

GAO T F, LI M M, KONG Z Q, et al. 2021. Enantioselective developmental toxicity of chiral cyflumetofen to zebrafish embryos. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 41(2): 680-688.

高腾飞, 李敏敏, 孔志强, 等. 2021. 手性农药丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的选择性发育毒性[J]. *环境科学学报*, 41(2): 680-688.

GAO T F, LI M M, KONG Z Q, et al. 2021. Enantioselective developmental toxicity of chiral cyflumetofen to zebrafish embryos[J]. *Acta Scientiae Circumstantiae*, 41(2): 680-688.

手性农药丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的选择性发育毒性 [PDF全文]

高腾飞¹, 李敏敏^{1,3}, 孔志强², 王瑞¹, 全蕊¹, 张嘉¹, 李瑞瑾¹, 叶丰¹, Frédéric Francis³, 王凤忠¹, 范蓓¹

摘要：近年来丁氟螨酯（CYF）对非靶标生物的开发毒性已成为一个值得关注的问题，但其对水生生物的对映选择性效应尚不清晰。为评估丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的对映选择性毒性，通过96 h的暴露试验，研究了梯度浓度的丁氟螨酯消旋体及对映体对斑马鱼胚胎的急性毒性。此外，试验还研究了丁氟螨酯对斑马鱼胚胎孵化率、卵黄囊水肿、心包囊水肿和身体弯曲的影响。根据急性毒性结果可知，毒性大小为S-CYF > Rac-CYF > R-CYF，其中S-CYF的毒性是R-CYF的2.3倍。72 hpf，500 mg·L⁻¹的S-CYF可显著诱导胚胎产生卵黄囊水肿（YSE）、体轴弯曲（CB）等畸形效应（ $p < 0.05$ ），而Rac-CYF降低了斑马鱼胚胎的孵化成功率。在本研究中发育毒性效应结果与急性毒性结果一致，均为S-CYF > Rac-CYF > R-CYF，表明丁氟螨酯对斑马鱼胚胎存在显著的对映选择性发育毒性，研究结果为丁氟螨酯的环境风险评估提供了理论依据。

关键词：丁氟螨酯 斑马鱼 急性毒性 发育毒性 对映选择性毒性

Enantioselective developmental toxicity of chiral cyflumetofen to zebrafish embryos

GAO Tengfei¹, LI Minmin^{1,3}, KONG Zhiqiang², WANG Rui¹, QUAN Rui¹, ZHANG Jia¹, LI Ruixing¹, YE Feng¹, Frédéric Francis³, WANG Fengzhong¹, FAN Bei¹

Abstract: Although the developmental toxicity of cyflumetofen (CYF) to non-target organisms has become a significant concern in recent years, its enantioselective effects on aquatic organisms are poorly understood. To evaluate the enantioselective toxicity of CYF on zebrafish, zebrafish embryos were exposed to a series of isometric concentrations of two CYF enantiomers and the CYF racemate (Rac) for 96 h. In addition, the effect of three compounds on hatching rate, yolk sac edema, pericardial edema, and curved body axis were investigated. According to the acute toxicity results, S-CYF and Rac-CYF were higher than R-CYF, the toxicity of S-CYF was 2.3 times higher than R-CYF. At 500 mg·L⁻¹, and the S-CYF could significantly induce developmental abnormalities including yolk sac edema, pericardial edema, curved body axis ($p < 0.05$) at 72 hpf, while only the Rac-CYF could decrease the hatching rate. It's been noticeable a regulation was apparent in this study, the developmental toxicity was consistent with acute toxicity (S-CYF > Rac-CYF > R-CYF). This work demonstrated the obvious of enantioselectivity in developmental toxicity of CYF to zebrafish embryos, which could be considered in environmental risk assessment.

Keywords: Cyflumetofen (CYF) Zebrafish acute toxicity developmental toxicity enantioselective toxicity

1 引言(Introduction)

农药作为农业生产活动不可或缺的生产物资被广泛使用，但农药毒性问题一直是国际关注的焦点。农药致癌性(Xu *et al.*, 2018)、神经毒性(Xiang *et al.*, 2019)、生殖毒性(Dong *et al.*, 2013)和代谢毒性(Wang *et al.*, 2018)等问题严重威胁人类健康。丁氟螨酯(Cyflumetofen, CYF)作为一种含氟的新型手性杀螨剂，主要用于对柑橘、蔬菜上的红蜘蛛、有害螨类的防治。因其高效无交互抗性，在我国大量使用。通过Wang等(2016)、李敏敏(2013)的模拟实验发现，当田间喷施丁氟螨酯后，其很容易在水环境中生成代谢产物。Wang等(2016)对东北湖泊、湖南水田、北京上庄水库3种

不同的水-沉积物系统中的丁氟螨酯进行检测, 在有氧条件下测得其原始沉积量分别为9.89、10.03、10.12 mg · kg⁻¹, 半衰期分别为15.4、16.9、15.1 d.在厌氧条件下原始沉积量分别为9.97、10.06、11.05 mg · kg⁻¹, 半衰期分别为16.5、17.3、16.1 d. Wang等研究发现, 从1 d开始, 丁氟螨酯在沉积物中降解为B-1, 而在水中主要降解为B-3, 最后丁氟螨酯完全转化成B-1和B-3. 李敏敏(2013)对北京地下水中的丁氟螨酯进行检测, 原始沉积量为5.0 mg · kg⁻¹时, 半衰期为3.1 d.虽然丁氟螨酯因易在水环境中发生降解生成有毒代谢产物已被欧盟禁止使用, 但目前丁氟螨酯在我国依然广泛使用.同时, 丁氟螨酯作为一种手性农药, 关于其对映体间的毒性差异尚未明确, 因此, 系统深入研究丁氟螨酯对映体间的生物毒性差异将为后续开发手性农药单体提供科学的数据支撑.然而有关对映体水平丁氟螨酯水生毒性研究的资料较少, 多数研究还是集中在消旋体毒性、生物活性和检测方法上(Li *et al.*, 2012 ; Li *et al.*, 2013 ; 胡选祥等, 2014; Pavlidi *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Guo *et al.*, 2018; Wei *et al.*, 2019; Feng *et al.*, 2019).有研究表明, 含氟的手性农药大多具有对映选择性毒性. Xu等(2008)发现氟氟菊酯对斑马鱼的急性毒性左旋体是右旋体的162倍. 1*S*-联苯菊酯(1*S*-BF)显著上调斑马鱼神经毒性相关基因的表达, 导致较1*R*-BF具有更高的神经毒性(Xiang *et al.*, 2019).因此使用外消旋体评估手性农药的环境风险并不准确.

在丁氟螨酯的手性研究中, Sun等(2016)从对映体水平上对丁氟螨酯进行了研究, 其对人肝癌细胞的毒性大小为*S*-CYF>*Rac*-CYF>*R*-CYF, 其中*S*-CYF的毒性约为*R*-CYF的2倍.目前关于手性农药丁氟螨酯对映体间水生生物毒性的研究尚未见报道, 水生生物因生存环境复杂且与人类生活息息相关, 其毒性评估更能揭示农药的潜在毒性, 尤其对生殖发育系统的毒性越来越受到重视.斑马鱼基因与人类基因高度同源, 在发育初期, 脊椎动物之间更是具有很强的相似性, 因此其发育毒性往往代表了整个水生环境中脊椎动物的生态毒性研究结果.斑马鱼胚胎作为毒性研究的模式生物, 在手性农药毒性研究中起着至关重要的作用.研究发现暴露于手性农药茚虫威的斑马鱼胚胎, (-)-*R*-茚虫威会导致明显的致死和畸形效应(Fan *et al.*, 2017), 从而产生了更大的发育毒性.而金美青(2010)研究发现, 拟除虫菊酯代谢产物具有比母体化合物更大的发育毒性.因此, 利用斑马鱼作为模式生物研究手性农药丁氟螨酯选择性发育毒性, 为评估生物体的生存环境安全提供了理论依据.本研究以斑马鱼胚胎为模型, 从对映体水平研究暴露于*Rac*-CYF、*S*-CYF和*R*-CYF的斑马鱼胚胎的发育毒性, 为制定更加完善的环境评价标准提供理论依据.

2 材料与方法(Materials and methods)2.1 药物和仪器

丁氟螨酯消旋体(*Rac*-CYF, 纯度>98%), 购自北京华威锐科化工有限公司; 丁氟螨酯对映体(*S*-CYF和*R*-CYF, 纯度>98%), 由大赛璐药物手性(上海)技术公司制备; 色谱纯级二甲基亚砜(DMSO), 购买于北京拜尔迪生物技术有限公司; 二十四孔板, 购买自上海生工生物工程股份有限公司.

2.2 斑马鱼的饲养

购买于上海费曦公司的野生型的AB品系斑马鱼.在本实验室条件下饲养和繁殖, 直至产卵稳定, 死亡率 < 1%.雌、雄鱼分开饲喂, 每天保持14 h的光照和10 h的黑暗时间.水温为(28 ± 0.5) °C.自来水需经过除杂、除氯、净化和紫外消毒处理等过程后才进入养殖系统, 同时在水中添加质量浓度均为1 kg/10 L的NaCl和NaHCO₃, 电导率为500~550 μS · cm⁻¹, pH为7.0 ~7.6.成鱼每日分别在上午9: 00—10: 00和下午16: 00—17: 00喂食一次新孵化的盐水虾.

2.3 斑马鱼的交配与收卵

在交配产卵的前一天晚上, 关灯前2 h, 选择发育良好, 游动活跃的亲鱼, 将雌鱼和雄鱼以1 : 1的比例置于有隔板的产卵缸内.第二天开灯后抽开隔板, 30 min后收集鱼卵.将产卵缸中的鱼卵收集到准备好的培养皿中后.再将胚胎转移到恒温的光照培养箱中, 等胚胎发育到3 hpf(3 hours post-fertilization), 用吸管在体式显微镜下将无畸形且正常发育的胚胎挑选出进行急性毒性和发育毒性实验.

2.4 胚胎急性毒性实验

胚胎毒性实验在OECD(2013)的基础上进行了改进.实验共设置1个DMSO溶剂对照组、1个空白对照组和5个药液处理组.用DMSO作助溶剂配制浓度为 $10000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的Rac-CYF、S-CYF、R-CYF标准储备液,其中助溶剂DMSO浓度不超过0.1%.在前期实验基础上,用胚胎培养液Holt缓冲液逐级稀释配成不同浓度处理药液,其中Rac-CYF对斑马鱼胚胎的急性毒性实验浓度为156.25、312.5、625、1250、2500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.S-CYF对斑马鱼胚胎的急性毒性实验浓度为62.5、125、250、500、1000 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.R-CYF对斑马鱼胚胎的急性毒性实验浓度156.25、312.5、625、1250、2500 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$.每组20个胚胎,所有实验均进行3次生物学重复($n=3$).将发育至3 hpf的胚胎转移到24孔板内,每孔1个胚胎和2 mL的Rac-CYF、S-, R-CYF溶液.将24孔板放在培养箱中进行培养并且保持14 h/10 h的明/暗恒温循环,每个胚胎间隔24 h更换1/2体积的丁氟螨酯药液.在此实验条件下的胚胎发育至96 hpf时停止丁氟螨酯药液处理.

2.5 死亡、畸形与孵化胚胎数量统计

对于在药液处理过程中的斑马鱼胚胎,用显微镜观察胚胎在早期发育过程中出现的孵化和死亡情况以及出现的畸形现象,当心脏停止跳动,认定胚胎为死亡胚胎.对统计的实验结果按照以下公式进行计算:死亡率(%)=死亡胚胎数/胚胎总数(20) $\times 100$,孵化率=成功孵化的受精卵数/受精卵总数(20) $\times 100$,畸形率=畸形胚胎数/胚胎存活数量 $\times 100$.

2.6 数据统计与分析

使用概率单位法计算急性毒性实验的 LC_{50} 值.利用Origin 8.0软件进行数据绘图,同时采用单因素方差分析判断数据之间是否存在显著差异.本实验中所有数值均为平均值 \pm 标准误差,当 $p < 0.05$ 时表示具有统计学意义.

3 结果与讨论(Results and discussion)

3.1 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的急性毒性结果

研究结果发现,空白对照组和DMSO溶剂对照组在胚胎毒性实验中所涉及到的检测指标均无显著性差异,因此本研究中所出现的对照组均为DMSO溶剂对照.急性毒性结果如表1所示,Rac-CYF、S-CYF、R-CYF对斑马鱼胚胎的 LC_{50} 值分别为655.07、294.04、669.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,毒性大小为S-CYF>Rac-CYF>R-CYF,S-CYF对斑马鱼胚胎的毒性是Rac-CYF的2.3倍,是R-CYF的2.27倍.本文结果与Sun等(2016)研究的丁氟螨酯对人肝癌细胞毒性结果相吻合.由表2可知,当 LC_{50} 的浓度大于10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,判定为低毒农药.根据本实验中的丁氟螨酯消旋体及对映体的 LC_{50} 值,可知丁氟螨酯消旋体及对映体对斑马鱼胚胎均为低毒农药,虽然S-CYF较Rac-CYF和R-CYF两种农药毒性大,但并未改变S-CYF的急性毒性等级.在Ullah等(2011)研究的丁氟螨酯对靶标生物螨虫的生物活性实验中,发现 LC_{50} 为388 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$,略高于由S-CYF引起的50%斑马鱼胚胎死亡率(294.04 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),显著低于R-CYF(669.70 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)和Rac-CYF(655.07 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$),说明丁氟螨酯在对靶标生物螨虫具有杀虫活性的同时,对非靶标生物也具有毒害作用,且与Rac-CYF相比,S-CYF会引起更大的毒性效应.

表 1 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的急性毒性 LC_{50} (96 h) Table 1 The LC_{50} (96 h) of CYF to zebrafish embryos

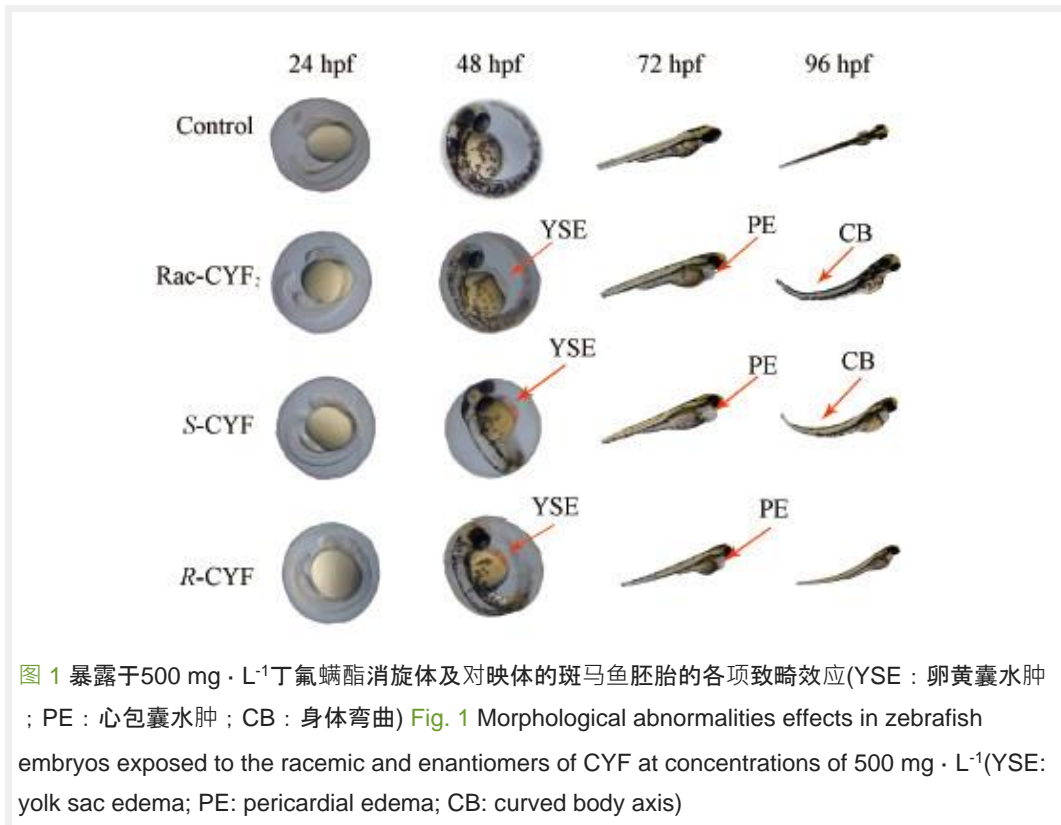
农药名称	LD50 (mg/kg)	急性毒性等级	慢性毒性等级	备注
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸

表 2 农药对鱼类的急性毒性等级标准划分 Table 2 Acute toxicity evaluation and grading of pesticides to *B. rerio*

农药名称	LD50 (mg/kg)	急性毒性等级	慢性毒性等级	备注
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸
1,1'-Bi(2-naphthyl)ethane	150	II	III	强致畸

3.2 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的致畸效应

由图 1可知, 丁氟螨酯消旋体和对映体对斑马鱼胚胎都产生了明显的致畸效应. 500 mg · L⁻¹的S-CYF不仅在72 hpf导致了严重的心包囊水肿, 心包囊水肿率为68.47%.在96 hpf也有轻微的心包囊水肿现象出现, 心包囊水肿率为12.3%. R-CYF在96 hpf对斑马鱼胚胎有轻微的身体弯曲现象, 身体弯曲率为15.47%.因为畸形胚胎出现的频率和强度关系到最终的胚胎毒性结果, 所以选择合适的毒性终点是十分重要的. 96 hpf存活率、自主运动频率、体轴弯曲等常作为毒性指标去评估斑马鱼的发育毒性(Nagel *et al.*, 2002).为了方便观察与统计, 本研究选择了4个主要的时间节点(24 hpf自主运动、48 hpf卵黄囊水肿率、72 hpf心包囊水肿率、96 hpf孵化率及存活率)进行观察.当浓度为500 mg · L⁻¹时, S-CYF在48 hpf引起的卵黄囊水肿率为91.40%, R-CYF为34.90%, 在48 hpf的卵黄囊水肿率S-CYF是R-CYF的2.62倍. S-CYF和R-CYF在72 hpf引起的心包囊水肿率分别为68.47%、25.10%, 由S-CYF引起的心包囊水肿率约为R-CYF导致的心包囊水肿率的2.73倍. S-CYF和R-CYF引起的身体弯曲率分别28.90%、15.47%, S-CYF引起的身体弯曲率是R-CYF的1.87倍.而在Jin等(2010)研究的BF对斑马鱼胚胎的形态异常实验中, 在测试的早期直至72 hpf之前, 未检测到对映异构体的明显作用, 即使在实验最高测试浓度(300 µg · L⁻¹)下, 1S-BF在暴露96 h后也没有出现明显的症状.综上所述, 与联苯菊酯等农药相比并通过本文的实验结果, 表明丁氟螨酯消旋体及对映体对斑马鱼胚胎的发育均具有一定的致畸作用.



3.3 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的孵化成功率的影响

正常发育的胚胎, 在48 hpf开始孵化, 一般到96 hpf基本孵化完全(王蕊等, 2004).在梯度浓度丁氟螨酯对斑马鱼胚胎孵化率统计的研究中, 在48 hpf(图 2 a), 与对照组相比, 低浓度(50 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的R-CYF, S-CYF加快了斑马鱼胚胎的孵化.在48 hpf暴露浓度为 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, S-CYF, R-CYF对胚胎的孵化率均为6.67%, 暴露于 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的S-CYF的胚胎孵化率为11.67%.随着发育进行, 各组胚胎孵化率逐渐增加.胚胎在72 hpf基本发育完全(图 2 b), 对照组胚胎的孵化率为86.67%, 但Rac-CYF、S-CYF和R-CYF组胚胎孵化成功率小于对照组($p < 0.05$).胚胎发育至96 hpf时, 对照组、S-CYF和R-CYF组处理的斑马鱼胚胎已孵化完全, 对照组胚胎的孵化率为97.67%, 而暴露于高浓度($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)Rac-CYF组(图 2 c)的胚胎孵化率分别为63.33%和43.33%.对暴露96 h的胚胎存活情况进行统计(图 2 d), 发现在96 hpf经高浓度($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)Rac-CYF处理的胚胎存活率分别为83.33%和65.00%, 表明与对照组相比高浓度($300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)的Rac-CYF延迟了斑马鱼胚胎的孵化, 延迟率分别为20%和21.67%.

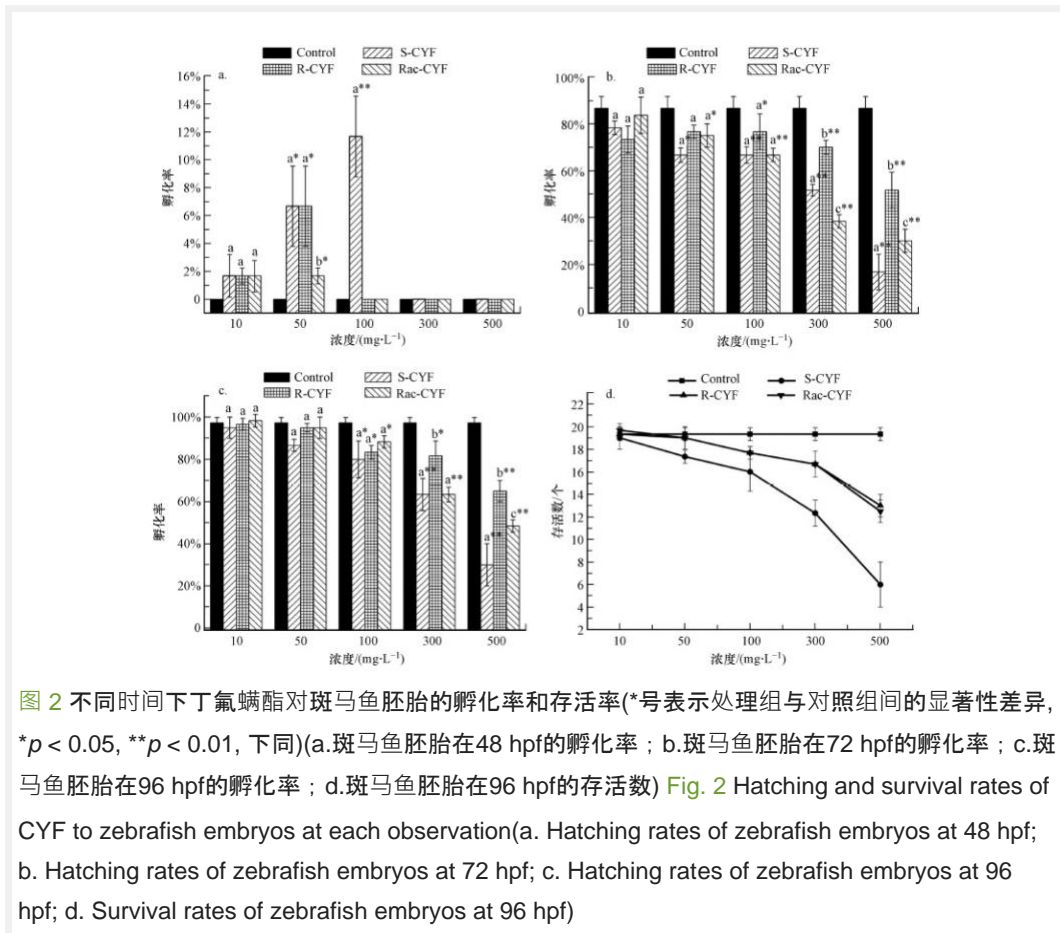


图 2 不同时间下丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的孵化率和存活率(*号表示处理组与对照组间的显著性差异, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, 下同)(a.斑马鱼胚胎在48 hpf的孵化率; b.斑马鱼胚胎在72 hpf的孵化率; c.斑马鱼胚胎在96 hpf的孵化率; d.斑马鱼胚胎在96 hpf的存活数) Fig. 2 Hatching and survival rates of CYF to zebrafish embryos at each observation(a. Hatching rates of zebrafish embryos at 48 hpf; b. Hatching rates of zebrafish embryos at 72 hpf; c. Hatching rates of zebrafish embryos at 96 hpf; d. Survival rates of zebrafish embryos at 96 hpf)

孵化不仅是胚胎发育的关键时期,也是毒性反应的一个重要终点,在此期间生化、机械力等共同作用于胚胎的孵化过程(Martinez-Sales *et al.*, 2015).在对斑马鱼胚胎孵化率下降的机制研究中,Zhou等(2009)发现杀螟丹是通过阻断孵化酶的分泌,从而导致斑马鱼胚胎孵化率下降.前期有研究发现某些环境内分泌干扰物如联苯菊酯等可能通过雌激素干扰等机制影响胚胎发育(Döhler *et al.*, 1998; Jin *et al.*, 2009).根据EFSA(2016)的报告,Rac-CYF可能存在潜在的内分泌干扰作用.因此暴露于高浓度Rac-CYF的斑马鱼胚胎孵化延迟,可能是潜在的内分泌干扰作用使胚胎自身的发育受到抑制.而50、100 mg·L⁻¹的S-CYF和R-CYF促进孵化可能是斑马鱼胚胎对丁氟螨酯对映体具有毒物兴奋效应,但影响孵化的具体机制还需进一步的研究.

3.4 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎卵黄囊水肿的影响

对卵黄囊水肿出现频率进行统计分析,发现在48 hpf,在500 mg·L⁻¹的S-CYF处理下,斑马鱼胚胎卵黄囊水肿现象最为明显(图 3),卵黄囊水肿率高达91.40%.由图 3可知,经S-CYF、Rac-CYF处理的胚胎,与对照组相比呈显著性差异($p < 0.05$).并且卵黄囊水肿率随着Rac-CYF、S-CYF、R-CYF浓度的升高而增加,从50 mg·L⁻¹开始,S-CYF和R-CYF之间存在对映选择性.在经两种对映体处理的最高浓度(500 mg·L⁻¹)下,S-CYF和R-CYF引起的卵黄囊水肿率分别为91.40%和34.90%,表现为S构型诱导效应大于R构型,由S-CYF引起的卵黄囊水肿率约为R-CYF导致的卵黄囊水肿率的2.62倍.

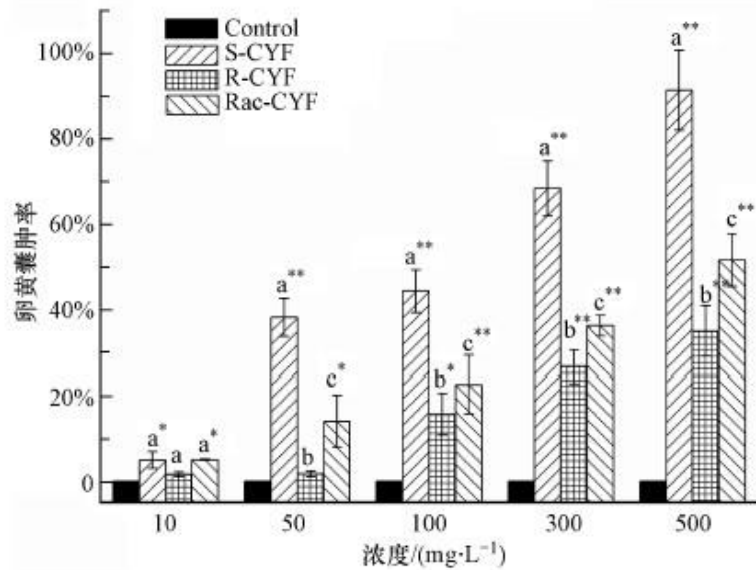


图 3 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎在48 hpf的卵黄囊水肿率 Fig. 3 Yolk sac edema rate of CYF to zebrafish embryos at 48 hpf

卵黄囊水肿作为一个重要的毒性指标,在发育毒性评估中发挥着重要的作用.在动物代谢、生存和生长发育过程中,甲状腺激素(THs)发挥着关键作用(Power *et al.*, 2001; Tu *et al.*, 2016).如Xu等(2019)对暴露于手性农药乙草胺(Aceto chlor, ACT)的斑马鱼胚胎的发育毒性及毒性机制进行了研究,发现手性农药乙草胺对胚胎卵黄囊水肿的毒性大小为(+)-S-ACT>(±)-rac- ACT>(-)-R-ACT.对其毒性机制进行研究,发现手性农药乙草胺对斑马鱼胚胎体内甲状腺激素合成异常的毒性大小为(+)-S-ACT>(-)-R-ACT.且已有研究证明,氟可通过影响斑马鱼中下丘脑-垂体-甲状腺轴(hypothalamic-pituitary-thyroid axis, HPT)中的基因表达来干扰甲状腺激素的合成从而影响胚胎发育(郭文静等, 2019).因此在本研究中,暴露于Rac-CYF和S- CYF, R-CYF的斑马鱼胚胎出现的卵黄囊水肿现象,可能是丁氟螨酯通过干扰甲状腺激素的合成从而导致了胚胎的发育畸形,且对甲状腺激素的毒性效应大小可能为S-CYF>Rac-CYF>R-CYF.

3.5 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎心包囊水肿的影响

心包囊水肿是斑马鱼胚胎发育过程中另一个重要的毒性指标.暴露于Rac-CYF、S-, R-CYF的斑马鱼胚胎,在10 mg · L⁻¹时,未出现心包囊水肿.在50 mg · L⁻¹时,丁氟螨酯导致斑马鱼胚胎有轻微的卵黄囊水肿现象出现, S-CYF、Rac-CYF和R-CYF导致的心包囊水肿率分别为3.70%、1.77%、1.67%, S-CYF与对照组呈显著性差异($p < 0.05$).随着浓度的增加,心包囊水肿率逐渐增加,在最高浓度(500 mg · L⁻¹)处理下, S-CYF和R-CYF引起的心包囊水肿率分别为68.47%、25.10%,由S-CYF引起的心包囊水肿率约为R-CYF的2.73倍,呈现显著的对映选择性差异($p < 0.05$).

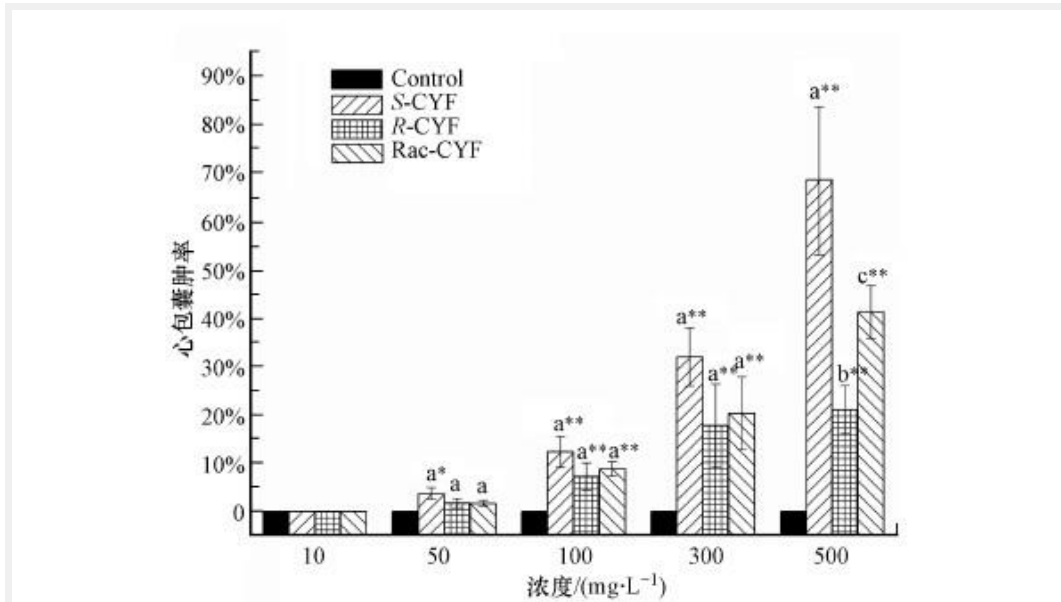
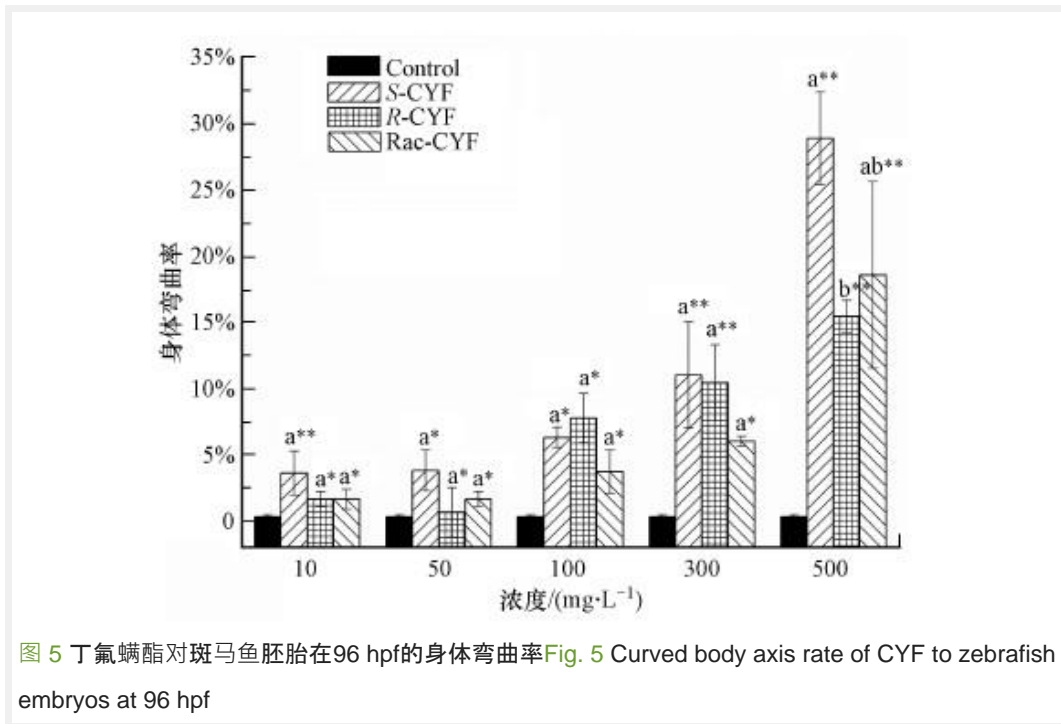


图 4 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎在 72 hpf 的心包囊肿率 Fig. 4 Pericardial edema rate of CYF to zebrafish embryos at 72 hpf

侯佳(2008)研究发现视磺酸缺乏除了会导致卵黄囊肿大外,还会导致胚胎心包囊肿大. Mu等(2016)对出现心包囊肿大的胚胎进行研究,发现苯醚甲环唑显著上调了与视磺酸代谢有关的基因表达,推测心包囊肿大可能与视磺酸代谢基因表达异常有关.线粒体为心脏的正常工作提供能量,如果线粒体能量供应不足,心脏的正常工作就会受到影响(Kodde *et al.*, 2007).心脏的作用是推动血液循环,循环系统提供了机体中其它器官所需的氧气和各种营养物质,故血液的正常循环在机体各种器官的正常发育中显得尤为重要(cha *et al.*, 2007; Swift *et al.*, 2009).当血管供血不足,导致机体发育异常,常会引起心包囊肿(Billiard *et al.*, 1999).已有研究证明,丁氟螨酯的作用机制主要为抑制线粒体的合成从而达到杀虫效果(Hayashi *et al.*, 2013).因此本研究中产生的心包囊肿水肿现象,可能是由于丁氟螨酯抑制了线粒体合成,从而影响血液的正常循环,最终导致斑马鱼胚胎产生心包囊肿水肿.

3.6 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎身体弯曲的影响

图 5 结果显示,暴露于丁氟螨酯的斑马鱼胚胎,在 10 mg · L⁻¹时, S-CYF、R-CYF 和 Rac-CYF 引起的身体弯曲率分别为 3.63%、1.66%、1.70%,与对照组相比呈显著性差异($p < 0.05$).随着浓度的增加,因丁氟螨酯消旋体及对映体暴露导致的身体弯曲率逐渐增加.在最高浓度(500 mg · L⁻¹)处理下, S-CYF 与 R-CYF 之间存在对映选择性差异($p < 0.05$). S-CYF 和 R-CYF 引起的身体弯曲率分别为 28.90%、15.47%, S-CYF 引起的身体弯曲率是 R-CYF 的 1.87 倍,表现为 S 诱导大于 R.



身体弯曲是斑马鱼胚胎毒性实验中出现的毒性反应.许多有毒物质如联苯菊酯(Jin *et al.*, 2009)、氯菊酯(Jin *et al.*, 2009)等都会引起体轴弯曲.当斑马鱼脊椎骨原件产生畸变或体轴部位肌肉组织受到损坏都会导致身体弯曲.因此本研究中出现的体轴弯曲现象,可能是由于暴露于Rac-CYF和S-CYF, R-CYF的斑马鱼胚胎肌肉或神经系统发育受到损伤造成的.

3.7 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎自主运动次数的影响

研究发现,胚胎发育到24 hpf,发育正常的胚胎会出现有规律的自主运动.研究表明(图 6),随着药液浓度的增加,暴露于S-CYF和R-CYF的斑马鱼胚胎在1 min内的自主运动次数显著降低,与对照组相比均呈显著性差异($p < 0.05$),但在试验浓度范围内对映体之间无显著性差异.暴露于浓度为500 mg · L⁻¹的Rac-CYF的斑马鱼胚胎,自主运动次数增加,但低于对照组的运动频率.

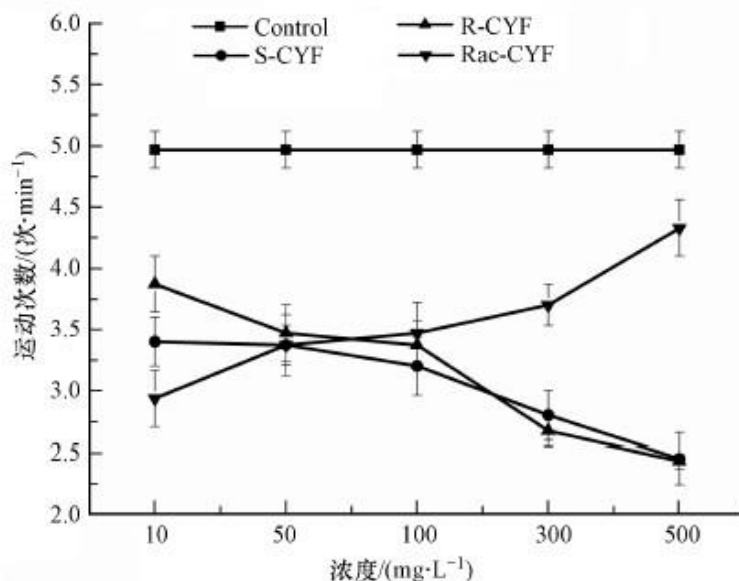


图 6 丁氟螨酯对斑马鱼胚胎24 hpf自主运动的影响 Fig. 6 Effects of CYF on spontaneous movement frequency of zebrafish embryos at 24 hpf

当斑马鱼运动神经系统尚未发育成熟时,会出现自主运动表现异常的现象(Drapeau *et al.*, 2002).研究发现斑马鱼胚胎的自主运动次数与处理药液的浓度有关.如暴露于 $0.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的啮菌酯药液(穆希岩等, 2016)、高浓度氟霉素(刘曦薇等, 2010)、 β -氟氰菊酯(徐永学等, 2013)的斑马鱼胚胎,在高浓度处理下自主运动次数增加. Jin等(2010)研究了联苯菊酯对斑马鱼胚胎自主运动的对映选择性差异,结果表明1S-BF降低了自主运动次数,但1R-BF却加速了自主运动.已有研究证明拟除虫菊酯类农药是通过干扰中枢神经系统的钠离子通道,从而对目标生物产生神经毒性.因此,作者推测斑马鱼胚胎自主运动次数的升高或降低可能是由于农药对神经系统产生毒性引起的.赵海洲等(2017)利用人神经母细胞瘤细胞(SH-SY5Y)模型,发现丁氟螨酯具有神经毒性.在本文中,当Rac-CYF、S-CYF、R-CYF的浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,与对照组相比,斑马鱼胚胎在24 hpf的自主运动次数分别是对照组的1.15、2.02、2.1倍.因此推测与对照组相比,经Rac-CYF处理的胚胎随浓度的升高自主运动次数增加,而S-CYF和R-CYF导致的胚胎随浓度的升高自主运动次数降低可能是由于农药对神经系统的选择性毒性引起的.但具体机理还有待进一步探究.

从胚胎到出膜孵化成幼鱼时期是斑马鱼胚胎发育的关键阶段,在此期间,许多组织和器官开始分化和发育并逐渐成熟.在整个染毒过程中,卵黄囊水肿在48 hpf时表现的最为明显,丁氟螨酯消旋体及对映体在48 hpf诱导胚胎产生的卵黄囊肿率均随药液浓度的升高而增加, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的S-CYF导致的卵黄囊水肿率高达91.40%.从 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 开始,S-CYF和R-CYF对卵黄囊肿大存在对映选择性差异,表现为S-CYF的畸形效应大于R-CYF.随胚胎发育时间的推移,在60 hpf腹部肿大现象开始出现,并在72 hpf达到最大值.在处理组 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 中,开始出现心包囊水肿现象($p < 0.05$),在 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处理下,S-CYF和R-CYF存在对映选择性,表现为S-CYF诱导大于R-CYF.但在孵化成功率方面S-CYF、R-CYF和Rac-CYF存在着截然不同的影响, $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的S-CYF和 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的R-CYF能够促进孵化而 $300 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的Rac-CYF延迟孵化.对S-CYF和R-CYF导致的体轴弯曲率进行分析,发现在 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,对映体间存在显著性差异($p < 0.05$),S-CYF对体轴弯曲的诱导大于R-CYF.丁氟螨酯对斑马鱼胚胎的毒性实验结果表明,当浓度为 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时对映体之间在畸形毒性方面均存在显著性差异($p < 0.05$),并表现出和急性毒性相类似的毒性规律,即S-CYF>R-CYF.

4 结论(Conclusions)

1) 96 h胚胎急性毒性实验结果表明,在斑马鱼胚胎中,从24 hpf开始,丁氟螨酯消旋体及对映体均能引起胚胎产生致死效应,96 h的 LC_{50} : S-CYF(294 mg · L⁻¹) > Rac-CYF(655 mg · L⁻¹) > R-CYF(669 mg · L⁻¹).因此丁氟螨酯作为手性农药,其对映选择性毒性值得关注.

2) 丁氟螨酯消旋体及对映体的胚胎毒性实验结果表明,在斑马鱼从胚胎发育成幼鱼期间,Rac-CYF、S-CYF和R-CYF会对胚胎发育造成毒害作用,包括自主运动次数减少、卵黄囊肿大、心包囊肿大等毒性现象,其中S-CYF的毒性远大于R-CYF,并表现出一致的对映选择性.因此手性农药丁氟螨酯对斑马鱼早期的发育毒性应受到重视.

参考文献

- d S M, Querbach K, Hodson P V. 1999. Toxicity of retene to early life stages of two freshwater fish species[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 18(9): 2070-2077. DOI:10.1002/etc.5620180927
- Cha Y R, Weinstein B M. 2007. Visualization and experimental analysis of blood vessel formation using transgenic zebrafish[J]. *Birth Defects Research. Part C, Embryo Today:Reviews*, 81(4): 286-296. DOI:10.1002/bdrc.20103
- Döhler K D. 1998. Influence of hormones and hormone antagonists on sexual differentiation of the brain[J]. *Archives of Toxicology*, 20: 131-141.
- Dong F, Li J, Chankvetadze B, *et al.* 2013. Chiral triazole fungicide difenoconazole: absolute stereochemistry, stereoselective bioactivity, aquatic toxicity, and environmental behavior in vegetables and soil[J]. *Environmental Science & Technology*, 47(7): 3386-3394.
- Drapeau P, Saint-Amant L, Buss R R, *et al.* 2002. Development of the locomotor network in zebrafish[J]. *Progress in Neurobiology*, 68(2): 85-111. DOI:10.1016/S0301-0082(02)00075-8
- EFSA (European Food Safety Authority). 2016. Conclusion on the peer review of the pesticide risk assessment for the active substance cyflumetofen in light of confirmatory data[J]. *EFSA Journal*, 14(12): 4635.
- Feng K, Yang Y, Wen X, *et al.* 2019. Stability of cyflumetofen resistance in *Tetranychus cinnabarinus* and its correlation with glutathione-S-transferase gene expression[J]. *Pest Management Science*, 75(10): 2802-2809. DOI:10.1002/ps.5392
- Fan Y, Feng Q, Lai K, *et al.* 2017. Toxic effects of indoxacarb enantiomers on the embryonic development and induction of apoptosis in zebrafish larvae (*Danio rerio*)[J]. *Environmental Toxicology*, 32(1/2): 7-16.
- Guo J, Li M, Liu Y, *et al.* 2018. Residue and dietary risk assessment of chiral cyflumetofen in apple[J]. *Molecules*, 23(5): 1060. DOI:10.3390/molecules23051060
- 郭文静, 王天玉, 薛文娟, 等. 2019. 氟对斑马鱼甲状腺内分泌功能的干扰效应[J]. *环境科学学报*, 39(4): 1340-1347.
- Hayashi N, Sasama Y, Takahashi N, *et al.* 2013. Cyflumetofen, a novel acaricide - its mode of action and selectivity[J]. *Pest Management Science*, 69(9): 1080-1084. DOI:10.1002/ps.3470
- 侯佳. 2008. 视黄酸缺乏对斑马鱼心脏发育影响的机制研究[D]. 上海: 复旦大学
- 胡选祥, 邵美红, 洪文英, 等. 2014. 丁氟螨酯在草莓中的残留消解动态及安全性评价[J]. *浙江农业学报*, 26(6): 1558-1563. DOI:10.3969/j.issn.1004-1524.2014.06.27
- Jin M, Zhang X, Wang L, *et al.* 2009. Developmental toxicity of bifenthrin in embryo-larval stages of zebrafish[J]. *Aquatic Toxicology*, 95(4): 347-354. DOI:10.1016/j.aquatox.2009.10.003
- Jin M, Zhang Y, Ye J, *et al.* 2010. Dual enantioselective effect of the insecticide bifenthrin on locomotor behavior and development in embryonic-larval zebrafish[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 29(7): 1561-1567. DOI:10.1002/etc.190

- Jin Y, Chen R, Sun L, *et al.* 2009. Enantioselective induction of estrogen-responsive gene expression by permethrin enantiomers in embryo-larval zebrafish[J]. *Chemosphere*, 74(9): 1238-1244. DOI:10.1016/j.chemosphere.2008.11.015
- 金美青. 2010. 典型手性农药拟除虫菊酯及其代谢产物对斑马鱼的发育毒性研究[D]. 杭州: 浙江大学
- Kodde I F, Stok J V D, Smolenski R T, *et al.* 2007. Metabolic and genetic regulation of cardiac energy substrate preference[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology. Part A, Molecular & Integrative Physiology*, 146(1): 26-39.
- Li M, Liu X, Dong F, *et al.* 2012. Determination of cyflumetofen residue in water, soil, and fruits by modified quick, easy, cheap, effective, rugged, and safe method coupled to gas chromatography/tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 35(20): 2743-2749. DOI:10.1002/jssc.201200349
- Li M, Liu X, Dong F, *et al.* 2013. Simultaneous determination of cyflumetofen and its main metabolite residues in samples of plant and animal origin using multi-walled carbon nanotubes in dispersive solid-phase extraction and ultrahigh performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Chromatography A*, 1300: 95-103. DOI:10.1016/j.chroma.2013.05.052
- Liu N, Dong F, Xu J, *et al.* 2016. Enantioselective separation and pharmacokinetic dissipation of cyflumetofen in field soil by ultra-performance convergence chromatography with tandem mass spectrometry[J]. *Journal of Separation Science*, 39(7): 1363-1370. DOI:10.1002/jssc.201501123
- 李敏敏. 2013. 杀螨剂丁氟螨酯残留分析及环境降解行为研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学
- 刘曦薇, 吴玲玲. 2010. 氟霉素对斑马鱼早期发育的毒性效应[J]. *环境科学报*, 30(8): 1649-1657.
- Martinez-Sales M, García-Ximénez F, Espinós F J. 2015. Zebrafish (*Danio rerio*) as a possible bioindicator of epigenetic factors present in drinking water that may affect reproductive function: is chorion an issue?[J]. *Zygote*, 23(3): 447-452. DOI:10.1017/S0967199414000045
- Mu X, Chai T, Wang K, *et al.* 2016. The developmental effect of difenoconazole on zebrafish embryos: A mechanism research[J]. *Environmental Pollution*, 212: 18-26. DOI:10.1016/j.envpol.2016.01.035
- 穆希岩, 黄瑛, 罗建波, 等. 2017. 通过多阶段暴露试验评价啮菌酯对斑马鱼的急性毒性与发育毒性[J]. *环境科学学报*, 37(3): 1122-1132.
- Nagel R. 2002. DarT: The embryo test with the Zebrafish *Danio rerio* - A general model in ecotoxicology and toxicology[J]. *ALTEX*, 19(Suppl 1): 38-48.
- OECD. 2013. Test No.236: Fish embryo acute toxicity (FET) test[S]. Paris: OECD
- Power D, Llewellyn L, Faustino M, *et al.* 2001. Thyroid hormones in growth and development of fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 130(4): 447-459.
- Pavliidi N, Khalighi M, Myridakis A, *et al.* 2017. A glutathione-S-transferase (TuGSTd05) associated with acaricide resistance in *Tetranychus urticae* directly metabolizes the complex II inhibitor cyflumetofen[J]. *Insect Biochemistry & Molecular Biology*, 80: 101-115.
- Sun D, Pang J, Zhou Z, *et al.* 2016. Enantioselective environmental behavior and cytotoxicity of chiral acaricide cyflumetofen[J]. *Chemosphere*, 161: 167-173. DOI:10.1016/j.chemosphere.2016.06.087
- Swift M R, Weinstein B M. 2009. Arterial-venous specification during development[J]. *Circulation Research*, 104(5): 576-588.
- Tu W, Xu C, Lu B, *et al.* 2016. Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryos[J]. *Science of the Total Environment*, 542: 876-885. DOI:10.1016/j.scitotenv.2015.10.131

- Ullah M S, Moriya D, Kongchuensin M, *et al.* 2011. Comparative toxicity of acaricides to *Tetranychus merganser* Boudreaux and *Tetranychus kanzawai* Kishida (Acari:Tetranychidae)[J]. *International Journal of Acarology*, 37(6): 535-543. DOI:10.1080/01647954.2010.525531
- Wei P, Chen M, Nan C, *et al.* 2019. Downregulation of carboxylesterase contributes to cyflumetofen resistance in *Tetranychus cinnabarinus* (Boisduval)[J]. *Pest Management Science*, 75(8): 2166-2173. DOI:10.1002/ps.5339
- Wang F, Jing G, Li C, *et al.* 2018. Enantioselective bioaccumulation and metabolism of lactofen in zebrafish *Danio rerio* and combined effects with its metabolites[J]. *Chemosphere*, 213: 443-452. DOI:10.1016/j.chemosphere.2018.09.052
- Wang P, Li M, Liu X, *et al.* 2016. Degradation of cyflumetofen and formation of its main metabolites in soils and water/sediment systems[J]. *Environmental Science & Pollution Research International*, 23(22): 23114-23122.
- 王蕊, 殷浩文. 2004. 斑马鱼胚胎发育中适宜的毒理学指标分析[J]. *环境与职业医学*, (2): 88-89.
- Xiang D, Qiao K, Song Z, *et al.* 2019. Enantioselectivity of toxicological responses induced by maternal exposure of cis-bifenthrin enantiomers in zebrafish (*Danio rerio*) larvae[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 371: 655-665. DOI:10.1016/j.jhazmat.2019.03.049
- Xu C, Lin X, Yin S, *et al.* 2018. Enantioselectivity in biotransformation and bioaccumulation processes of typical chiral contaminants[J]. *Environmental Pollution*, 243: 1274-1286. DOI:10.1016/j.envpol.2018.09.095
- Xu C, Sun X, Niu L, *et al.* 2019. Enantioselective thyroid disruption in zebrafish embryo-larvae via exposure to environmental concentrations of the chloroacetamide herbicide acetochlor[J]. *Science of the Total Environment*, 653: 1140-1148. DOI:10.1016/j.scitotenv.2018.11.037
- Xu C, Wang J, Liu W, *et al.* 2008. Separation and aquatic toxicity of enantiomers of the pyrethroid, insecticide lambda-cyhalothrin[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 27(1): 174-181.
- 徐永学, 刘丽丽, 王健, 等. 2013. β -氰氟菊酯对斑马鱼胚胎的发育毒性[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 27(2): 256-262. DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2013.02.022
- Zhou S, Dong Q, Li S, *et al.* 2009. Developmental toxicity of cartap on zebrafish embryos[J]. *Aquatic Toxicology*, 95(4): 339-346. DOI:10.1016/j.aquatox.2009.10.006
- 赵海洲, 陈永星, 李楠, 等. 2017. 丁氟螨酯对SH-SY5Y细胞的毒性作用及其机制[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 31(4): 318-324. DOI:10.3867/j.issn.1000-3002.2017.04.004