

高氯酸盐对秀丽隐杆线虫生长发育的影响

李苏婉, 郝梦真, 姜玉池, 熊文文, 车会莲*

(中国农业大学 食品科学与营养工程学院 北京 100083)

摘要 食物链可以通过环境中的高氯酸盐(一种新型持久性无机污染物)富集人体。进入食物链的高氯酸盐数量不容忽视, 尽管目前缺乏具体事实支持。本研究以高氯酸盐为研究对象, 以秀丽隐杆线虫为模型生物, 检测秀丽隐杆线虫的氧化应激(ROS、SOD、CAT、MDA、GSH)。测量暴露于不同浓度高氯酸盐的秀丽隐杆线虫的生长和发育相关指标(体长、寿命和产卵量)和生长基因表达的相关水平, 以确定高氯酸盐影响秀丽隐杆线虫生长和发育的机制。结果表明, 高氯酸盐显著降低了秀丽隐杆线虫的生命周期[(4.654 d ± 0.146 d) ~ (7.212 d ± 0.050 d)], 产卵频率(-28.1% ~ -49.0%)和体长。此外, 秀丽隐杆线虫的 ROS、GSH 和 MDA 水平升高, SOD 和 CAT 活性增强。胰岛素/胰岛素生长因子信号通路中的 *Daf-2*、*Daf-16*、*Daf-18*、*Sir-2.1*、*Skn-1* 等相关基因可能受到影响。高氯酸盐通过氧化应激, 可激活胰岛素/胰岛素生长因子信号通路及相关基因, 影响生长发育。

关键词 高氯酸盐; 秀丽隐杆线虫; 氧化应激; 生长发育; IIS 信号通路

文章编号 1009-7848(2024)06-0155-10 **DOI:** 10.16429/j.1009-7848.2024.06.014

高氯酸盐是由高氯酸形成的盐类, 主要成分是含有四面体型的高氯酸根离子(ClO_4^-), 物质的量为 99.45。其物理化学性质极其稳定, 水溶性强, 土壤对其的吸附性极低, 自然环境中难以达到生物降解的条件^[1], 在工业、农业以及军事生产中广泛应用^[2], 可经过土壤、水等途径被植物吸收, 并通过食物链进入人体, 目前已成为环境中重要的无机污染物之一^[3]。Wu 等^[4]从中国 13 个省市 15 个地点采集 300 份水样进行高氯酸盐含量检测, 结果发现自来水、地下水、地表水和瓶装水中高氯酸盐的平均质量浓度分别为 2.46, 3.04, 2.82 $\mu\text{g/L}$ 和 0.22 $\mu\text{g/L}$ 。Shi 等^[5]调查发现我国大米、瓶装饮用水和牛奶中高氯酸盐质量浓度分别在 0.16~4.88 $\mu\text{g/kg}$, 0.037~2.013 $\mu\text{g/L}$ 和 0.30~9.1 $\mu\text{g/L}$ 范围。杨佳佳^[6]在对我国总膳食样品中高氯酸盐暴露水平的调查发现, 高氯酸盐检出浓度在 0.09~70.91 $\mu\text{g/kg}$ 之间, 检出率高达 91.67%。中国居民高氯酸盐膳食平均摄入量为 0.65 $\mu\text{g/kg bw/d}$, 高于美国和加拿大的膳食高氯酸盐摄入量。

目前已有高氯酸盐对机体毒性作用的研究, 相关试验表明高氯酸盐属于低等毒性物质, 具有一定的遗传损伤作用^[7]。目前高氯酸盐除了常见的

干扰甲状腺功能^[8], 还对哺乳类、两栖类及鱼类等动物的生长发育、生殖行为、神经系统发育产生一定的负面影响。Goleman 等^[9]发现暴露于较高浓度的任何一种高氯酸盐中, 均影响非洲爪蟾生长发育的能力。Park 等^[10]发现高氯酸盐对蚊子鱼的繁殖力、性腺指数和卵/胚胎质量有刺激作用, 且可能对该物种的生长发育具有低浓度促进高浓度抑制作用。Alsaleh 等^[11]利用秀丽隐杆线虫做生物传感器, 检测环境中的高氯酸盐具有较好的灵敏度, 而影响其生长发育的机制未详细阐述。本文研究高氯酸盐对秀丽隐杆线虫生长发育的影响。

秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*, 简称为 *C. elegans*)是一种无毒、无害, 以细菌为食物, 可以独立生存的线性动物^[12]。这种小型线虫除了具有体小(成年时为 1 mm)、寿命短(2~3 周)、生殖周期短(3 d)且育雏量大(自受精约 300 个卵)等优点外, 其基因组已被完全测序, 且 65%以上的基因与人类相关^[13]。

氧化应激(Oxidative Stress, OS)是指体内氧化与抗氧化作用失衡的一种状态^[14]。赵雪松等^[15]发现四溴二苯醚与高氯酸盐复合诱导斑马鱼胚胎的急性发育毒性, 较两种物质单独作用效果增强, 且有产生氧化应激的现象。通常影响机体发育的一些特征, 例如基因组紊乱, 蛋白质稳定性下降, 营养感应失调, 线粒体功能损伤和配体结合错位等

收稿日期: 2023-06-25

第一作者: 李苏婉, 女, 硕士生

通信作者: 车会莲 E-mail: chehuilian@cau.edu.cn

大多是受到机体内活性氧(ROS)的影响^[6]。胰岛素/类胰岛素(insulin/IGF-1,IIS)信号转导通路作为广泛存在于模式生物的一种经典通路,影响生物的生长发育。研究表明通过刺激该通路 *daf-2/daf-16/daf-18* 等上游基因,能够调节下游与抗氧化能力相关基因的表达^[7]。据此推断高氯酸盐可能通过调控相关信号通路,降低秀丽隐杆线虫的抗氧化能力,从而影响其生长发育的能力。本研究以秀丽隐杆线虫为模式生物,从线虫生理指标(身长、产卵数、寿命),体内氧化应激程度,基因水平3个方面探究高氯酸盐对其生长发育的影响。

1 材料与方法

1.1 试验材料与仪器

1.1.1 试验材料 秀丽隐杆线虫品系 N2,由美国线虫遗传学中心(*Caenorhabditis genetics center*, CGC)提供。大肠杆菌(OP50),由美国罗格斯大学狄榕实验室提供。将线虫接种与添加大肠杆菌(OP50)的线虫生长培养基(NGM)培养基,培养于20℃恒温培养箱,光暗时间为12 h/12 h,光强3 000 Lx。

高氯酸钠·一水(分析纯级),国药集团化学试剂有限公司;无水乙醇(分析纯级),北京化工厂;线虫活性氧簇(ROS)ELISA 检测试剂盒,酶科生物公司;超氧化物歧化酶(SOD)测定试剂盒、丙二醛(MDA)测试盒、微量还原型谷胱甘肽(GSH)测定试剂盒、过氧化氢酶(CAT)测定试剂盒,南京建成生物科技有限公司;反转录试剂盒和荧光定量PCR试剂盒,诺唯赞试剂公司。

1.1.2 仪器与设备 UV-2800A 紫外分光光度计,尤尼柯(上海)仪器有限公司;DL-CJ-FND 超净台,北京东联哈尔仪器制造有限公司;SZ66013ZL 体视镜,重庆奥特光学仪器有限责任公司;SHP-80 生化培养箱,上海培因实验仪器有限公司;SL-N 系列电子天平,上海民桥精密仪器有限公司;MyCycler PCR 仪、MyiQ2 qPCR 仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 线虫身长、产卵数和生命周期的测定 试验分为试验组和对照组。试验组中将同期化的 L4

期线虫转移到 NGM 培养基上,喂食3种不同质量浓度(50,500,1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)高氯酸盐的大肠杆菌菌液,对照组为无高氯酸盐的大肠杆菌菌液。

挑取试验处理后的同期化幼虫于做过处理的 NGM 培养板中,置于体式显微镜下,转动培养皿,使秀丽线虫的身体与标尺贴近并尽可能笔直,读取其身体长度为多少小格,按照标尺与实际长度的比例,计算得到秀丽线虫的身体长度。线虫同期化当天记为第0天,之后每隔24 h 记录线虫身体长度,直至第6天。每组10条线虫,重复3次。

采用同期化 L3 期秀丽隐杆线虫进行产卵试验。每天将这条线虫转移到一个新培养基上,直到其不再产卵。每次转移后约12 h,清点旧培养基上后代的数量。最后合计该虫一生的产卵总量。每组10条线虫,重复3次。

挑取 L1 期幼虫至做过处理的 NGM 培养板上,之后每天将培养板中活着的秀丽线虫转移至相同的新平板中培养,记录每天存活的线虫数量,直至全部死亡。丢失的秀丽线虫、因爬到培养皿壁上而死亡的线虫应从统计中排除。每组30条线虫,重复3次。以生存率百分比为纵坐标,绘制生存曲线。

1.2.2 体内 ROS、SOD、GSH、CAT 和 MDA 的测定

采用同期化 L3 期秀丽隐杆线虫进行试验。将染毒4 d 的秀丽隐杆线虫从 NGM 培养基上用 M9 溶液洗下,收集到1.5 mL 离心管中,5 000 r/min 离心1 min,重复3次尽量除去收集到的细菌,加入生理盐水1 mL,放入组织研磨机中研磨成浆,离心取上清。随后测量蛋白浓度,根据 ROS、SOD、CAT、GSH 和 MDA 检测试剂盒进行操作。试验重复3次。

1.2.3 mRNA 提取及荧光定量 PCR 检测 将同期化 L4 期线虫用高氯酸盐处理后,每组设定3个平行,每个平板约200条线虫,培养4 d。用 M9 缓冲液冲洗 NGM 培养基表面线虫至无菌无酶研磨管。PBS 缓冲液冲洗3次。Trizol 法提取线虫总 RNA,Primer 5.0 设计相关基因引物。用 SYBR Green 为 DNA 荧光染料,实时荧光定量 PCR 测定,以 Actin 为内参测定 *daf-2* 及其相关基因的表达量,基因表达以 PCR 的 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 值表示。

表 1 秀丽隐杆线虫实时定量 PCR 引物

Table 1 Real time quantitative PCR primers of *C. elegans*

基因类型	上游引物序列	下游引物序列
<i>Actin</i>	5'AGAAGAGCACCCAGTCCTCC3'	5'GAAGCGTAGAGGGAGAGGAC3'
<i>Wah-1</i>	5'GTTGCTCTTGGTGGTGGGAC3'	5'GCCACGGCTCCGATGAATG3'
<i>Ctl-1</i>	5'CACTGATCGAGGTCCGGCAAGATG3'	5'GATGGTAATGCGTGTCCGTGTAGG3'
<i>Ctl-2</i>	5'GACAATCAGCAACATGCTCC3'	5'CTGGCATTCTCTCCCGAG3'
<i>Gpd-1</i>	5'TCCGTCGTTGATCTGACCGTTC3'	5'ATCTTCAGTGTAGGCGAGGATTCC3'
<i>Sod-1</i>	5'CGAGGGAGTCGGAGACAAGG3'	5'GTAGTAGGAGTAGGAACAAC3'
<i>Sod-3</i>	5'TTGAAGATCGCCACCTGTGCAAAC3'	5'ATGGACATAGTCTGGCGGACATT3'
<i>Gst-21</i>	5'GCTCTTCCATCTTGGTGGAGTTC3'	5'TCCGAATTGTCTCGCAAGGTAACG3'
<i>Gst-33</i>	5'GCAGAGGCTTCGAGAGCTATGTTC3'	5'CGATTGCCGTAATTGCCTTGAACC3'
<i>Gst-44</i>	5'GGAACATCTTCACCTGGCTTCGTC3'	5'GGATTGCCGTAATTGCCTTGAACC3'
<i>Cep-1</i>	5'TTCCGACGCAAGTAGTCTCC3'	5'CGGTAAGAGCTGAGAAACG3'
<i>hsp-16.1</i>	5'GAGAGATATGGCTCAGATGGAACG3'	5'TGGCTTGAAGTGCAGACATTG3'
<i>hsp-16.2</i>	5'ATGGAACGCCAATTTGCTCCAGTC3'	5'TCCTTGATTGATAGCGTACGACC3'
<i>hsp-16.48</i>	5'ACTCGATGTTTCTCATTTTC3'	5'TGGGAATAGAACCAGATGAG3'
<i>daf-2</i>	5'ATGTGGCGTGAGAATGAA3'	5'AGCCGAACACGAACAACA3'
<i>daf-16</i>	5'CTATCAACATCCAACATCCTC3'	5'GCATCAACATCCATAGTATCC3'
<i>daf-18</i>	5'CCAGAAGATGCTCCAGTAT3'	5'TTCCGTCCGATTGATGTAT3'
<i>akt-1</i>	5'GGACAACCGTTTCCTGAG3'	5'GACGAACCTTCTGCCGACT3
<i>akt-2</i>	5'TCCAAGCACAATATCACATC3'	5'AAGGTATCCAAGAGCAAGTA3'
<i>sir-2.1</i>	5'TACTGAGATGCTCCATGAC3'	5'AGCAAGACGAACCACACGAAC3'
<i>mtl-1</i>	5'GCAGTGAGACAAGTGT3'	5'AGTTCCTGCTGTTGATG3'
<i>skn-1</i>	5'AGTGCTTCTTCCGGTAGCCG3'	5'TGTTGGACGATGGTGAAGTGA3'

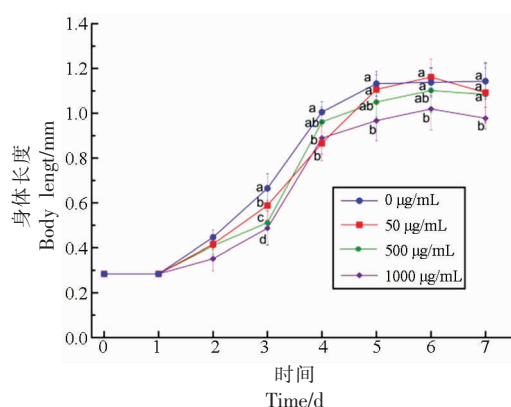
1.3 统计学分析

数据处理采用 Prism 9.0 数据处理软件进行统计学处理并做图, 组间比较采用单因素方差分析(One-way analysis of variance, One-way ANOVA), 数据采用平均值±标准差表示。两两比较采用 *t* 检验, 相关性采用皮尔逊检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义, 图中用 abcd 标记。

2 结果

2.1 高氯酸盐对秀丽隐杆线虫身长的影响

在使用线虫模型去探究高氯酸盐对其的生长发育影响时, 需要对高氯酸盐对浓度进行探究, 经过文献的查阅, 高氯酸盐的浓度范围应不影响线虫生长所摄入的菌类生长^[11], 故选择与未暴露于高氯酸盐环境的线虫有显著差异的 500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 质量浓度, 且增加一个 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 低质量浓度组探究在微量高氯酸盐环境下是否对线虫的生长有影响。N2 型线虫暴露在不同浓度高氯



注: 单个小写字母与两个小写字母之间代表 $P < 0.05$; 单个不同小写字母之间表示 $P < 0.01$ 。

图 1 不同浓度高氯酸盐环境下秀丽隐杆线虫身长情况

Fig.1 Body length of *C. elegans* in different perchlorate concentrations

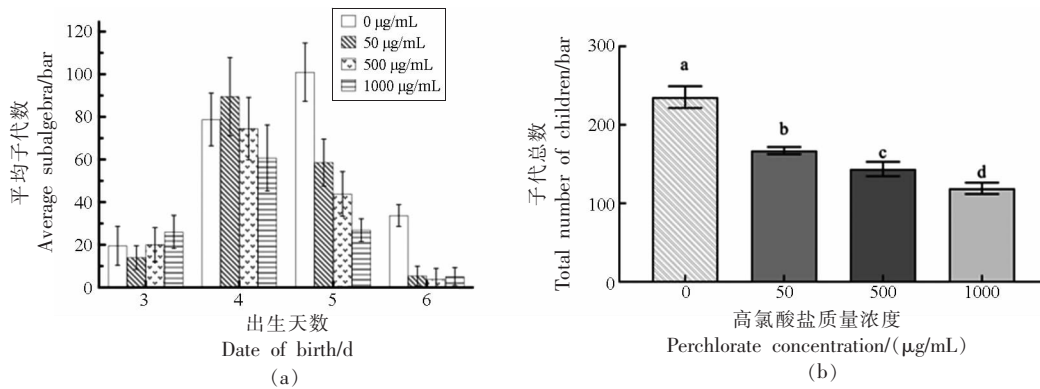
酸盐环境下身长情况如图 1 所示, 当暴露到第 3 天时, 与对照组相比各个浓度下线虫身长情况均有显著差异, 虽然在后期低质量浓度组 (50 $\mu\text{g}/$

mL)和中高质量浓度组(500 μg/mL)与对照组相比无显著差异但高质量浓度组(1 000 μg/mL)始终保持着显著差异的趋势。

2.2 高氯酸盐对秀丽隐杆线虫产卵数的影响

N2型线虫暴露在不同浓度高氯酸盐环境下每日的产卵情况如图2a所示,线虫在整个产卵周期的产卵数量是先升后降的,对照组在第5天达到产卵高峰,低浓度高氯酸盐处理组(50 μg/mL)在产卵第1天时数量比对照组少,但在第2天产

卵数超过对照组这一结果联系线虫身长情况可考虑是由生长发育的延迟导致产卵数下降^[18]。由图2b可以看出,和对照组相比,50 μg/mL高氯酸盐环境下线虫的产卵总数减少了28.1%,500 μg/mL高氯酸盐环境下线虫的产卵数减少了38.9%,1 000 μg/mL高氯酸盐环境下线虫的产卵数更是减少了49.0%,表明线虫暴露在有高氯酸盐的环境下确实会对其产卵周期内的产卵总数有一定的影响。



注:图中柱上不同的小写字母表示在 P<0.01 上有统计学显著差异。

图2 不同浓度高氯酸盐对线虫每日产卵量(a)和子代总数量(b)的影响

Fig.2 Effects of different concentrations of perchlorate on daily egg production (a) and total offspring number (b) of *C. elegans*

2.3 高氯酸盐对秀丽隐杆线虫寿命的影响

N2型线虫暴露在不同浓度高氯酸盐环境下的寿命情况如表2和图3所示,对照组为未暴露在高氯酸盐环境下的N2线虫,在整个生长周期中,对照组的线虫生存率于处理组相比都有明显的增加趋势,在成长周期的第7天到第8天,有数

量较多的线虫死亡,使得整体的平均寿命在7 d左右的程度。暴露在50 μg/mL高氯酸盐环境下线虫在生长周期前5天的生存率与对照组相近,在第5~10天时生存率有大幅度下降,但与高浓度组相比下降幅度不及高浓度组明显;暴露在500 μg/mL高氯酸盐环境下线虫对照组相比在生长周期

表2 暴露于不同浓度高氯酸盐环境下秀丽隐杆线虫平均寿命

Table 2 Average life span of *Caenorhabditis elegans* exposed to different concentrations of perchlorate

高氯酸盐质量浓度/(μg/mL)	平均寿命/d	相对寿命变化率/%
0	7.212 ± 0.050	
50	6.250 ± 0.752*	13.34
500	5.456 ± 0.751**	24.35
1 000	4.654 ± 0.146**	35.46

注:与对照组相比,* P<0.05;** P<0.01。

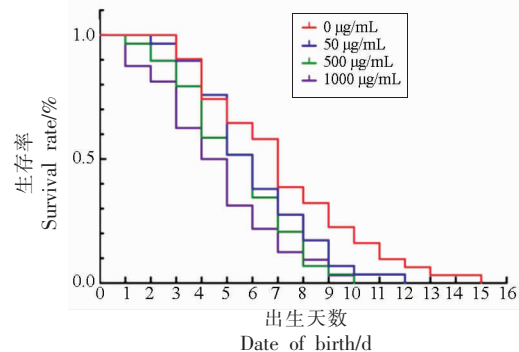


图3 暴露于不同浓度高氯酸盐环境下秀丽隐杆线虫生存率情况

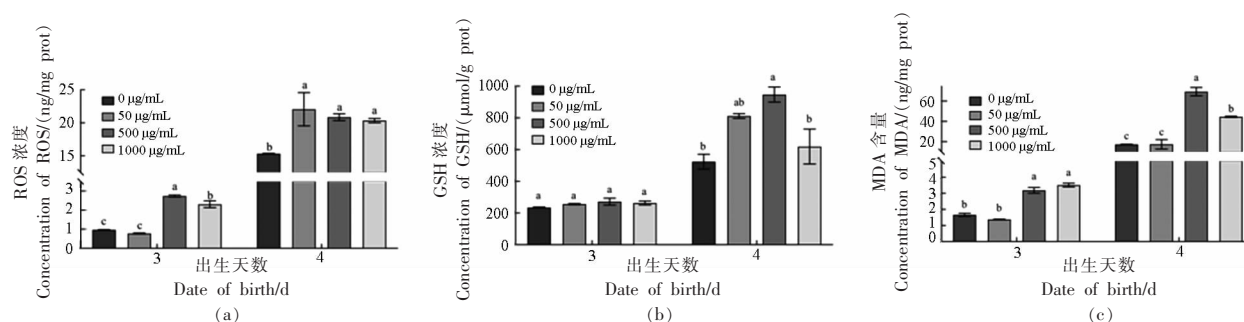
Fig.3 Survival rate of *C. elegans* exposed to different concentrations of perchlorate

的前 6 天即表现出了明显的生存差异;暴露在 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 高氯酸盐环境下线虫在整个生长周期均表现出较低的生存率与对照组相比有显著差异,在生长后期的第 8~10 天线虫大幅度的死亡,最高的存活时间仅为 10 d。综上所述,可以得出高氯酸盐存在的生长环境确实会对线虫的生存率有一定程度的影响。

2.4 高氯酸盐对线虫体内 ROS、GSH、MDA 含量的影响

本试验以未添加高氯酸盐为空白对照组,根据上一节的数据显示,线虫在发育的第 3~4 天身

体长度快速增长,产卵数也出现高峰期,处于生长发育的重要阶段,故选择该阶段的线虫为测试对象,探究暴露在不同高亮氯酸盐浓度环境下的线虫体内氧化还原指标的差异。如图 4a、4b 和 4c 所示,线虫出生第 4 天时体内 ROS、GSH 和 MDA 含量较出生第 3 天均有明显的增长,在出生第 3 天时,与对照组相比中高质量浓度和高质量浓度处理组(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)ROS 和 MDA 的含量有显著差异。出生第 4 天时,低质量浓度组(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)ROS 的含量较对照组有大幅度增加。



注:单个小写字母与两个小写字母之间代表 $P < 0.05$;单个不同小写字母之间表示 $P < 0.01$ 。

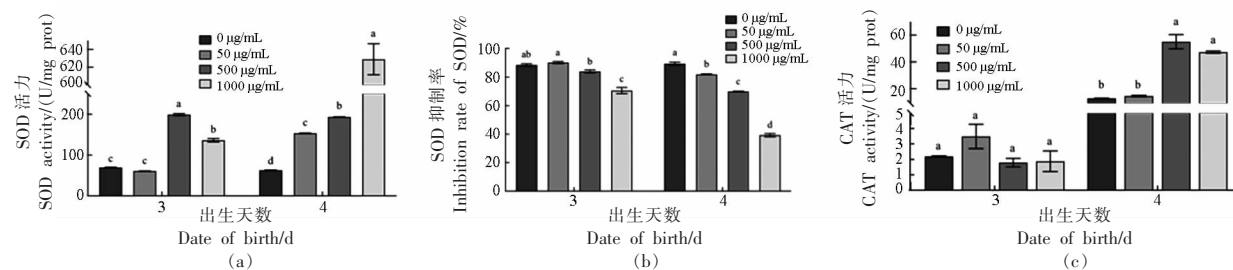
图 4 暴露于不同浓度高氯酸盐环境下秀丽隐杆线虫体内 ROS(a)、GSH(b)、MDA(c)的含量情况

Fig.4 Contents of ROS(a), GSH(b) and MDA(c) in *C. elegans* exposed to different concentrations of perchlorate

2.5 高氯酸盐对线虫体内 SOD、CAT 活力的影响

当机体内发生氧化应激时,体内的抗氧化酶类物质的活性会随之发生改变。如图 5a 和 5b 可以看出与对照组相比 SOD 抑制率呈现浓度依赖的下降趋势,SOD 的活力有不同程度的增强,高质量浓度组(1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的差异尤为显著。图 5c 中反映的 CAT 活力虽在出生第 3 天时无显著差异,但在第 4 天时中高质量浓度和高质量浓度处理组(500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$)分别增加了 330.84%,

270.09%,趋势显著。SOD 和 CAT 作为十分重要的抗氧化酶,在体内发挥着水解过氧化氢的,避免过氧化氢与体内其它的物质发生反应生成羟基自由基等毒性更大的物质以及防止生物机体内的脂质化合物过氧化物的作用,可以有效降低生物膜上的不饱和酸过氧化反应^[19]。结果表明在高浓度高氯酸盐的刺激下产生氧化应激现象,为平衡活性氧浓度,线虫体内抗氧化酶活性增加。



注:单个小写字母与两个小写字母之间代表 $P < 0.05$;单个不同小写字母之间表示 $P < 0.01$ 。

图 5 暴露于不同浓度高氯酸盐环境下秀丽隐杆线虫体内 SOD 活力(a)、SOD 抑制率(b)、CAT 活力(c)情况

Fig.5 SOD activity (a), inhibition rate of SOD (b) and CAT activity (c) in *C. elegans* exposed to different concentrations of perchlorate

2.6 高氯酸盐对线虫生长发育相关基因表达情况的影响

上述试验表明高氯酸盐能刺激线虫发生氧化应激并影响生长发育的速度与质量,为进一步检测高氯酸盐对线虫生长发育的影响机制,利用qRT-PCR分析高氯酸盐对IIS信号通路有关转录因子 *daf-16/akt-1/akt-2* 及其下游相关基因和与细胞凋亡相关的 *Wah-1/Cep-1* 基因以及与生长发育相关的 *Gpd-1* 基因的影响。结果如图6所示,相比于对照组, *Wah-1/Gpd-1/Ctl-2/Ctl-2* 基因的表达情况呈剂量依赖型下调 ($P < 0.05$),反映热休克蛋白表达情况的 *hsp-16.1/hsp-16.2/hsp-16.48* 基因与IIS通路相关的 *daf-2/daf-16/daf-18/akt-1/akt-2/ml-1/sir-2.1* 基因在中高质量浓度组 (500 $\mu\text{g/mL}$) 表现出强表达,结合线虫在第3天至第4天身体长度、产卵量和生存率以及过氧化程度的数据可以发现,中高质量浓度 (500 $\mu\text{g/mL}$) 高氯酸盐在生长发育前期阶段对线虫的生长发育有一定促进作用,但同时影响着凋亡蛋白 *wah-1* 以及生长发育相关 *gpd-1* 基因的表达量下调,导致磷酸甘油醛-3-磷酸脱氢酶的合成能力下降,线虫体内的活性氧含量得不到充分的抑制,造成氧化应激的结果^[20-21]。

2.7 高氯酸盐对线虫 IIS 信号通路中第二信使 PI(3,4,5)P₃ 含量的影响

PI(3,4,5)P₃ 在 IIS 通路中作为第二信使有着重要作用, *daf-2* 可通过影响 PI(3,4,5)P₃ 作用于 *daf-16* 蛋白表达, *daf-18* 同样可以通过对第二信使 PI(3,4,5)P₃ 去磷酸化激活丝氨酸/苏氨酸 Akt/PKB 蛋白激酶进而影响 *akt-1* 和 *akt-2* 的转录水平,由图7可知在本试验中 PI(3,4,5)P₃ 在低浓度高氯酸盐刺激时无显著变化,在中高浓度和高浓度刺激下呈显著下降趋势,结合影响 PI(3,4,5)P₃ 浓度的上游基因表达情况表明该物质的受 *daf-2* 和 *daf-18* 两个基因的共同调节,在中高质量浓度和高质量浓度高氯酸盐刺激下表现明显差异。

3 讨论

在秀丽隐杆线虫的毒理学中,体型减小是一个常见的概念,各种毒素通过降低生长率或减小

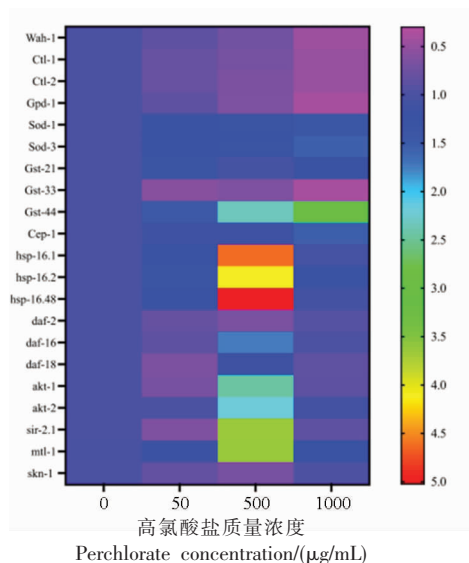
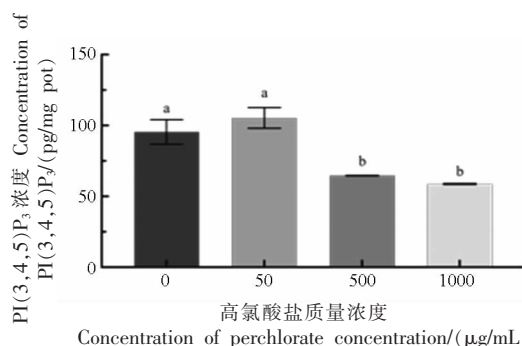


图6 高氯酸盐对线虫生长发育相关基因表达情况的影响
Fig.6 Effect of perchlorate on expression of genes related to *C. elegans* growth and development



注:图中柱上不同的小写字母表示在 $P < 0.01$ 上有统计学显著差异。

图7 高氯酸盐对线虫 IIS 信号通路中第二信使 PI(3,4,5)P₃ 含量的影响

Fig.7 Effect of perchlorate on the content of second messenger PI(3,4,5)P₃ in IIS signaling pathway of *C. elegans*

线虫的大小来影响线虫的生长。图1反映出高浓度高氯酸盐 (500 $\mu\text{g/mL}$ 和 1 000 $\mu\text{g/mL}$) 的暴露环境确实能一定程度地减少线虫的身长,与图3反映的生存率均可以体现在高浓度高氯酸盐环境下,线虫的生长发育受到限制。繁殖的变化也能反映有毒化合物对线虫的影响^[18],赵雪松等^[15]发现高氯酸盐使斑马鱼性腺发育迟缓且卵细胞质量下降,Smith等^[22]探究高氯酸盐对啮齿动物的对生殖影响时,虽然仅观察到轻微差异,但仍有不良表征的发现。

线虫作为研究氧化应激的经典模式生物,李卓航等^[23]发现羧甲基壳聚糖在一定程度上能够提高 GSH 的活力,增加线虫的抗氧化能力。脂质发生过氧化的产物丙二醛 MDA 会引起蛋白质核酸等生命大分子的交联聚合,且具有细胞毒性,通过测量 MDA 浓度可以反映出线虫体内脂质过氧化程度,间接的反映出细胞损伤的程度^[24]。通过对其生长发育阶段体内 ROS、GSH 和 MDA 含量的测定确定在高氯酸盐的刺激下会发生氧化应激, SOD 和 CAT 酶活力的提高以及相关基因的表达上调也反映出机体内抵抗氧化应激能力的提升^[25]。

秀丽隐杆线虫氧化应激反应转录因子 *skn-1* 作为 Nrf 家族转录因子的功能直系同源物对于维持氧化还原稳态是必不可少的^[26-28],没食子儿茶素没食子酸酯能够通过上调秀丽隐杆线虫中 *skn-1* 调节的保护反应来减轻甲基汞毒性^[29],鹿茸甲醇提取物 (MEs) 可通过 *skn-1* 保护秀丽隐杆线虫的氧化应激^[30],由此可见,在本研究中高氯酸盐不同程度的抑制了 *skn-1* 基因的表达,对线虫抗氧化能力有抑制作用。

IIS 信号通路是在分子水平上研究生长发育的关键信号通路,位于细胞膜上的 *daf-2* 与胰岛素配体结合后,促进 PI3K 催化亚基同源物并使 *age-1* 蛋白磷酸化,产生第二信使 PI(3,4,5)P3,激活丝氨酸/苏氨酸 Akt/PKB 蛋白激酶,促进 *daf-16* 蛋白的磷酸化,阻止 *daf-16* 进入细胞核,抑制其转录,达到缩短线虫寿命的结果^[31]。本研究发现在高氯酸盐对刺激下并非主要通过经典的 *daf-2/akt-1/akt-2/mlt-1/daf-16* 机制影响线虫的生长发育,*daf-18* 同样可以通过对第二信使 PI(3,4,5)P3 作用影响 *akt-1* 和 *akt-2* 的转录水平^[32]。而 *sir-2.1* 能够通过 14-3-3 蛋白结合激活 *daf-16* 的表达^[33],与 IIS 信号通路协同作用影响线虫的生长发育,在本研究中 *sir-2.1* 基因表达量在低浓度和高浓度的高氯酸盐刺激时被抑制,在中高浓度高氯酸盐刺激时被促进,与 *daf-16* 基因的表达有强相关性 ($r=1.00, P<0.05$),故推测高氯酸盐可能通过影响 *sir-2.1* 基因的表达进而影响 *daf-16* 蛋白的合成。

反映凋亡蛋白表达情况的 *wah-1* 基因的下调会损害氧化磷酸化系统的功能同时减少线虫的寿

命^[34],作为糖代谢的中心环节影响线虫的生长发育 3-磷酸甘油醛脱氢酶表达相关的 *gpd-1* 基因的表达量下调会使线虫体内的活性氧含量得不到充分的抑制,造成氧化应激的结果^[21]。与人源 p53 蛋白同源的 *cep-1* 蛋白,通过激活 *egl-1* 和 *ced-13* 的转录来调节 DNA 损伤诱导的生殖细胞死亡^[37],在本研究中高氯酸盐对作为编码 CAT 的重要基因 *ctl-1* 和 *ctl-2* 表达量的抑制反映进一步证实了高氯酸盐会刺激线虫产生氧化应激,线虫的抗氧化能力下降,生长发育受到影响^[35-38]。

4 结论

总之,线虫经过不同质量浓度的高氯酸盐干预后,其身长,产卵数和寿命均受到一定程度的负面影响,且体内的活性氧含量增加,抗氧化能力下降。通过对生长发育相关信号通路转录因子表达水平的测定,揭示高氯酸盐可能是通过激活胰岛素/胰岛素样生长因子信号通路和 *skn-1/sir-2.1/daf-16* 联合降低了其对氧化应激的抵抗能力,从而对线虫生长发育水平产生影响。与线虫生长发育相关的调控机制受多种因素影响,本试验中关于浓度的分组跨度较大,关于部分低浓度促进高浓度抑制结果的原因不得而知,后续试验过程中可以细化浓度梯度,结合食品中的污染情况,以更加贴近人体的情况对高氯酸盐的生长发育影响机制进行验证。

参 考 文 献

- [1] 吴春笃,李顺,许小红,等.高氯酸盐的环境毒理学效应及其机制的研究进展[J].环境与健康杂志,2013,30(1):85-89.
WU C D, LI S, XU X H, et al. Research progress of environmental toxicological effect and mechanism of perchlorate[J]. Journal of Environment and Health, 2013, 30(1): 85-89.
- [2] SUSARLA S, COLLETTE T W, GARRISON A W, et al. Perchlorate identification in fertilizers[J]. Environmental Science & Technology, 1999, 33(19): 3469-3472.
- [3] FANG Q L, CHEN B L. Environmental transport behaviors of perchlorate as an emerging pollutant

- and their effects on food safety and health risk[J]. Chinese Science Bulletin, 2013, 58(26): 2626–2642.
- [4] WU Q, ZHANG T, SUN H W, et al. Perchlorate in tap water, groundwater, surface waters, and bottled water from China and its association with other inorganic anions and with disinfection byproducts[J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2010, 58(3): 543–550.
- [5] SHI Y L, ZHANG P, WANG Y W, et al. Perchlorate in sewage sludge, rice, bottled water and milk collected from different areas in China[J]. Environment International, 2007, 33 (7): 955–962.
- [6] 杨佳佳. 中国居民膳食高氯酸盐和溴酸盐暴露水平研究[D]. 武汉: 武汉工业学院, 2012.
- YANG J J. Study on dietary perchlorate and bromate exposure level of residents in China [D]. Wuhan: Wuhan Institute of Technology, 2012.
- [7] 于佳, 唐玄乐, 宋建平, 等. 高氯酸盐的急性毒性和遗传毒性研究[J]. 毒理学杂志, 2007, 21(4): 267–269.
- YU J, TANG X L, SONG J P, et al. Study on acute toxicity and genotoxicity of perchlorate[J]. Journal of Toxicology, 2007, 21(4): 267–269.
- [8] LEUNG A M, PEARCE E N, BRAVERMAN L E. Perchlorate, iodine and the thyroid[J]. Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism, Elsevier, 2010, 24(1): 133–141.
- [9] GOLEMAN WANDA L, CARR JAMES A. Contribution of ammonium ions to the lethality and antimetamorphic effects of ammonium perchlorate [J]. Environmental Toxicology and Chemistry / SETAC, 2006, 25(4): 1060–1067.
- [10] PARK J W, RINCHARD J, LIU F J, et al. The thyroid endocrine disruptor perchlorate affects reproduction, growth, and survival of mosquitofish[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2006, 63 (3): 343–352.
- [11] ALSALEH S A, BARRON L, STURZENBAUM S. Perchlorate detection via an invertebrate biosensor[J]. Analytical Methods, 2021, 13(3): 327–336.
- [12] RUSZKIEWICZ J A, PINKAS A, MIAH M R C. *C. elegans* as a model in developmental neurotoxicology [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2018, 13 (1): 126–135.
- [13] GONZALEZ-MORAGAS L, ROIG A, LAROMAINE A. *Elegans* as a tool for *in vivo* nanoparticle assessment[J]. Advances in Colloid and Interface Science, 2015, 219(1): 10–26.
- [14] SIES H. Oxidative stress: Impact in redox biology and medicine[J]. Archives of Medical and Biomedical Research, 2016, 2(4): 146–150.
- [15] 赵雪松, 任新, 杨春维, 等. 四溴二苯醚与高氯酸钠急性暴露对成年斑马鱼联合毒性研究[J]. 吉林师范大学学报(自然科学版), 2016, 2(1): 105–110.
- ZHAO X S, REN X, YANG C W, et al. Joint toxicity study of acute exposure of tetrabromodiphenyl ether and sodium perchlorate on adult zebrafish[J]. Jilin Normal University Journal(Natural Science Edition), 2016, 2(1): 105–110.
- [16] MARENGONI A, ANGLEMAN S, MELIS R, et al. Aging with multimorbidity: A systematic review of the literature[J]. Ageing Research Reviews, 2011, 10(4): 430–439.
- [17] SUMINO YANASE A, KAYO YASUDA B, NAOAKI ISHII B. Interaction between the insIGF-1 and p38 MAPK signaling pathways in molecular compensation of sod genes and modulation related to intracellular ROS levels in *C. elegans* - ScienceDirect [J]. Biochemistry and Biophysics Reports, 2020, 23(100796): 1–6.
- [18] BOYD W A, MCBRIDE S J, RICE J R, et al. A high-throughput method for assessing chemical toxicity using a *Caenorhabditis elegans* reproduction assay [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2010, 245(2): 153–159.
- [19] LIN C, ZHANG X, SU Z, et al. Carnosol improved lifespan and healthspan by promoting antioxidant capacity in *Caenorhabditis elegans*[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2019, 2019(12): 1–13.
- [20] 梁颖, 李玉花. 植物中磷酸甘油醛——磷酸脱氢酶在氧化胁迫下的生理功能[J]. 植物生理学报, 2009, 45(10): 1027–1032.
- LIANG Y, LI Y H. Physiological function of glyceraldehyde phosphate -phosphate dehydrogenase in plants under oxidative stress[J]. Plant Physiology, 2009, 45(10): 1027–1032.
- [21] LIN J J, NAKAGAWA A, SKEEN-GAAR R, et al. Oxidative stress impairs cell death by repressing the nuclease activity of mitochondrial endonuclease G[J]. Cell Reports, 2016, 16(2): 279–287.
- [22] SMITH P N, SEVERT S A, JACKSON W A, et al. Thyroid function and reproductive success in ro-

- dents exposed to perchlorate via food and water[J]. *Environmental Toxicology & Chemistry*, 2010, 25(4): 1050–1059.
- [23] 李卓航, 杨敏, 张锋伦, 等. 羧甲基壳聚糖在秀丽线虫体内的抗衰老作用[J]. *食品工业科技*, 2020, 41(19): 327–331.
- LI Z H, YANG M, ZHANG F L, et al. Anti-aging effect of carboxymethyl chitosan in *Caenorhabditis Elegans*[J]. *Food Industry Science and Technology*, 2020, 41(19): 327–331.
- [24] 程琼. 秦皮甲素对氧化应激的缓解作用及其机制的初步研究[D]. 广州: 广东药科大学, 2020.
- CHENG Q. Preliminary study on the alleviating effect of aesculin on oxidative stress and its mechanism[D]. Guangzhou: Guangdong Pharmaceutical University, 2020.
- [25] 李玉英, 李元通, 张立伟. 连翘花黄色素对秀丽隐杆线虫应激抗性的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(9): 1.
- LI Y Y, LI Y T, ZHANG L W. Effect of Forsythia flower yellow pigment on stress resistance of *Caenorhabditis elegans*[J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 33(9): 1.
- [26] HOW C M, YEN P L, WEI C, et al. Early life exposure to di(2-ethylhexyl)phthalate causes age-related declines associated with insulin/IGF-1-like signaling pathway and SKN-1 in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Environmental Pollution*, 2019, 251(8): 871–878.
- [27] LI L, CHEN Y, CHENZHAO C, et al. Glucose negatively affects Nrf2/SKN-1-mediated innate immunity in *C. elegans*[J]. *Aging*, 2018, 10(11): 3089.
- [28] WANG J, LIU X, HANG S, et al. Onion vinegar quality evaluation and its alleviate oxidative stress mechanism in *Caenorhabditis elegans* via SKN-1[J]. *Plant Foods for Human Nutrition*, 2022, 77(2): 206–211.
- [29] CHEN M, WANG F, CAO J J, et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates the toxicity of methylmercury in *Caenorhabditis elegans* by activating SKN-1[J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2019, 307(1): 125–135.
- [30] CHEN M, WANG F, CAO J J, et al. (-)-Epigallocatechin-3-gallate attenuates the toxicity of methylmercury in *Caenorhabditis elegans* by activating SKN-1[J]. *Chemico-biological Interactions*, 2019, 307: 125–135.
- [31] QI Z, JI H, LE M, et al. Sulforaphane promotes *C. elegans* longevity and healthspan via DAF-16/DAF-2 insulin/IGF-1 signaling[J]. *Aging*, 2021, 13(2): 1649–1670.
- [32] SHI D, XIA X, CUI A, et al. The precursor of PI(3,4,5)P3 alleviates aging by activating daf-18 (Pten) and independent of daf-16[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 1–12.
- [33] BERDICHEVSKY A, VISWANATHAN M, HORVITZ H R, et al. *C. elegans* SIR-2.1 interacts with 14-3-3 proteins to activate DAF-16 and extend life span[J]. *Cell*, 2006, 125(6): 1165–1177.
- [34] TROULINAKI K, BÜTTNER S, MARSAL COTS A, et al. WAH-1AIF regulates mitochondrial oxidative phosphorylation in the nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Cell Death Discovery*, 2018, 4(1): 1–9.
- [35] SPECTOR M S, DESNOYERS S, HOEPPNER D J, et al. Interaction between the *C. elegans* cell-death regulators CED-9 and CED-4[J]. *Nature*, 1997, 385(6617): 653–657.
- [36] YAN N, CHAI J, LEE E S, et al. Structure of the CED-4–CED-9 complex provides insights into programmed cell death in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, Nature Publishing Group, 2005, 437(7060): 831–837.
- [37] TAN F J, HUSAIN M, MANLANDRO C M, et al. CED-9 and mitochondrial homeostasis in *C-elegans* muscle[J]. *Journal of Cell Science*, 2008, 121(Pt 20): 3373–3382.
- [38] KING S D, GRAY C F, SONG L, et al. The *cisd* gene family regulates physiological germline apoptosis through ced-13 and the canonical cell death pathway in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Cell Death & Differentiation*, Nature Publishing Group, 2019, 26(1): 162–178.

Effect of Perchlorate on the Growth and Development of *Caenorhabditis elegans* and Its Mechanism

Li Suwan, Hao Mengzhen, Jiang Yuchi, Xiong Wenwen, Che Huilian*

(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

Abstract The food chain can enrich the human body with perchlorate, a novel persistent inorganic contaminant, from the environment. The quantity of perchlorate entering the food chain cannot be ignored, despite the lack of particular facts to support it at the moment. The oxidative stress (ROS, SOD, CAT, MDA, and GSH) in *Caenorhabditis elegans* was detected in this study using perchlorate as the research object and *Caenorhabditis elegans* as the model organism. Growth and development-related indicators (body length, life span, and number of eggs laid) of *Caenorhabditis elegans* exposed to different concentrations of perchlorate were measured, and the associated levels of oxidative stress and growth gene expression were assessed to determine a potential mechanism of perchlorate's influence on *Caenorhabditis elegans* growth and development. The findings demonstrated that perchlorate dramatically decreased the *Caenorhabditis elegans* life cycle, spawning frequency, and body length. Additionally, *Caenorhabditis elegans* had elevated levels of ROS, GSH, and MDA as well as enhanced SOD and CAT activity. *Daf-2*, *Daf-16*, *Daf-18*, *Sir-2.1*, *Skn-1*, and other associated genes in the insulin/insulin growth factor signaling pathway may be affected. Through oxidative stress, perchlorate can activate the insulin/insulin growth factor signal pathway and associated genes, affecting growth and development.

Keywords perchlorate; *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*); oxidative stress; growth and development; IIS signaling pathway