

· 研究论文 ·

doi: 10.16801/j.issn.1008-7303.2023.0102

氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎及仔鱼心脏发育的 毒性及氧化损伤作用

李瑞瑞, 周 宁, 吴梦琪, 徐文平, 陶黎明, 张 阳*

(上海市化学生物学重点实验室, 华东理工大学 药学院, 上海 200237)

摘 要: 氯氟醚菊酯是目前中国市场上销量最大的卫生用杀虫剂品种之一, 其环境安全风险受到广泛关注。本研究以斑马鱼为试验模型, 评价了氯氟醚菊酯急性暴露对斑马鱼胚胎及仔鱼心脏发育的毒性及氧化损伤作用。结果表明, 氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎的急性毒性 72 h-LC₅₀ 值为 0.756 $\mu\text{g/mL}$, 属高毒。经氯氟醚菊酯不同剂量 (0、0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g/mL}$) 暴露 72 h 后发现: 0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 剂量处理组的仔鱼出现脊柱和尾部弯曲、心包和卵黄囊水肿等畸形特征, 且心率和孵化率显著降低、胚胎发育不完整 (体长变短、头部和眼睛面积缩小); 0.2、0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氟醚菊酯还能够诱导仔鱼心房心室分化, 心脏功能相关基因 *myl7*、*myh6*、*vmhc* 的表达水平下调, 并引起丙二醛 (MDA) 含量增加, 以及超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT)、谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等抗氧化酶活性的降低, 使仔鱼心脏处堆积活性氧 (ROS)。本研究结果表明, 氯氟醚菊酯暴露对斑马鱼胚胎的心脏发育具有显著毒性, 且与氧化损伤作用相关。

关键词: 卫生杀虫剂; 氯氟醚菊酯; 环境风险; 斑马鱼; 发育毒性; 氧化应激

中图分类号: S482.35; S481.1; X503.225 文献标志码: A

Toxicity and oxidative damage of meperfluthrin on cardiac development of zebrafish embryos and larvae

LI Ruirui, ZHOU Ning, WU Mengqi, XU Wenping, TAO Liming, ZHANG Yang*

(Shanghai Key Laboratory of Chemical Biology, School of Pharmacy, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China)

Abstract: Meperfluthrin is one of the top-selling sanitary insecticide species in the domestic market, drawing widespread attention due to its environmental safety risk. In this paper, zebrafish was used as an experimental model to assess the cardiac developmental toxicity and oxidative damage caused by acute exposure to meperfluthrin in embryos and larvae. The acute toxicity assessment revealed that meperfluthrin is highly toxic to zebrafish embryos with a 72 h-LC₅₀ of 0.756 $\mu\text{g/mL}$. After exposure to different doses of meperfluthrin (0, 0.2, 0.4, 0.8 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h, the larvae from 0.4 and 0.8 $\mu\text{g/mL}$ dose-treated groups showed deformities, including spine and tail curvature, pericardium and yolk sac

收稿日期: 2023-08-29; 录用日期: 2023-11-13; 网络首发日期: 2023-12-04.

Received: August 29, 2023; Accepted: November 13, 2023; Published online: December 4, 2023.

URL: <https://doi.org/10.16801/j.issn.1008-7303.2023.0102>

<http://www.nyxxb.cn/cn/article/doi/10.16801/j.issn.1008-7303.2023.0102>

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFD1700501).

Funding: Supported by National Key Research and Development Program of China (No. 2022YFD1700501).

第一作者 (First author): 李瑞瑞, Y12222131@mail.ecust.edu.cn. *通信作者 (Corresponding author): 张阳, zhangyang@ecust.edu.cn.

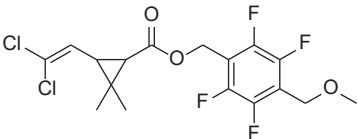
The authors declare that they have no competing interests.



edema, significant reduction of heart rate and hatchability, and incomplete embryonic development (shorter body length, smaller head, and eye area). Moreover, meperfluthrin of 0.2, 0.4, and 0.8 $\mu\text{g/mL}$ induced atrial and ventricular differentiation in larvae, and down-regulated the expression of cardiac function-related genes *myl7*, *myh6*, and *vmhc*. It also increased the content of malondialdehyde (MDA), as well as decreased the activities of antioxidant enzymes such as superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), and glutathione peroxidase (GSH-Px), resulting in the accumulation of reactive oxygen species (ROS) in the heart of larvae. The results of this paper indicate that meperfluthrin exposure has significant toxicity to the cardiac development of zebrafish embryos and is associated with oxidative damage.

Keywords: hygienic pesticides; meperfluthrin; environmental risk; zebrafish; developmental toxicity; oxidative stress

氯氟醚菊酯 (结构式见图式 1) 是一种广泛使用的拟除虫菊酯类杀虫剂^[1]。目前,它是市场上家庭用卫生杀虫剂的主要品种之一,常被用作蚊香或蚊香液类产品^[2]。伴随它的大量使用,其环境暴露风险也受到了越来越多的关注。2017 年 Pierre 等使用大鼠模型评价了氯氟醚菊酯类蚊香的急性毒性,发现该产品经肺吸收,具有高毒性风险,主要表现为麻木、嗜睡等^[3]。2021 年,埃及报道,吸入氯氟醚菊酯类蚊香烟雾的小白鼠出现细胞凋亡、组织病理学改变和生化指标的破坏^[4]。也有研究表明,含氯氟醚菊酯的蚊香对人体存在一定的毒性风险,如肺炎^[5]、脑损伤^[6]、呼吸道黏膜损伤和过敏^[7]等。此处,还有大量研究表明,同类别农用拟除虫菊酯类杀虫剂(高效氯氰菊酯、溴氰菊酯、功夫菊酯等)的持续使用会对人体和动物产生多种毒性,比如神经、内分泌干扰^[8]、发育及生殖^[9]、心脏毒性等。其中溴氰菊酯还可引起斑马鱼的发育毒性、细胞凋亡、心血管系统损伤和焦虑样行为,也会促进谷氨酸能突触之间的兴奋性神经递质的释放,导致成年斑马鱼社会行为的过度活跃^[10];高效氯氰菊酯可能通过延缓性腺发育、干扰性激素分泌和影响 HPG 轴基因的表达而对斑马鱼的生殖系统产生毒性^[11]。



图式 1 氯氟醚菊酯结构式
Scheme 1 The structural formula of meperfluthrin

生物体细胞内活性氧物质 (reactive oxygen species, ROS) 的过量产生与累积会导致氧化应激的发生,从而打破氧化还原平衡状态^[12]。氧化应激的发生可能引起 DNA、蛋白质和脂质等生物分

子的氧化损伤,导致细胞功能异常,甚至发生凋亡或坏死^[13]。为了对抗氧化应激产生的有害效应,生物体内有一套复杂的抗氧化防御系统,包括抗氧化酶,如超氧化物歧化酶 (SOD)、过氧化氢酶 (CAT) 及谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 等。这些抗氧化物质可以中和 ROS,从而减轻其对细胞的损伤^[14-15]。心脏作为推动血液循环的主要器官,对于动物的生长发育乃至存活都具有重要的生命意义。生物体一旦发生氧化应激,对心脏组织将产生一定的毒害作用,同时会引发生物体的心血管病变等。斑马鱼 *Danio rerio* 模型因胎心透明,心脏及血管发育等表观形态易于被观察研究,目前已被广泛应用到毒理学研究领域^[16]。

鉴于此,本研究评估了氯氟醚菊酯对斑马鱼心脏结构和功能的影响,包括心房和心室的形成、心脏收缩和泵血功能等;初步探讨了氯氟醚菊酯引起心血管毒性的潜在机制,旨在探究氯氟醚菊酯急性暴露对斑马鱼胚胎及仔鱼发育时期心血管发育的毒性效应,为氯氟醚菊酯的安全使用与风险管控提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验动物

斑马鱼成鱼由国家斑马鱼资源中心提供。雌、雄斑马鱼 (5 月大) 分别饲养,饲养水温控制在 (28 ± 1) °C, pH 值为 7.2, 电导率约为 500 $\mu\text{S/cm}$, 饲养房内光周期设置光照 14 h 和黑暗 10 h 交替,每日早、晚喂食鲜活丰年虫。

1.2 试剂和材料

氯氟醚菊酯 (meperfluthrin, CAS: 352271-52-4; 纯度 ≥ 99.5%), 江苏扬农化工股份有限公司提供。将氯氟醚菊酯粉末溶于二甲基亚砜 (DMSO), 于 4 °C 下保存。2',7'-二氯二氢荧光素二乙酸酯

(DCFH-DA)、RIPA 裂解缓冲液和吖啶橙 (AO, acridine orange) 染色试剂, 均来自 Sigma-Aldrich (美国)。Caspase 兔抗, 购自生工生物 (中国上海)。与氧化应激有关的商业检测试剂盒, 购自碧云天生物技术有限公司。用于 mRNA 分析的 TRIzol 试剂、逆转录酶、SYBR-Green Master Mix 和引物, 均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。CFX 96 孔, 购自 Labselect (中国北京)。磷酸盐缓冲溶液 (PBS, phosphate buffer saline) 等其他化学试剂, 均购自上海泰坦科技有限公司。

A1 HD25 共聚焦显微镜 (日本尼康公司); SMZ745T 体式显微镜 (日本尼康公司); CSW-DZ01 倒置荧光显微镜 (德国徕卡公司); QuantStudio 5 实时荧光定量 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher 公司)。

1.3 试验方法

1.3.1 急性毒性测试 将斑马鱼成鱼 (雌雄比例 1:1) 在产卵前 1 晚置于育种缸中进行黑暗处理, 第 2 天早上抽掉缸中隔板, 使其在强光刺激下开始交配。交配后 1 h 采集胚胎, 用胚胎培养液清洗 3 次, 置于 28 °C 恒温培养箱内。将受精后 6 h 的斑马鱼胚胎分别暴露于质量浓度分别为 0、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8、1.6 和 3.2 μg/mL 的氯氟醚菊酯药液中后, 记录胚胎暴露 72 h 的死亡情况。

将受精后 6 h 的斑马鱼胚胎分别暴露于 0、0.2、0.4、0.8 μg/mL 的氯氟醚菊酯药液中, 每 24 h 记录心率 (每分钟跳动次数, bpm)。于 48 h 和 72 h 统计并计算孵化率。

1.3.2 心血管毒性评估 基于本课题组先前的研究, 静脉窦-动脉球 (SV-BA) 的间距和心包面积被勾勒出, 以测量心包水肿的严重程度^[13]。Tg(*kdr1:EGFP*) 斑马鱼的胚胎分别经 0、0.2、0.4、0.8 μg/mL 的氯氟醚菊酯药液暴露 72 h 后, 使用 PBS 清洗 3 次, 并用 5 mg/L 的三卡因麻醉, 而后在共聚焦显微镜下采集图像, 使用 NIS 软件进行图像分析, 通过心脏部位的荧光强度和心房与心室的面积评估氯氟醚菊酯对斑马鱼仔鱼的心脏毒性; 通过肠下静脉的血管排列情况评价氯氟醚菊酯对仔鱼的血管毒性。

1.3.3 与氧化应激相关的酶活性检测 为了评估分别暴露于 0、0.2、0.4、0.8 μg/mL 氯氟醚菊酯药液 72 h 胚胎的氧化应激水平, 检测了与氧化应激有关的抗氧化酶 (SOD、CAT、GSH-Px) 活性以及丙二醛 (MDA) 和 ROS 的含量水平, 通过检测心脏

部位的荧光强度评价药物对胚胎心脏的毒性效应。

每组收集 30 枚胚胎, 随机取样, 在暴露 72 h 后用 PBS 清洗 3 次, 并在冰上匀浆, 根据先前的研究报告, 使用试剂盒测定 SOD、CAT、GSH-Px 的酶活性和 MDA 的含量水平, 使用 DCFH-DA 探针检测在药液中暴露 72 h 后斑马鱼仔鱼的活性氧水平^[17]。经不同浓度的氯氟醚菊酯药液处理斑马鱼胚胎 72 h 后, 用 PBS 洗涤 3 次, 之后用 5 mL ROS 检测液 (20 μmol/L DCFH-DA) 在 28 °C 黑暗条件下孵育 30 min。随后, 用 PBS 清洗仔鱼 3 次。最后, 使用倒置荧光显微镜捕捉整个仔鱼的实时图像。

1.3.4 病理学切片 为了评估斑马鱼心脏的组织病理学变化, 进行了苏木精伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色。将暴露于 0、0.2、0.4、0.8 μg/mL 的氯氟醚菊酯药液 72 h 的野生型 AB 斑马鱼仔鱼在 4% 多聚甲醛溶液、4 °C 环境下固定过夜。然后用 HE 染色进行组织学观察。于体式显微镜下采集图像。

1.3.5 RNA 提取和实时荧光定量 PCR 用 TRIzol 试剂提取 0、0.2、0.4、0.8 μg/mL 的 72 hpf (hours post fertiliation, 受精后小时) 仔鱼 (每组约 30 尾) 的总 RNA。通过 qRT-PCR 检测凋亡基因的表达水平, 包括心肌蛋白标记基因 *myl7*、心肌细胞转录因子 *myh6* 和心室早期发育标记基因 *vmhc*。

引物由赛维尔公司合成, 引物序列如表 1 所示。qRT-PCR 反应体系根据 2 × Universal Blue SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒 (G3326) 开展, 实时荧光定量 PCR 仪的反应运行程序为: ①95 °C 预变性 30 s; ②95 °C 变性 15 s, 60 °C 退火 10 s, 72 °C 延伸 30 s, 40 个循环; ③熔解曲线程序: 95 °C, 15 s; 60 °C, 1 min; 95 °C, 20 s, 步进 0.15 °C/s。以 *β-actin* 为内参, 用 2^{-ΔΔCt} 法计算目的基因的表达水平^[13]。

表 1 引物序列		
Table 1 Primer sequences		
基因 Gene	上游 Forward (5'-3')	下游 Reverse (5'-3')
<i>myl7</i>	CCAAGAGGGGGAAAACT GCT	CGGTTCTGATCTATGCAG CCA
<i>vmhc</i>	CAGTGAGGCGGTGAAAG GAA	TCTGCAGCCCTCTTGTA GC
<i>myh6</i>	GCTCCTTCCTCGGTGTGA AA	TTTTCAGACTCGGCGCTC TT

1.3.6 统计学分析 实验数据的统计以 3 个重复为单位, 采用 SPSS 25.0 计算机程序 (IBM 公司,

美国纽约) 进行。分析结果以平均值 ± 标准差 (SD) 表示。显著性概率水平设定为显著差异*, $P \leq 0.05$; 极显著差异**, $P \leq 0.01$ 。

2 结果与分析

2.1 急性毒性

根据不同浓度检测终点统计到的死亡率数据, 利用 OriginPro 2023b 统计学软件绘制了“浓度-致死率”效应曲线, 如图 1 所示, 并拟合得到了氯氟醚菊酯对斑马鱼的 72 h-LC₅₀ 值为 0.756 μg/mL, 95% 置信区间为 0.724~1.003 μg/mL。根据急性毒性结果, 选择 LC₅₀ 值作为最高浓度, 故将药液暴露质量浓度设置为 0、0.2、0.4、0.8 μg/mL。

2.2 氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎的发育毒性

2.2.1 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼胚胎的发育畸形

将 6 hpf 的斑马鱼胚胎在不同质量浓度的氯氟醚菊酯中急性暴露 72 h, 每 24 h 进行一次表型观

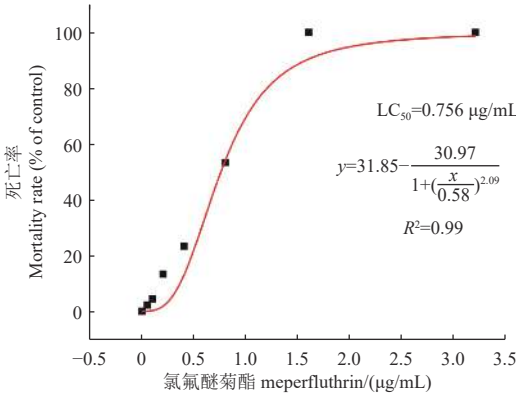


图 1 氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎-仔鱼的致死率 (72 h)
Fig. 1 Mortality of meperfluthrin to zebrafish embryo-larvae (72 h)

察, 结果发现, 斑马鱼胚胎从 24 h 开始出现不同程度的畸形特征, 包括脊柱弯曲、尾部弯曲、心包水肿或卵黄囊肿大 (图 2A), 其中 0.4 和 0.8 μg/mL 剂量暴露组的致畸率显著, 卵黄囊肿大的畸形占比最高 (图 2B)。

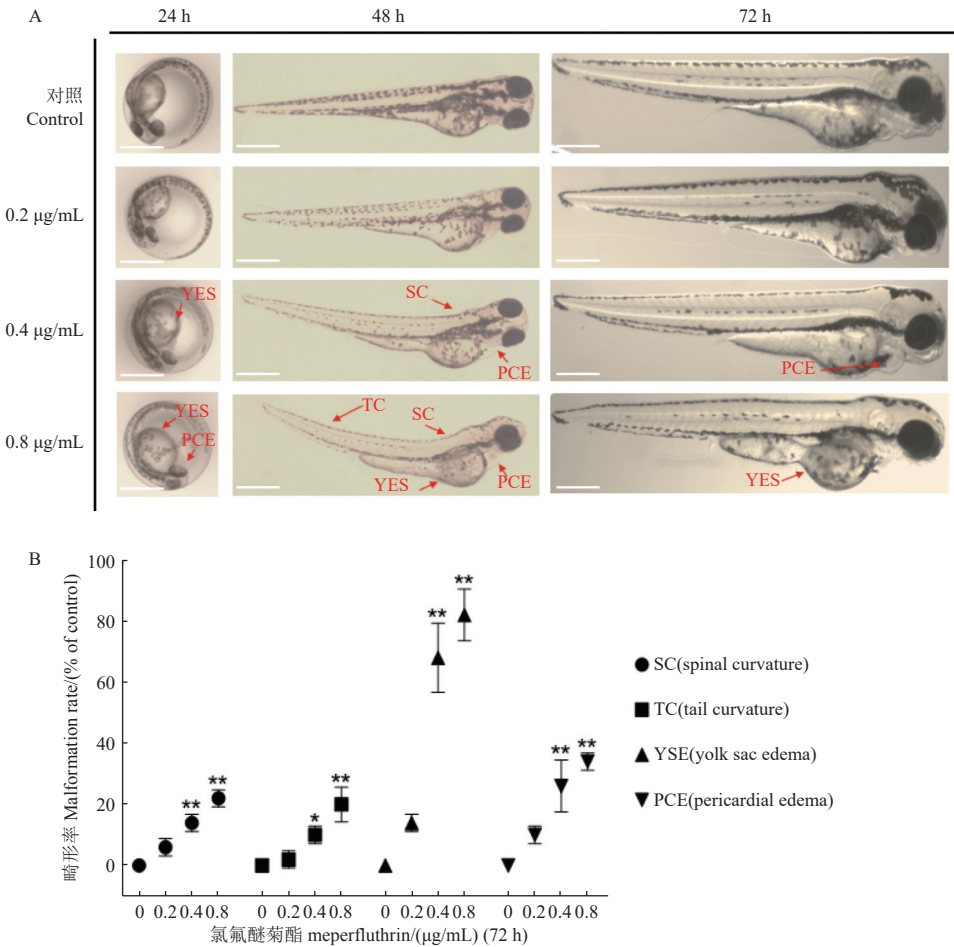
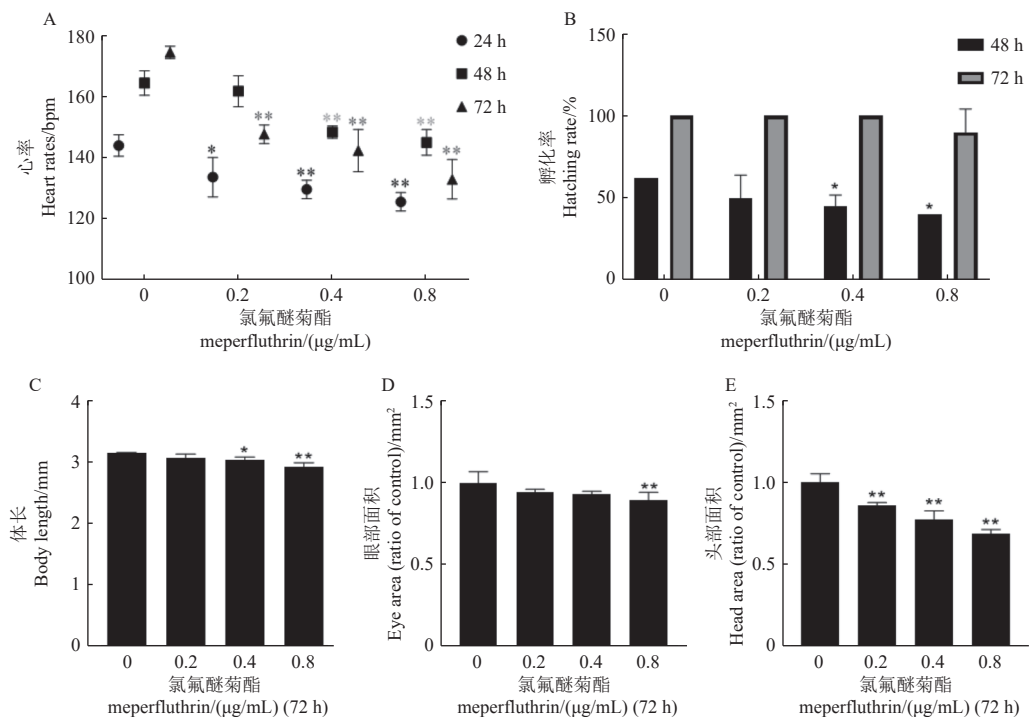


图 2 A. 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼产生脊柱弯曲(SC)、尾部弯曲(TC)、卵黄囊肿大(YSE)和心包水肿(PCE)等畸形现象;
B. 氯氟醚菊酯对斑马鱼的畸形率统计

Fig. 2 A. Meperfluthrin induced malformations including spinal curvature (SC), tail curvature (TC), yolk sac edema (YSE), and pericardial edema (PCE) in zebrafish; B. Statistical analysis of malformation rate in zebrafish induced by meperfluthrin

2.2.2 氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎及仔鱼的发育毒性 斑马鱼胚胎暴露于梯度质量浓度的氯氟醚菊酯 24、48 和 72 h 后, 其心率与对照组相比被显著抑制 (图 3A), 其中 48 h 的心率最高。如图 3B 所示, 0.2 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎的孵化率没有影响, 但在 0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 剂量暴露组中, 48 hpf 的斑马鱼胚胎孵化显著延迟, 72 hpf 的胚胎孵化不受暴露液质量浓度的影响, 这可能是因为

48 hpf 的胚胎各项机能发育不完善, 免疫力较弱, 难以抵御药剂的作用。由图 3C 可以看出, 0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的剂量组, 斑马鱼仔鱼的体长明显缩短。此外, 随着氯氟醚菊酯质量浓度的增大, 斑马鱼仔鱼眼部和头部面积出现显著减小 (图 3D、3E)。说明氯氟醚菊酯的暴露延缓了斑马鱼胚胎的早期发育。



A. 氯氟醚菊酯暴露 24、48、72 h 对斑马鱼心率的影响; B. 氯氟醚菊酯暴露 48、72 h 对斑马鱼孵化率的影响; C. 氯氟醚菊酯对斑马鱼体长的影响; D. 氯氟醚菊酯对斑马鱼眼睛面积的影响; E. 氯氟醚菊酯对斑马鱼头部面积的影响。

A. Effect of meperfluthrin exposure for 24, 48, and 72 h on heart rate of zebrafish; B. Effect of meperfluthrin exposure for 48 and 72 h on hatching rate of zebrafish; C. Effect of meperfluthrin on body length of zebrafish; D. Effect of meperfluthrin on eye area of zebrafish; E. Effect of meperfluthrin on head area of zebrafish.

图 3 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼胚胎的发育毒性

Fig. 3 Developmental toxicity induced by meperfluthrin in zebrafish embryos

2.3 氯氟醚菊酯对斑马鱼仔鱼的心脏毒性

采用 HE 染色观察斑马鱼仔鱼心脏的组织病理学变化, 结果 (图 4) 表明, 与对照相比, 0.2、0.4 和

2.3.1 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼仔鱼心脏线性化

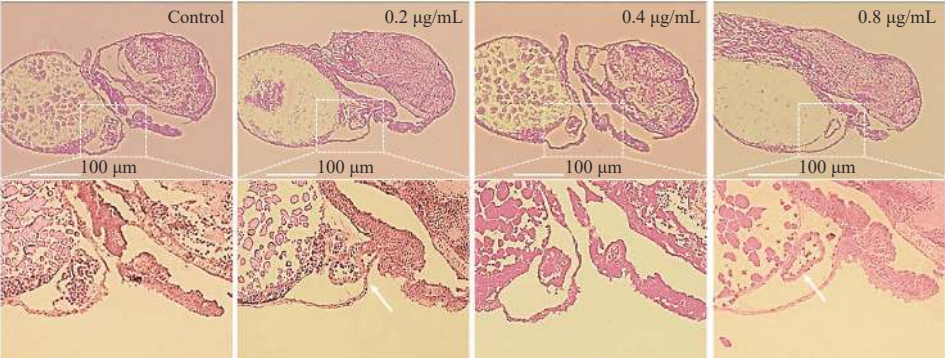


图 4 氯氟醚菊酯对斑马鱼心脏组织的影响 (72 h)

Fig. 4 Effects of meperfluthrin on zebrafish heart tissue (72 h)

0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氟醚菊酯处理使斑马鱼仔鱼心脏的心室扩大和线性化 (白色箭头指示), 说明氯氟醚菊酯损害了斑马鱼仔鱼心脏的发育形态。

2.3.2 氯氟醚菊酯对斑马鱼仔鱼心脏 SV-BA 间距的影响 测量药物暴露后的斑马鱼仔鱼的 SV-

BA 间距和心包面积发现, 与对照相比, 暴露于 0.2、0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氟醚菊酯的仔鱼呈现 SV-BA 间距显著加宽 (图 5B) 和心包面积增大 (图 5C) 的现象, 并具有浓度依赖性。

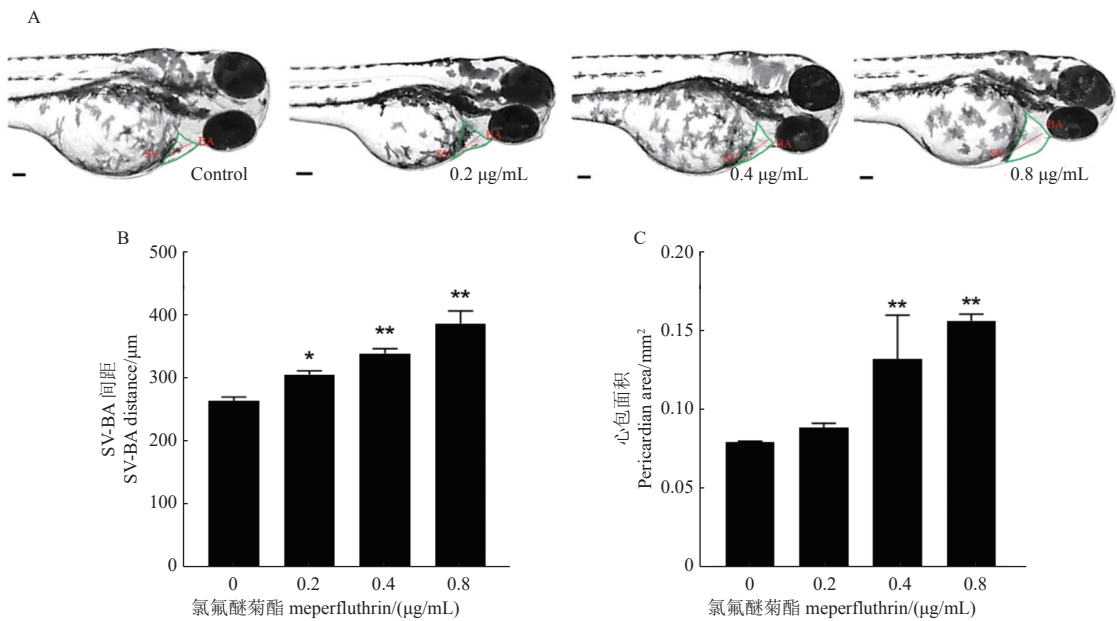


图 5 氯氟醚菊酯对斑马鱼仔鱼心脏的 SV-BA 间距 (B) 和心包面积 (C) 的影响 (72 h)

Fig. 5 Effect of meperfluthrin on cardiac SV-BA spacing (B) and pericardial area (C) on zebrafish larvae (72 h)

2.3.3 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼心脏的心房心室分化 斑马鱼的心脏是脊椎动物胚胎中第一个发育成熟并具有生理功能的器官, 由心房和心室两个腔室组成^[18-19]。若心脏受到影响, 心房和心室的位置将发生改变, SV-BA 距离也会发生相应的改变。本研究结果发现, 经 3 个剂量的氯氟醚菊酯处理

72 h, 斑马鱼仔鱼的心房和心室发生分化 (图 6), 并且随着药剂质量浓度的增加, 心房和心室间距较未处理组相比加大, 这正好验证了 HE 染色和 SV-BA 的结果。

2.3.4 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼心脏的基因表达失调 *myl7* 在斑马鱼的心房和心室中表达, 与其心

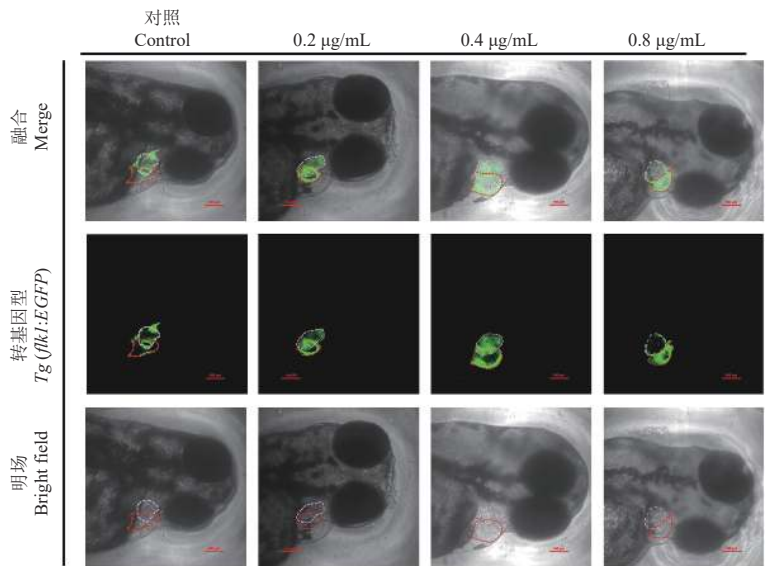


图 6 氯氟醚菊酯暴露对斑马鱼仔鱼心房心室位置的影响 (72 h)

Fig. 6 Effect of meperfluthrin exposure on the position of the atria and ventricles of zebrafish larvae hearts (72 h)

肌细胞增殖等生理过程密切相关; *myh6* 是与斑马鱼心脏发育有关的重要基因; *vmhc* 是最早标记心室的标记基因^[20]。如图 7 所示, 斑马鱼胚胎暴露于 3 个氯氟醚菊酯处理组 72 h 后, 与对照相比,

myl7、*myh6* 和 *vmhc* 的表达量均随着药剂质量浓度的增加而显著降低。说明氯氟醚菊酯可能通过降低 *myl7*、*myh6* 和 *vmhc* 基因的表达而损伤心肌细胞的功能, 从而产生对斑马鱼心脏的毒性。

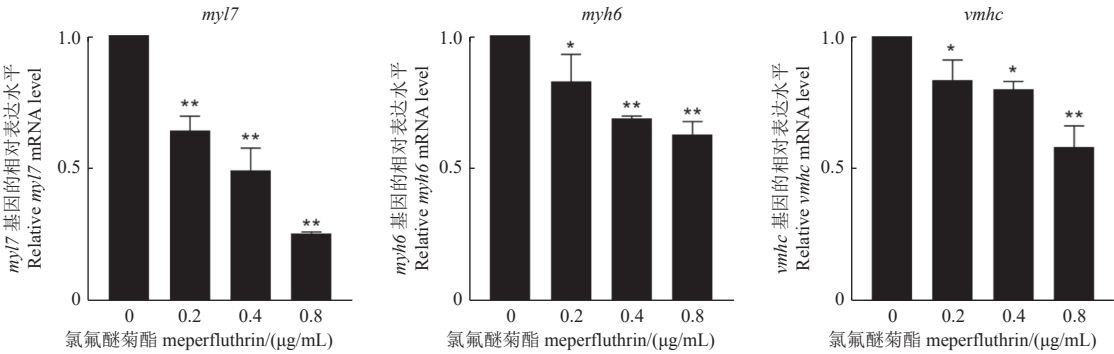


图 7 暴露于氯氟醚菊酯的斑马鱼心脏发育相关的基因表达水平 (72 h)

Fig. 7 Expression levels of genes associated with cardiac development in zebrafish exposed to meperfluthrin (72 h)

2.4 氯氟醚菊酯对斑马鱼仔鱼血管的毒性

2.4.1 氯氟醚菊酯对斑马鱼心脏部位血管发育的影响 采用 6 hpf 的转基因斑马鱼胚胎进行药剂暴露, 发现与对照相比, 经 0.2、0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的

氯氟醚菊酯处理的斑马鱼仔鱼心脏部位的血管发育不完全 (图 8), 说明氯氟醚菊酯会导致斑马鱼仔鱼心脏的血管出现发育缺陷。

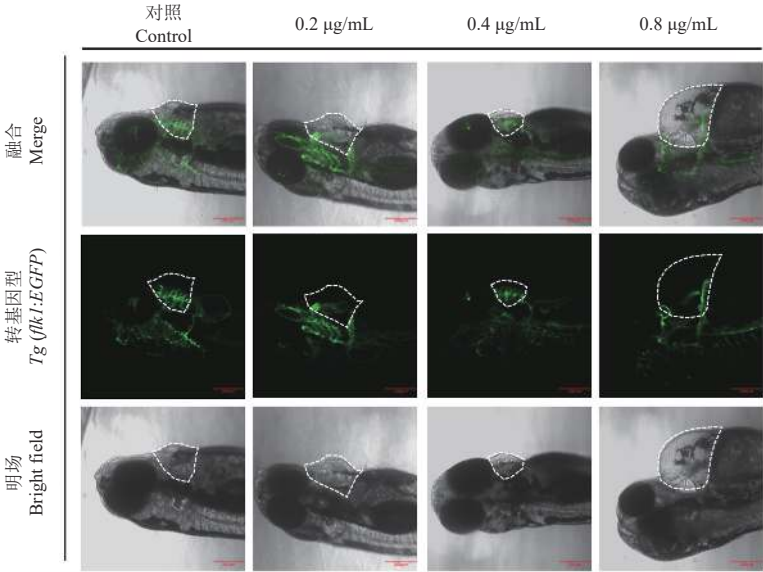


图 8 氯氟醚菊酯暴露对斑马鱼仔鱼心脏血管发育的影响

Fig. 8 Effect of meperfluthrin exposure on zebrafish larvae cardiac vascular development

2.4.2 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼肠下静脉发育缺陷 将经药剂处理 72 h 的斑马鱼仔鱼置于玻璃皿中, 于共聚焦显微镜下采集图像。结果表明, 与对照相比, 处理组的肠下静脉排列杂乱, 分布不均匀 (图 9)。说明 0.2、0.4 和 0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氟醚菊酯处理胚胎 72 h 后引起了斑马鱼肠下静脉发育异常。

2.5 氯氟醚菊酯对斑马鱼的氧化应激效应

2.5.1 氯氟醚菊酯诱导斑马鱼心脏产生 ROS 本研

究结果表明, 与对照相比, 氯氟醚菊酯处理组诱导了斑马鱼仔鱼心脏处 ROS 产生, 并且这种现象呈现剂量依赖性 (图 10A 和 10B), 说明氯氟醚菊酯诱导斑马鱼的心脏毒性可能是通过氧化应激这一途径。

2.5.2 氯氟醚菊酯对 MDA 含量的影响 6 hpf 的斑马鱼胚胎在不同质量浓度的氯氟醚菊酯中暴露 72 h 后, 与对照组相比, 0.2、0.4、0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的

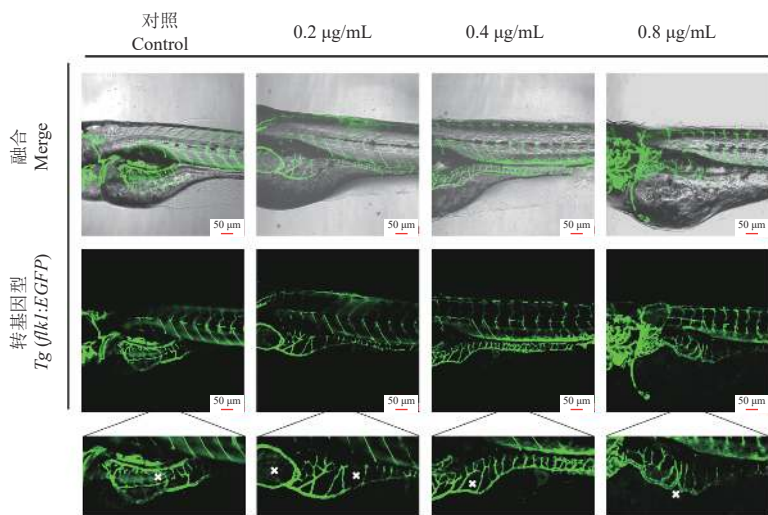


图9 氯氟醚菊酯诱导对斑马鱼肠下静脉的影响 (72 h)

Fig. 9 Effect of meperfluthrin induction on zebrafish subintestinal veins (72 h)

暴露组中斑马鱼仔鱼的MDA含量均显著增加(P 均 ≤ 0.05) (图10C), 说明氯氟醚菊酯促进了斑马鱼体内MDA的产生, 可能引起其的氧化应激效应。

2.5.3 氯氟醚菊酯对抗氧化防御系统相关酶的影响 经过72 h的氯氟醚菊酯暴露后, 与对照组相比, 0.4和0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的暴露组中3种酶的活性均显著下降, 其中最高浓度处理组的SOD和GSH-Px的酶活性分别仅占对照组的29.87%和44.36% (图10D), 说明氯氟醚菊酯暴露引起了斑马鱼抗氧化防御系统的崩溃, 使得过量的ROS无法被清除而导致氧化损伤。

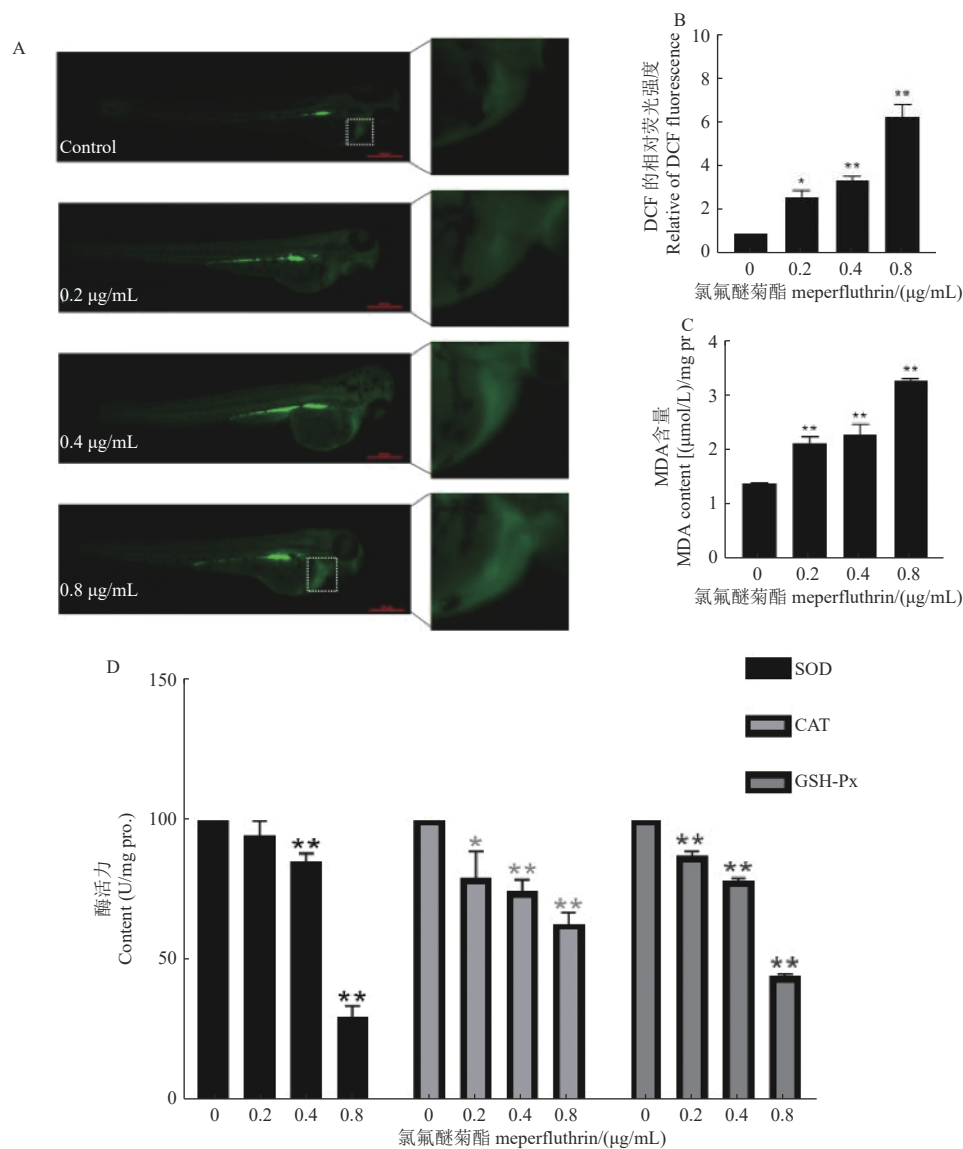
3 结论与讨论

氯氟醚菊酯是目前市场上销量最大的卫生用杀虫剂品种之一, 它的环境安全风险受到了广泛关注。本研究通过研究氯氟醚菊酯急性暴露对斑马鱼胚胎发育的影响, 尤其是对其心血管系统发育的影响, 评价了氯氟醚菊酯的环境安全风险和毒理学特征。

斑马鱼的胚胎期是其生命周期中最重要的时期之一, 早期发育过程相对快速且容易观察^[21]。将斑马鱼胚胎暴露于四溴菊酯, 发现四溴菊酯会导致斑马鱼的心血管发育异常和红细胞生成障碍等, 同时胚胎还发生了氧化应激现象^[22]。本研究结果表明, 暴露于氯氟醚菊酯的斑马鱼胚胎出现了不同程度的畸形 (图2A), 在0.4和0.8 $\mu\text{g/mL}$ 的氯氟醚菊酯下暴露72 h的斑马鱼畸形特征尤为显著, 并且卵黄囊水肿的畸形率最高 (图2B)。这

可能是因为卵黄囊是由蛋白质和脂质组成的透明囊泡, 是为斑马鱼的早期发育提供营养和支持的, 其在受精卵形成后不久就开始退化变薄, 蛋白质和脂质逐渐被胚胎吸收和利用, 此时卵黄囊对外界污染物的抵抗能力下降, 更易遭受氯氟醚菊酯的胁迫。此外, 氯氟醚菊酯的暴露会造成斑马鱼胚胎及仔鱼的早期发育毒性, 如心率变化、体长变短、头眼发育缺陷等, 这可能导致斑马鱼对外界刺激的反应受损。

斑马鱼已被广泛用作研究心脏发育、评估心脏结构和功能、探索毒性机制以及进行药物筛选等研究的可信赖的模式生物^[23]。Park等的研究表明, 卫生用菊酯类杀虫剂联苯菊酯对斑马鱼胚胎最显著的病理诱导特征是心脏水肿^[24]。SV-BA间距可反映斑马鱼心房和心室的位置变化, 通过在体式显微镜下测量SV-BA间距可判断受试化合物对心脏的影响^[25]。与对照相比, 暴露于氯氟醚菊酯72 h的斑马鱼仔鱼心脏的SV-BA间距显著增大, 心房心室出现明显分化, 这可能是由于氯氟醚菊酯诱导斑马鱼心脏发育异常, 导致心腔变形, 从而引起压力改变, 使得SV-BA间距受到影响。心脏形态学结果显示, 暴露于氯氟醚菊酯的斑马鱼仔鱼的心包面积与对照相比也显著增加 (图4、图5B)。myl7、myh6、vmhc分别调节心肌收缩、维持心肌结构和推动血液泵出, 共同确保斑马鱼心脏的正常功能和循环系统的稳定^[26]。在心脏分化过程中, 早在14节段期就可以在前侧板中胚层中观察到肌球蛋白基因的表达, 并且在少数细胞中开始表达myl7, 它与肌球蛋白重链 (如



A、B. 氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎心脏 ROS 产生的影响；C. 氯氟醚菊酯诱导对斑马鱼体内 MDA 含量的影响；D. 氯氟醚菊酯诱导对斑马鱼抗氧化防御系统中酶含量的影响

A, B. Effects of meperfluthrin on ROS production in zebrafish embryonic heart; C. Effect of meperfluthrin induction on MDA content in zebrafish *in vivo*; D. Effect of meperfluthrin induction on enzyme content in the zebrafish antioxidant defense system

图 10 氯氟醚菊酯对斑马鱼氧化应激的影响 (72 h)

Fig. 10 Effect of meperfluthrin on oxidative stress in zebrafish (72 h)

myh6) 相互作用, 形成心肌纤维的骨架^[27]。*vmhc* 主要参与心肌的收缩过程, 推动血液从心室排出^[28]。这 3 种基因的表达失调说明斑马鱼的心肌细胞在氯氟醚菊酯诱导后功能受损(图 7), 这可能与观察到的心脏缺陷和心包水肿有关。这些结果表明, 氯氟醚菊酯分别从发育、结构和功能等方面对斑马鱼的心脏造成了严重损伤。

有研究表明, 联苯菊酯可通过抑制斑马鱼胚胎发育过程中的血管生成而抑制器官发育, 其机制可能与肠道氧化应激和炎症反应有关^[24]。本研究结果表明, 氯氟醚菊酯可诱导斑马鱼心脏部位的血管发育异常(图 8), 这说明氯氟醚菊酯暴露可

能影响了斑马鱼血管的运输功能, 导致心脏无法正常供血, 进而影响心脏发育。这可能也是氯氟醚菊酯引起斑马鱼心脏毒性的原因之一, 并且这一毒性可能是通过氧化应激实现的。斑马鱼的肠下静脉在胚胎发育中涉及到血液循环、营养吸收、免疫功能和器官发育等功能, 氯氟醚菊酯的暴露影响了肠下静脉的均匀排列, 与对照相比静脉血管出现分支, 排列杂乱(图 9), 说明氯氟醚菊酯诱导斑马鱼产生了不可逆的血管毒性, 对其进行研究有助于深入了解与斑马鱼胚胎发育相关的疾病和畸形的形成机制^[29]。

拟除虫菊酯类杀虫剂, 如氯氟醚菊酯可能会增

加活性氧的产生，影响抗氧化酶的活性，从而导致氧化应激，引起细胞内的炎症反应，进而导致代谢紊乱等^[30-31]。氧化应激是导致机体组织产生病理表现的关键因素，心血管、肝脏等疾病都与活性氧 (ROS) 密切相关^[32]。ROS 是重要的细胞信号分子，但过量的 ROS 产生可能会导致氧化应激和细胞损伤，导致不可逆转的细胞凋亡和死亡^[33]。同时氧化应激可诱导细胞脂质过氧化，破坏细胞膜的完整性，产生具有高活性的 MDA^[34]，这可能影响细胞内的信号传递，导致细胞凋亡、氧化应激和 DNA 损伤等不良效应^[35]，而鱼类的抗氧化防御机制用来对抗氧化应激和脂质过氧化。有研究称，家用菊酯类杀虫剂炔丙菊酯和四氟苯菊酯等均能诱导斑马鱼抗氧化酶的变化，增加脂质过氧化和氢过氧化物^[36]。本研究也表明，氯氟醚菊酯诱导斑马鱼心脏部位产生了过量的 ROS (图 10A)，同时 SOD、CAT、GSH-Px 等抗氧化酶的活性也因药物作用而减少 (图 10B)，MDA 含量显著增加 (图 10C)，这导致了氧化应激的加剧，使细胞遭受不可逆转的损伤，最终影响器官和组织的功能。

本研究使用斑马鱼为模型对氯氟醚菊酯的毒理学效应进行了探究。结果表明，氯氟醚菊酯对斑马鱼胚胎的 72 h-LC₅₀ 值为 0.756 μg/mL；氯氟醚菊酯急性暴露引起了斑马鱼胚胎及仔鱼的发育毒性 (心率变缓、孵化率降低、头眼发育缺陷、体长缩短) 和器官畸形 (心包水肿、卵黄囊肿大、脊柱和尾部弯曲)；心血管毒性 (心脏线性化、SV-BA 间距增大、心房和心室分化、血管发育不完全) 和氧化应激效应 (ROS 产生过量，MDA 含量增加，抗氧化酶活性降低)。本研究揭示了卫生杀虫剂氯氟醚菊酯的环境风险及毒性效应，初步阐明了氯氟醚菊酯诱导斑马鱼胚胎及仔鱼心脏毒性发生的潜在机制；研究结果增进了氯氟醚菊酯的毒理学认识，有利于促进环境友好型卫生杀虫剂的开发和使用。

参考文献 (References):

[1] CHRUSTEK A, HOLYŃSKA-IWAN I, OLSZEWSKA-SŁONINA D. Wpływ pyretroidów: permetryny, deltametny, *alfa*-cypermetryny na stres oksydacyjny [J]. *Postępy Higieny i Medycyny Doświadczalnej*, 2021, 75(1): 229-237.

[2] 游飞明. 蚊香中 4 种新型菊酯类有效成分分析方法[J]. *农药*, 2010, 49(11): 819-821.

YOU F M. Analysis method for four novel pyrethroids effective components in mosquito-repellent incense[J]. *Agrochemicals*, 2010,

49(11): 819-821.

[3] PIERRE M. Evaluation of the acute toxicity of a mosquito coil based-meperfluthrin [J/OL]. *MOJ Toxicol*, 2017, 3(7): 00076. <https://www.researchgate.net/publication/321757409>.

[4] ABDRABOUH A. Toxicological and histopathological alterations in the heart of young and adult albino rats exposed to mosquito coil smoke[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2023, 30(40): 93070-93087.

[5] YANAGIHARA T, NAKAGAWA T, FUKUSHIMA T, et al. Acute pneumonitis associated with the inhalation of pyrethroid-based domestic insecticides[J/OL]. *Cureus*, 2023, 15(8): e43200. <https://www.cureus.com/users/548271-akiko-ishimatsu>.

[6] LOU Q, ZHANG S, ZHENG S, et al. A case report of brain and lung injury caused by mistakenly taking mosquito repellent liquid contains meperfluthrin [J]. *Environ Sci Pollut R*, 2020, Preprint.

[7] LI Z Q, WU X J, LV G M, et al. Paediatric lung injury due to accidental ingestion of meperfluthrin: a case report[J]. *BMC Pediatr*, 2022, 22(1): 43.

[8] BERTOTTO L B, RICHARDS J, GAN J, et al. Effects of bifenthrin exposure on the estrogenic and dopaminergic pathways in zebrafish embryos and juveniles[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2018, 37(1): 236-246.

[9] GUPTA P, MAHAPATRA A, SUMAN A, et al. *In silico* and *in vivo* assessment of developmental toxicity, oxidative stress response & Na⁺/K⁺-ATPase activity in zebrafish embryos exposed to cypermethrin[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 251: 114547.

[10] LI M, LIU X Y, FENG X Z. Cardiovascular toxicity and anxiety-like behavior induced by deltamethrin in zebrafish (*Danio rerio*) larvae[J]. *Chemosphere*, 2019, 219: 155-164.

[11] LU J L, WU Q, YANG Q, et al. Molecular mechanism of reproductive toxicity induced by *beta*-cypermethrin in zebrafish[J]. *Comp Biochem Physiol C*, 2021, 239: 108894.

[12] LI B H, SUN C L, LIN X Y, et al. The emerging role of gsnor in oxidative stress regulation[J]. *Trends Plant Sci*, 2021, 26(2): 156-168.

[13] LU J, WANG W G, XU W P, et al. Induction of developmental toxicity and cardiotoxicity in zebrafish embryos by emamectin benzoate through oxidative stress[J]. *Sci Total Environ*, 2022, 825: 154040.

[14] JACOBS P J, OOSTHUIZEN M K, MITCHELL C, et al. Oxidative stress in response to heat stress in wild caught Namaqua rock mice, *Micaelamys namaquensis*[J]. *J Therm Biol*, 2021, 98: 102958.

[15] LEE K H, CHA M, LEE B H. Crosstalk between neuron and glial cells in oxidative injury and neuroprotection[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(24): 13315.

[16] SREE KUMAR H, WISNER A S, REFSNIDER J M, et al. Small fish, big discoveries: zebrafish shed light on microbial biomarkers for neuro-immune-cardiovascular health[J]. *Front Physiol*, 2023, 14: 1186645.

[17] WANG H L, MENG Z, ZHOU L Q, et al. Effects of acetochlor on neurogenesis and behaviour in zebrafish at early developmental stages[J]. *Chemosphere*, 2019, 220: 954-964.

[18] 盛众, 陈家乐, 王斌杰, 等. 伏杀硫磷对斑马鱼心脏发育毒性及氧化损伤机制[J]. *中国环境科学*, 2023, 43(4): 1957-1966.

SHENG Z, CHEN J L, WANG B J, et al. Cardiotoxicity and oxidative damage of phosalone exposure on zebrafish embryos[J]. *China Environ Sci*, 2023, 43(4): 1957-1966.

[19] DUAN F F, LI H, LU H Q. *In vivo* and molecular docking studies of the pathological mechanism underlying adriamycin cardiotoxicity[J].

[Ecotoxicol Environ Saf](#), 2023, 256: 114778.

[20] HUANG M M, JIAO J J, WANG J, et al. Exposure to acrylamide induces cardiac developmental toxicity in zebrafish during cardiogenesis[J]. [Environ Pollut](#), 2018, 234: 656-666.

[21] HOU Y Y, LIU X X, QIN Y L, et al. Zebrafish as model organisms for toxicological evaluations in the field of food science[J]. [Compr Rev Food Sci Food Saf](#), 2023, 22(5): 3481-3505.

[22] GUO S S, WU Y Q, LI W H, et al. Tralomethrin causes cardiovascular toxicity in zebrafish (*Danio rerio*) embryos[J]. [Environ Toxicol](#), 2023, 38(11): 2761-2771.

[23] NARUMANCHI S, WANG H, PERTTUNEN S, et al. Zebrafish heart failure models[J]. [Front Cell Dev Biol](#), 2021, 9: 662583.

[24] PARK S, LEE J Y, PARK H, et al. Bifenthrin induces developmental immunotoxicity and vascular malformation during zebrafish embryogenesis[J]. [Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol](#), 2020, 228: 108671.

[25] HOU W T, ZHONG J, XIAO C X, et al. Using a zebrafish xenograft tumor model to compare the efficacy and safety of VEGFR-TKIs[J]. [J Cancer Res Clin Oncol](#), 2023, 149(9): 5975-5987.

[26] YANG M Y, LUAN J L, XU Y X, et al. Cardiotoxicity of zebrafish induced by 6-benzylaminopurine exposure and its mechanism[J]. [Int J Mol Sci](#), 2022, 23(15): 8438.

[27] PERUMAL E, ESWARAN S, PARVIN R, et al. Mitigation of arsenic induced developmental cardiotoxicity by ferulic acid in zebrafish[J]. [Comp Biochem Physiol C](#), 2021, 244: 109021.

[28] LI M F, YU T T, LAI J L, et al. Ethoprophos induces cardiac toxicity in zebrafish embryos[J]. [Ecotoxicol Environ Saf](#), 2021, 228: 113029.

[29] 杜孟姣, 陈坚平, 余嘉贤, 等. 基于斑马鱼模型的知母皂苷 B II 的血管保护作用及机制研究[J]. [中国药房](#), 2020, 31(7): 811-815.

DU M J, CHEN J P, YU J X, et al. Study on vascular protection effect and mechanism of timosaponin B II based on zebrafish model[J]. [China Pharm](#), 2020, 31(7): 811-815.

[30] SHI X G, GU A H, JI G X, et al. Developmental toxicity of cypermethrin in embryo-larval stages of zebrafish[J]. [Chemosphere](#), 2011, 85(6): 1010-1016.

[31] LI J, SUN B X, WANG D L, et al. Melatonin ameliorates cypermethrin-induced impairments by regulating oxidative stress, DNA damage and apoptosis in porcine Sertoli cells[J]. [Theriogenology](#), 2021, 167: 67-76.

[32] PATEL M Y, STOVALL K, FRANKLIN J L. The intrinsic apoptotic pathway lies upstream of oxidative stress in multiple organs[J]. [Free Radic Biol Med](#), 2020, 158: 13-19.

[33] LI J J, PAN L M, PAN W, et al. Recent progress of oxidative stress associated biomarker detection[J]. [Chem Commun](#), 2023, 59(48): 7361-7374.

[34] SUWANNACHOT P, THAWORNCHINSOMBUT S, JONGJAR-EONRAK A, et al. Supplementation with rice bran hydrolysates reduces oxidative stress and improves lipid profiles in adult dogs[J]. [J Vet Med Sci](#), 2023, 85(7): 727-734.

[35] ZHANG J A, CHEN Q Y, WANG Y A, et al. Protective effects of feruloyl oligosaccharides from fermented wheat bran against oxidative stress in IPEC-J2 cells *in vitro* and in a zebrafish model *in vivo*[J]. [J Food Qual](#), 2022, 2022: 1-11.

[36] TAMAGNO W A, ALVES C, POMPERMAIER A, et al. Transfluthrin- and prallethrin-based insecticides elicit specific enzymatic antioxidant responses in different tissue of zebrafish[J]. [Environ Pollut](#), 2023, 327: 121530.

(责任编辑: 金淑惠)