

杨瑞泉, 叶婷, 冯雪, 肖洁美, 李冕, 杨大星, 李灿. 再生水对斑马鱼幼鱼下丘脑-垂体-甲状腺轴相关基因转录水平的影响[J]. 应用与环境生物学报, 2022, 28 (1): 208-214

Yang RQ, Ye T, Feng X, Xiao JM, Li M, Yang DX, Li C. Effects of reclaimed water on gene transcription of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebra fish larvae (*Danio rerio*) [J]. *Chin J Appl Environ Biol*, 2022, 28 (1): 208-214

再生水对斑马鱼幼鱼下丘脑-垂体-甲状腺轴相关基因转录水平的影响

杨瑞泉 叶婷 冯雪 肖洁美 李冕 杨大星 李灿✉

贵阳学院生物与环境工程学院/贵州省山地珍稀动物与经济昆虫重点实验室 贵阳 550005

摘 要 再生水中具有多种微量内分泌干扰化合物, 对水体生物具有潜在危害. 为探究再生水对斑马鱼分子水平的甲状腺内分泌干扰效应, 以斑马鱼幼鱼为研究对象, 将斑马鱼幼鱼分别暴露于再生水中3 d和7 d后, 然后在洁净水体中恢复7 d, 采用实时荧光定量PCR方法测定下丘脑-垂体-甲状腺轴上关键基因的转录水平. 结果显示, 与对照组相比, 再生水暴露3 d、7 d和自来水恢复7 d对斑马鱼幼鱼存活率没有显著影响. 与对照组相比, 再生水暴露3 d后, 斑马鱼幼鱼*Trh*、*Dio2*、*Thra*、*Thrb*基因转录水平显著上调($P < 0.05$), *Dio1*基因转录水平显著下调($P < 0.05$). 再生水暴露7 d后, *Trh*、*Tshb*、*Dio2*、*Nis*、*Thrb*基因转录水平相对于对照组显著下调($P < 0.05$), *Dio1*、*Thra*基因转录水平极显著下调($P < 0.01$); 自来水恢复7 d后, 斑马鱼幼鱼*Trh*、*Dio1*、*Dio2*、*Nis*、*Thra*、*Thrb*基因转录水平相对于对照组无显著改变($P > 0.05$), 仅*Tshb*基因转录水平显著下调($P < 0.05$). 本研究表明再生水影响了斑马鱼幼鱼HPT轴相关基因的转录水平, 在洁净水体中恢复可减弱再生水对斑马鱼幼鱼HPT轴相关基因的影响, 结果可为再生水中的内分泌干扰物生态毒性效应及风险评估提供理论依据. (图4 表1 参36)

关键词 再生水; 斑马鱼幼鱼; 下丘脑-垂体-甲状腺; 内分泌干扰效应

Effects of reclaimed water on gene transcription of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebra fish larvae (*Danio rerio*)

YANG Ruiquan, YE Ting, FENG Xue, XIAO Jiemei, LI Mian, YANG Daxing & LI Can✉

College of Biology and Environmental Engineering, Guiyang University / Guizhou Provincial Key Laboratory for Rare Animal and Economic Insects of the Mountainous Region, Guiyang 550005, China

Abstract There are many trace endocrine disrupting compounds in reclaimed water, and it can be potentially harmful to aquatic organisms. Therefore, to investigate the effects of reclaimed water on thyroid endocrine disruption at molecular level in zebra fish, zebra fish larvae were used as the research object in this study. Zebra fish larvae were exposed to reclaimed water for 3 to 7 days and then recovered in clean water for 7 days. Quantitative real-time polymerase chain reaction was used to measure the transcription levels of key genes in the hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis. Results showed that compared with that of the control group, the survival rate of zebra fish larvae was not significantly affected by reclaimed water exposure. Compared with those of the control group, the transcription levels of *Trh*, *Dio2*, *Thra*, and *Thrb* genes of zebra fish larvae were significantly increased ($P < 0.05$) and the transcription levels of *Dio1* gene was significantly decreased ($P < 0.05$) after reclaimed water exposure for 3 days. After reclaimed water exposure for 7 days, the transcription levels of *Trh*, *Tshb*, *Dio2*, *Nis*, and *Thrb* genes were significantly decreased ($P < 0.05$), and the transcription levels of *Dio1* and *Thra* genes were extremely down-regulated ($P < 0.01$) compared with the those of the control group in zebra fish larvae. After tap water recovery for 7 days, the transcription levels of *Trh*, *Dio1*, *Dio2*, *Nis*, *Thra*, and *Thrb* genes were not significantly changed compared with those of the control group ($P > 0.05$), but the transcription levels of *Tshb* was significantly decreased ($P < 0.05$) in zebra fish larvae. In conclusion, reclaimed water affected the transcription levels of HPT axis-related genes in zebra fish larvae. The effects of reclaimed water on HPT axis-

收稿日期 Received: 2021-06-28 接受日期 Accepted: 2021-11-09

贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2018]1005)、贵州省普通高等学校青年科技人才成长项目(黔教合KY字[2019]096)、贵阳市财政支持贵阳学院学科与硕士点建设项目(SH-2020)、国家级大学生创新创业训练计划项目(202010976009)和贵阳学院校级大学生创新创业训练计划项目(0203035004004)资助 Supported by the Science and Technology Foundation of Guizhou Province ([2018]1005), the Development Project of Youth Science and Technology Foundation of Colleges and Universities in Guizhou Province ([2019]096), the Financial Supporting Guiyang University Disciplines and Master Program Construction Projects of Guiyang (SH-2020), the National College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program (202010976009), and the College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Program of Guiyang University (0203035004004)

✉通信作者 Corresponding author (Email: lican790108@163.com)

related genes in zebra fish larvae were recovered after tap water exposure. This study provides a theoretical basis for ecotoxicity effect and risk assessment of endocrine-disrupting chemicals in reclaimed water.

Keywords reclaimed water; zebra fish larvae; hypothalamus-pituitary-thyroid; endocrine disrupting effect

作为一种稳定可靠的水资源,再生水(reclaimed water)已经广泛用于景观用水补给、农田灌溉、绿地灌溉及工业用水等^[1]。虽然污水处理技术正不断完善,但再生水中仍能检测出多种微量污染物,随着再生水回用于水体补给、农业灌溉及其他途径,再生水中残留的污染物会释放进入环境中从而产生诸多潜在健康危害^[2]。据报道,再生水中检测出多种微量内分泌干扰化合物,如类固醇[雌二醇(17β -Estradiol, E2)、雌酮、炔雌醇]、烷基酚(4-叔辛基苯酚、4-壬基酚、双酚A)和邻苯二甲酸酯[邻苯二甲酸二正丁酯、邻苯二甲酸二异丁酯、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(Di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)]等化合物^[3]。水环境中内分泌干扰物的浓度在微量(ng/L)时就可能会干扰水生生物的内分泌系统,从而引起内分泌干扰效应^[4],目前关于再生水中内分泌干扰物分子水平上的干扰效应研究相当有限。

再生水中存在多种微量的已知和未知的污染物,无法通过检测水体理化参数、污染物浓度等常规水质参数来全面评价再生水的综合安全性。生物毒性测试法是一种快速、灵敏的方法,可用于测量水中多种化合物的整体毒性及评价再生水的安全性^[5]。近年来已有学者使用生物毒性测试法对再生水进行评估,研究结果表明再生水干扰了水生生物的生长发育,如Planelló等发现再生水显著影响摇蚊幼虫中卵黄原蛋白(vitellogenin, Vtg)、热休克蛋白、热休克同源蛋白基因转录水平,并损伤了摇蚊幼虫的发育速度和繁殖力^[6]。孙青将斜生栅藻作为受试生物,发现再生水即使经过次氯酸钠(NaClO)消毒仍会对斜生栅藻的细胞膜造成明显破坏,并抑制藻活性^[7]。Sun等发现暴露于贾鲁河水中的雄性斑马鱼Vtg被显著诱导,辜酮和E2表达异常,这表明再生水排入贾鲁河后即使经过河流净化,河水中仍具有对水生生物产生雌激素活性的化合物^[8]。Pablos等研究表明非洲爪蟾蝌蚪变态期间接触再生水会发生甲状腺组织病变,如滤泡扩张、胶质生成增加、轻度上皮增生等,并出现尾部畸形、体重和体长增加的现象^[9],但未阐明再生水对非洲爪蟾蝌蚪甲状腺内分泌系统的分子干扰机制,关于再生水对水生生物甲状腺内分泌干扰的分子机制需要进一步研究。环境污染物对生物机体的作用是从分子水平开始的,分子效应是生态毒理效应中最早期、最灵敏的效应,然后逐步在细胞、器官、个体、种群、群落、生态系统各个水平上反映出来,因此分析再生水对水生生物甲状腺内分泌干扰分子水平的影响有助于预警污染物毒性水平。

斑马鱼是一种理想的模式生物,因其体型小、易于繁育、胚胎透明容易观察等优点,广泛应用于毒理学领域研究中^[10-11]。在鱼类早期生命阶段,甲状腺作为内分泌系统的重要组成部分控制着鱼类的生长发育,鱼类在此阶段也容易受到环境污染物的影响,斑马鱼胚胎/幼体被认为是评估污染物对甲状腺内分泌干扰的可靠模型^[12]。下丘脑-垂体-甲状腺轴(hypothalamus-pituitary-thyroid, HPT)是一个负责调节激素合成、分泌、转运和代谢的通路,对生物的生长发育具有重要作用^[13]。研究表明暴露在环境污染物中的鱼类甲状腺激素受体(thyroid hormone receptor, Thr)和脱碘酶(deiodinase, Dio)等基因表达水平是评估甲状腺干扰的敏感分子生物标志物^[14-15]。HPT轴的刺激来自

大脑传递来的信号,通过控制下丘脑分泌促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, Trh)作用于垂体,进而调节垂体分泌促甲状腺激素(thyroid stimulating hormone, Tsh),Tsh通过血液循环系统进入甲状腺细胞,促使甲状腺激素(thyroid hormones, THs)的合成与分泌。钠碘转运体(sodium/iodide symporter, Nis)将碘化物转移到甲状腺滤泡细胞中合成THs,THs包含四碘甲状腺原氨酸(4'-triiodothyronine, T4)和三碘甲状腺原氨酸(3'-triiodothyronine, T3),T4在Dio的作用下形成T3,THs通过血液循环到靶细胞后,与Thr结合调节机体的新陈代谢、生长发育、生殖等生理活动。同时,它们经过血液循环系统反馈给下丘脑和垂体以调节Trh和Tsh的合成与分泌。HPT轴相关基因转录水平已经广泛用于研究污染物对甲状腺内分泌干扰的分子机制,如Chen等采用斑马鱼HPT轴研究发现氟能显著抑制斑马鱼的生长、引起甲状腺组织病变,并通过影响雄性斑马鱼甲状腺激素水平和内分泌相关基因表达而显著影响甲状腺内分泌系统^[10]。Jia等利用斑马鱼HPT轴研究DEHP引起斑马鱼甲状腺内分泌干扰的分子机制^[11]。根据内分泌干扰物暴露时间、持续时间、浓度、受试物种的不同,内分泌干扰物可能会对生物体造成暂时或永久的影响,评估生物体受到污染物的内分泌干扰影响后是否具有恢复能力成为一个重要的研究课题^[16],已有研究发现一些鱼类在接触化学品后部分受损的机体功能能够恢复到正常水平^[17]。

本研究以斑马鱼幼鱼为受试生物,对贵阳市某再生水厂的再生水进行评价,将斑马鱼幼鱼直接暴露于再生水7 d,为探究斑马鱼幼鱼接触再生水后是否存在恢复能力,转入自来水中恢复7 d,利用荧光定量PCR技术(quantitative real-time PCR, RT-PCR)分析再生水对斑马鱼幼鱼HPT轴相关基因表达的影响,从分子水平分析再生水对斑马鱼幼鱼内分泌干扰效应,即分析再生水对斑马鱼幼鱼Trh、Nis、I型脱碘酶(deiodinase Iodothyronine type I, Dio1)、II型脱碘酶(deiodinase Iodothyronine type II, Dio2)、甲状腺激素受体 α (thyroid hormone receptor alpha, Thra)、甲状腺激素受体 β (thyroid hormone receptor beta, Thr β)及促甲状腺激素 β (thyroid stimulating hormone beta, Tsh β)基因转录水平的影响,通过斑马鱼HPT轴相关基因水平的变化情况评价再生水的安全性及生态影响,预测或早期警报是否有生态风险发生的可能。

1 材料与方

1.1 试验材料

斑马鱼幼鱼:将购买自上海费曦生物科技有限公司的斑马鱼鱼卵在实验室内进行孵化,饲养用水为充分曝气除氯的自来水,每天定时喂饲料一次,人工气候箱培养的光照周期为14 h:10 h,温度为(28 ± 0.5) $^{\circ}\text{C}$,湿度为70%,每日换水,驯化一周后筛选健康活泼的斑马鱼幼鱼进行实验。

试验再生水采集自贵阳市某再生水厂,该再生水系统是利

河道补给,水样采集后立即运送至实验室进行斑马鱼幼鱼暴露实验。

1.2 仪器与试剂

仪器:台式(常温/低温)离心机(Microfuge 20R,美国贝克曼库尔特公司);超净工作台(SW-CJ-1FD,上海博迅);超微量分光光度计(NanoDrop 2000赛默飞世尔科技公司);T100TM Thermal Cycler 梯度PCR仪(美国BIO-RAD公司),CFX96TM PCR 仪(美国BIO-RAD公司);超纯净水系统(成都唐氏康宁科技发展有限公司)。

试剂:RNA提取试剂盒购自中国大连宝生物公司;反转录试剂盒、RT-PCR试剂盒均购自北京全式金生物技术有限公司。

1.3 再生水对斑马鱼幼鱼的暴露实验

斑马鱼幼鱼暴露试验分别设置自来水对照组和再生水实验组,自来水对照组为充分曝气除氯的洁净自来水。根据OECD 准则来指导斑马鱼幼鱼的暴露试验,再生水试验组的幼鱼首先暴露在再生水中7 d,然后在除氯曝气自来水中暴露7 d。每个处理设置3个平行。在培养皿内加入20 mL暴露液,每个玻璃培养皿内含有30条幼鱼,每天定时喂食饲料两次,暴露液每天更换一次,记录斑马鱼幼鱼死亡数量,及时清除死鱼(斑马鱼幼鱼无任何反应即确认死亡)。暴露3 d、7 d和14 d时,每个平行随机挑选5条幼鱼,将幼鱼吸入灭菌烘干的1.5 mL离心管中并保存于-80 °C冰箱以备后续实验。

1.4 下丘脑-垂体-甲状腺Real-time PCR测定

将冻存的斑马鱼幼鱼样品置于冰盒内,采用玻璃匀浆器在冰上研磨,按照RNA试剂盒说明书的方法步骤提取斑马鱼幼鱼总RNA,采用核酸检测仪检测其RNA浓度,并进行琼脂糖凝胶电泳检测RNA质量,快速置于-80 °C冰箱保存。根据反转录试剂盒的说明操作将总RNA反转录成cDNA,并放置于-20 °C保存备用。实时荧光定量PCR按照试剂盒说明书进行操作,每个RT-PCR反应体系为20 μ L,包括10 μ L 2 $\times$ TransStart Top Green qPCR SuperMix 试剂,7 μ L DEPC水,1 μ L cDNA样品,1 μ L 上游引物和1 μ L下游引物。RT-PCR 扩增程序为:首先进行95 °C预变性3 min;然后95 °C变性30 s,60 °C退火30 s,72 °C延伸30 s,进行40个循环;最后熔解曲线的测定是从60-95 °C。基因引物序列参考梁艳燕秋的报道^[18],见表1,内参采用 β -肌动蛋白(β -actin),所得数据用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法处理。

1.5 数据统计与分析

实验数据均以“平均值 $\pm$ 标准差”(mean $\pm$ SD)表示,SigmaPlot 10.0软件完成制图,采用SPSS 16.0软件通过T-test检验对照组与试验组的差异显著性($P < 0.05$ 和 $P < 0.01$,表示差异显著)。

2 结果与分析

2.1 再生水和自来水暴露对斑马鱼幼鱼存活率影响

斑马鱼幼鱼暴露在自来水对照组和再生水试验组不同时间的存活率见图1。与对照组相比,再生水对斑马鱼幼鱼暴露3 d、7 d的存活率无显著影响($P > 0.05$);经自来水恢复7 d后,斑马鱼幼鱼存活率出现降低,但与自来水对照组相比不存在显著差异($P > 0.05$)。

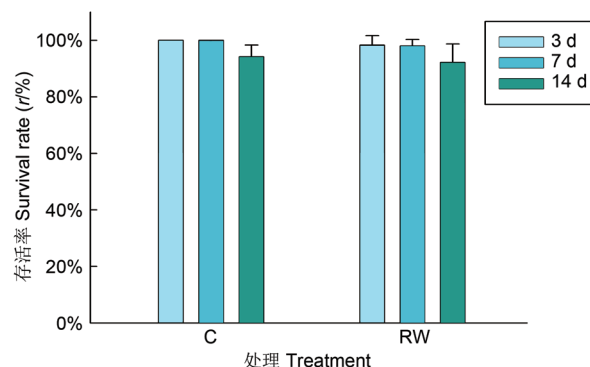


图1 自来水对照组(C)和再生水试验组(RW)暴露不同时间对斑马鱼幼鱼的存活率。

Fig. 1 Survival rate of zebra fish larvae after exposure to tap water control group (C) and reclaimed water treatment group (RW) at different time.

2.2 斑马鱼幼鱼下丘脑-垂体-甲状腺轴基因表达

2.2.1 再生水暴露3 d、7 d对斑马鱼HPT轴相关基因转录水平的影响

斑马鱼幼鱼经再生水暴露3 d后HPT轴相关基因转录水平变化如图2所示。与对照组相比,再生水对斑马鱼幼鱼暴露3 d显著下调了幼鱼体内的*Dio1*基因的转录水平($P < 0.05$),并显著上调了*Trh*、*Dio2*、*Thra*、*Thr β* 基因转录水平($P < 0.05$);与对照组相比,再生水暴露对斑马鱼幼鱼*Nis*、*Tsh β* 基因转录水平无显著影响($P > 0.05$)。

斑马鱼幼鱼经再生水暴露7 d后HPT轴相关基因转录水平变化如图3所示。再生水对斑马鱼幼鱼暴露7 d后,与对照组相比,再生水处理组斑马鱼幼鱼甲状腺中*Trh*、*Tsh β* 、*Dio2*、*Nis*、*Thr β* 的基因转录水平显著下调($P < 0.05$),*Dio1*、*Thra*的基因转录水平出现了极显著下调($P < 0.01$)。

2.2.2 自来水恢复7 d对斑马鱼HPT轴相关基因转录水平的影响

斑马鱼幼鱼在再生水中暴露7 d后,转移至自来水中恢复7 d后HPT轴相关基因转录水平变化如图4所示。与对照组相比,再生水处理组斑马鱼幼鱼甲状腺中*Tsh β* 基因的转录水平显著下调($P < 0.05$);再生水处理组斑马鱼幼鱼在自来水中恢复7 d后斑马鱼幼鱼*Trh*、*Dio1*、*Dio2*、*Nis*、*Thra*、*Thr β* 基因的转录水平与对照组相比无显著改变($P > 0.05$)。

表1 用于RT-PCR分析的引物序列

Table 1 Nucleotide sequence of primers used for quantitative real-time PCR

基因 Gene	引物序列 Sense primer (5' to 3')	引物序列 Antisense primer (5' to 3')	引物序号 GenBank accession No.	产物大小 Size (bp)
<i>Trh</i>	TGGAGCCGGAGGTGAAGA	GCAGTGGGGTCTCTAGCAT	NM_001012365.2	91
<i>Tshβ</i>	AGGTTGCCGTGCCTATGTG	GGACCCACCAACTCCTTTATGT	NM_181494.2	145
<i>Nis</i>	TGGTTGGTGTGGTGGTCAGTTA	GCATCGCAGGGCTTTTGT	NM_001089391.1	100
<i>Dio1</i>	GGTGGTGGATGAGATGAACAAC	TCCGATGCCTCCCTGATAGA	NM_001007283.1	106
<i>Dio2</i>	ATTTCCTTGCCCTCCTCAGTG	GCCACCTCCGAACATCTTTAAG	NM_212789.3	171
<i>Thra</i>	GGCTCGGAGTGTTTCTGA	CTTGCGGTGGTTGATGTAGTG	NM_131396.1	200
<i>Thrβ</i>	AGCGTTGTCAGGAGGAGTTTC	GATTGGATTGCCATCAGTCTTC	NM_131340.1	222
β -actin	TCTGGCATCACACCTTCTACAAT	TGTTGGCTTTGGGATTCAGG	AF057040.1	91

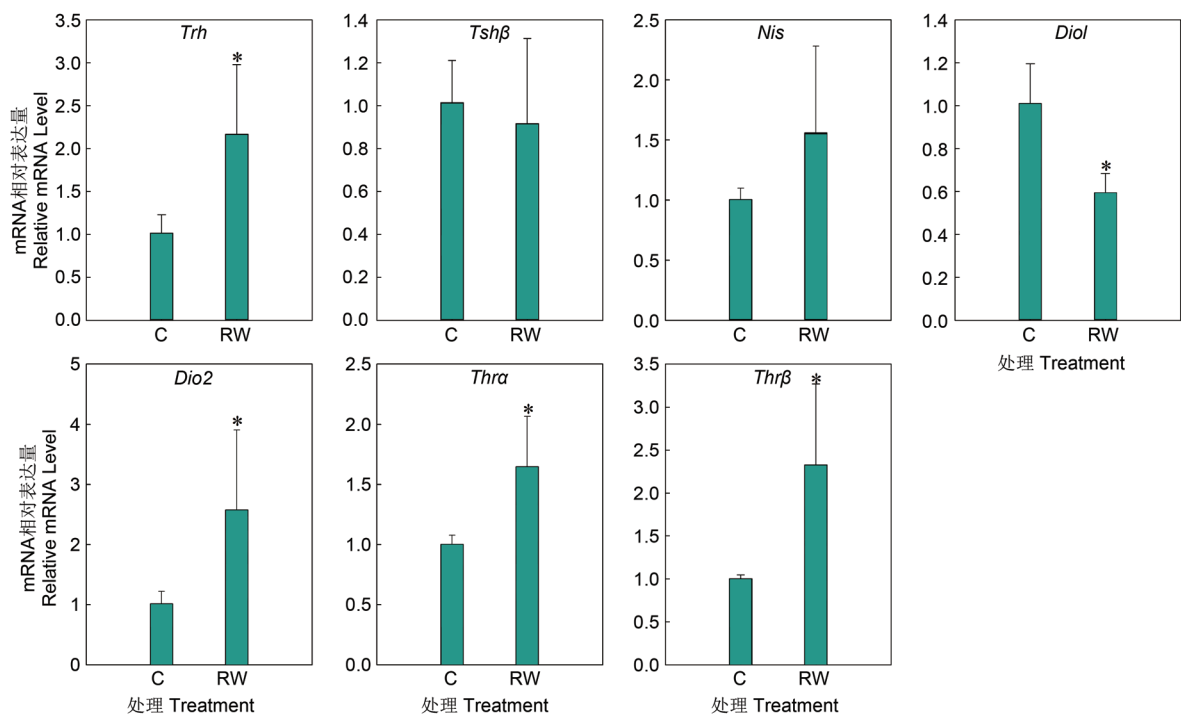


图2 再生水暴露3 d对斑马鱼幼鱼下丘脑-垂体-甲状腺（HPT）轴相关基因转录水平的影响。* $P < 0.05$ ，表示实验组与对照组有显著差异；** $P < 0.01$ ，表示试验组与对照组有极显著差异。C：自来水对照组；RW：再生水试验组。

Fig. 2 Effect of reclaimed water exposure on hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis related gene transcription levels in zebra fish larvae for 3 days. * $P < 0.05$, indicating significant differences between the treatment group and the control group. ** $P < 0.01$, indicating extremely significant differences between the treatment group and the control group. C: Tap water control group; RW: Reclaimed water treatment group.

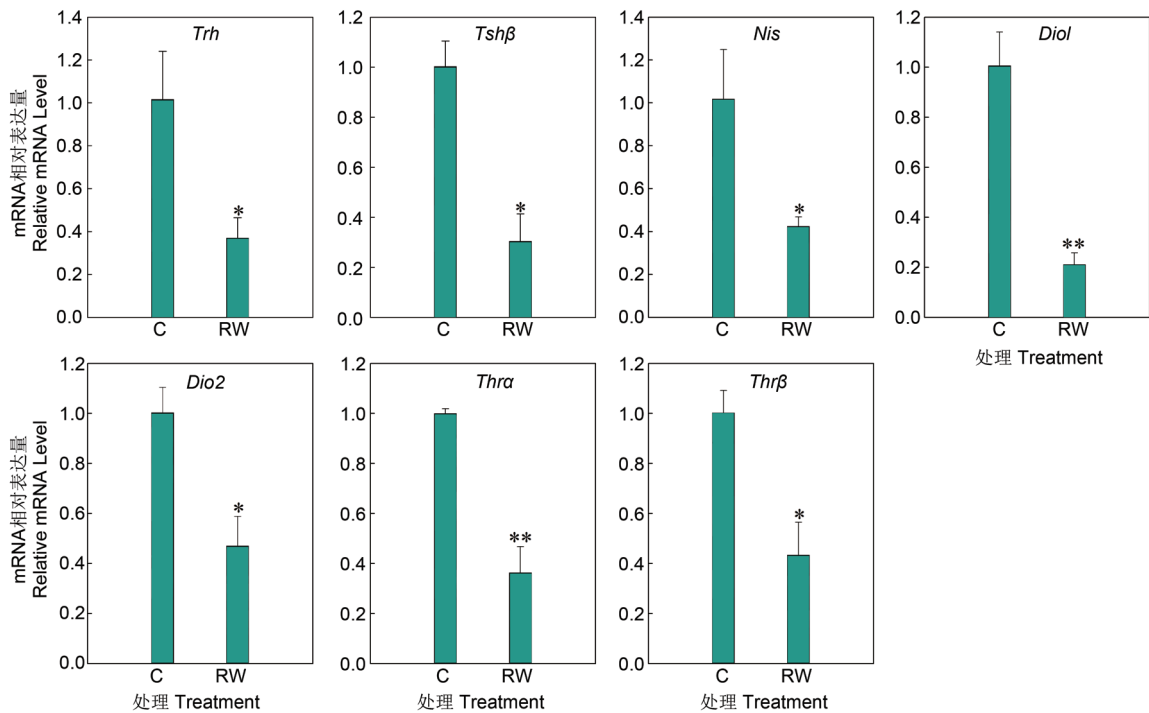


图3 再生水暴露7 d对斑马鱼幼鱼下丘脑-垂体-甲状腺（HPT）轴相关基因转录水平的影响。* $P < 0.05$ ，表示实验组与对照组有显著差异；** $P < 0.01$ ，表示实验组与对照组有极显著差异。C：自来水对照组；RW：再生水实验组。

Fig. 3 Effect of reclaimed water exposure on hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis related gene transcription levels in zebra fish larvae for 7 days. * $P < 0.05$, indicating significant differences between the treatment group and the control group. ** $P < 0.01$, indicating extremely significant differences between the treatment group and the control group. C: Tap water control group; RW: Reclaimed water treatment group.

3 讨论

甲状腺稳态受HPT轴调节，HPT轴控制着甲状腺激素的合成、分泌、转运和代谢，HPT轴对维持机体内甲状腺激素平

衡起到重要作用^[13]。HPT轴相关基因表达水平已被用作评估环境污染毒理效应的分子水平检测终点^[19]。*Trh*和*Tshβ*被认为是斑马鱼幼体发育过程中HPT轴的主要调节因子，*Trh*和*Tshβ*转录水平的改变可用于确定环境污染是否可能导致甲

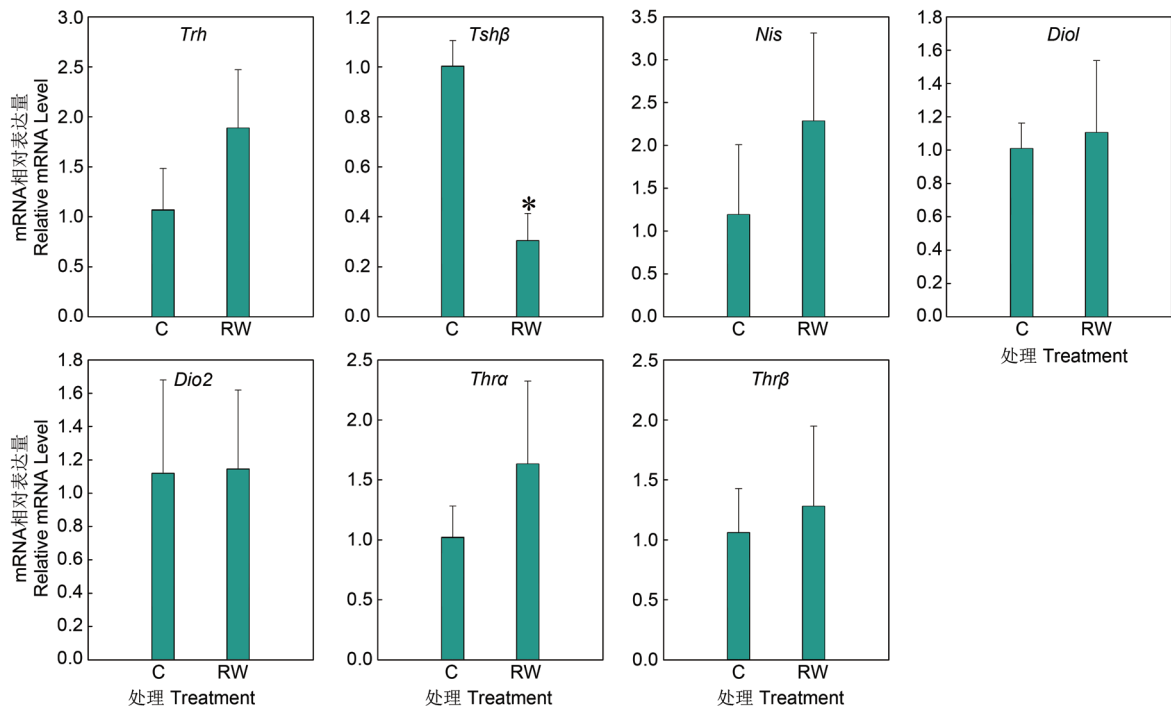


图4 自来水净化7 d对斑马鱼幼鱼下丘脑-垂体-甲状腺轴(HPT)轴相关基因转录水平的影响。* $P < 0.05$, 表示实验组与对照组有显著差异; ** $P < 0.01$, 表示试验组与对照组有极显著差异。C: 自来水对照组; RW: 再生水试验组。

Fig. 4 Effect of tap water recovery on hypothalamus-pituitary-thyroid (HPT) axis related gene transcription levels in zebra fish larvae for 7 days. * $P < 0.05$, indicating significant differences between the treatment group and the control group. ** $P < 0.01$, indicating extremely significant differences between the treatment group and the control group. C: Tap water control group; RW: Reclaimed water treatment group.

状腺内分泌干扰效应^[20]。Tsh是一种由 α 亚单位和 β 亚单位组成的糖蛋白,决定了垂体和甲状腺功能的完整性,其中 β 亚单位显著决定了激素的功能特异性^[21]。Nis是一种跨膜蛋白,可以将钠和碘转运到甲状腺滤泡细胞,这是甲状腺激素合成的第一步^[22]。Dio包括Dio1、Dio2和III型脱碘酶(Dio3),其中Dio1对血浆甲状腺激素稳态的影响很小,但在甲状腺激素稳态中具有一定的功能,对碘的回收和甲状腺激素的清除具有重要作用,Dio2通过将T4转化为T3来激活外环脱碘途径^[23]。甲状腺激素通过与直接作用于靶基因的核受体(Thra和Thr β)结合从而发挥作用,核受体与特定的DNA序列结合,以增加或减少基因的表达,进而引起细胞对甲状腺激素的反应^[24]。本研究发现再生水对斑马鱼幼鱼没有显著的致死毒性,这与Pablos等在非洲爪蟾蝌蚪暴露于再生水中21 d的实验中观察到显著死亡率的研究结果^[9]相似,但非洲爪蟾蝌蚪经再生水暴露后甲状腺组织发生了病变,然而该研究并没有报道再生水对水生生物甲状腺内分泌干扰的分子机制。因此本研究重点关注再生水对幼年斑马鱼HPT轴相关基因转录水平的影响,从而揭示再生水潜在的甲状腺内分泌干扰分子机制。

本研究将斑马鱼幼鱼暴露于再生水中3 d后,结果显示斑马鱼幼鱼Trh基因转录水平显著上调,与全氟十二酸(PFDoA)对斑马鱼幼鱼HPT轴的分子水平干扰结果^[25]相似,这可能是由于斑马鱼体内T3和T4水平降低导致对下丘脑进行的负反馈调节引起的。据报道Trh基因转录水平上调会导致Tsh β 基因转录水平升高^[26],但本研究中观察到再生水对Tsh β 基因转录水平下调,类似地,Wiens的研究表明一些化学物质处理会下调Tsh β 转录水平^[27]。Zhang等发现双酚S作为一种环境内分泌干扰化学物质,上调了HPT轴上Dio2基因的转录水平^[28],与本研究再生水暴露显著上调Dio2基因转录水平的结果相似。Dio2基因转录水平显著上调可能会促进T4向T3的

转化,并导致T4水平的降低,由于补偿机制的作用促进T4向T3的转化可能进一步诱导Dio1基因转录水平上调,加速T3的代谢^[29]。但本研究中Dio1转录水平出现了显著降低,Walpita等人研究表明斑马鱼体内Dio1基因在维持血浆中甲状腺激素平衡的作用很小,Dio1基因转录水平显著变化后对斑马鱼的发育进程不会有显著影响^[30]。再生水暴露3 d对斑马鱼幼鱼的Nis基因转录水平上调,这与拟除虫菊酯对斑马鱼幼鱼毒性研究中Nis基因转录水平显著上调^[22]类似,这可能是对T4减少的一种补偿机制。与再生水暴露3 d后的斑马鱼幼鱼体内Thr β 和Thra基因转录水平显著上调结果相似,Cheng等研究斑马鱼接触五氯苯酚和三氯苯甲醚后Thra和Thr β 的基因转录水平也出现显著增加^[24],这可能是由于Dio2基因转录水平上调从而增加了T3含量,作为转运T3的核受体,Thra和Thr β 基因表达水平显著增加。本研究结果表明再生水对斑马鱼幼鱼暴露3 d后,显著影响了HPT轴部分基因的转录水平。

为分析再生水处理不同时间对斑马鱼幼鱼HPT轴基因转录水平不同模式的影响,本研究还调查了再生水对斑马鱼幼鱼暴露7 d后HPT轴相关基因转录水平变化。研究结果表明再生水暴露7 d对斑马鱼幼鱼部分基因与再生水暴露3 d时的表达模式不同,Trh、Dio2、Nis、Thra基因转录水平显著下降,Thr β 基因极显著下降,相同的是Tsh β 、Dio1基因转录水平仍然处于下调状态,与3 d相比,Tsh β 基因表达显著下调,Dio1基因表达极显著下调。Trh涉及下丘脑向垂体传递信号的过程,Trh基因转录水平下降也导致垂体中相关基因和Tsh β 基因极显著下降,最终可能影响鱼体内TH的合成^[20]。Nis基因的表达水平显著性下降,可能导致T4的合成受阻^[22]。Dio1和Dio2基因的表达水平分别出现极显著和显著下调,可能导致T4向T3的转化速率降低^[30]。Thra和Thr β 基因表达分别出现显著和极显著下调,可能会出现结构异常从而导致TH不能与受体结合,

无法激活相应的受体发生级联反应^[24]。类似地,杨洋等发现双酚AF暴露可延缓胚胎期斑马鱼的发育和孵化,并随着暴露时间的延长以及中毒程度的加深,幼鱼期斑马鱼出现的中毒症状^[31]。本研究结果表明再生水暴露时间延长对斑马鱼幼鱼HPT轴分子转录水平产生了更显著的影响,可能会对斑马鱼主要器官系统的功能及机体生长造成影响。

为研究斑马鱼幼鱼接触再生水后是否存在恢复能力,将其转入自来水中恢复7 d,观察再生水对斑马鱼幼鱼HPT轴相关基因转录水平的影响能否消除。因为环境污染物输入地表水可能是周期性或者瞬时的,水生生物通常不是持续性地接触内分泌干扰物^[32],因此越来越多的研究者模拟现实的暴露场景^[33-35]。研究表明鱼类接触环境污染物后具有恢复能力,如Baumann等发现雌激素炔雌醇暴露60 d对斑马鱼性腺发育有较强的雌性化和抑制作用,脑型芳香化酶(*Cyp19b*)基因表达无明显变化,但*Vtg*水平显著升高,性腺成熟和机体生长受到抑制,但这些影响在将斑马鱼置于自来水中培养40 d后都能消除^[33]。Chen等等发现雌性和雄性斑马鱼在早期生命阶段暴露于含有Hg²⁺的氯化汞溶液中5 d后,*gnih*和*gnih2*基因表达都显著上调,雄性斑马鱼的*kiss1*、*kiss2*基因表达水平显著下降,*kiss2*基因表达在雌性斑马鱼中显著下调,但经115 d清水饲养后,促性腺激素抑制激素(*GnIH*)和*Kisspeptin*的基因表达在第1代的雄性和雌性斑马鱼中没有受到显著影响^[36],这表明在鱼类亲代早期生命阶段暴露于Hg²⁺引起的相关生殖基因表达水平的改变恢复到正常水平,不会持续影响后代。本研究结果表明再生水暴露后的斑马鱼幼鱼在洁净的自来水中恢复7 d后,*Dio1*、*Dio2*、*Thra*、*Thrb*、*Trh*、*Nis*基因的转录水平已无显著影响,Lyons等的研究同样发现斑马鱼幼鱼中细胞

色素P450s基因转录水平的改变会在停止暴露于含有油砂的水中后够快速消除^[34],说明斑马鱼幼鱼停止暴露于再生水后机体能够代谢内分泌干扰物,通过修复机制使HPT轴相关基因的转录恢复正常。但在洁净的自来水中恢复后,斑马鱼体内*Tshb*基因的转录水平仍然显著下调,Ye等在对海洋青鳉幼鱼的研究中观察到了类似现象,海洋青鳉幼鱼停止接触DEHP后雌激素受体(*ERs*)、*VTG*、细胞色素P450 19(*CYP19*)等基因转录水平没有出现显著影响,但停止接触E2后雌激素受体 γ (*ERY*)、细胞色素P450 19a(*CYP19a*)、过氧化物酶体增殖激活受体(*PPARs*)等基因转录水平仍然显著降低^[35],可能是洁净水体中恢复的时间还不够长。本研究发现斑马鱼幼鱼在自来水中恢复后减弱了再生水对HPT分子水平的影响,说明再生水对斑马鱼幼鱼分子水平的影响可以通过在洁净水体中得以恢复,因此再生水回用于景观水体补给等所存在的内分泌干扰物的联合效应,可以考虑采用定时的水源轮换方式有效缓解,对水生生物的保护有一定价值。

4 结论

综上所述,再生水通过影响斑马鱼幼鱼HPT轴相关基因转录水平对水体生物的生长发育造成潜在的影响,随着再生水暴露时间延长会对斑马鱼幼鱼HPT轴产生更显著影响,再生水对斑马鱼幼鱼HPT轴分子水平的影响可以通过在洁净水体中得以恢复。本研究结果为再生水影响斑马鱼幼鱼生长发育的分子机制提供基础依据,同时为再生水中内分泌干扰物的生态毒性效应及风险评估提供了理论依据,有关再生水对鱼类甲状腺内分泌干扰效应的机理还需要进一步研究。

参考文献 [References]

- 1 Xu J, Wei D, Wang F, Bai C, Du Y. Bioassay: a useful tool for evaluating reclaimed water safety [J]. *J Environ Sci*, 2020, **88**: 165-176
- 2 Sjerps RMA, Vughs D, van Leerdam JA, Laak TLT, Avan WAP. Data-driven prioritization of chemicals for various water types using suspect screening LC-HRMS [J]. *Water Res*, 2016, **93**: 254-264
- 3 Wang Y, Hu W, Cao Z, Fu X, Zhu T. Occurrence of endocrine-disrupting compounds in reclaimed water from Tianjin, China [J]. *Anal Bioanal Chem*, 2005, **383** (5): 857-863
- 4 Williams RJ, Johnson A C, Smith JLL, Kanda R.. Steroid estrogens profiles along river stretches arising from sewage treatment works discharges [J]. *Environ Sci Technol*, 2003, **37** (9): 1744-1750
- 5 Väitalo P, Mäse R, Heiskanen I, Behnisch P, Brack W, Tindall AJ, Du Pasquier D, Küster E, Mikola A, Schulze T, Sillanpää M. Effect-based assessment of toxicity removal during wastewater treatment [J]. *Water Res*, 2017, **126**: 153-163
- 6 Planelló R, Herrero O, García P, Beltrán EM, Llorente L, Sánchez-Argüello P. Developmental/reproductive effects and gene expression variations in *Chironomus riparius* after exposure to reclaimed water and its fortification with carbamazepine and triclosan [J]. *Water Res*, 2020, **178**: 115790
- 7 孙青. 行业废水及城市污水对斜生栅藻的急性毒性效应研究[D]. 大连: 大连理工大学, 2015 [Sun Q. Acute toxic effects of industrial and municipal wastewater on *Scenedesmus obliquus* [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2015]
- 8 Sun J, Ji X, Zhang R, Huang Y, Liang Y, Du J, Xie X, Li A. Endocrine disrupting compounds reduction and water quality improvement in reclaimed municipal wastewater: a field-scale study along Jialu River in North China [J]. *Chemosphere*, 2016, **157**: 232-240
- 9 Pablos MV, Beltrán EM, Jiménez MA, García-Hortigüela P, Fernández A, González-Doncel M, Fernández C. Effect assessment of reclaimed water and carbamazepine exposure on the thyroid axis of *X. laevis*: apical and histological effects [J]. *Sci Total Environ*, 2020, **723**: 138023
- 10 Chen J, Xue W, Cao J, Song J, Jia R, Li M. Fluoride caused thyroid endocrine disruption in male zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2016, **171**: 48-58
- 11 Jia P, Ma Y, Lu C, Mirza Z, Zhang W, Jia Y, Li W, Pei D. The effects of disturbance on hypothalamus-pituitary-thyroid (hpt) axis in zebrafish larvae after exposure to DEHP [J]. *PLoS ONE*, 2016, **11** (5): e0155762
- 12 Raldúa D, Thienpont B, Babin PJ. Zebrafish eleutheroembryos as an alternative system for screening chemicals disrupting the mammalian thyroid gland morphogenesis and function [J]. *Reprod Toxicol*, 2012, **33** (2): 188-197
- 13 Carr JM, Patiño R. The hypothalamus-pituitary-thyroid axis in teleosts and amphibians: endocrine disruption and its consequences to natural populations [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2011, **170** (2): 299-312
- 14 Picard-Aitken M, Fournier H, Pariseau R, Marcogliese DJ, Cyr

- DG. Thyroid disruption in walleye (*Sander vitreus*) exposed to environmental contaminants: cloning and use of iodothyronine deiodinases as molecular biomarkers [J]. *Aquat Toxicol*, 2007, **83** (3): 200-211
- 15 Xiang D, Han J, Yao T, Wang Q, Zhou B, Mohamed AD, Zhu G. 2017. Editor's highlight: structure-based investigation on the binding and activation of typical pesticides with thyroid receptor [J]. *Toxicol Sci*, 2017, **160** (2): 205-216
- 16 Guillette J, Crain DA, Rooney AA, Pickford DB. Organization versus activation: the role of endocrine-disrupting contaminants (EDCs) during embryonic-development in wildlife [J]. *Environ Health Perspect*, 1995, **103** (Suppl 7): 157-164
- 17 de Menezes C, Fonseca M, Loro VL, Santi A, Cattaneo R, Clasen B. Roundup effects on oxidative stress parameters and recovery pattern of *Rhamdia quelen* [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2011, **60** (4): 665-671
- 18 梁燕秋. 孕激素物质黄体酮和甲炔诺酮对斑马鱼不同发育阶段的内分泌干扰效应[D]. 广州: 中国科学院研究生院(广州地球化学研究所), 2017 [Liang YQ. Endocrine disrupting effects of progestins (progesterone and norgestrel) on the different stages of zebrafish (*Danio rerio*). Guangzhou: University of Chinese Academy of Sciences (Guangzhou Institute of Geochemistry), 2017]
- 19 Hermesen S, Pronk TE, Evert-Jan VDB, Van d VLTM, Piersma AH. Concentration-response analysis of differential gene expression in the zebrafish embryo toxicity test following flusilazole exposure [J]. *Toxicol Sci*, 2012, **127** (1): 303-312
- 20 De Groef B, Van der Geyten S, Darras Veerle M, Kühn Eduard R. Role of corticotropin-releasing hormone as a thyrotropin-releasing factor in non-mammalian vertebrates [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2006, **146** (1): 62-68
- 21 Zoeller RT, Tyl RW, Tan SW. Current and potential rodent screens and tests for thyroid toxicants [J]. *CRC Crit Rev Toxicol*, 2007, **37** (1-2): 55-95
- 22 Yu L, Chen M, Liu Y, Gui W, Zhu G. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae following exposure to hexaconazole and tebuconazole [J]. *Aquat Toxicol*, 2013, **138**: 35-42
- 23 Tang T, Yang Y, Chen Y, Tang W, Wang F, Diao X. Thyroid disruption in zebrafish larvae by short-term exposure to bisphenol AF [J]. *Int J Environ Res*, 2015, **12** (10): 13069-13084
- 24 Cheng Y, Ekker M, Chan HM. Relative developmental toxicities of pentachloroanisole and pentachlorophenol in a zebrafish model (*Danio rerio*) [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2015, **112**: 7-14
- 25 Zhang S, Guo X, Lu S, Sang N, Li G, Xie P, Liu C, Zhang L, Xing Y. Exposure to PFDoA causes disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish larvae [J]. *Environ Pollut*, 2018, **235**: 974-982
- 26 Tu W, Xu C, Lu B, Lin C, Wu Y, Liu W. Acute exposure to synthetic pyrethroids causes bioconcentration and disruption of the hypothalamus-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryos [J]. *Sci Total Environ*, 2016, **542** (Pt A): 876-885
- 27 Wiens SC, Trudeau VL. Thyroid hormone and gamma-aminobutyric acid (GABA) interactions in neuroendocrine systems [J]. *Comp Biochem Phys A*, 2006, **144** (3): 332-344
- 28 Zhang D, Zhou E, Yang Z. Waterborne exposure to BPS causes thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae [J]. *PLoS ONE*, 2017, **12**(5): e0176927
- 29 Zhai W, Huang Z, Chen L, Feng C, Li B, Li T. Thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae after exposure to mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) [J]. *PLoS ONE*, 2014, **9**(3): e92465
- 30 Walpita CN, Crawford AD, Darras VM. Combined antisense knockdown of type 1 and type 2 iodothyronine deiodinases disrupts embryonic development in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Gen Comp Endocr*, 2010, **138-139**: 35-42
- 31 杨洋, 陈亚文, 唐天乐, 唐文浩. 双酚AF暴露对胚胎期和幼鱼期斑马鱼的毒性效应[J]. 环境科学研究, 2015, **28** (8): 1219-1226. [Yang Y, Chen YW, Tang TL, Tang WH. Toxic effects of bisphenol AF on zebrafish embryos and larvae [J]. *Res Environ Sci*, 2015, **28** (8): 1219-1226]
- 32 Rocha MJ, Ribeiro M, Ribeiro C, Couto C, Cruzeiro C, Rocha E. Endocrine disruptors in the Leça River and nearby Porto Coast (NW Portugal): presence of estrogenic compounds and hypoxic conditions [J]. *Toxicol Environ Chem*, 2012, **94** (2): 262-274
- 33 Baumann L, Knörr S, Keiter S, Rehberger K, Volz S, Schiller V, Fenske M, Holbech H, Segner H, Braunbeck T. Reversibility of endocrine disruption in zebrafish (*Danio rerio*) after discontinued exposure to the estrogen 17 α -ethinylestradiol [J]. *Toxicol App. Pharmacol*, 2014, **278** (3): 230-237
- 34 Lyons DD, Morrison C, Philibert DA, El-Din MG, Kierney KB. Growth and recovery of zebrafish embryos after developmental exposure to raw and ozonated oil sands process-affected water [J]. *Chemosphere*, 2018, **206**: 405-413
- 35 Ye T, Kang M, Huang Q, Fang C, Chen Y, Liu L, Dong S. Accumulation of di(2-ethylhexyl) phthalate causes endocrine-disruptive effects in marine medaka (*Oryzias melastigma*) embryos [J]. *Environ Toxicol*, 2016, **31** (1): 116-127
- 36 Chen Q, Jingj A, Xie D, Gong S, Lian X, Liu Z, Shen Y, Li Y. Suppression and recovery of reproductive behavior induced by early life exposure to mercury in zebrafish [J]. *Comp Biochem Physiol A Physiol: Part C*, 2021, **239**: 108876