

张伟浩,柳贤德,朴伶华. 利用转基因斑马鱼快速检测水体抗生素污染[J]. 江苏农业科学,2019,47(22):269-272.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.22.063

利用转基因斑马鱼快速检测水体抗生素污染

张伟浩¹, 柳贤德¹, 朴伶华²

(1. 海南大学热带农林学院, 海南海口 570228; 2. 海南医学院生理学教研室, 海南海口 570228)

摘要:将转基因斑马鱼 Tg(CYP1A:GFP) 和 Tg(Flk1:EGFP) 暴露于不同浓度的 3 种抗生素(盐酸庆大霉素、硫酸卡那霉素、盐酸万古霉素)中 24 h, 观察其荧光变化。结果表明, 以 ABIX 野生型斑马鱼胚胎进行毒性试验, 药物暴露 24 h 后盐酸庆大霉素、硫酸卡那霉素和盐酸万古霉素的最高合理浓度分别为 120、150、240 $\mu\text{g/mL}$ 。3 种抗生素对 CYP1A 转基因斑马鱼幼鱼药物暴露 24 h 后, 盐酸庆大霉素、硫酸卡那霉素和盐酸万古霉素分别在 2、4、0.4 $\mu\text{g/mL}$ 时开始出现荧光。而与对照(0 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸万古霉素)相比, Flk1 转基因斑马鱼胚胎只有当 240 $\mu\text{g/mL}$ 盐酸万古霉素的高浓度暴露下才会出现血管被显著抑制的效果($P < 0.05$)。综上所述, Flk1 对这 3 种药物的敏感度过低, 不适合用于这 3 种抗生素污染的检测, 而 CYP1A 转基因斑马鱼幼鱼对这 3 种抗生素的敏感度都很高, 可以作为这些抗生素污染的生物监测手段, 这进一步开发了转基因斑马鱼在水环境检测氨基糖苷类和糖肽类抗生素污染中的应用。

关键词: 抗生素; 转基因斑马鱼; 水质检测

中图分类号: X832

文献标志码: A

文章编号: 1002-1302(2019)22-0269-04

近年来, 在全球各地自然环境中频繁检测到抗生素, 这些抗生素大多数为人用非处方药、兽用抗生素和饲料添加剂, 其使用量大, 持续时间持久, 在环境中广泛存在, 对于非靶标生物特别是水生生物的毒性作用逐渐受到重视。以我国为例, 2013 年全国 36 种常用抗生素总消耗量约为 92 700 t, 其中 54 000 t 抗生素经由人和动物排泄到体外, 经过各种污水处理系统, 最终 53 800 t 抗生素进入自然环境中^[1]。畜牧业使用的抗生素绝大多数以原药被牲畜排泄物带进土壤后渗入地下水形成污染; 水产养殖中使用的抗生素则有 70%~80% 最终会进入水环境^[2]。目前使用较多的抗生素的种类主要有: β -内酰胺类、氨基糖苷类、四环素类、氯霉素类、大环内酯类、糖肽类抗生素、喹诺酮类等。

斑马鱼(zebrafish, *Danio rerio*)具有个体小、发育周期短、养殖费用低、体外受精、透明、单次产卵数较高以及对污染物的反应快速等优点。更重要的是, 斑马鱼的基因与人类基因相似度高达 87%, 并拥有与人相似的组织器官和系统, 被国际标准化组织(International Organization for Standardization, ISO)和经济合作与发展组织(Organization for Economic Co-operation and Development, OECD)认定为标准鱼类毒性测试生物。水体受到污染物侵入后, 鱼的生存环境发生转变, 污染物通过鱼类鳃呼吸运动、吞食和鱼体表面渗入进入体内, 继而鱼类的生理活动随着水体环境的污染程度做出反应^[3-4]。其行为变化遵循环境压力模型, 即随时间经历稳定、急剧变化、恢复、逐渐消失过程, 行为强度会随污染物浓度和时间而变

化^[5-6]。相比于斑马鱼成鱼, 早期生命阶段的斑马鱼胚胎因其快速、敏感、高通量和体外测试等优点被逐渐用于环境监测领域, 成为环境监测的“哨兵”和“指示兵”^[7]。

盐酸庆大霉素和硫酸卡那霉素同属氨基糖苷类化合物, 作为廉价的广谱性抗菌素, 在规模化养殖中使用广泛, 近年来也有盐酸庆大霉素对鸡瘟治理效果很好的相关报道^[8]。我国是氨基糖苷类抗生素的主要生产国, 至 2010 年, 盐酸庆大霉素产量突破 2 500 t, 其他如硫酸卡那霉素、奈替米星等的产量合计近 1 000 t^[9]。氨基糖苷类抗生素脂溶性差, 因此人体和畜禽的胃肠道几乎不吸收, 肌肉注射后大部分以原药经肾排泄^[10], 因此在食物链中的富集情况非常严重。有研究认为氨基糖苷类抗性基因是在污水、废水和动物粪便中最频繁检出的一类抗性基因^[11], 在天然水体中也有检出^[12], 并且很多氨基糖苷类抗性基因与可移动遗传元件有关。然而氨基糖苷类抗生素及其抗性基因对环境的影响的相关研究并不多。盐酸万古霉素属于糖肽类抗生素, 其作用机制主要是通过阻碍细菌细胞壁的合成导致致病菌死亡, 临床上主要用于治疗严重革兰氏阳性菌感染, 尤其是耐甲氧西林金黄色葡萄球菌(MRSA)感染^[13]。因对革兰氏阳性菌有很强的抗菌效果, 所以广泛用于家禽、家畜等饲料添加剂和兽药^[14]。但这种药物的滥用导致耐药菌快速产生。据报道, 2003 年出现了大量耐盐酸万古霉素细菌^[15]。因此, 我国农业农村部规定将盐酸万古霉素列为禁用兽药。本试验选用这 3 种使用比较普遍的抗生素为对象, 用生物监测手段观察转基因斑马鱼对不同浓度抗生素的反应, 以期发现斑马鱼对于水质快速检测的潜力, 使水质抗生素检测更经济快捷。

1 材料与方法

1.1 材料

试验药品: 盐酸庆大霉素、硫酸卡那霉素、盐酸万古霉素(Biotopped, 北京)。斑马鱼: ABIX 野生型、Tg(CYP1A:GFP)

收稿日期: 2018-08-18

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31660733); 海南省自然科学基金(编号: ZDXM2015065)。

作者介绍: 张伟浩(1994—), 男, 江苏南通人, 硕士, 主要从事动物遗传育种与繁殖研究。E-mail: 923974568@qq.com。

通信作者: 朴伶华, 博士, 副教授, 主要从事医学生理学研究。
E-mail: plh0708@hotmail.com。

和 Tg(Flk1:EGFP) 转基因型品系购自国家斑马鱼资源中心 (CZRC)。仪器设备:斑马鱼养殖系统(爱生科技发展有限公司,北京);BPC-250 F 型生化培养箱(一恒科学仪器有限公司,上海);X71 荧光显微镜(奥林巴斯公司,日本);一次性吸管、培养皿、塑料六孔细胞培养板(TrueLine,美国);三卡因甲磺酸盐麻醉剂(简称 TMS, CAS 编号:886-86-2, Sigma-Aldrich 公司,美国);氯化钠、碳酸氢钠等化学药品均为分析纯,购自西陇科学股份有限公司;Heal Force 超纯水系统(力康集团,香港)。

1.2 3 种抗生素的毒性试验

斑马鱼胚胎毒性试验:为保证对照组胚胎死亡率小于 5%,排除未受精及异常胚胎对毒性评价的干扰,本试验选择在受精后 48 h(48 hpf) 开始暴露药物。收集到胚胎 6 h 后,去除异常和死胚,最后挑选出发育正常的胚胎。试验浓度范围根据预试验结果设置,将提前配制的高浓度储备液用蓝水稀释到不同梯度,包含 1 个对照组,5 个处理组。每个处理组包含 3 个生物学重复,20 个胚胎为 1 个重复。试验在 6 孔板中进行,每孔加入 20 个健康胚胎,尽量去除水分之后再分别加入不同浓度的处理液 5 mL,对照组加入等体积蓝水。采用半静态方式进行暴露处理,将培养皿置于恒温生化培养箱中,暴露总时间为 96 h(即从 48 hpf~144 hpf),培养箱孵化温度为 $(28 \pm 0.5)^\circ\text{C}$,处理液 pH 值维持在 7,电导率约 $510\ \mu\text{S}/\text{cm}$,溶氧量 $>6\ \text{mg}/\text{L}$,胚胎保持光—暗周期为 14 h—10 h。毒性试验对斑马鱼胚胎每 24 h 更换 1 次处理液,及时挑出死亡的胚胎。每 24 h 对斑马鱼胚胎进行 1 次镜检观察,计量不同时期的各项生理指标和死亡、畸形等数据,进行记录。

1.3 抗生素对血管发育的影响

3 种抗生素的不同浓度对 48 hpf 的 Flk1 斑马鱼胚胎暴露 24 h,然后用荧光显微镜观察节间血管的直径。

1.4 抗生素对 CYP1A 蛋白表达的影响

在对 CYP1A 和 Flk1 的试验中,斑马鱼胚胎于 48 h 用灭

过菌的镊子显微镜下手动破膜,并挑选出正常发育的幼鱼。3 种抗生素的不同浓度对 48 hpf 的 CYP1A 斑马鱼胚胎暴露 24 h,然后用荧光显微镜观察荧光强度。

1.5 试验时间及地点

试验于 2017 年 5 月至 2018 年 2 月,在海南大学热带作物种质资源保护与开发利用教育部重点实验室进行。

1.6 数据统计

CYP1A 斑马鱼胚胎观察其头部荧光强度,用软件 Image J 反转换成灰度值分析出其荧光强度,最终以荧光强度值相互比较;Flk1 斑马鱼胚胎观察其血管发育情况,选取中间部位的节间血管用 Image-Pro plus 分析出血管的直径,试验每组每个浓度胚胎数量至少 20 个。所有数据用 SPSS 分析,graphpad 作图。

2 结果与分析

2.1 斑马鱼胚胎毒性试验

2.1.1 盐酸庆大霉素对胚胎死亡率的影响 根据预试验结果,药物暴露 96 h 后,900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组幼鱼全部死亡,所以笔者选用 900 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 为盐酸庆大霉素的最高浓度。如图 1-A,药物暴露 24 h 后盐酸庆大霉素的毒性开始显露,当盐酸庆大霉素为 180 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时胚胎开始出现极少数死亡,死亡率只有 2.5%。

2.1.2 硫酸卡那霉素对胚胎死亡率的影响 预试验结果表明,药物暴露 96 h 后,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度组幼鱼全部死亡,药物暴露 24 h 后从 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 开始出现死亡(图 1-B)。

2.1.3 盐酸万古霉素对胚胎死亡率的影响 盐酸万古霉素不同浓度暴露 96 h 后,笔者发现当盐酸万古霉素浓度为 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时幼鱼全部死亡,因此将 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 设为处理的最高浓度。药物暴露 24 h 后当盐酸万古霉素浓度为 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时胚胎开始出现死亡,表明盐酸万古霉素的毒性发生点在 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度持续处理 24 h 处(图 1-C)。

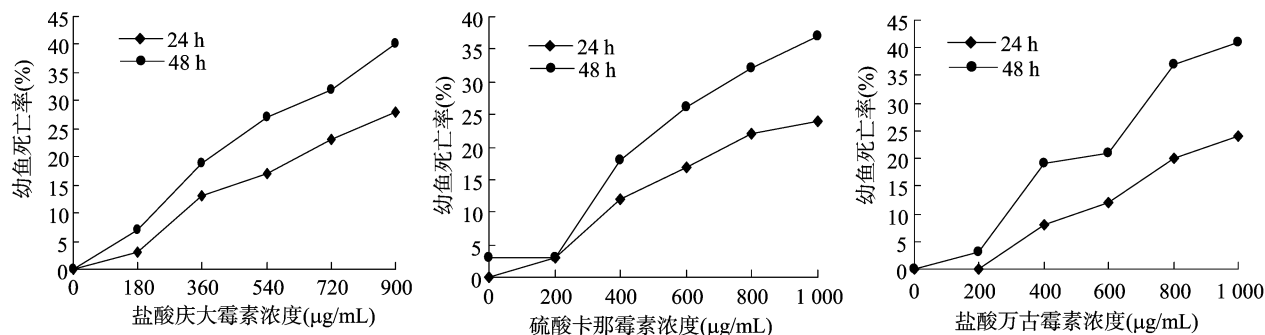


图1 3 种抗生素不同浓度对幼鱼死亡率的影响

2.2 抗生素对血管发育的影响

根据抗生素对胚胎处理 24 h 毒性的影响(图 1),盐酸庆大霉素选用 40、80、120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理 Flk1 幼鱼;硫酸卡那霉素选用 50、100、150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理 Flk1 幼鱼;盐酸万古霉素选用 80、160、240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 浓度处理幼鱼。盐酸庆大霉素和硫酸卡那霉素处理组的节间血管发育与对照(0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)相比无显著差异,当盐酸万古霉素浓度为 240 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理时胚胎血管直径与对照出现显著差异($P < 0.05$)(图 2、图 3),节间血管的直径减少至 2 μm 以下。

2.3 抗生素对 CYP1A 蛋白表达的影响

预试验表明,随着药物处理时间的延长,幼鱼最先出现绿色荧光的是脑部。由图 4 可知,药物暴露 24 h 后,这 3 种抗生素低浓度时可以促进 CYP1A 蛋白质的表达,并有浓度依赖性。由图 4、图 5 可知,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 盐酸庆大霉素处理组开始出现荧光,随着浓度增加各组间荧光强度逐渐增强并具有显著差异($P < 0.05$);4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 硫酸卡那霉素处理组开始出现荧光,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 处理组的荧光强度是 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组的 4 倍,各组与对照组均具有显著差异($P < 0.05$);其中,CYP1A 蛋白对盐酸

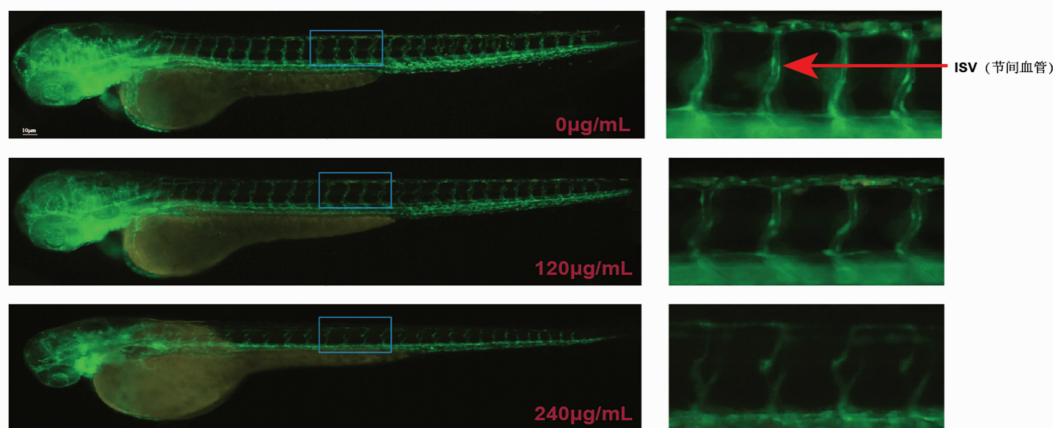
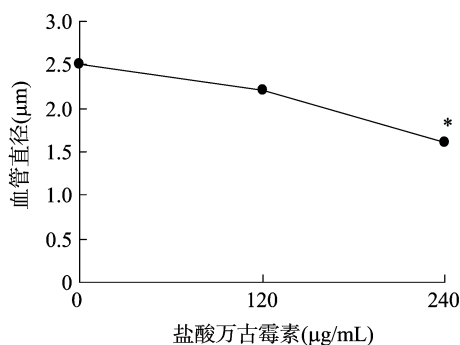


图2 盐酸万古霉素不同浓度对 Flk1 斑马鱼幼鱼节间血管发育的影响



*表示与 0 μg/mL 差异显著 ($P < 0.05$), **表示与 0 μg/mL 差异极显著 ($P < 0.01$)。图 5 同

图3 盐酸万古霉素对节间血管直径的影响

万古霉素的敏感性比盐酸庆大霉素和硫酸卡那霉素更强,在 0.4 μg/mL 处理组就开始出现荧光,相比于氨基糖苷类的盐酸庆大霉素和硫酸卡那霉素更敏感。

3 讨论

氨基糖苷类抗生素具有较强的肾毒性和耳毒性^[16],其滥用滥排现象已对人类和动物的生存环境构成威胁。盐酸万古霉素属糖肽类抗生素,起初因良好的耐药菌治疗效果在畜牧业大量使用,因其滥用造成耐盐酸万古霉素菌快速形成。这些表明,环境中抗生素的污染不容小觑,因此,抗生素的早期检测是非常重要的。笔者希望转基因斑马鱼在作为现代医学模式动物“宠儿”的同时,也能在水环境监测中起到作用。

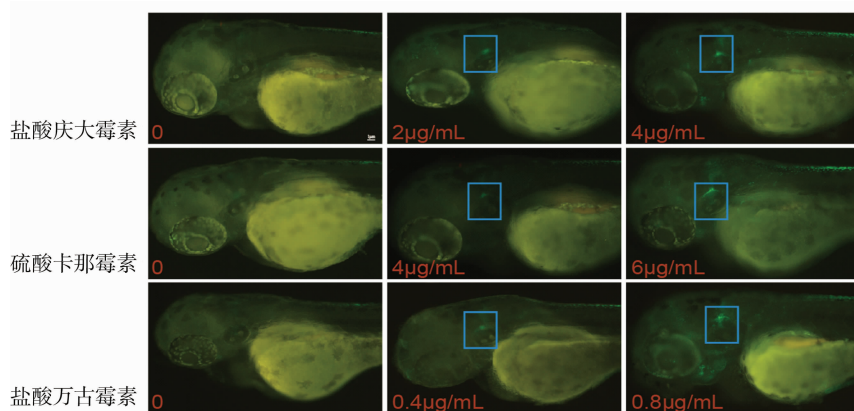


图4 3种抗生素的不同浓度对 CYP1A 斑马鱼幼鱼头部荧光的影响

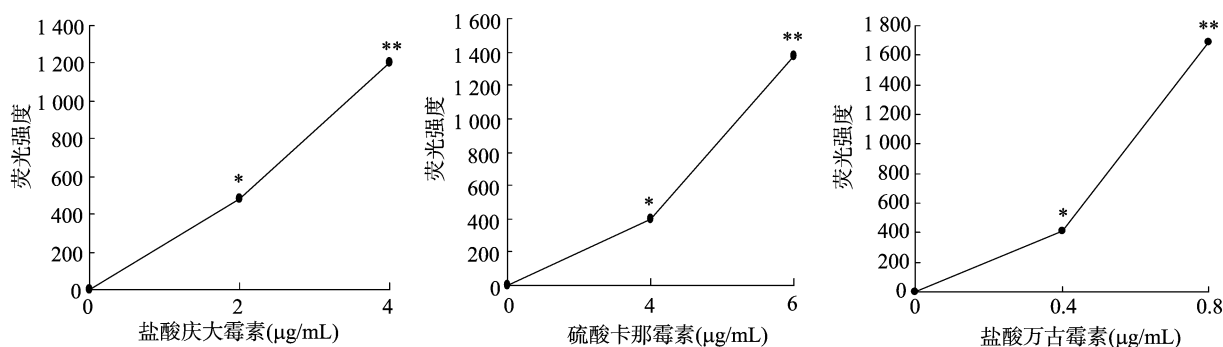


图5 3种抗生素的不同浓度对 CYP1A 斑马鱼头部荧光强度的差异性分析

Flk1 (EGFP)斑马鱼是针对血管发绿色荧光的转基因斑马鱼, Cross 等运用 G-RCFP 标记插到 *VEGF2* 基因的启动子序列表达, 从而得到了有绿色荧光血管的转基因斑马鱼, 能很清楚地观察到血管的状态^[17]。利用血管的可视化, 可以快速准确地看出药物对血管的作用, 本试验结果表明, 盐酸庆大霉素和硫酸卡那霉素在一定浓度下对血管发育没有明显影响, 而盐酸万古霉素在较高浓度时才有抑制血管生成的作用, 这说明 Flk1 转基因斑马鱼不适用于这 3 种抗生素的快速检测。

CYP1A 属于细胞色素 P450 超家族, 广泛分布于脑、肝及其他很多部位中, 参与烃类致癌物的代谢, CYP1A2 在肝组织中有特异性表达, 参与许多前致癌物和前毒物的代谢活化^[18]。CYP1A 转基因斑马鱼目前在水质检测方面较多应用于多环芳香烃类化合物的检测^[19], 很少用于其他污染物的检测。Ohlsen 等检测医院废水中的抗生素浓度, 其中盐酸庆大霉素的浓度不低于 0.01 mg/L^[20]。本试验数据表明, 盐酸庆大霉素和硫酸卡那霉素浓度分别为 2 μg/mL 和 4 μg/mL 时, CYP1A 斑马鱼头部开始出现荧光。盐酸万古霉素浓度为 0.4 μg/mL 时, 幼鱼头部开始出现荧光, 这表明 CYP1A 对盐酸万古霉素更敏感。所以 CYP1A 具有作为氨基糖苷类化合物生物监测手段的潜力。

4 结论

随着基因工程技术的发展, 转基因斑马鱼技术也越来越成熟。本试验得出, CYP1A 斑马鱼在用于检测卤化芳香族碳氢化合物的同时, 也可以作为其他部分化合物的生物标记。Flk1 斑马鱼对这 3 种抗生素的敏感程度太低, 所以不适合作为这 3 种抗生素的检测手段。这说明一种转基因斑马鱼在用于医学定向研究的同时可能还具有用于检测水体中化合物污染的作用, 这进一步扩展了转基因斑马鱼的用途, 为水体环境污染的快速监测提供了更经济方便的手段。

参考文献:

- [1] Zhang Q Q, Ying G G, Pan C G, et al. Comprehensive evaluation of antibiotics emission and fate in the river basins of China: source analysis, multimedia modeling, and linkage to bacterial resistance[J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(11): 6772–6782.
- [2] 叶必雄, 张 岚. 环境水体及饮用水中抗生素污染现状及健康影响分析[J]. *环境与健康杂志*, 2015, 32(2): 173–178.
- [3] Depledge M H, Aagaard A, Györkös P. Assessment of trace metal toxicity using molecular, physiological and behavioural biomarkers[J]. *Marine Pollution Bulletin*, 1995, 31(1/2/3): 19–27.
- [4] Wang W X. Dietary toxicity of metals in aquatic animals: recent studies and perspectives[J]. *Chinese Science Bulletin*, 2013, 58(2): 203–213.
- [5] Ren Z M, Zha J M, Ma M, et al. The early warning of aquatic organophosphorus pesticide contamination by on-line monitoring behavioral changes of *Daphnia magna*[J]. *Environmental Monitoring & Assessment*, 2007, 134(1): 373–383.
- [6] Li Y, Lee J M, Chon Tae-soo, et al. Analysis of movement behavior of zebrafish (*Danio rerio*) under chemical stress using Hidden Markov model[J]. *Modern Physics Letters B*, 2013, 27(2): 1350014.
- [7] 马中雨, 陈家全, 陈兴厅, 等. 斑马鱼对水源特定污染物的水质监测预警[J]. *中国环境监测*, 2015, 31(1): 146–151.
- [8] 赵运吉. 盐酸庆大霉素治鸡瘟有特效[J]. *今日畜牧兽医*, 2018, 34(7): 81.
- [9] Aruguete D M, Kim B, Jr H M, et al. Antimicrobial nanotechnology: its potential for the effective management of microbial drug resistance and implications for research needs in microbial nanotoxicology[J]. *Environmental Science Processes & Impacts*, 2013, 15(1): 93–102.
- [10] 张 红, 程寒飞. 水环境中氨基糖苷类抗性基因污染及研究进展[J]. *环境科学与技术*, 2018, 41(10): 121–130.
- [11] Heuer H, Krögerrecklenfort E, Wellington E M H, et al. [J]. *FEMS Microbiology Ecology*, 2002, 42(2): 289–302.
- [12] Hsu C Y, Hsu B M, Ji W T, et al. A potential association between antibiotic abuse and existence of related resistance genes in different aquatic environments[J]. *Water Air & Soil Pollution*, 2015, 226(1): 2235.
- [13] 盐酸万古霉素临床应用剂量专家组. 盐酸万古霉素临床应用剂量中国专家共识[J]. *中华传染病杂志*, 2012, 30(11): 641–646.
- [14] 何方洋, 罗晓琴, 张 禹, 等. 牛奶中盐酸万古霉素残留的胶体金免疫层析法测定试验[J]. *黑龙江畜牧兽医*, 2013(15): 82–193.
- [15] Fridkin S K, Hageman J, McDougal L K, et al. Epidemiological and microbiological characterization of infections caused by *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin, United States, 1997–2001[J]. *Clinical Infectious Diseases*, 2003, 36(4): 429–439.
- [16] 柳林整. 氨基糖苷类抗生素耳毒性机制的研究进展[J]. *青岛医药卫生*, 2003(3): 221–223.
- [17] Cross L M, Cook M A, Lin S, et al. Rapid analysis of angiogenesis drugs in a live fluorescent zebrafish assay[J]. *Arteriosclerosis Thrombosis & Vascular Biology*, 2003, 23(5): 911–912.
- [18] 孙智慧, 贾顺姬, 孟安明. 斑马鱼: 在生命科学中畅游[J]. *生命科学*, 2006, 18(5): 431–436.
- [19] Guiney P D, Walker M K, Spitsbergen J M, et al. Hemodynamic dysfunction and cytochrome P4501A mRNA expression induced by 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin during embryonic stages of lake trout development[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2000, 168(1): 1–14.
- [20] Ohlsen K, Temes T, Werner G, et al. Impact of antibiotics on conjugational resistance gene transfer in *Staphylococcus aureus* in sewage[J]. *Environmental Microbiology*, 2003, 5(8): 711–716.