

# 氧化应激参与溴乙酰胺致斑马鱼胚胎神经发育毒性

何梦婷, 王伟, 许洁, 张洁

苏州大学医学部公共卫生学院卫生毒理学教研室, 江苏 苏州 215123

## 摘要:

**[背景]** 溴乙酰胺是一种饮用水消毒副产物, 研究证实它具有细胞毒性和遗传毒性, 但对于神经发育的毒性作用尚不明确。

**[目的]** 探究溴乙酰胺在斑马鱼胚胎期暴露所致神经发育毒性及可能机制。

**[方法]** 将野生型斑马鱼胚胎随机分为6组(每组  $n=30$ ) 进行染毒, 分别为: 对照组、溴乙酰胺各质量浓度(后称: 浓度) (0.625、1.25、2.5、5、10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 染毒组。染毒时间为受精后2 h (2 hpf) 至96 hpf。每天观察斑马鱼胚胎的死亡情况并更换培养液, 最终统计72 hpf的孵化率和96 hpf的死亡率、畸形率、体长。于120 hpf时检测斑马鱼幼鱼的运动行为能力, 并进行结果统计。用二氯二氢荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 为探针检测斑马鱼体内活性氧 (ROS) 水平。通过荧光定量PCR方法检测神经发育相关基因 (*dlx2*、*ngn1*、*elavl3*、*shha*、*mbp*、*syn2a*) 及氧化应激相关基因 (*Cu/Zn sod*、*gpx*、*cat*、*nrf2*、*ho-1*) 的表达情况。

**[结果]** 72 hpf时, 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溴乙酰胺染毒组斑马鱼胚胎的孵化率为88.40%, 较对照组(100%) 降低 ( $P<0.05$ )。96 hpf时, 5、10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溴乙酰胺染毒组斑马鱼胚胎的死亡率为48.10%和96.06%, 较对照组(15.92%) 升高 ( $P<0.05$ ); 2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溴乙酰胺染毒组胚胎畸形率为21.38%和43.43%, 也较对照组(1.94%) 升高 ( $P<0.05$ ); 2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溴乙酰胺染毒组胚胎体长分别为5.21、4.94 mm, 较对照组(5.40 mm) 下降 ( $P<0.05$ )。运动检测发现: 与对照组相比, 溴乙酰胺染毒组均出现运动距离下降和运动时间缩短的现象, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。ROS染色发现, 1.25、2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  溴乙酰胺染毒组斑马鱼胚胎头部区域ROS表达水平高于对照组, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。定量PCR检测结果发现: 与对照组相比, 神经发育相关基因 *dlx2* 在2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组表达下调, *ngn1* 在5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组下调, *elavl3*、*shha* 在1.25、2.5和5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组下调, *mbp* 在1.25、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组下调, *syn2a* 在各染毒组均下调, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ); 氧化应激相关基因 *Cu/Zn sod* 在2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组上调, *gpx* 在5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组上调, *cat*、*nrf2* 在1.25、2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组上调, *ho-1* 在各染毒组均上调 ( $P<0.05$ )。

**[结论]** 溴乙酰胺暴露后可能通过诱导氧化应激, 抑制神经发育相关基因的表达, 从而导致斑马鱼胚胎神经发育毒性。

**关键词:** 饮用水消毒副产物; 溴乙酰胺; 斑马鱼; 氧化应激; 神经发育

**Role of oxidative stress in neurodevelopmental toxicity of bromoacetamide in zebrafish embryos** HE Mengting, WANG Wei, XU Jie, ZHANG Jie (Department of Health Toxicology, School of Public Health, Medical College of Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China)

## Abstract:

**[Background]** Bromoacetamide (BACAm) is a kind of disinfection by-products, and has been confirmed to have cytotoxicity and genetic toxicity, but its toxic effect on neurodevelopment is still unclear.

**[Objective]** This experiment aims to study the neurodevelopmental toxicity and its mechanism caused by BACAm on zebrafish embryos.

**[Methods]** Wild-type zebrafish embryos were randomly divided into six groups (30 embryos in each group), namely a control group and five BACAm exposure groups (0.625, 1.25, 2.5, 5, and 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ). The exposure period was from 2 h post-fertilization (hpf) to 96 hpf. The mortality of zebrafish embryos was detected every day, and the 72 hpf hatching rate and the 96 hpf mortality, deformity rate, and body length were calculated. The locomotor ability of zebrafish was tested at 120 hpf. Reactive oxygen species (ROS) levels in zebrafish were detected by 2, 7-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) probe. The expression levels of neurodevelopment-related genes (*dlx2*, *ngn1*, *elavl3*, *shha*, *mbp*, and *syn2a*) and oxidative stress-related genes (*Cu/Zn sod*, *gpx*, *cat*, *nrf2*, and *ho-1*) were detected by fluorescence quantitative PCR.

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2021.20580

## 基金项目

国家自然科学基金项目 (81673203)

## 作者简介

并列第一作者。

何梦婷 (1995—), 女, 硕士生;

E-mail: 2872489764@qq.com

王伟 (1992—), 男, 硕士生;

E-mail: 804434214@qq.com

## 通信作者

张洁, E-mail: zhangjie\_78@suda.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2020-12-21

录用日期 2021-04-13

文章编号 2095-9982(2021)06-0586-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

## ►引用

何梦婷, 王伟, 许洁, 等. 氧化应激参与溴乙酰胺致斑马鱼胚胎神经发育毒性[J]. 环境与职业医学, 2021, 38(6): 586-592.

## ►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20580

## Funding

This study was funded.

## Correspondence to

ZHANG Jie, E-mail: zhangjie\_78@suda.edu.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2020-12-21

Accepted 2021-04-13

## ►To cite

HE Mengting, WANG Wei, XU Jie, et al. Role of oxidative stress in neurodevelopmental toxicity of bromoacetamide in zebrafish embryos[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2021, 38(6): 586-592.

## ►Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2021.20580

**[Results]** At 72 hpf, the hatching rate of zebrafish embryos in the 10 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm exposure group was 88.40%, lower than the 100% hatching rate in the control group ( $P < 0.05$ ). At 96 hpf, the mortality rates of zebrafish embryos in the 5 and 10 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm exposure groups were 48.10% and 96.06%, respectively, higher than 15.92% in the control group ( $P < 0.05$ ); the malformation rates of embryos in the 2.5 and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm exposure groups were 21.38% and 43.43%, respectively, which were higher than 1.94% in the control group ( $P < 0.05$ ); the body lengths of embryos in the 2.5 and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm exposure groups were 5.21 and 4.94 mm, respectively, lower than 5.40 mm in the control group ( $P < 0.05$ ). The locomotor ability test results found that compared with the control group, the BAcAm exposure groups showed decreasing movement distance and time ( $P < 0.05$ ). ROS staining results revealed that the ROS expression levels in the head region of zebrafish embryos in the 1.25, 2.5, and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm groups were significantly higher than those in the control group ( $P < 0.05$ ). Quantitative PCR results showed that the expression levels of neurodevelopment-related genes *dlx2* were down-regulated in the 2.5 and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm groups, *ngn1* was down-regulated in the 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm group, *elavl3* and *shha* were down-regulated in the 1.25, 2.5, and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm groups, *mbp* was down-regulated in the 1.25 and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm groups, *syn2a* was down-regulated in all BAcAm groups ( $P < 0.05$ ); the expression levels of oxidative stress-related genes *Cu/Zn sod* was up-regulated in the 2.5 and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm groups, *gpx* was up-regulated in the 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm group, *cat* and *nrf2* were up-regulated in the 1.25, 2.5, and 5 mg·L<sup>-1</sup> BAcAm groups, and *ho-1* was up-regulated in all BAcAm groups ( $P < 0.05$ ).

**[Conclusion]** BAcAm exposure may induce oxidative stress and inhibit the expression of neurodevelopment-related genes, thereby induce neurodevelopmental toxicity in zebrafish embryos.

**Keywords:** disinfection by-products; bromoacetamide; zebrafish; oxidative stress; neurodevelopment

作为 20 世纪公共卫生事业的重大进步之一，氯化消毒是目前饮用水处理中最常用的消毒方法。然而，研究发现氯化消毒过程中产生的消毒副产物具有较强的致畸性和致癌性<sup>[1]</sup>。随着水污染状况的变化和水处理工艺的改进，卤代酰胺作为一种新型的含氮消毒副产物开始受到关注，目前已确认的有 13 种<sup>[2]</sup>。研究发现在许多国家的饮用水，由于通过氯化化和氯胺化消毒后检出多种卤代酰胺<sup>[3]</sup>。毒理学研究证实，卤代酰胺的细胞毒性比卤代乙酸高 99 倍，遗传毒性比卤代乙酸高 19 倍<sup>[4]</sup>。

溴乙酰胺是 13 种卤代酰胺中的一种，Chu 等<sup>[5-6]</sup>发现因氯化化和氯胺化消毒导致的自然水域和水处理厂的水中溴乙酰胺浓度超过了检测限值。本实验室最近研究发现，溴乙酰胺可引起斑马鱼发育毒性，主要表现为死亡率增加，孵化率、体长及运动能力的下降<sup>[7]</sup>，但具体机制尚不明确。Hong 等<sup>[8]</sup>发现单卤代酰胺的暴露可能会增加活性氧的产生。吉贵祥等<sup>[9]</sup>发现斑马鱼胚胎暴露于 2, 2', 4, 4'-四溴联苯醚 (BDE-47) 后引起神经受损并激活抗氧化防御系统。因此，我们假设溴乙酰胺是否通过诱导氧化应激导致斑马鱼的神经发育毒性。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 是一种重要的水生脊椎动物，胚胎透明，便于在显微镜下观察，对低浓度的环境污染非常敏感，并且与人类基因高度同源<sup>[10]</sup>。因此，它被广泛用于评估水中有害物质和药理学、药物筛选、毒理学研究等方面。本研究以斑马鱼作为实验对象，探究斑马鱼胚胎期暴露于溴乙酰胺后所致的神经发育毒性及其可能机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物与试剂

受精后 2 h (2 hours of post-fertilization, 2 hpf) 的野生型 AB 系斑马鱼鱼卵 (木芮生物科技有限公司, 中国)。溴乙酰胺 (纯度 ≥ 98%, CAS : 683-57-8) 以及二氯二氢荧光素二乙酸酯 (dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) 均购自 Sigma-Aldrich (美国)。

### 1.2 主要仪器

DS-Qi2 荧光显微镜 (Nikon, 日本), Zebrabox 斑马鱼行为追踪分析仪 (ViewPoint, 法国), Milli Q 纯水仪 (Millipore, 美国), NanoDrop2000 分光光度计 (Thermo Fisher, 美国), 荧光定量 PCR 仪 (ABI, 美国)。

### 1.3 实验方法

**1.3.1 急性毒性实验** 溴乙酰胺溶于双蒸水 (ddH<sub>2</sub>O) 配制为 100 mg·L<sup>-1</sup> 的母液, 4 °C 避光保存备用。按经济合作与发展组织 (Organization for Economic Cooperation and Development, OECD) 鱼类急性毒性实验标准方法<sup>[11]</sup> 设置分组, 分别为对照组和溴乙酰胺染毒组 (0.625、1.25、2.5、5、10 mg·L<sup>-1</sup>, 同步设置 3 个平行组)。将受精后 2 h (2 hours post-fertilization, 2 hpf) 的斑马鱼受精卵随机放入 6 孔板中, 每孔 30 枚鱼卵。将 6 孔板置于标准培养环境中, 该环境保持 (28.5±0.5) °C<sup>[12]</sup> 恒温, 14 h : 10 h 光 - 暗周期。每天更换培养液并及时取出死亡胚胎并统计, 直至 96 hpf。72 hpf 时记录斑马鱼的孵化情况, 96 hpf 时记录斑马鱼的死亡数、畸形数以及镜下测量斑马鱼的体长。

**1.3.2 幼鱼运动能力测试** 在溴乙酰胺暴露至 96 hpf 时, 用养殖系统水 (后称: 卵水) 将幼鱼清洗 2 次, 然后全

部换成卵水继续培养至 120 hpf。从 6 孔板中挑出无畸形的幼鱼置于 96 孔板中, 每孔一条, 加入 200  $\mu\text{L}$  卵水, 保证幼鱼可以自由游动。将 96 孔板放置于 Zebrabox 斑马鱼行为追踪分析仪中, 设置仪器每 20 min 照明 - 黑暗交替出现, 持续 140 min, 开始记录前适应 20 min。并记录下每分钟幼鱼的运动距离和运动时间。

**1.3.3 幼鱼体内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测** 在 96 hpf 时, 以 DCFH-DA 为探针测量 ROS 的产生。将斑马鱼 (每组  $n \geq 12$ ) 放入含有 5  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  DCFH-DA 的 1 mL 卵水的 24 孔板中避光孵育 40 min, 然后用卵水洗涤 3 次。荧光显微镜拍摄荧光图像, 用 Image J 1.50i 软件对头部荧光强度进行分析。

**1.3.4 斑马鱼胚胎总 RNA 提取及基因检测** 按本实验室方法<sup>[13]</sup>进行 RNA 提取, 每组收取  $\geq 20$  个胚胎, 使用 Trizol 法提取总 RNA。逆转录试剂盒逆转录合成 cDNA (complementary DNA), 向 cDNA 中加入 SYBR green 以及正反向引物进行实时定量 PCR 实验, 引物序列见表 1。采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法分析目的基因表达的相对差异。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列 (5'-3') [Primer sequences (5'-3')]	
	正向 (Forward)	反向 (Reverse)
<i><math>\beta</math>-actin</i>	ACGAACGACCAACTAACTCT	TTAGACAACCTACCTCCCTTTGC
<i>Cu/Zn sod</i>	GTCGCTCTGGCTTGTGGAGTG	TGTCAGCGGGCTAGTGCTT
<i>cat</i>	AGGGCAACTGGGATCTTACA	TTTATGGGACCAGACCTTGG
<i>gpx</i>	AGATGTCATTCTGCACACG	AAGGAGAAGCTTCTCAGCC
<i>nrf2</i>	GACAAAATCGGCGACAAAAT	TTAGGCCATGTCCACACGTA
<i>ho-1</i>	GGAAGAGCTGGACAGAAACG	CGAAGAAGTGTCCAAGTCC
<i>dlx2</i>	TGCTCCTCACCACCTCT	GAACCTTGAACGACGATT
<i>ngn1</i>	TGCACAACCTTAACGACGCATTGG	TGCCAGATGTAGTTGTGAGCGAA
<i>elavl3</i>	GTCAGAAAGACATGGAGCAGTTG	GAACCGAATGAAACCTACCC
<i>shha</i>	AGACCGAGACTCCACGACGC	TGCAGTCACTGGTGCGAACG
<i>mbp</i>	AATCAGCAGGTTCTTCGGAGGAGA	AAGAAATGCACGACAGGGTTGACG
<i>syn2a</i>	GTGACCATGCGACATTTC	TGGTTCTCCACTTTCACCTT

## 1.4 统计学分析

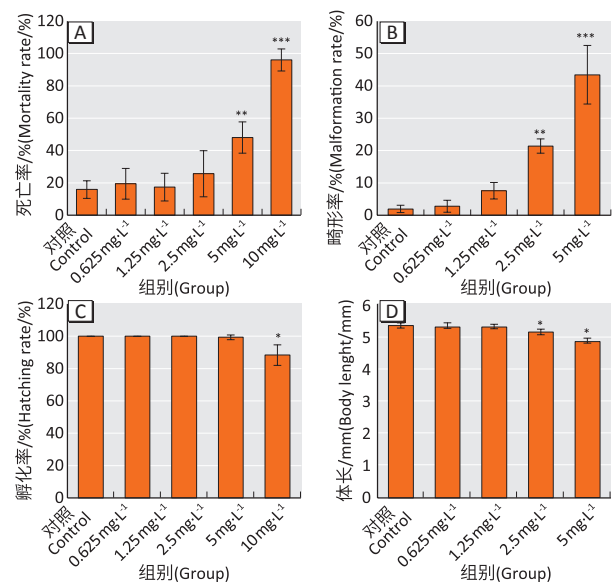
实验数据使用 SPSS 20.0 统计软件分析。资料经正态性检验后符合正态分布, 因此计量数据以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示; 各染毒组间比较用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 进一步使用 LSD 进行两两比较, 检验水准为  $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

### 2.1 溴乙酰胺对斑马鱼胚胎发育的影响

斑马鱼胚胎期暴露于溴乙酰胺至 96 hpf 时, 各染毒组间死亡率的差异具有统计学意义 ( $F=32.733$ ,  $P<0.001$ ), 5、10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组的死亡率分别为 48.10% 和

96.06%, 高于对照组 (15.92%), 差异具有统计学意义 (分别  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ) (图 1A)。由于 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组的死亡率过高, 剩余胚胎不能进行统计分析, 因此以下结果均无 10  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组。96 hpf 时各组间畸形率的差异具有统计学意义 ( $F=23.384$ ,  $P<0.001$ ), 2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组的胚胎畸形率分别为 21.38% 和 43.43%, 高于对照组 (1.94%), 差异具有统计学意义 (分别  $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ) (图 1B)。斑马鱼 72 hpf 时各组间孵化率差异具有统计学意义 ( $F=15.273$ ,  $P<0.001$ ), 在 5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组下降了 11.6%, 差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ ) (图 1C)。96 hpf 时各组间体长差异具有统计学意义 ( $F=18.841$ ,  $P<0.001$ ), 2.5、5  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  染毒组中斑马鱼体长较对照组分别缩短了 3.52% 和 8.52%, 差异具有统计学意义 (分别  $P<0.05$ ,  $P<0.05$ ) (图 1D)。



[注] A、B、D: 96 hpf; C: 72 hpf。与对照组比较, \* :  $P<0.05$ , \*\* :  $P<0.01$ , \*\*\* :  $P<0.001$ 。

[Note] A, B, D: 96 hpf; C: 72 hpf. Compared with the control group, \* :  $P<0.05$ , \*\* :  $P<0.01$ , \*\*\* :  $P<0.001$ .

图 1 溴乙酰胺对斑马鱼胚胎发育的影响

Figure 1 Effect of bromoacetamide on zebrafish embryonic development

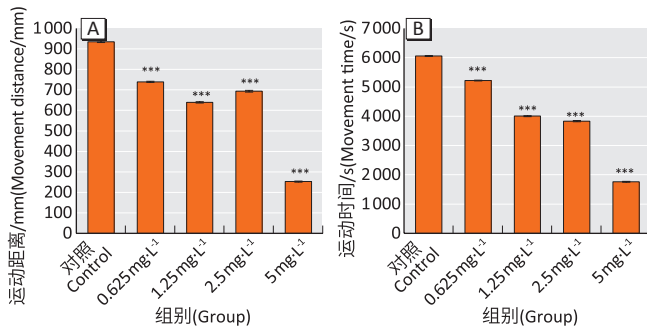
### 2.2 溴乙酰胺对斑马鱼运动行为的影响

溴乙酰胺染毒至 96 hpf 时, 各组间的运动距离和运动时间差异具有统计学意义 ( $F_1=47.545$ ,  $F_1=43.860$ , 均  $P<0.001$ ), 染毒组斑马鱼胚胎运动总距离和运动总时间明显下降, 差异具有统计学意义 (均  $P<0.001$ ) (图 2)。

### 2.3 溴乙酰胺对斑马鱼神经发育相关基因表达的影响

斑马鱼胚胎各染毒组间神经发育相关基因 (*dlx2*、*ngn1*、*elavl3*、*shha*、*mbp*、*syn2a*) 的表达差异具有统计学意义 ( $F_1=11.220$ ,  $F_2=6.613$ ,  $F_3=38.726$ ,  $F_4=41.189$ ,  $F_5=15.808$ ,  $F_6=43.110$ , 均  $P<0.01$ ), 与对照组比较, *dlx2*

在2.5、5 mg·L<sup>-1</sup>染毒组表达下调, *ngn1*在5 mg·L<sup>-1</sup>染毒组表达下调, *elavl3*、*shha*在1.25、2.5和5 mg·L<sup>-1</sup>染毒组表达下调, *mbp*在1.25、5 mg·L<sup>-1</sup>染毒组下调, *syn2a*在各染毒组均表达下调, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ) (图3)。

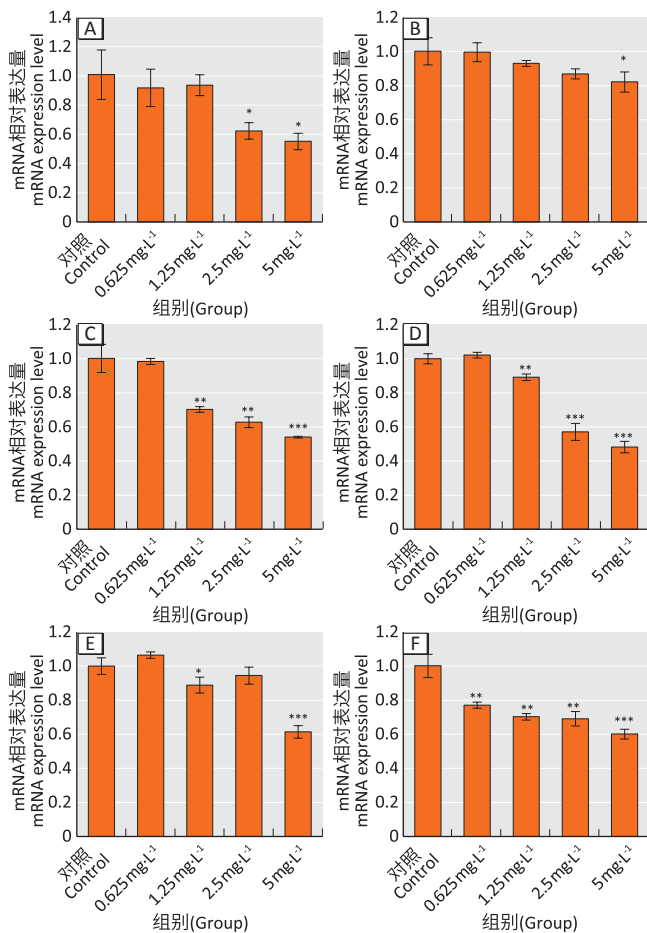


[注] \*\*\* : 与对照组比较,  $P < 0.001$ .

[Note] \*\*\*: Compared with the control group,  $P < 0.001$ .

图2 溴乙酰胺对斑马鱼运动距离 (A)、运动时间 (B) 的影响

Figure 2 Effect of bromoacetamide on zebrafish embryonic movement distance (A) and time (B)



[注] A: *dlx2*; B: *ngn1*; C: *elavl3*; D: *shha*; E: *mbp*; F: *syn2a*. 与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ .

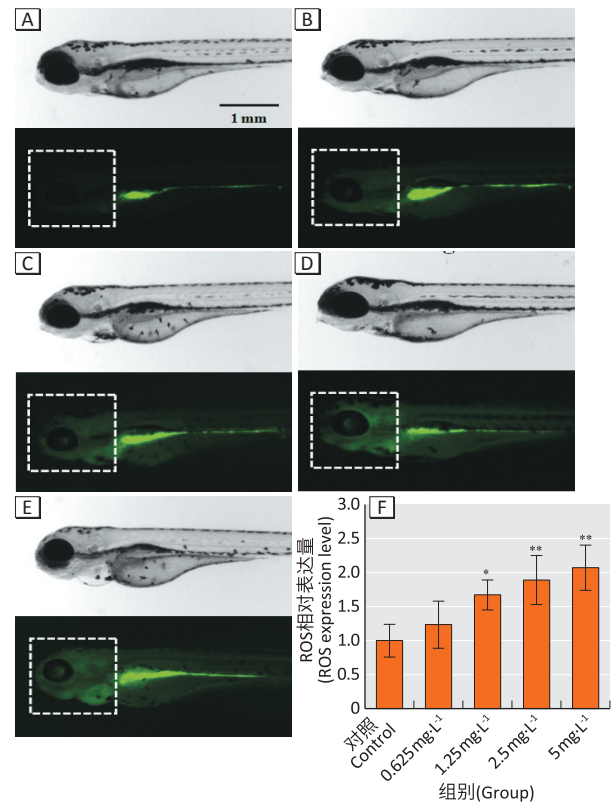
[Note] A: *dlx2*; B: *ngn1*; C: *elavl3*; D: *shha*; E: *mbp*; F: *syn2a*. Compared with the control group, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ .

图3 溴乙酰胺对斑马鱼神经发育基因表达的影响

Figure 3 Effect of bromoacetamide on neurodevelopmental gene expressions of zebrafish

## 2.4 溴乙酰胺对斑马鱼头部 ROS 的影响

斑马鱼胚胎暴露于溴乙酰胺后, 头部的 ROS 荧光信号明显增强 (图 4A-E), 对荧光信号进行定量后发现各组间 ROS 表达差异具有统计学意义 ( $F = 7.246$ ,  $P < 0.01$ ) (图 4F), 1.25、2.5、5 mg·L<sup>-1</sup> 溴乙酰胺染毒组的 ROS 表达水平分别较对照组升高了 67%、89% 和 107%, 差异具有统计学意义 (分别  $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.01$ )。



[注] A : 对照组 ; B : 0.625 mg·L<sup>-1</sup> ; C : 1.25 mg·L<sup>-1</sup> ; D : 2.5 mg·L<sup>-1</sup> ; E : 5 mg·L<sup>-1</sup>. A-E : 斑马鱼头部的 ROS 荧光信号 ; 上图表示明场图片, 下图表示荧光图片, 白色方框代表斑马鱼胚胎头部区域, 随着溴乙酰胺浓度的增加, 该区域荧光强度逐渐增强. F : 各组 ROS 相对表达量比较. 与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ .

[Note] A: Control; B: 0.625 mg·L<sup>-1</sup>; C: 1.25 mg·L<sup>-1</sup>; D: 2.5 mg·L<sup>-1</sup>; E: 5 mg·L<sup>-1</sup>. A-E: Typical fluorescence images of ROS formation in zebrafish embryo head. Upper picture: bright field; lower picture: fluorescence. The white box represents the head area of zebrafish embryos. As the concentration of BACAm increases, the fluorescence intensity of this area gradually increases. F: ROS relative expression level. Compared with the control group, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ .

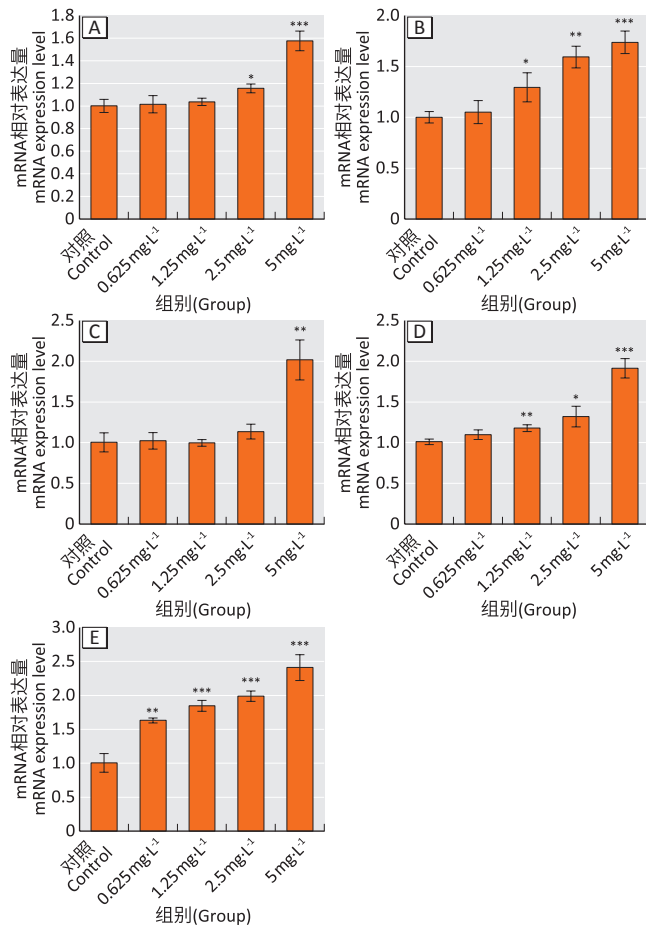
图4 溴乙酰胺对斑马鱼头部 ROS 的影响

Figure 4 Effect of bromoacetamide on ROS in zebrafish head

## 2.5 溴乙酰胺对斑马鱼氧化应激相关基因表达的影响

如图 5 所示, 斑马鱼胚胎暴露于溴乙酰胺 96 hpf 后, 各组间氧化应激相关基因 *Cu/Zn sod*、*gpx*、*cat*、*nrf2*、*ho-1* 的表达差异具有统计学意义 ( $F_1 = 45.567$ ,  $F_2 = 26.387$ ,  $F_3 = 30.845$ ,  $F_4 = 52.878$ ,  $F_5 = 58.172$ , 均  $P < 0.01$ ) ; 与对照组相比, *Cu/Zn sod* 在 2.5、5 mg·L<sup>-1</sup> 染毒组表达

上调, *cat*、*nrf2* 在 1.25、2.5、5 mg·L<sup>-1</sup> 染毒组表达上调, *gpx* 在 5 mg·L<sup>-1</sup> 染毒组表达上调, *ho-1* 在各染毒组表达均上调, 差异具有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。



[注] A: *Cu/Zn sod*; B: *cat*; C: *gpx*; D: *nrf2*; E: *ho-1*。与对照组比较, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ 。

[Note] A: *Cu/Zn sod*; B: *cat*; C: *gpx*; D: *nrf2*; E: *ho-1*. Compared with the control group, \* :  $P < 0.05$ , \*\* :  $P < 0.01$ , \*\*\* :  $P < 0.001$ 。

图5 溴乙酰胺对斑马鱼氧化应激相关基因表达的影响

Figure 5 Effect of bromoacetamide on the expression of oxidative stress-related genes in zebrafish

### 3 讨论

饮用水消毒副产物是目前饮用水安全领域关注的重要水质问题之一。鉴于我国部分地区水源水中有机物和溶解性氮含量较高, 并且自来水厂普遍采用氯化法和氯胺化消毒方式, 因此出厂水和管网水中可能存在较高浓度的卤代酰胺<sup>[14]</sup>。Plewa等<sup>[15]</sup>研究发现, 卤代酰胺可与细胞蛋白质硫醇反应, 从而诱导多种生物反应, 其中包括细胞凋亡和坏死。本研究发现斑马鱼在胚胎早期暴露于溴乙酰胺后出现发育毒性, 主要表现为胚胎死亡率和畸形率升高, 孵化率下降和体长缩短, 以及出现神经损伤, 运动能力下降。

斑马鱼运动行为学检测应用于探究环境因素对

斑马鱼胚胎活动的影响, 并且斑马鱼的运动行为特征能够体现斑马鱼的神经发育情况。本研究结果显示, 斑马鱼胚胎暴露于溴乙酰胺至 96 hpf 时, 斑马鱼的运动能力下降, 主要表现为运动时间和运动距离的明显下降。这些结果与曹文平等<sup>[16]</sup>的结果一致, 表明斑马鱼胚胎早期暴露于溴乙酰胺后出现神经发育毒性效应。*dlx* 基因家族基因编码的转录因子在脊椎动物中枢神经系统的发育中起关键作用<sup>[17]</sup>, 是哺乳动物大脑发育所必需的。就斑马鱼而言, *dlx* 基因也在发育中的大脑中表达<sup>[18]</sup>, 研究发现当 *dlx2* 基因下调后, 斑马鱼神经发育出现异常<sup>[19]</sup>。*elavl3* 基因是果蝇 *elav* 基因的直系同源基因, 它编码神经特异性 RNA 结合蛋白 HuC, 并且在神经元分化和维持中起到重要作用<sup>[20]</sup>。有研究证实, 斑马鱼胚胎暴露于磷酸三苯酯后, *elavl3* 基因水平表达下降, 斑马鱼胚胎神经发育出现异常<sup>[21]</sup>。研究发现 *ngn1* 基因的表达先于 *elavl3*, 并且参与了发育阶段中能够表达 HuC/Elavl3 蛋白的细胞的生成<sup>[22]</sup>, 有研究发现斑马鱼胚胎暴露于铜绿微囊藻后, *ngn1* 基因表达下调, 斑马鱼神经发育异常<sup>[23]</sup>。*Shha* 控制着关键的神经发育过程, 包括神经管的形成, 神经干细胞增殖和神经元、神经胶质细胞的存活。在人类和小鼠中, *Shha* 缺乏可导致脑部发育异常<sup>[24]</sup>。除了在神经发育中的作用外, *Shha* 的过度表达可促进神经细胞的存活, 保护这些细胞免受神经毒素的侵害<sup>[25]</sup>。因此, 当 *Shha* 表达缺乏时, 可致神经细胞损伤。髓鞘碱性蛋白 (myelin basic protein, MBP) 则是髓鞘形成的生物标志物, 而突触蛋白 (synapsin, SYN2) 是一种神经磷蛋白质, 在突触形成和神经递质释放过程中发挥重要作用<sup>[26]</sup>。GU 等<sup>[27]</sup> 发现斑马鱼胚胎早期暴露于双酚 S 后行为异常, *mbp* 和 *syn2a* 基因表达下调, 进而导致了斑马鱼胚胎的神经发育紊乱。Fu 等<sup>[28]</sup> 也发现斑马鱼暴露于双酚 A 后 *mbp* 和 *syn2a* 的基因和蛋白表达明显下调, 胚胎出现神经发育毒性, 进而导致运动能力的下降。本研究结果与上述研究结果一致, 当斑马鱼胚胎暴露于溴乙酰胺后出现运动能力的下降, 基因检测发现神经发育相关基因 *dlx2*、*ngn1*、*elavl3*、*shha*、*mbp*、*syn2a* 表达量均有不同程度的降低 ( $P < 0.05$ ), 表明溴乙酰胺在胚胎期暴露对斑马鱼的神经发育具有毒性作用。

在正常的生理情况下, 体内 ROS 的产生和清除一直处于动态平衡的状态, 若机体处于氧化与抗氧化不平衡的状态, 则会使得机体产生氧化应激, 氧化应激的产生会使机体处于易损状态, 同时还能增强致

病因素的毒性作用。最近研究表明,氧化应激可导致斑马鱼神经发育异常<sup>[29]</sup>。在抗氧化防护体系中,体内的抗氧化酶主要包括超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPx) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT), 可协助清除自由基,减轻和消除氧化损伤<sup>[30]</sup>。在本研究中, *Cu/Zn sod* 基因的表达水平在高浓度染毒组出现明显增加,表明机体出现 ROS 的增加。GPx 是机体内广泛存在的非酶抗氧化剂,具有清除脂类氢过氧化物以及 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 等生物学作用。CAT 是催化 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 分解的酶,主要存在于细胞的过氧化物体内,是过氧化物酶体的标志性酶。与 ZHANG 等<sup>[31]</sup> 研究结果一致,为了避免 ROS 产生所引起的氧化损伤,在溴乙酰胺暴露后抗氧化酶 SOD、CAT 和 GPx 的基因水平出现了增加。血红素加氧酶 (heme oxygenase, HO) -1 是一种众所周知的细胞保护性限速酶,可将血红素分解为一氧化碳、胆绿素和铁,作为内在有效的抗氧化剂<sup>[32]</sup>; HO-1 的表达由核转录因子红系 2 相关因子 2 (nuclear factor-erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 介导<sup>[33]</sup>, *nrf2* 和 *ho-1* 是被广泛研究的抗氧化基因,研究表明可通过激活 Nrf2/HO-1 抗氧化途径减轻辐射引起的斑马鱼神经氧化损伤<sup>[34]</sup>。本研究结果发现溴乙酰胺暴露后, *nrf2*、*ho-1* 的基因出现明显上调,说明溴乙酰胺暴露后导致斑马鱼体内 ROS 的产生从而激活了斑马鱼的抗氧化系统。

综上所述,本研究通过对斑马鱼行为学、神经发育相关基因、ROS 水平和抗氧化系统相关基因的研究,探讨了溴乙酰胺对斑马鱼神经毒性的作用及其毒性的分子相关机制,表明溴乙酰胺可能通过诱导氧化应激,抑制神经系统发育相关基因的表达,导致斑马鱼神经发育毒性。但本研究尚存在不足,如溴乙酰胺诱导的氧化应激与神经毒性之间是否存在直接的因果关系还需要通过使用抗氧化剂 N-乙酰-L-半胱氨酸进一步验证。

## 参考文献

- [1] RICHARDSON S D, PLEWA M J, WAGNER E D, et al. Occurrence, genotoxicity, and carcinogenicity of regulated and emerging disinfection by-products in drinking water: a review and roadmap for research [J]. *Mutat Res/Rev Mutat Res*, 2007, 636 (1/2/3): 178-242.
- [2] KRASNER S W, WEINBERG H S, RICHARDSON S D, et al. Occurrence of a new generation of disinfection byproducts [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40 (23): 7175-7185.
- [3] HUANG H, ZHU H, GAN W, et al. Occurrence of nitrogenous and carbonaceous disinfection byproducts in drinking water distributed in Shenzhen, China [J]. *Chemosphere*, 2017, 188: 257-264.
- [4] PLEWA M J, MUELLNER M G, RICHARDSON S D, et al. Occurrence, synthesis, and mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of haloacetamides: an emerging class of nitrogenous drinking water disinfection byproducts [J]. *Environ Sci Technol*, 2008, 42 (3): 955-961.
- [5] CHU W, GAO N, YIN D, et al. Formation and speciation of nine haloacetamides, an emerging class of nitrogenous DBPs, during chlorination or chloramination [J]. *J Hazard Mater*, 2013, 260: 806-812.
- [6] CHU W, GAO N, YIN D, et al. Trace determination of 13 haloacetamides in drinking water using liquid chromatography triple quadrupole mass spectrometry with atmospheric pressure chemical ionization [J]. *J Chromatogr A*, 2012, 1235: 178-181.
- [7] DING X, ZHU J, ZHANG J, et al. Developmental toxicity of disinfection by-product monohaloacetamides in embryonic-larval stage of zebrafish [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2020, 189: 110037.
- [8] HONG H, WU H, CHEN J, et al. Cytotoxicity induced by iodinated haloacetamides via ROS accumulation and apoptosis in HepG-2 cells [J]. *Environ Pollut*, 2018, 242: 191-197.
- [9] 吉贵祥, 石利利, 刘济宁, 等. BDE-47 对斑马鱼胚胎-幼鱼的急性毒性及氧化应激作用 [J]. *生态毒理学报*, 2013, 8 (5): 731-736.  
JI G X, SHI L L, LIU J N, et al. Acute toxicity and oxidative stress effects of BDE-47 on zebrafish embryos and larvae [J]. *Asian J Ecotoxicol*, 2013, 8 (5): 731-736.
- [10] BASU S, SACHIDANANDAN C. Zebrafish: a multifaceted tool for chemical biologists [J]. *Chem Rev*, 2013, 113 (10): 7952-7980.
- [11] BUSCHMANN J. The OECD guidelines for the testing of chemicals and pesticides [J]. *Methods Mol Biol*, 2013, 947: 37-56.
- [12] KIMMEL C B, BALLARD W W, KIMMEL S R, et al. Stages of embryonic development of the zebrafish [J]. *Dev Dyn*, 1995, 203 (3): 253-310.
- [13] 严锐. 斑马鱼胚胎对双酚 A 神经毒性的敏感期及其机制研究 [D]. 苏州: 苏州大学, 2019.  
YAN R. Sensitive period and mechanism of bisphenol A on

- neurotoxicity in zebrafish embryo [D]. Suzhou: Soochow University, 2019.
- [14] 李冕, 徐斌, 夏圣骥, 等. 含氮消毒副产物卤代酰胺的生成特性与控制研究进展 [J]. 中国给水排水, 2011, 27 (14): 31-34.  
LI M, XU B, XIA S J, et al. State-of-the-art of formation and control of nitrogenous disinfection by-products: haloamides [J]. China Water Wastewater, 2011, 27 (14): 31-34.
- [15] PLEWA M J, KARGALIOGLU Y, VANKERK D, et al. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity analysis of drinking water disinfection by-products [J]. Environ Mol Mutagen, 2002, 40 (2): 134-142.
- [16] 曹文平, 赵鑫, 王国祥, 等. 消毒副产物二氯乙酰胺的去除特性及对斑马鱼的毒性 [J]. 中国环境科学, 2017, 37 (3): 1073-1081.  
CAO W P, ZHAO X, WANG G X, et al. Removal property and toxicity research on zebrafish of the disinfection-byproduct—dichloroacetamide [J]. China Environ Sci, 2017, 37 (3): 1073-1081.
- [17] PANGANIBAN G, RUBENSTEIN J L R. Developmental functions of the Distal-less/Dlx homeobox genes [J]. Development, 2002, 129 (19): 4371-4386.
- [18] ELLIES D L, STOCK D W, HATCH G, et al. Relationship between the genomic organization and the overlapping embryonic expression patterns of the Zebrafish *dlx* Genes [J]. Genomics, 1997, 45 (3): 580-590.
- [19] HAN J, JI C, GUO Y, et al. Mechanisms underlying melatonin-mediated prevention of fenvalerate-induced behavioral and oxidative toxicity in zebrafish [J]. J Toxicol Environ Health A, 2007, 80 (23/24): 1331-1341.
- [20] XU H, SHAO X, ZHANG Z, et al. Effects of di-n-butyl phthalate and diethyl phthalate on acetylcholinesterase activity and neurotoxicity related gene expression in embryonic zebrafish [J]. Bull Environ Contam Toxicol, 2013, 91 (6): 635-639.
- [21] SHI Q, WANG M, SHI F, et al. Developmental neurotoxicity of triphenyl phosphite in zebrafish larvae [J]. Aquat Toxicol, 2018, 203: 80-87.
- [22] KIM C H, BAE Y K, YAMANAKA Y, et al. Overexpression of *neurogenin* induces ectopic expression of HuC in zebrafish [J]. Neurosci Lett, 1997, 239 (2/3): 113-116.
- [23] QIAN H, LIU G, LU T, et al. Developmental neurotoxicity of *Microcystis aeruginosa* in the early life stages of zebrafish [J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2018, 151: 35-41.
- [24] HO K S, SCOTT M P. Sonic hedgehog in the nervous system: functions, modifications and mechanisms [J]. Curr Opin Neurobiol, 2002, 12 (1): 57-63.
- [25] LI J, LI P, CARR A, et al. Functional expression of SCL/TAL1 interrupting locus (Stil) protects retinal dopaminergic cells from neurotoxin-induced degeneration [J]. J Biol Chem, 2013, 288 (2): 886-893.
- [26] FAN C Y, COWDEN J, SIMMONS S O, et al. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening [J]. Neurotoxicol Teratol, 2010, 32 (1): 91-98.
- [27] GU J, ZHANG J, CHEN Y, et al. Neurobehavioral effects of bisphenol S exposure in early life stages of zebrafish larvae (*Danio rerio*) [J]. Chemosphere, 2019, 217: 629-635.
- [28] FU J, GUO Y, YANG L, et al. Nano-TiO<sub>2</sub> enhanced bioaccumulation and developmental neurotoxicity of bisphenol a in zebrafish larvae [J]. Environ Res, 2020, 187: 109682.
- [29] 陈金, 范蓉, 张萍, 等. 纳米氧化铝对斑马鱼幼鱼的神经毒性及 mTOR 基因的作用 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (5): 431-437.  
CHEN J, FAN R, ZHANG P, et al. Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub> nanoparticles induced neurotoxicity and role of mTOR gene in zebrafish larvae [J]. J Environ Occup Med, 2019, 36 (5): 431-437.
- [30] 王秋林, 王浩毅, 王树人. 氧化应激状态的评价 [J]. 中国病理生理杂志, 2005, 21 (10): 2069-2074.  
WANG Q L, WANG H Y, WANG S R. Assessment of the state of oxidative stress [J]. Chin J Pathophysiol, 2005, 21 (10): 2069-2074.
- [31] ZHANG D L, HU C X, LI D H, et al. Lipid peroxidation and antioxidant responses in zebrafish brain induced by *Aphanizomenon flos-aquae* DC-1 aphantoxins [J]. Aquat Toxicol, 2013, 144-145: 250-256.
- [32] DUCKERS H J, BOEHM M, TRUE A L, et al. Heme oxygenase-1 protects against vascular constriction and proliferation [J]. Nat Med, 2001, 7 (6): 693-698.
- [33] ITOH K, CHIBA T, TAKAHASHI S, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1997, 236 (2): 313-322.
- [34] LIAO G, LI R, CHEN X, et al. Sodium valproate prevents radiation-induced injury in hippocampal neurons via activation of the Nrf2/HO-1 pathway [J]. Neuroscience, 2016, 331: 40-51.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)