

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20180121001

陈玫宏, 徐怀洲, 宋宁慧, 等. 羟基多溴联苯醚(OH-PBDEs)小鼠肝脏微粒体体外代谢及对雌激素代谢的影响研究[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(6): 136-143

Chen M H, Xu H Z, Song N H, et al. *In vitro* metabolism of hydroxyl polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) and effects on estrogen metabolism in mouse liver microsomes [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(6): 136-143 (in Chinese)

羟基多溴联苯醚 (OH-PBDEs) 小鼠肝脏微粒体体外代谢及对雌激素代谢的影响研究

陈玫宏^{1,2}, 徐怀洲¹, 宋宁慧¹, 张芹¹, 张圣虎^{1,*}, 李江^{2,#}

1. 生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210042

2. 贵州大学资源与环境工程学院, 贵阳 550025

收稿日期: 2018-01-21

录用日期: 2018-03-27

摘要: 羟基化多溴联苯醚(OH-PBDEs)是一类具有内分泌干扰效应的酚类化合物,以小鼠肝脏微粒体作为研究对象,考察了 OH-PBDEs 的体外代谢行为及对雌激素代谢的影响。研究结果发现,4 种 OH-PBDE 均能够代谢,其代谢率大小为 6-OH-BDE-99>6'-OH-BDE-99>6-OH-BDE-137>5'-OH-BDE-99,表明羟基官能团(-OH)与醚键及溴原子处于邻位时,表现出较高的代谢率;4 种 OH-PBDE 对 3 种天然雌激素包括雌酮(E1)、17 β -雌二醇(E2)、雌三醇(E3)的代谢表现出不同作用,整体来说,对 E1 和 E2 代谢随着 OH-PBDE 浓度的增加抑制作用逐渐增强,对 E3 代谢则表现出促进作用,但是对人工合成的雌激素 17 α -炔雌醇(EE2)无明显影响;对 E2 代谢产物 2-羟基雌二醇(2-OH-E2)的生成量定量表征表明,除 6-OH-BDE-99 促进了 2-OH-E2 的生成量,其余 3 种 OH-PBDE 随实验添加浓度的增加,抑制了 2-OH-E2 的生成量,这可能与酶介导的不同代谢机制有关。

关键词: OH-PBDEs; 肝脏微粒体; 体外代谢; 雌激素

文章编号: 1673-5897(2018)6-136-08

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

In vitro Metabolism of Hydroxyl Polybrominated Diphenyl Ethers (OH-PBDEs) and Effects on Estrogen Metabolism in Mouse Liver Microsomes

Chen Meihong^{1,2}, Xu Huaizhou¹, Song Ninghui¹, Zhang Qin¹, Zhang Shenghu^{1,*}, Li Jiang^{2,#}

1. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment, Nanjing 210042, China

2. College of Resources and Environmental Engineering, Guizhou University, Guiyang 550025, China

Received 21 January 2018

accepted 27 March 2018

Abstract: Hydroxylation polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) are a class of phenolic compounds that have been found to be an endocrine disruptor, and the *in vitro* metabolism of OH-PBDEs and effect on metabolism of synthetic estrogen were investigated using mouse liver microsome. The results showed that all of the four OH-PBDEs can be metabolized, and the metabolic rate followed the order: 6-OH-BDE-99>6'-OH-BDE-99>6-OH-BDE-137>5'-OH-BDE-99, which indicated OH-PBDEs were more readily bio-transformed when the hydroxyl

基金项目: 国家自然科学基金(No. 21407055, 51508120);

作者简介: 陈玫宏(1991-), 女, 硕士研究生, 研究方向为环境评价, E-mail: phemia_chen0912@126.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: zsh@nies.org

共同通讯作者 (Corresponding author), E-mail: jli82@gzu.edu.cn

functional group (-OH) was in the ortho position with the ether bond and the Br atom. The four OH-PBDEs showed different effects on the metabolism of natural estrogens, including estrone (E1), 17 β -estradiol (E2), estriol (E3). As a whole, the inhibition on metabolic rate of E1 and E2 gradually increased with the increasing concentrations of OH-PBDE, but showed a promotion effect on metabolism of E3 and no significant effect on metabolism of synthetic estrogen 17 α -ethynylestradiol (EE2). The quantification of the metabolite 2-hydroxyestradiol (2-OH-E2) showed that 6-OH-BDE-99 promoted the 2-OH-E2 production, while 2-OH-E2 production was inhibited by the other three OH-PBDEs as the experimental concentration increased, and these results revealed that it may be related to the different metabolic mechanisms mediated by enzymes.

Keywords: OH-PBDEs; liver microsomes; *in vitro* metabolism; estrogen

羟基多溴联苯醚(OH-PBDEs)作为一类具有内分泌干扰性质的酚类化合物已经引起了人们的广泛关注^[1-3]。与母体多溴联苯醚(PBDEs)相比,具有更大的生物毒性效应^[4-5],目前在环境介质^[6-8]、生物体^[9-11]甚至人体^[12-14]中均有检出,表明 OH-PBDEs 具有一定的持久性。目前有研究表明,OH-PBDEs 可以在生物体内通过生物酶催化氧化进一步形成一相代谢产物,代谢速率受溴原子数量及羟基、溴原子和醚键三者之间的位置等因素的影响^[15-19]。

由于生物体内雌激素的合成和代谢受多种因素的调节,外源性雌激素可能通过影响这些调节发挥其雌激素活性效应^[20-22]。目前研究表明 OH-PBDEs 在生物体内能够影响磺基转移酶的生物活性^[23-25]。细胞色素 P450 酶作为生物体内重要代谢酶系,是维持哺乳动物体内适当 17 β -雌二醇(E2)水平的主要因素,Lai 和 Cai^[26]发现 OH-PBDEs 对 E2 的代谢能够产生非竞争性抑制作用。

因此,本研究用小鼠肝微粒体对 4 种 OH-PBDEs(5'-OH-BDE-99、6'-OH-BDE-99、6-OH-BDE-99 和 6-OH-BDE-137)进行体外代谢研究,并考察 OH-PBDEs 对雌激素包括雌酮(E1)、17 β -雌二醇(E2)、雌三醇(E3)、17 α -炔雌醇(EE2)等代谢的影响,有助于更加全面的评价 OH-PBDEs 在生物体的代谢行为和毒性效应。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

AG-285 电子天平(Mettler 公司,瑞士); Biofuge stratos 高速冷冻离心机(Heraeus 公司,德国); Avanti J-30I 超高速离心机(Beckman Coulter 公司,美国); Tecan Infinite 200 酶标仪(Tecan 公司); 恒温振荡培养箱(INNOVA 43R, NBS 公司); UVmini-1240 紫外分光光度计(Kyoto 公司,日本); 超高效液相色谱-串联质谱仪(LC-Agilent Technologies 1290 Infinity, MS-AB SCIEX QTRAP 4500, 美国)。

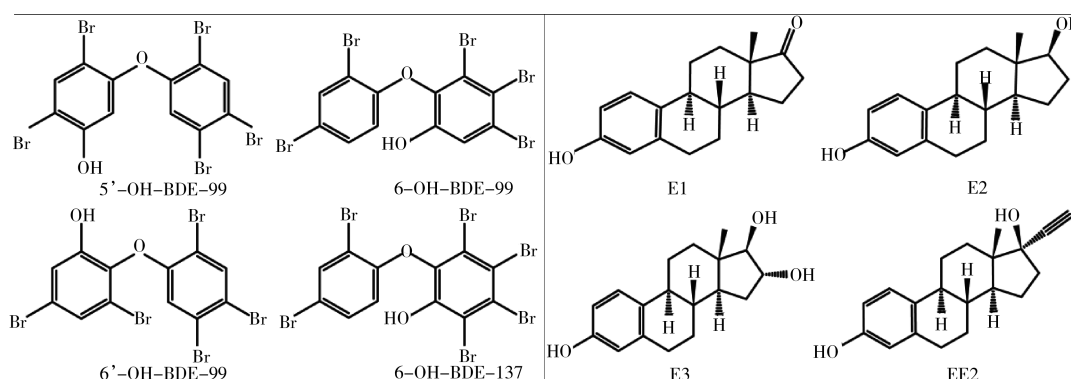


图1 羟基多溴联苯醚(OH-PBDEs)和雌激素的结构图

注: 5'-OH-BDE-99 为 5'-羟基-2,2',4,4',5-五溴联苯醚, 6'-OH-BDE-99 为 6'-羟基-2,2',4,4',5-五溴联苯醚, 6-OH-BDE-99 为 6-羟基-2,2',3,4,4'-五溴联苯醚, 6-OH-BDE-137 为 6-羟基-2,2',3,4,4',5-六溴联苯醚; E1 为雌酮, E2 为 17 β -雌二醇, E3 为雌三醇, EE2 为 17 α -炔雌醇。

Fig. 1 Constructions of hydroxyl polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) and estrogens

Note: 5'-OH-BDE-99 (5'-Hydroxy-2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether), 6'-OH-BDE-99 (6'-Hydroxy-2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether), 6-OH-BDE-99 (6-Hydroxy-2,2',3,4,4'-pentabromodiphenyl ether), 6-OH-BDE-137 (6-Hydroxy-2,2',3,4,4',5-hexabromodiphenyl ether); E1 (Estrone), E2 (17 β -Estradiol), E3 (Estriol), EE2 (17 α -Ethinylestradiol).

4种OH-PBDEs和4种雌激素(图1):5'-羟基-2,2',4,4',5-五溴联苯醚(5'-OH-BDE-99)、6'-羟基-2,2',4,4',5-五溴联苯醚(6'-OH-BDE-99)、6-羟基-2,2',3,4,4'-五溴联苯醚(6-OH-BDE-99)、6-羟基-2,2',3,4,4',5-六溴联苯醚(6-OH-BDE-137)、雌酮(E1)、17 β -雌二醇(E2)、雌三醇(E3)、17 α -炔雌醇(EE2)购于百灵威科技有限公司(J&K公司)。

三(羟甲基)氨基甲烷(Tris)、乙二醇四乙酸二钠盐二水合物(Na_2EDTA)、二硫苏糖醇(DTT)、牛血清蛋白(BSA)、考马斯亮蓝 G250、7-乙氧基试卤灵、试卤灵、甘氨酸、7-乙氧基香豆素、7-羟基香豆素、盐酸苯胺、4-氨基苯酚均购于 J&K 公司;烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸(NADPH)购自 Sigma Aldrich 公司;甲醇和乙腈为色谱纯,购自德国 Merck 公司;氨水(色谱纯)、二甲基亚砜(DMSO,药检专用)、氯化钾和氢氧化钠(分析纯)均购于国药集团药业股份有限公司。

1.2 肝微粒体的制备

无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级 ICR 小白鼠(约 6 周龄)购自上海杰思捷实验动物有限公司。通过颈椎脱臼法处死小鼠,迅速取出肝脏,在冰浴中用冰冷的生理盐水(0.9%)冲洗,滤纸拭干后称重,剪碎后加入由 20% 甘油、 $0.15\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ KCl}$ 、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{EDTA}$ 、 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT)、 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ (pH 7.4)配制而成的缓冲液(m (肝脏): V (缓冲液)=1:3),匀浆后以 9 000 g(4℃)离心 20 min。将所得上清液在 105 000 g(4℃)下进一步离心 30 min,弃去上清液,淡红色沉淀物即为肝脏微粒体。按单位肝脏重量(g)加 0.5 mL 重悬缓冲液(20% 甘油、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Na}_2\text{EDTA}$ 、 $0.1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ DTT}$ 、以 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ (pH 7.4)配制。制成匀浆,分装后储存于液氮中备用。用 Bradford 法测定微粒体蛋白质浓度,以牛血清蛋白作为标准蛋白^[27],以上步骤均在冰浴中进行。

1.3 酶活性测定方法

乙氧基香豆素-O-脱乙基酶(ECOD)活性的测定方法^[16,18]:反应体系包括 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 牛血清蛋白(BSA)、 $1\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 7-乙氧基香豆素、微粒体样品液、Tris-HCl 缓冲液用于维持体系的 pH 值,整个反应体系总体积为 1 mL。37℃ 预热 5 min 后加入 NADPH 开启反应,反应 10 min 后,添加三氯乙酸(15%)终止反应。加入 2 mL 三氯甲烷萃取反应产物,涡旋 2 min 后于 3 000 g 下离心 5 min;随后,取 1 mL 有机相加入 5 mL $0.6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ NaOH}$ -甘氨酸缓冲液(pH

10.4),涡旋萃取,用酶标仪在激发波长 370 nm 和发射波长 450 nm 处检测 7-羟基香豆素的吸光度值。酶活性最终用 7-羟基香豆素的生成量表示,单位为 $\text{pmol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ 。

1.4 OH-PBDE 对微粒体活性影响

通过在 NADPH 存在下将小鼠肝脏微粒体与 OH-PBDE 一起孵育,分别考察不同浓度的 OH-PBDE 对小鼠肝脏微粒体 CYP450 的 ECOD 活性的影响。设定 OH-PBDE 在代谢体系中浓度为 1.5、3、6、15、30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,于 37℃ 条件下代谢 2 h,终止反应后,测定 ECOD 的活性,对照组不添加 OH-PBDE。

1.5 体外代谢实验

1.5.1 OH-PBDEs 的体外代谢

代谢反应体系体积为 2 mL(pH=7.4),包含 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ 、3 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ OH-PBDE}$ 、 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 微粒体,OH-PBDEs 用 DMSO 助溶(反应体系中 DMSO 比例为 1%)。将反应体系在 37℃ ($120\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$)恒温振荡器中预孵育 5 min,然后加入辅酶 NADPH 启动反应。NADPH 的最终浓度为 $0.8\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$,对照组不含辅酶。孵育 2 h 后,加入 2 mL 冰乙腈终止反应,放入 -20℃ 冰箱 20 min 后,取上清液过 0.22 μm 有机滤膜,待 HPLC-MS/MS 测定目标物的浓度。4 种 OH-PBDEs 单独进行体外代谢实验,每组设置 3 个平行,一个对照组,并根据代谢反应结束时 OH-PBDEs 的浓度与零时刻浓度比值计算代谢率。

1.5.2 OH-PBDEs 对雌激素体外代谢影响

分别将 4 种 OH-PBDEs 添加到含 $2.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雌激素的代谢体系中进行代谢影响研究。代谢反应体系体积为 2 mL,包含 $0.1\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ Tris-HCl}$ 、1.5~6 ($1.5, 3, 6$) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}\text{ OH-PBDE}$ 、 $2.7\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雌激素(E1、E2、E3、EE2)、 $1\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 微粒体,加入辅酶 NADPH 启动反应,37℃ 下分别振荡培养 2 h,每组设置 3 组平行,对照组不含 OH-PBDEs。代谢反应结束时加入 2 mL 冰乙腈,放入 -20℃ 冰箱 20 min 后,取上清液过 0.22 μm 有机滤膜后测定雌激素的含量,并根据代谢反应结束时雌激素的含量与零时刻含量比值计算代谢率。

1.6 仪器分析

1.6.1 OH-PBDEs 的测定

样品测定采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS);质谱条件为电喷雾离子源(ESI-),多反应离子监测(MRM),负离子模式,离子源温度 500℃,离

子喷雾电压 4 500 V,气帘气压力 206 851.8 Pa,喷雾气压力 241 327.1 Pa,辅助加热气压力 275 802.4 Pa;色谱条件为 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱(150 mm × 2.1 mm, 3.5 μm),OH-PBDEs 测定的流动相为 0.2% (V/V)氨水(A)和乙腈(B),A 与 B 的比例为 3:7 (V/V),柱温 40 ℃,进样体积 5 μL,外标法定量。具体参数见表 1。4 种 OH-PBDEs 均在 1 ~ 100 μg · L⁻¹ 范围内线性相关,相关系数(*r*²)为 0.9789,定量限(LOQ)范围为 0.01 ~ 1.03 μg · L⁻¹,回收率范围为 65% ~ 116%。

1.6.2 雌激素及其产物的测定

4 种雌激素及产物 2-羟基雌二醇(2-OH-E2)采用高效液相色谱串联质谱(HPLC-MS/MS)进行检测

分析。质谱条件为电喷雾离子源(ESI-),多反应离子监测(MRM),负离子模式,离子源温度 400 ℃,离子喷雾电压 4 500 V,气帘气压力 206 851.8 Pa,喷雾气压力 241 327.1 Pa,辅助加热气压力 275 802.4 Pa;色谱条件为 ZORBAX Eclipse Plus C18 色谱柱(150 mm × 2.1 mm,3.5 μm),流动相为水(A)和乙腈(B),A 与 B 的比例为 3:7 (V/V),柱温 40 ℃,进样体积 5 μL,外标法定量,其他具体参数见表 2。

1.7 数据处理

本文所有结果均采用平均值±标准偏差(mean±SD)表示。采用 SPSS19.0 和独立样本 T 检验(单因素方差分析,Dunnett's T3(3)),对各处理组与对照组数据进行差异显著性分析,*P*<0.05 为差异显著(*)。

表 1 4 种 OH-PBDEs 的质谱条件
Table 1 Mass spectrometric conditions of four OH-PBDEs

目标物 Targets	母离子 (m/z) Parent ion (m/z)	子离子 (m/z) Daughter ion (m/z)	去簇电压 /eV Declustering potential /eV	碰撞能量 /eV Collision energy /eV	入口电压 /eV Entrance potential /eV	出口电压 /eV Collision cell exit potential /eV
5'-OH-BDE-99	580.3	80.7*	-169	-92.6	-10	-7
		498.6	-169	-34.4	-10	-7
6'-OH-BDE-99	580.3	80.8*	-149	-70.2	-10	-7
		548.6	-149	-70.2	-10	-7
6-OH-BDE-99	580.3	80.7*	-149	-73	-10	-7
		548.9	-149	-73	-10	-7
6-OH-BDE-137	658.6	78.9*	-154	-73	-10	-7

注:* 为定量离子。
Note: * represents quantitative ions.

表 2 4 种雌激素及产物的质谱条件
Table 2 Mass spectrometric conditions of four estrogens and products

目标物 Targets	母离子(m/z) Parent ion (m/z)	子离子(m/z) Daughter ion (m/z)	去簇电压/eV Declustering potential/eV	碰撞能量/eV Collision energy/eV	出口电压/eV Collision cell exit potential/eV
E1	269.2	145.3*	-127	-46	-7
		252.7	-127	-40	-7
E2	271.3	144.8*	-134	-50	-7
		183.5	-134	-50	-7
E3	287.1	144.8*	-148	-50	-7
		171.4	-148	-47	-7
EE2	295.2	144.8*	-149	-48	-10
		198.7	-149	-50	-10
2-OH-E2	287.2	147.1*	-140	-53	-10
		255.0	-140	-53	-10

注:* 定量离子; 2-OH-E2 表示 2-羟基雌二醇。
Note: * represents quantitative ions; 2-OH-E2 stands for 2-hydroxyestradiol.

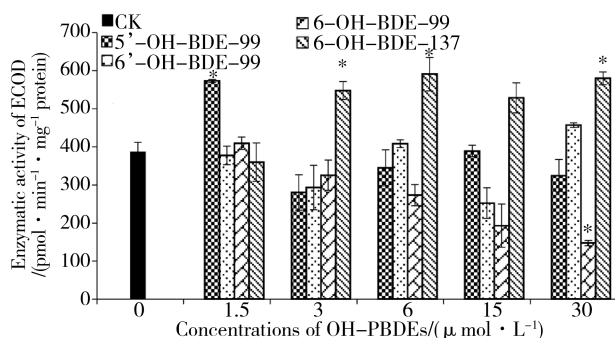


图2 不同浓度的 OH-PBDEs 对 7-乙氧基香豆素-O-脱乙基酶 (ECOD) 活性的影响

注:CK 表示未添加 OH-PBDEs 时,孵育 2 h 后 ECOD 活性;

*表示与对照相比有显著性差异($P < 0.05$)。

Fig. 2 Effect of OH-PBDEs at different concentrations on the 7-ethoxycoumarin-O-deethylase (ECOD) activity

Note: CK indicates ECOD activity after 2 h incubation without OH-PBDEs;

* indicates significant difference ($P < 0.05$), compared with CK.

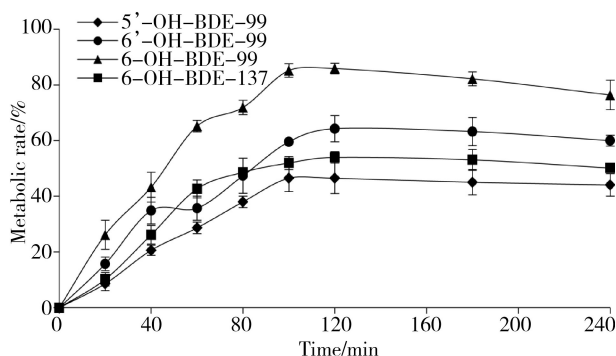


图3 OH-PBDEs 与孵育时间的关系

Fig. 3 Concentrations of OH-PBDEs as a function of incubation time

2 结果与讨论 (Results and discussion)

2.1 OH-PBDEs 对 ECOD 活性的影响

由于 ECOD 可以表征 CYP1A1、CYP1A2、CYP2A6、CYP2B1、CYP2B6、CYP2E1 等多种 CYP450 酶亚系的活性,因此 ECOD 活性一般可以作为表征 CYP450 总活性的指标。

在未添加 OH-PBDEs 时,微粒体孵育 2 h 后 ECOD 活性为 $(2\ 500 \pm 43)$ $\text{pmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ protein。不同 OH-PBDEs 浓度下 ECOD 活性结果如图 2 所示,随着反应体系中 OH-PBDEs 浓度的增加,5'-OH-BDE-99 在低浓度 ($1.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下显著促进 ECOD 活性 ($P < 0.05$),其余浓度条件下与对照相比不存在显著性差异;6-OH-BDE-99 随浓度的增加降低

了 ECOD 活性,但是与对照相比不存在显著性差异;6-OH-BDE-137 在低浓度 ($1.5\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 下对 ECOD 活性无显著影响,但是随着浓度的增加显著促进 ECOD 活性,与对照相比存在显著性差异 ($P < 0.05$);6'-OH-BDE-99 随浓度的增加,对 ECOD 活性的影响不明显。由此可见,4 种 OH-PBDEs 对微粒体 ECOD 活性存在不同作用。

2.2 OH-PBDEs 的体外代谢

图 3 为 4 种 OH-PBDEs 的代谢率随孵育时间的变化图。由图 3 可以看出,随孵育时间的增加,4 种 OH-PBDEs 的代谢率逐渐增大,在 100 min 左右达到最高,反应结束时基本达到平衡位置,其中 6-OH-BDE-99 代谢率最大,为 85.9%,其他 3 种 OH-PBDEs (5'-OH-BDE-99、6'-OH-BDE-99、6-OH-BDE-137) 的代谢率分别为 46.0%、64.3%、53.9%。

研究表明,溴原子数量会影响 OH-PBDEs 的代谢,Li 等^[16]用猪肝微粒体体外代谢 3 种 OH-PBDEs (3'-OH-BDE-7、4'-OH-BDE-17 和 3-OH-BDE-47),发现代谢率随溴原子数量的增加而降低。Lai 和 Cai^[26]用大鼠肝微粒体体外代谢 11 种 OH-PBDEs,发现溴原子含量较多的 6-OH-BDE-137 代谢率最小,这与本研究结论一致 ($6\text{-OH-BDE-137} < 6\text{-OH-BDE-99}$)。此外,对于溴原子数量相同的 3 种五溴 OH-PBDEs,醚键与羟基(OH)官能团及溴原子互为邻位时代谢率最高,表明醚键、OH 官能团和溴原子的相对位置对代谢有重要影响,这与 Lai 和 Cai^[26]以及本实验室^[18]前期研究结论一致。

2.3 OH-PBDEs 对雌激素体外代谢的影响

4 种不同浓度 OH-PBDEs 对雌激素代谢影响见图 4。结果表明,除 EE2 外(代谢率 91.0%),4 种 OH-PBDEs 不同浓度下对 E1、E2 和 E3 代谢具有不同影响。与未添加 OH-PBDEs 的空白对照组相比 (52.3%),5'-OH-BDE-99 在实验设置的低浓度时对 E1 代谢无影响,但是随着实验添加浓度的增加,对 E1 代谢表现出显著的抑制作用 ($P < 0.05$);6'-OH-BDE-99 和 6-OH-BDE-99 在实验设置的低浓度时具有显著的促进作用 ($P < 0.05$),但随着实验添加浓度的增加,对 E1 代谢的促进作用逐渐降低;6-OH-BDE-137 在实验设置浓度下对 E1 代谢无影响。

E2 与 E1 的代谢率接近,为 47.1%。与未添加 OH-PBDEs 的空白对照组相比,5'-OH-BDE-99 随实验添加浓度的增加略有降低,但是无显著性影响;

其余 3 种 OH-PBDEs 在实验设置的低浓度时对 E2 代谢具有显著的促进作用($P<0.05$),但随着实验添加浓度的增加,6'-OH-BDE-99 对 E2 代谢的促进作用逐渐降低,并在实验设置的高浓度时表现出显著的抑制作用($P<0.05$),而 6-OH-BDE-99 和 6-OH-BDE-137 随着实验添加浓度的增加促进作用略有降低,但仍表现出显著的促进作用($P<0.05$)。目前,OH-PBDEs 对雌激素代谢的影响的研究报道较少,Lai 和 Cai^[26]研究了 BDE 47、6-CH₃O-BDE-47 和 2 种 OH-PBDEs(2'-OH-BDE-28 和 3'-OH-BDE-100)在浓度范围 0.9 ~ 412.0 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 内对 E2 代谢的影响,结果发现相对母体 BDE 47 和甲氧基 6-CH₃O-BDE-47,2 种 OH-PBDEs 更能够显著抑制 E2 的代谢,而且对 E2 代谢表现为非竞争性抑制。与本研究结果不同,这可能与 OH-PBDEs 的结构以及设置

浓度有关,对生物体内 E2 代谢的差异可能源于 OH-PBDEs 对本身代谢体系酶活性的影响所致,有待于进一步研究。

E3 的代谢率相对较低,仅为 16.9%,这可能是由于 E3 作为 E2 的代谢物,生物利用性相对较低^[28]。与未添加 OH-PBDEs 的空白对照组相比,5'-OH-BDE-99、6'-OH-BDE-99 和 6-OH-BDE-99 对雌激素代谢影响表现出相似的趋势,在实验设置的低浓度时表现为促进作用,且随着 OH-PBDEs 浓度的增加,促进作用逐渐增加,在实验设置的高浓度时具有显著的促进作用($P<0.05$);6-OH-BDE-137 与上述 3 种 OH-PBDEs 对 E3 代谢的影响略有不同,在实验设置的低浓度时对 E3 代谢具有显著的促进作用($P<0.05$),但随着实验添加浓度的增加,6'-OH-BDE-137 对 E3 代谢的促进作用逐渐降低。

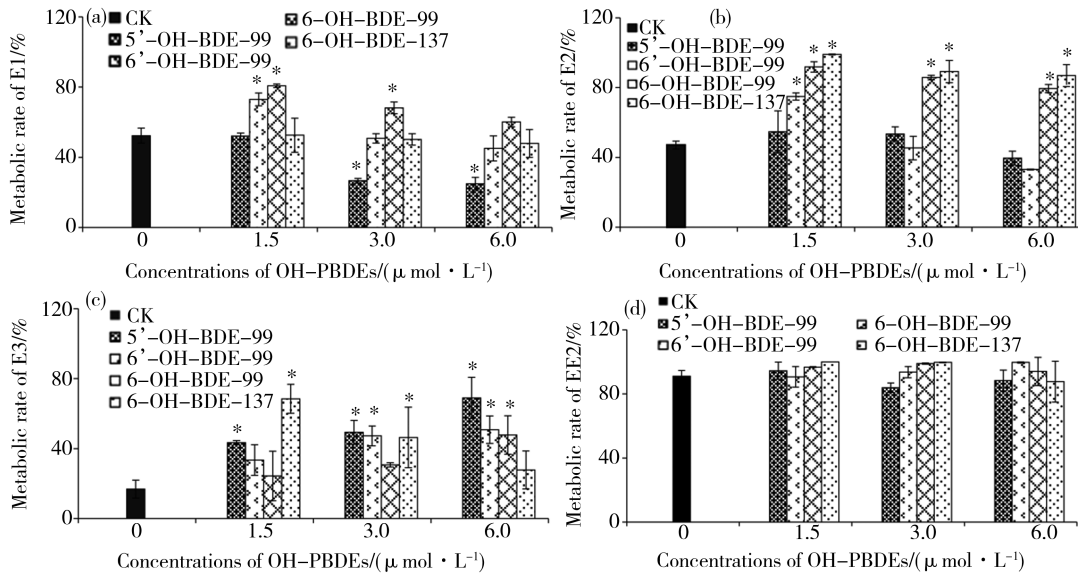


图 4 不同浓度 OH-PBDEs 对雌激素代谢的影响

注:CK 表示未添加 OH-PBDEs 时,孵育 2 h 后雌激素的代谢率;* 表示与对照相比有显著性差异($P<0.05$)。

Fig. 4 Effects of different concentrations of OH-PBDEs on metabolism of estrogens

Note: CK indicates metabolic rate of estrogen after 2 h incubation without OH-PBDEs; * indicates significant difference ($P<0.05$), compared with CK.

表 3 不同浓度 OH-PBDEs 对 E2 的代谢产物 2-OH-E2 产量影响

Table 3 Effects of different concentrations of OH-PBDEs on the production of 2-OH-E2

OH-PBDEs 的浓度/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	2-OH-E2 的产量/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			
Concentration of OH-PBDEs/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	Production of 2-OH-E2/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)			
	5'-OH-BDE-99	6'-OH-BDE-99	6-OH-BDE-99	6-OH-BDE-137
CK	0.88±0.13			
1.5	0.58±0.13	0.94±0.07	0.92±0.03	1.11±0.17
3.0	0.46±0.15	0.63±0.11	1.02±0.34	0.87±0.14
6.0	0.55±0.19	0.62±0.24	1.49±0.24	0.41±0.03

由于不同的雌激素是由不同的酶催化^[25], Kester 等^[24]报道了 OH-PBDEs 对 E2 磺基转移酶的抑制作用,导致 E2 硫酸化降低和内源性雌激素的生物利用度增加。因此不同结构和浓度的 OH-PBDEs 对 E1、E2、E3 代谢产生的不同效应,在一定程度上说明外源性物质可能对代谢雌激素的生物酶的活性位点产生作用,进而影响其代谢,但是具体如何影响将进一步研究。

雌激素的代谢途径较为复杂,最常见的有 2、6 α 、6 β 、15 α 、16 α 羟基化,17 β 羟基脱氢氧化以及 3-羟基硫酸酯化^[29]。为了进一步研究 OH-PBDEs 对雌激素代谢的影响,以 E2 为代表定量表征其代谢产物生成量,由于 2-OH-E2 是 E2 在 I 相酶中的主要代谢产物之一,能够评估外源性化合物对 E2 代谢的抑制^[30],因此,本研究利用外标法定量测定了 E2 代谢产物 2-OH-E2 的生成量,结果见表 3。与未添加 OH-PBDEs 的空白对照相比,5'-OH-BDE-99 能够抑制 2-OH-E2 的生成量,但是随着实验添加浓度的增加,抑制作用无明显差异;其余 3 种 OH-PBDEs 在实验设置的低浓度时对 2-OH-E2 的生成量具有促进作用,但随着实验添加浓度的增加,6'-OH-BDE-99 和 6-OH-BDE-137 抑制了 2-OH-E2 的生成量,且 6-OH-BDE-137 抑制能力更强,而 6-OH-BDE-99 随着实验添加浓度的增加促进作用反而增加,这表明 OH-PBDEs 的不同暴露水平对 2-OH-E2 的生成量存在差异,也间接表明对 E2 代谢途径的影响不同,有待于进一步研究。

通讯作者简介:张圣虎(1984-),男,博士,副研究员,主要从事环境污染物暴露评估和风险评估研究。

共同通讯作者简介:李江(1982-),男,博士,副教授,主要从事有机污染物效应及控制。

参考文献(References):

- [1] Usenko C Y, Hopkins D C, Trumble S J, et al. Hydroxylated PBDEs induce developmental arrest in zebrafish[J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2012, 262(1): 43-51
- [2] Macaulay L J, Chen A, Rock K D, et al. Developmental toxicity of the PBDE metabolite 6-OH-BDE-47 in zebrafish and the potential role of thyroid receptor β [J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 168(3): 38-47
- [3] Li T, Wang W, Pan Y W, et al. A hydroxylated metabolite of flame-retardant PBDE-47 decreases the survival, proliferation, and neuronal differentiation of primary cultured adult neural stem cells and interferes with signaling of ERK5 MAP kinase and neurotrophin 3 [J]. *Toxicological Sciences*, 2013, 134(1): 111-124
- [4] 施玉泉, 闻胜, 李敬光, 等. 固相萃取-超高效液相色谱-电喷雾离子源-串联质谱法测定人血中羟基化多溴联苯醚[J]. *中国食品卫生杂志*, 2012, 4(24): 317-321
Shi Y Q, Wen S, Li J G, et al. Determination of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in human blood by solid phase extraction-ultra-performance liquid chromatography-electrospray ionization-ion tandem mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Food Hygiene*, 2012, 4(24): 317-321 (in Chinese)
- [5] Legradi J, Pomeroy M V, Dahlberg A K, et al. Effects of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in developing zebrafish are indicative of disruption of oxidative phosphorylation [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2017, 18(5): 970
- [6] Liu D, Wu S M, Zhang Q, et al. Occurrence, spatial distribution, and ecological risks of typical hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in surface sediments from a large freshwater lake of China [J]. *Environmental Science & Pollution Research*, 2017, 24(6): 1-8
- [7] Fan Y, Lan J, Li H, et al. Spatial distributions of methoxylated and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in the East China Sea—A seaward increasing trend[J]. *Chemosphere*, 2014, 114(1): 247-254
- [8] Zhang K, Wan Y, Jones P D, et al. Occurrences and fates of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers in marine sediments in relation to trophodynamics [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46(4): 2148-2155
- [9] Malmberg T, Athanasiadou M, Marsh G, et al. Identification of hydroxylated polybrominated diphenyl ether metabolites in blood plasma from polybrominated diphenyl ether exposed rats [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(14): 5342-5348
- [10] Mizukawa H, Nomiyama K, Nakatsu S, et al. Organohalogen compounds in pet dog and cat: Do pets biotransform natural brominated products in food to harmful hydroxylated substances? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(1): 444-452
- [11] Zhu L, Ma B, Hites R A. Brominated flame retardants in serum from the general population in northern China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43 (18): 6963-6968
- [12] Morellofrosch R, Cushing L J, Jesdale B M, et al. Environmental chemicals in an urban population of pregnant women and their newborns from San Francisco [J]. *Euro-*

- pean Neurology, 2016, 43(2): 102-106
- [13] Wang Y, Liu S, Zhao H, et al. Polybrominated diphenylethers (PBDEs) and their hydroxylated metabolites (OH-PBDEs) in female serum from Dalian, China [J]. International Journal of Hygiene & Environmental Health, 2016, 219(8): 816-822
- [14] Wang H S, Chen Z J, Ho K L, et al. Hydroxylated and methoxylated polybrominated diphenyl ethers in blood plasma of humans in Hong Kong [J]. Environment International, 2012, 47(16): 66-72
- [15] 张易曦, 张芹, 吉贵祥, 等. 羟基化多溴联苯醚(OH-PBDEs)在小鼠肝脏 S9 中的体外代谢研究[J]. 环境科学学报, 2016, 36(9): 3480-3487
- Zhang Y X, Zhang Q, Ji G X, et al. Metabolism of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in mouse liver S9 *in vitro* [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2016, 36(9): 3480-3487 (in Chinese)
- [16] Li J, Zhang Y, Du Z, et al. Biotransformation of OH-PBDEs by pig liver microsomes: Investigating kinetics, identifying metabolites, and examining the role of different CYP isoforms [J]. Chemosphere, 2016, 148: 354-360
- [17] 赖永权, 陈学国, 蔡宗苇. 羟基多溴联苯醚(3'-OH-BDE-7)的大鼠体外肝代谢研究[J]. 环境化学, 2011, 30(1): 346-350
- Lai Y Q, Chen X G, Cai Z W. Liver metabolism of hydroxy polybrominated diphenyl ethers (3'-OH-BDE-7) in rats[J]. Environmental Chemistry, 2011, 30(1): 346-350 (in Chinese)
- [18] 张易曦, 张圣虎, 吴永贵, 等. 羟基化多溴联苯醚(OH-PBDEs)在小鼠肝脏微粒体的体外代谢及对 CYP450 酶活性的影响[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 693-701
- Zhang Y X, Zhang S H, Wu Y G, et al. Metabolism of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers (OH-PBDEs) in mouse liver microsomes *in vitro* and its effect on CYP450 enzyme activity [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2): 693-701 (in Chinese)
- [19] Qiu X, Bigsby R M, Hites R A. Hydroxylated metabolites of polybrominated diphenyl ethers in human blood samples from the United States [J]. Environmental Health Perspectives, 2009, 117(1): 93-98
- [20] Christopher L. The effects of brominated flame retardants on thyroid hormone homeostasis in human placenta tissues and cell culture [D]. Durham, North Carolina: Duke University, 2016
- [21] Simon C R. PBDE metabolism and effects on thyroid hormone regulation in human astrocytes [D]. Durham, North Carolina: Duke University, 2014
- [22] Kretschmer X C, Baldwin W S. CAR and PXR: Xenosensors of endocrine disruptors? [J]. Chemico-Biological Interactions, 2005, 155(3): 111-128
- [23] Hamers T, Kamstra J H, Sonneveld E, et al. Biotransformation of brominated flame retardants into potentially endocrine-disrupting metabolites, with special attention to 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47)[J]. Molecular Nutrition & Food Research, 2008, 52(2): 284-298
- [24] Kester M H A, Bulduk S, van Toor H, et al. Potent inhibition of estrogen sulfotransferase by hydroxylated metabolites of polyhalogenated aromatic hydrocarbons reveals alternative mechanism for estrogenic activity of endocrine disruptors [J]. Clinical Endocrinology & Metabolism, 2002, 87(3): 1142-1150
- [25] 程泽能, 周宏灏. 雌激素的代谢机制及其与疾病的相关性[J]. 中国临床药理学杂志, 2000, 16(4): 304-308
- Cheng Z N, Zhou H H. Metabolic mechanism of estrogen and its correlation with disease [J]. Chinese Journal of Clinical Pharmacology, 2000, 16(4): 304-308 (in Chinese)
- [26] Lai Y Q, Cai Z W. *In vitro* metabolism of hydroxylated polybrominated diphenyl ethers and their inhibitory effects on 17 β -estradiol metabolism in rat liver microsomes[J]. Environmental Science & Pollution Research, 2012, 19(8): 3219-3227
- [27] 谢晴. 多溴联苯醚及其羟基化衍生物的环境光化学转化[D]. 大连: 大连理工大学, 2011
- Xie Q. Environmental photochemical conversion of polybrominated diphenyl ethers and their hydroxylated derivatives [D]. Dalian: Dalian University of Technology, 2011
- [28] Shimada K, Masue T, Chiba H. Application of inclusion chromatography to the determination of *in vitro* metabolites of estriol [J]. Journal of Chromatographic Science, 1989, 27: 557-560
- [29] Shou M, Korzekwa K R, Brooks E N, et al. Role of human hepatic cytochrome P450 1A2 and 3A4 in the metabolic activation of estrone [J]. Carcinogenesis, 1997, 18: 207-214
- [30] Usmani K A, Cho T M, Rose R L, et al. Inhibition of the human liver microsomal and human cytochrome P450 1A2 and 3A4 metabolism of estradiol by deployment-related and other chemicals [J]. Drug Metabolism & Disposition, 2006, 34(9): 1606-1614