

迷迭香酸对硫酸铜致斑马鱼胚胎毒性的抑制作用

李倩 姜丝涛 李鲁美

烟台大学生命科学学院 烟台 264005

摘要: 本文探讨硫酸铜 (CuSO_4) 对斑马鱼 (*Danio rerio*) 胚胎发育的毒性效应, 使用迷迭香酸 (RA) 抑制 CuSO_4 对斑马鱼胚胎发育的毒性并探讨其作用机制。收集受精后 1 h (1 hpf) 的斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的 CuSO_4 溶液, 或含有不同浓度迷迭香酸的 CuSO_4 溶液, 对照组培养在 E3 培养液中, 观察胚胎死亡、孵化及畸形情况, 计算胚胎死亡率、孵化率和畸形率; 以活性氧 (ROS) 荧光探针 DCFH-DA 染色法检测迷迭香酸保护下胚胎的活性氧水平。对实验数据进行方差分析。结果显示: (1) CuSO_4 浓度超过一定量时能诱导斑马鱼胚胎死亡和畸形, 胚胎孵化率也降低。 CuSO_4 对 96 hpf 斑马鱼胚胎的半致死浓度 (LC_{50}) 为 $7.7 \mu\text{mol/L}$, 半致畸浓度 (EC_{50}) 为 $1.9 \mu\text{mol/L}$ 。(2) 在 96 hpf, 迷迭香酸与 $8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 共同处理组斑马鱼胚胎的死亡率明显降低, 孵化率升高。迷迭香酸与 $1.6 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 共同处理组斑马鱼胚胎的畸形率降低。(3) CuSO_4 单独处理组的活性氧含量明显高于迷迭香酸与 CuSO_4 共同处理组和对照组。结果表明, CuSO_4 暴露对斑马鱼胚胎发育的毒性效应可能与活性氧升高导致的氧化应激相关; 迷迭香酸抑制 CuSO_4 对斑马鱼胚胎发育的毒性作用, 可能与减少活性氧生成有关。

关键词: 硫酸铜; 迷迭香酸; 斑马鱼; 活性氧; 毒性效应

中图分类号: Q955 **文献标识码:** A **文章编号:** 0250-3263 (2019) 01-99-09

Inhibitory Effect of Rosmarinic Acid on the Developmental Toxicity Induced by Copper Sulfate in Zebrafish Embryos

LI Qian JIANG Si-Tao LI Lu-Mei

School of Life Sciences, Yantai University, Yantai 264005, China

Abstract: The purpose of this study was to investigate the developmental toxicity of copper sulfate (CuSO_4) and the inhibitory effect of rosmarinic acid (RA) on the zebrafish (*Danio rerio*) embryos. The embryos (1 hour post fertilization, 1 hpf) were exposed to different concentrations of CuSO_4 solution and CuSO_4 solution containing different concentrations of RA, respectively. Control group was exposed to E3 medium. The mortality, malformation and hatching of embryos were observed under stereo microscope. The lethal rate, malformity rate and hatching rate were calculated and analysed. The embryonic reactive oxygen species

基金项目 山东省高等学校科技立项经费项目 (No. J17KA257);

第一作者介绍 李倩, 女, 博士研究生; 研究方向: 动物胚胎工程; E-mail: ydskysxh@163.com。

收稿日期: 2018-05-29, 修回日期: 2018-09-07 DOI: 10.13859/j.cjz.201901012

(ROS) was detected using the fluorescent probe of DCFH-DA under RA defense. The experimental data were statistically analyzed with variance analysis. The results showed that the exposure to the CuSO₄ solution caused serious lethal effect (Fig. 1a) and teratogenic effect (Fig. 1b, 2), decreased the hatching rate of embryos (Fig. 3) in a concentration-dependent manner. The linear regression equation between concentration of CuSO₄ and mortality of zebrafish embryos at 96 hpf was $Y = 5.59X + 7.1533$, Y and X referred to lethal rate (%) and concentration of CuSO₄ (μmol/L), respectively. The corresponding half lethal concentration (LC₅₀) of CuSO₄ on zebrafish embryos was 7.7 μmol/L. The linear regression equation between concentration of CuSO₄ and deformity rate of zebrafish embryos at 96 hpf was $Y = 24.213X + 3.5443$, Y and X referred to lethal rate (%) and concentration of CuSO₄ (μmol/L), respectively, and the half effective concentration (EC₅₀) resulted in the malformation was 1.9 μmol/L. At 96 hpf, RA decreased lethal effect and increased hatching of zebrafish embryos induced by 8 μmol/L CuSO₄ (Fig. 4). RA decreased malformation effect of zebrafish embryos induced by 1.6 μmol/L (Fig. 5). CuSO₄ and RA inhibited ROS level induced by CuSO₄ in zebrafish embryos (Fig. 6). The results indicate that CuSO₄ has serious toxic effect on the development of zebrafish embryos, which may be associated with increased ROS level and caused oxidative stress. RA inhibits developmental toxicity of CuSO₄ by reducing oxidative stress.

Key words: CuSO₄; Rosemary acid; Zebrafish, *Danio rerio*; Reactive oxygen; Toxic effect

随着工农业的快速发展, 重金属的应用越来越广, 铜作为工农业生产中的原材料以及农业生产中的饲料、肥料和农药被广泛应用。残留的铜通过污水排放和地表径流等途径进入水体而污染水环境, 对水生生物造成毒害 (Chen et al. 2011)。水生生物也可以富集铜, 大量铜会通过食物链的富集进入人体, 一部分也可通过植物根部的吸收然后变成食物进入人体。当铜在体内蓄积到一定程度后即可对人体健康产生危害。

斑马鱼 (*Danio rerio*) 作为一种模式生物, 有胚胎透明、方便饲养、易于操作和观察等多种优点, 常常被用于毒理实验。鱼类的早期生活阶段对重金属污染物敏感。尽管关于 CuSO₄ 毒害作用的研究很多, 但是以斑马鱼胚胎作为实验材料来研究 CuSO₄ 毒性的文献报道却很少。章晓凤等 (2012) 发现 1 μmol/L 和 10 μmol/L 的 CuSO₄ 可明显降低斑马鱼胚胎的孵化率。章强等 (2015) 在文章中提到, 铜在低浓度下可以降低斑马鱼胚胎的孵化率, 导致畸形的出现。赖凡 (2016) 研究表明, CuSO₄ 单独暴露可导致斑马鱼胚胎死亡率的升高。

氧化胁迫是重金属离子对水生生物毒性作用的重要机制之一 (张清顺等 2010)。当动物受到不良刺激或感染疾病时, 机体会产生活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 等高活性分子 (杜威等 2013)。活性氧可导致 DNA 断裂、酶蛋白失活等, 引起氧化应激, 使生物大分子和膜脂质过氧化, 对机体造成损伤 (Buttke et al. 1994)。迷迭香酸 (rosmarinic acid, RA) 是一种天然的抗氧化剂 (Bakota et al. 2015), 具有抗炎、抗菌、抗病毒、抗肿瘤、免疫调节和抑制尿酸生成等多方面的作用。迷迭香酸具有清除超氧化物自由基的活性 (Zhang et al. 2010)。Xu 等 (2010) 发现迷迭香酸通过降低活性氧以及基质金属蛋白酶 2 和 9 的表达, 提高谷胱甘肽水平, 抑制 Ls174-T 人结肠癌细胞的侵袭转移。迷迭香酸可以通过减少活性氧生成, 减少 IL-6、caspase-3 和 caspase-9 的活性和分泌, 而发挥抗氧化作用 (Vostalova et al. 2010)。迷迭香酸能通过减少活性氧产生和阻止 caspase-3 异常激活, 抑制了 1-甲基-4-苯基-1, 2, 3, 6-四氢吡啶 (1-methyl-4-phenyl-1, 2, 3, 6-tetrahydropyridine, MPTP) 诱导的多巴胺神

神经元损伤(钟雯雯等 2017)。

鲁疆等(2013)研究发现迷迭香酸可以通过减少活性氧生成,改善氧化胁迫状态而抑制氯化铬(CdCl_2)导致的斑马鱼胚胎发育毒性。尽管赖凡(2016)研究表明,与 CdCl_2 、硝酸铅 $[\text{Pb}(\text{NO}_3)_2]$ 和 CuSO_4 重金属处理组相比,60 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸联合 CdCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 和 CuSO_4 重金属处理组的斑马鱼胚胎的活性氧水平降低,死亡率也降低,但是 CdCl_2 、 $\text{Pb}(\text{NO}_3)_2$ 和 CuSO_4 具复杂的协同效应,而且实验中3种金属离子联合暴露后 CuSO_4 对受精后96 h(96 hours post fertilization, 96 hpf)斑马鱼胚胎的半数致死浓度(half lethal concentration, LC_{50})(3.551 mg/L)和 CuSO_4 单独暴露96 hpf 斑马鱼胚胎的 LC_{50} (3.755 mg/L)值相差不大,迷迭香酸干预后能否减少 CuSO_4 单独暴露斑马鱼胚胎活性氧的产生,能否降低斑马鱼胚胎的畸形率和死亡率,这些问题都需要进一步验证。

本实验以斑马鱼胚胎作为实验材料,通过观察胚胎死亡率、畸形率和孵化率,探讨不同剂量的 CuSO_4 暴露对斑马鱼胚胎发育的影响。使用迷迭香酸抑制 CuSO_4 对斑马鱼胚胎发育的毒性,并通过检测活性氧,探讨氧化胁迫是否在 CuSO_4 致斑马鱼胚胎发育毒性中起着关键作用。本研究将为进一步研究 CuSO_4 对胚胎发育的影响提供基础数据,为水产养殖中 CuSO_4 的正确使用提供参考,同时为预防 CuSO_4 和铜中毒的临床治疗提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

AB系斑马鱼成鱼由国家斑马鱼模式动物北方中心惠赠,由本实验室繁育保存。斑马鱼的养殖系统(北京爱生生物科技有限公司)水温保持在 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,光周期为14 h/10 h(光照/黑暗),水中溶解氧浓度高于5.5 mg/L, pH控制在7左右,电导率450~550 $\mu\text{S/cm}$ 。每日早晚各喂食1次,食物为利用虾卵孵化系统提前孵化好的新鲜丰年虫(*Artemia salina*)。

1.2 实验方法

1.2.1 斑马鱼胚胎收集 在收集胚胎的前1 d晚上将2条雌鱼和2条雄鱼放在黑暗交配箱中,中间用隔板隔开过夜。第二天早晨移去隔板,雄鱼、雌鱼开始追尾,一般在交配20 min后雄鱼和雌鱼分别开始射精和排卵,卵在水中受精,收集1 hpf胚胎。将收集的胚胎用E3培养液[0.012 7 g/L KCl(国药集团化学试剂有限公司),0.286 7 g/L NaCl(西陇化工股份有限公司),0.036 5 g/L无水 CaCl_2 (天津市瑞金特化学品有限公司),0.081 7 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ (pH = 7.2)(天津市瑞金特化学品有限公司)]清洗后,在体式显微镜(Phenix)下挑选发育正常的胚胎,用于毒性实验。

1.2.2 斑马鱼胚胎急性毒性实验 按照Vaughan等(2010)染毒实验设计实验。收集1 hpf斑马鱼胚胎置于6孔细胞培养板中(30卵/孔),每孔分别加入4.0 ml含0(空白对照)、2、4、8、12和16 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 (天津市瑞金特化学品有限公司)的E3培养液,每个浓度设3个平行样。加盖并置于 28.5°C 环境中培养。每24 h换液,并观察记录胚胎发育情况,至96 hpf,以卵凝结或心停止跳动作为胚胎死亡终点。记录总胚胎数和胚胎或幼鱼的死亡数量、畸形数量及幼鱼孵化情况,计算死亡率、畸形率和孵化率。胚胎死亡率(%) = (死亡的胚胎总数/总胚胎数量) \times 100;畸形率(%) = (畸形幼鱼数量/总胚胎数量) \times 100;孵化率(%) = (孵化胚胎总数/总胚胎数量) \times 100。

1.2.3 迷迭香酸干预实验 根据预实验结果,迷迭香酸低于200 $\mu\text{mol/L}$ 时,其对斑马鱼胚胎发育没有明显影响。 CuSO_4 较高浓度时,致斑马鱼胚胎大量死亡,难以开展迷迭香酸保护作用的研究。本研究选用迷迭香酸和8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 联合干预,研究迷迭香酸对 CuSO_4 致斑马鱼胚胎发育毒性的抑制作用。为了研究迷迭香酸对 CuSO_4 致斑马鱼畸形的抑制作用,选择1.6 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 单独处理以及用25、50和100 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸与1.6 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 共同

处理斑马鱼胚胎, 100 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸处理设为迷迭香酸对照组。按 1.2.2 胚胎染毒方法, 取 1 hpf 斑马鱼胚胎暴露于 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 或 8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 溶液, 以及 1.6 $\mu\text{mol/L}$ 或 8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 联合不同浓度的迷迭香酸 (25 $\mu\text{mol/L}$ 、50 $\mu\text{mol/L}$ 、100 $\mu\text{mol/L}$) (Sigma 公司, 其纯度 $\geq 95.5\%$) 的溶液中。以卵凝结或心停跳作为死亡终点, 在体式显微镜下观察至 96 hpf, 记录胚胎或幼鱼的死亡数、畸形数及幼鱼的孵化数, 计算死亡率、畸形率和孵化率。

1.2.4 活性氧的测定 为探讨迷迭香酸对 CuSO_4 致斑马鱼胚胎发育毒性的抑制机制, 我们检测了 50 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸抑制 CuSO_4 致斑马鱼胚胎发育毒性后, 斑马鱼胚胎的活性氧水平。对照组的荧光密度设为 1, 其他各组测得的荧光密度与对照组荧光密度的比值作为荧光密度的相对值。配制 Hanks 平衡盐溶液 (NaHCO₃ 0.35 g, NaCl 8 g, KCl 0.4 g, 葡萄糖 1 g, KH₂PO₄ 60 mg, Na₂HPO₄ 47.5 mg, 加去离子水至 1 000 ml, 调 pH 为 7.2), 在避光条件下把 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (2',7'-Dichloro-di-hydrofluorescein diacetate, DCFH-DA) (碧云天生物技术有限公司) 加入 Hanks 平衡盐溶液, 稀释 1 000 倍使浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$, 现配现用。按 1.2.2 胚胎染毒方法, 首先将 1 hpf 斑马鱼胚胎分别在含有不同药物 (1.6 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , 1.6 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 联合 50 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸, 8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , 8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 联合 50 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸, 100 $\mu\text{mol/L}$ 迷迭香酸) 的 E3 培养液中进行培养, 只加 E3 培养液的为空白对照组, 将培养 3 h 的胚胎加入 2 ml 的离心管中, 更换新鲜的 E3 培养液清洗数次。然后加入含有 DCFH-DA 探针的 E3 培养液, 在 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育 30 min, 用 E3 培养液洗 3 次后, 将胚胎转入 96 孔酶标板, 用酶标仪 (瑞士 Tecan Infinite M200) 测定荧光强度 (检测时使用激发波长 488 nm, 发射波长 525 nm)。

1.2.5 数据分析 所有实验至少重复 3 次。利用 SPSS 13.0 (SPSS Inc.) 软件进行单因素方差

分析, 数据采用平均值 \pm 标准误, $P < 0.05$ 表示差异显著。

2 结果与分析

2.1 CuSO_4 对斑马鱼胚胎的急性毒性

2.1.1 CuSO_4 对斑马鱼胚胎死亡率的影响 加入 0 (空白对照)、2、4、8、12 和 16 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理 1 hpf 斑马鱼胚胎至 96 hpf, 斑马鱼胚胎的死亡率对 CuSO_4 具有浓度依赖性 (图 1a)。当 CuSO_4 浓度为 2 $\mu\text{mol/L}$ 时, 斑马鱼胚胎的死亡率与空白对照组没有差异; CuSO_4 浓度在 4 $\mu\text{mol/L}$ 至 16 $\mu\text{mol/L}$ 之间, 斑马鱼胚胎的死亡率与对照组均有明显差异 ($P < 0.05$)。当 CuSO_4 浓度为 16 $\mu\text{mol/L}$ 时, 胚胎死亡率高达 90%。根据线性回归方程得出 CuSO_4 对斑马鱼胚胎 96 hpf 的半致死浓度 LC_{50} 为 7.7 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.1.2 CuSO_4 对斑马鱼胚胎畸形率的影响 加入 0 (空白对照)、0.4、0.8、1.6、3.2 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理 1 hpf 斑马鱼胚胎至 96 hpf, 观察胚胎畸形情况。与空白对照组相比, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 暴露对斑马鱼胚胎及幼鱼发育没有影响, 当 CuSO_4 浓度达到 0.8 $\mu\text{mol/L}$ 后, 斑马鱼幼鱼畸形显著, 而且畸形率随着 CuSO_4 浓度的升高而增大 (图 1b)。用 4 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理, 斑马鱼胚胎畸形率达 91.1%。根据线性回归方程得出 CuSO_4 处理至 96 hpf, 斑马鱼胚胎的半致畸浓度 EC_{50} 为 1.9 $\mu\text{mol/L}$ 。

CuSO_4 暴露使斑马鱼出现脊柱弯曲、卵黄囊肿大等畸形 (图 2)。在斑马鱼的畸形情况中, 卵黄囊肿大主要出现在 0.8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理组, 大约占 10% (图 2b), 脊柱弯曲约占 90% (图 2c ~ f), 其中, 少数斑马鱼幼鱼 (0.8 $\mu\text{mol/L}$ CuSO_4 处理组中) 脊柱向背部弯曲 (图 2c), 多数斑马鱼幼鱼脊柱向腹部弯曲 (图 2d ~ f), 而且当 CuSO_4 的浓度过高时, 斑马鱼胚胎脊柱向腹部严重弯曲 (图 2f)。

2.1.3 CuSO_4 对斑马鱼胚胎孵化率的影响 与空白对照组相比, 0.4 $\mu\text{mol/L}$ 的 CuSO_4 暴露不影响斑马鱼胚胎的孵化率, 当 CuSO_4 浓度为

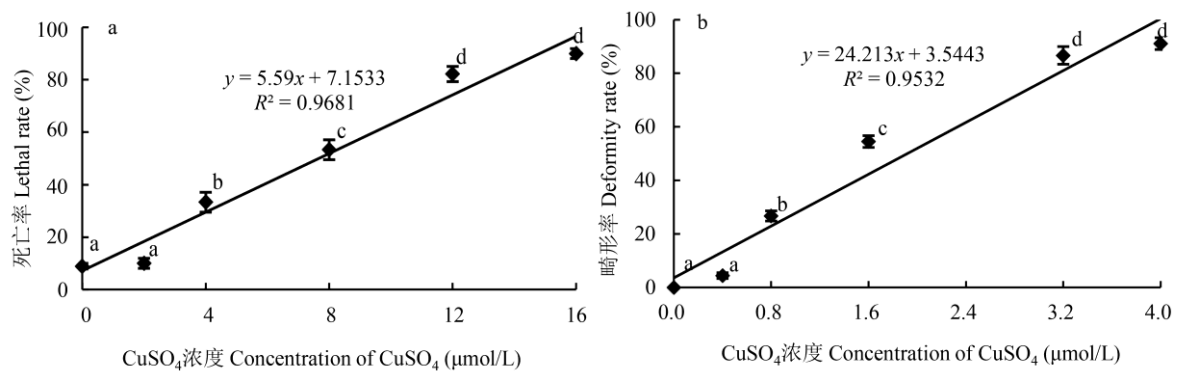


图 1 CuSO_4 对斑马鱼胚胎死亡率 (a) 和畸形率 (b) 的影响

Fig. 1 The toxic effects of CuSO_4 on lethal rate (a) deformity rate (b) of zebrafish embryos

图中标注的不同字母表示其间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

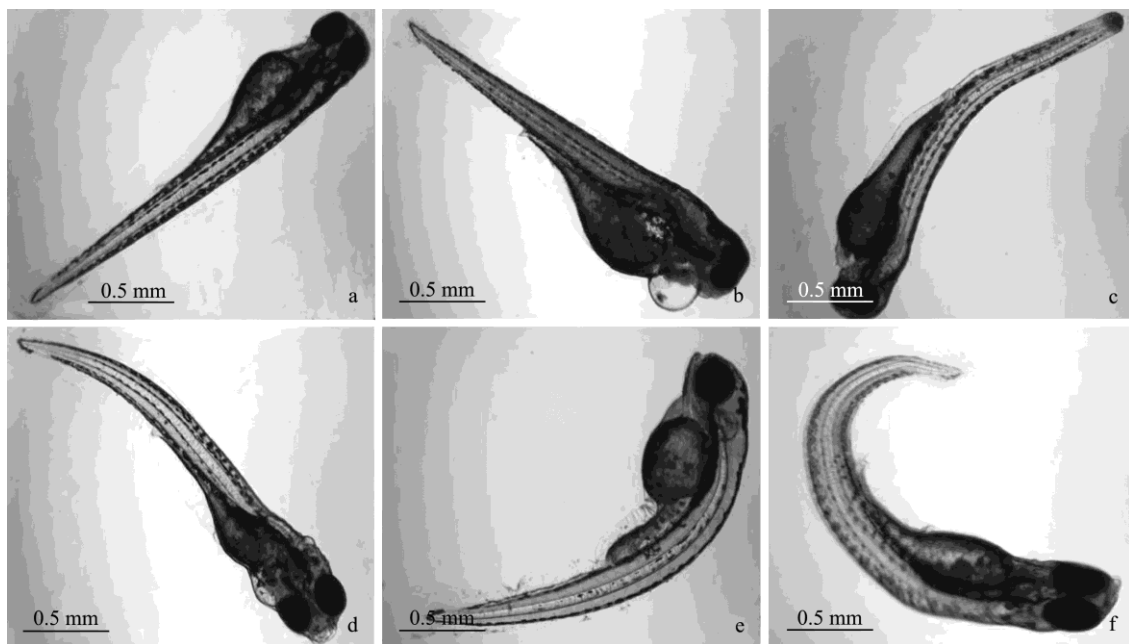


图 2 CuSO_4 暴露所致斑马鱼胚胎发育的典型畸形特征

Fig. 2 Typical malformation of zebrafish embryos induced by CuSO_4

a. 正常幼鱼; b ~ f. CuSO_4 所致畸形幼鱼: b. 卵黄囊肿大 ($0.8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4); c ~ f. 脊柱弯曲 (c. $0.8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , d. $0.8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , e. $1.6 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , f. $4 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4)。

a. Normal embryo; b - f. Embryos treated with CuSO_4 : b. Yolk sac edema ($0.8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4); c - f. Spinal curvature (c. $0.8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , d. $0.8 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , e. $1.6 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4 , f. $4 \mu\text{mol/L}$ CuSO_4).

$0.8 \mu\text{mol/L}$ 时孵化率显著降低, 而且斑马鱼胚胎孵化率随着 CuSO_4 浓度的升高而降低(图 3)。当 CuSO_4 浓度达到 3.2 和 $4.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 孵化

率受到严重影响, 降低至 8.9% 和 5.7% 。

2.2 迷迭香酸对 CuSO_4 致斑马鱼胚胎发育毒性的抑制作用

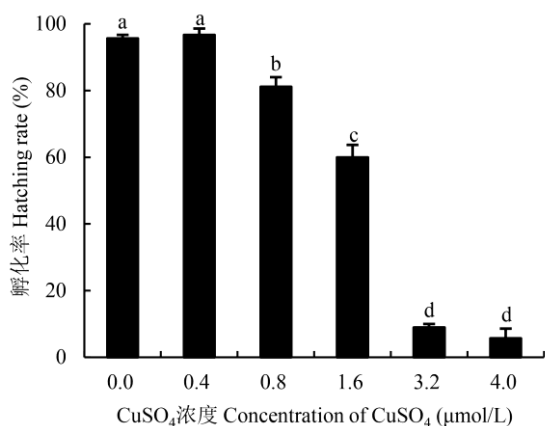


图3 硫酸铜对斑马鱼胚胎孵化率的影响

Fig. 3 The toxic effects of CuSO₄ on hatching rate of zebrafish embryos

图中标注的不同字母表示其间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

与空白对照组相比, 8 μmol/L CuSO₄ 单独处理组斑马鱼胚胎的死亡率升高, 孵化率下降。与 8 μmol/L CuSO₄ 单独处理组相比, 25、50 和 100 μmol/L 迷迭香酸与 8 μmol/L CuSO₄ 共同处理降低了斑马鱼胚胎的死亡率, 提高了孵化率, 且呈浓度依赖性 (图 4)。

2.3 迷迭香酸对 CuSO₄ 致斑马鱼胚胎发育畸形的抑制作用

与空白对照组相比, 1.6 μmol/L CuSO₄ 单独处理组的斑马鱼胚胎的发育异常, 主要表现为脊柱弯曲, 胚胎畸形率为 46.7%, 20、50 和 100 μmol/L 迷迭香酸与 1.6 μmol/L CuSO₄ 共同处理组均明显降低斑马鱼胚胎畸形率 (图 5)。

2.4 斑马鱼胚胎活性氧测定结果

与空白对照组相比, 1.6 μmol/L CuSO₄ 单独处理组的活性氧水平明显升高, 只加入 50 μmol/L 迷迭香酸的荧光密度与空白对照组无差异。

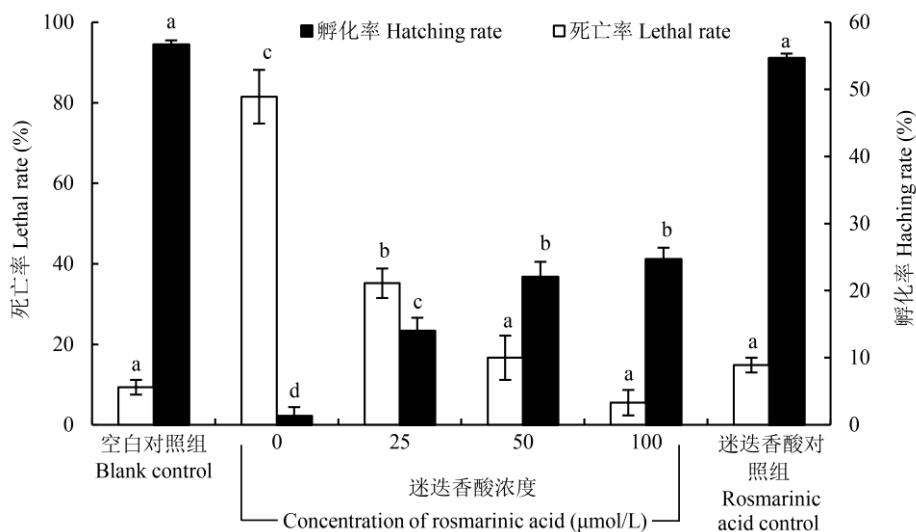


图4 迷迭香酸对 8 μmol/L CuSO₄ 致斑马鱼胚胎发育毒性的抑制作用

Fig. 4 Toxic effect of 8 μmol/L CuSO₄ on zebrafish embryos were inhibited by rosmarinic acid

空白对照组是 E3 培养液中培养的斑马鱼胚胎, 迷迭香酸对照组是在添加 100 μmol/L 迷迭香酸的 E3 培养液中培养的斑马鱼胚胎。

Blank control refers to zebrafish embryos cultured in E3 medium. Rosmarinic acid control refers to zebrafish embryos cultured in E3 medium containing 100 μmol/L rosmarinic acid.

图中标注的不同字母表示其间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

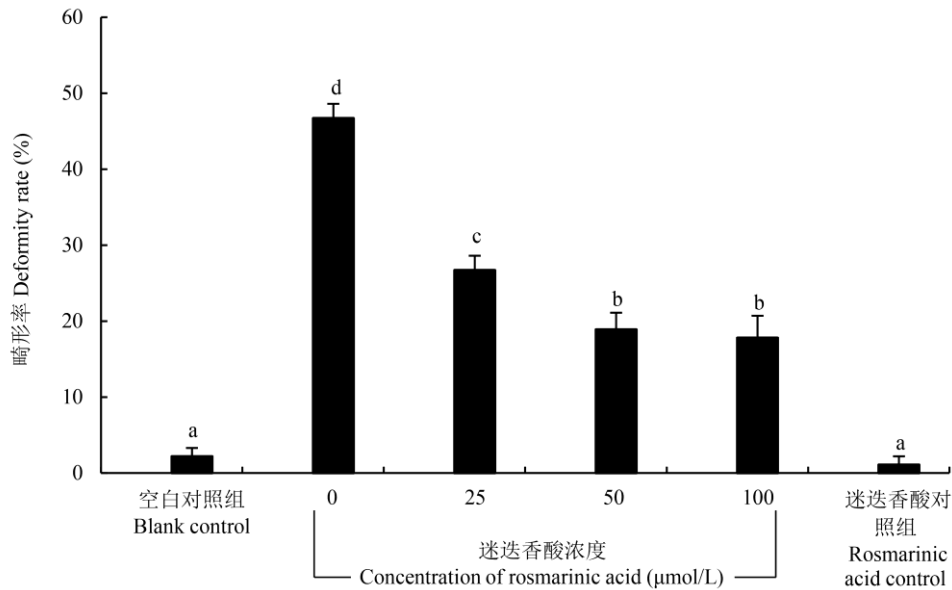


图 5 迷迭香酸对 1.6 μmol/L CuSO₄ 致斑马鱼胚胎发育毒性的抑制作用

Fig. 5 Toxic effect of 1.6 μmol/L CuSO₄ on zebrafish embryos were inhibited by rosmarinic acid

空白对照组是 E3 培养液中培养的斑马鱼胚胎，迷迭香酸对照组是在添加 100 μmol/L 迷迭香酸的 E3 培养液中培养的斑马鱼胚胎。

Blank control refers to zebrafish embryos cultured in E3 medium. Rosmarinic acid control refers to zebrafish embryos cultured in E3 medium containing 100 μmol/L rosmarinic acid.

图中标注的不同字母表示其间存在显著性差异 ($P < 0.05$)，相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

50 μmol/L 迷迭香酸与 1.6 μmol/L CuSO₄ 共同处理时，明显下调了 CuSO₄ 导致的活性氧水平的升高，50 μmol/L 迷迭香酸和 8 μmol/L CuSO₄ 共同处理时，胚胎组织中的活性氧水平与 8 μmol/L CuSO₄ 单独处理相比显著降低(图 6)。

3 讨论

CuSO₄ 消毒灭菌作用强，常用于水产养殖中杀灭有害藻类。CuSO₄ 使用剂量不当会导致鱼类中毒死亡，给水产养殖业造成大量损失。鱼类早期发育阶段的胚胎对外界环境污染敏感。利用斑马鱼胚胎研究污染物毒性效应是最常用的方法之一。因此本实验选择斑马鱼胚胎作为实验材料，研究 CuSO₄ 对其发育的急性毒性，而且通过添加抗氧化剂迷迭香酸研究了抗氧化剂对 CuSO₄ 致斑马鱼胚胎发育毒性的抑制作用。

本实验得到 CuSO₄ 对斑马鱼胚胎 96 hpf 的半致死浓度 LC₅₀ 是 7.7 μmol/L (1.9 mg/L)，半致畸浓度 EC₅₀ 为 1.9 μmol/L (0.9 mg/L)。赖凡 (2016) 以 2 hpf 的斑马鱼胚胎作为实验材料，得到 CuSO₄ 对斑马鱼胚胎 96 hpf 的半致死浓度 LC₅₀ 是 3.755 mg/L，与本实验结果不同，可能主要与实验收集斑马鱼胚胎的时间不同有关。吕爱军等 (2011) 研究表明，CuSO₄ 对斑马鱼 96 h 的半致死浓度 LC₅₀ 是 5.4 mg/L，其选取斑马鱼成鱼为实验材料，而本实验使用的是 1 hpf 斑马鱼胚胎，斑马鱼不同发育阶段对 CuSO₄ 敏感性不同，这是造成两个实验结果不同的主要原因。

蔡文超等 (2009) 研究表明，铜离子可通过绒毛膜进入胚胎，从而造成胚胎孵化率降低，并使胚胎及仔鱼出现畸形等情况。铜离子主要在抑制孵化、抑制生长发育和加快心率等方面

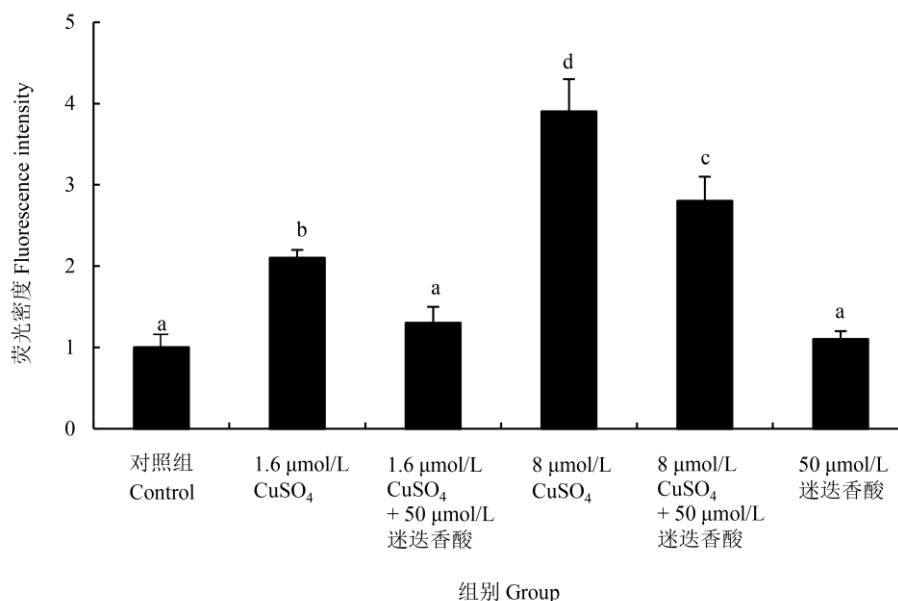


图 6 迷迭香酸抑制对 CuSO₄ 致斑马鱼胚胎活性氧的影响

Fig. 6 The change of ROS level in Zebrafish embryos caused by CuSO₄ were inhibited by rosmarinic acid

图中标注的不同字母表示其间存在显著性差异 ($P < 0.05$), 相同字母代表差异不显著 ($P > 0.05$)。

Different letters mean significant difference ($P < 0.05$), same letters indicate no significant difference ($P > 0.05$).

影响斑马鱼胚胎的早期发育 (Johnson et al. 2007)。氧化应激也是造成 CuSO₄ 对生物体毒害的重要机制之一 (张清顺等 2010)。Rola 等 (2014) 发现斑马鱼肝细胞暴露铜后, 活性氧水平升高, 谷胱甘肽氧化酶和谷胱甘肽转移酶的 mRNA 水平升高。Ganesan 等 (2016) 把斑马鱼胚胎暴露于纳米铜氧化物中, 发现 48 hpf 半致死浓度 LC₅₀ 值大约是 64 mg/L。纳米铜氧化物通过降低抗氧化酶活性而诱导了氧化应激。Yin 等 (2018) 研究表明, 成年斑马鱼暴露重金属铜后, 活性氧、丙二醛和超氧化物歧化酶水平均升高, 引发氧化应激, 对斑马鱼造成毒害。

抗氧化剂能有效调节动物机体氧化还原平衡, 减少氧化应激的产生, 阻止或减少氧化损伤 (朱若岑等 2015)。Olivari 等 (2008) 证明斑马鱼的侧线毛细胞暴露低浓度铜后, 活性氧水平增高, 加入抗氧化剂可以有效抑制铜对侧线毛细胞造成的毒害。抗氧化剂 N-乙酰半胱氨酸可以抑制 CdCl₂ 对斑马鱼胚胎的发育毒性

(鲁疆等 2013)。迷迭香酸是一种天然的抗氧化剂, 其可通过减少活性氧生成, 改善氧化胁迫状态而对 CdCl₂ 导致的斑马鱼胚胎发育毒性起抑制作用 (鲁疆等 2013)。本实验表明, 50 μmol/L 的迷迭香酸能有效降低 CuSO₄ 引起的斑马鱼胚胎死亡率和畸形率的上升, 提高胚胎孵化率。迷迭香酸通过减少体内活性氧的生成, 降低氧化应激, 从而对 CuSO₄ 致斑马鱼的胚胎毒性起抑制作用。

参 考 文 献

- Bakota E L, Winkler-Moser J K, Berhow M A, et al. 2015. Antioxidant activity and sensory evaluation of a rosmarinic extract of *Salvia officinalis*. *Journal of Food Science*, 80(4): 711–717.
- Buttke T M, Sandstrom P A. 1994. Oxidative stress as a mediator of apoptosis. *Immunology Today*, 15(1): 7–10.
- Chen D S, Chan K M. 2011. Differentially expressed proteins in zebrafish liver cells exposed to copper. *Aquatic Toxicology*, 104(3/4): 270–277.

- Ganesan S, Anaimalai T N, Raghunath A, et al. 2016. Acute and sub-lethal exposure to copper oxide nanoparticles causes oxidative stress and teratogenicity in zebrafish embryos. *Journal of Applied Toxicology*, 36(4): 554–567.
- Johnson A, Carew E, Sloman K A. 2007. The effects of copper on the morphological and functional development of zebrafish embryos. *Aquatic Toxicology*, 84(4): 431–438.
- Olivari F A, Hernández P P, Allende M L. 2008. Acute copper exposure induces oxidative stress and cell death in lateral line hair cells of zebrafish larvae. *Brain Research*, 1244: 1–12.
- Rola R C, Marins L F, Nery L E, et al. 2014. Responses to ROS inducer agents in zebrafish cell line: differences between copper and UV-B radiation. *Fish & Shellfish Immunology*, 40(6): 1817–1825.
- Vaughan M, van Egmond R. 2010. The use of the zebrafish (*Danio rerio*) embryo for the acute toxicity testing of surfactants, as a possible alternative to the acute fish test. *Alternatives to Laboratory Animals*, 38(3): 231–238.
- Vostalova J, Zdarilova A, Svobodova A. 2010. *Prunella vulgaris* extract and rosmarinic acid prevent UVB- induced DNA damage and oxidative stress in HaCaT keratinocytes. *Archives of Dermatological Research*, 302(3): 171–181.
- Xu Y, Xu G, Liu L, et al. 2010. Anti- invasion effect of rosmarinic acid via the extracellular signal- regulated kinase and oxidation- reduction pathway in Ls174- T cells. *Journal of Cellular Biochemistry*, 111(2): 370–379.
- Yin J, Wang A P, Li W F, et al. 2018. Time-response characteristic and potential biomarker identification of heavy metal induced toxicity in zebrafish. *Fish & Shellfish Immunology*, 72: 309–317.
- Zhang Y, Li X, Wang Z. 2010. Antioxidant activities of leaf extract of *Salvia miltiorrhiza* Bunge and related phenolic constituents. *Food and Chemical Toxicology*, 48(10): 2656–2662.
- 蔡文超, 区又君. 2009. 重金属离子铜对鱼类早期发育阶段的毒性. *南方水产*, 5(5): 75–79.
- 杜威, 李雅丽, 吴红照, 等. 2013. H₂O₂对Caco-2细胞氧化应激的影响. *浙江农业科学*, (9): 1202–1205.
- 赖凡. 2016. 三种重金属对斑马鱼发育联合毒性及迷迭香酸干预作用研究. 烟台: 烟台大学硕士学位论文.
- 鲁疆, 贺靖, 孙培环, 等. 2013. 迷迭香酸对氯化铜致斑马鱼胚胎发育毒性的保护作用. *生物物理学报*, 29(5): 338–350.
- 吕爱军, 李晓芹, 胡秀彩, 等. 2011. 硫酸铜和氧戊菊酯对斑马鱼急性毒性试验. *安全与环境学报*, 11(2): 8–11.
- 张清顺, 熊邦喜, 侯建军. 2010. 低浓度铜暴露导致梨形环棱螺氧化胁迫及DNA损伤的研究. *水生态学杂志*, 3(5): 49–55.
- 章强, 辛琦, 强丽媛, 等. 2015. 铜及其与四环素的联合暴露对斑马鱼胚胎的毒性效应研究. *生态毒理学报*, 10(5): 35–46.
- 章晓凤, 张微, 周聪. 2012. 氟虫腈和铜对斑马鱼早期发育的联合毒性效应. *浙江工业大学学报*, 40(6): 612–615.
- 钟雯雯, 张志毕, 张兰春, 等. 2017. 迷迭香酸对MPTP诱导的多巴胺神经元损伤的保护作用. *天然产物研究与开发*, 29(10): 1723–1727.
- 朱若岑, 蒋维维, 谭柱良, 等. 2015. 动物体内活性氧、氧化应激与细胞凋亡以及抗氧化剂研究进展. *中兽医医药杂志*, 34(3): 22–26.