

文章编号: 1674-7054(2023)03-0338-09



# 四氯虫酰胺对斑马鱼急性毒性及黑色素合成的影响

郑世祥, 张太宇, 郭雨昭, 张洁, 范咏梅

(海南大学植物保护学院/热带农林灾害绿色防控教育部重点实验室, 海口 570228)

**摘要:** 基于四氯虫酰胺生态风险评估, 本研究采用超高效液相色谱-串联质谱法测定四氯虫酰胺在水中暴露 96 h 浓度的变化情况; 参照 OECD 标准, 以斑马鱼 (*Danio rerio*) 为研究对象, 通过静态染毒观察药剂对斑马鱼生长发育影响, 统计自主运动、黑色素和体长等指标, 通过死亡率计算得到暴露 96 h 的  $LC_{50}$ ; 采用 RT-qPCR 的方法研究四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎黑色素合成相关基因的影响。结果表明: 四氯虫酰胺在水中暴露 96 h 的最高降解率为 7.6%, 浓度大于 80%, 在水中暴露 96 h 的稳定性良好; 四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎的暴露 96 h 的  $LC_{50}$  为  $23.775 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 属于低毒范畴; 四氯虫酰胺暴露影响斑马鱼胚胎发育, 主要表现: 一是随着四氯虫酰胺浓度的升高斑马鱼胚胎自主运动频率增加, 其中暴露浓度为  $39.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 斑马鱼胚胎自主运动频率达到  $5.5 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ , 为对照自主运动频率的 22 倍; 二是孵化率降低, 暴露浓度在  $27.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 斑马鱼胚胎孵化率下降 75%; 三是体长缩短, 暴露浓度为  $39.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 斑马鱼体长较对照减少了 32.27%。暴露后, 黑色素沉着下降, 暴露 96 h 斑马鱼胚胎黑色素面积随着四氯虫酰胺暴露浓度的增加明显减少, 与空白相比, 最高暴露浓度  $39.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时黑色素面积减少了 65%。RT-qPCR 结果表明, 发现黑色素合成相关基因酪氨酸酶基因 (*Tyr*), SRY-box 转录因子 10 (*Sox10*), 酪氨酸酶相关蛋白 1 (*Trp-1a*), 调节小眼症相关转录因子 (*Mitfa*) 有一定的变化。本研究结果表明, 四氯虫酰胺通过抑制 *Sox10* 以及 *Mitfa* 的表达, 使得酪氨酸酶相关转录因子 *Tyr* 和 *Trp-1a* 等表达异常, 最终导致斑马鱼胚胎黑色素合成以及沉着行为受到损害。

**关键词:** 四氯虫酰胺; 斑马鱼; 急性毒性; 黑色素

**中图分类号:** S 481<sup>+</sup>.1      **文献标志码:** A

**引用格式:** 郑世祥, 张太宇, 郭雨昭, 等. 四氯虫酰胺对斑马鱼急性毒性及黑色素合成的影响 [J]. 热带生物学报, 2023, 14(3): 338-346. DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2023.03.011

四氯虫酰胺 (Tetrachlorantraniliprole) 是我国自主研发的双酰胺类杀虫剂, 2013 年在农业农村部获得登记, 具有高效、低毒、广谱的特点<sup>[1]</sup>。已有研究报道, 10% 四氯虫酰胺悬浮剂对玉米田棉铃虫 (*Helicoverpa armigera*)<sup>[2]</sup> 和玉米螟 (*Pyrausta nubilalis*)<sup>[3]</sup> 有较好的防治效果。四氯虫酰胺对水稻二化螟 (*Chilo suppressalis*)<sup>[4]</sup> 和水稻纵卷叶螟 (*Cnaphalocrocis medinalis*)<sup>[5]</sup> 田间防治效果较好, 但药剂在水稻田的喷洒使用行为会造成水体环境污染, 从而对水生生物产生毒性危害。四氯虫酰胺与甲维盐复配对草地贪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 有较好的防治效果<sup>[6]</sup>, 但由于农药在生

态环境中的迁移转化, 会对非靶标生物产生一定的影响, 如双酰胺类农药氯虫苯甲酰胺和溴氰虫酰胺对螟黄赤眼蜂 (*Trichogramma chilonis Ishii*) 成蜂表现为低风险性<sup>[7]</sup>; 在水生生态系统中, 溴氰虫酰胺会影响羊角月牙藻 (*Selenastrum bibrainum*) 的光合作用并抑制生长<sup>[8]</sup>; 10% 四氯虫酰胺悬浮剂对家蚕 (*Bombyx mori* Linnaeus) 的毒性为中毒, 96 h 的  $LC_{50}$  为  $27.28 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 10% 四氯虫酰胺悬浮剂对水生生物鲤鱼 (*Cyprinus carpio*) 为低毒, 96 h 的  $LC_{50}$  为  $89.11 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ <sup>[9]</sup>。黑色素是通过一个复杂的过程被合成为紫外线防御机制, 该过程涉及一系列酶和多种信号转导途径。黑色素生成是由

收稿日期: 2022-03-20

修回日期: 2022-10-01

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31860514); 海南省自然科学基金高层次人才项目 (321RC479)

第一作者: 郑世祥 (1995-), 男, 海南大学植物保护学院 2019 级硕士研究生. E-mail: zhengshixiang6@163.com

通信作者: 范咏梅 (1968-), 女, 硕士. 教授. 研究方向: 农药环境安全评价. E-mail: yongmeifan@126.com

酪氨酸酶基因(*Tyr*)催化的酪氨酸经中间体 3,4-二羟基苯丙氨酸氧化为多巴醌而引发的;在没有巯基(例如半胱氨酸或谷胱甘肽)的情况下,黑色素合成途径中的第二种酶酪氨酸酶相关蛋白 2(*Trp-2*)将多巴醌迅速转化为多巴色素,随后将多巴色素转化为 5,6-二羟基吲哚(*DHI*)或吲哚 5,6-醌 2-羧酸(*DHICA*);参与黑色素合成的最后一种酶,即酪氨酸酶相关蛋白 1(*Trp-1*),催化 *DHICA* 的氧化形成直链黑色素<sup>[10]</sup>。*Tyr* 是一种糖蛋白,它的糖基化和降解作用在抗黑素形成剂的开发中起着至关重要的作用。小眼症相关转录因子(*MITF*),通过转录调节 *Tyr*, *Trp-1* 和 *Trp-2* 表达在黑色素生成中起重要作用,为此 *MITF* 为黑色素生成的主转录因子<sup>[11]</sup>。*SRY-box* 转录因子 10 (*Sox10*)可以调节小眼症相关转录因子 *Mitf/mitfa* 的表达, *Sox10* 在分化前的神经嵴细胞中广泛表达。*Sox10* 功能的丧失会导致斑马鱼(*Danio rerio*)和小鼠(*Mus musculus*)中黑色素细胞和大多数其他神经嵴衍生细胞完全或部分缺失,因此 *Sox10* 对于黑色素细胞的发育非常重要<sup>[12]</sup>。

目前未见有四氯虫酰胺原药对模式生物斑马鱼的毒性影响力的研究报道。本研究以斑马鱼为研究对象,通过静态染毒观察农药暴露对斑马鱼胚胎生长发育的影响;同时通过 RT-qPCR 方法研究四氯虫酰胺原药对斑马鱼胚胎黑色素合成的相关基因的影响,以期对四氯虫酰胺农药的生态风险评估提供一定的理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 化学品和仪器** 四氯虫酰胺(纯度 96%, CAS: 1104384-14-6),购自海南青峰生物科技有限公司; Tween-80、二甲基甲酰胺(DMF)购自 Solarbio 科技有限公司;磷酸盐缓冲液(PBS)购自上海立菲生物技术有限公司; Trizol 试剂购自 Invitrogen 科技有限公司; Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒购自 Roche 公司; SYBR Green I Master(Roche diagnostics A/S)试剂盒购自 Roche 公司; Triple Quad 6500+超高效液相色谱-三重四极杆串联质谱联用仪 UPLC-MS-MS(SCIEX 美国 Waters 公司); LightCycler96 R 实时荧光定量 PCR 仪(Roche 公司)。

## 1.2 水样中四氯虫酰胺的测定

**1.2.1 样品处理** 试验分别在 24, 48, 72, 96 h 对各试验浓度四氯虫酰胺药液取样,并对样品进行前处理。样品前处理:将试验药液稀释成设定的浓度的 10 倍,取 1 mL 稀释后的药液并加入 9 mL 的甲醇,使得水药液与甲醇的体积比为 1 : 9,再涡旋,摇匀,取 1 mL 经 0.22  $\mu\text{m}$  过滤膜过滤后转移到样品瓶。

**1.2.2 标准溶液的配制** 根据试验设定标准曲线浓度为 0.005, 0.01, 0.05, 0.1, 0.2  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

**1.2.3 色谱条件** 色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C18 柱(2.1 mm $\times$ 50 mm, 1.7  $\mu\text{m}$ ), 流动相 A: 超纯水, 流动相 B: 乙腈, 梯度洗脱程序: 0 ~ 0.5 min, 保持初始 10% 的乙腈; 0.5 ~ 2 min, 乙腈的比例线性增加从 10% ~ 95%; 2 ~ 5 min, 保持 95% 的乙腈 3 min; 5.0 ~ 5.2 min, 乙腈的比例线性下降从 95% ~ 10%; 5.2 ~ 8.0 min, 保持 10% 的乙腈 2.8 min。每个样品进样结束, 仪器平衡 5 min。流速: 0.25 mL $\cdot\text{min}^{-1}$ 。

**1.2.4 质谱条件** 离子化方式: 电喷雾离子源(ESI); 检测模式: 多反应检测模式(MRM); 扫描方式为负离子扫描( $\text{ESI}^-$ ), 一级扫描范围( $m/z$ ): 201.9 ~ 535.8, 二级扫描范围( $m/z$ ): 499.7 ~ 535.8; 气帘气: 0.28 Mpa; 碰撞气: 0.06 Mpa; 去簇电压(DP): 70 V; 碰撞能量(CE): 5 eV; 离子喷雾电压: 5 500 V; 离子源温度: 550 $^{\circ}\text{C}$ 。

**1.2.5 添加回收和精度** 设定加标浓度分别为 0.01、0.02、0.05  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。然后按照上述的分析方法测定,并根据建立的基质标准方程,采用外标法计算回收浓度,根据 SANCO/12571/2013<sup>[13]</sup> 的要求计算回收率和相对标准偏差(RSD)。

**1.3 斑马鱼的饲养及产卵** 试验用 AB 野生型斑马鱼(*Danio rerio*)引自国家斑马鱼中心,并参照 OECD 标准<sup>[14]</sup>,采用北京爱生科技公司的斑马鱼养殖系统饲养,饲养中严格控制饲养条件。饲养条件: 室温 28  $^{\circ}\text{C}$ , 水的 pH 为 7.5 左右,水中电导率 550  $\mu\text{S}\cdot\text{cm}^{-1}$  左右,通过加氧泵使水中含氧量在 80% 以上,调节养殖时的光暗比为 14 h : 10 h。

斑马鱼胚胎的获取: 将 5 cm 左右的成年斑马鱼按照雌雄比例为 1 : 2 的标准放到孵化盒中用挡板隔开,并控制光暗比(14 h : 10 h),次日拔掉挡板,使得雌雄鱼之间自由交配,收集交配后 30

min 之内的胚胎,并小心地用孵化液清洗。

#### 1.4 四氯虫酰胺对斑马鱼的急性毒性试验

**1.4.1 试验方法以及浓度设计** 按照 OECD 标准<sup>[14]</sup>开展斑马鱼胚胎急性毒性试验,采用静态染毒法将暴露于四氯虫酰胺的斑马鱼胚胎放到 24 孔板中观察,根据预实验的结果,设计 6 个实验浓度为: 16.00, 19.20, 23.04, 27.65, 33.18, 39.80 mg·L<sup>-1</sup>(公比为 1.2)。在试验过程中设置溶剂对照 SC 和空白对照 CK,并且每个浓度选取 20 个观察胚胎。

**1.4.2 药液设置** 四氯虫酰胺原药试验质量浓度: 16.00、19.20、23.04、27.65、33.18、39.80 mg·L<sup>-1</sup>。溶剂和助剂采用 DMF 和 Tween-80,其最高用量低于 0.1%。

**1.4.3 试验现象观察及数据处理** 根据 OECD 标准<sup>[14]</sup>分别于暴露 24、48、72、96 h,使用体视显微镜观察统计各项指标(死亡率、自主运动、孵化率及体长等)。

#### 1.5 斑马鱼胚胎黑色素含量分析

表 1 实时荧光定量 PCR 引物序列

基因	上游引物序列5'→3'	下游引物序列5'→3'
<i>β-actin</i>	GTCCCTGTACGCCTCTGGTGC	GCCGGACTCATCGTACTCCTG
<i>GAPDH</i>	CTGGTGACCCGTGCTGCTT	TTTGCCGCCTTCTGCCTTA
<i>Tyr</i>	GACAGACGAGGAGACGGAAG	CCTTGGGTTTACGGATGAGA
<i>Dicer</i>	ATCGCTAGCTGGTGCAATTT	GTCTCTGGCTCCATCTCCAG
<i>Sox10</i>	AAAACACTGGGGAAGCTGTG	ACGTGGCTGGTACTTGTACT
<i>Mitfb</i>	CAAACCGCAACCTCTTGCTC	GTCTTTGTGCGTGTCTTTCGT
<i>Trp-1a</i>	GGGAACTACAGCGGGTTTGA	GGAGAAATCCCAGAACGGCA
<i>Dct</i>	TCTTCCCACCTGTGACCAAT	CTGATGTGTCCAGCTCTCCA
<i>Mitfa</i>	CTGGACCATGTGGCAAGTTT	GAGGTTGTGGTTGTCTTCT
<i>Trp-1b</i>	CGACAACCTGGGATACACCT	AACCAGCACCCTGCAACTA
<i>Trp-2</i>	GGATGACCGTGAGCAATGGC	CGGTTGTGACCAATGGGTGC

**1.7 统计分析** 使用体视显微镜观察统计各项指标(死亡率、自主运动、孵化率及体长等)。试验结果用 SPSS Statistics 22.0 软件分析计算 LC<sub>50</sub>。并采用 Dunnett's 方法对每个浓度处理的结果和空白对照的结果进行比较,差异不显著用  $P>0.05$  表示,差异显著性用  $P<0.05$  和  $P<0.01$  表示。

## 2 结果与分析

**2.1 超高效液相色谱-串联质谱法测定水中四氯虫酰胺的浓度** 标准曲线的拟合方程为  $y=5.07e+$

软件对斑马鱼胚胎黑色素颜色区域进行提取,得到黑色素整体面积。将图片进行 Color Inspector 3D 软件分析得到 RGB 三维颜色分析图片,通过直观图片中黑色区域来表现黑色素的变化。

**1.6 基因的表达分析** 使用 Trizol 试剂提取斑马鱼胚胎染毒 24 h 后各浓度的总 RNA,包括溶剂对照 SC 和空白对照 CK。采用普通琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,并使用 Roche 公司的 Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒将 RNA 逆转录成 cDNA,检测的基因和实时荧光定量 PCR 引物序列见 表 1。将各浓度反转录成的 cDNA 分别稀释到同一浓度后,使用 SYBR Green I Master(Roche diagnostics A/S)试剂盒方法在 LightCycler96 R(Roche diagnostics A/S)仪器上进行实时定量 PCR 扩增。扩增条件:95℃ 预变性 10 min,循环 1 次,然后 95℃ 进行 15 min,在 60℃ 下退火 20 min,以及 72℃ 下延伸 20 min,40 个循环。RT-qPCR 结果数据分析采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 方法,每个基因进行 3 个技术重复。

0.05x( $R^2=0.999$  1);四氯虫酰胺的加标浓度 0.01, 0.02 和 0.05 μg·mL<sup>-1</sup> 对应的平均回收率分别为 97.98%, 101.60% 和 103.92%,相对标准偏差(RSD)在 4.3%~6.0%,说明该方法有较好的回收率。

按照上述仪器条件和样品前处理方法,以甲醇为阳性对照,对水中四氯虫酰胺的浓度进行检测,通过检测 24、48、72、96 h 中各样品分别在甲醇和水中的浓度(表 2),四氯虫酰胺在水中 96 h 的最高降解率为 7.6%,浓度大于 80%。因此,四氯虫酰胺在水中 96 h 稳定性良好,满足 OECD 标准中静态染毒法的要求。



表 2 四氯虫酰胺的检测浓度

样品	不同暴露时长四氯虫酰胺的浓度/( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )					
	0 h	24 h	48 h	72 h	96 h	平均浓度
1	0.090 6	0.094 0	0.089 5	0.083 9	0.083 8	0.088 4
2	0.096 4	0.096 1	0.096 7	0.099 7	0.089 7	0.095 7
3	0.100 2	0.095 6	0.097 8	0.094 5	0.089 4	0.095 5
4	0.089 9	0.097 9	0.088 3	0.096 3	0.093 8	0.093 2
5	0.091 5	0.096 7	0.087 9	0.090 1	0.087 9	0.090 8
6	0.093 1	0.095 2	0.089 1	0.096 8	0.097 4	0.094 3
7	0.084 0	0.097 8	0.082 2	0.081 4	0.096 4	0.088 4
8	0.099 1	0.099 2	0.095 4	0.098 9	0.094 9	0.097 5
9	0.099 9	0.094 9	0.096 6	0.094 7	0.092 7	0.096 4
10	0.090 4	0.098 6	0.097 6	0.095 9	0.096 4	0.095 8
11	0.094 1	0.097 4	0.099 6	0.089 9	0.092 4	0.094 7
12	0.092 3	0.093 2	0.099 6	0.095 1	0.095 1	0.095 1

注: 四氯虫酰胺样品 1~6 溶解甲醇中为阳性对照, 四氯虫酰胺样品 7~12 溶解水中。

**2.2 四氯虫酰胺对斑马鱼的急性毒性** 斑马鱼胚胎暴露在四氯虫酰胺 24 h 和 48 h 的  $\text{LC}_{50}$  均为  $112.88 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 72 h 的  $\text{LC}_{50}$  为  $30.421 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 95% 置信区间(CI)为  $27.652 \sim 34.480 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ ; 96 h 的  $\text{LC}_{50}$  为  $23.775 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ , 95% 置信区间(CI)为  $22.066 \sim 25.582 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ (表 3)。

表 3 四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎急性毒性

暴露时长/h	回归方程	$\text{LC}_{50}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	95%置信区间/ ( $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )
24	$y=2.63x-4.9$	112.88	--
48	$y=2.63x-4.9$	112.88	--
72	$y=6.03x-8.93$	30.421	$27.652 \sim 34.480$
96	$y=8.63x-11.89$	23.775	$22.066 \sim 25.582$

**2.3 四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎发育的影响**

**2.3.1 自主运动频率增加** 试验结果表明, 溶剂对照组和空白对照组没有明显差异。处理后 24 h, 随着四氯虫酰胺浓度的增加斑马鱼胚胎每分钟自主运动频率加快(图 1), 当四氯虫酰胺暴露浓度高于  $27.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 斑马鱼胚胎自主运动频率与对照相比差异即达显著水平( $P<0.01$ ), 其中自主运动对照组为  $0.25 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ , 暴露浓度为  $39.8$

$\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 斑马鱼胚胎自主运动频率达到  $5.5 \text{ 次}\cdot\text{min}^{-1}$ , 为对照自主运动频率的 22 倍。

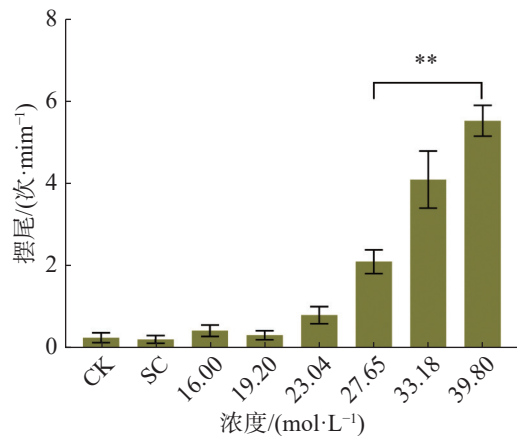


图 1 四氯虫酰胺暴露 24 h 对斑马鱼胚胎自主运动频率的影响

结果为平均值±标准误。与 CK 对比, \*:  $P<0.05$ , \*\*:  $P<0.01$ (下同)。

**2.3.2 孵化率降低** 暴露时间 72 h 和 96 h 四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎孵化率有明显的抑制作用。暴露 96 h 斑马鱼胚胎的孵化率也受到明显抑制, 其中, 暴露于四氯虫酰胺浓度在  $19.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上, 与对照相比, 暴露浓度在  $19.02 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时的孵化率下降了 15%, 暴露浓度在  $27.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时斑马鱼胚胎孵化率下降 75% 以上(图 2)。用  $16.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  四氯虫酰胺溶液暴露斑马鱼胚胎, 四氯虫酰胺暴露 96 h 显著抑制斑马鱼胚胎的正常生长发育, 斑马鱼胚胎的体长随着四氯虫酰胺浓度的增加而降低(图 3)。当四氯虫酰胺暴露浓度高于  $16.00 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 斑马鱼胚胎的体长与对照相比差异即达显著水平( $P<0.01$ ), 其中体长对照组为  $2.755 \text{ mm}$ , 暴露浓度为  $39.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  时, 斑马鱼体长为  $0.677 \text{ mm}$ , 较对照减少了 32.27%。

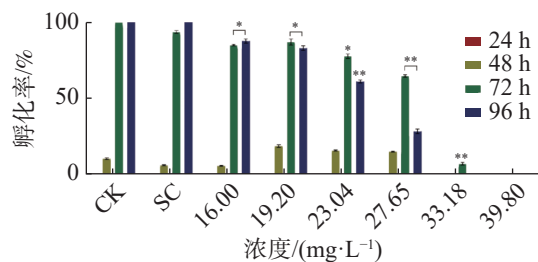


图 2 四氯虫酰胺不同暴露时长对斑马鱼胚胎孵化率的影响

**2.4 四氯虫酰胺对斑马鱼黑色素生成的影响** 四氯虫酰胺暴露 24、48、72、96 h 的斑马鱼胚胎与空白对照相比, 发现四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎

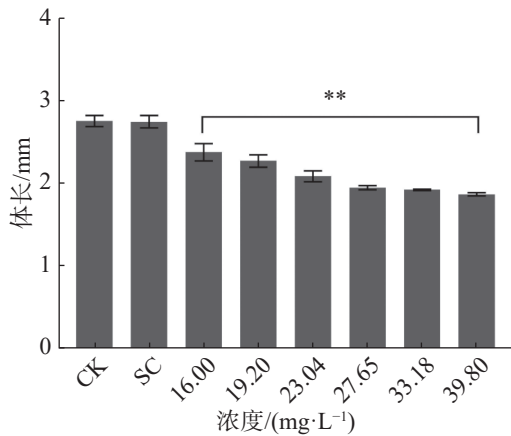


图3 暴露 96 h 对斑马鱼胚胎体长的影响

的色素沉着产生影响(图4),随着四氯虫酰胺处理浓度的增加斑马鱼黑色素区域显著减少。通过 Image-J 使用 RGB 三维色素模型分析结果表明,与空白对照相比,黑色素区域的密度随着暴露浓度的增加而显著降低(图5)。四氯虫酰胺暴露 24 h 通过计算黑色素面积发现随着四氯虫酰胺浓度的增加,斑马鱼黑色素面积明显减少,最高四氯虫酰胺暴露浓度  $39.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  与空白相比黑色素面积减少了 80%(图6)。四氯虫酰胺暴露 48 h 和 72 h 随着四氯虫酰胺浓度的增加,斑马鱼胚胎黑色素面积显著减少,并且和暴露浓度之间有着良

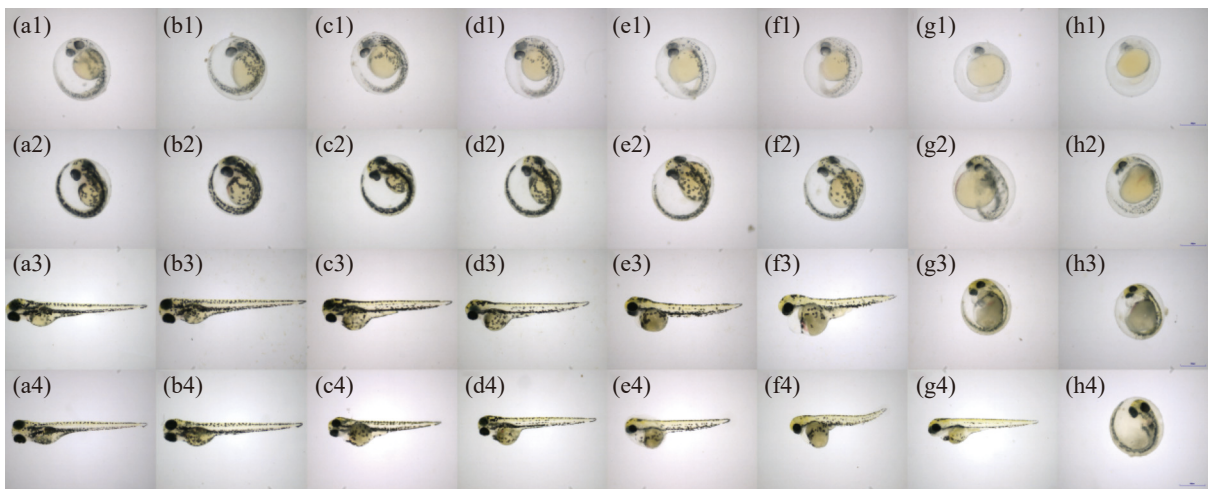


图4 斑马鱼胚胎黑色素形态观察

a、b、c、d、e、f、g、h 分别代表各处理为 CK、SC、16.00、19.20、23.04、27.65、33.18 和  $39.80 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。数字 1~4 分别代表暴露时长 24、48、72、96 h(下同)。

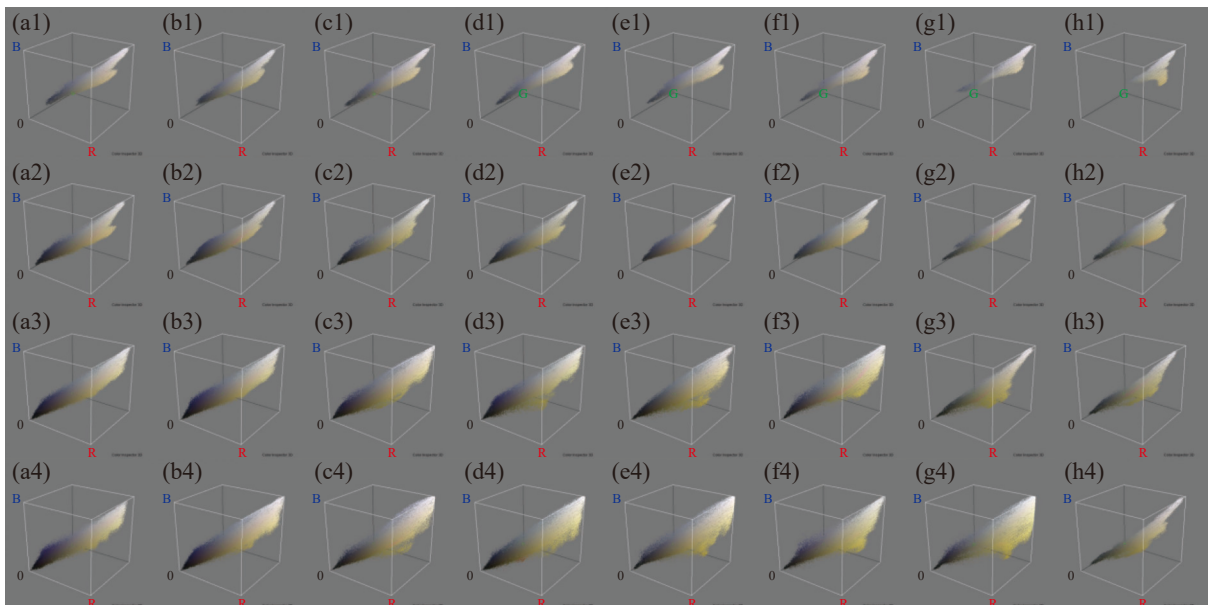


图5 斑马鱼胚胎黑色素 RGB 三维色素模型

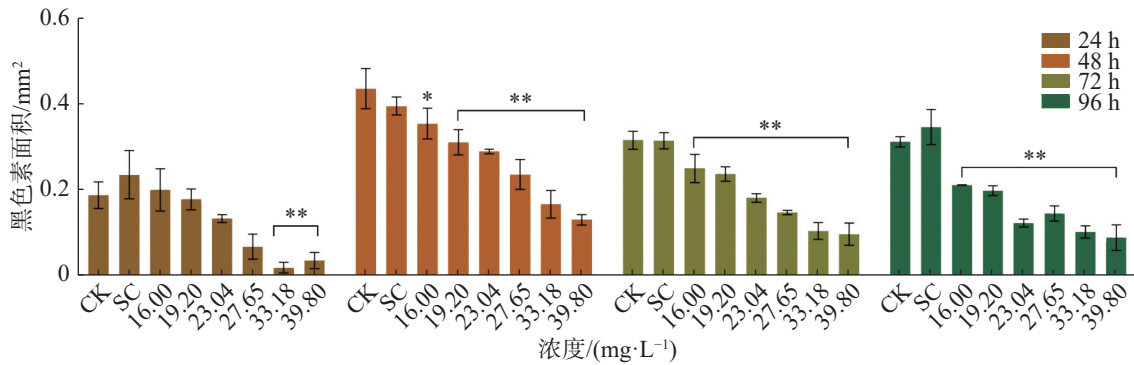


图 6 四氯虫酰胺不同暴露时长对斑马鱼胚胎黑色素面积的影响

好的剂量效应关系。暴露浓度  $33.18 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  与空白相比黑色素面积减少了 60%。四氯虫酰胺暴露 96 h 斑马鱼胚胎黑色素面积随着四氯虫酰胺暴露浓度的增加明显减少, 最高暴露浓度  $39.8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  与空白相比黑色素面积减少了 65%。

**2.5 四氯虫酰胺暴露对斑马鱼黑色素相关基因表达的影响** 对 RT-qPCR 结果分析表明, 在急性浓度暴露下四氯虫酰胺会影响斑马鱼黑色素合成相关基因的变化, 分别使用  $\beta\text{-actin}$  和  $GAPDH$  两个内参基因对斑马鱼黑色素合成相关基因进行分析(图 7、图 8), 发现 2 个内参基因趋势一致。

**2.5.1 以  $\beta\text{-actin}$  为内参基因的结果** 以  $\beta\text{-actin}$

内参基因进行结果分析, 图 7-a 中 *Tyr*, *Sox10*, *Trp-1a*, *Mitfa* 基因在处理浓度  $23.04 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上的表达量随着浓度的增加先上调后下调, 相比对照 CK 最高处理浓度的基因表达量分别是对照的 0.15 倍、0.43 倍、0.96 倍和 1.30 倍; 图 8-a 表明四氯虫酰胺暴露 24 h 诱导斑马鱼胚胎黑色素合成通路中 *Tyr*, *Sox10*, *Trp-1a*, *Mitfa*, *Dicer*, *Trp-1b* 等基因表达量变化趋势, 其中 *Sox10* 基因与 *Mitfa* 基因变化幅度较大, 且趋势相对较一致, 均呈现上调趋势, *Trp-1a* 次之, 说明这 3 个基因在四氯虫酰胺诱导斑马鱼胚胎黑色素合成过程中起关键作用(图 7-a、图 8-a)。

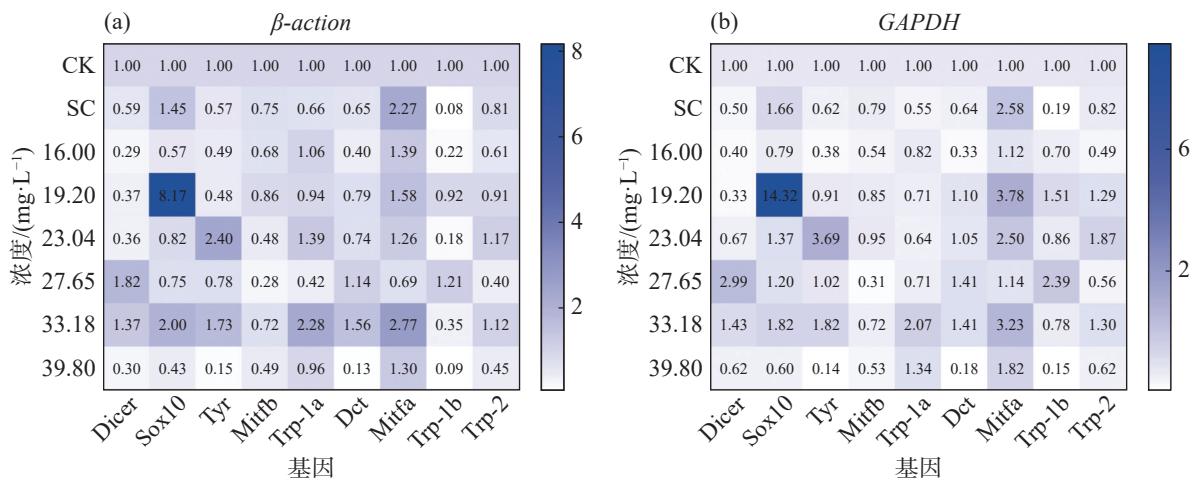


图 7 四氯虫酰胺暴露 24 h 下斑马鱼胚胎黑色素合成相关基因的差异分析  
注: a 和 b 分别代表  $\beta\text{-actin}$  和  $GAPDH$  两个内参(下同)。

**2.5.2 以  $GAPDH$  为内参基因的结果** 以  $GAPDH$  内参进行结果分析, 图 7-b 中, *Sox10*, *Tyr*, *Trp-1a*, *Mitfa* 基因在处理浓度  $27.65 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  以上的表达量随着浓度的增加呈现出先上调后下调的现象, 相比对照 CK 最高处理浓度的基因表达量分别是对照的 0.60 倍、0.14 倍、1.34 倍和 1.82 倍。图 8-b

表明 四氯虫酰胺暴露 24 h 诱导斑马鱼胚胎黑色素合成通路中 *Tyr*, *Sox10*, *Trp-1a*, *Mitfa*, *Dicer*, *Trp-1b* 等基因表达量变化趋势, 其中 *Sox10*、*Mitfa* 基因变化幅度较大, *Trp-1a* 次之, 说明这 3 个基因在四氯虫酰胺诱导斑马鱼胚胎黑色素合成过程中起关键作用(图 7-b,图 8-b)。



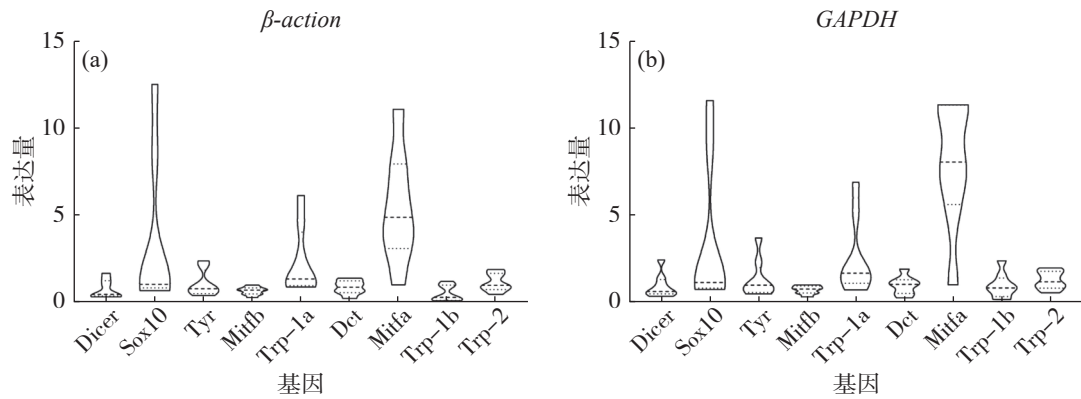


图8 四氯虫酰胺暴露24 h下斑马鱼胚胎黑色素合成相关基因的差异分析

### 3 讨论

斑马鱼为评价除草剂、杀虫剂和杀菌剂等农药对环境的影响提供了有前景的生物平台。有机磷杀虫剂杀螟松暴露72 h对斑马鱼的急性毒性平均 $LC_{50}$ 为 $0.341 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,并诱导卵黄囊肿等躯体畸形<sup>[15]</sup>。杀菌剂三氯生暴露96 h对斑马鱼胚胎急性毒性平均 $LC_{50}$ 为 $0.42 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,显著延迟孵化<sup>[16]</sup>;有机磷农药久效磷(MCP)对斑马鱼胚胎具有中等毒性,暴露96 h的 $LC_{50}$ 为 $(37.44 \pm 3.32) \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[17]</sup>;除草剂2,4-D对斑马鱼胚胎的急性毒性暴露96 h的 $LC_{50}$ 为 $15.010 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,表明毒性为低毒<sup>[18]</sup>。乙基多杀菌素对斑马鱼胚胎的毒性为低毒并具有致畸作用,暴露96 h的 $LC_{50}$ 为 $9.713 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ <sup>[19]</sup>,黄伟康<sup>[20]</sup>研究了溴氰虫酰胺对斑马鱼胚胎的急性毒性,暴露96 h的 $LC_{50}$ 为 $1.57 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,属于中毒范围。四氯虫酰胺是我国自主研发的具有低毒、高效等特点的杀虫剂,本研究按照OECD的准则开展了四氯虫酰胺原药对斑马鱼胚胎的急性毒性试验,暴露96 h的 $LC_{50}$ 为 $23.775 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ,结果表明为低毒,这与张琦<sup>[9]</sup>报道的10%四氯虫酰胺悬浮剂对水生生物鲤鱼的结果相似。本试验结果表明与对照相比,随着四氯虫酰胺浓度的升高斑马鱼胚胎在暴露96 h下的孵化率降低、自主运动频率增加以及体长降低,并且较高浓度四氯虫酰胺显著地减少斑马鱼黑色素的面积。新型吡啶基恶唑甲酰胺可以引起斑马鱼胚胎的黑色素细胞缺失现象<sup>[21]</sup>,说明化学物质在水体中会对斑马鱼黑色素细胞的生成产生影响,本研究结果表明四氯虫酰胺对斑马鱼胚胎黑色素的合成有显著的抑制作用,这与前人的结果具有相似性。

与黑色素合成相关基因的报道中,*Mitfa*是在

黑色素母细胞前体中表达的早期基因之一,*Mitfa*置于产生黑色素和最终分化黑色素细胞所必需的多个基因的上游,包括多巴色素互变异构酶,酪氨酸酶,酪氨酸酶相关蛋白1,*C-kit*和*Bcl2*转录因子<sup>[22]</sup>。也有研究报道表明,*Mitf*作为主导作用的天然木质素通过下调*Mitf*和*Tyr*的表达,从而有效地抑制斑马鱼黑色素细胞的生成<sup>[23]</sup>;在新型污染物三氯卡班影响斑马鱼幼虫黑色素生成的研究报道中,也指出*Mitfa*(小眼相关转录因子)和*Tyr*(酪氨酸酶)的表达水平的变化是影响黑色素合成的关键因子<sup>[24]</sup>,本研究中*Mitf*基因是四氯虫酰胺诱导斑马鱼黑色素减少变化最大的基因。另文献<sup>[25]</sup>报道,在损害神经嵴细胞分化的过程中*Sox10*和*Mitfa*转录所涉及的成熟miRNA的生成来实现存在一致性。黑色素细胞由*Sox10*转录因子核心参与的神经嵴细胞生成,*Sox10*通过*Mitfa*启动子直接驱动黑色素细胞的命运,存在调控关系<sup>[26]</sup>,且*Mitf/mitfa*作为黑色素分化多个关键基因的上游基因,决定黑色素细胞的命运,导致黑色素细胞的生成和发育受到影响。本研究结果显示,*Sox10*基因与*Mitfa*基因变化幅度较大,且趋势相对较一致,均呈现上调趋势。

黑色素生物取决于酪氨酸酶家族的3种酶的功能,有研究表明酪氨酸酶(*Tyr*)、酪氨酸酶相关蛋白1(*Tyrp1*)和多巴色素互变异构酶(*Dct*或*Tyrp2*)等3种酶的功能直接影响黑色素的生物合成,其中酪氨酸酶相关蛋白的异常表达会导致黑色素细胞死亡<sup>[27]</sup>,有文献报道杀菌剂恶霉灵通过抑制酪氨酸酶活性降低了斑马鱼胚胎黑色素密度<sup>[28]</sup>,本研究中酪氨酸酶相关基因*Trp-1a*也是变化较大的3个基因之一。

## 参考文献:

- [1] 谭海军. 新型邻甲酰氨基苯甲酰胺类杀虫剂四氯虫酰胺[J]. *世界农药*, 2019, 41(5): 60–64.
- [2] 郭雪岗, 王玉强, 马栋, 等. 10% 四氯虫酰胺悬浮剂(9080™)防治玉米田棉铃虫田间药效试验[J]. *基层农技推广*, 2016, 4(5): 50–52.
- [3] 王洪涛, 衣先家, 王英姿, 等. 10% 四氯虫酰胺悬浮剂对玉米螟药效评价[J]. *农药*, 2018, 57(6): 448–449.
- [4] 李艳梅. 四氯虫酰胺等多种新药剂防治水稻二化螟田间效果的评价[J]. *上海农业科技*, 2015(3): 127–128.
- [5] 顾建忠, 张夕林. 四氯虫酰胺等 8 种药剂防治水稻纵卷叶螟的效果及其应用技术[J]. *上海农业科技*, 2015(4): 138–140.
- [6] 高庆远, 杨石有, 张贝贝. 甲维盐与四氯虫酰胺复配对草地贪夜蛾的室内生物活性及田间防效[J]. *农药*, 2021, 60(4): 306–309.
- [7] 李增鑫, 李亮, 何月平. 11 种杀虫剂对螟黄赤眼蜂的急性毒性和安全性评价[J]. *热带生物学报*, 2021, 12(1): 83–87.
- [8] 徐成滨, 王宇心, 孔伟浩, 等. 溴氰虫酰胺对羊角月牙藻的急性毒性效应[J]. *热带生物学报*, 2019, 10(2): 135–139.
- [9] 张琦. 两种双酰胺类农药对家蚕和鲤鱼的毒性安全评价[J]. *基层农技推广*, 2020, 8(1): 47–52.
- [10] BAEK S, LEE S H. Sesamol decreases melanin biosynthesis in melanocyte cells and zebrafish: Possible involvement of MITF *via* the intracellular cAMP and p38/JNK signalling pathways [J]. *Experimental Dermatology*, 2015, 24(10): 761–766.
- [11] BAEK S, LEE S H. Omeprazole inhibits melanin biosynthesis in melan-a cells and zebrafish [J]. *Experimental Dermatology*, 2016, 25(3): 239–241.
- [12] NAGAO Y, TAKADA H, MIYADAI M, et al. Distinct interactions of Sox5 and Sox10 in fate specification of pigment cells in medaka and zebrafish [J]. *PLoS Genetics*, 2018, 14(4): e1007260.
- [13] SANCO/12571/2013. Guidance document on analytical quality control and validation procedures for pesticide residues analysis in food and feed[S]. European Union:SANCO,2013.
- [14] OECD. OECD guidelines for the testing of chemicals. Draft proposal for a new guideline, fish embryo toxicity(FET) test[S]. Paris: OECD, 2013.
- [15] RAHMAN M S, ISLAM S M M, HAQUE A, et al. Toxicity of the organophosphate insecticide sumithion to embryo and larvae of zebrafish [J]. *Toxicology Reports*, 2020, 7: 317–323.
- [16] OLIVEIRA R, DOMINGUES I, KOPPE GRISOLIA C, et al. Effects of triclosan on zebrafish early-life stages and adults [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2009, 16(6): 679–688.
- [17] PAMANJI R, BETHU M S, YASHWANTH B, et al. Developmental toxic effects of monocrotophos, an organophosphorous pesticide, on zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Environmental Science and Pollution Research*, 2015, 22(10): 7744–7753.
- [18] MARTINS R X, VIEIRA L, SOUZA J A C R, et al. Exposure to 2, 4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2021, 248: 109110.
- [19] 孔伟浩, 高薇珊, 范咏梅. 多杀菌素和乙基多杀菌素对斑马鱼胚胎发育的影响[J]. *热带生物学报*, 2018, 9(3): 267–273.
- [20] 黄伟康. 两种双酰胺类杀虫剂对斑马鱼胚胎毒性机理初探研究[D]. 海口: 海南大学, 2017: 25-40.
- [21] CHEN S, ZHANG D L, REN C L, et al. Novel Pyridyl-Oxazole Carboxamides: Toxicity assay determination in fungi and zebrafish embryos [J]. *Molecules*, 2021, 26(13): 3883.
- [22] STEINGRÍMSSON E, COPELAND N G, JENKINS N A. Melanocytes and the microphthalmia transcription factor network [J]. *Annu. Rev. Genet.*, 2004, 38: 365–411.
- [23] SHIN Y, JANG E J, PARK H J, et al. Suppression of melanin synthesis by Americanin A in melan-a cells *via* regulation of microphthalmia-associated transcription factor [J]. *Experimental Dermatology*, 2016, 25(8): 646–647.
- [24] CAIONI G, D'ANGELO M, PANELLA G, et al. Environmentally relevant concentrations of triclocarban affect morphological traits and melanogenesis in zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2021, 236: 105842.
- [25] WEINER A M J, SCAMPOLI N L, STEEMAN T J, et al. Dicer1 is required for pigment cell and craniofacial development in zebrafish [J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms*, 2019, 1862(4): 472–485.
- [26] ELWORTHY S, LISTER J A, CARNEY T J, et al. Transcriptional regulation of mitfa accounts for the sox10 requirement in zebrafish melanophore development [J]. *Development*, 2003, 130(12): 2809–2818.
- [27] KRAUSS J, GEIGER-RUDOLPH S, KOCH I, et al. A dominant mutation in tyrp1 A leads to melanophore death in zebrafish [J]. *Pigment Cell & Melanoma Research*, 2014, 27(5): 827–830.
- [28] FAN Y, MIAO W, LAI K, et al. Developmental toxicity and inhibition of the fungicide hymexazol to melanin biosynthesis in zebrafish embryos [J]. *Pesticide biochemistry and physiology*, 2018, 147: 139–144.



## Acute toxicity of Tetrachlorantraniliprole to Zebrafish and an impact on melanin biosynthesis

ZHENG Shixiang, ZHANG Taiyu, GUO Yuzhao, ZHANG Jie, FAN Yongmei

(College of Plant Protection/Ministry of Education Key Laboratory for Green Prevention and Control of Disasters in Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou, Hainan 570228, China)

**Abstract:** In order to provide a certain theoretical basis for the ecological risk assessment of pesticide tetrachlorantraniliprole, the concentration change of tetrachlorantraniliprole in water for 96 hours was determined by using ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry. According to the OECD standard, embryos of *Danio rerio* were used as assessment of the model organisms. After static exposure to different doses of tetrachlorantraniliprole, zebrafish embryos were observed in terms of growth and development, and their voluntary movement, melanin and body length were calculated. The 96 h LC<sub>50</sub> were evaluated by mortality rate. Genes related with the melanin biosynthesis in the embryos were determined by using the RT-qPCR. The results showed that the tetrachlorantraniliprole in water for 96 h had the highest degradation rate (7.6%), with its concentration being greater than 80%, and had a good stability in water for 96 h. The LC<sub>50</sub> of tetrachlorantraniliprole at 96 h was 23.775 mg·L<sup>-1</sup>, indicating low toxicity. The exposure to tetrachlorantraniliprole affected the development of zebrafish embryos in voluntary movement frequency, hatching rate and body length. The frequency of voluntary movement of zebrafish embryos increased with the tetrachlorantraniliprole concentration. When the exposure concentration was 39.8 mg·L<sup>-1</sup>, the zebrafish embryos had a voluntary movement frequency of 5.5 times·min<sup>-1</sup>, which was 22 times that of the control. When the exposure concentration was 27.65 mg·L<sup>-1</sup>, the zebrafish embryos decreased their hatching rate by 75%. At an exposure concentration of 39.8 mg·L<sup>-1</sup>, zebrafish decreased its body length by 32.27% compared with the control. Moreover, during the experiment it was also found that melanin pigmentation decreased after exposure to tetrachlorantraniliprole, and that the melanin area of 96 h zebrafish embryos decreased significantly with the increase of tetrachlorantraniliprole concentration, and was reduced by 65% at the highest exposure concentration of 39.8 mg·L<sup>-1</sup> as compared with the blank control. The RT-qPCR results showed that the expression of *Tyr*, *Sox10*, *Trp-1a*, and *Mitfa* genes had certain changes. The results showed that tetrachlorantraniliprole inhibited the expression of *Sox10* and *Mitfa*, resulting in abnormal expression of tyrosinase-related transcription factors such as *Tyr* and *Tyr-1a*, which ultimately led to the impairment of melanin synthesis and pigmentation in zebrafish embryos.

**Keywords:** tetrachlorantraniliprole; zebrafish; acute toxicity; melanin

(责任编辑:叶 静)