

环境因素对酰胺类除草剂水生毒性的影响

——以鱼类先天性免疫毒性为例

涂文清^{1,2}, 余晓玲^{1,3}, 邓觅^{1,3}, 何小立⁴, 吴永明¹, 邹义龙^{1,3}, 陆彬², 杨春燕¹, 徐超^{2*}

(1.江西省科学院 鄱阳湖研究中心, 江西 南昌 330096; 2.浙江工业大学 环境学院, 浙江 杭州 310014;

3.南昌大学 资源环境与化工学院, 江西 南昌 330031; 4.南昌大学 食品学院, 江西 南昌 330031)

摘要:为了探讨不同温度和光照周期条件下, 酰胺类除草剂对鱼类先天性免疫系统的影响, 以斑马鱼胚胎为实验模型, 将其急性暴露于致死浓度的甲草胺、乙草胺和丁草胺中 72 h, 测定它们的 LC50 值; 进一步的, 在不同温度和光照周期条件下, 将胚胎暴露于亚致死浓度的酰胺类除草剂中研究其对胚胎与先天性免疫系统相关基因表达的影响及其差异。结果表明: 酰胺类除草剂急性毒性大小为丁草胺>乙草胺>甲草胺, 温度和光照周期会显著影响酰胺类除草剂介导的与先天性免疫相关基因 (Interleukin-1 beta (*IL-1β*), interleukin-8 (*IL-8*), CC-chemokine (*CC-chem*) 和 *CXCL-cc*) 的表达量。此外, 双因素方差分析揭示: 在乙草胺诱导 *IL-1β* 表达和丁草胺诱导 *IL-8* 表达中, 暴露溶液浓度和温度-光照周期之间存在显著的联合作用。上述结果表明, 光照和温度会改变酰胺类除草剂对斑马鱼先天性免疫系统的影响。

关键词: 温度和光照; 先天性免疫系统; 基因表达; 斑马鱼胚胎

中图分类号: X506

文献标志码: A

文章编号: 1672-9102(2018)01-0097-06

The Effect of Environmental Factors on the Aquatic Toxicity of Chloroacetamide Herbicide: A Case Study in Fish Innate Immune Toxicity

Tu Wenqing^{1,2}, Yu Xiaoling^{1,3}, Deng Mi^{1,3}, He Xiaoli⁴, Wu Yongming¹,
Zou Yilong^{1,3}, LU Bin², Yang Chunyan¹, Xu Chao²

(1. Research Institute of Poyang Lake, Jiangxi Academy of Sciences, Nanchang 330029, China;

2. College of Environment, Zhejiang University of Technology, Hangzhou 310014, China;

3. College of Environmental Resources and Chemical Engineering, Nanchang University, Nanchang 330029, China;

4. College of Food Science and Technology, Nanchang University, Nanchang 330031, China)

Abstract: The aim was to assess the effects of temperature and photoperiod in immune system of fish after exposure to chloroacetamide herbicides. Zebrafish embryos were acutely exposed to lethal concentrations of chloroacetamide herbicides (including alachlor, acetochlor and butachlor) for 72 h, in order to determine their LC50 values. Further, exposures at sub-lethal concentrations of chloroacetamide herbicides under different temperature and photoperiod were carried out to investigate the influence and differences on the transcription of genes related to the innate immune and system. The results showed that the order of 72 h acute toxicity is butachlor>acetochlor>alachlor, and temperature and photoperiod significantly influence the mRNA levels of interleukin-1 beta (*IL-1β*), interleukin-8 (*IL-8*), CC-chemokine (*CC-chem*) and *CXCL-cc*, which are involved in the innate immune system in embryos. In addition, two-way analysis revealed a significant interaction between temperature-photoperiod and concentrations in *IL-1β* and *IL-8* mRNA expression in acetochlor and

收稿日期: 2015-06-03

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (21647005; 21277126); 江西省自然科学基金资助项目 (20161BAB213095; 20133BBF60053; 20151BDH80021); 国家外专局资助项目 (P172022005); 江西省科学院重大科技专项资助项目 (2017-YZD2-13)

* 通信作者, E-mail: chaoxu@zjut.edu.cn

butachlor treatment groups, respectively. These results demonstrate that temperature and photoperiod could inflect the effects of chloroacetamide herbicides on the immune system of fish species.

Keywords: temperature and photoperiod; innate immune system; gene transcription; zebrafish embryos

酰胺类除草剂是世界上目前使用最为广泛的除草剂种类之一,主要包括:甲草胺、乙草胺、异丙甲草胺、丁草胺和毒草胺等.其中乙草胺和丁草胺是我国使用最多的2种除草剂^[1],而甲草胺已被美国环境保护局列为B-2类致癌物.随着酰胺类除草剂的广泛使用,在土壤、地表水、地下水和底泥中均有检出,且其对水生生物有较强的水生毒性^[2-3].

先前的研究表明,鱼类的免疫学参数,如白细胞、巨噬细胞、先天性免疫和获得性免疫系统可以作为环境污染物的生物标志物^[4-5].在鱼类的早期发育阶段,先天性免疫系统是其抵御外源性化合物感染的唯一途径.通常地,温度和光照周期被认为是影响水生生物内分泌系统和生殖过程最重要的两个因素^[6].先前的研究表明,内分泌系统和免疫系统之间存在双向互动作用^[4],同时与哺乳动物一样,鱼体内的免疫系统和生殖系统有重叠的部分.因此,我们可以推测:自然环境中周期性的温度和光照条件的改变会对鱼类的免疫系统产生一定的影响.然而,以往评价化合物毒性的研究中一般不考虑这些因素.因此,为了更加真实的反映环境污染物在真实环境条件下的毒性效应,很有必要开展在不同环境因素条件下评价酰胺类除草剂对鱼类先天性免疫系统的影响.

斑马鱼是目前使用最广泛的模式生物之一,具有体型小易于饲养,产卵量大,胚胎透明易于观察且与人类基因同源性高(87%)等优势,因此,近年来常作为免疫系统的研究模型.因此,本研究中采用斑马鱼胚胎作为模式生物,研究了3种酰胺类除草剂(分别是甲草胺、乙草胺和丁草胺)在不同温度和光照周期条件下,对斑马鱼胚胎的先天性免疫系统的干扰效应,对真实环境条件下评估该类除草剂的生态风险提供科学依据.

1 材料与方法

1.1 试剂和材料

甲草胺(纯度:97%)、乙草胺(纯度>98.5%)和丁草胺(纯度:98.5%)均购自美国Sigma-Aldrich公司.除草剂标准品溶于正己烷(HPLC级)中配成浓度为2 000 mg/L的储备液,于4℃冰箱避光保存.临用时再稀释成所需浓度,且溶剂DMSO的体积浓度为0.5%.本实验中所使用的其它试剂均为分析纯.

1.2 斑马鱼的饲养与幼鱼的获取

青年期的斑马鱼购自中国科学院水生生物研究所(武汉),并在我们实验室条件下养殖和繁殖.斑马鱼饲养在一个恒定温度(28 ± 1 ℃),昼夜光照周期比为12 h:12 h的水循环系统中.斑马鱼每天喂食2次丰年虾.产卵时把10条雄性和5条雌性成年斑马鱼放置于产卵玻璃箱中.次日,当灯光打开时,成鱼受光照刺激,开始产卵.鱼卵的收集参见Westerfield^[7]和陆彬^[8]等人的方法.

1.3 斑马鱼胚胎的暴露实验

把斑马鱼胚胎随机暴露于含有不同浓度甲草胺(70, 105, 140, 175, 210 $\mu\text{mol/L}$)、乙草胺(20, 40, 60, 80, 120 $\mu\text{mol/L}$)和丁草胺(4, 6, 8, 10, 12 $\mu\text{mol/L}$)的24孔板(Costar, Corning Inc, NY, USA)中.每块24孔板中的20个孔为同一实验浓度,其余4孔为对照组,每孔中加入2 mL溶液,并放置一个胚胎.对照组为含0.5% DMSO的Hank's溶液(137 mM NaCl, 5.4 mM KCl, 0.25 mM Na_2HPO_4 , 0.44 mM KH_2PO_4 , 1.3 mM CaCl_2 , 1.0 mM MgSO_4 , 4.2 mM NaHCO_3).每个浓度设置3个平行.24孔板置于 28 ± 1 ℃,昼夜光照周期比为12 h:12 h的人工气候箱中培养至72 hpf (hours post-fertilization).每24 h更换50%的暴露溶液.胚胎发育过程在倒置解剖显微镜(Leica Microsystems, Wetzlar, Germany)进行观察.暴露过程中,死胚胎/幼鱼和碎屑及时挑出.

为了探讨不同温度和光照周期条件下,酰胺类除草剂对斑马鱼先天免疫系统的影响,20个斑马鱼胚胎随机分配到含有50 mL不同浓度的甲草胺(1和5 $\mu\text{mol/L}$)、乙草胺(1和5 $\mu\text{mol/L}$)和丁草胺(1和5 $\mu\text{mol/L}$)的烧杯中.对照组为含0.5% DMSO的Hank's溶液.将烧杯分别置于18℃-10 L, 24℃-

12 L,30 ℃-14 L 这 3 种不同的环境条件下的人工气候箱中培养至 72 hpf.每个浓度进行 4 个平行实验,每 24 h 更换暴露溶液 1 次.暴露结束后,收集至少 15 条斑马鱼幼鱼作为 1 个样本进行基因转录分析,而后储存在-80 ℃.

1.4 总 RNA 的提取,反转录和实时定量 PCR

按照 TRIzol 试剂(Takara Biochemical,Dalian,China)的说明书提取鱼样中的总 RNA.通过 1%琼脂糖凝胶电泳和 260/280 nm 的比值对每个样本中的 RNA 纯度进行评估.样品中 RNA 的浓度是通过 260 nm 的读数计算得到.根据反转录试剂盒说明书使用 500 ng 总 RNA 与逆转录酶试剂盒(Takara Biochemical,Dalian,China)反应合成 cDNA.*IL-1β*,*IL-8*,*CC-chem*,*CXCL-cc* 的定量过程是按照说明书使用 10 μL 的 SYBR 反应混合物和特异性引物对在 PCR 仪(Eppendorf,Hamburg,Germany)进行的.实时定量的扩增程序:95 ℃ 1 min 以激活聚合酶,接着 95 ℃ 15 sec,60 ℃ 1 min 进行 40 个循环.*β-actin* 作为管家基因,相对基因表达量使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算.*IL-1β*,*IL-8*,*CC-chem*,*CXCL-cc* 和管家基因(*β-actin*)的引物序列见表 1.

表 1 实时定量 PCR 反应中基因引物序列

Gene name	Sequence of the primer (5'-3')	GenBank accession no.
<i>IL-1β</i>	F:5'-CATTTGCAGGCCGTCACA-3'	AY340959.1
	R:5'-GGACATGCTGAAGCGCACTT-3'	
<i>IL-8</i>	F:5'-GTCGCTGCATTGAAACAGAA-3'	XM_001342570.2
	R:5'-CTTAACCCATGGAGCAGAGG-3'	
<i>CC-chem</i>	F:5'-TGCAGCTCAACCAGAAGATG-3'	BC162421.1
	R:5'-CTTTGACGCATGGAGGATTT-3'	
<i>CXCL-cc</i>	F:5'-CTGCTGCTTGCGGTAGTTTA-3'	NM_001115060
	R:5'-TCAACTTTGTGCGCACTTTGG-3'	
<i>β-actin</i>	F:5'-ATGGATGAGGAA ATCGCTGCC-3'	AF057040
	R:5'-CTCCCTGATGTCTGGGTCGTC-3'	

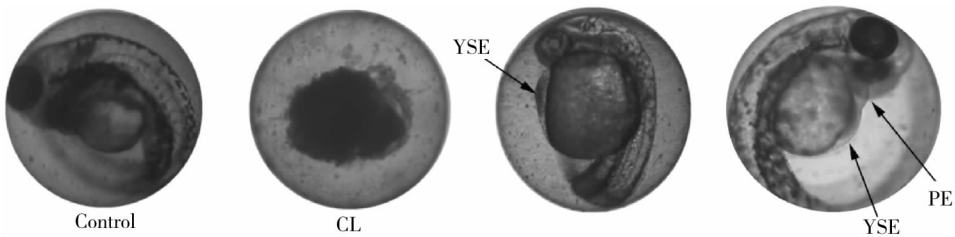
1.5 数据分析

利用 Origin 8.0(Northampton,MA,USA)对数据进行分析.结果以平均值±标准偏差(SD)的形式表示.为了评估浓度,温度-光照周期各自对斑马鱼胚胎先天性免疫系统的影响,以及它们之间是否存在相互作用,试验数据用 SPSS 19.0(SPSS,Chicago,IL,USA)统计软件进行双因素方差分析(包括 3 个浓度水平和 3 个温度-光照周期水平). * 表示 $p<0.05$, * * 表示 $p<0.01$,差异显著.

2 结果

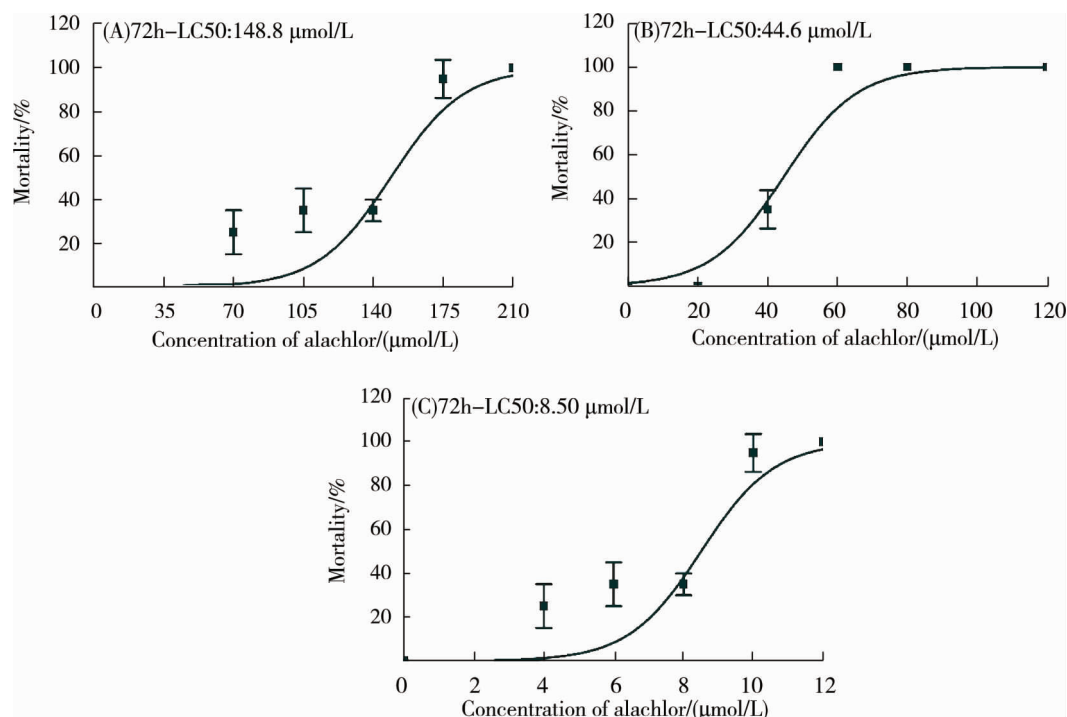
2.1 急性毒性

在斑马鱼胚胎急性毒性实验中,酰胺类除草剂导致一系列畸形现象,包括卵黄囊水肿(YSE)、心胞囊水肿(PE)和卵凝结(CL)等(见图 1).酰胺类除草剂不同暴露浓度与斑马鱼胚胎死亡率效应关系见图 2.从图中可以看出,3 种酰胺类除草剂的浓度与死亡率之间存在明显的剂量-效应关系.通过 S 型曲线回归方程,求得甲草胺、乙草胺和丁草胺对斑马鱼胚胎 72 h 的半致死浓度(LC50)值分别为 148.8,44.6,8.5 μmol/L,按照《化学农药环境安全评价实验准则》中关于化学农药对鱼类毒性等级划分的标准,其中乙草胺和丁草胺属于高毒农药,甲草胺属于中毒农药.



(YSE=卵黄囊水肿,PE=心胞囊水肿,CL=卵凝结)

图 1 酰胺类除草剂暴露引起的斑马鱼胚胎畸形现象



注:甲草胺(A),乙草胺(B)和丁草胺(C)72-h LC50 值通过 S 型剂量-效应曲线拟合求得

图2 酰胺类除草剂对斑马鱼胚胎死亡率的影响

2.2 先天性免疫相关基因的表达

根据 GeNorm (<http://medgen.ugent.be>) 软件分析结果表明:在斑马鱼胚胎中, β -actin 是 5 个最常用的内参,*rpl8* (ribosomal protein L8), β -actin, *elf α* (elongation factor1- α), 18 s (18s ribosomal RNA), *b2m* (beta-2-microglobulin) 中最稳定的.因此本研究中 β -actin 被选做管家基因.

在不同温度和光照周期条件下,将斑马鱼胚胎暴露于 3 种酰胺类除草剂中 72 hpf,与先天性免疫相关基因 *IL-1 β* , *IL-8*, *CC-chem*, *CXCL-cc* 的表达量见图 3.从图中可以看出,在 30 °C-14 L 条件下,甲草胺处理组中 *IL-1 β* 表达量显著增加,而 18 °C-10 L 和 24 °C-12 L 条件下没有显著改变;在 18 °C-10 L 和 30 °C-14 L 条件下,乙草胺处理组中 *IL-1 β* 表达量均显著增加;在 30 °C-14 L 条件下,丁草胺处理组中 *IL-1 β* 表达量显著增加,而 24 °C-12 L 条件下则显著下降(图 3A).对于 *IL-8* 基因,仅在 18 °C-10 L 条件下,丁草胺处理组中发现其表达量显著下降,而在其它条件以及甲草胺、乙草胺处理组均没有显著变化(图 3B).与 *IL-8* 基因表达类似,仅在 24 °C-12 L 条件下,丁草胺处理组中发现其表达量显著下降,而其它条件和其它 2 种酰胺类除草剂处理组均没有显著变化(图 3C).18 °C-10 L 条件下,3 种酰胺类除草剂处理组中, *CXCL-cc* 的表达量均显著下降,而其它条件下均没有显著变化(图 3D).

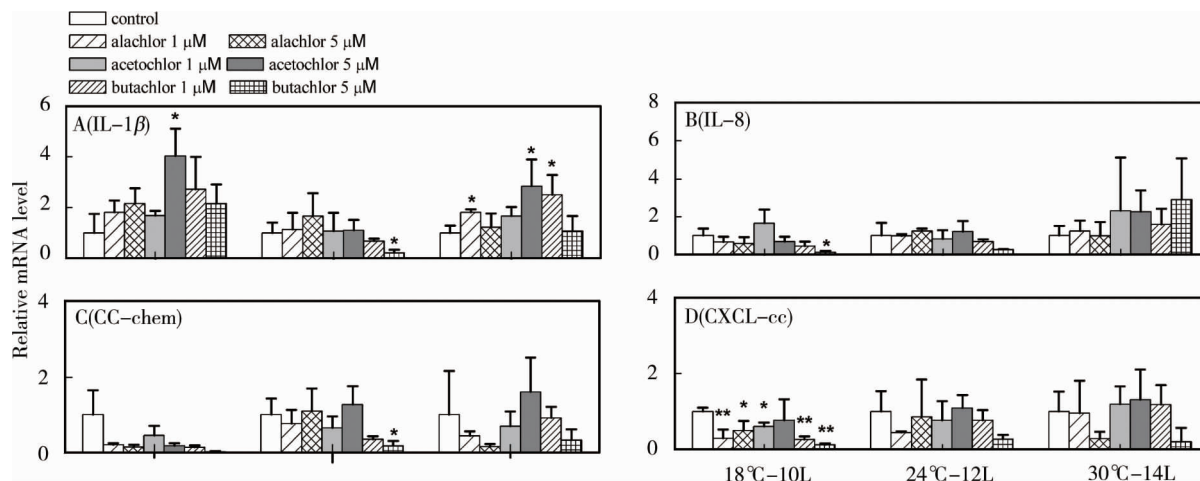


图3 在不同湿度和光照周期下,斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的酰胺类除草剂中至 72 hpf, (A) *IL-1 β* , (B) *IL-8*, (C)

CC-chem, (D) *CXCL-cc* 基因表达量

2.3 双因素方差分析

为了更好的阐明酰胺类除草剂的浓度和温度-光照周期是否会干扰斑马鱼胚胎与先天性免疫相关基因的表达.我们对 3 种不同酰胺类除草剂在不同温度-光照周期和浓度条件下诱导的先天性免疫相关基因的表达进行双因素方差分析 (two-way ANOVA), 结果见表 2. 双因素方差分析表明: 甲草胺处理组中, 浓度和温度-光照周期对 *IL-1β* 基因表达量均具有显著影响 ($p<0.05$); 然而对于所有测试的与先天性免疫相关基因的表达量并没有发现存在显著的浓度和温度-光照周期之间的相互作用 ($p>0.05$). 乙草胺处理组中, 浓度和温度-光照周期对 *IL-1β* 基因表达量均具有显著影响 ($p<0.001$), 且浓度和温度-光照周期之间存在显著的联合作用 ($p<0.01$). 对于丁草胺处理组, 浓度对于 *CC-chem* 和 *CXCL-cc* 基因的表达量具有显著影响 ($p<0.01$), 温度-光照周期对于 *IL-1β* 和 *IL-8* 基因的表达量具有显著影响 ($p<0.01$), 且浓度和温度-光照周期对于 *IL-8* 基因的表达量存在显著的联合作用 ($p<0.01$).

表 2 斑马鱼胚胎暴露于酰胺类除草剂中, 暴露液浓度、温度-光照周期对先天性免疫系统影响的对比

Chemicals	Factors	F(P)			
		<i>IL-1β</i>	<i>IL-8</i>	<i>CC-chem</i>	<i>CXCL-cc</i>
Alachlor	Concentration	3.711 (0.045) *	0.205 (0.817)	2.785 (0.088)	3.038 (0.073)
	Temp and Photo	16.865 (<0.001) ***	0.280 (0.759)	7.725 (0.004) **	0.553 (0.584)
	Concentration×Temp and Photo	1.407 (0.272)	0.841 (0.517)	0.828 (0.525)	1.157 (0.362)
Acetochlor	Concentration	15.090 (<0.001) ***	0.855 (0.442)	1.664 (0.217)	0.605 (0.557)
	Temp and Photo	29.004 (<0.001) ***	0.982 (0.394)	4.012 (0.036) *	0.316 (0.733)
	Concentration×Temp and Photo	8.103 (0.001) **	0.918 (0.475)	1.448 (0.259)	0.496 (0.739)
Butachlor	Concentration	2.697 (0.098)	0.298 (0.746)	8.223 (0.003) **	15.455 (<0.001) ***
	Temp and Photo	17.066 (<0.001) ***	6.745 (0.008) **	0.836 (0.451)	0.043 (0.958)
	Concentration×Temp and Photo	2.174 (0.118)	5.052 (0.008) **	0.832 (0.524)	2.669 (0.070)

^aSignificant differences are indicated by * for $p<0.05$, ** for $p<0.01$ and *** for $p<0.001$

3 讨论

本研究的目的是阐明酰胺类除草剂对斑马鱼胚胎的水生毒性; 重点探讨不同温度-光照周期条件下, 酰胺类除草剂对斑马鱼先天性免疫系统的影响及其差异性. 结果表明, 酰胺类除草剂具有较强的水生毒性, 会引起胚胎的死亡和一些非致命性的发育畸形; 基因表达分析结果揭示, 酰胺类除草剂会诱发与斑马鱼与先天性免疫相关基因的表达, 且不同温度-光照周期条件下, 存在显著差异.

先天性免疫系统是斑马鱼早期发育阶段对抗病原体感染的唯一防御途径, 因为对于斑马鱼幼鱼而言, 当发育至第 4~6 周时获得性免疫系统才形成, 功能才成熟^[9]. 因此, 早期阶段的斑马鱼成为研究先天性免疫系统的一个有用模型. 温度和光照周期在鱼类的生长发育过程中起着重要的作用. 一般地, 环境因素影响鱼类的繁殖是通过下丘脑-垂体-性腺轴 (HPG 轴)^[10]. 对于某些鱼类, 改变光照周期会刺激性腺的成熟, 而改变温度则会促性腺激素水平^[11]. 越来越多的研究表明, 环境因素在鱼类的内分泌干扰中起着重要的作用^[6]. 而内分泌系统和免疫系统之间存在双向互动作用. 以往的研究表明, 细菌, 病毒和环境的化学品可诱导或抑制与先天免疫系统有关基因的表达^[12]. 我们当前的研究表明: 当把斑马鱼胚胎暴露于 3 种酰胺类除草剂中 72 hpf, 温度和光照周期显著影响斑马鱼胚胎与先天性免疫相关基因的表达量. 细胞因子如 *IL-1β*, *IL-8*, *CC-chem*, *CXCL-cc* 是一组非抗体蛋白, 由免疫细胞分泌, 用于调节和介导免疫, 炎症和造血. 在 24 °C-12 L 条件下, 丁草胺显著抑制 *IL-1β* 的表达, 而在另外 2 种条件下, 酰胺类除草剂表现为显著上调 *IL-1β* 的表达. *IL-1β* 在促使吞噬细胞到感染部位中起着举足轻重的作用, 激活中性粒细胞和巨噬细胞, 刺激它们到感染部位^[13]. 因此, *IL-1β* 基因过度表达与减少免疫相关细胞的抗感染作用有关. 在 18 °C-10 L 条件下, 3 种除草剂均显著抑制 *CXCL-cc* 的表达. *CXCL-cc* 具有吸引和激活中性粒细胞并影响它们作为炎症介质的潜力. 因此, 3 种酰胺类除草剂有可能诱导早期发育阶段的斑马鱼的免疫反应. Jin^[10]等使用双因素方差分析发现斑马鱼暴露于 17β-estradiol (E2) 中, 温度和光照周期在诱导肝脏 VTG1 和 ERα 基因表达量中起着联合作用. 在本研究中, 我们

也发现温度和光照周期在乙草胺诱导 *IL-1 β* 表达和丁草胺诱导 *IL-8* 表达中起着联合作用,然而在甲草胺处理组中没有任何相互作用.根据范特霍夫规则,在一定温度范围内,水温每增加 10 $^{\circ}\text{C}$ 会增加酶活 2~3 倍^[14-15].因此,环境因素很可能会影响化学物质的吸收和排出.从而导致污染物在鱼体富集,影响幼鱼的先天性免疫系统.

4 结论

1) 酰胺类除草剂具有较强的水生毒性,会引起胚胎的死亡和一些非致命性的发育畸形,且毒性大小关系为:丁草胺>乙草胺>甲草胺.

2) 酰胺类除草剂会诱发与斑马鱼与先天性免疫相关基因的表达,且不同温度-光照周期条件下,存在显著差异;且除草剂浓度与温度-光照周期之间存在联合作用.

参考文献:

- [1] 胡笑彤.我国农药工业的现状与发展方向[J]. 农药, 1998, 37 (6):7-10.
- [2] Kalkhoff S J, Kolpin D W, Thurman E M, et al. Degradation of chloroacetanilide herbicides: The prevalence of sulfonic and oxanilic acid metabolites in Iowa groundwaters and surface waters[J]. Environ Sci Technol, 1998, 32(11):1738-1740.
- [3] Tu W Q, Niu L L, Liu W P, et al. Embryonic exposure to butachlor in zebrafish (*Danio rerio*): Endocrine disruption, developmental toxicity and immunotoxicity[J]. Ecotox Environ Safe, 2013, 89: 189-195.
- [4] Ahmed S R. The immune system as a potential target for environmental estrogens (endocrine disruptors): a new emerging field [J]. Toxicology, 2000, 150(1/3):191-206.
- [5] Milla S, Depiereux S, Kestemont P. The effects of estrogenic and androgenic endocrine disruptors on the immune system of fish: a review[J]. Ecotoxicology, 2011, 20(2):305-319.
- [6] Jin Y X, Shu L J, Huang F Y, et al. Environmental cues influence EDC-mediated endocrine disruption effects in different developmental stages of Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. Aquat Toxicol, 2011, 101(1):254-260.
- [7] Westerfield M. The zebrafish book: a guide for the laboratory use of zebrafish (*Brachydanio rerio*) [M]. University of Oregon Press, 1995.
- [8] 陆彬, 楼鸳鸯, 陈楚楚, 等. 熊果苷抑制斑马鱼胚胎黑色素合成的研究[J]. 湖南科技大学学报(自然科学版), 2015, 30 (1):116-120.
- [9] Nayak A S, Lage C R, Kim C H. Effects of low concentrations of arsenic on the innate immune system of the zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Toxicol Sci, 2007, 98 (1):118-124.
- [10] Jin Y X, Chen R J, Sun L W, et al. Photoperiod and temperature influence endocrine disruptive chemical-mediated effects in male adult zebrafish[J]. Aquat Toxicol, 2009, 92 (1):38-43.
- [11] Breton B, Billard R, Reinaud P, et al. In Effects of photoperiod and temperature on plasma gonadotropin and spermatogenesis in the rainbow trout *Salmo gairdnerii* Richardson[J]. Ann Biol Anim Bioch Biophys, 1977, 17 (3A):331-340.
- [12] Eder K J, Clifford M A, Hedrick R P, et al. Expression of immune-regulatory genes in juvenile Chinook salmon following exposure to pesticides and infectious hematopoietic necrosis virus (IHNV) [J]. Fish Shellfish Immun, 2008, 25 (5):508-516.
- [13] Jin Y X, Zheng S S, Fu Z W. Embryonic exposure to cypermethrin induces apoptosis and immunotoxicity in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Fish Shellfish Immun, 2011, 30:1049-1054.
- [14] Caissie D. The thermal regime of rivers: a review[J]. Freshwater Biol, 2006, 51 (8):1389-1406.
- [15] Reid S, Dockray J, Linton T, et al. Effects of chronic environmental acidification and a summer global warming scenario: protein synthesis in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. Can J Fish Aquat Sci, 1997, 54 (9):2014-2024.