

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220330005

赵浩丞, 刘尚书, 李佳欣, 等. 磺胺甲恶唑对斑马鱼早期生命阶段的发育毒性研究[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(1): 114-123

Zhao H C, Liu S S, Li J X, et al. Developmental toxicity of sulfamethoxazole to early life stages of zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(1): 114-123 (in Chinese)

## 磺胺甲恶唑对斑马鱼早期生命阶段的发育毒性研究

赵浩丞<sup>1</sup>, 刘尚书<sup>1</sup>, 李佳欣<sup>1</sup>, 郑梦嫣<sup>1</sup>, 王泓锴<sup>1</sup>, 董飞龙<sup>1</sup>, 胡丰晓<sup>1,2,\*</sup>

1. 福建农林大学海洋研究院, 福州 350002

2. 福建省海洋生物技术重点实验室, 福州 350002

收稿日期: 2022-03-30 录用日期: 2022-06-02

**摘要:** 磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMX)作为一种广谱型抗生素,由于大量使用而在各类水体中广泛存在。为研究 SMX 对斑马鱼(*Danio rerio*)早期生命阶段的发育毒性,将 3 hpf(hours post fertilization,受精后小时数)内的斑马鱼胚胎在不同浓度(空白对照:0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , S4:4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , S40:40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , S400:400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的磺胺甲恶唑溶液中暴露至 120 hpf,观察统计斑马鱼胚胎的孵化率,仔鱼的死亡率、心率、体长和畸形率等发育参数,并检测斑马鱼体内生长激素(GH)、胰岛素样生长因子(IGF-I)含量以及 GH/IGF 轴相关基因转录水平的变化。结果显示,40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 SMX 暴露会导致斑马鱼死亡率显著升高,体长明显缩短,并且对仔鱼有明显的致畸作用(心包囊肿、脊椎弯曲和尾部畸形等)。SMX 暴露对斑马鱼的孵化率未产生显著影响,但会造成胚胎/仔鱼心率下降。此外,在 SMX 胁迫下,仔鱼体内 GH 和 IGF-I 水平显著升高。而基因转录分析发现,S4、S40 和 S400 不同处理组 SMX 暴露下调了 *ghl*(相对表达量:0.30 倍、0.17 倍和 0.10 倍)、*ghrb*(相对表达量:0.74 倍、0.36 倍和 0.39 倍)、*igfl*(相对表达量:0.75 倍、0.23 倍和 0.33 倍)和 *igflra*(相对表达量:0.49 倍、0.22 倍和 0.72 倍)等多个 GH/IGF 轴相关基因的转录水平,激素水平的变化相较于基因转录水平的变化可能存在滞后性。实验结果表明,SMX 暴露对斑马鱼表现出胚胎发育毒性,可能通过减缓心脏搏动以及干扰 GH/IGF 轴来抑制斑马鱼仔鱼的早期生长。

**关键词:** 磺胺甲恶唑;斑马鱼;胚胎发育毒性;心率;畸形;生长抑制;GH/IGF 轴

文章编号: 1673-5897(2023)1-114-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## Developmental Toxicity of Sulfamethoxazole to Early Life Stages of Zebrafish

Zhao Haocheng<sup>1</sup>, Liu Shangshu<sup>1</sup>, Li Jiaxin<sup>1</sup>, Zheng Mengyan<sup>1</sup>, Wang Hongkai<sup>1</sup>, Dong Feilong<sup>1</sup>, Hu Fengxiao<sup>1,2,\*</sup>

1. Institute of Oceanology, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002, China

2. Fujian Key Laboratory of Marine Biotechnology, Fuzhou 350002, China

Received 30 March 2022 accepted 2 June 2022

**Abstract:** As a broad-spectrum antibiotic, sulfamethoxazole (SMX) has been widely used and frequently detected in various water bodies. In order to study the developmental toxicity of SMX to zebrafish (*Danio rerio*), embryos within 3 hours after fertilization (hpf) were treated with different concentrations (CK: 0  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , S4: 4  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , S40: 40  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ , S400: 400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ) of SMX solution until 120 hpf. The hatchability of zebrafish embryos, the

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31702394);2021年福建省大学生创新创业计划项目(S202110389058)

第一作者:赵浩丞(2001—),男,学士,研究方向为生态毒理学,E-mail: zhaohaocheng1010@163.com

\* 通信作者( Corresponding author), E-mail: hufengxiao@fafu.edu.cn

mortality rate, heart rate, body length and malformation rate of larvae and other developmental parameters were observed. Besides, the contents of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF- I ) and the transcriptional levels of genes involved in GH/IGF-axis in zebrafish were detected. The results showed that exposure to  $40 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  and  $400 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  of SMX significantly resulted in increased mortality and malformation (pericardium cyst, spinal curvature, tail deformity, etc.), and shortened body length. SMX stress exhibited no significant effects on the hatchability of zebrafish, but decreased the heart rates of embryos and larvae. In addition, under SMX exposure, the levels of GH and IGF- I in larval fish were significantly increased, while SMX exposure down-regulated the transcription of several genes along GH/IGF-axis, including *gh1* (0.30-, 0.17- and 0.10-fold), *ghrb* (0.74-, 0.36- and 0.39-fold), *igfl* (0.75-, 0.23- and 0.33-fold) and *igflra*(0.49-, 0.22- and 0.72-fold). It seemed that the response of hormones had a delay compared with the transcriptional change of genes. The current results indicate that SMX induces embryo developmental toxicity in zebrafish, and may inhibit the early growth of zebrafish via slowing heart beat and/or interfering with GH/IGF axis.

**Keywords:** sulfamethoxazole; zebrafish; embryonic toxicity; heart rate; malformation; growth inhibition; GH/IGF axis

磺胺甲恶唑(sulfamethoxazole, SMX)是一种广谱型的磺胺类抗生素,是治疗和预防人类由于敏感菌引起感染的常用药<sup>[1]</sup>,也广泛应用于畜牧业以及水产养殖业等<sup>[2]</sup>。SMX 一般通过污水、农业生产和畜禽粪便排放到水环境中<sup>[3]</sup>。调查数据显示,全球范围内的多种水体中都能频繁检测到 SMX。例如,波罗的海德国沿岸区域检测到 SMX 的浓度范围为  $0.6 \sim 47.5 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[4]</sup>,日本多摩川流域中为  $110 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[5]</sup>,美国地表水中为  $7.9 \sim 1\,900 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[6-7]</sup>,湄公河三角洲地区为  $19.2 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[8]</sup>,而非洲地表水中检测到的 SMX 的浓度高达  $39 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[9]</sup>。SMX 通过食物链等生态循环会对人体造成溶血性贫血、肝脏损害和肾脏损害等较严重的病症,因此 2017 年世界卫生组织国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将 SMX 划为致癌物质之一<sup>[10]</sup>。

SMX 较难降解,在环境中可长时间存在,会在生物体内富集从而对生物体造成影响<sup>[11]</sup>。近年来,SMX 已经被证明对水生生物(藻类、甲壳类和鱼类)具有胚胎毒性、发育毒性和神经毒性等多种负面效应。例如,刘仁彬等<sup>[12]</sup>研究发现, $0.01 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  磺胺甲恶唑暴露 96 h 对斑马鱼胚胎的抗氧化系统造成明显的损伤,超氧化物歧化酶(SOD)和谷胱甘肽 S-转移酶(GST)被显著诱导,过氧化氢酶(CAT)受到显著抑制,丙二醛(MDA)含量显著增加,并导致斑马鱼仔鱼的心率减慢以及体长缩短。有研究表明,磺胺类药物会使肠道微生物的菌群数量下降,对鱼类的生长发育造成显著的负面影响,斑马鱼肠道在无菌

的状态下,其刷状缘碱性磷酸酶活力丧失,导致肠道发育受阻,进而影响斑马鱼的生长发育<sup>[13]</sup>。张石云<sup>[14]</sup>发现,含有 SMX 的饲料会降低罗非鱼肠道菌群的生物丰度、物种丰度和生物多样性,从而对罗非鱼的生长发育造成显著影响。此外,张健等<sup>[15]</sup>发现 SMX 能对斑马鱼的自由运动和心跳速率产生诱导和抑制作用,对斑马鱼的身体循环功能和身体协调功能产生负面影响。在鱼类中,GH/IGF- I 轴是生长发育的重要调控轴<sup>[16]</sup>,垂体前叶产生生长激素(growth hormone, GH),通过与生长激素受体(growth hormone receptor, GHR)结合发挥作用,最终在肝脏中促进胰岛素样生长因子(insulin like growth factor, IGF)的合成<sup>[17]</sup>,从而促进细胞增殖、活化进而促使鱼类生长发育<sup>[18]</sup>。多项研究发现,许多外源性化学物质包括某些抗生素(3,4-二氯苯胺、二噁英、螺吡啶咪唑磺酰胺 MK-677 和环肽生长抑素等)能够通过干扰 GH/IGF-I 轴从而影响生物机体的生长<sup>[19-22]</sup>。但是,目前环境相关浓度的 SMX 暴露对鱼类的发育毒性及生长抑制机制尚不清楚。

斑马鱼是一种被广泛使用的模式动物,具有养殖成本低,发育周期短,幼鱼透明易观察,产卵量大等独特优势<sup>[23]</sup>。本实验以斑马鱼为实验动物,检测 SMX 暴露下斑马鱼胚胎的孵化率,仔鱼的死亡率、心率、体长和畸形率等发育参数,测定斑马鱼 GH/IGF-I 轴激素含量和相关基因的转录水平,评估 SMX 对斑马鱼早期生命阶段的发育毒性,揭示 SMX 对仔鱼的生长抑制作用机制,为 SMX 的水生生态安全性评价提供参考数据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

磺胺甲恶唑,即 4-氨基-N-(5-甲基-3-异恶唑基)苯磺酰胺(纯度为 98%,美国生命科学与高科技集团公司);二甲亚砜(DMSO)(分析纯,阿拉丁科技(中国)有限公司)。FastPure<sup>®</sup> Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司),ChamQTM Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)。

本实验采用野生型成年斑马鱼,购自国家斑马鱼资源中心。实验开始前对斑马鱼进行 1 个月的饲养驯化,保持 14 h/10 h 光暗比,水温(28.0±1) °C, pH 值为 7.0~8.0,溶解氧>7 mg·L<sup>-1</sup>。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 胚胎/幼体发育毒性实验

使用 DMSO 为助溶剂,将磺胺甲恶唑溶解,配制成 1 g·L<sup>-1</sup> 储备液,避光保存于 4 °C。进行暴露实验前,将储备液逐级稀释至 E3 孵化液中(5 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl,0.17 mmol·L<sup>-1</sup> KCl,0.33 mmol·L<sup>-1</sup> CaCl<sub>2</sub>,0.33 mmol·L<sup>-1</sup> MgSO<sub>4</sub>),溶液中 DMSO 终浓度为 0.01%,实验共设置 1 个助溶剂对照组(0.01% DMSO)和 3 个处理组(4、40 和 400 μg·L<sup>-1</sup> SMX),每一处理组设置 3 个平行。暴露实验在玻璃培养皿中进行,每个培养皿中放置 100 mL E3 孵化液和 100 粒受精卵,持续暴露 120 h,光照周期 12 h/12 h。

暴露过程中,统计记录 48、72、96 和 120 h 死亡胚胎数,计算 48、72 和 96 h 这 3 个时间段不同浓度下的孵化率。统计并记录 48、72 和 96 h 斑马鱼仔鱼 30 s 的心率,记录 72 h、96 h 斑马鱼仔鱼的体长,观察记录 48、72 和 96 h 斑马鱼仔鱼致畸效果。

#### 1.2.2 生长激素(GH)和胰岛素样生长因子(IGF-I)检测

GH 和 IGF-I 含量的测定采用斑马鱼生长激素(GH)ELISA 检测试剂盒和斑马鱼胰岛素样生长因子(IGF-I)ELISA 检测试剂盒(南京建成生物工程研究所),每个平行随机选取 15 条仔鱼,实验步骤和计算公式参照试剂盒说明书。

#### 1.2.3 荧光定量 PCR

120 hpf 时,每个平行随机选取 10 条斑马鱼仔鱼,制备全鱼组织匀浆,使用 FastPure<sup>®</sup> Cell/Tissue Total RNA Isolation Kit V2(南京诺唯赞生物科技股

份有限公司)提取 RNA,使用 HiScript<sup>®</sup> II Q RT SuperMix for qPCR (+gDNA wiper)(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)进行逆转录合成 cDNA。使用 ChamQTM Universal SYBR<sup>®</sup> qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物科技股份有限公司)在仪器 LightCycle<sup>®</sup> 480 II (瑞士罗氏)上进行 qRT-PCR 反应。以 rpl8 为内参基因,用 2<sup>-ΔΔC<sub>t</sub></sup> 方法计算目的基因的相对表达量。引物通过 NCBI 网站的 Primer-Blast 在线工具设计,目标基因和内参基因的引物序列如表 1 所示。

### 1.3 数据处理

本实验所有数据均使用 SPSS 25.0 软件进行统计分析。实验结果在检验方差齐性后采用单因素方差分析(One-way ANOVA),通过 Tukey's HSD 检验差异的显著性( $P<0.05$ )。实验结果均以平均值±标准差(mean±S.D.)的形式表示。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 磺胺甲恶唑对斑马鱼胚胎/幼体的发育参数的影响

如图 1(a)所示,与对照组相比,SMX 暴露至 24 hpf 时,S40 和 S400 处理组死亡率显著增加至 39.25% 和 38.23% ( $P<0.05$ ),暴露至 48 hpf 时,S40 和 S400 处理组死亡率显著上升至 39.75% 和 39.33% ( $P<0.05$ ),暴露至 72 hpf 时,S40 和 S400 处理组死亡率显著升高至 54.75% 和 41.33% ( $P<0.05$ ),当暴露至 96 hpf 时,S4 和 S40 处理组的仔鱼死亡率显著上升至 61.67% 和 67.25% ( $P<0.05$ ),暴露至 120 hpf 时,S4、S40 和 S400 处理组死亡率都显著升高到 75.00%、72.50% 和 63.33% ( $P<0.05$ )。由图 1(b)可知,斑马鱼在 SMX 暴露至 48 hpf 和 96 hpf 后,所有实验组孵化率与对照组相比未出现明显变化,但在暴露至 72 hpf 时,S400 处理组的孵化率显著上升至 98.67% ( $P<0.05$ )。由图 1(c)可知,暴露至 48 hpf 时,S4、S40 和 S400 处理组的心率显著降低至 102.94、106.60 和 115.73 次·min<sup>-1</sup> ( $P<0.05$ ),暴露至 72 hpf 和 96 hpf 时,所有处理组的心率均发生显著降低 ( $P<0.05$ )。在 SMX 胁迫下仔鱼体长变化如图 1(d)所示,在 SMX 暴露至 72 hpf 时,S400 处理组的斑马鱼体长与对照组相比显著降低至 2.51 mm ( $P<0.05$ )。在暴露至 96 hpf 时,S40 和 S400 处理组的斑马鱼体长与对照组相比显著下降至 3.08 mm 和 2.33 mm ( $P<0.05$ )。

如图 1(e)所示,SMX 暴露至 48 hpf 时,所有实

验组仔鱼畸形率与对照组相比无显著差异( $P<0.05$ );暴露至 72 hpf 时, S40 处理组的仔鱼畸形率显著上升至 5.33% ( $P<0.05$ );暴露至 96 hpf 时, S4、S40 和 S400 处理组的畸形率显著增加至 12.00%、16.00% 和 14.00% ( $P<0.05$ )。如图 2 所示, SMX 暴露 72 h 后, 典型的畸形有脊柱弯曲(图 2(b))、尾部变形(图 2(c))和尾部缺失(图 2(d)); SMX 暴露至 96 h 时, 仔鱼出现了卵黄囊水肿(图 2(f))、脊柱弯曲(图 2(g))和心包囊水肿(图 2(h))等畸形。

## 2.2 磺胺甲恶唑对斑马鱼体内 GH、IGF-I 含量的影响

不同浓度 SMX 暴露下斑马鱼仔鱼全鱼 GH 和 IGF-I 的含量如图 3 所示, 暴露至 120 hpf 时, 实验组体内的 GH 含量和 IGF-I 含量与对照组相比均显著升高( $P<0.05$ )。

## 2.3 SMX 暴露后斑马鱼的基因表达

如图 4 所示, 斑马鱼在 SMX 暴露至 120 hpf

时, S4 处理组的 *gh1* (0.30 倍)、*ghrb* (0.74 倍)、*igfl* (0.75 倍)、*igflra* (0.49 倍) 的 mRNA 表达量与对照组相比显著下调( $P<0.05$ )。S40 处理组 *gh1* (0.17 倍)、*ghra* (0.48 倍)、*ghrb* (0.36 倍)、*igfl* (0.23 倍)、*igf2b* (0.57 倍)、*igflra* (0.22 倍)、*igflrb* (0.74 倍) 的 mRNA 表达量与对照组相比显著下调( $P<0.05$ )。S400 处理组 *gh1* (0.10 倍)、*ghra* (0.36 倍)、*ghrb* (0.39 倍)、*igfl* (0.33 倍)、*igf2a* (0.48 倍)、*igf2b* (0.32 倍)、*igflra* (0.72 倍)、*gflrb* (0.45 倍)、*igf2r* (0.35 倍) 的 mRNA 表达量与对照组相比显著下调( $P<0.05$ )。

## 2.4 相关分析

在不同浓度的 SMX 暴露下, 体长与心率、激素水平和相关基因的转录水平的皮尔逊相关分析如表 2 所示。暴露 96 h 后, 体长和心率与 GH、IGF-I 水平呈显著负相关, 而与 *gh1*、*ghra*、*ghrb*、*igfl*、*igf2a*、*igf2b*、*igflra*、*gflrb* 和 *igf2r* 的转录水平呈显著正相关。

表 1 实验所用引物序列

Table 1 Nucleotide sequences of primers used in present study

基因名称	基因编号	引物序列(5' ~ 3')	产物长度/bp	扩增效率/%
Gene	Gene number	Primer sequence (5' ~ 3')	Product size/bp	Amplification efficiency/%
<i>ghrh</i>	NM_001080092.1	F: CACCAACAGTAGAGGCTGGG R: AGCATAGCACTAGCAAGGCA	145	98.4
<i>gh</i>	NM_001020492.2	F: GCATCAGCGTGCTCATCAAG R: TGAGACTGGTCTCCCCTACG	114	97.6
<i>ghra</i>	NM_001083578.1	F: AGAGCCTCCCTCCAAATCCT R: CTCATGGGGTCAGGTTTCCC	98	99.2
<i>ghrb</i>	NM_001111081.2	F: GAACTCAGAGTCCGGGCAAA R: AAAGACCAGCACAGCCGTAA	117	98.8
<i>igfl</i>	NM_131825.2	F: TGACATTGCCCGCATCTCAT R: CCGCTAGACATCCCTTTGGG	101	100.2
<i>igf2a</i>	NM_131433.1	F: CAGCCATCCCAATGGCAAC R: CTGGTTTTGGAAAGACGGCG	105	98.4
<i>igf2b</i>	NM_001001815.1	F: TACTGCGCTAAACCTGCCAA R: GAGCAGCCTTTCTTTGCCAC	151	102.5
<i>igflra</i>	NM_152968.1	F: GATCCAAAGAGCAGGGCTCC R: CCCTCGTCATGCCAAAGTCT	192	97.6
<i>igflrb</i>	NM_152969.1	F: TCGTGGACTGGTCTCTCAT R: TCGTGCACTGAGAGTTGTCC	121	99.1
<i>igf2r</i>	NM_001039627.2	F: GAGCTTCATACGGGAACGCT R: CACCACTTCCTGCCATCAGT	199	98.4
<i>rpl8</i>	NM_200713.1	F: GAGTTTAGGCCCAATGGGA R: GACGGAGTTTAGCAGCACCT	105	99.5

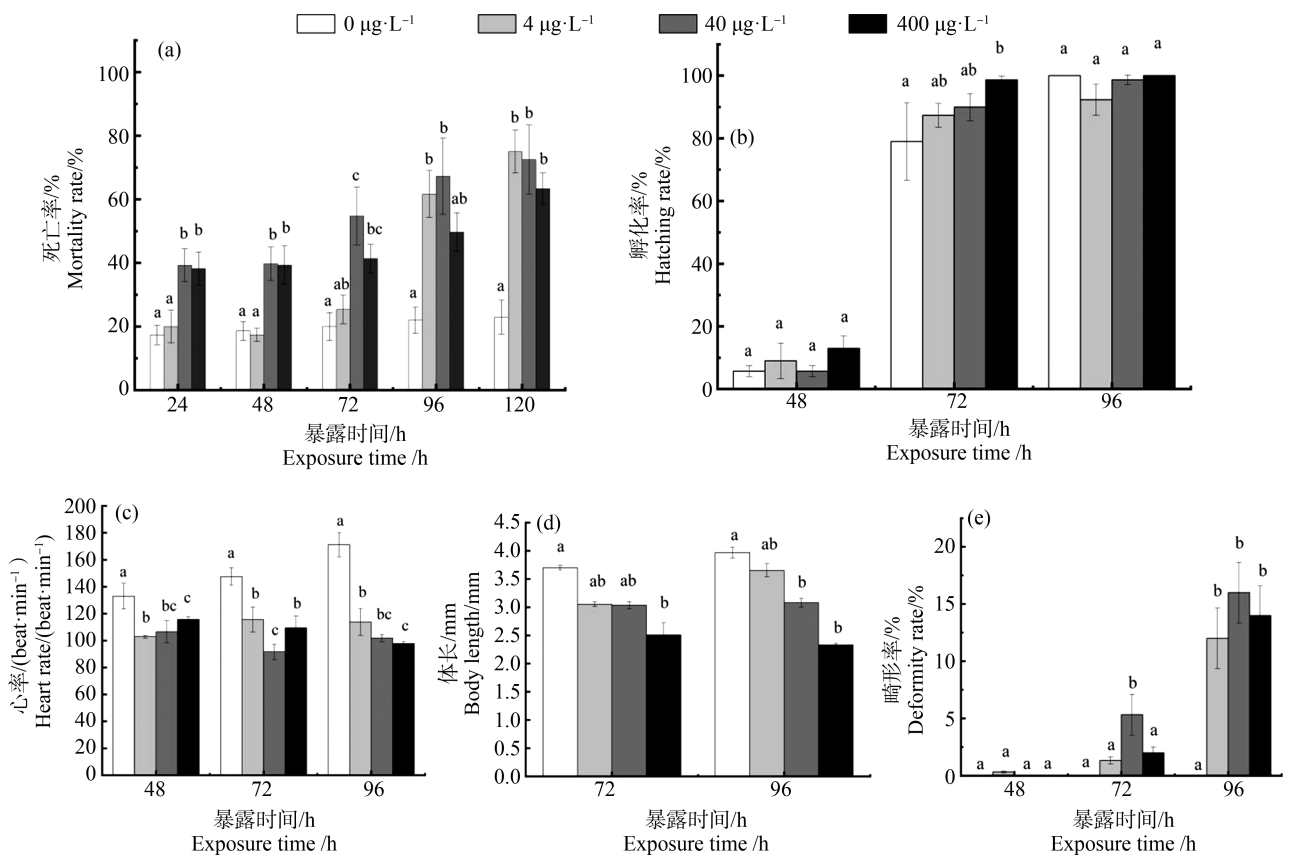


图1 磺胺甲恶唑 (SMX) 暴露对斑马鱼孵化率、死亡率、心率、体长和畸形率的影响

Fig. 1 Effects of sulfamethoxazole (SMX) exposure on hatchability, mortality, heart rate, body length and malformation rate of zebrafish

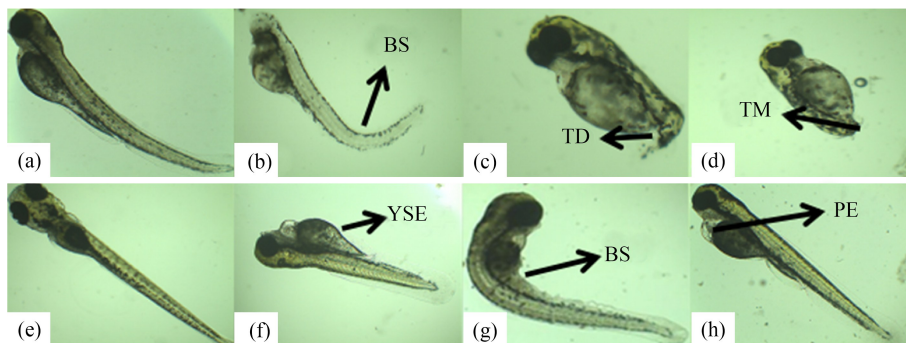


图2 72 hpf 和 96 hpf 时斑马鱼幼鱼典型的畸形情况

注: TD 表示尾部变形; YSE 表示卵黄囊水肿; PE 表示心包囊水肿; BS 表示脊柱弯曲; TM 表示尾部缺失。

Fig. 2 Typical malformations of zebrafish larvae at 72 hpf and 96 hpf

Note: TD, tail deformation; YSE, yolk sac edema; PE, pericardial edema; BS, bend spinal; TM, tail missing.

### 3 讨论 (Discussion)

SMX 是一种广谱型的抗生素,由于大量使用而在水环境中广泛存在,通过生物富集从而对水生生物产生负面影响。本研究以斑马鱼胚胎/仔鱼为模型,考察了 SMX 暴露下斑马鱼胚胎的死亡率、孵化率、心率、体长和畸形率等发育参数的变化以及仔鱼

体内生长相关激素水平及 GH/IGF 轴基因的转录变化,旨在探究 SMX 对斑马鱼早期生命阶段的发育毒性及生长抑制机制。

以往的研究表明,抗生素的暴露可能会对水生生物的存活产生影响。例如,刘丽丽等<sup>[24]</sup>发现用高浓度的磺胺二甲嘧啶(500 ~ 1 000 mg·L<sup>-1</sup>)暴露,会

导致斑马鱼胚胎的死亡率显著上升。本研究发现较低浓度的 SMX 暴露仍然显著提高了斑马鱼胚胎的死亡率,并表现出明显的剂量效应关系,这表明

SMX 对鱼类的早期生命阶段具有很强的毒性。孵化期是斑马鱼胚胎发育的一个关键时期,孵化率是评估化学物质对鱼类影响的一个重要毒理学终点<sup>[25]</sup>。据

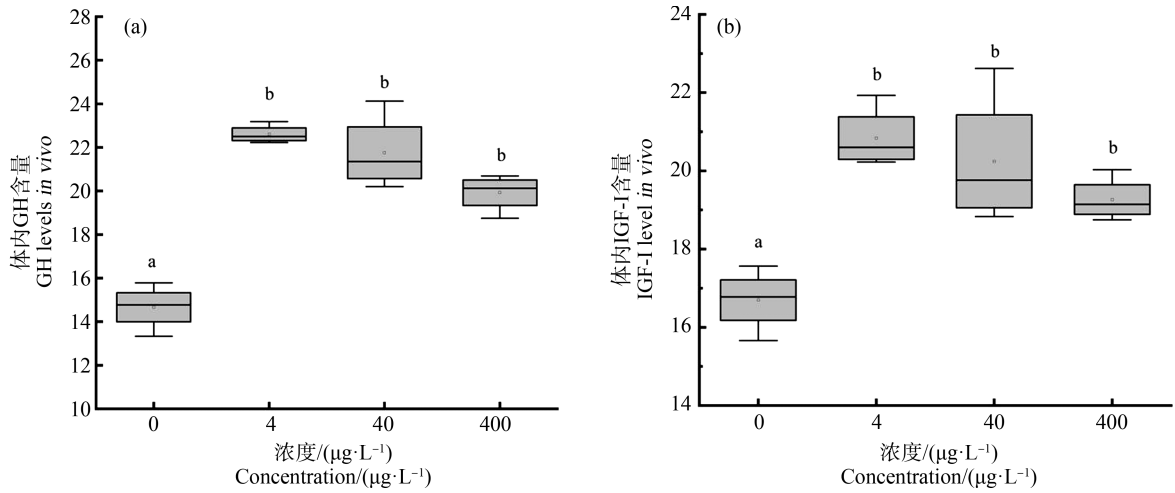


图 3 120 hpf 时斑马鱼幼鱼体内生长激素 (GH) 和胰岛素样生长因子 (IGF-I) 的含量

Fig. 3 The contents of growth hormone (GH) and insulin-like growth factor (IGF-I) in zebrafish larvae at 120 hpf

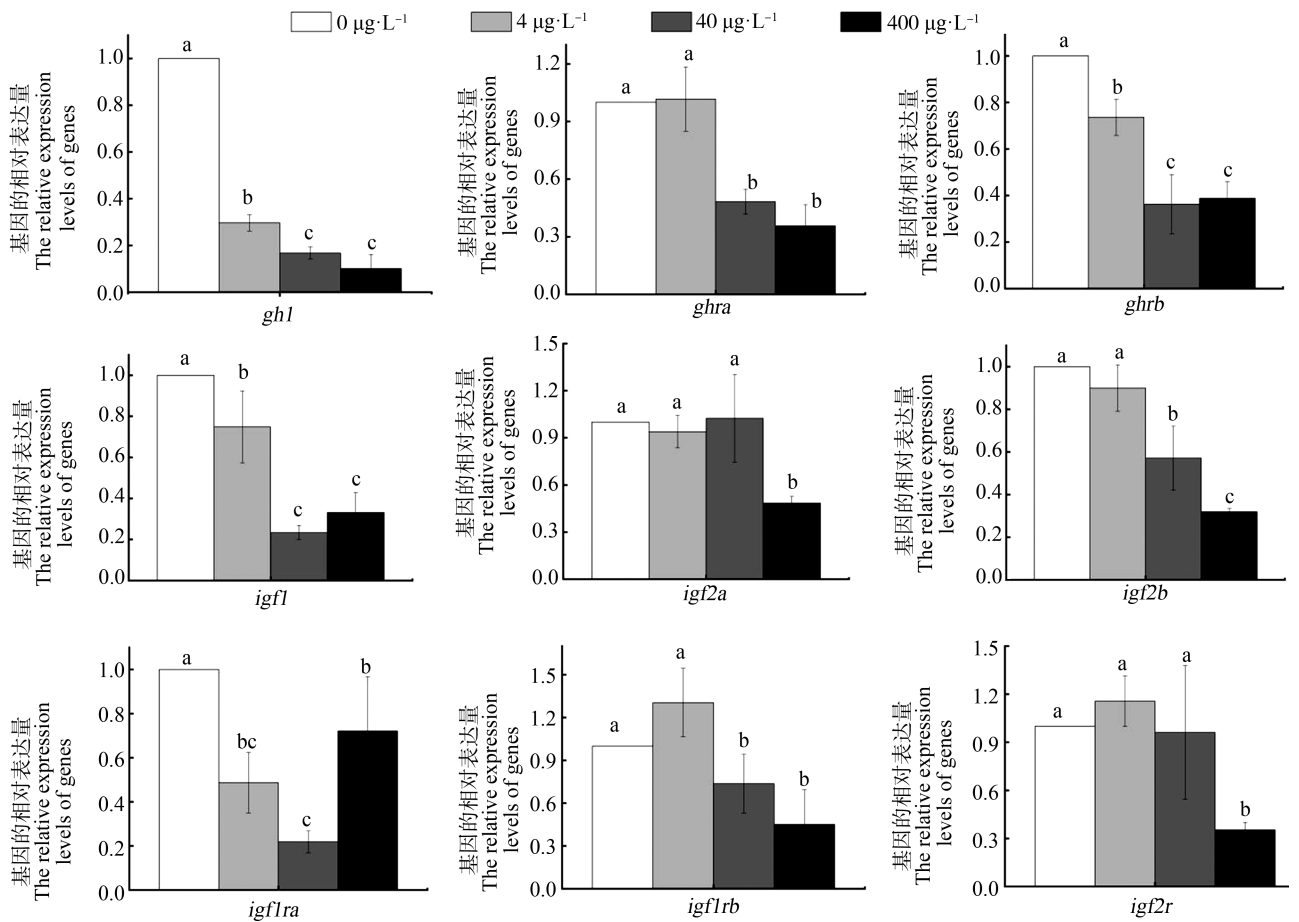


图 4 斑马鱼幼鱼体内 GH/IGF-I 轴相关基因的 mRNA 表达水平

Fig. 4 The mRNA expression levels of genes involved in GH/IGF-I axis in zebrafish larvae

表2 皮尔逊相关分析  
Table 2 Pearson correlation analysis

	激素水平 Hormone level			mRNA 水平 mRNA level									
	心率 Heart rate	GH	IGF-I	<i>ghl</i>	<i>ghra</i>	<i>ghrb</i>	<i>igfl</i>	<i>igf2a</i>	<i>igf2b</i>	<i>igflra</i>	<i>igflrb</i>	<i>igf2r</i>	
体长 Body length	<i>r</i>	0.591*	-0.887**	-0.874**	0.734**	0.735**	0.740**	0.739**	0.736**	0.734**	0.754**	0.733**	0.730**

注: \*表示显著相关  $P < 0.05$ ; \*\*表示显著相关  $P < 0.01$ 。

Note: \* indicates a significant correlation  $P < 0.05$ ; \*\* indicates a significant correlation  $P < 0.01$ .

文献报道,不同的化学物质对斑马鱼孵化率的影响各不相同。例如,4,4'-二氟二苯醚和2,4'-二羟基二苯醚等物质会降低斑马鱼的孵化率,而乙酸三苯锡、联苯菊酯能够促进斑马鱼胚胎的孵化<sup>[26]</sup>。本研究除了SMX暴露至72 hpf时S400处理组的孵化率显著上升,其余处理组的孵化率都未受到显著影响。刘丽丽等<sup>[24]</sup>研究发现,与SMX具有相似化学结构的磺胺二甲嘧啶(1~700  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )暴露斑马鱼胚胎,48 hpf时孵化率显著升高,表现出毒物兴奋效应。因此,我们推测400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  SMX暴露对斑马鱼胚胎发育可能表现出同样的毒物兴奋效应,在72 hpf时使胚胎自主运动频率升高,提前出膜而导致孵化率异常升高。胚胎发育过程中心脏是最早发生并发挥生理功能的器官,完善的循环功能对于胚胎的正常发育起着关键作用<sup>[27]</sup>。因此,心率是评估环境污染对斑马鱼胚胎心脏毒性的重要指标。本研究中,SMX暴露显著降低了斑马鱼胚胎/仔鱼的心率,这与Lin等<sup>[28]</sup>将斑马鱼暴露于磺胺甲恶唑、磺胺二甲嘧啶和磺胺嘧啶溶液中观察到的心率显著下降的结果相似。这些结果表明,SMX暴露可以降低斑马鱼胚胎/仔鱼的心率,影响心脏发育和干扰心脏的正常生理功能。此外,本研究发现高浓度的SMX(400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )会导致幼鱼畸形率显著升高。从暴露时间来看,SMX暴露至48 hpf时,斑马鱼的胚胎暂未出现畸形,继续暴露至72 hpf和96 hpf时出现了不同程度的畸形,包括脊柱弯曲、尾部缺失和心包囊水肿等。SMX对斑马鱼畸形率的影响表现出明显的时间依赖性,且实验中出现的脊柱及尾部弯曲表明SMX对斑马鱼早期生命阶段的骨骼发育有着明显的致畸作用,这与Yan等<sup>[29]</sup>用磺胺类药物暴露斑马鱼胚胎引起水肿和脊柱畸形的结果相似。

本研究还发现,高浓度的SMX(400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )对斑马鱼的体长有明显的抑制作用,并且表现出明显

的剂量效应关系。近期研究也发现,在72 hpf时,SMX(0.2, 20和2000  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )暴露显著降低了斑马鱼幼鱼的体长<sup>[30]</sup>。相似的,Liu等<sup>[31]</sup>将斑马鱼幼鱼暴露于100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$  SMX后,也发现了幼鱼体长显著缩短。这种体长的抑制效应可能与斑马鱼的心率有关,因为心率的下降会造成营养物质缺失,导致生长缓慢<sup>[32]</sup>。为了更深入地阐释SMX对斑马鱼生长的抑制作用机制,本研究对斑马鱼体内的GH、IGF-I水平及GH/IGF-I轴相关基因的转录水平进行了进一步的探索。GH是调控鱼类生长的关键因子,它通过IGF-I的介导发挥作用<sup>[33-34]</sup>。IGF-I是具有促有丝分裂和胰岛素样代谢功能的蛋白质<sup>[35]</sup>,通过血液循环促进GH的合成与分泌。本实验中,SMX暴露使斑马鱼体内GH和IGF-I的含量都显著升高,这与生长抑制效应的结果不一致。在鱼体内,IGF-I水平受GH的调控,GH含量的上升对IGF-I的表达具有正调节作用,会使鱼体内的IGF-I浓度上升<sup>[36]</sup>。但是,GH对IGF-I的调节是通过与生长激素受体(GHR)结合发挥作用,而IGF的活性主要受IGF受体(IGFR)的调控,IGFR水平的降低会抑制IGF结合蛋白(IGFBPs)的合成从而影响IGF转运,导致生长发育受损<sup>[37]</sup>。因此,我们推测SMX胁迫可能影响了GH与GHR及IGF-I与IGFR的结合,从而抑制它们发挥正常的生理功能,从而对斑马鱼造成生长抑制效应。在本研究中,基因转录分析显示,高浓度的SMX暴露引起*ghl*和*igfl*的mRNA表达量显著下调,与幼鱼体内GH和IGF-I变化趋势相反。这可能是由于斑马鱼在SMX暴露后激素水平的变化相较于基因转录水平的变化存在滞后性,GH/IGF轴相关基因的表达、转录、翻译调控与翻译后的修饰到相应物质合成需要一定的时间过程,因此随着暴露时间延长,GH和IGF-I水平也可能相应地出现下调。类似的,孙文静等<sup>[38]</sup>用一定

剂量的 BaP 注射于褐菖鲉体内,发现 EROD 蛋白含量的变化明显滞后于基因表达量的变化。Borski 等<sup>[9]</sup>发现,17 $\beta$ -雌二醇处理会诱导雌性成年大鼠体内 GH 和 IGF-I 含量的显著上升,而 *gh* 和 *igf1* mRNA 表达水平显著下调,并导致大鼠体质量显著下降。在本研究中,高浓度 SMX 暴露组中 *gh1*、*ghra*、*ghrb*、*igf1*、*igf2a*、*igf2b*、*igf1ra*、*gflrb* 和 *igf2r* 的转录水平均显著下降,与体长缩短的结果表现出显著正相关。*ghr*、*igf1ra* 和 *igf1rb* 转录水平的下调也从基因层面上印证了我们的推测,SMX 胁迫可能是通过抑制 GH 和 IGF 与受体的结合,从而影响了它们发挥正常的生理功能<sup>[40]</sup>。同时,IGF-I 水平的升高会通过负循环反馈机制抑制垂体 GH 的分泌<sup>[41]</sup>,也可能导致后期鱼体内 GH 含量下降。此外,甲状腺激素水平对于鱼类早期的生长发育非常重要<sup>[42]</sup>。近期研究表明,SMX 暴露能干扰甲状腺激素的合成,引起 T4 含量显著下降<sup>[43]</sup>。因此,甲状腺干扰也可能是 SMX 造成生长抑制效应的机制之一,有待进一步研究。

综上所述,SMX 暴露对斑马鱼早期生命阶段表现出发育毒性,引起死亡率显著增加,心率明显下降和体长缩短。此外,高浓度(400  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )的 SMX 对斑马鱼仔鱼有明显的致畸作用,典型畸形包括心包囊肿、脊柱弯曲和尾部畸形等。SMX 暴露会导致斑马鱼仔鱼体内 GH 和 IGF-I 水平的增加,但会下调多个 GH/IGF 轴基因的转录水平。SMX 可能通过减缓心脏搏动和干扰 GH/IGF 轴从而产生生长抑制效应。

通信作者简介:胡丰晓(1987—),男,博士,讲师,主要研究方向为生态毒理学。

#### 参考文献 (References):

- [1] Rodayan A, Roy R, Yargeau V. Oxidation products of sulfamethoxazole in ozonated secondary effluent [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2010, 177(1-3): 237-243
- [2] Wang J L, Wang S Z. Microbial degradation of sulfamethoxazole in the environment [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2018, 102(8): 3573-3582
- [3] Luo Y, Xu L, Rysz M, et al. Occurrence and transport of tetracycline, sulfonamide, quinolone, and macrolide antibiotics in the Haihe River Basin, China [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(5): 1827-1833
- [4] Fisch K, Wanick J J, Schulz-Bull D E. Occurrence of pharmaceuticals and UV-filters in riverine run-offs and waters of the German Baltic Sea [J]. *Marine Pollution Bulletin*, 2017, 124(1): 388-399
- [5] Mano H, Okamoto S. Preliminary ecological risk assessment of 10 PPCPs and their contributions to the toxicity of concentrated surface water on an algal species in the middle basin of Tama River [J]. *Journal of Water and Environment Technology*, 2016, 14(6): 423-436
- [6] Lv M, Sun Q, Hu A Y, et al. Pharmaceuticals and personal care products in a mesoscale subtropical watershed and their application as sewage markers [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2014, 280: 696-705
- [7] Wang L, Wu Y C, Zheng Y, et al. Efficient degradation of sulfamethoxazole and the response of microbial communities in microbial fuel cells [J]. *RSC Advances*, 2015, 5(69): 56430-56437
- [8] Managaki S, Murata A, Takada H, et al. Distribution of macrolides, sulfonamides, and trimethoprim in tropical waters: Ubiquitous occurrence of veterinary antibiotics in the Mekong Delta [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(23): 8004-8010
- [9] Faleye A, Adegoke A, Ramluckan K, et al. Antibiotic residue in the aquatic environment: Status in Africa [J]. *Open Chemistry*, 2018, 16(1): 890-903
- [10] 陈雪妍. 希瓦氏菌 MR-1 作用下磺胺甲恶唑的去除效果及强化研究[D]. 北京: 北京林业大学, 2020: 9
- [11] 金凡. 电化学阴极增强 Co(II)-过硫酸盐体系降解水中磺胺甲恶唑的研究[D]. 重庆: 重庆大学, 2019: 11
- [12] 刘仁彬, 姜锦林, 张宇峰, 等. 磺胺甲恶唑对斑马鱼胚胎/仔鱼的毒性效应[J]. *环境污染与防治*, 2020, 42(3): 310-316
- [13] Liu R B, Jiang J L, Zhang Y F, et al. Toxic effects of sulfamethoxazole on zebrafish (*Danio rerio*) embryo/larva [J]. *Environmental Pollution & Control*, 2020, 42(3): 310-316 (in Chinese)
- [14] Bates J M, Mittge E, Kuhlman J, et al. Distinct signals from the microbiota promote different aspects of zebrafish gut differentiation [J]. *Developmental Biology*, 2006, 297(2): 374-386
- [15] 张石云. 抗生素磺胺甲恶唑和微塑料复合暴露对罗非鱼生理效应影响的机制研究[D]. 南京: 南京农业大学, 2019: 50



- Zhang S Y. Mechanism of antibiotics sulfamethoxazole and micro-plastics on physiological effects of tilapia [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2019: 50 (in Chinese)
- [15] 张健, 刘玉兰, 张冬, 等. 水体中二氯乙酰胺以及磺胺甲恶唑对斑马鱼的毒性研究[J]. 环境科技, 2015, 28(6): 34-39
- Zhang J, Liu Y L, Zhang D, et al. Toxic research on zebrafish exposed to dichloroacetamide and sulfamethoxazole in aquatic ecosystem [J]. Environmental Science and Technology, 2015, 28(6): 34-39 (in Chinese)
- [16] 郑艳, 汝少国. 外源化学物质对鱼类生长和 GH/IGF- I 轴的影响[J]. 中国海洋大学学报(自然科学版), 2012, 42(S1): 102-106
- Zheng Y, Ru S G. Effects of exogenous chemicals on fish growth and GH/IGF- I axis [J]. Periodical of Ocean University of China, 2012, 42(S1): 102-106 (in Chinese)
- [17] 仲勇. 盐度影响金钱鱼生长及渗透相关基因的表达 [D]. 上海: 上海海洋大学, 2019: 4
- Zhong Y. Effects of salinity on growth and osmotic gene expression in spotted scat (*Scatophagus argus*) [D]. Shanghai: Shanghai Ocean University, 2019: 4 (in Chinese)
- [18] Jones J I, Clemmons D R. Insulin-like growth factors and their binding proteins: Biological actions [J]. Endocrine Reviews, 1995, 16(1): 3-34
- [19] Svensson J, Ohlsson C, Jansson J O, et al. Treatment with the oral growth hormone secretagogue MK-677 increases markers of bone formation and bone resorption in obese young males [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 1998, 13(7): 1158-1166
- [20] Murray R D, Kim K, Ren S G, et al. Central and peripheral actions of somatostatin on the growth hormone-IGF- I axis [J]. The Journal of Clinical Investigation, 2004, 114(3): 349-356
- [21] Elonen G E, Spehar R L, Holcombe G W, et al. Comparative toxicity of 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin to seven freshwater fish species during early life-stage development [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1998, 17(3): 472-483
- [22] Ensenbach U, Nagel R. Toxicity of binary chemical mixtures: Effects on reproduction of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 1997, 32(2): 204-210
- [23] 许冰洁, 张立将, 李春启, 等. 斑马鱼胚胎评价 5 种药物的发育毒性与模型验证[J]. 中国药理学通报, 2016, 32(1): 74-79
- Xu B J, Zhang L J, Li C Q, et al. Model validation and evaluation of developmental toxicity of five drugs using zebrafish embryos [J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2016, 32(1): 74-79 (in Chinese)
- [24] 刘丽丽, 吕鹏, 闫艳春. 磺胺二甲嘧啶对斑马鱼胚胎的急性毒性作用[J]. 中国渔业质量与标准, 2018, 8(1): 34-39
- Liu L L, Lv P, Yan Y C. Acute toxicities of sulfamethazine to zebrafish embryos [J]. Chinese Fishery Quality and Standards, 2018, 8(1): 34-39 (in Chinese)
- [25] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 236: Fish embryo acute toxicity (FET) test [S]. Paris: OECD, 2013
- [26] Qin L, Liu F, Liu H, et al. Evaluation of HODE-15, FDE-15, CDE-15, and BDE-15 toxicity on adult and embryonic zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Environmental Science and Pollution Research International, 2014, 21 (24): 14047-14057
- [27] 吴玉琼, 陈莹, 胡永乐, 等. 四种新型农药对斑马鱼胚胎发育的毒性效应[J]. 生物技术通报, 2017, 33(6): 155-161
- Wu Y Q, Chen Y, Hu Y L, et al. Toxic effects of four currently-used pesticides on zebrafish embryonic development [J]. Biotechnology Bulletin, 2017, 33(6): 155-161 (in Chinese)
- [28] Lin T, Yu S L, Chen Y Q, et al. Integrated biomarker responses in zebrafish exposed to sulfonamides [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2014, 38 (2): 444-452
- [29] Yan Z Y, Yang Q L, Jiang W L, et al. Integrated toxic evaluation of sulfamethazine on zebrafish: Including two lifespan stages (embryo-larval and adult) and three exposure periods (exposure, post-exposure and re-exposure) [J]. Chemosphere, 2018, 195: 784-792
- [30] Yan Z H, Lu G H, Ye Q X, et al. Long-term effects of antibiotics, norfloxacin, and sulfamethoxazole, in a partial life-cycle study with zebrafish (*Danio rerio*): Effects on growth, development, and reproduction [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2016, 23 (18): 18222-18228
- [31] Liu J Y, Wei T Z, Wu X, et al. Early exposure to environmental levels of sulfamethoxazole triggers immune and inflammatory response of healthy zebrafish larvae [J]. The Science of the Total Environment, 2020, 703: 134724
- [32] 宋唯一, 刘景, 白琼琼, 等. 有机磷阻燃剂 TDMPP 对斑马鱼早期器官发育毒性的研究[J]. 中国实用医药, 2020, 15(36): 202-206
- Song W Y, Liu J, Bai Q Q, et al. Study on toxicity of organophosphorus flame retardant TDMPP to early organ

- development of zebrafish [J]. *China Practical Medicine*, 2020, 15(36): 202-206 (in Chinese)
- [33] 林浩然. 鱼类生长和生长激素分泌活动的调节[J]. *动物学报*, 1996, 42(1): 69-79  
Lin H R. The regulation of growth and growth hormone secretion in fish [J]. *Acta Zoologica Sinica*, 1996, 42(1): 69-79 (in Chinese)
- [34] 姜雪. 久效磷对早期生长发育阶段斑马鱼 GH、GHR1 和 IGF- I 基因表达的影响[D]. 青岛: 中国海洋大学, 2009: 49  
Jiang X. The effects of monocrotophos on the expression of GH, GHR1 and IGF- I of early developmental stages of zebrafish [D]. Qingdao: Ocean University of China, 2009: 49 (in Chinese)
- [35] 马文阁. 黄颡鱼 GH/IGF 生长轴基因的序列特征和两性表达差异分析[D]. 武汉: 华中农业大学, 2016: 14  
Ma W G. Characterization and sex-dependent expression of GH/IGF axis genes in yellow catfish [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2016: 14 (in Chinese)
- [36] Wood A W, Duan C M, Bern H A. Insulin-like growth factor signaling in fish [J]. *International Review of Cytology*, 2005, 243: 215-285
- [37] Baxter R C, Martin J L. Binding proteins for the insulin-like growth factors: Structure, regulation and function [J]. *Progress in Growth Factor Research*, 1989, 1(1): 49-68
- [38] 孙文静, 王晓艳, 祁鹏志, 等. 苯并[a]芘(BaP)对褐菖鲉 (*Sebasticus marmoratus*) 肝 CYP1A1 酶活性、基因表达及蛋白表达的影响[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(4): 897-903  
Sun W J, Wang X Y, Qi P Z, et al. Effects of benzo[a]pyrene on EROD activity, mRNA expression, and protein expression of CYP1A1 in the liver of *Sebasticus marmoratus* [J]. *Oceanologia et Limnologia Sinica*, 2018, 49(4): 897-903 (in Chinese)
- [39] Borski R J, Tsai W, DeMott-Friberg R, et al. Regulation of somatic growth and the somatotrophic axis by gonadal steroids: Primary effect on insulin-like growth factor I gene expression and secretion [J]. *Endocrinology*, 1996, 137(8): 3253-3259
- [40] Wang L N, Yan R, Yang Q L, et al. Role of GH/IGF axis in arsenite-induced developmental toxicity in zebrafish embryos [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2020, 201: 110820
- [41] Wong A O, Zhou H, Jiang Y H, et al. Feedback regulation of growth hormone synthesis and secretion in fish and the emerging concept of intrapituitary feedback loop [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 2006, 144(3): 284-305
- [42] 于道德, 宁璇璇, 任贵如, 等. 甲状腺激素在鱼类繁殖中的作用[J]. *海洋科学*, 2010, 34(7): 106-110  
Yu D D, Ning X X, Ren G R, et al. Functions of thyroid hormone in fish reproduction [J]. *Marine Sciences*, 2010, 34(7): 106-110 (in Chinese)
- [43] Thienpont B, Tingaud-Sequeira A, Prats E, et al. Zebrafish eleutheroembryos provide a suitable vertebrate model for screening chemicals that impair thyroid hormone synthesis [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(17): 7525-7532