

## 研究报告

## 柑橘中丙溴磷与其他4种常见残留农药的联合神经毒性研究

王萍<sup>1</sup>,康依<sup>1</sup>,周鸿媛<sup>1,2</sup>,马良<sup>1,2,3</sup>,张宇昊<sup>1,2</sup>,白亚敏<sup>4</sup>

(1. 西南大学食品科学学院,重庆 400715;2. 川渝共建特色食品重庆市重点实验室,重庆 400715;  
3. 农业农村部柑橘类果品质量安全控制重点实验室,重庆 400715;4. 重庆市食品药品检验  
检测研究院,重庆 401121)

**摘要:**目的 探究柑橘中常见残留农药丙溴磷(PFF)与阿维菌素(ABM)、苯醚甲环唑(DIF)、联苯菊酯(BIF)、吡虫啉(IMI)混合暴露对秀丽隐杆线虫的神经毒性作用。方法 L1期野生型线虫N2品系秀丽隐杆线虫(简称线虫)和转基因线虫EG1285(*unc-47::GFP*)品系线虫液体环境染毒24~72h后,测定5种农药(PFF、ABM、DIF、BIF、IMI)分别对线虫的体长抑制率,并根据其单一毒性效应设计低、中、高(1/10 EC<sub>50</sub>、1/2 EC<sub>50</sub>、EC<sub>50</sub>)3个剂量组,探究PFF分别与其他4种农药混合暴露对线虫运动行为能力的影响,最终利用Chou-Talalay模型分析其联合毒性效应并对具有显著协同作用的PFF-ABM混合物开展联合神经毒性研究,进一步探究其对线虫趋化性、捕食率、ATP和GABA水平及GABA能神经元的影响。结果 5种农药对线虫体长的抑制程度(24h)依次为ABM(EC<sub>50</sub>=0.015 μg/mL)>PFF(EC<sub>50</sub>=0.458 μg/mL)>DIF(EC<sub>50</sub>=10.585 μg/mL)>IMI(EC<sub>50</sub>=39.981 μg/mL)>BIF(EC<sub>50</sub>=46.623 μg/mL)。农药混合物联合毒性效应结果表明,所有农药联合处理组对线虫的运动行为均具有抑制作用,PFF-DIF、PFF-BIF和PFF-IMI的联合毒性效应均为低浓度协同作用,高浓度拮抗作用,而PFF-ABM的联合毒性效应在受试浓度下均为协同作用。PFF-ABM中、高剂量组线虫的ATP、GABA水平较PFF和ABM单独组均显著下降( $P<0.05$ )。在神经元发育损伤实验中,PFF-ABM高剂量组转基因线虫的GABA能神经元的荧光强度分别较PFF和ABM单独组分别下降43.38%和33.20%。结论 PFF与ABM混合物的联合神经毒性效应为协同作用,与其他3种农药混合物的联合神经毒性效应随暴露浓度增加具有由协同作用转为拮抗作用趋势。PFF-ABM联合暴露通过降低线虫ATP和GABA水平、损伤GABA能神经元诱导协同作用的产生。

**关键词:**丙溴磷;联合毒性;神经毒性;农药残留;秀丽隐杆线虫

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2025)02-0115-09

DOI:10.13590/j.cjfh.2025.02.002

### Study on the combined neurotoxicity of propiconazole and four other common residual pesticides in citrus fruits

WANG Ping<sup>1</sup>, KANG Yi<sup>1</sup>, ZHOU Hongyuan<sup>1,2</sup>, MA Liang<sup>1,2,3</sup>, ZHANG Yuhao<sup>1,2</sup>, BAI Yamin<sup>4</sup>

(1. College of Food Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Chongqing Key Laboratory of Specialty Food Co-Built by Sichuan and Chongqing, Chongqing 400715, China; 3. Key Laboratory of Quality and Safety Control of Citrus Fruits, Ministry of Agriculture and Rural Affairs, Southwest University, Chongqing 400715, China; 4. Chongqing Institute for Food and Drug Control, Chongqing 401121, China)

**Abstract: Objective** Exploring the neurotoxic effects of combined exposure to commonly detected pesticide residues in citrus, including profenofos (PFF), avermectin (ABM), difenoconazole (DIF), bifenthrin (BIF), and imidacloprid (IMI), respectively, on *Caenorhabditis elegans*. **Methods** Wild type N2 and transgenic EG1285 (*unc-47::GFP*) *C. elegans* were exposed to mycotoxins in the liquid environment for 24-72 h, and the body length inhibition rates of five pesticides were measured. Based on the single toxic effect, low, medium and high (1/10 EC<sub>50</sub>, 1/2 EC<sub>50</sub>, EC<sub>50</sub>) dose groups were designed to investigate the effects of PFF mixed with four other pesticides, respectively. On the motility

收稿日期:2024-09-08

基金项目:重庆市技术创新与应用发展专项重点项目(CSTB2023TIAD-KPX0066);中央高校基本科研业务费专项资金(SWU-KT22048);国家自然科学基金(32102062);重庆市市场监督管理局科研计划(CQSKJJDW2023033)

作者简介:王萍 女 硕士研究生 研究方向为食品质量与安全控制 E-mail:2523916877@qq.com

通信作者:马良 女 教授 研究方向为食品质量与安全控制 E-mail:zhyhml@163.com

behavior of *C. elegans*, followed by using Chou-Talalay model to analyze the type of combined toxicity. Finally, a combined neurotoxicity study was conducted on the PFF-ABM mixture which showing the significantly synergistic effects to further explore its effects on the chemotaxis, predation rate, ATP and GABA levels and GABAergic neurons. **Results** The toxic effects of the five pesticides on the body length of nematodes (24 h) were in the order of ABM ( $EC_{50}=0.015 \mu\text{g/mL}$ ) > PFF ( $EC_{50}=0.458 \mu\text{g/mL}$ ) > DIF ( $EC_{50}=10.585 \mu\text{g/mL}$ ) > IMI ( $EC_{50}=39.981 \mu\text{g/mL}$ ) > BIF ( $EC_{50}=46.623 \mu\text{g/mL}$ ). The results of the combined toxicity effects of pesticide mixtures showed that all pesticide combination treatment groups had inhibitory effects on the motility behavior of *C. elegans*. The combined toxic effects of PFF-DIF, PFF-BIF and PFF-IMI were synergistic at low concentrations whereas antagonistic at high concentrations. However, the combined toxic effect of PFF-ABM was synergistic at all the tested concentration. The ATP and GABA levels of *C. elegans* in the medium and high-dose groups of PFF-ABM were significantly lower than those in the PFF and ABM groups alone ( $P<0.05$ ). In the experiment of neuronal developmental damage, the fluorescence intensity of GABAergic neurons in transgenic *C. elegans* in the high-dose group of PFF-ABM decreased by 43.38% and 33.20%, respectively, compared to the PFF and ABM alone groups. **Conclusion** The combined neurotoxic effects of PFF and ABM mixture was synergistic and the combined neurotoxic effects of the mixtures with the other three pesticides showed a trend of shifting from synergistic to antagonistic effects with the increasing exposure concentration. PFF-ABM combined exposure induced synergistic effects by reducing the ATP and GABA levels and damaging GABAergic neurons in nematodes.

**Key words:** Profenofos; combined toxicity; neurotoxicity; pesticide residues; *Caenorhabditis elegans*

柑橘是世界范围内种植国家最多、产量最高的水果。柑橘的生长周期长,虽易受病虫侵害但施用农药能进行有效控制,使其在国内外被人们广泛种植和食用。然而,调查显示仍有部分农药如丙溴磷(Profenofos, PFF)、联苯菊酯(Bifenthrin, BIF)、吡虫啉(Imidacloprid, IMI)、阿维菌素(Avermectin, ABM)和苯醚甲环唑(Difenoconazole, DIF)等存在检出率较高甚至超标的情况<sup>[1-2]</sup>。其中,PFF的残留情况更为严重,部分地区样本的超标率达到100%,成为柑橘类农残的主要来源之一<sup>[3]</sup>。此外,在浙江、重庆、江西等产区的柑橘样品中还常检出PFF与其他农药如ABM、BIF、DIF、IMI混合残留<sup>[3-5]</sup>。研究表明,残留农药可在环境中不断积累,可通过食物链进入生物体内形成复杂的农药混合物,对机体的生殖、神经、免疫等多个系统产生毒性损伤<sup>[6]</sup>,且存在拮抗、协同、加和等联合毒性效应的可能<sup>[7-8]</sup>,对机体健康造成不同程度的危害。目前,对PFF的单一毒性研究较为广泛,已证实其具有不同程度的发育、生殖、遗传等多种毒性作用<sup>[9]</sup>,但其神经毒性的研究相对较少,同时与其他农药的联合毒性效应及相应的毒性机制尚不清楚,故对PFF与其他农药共存而产生的联合毒性效应展开研究意义重大。

Chou-Talalay法是一种评估多种毒性物质联合作用类型的方法,不受毒性物质间相互作用的影响,近年来在化学混合物风险评估方面得到了广泛应用<sup>[10]</sup>。WANG等<sup>[11]</sup>利用了3种不同的数学模型评估了毒死蜱、呋喃丹和啮虫脒对HepG2细胞的联合毒性,发现Chou-Talalay模型评估农药混合物联合作用方式更加准确,并表明该模型能够作为评

估农药混合物联合毒性的有效工具。此外,现有的毒性研究报道多是利用鱼类和鼠类模型进行研究,但因其体型较大、神经系统复杂和干扰因素多等原因,使其在神经毒性的研究中受到一定限制。秀丽隐杆线虫(*Caenorhabditis elegans*,简称线虫)不仅具有体积小、生长周期短、易于观察、与人类具有60%~80%的基因同源性等优势,还拥有简单且与哺乳动物神经递质的合成、转运及受体结合途径高度相似的神经系统,可表达多种复杂的行为,并能通过绿色荧光蛋白标记表征其神经元结构,是一种研究神经毒理学的优势生物模型<sup>[12]</sup>。因此,本研究以线虫为生物模型,研究PFF与ABM、DIF、BIF和IMI混合暴露对线虫行为能力的影响并分析其联合毒性效应类型,最后通过测定ATP水平、GABA水平和GABA能神经元损伤情况来探究PFF-ABM混合物对线虫产生协同毒性作用的潜在机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要仪器与试剂

高速冷冻离心机(Thermo Fisher Scientific),生物显微镜(无陌光学),生化培养箱(上海一恒科学仪器有限公司),荧光正置显微镜(Olympus公司),研磨器(北京天根生化科技有限公司)。氯化钾、氯化钠、氢氧化钠(分析纯,重庆川东化工有限公司);琼脂粉、蛋白胨、胆固醇(生物技术级,上海阿拉丁生化科技有限公司);七水硫酸镁、氯化钙(分析纯,成都市科隆化学品有限公司);叠氮化钠(分析纯,德国Merck有限公司);次氯酸钠(分析纯,南京试剂有限公司)。

PFF、ABM、IMI、BIF、DIF 标准品 (Pibolab 公司), 三磷酸腺苷 (Adenosine triphosphate, ATP)、蛋白浓度 (Bicinchoninic acid, BCA)、 $\gamma$ -氨基丁酸 (Gamma-aminobutyric acid, GABA) 检测试剂盒 (碧云天生物有限公司), 野生型线虫 *N2* 品系、转基因线虫 *EG1285(unc-47::GFP)* 品系、尿嘧啶缺陷型大肠杆菌 (*E. coli OP50*) (Caenorhabditis Genetics Center)。固体培养基 (Nematode growth medium, NGM) 由 1.77 g 氯化钾, 2.25 g 氯化钠, 12.75 g 琼脂粉, 3.76 g 蛋白胨和 750 mL 超纯水配制, 经灭菌后冷却至 60 °C, 向其依次加入 1 mol/L 氯化钙、1 mol/L 七水硫酸镁和 10 mg/mL 胆固醇 1 mL。缓冲液由 2.36 g 氯化钾、3.00 g 氯化钠和 1000 mL 超纯水配制。裂解液由 1.00 g 氢氧化钠, 20 mL 次氯酸钠 (5.25%) 和 80 mL 超纯水配制。

## 1.2 线虫的处理与染毒

### 1.2.1 线虫的同步化处理

实验所用线虫日常均培养在含 *E. coli OP50* 的 NGM 培养基中, 20 °C 恒温培养。为得到同期的 L1 期线虫, 收集大量处于孕期的线虫, 用裂解液释放虫卵, 置于缓冲液中并孵育 10 h<sup>[13]</sup>。

### 1.2.2 线虫的暴露浓度

根据柑橘类水果中 PFF、ABM、DIF、BIF 和 IMI 的实际残留浓度, 综合考虑我国相关限量标准中最大残留限量的数量级<sup>[15]</sup>, 以及考虑物种间的不确定系数 1~1 000 (秀丽隐杆线虫选择不确定系数 1 000) 和前期预实验结果, 设定其体长暴露最高浓度分别为 0.8  $\mu\text{g/mL}$  (PFF)、0.04  $\mu\text{g/mL}$  (ABM)、60  $\mu\text{g/mL}$  (DIF)、80  $\mu\text{g/mL}$  (BIF)、80  $\mu\text{g/mL}$  (IMI), 采用二倍稀释法设置 6 个浓度梯度, 如 PFF 暴露浓度 0 (对照组, 记为 control)、0.05、0.1、0.2、0.4、0.8  $\mu\text{g/mL}$ , 其余测定指标的单独暴露浓度根据 5 种农药单一暴露对线虫体长抑制率 (48 h) 得到的半数有效浓度 (Effective Concentration 50%,  $EC_{50}$ ) 作为其暴露的最高剂量, 设计低 (1/10  $EC_{50}$ )、中 (1/2  $EC_{50}$ )、高 ( $EC_{50}$ ) 3 组浓度梯度。具体为 PFF (0.02、0.1、0.2  $\mu\text{g/mL}$ )、ABM (0.001、0.005、0.01  $\mu\text{g/mL}$ )、DIF (2.0、10.0、20.0  $\mu\text{g/mL}$ )、BIF (0.5、2.5、5.0  $\mu\text{g/mL}$ )、IMI (2.0、5.0、10.0  $\mu\text{g/mL}$ ), 两种农药联合暴露浓度的低中高剂量分别为对应单一农药的低中高剂量的加和, 如 PFF+DIF (0.02+2.0、0.1+10.0、0.2+20.0  $\mu\text{g/mL}$ )。

## 1.3 生理生化指标测定方法

### 1.3.1 体长的测定

体长是线虫对外源污染物敏感的指标之一, 可以反映其生长发育情况。根据体长的抑制率可计算 5 种农药对线虫体长的  $EC_{50}$ 。

将 L1 期线虫转移至含 *E. coli OP50* 的液体培养基中 (包括充足 *E. coli OP50* 以及特定浓度的农药和缓冲液), 暴露 24、48、72 h 时, 随机吸取不同测试浓度的含线虫液体置于表面皿中, 用酒精灯将虫体固定后, 在显微镜下拍照并测量体长<sup>[16]</sup>。

### 1.3.2 头部摆动和身体弯曲测定

暴露 48 h 后, 将线虫转移至不含 *E. coli OP50* 的 NGM 板上, 滴加 1 滴缓冲液进行 1 min 适应恢复, 记录线虫 1 min 内头部摆动次数 (头部从一侧摆到另一侧再摆回来记录为 1 次) 和身体弯曲次数 (身体长轴方向上做 1 次正弦运动记录为 1 次)<sup>[16]</sup>。

### 1.3.3 觅食行为测定

线虫可以通过多种神经元相互作用准确定位食物的位置。因此, 通过测定线虫的捕食率可以评估线虫神经元的损伤程度。

测试前, 在 NGM 板的中心涂 1 个直径 1 cm 含有 *E. coli OP50* 的目标圆, 并在圆心滴加 1  $\mu\text{L}$  叠氮化钠溶液。测试时, 将暴露 48 h 的线虫转移至距圆心 4 cm 的位置, 分别在 2、4、8、24 h 后观察目标圆内线虫的数目 (捕食率/% = 菌液目标圆中的线虫数目 / 测试培养板中总的线虫数目  $\times 100\%$ )<sup>[17]</sup>。

### 1.3.4 学习能力测定

线虫的行为具有可塑性, 经训练后能够将食物和化学物质相联系, 对某些化学物质做出趋避行为<sup>[18]</sup>。正常状态下的线虫对 NaCl 具有趋向性, 但在 NaCl 和饥饿刺激条件下, 线虫能对 NaCl 做出逃避行为。

将暴露 48 h 的线虫提前转移至含 NaCl 且不含 *E. coli OP50* 的 NGM 板上饥饿 3 h。然后将线虫置于提前准备好的测试培养板中的点 C, 并在点 A 和点 B 处各滴加 1  $\mu\text{L}$  的叠氮化钠溶液 (0.5 mmol/L), 待线虫自由运动 1 h 后, 分别计数以点 A 和点 B 为圆心的圆内线虫数, 并计算趋向性指数。趋向性指数 = (A 域内线虫条数 - B 域内线虫条数) / 总线虫条数。测试培养板: 在 NGM 板上设置点 A、点 B (两点相距 4 cm) 及点 C (距离 A 和 B 点 3 cm), 并在 A 点放置一个含 100 mmol/L NaCl 琼脂圆柱切块 (测试时移除)<sup>[18]</sup>。

### 1.3.5 神经元形态观察

利用 *EG1285* 线虫评估 GABA 能神经元的形态变化。将暴露 48 h 后的线虫用叠氮钠溶液固定在载玻片上, 在荧光显微镜下, 随机捕捉 20 条线虫的荧光照片。同时, 选择 Image J 软件计算神经元的荧光强度<sup>[16]</sup>。

### 1.3.6 生化指标测定

将暴露 48 h 的线虫收集到离心管中, 加入组织

裂解液并研磨匀浆,在4℃下12 000 r/min离心5 min(离心半径为10 cm),收集上清液作为样品,测定线虫BCA浓度、ATP水平和GABA水平。生化指标均按照生物试剂盒说明书测定并用蛋白含量归一化,以相比于对照组的百分值表示。

1.4 统计学分析

所有数据使用SPSS 23.0软件分析,以均数±标准差表示,利用单因素方差分析进行显著性差异性分析,采用Origin 2021软件绘图。EC<sub>50</sub>采用回归分析Probit概率函数得出,使用CompuSyn软件计算相互作用指数(Combination index value, CI值)分析联合毒性效应。

表1 PFF、ABM、DIF、BIF、IMI对线虫体长的EC<sub>50</sub>值

Table 1 EC<sub>50</sub> values of PFF, ABM, DIF, BIF, and IMI for *C. elegans* body length

	PFF/(μg/mL)	ABM/(μg/mL)	DIF/(μg/mL)	BIF/(μg/mL)	IMI/(μg/mL)
体长24 h-EC <sub>50</sub> (95%CI)	0.458 (0.353~1.413)	0.015 (0.013~0.021)	10.585 (3.593~15.996)	46.623 (34.770~68.794)	39.981 (27.618~59.387)
体长48 h-EC <sub>50</sub> (95%CI)	0.294 (0.215~1.027)	0.019 (0.013~0.027)	9.167 (1.285~14.955)	39.544 (30.677~61.202)	61.372 (42.266~121.642)
体长72 h-EC <sub>50</sub> (95%CI)	0.315 (0.322~1.202)	0.025 (0.016~0.036)	14.159 (8.619~19.635)	43.176 (29.651~48.341)	63.513 (47.760~98.836)

2.2 PFF与ABM、DIF、BIF、IMI混合暴露对野生型N2线虫运动能力的影响和联合毒性效应评估

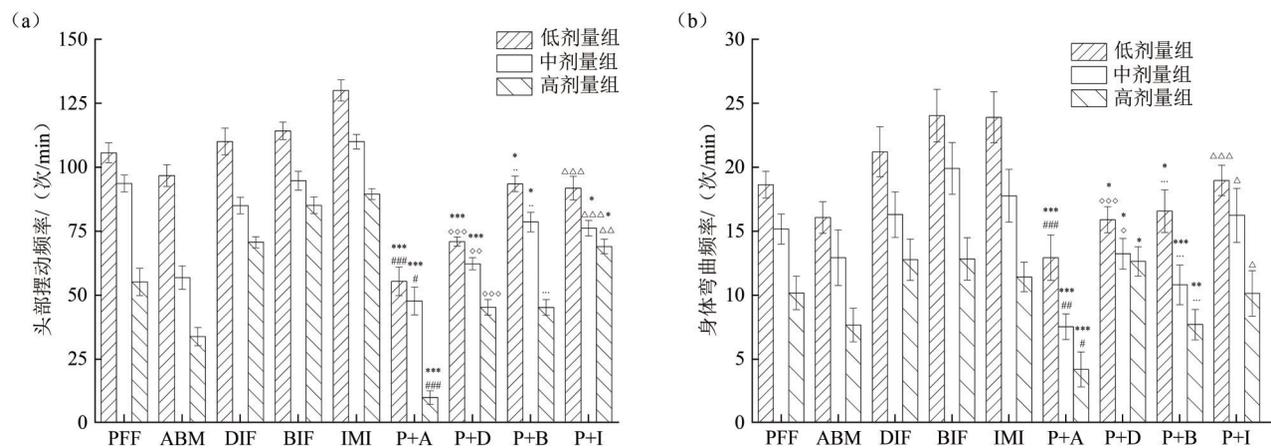
线虫的运动行为受多个神经元的控制,其运动频率的变化可以量化农药对线虫运动相关神经元的损伤。如图1(a)和1(b)所示,PFF、ABM、DIF、BIF、IMI单独处理组与对照组相比,线虫的运动频率均受到不同程度抑制。PFF+ABM所有联合处理组的线虫运动频率均显著低于同浓度下PFF、ABM单独处理组,

2 结果

2.1 PFF、ABM、IMI、DIF、BIF对野生型N2线虫体长的影响

暴露24、48、72 h时,5种农药单一暴露对线虫的体长均具有不同程度的抑制作用。单一农药生长发育毒性(48 h)大小排序为IMI<BIF<DIF<PFF<ABM。随着暴露时间由24 h延长至72 h,PFF、ABM、DIF和BIF的EC<sub>50</sub>变化较小,而IMI的EC<sub>50</sub>明显增加。由此表明,农药对线虫生长发育的抑制不仅受浓度的影响,还与毒作用时间有关,这可能与农药在线虫体内的代谢动力学和线虫自身对农药的代偿能力不同有关(表1)。

差异有统计学意义(P<0.05)。PFF+DIF和PFF+BIF联合处理组的线虫运动频率在低、中剂量时显著低于PFF、DIF和BIF单独处理组,差异有统计学意义(P<0.05),但高剂量时与单独处理组比较,差异无统计学意义(P>0.05)。PFF+IMI联合处理组在低浓度时线虫的运动频率与PFF或IMI单独处理组比较,差异无统计学意义(P>0.05),但中、高浓度时与IMI单独处理组比较,差异有统计学意义(P<0.05)。



注:横坐标P+A、P+D、P+B、P+I分别表示PFF+ABM、PFF+DIF、PFF+BIF、PFF+IMI; \*、#、◇、●、Δ表示同浓度下分别与PFF、ABM、DIF、BIF、IMI单独组有显著差异; \*\*、###、◇◇◇、●●●、ΔΔΔ表示P<0.001, \*、#、◇◇、●●●、ΔΔ表示P<0.01, \*、#、◇、●、Δ表示P<0.05

图1 PFF与ABM、DIF、BIF、IMI联合暴露后线虫的头部摆动频率(a)和身体弯曲频率(b)

Figure 1 Head swing frequency (a) and body bending frequency (b) of *C. elegans* after combined exposure to PFF, ABM, DIF, BIF, and IMI

利用CompuSyn软件计算CI值,结果如表2所示。PFF+ABM联合效应在EC<sub>25</sub>~EC<sub>75</sub>范围内表现为协同作用。PFF+DIF、PFF+BIF、PFF+IMI联合效应在EC<sub>25</sub>~EC<sub>75</sub>范围内随暴露浓度的增加,联合毒性效

应逐渐从协同作用转为拮抗作用。基于此,对在线虫模型中产生协同毒性损伤的PFF+ABM联合暴露组[PFF(0.02~0.2 μg/mL)+ABM(1.0~10.0 ng/mL)]展开进一步研究。

表2 PFF和ABM、DIF、BIF、IMI联合暴露对线虫运动行为的联合毒性分析

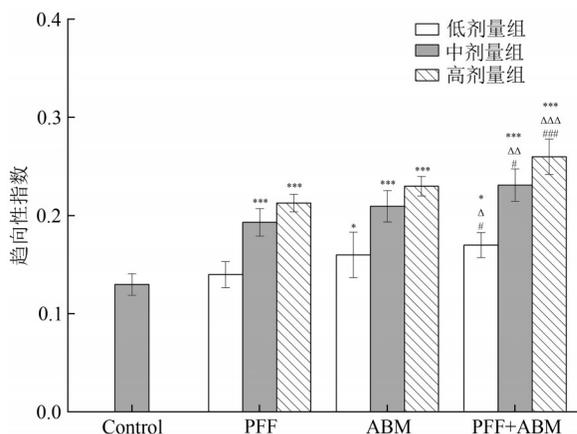
Table 2 Combined toxicity analysis of the combined exposure to PFF and ABM, DIF, BIF, and IMI on *C. elegans* motor behavior

效应水平	指标	相互作用值			
		Combination index value			
		PFF+ABM	PFF+DIF	PFF+BIF	PFF+IMI
EC <sub>25</sub>	头部摆动-48 h	0.31	0.03	0.41	0.25
	身体弯曲-48 h	0.52	0.87	0.92	0.79
EC <sub>50</sub>	头部摆动-48 h	0.53	0.71	0.55	1.84
	身体弯曲-48 h	0.77	1.16	0.54	1.41
EC <sub>75</sub>	头部摆动-48 h	0.59	1.34	1.09	2.76
	身体弯曲-48 h	0.64	1.98	1.01	3.06

注:CI<1表示联合效应为协同作用,CI=1表示加和作用,CI>1表示为拮抗作用<sup>[19]</sup>

### 2.3 PFF与ABM混合暴露对野生型N2线虫学习能力的影响

如图2所示,随着暴露浓度增加,PFF+ABM组线虫表现出对NaCl正向趋向,表明学会将NaCl与饥饿联系起来的线虫数量正在减少。与PFF和ABM单独处理组相比,PFF+ABM组线虫的趋向性指数显著增加( $P<0.05$ ),表明联合暴露对线虫趋化性学习能力产生协同损伤作用,这一结果与表2中的结果相似。



注:\*、Δ、#分别表示与对应剂量的空白组、PFF和ABM单独组具有显著差异;\*\*\*、###、ΔΔΔ表示 $P<0.001$ ,\*\*、##、ΔΔ表示 $P<0.01$ ,\*、#、Δ表示 $P<0.05$

图2 PFF和ABM联合暴露线虫的化学趋向性指数

Figure 2 Chemical tendency index of *C. elegans* exposed to PFF and ABM

### 2.4 PFF和ABM混合暴露对野生型N2线虫觅食行为的影响

如图3所示,随着暴露浓度增加,单独和联合处理线虫的觅食能力呈下降趋势。在接触食物2h和4h后,PFF+ABM联合处理组在低、中浓度时线虫捕食率ABM单独组比较,差异无统计学意义( $P>0.05$ )。然而,在接触食物8h和24h后,PFF+ABM组线虫捕食率较PFF和ABM单独组显著下降,差

异有统计学意义( $P<0.05$ )。

### 2.5 PFF+ABM对野生型N2线虫能量代谢水平的影响

ATP由供能细胞器线粒体产生,是线虫维持神经元正常生理活动的重要能量来源。当外源物损伤线粒体结构和功能时,线虫的体内ATP的合成将受到影响。因此,通过测定线虫体内ATP水平可以反映线粒体的功能活性和机体的能量代谢水平。如图4所示,随着联合暴露浓度增加,线虫体内ATP水平较空白组显著降低( $P<0.001$ )。与对应浓度的PFF和ABM单独处理组相比,PFF+ABM联合处理组在高剂量时分别降低29.53%和38.01%。

### 2.6 PFF+ABM对野生型N2线虫神经递质GABA的影响

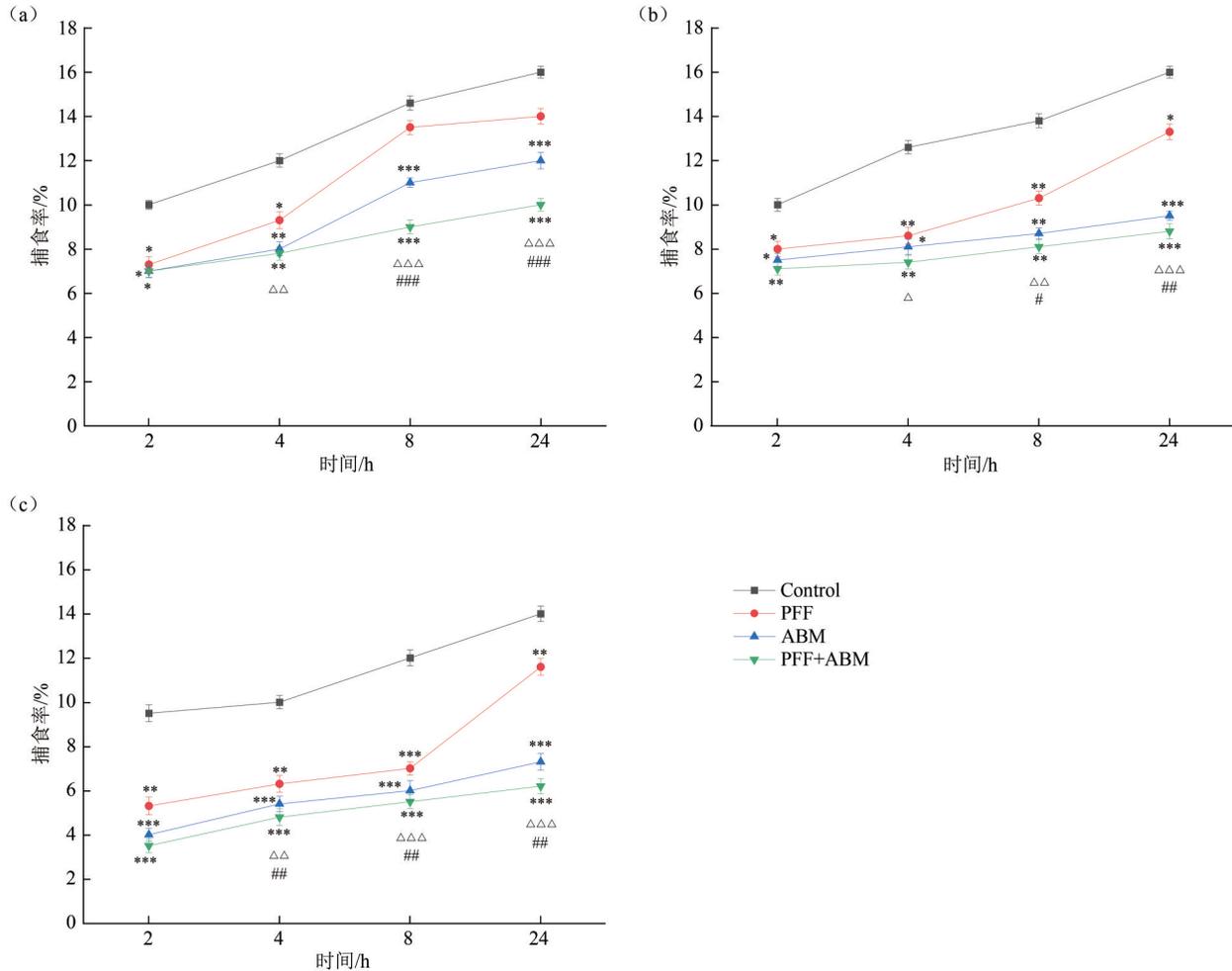
神经递质是神经系统的化学信使,在神经元和肌肉之间传递信号,测定其神经递质含量可以准确评估线虫的神经系统是否受到有毒物质的影响。如图5所示,其他处理组与空白组相比均具有显著差异( $P<0.05$ )。同时,PFF+ABM组线虫GABA含量较PFF和ABM单独处理组均显著降低,差异有统计学意义( $P<0.001$ )。其中,高剂量联合处理组较对应的PFF和ABM单独处理组分别下降了33.22%和29.78%。

### 2.7 PFF+ABM对转基因EG1285线虫GABA能神经元的影响

利用绿色荧光蛋白标记的转基因线虫可直观地观察不同神经递质类型的神经元发育形态。因此,我们利用EG1285线虫(GABA能神经元由转运蛋白标志物 $unc-47::GFP$ 表达,该神经元系统在调节线虫的运动、觅食和学习等行为中发挥着关键作用)评估了联合处理对线虫GABA能神经元的影响,结果如图6所示。与空白组相比,PFF和ABM单独处理的低、中剂量组线虫GABA能神经元荧光表达量差异无统计学意义( $P>0.05$ ),而高剂量组中线虫的荧光强度显著降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与PFF和ABM单独处理组相比,PFF+ABM联合处理组在高剂量时线虫GABA能神经元的荧光强度分别降低43.38%和33.20%,差异有统计学意义( $P<0.001$ ),对线虫GABA能神经元发育损伤产生协同作用。同时,图6还显示EG1285线虫中神经元的荧光强度减弱和荧光点数量减少,表明存在神经元胞体缩小和神经元缺失等情况。

## 3 讨论

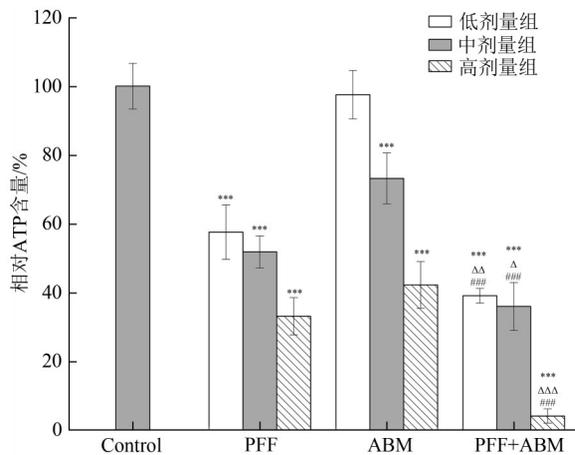
多种农药共同残留于同一食品中的现象普遍存在,而它们产生的联合毒性效应会对人类健康产生不同程度的危害。PFF作为已知的神经毒物,是柑橘类



注：\*、Δ、#分别表示与对应剂量的空白组、PFF和ABM单独组具有显著差异；(a)低剂量组；(b)中剂量组；(c)高剂量组；\*\*\*、###、ΔΔΔ表示  $P < 0.001$ ，\*\*、##、ΔΔ表示  $P < 0.01$ ，\*、#、Δ表示  $P < 0.05$

图3 PFF和ABM联合暴露线虫的捕食率

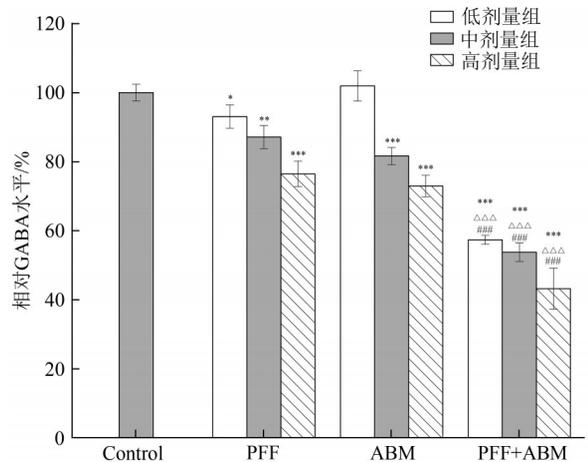
Figure 3 Feeding rate of *C. elegans* exposed to PFF and ABM



注：\*、Δ、#分别表示与对应剂量的空白组、PFF和ABM单独组具有显著差异；\*\*\*、###、ΔΔΔ表示  $P < 0.001$ ，\*\*、##、ΔΔ表示  $P < 0.01$ ，\*、#、Δ表示  $P < 0.05$

图4 PFF和ABM联合暴露线虫的ATP含量

Figure 4 ATP levels of *C. elegans* exposed to PFF and ABM



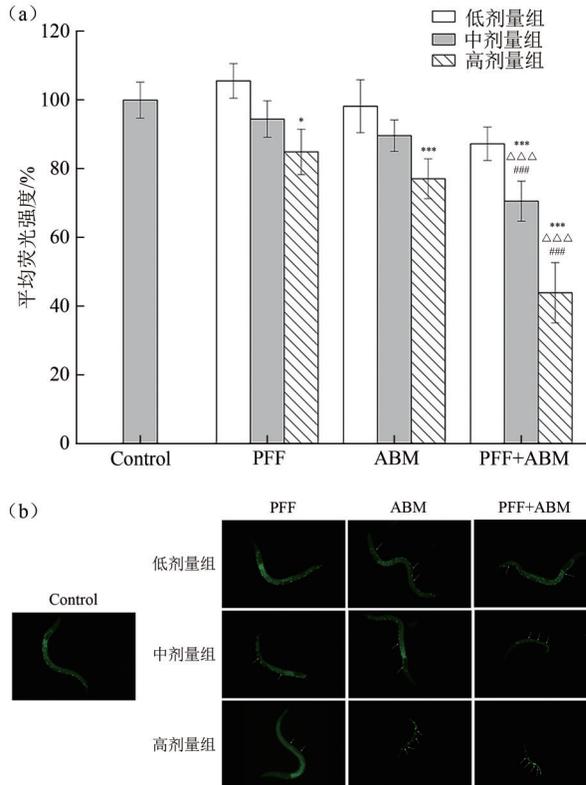
注：\*、Δ、#分别表示与对应剂量的空白组、PFF和ABM单独组具有显著差异；\*\*\*、###、ΔΔΔ表示  $P < 0.001$ ，\*\*、##、ΔΔ表示  $P < 0.01$ ，\*、#、Δ表示  $P < 0.05$

图5 PFF和ABM联合暴露线虫的神经递质GABA含量

Figure 5 Neurotransmitter GABA levels of *C. elegans* exposed by PFF and ABM

水果中常见的农残成分,但目前PFF与其他农药混合暴露产生的联合神经毒性的效应尚不清楚。因此,本研究通过测定柑橘类水果中频繁检出的农药混合物

对线虫的神经毒性,以评估其在线虫体内产生的联合毒性作用,为开展PFF联合神经毒性研究提供了数据。



注: \*、Δ、# 分别表示与对应剂量的空白组、PFF 和 ABM 单独组具有显著差异; 箭头表示神经元缺失; \*\*\*、###、ΔΔΔ 表示  $P < 0.001$ , \*\*、##、ΔΔ 表示  $P < 0.01$ , \*、#、Δ 表示  $P < 0.05$

图6 PFF 和 ABM 联合暴露线虫 GABA 能神经元的平均荧光强度(a) 和 *EG1285* 线虫神经元形态图(b) (×20)

Figure 6 Mean fluorescence intensity of GABA neurons exposed to PFF and ABM (a) and morphology of *EG1285* *C. elegans* neurons (b) (×20)

在本研究中,除 PFF+ABM 外,PFF+DIF、PFF+BIF、PFF+IMI 对线虫的联合神经毒性整体上表现为随农药浓度增大,其联合效应具有协同转为拮抗作用的趋势,这与 IMI、环氧虫啉和戊唑醇对水蚤的联合毒性作用类似<sup>[20]</sup>,其原因可能与其毒性机制和农药在体内的代谢有关。既往研究表明,PFF、DIF 和 IMI 均能产生活性氧,引起氧化应激反应<sup>[21]</sup>。由此推测,PFF 与 DIF、IMI 暴露可能引起了一定的氧化应激,使线虫的正常生理功能受限,由此联合神经毒性增强;但随着浓度增加,不同组分间可能对相同的结合位点产生竞争<sup>[22]</sup>,如 PFF、DIF、IMI 都是乙酰胆碱酯酶(Acetylcholinesterase, AChE)抑制剂,其浓度过高时会竞争 AChE 的结合位点,从而导致其联合神经毒性减弱。PFF 与 BIF 对线虫的联合效应类型发生改变,可能是由于 BIF 暴露引起了机体代谢紊乱从而加快了 PFF 的代谢<sup>[23]</sup>,最终使其联合神经毒性减弱产生拮抗作用。运动、觅食和趋向性都是线虫生存的基本行为能力,由神经系统进行统一调控。本研究发现 PFF 与 ABM 联合处理对线虫的

神经系统造成了更加严重的损伤,使其运动频率、捕食率和趋化性指数显著改变,这一结果与 Chou-Talalay 模型分析得出的 PFF 与 ABM 联合毒性效应类型(协同作用)一致。这可能是因为 PFF 的神经毒性机制主要是通过磷酸化 AChE 的活性位点,导致乙酰胆碱在突触连接处积累,从而引发神经元功能障碍<sup>[24]</sup>;而 ABM 的毒性机制主要是通过靶向 GABA 受体和谷氨酸门控氯离子通道来增加氯离子膜通透性,引起大量的氯离子流入神经元,从而导致神经递质传递受阻<sup>[25]</sup>。PFF 和 ABM 暴露均可使机体发生神经元损伤或神经递质紊乱,二者通过不同的作用途径引起相似的毒性反应,从而使联合神经毒性增强。线虫联合暴露农药的神经毒性具有多靶点和多机制的特点,推测 PFF 与 DIF、IMI、BIF 农药组合在不同浓度下对线虫的觅食和趋向性的影响可能与运动能力的变化类似,甚至可能引发更复杂的神经行为异常,这一推测有待进一步研究验证,以期为后续进一步动物实验中神经毒性的评价提供指导。

线虫的运动行为主要由 GABA 能神经元控制,其运动行为变化与 GABA 能神经元荧光强度显著相关<sup>[26]</sup>。在本研究中,PFF 和 ABM 联合暴露使 *EG1285* 线虫的 GABA 能神经元胞体缩小和缺失,并使其荧光强度显著低于两个单独处理组。这一结果表明,PFF 与 ABM 对线虫神经系统产生协同毒性可能与 GABA 能神经元损伤密切相关。结果还显示,PFF 与 ABM 联合处理后野生型线虫 GABA 水平显著降低,GABA 能神经元发生神经递质传递异常。值得注意的是,PFF 单独处理后线虫 GABA 水平显著降低,表明 PFF 对胆碱能神经递质系统的影响可能并不是唯一的行为毒性机制,非胆碱能系统(即 GABA 受体)可能是其替代或次要靶标,这与对氧磷灌胃后,大鼠的大脑皮层和海马突触体中 GABA 水平和运动行为改变的结果类似<sup>[27]</sup>。

ATP 是神经系统的能量来源,可为神经递质的合成和传递提供能量,保证神经元的正常活动<sup>[28]</sup>。本研究发现,经 PFF+ABM 联合处理后线虫的 ATP 水平较两个单独处理组降低。这可能是由于 PFF 与 ABM 共同作用引发了线粒体损伤,使线粒体膜通透性增加,从而使 ATP 生成过程受阻<sup>[29]</sup>。因此,PFF+ABM 诱导协同神经毒性的产生还可能与线粒体功能障碍有关,使神经元由于能量供应不足发生神经递质传递障碍,加剧神经毒性。与之相似,ZHAO 等<sup>[30]</sup>研究证明了线粒体相关基因(*Pink-1*)参与纳米塑料和四溴双酚 A 共同暴露引起的线虫运动能力下降和协同神经毒性的产生。此外,农药诱导协同神经毒性的机制较为复杂,还需深入探究有

关氧化应激、线粒体损伤、内质网应激等介导的神经毒性相关通路和基因,进而阐明农药联合暴露诱导的协同神经毒性的机制。

综上所述,本研究证实了PFF对线虫的运动能力有明显的抑制作用且与其他可能共存的农药会产生协同神经毒性,可能对人或动物的健康产生更大影响,故PFF的联合神经毒性值得更多关注。未来,PFF的联合暴露研究应进一步关注多农药种类、更宽的暴露浓度和更多的监测终点,进而能全面客观地对PFF及其共存农药的健康风险展开评估。

### 参考文献

- [1] 李志霞,董超,周杰,等.柑橘中高风险农药及主要代谢物的消解转化特征及健康风险评估[J].食品与发酵工业,2021,47(14):45-50.  
LI Z X, DONG C, ZHOU J, et al. Degradation and transformation characteristics of high-risk pesticides and major metabolites in citrus and health risk assessment[J]. Food and Fermentation Industry, 2021, 47(14): 45-50
- [2] 鲍涵冰.中国市售蔬菜水果中农药残留状况及联合暴露风险评估[D].武汉:华中科技大学,2022.  
BAO H B. Pesticide residue status and joint exposure risk assessment in vegetables and fruits sold in China[D]. Wuhan: Huazhong University of Science and Technology, 2022.
- [3] LI Z, ZHANG Y, ZHAO Q, et al. Determination, distribution and potential health risk assessment of insecticides and acaricides in citrus fruits of China[J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2022, 111: 104645.
- [4] 韦菲,吴常智,龙秋均,等.5种高检出农药在柑橘中残留的气相色谱分析方法研究[J].安徽农业科学,2020,48(17):210-212.  
WEI F, WU C Z, LONG Q J, et al. Research on Gas Chromatography Analysis Method for Residue of 5 Highly Detected Pesticides in Citrus[J]. Anhui Agricultural Science, 2020, 48(17): 210-212.
- [5] LIU Y, BEI K, ZHENG W, et al. Pesticide residues risk assessment and quality evaluation of four characteristic fruits in Zhejiang Province, China[J]. Frontiers in Environmental Science, 2023, 11: 1124094.
- [6] HERNÁNDEZ A F, PARRÓN T, TSATSAKIS A M, et al. Toxic effects of pesticide mixtures at a molecular level: Their relevance to human health[J]. Toxicology, 2013, 307: 136-145.
- [7] FAN R, ZHANG W, LI L, et al. Individual and synergistic toxic effects of carbendazim and chlorpyrifos on zebrafish embryonic development[J]. Chemosphere, 2021, 280: 130769.
- [8] ZHANG W, FAN R, LUO S, et al. Antagonistic effects and mechanisms of carbendazim and chlorpyrifos on the neurobehavior of larval zebrafish[J]. Chemosphere, 2022, 293: 133522.
- [9] LI J, JIN Q, LI S, et al. Effects of profenofos on the growth, reproduction, behavior, and gene transcription of *Daphnia magna* [J]. Environmental Science and Pollution Research, 2023, 30(30): 74928-74938.
- [10] ROELL K R, REIF D M, MOTSINGER-REIF A A. An introduction to terminology and methodology of chemical synergy—perspectives from across disciplines[J]. Frontiers in Pharmacology, 2017, 8: 158.
- [11] WANG R, YANG X, WANG T, et al. Synergistic effects on oxidative stress, apoptosis and necrosis resulting from combined toxicity of three commonly used pesticides on *HepG2* cells[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 263: 115237.
- [12] WU T, XU H, LIANG X, et al. *Caenorhabditis elegans* as a complete model organism for biosafety assessments of nanoparticles [J]. Chemosphere, 2019, 221: 708-726.
- [13] LEE Y, CHOI S, KIM K W. Dithianon exposure induces dopaminergic neurotoxicity in *Caenorhabditis elegans*[J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 255: 114752.
- [14] 国家卫生健康委员会.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:中国农业出版社,2021.  
National Health Commission. National Food Safety Standard Maximum Residue Limits for Pesticides in Food: GB 2763—2021[S]. Beijing: China Agricultural Press, 2021.
- [15] YU Y, HUA X, CHEN H, et al. Toxicity of lindane induced by oxidative stress and intestinal damage in *Caenorhabditis elegans* [J]. Environmental Pollution, 2020, 264: 114731.
- [16] 张晓娟.基于秀丽隐杆线虫模型的伏马毒素B1神经毒性机制及其干预研究[D].无锡:江南大学,2022.  
ZHANG X J. Study on the neurotoxic mechanism and intervention of fumonisin B1 based on the *Caenorhabditis elegans* model[D]. Wuxi: Jiangnan University, 2022.
- [17] CALHOUN A J, CHALASANI S H, SHARPEE T O. Maximally informative foraging by *Caenorhabditis elegans*[J]. eLife, 2014, 3: e04220.
- [18] WU T, HE K, ZHAN Q, et al. MPA-capped CdTe quantum dots exposure causes neurotoxic effects in nematode *Caenorhabditis elegans* by affecting the transporters and receptors of glutamate, serotonin and dopamine at the genetic level, or by increasing ROS, or both[J]. Nanoscale, 2015, 7(48): 20460-20473.
- [19] CHOU T C. Drug Combination Studies and Their Synergy Quantification Using the Chou-Talalay Method[J]. Cancer Research, 2010, 70(2): 440-446.
- [20] MAN Y, SUN T, WU C, et al. Evaluating the Impact of Individual and Combined Toxicity of Imidacloprid, Cyclozaprid, and Tebuconazole on *Daphnia magna*[J]. Toxics, 2023, 11(5): 428.
- [21] FU D J, LI P, SONG J, et al. Mechanisms of synergistic neurotoxicity induced by two high risk pesticide residues - Chlorpyrifos and Carbofuran via oxidative stress[J]. Toxicology in Vitro, 2019, 54: 338-344.
- [22] Single and joint toxic effects of five selected pesticides on the early life stages of zebrafish (*Denio rerio*) [J]. Chemosphere, 2017, 170: 61-67.
- [23] DAI P L, WANG Q, SUN J H, et al. Effects of sublethal concentrations of bifenthrin and deltamethrin on fecundity, growth, and development of the honeybee *Apis mellifera ligustica* [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2010, 29(3): 644-649.
- [24] PAMANJI R, YASHWANTH B, BETHU M S, et al. Toxicity

- effects of profenofos on embryonic and larval development of Zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2015, 39(2): 887-897.
- [25] SALMAN M, ABBAS R Z, MEHMOOD K, et al. Assessment of Avermectins-Induced Toxicity in Animals [J]. *Pharmaceuticals*, 2022, 15(3): 332.
- [26] ZHANG X, YE Y, SUN J, et al. Abnormal neurotransmission of GABA and serotonin in *Caenorhabditis elegans* induced by Fumonisin B1 [J]. *Environmental Pollution*, 2022, 304: 119141.
- [27] GUBERT P, ÁVILA D S, BRIDI J C, et al. Low concentrations of methamidophos do not alter AChE activity but modulate neurotransmitters uptake in hippocampus and striatum in vitro [J]. *Life Sciences*, 2011, 88(1): 89-95.
- [28] BAILEY D C, TODT C E, BURCHFIELD S L, et al. Chronic exposure to a glyphosate-containing pesticide leads to mitochondrial dysfunction and increased reactive oxygen species production in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2018, 57: 46-52.
- [29] MARTINS A C, VIRGOLINI M B, ÁVILA D S, et al. Mitochondria in the Spotlight: *C. elegans* as a Model Organism to Evaluate Xenobiotic-Induced Dysfunction [J]. *Cells*, 2023, 12(17): 2124.
- [30] ZHAO K, ZHANG Y, LIU M, et al. The joint effects of nanoplastics and TBBPA on neurodevelopmental toxicity in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Toxicology Research*, 2023, 12(1): 76-85.

(上接第 114 页)

- 朱心强(浙江大学医学院)
- 刘 弘(上海市疾病预防控制中心)
- 刘长青(河北省疾病预防控制中心)
- 刘成伟(江西省疾病预防控制中心)
- 刘兆平(国家食品安全风险评估中心)
- 刘守钦(济南市疾病预防控制中心)
- 刘烈刚(华中科技大学公共卫生学院)
- 刘爱东(国家食品安全风险评估中心)
- 孙长颢(哈尔滨医科大学)
- 李 宁(国家食品安全风险评估中心)
- 李 黎(中华预防医学会)
- 李凤琴(国家食品安全风险评估中心)
- 李业鹏(国家食品安全风险评估中心)
- 李国梁(陕西科技大学食品与生物工程学院)
- 李静娜(武汉市疾病预防控制中心)
- 杨 方(福州海关技术中心)
- 杨 钧(青海省卫生健康委员会卫生监督所)
- 杨大进(国家食品安全风险评估中心)
- 杨小蓉(四川省疾病预防控制中心)
- 杨杏芬(南方医科大学公共卫生学院)
- 肖 荣(首都医科大学公共卫生学院)
- 吴永宁(国家食品安全风险评估中心)
- 何更生(复旦大学公共卫生学院)
- 何来英(国家食品安全风险评估中心)
- 何洁仪(广州市疾病预防控制中心)
- 钟 凯(科信食品与营养信息交流中心)
- 姜毓君(东北农业大学食品学院)
- 聂俊雄(常德市疾病预防控制中心)
- 贾旭东(国家食品安全风险评估中心)
- 徐 娇(国家食品安全风险评估中心)
- 徐海滨(国家食品安全风险评估中心)
- 高志贤(军事科学院军事医学研究院)
- 郭云昌(国家食品安全风险评估中心)
- 郭丽霞(国家食品安全风险评估中心)
- 唐振柱(广西壮族自治区疾病预防控制中心)
- 黄 薇(深圳市疾病预防控制中心)
- 黄锁义(右江民族医学院药学院)
- 常凤启(河北省疾病预防控制中心)
- 崔生辉(中国食品药品检定研究院)
- 章 宇(浙江大学生物工程与食品学院)
- 章荣华(浙江省疾病预防控制中心)
- 梁进军(湖南省疾病预防控制中心)
- 程树军(广州海关技术中心)
- 傅武胜(福建省疾病预防控制中心)
- 谢剑炜(军事科学院军事医学研究院)
- 赖卫华(南昌大学食品学院)
- 裴晓方(四川大学华西公共卫生学院)
- 廖兴广(河南省疾病预防控制中心)
- 熊丽蓓(上海市疾病预防控制中心)
- 樊永祥(国家食品安全风险评估中心)