

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190301003

牛玥, 朱敏, 刘芃岩, 等. 双酚 A 替代品与双酚 A 对非洲爪蛙急性毒性及其应激响应的比较[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(2): 141-148

Niu Y, Zhu M, Liu P Y, et al. Comparison on acute toxicity and stress induction of bisphenol A with its substitutes to *Xenopus laevis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(2): 141-148 (in Chinese)

双酚 A 替代品与双酚 A 对非洲爪蛙急性毒性及其应激响应的比较

牛玥^{1,2}, 朱敏^{1,3}, 刘芃岩², 秦占芬^{1,3,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002

3. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2019-03-01 录用日期: 2019-04-17

摘要: 双酚 F(bisphenol F, BPF)和双酚 AF(bisphenol AF, BPAF)作为双酚 A(bisphenol A, BPA)的替代品已被投入生产和使用,然而目前有关 BPA 替代品毒性的数据还很缺乏。本文从急性毒性和应激响应 2 个方面比较了 BPF、BPAF 与 BPA 对非洲爪蛙蝌蚪的毒性。结果表明,48 h 的半致死浓度(LC₅₀)顺序为 BPF(11.01 mg·L⁻¹)>BPA(7.54 mg·L⁻¹)>BPAF(2.87 mg·L⁻¹);对氧化应激水平的影响 BPAF 强于 BPA, BPF 与 BPA 相近;BPA 和 BPAF 对热休克蛋白基因表达水平有影响, BPF 没有影响。本研究提示, BPAF 作为 BPA 的替代品,其毒性强于 BPA,而 BPF 与 BPA 类似。

关键词: 双酚 A; 双酚 F; 双酚 AF; 非洲爪蛙; 急性毒性; 氧化应激; 热休克蛋白

文章编号: 1673-5897(2020)2-141-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Comparison on Acute Toxicity and Stress Induction of Bisphenol A with Its Substitutes to *Xenopus laevis*

Niu Yue^{1,2}, Zhu Min^{1,3}, Liu Pengyan², Qin Zhanfen^{1,3,*}

1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecological Toxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. School of Chemistry and Environmental Sciences, Hebei University, Baoding 071002, China

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 1 March 2019 accepted 17 April 2019

Abstract: Bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF) have been used as bisphenol A (BPA) substitutes, but little is known about their toxic effects. In this study, we compared acute toxicity and stress induction between BPF/BPAF and BPA in *Xenopus laevis* tadpoles. It is found that 48 h-LC₅₀ values of BPA and its substitutes were BPF (11.01 mg·L⁻¹) > BPA (7.54 mg·L⁻¹) > BPAF (2.87 mg·L⁻¹). The oxidative stress induction of BPAF on *X. laevis* tadpoles was stronger than that of BPA and BPF. In addition, BPA has more remarkable effects on the expression of heat shock protein gene than BPF, and BPAF has little effects. Our study indicates that BPA is less harmful

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2017YFF0211203); 国家自然科学基金面上项目(21876196)

作者简介: 牛玥(1995—), 女, 硕士, 研究方向为生态毒理学, E-mail: 296046855@qq.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: qinzhanchen@rcees.ac.cn

than BPAF, and is close to BPA.

Keywords: bisphenol A; bisphenol F; bisphenol AF; *Xenopus laevis*; acute toxicity; oxidative stress; heat shock protein

双酚 A(bisphenol A, BPA)是全球大量生产的化学品之一,主要用于生产聚碳酸酯塑料和环氧树脂^[1]。动物和人类通过多种途径暴露于这种化学物质^[2]。动物试验研究表明,BPA 在生物体生殖、发育和神经功能等方面具有毒性效应^[3-5],近几年的流行病学调查数据也表明,BPA 与人类某些疾病相关^[6],所以,一些国家和政府开始限制 BPA 的使用范围。相应地,BPA 类似物开始作为 BPA 的替代品被投入生产和使用,如双酚 F(bisphenol F, BPF)、双酚 S(bisphenol S, BPS)、双酚 AF(bisphenol AF, BPAF)等。BPA 替代品在多种环境介质、生物样品乃至人体样品中都有检出^[7-9],因此,BPA 替代品的安全性受到越来越广泛的关注。

BPA 替代品与 BPA 的化学结构相似^[10],可能存在与 BPA 类似的效应,已有文献报道 BPF、BPS 有与 BPA 类似的激素活性^[11],可产生内分泌干扰效应^[12]。资料显示,BPA 对大鼠、小鼠和兔的经口暴露半致死剂量(LD₅₀)分别为 240、3 250 和 2 230 mg·kg⁻¹^[13-14];BPF 对大鼠的经口暴露 LD₅₀ 为 4 950 mg·kg⁻¹^[13-14]。李圆圆等^[15]发现,BPA 和 BPF 对黑斑蛙蝌蚪的半致死浓度(LC₅₀)分别为 9.00 和 9.52 mg·L⁻¹;任文娟等^[16]报道了 BPA、BPF 和 BPAF 对斑马鱼的 LC₅₀ 分别为 8.09、9.51 和 2.47 mg·L⁻¹。当生物体暴露于化学品时,生物体为保护自身免受损伤而做出一系列的应激响应^[17],如氧化应激与热休克反应。在生物体内谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)、谷胱甘肽转移酶(glutathione transferase, GST)和硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)等是氧化应激的良好指标^[18]。热休克蛋白(heat shock proteins, HSPs)是生物体在不良环境因素作用下所产生的一组特殊的蛋白质,能维持细胞稳态应对环境变化,从而起到分子伴侣的作用。HSPs 基因一般主要分为 *hsp90*、*hsp70*、*hsp60* 和小 *hsp* 共 4 个家族。氧化应激与热休克反应是应激响应的主要组分,是生态毒理学中用来评价化学品毒性的常用指标^[18]。许多体外和动物试验表明,BPA 可以诱导生物体释放活性氧产生氧化应激^[18-19]。Jain 等^[20]研究发现,BPA 暴露导致大鼠体内活性氧水平升高,产生氧化

应激。还有研究表明,BPA 不但能够改变秀丽隐杆线虫幼虫中 GST 活性,还能够改变蜗牛体内 *hsp70* 和 *hsp90* 的表达^[17,21]。流行病学研究表明,人体尿液中 BPA 的浓度与氧化应激水平相关^[22-24]。

本文选用两栖动物非洲爪蛙作为实验材料,通过研究 LC₅₀、氧化应激和热休克蛋白相关基因转录水平,比较 BPA 及替代品对非洲爪蛙的急性毒性以及其引起的蛙体的应激响应,从而进一步分析 BPA 及替代品的生态风险,同时为 BPA 及替代品的毒性研究提供有效数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验动物

本实验室饲养的非洲爪蛙的成年雌蛙和雄蛙,分养于盛有去氯自来水的玻璃缸中,水温(22±2)℃,明暗光周期为 12 h:12 h。成蛙喂食 1:1 配比的猪肝和商品饲料,喂食 2 h 后换水,每周 2 次。

非洲爪蛙雌蛙皮下注射 300~500 IU 促黄体素释放激素(LHRH)和人绒毛膜促性腺激素(HCG),雄蛙注射 200~300 IU 的上述激素。将雌雄蛙放于产卵容器中,置于黑暗、安静的环境中让其抱对,12 h 左右即可产卵。受精卵在(22±1)℃的去氯自来水中孵化,胚胎发育至 48 期的蝌蚪,进行暴露试验。

1.2 试剂与仪器

仪器和设备:高速冰冻离心机(5810/5810R, Eppendorf, 德国);PCR 仪(MiniAmp, Applied Biosystem, 美国);荧光定量 PCR 仪(MX3500P, Strata gene, 美国);组织碾磨仪(MM301, Retsch, 德国);涡旋混匀器(VORTEX 2, WIGGENS, 美国);全自动核酸提取仪(AU1001, 北京百泰克生物技术有限公司);电子天平(JA2003B, 上海越平科技仪器有限公司);移液器(Eppendorf, 德国);全自动凝胶成像仪(GBOX-HR, Syn Gene, 英国);普通 PCR 仪(My Cycler TM, BIO-RAD, 美国);电泳仪(DYCP-31F, 北京六一仪器厂)。

试剂:BPA(CAS No. 80-05-7, 纯度 97%, ACROS Organics, 分子量 228.29);BPF(CAS No. 620-92-8, 纯度>99%, 东京化成工业, 分子量 200.24);BPAF(CAS No. 1478-61-1, 纯度 99%, 北京百灵威科技有限公司, 分子量 336.23);二甲基亚砜(DMSO, CAS No. 67-68-5, 纯度≥99.5%, Sigma-Aldrich, 美

国);核酸染料(G-red)和 RNA 提取试剂盒(北京百泰克生物技术有限公司);反转录试剂盒 Fast Quant RT Kit 和 RT-qPCR 试剂盒 Super Real Pre Mix Plus (SYBR Green)kit(天根生化科技有限公司,北京);PCR 引物(华大基因,北京)。

1.3 非洲爪蛙蝌蚪急性毒性试验

BPA、BPF 和 BPAF 用助溶剂 DMSO 配成 100 g·L⁻¹的储备液。设置溶剂对照组,其中溶剂的浓度与最高浓度处理组溶剂浓度相同,溶剂的体积浓度不超过 0.01%。暴露实验在玻璃缸内进行,每个缸盛有 1 L 暴露液,蝌蚪随机放入 10 尾。每隔 24 h 换一次水,清除死亡个体,记录死亡数,实验持续 48 h。

在正式实验之前先对 3 种化学物质进行较大浓度范围(0.1、1、10、100 和 1 000 mg·L⁻¹)的预试验,不设平行组,各浓度的缸中加入 10 尾蝌蚪,观察记录 48 h 蝌蚪死亡数。根据预试验得出的结果,设置正式试验浓度。正式试验以 1.2 为公比设置 5 个浓度梯度(表 1)和溶剂对照组,每组 3 个平行,每个缸中随机加入 10 尾蝌蚪。其他同预实验,重复 2 次正式试验。

表 1 双酚 A (BPA)、双酚 F (BPF) 和双酚 AF (BPAF) 的浓度设置

Table 1 Concentration of bisphenol A (BPA), bisphenol F (BPF) and bisphenol AF (BPAF)

测试化学品 Test chemical	正式试验暴露浓度/(mg·L ⁻¹) Exposure concentration/(mg·L ⁻¹)
BPA	10.00、8.33、6.94、5.79、4.82
BPF	15.00、12.50、10.42、8.68、7.23
BPAF	4.00、3.33、2.78、2.31、1.93

1.4 RNA 提取和 RT-qPCR

每个缸随机取 2 尾蝌蚪,全自动核酸提取仪提取 RNA,超微量分光光度计测定 RNA 浓度,用琼脂糖凝胶电泳来确定 RNA 完整性。然后根据 Fast Quant RT Kit(with g DNase)说明书配制 20 μL 反应体系进行反转录。

根据 SYBR Green PCR Kit 说明,配制 10 μL 反应体系进行 RT-qPCR。PCR 程序为:95 ℃ 预变性 15 min,40 个循环扩增(95 ℃ 变性 10 s、退火 20 s、72 ℃ 延伸 20 s)。每个基因在使用之前都进行了扩增效率的验证,计算公式为 $E=(10^{-1/\text{slope}}-1)\times 100$ 。扩增效率在 90% ~ 110% 之间、溶解曲线单一且重

合、不存在非特异性扩增的基因时,可用于后续实验。进行基因表达分析时,以 *tp18* 为管家基因对各个基因的表达进行标准化^[25]。基因的相对表达量根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算^[26]。引物及相关信息如表 2 所示。

1.5 数据统计

用 SPSS 16.0 进行数据分析。统计单元为缸,即 *n* 值等于平行缸数^[27]。重复 2 次正式试验,得到相似的结果,在文中只呈现其中一次的试验数据^[28]。回归分析使用 Probit,建立“剂量-效应”线性方程,并计算 LC₅₀ 值及其 95% 置信区间。统计数据均以平均值±标准误(standard error of mean, SEM)表示。暴露组与各自的对照相比,显著性差异采用单因素方差(one-way ANOVA)分析,*P* 值<0.05 认为有显著性差异。

2 结果 (Results)

2.1 非洲爪蛙蝌蚪急性毒性试验

溶剂对照组中非洲爪蛙蝌蚪无死亡,试验质量控制良好。BPA、BPF 和 BPAF 暴露组蝌蚪均有不同程度的死亡(图 1)。24 h 时,4.82 mg·L⁻¹ BPA、7.23 mg·L⁻¹ BPF 和 1.93 mg·L⁻¹ BPAF 暴露组的蝌蚪存活率分别为 93.33%、83.33% 和 100%,10.00 mg·L⁻¹ BPA 暴露组蝌蚪的存活率为 20%,15.00 mg·L⁻¹ BPF 和 4.00 mg·L⁻¹ BPAF 暴露组蝌蚪的存活率相同,均为 0%。48 h 时,5.79 mg·L⁻¹ 的 BPA 暴露组中蝌蚪的存活率由 24 h 的 76.67% 下降到 73.33%,12.50 mg·L⁻¹ 的 BPF 暴露组的蝌蚪存活率与 24 h 时相比下降了 16.67%,其他浓度暴露组的蝌蚪存活率不变。观察蝌蚪死亡现象时发现,15.00 mg·L⁻¹ BPF 暴露组实验开始不久,蝌蚪沉到水底,很快死亡,其他浓度 BPF 暴露组的部分蝌蚪也出现了上述现象,并清楚看到存活蝌蚪的腮充血,在显微镜下观察发现,存活蝌蚪心脏的血液回流缓慢甚至堵塞。暴露于 4.00 mg·L⁻¹ BPAF 的蝌蚪,先是快速没有规律地游动,同时皮肤迅速发白,很快死亡,这种现象随暴露组浓度的降低而消失。10.00 mg·L⁻¹ BPA 暴露组的蝌蚪,行动迟缓,最终死亡,其他浓度 BPA 暴露组的部分蝌蚪也出现该现象,暴露组浓度越低该现象越不明显。

经统计分析得到 BPA、BPF 和 BPAF 对蝌蚪的 24 h-LC₅₀ 分别为 7.59、11.58 和 2.87 mg·L⁻¹;48 h-LC₅₀ 分别为 7.54、11.01 和 2.87 mg·L⁻¹(表 3)。毒性强弱顺序为 BPAF>BPA>BPF。

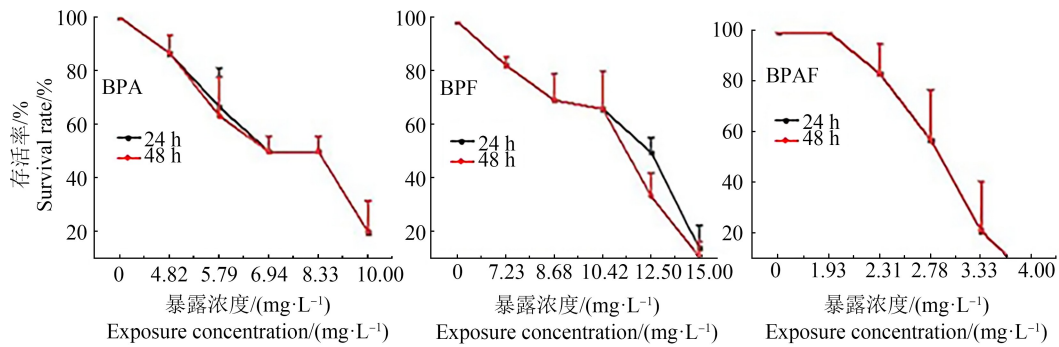


图 1 BPA、BPF 和 BPAF 暴露后非洲爪蛙蝌蚪的存活率

Fig. 1 Survival rates of *Xenopus laevis* tadpoles after exposure to BPA, BPF and BPAF

表 2 RT-qPCR 引物及相关信息

Table 2 Primers sequences and relevant information for RT-qPCR

基因名称 Gene	引物序列(5'~3') Primer sequences (5'~3')	产物大小/bp Product size/bp	退火温度/℃ Annealing temperature/℃
<i>rpl8</i>	F: AGAAAGGGTGCTGCTAAG	471	60
	R: GATGGGTTTGTCATACG		
<i>gr</i>	F: TGGCTATTTCACCGACTTCCT	89	60
	R: TTGTCTATCAGTGCTTGTGCTT		
<i>gst</i>	F: AAGAGGCGGTATTCGGTCAG	118	60
	R: TCATCATGGCTCCAGTCAGT		
<i>txn</i>	F: GGATGTGGCTCAACTCTGTG	82	60
	R: ACTGAACCGCTCAACCTCTT		
<i>gpx</i>	F: TGTGGACCAGAAATCGGTGG	123	60
	R: AGGTACTTCCCTTGGTAGGCT		
<i>hsp27</i>	F: GCCTCATCGCTTTCTCCTGA	120	60
	R: GCCTCGGATGTGCCAATTC		
<i>hsp70</i>	F: TTAGAACCGGCCATAGCACA	79	60
	R: GAAGACACCCACACAGGAGT		
<i>hsp90</i>	F: ACTAGCAGACAAGATGCCAGAA	142	60
	R: GATGATCAGGGACATCAACTGC		

表 3 BPA、BPF 和 BPAF 对非洲爪蛙蝌蚪的 LC₅₀ 及其 95% 置信区间和回归方程

Table 3 LC₅₀, 95% confidence interval and regression equations of BPA, BPF and BPAF to *Xenopus laevis* tadpoles

测试化学品 Test chemical		LC ₅₀ [95% 置信区间] LC ₅₀ [95% confidence interval]	回归方程 Regression equations
24 h	BPA	7.59[6.94,8.35]	y = -4.22+0.56 x
	BPF	11.58[10.68,12.65]	y = -4.75+0.41 x
	BPAF	2.87[2.73,3.02]	y = -10.40+3.63 x
48 h	BPA	7.54[6.88,8.31]	y = -4.10+0.54 x
	BPF	11.01[10.20,11.89]	y = -5.27+0.48 x
	BPAF	2.87[2.73,3.02]	y = -10.40+3.63 x

注:LC₅₀ 及其 95% 置信区间的单位为 mg·L⁻¹。

Note: The unit of LC₅₀ and its 95% confidence interval is mg·L⁻¹.

2.2 BPA 及替代品对非洲爪蛙蝌蚪体内氧化应激相关基因转录水平的影响

RT-qPCR 结果表明(图 2),暴露 48 h 后,4.82 ~ 10.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 和 7.23 ~ 12.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPF 显著上调蝌蚪体内 *gr*、*gst* 和 *trx* 这 3 种基因的转录水平,呈线性剂量-效应关系。8.68 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPF 暴露组蝌蚪体内 *gst* 的相对表达量远高于 8.33 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露组。8.68 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPF 暴露组蝌蚪体内 *gr* 和 *trx* 的表达量与 8.33 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露组类似。4.82 ~ 10.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 显著下调蝌蚪体内 *gpx* 的转录水平,7.23 ~ 8.68 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPF 与 4.82 ~ 10.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 类似,但 12.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPF 显著上调 *gpx* 的转录水平,呈现高浓度促进低浓度抑制的趋势。BPAF 暴露组蝌蚪体内 *gst* 和 *gr* 基因的相对表达量与 BPAF 暴露浓度呈“倒 U 型”关系,浓度分别为 2.78 和 2.31 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,*gst* 和 *gr* 的相对表达量最高。2.31 ~ 3.33 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPAF 显著上调蝌蚪体内 *trx* 和 *gpx* 的转录水平,呈线性剂量-效应关系。

2.3 BPA 及替代品对非洲爪蛙蝌蚪体内热休克蛋白转录水平的影响

RT-qPCR 结果表明(图 3),暴露 48 h 后,4.82 ~ 8.33 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 显著下调蝌蚪体内 *hsp27* 和 *hsp90* 的转录水平,4.82 ~ 10.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 对蝌蚪体内 *hsp70* 的转录水平没有显著影响。与 BPA 不同,7.23 ~ 12.50 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPF 对蝌蚪体内 *hsp27*、*hsp70* 和 *hsp90* 的表达均没有显著影响,但 15.00 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPF 显著抑制 *hsp27* 和 *hsp90* 的表达水平。2.31 ~ 3.33 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPAF 显著上调蝌蚪体内 *hsp70* 和 *hsp90* 的转录水平,呈线性剂量-效应关系,但对蝌蚪体内 *hsp27* 基因没有显著影响。

3 讨论 (Discussion)

检测结果表明,BPA 及替代品对非洲爪蛙蝌蚪的 48 h- LC_{50} 排序为:BPF(11.01 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)>BPA(7.54 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)>BPAF(2.87 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$)。根据危险化学品分类准则^[29],BPA 和 BPAF 对非洲爪蛙的毒性为中等毒性,BPF 对非洲爪蛙的毒性略低于中等毒性标准。

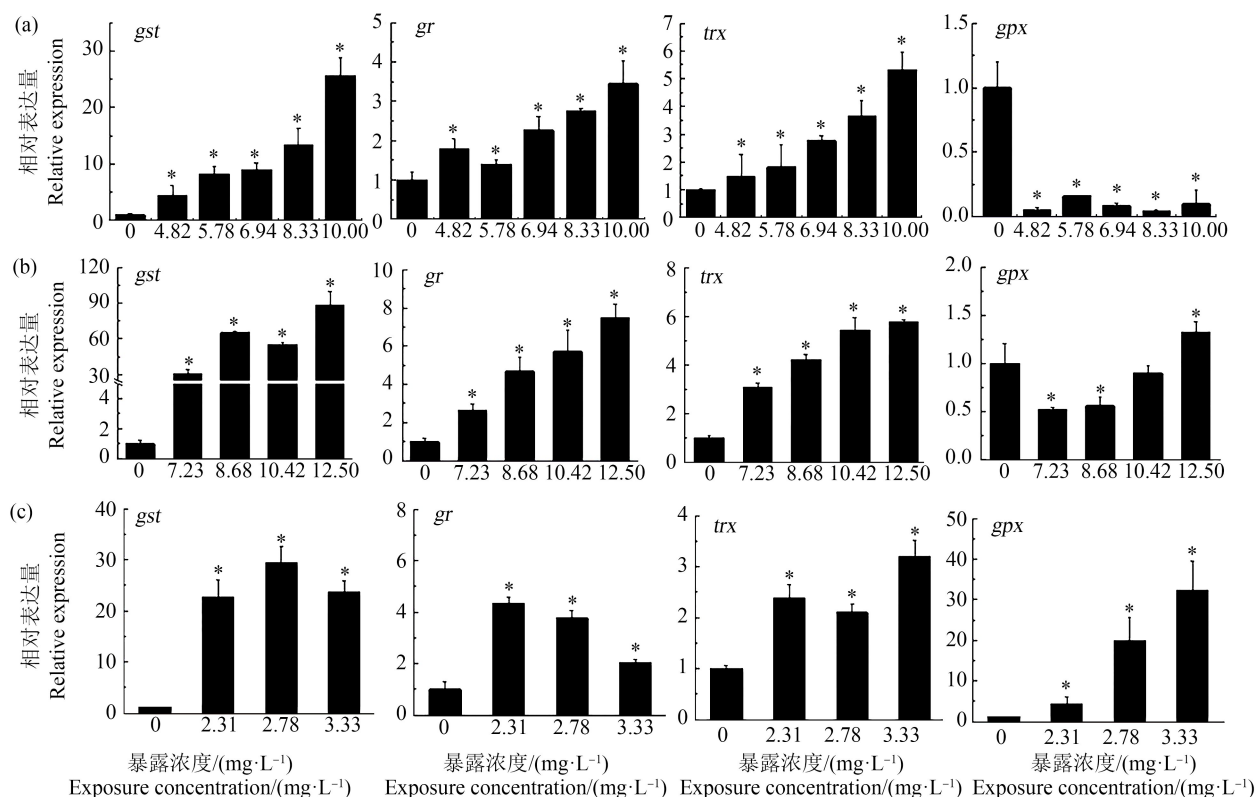


图2 BPA(a)、BPF(b)和BPAF(c)对非洲爪蛙蝌蚪的氧化应激相关基因转录水平的影响

注: *表示 $P < 0.05$ 。

Fig. 2 Oxidative stress related gene transcription level of *Xenopus laevis* tadpoles after exposure to BPA (a), BPF (b) and BPAF (c)

Note: * represents $P < 0.05$.

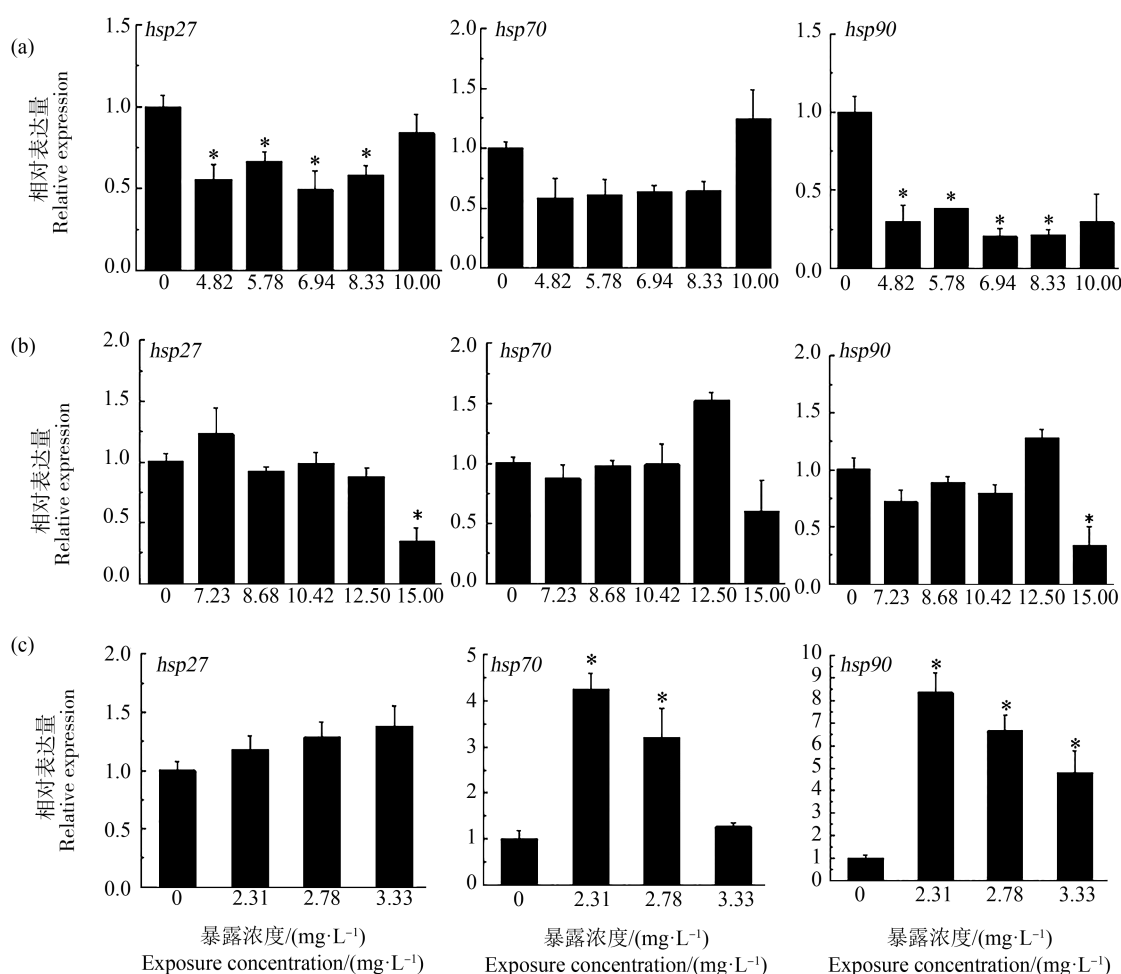


图3 BPA (a)、BPF (b) 和 BPAF (c) 对非洲爪蛙蝌蚪的热休克蛋白转录水平的影响

注: * 表示 $P < 0.05$ 。

Fig. 3 Transcriptional levels of heat-shock protein of *Xenopus laevis* tadpoles after exposure to BPA (a), BPF (b) and BPAF (c)

Note: * represents $P < 0.05$.

最近的研究表明,BPA 及替代品对黑斑蛙和斑马鱼的毒性均为中等毒性^[15-16]。

BPA 和 BPF 对非洲爪蛙蝌蚪体内氧化应激相关基因 *gr*、*gst* 和 *trx* 转录水平的影响呈线性剂量-效应关系。对比 BPF 与 BPA 相似浓度暴露组(如 $8.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPF 暴露组与 $8.33 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 暴露组)蝌蚪体内 *gst*、*gr* 和 *trx* 的相对表达量后,发现 BPF 暴露组蝌蚪体内的 *gst* 基因的相对表达量高于 BPA 暴露组,BPF 暴露组蝌蚪体内 *gr* 和 *trx* 的相对表达量与 BPA 暴露组类似。整体来看,BPF 对蝌蚪体内氧化应激水平的影响与 BPA 相近。分析 BPAF 和 BPA 暴露组数据发现, $2.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPAF 暴露组中蝌蚪体内 *gst*、*gr* 和 *trx* 基因的相对表达量与 $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 暴露组类似,此结果说明 $2.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPAF 与 $10.00 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPA 产生类似的氧

化应激效应,所以 BPAF 对蝌蚪体内氧化应激水平的影响强于 BPA。另发现,BPA 及替代品对蝌蚪体内 *gpx* 基因表达水平的影响有所不同。BPA 暴露组蝌蚪体内 *gpx* 表达被显著下调; $12.50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BPF 显著上调蝌蚪体内 *gpx* 的表达水平, $7.23 \sim 8.68 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 则显著下调 *gpx* 的表达水平;BPAF 显著上调蝌蚪体内 *gpx* 基因的表达水平,呈线性剂量-效应关系。有研究表明,暴露于不同重金属污染物的生物体内 *gpx* 的表达水平表现为双向效应(降低或增加),主要取决于污染物种类^[20-35]。这可能为 BPA 及替代品对蝌蚪体内 *gpx* 转录水平的不同影响提供合理的解释。综合考虑以上结果,BPF 对非洲爪蛙体内氧化应激水平的影响与 BPA 相近,BPAF 强于 BPA。

BPA 及替代品对非洲爪蛙蝌蚪体内热休克蛋

白表达的影响结果表明,BPA暴露组($10.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 除外)蝌蚪体内 *hsp27* 和 *hsp90* 的表达被显著下调。Morales 等^[21]研究发现,蜗牛暴露于 100 和 $500\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BPA 48 h 后,体内 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的转录水平下降。还有研究表明,秀丽隐杆线虫暴露于 250 和 $500\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ BPA 24 h 后,体内的 *hsp70* 基因表达下调^[17]。以上研究的实验物种和 BPA 暴露浓度与本实验不同,但 BPA 对生物体内热休克蛋白的影响与本研究 BPA 的实验结果类似。此外,BPF、BPAF 对蝌蚪体内热休克蛋白的影响与 BPA 不一致; $7.23\sim 12.50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BPF 对蝌蚪体内热休克蛋白的表达水平没有显著影响, $15.00\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BPF 显著下调 *hsp27* 和 *hsp90* 的表达;BPAF 对蝌蚪体内 *hsp27* 的表达没有显著影响,但 BPAF 显著上调蝌蚪体内 *hsp70* 和 *hsp90* 的表达,呈线性剂量-效应关系。总体来看,BPA 和 BPAF 均影响蝌蚪体内热休克蛋白的表达水平,而 BPF 对蝌蚪体内热休克蛋白表达没有显著影响。

综上所述,BPA 及替代品对非洲爪蛙蝌蚪的毒性强弱顺序为:BPAF>BPA>BPF;BPAF 对非洲爪蛙体内氧化应激水平的影响最大,BPF 与 BPA 相近;BPA 和 BPAF 显著影响非洲爪蛙体内热休克蛋白表达水平,BPF 没有影响显著影响。本文可为 BPA 及替代品的生产和使用以及相应的环境管理提供毒理学参考数据。

通讯作者简介:秦占芬(1971—),女,环境科学博士,研究员,主要研究方向为新型 POPs 的生殖和发育毒性以及基于两栖动物的化学品毒性评价方法。

参考文献 (References):

- [1] Michałowicz J. Bisphenol A—Sources, toxicity and biotransformation [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2014, 37(2): 738-758
- [2] Chen D, Kannan K, Tan H, et al. Bisphenol analogues other than BPA: Environmental occurrence, human exposure, and toxicity—A review [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(7): 5438-5453
- [3] Richter C A, Birnbaum L S, Farabollini F, et al. *In vivo* effects of bisphenol A in laboratory rodent studies [J]. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(2): 199-224
- [4] Bonefeld-Jorgensen E C, Long M H, Hofmeister M V, et al. Endocrine-disrupting potential of bisphenol A, bisphenol A dimethacrylate, 4-n-nonylphenol, and 4-n-octylphenol *in vitro*: New data and a brief review [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(Suppl 1): 69-76
- [5] Crain D A, Eriksen M, Iguchi T, et al. An ecological assessment of bisphenol-A: Evidence from comparative biology [J]. *Reproductive Toxicology*, 2007, 24(2): 225-239
- [6] Rochester J R. Bisphenol A and human health: A review of the literature [J]. *Reproductive Toxicology*, 2013, 42(8): 132-155
- [7] Song S, Song M, Zeng L, et al. Occurrence and profiles of bisphenol analogues in municipal sewage sludge in China [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 186: 14-19
- [8] Yamazaki E, Yamashita N, Taniyasu S, et al. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 122: 565-572
- [9] Zhou X, Kramer J P, Calafat A M, et al. Automated on-line column-switching high performance liquid chromatography isotope dilution tandem mass spectrometry method for the quantification of bisphenol A, bisphenol F, bisphenol S, and 11 other phenols in urine [J]. *Journal of Chromatography B*, 2014, 944: 152-156
- [10] Liao C, Liu F, Moon H B, et al. Bisphenol analogues in sediments from industrialized areas in the United States, Japan, and Korea: Spatial and temporal distributions [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46 (21): 11558-11565
- [11] Rosenmai A K, Dybdahl M, Pedersen M, et al. Are structural analogues to bisphenol A safe alternatives? [J]. *Toxicological Sciences*, 2014, 139(1): 35-47
- [12] Rochester J R, Bolden A L. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(7): 643-650
- [13] National Institutes of Health (NIH). U.S. national library of medicine and toxicology data network, 4,4'-methylenebis(phenol) [EB/OL]. (2014-04-28) [2019-03-01]. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemid-plus/ProxyServlet?ObjectHandle=DBM aint & action Handle = default & next Page = jsp /chemidlite /Result-Screen. jsp &TXTSUPER-LISTID=0000620928>
- [14] U.S. Environmental Protection Agency (US EPA). U.S. Environmental Protection Agency substance registry services [EB/OL]. (2014-04-28) [2019-03-01]. http://ofmpub.epa.gov/sor_internet/registry/substreg/searchandretrieve/advancedsearch/search.do?Details=displyDetails
- [15] 李圆圆, 付旭锋, 赵亚娟, 等. 双酚A 与其替代品对黑斑蛙急性毒性的比较 [J]. *生态毒理学报*, 2015, 10(2): 251-257

- Li Y Y, Fu X F, Zhao Y X, et al. Comparison on acute toxicity of bisphenol A with its substitutes to *Pelophylax nigromaculatus* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 251-257 (in Chinese)
- [16] 任文娟, 汪贞, 杨先海, 等. 双酚 A 及其类似物对斑马鱼成鱼及胚胎的急性毒性[J]. 生态与农村环境学报, 2017, 33(4): 372-378
- Ren W J, Wang Z, Yang X H, et al. Acute toxicity effect of bisphenol A and its analogues on adult and embryo of zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 33(4): 372-378 (in Chinese)
- [17] Tan L, Wang S, Wang Y, et al. Bisphenol A exposure accelerated the aging process in the nematode *Caenorhabditis elegans* [J]. Toxicology Letters, 2015, 235: 75-83
- [18] Srikanth K, Pereira E, Duarte A C, et al. Glutathione and its dependent enzymes' modulatory responses to toxic metals and metalloids in fish—A review [J]. Environmental Science Pollution Research, 2013, 20: 2133-2149
- [19] Xin F, Jiang L, Liu X, et al. Bisphenol A induces oxidative stress-associated DNA damage in INS-1 cells [J]. Mutation Research-Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis, 2014, 769: 29-33
- [20] Jain S, Kumar C H, Suranagi U D, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on bisphenol A-induced cognitive dysfunction and oxidative stress in rats [J]. Food and Chemical Toxicology, 2011, 49: 1404-1409
- [21] Morales M, Martínez-Paz P, Sánchez-Argüello P, et al. Bisphenol A (BPA) modulates the expression of endocrine and stress response genes in the freshwater snail *Physa acuta* [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2018, 152: 132-138
- [22] Hong Y C, Park E Y, Park M S, et al. Community level exposure to chemicals and oxidative stress in adult population [J]. Toxicology Letters, 2009, 184: 139-144
- [23] Yang Y J, Hong Y C, Oh S Y, et al. Bisphenol A exposure is associated with oxidative stress and inflammation in postmenopausal women [J]. Environmental Research Letters, 2009, 109: 797-801
- [24] Zhang T, Xue J C, Gao C Z, et al. Urinary concentrations of bisphenols and their association with biomarkers of oxidative stress in people living near e-waste recycling facilities in China [J]. Environmental Science & Technology, 2016, 50: 4045-4053
- [25] Lou Q, Cao S, Xu W, et al. Molecular characterization and mRNA expression of ribosomal protein L8 in *Rana nigromaculata* during development and under exposure to hormones [J]. Journal of Environmental Sciences, 2014, 26(11): 2331-2339
- [26] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method [J]. Methods, 2001, 25(4): 402-408
- [27] Festing M F, Altman D G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals [J]. ILAR Journal, 2002, 43(4): 244-258
- [28] Buchholz D R, Hayes T B. Variation in thyroid hormone action and tissue content underlies species differences in the timing of metamorphosis in desert frogs [J]. Evolution & Development, 2010, 7(5): 458-467
- [29] 国家质量监督及检验检疫总局、国家标准化管理委员会. 化学农药环境安全评价试验准则(2008 年报批稿) [S]. 北京: 国家质量监督及检验检疫总局、国家标准化管理委员会, 2008
- [30] Kim S J, Jung H J, Hyun D H, et al. Glutathione reductase plays an anti-apoptotic role against oxidative stress in human hepatoma cells [J]. Biochimie, 2010, 92(8): 927-932
- [31] Dorval J, Leblond V, Deblois C, et al. Oxidative stress and endocrine endpoints in white sucker (*Catostomus commersoni*) from a river impacted by agricultural chemicals [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24: 1273-1280
- [32] Zhang J F, Liu H, Sun Y Y, et al. Responses of the antioxidant defenses of the gold fish *Carassius auratus*, exposed to 2,4-dichlorophenol [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19: 185-190
- [33] Sanchez W, Palluel O, Meunier L, et al. Copper-induced oxidative stress in three-spined stickle-back: Relationship with hepatic metal levels [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19: 177-183
- [34] Ahmad I, Oliveira M, Pacheco M, et al. oxidative stress biomarkers responses to copper exposure with or without β -naphthoflavone pre-exposure [J]. Chemosphere, 2005, 61: 267-275
- [35] Miller L L, Wang F, Palace V P, et al. Effect of acute and subchronic exposures to waterborne selenite on the physiological stress response and oxidative stress indicators in juvenile rainbow trout [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 83: 263-271