

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20230714002

冯敏, 王巧鑫, 斯朝金, 等. 高效氯氰菊酯对秀丽隐杆线虫毒性作用的立体选择性研究[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(6): 207-216

Feng M, Wang Q X, Si C J, et al. Stereoselective toxicity of beta-cypermethrin and its enantiomer exposures on *Caenorhabditis elegans* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(6): 207-216 (in Chinese)

高效氯氰菊酯对秀丽隐杆线虫毒性作用的立体选择性研究

冯敏, 王巧鑫, 斯朝金, 李华悦, 赵甲元*, 廖颖[#]

四川师范大学生命科学学院, 成都 610101

收稿日期: 2023-07-14 录用日期: 2023-09-28

摘要: 为探究高效氯氰菊酯(β -cypermethrin, β -CYP)及其对映体毒性的立体选择性,以秀丽隐杆线虫(*C. elegans*)为模型,分别评估了 β -CYP 及其 4 种对映体对线虫的毒性作用,包括生长发育、摄食行为、运动能力、寿命、体内活性氧自由基(ROS)及抗氧化酶活性等。结果表明,5 种药物分别对线虫进行染毒后,暴露组与溶剂对照组相比,生长发育毒性排序为 1R-trans- α S> β -CYP>1S-trans- α R>1R-cis- α S>1S-cis- α R, 摄食行为毒性排序为 1R-trans- α S>1R-cis- α S>1S-trans- α R> β -CYP>1S-cis- α R, 对线虫运动行为影响不显著,对平均寿命抑制作用排序为 1R-trans- α S>1S-trans- α R>1S-cis- α R>1R-cis- α S> β -CYP, 对线虫体内 ROS 水平、SOD-3 和 GST-4 抗氧化酶的活性抑制作用排序均表现为反式异构体>外消旋体>顺式异构体,不同药物对线虫内部抗氧化酶的调节作用也存在差异。综上所述,4 种手性对映体对线虫的毒性和抗氧化作用存在选择性差异,其中 1R-trans- α S 对线虫的毒性作用普遍强于外消旋体及其他对映单体。

关键词: 高效氯氰菊酯;秀丽隐杆线虫;生态风险;手性对映体;生长抑制

文章编号: 1673-5897(2023)6-207-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Stereoselective Toxicity of Beta-cypermethrin and Its Enantiomer Exposures on *Caenorhabditis elegans*

Feng Min, Wang Qiaoxin, Si Chaojin, Li Huayue, Zhao Jiayuan*, Liao Ying[#]

College of Life Sciences, Sichuan Normal University, Chengdu 610101, China

Received 14 July 2023 accepted 28 September 2023

Abstract: In this study, we investigated the stereo-selective toxicity of beta-cypermethrin (β -CYP) and its four stereoisomers using *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) as a model organism. We assessed the toxicity of β -CYP and its four stereoisomers on *C. elegans* growth and development, feeding behavior, locomotion, lifespan, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, and antioxidant enzyme activities. The results indicated that, compared to the blank control group, the ranking of toxicity for growth and development was 1R-trans- α S > β -CYP > 1S-trans- α R > 1R-cis- α S > 1S-cis- α R. For feeding behavior, the ranking was 1R-trans- α S > 1R-cis- α S > 1S-trans- α R > β -CYP > 1S-cis- α R. There was no significant impact on locomotion. The suppression on average lifespan followed the

基金项目:国家自然科学基金青年项目(31801644)

第一作者:冯敏(2000—),女,硕士研究生,研究方向为细胞生物学,E-mail: 1245086349@qq.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: jiangnanyu123@126.com

共同通信作者(Co-corresponding author), E-mail: 421135278@qq.com

order of 1R-trans- α S > 1S-trans- α R > 1S-cis- α R > 1R-cis- α S > β -CYP. In terms of intracellular ROS levels and the activities of antioxidant enzymes SOD-3 and GST-4, the order of inhibitory effects was generally: trans-isomers > racemate > cis-isomers. Furthermore, different compounds exhibited varied regulatory effects on the nematode's internal antioxidant enzymes. In summary, the stereoisomers displayed selective differences in their toxicity and antioxidant effects on *C. elegans*, with 1R-trans- α S consistently demonstrating greater toxicity than the racemate and other stereoisomers.

Keywords: beta-cypermethrin; *Caenorhabditis elegans*; ecological risks; chiral enantiomers; growth inhibition

随着手性农药广泛的应用,我国目前已登记使用的手性农药超过 270 多种,占农药使用总量近 40%^[1],其中拟除虫菊酯类和有机磷类等手性农药的使用呈逐年上升的趋势^[2-4]。尽管手性化合物在物理化学性质上几乎相同,但在作用于生物体时往往呈现出一定的差异,表现出生物学上的立体选择性特征^[5]。例如,在环境中,它们可能在迁移^[6-7]、降解^[8]、构型转换^[7,9]、趋附行为以及生物活性和毒性方面显示出对映体选择性^[10]。由于手性农药在环境代谢过程中可能会异构化为其他更强毒性或持久性的异构体,导致对其的生态环境和人体健康的毒性评价被高估或者低估。然而,受制于单体制备成本高昂和技术复杂等因素,目前关于手性农药的研究大多限于外消旋体的层面,对映体层面的选择性毒性和平活性差异的报道相对较少^[11-12]。因此,揭示手性农药在环境行为中的立体选择性差异具有实质性意义。在考量手性对映体异构化的层面上,准确评估手性农药的安全性显得尤为迫切。

高效氯氰菊酯(beta-cypermethrin, β -CYP)是一种稳定、高效、广谱^[13-15],对哺乳动物低毒的拟除虫菊酯类杀虫剂^[16]。其具备部分持久性有机污染物(persistent organic pollutants, POPs)的特征,如在环境滞留时间较长、脂溶性较高,以及随食物链逐级富集^[17],此外, β -CYP 还表现出随大气和水等介质传播的特点,从而对全球环境产生影响^[18-19]。研究表明,指未被利用的 β -CYP 可能通过农业渗透、土地径流等途径进入水生生态系统、空气等多种介质^[20],最终通过食物链^[17,21]的途径富集到人体内。因此,对其潜在危害的关注仍然十分必要。

β -CYP 是一种由 1R-cis- α S : 1S-cis- α R : 1R-trans- α S : 1S-trans- α R=2:2:3:3(质量比)的比例构成的外消旋混合物^[22],其手性对映体结构如表 1 所示。作为一种手性药物, β -CYP 在自然环境的迁移、降解^[23]和生物富集过程中会发生立体选择性转化^[5],这可能导致不同的手性对映体表现出不同的毒性效

应^[24]。然而,目前对于 β -CYP 这类手性农药的毒性研究主要局限在外消旋体层面,缺乏对手性农药立体选择性作用的深入研究。为了更加全面地了解 β -CYP 外消旋体与其手性对映体的毒性差异,本研究选用了秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, *C. elegans*, 简称线虫)的 N2、CF1553(SOD-3::GFP)和 CL2166(GST-4::GFP)转基因品系为受试生物。在基于国家农药使用限定标准的基础上设置了暴露浓度^[25],将 β -CYP 及其 4 种手性对映体视为 5 种独立的药物,对线虫进行了不同测试终点的毒性差异评估。这一研究旨在为 β -CYP 的生产、管理和使用提供有力的实验数据支持。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

1.1.1 供试药品和线虫品系

β -CYP(购自广东立威化工有限公司,纯度>98%), β -CYP 的 4 种手性对映体:1S-cis- α R、1R-cis- α S、1R-trans- α S 和 1S-trans- α R(委托大赛璐药物手性技术有限公司制备与分离得到,纯度均≥98%)。将 β -CYP 及其 4 种手性对映体作为 5 种独立的药物分别溶于二甲基亚砜(DMSO,购自 Biofroxx,纯度≥99.9%),均制备成 7.5 mg·mL⁻¹ 储备液并避光保存于常温下,实验时,用 M9 缓冲液(3 g KH₂PO₄、15.137 g Na₂HPO₄·12H₂O、5 g NaCl、1 L ddH₂O)稀释成工作液,进行后续实验。

野生型秀丽隐杆线虫 N2、转基因线虫 CF1553 {muIs84 [(pAD76) sod-3p::GFP+rol-6(su1006)]}、CL2166 {dvIs19[(pAF15) GST-4p::GFP:NLS] III} 均由美国线虫遗传中心(Caenorhabditis Genetics Center, CGC)提供。

1.2 线虫培养和同步化

线虫培养于以尿嘧啶缺陷型大肠杆菌(*E. coli* OP50)为食物的线虫固体生长培养基(NGM)中,所有线虫均在 20 ℃ 培养条件下进行。将新鲜配制的碱性裂解液(混合比例为 V(4% NaClO) : V(5 mol·

L^{-1}NaOH : $V(\text{ddH}_2\text{O})=1:2:7$)和线虫悬液按体积比为2:1混匀,裂解产卵期线虫获得同步化的虫卵,培养至L4期进行后续实验。

1.3 线虫生长发育测定

根据我国食品安全国家标准GB 2763—2021^[25],选取 β -CYP及其4种对映体,分别设置浓度为0.06、0.3、1.5、7.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 进行线虫的暴露实验。暴露结束后,将线虫置于2%琼脂载玻片上,加入30 μL 的 NaN_3 溶液进行麻醉处理,DM3000正置荧光显微镜下拍照并测定。

1.4 摄食行为能力测定

本实验通过观察线虫头部以下咽泵的跳动频率来判断线虫的进食受到的影响,暴露方法与前述相同,显微镜观察线虫自由进食过程中咽泵的跳动频率,记录60 s内线虫咽泵跳动次数,即线虫咽泵跳动指标。

1.5 线虫运动能力测定

将暴露结束后的线虫转至每孔含200 μL 的M9缓冲液的96孔板中恢复1 min后,对1 min内

线虫身体弯曲的次数进行计数。线虫相对于其身体长轴方向1个波长的运动记为1次身体弯曲。

1.6 寿命测定

将L4期的N2定义为 $t=0$,每组挑取50条L4期线虫于涂布有不同浓度的 β -CYP及其4种对映体的NGM中,放置于20 °C生化培养箱培养。繁殖期每24 h进行1次转移,其余时间段为每48 h转移1次。转移前在体视显微镜下观察线虫的生存状况,并记录线虫的死亡数和丢失数,计算存活率。直至线虫用铂丝轻触虫体,无任何反应即定义为死亡。

1.7 ROS测定

采用细胞渗透性荧光探针2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)反映线虫体内ROS水平。处理后的线虫用M9缓冲液反复清洗3次,将线虫转移至终浓度50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的DCFH-DA中,20 °C孵育3 h。随后转移至载玻片进行麻醉处理,荧光显微镜(485 nm和530 nm激发和发射波长)下观察拍照,ImageJ分析各照片荧光强度。

表1 4种高效氯氰菊酯异构体的基本信息

Table 1 Basic information on the four beta-cypermethrin isomers

顺反 Contrary	化学药品 Chemicals	化学结构 Chemical structures	SMART 表达式 SMART expression
顺式异构体 Cis-isomer	1S-cis- α R		$[\#6]-[\#6]-1(-[\#6])-[\#6@H]-[\#6]=[\#6](-[\text{Cl}])-[\text{Cl}])-[\#6@@H]-1-[\#6]-([\#8]-[\#6@H]-[\#6][\#7])-c2cccc(c2)-[\#8]-c3ccccc3)=[\#8]$
	1R-cis- α S		$[\#6]-[\#6]-1(-[\#6])-[\#6@@H]-[\#6]=[\#6](-[\text{Cl}])-[\text{Cl}])-[\#6@H]-1-[\#6]-([\#8]-[\#6@H]-[\#6][\#7])-c2cccc(c2)-[\#8]-c3ccccc3)=[\#8]$
反式异构体 Trans-isomer	1R-trans- α S		$[\#6]-[\#6]-1(-[\#6])-[\#6@H]-[\#6]=[\#6](-[\text{Cl}])-[\text{Cl}])-[\#6@H]-1-[\#6]-([\#8]-[\#6@H]-[\#6][\#7])-c2cccc(c2)-[\#8]-c3ccccc3)=[\#8]$
	1S-trans- α R		$[\#6]-[\#6]-1(-[\#6])-[\#6@@H]-[\#6]=[\#6](-[\text{Cl}])-[\text{Cl}])-[\#6@H]-1-[\#6]-([\#8]-[\#6@H]-[\#6][\#7])-c2cccc(c2)-[\#8]-c3ccccc3)=[\#8]$

注:高效氯氰菊酯的结构表现为1C、3C和 α C的不对称碳位;SMARTS表达式中@表现为手性逆时针,@@表现为手性顺时针。

Note: Structure of beta-cypermethrin showing asymmetric carbon positions at 1C, 3C, and α C; in the SMARTS expression, @ is chiral anticlockwise and @@ is chiral clockwise.

1.8 转基因线虫体内 GST-4::GFP 和 SOD-3::GFP 的表达能力测定

将转基因 CF1553 转基因线虫(SOD-3::GFP)和 CL2166 突变体线虫(GST-4::GFP)暴露于最高浓度药物的 NGM 中进行处理, 暴露结束后, 荧光显微镜下观察拍照, ImageJ 分析各照片荧光强度。

1.9 数据统计分析

采用 SPSS 22.0 对数据进行统计学分析, 组间差异采用单因素方差分析, 用 Excel 2010, Graphpad Prism 7.0 软件进行绘图, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果(Results)

2.1 对生长发育影响

以秀丽线虫的体长和体宽为评估指标, 观察 β -CYP 及其 4 种手性对映体对线虫发育的影响。如图 1 所示, 5 种药物对线虫的体长抑制率与药物浓度呈正相关, 随着高效氯氟菊酯及其 4 种对映体浓度的增加, 线虫的体长受到显著影响($P<0.05$)。与溶剂对照组和 β -CYP 处理组相比, 1R-trans- α S 处理组显示出最强的生长抑制效应($P<0.01$), 是 4 种手性对映体药物中对线虫体长发育影响最大的。而 1S-cis- α R 处理组的抑制效果较弱。但是, 这 5 种药物

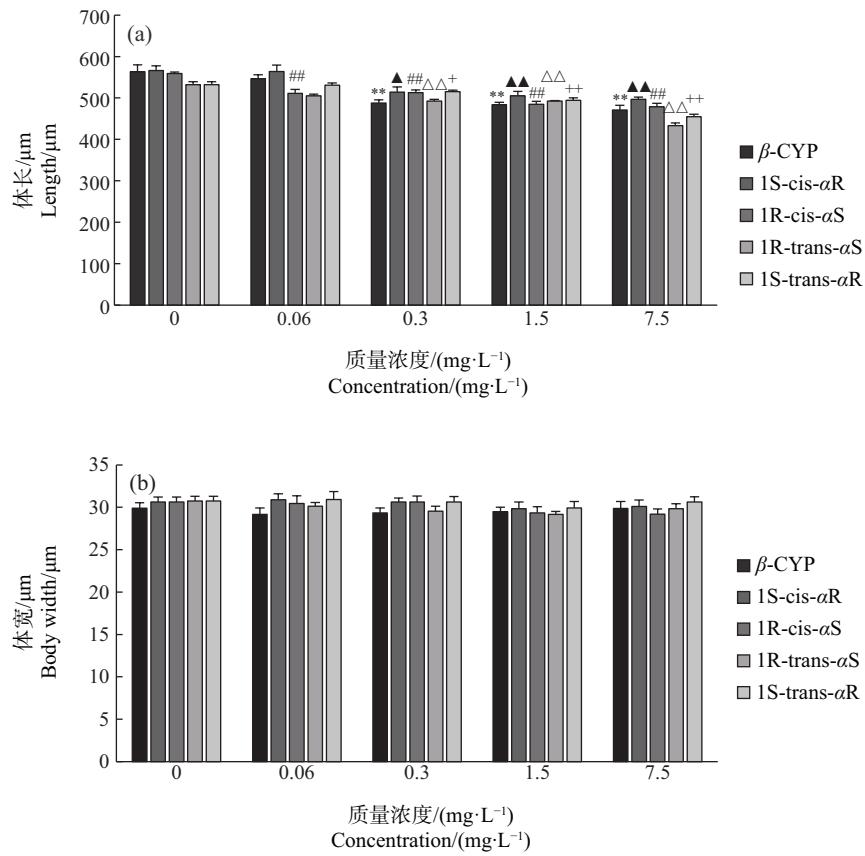


图 1 β -CYP 及其 4 种手性对映体对线虫生长发育指标体长(a)和体宽(b)的影响

注: 0 表示 0.1% DMSO 溶剂对照组, 所有暴露组均与相对应的溶剂对照组相比; * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$ (β -CYP 暴露组与溶剂对照组相比); ▲表示 $P<0.05$, ▲▲表示 $P<0.01$ (1S-cis- α R 暴露组与溶剂对照组相比); #表示 $P<0.05$, ##表示 $P<0.01$ (1R-cis- α S 暴露组与溶剂对照组相比); Δ表示 $P<0.05$, ΔΔ表示 $P<0.01$ (1R-trans- α S 暴露组与溶剂对照组相比); +表示 $P<0.05$, ++表示 $P<0.01$ (1S-trans- α R 暴露组与溶剂对照组相比), 无标注均表示 $P>0.05$, 下同。

Fig. 1 Effects of β -CYP and its four chiral enantiomers on nematode growth and development indexes body length (a) and body width (b)

Note: 0.1% DMSO represents the solvent control group, and all exposure groups are compared to the corresponding solvent control group; * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$ (β -CYP exposure group compared to solvent control group); ▲ represents $P<0.05$, ▲▲ represents $P<0.01$ (1S-cis- α R exposure group compared to solvent control group); # represents $P<0.05$, ## represents $P<0.01$ (1R-cis- α S exposure group compared with solvent control group); Δ represents $P<0.05$, ΔΔ represents $P<0.01$ (1R-trans- α S exposure group compared to solvent control group); + represents $P<0.05$, ++ represents $P<0.01$ (1S-trans- α R exposure group compared to solvent control group); no label indicates $P>0.05$; the same as below.

对线虫的体宽没有产生显著影响($P>0.05$)。

2.2 对摄食行为影响

观察咽泵频率来评估秀丽隐杆线虫在长期药物暴露后的进食速率。如图2所示,与溶剂对照组相比, β -CYP及其4种手性对映体均显著影响秀丽隐杆线虫的进食,且这种影响呈浓度依赖性。随着药物浓度的增加,咽泵振动频率逐渐降低。1R-trans- α S处理组与溶剂对照组以及 β -CYP处理组相比,抑制效果最强($P<0.01$),而1S-cis- α R处理组的抑制效果最弱($P<0.01$)。

2.3 对运动能力影响

通过检测线虫的身体摆动频率,来评估秀丽隐杆线虫的运动行为在长期药物暴露后是否受到影晌^[26]。如图3所示,经过不同药物的不同浓度处理后,与溶剂对照组相比,秀丽隐杆线虫的摆动频率没有发生显著变化($P>0.05$)。这表明高效氯氰菊酯及其4种手性对映体在所测试的浓度下并未显著影响秀丽隐杆线虫的运动能力。

2.4 对寿命影响

观察不同浓度的 β -CYP以及4种对映体对秀丽隐杆线虫寿命的影响。如图4和表2所示,与溶剂对照组相比, β -CYP处理组中最高浓度($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组导致线虫的平均寿命显著缩短至(10.487 ± 0.579) d,抑制率为15.6% ($P<0.05$);1S-cis- α R和1R-cis- α S处理组中,最高浓度($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组都显著降低线虫的平均寿命,分别缩短至(9.538 ± 0.724) d和(9.697 ± 0.721) d,抑制率分别为19.3%和18.0% ($P<0.05$);1R-trans- α S和1S-trans- α R最高浓度($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)组的平均寿命分别缩减至(9.506 ± 0.513) d和(10.024 ± 0.554) d,抑制率分别为23.4%和19.3% ($P<0.01$)。这表明,所有药物处理均对线虫寿命产生一定程度的缩短效应,其中1R-trans- α S的影响最显著。与 β -CYP处理组相比,1R-trans- α S在最高浓度($7.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)下的平均寿命抑制率为9.4% ($P<0.05$),而其他药物处理组对线虫寿命均无显著影响。

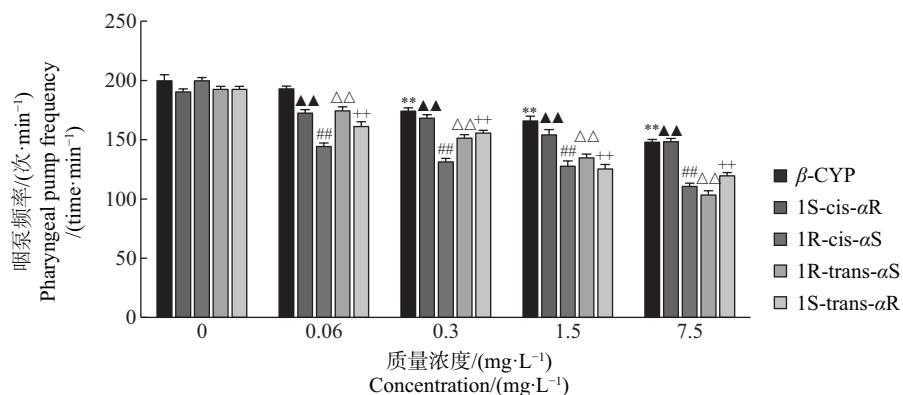


图2 β -CYP及其4种手性对映体对线虫咽泵频率的影响

Fig. 2 Effect of β -CYP and its four chiral enantiomers on the frequency of nematode pharyngeal pumps

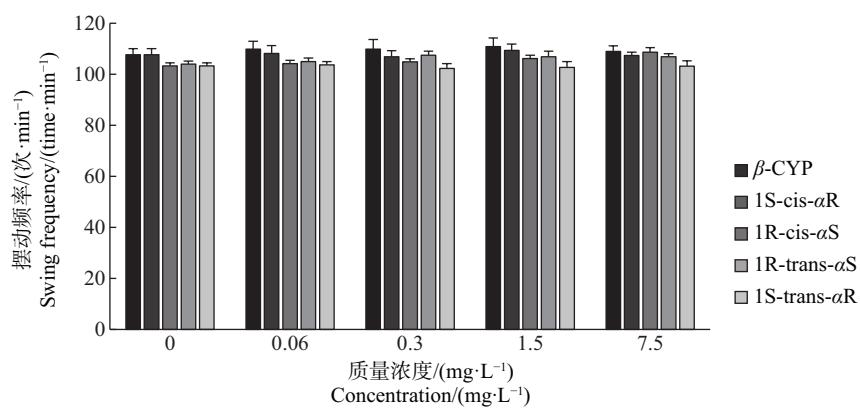
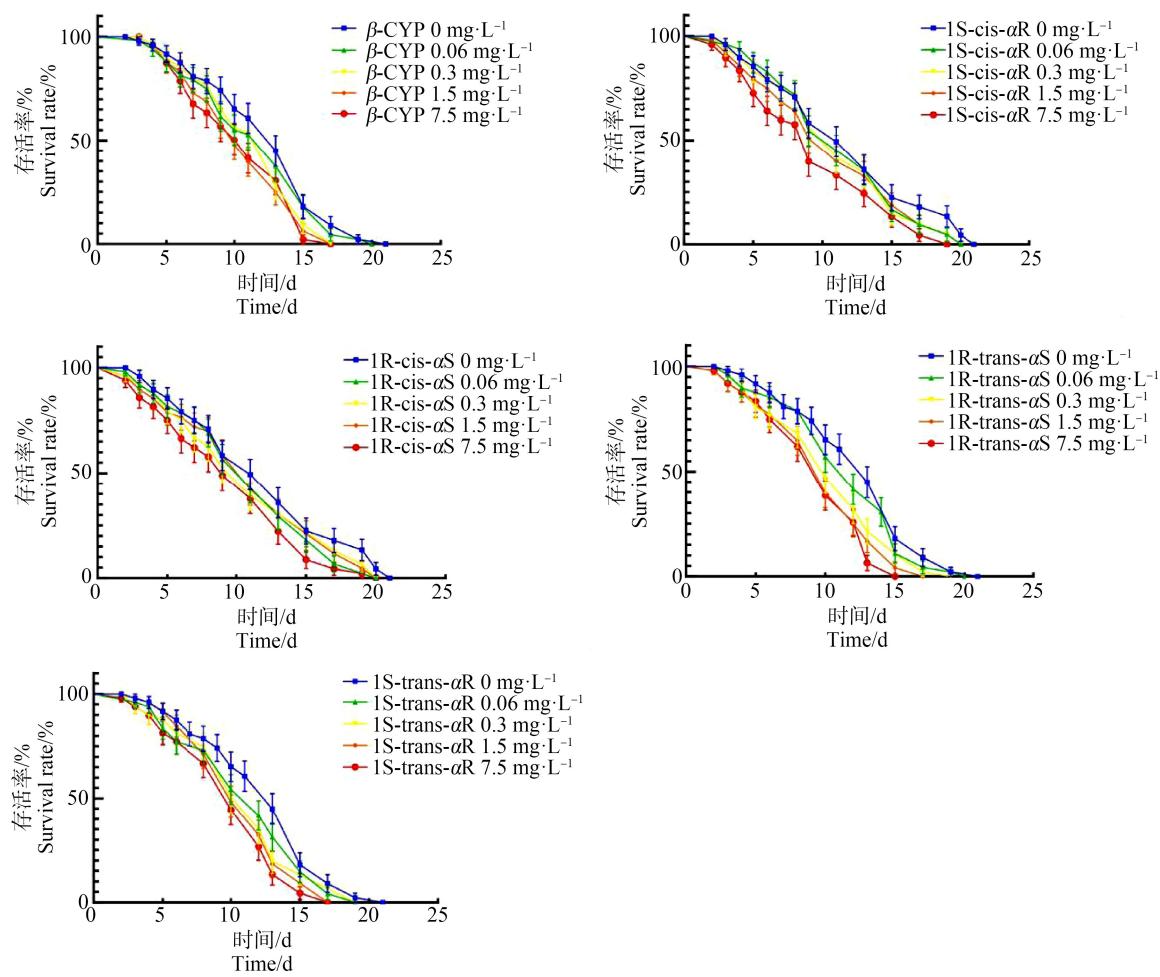


图3 β -CYP及其4种手性对映体对线虫摆动频率的影响

Fig. 3 Effect of β -CYP and its four chiral enantiomers on the oscillation frequency of nematodes

图4 β -CYP 及其4种手性对映体对线虫存活率的影响Fig. 4 Effect of β -CYP and its four chiral enantiomers on nematode survival表2 β -CYP 及4种手性对映体对线虫寿命的影响Table 2 Effects of β -CYP and four cypermethrin isomers on nematode lifespan

浓度/(mg·L⁻¹) Concentration/(mg·L⁻¹)	平均寿命/d Average life/d				
	β -CYP	1S-cis- α R	1R-cis- α S	1R-trans- α S	1S-trans- α R
0	12.418±0.651	11.825±0.777	11.825±0.777	12.418±0.651	12.418±0.651
0.06	11.588±0.656	11.356±0.702	10.998±0.714	11.647±0.606	11.247±0.635
0.3	11.308±0.566	11.117±0.725	10.796±0.779	10.496±0.614*	10.985±0.618
1.5	10.545±0.556*	10.707±0.762	11.007±0.783	9.898±0.563**	10.812±0.534*
7.5	10.487±0.579*	9.538±0.724*	9.697±0.721*	9.506±0.513**	10.024±0.554**

注: 平均寿命结果以平均值±标准误表示; 各药物暴露组分别与对应的溶剂对照组相比,* 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$ 。

Note: Life mean results are expressed as mean±standard errors; each drug exposure group was compared with the corresponding solvent control group, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$.

2.5 对体内活性氧(ROS)水平影响

选取 β -CYP 及 4 种手性对映体 5 种药物, 以最高浓度 $7.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 对线虫进行暴露。结果如图 5 所示, 与溶剂对照组相比, 各药物处理组中线虫体内的

ROS 相对荧光强度均显著增加($P<0.01$)。具体而言, β -CYP、1S-cis- α R、1R-cis- α S、1R-trans- α S 和 1S-trans- α R 处理组的 ROS 水平分别上升了 82.4%、42.9%、58.1%、206.6% 和 110.6%。其中, 1R-trans-

αS 处理组对线虫体内 ROS 的促进效果最强。与 β -CYP 处理组相比,1S-cis- αR 和 1R-cis- αS 处理组的 ROS 水平分别降低了 22.6% 和 14.3%, 而 1R-trans- αS 和 1S-trans- αR 处理组的 ROS 荧光强度分别增加了 68.1% 和 15.5%。这表明反式异构体对线虫的 ROS 水平影响普遍强于顺式异构体。

2.6 对转基因线虫体内 GST-4::GFP 和 SOD-3::GFP 表达的影响

本实验中,采用转基因线虫 CF1553 (SOD-3::GFP)和 CL2166(GST-4::GFP)作为研究对象,通过检测相对荧光表达量来评估抗氧化酶 SOD-3 和 GST-4 的表达水平。其中药物对 CF1553 转基因线虫 SOD-3 表达水平的影响如图 6 所示,与溶剂对照组相比, β -CYP、1R-cis- αS 、1R-trans- αS 、1S-trans- αR 处理组均对抗氧化酶 SOD-3 的表达产生不同程度的抑制效应,相对荧光强度分别下降了 24.0%、28.2%、37.3%、17.9% ($P<0.01$),而 1S-cis- αR 处理组 SOD-3 的表达未受到显著影响($P>0.05$)。而与 β -CYP 处理组相比,1R-trans- αS 处理组的 SOD-3::GFP 荧光强度低于 β -CYP 处理组的 17.5% ($P<0.01$),而其他 2 组 1R-cis- αS 和 1S-trans- αR 无显著差异。药物对 CL2166 转基因线虫 GST-4 表达水平的影响如图 7 所示,与溶剂对照组相比,1S-cis- αR 、1R-cis- αS 处理组没有发生显著变化($P>0.05$), β -CYP 和 1S-trans- αR 处理组 GST-4 的荧光强度下降了 23.3% 和 27.4% ($P<0.05$),1R-trans- αS 组显著下降了 34.4% ($P<0.01$)。而与 β -CYP 处理组相比,1R-trans- αS 处理组 GST-4 的荧光强度下降了 14.5%,而其他对映体药物处理组均未显著抑制 GST-4::GFP 表达。这些结果说明,5 种药物除 1S-cis- αR 处理组外,均一定程度上抑制了 2 种抗氧化酶的表达,降低了线虫抗氧化应激的能力。

3 讨论(Discussion)

拟除虫剂高效氯氰菊酯在农业领域的广泛使用引发了环境安全的担忧。然而, β -CYP 并非单一化合物,而是由 4 种手性对映体(1R-cis- αS 、1S-cis- αR 、1R-trans- αS 和 1S-trans- αR)组成的混合物。这个复杂的结构引发了一个重要问题:不同手性对映体是否表现出不同的毒性效应?本研究探讨 β -CYP 及其手性对映体对秀丽隐杆线虫的生长发育、摄食行为、运动能力、寿命和 ROS 相对表达水平等指标的影响,从手性对映体层面来综合评判 β -CYP 的立体选择性毒性差异,并采用 GFP 标记突变型线虫

CF1553(SOD-3::GFP)和 CL2166(GST-4::GFP)来分析氧化损伤可能的途径。

研究表明,将线虫分别暴露于 β -CYP 及其 4 种手性对映体中,各药物对线虫生长和摄食速率均呈现出浓度依赖性抑制作用。其中,1R-trans- αS 和 1R-cis- αS 表现出较强毒性,而 1S-cis- αR 和 1S-cis- αR 相对较弱,这一结果与先前的斑马鱼胚胎孵化率^[27]和急性毒性试验^[28]结果相一致。寿命实验也表明,5 种药物的高浓度组都显著缩短了线虫的平均寿命,而与消旋体处理组相比,1R-trans- αS 组对线虫寿命的抑制效应最显著,而其他 3 组的寿命毒性没有显著差异。这提示 β -CYP 及其手性对映体的暴露可能引发线虫应激反应,保持了其运动能力,但明显抑制了生长、进食和促进了寿命的缩短。然而,值得注意的是,这些毒性效应在不同对映体之间存在一定差异,进一步突显了其立体选择性毒性差异。

高水平的 ROS 积累已被广泛认为会导致氧化应激,引发细胞结构损伤,并可能加速衰老和死亡^[29-30]。本研究表明 5 种药物的最高浓度组均显著增加了线虫体内 ROS 积累,其中 1R-trans- αS 处理组中,线虫体内 ROS 水平上升了 206.6%。不容忽视的是,1R-trans- αS 处理组同时也表现出了最显著的生长发育抑制和寿命缩短效应,这一结果说明 ROS 的过量积累可能是导致线虫细胞结构受损、抑制生长发育以及促进线虫死亡的主要原因之一。

为了管理氧化应激,超氧化物歧化酶担任细胞抗氧化保护系统的第一道防线^[31-32],而还原型谷胱甘肽 S-转移酶在过氧化物的转移过程起着重要作用^[33],它们分别在维持细胞氧化还原状态^[34]中扮演着重要角色。为了更深入地探究这一现象,采用 GFP 标记的转基因线虫 CF1553 (SOD-3::GFP) 和 CL2166(GST-4::GFP),分析氧化损伤的潜在机制。结果表明,与 β -CYP 处理组相比,1S-cis- αR 和 1R-cis- αS 的促 ROS 增强效应相对较弱,1S-cis- αR 处理组对 SOD-3 和 GST-4 这 2 种抗氧化酶没有产生明显的抑制作用,其导致 ROS 增加的途径需要更多研究。而 1R-cis- αS 处理组则仅对 SOD-3 的活性具有明显的抑制作用,从而促使线虫体内 ROS 积累。1R-trans- αS 和 1S-trans- αR 处理组均显著抑制了 2 种抗氧化酶的表达,特别是 1R-trans- αS 处理组抑制效果最为显著,从而加剧了线虫体内 ROS 的积累。总体而言,5 种药物对线虫体内 ROS 的促进效应普遍表现为反式异构体>外消旋体>顺式异构体。这

与 Mu 等^[28]发现 1R-cis- α S、1R-trans- α S 和 β -CYP 对斑马鱼肝脏和脑中抗氧化酶水平有明显的调节作用结果一致。

综上所述,本研究明确了 β -CYP 型手性农药及其 4 种手性对映体的明显毒性立体选择性。这种立体选择性毒性可能源于反式异构体和顺式异构体在

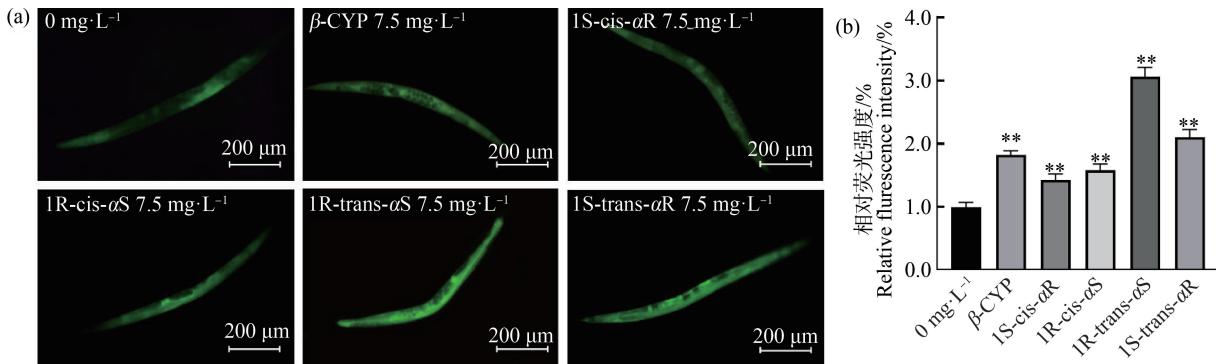


图 5 β -CYP 及其 4 种对映体高浓度组对线虫体内活性氧(ROS)的影响

注:(a) 线虫体内 ROS 荧光图;(b) ROS 相对荧光强度。

Fig. 5 Effect of β -CYP and its four enantiomeric high-dose groups on reactive oxygen species (ROS) in nematodes

Note: (a) ROS fluorescence image in *C. elegans*; (b) Relative fluorescence intensity of ROS.

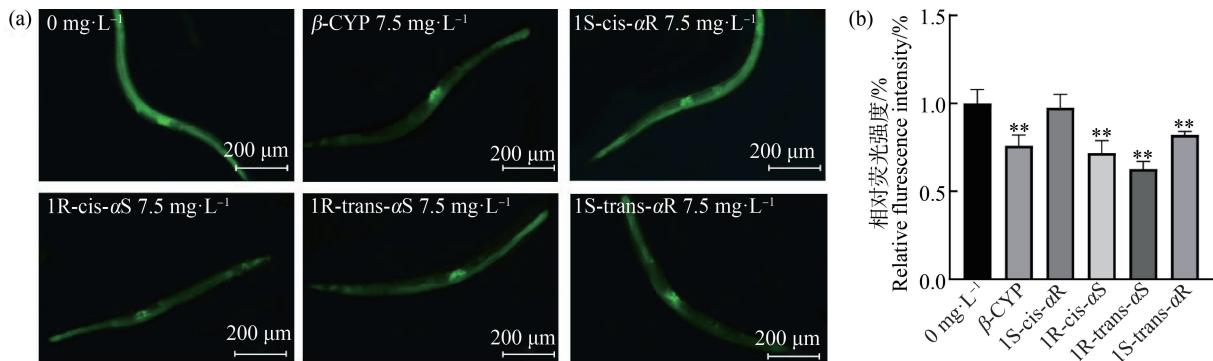


图 6 β -CYP 及其 4 种手性对映体对 CF1553 转基因线虫 SOD-3 表达水平的影响

注:(a) 线虫体内 SOD-3::GFP 荧光图;(b) SOD-3::GFP 相对荧光强度。

Fig. 6 Effects of β -CYP and its four chiral enantiomers on SOD-3 expression of *Caenorhabditis elegans*

Note: (a) SOD-3::GFP fluorescence image in *C. elegans*; (b) Relative fluorescence intensity of SOD-3::GFP.

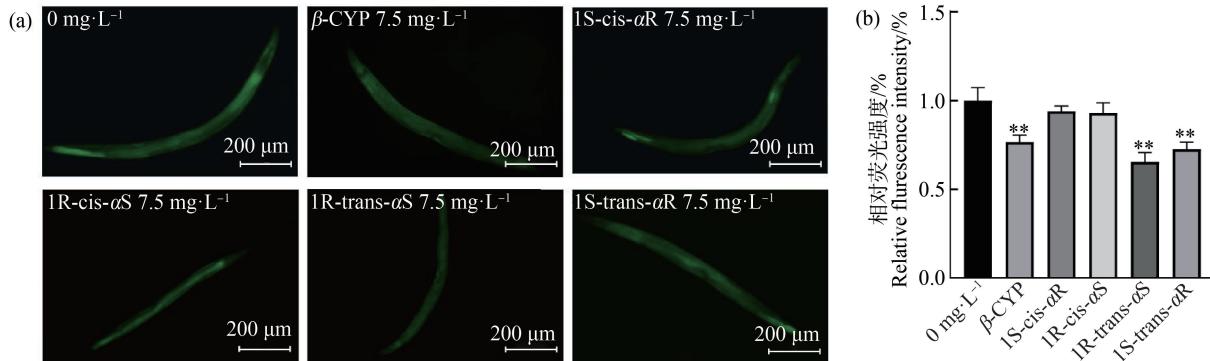


图 7 β -CYP 及其 4 种手性对映体对 CL2166 转基因线虫 GST-4 表达水平的影响

注:(a) 线虫体内 GST-4::GFP 荧光图;(b) GST-4::GFP 相对荧光强度。

Fig. 7 Effects of β -CYP and its four chiral enantiomers on GST-4 expression of *Caenorhabditis elegans*

Note: (a) GST-4::GFP fluorescence image in *C. elegans*; (b) Relative fluorescence intensity of GST-4::GFP.

三维空间构象上的差异,导致它们与生物受体形成氢键的方式不同,最终影响了配体-受体复合物的稳定性和亲和力。因此,需要进一步深入研究特定的信号通路和受体,通过分子对接手段来分析不同构型对映体与不同生物受体的结合位点和空间取向,来深刻理解这些立体异构引发的毒性选择性差异。这不仅有助于加深对 β -CYP型手性农药及其4种手性对映体选择性毒性的理解,更为未来该农药的生产、管理和使用提供了重要的理论依据。

通信作者简介:赵甲元(1984—),男,博士,副教授,主要研究方向为功能性食品、生物降解与转化。

共同通信作者简介:廖颖(1976—),女,硕士,副教授,主要研究方向为天然产物的生物学功效与环境污染物和健康相关研究。

参考文献(References):

- [1] Ye J, Zhao M R, Liu J, et al. Enantioselectivity in environmental risk assessment of modern chiral pesticides [J]. Environmental Pollution, 2010, 158(7): 2371-2383
- [2] Sharma B. Nature of chiral drugs and their occurrence in environment [J]. Journal of Xenobiotics, 2014, 4(1): 14-17
- [3] Qu H, Wang P, Ma R X, et al. Enantioselective toxicity, bioaccumulation and degradation of the chiral insecticide fipronil in earthworms (*Eisenia fetida*) [J]. The Science of the Total Environment, 2014, 485-486: 415-420
- [4] 王宁,李建华,谭文丽,等.有机磷农药手性对映体生物活性、生态毒性及环境行为研究[J].热带农业工程,2019,43(4): 49-54
Wang N, Li J H, Tan W L, et al. Bioactivity, ecotoxicity and environmental behavior of chiral enantiomers of organophosphorus pesticides [J]. Tropical Agricultural Engineering, 2019, 43(4): 49-54 (in Chinese)
- [5] 郭浩铭,魏一木,刘雪科,等.手性农药选择性生物活性与毒性效应研究进展[J].农药学学报,2022,24(5): 1108-1124
Guo H M, Wei Y M, Liu X K, et al. Research progress on the stereoselective bioactivity and toxicity of chiral pesticides [J]. Chinese Journal of Pesticide Science, 2022, 24(5): 1108-1124 (in Chinese)
- [6] 范瑞芳,方展强,于志强,等.手性农药的环境行为研究进展[J].生态环境,2008,17(4): 1690-1695
Fan R F, Fang Z Q, Yu Z Q, et al. Research progress in environmental fate of chiral pesticides [J]. Ecology and Environment, 2008, 17(4): 1690-1695 (in Chinese)
- [7] Ulrich E M, Morrison C N, Goldsmith M R, et al. Chiral pesticides: Identification, description, and environmental implications [J]. Reviews of Environmental Contamination and Toxicology, 2012, 217: 1-74
- [8] 程凤宁.典型手性农药的光解及土壤降解中的手性稳定性[D].石家庄:河北科技大学,2011: 6-7
Cheng F N. Research on photolysis of typical chiral pesticides and the chiral stability of degradation in soil [D]. Shijiazhuang: Hebei University of Science and Technology, 2011: 6-7 (in Chinese)
- [9] Kallenborn R, Hühnerfuss H, Aboul-Enein H, et al. Chiral environmental pollutants: Analytical methods, environmental implications and toxicology [J]. Chiral Environmental Pollutants, 2021, 1: 1-12
- [10] Wang Z, Tan Y T, Li Y H, et al. Comprehensive study of pydiflumetofen in *Danio rerio*: Enantioselective insight into the toxic mechanism and fate [J]. Environment International, 2022, 167: 107406
- [11] 李玲,李俊杰,王俊英,等.手性农药水胺硫磷对浮游生物氧化应激的对映体选择性影响[J].生态毒理学报,2021,16(3): 264-272
Li L, Li J J, Wang J Y, et al. Enantiomeric selectivity of chiral pesticide isocarbophos on oxidative stress in plankton [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(3): 264-272 (in Chinese)
- [12] 苍涛,王新全,王彦华,等.手性氟虫腈对意大利蜜蜂和稻螟赤眼蜂的急性毒性及安全评价[J].生态毒理学报,2012,7(3): 326-330
Cang T, Wang X Q, Wang Y H, et al. Acute toxicities and safety evaluation of chiral fipronil to *Apis mellifera* L. and *Trichogramma japonicum* Ashmead [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2012, 7(3): 326-330 (in Chinese)
- [13] Heller J J. Beta-cypermethrin: A new broad spectrum molecule for the control of insect pests in row crops, fruits, grapes and vegetables in Europe [C]. Montpellier, France: Association Française De Protection Des Plantes (AFPP), 2011: 690-697
- [14] Zhang Q Q, Li W Q, Lu Z B, et al. Sublethal effects of beta-cypermethrin on the bird cherry-oat aphid *Rhopalosiphum padi* (Hemiptera: Aphididae) [J]. Journal of Asia-Pacific Entomology, 2019, 22(3): 693-698
- [15] Ambwani S, Kumar Ambwani T, Singh Chauhan R. Ameliorating effects of badri cow urine on cypermethrin induced immunotoxicity and oxidative stress in chicken lymphocytes culture system [J]. Biosciences, Biotechnology and Biochemistry Research Asia, 2018, 15(3): 711-717
- [16] 李海斌,李君.氯氰菊酯作用研究进展[J].环境与健康杂志,2007,24(5): 372-374
Li H B, Li J. Advance on cypermethrine toxicity research

- [J]. Journal of Environment and Health, 2007, 24(5): 372-374 (in Chinese)
- [17] 王冬群, 华晓霞. 慈溪市葡萄农药残留膳食摄入风险评估[J]. 食品安全质量检测学报, 2017, 8(3): 1018-1024
Wang D Q, Hua X X. Dietary intake risk assessment of pesticide residues on grape in Cixi City [J]. Journal of Food Safety & Quality, 2017, 8(3): 1018-1024 (in Chinese)
- [18] 张琛. 高效氯氟菊酯降解菌的筛选、鉴定、疏水性及降解性能研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2009: 5-23
Zhang C. Isolation, characterization, hydrophobicity and mineralizing mechanism of beta-cypermethrin degrading strains [D]. Taian: Shandong Agricultural University, 2009: 5-23 (in Chinese)
- [19] Li H Z, Cheng F, Wei Y L, et al. Global occurrence of pyrethroid insecticides in sediment and the associated toxicological effects on benthic invertebrates: An overview [J]. Journal of Hazardous Materials, 2017, 324: 258-271
- [20] 何华, 徐存华, 孙成, 等. 高效氯氟菊酯在土壤中的降解动态[J]. 中国环境科学, 2003, 23(5): 490-492
He H, Xu C H, Sun C, et al. The degradation trends of high effect cypermethrin in soils [J]. China Environmental Science, 2003, 23(5): 490-492 (in Chinese)
- [21] 朱盼, 万欢, 黄芮, 等. 广东省本地产茶叶农药多残留累积风险评估[J]. 中国食品卫生杂志, 2022, 34(2): 308-314
Zhu P, Wan H, Huang R, et al. Cumulative intake risk assessment of multi-pesticides in local tea samples in Guangdong Province [J]. Chinese Journal of Food Hygiene, 2022, 34(2): 308-314 (in Chinese)
- [22] 范志金, 刘丰茂, 钱传范. 氯氟菊酯的名称和组成及其光学异构体[J]. 农药科学与管理, 1999, 20(2): 9-11, 17
Fan Z J, Liu F M, Qian C F. The name and composition of cypermethrin and its optical isomers [J]. Pesticide Science and Administration, 1999, 20(2): 9-11, 17 (in Chinese)
- [23] 徐鹏. 手性农药高效氯氟菊酯选择性降解研究[D]. 长沙: 湖南农业大学, 2012: 12-14
Xu P. Studies on the enantioselective degradation of chiral pesticides lambda-cyhalothrin [D]. Changsha: Hunan Agricultural University, 2012: 12-14 (in Chinese)
- [24] 葛平, 刘娜, 金小伟, 等. 手性药物的水环境行为、毒性效应及生态风险[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(1): 191-205
Ge P, Liu N, Jin X W, et al. Chiral pharmaceuticals in aquatic environments: Occurrence, fate, toxicity, and ecological risk [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(1): 191-205 (in Chinese)
- [25] 国家卫生健康委员会, 农业农村部, 国家市场监督管理总局. 食品安全国家标准 食品中农药最大残留限量: GB 2763—2021[S]. 北京: 中国标准出版社, 2021
- [26] 华欣, 陈海波, 李杰, 等. 农药对秀丽隐杆线虫毒性效应及其机制的研究进展[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(1): 34-43
Hua X, Chen H B, Li J, et al. Review on toxicology of pesticides in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(1): 34-43 (in Chinese)
- [27] 王佳佳. 高效氯氟菊酯的手性拆分及其对映体毒性研究[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2008: 25-35
Wang J J. Study on the separation and toxicity of enantiomers of beta-cypermethrin [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2008: 25-35 (in Chinese)
- [28] Mu X Y, Shen G M, Huang Y, et al. The enantioselective toxicity and oxidative stress of beta-cypermethrin on zebrafish [J]. Environmental Pollution, 2017, 229: 312-320
- [29] Rosenblat M, Coleman R, Aviram M. Increased macrophage glutathione content reduces cell-mediated oxidation of LDL and atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Atherosclerosis, 2002, 163(1): 17-28
- [30] Schulz J B, Lindenau J, Seyfried J, et al. Glutathione, oxidative stress and neurodegeneration [J]. European Journal of Biochemistry, 2000, 267(16): 4904-4911
- [31] Wang H, Ki J S. Molecular characterization and expression analysis of copper-zinc superoxide dismutases from the freshwater alga *Closterium ehrenbergii* under metal stress [J]. Environmental Toxicology, 2020, 35(1): 5-14
- [32] Yuan M, Wang C L, Wang Y F, et al. Progress in the research of superoxide dismutase [J]. Chinese Journal of Histochemistry and Cytochemistry, 2016, 25: 550-558
- [33] Madhu, Sharma A, Kaur A, et al. Glutathione peroxidases in plants: Innumerable role in abiotic stress tolerance and plant development [J]. Journal of Plant Growth Regulation, 2023, 42(2): 598-613
- [34] Valko M, Leibfritz D, Moncol J, et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease [J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2007, 39(1): 44-84