157: 89-94
- [18] Xie S L, Zhou A G, Xu N, et al. Benzo[a]pyrene induces microbiome dysbiosis and inflammation in the intestinal tracts of western mosquitofish (*Gambusia affinis*) and zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2020, 105: 24-34
- [19] Vignet C, Larcher T, Davail B, et al. Fish reproduction is disrupted upon lifelong exposure to environmental PAHs-fractions revealing different modes of action [J]. *Toxics*, 2016, 4(4): 26
- [20] Hicken C E, Linbo T L, Baldwin D H, et al. Sublethal exposure to crude oil during embryonic development alters cardiac morphology and reduces aerobic capacity in adult fish [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2011, 108(17): 7086-7090
- [21] Wang H T, Li Y Y, Xia X H, et al. Relationship between metabolic enzyme activities and bioaccumulation kinetics of PAHs in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2018, 65: 43-52
- [22] Timme-Laragy A R, Cockman C J, Matson C W, et al. Synergistic induction of AHR regulated genes in developmental toxicity from co-exposure to two model PAHs in zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2007, 85(4): 241-250
- [23] Wincent E, Jönsson M E, Bottai M, et al. Aryl hydrocarbon receptor activation and developmental toxicity in zebrafish in response to soil extracts containing unsubstituted and oxygenated PAHs [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(6): 3869-3877
- [24] Kim S, Sohn J H, Ha S Y, et al. Thyroid hormone disruption by water-accommodated fractions of crude oil and sediments affected by the Hebei spirit oil spill in zebrafish and GH3 cells [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(11): 5972-5980
- [25] 谭敏卿. 菲和高氯酸钠对斑马鱼的毒性效应[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学, 2011: 27-32
- Tan M Q. The toxicity of phenanthrene and sodium percolorate to zebrafish [D]. Harbin: Harbin Institute of Technology, 2011: 27-32 (in Chinese)
- [26] Mai Y Z, Peng S Y, Li H Y, et al. Histological, biochemical and transcriptomic analyses reveal liver damage in zebrafish (*Danio rerio*) exposed to phenanthrene [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2019, 225: 108582
- [27] Ning X, Wang Y, Zhu N, et al. Risk assessment of the lipid metabolism-disrupting effects of nitro-PAHs [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 396: 122611
- [28] Wegermann K, Hyun J, Diehl A M. Molecular mechanisms linking nonalcoholic steatohepatitis to cancer [J]. *Clinical Liver Disease*, 2021, 17(1): 6-10
- [29] 宋静文, 靳亚茹, 刘红玲. 典型酚类污染物内分泌干扰效应研究: 对斑马鱼发育及核受体介导基因调控的分子影响 [J]. *中国环境科学*, 2020, 40(9): 4065-4076
- Song J W, Jin Y R, Liu H L. Research on the endocrine disruption effect of typical phenolic pollutants: The embryonic development effects and molecule effects of gene regulation mediated by nuclear receptor on zebrafish [J]. *China Environmental Science*, 2020, 40(9): 4065-4076 (in Chinese)
- [30] Bui A, Xiao R, Perveen Z, et al. Zebrafish embryos sequester and retain petrochemical combustion products: Developmental and transcriptome consequences [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 108: 23-32
- [31] Shankar P, Geier M C, Truong L, et al. Coupling genome-wide transcriptomics and developmental toxicity profiles in zebrafish to characterize polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH) hazard [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(10): 2570
- [32] Garcia G R, Shankar P, Dunham C L, et al. Signaling events downstream of AHR activation that contribute to toxic responses: The functional role of an AHR-dependent long noncoding RNA (slincR) using the zebrafish model [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2018, 126(11): 117002
- [33] McIntyre J K, Edmunds R C, Redig M G, et al. Confirmation of stormwater bioretention treatment effectiveness using molecular indicators of cardiovascular toxicity in developing fish [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(3): 1561-1569
- [34] Fang X F, Corrales J, Thornton C, et al. Transcriptomic changes in zebrafish embryos and larvae following benzo[a]pyrene exposure [J]. *Toxicological Sciences*, 2015, 146(2): 395-411
- [35] Yun Y, Zhang Y J, Li G K, et al. Embryonic exposure to oxy-polycyclic aromatic hydrocarbon interfere with pancreatic β -cell development in zebrafish via altering DNA methylation and gene expression [J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 660: 1602-1609
- [36] Elie M R, Choi J, Nkrumah-Elie Y M, et al. Metabolomic analysis to define and compare the effects of PAHs and oxygenated PAHs in developing zebrafish [J]. *Environ-*

- mental Research, 2015, 140: 502-510
- [37] Sogbanmu T O, Nagy E, Phillips D H, et al. Lagos lagoon sediment organic extracts and polycyclic aromatic hydrocarbons induce embryotoxic, teratogenic and genotoxic effects in *Danio rerio* (zebrafish) embryos [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2016, 23(14): 14489-14501
- [38] Fujita K K, Xia Z, Tomy G, et al. 1H NMR based metabolomic profiling of early life stage zebrafish (*Danio rerio*) exposed to a water-soluble fraction of weathered sediment-bound diluted bitumen [J]. Aquatic Toxicology, 2021, 232: 105766
- [39] 陈宏姍, 盛连喜, 边红枫. 化合物萘对斑马鱼(*Danio rerio*)发育毒性及基因组 DNA 甲基化影响的研究[J]. 东北师大学报: 自然科学版, 2016, 48(3): 167-173
Chen H S, Sheng L X, Bian H F. Investigation of the effects of developmental toxicity and genomic DNA methylation upon naphthalene exposure in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Journal of Northeast Normal University : Natural Science Edition, 2016, 48(3): 167-173 (in Chinese)
- [40] 张恂, 张楠, 朱丹. 斑马鱼在血液系统研究中的应用[J]. 中央民族大学学报: 自然科学版, 2020, 29(4): 67-72
Zhang X, Zhang N, Zhu D. Application of zebrafish in hematological system investigation [J]. Journal of Minzu University of China: Natural Sciences Edition, 2020, 29(4): 67-72 (in Chinese)
- [41] Koenig J A, Dao T L, Kan R K, et al. Zebrafish as a model for acetylcholinesterase-inhibiting organophosphorus agent exposure and oxime reactivation [J]. Annals of the New York Academy of Sciences, 2016, 1374(1): 68-77
- [42] 张麒麟, 江宇航, 董志祥, 等. 汞暴露对斑马鱼肠道菌群结构和肝脏抗氧化指标的影响[J]. 生态环境学报, 2020, 29(8): 1645-1653
Zhang Q L, Jiang Y H, Dong Z X, et al. Effects of mercury exposure on intestinal flora structure and liver antioxidant ability in adult zebrafish [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2020, 29(8): 1645-1653 (in Chinese)
- [43] Horzmann K A, Freeman J L. Making waves: New developments in toxicology with the zebrafish [J]. Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology, 2018, 163(1): 5-12
- [44] Cachat J, Stewart A, Utterback E, et al. Three-dimensional neurophenotyping of adult zebrafish behavior [J]. PLoS One, 2011, 6(3): e17597
- [45] Singh S K, Sundaram C S, Shanbhag S, et al. Proteomic profile of zebrafish brain based on two-dimensional gel electrophoresis matrix-assisted laser desorption/ionization MS/MS analysis [J]. Zebrafish, 2010, 7(2): 169-177
- [46] Garcia G R, Noyes P D, Tanguay R L. Advancements in zebrafish applications for 21st Century toxicology [J]. Pharmacology & Therapeutics, 2016, 161: 11-21
- [47] Yang J, Meng Z J, Liu Q, et al. Performing DNA nanotechnology operations on a zebrafish [J]. Chemical Science, 2018, 9(36): 7271-7276