

三氯生和三氯卡班对斑马鱼幼鱼的免疫毒性比较

程颖, 詹海锋, 倪安煜, 刘兴成, 闫瑾, 王慧利*

苏州科技大学 环境科学与工程学院, 江苏 苏州 215009

程颖, 詹海锋, 倪安煜, 刘兴成, 闫瑾, 王慧利. 三氯生和三氯卡班对斑马鱼幼鱼的免疫毒性比较[J]. 生物工程学报, 2024, 40(10): 3765-3780.

CHENG Ying, ZHAN Haifeng, NI Anyu, LIU Xingcheng, YAN Jin, WANG Huili. Comparison of triclosan and triclocarban in triggering immunotoxicity in larval zebrafish[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2024, 40(10): 3765-3780.

摘要: 三氯生(triclosan, TCS)和三氯卡班(triclocarban, TCC)作为两种高效的广谱杀菌剂被广泛使用,尤其是在新冠肺炎疫情期间,然而其二次污染造成的健康风险备受关注。TCS和TCC具有相似的母核结构和高亲脂性特点,其对环境生物的毒性效应和致毒机制的差异尚不明晰,尤其是二者的免疫毒性研究较少。本研究以脊椎动物斑马鱼为模型,比较二者在相同浓度暴露下(0.6 $\mu\text{mol/L}$)的免疫毒性及其作用机制。结果发现, TCS和TCC均能导致受精后72 h (hours post fertilization, hpf)的斑马鱼受精卵孵化率低于60%,对120 hpf幼鱼的致死率分别达40%和50%,并伴有抑制体节生长、游囊关闭、心包水肿、卵黄囊肿淤积与吸收障碍等畸形,且TCC致畸程度显著高于TCS。TCS暴露刺激固有免疫细胞增殖率为20%,T细胞减少了35%,而TCC对固有免疫细胞和T细胞分化均呈抑制作用,抑制率分别为25%和60%。实时荧光定量PCR (real-time quantitative PCR, RT-qPCR)和ELISA的结果显示, TCS和TCC分别致 *il-1 β* 、*il-6* 和 *tnf- α* 炎症因子编码基因显著上调,而二者对 *il-10* 和 IgM 的表达呈相反趋势,且均导致 C3 的表达下降。皮尔逊(Pearson)相关性分析表明,发现 TCS 与 TCC 诱导的发育毒性与免疫细胞分化之间分别呈正相关和负相关,但二者均与促炎因子表达量呈正相关。GO 功能和 KEGG 通路富集分析发现, TCS 与 TCC 作用靶分子富集在不同的信号通路上,关键网络 hub 基因和富集的调控通路也有所不同。本研究为揭示 TCS 和 TCC 引发免疫毒性的不同机制提供了证据,并为二者所致健康风险的识别、预警和管理提供了理论参考。
关键词: 三氯生; 三氯卡班; 斑马鱼; 免疫毒性; 致毒机制

资助项目: 国家自然科学基金(32371705); 江苏省自然科学基金(BK20231341)

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (32371705) and the Natural Science Foundation of Jiangsu Province (BK20231341).

*Corresponding author. E-mail: whuili@163.com

Received: 2023-11-27; Accepted: 2024-04-01; Published online: 2024-09-13

Comparison of triclosan and triclocarban in triggering immunotoxicity in larval zebrafish

CHENG Ying, ZHAN Haifeng, NI Anyu, LIU Xingcheng, YAN Jin, WANG Huili*

School of Environmental Science and Engineering, Suzhou University of Science and Technology, Suzhou 215009, Jiangsu, China

Abstract: As two efficient broad-spectrum sterilizing agents, triclosan (TCS) and triclocarban (TCC) are widely used, especially during the COVID-19 pandemic. The health risks caused by secondary pollution of TCS and TCC have aroused wide concern. Because of the similar mother nucleus structure and high lipophilicity, it remains unknown about the differences in the effect and mechanism of the toxicity (especially immunotoxicity) between TCS and TCC in organisms in the environment. In this study, we used zebrafish as a model to compare the immunotoxicity and mechanisms between the two pollutants at the same exposure concentration (0.6 $\mu\text{mol/L}$). The results showed that both TCS and TCC led to a hatching rate below 60% at the time point of 72 hours post fertilization (hpf) and the mortality rates of 40% and 50% at 120 hpf in larval zebrafish, respectively. The zebrafish exposed to TCS and TCC displayed malformations, such as shortened body, swimming sac closure, pericardial edema, yolk cyst deposition, and absorption disorder. Moreover, the developmental abnormalities caused by TCC were significantly severer than those caused by TCS. TCS exposure increased the proliferation rate of innate immune cells to 20% and decreased the number of mature T cells by 35%, while TCC exposure inhibited the differentiation of both innate immune cells and T cells, with the inhibition rates of 25% and 60%, respectively. The results of real-time quantitative PCR (RT-qPCR) and ELISA showed that TCS and TCC exposure up-regulated the expression levels of *il-1 β* , *il-6*, and *tnf- α* , while *il-10* and IgM exhibited opposite expression patterns. Additionally, both compounds slightly decreased C3 expression. The Pearson correlation analysis showed that the developmental toxicity induced by TCS and TCC had positive and negative correlations with the differentiation of immune cells, respectively. However, the toxicity induced by either TCS or TCC was positively correlated with the expression of pro-inflammatory cytokines. GO function and KEGG pathway enrichment analyses demonstrated that the target molecules of TCS and TCC were enriched in different signaling pathways, and the key network hub genes and the enriched regulatory pathways differed between TCS and TCC. The findings provide compelling evidence that TCS and TCC adopt different mechanisms in triggering immunotoxicity and offer a theoretical reference for the recognition, warning, and management of TCS and TCC-induced health risks.

Keywords: triclosan; triclocarban; zebrafish; immunotoxicity; toxicity mechanism

三氯生(triclosan, TCS)和三氯卡班(triclocarban, TCC)作为高效广谱性杀菌剂,被广泛应用于医药和精细化工等领域^[1]。其大量频繁使用产生

的“二次污染”已构成生态环境隐患^[2]。尽管2016–2019年美国食品和药品管理局(Food and Drug Administration, FDA)陆续禁止在部分卫生

产品如手皂、沐浴露、临床护理用品、洗手液和牙膏中使用 TCS, 但全球许多大公司仍将其添加到高端产品中, 并在全球畅销, 引领卫生产品的潮流。在 2022 年, 全球 TCS 的市场规模为 4.35 亿元。美国销量第四的高露洁道达尔®牙膏中 TCS 含量为 0.3%^[3]。TCC 在欧美国家中的使用历史已长达 45 年, 目前美国 TCC 年产量大约为 4.54×10^5 t, 保守估计世界范围 TCC 的年使用量大概为 7.5×10^5 t^[4]。由于 TCC 具有活性高、脂溶性强、对光和热稳定, 一旦附着于皮肤, 不易冲洗, 因此可以持续发挥杀菌的效果^[5]。而发展中国家不良的卫生系统使原污水大量释放到地表水, 使二者的污染程度加剧^[6]。TCS 的光解产物为稳定的氯代中间体, 如 2,4-二氯苯酚、2,4,6-三氯苯酚、2,8-二氯代二苯并二噁英(2,8-dichlorodibenzo-p-dioxin, 2,8-DCDD)、2,7-二氯代二苯并二噁英(2,7-dichlorodibenzo-p-dioxin, 2,7-DCDD), 也能产生羟基化二氯代二苯并呋喃; 炎热夏季还会与水中氯离子反应, 形成三氯甲烷^[7], 或被生物体甲基化为 TCS-CH₃^[8]等。其转化产物稳定性和毒性高于母体, 且部分具“三致”作用。

研究发现 TCS 和 TCC 在污水、污泥等环境介质中被广泛检出^[9-10]。尤其在新冠大流行期间, 杀菌消毒等卫生类防护产品的大量频繁使用, 致使两者在医院废水和生物污水中的检出浓度显著升高^[11]。其中, 在河流^[12-14]、沉积物^[15]、底泥^[16]中均检出不同浓度的 TCC 和 TCS。由于 TCC 和 TCS 均具亲脂性($\log^{K_{ow}}$ 值分别为 4.90、5.46), 故有较强的生物蓄积、生物放大作用, 研究者在水藻、鱼虾, 甚至 80% 妇女的乳汁和脐带血中均检出 0.08–16 000.00 ng/g TCS^[17-18]。二者在部分产品中的禁用未减轻其生态污染与健康风险, 长期作用于生态系统引发的慢性毒性、生物蓄积、生物放大及多种药物共存的“加和作用”对人类健康和生态安全构成威胁。

由于二者化学结构近似于非固醇类激素, 与典型的内源激素干扰剂多氯联苯、多溴联苯醚和双酚 A 等结构的相似性可预测其潜在的(抗)雄或雌激素效应的可能。体内外实验也证实了二者具有典型的环境内分泌干扰效应^[19], 扰乱激素水平, 诱导脂质代谢紊乱。由于二者高效的杀菌作用, 长期暴露于 TCC 和 TCS 的环境浓度下, 干扰脊椎动物的肠道菌群结构, 降低肠道益生菌的丰度和多样性^[20-21], 通过肠-肝轴导致糖脂代谢紊乱, 诱发肥胖、非酒精性脂肪肝和肝炎等^[22]。通过肠-脑轴导致暴露生物的运动和神经行为异常, 诱发神经毒性^[23-24]。TCC 通过影响细胞周期进程等破坏小鼠卵母细胞的成熟, 产生生殖毒性^[25], 长时间接触大量的 TCC 可能引起动物的肝肾功能的损伤^[26], 改变氧化应激水平^[27], 诱发免疫毒性。TCC 也可以破坏雌激素受体的信号传导^[28], 增加人体细胞中控制睾酮的基因表达^[29], 产生内分泌干扰作用。TCC 和 TCS 均能造成 DNA 的断裂损伤, 产生遗传毒性^[30-31]。综上, 基于二者相似的母核结构和高亲脂性特点, 其产生上述毒性效应的作用途径、作用靶点及分子机制是否存在差异这一问题尚不明晰, 尤其是二者的免疫毒性研究较少, 因此, 本文以脊椎模式生物斑马鱼为模型, 从不同层次上系统地评价了 TCS 和 TCC 对免疫毒性的影响, 并比较二者诱导免疫毒性的差异和致毒机制的不同, 以期为两者的风险预警、管控和环境标准制定提供参考, 并为污染性疾病认知、预防和精准靶向诊疗提供重要的理论指导。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及仪器

试剂: TCS (99.0%) 和 TCC (99.0%) 分别购自上海西格玛奥德里齐贸易有限公司和北京索

莱宝科技有限公司；放射免疫沉淀测定 (radioimmunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液和焦碳酸二乙酯 (diethyl pyrocarbonate, DEPC) 水购自上海西格玛奥德里齐贸易有限公司；中性红和苏丹黑 B 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司；第一链 cDNA 合成试剂盒和 TransStart[®] Green qPCR Super Mix 试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司；丙酮、乙醇购自无锡展望化工试剂有限公司。

仪器：体式显微镜(奥林巴斯)、台式低温高速离心机(艾本德股份公司)、制冰机(宁波特朗普仪器有限公司)、涡旋混合器(上海医科大学仪器厂)、F6/F10 手持式高速匀浆机(上海净信科技公司)、Step OnePlus[™] Real-Time PCR System (赛默飞世尔科技有限公司)。

1.2 实验动物

受试生物斑马鱼 AB 品系和 Tg (*coro1a*:EGFP)、Tg (*rag2*:DsRed) 转基因斑马鱼品系购于中国科学院武汉水生所, 根据参考文献报道的方法^[10]进行斑马鱼饲养、繁殖和胚胎收集。实验动物均按苏州科技大学学术伦理审查委员会的规定(批准号: USTS2024017)进行处理。设置对照组为含 0.01% 丙酮溶剂的胚胎培养液, 0.6 $\mu\text{mol/L}$ TCS 处理组和 0.6 $\mu\text{mol/L}$ TCC 处理组, 暴毒方式模拟环境接触方式采用体外浸药暴露, 药物含在循环水中。每隔 12 h 更换 1 次染毒液以维持暴露浓度, 连续暴露 5 d。每个处理组 4 hpf 胚胎为 48 枚, 设置 3 次生物重复, 样本总量为 144 枚, 实验实施中每处理组设置 3 次技术重复。

1.3 幼鱼巨噬细胞的中性红染色

将各处理组发育 72 hpf 的幼鱼随机且等量放入 12 尾于 6 孔板中, 加入中性红染液 (2.5 $\mu\text{g/mL}$), 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 避光环境下孵育 7 h 后, 用 1% tricaine 麻醉幼鱼后在体视显微镜下观察巨噬细胞的数量, 记录平行 3 个技术重复并拍照。

1.4 幼鱼性粒细胞的苏丹黑 B 染色

将各处理组发育 72 hpf 的幼鱼随机且等量放入 12 尾于 1.5 mL 无菌离心管中, 低温麻醉后加入 4% 多聚甲醛 (polyformaldehyde, PFA) 溶液固定过夜, 用磷酸缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 清洗 2 次, 加入苏丹黑 B 染液避光染色 40 min, 用 70% 乙醇避光清洗幼鱼至表面无色后用 PBS 复水, 然后记录平行 3 个技术重复的中性粒细胞并拍照。

1.5 总 RNA 提取和 RT-qPCR 定量免疫因子变化

根据文献报道的斑马鱼 RNA 提取方法^[11], 收集各处理组发育至 120 hpf 的幼鱼各 50 尾, 根据逆转录试剂盒的操作说明书逆转录合成 cDNA 后, 根据 TransStart Green qPCR Super Mix 试剂盒操作要求配制 RT-qPCR 反应体系, 放入 Thermofisher 实时定量 PCR 仪器循环, 每处理组 3 次技术重复。循环终止后, 下载记录数据。

1.6 ELISA 检测体液免疫因子的含量和活性

随机收集各处理组 50 尾 120 hpf 幼鱼于 1.5 mL 的 EP 管中, 用 PBST 缓冲液清洗 2-5 次; 用 RNase-free 枪头吸取 120 μL RIPA (RIPA lysis buffer) 裂解液于各组幼鱼的 EP 管中, 冰浴中匀浆破碎后 4 $^{\circ}\text{C}$ 、12 000 r/min 离心 5 min, 取上清液于新的 EP 管中, 用于补体 C3 和免疫球蛋白 M (immunoglobulin M, IgM) 检测。所有步骤均按照 ELISA 试剂盒 (H186-1-2、H109-1-2, 南京建成生物工程研究所) 中的说明书进行, 并建立标准曲线计算含量, 表示为 $\mu\text{g/mL}$ 。

1.7 TCS 和 TCC 作用靶标分子预测和功能分析

利用 ChemDraw 20.0 软件构建 TCC 和 TCS 的化学结构式, 导入 Pharm Mapper 进行作用靶标分析的预测, 将筛选出的靶标蛋白导入 String

数据库(<https://cn.string-db.org/>)进行蛋白-蛋白互作分析后,将结果再导入 Cytoscape 3.7.2 窗口,基于 CytoHubba 0.1 插件筛选 hub 基因,导入 R4.2.0 进行 hub 基因富集网络的功能分析。

1.8 数据统计分析

通过单因素方差分析和 Dunnett 检验,分析处理组与对照组间各生物学指标的显著差异,以 $P<0.05$ (*), $P<0.01$ (**)或 $P<0.001$ (***)表示显著性水平。数据统计分析和图表绘制使用 GraphPad Prism 7.0、R 4.2.0 作图软件。

2 结果与分析

2.1 TCS 和 TCC 急性暴露导致斑马鱼胚胎发育异常

在斑马鱼胚胎急性暴露过程中,实时观察记录 12、24、72、96、120 hpf 这 5 个发育阶段不同处理组斑马鱼的胚胎/幼鱼形态(图 1A、1B)。TCS 和 TCC 暴露均导致斑马鱼胚胎发育异常,具有明显的致畸作用,主要表现为胚胎发育延迟、眼睛减小、心包囊肿、体轴弯曲、游囊关闭等, TCC 引起幼鱼体长明显变短,其致畸效应明显比 TCS 更严重(图 1C、1D)。与对照组相比, TCS 和 TCC 组斑马鱼胚胎的孵化率和累计存活率均显著降低,对照组 120 hpf 幼鱼存活率 90%以上, TCS 暴露组幼鱼存活率低于 60%, TCC 暴露组幼鱼存活率低于 50%,对照组 72 hpf 胚胎孵化率接近 100%,而 TCS 和 TCC 组孵化率均低于 60%,在 96 hpf 胚胎才趋于完全孵化(图 1E、1F),表明 TCS 和 TCC 暴露推迟了胚胎孵化。

2.2 TCS 和 TCC 暴露对幼鱼免疫细胞分化和成熟的影响

利用转基因斑马鱼 Tg (*coro1a*:EGFP)、Tg (*rag2*:DsRed)分别观察先天免疫细胞和获得性 T 细胞在鱼体内的分布和数量变化。在 72 hpf

的对照组幼鱼中,先天免疫细胞正常分布在鱼的躯干、尾部、中枢神经系统、胸腺和肾脏中。TCS 和 TCC 处理组幼鱼中先天免疫细胞与对照组相比分别呈现上升和下降趋势(图 2A),尤其在幼鱼躯干部造血组织区域变化趋势更明显。图 2B 量化了 Tg (*coro1a*:EGFP)中免疫细胞的数量,结果显示, TCS 诱导固有免疫细胞数量显著上升($P<0.01$),而同等浓度 TCC 诱导免疫细胞数量显著下调($P<0.05$),二者对免疫细胞数量影响呈现显著的差异水平($P<0.001$)。

为进一步验证上述实验结果,利用中性红和苏丹黑 B 分别进行 72 hpf 幼鱼巨噬细胞和中性粒细胞染色并对结果用 image J 进行量化。巨噬细胞染色(图 2C)及量化(图 2D)结果显示, TCS 处理组幼鱼脑部巨噬细胞数量与对照组相比显著增多($P<0.05$),而 TCC 处理组相对于对照组幼鱼脑部巨噬细胞数减少($P<0.05$)。类似地,中性粒细胞染色(图 2E)及量化(图 2F)结果显示, TCS 处理组在幼鱼尾部造血组织区域中性粒细胞显著增多($P<0.05$),而 TCC 处理组与对照组相比在造血组织的中性粒细胞显著减少($P<0.01$)。利用转基因斑马鱼 Tg (*rag2*:DsRed)追踪胸腺 T 细胞的成熟(图 2G)并对结果进行量化(图 2H)。对照组 120 hpf 幼鱼胸腺处分化成熟较多的 T 细胞(红色荧光标识)。相反,在 TCS 和 TCC 处理组中,幼鱼胸腺 T 细胞的数量呈下降趋势($P<0.05$, $P<0.01$),表明二者均抑制了免疫 T 细胞的分化,表明二者在发育早期对继发免疫细胞的变化趋势影响不同或不同的严重程度。

2.3 TCS 和 TCC 诱导斑马鱼免疫相关功能基因和生物标志物的异常变化

基于上述利用免疫细胞的特异性染色和两种免疫细胞标记的转基因斑马鱼,证实了 TCS 和 TCC 对细胞免疫的影响,为了探究二者对体液免疫的影响差异, RT-qPCR 结果显示,与对照

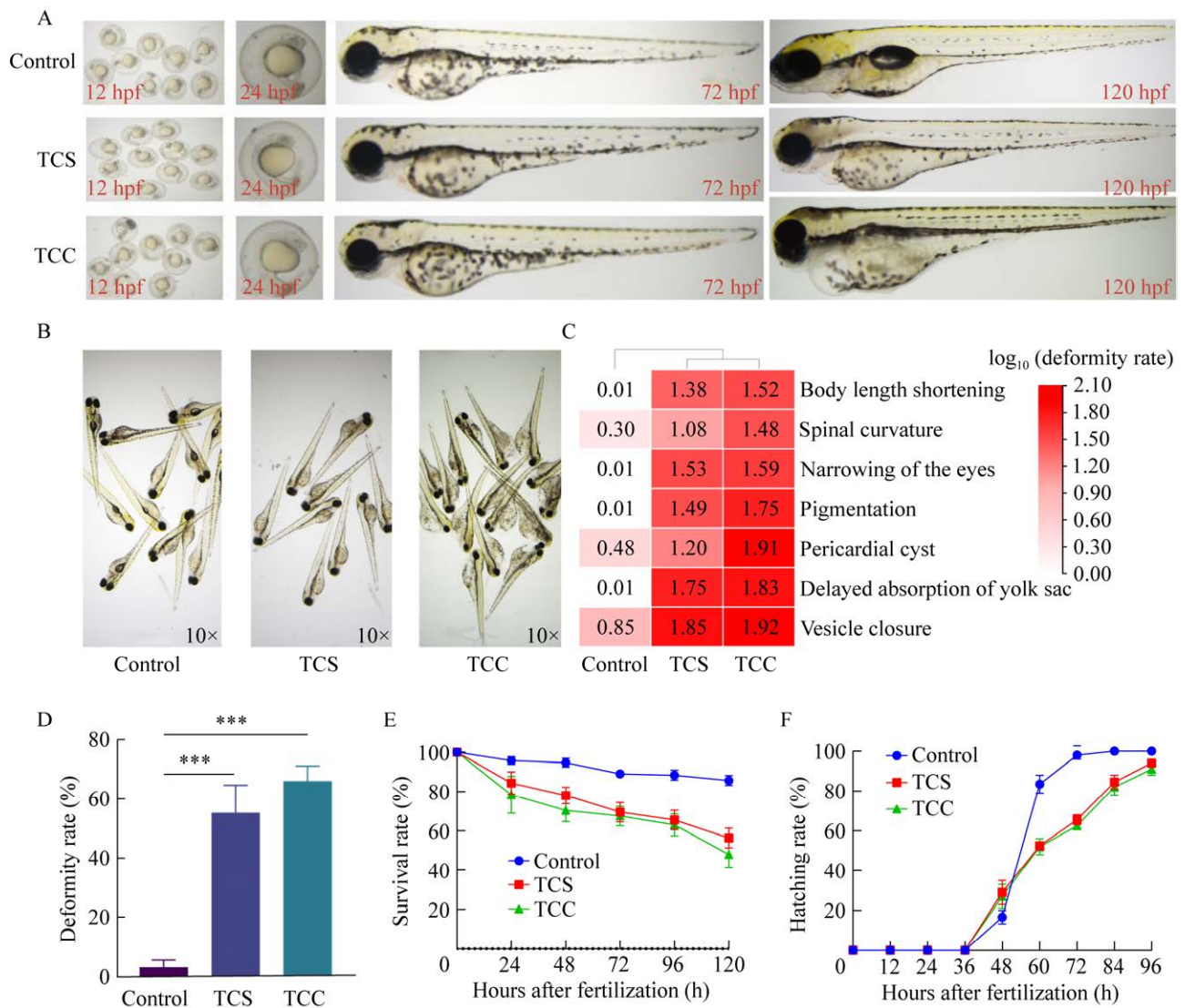


图1 TCS和TCC暴露诱导斑马鱼发育毒性 A-B:暴露12-120 hpf斑马鱼发育情况. C-D:120 hpf幼鱼畸形情况和畸形率量化结果. E:120 hpf幼鱼存活率. F:72 hpf幼鱼孵化率.***: $P < 0.001$

Figure 1 Developmental toxicity of zebrafish induced by TCS and TCC. A-B: Development of zebrafish exposed to 12-120 hpf. C-D: Deformity of larvae at 120 hpf deformity rate and quantitative results. E: The survival rate of larvae at 120 hpf. F: The hatching rate of larvae at 72 hpf.***: $P < 0.001$; one-way analysis of variance (ANOVA).

组相比, TCS 暴露诱导促炎因子基因 *il-1 β* ($P < 0.001$)、*il-10* ($P < 0.01$)、*il-6* ($P < 0.05$)和 *tnf- α* ($P < 0.001$)转录水平均显著升高(图 3A-3D), TCC 暴露诱导炎症因子基因 *il-1 β* ($P < 0.001$)、*il-6* ($P < 0.05$)、*tnf- α* ($P < 0.001$)的转录水平上调, 但

显著抑制了 *il-10* 基因表达($P < 0.01$, 图 3B)。ELISA 酶联免疫实验检测补体 C3 和 IgM 浓度, 与对照组相比, TCS 处理组 120 hpf 幼鱼的补体 C3 含量显著减少($P < 0.05$) (图 3E), 而增加了 IgM 含量($P < 0.01$) (图 3F)。TCC 处理组对补体

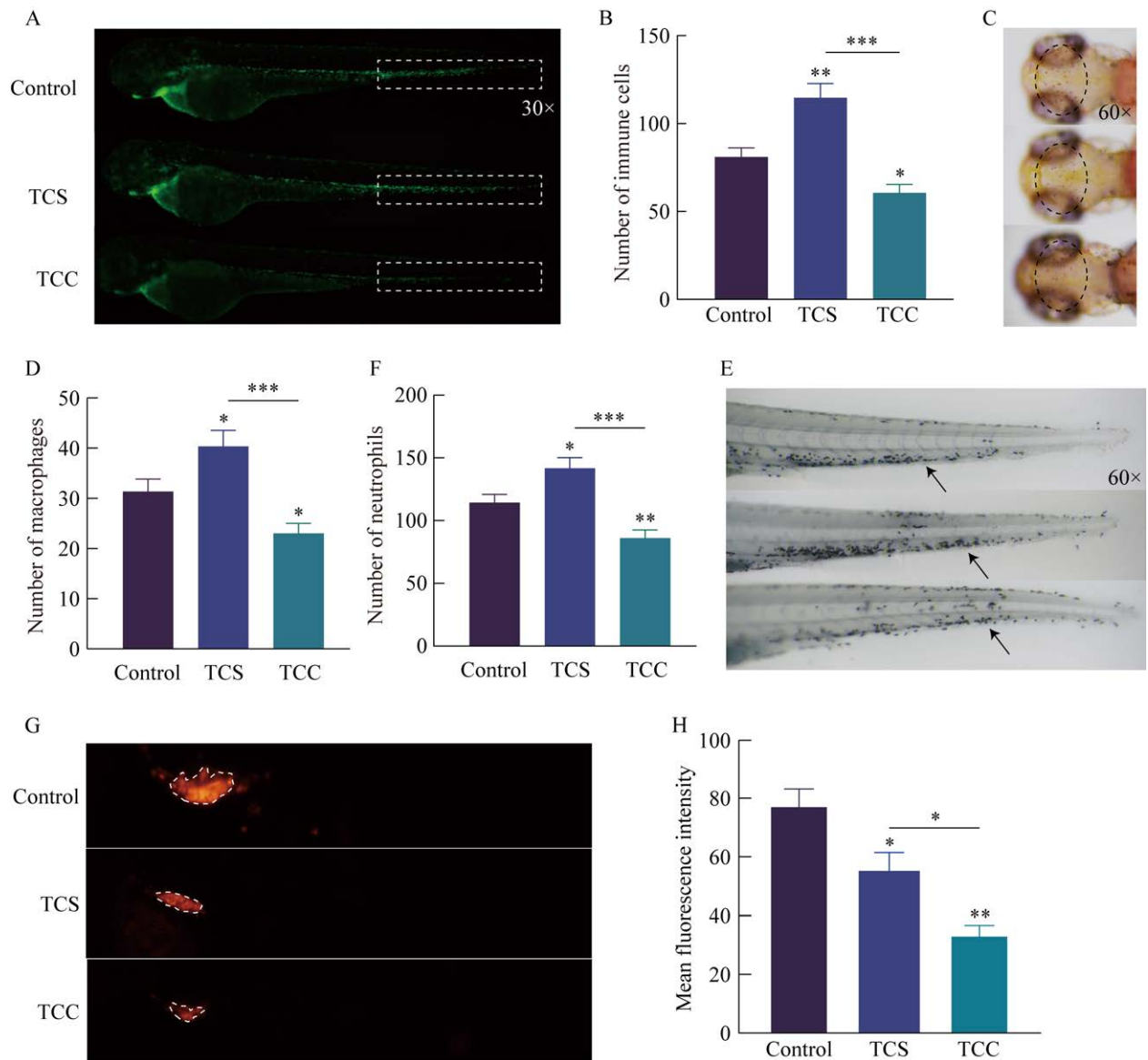


图 2 TCS 和 TCC 对斑马鱼免疫细胞数量的影响 A: 暴露 5 dpf 的 Tg (*coro1a*:EGFP) 的巨噬细胞和中性粒细胞. 绿色荧光点表示阳性巨噬细胞和中性粒细胞. B: 免疫细胞数量量化. C: 5 dpf 斑马鱼头部巨噬细胞. D: 巨噬细胞数量量化. E: 5 dpf 斑马鱼中性粒细胞分布. F: 中性粒细胞数量量化. G: 暴露 5 dpf 的 Tg (*rag2*:DsRed) 的 T 细胞. H: Tg (*rag2*:DsRed) 平均荧光强度量化. *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 2 The impact of TCS and TCC on the number of immune cells in zebrafish. A: Macrophages and neutrophils of Tg (*coro1a*:EGFP) exposed at 5 dpf, with green fluorescent dots indicating positive macrophages and neutrophils. B: Quantification of immune cell numbers. C: Macrophages in the head of 5 dpf zebrafish. D: Quantification of macrophage numbers. E: Distribution of neutrophils in 5 dpf zebrafish. F: Quantification of neutrophil numbers. G: T cells of Tg (*rag2*:DsRed) exposed at 5 dpf. H: Quantification of average fluorescence intensity of Tg (*rag2*:DsRed). *: $P < 0.05$; **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; One-way analysis of variance (ANOVA).

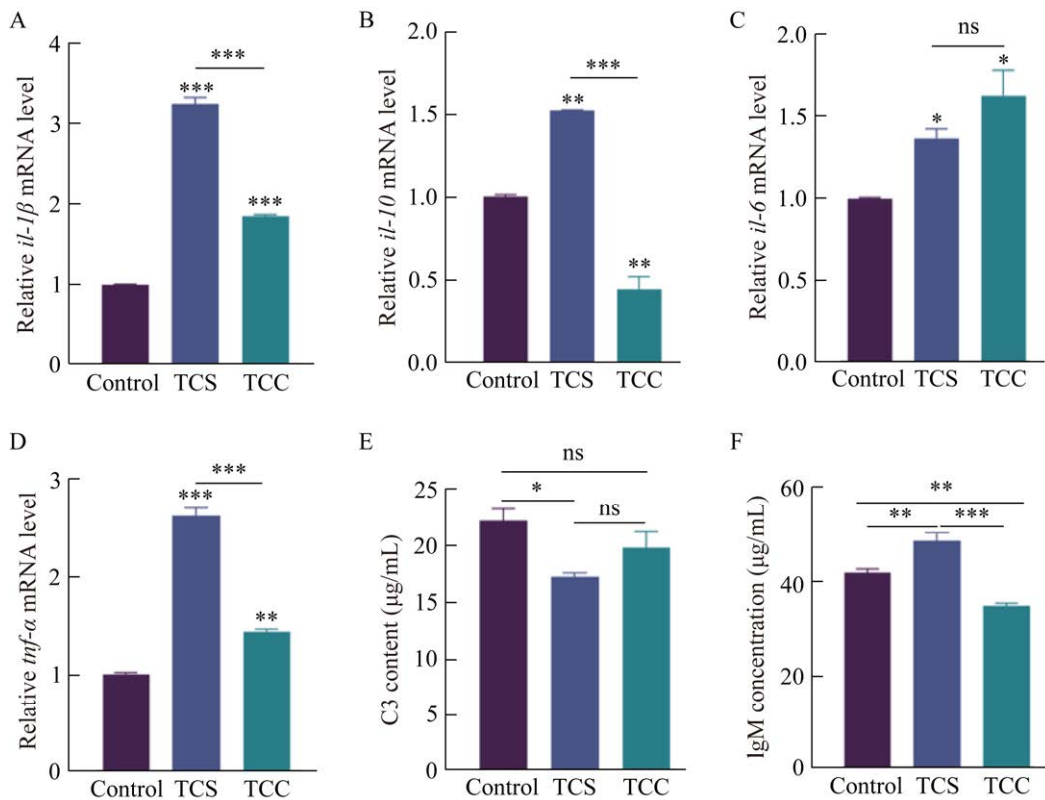


图3 TCS和TCC诱导斑马鱼免疫指标异常 A-F: *il-1β* (A)、*il-10* (B)、*il-6* (C)、*tnf-α* (D)、补体C3 (E)、IgM (F)表达水平. ns: 无显著差异; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.01$; ***: $P < 0.001$

Figure 3 TCS and TCC induce abnormal immune parameters in zebrafish. A-F: Expression level of *il-1β* (A), *il-10* (B), *il-6* (C), *tnf-α* (D), complement C3 (E) and IgM (F). ns: No significant difference; *: $P < 0.05$; **: $P < 0.05$; ***: $P < 0.001$; One-way analysis of variance (ANOVA).

C3的抑制作用无显著差异($P > 0.05$),但对IgM的产生有极显著抑制效果($P < 0.001$).由此可知,TCS和TCC暴露幼鱼*il-1β*、*il-6*和*tnf-α*因子基因变化趋势一致,其他免疫因子*il-10*、C3和IgM表达变化则相反,预示二者在体液免疫毒性上可能存在不同的作用模式。

为进一步研究TCS和TCC诱导免疫毒性的差异,对TCS和TCC暴露的发育毒性效应与免疫细胞分化、炎症因子表达变化和炎症标志物变化之间进行了Pearson相关性分析。结果显示,TCS引起的发育毒性效应与固有免疫细胞分化呈高度正相关(图4左),而TCC诱发的发育毒性与固有免疫细胞分化呈负相关(图4右),但与

促炎因子表达量均呈正相关。表明TCS和TCC尽管对免疫细胞有不同的作用和变化,但最终均可使促炎因子上调,从而导致炎症反应。

2.4 TCS和TCC作用靶基因GO功能分类和富集的KEGG信号通路分析

基因本体论(gene ontology, GO)功能分类是在某一功能层次上统计基因或蛋白的数目和组成,可分为分子功能、生物过程和细胞组成3个部分。京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)代谢通路富集分析可以挖掘靶基因可能参与的生物信号通路,可以阐明污染物具体通过哪些生物信号通路诱发相应毒性和导致的表观现象。TCS

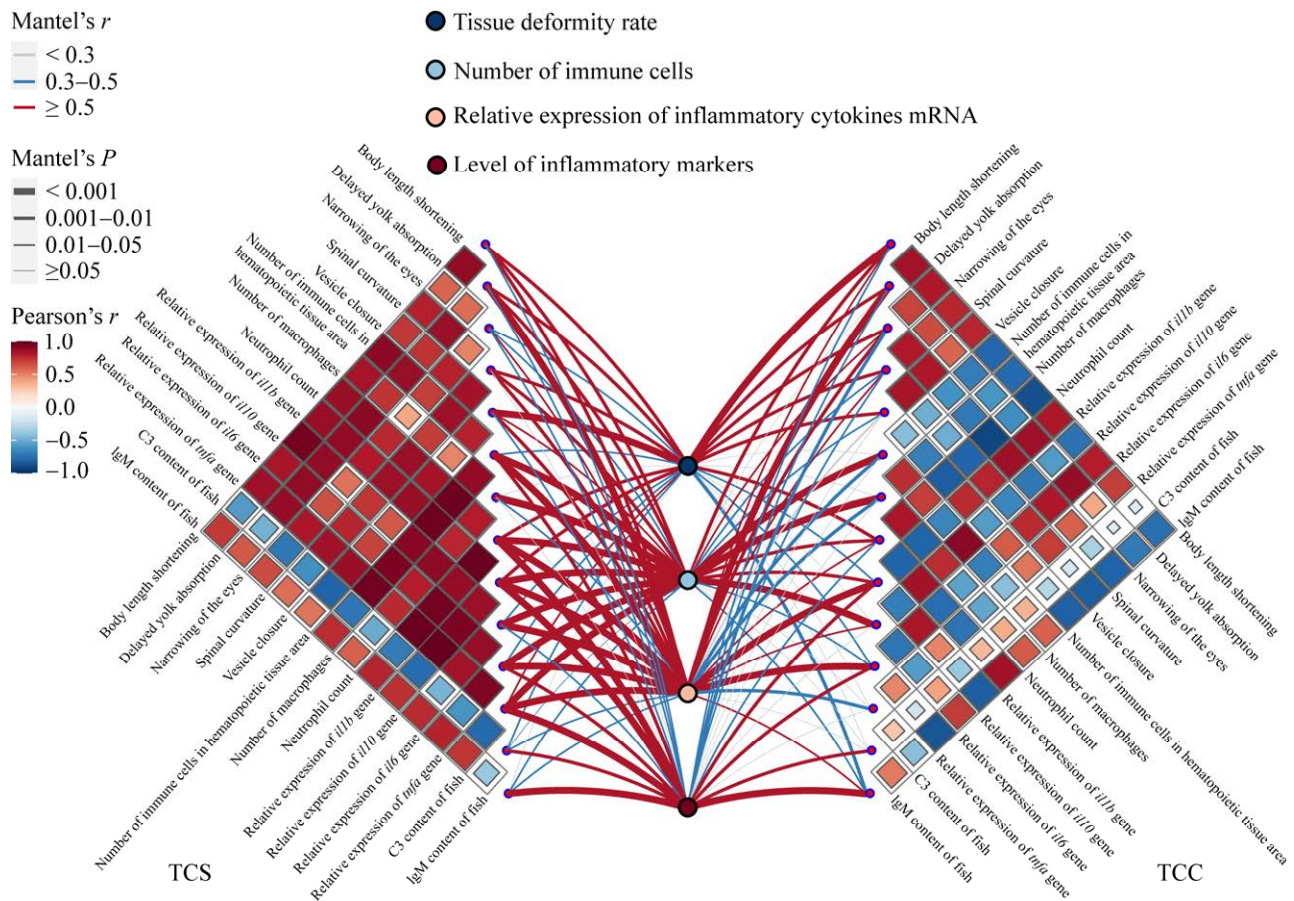


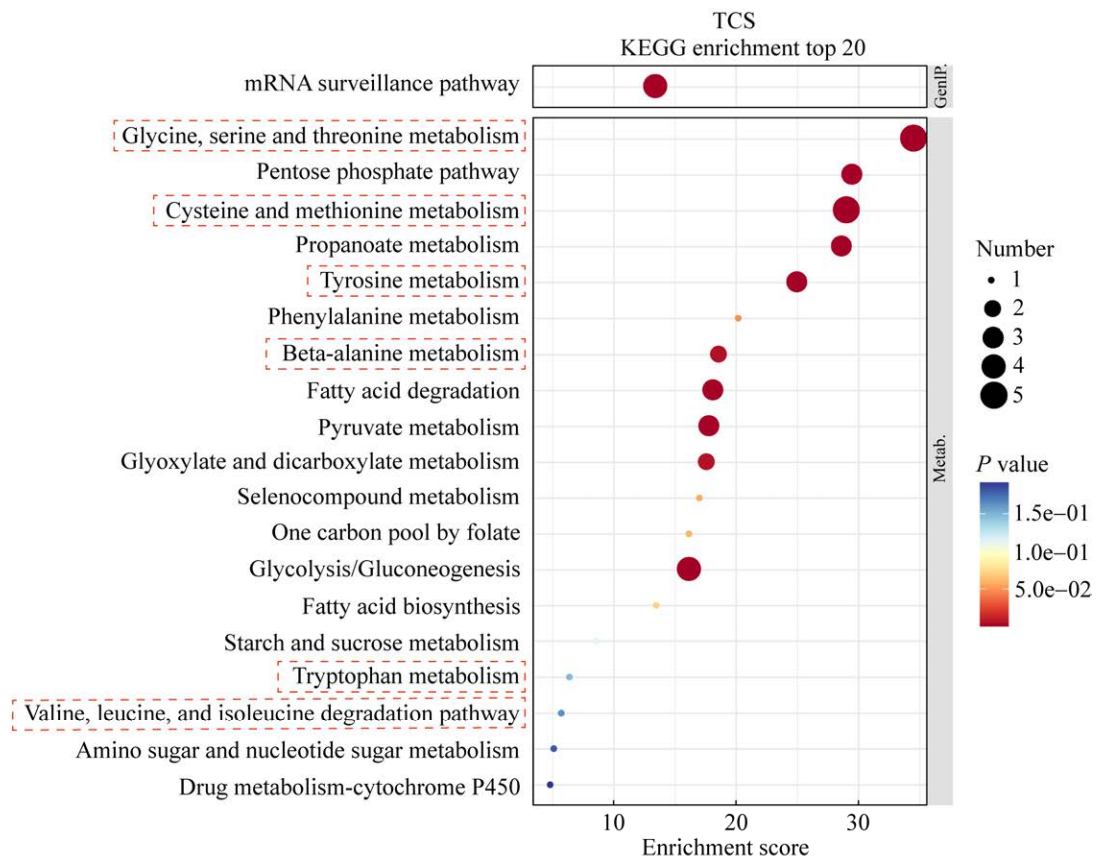
图4 TCS和TCC暴露下异常生理生化指标的相关性分析 左侧的数值为相关系数大小和相关性强弱分级, 左下部分为 P 值

Figure 4 Correlation analysis of abnormal physiological and biochemical indexes after TCS and TCC exposure. The values on the left side of the figure represent the correlation coefficient and the classification of correlation strength, while the values in the lower left part indicate the P value.

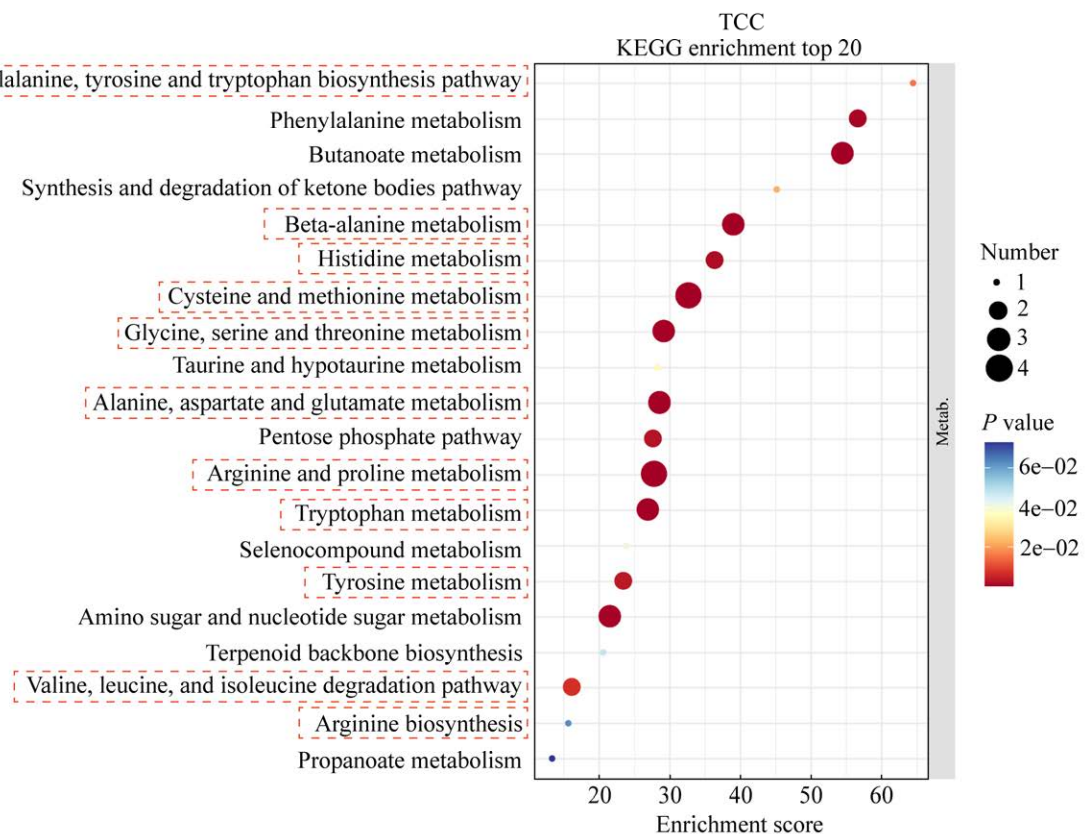
和TCC作用靶标基因富集的KEGG代谢通路分析($P < 0.05$)显示,二者作用靶基因大量富集在“甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢”“半胱氨酸和蛋氨酸代谢”“酪氨酸代谢”“B-丙氨酸代谢”“色氨酸代谢”等氨基酸及其衍生物的代谢通路,但涉及的具体氨基酸种类不同(图5A、5B红框标识)。此外,TCS可能还影响“糖酵解/葡萄糖异生”“脂肪酸降解”“脂肪酸生物合成”“戊糖磷酸通路”等的糖脂代谢过程。TCS和TCC作用靶标基因的GO功能分析($P < 0.05$)显示,TCS作用靶基因较多富集在“含碱基的小分子代谢过程”和“嘌

呤代谢过程”等通路,而TCC作用靶基因多涉及“细胞氨基酸生物合成过程”和“细胞氨基酸代谢过程”。上述结果表明二者作用靶基因在功能分类和富集的作用信号通路不同(图5A、5B)。Hub基因是指在网络中具有广泛连接和调控其他基因的中心节点,使用hub基因计算方法可以帮助了解基因调控网络中的重要调控机制和关键基因,及其在生物学过程中发挥的重要作用、介导蛋白质之间的互动。在通路中为主导地位调控的基因,也称之为枢纽基因,是污染物重要的作用靶点和研究热点。为了比较二者作用

A



B



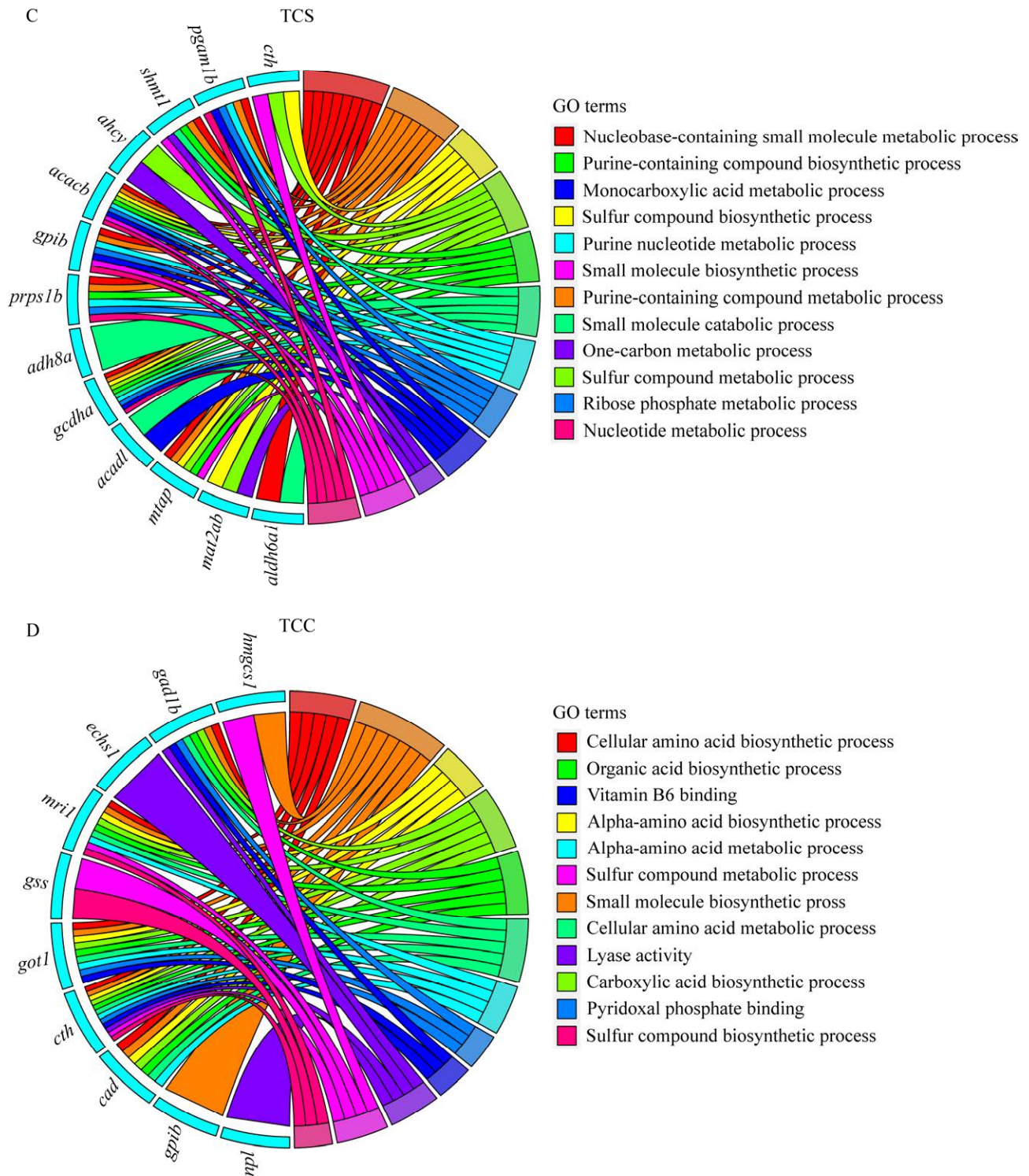


图5 TCS和TCC作用靶基因的功能分析 TCS (A)和TCC (B)富集排名前20的KEGG通路以及TCS (C)和TCC (D)靶基因GO分析

Figure 5 Functional analysis of TCS and TCC target genes. Top 20 enriched KEGG pathways based on TCS (A) and TCC (B) enrichment and GO analysis of target genes for TCS (C) and TCC (D).

靶基因中 hub 基因的异同, 利用 Cytoscape 和 Cytohubba 插件在线 (https://cn.string-db.org/cgi/input?sessionId=btnIJ1IPN1ts&input_page_active_form=multiple_identifiers) 筛选二者各自作用靶基因中的 hub 基因, 结果表明从 TCS 作用靶基因中筛选出 *cth*、*pgam1b*、*shmt1*、*ahcy*、*acacb*、*gpib*、*prps1b*、*adh8a*、*gcdha*、*acadl*、*mtap*、*mat2ab*、*aldh6a1* 共 13 条 hub 基因, 从 TCC 作用靶基因中筛选出 *hmgcs1*、*gad1b*、*echs1*、*mri1*、*gss*、*got1*、*cth*、*cad*、*gpib*、*npl* 共 10 条 hub 基因(图 5C、5D)。除了 *cth* 和 *gpib* 基因二者相同外, 其他 hub 基因均不同, 此结果也表明二者的调控网络枢纽基因不同, 调控的信号通路和介导的蛋白互作网络也存在差异。

3 讨论

TCS 和 TCC 为环境持久性内分泌干扰物, 由于其脂溶性高, 在环境生物体内具有生物蓄积和生物放大作用, 在特殊的环境条件下可以转化为二噁英类致畸致癌产物, 具有代谢增毒效应, 对环境生物代谢、免疫和内分泌系统产生重大影响^[32]。本研究利用斑马鱼模型生物, 研究和比较了 TCC 和 TCS 对斑马鱼幼鱼体发育和免疫功能的毒性作用。首先, 观察统计了亚致死剂量的 TCS 和 TCC 暴露对斑马鱼的发育毒性。在此基础上进一步研究发现 TCS 和 TCC 对斑马鱼固有免疫系统的毒性效应存在一定差异或者表现出不同的严重程度, 但二者均能通过作用于免疫系统介导炎症发生, 相关性分析结果显示炎症反应和免疫缺陷可能是导致斑马鱼发育异常的关键因素之一。最后通过对 TCS 和 TCC 作用靶标预测、筛选所得的枢纽靶基因进行功能分析和富集通路研究, 揭示了 TCS 和 TCC 潜在的致毒机制存在差异, 但具体作用的信号通路有待于进一步阐明。

胚胎是各器官发育的起源, 机体的后天生长和存活状态与胚胎早期发育密切相关, 生命早期致畸效应的研究可用以评估污染物对生物个体发育的影响^[33]。0.6 $\mu\text{mol/L}$ 的 TCS 或 TCC 急性暴露至 120 hpf 时, 可观察到明显的畸形现象, 但二者对胚胎发育不利影响的严重程度不同, 其表观效应与致毒机制间的关系也有待于深入探讨。

斑马鱼属于硬骨鱼, 其个体发育主要依赖于先天性免疫, 而获得性免疫系统发育较差^[34]。早期先天性免疫系统的发育对于抵御病原微生物感染环境污染胁迫至关重要。已被证实通过刺激先天免疫系统导致病理后果^[35-36]。本研究通过免疫细胞的特异性染色探究 TCS 和 TCC 对斑马鱼免疫细胞分化和形成的影响, 发现其先天免疫系统在防御相同浓度的 TCS 和 TCC 胁迫时表现出不同的免疫反应。TCS 在一定程度上激活了先天免疫系统, 致使先天免疫细胞数量增多以响应炎症反应, 而 TCC 抑制了斑马鱼先天免疫细胞的分化、产生和发育, 使先天免疫细胞数量减少, 难以抵抗病原微生物感染和环境胁迫。有研究指出, 低浓度 TCS 暴露导致炎症反应, 而高浓度 TCS 暴露会损害胸腺的适应性免疫功能^[37]。因而在探究 TCS/TCC 暴露对斑马鱼个体发育和免疫功能影响时, 有待于进一步设置浓度梯度暴露和环境相关浓度进行致毒效应研究和致毒机制研究。

RT-qPCR 和 ELISA 检测发现 TCS、TCC 暴露改变了斑马鱼炎症相关标记基因的 mRNA 表达水平并导致补体 C3 和 IgM 两种免疫功能指标异常。*il-1 β* 、*il-6* 和 *tnf- α* 基因分别编码促炎性细胞因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 和肿瘤坏死因子(tumour necrosis factor, TNF- α), 三者均为炎症反应中的重要细胞因子, 可以促进

炎症反应过程中的细胞增殖、细胞介导免疫反应以及促进组织修复和再生^[38-41]。高水平 IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 可以导致炎症反应过度, 从而造成机体损伤^[41]。IL-10 是公认的炎症与免疫抑制因子, IL-10 转录激活标志着机体免疫激活, 而 IL-10 的缺失会导致过度持续的免疫激活, 对免疫系统造成损伤^[42]。TCS、TCC 的暴露均会引起斑马鱼的炎症反应, 先天免疫系统在二者的刺激下对炎症反应的响应能力存在差异。此外依据 IL-10 的转录水平可以推测, TCS 刺激了斑马鱼的先天免疫系统, 抗炎因子释放以响应炎症反应, 而 TCC 暴露后造成 IL-10 缺失, 持续的免疫激活造成了严重的多器官损伤或“免疫风暴”。进一步探究 C3 和 IgM 发现, 二者均引起斑马鱼免疫紊乱, 但 TCC 急性暴露引起斑马鱼免疫细胞凋亡、缺失, 导致炎症反应过度持续, 对鱼体造成的损伤更为严重。此外, 研究发现 TCS 和 TCC 暴露造成的免疫系统异常均与斑马鱼的发育畸形高度相关, 表明二者可能通过攻击免疫系统介导斑马鱼个体发育。

为了进一步探究 TCS 和 TCC 诱导免疫毒性的机制差异, 本研究对 TCS 和 TCC 进行预测与分析, 探究其诱导免疫毒性的潜在机制。对 hub 基因筛选及调控功能网络富集分析发现, TCS 和 TCC 作用的靶基因与糖、脂、氨基酸及其他小分子物质的合成代谢存在关联。多组学研究结果表明, 由 TCS 和 TCC 诱导的小鼠肝、肠炎症状态与生物基质中代谢谱的变化相关^[43]。免疫系统中的活动需要大量能量和合成物质支持, 磷酸戊糖途径是细胞内葡萄糖代谢的一个重要途径, 提供包括免疫细胞在内的多种细胞活动所需的能量和原料^[44-45]。脂肪酸作为重要的能量来源和信号分子, 在免疫细胞的发育、功能和免疫应答中扮演着重要的角色, 而丙酮酸作为脂肪酸代谢的重要产物之一具有

产生酮体作为替代能源供给的功能, 乙醛酸则是乙醇代谢的中间产物, 主要涉及酒精摄入后的代谢过程^[46-48]。此外, 近期还有研究发现乙醛酸与丙酮酸组合后会产生新的一种 α -酮酸循环, 为氨基酸的合成提供一条平行于现有代谢机制的天然途径^[48]。适当的氨基酸供应支持免疫细胞的增殖、分化和功能, 有助于维持免疫系统的正常功能^[44]。富集结果表明, TCS 和 TCC 均影响一些氨基酸的合成代谢过程, 但二者涉及的具体氨基酸途径不同。氨基酸代谢的破坏可致免疫反应异常, 免疫细胞增殖和分化障碍, 炎性反应、细胞因子的异常产生和免疫记忆受损, 对多个生理功能产生广泛而复杂的影响^[44,49-50]。来自啮齿动物模型的证据表明, 虽然 TCS 和 TCC 具有相似的分子结构特征, 但它们对不同器官的毒性作用却存在较大差异, 原因可能是其在体内的吸收、新陈代谢和分布不同^[51]。本研究分析结果显示 TCS 可能对多种物质的合成代谢过程产生广泛影响, 而相比之下, TCC 更侧重于影响各种氨基酸的合成代谢过程, 相同的是二者均可能通过引起代谢紊乱这一分子起始事件来介导炎症反应, 并最终导致个体的损伤或死亡。

4 结论

急性暴露于 0.6 $\mu\text{mol/L}$ TCS 和 TCC 中均会导致斑马鱼胚胎发育延迟、孵化率下降以及幼鱼不同程度的畸形, 且相同剂量下 TCC 的毒性作用更强。TCS 和 TCC 暴露影响了斑马鱼免疫系统的正常生理功能, TCS 会刺激斑马鱼的先天免疫系统, 导致免疫细胞的活化和促炎细胞因子的释放, 同时促进免疫调节细胞因子 IL-10 的产生以平衡炎症, 进而抵抗 TCS 对机体的侵害。而 TCC 会抑制斑马鱼生命早期先天免疫系统的发育, 造成其体内的免疫细胞数量不足的同时

还影响机体急性期反应物的合成,免疫反应过度持续进而引起免疫紊乱,导致自卫失败甚至死亡。深入分析发现 TCS 和 TCC 可能通过代谢紊乱进而影响免疫细胞的正常活动。总之,这项研究初步探索了 TCC 和 TCS 两种内分泌干扰物分别对斑马鱼的免疫毒性效应及潜在的分子机制,有望为进一步的环境风险评估提供理论参考。

REFERENCES

- [1] XU LY, HU Y, ZHU QQ, LIAO CY, JIANG GB. Several typical endocrine-disrupting chemicals in human urine from general population in China: regional and demographic-related differences in exposure risk[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2022, 424(Pt B): 127489.
- [2] LU S, WANG BD, XIN M, WANG J, GU X, LIAN MS, LI Y, LIN CY, OUYANG W, LIU XT, HE MC. Insights into the spatiotemporal occurrence and mixture risk assessment of household and personal care products in the waters from rivers to Laizhou Bay, southern Bohai Sea[J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 810: 152290.
- [3] NARAGINTI S, SATHISHKUMAR K, LAVANYA K, ZHANG FC, LIU XH. Sunlight-driven intimately coupled photocatalysis and biodegradation (SDICPB): a sustainable approach for enhanced detoxification of triclosan[J]. *Chemosphere*, 2023, 336: 139210.
- [4] 赵晨曦, 王杨, 钱秋慧, 闫瑾, 肖傲, 王学东, 王慧利. 三氯卡班环境暴露对斑马鱼神经行为的影响[J]. *中国环境科学*, 2022, 42(1): 456-464. ZHAO CX, WANG Y, QIAN QH, YAN J, XIAO A, WANG XD, WANG HL. Effects of environmental exposure to triclocarban on the neurobehavior of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *China Environmental Science*, 2022, 42(1): 456-464 (in Chinese).
- [5] 王亚利. 三氯卡班在污水-污泥系统转化及其对污水-污泥系统的影响[D]. 长沙: 湖南大学博士学位论文, 2019. WANG YL. The fate of triclocarban in biological wastewater treatment system-anaerobic sludge system and its effect on wastewater treatment system-anaerobic sludge system[D]. Changsha: Doctoral Dissertation of Hunan University, 2019 (in Chinese).
- [6] 杨雅淇, 童一帆, 田胜艳. 三氯生在水生生态系统中的污染现状及其生物毒性效应[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(6): 47-56. YANG YQ, TONG YF, TIAN SY. Pollution status and toxic effect of triclosan in aquatic ecosystem[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(6): 47-56 (in Chinese).
- [7] ZHOU ZY, WU H, FU BM, WANG Z, HONG R, HUANG LQ, GU XY, GU C, JIN X. Dissolved black carbon incorporating with ferric minerals promoted photo-Fenton-like degradation of triclosan in acidic conditions[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 459: 132253.
- [8] JEDYNAK P, BROSEUS L, TOST J, BUSATO F, GABET S, THOMSEN C, SAKHI AK, PIN I, SLAMA R, LEPEULE J, PHILIPPAT C. Prenatal exposure to triclosan assessed in multiple urine samples and placental DNA methylation[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 335: 122197.
- [9] JIANG JS, HOU R, CUI HL, LIU D, YAN GX, FAN YJ, CHENG K, CAO ZG. Occurrences of typical PPCPs during wastewater treatment and the composting of sewage sludge with micron-sized and nano-sized Fe₃O₄[J]. *Environmental Pollution*, 2023, 336: 122386.
- [10] YUN H, LIANG B, KONG DY, LI XK, WANG AJ. Fate, risk and removal of triclocarban: a critical review[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 387: 121944.
- [11] TAWEETANAWANIT P, THERDKIATTIKUL N, SONSUPHAB K, SUCHARITPWATSKUL S, SURIYAWANAKUL J, RADPUKDEE T, RATPUKDI T, SIRIPATTANAKUL-RATPUKDI S. Triclocarban-contaminated wastewater treatment by innovative hybrid moving entrapped bead activated sludge reactor (HyMER): continuous performance and computational dynamic simulation analysis[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 879: 163037.
- [12] 周艳君, 施阳, 吴源. 三氯生和三氯卡班的毒性研究进展[J]. *安徽医科大学学报*, 2017, 52(1): 147-151. ZHOU YJ, SHI Y, WU Y. Progress in toxicity studies of triclosan and triclocarban[J]. *Acta Universitatis Medicinalis Anhui*, 2017, 52(1): 147-151 (in Chinese).
- [13] 孙静. 环境介质中三氯生和三氯卡班的分析研究[D]. 济南: 山东轻工业学院硕士学位论文, 2011. SUN J. The Determination of Triclosan and Triclocarban in Environmental Samples[D]. Jinan: Master's Thesis of Shandong Polytechnic University, 2011 (in Chinese).
- [14] 李林朋. 三氯生和三氯卡班的生态与健康毒性初步研究[D]. 北京: 中国科学院研究生院硕士学位论文, 2011. LI LP. Preliminary studies on the ecological and health

- toxicity of triclosan and triclocarban[D]. Beijing: Master's Thesis of Chinese Academy of Sciences, 2011 (in Chinese).
- [15] SALES JUNIOR SF, VALLERIE Q, de FARIAS ARAUJO G, SOARES LOS, OLIVEIRA Da SILVA E, CORREIA FV, SAGGIORO EM. Triclocarban affects earthworms during long-term exposure: behavior, cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity assessments[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 267: 115570.
- [16] DAR OI, SHARMA S, SINGH K, SHARMA A, BHARDWAJ R, KAUR A. Biochemical markers for prolongation of the acute stress of triclosan in the early life stages of four food fishes[J]. *Chemosphere*, 2020, 247: 125914.
- [17] LIU Y, MEKIC M, CARENA L, VIONE D, GLIGOROVSKI S, ZHANG G, JIN B. Tracking photodegradation products and bond-cleavage reaction pathways of triclosan using ultra-high resolution mass spectrometry and stable carbon isotope analysis[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 264: 114673.
- [18] 盛诚, 王馨颖, 易珍, 张宴, 任洪强. 不同材质微塑料对三氯生的吸附及其在斑马鱼体内累积分布的影响[J]. *生态毒理学报*, 2020, 15(5): 108-117. SHENG C, WANG XY, YI Z, ZHANG Y, REN HQ. The adsorption of triclosan by microplastics of different polymers and its effect on triclosan accumulation in zebrafish[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2020, 15(5): 108-117 (in Chinese).
- [19] ZHONG R, HE H, JIN M, LU ZQ, DENG Y, LIU C, SHEN N, LI JY, WANG HX, YING PT, LI B, ZENG Q, LU Q, CHENG LM, ZHU Y, MIAO XP, TIAN JB. Genome-wide gene-bisphenol A, F and triclosan interaction analyses on urinary oxidative stress markers[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 807(Pt 1): 150753.
- [20] SANIDAD KZ, WANG GQ, PANIGRAHY A, ZHANG GD. Triclosan and triclocarban as potential risk factors of colitis and colon cancer: roles of gut microbiota involved[J]. *The Science of the Total Environment*, 2022, 842: 156776.
- [21] ZHANG D, LU SY. A holistic review on triclosan and triclocarban exposure: epidemiological outcomes, antibiotic resistance, and health risk assessment[J]. *The Science of the Total Environment*, 2023, 872: 162114.
- [22] WANG WW, LI X, QIAN QH, YAN J, HUANG HS, WANG XD, WANG HL. Mechanistic exploration on neurodevelopmental toxicity induced by upregulation of *alkbh5* targeted by triclosan exposure to larval zebrafish[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 457: 131831.
- [23] 王杨, 吴国辉, 钱秋慧, 赵晨曦, 闫瑾, 王学东, 王慧利. 三氯生对斑马鱼发育和脂质代谢的影响[J]. *中国环境科学*, 2022, 42(3): 1394-1400. WANG Y, WU GH, QIAN QH, ZHAO CX, YAN J, WANG XD, WANG HL. Effects of triclosan environmental exposure on zebrafish development and lipid metabolism[J]. *China Environmental Science*, 2022, 42(3): 1394-1400 (in Chinese).
- [24] DIAO WQ, YAN J, WANG XD, QIAN QH, WANG HL. Mechanisms regarding cardiac toxicity triggered by up-regulation of *miR-144* in larval zebrafish upon exposure to triclosan[J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2023, 443(Pt B): 130297.
- [25] DING ZM, AHMAD MJ, MENG F, CHEN F, WANG YS, ZHAO XZ, ZHANG SX, MIAO YL, XIONG JJ, HUO LJ. Triclocarban exposure affects mouse oocyte *in vitro* maturation through inducing mitochondrial dysfunction and oxidative stress[J]. *Environmental Pollution*, 2020, 262: 114271.
- [26] 杨峰, 王京真, 刘文华. 三氯卡班可以影响肾小管上皮细胞的屏障功能[J]. *生态毒理学报*, 2017, 12(2): 177-181. YANG F, WANG JZ, LIU WH. Triclocarban alters barrier function in NRK-52E cells[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2017, 12(2): 177-181 (in Chinese).
- [27] XU JQ, QIAN QH, XIA M, WANG XD, WANG HL. Trichlorocarban induces developmental and immune toxicity to zebrafish (*Danio rerio*) by targeting TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway[J]. *Environmental Pollution*, 2021, 273: 116479.
- [28] KAJTA M, RZEMIENIEC J, WNUK A, LASOŃ W. Triclocarban impairs autophagy in neuronal cells and disrupts estrogen receptor signaling *via* hypermethylation of specific genes[J]. *The Science of the Total Environment*, 2020, 701: 134818.
- [29] CHEN JG, AHN KC, GEE NA, AHMED MI, DULEBA AJ, ZHAO L, GEE SJ, HAMMOCK BD, LASLEY BL. Triclocarban enhances testosterone action: a new type of endocrine disruptor?[J]. *Endocrinology*, 2008, 149(3): 1173-1179.
- [30] 李林朋, 马慧敏, 胡俊杰, 黎玉华, 王艺陪, 盛国英, 傅家谟. 三氯生和三氯卡班对人体肝细胞 DNA 损伤的研究[J]. *生态环境学报*, 2010, 19(12): 2897-2901. LI LP, MA HM, HU JJ, LI YH, WANG YP, SHENG GY, FU JM. Studies on DNA damage of human

- hepatocytes by triclosan and triclocarban[J]. Ecology and Environmental Sciences, 2010, 19(12): 2897-2901 (in Chinese).
- [31] 李倩倩, 李光德, 闫晓彤, 刘斌, 李紫薇. 三氯卡班对蚯蚓的氧化胁迫及 DNA 损伤[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 263-270.
LI QQ, LI GD, YAN XT, LIU B, LI ZW. Oxidative stress and DNA damage in earthworms by triclocarban[J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 263-270 (in Chinese).
- [32] JIN YX, CHEN RJ, LIU WP, FU ZW. Effect of endocrine disrupting chemicals on the transcription of genes related to the innate immune system in the early developmental stage of zebrafish (*Danio rerio*)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2010, 28(5/6): 854-861.
- [33] 王菲儿. 典型重金属和阻燃剂类环境污染物对斑马鱼胚胎的发育毒性研究[D]. 武汉: 华中农业大学硕士学位论文, 2018.
WANG FE. Developmental Toxicity of Typical Heavy Metals and Flame Retardant Environmental Contaminants to Zebrafish Embryos[D]. Wuhan: Master's Thesis of Huazhong Agricultural University, 2018 (in Chinese).
- [34] LIESCHKE GJ, TREDE NS. Fish immunology[J]. Current Biology: CB, 2009, 19(16): R678-R682.
- [35] MAGNADÓTTIR B. Innate immunity of fish (overview)[J]. Fish & Shellfish Immunology, 2006, 20(2): 137-151.
- [36] GUTTENBERG MA, VOSE AT, TIGHE RM. Role of innate immune system in environmental lung diseases[J]. Current Allergy and Asthma Reports, 2021, 21(5): 34.
- [37] ZHAO CX, XIE RH, QIAN QH, YAN J, WANG HL, WANG XD. Triclosan induced zebrafish immunotoxicity by targeting *miR-19a* and its gene *socs3b* to activate IL-6/STAT3 signaling pathway[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 815: 152916.
- [38] WEBER A, WASILIEW P, KRACHT M. Interleukin-1 (IL-1) pathway[J]. Science Signaling, 2010, 3(105): cm1.
- [39] ROSE-JOHN S, JENKINS BJ, GARBERS C, MOLL JM, SCHELLER J. Targeting IL-6 trans-signalling: past, present and future prospects[J]. Nature Reviews Immunology, 2023, 23(10): 666-681.
- [40] LOPETUSO LR, CUOMO C, MIGNINI I, GASBARRINI A, PAPA A. Focus on anti-tumour necrosis factor (TNF)- α -related autoimmune diseases[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2023, 24(9): 8187.
- [41] CAVALCANTI MRM, PASSOS FRS, MONTEIRO BS, GANDHI SR, HEIMFARTH L, LIMA BS, NASCIMENTO YM, DUARTE MC, ARAUJO AAS, MENEZES IRA, COUTINHO HDM, ZENGIN G, CEYLAN R, AKTUMSEK A, QUINTANS-JÚNIOR LJ, QUINTANS JSS. HPLC-DAD-UV analysis, anti-inflammatory and anti-neuropathic effects of methanolic extract of *Sideritis bilgeriana* (Lamiaceae) by NF- κ B, TNF- α , IL-1 β and IL-6 involvement[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 265: 113338.
- [42] OUYANG WJ, O'GARRA A. IL-10 family cytokines IL-10 and IL-22: from basic science to clinical translation[J]. Immunity, 2019, 50(4): 871-891.
- [43] SONG YC, ZHANG C, LEI HH, QIN MY, CHEN G, WU F, CHEN C, CAO Z, ZHANG C, WU MJ, CHEN XY, ZHANG LM. Characterization of triclosan-induced hepatotoxicity and triclocarban-triggered enterotoxicity in mice by multiple omics screening[J]. The Science of the Total Environment, 2022, 838(Pt 4): 156570.
- [44] ZHU JJ, THOMPSON CB. Metabolic regulation of cell growth and proliferation[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2019, 20: 436-450.
- [45] O'NEILL LAJ, HARDIE DG. Metabolism of inflammation limited by AMPK and pseudo-starvation[J]. Nature, 2013, 493: 346-355.
- [46] HOTAMISLIGIL GS. Inflammation, metaflammation and immunometabolic disorders[J]. Nature, 2017, 542: 177-185.
- [47] JR CGF. Fuel metabolism in starvation[J]. Annual Review of Nutrition, 2006, 26: 1-22.
- [48] STUBBS RT, YADAV M, KRISHNAMURTHY R, SPRINGSTEEN G. A plausible metal-free ancestral analogue of the Krebs cycle composed entirely of α -ketoacids[J]. Nature Chemistry, 2020, 12: 1016-1022.
- [49] LEMOS H, HUANG L, PRENDERGAST GC, MELLOR AL. Immune control by amino acid catabolism during tumorigenesis and therapy[J]. Nature Reviews Cancer, 2019, 19: 162-175.
- [50] ABLES GP, JOHNSON JE. Pleiotropic responses to methionine restriction[J]. Experimental Gerontology, 2017, 94: 83-88.
- [51] ONISEI T, TIHĂUAN BM, DOLETE G, AXINIE BUCOS M, RĂSCOL M, ISVORANU G. *In vivo* acute toxicity and immunomodulation assessment of a novel nutraceutical in mice[J]. Pharmaceutics, 2023, 15(4): 1292.

(本文责编 郝丽芳)