

管盛,胡彬,朱浙宁,等.噻菌灵诱导斑马鱼早期发育阶段的心脏毒性研究[J].中国环境科学,2025,45(2):1110-1117.

Guan S, Hu B, Zhu Z N, et al. Thiabendazole-induced cardiac toxicity in early developmental stages of zebrafish [J]. China Environmental Science, 2025,45(2):1110-1117.

噻菌灵诱导斑马鱼早期发育阶段的心脏毒性研究

管盛,胡彬,朱浙宁,王斌杰*,王继业,郑若楠(浙江警察学院刑事科学技术系,浙江省毒品防控技术研究重点实验室,浙江杭州310053)

摘要:以斑马鱼胚胎为研究对象,研究在不同浓度噻菌灵(TBZ)溶液(0.06、0.6和6mg/L)暴露下心脏的发育情况;检测其体内过氧化氢酶(CAT)活性、超氧化物歧化酶(SOD)活性、活性氧(ROS)水平以及心脏发育相关基因的转录水平.结果表明,高浓度的TBZ(6mg/L)暴露诱导斑马鱼胚胎产生严重的心脏毒性,出现心包水肿和心率下降等现象,同时在心脏部位诱发了较强的氧化应激反应,造成大量细胞凋亡,且心脏发育相关基因 *gate4*、*nppa*、*sox9b* 和 *vmhc* 和细胞凋亡相关基因 *bcl2*、*bax*、*puma* 和 *p53* 表达量显著下降.结果表明,TBZ可能通过破坏心脏发育相关基因的正常表达,产生氧化应激反应并诱导细胞凋亡,引发心脏毒性.

关键词: 噻菌灵; 斑马鱼; 心脏毒性; 氧化应激; 细胞凋亡

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)02-1110-08

Thiabendazole-induced cardiac toxicity in early developmental stages of zebrafish. GUAN Sheng, HU Bin, ZHU Zhe-ning, WANG Bin-jie*, WANG Ji-ye, ZHENG Ruo-nan (Key Laboratory of Drug Prevention and Control Technology Research in Zhejiang Province, Department of Criminal Science and Technology, Zhejiang Police College, Hangzhou 310053, China). *China Environmental Science*, 2025,45(2): 1110~1117

Abstract: The development of the heart in zebrafish embryos was examined after exposure to different concentrations of thiabendazole (TBZ) solution (0.06, 0.6, and 6mg/L). The levels of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD), reactive oxygen species (ROS), and the expression of genes related to cardiac development were assessed. The results indicated that exposure to the high concentration of TBZ (6mg/L) caused severe cardiotoxicity, including pericardial edema and a reduced heart rate in zebrafish embryos. This concentration also induced significant oxidative stress in the heart, leading to a large number of apoptotic cells and marked changes in the expression of cardiac development-related genes (*gate4*, *nppa*, *sox9b*, *vmhc*), as well as apoptosis-related genes (*bcl2*, *bax*, *puma*, *p53*). These findings suggested that TBZ induced cardiotoxicity by disrupting the normal expression of genes involved in cardiac development, generating oxidative stress, and triggering apoptosis.

Key words: Thiabendazole; zebrafish; cardiotoxicity; oxidative stress; apoptosis

杀菌剂被广泛用于抑制农业生产中真菌、细菌和寄生虫的生长,能够降低疾病对多种粮食作物的减产风险^[1].然而,杀菌剂不可避免地在水环境中残留,可能通过食物链在水生生物体内蓄积,对水生生物的生长繁殖造成干扰^[2].噻菌灵(TBZ)是一种高效的苯并咪唑类杀真菌剂,可以通过与 β -微管蛋白结合从而抑制真菌有丝分裂,因此常用于水果加工以延长保质期,防止水果腐烂^[3-4].在黄瓜、蜂蜜、蜂蜡等多种农产品中均已检测到TBZ残留^[5-6].

多项研究证明,TBZ在长期暴露或与其他农药联合使用中对啮齿动物和人体的毒性作用,包括肝脏毒性^[7]和致畸性^[8]和儿童过敏反应^[9].TBZ类似的苯并咪唑化合物可以诱导啮齿动物产生自闭症谱系障碍(ASD)行为,引发运动发育、探索行为和学习

行为的改变^[8].此外,苯并咪唑化合物还能够诱导人支气管上皮细胞和神经细胞的氧化应激,导致细胞凋亡^[10].相比其他苯并咪唑杀菌剂,TBZ由于分子结构中的噻唑基团具有较大的空间位阻,抑制其与生物转化酶的结合,降低了TBZ沉积物在环境中的降解速度,因而TBZ具有更高的环境残留风险,能够在土壤中的残留达22周^[11-14].据报道,由于柑桔生产等集约化农业生产,在地中海河流中的噻菌灵的浓度达到34.5 μ g/L^[15].在西班牙Castell'o的城市污水中也检测到平均60 μ g/L的TBZ残留^[16].此外,在其他环境水样,如地表水、地下水和沉积物中也检测到浓

收稿日期: 2024-07-16

基金项目: 浙江省基础公益研究计划项目(LGF20C090001)

* 通讯作者, 副教授, wangbinjie@zjccxy.cn

度从 5.0 到 30.4ng/L 的 TBZ^[17-19]。

斑马鱼(Zebrafish)与人类有 75%的遗传相似性,同时具有胚胎透明、产卵量高、实验周期短、伦理性要求低等优势,被广泛用于环境污染物的风险评估^[20]。现有研究表明,苯并咪唑类化合物暴露在斑马鱼早期发育过程中能够引发骨骼毒性^[21]、肾脏毒性^[22]、心脏毒性^[21]、视觉毒性^[23]和运动行为损伤^[24]。但对于 TBZ 对斑马鱼早期生命阶段的肝脏毒性机制仍没有相关报道。

本文将斑马鱼胚胎暴露在包括环境相关浓度在内的 3 种不同浓度 TBZ 溶液中,以评估环境相关浓度的 TBZ 对斑马鱼早期发育阶段的潜在肝脏毒性,并通过氧化应激、细胞凋亡和相关基因表达证明毒性机制。研究结果旨在更深入地了解 TBZ 杀菌剂对斑马鱼早期生命阶段的肝脏毒性机制,为 TBZ 在环境中的残留危险性提供新的证据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

TBZ(CAS:148-79-8,纯度>98%)购自北京北方伟业计量技术研究院。二甲基亚砜(DMSO)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司,用于配制 TBZ 母液。为确保实验的准确性,将母液储存在 4℃ 环境中,用纯水稀释以控制各组 DMSO 浓度均为 0.01%。吖啶橙(CAS:10127-02-3,纯度>98%)购自索莱宝科技有限公司,CAT、SOD、ROS 和总蛋白(BCA)测定试剂盒均购自中国南京建成生物工程研究所。

1.2 斑马鱼的养殖和采卵

本研究所使用的野生 AB 系购自武汉中国斑马鱼资源中心。成年斑马鱼被饲养在 28℃ 的恒温循环水系统中,控制系统 pH 值在 7±0.2,电导率在(500±100) μS/cm,光照周期为 14h(光):10h(暗)。所有斑马鱼实验经浙江大学实验动物福利与伦理审查委员会批准(伦理批准号:ZJU20210168)。

1.3 TBZ 暴露实验

向六孔板每个孔中放置 30 枚正常发育的受精后 4h(hpf, hours pos-fertilization)斑马鱼胚胎,加入 8mL 浓度分别为 0, 2, 4, 8, 16, 24, 32mg/L 的 TBZ 溶液,每个浓度 3 个重复,每隔 24h 更换一半的溶液,观察并记录死亡率至 120hpf,得到 TBZ 对斑马鱼

120hpf-LC₅₀。根据报道的环境浓度(60μg/L)并参考 120hpf-LC₅₀ 进行梯度设计,每孔分别加入 3mL(0.06,0.6 和 6mg/L)的 TBZ 溶液作为 3 个暴露组,对照组则添加 0.01% DMSO 的胚胎培养液。每个浓度设置 3 次生物学重复。胚胎培养在温度 28℃、光照周期为 14h(光):10h(暗)的恒温培养箱,暴露至 96hpf。期间每天更新 1/2 溶液并及时清除无心跳的死亡斑马鱼。

1.4 发育毒性实验

72hpf 时,通过体视显微镜(Olympus, SZX2)观察并记录胚胎孵化的情况,每组随机统计 10 个胚胎的心率。96hpf 时,统计胚胎死亡率,同时使用体视显微镜随机拍摄每组 10 个胚胎,统计心包面积(mm²)和体长(μm)。

1.5 氧化应激、细胞凋亡分析

96hpf 时,每组随机挑选 10 个胚胎进行 ROS 染色,在 37℃ 黑暗环境中染色 30min 后清洗,通过体视显微镜在蓝色激发光下拍摄。心脏部位 ROS 荧光强度用 ImageJ 软件进行分析,测定各实验组的 ROS 水平。每组随机挑选 30 个胚胎制成组织匀浆,根据说明书测定不同浓度组的氧化应激水平,包括测定 CAT 活性和 SOD 活性。每组随机挑选 10 个胚胎,用吖啶橙(AO)染色检测 96hpf 胚胎的凋亡细胞,吖啶橙可透过细胞膜与细胞核内的双链 DNA 结合产生荧光,导致凋亡的细胞在蓝色激发光下呈现为黄绿色斑点状荧光。

1.6 PCR 分析

96hpf 时,每组随机抽取 30 个胚胎分别进行 3 次实验重复,研磨成组织匀浆,利用 Trizol 试剂(Thermo Fisher, USA)从匀浆中纯化总 RNA,每组 3 个重复。通过超微量紫外分光光度计(Nanodrop 2000)测定总 RNA 浓度。将总 RNA 稀释至 200ng/L 后,使用 PrimeScript™ RT 试剂盒(with gDNA Eraser)对总 RNA 反转录为 cDNA。选取 β-actin 作为参照基因,使用 SYBR Green Master Mix (Thermo Fisher, USA)在 ABI Step One plus RT-PCR 系统(Applied Biosystems, CA, USA)上进行实时定量聚合酶链反应(RT-qPCR)。所有目标基因的特异性引物均由 BLAST 设计与合成(表 1)。通过 2^{-ΔΔCt} 相对定量法,对心脏发育相关基因(*gata4*, *sox9a*, *nppa*, *vmhc*)以及细胞凋亡调控基因(*bcl2*, *bax*, *puma*, *p53*)的 mRNA 表达水平进行了统计学分析。

表 1 用于实时定量聚合酶反应的引物

Table 1 Primers for real-time quantitative PCR

基因名称	引物序列(5'-3')
<i>β-actin</i>	F:AGGTCATCACCATCGGCAAT R:GATGTCACGTCGCACTTCA
<i>gata4</i>	F:GCCGGGATACCGCAACTTAT R:AGTACGGAGCTGTCGAAGTG
<i>nppa</i>	F:GGATTGACACACAGAGAAATCGCC R:TTGCAGCTAACCTTTTTAGAGTTGC
<i>sox9a</i>	F:TGACGAGTTGTTCTCCAGAG R:AGGCCACAGTCTATAACCC
<i>vmhc</i>	F:TGATATCGAGCGAAACTAGCCG R:CTGGATCTCCATCTCATTGAGTGC
<i>bcl2</i>	F:TGGCGTCCAGGTAGATAATATTGC R:CGCAGAGGCTGTCACCTTCTGAGC
<i>bax</i>	F:GCGATACGGGCAGTGGCAATG R:GCGTTTATGGCTGGGGTCACAC
<i>puma</i>	F:TGGAAAGCAGAGTGGACGAA R:GATGGCAGGGCTGGATGA
<i>p53</i>	F:TGCTTGAAGAACAGCCTCAGCCAT R:TATTGAGTCCGGTGAATAAGTGCA

1.7 数据统计与分析

运用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计分析并绘制数据图,并借助非线性回归算法拟合剂量-响应曲线,得到 TBZ 的 120hpf-LC₅₀.采用 Kolmogorov-Smirnov test 进行正态检验.随后采用单因素方差分析法和 Dunnett 多重比较检验分析各组间的差异显著性.数值以均数±标准差表示.与对照组比较,*P* 值小于 0.05 认为有统计学差异(**P*<0.05,***P*<0.01).

2 实验结果

2.1 TBZ 诱发斑马鱼胚胎发育畸形

斑马鱼胚胎暴露在 TBZ 溶液至 120hpf,其 LC₅₀ 为 8.727mg/L,如图 1(a)所示.

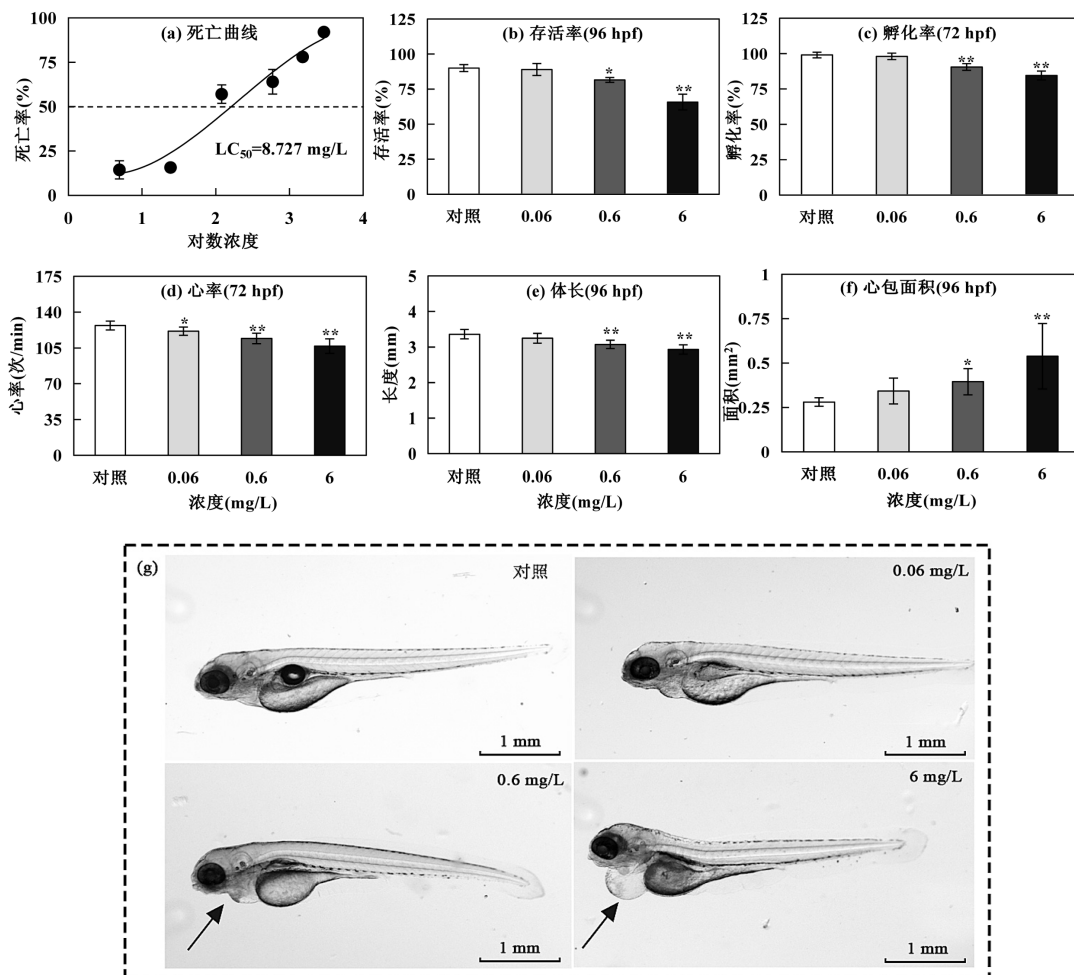


图 1 TBZ 暴露对斑马鱼胚胎发育的影响

Fig.1 Effects of TBZ exposure on zebrafish embryonic development

(a)TBZ 梯度浓度暴露对斑马鱼 120hpf-LC₅₀ 测定; (b)-(f) TBZ 暴露对 96hpf 斑马鱼胚胎存活率、体长和心包面积的影响; (c)-(d) TBZ 暴露对 72hpf 斑马鱼胚胎孵化率和心率的影响; (g) TBZ 暴露对 96hpf 斑马鱼心脏发育的影响

P*<0.05,*P*<0.01 表示与对照组的显著性差异水平,箭头指示心包水肿现象,下同

本实验参考 TBZ 暴露至 120hpf 的斑马鱼 LC_{50} , 根据等比原则设置 TBZ 处理组浓度分别为 0.06, 0.6 和 6mg/L, 对斑马鱼胚胎进行 96hpf 暴露处理. 结果显示, TBZ 暴露后导致斑马鱼胚胎存活率、孵化率下降, 其中 0.6mg/L 和 6mg/L 浓度组跟对照组相比, 存活率分别降低了 18.33% ($P < 0.05$) 和 34.17% ($P < 0.01$), 孵化率分别下降了 9.45% ($P < 0.01$) 和 15.49% ($P < 0.01$), 如图 1(b) 和图 1(c) 所示. 同时, 0.6mg/L 和 6mg/L 浓度组心率和体长皆显著下降 ($P < 0.01$), 如图 1(d) 和 1(e) 所示. TBZ 诱发斑马鱼心脏毒性, 0.6 和 6mg/L 浓度组胚胎心包面积显著增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 如图 1(f) 所示. 结果表明, TBZ 暴露将导致斑马鱼出现体长缩短、心包水肿等发育畸形, 如图 1(g) 所示.

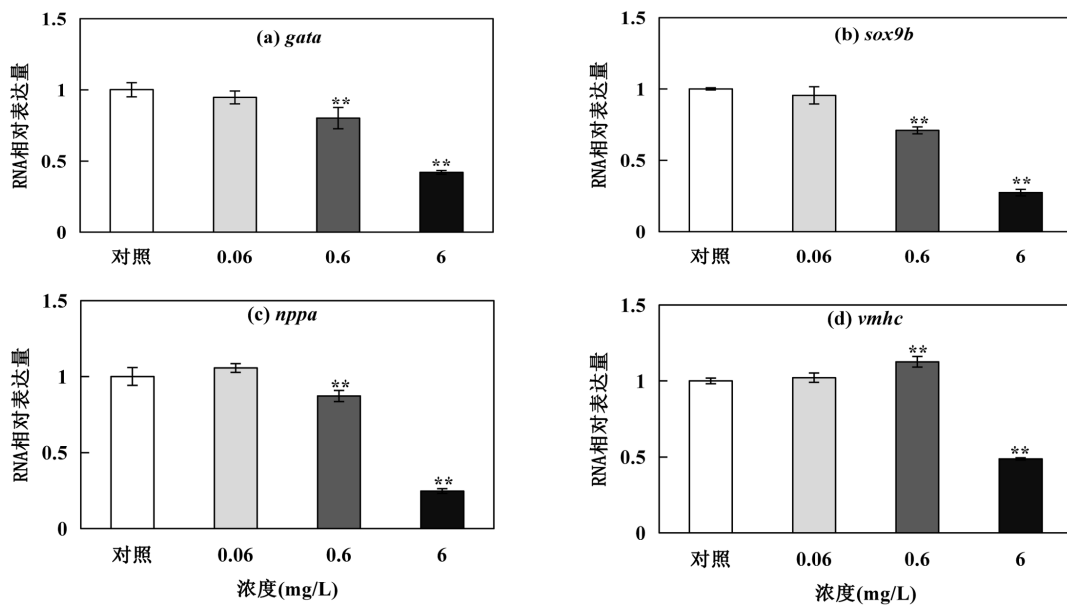


图 2 TBZ 对斑马鱼心脏发育相关基因 mRNA 表达量的影响

Fig.2 Effect of TBZ on mRNA expression of zebrafish heart development related genes

(a)~(d) TBZ 96hpf 暴露下斑马鱼胚胎 *gata*, *sox9b*, *nppa*, *vmhc* 基因的 RNA 相对表达量

2.3 氧化应激水平分析

氧化应激指生物体内氧化与抗氧化作用失衡, 从而引发组织损伤的现象, 是评估农药毒性的重要指标. 96hpf 时, 高浓度组胚胎的心脏区域 ROS 水平明显增加, 呈现出随 TBZ 剂量递增的趋势, 如图 3(a)~(e) 所示. 同时, SOD 活性则呈现出与 TBZ 浓度相反的浓度依赖性降低 ($P < 0.01$), 如图 3(f) 所示. CAT 活性在 0.6 与 6mg/L 的 TBZ 浓度下, 较对照组出现了显著的抑制 ($P < 0.01$), 如图 3(g) 所示. 上述发现揭示

2.2 斑马鱼心脏发育相关基因的表达

为了进一步探究 TBZ 对斑马鱼心脏发育的影响, 本研究对 4 个心脏相关基因的表达进行分析, 结果如图 2 所示. 相比于对照组, 实验组中 *gata4*, *sox9b* 的表达量随浓度升高依赖性降低, 如图 2(a) 和图 2(b) 所示. 其中 *sox9b* 基因在心脏瓣膜、心内膜细胞及动脉球中表达, 对心脏的正常发育至关重要, 其表达量在 0.6mg/L 和 6mg/L 都显著下调 ($P < 0.01$). *nppa* 和 *vmhc* 的表达量随浓度升高先升高后降低, 如图 2(c) 和图 2(d) 所示. 其中 *nppa* 的表达量在 0.6mg/L 和 6mg/L 显著下调 ($P < 0.01$ 和 $P < 0.01$). 斑马鱼心脏早期发育的标志基因 *vmhc* 的表达量在 0.6mg/L 显著上调 ($P < 0.01$), 而在 6mg/L 显著下调 ($P < 0.01$). 结果表明, TBZ 影响胚胎心脏发育过程中的心脏基因表达.

了 TBZ 暴露可能干扰斑马鱼胚胎体内的氧化还原平衡, 诱发心脏部位的氧化损伤.

2.4 斑马鱼细胞凋亡相关基因的表达

为探究 TBZ 是否会诱发细胞凋亡, 用 AO 对各个浓度组 96hpf 胚胎进行染色. 结果表明, 对照组和 0.06mg/L 浓度组并没有出现明显的细胞凋亡现象, 如图 4(a) 和图 4(a'), 图 4(b) 和 4(b') 所示. 0.6mg/L 浓度组出现小范围细胞凋亡, 如图 4(c) 和图 4(c') 所示, 而 6mg/L 浓度组在心脏部分观察到大规模的细胞凋亡,

如图 4(d)和图 4(d')所示.为了更深入探究 TBZ 暴露下心脏细胞凋亡的机制,分析了 4 个与凋亡相关的基因表达.相比对照组,TBZ 暴露组的 *bcl2*,*bax*,*puma*

和 *p53* 基因表达量在 0.6mg/L 和 6mg/L 显著下调 ($P<0.01$),如图 4(e)~(h)所示.结果表明,TBZ 暴露诱发胚胎心脏部位细胞凋亡.

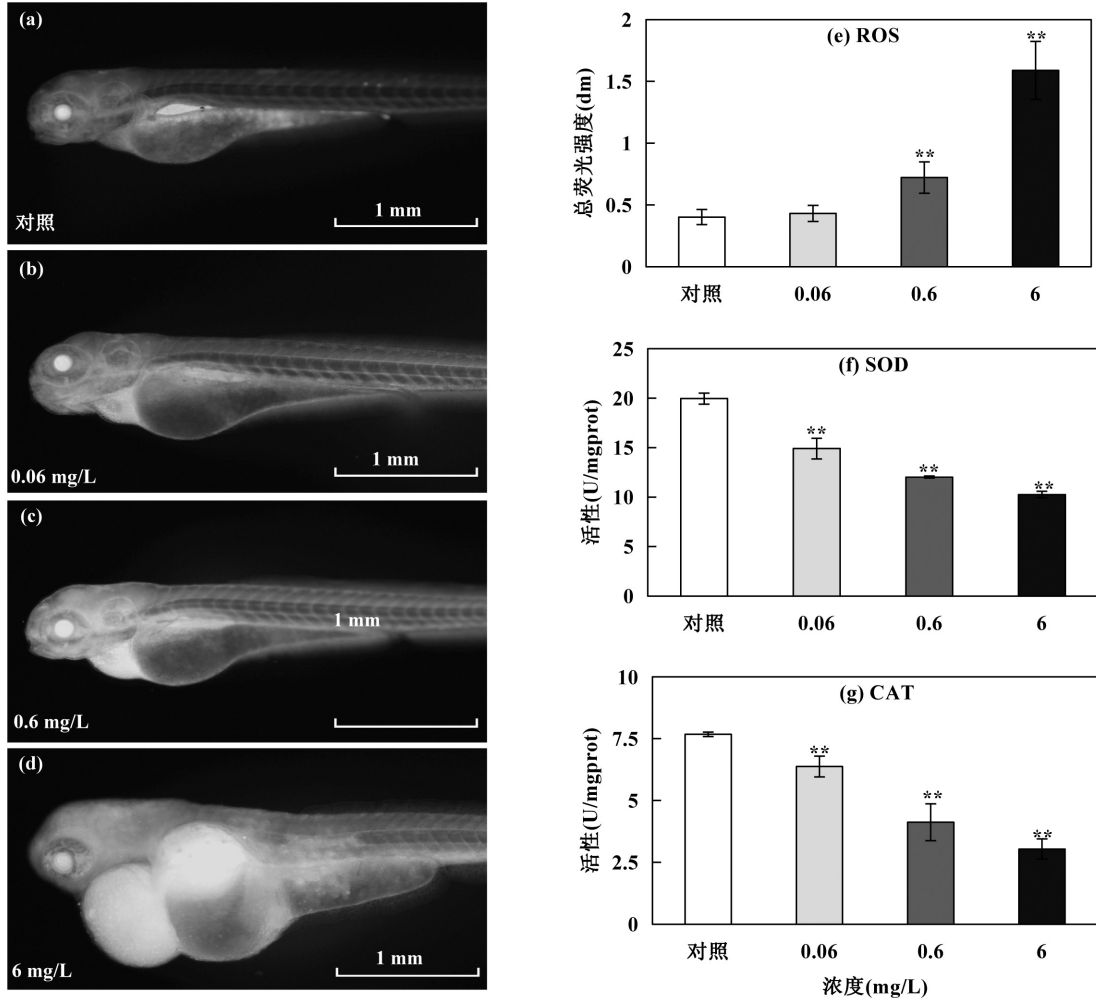
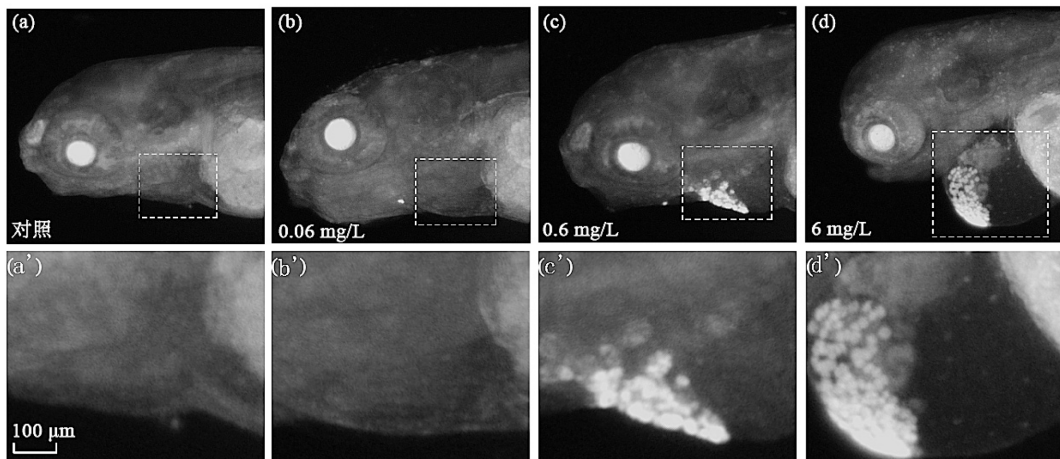


图 3 TBZ 暴露对斑马鱼胚胎氧化平衡的影响

Fig.3 Effects of TBZ exposure on oxidative homeostasis in zebrafish embryos

(a)~(d) TBZ 96hpf 暴露下斑马鱼胚胎的 ROS 染色情况; (e) TBZ 暴露对斑马鱼胚胎 96hpf 心脏部位总荧光强度的影响; (f)~(g) TBZ 暴露对 96hpf 斑马鱼胚胎 SOD 和 CAT 活性的影响



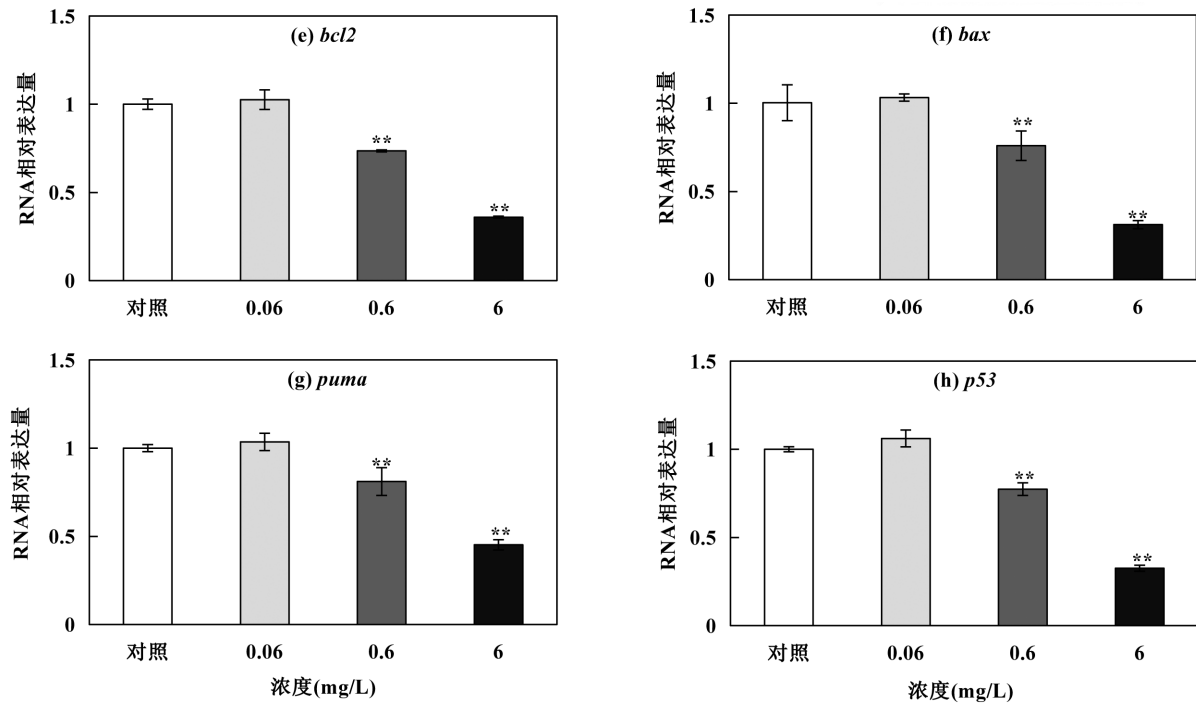


图4 TBZ暴露后心脏吖啶橙染色和对凋亡相关基因 mRNA 表达量的影响

Fig.4 Acridine orange staining of the heart and effect on mRNA expression of apoptosis-related genes after thiram exposure

(a)~(d) TBZ96hpf暴露下斑马鱼胚胎的AO染色情况; (e)~(h) TBZ暴露对96hpf斑马鱼胚胎细胞凋亡调控基因(*bcl2*,*bax*,*puma*,*p53*) mRNA表达量的影响

3 讨论

TBZ 是一种苯并咪唑类杀菌剂^[24],被广泛应用于油菜菌核病、霜霉病和黑腐病的防治.然而,研究表明TBZ在6小时内可以穿透角质层进入植物组织,因此很容易残留在农作物中^[25].同时,TBZ在自然环境中降解速度较慢,导致其在环境中残留和生物积累,引起人们关注其生态环境风险^[26-27].TBZ对水生生物有较强的遗传毒性^[25]、生殖毒性^[26]、肝毒性^[7]、肾毒性^[27],然而对于其引发的发育毒性尚不清楚.本研究中,斑马鱼胚胎被暴露于TBZ溶液中至96hpf,观察到TBZ抑制了胚胎的存活和孵化,诱导斑马鱼产生了发育毒性、心脏毒性、氧化应激和细胞凋亡,并改变相关基因表达.首次利用斑马鱼模型研究环境浓度TBZ对心脏急性毒性的影响,并证实了这种心脏毒性与氧化损伤、细胞凋亡及心脏基因发育异常之间的关联.

暴露于TBZ的斑马鱼胚胎孵化率和存活率降低,并且出现心率降低、体长缩短和心包水肿等发育、心脏畸形表型.Park等^[28]认为TBZ引发了斑马鱼幼体的细胞凋亡、活性氧(ROS)产生和炎症反应,

可能通过改变PI3K/Akt和MAPK信号通路的激活水平对正常器官的损害.我们进一步证明了更低的TBZ暴露可能诱导斑马鱼胚胎心脏发育毒性及机制.心脏发育的过程受许多重要基因和转录因子的调控.*gata4*基因作为心脏发育必不可少的转录因子,它与心肌细胞的重构再生增殖有关^[29-30]; *sox9b*转录调控对心肌细胞的发育是必要的,其突变可导致心室心肌细胞减少,最终导致心力衰竭^[31].暴露在0.6和6mg/L的TBZ溶液的斑马鱼胚胎体内*gata4*和*sox9b*表达量显著下调,说明心肌细胞的重构、再生和增殖过程被破坏,心肌细胞数量减少.胚胎心脏部位出现大量细胞凋亡,这与暴露组胚胎心率下降相关.心室肌球蛋白重链*vmhc*基因被认为是揭示心室细胞谱系的最早心肌标志物.在斑马鱼胚胎发育过程中,*vmhc*的表达模式是确保将心肌前体分为心室和心房亚群^[32-33].相关研究表明,TBZ可能在低浓度会诱导心肌细胞发生代偿性转录变化,通过*vmhc*的补充表达来挽救肌丝结构异常的缺陷,但高浓度时,随着心肌细胞结构的完全破坏,*vmhc*的表达则会下降^[34].心房利钠肽*nppa*基因也是心脏心房和心室工作心肌分化的重要标志^[35],在心血管系统中发挥关

键的多效性作用,如限制心肌细胞肥大和死亡,减少心脏纤维化并促进血管完整性^[36]。本实验中,高浓度暴露组的胚胎都有出现心包水肿现象,并且 *nppa* 基因表达量显著下调。推测 TBZ 诱导的 *nppa* 表达量下调可能是造成心包水肿的原因之一。

在适当的时间点调节细胞凋亡对发育至关重要,因此我们认为不受控制的细胞凋亡是 TBZ 引发心脏毒性的主要原因之一。根据这一假设,我们在 AO 染色实验中发现,0.6 和 6mg/L TBZ 暴露组的斑马鱼胚胎在心脏部位出现了相当程度的凋亡细胞。此外,在对细胞凋亡相关基因相对表达量的测定中发现,TBZ 暴露影响了相关凋亡基因 *bcl2*,*bax*,*puma* 和 *p53* 的表达。*bcl2* 基因在线粒体凋亡途径中起关键调节作用。它通过抑制线粒体细胞色素的释放,在应激期间阻止细胞凋亡^[37-38]。本实验中,*bcl2* 基因表达量在高浓度组显著下调,在一定程度上减弱了凋亡过程中线粒体对于细胞的保护。而 *bax* 基因与之相反,当存在凋亡信号时,*bax* 易位到线粒体外膜,并与其他 *bax* 蛋白形成同源或异源寡聚体通道,线粒体细胞色素释放到细胞质中,促进细胞凋亡^[39]。研究发现 *bax/bcl-2* 两蛋白之间的比例关系影响细胞凋亡抑制作用的强弱^[40]。此外,*p53* 基因也是促细胞凋亡的标志基因之一。在 *p53* 基因缺乏的情况下可明显减少 DNA 的损伤^[41]。*puma* 作为 *p53* 的转录靶点,介导 *p53* 的促调^[42]。同时有研究表明 *puma* 基因通过与促凋亡 *bcl-2* 家族蛋白 *bax* 和 *bak* 的直接相互作用来激活线粒体凋亡,从而构成“激活剂”引发细胞凋亡^[42]。在本研究中,*p53* 和 *puma* 基因的表达量皆在高浓度组显著下调。猜测可能是高浓度 TBZ 诱发大量细胞凋亡,机体为保持平衡,通过抑制作为转录靶点的 *puma* 基因的表达,使 *p53* 基因表达量下调,同时可以达到抑制 *bax* 和 *bak* 的直接相互作用的目的,从而减弱细胞凋亡程度。

氧化应激是导致细胞凋亡的一个重要原因,它可以激活调控细胞凋亡的基因 *p53* 和凋亡蛋白酶激活因子 1(Apaf-1)之间的相互作用,是评估农药毒性的重要指标。本实验以此来探究 TBZ 对斑马鱼胚胎心脏毒性和氧化损伤之间的关联机制。实验发现,高浓度 TBZ 暴露后胚胎心脏部位 ROS 水平增加,可能诱导 DNA 损伤,这是常见先天性心脏缺陷的原因之一^[43]。超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)是

对抗氧化损伤的重要手段之一,前者通过将机体有害的超氧阴离子自由基(O²⁻)歧化为水和氧气而产生作用,后者是通过不断运转清除对机体有害的过氧化氢(H₂O₂)和过氧化物,阻止其进一步生成氧化性更强的物质来产生作用^[44]。在本实验中观察到 SOD 和 CAT 皆显著下调且随 TBZ 浓度升高呈浓度依赖性,并且在高浓度组中下调更为明显,这可能是由于高浓度组 ROS 水平增加,为维持体内 ROS 与抗氧化防御系统的平衡,导致 SOD 和 CAT 过度消耗造成的,或者是高浓度的 TBZ 抑制 SOD 和 CAT 相关酶的活性,导致 SOD 和 CAT 活性降低造成的。综上,TBZ 诱导斑马鱼胚胎产生强烈的氧化应激反应,导致抗氧化防御系统失衡,造成胚胎内大量 ROS 无法及时清除而产生积累,从而引发更为严重的氧化损伤,进而诱导强烈的细胞凋亡,出现心脏畸形表型。

在本研究中,我们证实了 TBZ 暴露诱导斑马鱼产生严重的心脏毒性,出现心包水肿、心率下降、体长缩短等现象,同时会诱发胚胎心脏部位产生较强的氧化应激反应,造成大量细胞凋亡。我们的数据为 TBZ 在环境中的残留危险性提供了新的证据。考虑到其在环境和生物体中的富集,今后有必要对环境浓度下 TBZ 的长期暴露毒性进行研究,以进一步了解这种化合物在生长、繁殖以及跨代遗传方面的毒性,为预防人类和野生动物接触这种环境污染物引起的疾病提供一种潜在的策略。

4 结论

4.1 TBZ 暴露显著降低了斑马鱼胚胎的存活率,孵化率和体长,造成了严重的心率下降和心包水肿,表现出明显的心脏发育毒性。

4.2 TBZ 暴露显著影响了斑马鱼胚胎心脏发育以及细胞凋亡相关基因的表达。

4.3 TBZ 暴露诱导斑马鱼胚胎在心脏部位产生较强的氧化应激反应,且在心脏部位造成了大量的细胞凋亡,这可能与 TBZ 暴露导致的心脏毒性相关。

参考文献:

- [1] Gikas G D, Parlakidis P, Mavropoulos T, et al. Particularities of fungicides and factors affecting their fate and removal efficacy: A Review [J]. Sustainability, 2022,14(7):4056.
- [2] Choi T Y, Choi T I, Lee Y R, et al. Zebrafish as an animal model for biomedical research [J]. Experimental & Molecular Medicine, 2021,53(3):310-317.
- [3] Basha N J. Therapeutic efficacy of benzimidazole and its analogs: An

- update [J]. *Polycyclic Aromatic Compounds*, 2022,43(7):6549–6569.
- [4] Shahzad F, Vashisth T, Ritenour M A, et al. Quest for desirable quality of Tango Mandarin in the citrus greening era: The promise of integrated approaches [J]. *Food Science and Technology*, 2022,161:113321.
- [5] Li D, Gu Y, Feng Y, et al. Synthesis of silver nanoplates on electrospun fibers via tollens reaction for SERS sensing of pesticide residues [J]. *Microchimica Acta*, 2020,187(10):560.
- [6] Valdovinos F C, Alcantar R V, Gaspar R O, et al. Agricultural pesticide residues in honey and wax combs from Southeastern, Central and Northeastern Mexico [J]. *Journal of Apicultural Research*, 2017,56(5):667–679.
- [7] S eide M, Marion M, Mateescu M A, et al. The fungicide thiabendazole causes apoptosis in rat hepatocytes [J]. *Toxicology in Vitro*, 2016,32: 232–239.
- [8] Ongono J S, B eranger R, Baghdadi A, et al. Pesticides used in Europe and autism spectrum disorder risk: Can novel exposure hypotheses be formulated beyond organophosphates, organochlorines, pyrethroids and carbamates? – A systematic review [J]. *Environmental Research*, 2020,187:109646.
- [9] Islam J Y, Hoppin J, Mora A M, et al. Respiratory and allergic outcomes among 5-year-old children exposed to pesticides [J]. *Thorax*, 2023,78(1):41–49.
- [10] Jang Y, Lee A Y, Kim J E, et al. Benomyl-induced effects of ORMDL3 overexpression via oxidative stress in human bronchial epithelial cells [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2016,98:100–106.
- [11] Han P, Rios M A, Tang X, et al. Benzimidazole fungicide biotransformation by comammox nitrospirilla bacteria: Transformation pathways and associated proteomic responses [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023,445:130558.
- [12] Al-Mashaqbeh O, Alsafadi D, Dalahmeh S, et al. Removal of selected pharmaceuticals and personal care products in wastewater treatment plant in Jordan [J]. *Water*, 2019,11(10):2004.
- [13] El B K, Mekhzoum M E, Qaiss A E, et al. Recent advances in the synthesis and applications of thiabendazole derivatives: A short review [J]. *Current Organic Chemistry*, 2020,24(20):2367–2377.
- [14] Solel Z, Sandler D, Diior A. Mobility and persistence of carbendazim and thiabendazole applied to soil via drip irrigation [J]. *Phytopathology*, 1979,69:1273–1277.
- [15] Bijlsma L, Pitarch E, Hern andez F, et al. Ecological risk assessment of pesticides in the Mijares River (eastern Spain) impacted by citrus production using wide-scope screening and target quantitative analysis [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2021,412:125277.
- [16] Romero C R, Kassuha D, Peris V J, et al. Analysis of thiabendazole, 4-tert-octylphenol and chlorpyrifos in waste and sewage water by direct injection – micellar liquid chromatography [J]. *Analyst*, 2015, 140(5):1739–1746.
- [17] Barnhoorn I, van Dyk C. The first report of selected herbicides and fungicides in water and fish from a highly utilized and polluted freshwater urban impoundment [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2020,27(26):33393–33398.
- [18] Chinescu C L, Nicolau A I. Preliminary survey of pharmaceutical residues in some important Romanian rivers [J]. *Toxicological & Environmental Chemistry*, 2015,96(9):1333–1345.
- [19] Tokath C, K ose E,  i ek A, et al. Pesticide accumulation in Turkey’s Meri  River Basinwater and Sediment [J]. *Polish Journal of Environmental Studies*, 2019,29(1):1003–1008.
- [20] Sarmah S, Marrs J. Zebrafish as a vertebrate model system to evaluate effects of environmental toxicants on cardiac development and function [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2016,17(12):2123.
- [21] Zhang X, Zhang P, Perez R V, et al. Assessing the toxicity of the benzamide fungicide zoxamide in zebrafish (*Danio rerio*): Towards an adverse outcome pathway for beta-tubulin inhibitors [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2020,78:103405.
- [22] Westhoff J H, Steenbergen P J, Thomas L S V, et al. In vivo high-throughput screening in zebrafish for developmental nephrotoxicity of approved drugs [J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2020,8:583.
- [23] Sasagawa S, Nishimura Y, Kon T, et al. DNA damage response is involved in the developmental toxicity of mebendazole in zebrafish retina [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2016,7:57.
- [24] Andrade T S, Henriques J F, Almeida A R, et al. Carbendazim exposure induces developmental, biochemical and behavioural disturbance in zebrafish embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2016,170:390–399.
- [25] Delescluse C, Leduc N, Li R, et al. Induction of cytochrome P450 1A1 gene expression, oxidative stress, and genotoxicity by carbaryl and thiabendazole in transfected human HepG2 and lymphoblastoid cells [J]. *Biochemical Pharmacology*, 2001,61(4):399–407.
- [26] Ogata A, Ando H, Kubo Y, et al. Teratogenicity of thiabendazole in ICR mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1984,22(7):509–520.
- [27] Tada Y, Yoneyama M, Kabashima J, et al. Effects of thiabendazole on the kidneys of ICR mice [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 1989,27(5):307–315.
- [28] Park J, An G, Park H, et al. Developmental defects induced by thiabendazole are mediated via apoptosis, oxidative stress and alteration in PI3K/Akt and MAPK pathways in zebrafish [J]. *Environment International*, 2023,176:107973.
- [29] Holtzinger A, Evans T. Gata4 regulates the formation of multiple organs [J]. *Development*, 2005,132(17):4005–4014.
- [30] Zeisberg E M, Ma Q, Juraszek A L, et al. Morphogenesis of the right ventricle requires myocardial expression of Gata4 [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2005,115(6):1522–1531.
- [31] England J, Loughna S. Heavy and light roles: Myosin in the morphogenesis of the heart [J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012,70(7):1221–1239.
- [32] Jin D, Ni T T, Hou J, et al. Promoter analysis of ventricular myosin heavy chain (*vmhc*) in zebrafish embryos [J]. *Developmental Dynamics*, 2009,238(7):1760–1767.
- [33] Yelon D, Stainier D Y R. Patterning during organogenesis: Genetic analysis of cardiac chamber formation [J]. *Seminars in Cell & Developmental Biology*, 1999,10(1):93–98.
- [34] 刘 恋,张冉冉,杨 倩,等.利用 CRISPR/Cas9 技术构建 *tnt2a* 基因突变斑马鱼及表型分析 [J]. *生理学报*, 2017,69(3):267–275. Liu Lian, Zhang R, Yang Q, et al. Generation of *tnt2a* knock-out zebrafish via CRISPR/Cas9 and phenotypic analysis. [J]. *Acta Physiologica Sinica*, 2017,69(3):267–275.
- [35] Grassini D R, Lagendijk A K, De Angelis J E, et al. Nppa and Nppb act redundantly during zebrafish cardiac development to confine AVC marker expression and reduce cardiac jelly volume [J]. *Development*, 2018,145(12):160739.
- [36] Forte M, Marchitti S, Di N F, et al. NPPA/atrial natriuretic peptide is an extracellular modulator of autophagy in the heart [J]. *Autophagy*, 2022,19(4):1087–1099.
- [37] Anilkumar U, Prehn J H M. Anti-apoptotic BCL-2 family proteins in acute neural injury [J]. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 2014,8:281.
- [38] Kang P M, Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases [J]. *Trends in Molecular Medicine*, 2003,9(4):177–182.
- [39] Cartron P F, Bellot G, Oliver L, et al. Bax inserts into the mitochondrial outer membrane by different mechanisms [J]. *FEBS Letters*, 2008,582(20):3045–3051.
- [40] Shen J, Liu P, Sun Y, et al. Embryonic exposure to prothioconazole induces oxidative stress and apoptosis in zebrafish (*Danio rerio*) early life stage [J]. *Science of the Total Environment*, 2021,756:143859.
- [41] Langheinrich U, Hennen E, Stott G, et al. Zebrafish as a model organism for the identification and characterization of drugs and genes affecting p53 signaling [J]. *Current Biology*, 2002,12(23):2023–2028.
- [42] Villunger A, Toruno C, Carbonneau S, et al. Interdependence of bad and puma during ionizing-radiation-induced apoptosis [J]. *PLOS ONE*, 2014,9(2):88151.
- [43] Asoglu M R, Gabbay B R, Turan O M, et al. Exposure of the developing heart to diabetic environment and early cardiac assessment: A review [J]. *Echocardiography*, 2018,35(2):244–257.
- [44] Ren F, Ji C, Huang Y, et al. AHR-mediated ROS production contributes to the cardiac developmental toxicity of PM_{2.5} in zebrafish embryos [J]. *Science of the Total Environment*, 2020,719:135097.

作者简介: 管 盛(2003-),男,浙江温州人,浙江警察学院本科生,从事环境毒理学方向研究.g1715983842@outlook.com.