

DOI: 10.5846/stxb202108092183

刘建超, 马雨辰, 张凌玉, 任静华, 李一平, 陆光华. 红霉素对大型溞生殖、生长和基因表达的生态毒理效应. 生态学报, 2022, 42(19): 8105-8113.

Liu J C, Ma Y C, Zhang L Y, Ren J H, Li Y P, Lu G H. Ecotoxicity of erythromycin on reproduction, growth and genetic expression in *Daphnia magna*. Acta Ecologica Sinica, 2022, 42(19): 8105-8113.

红霉素对大型溞生殖、生长和基因表达的生态毒理效应

刘建超¹, 马雨辰¹, 张凌玉¹, 任静华², 李一平¹, 陆光华^{1,*}

¹ 河海大学环境学院, 浅水湖泊综合治理与资源开发教育部重点实验室, 南京 210098

² 江苏省地质调查研究院, 自然资源部(国土)耕地生态监测与修复工程技术创新中心, 南京 210018

摘要: 红霉素(ERM)在水环境中广泛检出,并产生生态毒理风险。以大型溞为模式生物,研究了 ERM 在浮游动物繁殖、生长、抗氧化及神经系统方面的慢性毒理效应。结果表明 ERM 对大型溞的急性毒性为低毒(48 h-LC₅₀ 为 315.41 mg/L, 96 h-LC₅₀ 为 163.08 mg/L)。在 2 μg/L 和 200 μg/L 浓度下暴露 21 d, ERM 会干扰大型溞的繁殖、生长、氧化应激防御及解毒相关基因的表达,诱导丙二醛含量上升,抑制抗氧化系统超氧化物歧化酶和谷胱甘肽转移酶及神经系统乙酰胆碱酯酶活性,引起细胞膜损伤和神经传导紊乱,造成大型溞前期产卵率升高,且对生长发育和游泳行为产生不利影响。解析了 ERM 在浮游动物繁殖、生长及在蛋白和基因水平上的毒理响应,为揭示抗生素对水生生物种群稳定和生态系统安全的影响提供基础数据支撑。

关键词: 红霉素;大型溞;生长繁殖;抗氧化系统;生态毒理

Ecotoxicity of erythromycin on reproduction, growth and genetic expression in *Daphnia magna*

LIU Jianchao¹, MA Yuchen¹, ZHANG Lingyu¹, REN Jinghua², LI Yiping¹, LU Guanghua^{1,*}

¹ Key Laboratory for Integrated Regulation and Resources Development on Shallow Lakes, Ministry of Education, College of Environment, Hohai University, Nanjing 210098, China

² Technology Innovation Center of Ecological Monitoring & Restoration Project on Land (arable), Ministry of Natural Resources, Geological Survey of Jiangsu Province, Nanjing 210018, China

Abstract: Erythromycin (ERM) is a macrolide antibiotic and is widely used to prevent and treat respiratory tract infections, acute pelvic inflammatory disease, amygdalitis, skin infection, and so on. ERM is of high concern due to their abundant occurrence in various environmental media and their toxic risk to aquatic organisms. However, knowledge on the molecular mechanisms of ERM toxicity and its effects on reproduction and growing development output remain scarce. In order to reveal the ecotoxicological effects of ERM on aquatic organisms, acute toxicity and chronic effects of reproduction, growth and development were conducted on the standard model organism *Daphnia magna*. The results of acute toxicity showed that the LC₅₀ of ERM for the 48 h and 96 h were 315.41 mg/L and 163.08 mg/L, respectively, belonging to low toxicity under the rules for classification and labelling of chemicals. In this experiment, 0.01‰ (2 μg/L) and 1‰ (200 μg/L) of 96 h-LC₅₀ were selected as the exposure concentrations for ERM chronic toxicity test. During the chronic toxicity test of 21 days, the ecological behavior indexes related to the growth, development and reproduction of *Daphnia magna* were recorded, and the population growth indexes were calculated. At the end of the 21-day exposure, the enzyme activities of

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(521709063); 耕地污染调查成果在基本农田保护修复中的应用试点研究(苏财建[2017]123号); 国家自然科学基金重点项目(52039003)

收稿日期: 2021-08-09; 网络出版日期: 2022-03-18

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: ghlu@hhu.edu.cn

antioxidant system and neurological system and the expression of genes related to growth, reproduction and metabolism of *Daphnia magna* were investigated. Following ERM exposure at concentrations of 2 $\mu\text{g/L}$ and 200 $\mu\text{g/L}$, phenotypic traits including growing development (body length, heart rate, thoracic limb activity) and fecundity (number of offspring, number of offspring per brood per female, intrinsic rate of increase) were obviously increased, and swimming activity (swimming trajectory and swimming speed) were clearly reduced. Lipid peroxidation malondialdehyde contents were significantly increased at day of 21, the antioxidant enzymes (superoxide dismutase and glutathione S-transferase) and neurotoxic enzymes (acetylcholinesterase) exhibited a trend towards inhibition at higher concentration, suggesting that ERM could result in oxidative damage and nerve conduction disorder. Upregulation of genes involved in reproductive and developmental process, including *vg1*, *vtg2*, *jhe*, *ecrb* and *cyp314* were observed, meanwhile the genes related to lipid metabolism and detoxification (*hr96* and *P-gp*) were clearly inhibited, which regulates the phenotypic traits and corresponding protein levels of *Daphnia magna*. The alterations in developmental and reproductive system as well as the disturbed antioxidant system and neurological system of zooplankton for ERM provides basic data support for revealing the effects of antibiotics on aquatic organism population stability and ecosystem security.

Key Words: erythromycin; *Daphnia magna*; growth and reproduction; anti-oxidation system; ecotoxicity

抗生素在中国广泛使用并不断检出,主要包括磺胺类、四环素类、大环内酯类、喹诺酮类和 β 内酰胺类。红霉素(ERM)作为一种大环内酯类抗生素,在中国江河湖泊及海域中检出频率和检出浓度相对偏高^[1]。中国海河中 ERM 最高达到 4200 ng/L ^[2], 辽河最高达到 2834 ng/L ^[3], 香港污水处理厂尾水中达到 3150 ng/L ^[4]。基于 ERM 的急性基准值(0.47 $\mu\text{g/L}$)和慢性基准值(0.10 $\mu\text{g/L}$),通过生态风险评估发现中国辽河、海河和珠江流域水体中 ERM 暴露风险需要关注,风险熵值在 0.17—10.1 之间^[5]。在中国 53 种用量较大抗生素风险评估中,ERM 是排在前十的优先关注高风险抗生素^[6]。研究发现 ERM 对浮游动物会产生影响,比如 ERM 会抑制多刺裸腹蚤(*Moina macrocopa*)的生长发育,造成氧化损伤,影响种群稳定^[7]。对于藻类,ERM 的暴露也会导致一系列的毒性效应。比如当 ERM 暴露浓度 $\geq 0.1 \mu\text{g/L}$ 时,水华微囊藻(*Microcystis flos-aquae*)体内丙二醛(MDA)和活性氧(ROS)含量会显著升高^[8]。ERM 暴露浓度为 10 $\mu\text{g/L}$ 时,微囊藻细胞内的超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)活性均显著增强^[9],影响细胞膜的通透性,造成氧化性损伤,并产生脂质过氧化物信号分子,导致细胞功能障碍和死亡^[8]。由此可见,ERM 长期暴露的潜在生态风险不容忽视。

为了揭示 ERM 长期暴露对水生生物的生态毒理效应,本实验选取标准模式生物大型蚤作为受试生物,以 ERM 急性毒性实验结果中 96 h-LC₅₀ 的 0.01‰ 和 1‰ 为暴露浓度,分析 ERM 对大型蚤生长发育、生殖和游泳等生态行为学指标的影响,测试大型蚤抗氧化系统和神经系统酶活性变化及生长繁殖代谢相关基因表达,分析 ERM 对大型蚤脂质代谢系统的影响,以期对 ERM 的毒理效应和污染防控提供借鉴。

1 材料和方法

1.1 实验材料

红霉素(ERM, CAS: 114-07-8)购买于百灵威科技有限公司;色谱级甲醇、乙醇、乙腈购买于 Merk 化工技术有限公司;受试生物大型蚤(*Daphnia magna*)由中国科学院水生生物研究所提供。大型蚤在实验之前驯化两周,驯化条件为:水温(21±1)℃,光暗周期 16 h:8 h,光照强度 1000 lx,每天定时喂食纯种斜生栅藻。

1.2 急性毒性实验

在预实验的基础上设置 10、50、100、150、200 mg/L 和 300 mg/L 这 6 个浓度,同时设置清水空白对照组和溶剂对照组(0.01%乙醇)。在实验中,往 100 mL 烧杯中加入 50 mL 目标浓度的暴露溶液,每个烧杯加 1 只健康幼蚤(6—24 h),每个浓度设置 20 个平行。实验周期为 96 h,在试验期间不进行喂食操作,也不更换暴露溶液。在实验开始后 24、48 和 96 h,分别观察和记录每个烧杯中幼蚤死亡的个数。

1.3 慢性毒性实验

根据急性毒性实验结果设置了两个暴露浓度 2 μg/L[实测浓度(1.92±0.026) μg/L]、200 μg/L[实测浓度(194.1±5.8) μg/L] 为慢性实验暴露组,同时设置清水空白对照组和溶剂对照组(0.01%乙醇)。在盛有 50 mL 暴露溶液的烧杯中随机放入 1 只 6—24 h 的健康幼溞,并设置 20 个平行。由于抗氧化损伤实验和荧光定量 PCR 实验测定时用溞量偏大,每个暴露组在 1000 mL 烧杯中加入 800 mL 暴露溶液,随机放置 150 只健康幼溞(6—24 h),设置 3 个平行,用于相关参数测定。暴露周期为 21 d,暴露期间实验条件维持在(21±1)℃,16:8 h(光:暗),每天喂食斜生栅藻,喂藻密度为 5×10⁴个/mL。每两天换水一次,换水时清洗烧杯。暴露期间记录各项指标:①母溞的产卵时间;②产卵数量;③21 d 时母溞的体长;④21 d 时母溞 1 min 内胸肢、心脏跳动频率;⑤21 d 时连续测定 30 s 游泳速度。大型溞种群增长、生长、生殖、游泳等行为指标参照张凌玉等^[10]的测定方法开展。

暴露 21 d 结束后,从清水对照、溶剂对照、2 μg/L 和 200 μg/L 的暴露组的每个平行样品中取出 50 只大型溞放置在液氮中保存,用于测定超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽硫转移酶(GST)、乙酰胆碱酯酶(AChE)和丙二醛(MDA)等生物标志物。生物标志物测定前,大型溞先用生理盐水冲洗,滤纸吸干表面水分,然后加入到已经称重的离心管中,用电子天平准确称取大型溞的重量,按重量(g):体积(mL)= 1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,在冰水浴条件下机械匀浆,匀浆液以 2500 r/min 转速离心 10 min,取上清液进行测定。抗氧化系统和神经系统酶活性的具体测定步骤参照 Wang 等^[11]和 Aksakal^[12]的方法进行。

另外,每个实验组取出 50 只大型溞,放入液氮中速冻 3—5 min,然后放入-80℃冰箱中保存。使用 Trizol 试剂进行总 RNA 提取,后用 TaKaRa 反转录试剂盒对总 RNA 进行逆转录合成 cDNA,然后进行特异性 PCR 扩增。目的基因测定引物序列见表 1,所有结果用两个内参基因(*actin* 和 *gapdh*)的 mRNA 水平和 C_q 值进行归一化。

表 1 目的基因及引物序列
Table 1 Target gene and primer sequence

目的基因 Target gene	检索号 Accession number	调控作用 Regulation	引物序列(5'—3') Primer sequence (5'—3')
<i>actin</i>	AJ292554	内参基因	GCCCTCTTCAGCCCTCATTCT TGGGGCAAGGCGGTGATT
<i>gapdh</i>	AJ292555		TGCTGATGCCCAATGTTTGTGT GCAGTTATGGCGTGGACGTTGT
<i>vg1</i>	AB114859	生殖	CCGTCGCTGAAGTCATCTTG ACAGTCTCGGAGCCAATCAA
<i>vtg2</i>	AB252738		CATTTCGAGACATGGGCAGAC GCACAGTCATTACGAGAACG
<i>jhe</i>	BJ932560	生长发育	TCTACAACAACCGCACGTT AATCGCATCTCAGGTGTGG
<i>ecrb</i>	AB274824		TCGCCAATAATCTGCCCTAC GTTCCGAAAAGATGACGATGG
<i>cyp314</i>	KC172920		ACTATGTATGGACTTCCCTGGTG TTATCGCGGCTGTCAACG
<i>P-gp</i>	AB257771	脂质代谢 解毒基因	CCACTTGCCTTCAACTTCTTC TTCGCCGATTGATGTTCC
<i>hr96</i>	NC_046179		GTCTGGGAAAGTTTGTGGACTCT GAACCTGCGTGAACAGCATCTA

gapdh: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; *vg1*: vitellogenin 1; *vtg2*: vitellogenin 2; *jhe*: juvenile hormone esterase; *ecrb*: ecdysone receptor
b; *cyp314*: cytochrome P450 314 family; *P-gp*: P-glycoprotein; *hr96*: toxicant nuclear receptor

1.4 统计分析

所有数据结果均采用 SPSS Statistics 22.0 统计软件进行单因素方差分析 (ANOVA), 以均值 $\pm$ 标准偏差的形式表示。数据可视化由 Origin 2019 实现。

2 结果与讨论

2.1 半致死浓度

在 10—300 mg/L 暴露溶液中, 大型蚤随着暴露浓度的增加, 死亡率不断提高。空白对照组和溶剂对照组死亡率 $<5\%$, 而低浓度组死亡率和对照组相比未见显著升高。通过使用 logistic 函数进行非线性回归计算, ERM 对大型蚤的 48 h-LC₅₀ 为 315.41 mg/L, 95% 置信区间为 247.39—398.11 mg/L, 96 h-LC₅₀ 为 163.08 mg/L, 95% 置信区间为 134.89—196.79 mg/L。以前研究发现 ERM 对大型蚤的 48 h 半致死浓度 (48 h-LC₅₀) 为 211 mg/L^[7], 对青鳉 (*Oryzias latipes*) 的 96 h 半致死浓度 (96 h-LC₅₀) 大于 100 mg/L^[7], 毒性低于大环内酯类抗生素罗红霉素, 罗红霉素对大型蚤的 48 h-LC₅₀ 和 96 h-LC₅₀ 分别为 60.26 mg/L 和 39.81 mg/L^[10]。根据化学品分类和标签规范第 28 部分: 对水生环境的危害 (GB 30000.28—2013) 的毒性等级划分^[13], ERM 对大型蚤的急性毒性为低毒。

2.2 对大型蚤生殖的影响

ERM 对大型蚤生殖指标的影响如表 2 所示, 清水对照和溶剂对照组大型蚤毒理数据无明显差异, 以下数据分析以溶剂对照组数据作为参照。高低两个 ERM 浓度组对大型蚤首胎产卵时间、首胎产卵个数均无显著影响, 轻微提升了大型蚤的产卵胎数。随着 ERM 暴露浓度的增加, 大型蚤平均每胎产卵数和 21 d 产卵总数不断增加, 高浓度组增加最为显著, 提升率分别为 50.6% 和 55.6%。从整个暴露过程来看, 高低两个浓度 ERM 均对大型蚤生殖能力产生诱导作用; 在 ERM 污染胁迫下, 随着暴露时间延长, 大型蚤产生生态补偿效应, 产卵量有所提升^[14], 暴露中期产卵量明显高于前期。

表 2 红霉素 (ERM) 对大型蚤生殖指标的影响

Table 2 Influence of ERM on reproductive index of *Daphnia magna*

指标 Index	对照组 Control group	ERM-2/ ($\mu\text{g/L}$)	ERM-200/ ($\mu\text{g/L}$)
第一胎产卵时间 Time to first brood/d	12.00 $\pm$ 1.00	12.07 $\pm$ 1.44	11.21 $\pm$ 1.18
第一胎产卵个数 Number of first brood per female /个	6.50 $\pm$ 3.16	5.00 $\pm$ 2.77	5.14 $\pm$ 2.54
产卵胎数 Brood times	2.79 $\pm$ 0.80	2.93 $\pm$ 1.00	3.77 $\pm$ 0.73
产卵总数 Total number of offspring/个	11.48 $\pm$ 3.15	15.44 $\pm$ 3.06	17.87 $\pm$ 2.69 *
平均每胎产卵数 Number of offspring per brood per female/个	4.17 $\pm$ 2.11	4.34 $\pm$ 2.40	6.28 $\pm$ 2.33 *
净生殖率 Net reproduction rate/个	21.56 $\pm$ 2.12	36.46 $\pm$ 1.12 *	42.57 $\pm$ 3.12 *
周限增长率 The finite rate of increase / (个/d)	1.13 $\pm$ 0.30	1.15 $\pm$ 0.24	1.15 $\pm$ 0.31
内禀增长率 The intrinsic rate of increase / (个/d)	0.121 $\pm$ 0.02	0.136 $\pm$ 0.04	0.139 $\pm$ 0.05 *

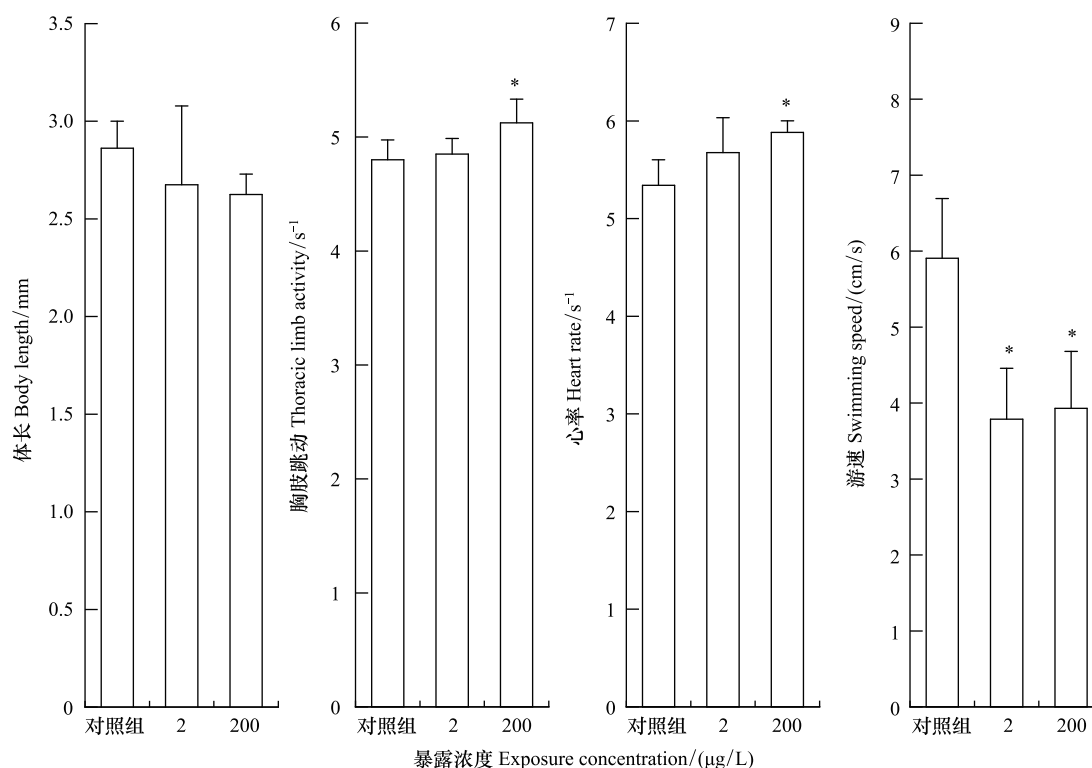
* 表示处理组与对照组的显著性差异, $P<0.05$

从 ERM 对大型蚤种群增长指标的影响来看 (表 2), 周限增长率在所有暴露组均无显著变化。高低两个 ERM 浓度暴露均显著提升大型蚤的净生殖率, 提升率分别达到 69% 和 97%。高浓度组 ERM 显著升高了内禀增长率, 这与罗红霉素慢性暴露的实验结果类似^[10]。ERM、罗红霉素等抗生素暴露下, 会引起大型蚤的种群繁殖能力提升, 导致生存所需的最低食物水平要求升高, 这在食物水平不足时可导致大型蚤因饥饿而死亡, 并影响寿命^[15]。根据衰老的进化理论, 过度生殖会消耗身体代谢的资源, 最终缩短大型蚤寿命和影响种群稳定^[16]。而本实验仅对大型蚤进行 21 d 慢性暴露实验, ERM 长期暴露对大型蚤全生命周期及世代的生殖和种群增长能力的影响仍需深入研究。

2.3 对大型蚤生长发育和游泳行为的影响

大型蚤心率、胸肢跳动频率和体长与大型蚤摄食、呼吸、代谢和内分泌系统等健康状况密切相关。从图 1

可以看出,高浓度组 ERM 轻微抑制了大型溞的体长,显著提高了大型溞胸肢和心脏跳动频次。高低两个暴露组 ERM 均对大型溞游速产生显著抑制作用,抑制率均超过 30%。



对大型溞的体长、胸肢跳动频率、心率和游泳速度的影响

Fig.1 Effect of ERM on body length, thoracic limb activity, heart rate and swimming speed of *Daphnia magna* after 21 d exposure

* 表示处理组与对照组的显著性差异, $P < 0.05$

大型溞体长变化是环境胁迫下生物体的一种防御机制,体长的改变虽然小,在实际生态环境中会显著影响大型溞的种群稳定^[17]。前期研究报道 400 µg/L 硫氰酸红霉素会抑制大型溞的体长增长^[18]。心率是反映污染物对大型溞血液循环系统影响的敏感生理指标^[19],心率紊乱说明大型溞器官可能受到损伤,呼吸能力下降^[20]。胸肢作为大型溞的摄食器官,受到心脏的能量供给和神经系统调控的双重作用完成摄食动作。心率过快一定程度上导致供给胸肢的能量过度输出,损耗身体机能,这与大型溞生长抑制和体长减短的结果相一致。游速常用于表征化学物质的有害影响的敏感可靠性生物指标^[21]。大型溞游泳能力不仅在游速方面受到显著抑制,高低两个浓度组都显著降低了大型溞的泳道密度,大型溞的移动范围变小(图 2),前期研究表明游泳活性的抑制会降低大型溞的生长发育和生殖功能^[22]。ERM 对大型溞游泳活性产生的抑制作用可能与 ERM 产生神经毒性相关^[21]。

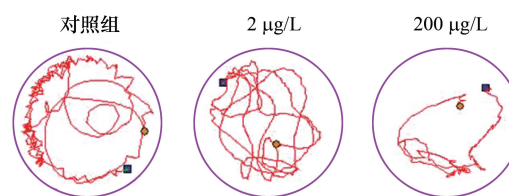


图 2 21 d 暴露后大型溞的游泳轨迹

Fig.2 Swimming trajectory of *Daphnia magna* after 21 d exposure

2.4 对大型溞抗氧化和神经系统的影响

为了研究 ERM 对大型溞抗氧化系统的影响,检测了大型溞 MDA 的含量和 SOD、GST 的酶活性,同时检测大型溞的 AChE 活性探究 ERM 潜在的神经毒性。根据图 3,高浓度 ERM 暴露显著增加了大型溞体内 MDA 含量,诱导量超过 2 倍。脂质过氧化产物 MDA 的过量产生将进一步影响 SOD 和 GST 酶活性,造成细胞膜损

伤^[23]。ERM 暴露下,高低两个暴露浓度组大型蚤 SOD 和 GST 酶活性都明显降低,高浓度暴露组 ERM 对 SOD 和 GST 的抑制率超过了 46%和 42%。同时,高低两个暴露组 ERM 都抑制了大型蚤 AChE 酶活性,最高浓度抑制率达到 39%。

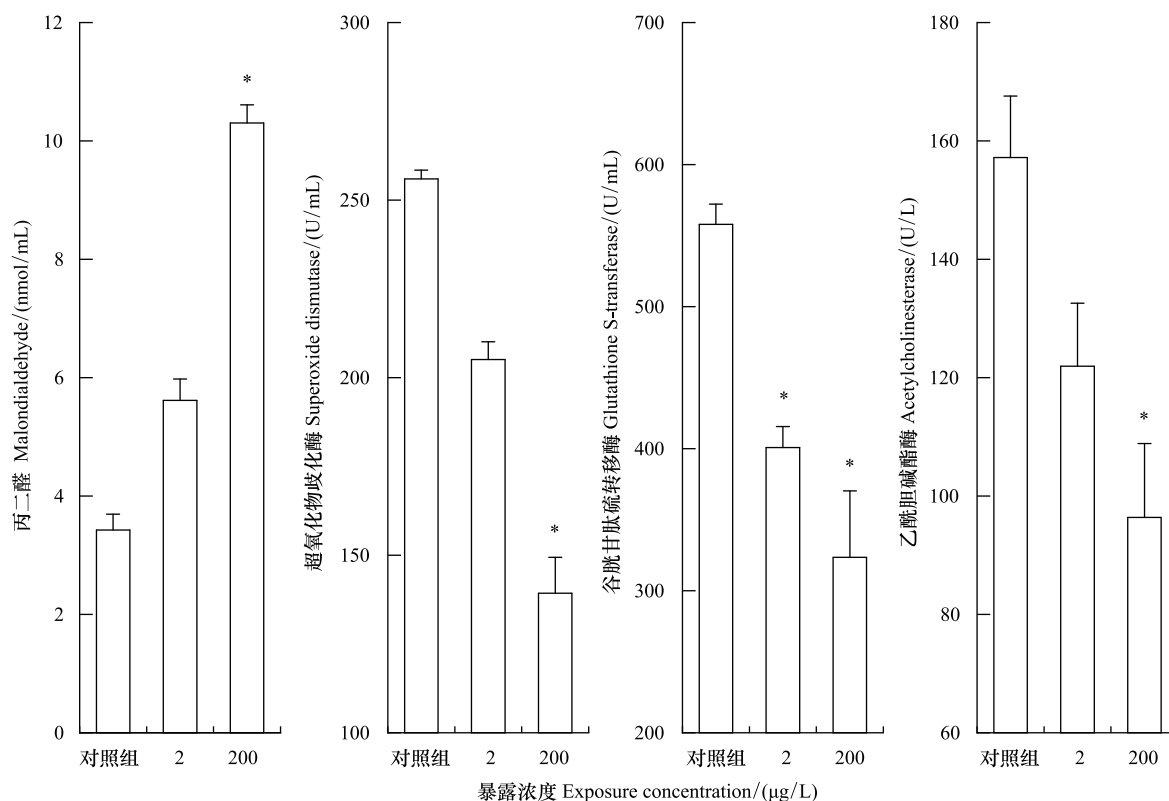


图3 21 d 暴露后红霉素(ERM)对大型蚤酶活性和丙二醛含量的影响

Fig.3 Effect of ERM on enzyme activities and malondialdehyde content of *Daphnia magna* after 21 d exposure

为了抵御 ROS 的氧化伤害,大型蚤体内 SOD、CAT、GST 和谷胱甘肽(GSH)等活性酶相互协同,形成抗氧化防御体系发挥抗氧化作用。SOD 和 CAT 构成抗氧化系统的第一道防线,SOD 能够歧化超氧化物自由基形成 H_2O_2 和 O_2 ^[24],CAT 将 H_2O_2 歧化成 H_2O 和 O_2 。CAT 含量不足时,GSH 可与 SOD 协同作用,用于清除 H_2O_2 ,而 GSH 的降低会进一步影响 GST 的抗氧化功能^[24]。在污染物胁迫作用下,生物体内清除 ROS 的速率小于 ROS 累积的速率,过量累积的 ROS 会对不饱和脂肪酸氧化或者过氧化,生成脂质过氧化产物 MDA,生物膜中不饱和脂肪酸减少,膜的流动性降低,通透性变差,导致营养物吸收效率降低,维生素和无机盐等营养失衡,最终造成生长发育受到抑制,生殖能力和免疫力降低^[25–26]。本研究发现,ERM 能够使大型蚤 MDA 含量增加,SOD 和 GST 活性减弱,尤其是高浓度 ERM 暴露后,大型蚤体内产生的过量 ROS 损害机体健康,抑制抗氧化酶的生成^[27],引起细胞膜损伤^[11]。

AChE 是无脊椎动物体内广泛存在的一种酶,能够保证生物神经信号正常传递,主要位于胆碱能神经末梢突触间隙,可通过降解神经递质乙酰胆碱^[28],降低它对乙酰胆碱受体的兴奋作用,保证神经传导。暴露 ERM 后,大型蚤 AChE 活性受到抑制,酶水解神经递质乙酰胆碱的能力减弱,导致乙酰胆碱受体过量而无法正常传递神经信号^[29],最终游速变慢。研究发现 AChE 活性的抑制和大型蚤游泳能力的削弱呈正相关^[30]。

2.5 对大型蚤基因转录的影响

2.5.1 对卵黄蛋白相关基因转录的影响

卵黄蛋白(vitellogenin)是胚胎发育的能量储备和内源性营养的主要来源^[31],受雌激素调控^[32]。卵黄蛋白 vg1 有助于卵黄的形成^[33],vtg2 是卵生动物卵黄蛋白的前体,它们通常被用作雌激素化合物的生物标志

物^[34]。暴露 21 d 时,相对于对照组,高浓度组 ERM 显著上调了 *vg1* 和 *vtg2* 表达(图 4),高浓度组 *vg1* 表达上调超过了 500%,暴露 21 d 时暴露组大型溞 *vg1* 和 *vtg2* 相对表达量均为正值(上调)。在秀丽隐杆线虫成年早期,过量的卵黄蛋白基因转录可以确保充分的卵黄蛋白合成能力,以达到最大的生殖率^[16]。在大型溞成年早期 *vg1* 和 *vtg2* 的转录水平相对偏高,以满足生殖需求^[16]。有研究结果表明药物扑热息痛短期暴露下,大型溞 *vtg* 表达随着暴露时间的延长会显著提高,在长期暴露扑热息痛对大型溞雌激素的干扰比短期更强^[35]。

2.5.2 对保幼激素和蜕皮激素相关基因转录的影响

甲壳类动物的生长发育主要受蜕皮激素、保幼激素及 *ecr* 受体和 *usp* 的转录调控^[36]。保幼激素调控大型溞卵黄蛋白的形成,对生物的生殖发育发挥作用^[36]。*jhe* 是保幼激素的编码基因。*Ecr* 是负责蜕皮激素合成的基因,*ecrb* 主要参与调节大型溞的蜕皮过程,而蜕皮和大型溞的生长有关^[37]。*cyp314* 基因参与主要蜕皮激素的生物合成^[38],可以介导蜕皮激素由无活性向活性形态 20-HE 转化^[39]。从图 4 可以看出,高浓度组 ERM 上调了 *jhe*、*ecrb* 和 *cyp314* 基因表达,低浓度组 ERM 显著促进了 *jhe* 和 *cyp314* 基因表达,说明 ERM 暴露后大型溞的保幼激素和蜕皮激素合成受到促进,导致大型溞的繁殖显著提升^[40]。由于大型溞的蜕皮周期和生殖周期同步,蜕皮激素合成发生变化在一定程度上反映了污染物对大型溞生殖能力的干扰^[41]。大型溞蜕皮激素的合成不仅涉及 *cyp314*、*ecrb* 基因的表达,同时还与多种信号通路(如视网膜 X 受体)有关^[42],ERM 全生命周期或世代暴露下,大型溞 *cyp314*、*Ecr* 等基因表达与繁殖能力的关系需要进一步研究。

2.5.3 对脂质代谢和解毒相关基因转录的影响

在无脊椎动物中,*hr96* 是核受体 *NR1J* 组中重要的毒物受体^[43]。在哺乳动物中,*hr96* 与 *NR1I*(*PXR*/*CAR*/*VDR*)等核受体基因同源,可以调控 I 和 II 相解毒基因的表达^[35]。*hr96* 还可以调控多个参与脂质吸收的基因,并通过内稳态和运输三酰基甘油、胆固醇介导能量代谢^[36, 44],调节涉及胆固醇和脂肪酸稳态的 *npc* 基因组^[36]。在大型溞的整个生命周期,脂质代谢进程保障其生存和繁殖,脂质代谢过程如果被破坏,脂肪酸摄取和分解脂质相关的酶受到抑制,会导致生物以脂肪的形式储存能量,影响健康^[45]。*P-gp*(*P-glycoprotein*)是一种通过 ATP 能量协助外源性化合物跨膜转运的基因,在外源性物质解毒方面起重要作用,生物体的 *P-gp* 活性与环境胁迫的抵抗和适应有关,相当于环境和生物组织之间的屏障^[42]。*P-gp* 编码基因是 *hr96* 的下游靶基因,它们的表达有一定相似性^[35]。从图 4 可以看出,高低两个 ERM 暴露组都使 *P-gp* 的相对表达量降低,高浓度 ERM 导致 *hr96* 表达显著下调。相似的结果在药物氟西汀和扑热息痛暴露中也被发现,50 $\mu\text{g/L}$ 浓度暴露下两种药物均显著抑制了 *hr96* 基因表达^[35, 46],解毒系统功能受到抑制会造成氧化损伤^[35]。污染胁迫下,*hr96* 和 *P-gp* 基因能够协同 CYP450s 去除体内的外源性污染物,但长期暴露污染物会引起大型溞解毒系统紊乱。

3 结论

ERM 对大型溞的急性毒性为低毒,48 h-LC₅₀ 和 96 h-LC₅₀ 分为 315.41 mg/L 和 163.08 mg/L。在暴露初期高浓度 ERM 导致大型溞内禀增长率和生殖能力显著升高,ACHe 活性被抑制,大型溞体长变短,心跳和胸肢跳动加快,游速减慢,生长发育受到影响,同时干扰大型溞的脂质代谢,体内 MDA 含量增加,过多自由基产生导致 SOD 和 GST 活性抑制,细胞膜损伤。ERM 显著影响大型溞生殖的相关基因 *vg1* 和 *vtg2* 表达,上调保幼激素和蜕皮激素相关的基因 *jhe*、*ecrb* 和 *cyp314* 表达,下调解毒相关基因 *hr96* 和 *P-gp* 的表达,最终引起免疫力

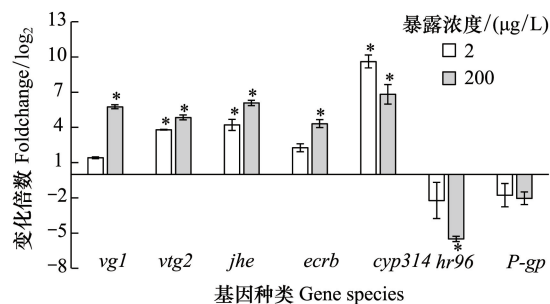


图 4 21 d 暴露后 ERM 对大型溞基因相对转录量的影响

Fig.4 Effect of ERM on relative gene transcription of *Daphnia magna* after 21 d exposure

低下和生长抑制,表明 ERM 长期暴露影响浮游生物种群稳定和生态系统安全。

参考文献 (References):

- [1] Li W, Xu X J, Lyu B, Tang Y, Zhang Y L, Chen F, Korshin G. Degradation of typical macrolide antibiotic roxithromycin by hydroxyl radical: kinetics, products, and toxicity assessment. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(14): 14570-14582.
- [2] Chen H Y, Jing L J, Teng Y G, Wang J S. Characterization of antibiotics in a large-scale river system of China: occurrence pattern, spatiotemporal distribution and environmental risks. *Science of the Total Environment*, 2018, 618: 409-418.
- [3] Bai Y W, Meng W, Xu J, Zhang Y, Guo C S. Occurrence, distribution and bioaccumulation of antibiotics in the Liao River Basin in China. *Environmental Science: Processes & Impacts*, 2014, 16(3): 586-593.
- [4] Leung H W, Minh T B, Murphy M B, Lam J C W, So M K, Martin M, Lam P K S, Richardson B J. Distribution, fate and risk assessment of antibiotics in sewage treatment plants in Hong Kong, South China. *Environment International*, 2012, 42: 1-9.
- [5] 陈丽红, 张瑜, 丁婷婷, 孟甜, 肖欣欣, 曹莹. 红霉素水生生物基准推导和对我国部分水体生态风险初步评估. *生态环境学报*, 2020, 29(8): 1610-1616.
- [6] 周力, 刘珊, 郭家骅, 李琦. 基于生态风险的我国水环境高风险抗生素筛选排序. *环境科学*, 2021, 42(6): 2748-2757.
- [7] Ji K, Kim S, Han S, Seo J, Lee S, Park Y, Choi K, Kho Y L, Kim P G, Park J, Choi K. Risk assessment of chlortetracycline, oxytetracycline, sulfamethazine, sulfathiazole, and erythromycin in aquatic environment: are the current environmental concentrations safe? *Ecotoxicology*, 2012, 21(7): 2031-2050.
- [8] Wan J J, Guo P Y, Peng X F, Wen K Q. Effect of erythromycin exposure on the growth, antioxidant system and photosynthesis of *Microcystis flos-aquae*. *Journal of Hazardous Materials*, 2015, 283: 778-786.
- [9] Yang F, Miao L F. Adaptive responses to progressive drought stress in two poplar species originating from different altitudes. *Silva Fennica*, 2010, 44(1): 23-37.
- [10] 张凌玉, 刘建超, 冷阳, 陆光华. 罗红霉素对大型溞生殖生长及抗氧化系统的影响. *环境科学*, 2021, 42(6): 3074-3083.
- [11] Wang L, Peng Y, Nie X P, Pan B B, Ku P J, Bao S. Gene response of CYP360A, CYP314, and GST and whole-organism changes in *Daphnia magna* exposed to ibuprofen. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2016, 179: 49-56.
- [12] Aksakal F I. Evaluation of boscalid toxicity on *Daphnia magna* by using antioxidant enzyme activities, the expression of genes related to antioxidant and detoxification systems, and life-history parameters. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology*, 2020, 237: 108830.
- [13] 郭婧颖, 刘建超, 李帅衡, 杭之昊, 陆光华. 双酚 AF 对大型溞生殖、生长等生态行为的影响. *中国环境科学*, 2019, 39(10): 4394-4400.
- [14] 张洪昌, 陈良燕, 刘树深, 尹大强. BPA 与 3 种双酚类化合物的联合作用雌激素效应. *环境科学*, 2009, 30(1): 260-265.
- [15] Tessier A J, Woodruff P. Trading off the ability to exploit rich versus poor food quality. *Ecology Letters*, 2002, 5(5): 685-692.
- [16] DePina A S, Iser W B, Park S S, Maudsley S, Wilson M A, Wolkow C A. Regulation of *Caenorhabditis elegans* vitellogenesis by DAF-2/HIS through separable transcriptional and posttranscriptional mechanisms. *BMC Physiology*, 2011, 11(1): 11.
- [17] Imhof H K, Rusek J, Thiel M, Wolinska J, Laforsch C. Do microplastic particles affect *Daphnia magna* at the morphological, life history and molecular level? *PLoS One*, 2017, 12(11): e0187590.
- [18] Meinertz J R, Schreier T M, Bernardy J A. Chronic toxicity of erythromycin thiocyanate to *Daphnia magna* in a flow-through, continuous exposure test system. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 2011, 87(6): 621-625.
- [19] Huang Q S, Fang C, Wu X L, Fan J L, Dong S J. Perfluorooctane sulfonate impairs the cardiac development of a marine medaka (*Oryzias melastigma*). *Aquatic Toxicology*, 2011, 105(1/2): 71-77.
- [20] Pan Y, Yan S W, Li R Z, Hu Y W, Chang X X. Lethal/sublethal responses of *Daphnia magna* to acute norfloxacin contamination and changes in phytoplankton-zooplankton interactions induced by this antibiotic. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 40385.
- [21] Bownik A, Ślaska B, Bochra J, Gumieniak K, Gałek K. Procaine penicillin alters swimming behaviour and physiological parameters of *Daphnia magna*. *Environmental Science and Pollution Research*, 2019, 26(18): 18662-18673.
- [22] Parolini M, De Felice B, Ferrario C, Salgueiro-González N, Castiglioni S, Finizio A, Tremolada P. Benzoylcegonine exposure induced oxidative stress and altered swimming behavior and reproduction in *Daphnia magna*. *Environmental Pollution*, 2018, 232: 236-244.
- [23] Fernandes C, Fontainhas-Fernandes A, Ferreira M, Salgado M A. Oxidative stress response in gill and liver of *Liza saliens*, from the Esmoriz-Paramos coastal lagoon, Portugal. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2008, 55(2): 262-269.
- [24] Zhang Q F, Li Y W, Liu Z H, Chen Q L. Exposure to mercuric chloride induces developmental damage, oxidative stress and immunotoxicity in zebrafish embryos-larvae. *Aquatic Toxicology*, 2016, 181: 76-85.
- [25] 李杜文, 华智杰, 张文香, 任海, 张玉, 靳晓敏, 高桂生, 李佩国. 金属蛋白酶对大菱鲆血清抗氧化酶活性及丙二醛含量的影响. *海洋科学*, 2019, 43(4): 52-60.
- [26] Viarengo A, Canesi L, Garcia Martinez P, Peters L D, Livingstone D R. Pro-oxidant processes and antioxidant defence systems in the tissues of the Antarctic scallop (*Adamussium colbecki*) compared with the Mediterranean scallop (*Pecten jacobaeus*). *Comparative Biochemistry and Physiology Part B: Biochemistry and Molecular Biology*, 1995, 111(1): 119-126.

- [27] 姜航, 丁剑楠, 黄叶菁, 陈微懿, 邹华, 史红星. 聚苯乙烯微塑料和罗红霉素对斜生栅藻 (*Scenedesmus obliquus*) 和大型溞 (*Daphnia magna*) 的联合效应研究. 生态环境学报, 2019, 28(7): 1457-1465.
- [28] 王召, 彭舒, 孟立霞. 噻虫嗪对鲫鱼的急性毒性和抗氧化酶及乙酰胆碱酯酶活性的影响. 水产科学, 2020, 39(6): 922-927.
- [29] Trac L N, Andersen O, Palmqvist A. Deciphering mechanisms of malathion toxicity under pulse exposure of the freshwater cladoceran *Daphnia magna*. Environmental Toxicology and Chemistry, 2016, 35(2): 394-404.
- [30] Printes L B, Callaghan A. Intracloal variability in *Daphnia* acetylcholinesterase activity: the implications for its applicability as a biomarker. Environmental Toxicology and Chemistry, 2003, 22(9): 2042-2047.
- [31] Subramoniam T. Mechanisms and control of vitellogenesis in crustaceans. Fisheries Science, 2011, 77(1): 1-21.
- [32] Jones P D, De Coen W M, Tremblay L, Giesy J P. Vitellogenin as a biomarker for environmental estrogens. Water Science and Technology, 2000, 42(7/8): 1-14.
- [33] Mahapatra S, Kabita S, Bhattacharya D, Sarkar S, Juin S K, Maitra S, Nath P. Purification and development of ELISAs for two forms of vitellogenin in Indian walking catfish, *Clarias batrachus* (L.). Fish Physiology and Biochemistry, 2017, 43(2): 477-491.
- [34] Jo M, Lee S, Yoon S, Kim W K. Developmental and reproductive effects of tamoxifen on *Daphnia magna*. Environmental Monitoring and Assessment, 2018, 190(11): 677.
- [35] Ding R, Liu S J, He C P, Nie X P. Paracetamol affects the expression of detoxification- and reproduction-related genes and alters the life traits of *Daphnia magna*. Ecotoxicology, 2020, 29(4): 398-406.
- [36] Seyoum A, Pradhan A, Jass J, Olsson P E. Perfluorinated alkyl substances impede growth, reproduction, lipid metabolism and lifespan in *Daphnia magna*. Science of the Total Environment, 2020, 737: 139682.
- [37] Kato Y, Kobayashi K, Oda S, Tatarazako N, Watanabe H, Iguchi T. Cloning and characterization of the ecdysone receptor and ultraspiracle protein from the water flea *Daphnia magna*. Journal of Endocrinology, 2007, 193(1): 183-194.
- [38] Aksakal F I, Arslan H. Detoxification and reproductive system-related gene expression following exposure to Cu(OH)₂ nanopesticide in water flea (*Daphnia magna* Straus 1820). Environmental Science and Pollution Research, 2020, 27(6): 6103-6111.
- [39] Bao S, Pan B B, Wang L, Cheng Z, Liu X Y, Zhou Z S, Nie X P. Adverse effects in *Daphnia magna* exposed to e-waste leachate: assessment based on life trait changes and responses of detoxification-related genes. Environmental Research, 2020, 188: 109821.
- [40] Yang H H, Lu G H, Yan Z H, Liu J C. Influence of suspended sediment on the bioavailability of benzophenone-3: Focus on accumulation and multi-biological effects in *Daphnia magna*. Chemosphere, 2021, 275: 129974.
- [41] Sumiya E, Ogino Y, Miyakawa H, Hiruta C, Toyota K, Miyagawa S, Iguchi T. Roles of ecdysteroids for progression of reproductive cycle in the fresh water crustacean *Daphnia magna*. Frontiers in Zoology, 2014, 11(1): 60.
- [42] Liu Y, Ding R, Pan B B, Wang L, Liu S J, Nie X P. Simvastatin affect the expression of detoxification-related genes and enzymes in *Daphnia magna* and alter its life history parameters. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 182: 109389.
- [43] Bertrand S, Brunet F G, Escriva H, Parmentier G, Laudet V, Robinson-Rechavi M. Evolutionary genomics of nuclear receptors: From twenty-five ancestral genes to derived endocrine systems. Molecular Biology and Evolution, 2004, 21(10): 1923-1937.
- [44] Sengupta N, Reardon D C, Gerard P D, Baldwin W S. Exchange of polar lipids from adults to neonates in *Daphnia magna*: Perturbations in sphingomyelin allocation by dietary lipids and environmental toxicants. PLoS One, 2017, 12(5): e0178131.
- [45] Janesick A, Blumberg B. Endocrine disrupting chemicals and the developmental programming of adipogenesis and obesity. Birth Defects Research, Part C-Embryo Today: Reviews, 2011, 93(1): 34-50.
- [46] Karimullina E, Li Y C, Gijupalli G K, Baldwin W S. *Daphnia* HR96 is a promiscuous xenobiotic and endobiotic nuclear receptor. Aquatic Toxicology, 2012, 116-117: 69-78.