

## DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20191114001

李嘉伟, 尹晓宇, 周旖妮, 等. 五溴联苯醚(BDE-99)和羟基五溴联苯醚(5-OH-BDE-99)经由 THRβ 影响斑马鱼胚胎眼部色素的沉着[J]. 生态毒理 学报,2020, 15(5): 181-188

Li J W, Yin X Y, Zhou Y N, et al. BDE-99 and 5-OH-BDE-99 affect the pigmentation of the eyes of zebrafish embryos via  $\text{THR}\beta$ [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(5): 181-188 (in Chinese)

# 五溴联苯醚(BDE-99)和羟基五溴联苯醚(5-OH-BDE-99)经由 THRβ 影响斑马鱼胚胎眼部色素的沉着

## 李嘉伟, 尹晓宇, 周旖妮, 杨景峰, 董武\*

内蒙古民族大学动物科学技术学院,内蒙古自治区毒物监控及毒理学重点实验室,通辽 028000 收稿日期:2019-11-14 录用日期:2020-01-08

**摘要:** 多溴联苯醚及其羟基代谢物(OH-BDEs)被认为是内分泌干扰物,特别是对甲状腺激素调节的影响。调查并比较了 BDE-99 及 5-OH-BDE-99 对甲状腺素受体的影响。斑马鱼胚胎暴露于不同浓度的 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 中,导致斑马鱼眼 球黑色素的色素沉着减少,使用原位杂交以及定量 PCR 方法检测,发现 *THR*β 在斑马鱼前脑部位表达,并有明显的降低。通 过体外实验也证实 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 能够与 THRβ 受体结合,尤其是 5-OH-BDE-99 的结合更为强烈。研究表明,BDE-99 和 5-OH-BDE-99 对斑马鱼胚胎早期 THRβ 的活性有干扰作用,并导致眼部黑色素沉积减少。上述研究结果对 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 的生物毒理学机制研究有一定的借鉴意义。

关键词: PBDE;斑马鱼胚胎;色素沉着;THRβ;BDE-99;5-OH-BDE-99

文章编号:1673-5897(2020)5-181-08 中图分类号:X171.5 文献标识码:A

# BDE-99 and 5-OH-BDE-99 Affect the Pigmentation of the Eyes of Zebrafish Embryos via THR $\beta$

Li Jiawei, Yin Xiaoyu, Zhou Yini, Yang Jingfeng, Dong Wu\*

College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, Inner Mongolia Key Laboratory of Toxicant Monitoring and Toxicology, Tongliao 028000, China

Received 14 November 2019 accepted 8 January 2020

Abstract: Polybrominated diphenyl ethers and their hydroxyl metabolites (OH-BDEs) are considered to be endocrine disruptors. They are found in human serum and particularly involved in the regulation of thyroid hormones. The effects of BDE-99 and 5-OH-BDE-99 on the thyroxine receptors were investigated and compared in this study. Zebrafish embryos were exposed to different concentrations of BDE-99 and 5-OH-BDE-99. The results showed that exposure to BDE-99 and 5-OH-BDE-99 resulted in reduced pigmentation in the eyes of zebrafish embryos. In situ hybridization and quantitative PCR analyses revealed that *THR* $\beta$  was expressed in the forebrain and its transcriptional expression was significantly suppressed by the two chemicals. In addition, *in vitro* experiments demon-

基金项目:国家自然科学基金资助项目(21267015,81360508,21567019);内蒙古民族大学特色交叉学科群建设项目(MDXK008);内蒙古毒物监控及毒理学重点实验室开放课题项目(MDK2019074);内蒙古民族大学研究生科研创新项目(NMDSS1860)

第一作者:李嘉伟(1994—),男,硕士研究生,研究方向为毒理学,E-mail: lijiaweihonor@163.com

<sup>\*</sup> 通讯作者(Corresponding author), E-mail: dongwu@imun.edu.cn

strated that BDE-99 and 5-OH-BDE-99 successfully bound to the THR $\beta$  receptor. This study indicates that BDE-99 and 5-OH-BDE-99 can disturb the thyroid endocrine system by altering the the expression of *THR* $\beta$  in zebrafish. This study helps better understand the mechanisms of the toxicity of BDE-99 and 5-OH-BDE-99 in zebrafish. **Keywords**: PBDE; zebrafish embryos; pigmentation; THR $\beta$ ; BDE-99; 5-OH-BDE-99

多溴联苯醚(PBDEs)是一类含溴原子的芳香族 化合物,根据溴原子在苯环上的取代位置和个数的 不同,多溴联苯醚共有209种同分异构体,由于其独 特的理化性质,PBDEs 是世界上使用最广泛的阻燃 剂之一<sup>[1]</sup>,在工业制造过程中,PBDEs 被人为添加到 复合材料中,使其不易燃烧。目前,PBDEs 被广泛 应用于电子电器设备、自动控制设备、建筑材料和纺 织品等的制造中<sup>[2]</sup>。虽然,PBDEs 作为阻燃剂使用 成本低廉,但是其在环境中不易降解而长期存在,使 其被归类为新型持久性环境有机污染物<sup>[3]</sup>。近年 来,PBDEs 所造成的影响被越来越多的国内外研究 者重视,在动物体内、水环境中和土壤中均检测出有 PBDEs 的存在。Brown 等<sup>[4]</sup>在美国加利福尼亚州沿 海水域中鱼体内检测出 43 种 PBDEs,浓度达到了 302 ng·g<sup>-1</sup>。在英国内陆水域鱼体中 PBDEs 的检出 量也达到了8 ng·kg<sup>-1[5]</sup>。除了在水生生物中检测出 PBDEs,在陆生生物体中也检测出不同浓度的 PB-DEs 含量。Guo 等<sup>61</sup>在禽类消化液中检测出 BDE-209 高达715 µg·g<sup>-1</sup>; Boyles 和 Nielsen<sup>[7]</sup>在不同年龄 性别的浣熊肝脏组织中也发现了有 PBDEs 的存在; 甚至有研究者在野生大熊猫血液中也检测出了 PB-DEs 的存在<sup>[8]</sup>。在最新研究中,PBDEs 在母乳中也被 检测出来<sup>19</sup>。PBDEs 作为新型有机污染物在环境中 的持久存在,可能会对人体尤其是胎儿产生危害[10]。

已有研究表明,PBDEs 具有一系列毒性作用, 包括内分泌紊乱<sup>[11]</sup>、肝脏毒性<sup>[12]</sup>、生殖毒性、神经毒 性<sup>[13-14]</sup>和发育毒性<sup>[11,15-16]</sup>。Balch 等<sup>[17]</sup>在非洲爪蛙 覆膜内注射 BDE-47、BDE-99 以及 DE-71,发现 3 种 物质会对非洲爪蛙皮肤色素沉着有影响,并且会产 生变态反应;而在腹腔注射 BDE-47、BDE-99 以及 DE-71 后发现变态反应的机制可能与甲状腺激素与 转运蛋白的结合有关。在 Macaulay 等<sup>[18]</sup>的研究中 提到,甲状腺激素部分介导斑马鱼的变态转变,而羟 基化 BDE(OH-BDEs)会破坏甲状腺的信号介导,从 而延缓斑马鱼的发育,也会对斑马鱼鳔、鱼鳍及色素 沉着产生影响。在 Macaulay 等<sup>[11]</sup>的另一项关于 OH-BDEs 的研究中,斑马鱼胚胎暴露于 6-OH-BDE 后发现,6-OH-BDE 使斑马鱼眼部色素沉着降低,并 使 *THRβ* mRNA 表达降低,表明 6-OH-BDE 会对斑 马鱼早期发育产生不利影响。Zezza 等<sup>[1]</sup>也提到了 BDE-47、BDE-99 和 BDE-209 会使 *THRβ* mRNA 表 达量下降,从而导致斑马鱼发育异常。目前国内外 学者并没有充分研究和对比 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 对斑马鱼眼部色素及甲状腺激素的影响及其相 关关系。

斑马鱼作为实验动物模型,具有快速、敏感和容易操作等特点,且其可利用资源极其丰富,因而被广泛应用。使用斑马鱼胚胎评价 PBDE 的毒性及其作用机制,具有独特优势。本研究中,针对 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 进行了对比研究,评估二者对斑马鱼眼部色素以及相关甲状腺受体的影响,探讨眼部色素与 THRβ 的关联。为 BDE-99 及 5-OH-BDE-99 的 毒性研究提供一定的参考数据。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

## 1.1 斑马鱼胚胎收集

成年 AB 系斑马鱼(*Danio rerio*),在循环水养殖 系统中进行繁育(北京爱生科技发展公司),雌雄鱼 分开进行饲喂,每天 14 h:10 h 的光暗周期。养殖温 度(28±1) ℃,pH 值 7.0 ~7.6。实验时挑选出优质健 康的性成熟斑马鱼,按照雌雄斑马鱼 1:2的比例放入 交配缸中,等到第 2 天早上开灯,斑马鱼见光后开始 产卵,并收集胚胎,放入斑马鱼培养液(ZR 液)中,并 放置在 28 ℃培养箱中孵化。

## 1.2 暴露方法

BDE-99 和 5-OH-BDE-99 购买于 Accustandard, 纯度>99.5%,通过二甲基亚砜(DMSO)溶解来制备 浓度为 1 mmol·L<sup>-1</sup>的储备溶液作为原液。暴露溶 液通过用鱼类养殖系统水从原液中进行梯度稀释, DMSO 的最终浓度<0.1%。斑马鱼胚胎暴露于 1、 10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup> 3 种浓度的 BDE-99 和 5-OH-BDE-99,暴露从 4 hpf 开始直到观察为止。

## 1.3 THRβ 重组蛋白的制备

将斑马鱼甲状腺受体 THRβ-LBD 通过组氨酸 标记后(作为带有 N-末端 His 标记的蛋白),亚克隆 到 pET-21b,在大肠杆菌 BL21 细胞中过表达 (Rosetta (DE3)pLysS cells (Novagen)),于 500 mL LB 培养基中培养(100  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>的氨苄西林和 34  $\mu$ g·mL<sup>-1</sup>氯霉素),温度控制在 18 °C,加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导蛋白并持续在 18 °C,加入 1 mmol·L<sup>-1</sup> IPTG 诱导蛋白并持续在 18 °C下培养 20 h。4 000 g 离心 30 min 收集细胞,可在-80 °C冷冻保存。用 5 mL 裂解缓冲液重悬细胞(50 mmol·L<sup>-1</sup> Tris、pH 8.0、 300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、12 mmol·L<sup>-1</sup> 2-巯基乙醇、10% 甘油和不含 EDTA 的蛋白酶抑制剂)并在冰上进行 超声处理(15 s 超声,4 次)。裂解物在 14 000 g、4 °C 下离心 10 min,之后将上清液加载到 Ni-NTA 树脂 (Qiagen)上,甲状腺受体用 250 mmol·L<sup>-1</sup>咪唑洗脱。 蛋白浓度通过 Bradford 分析法(BioRad)测定。通过 SDS-PAGE 和 Western blot(单克隆抗体 C3,Covance) 评估甲状腺素受体纯度(图 1)。

## 1.4 偏振光及其竞争性结合检测

利用 Levy-Bimbot 等<sup>[19]</sup>的方法,使用 JZ01 探针 (0.5 nmol·L<sup>-1</sup>)和甲状腺激素受体(TR)结合,可以直 接通过偏振光(fluorescence polarization, FP)检测 FP 强度与 THR $\beta$  浓度的关系。JZ01 提供了一种简便 的、非辐射性的竞争性比较,TR 作为检测结合力的 配体。将 JZ01 在 DMSO 中的溶解,制备 0.7 mmol· L<sup>-1</sup>的储备液,将其用缓冲液(50 mmol·L<sup>-1</sup>磷酸钠、 150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl、1 mmol·L<sup>-1</sup> DTT、1 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA、0.01% Nonidet P-40 和 10% 甘油;pH 7.2)稀 释。TR 溶液配制成为 0.3 ~ 1 000 nmol·L<sup>-1</sup>的不同 浓度。90  $\mu$ L TR 溶液的等分试样与 10  $\mu$ L 的 0.5 nmol·L<sup>-1</sup> JZ01 溶液混合,室温下孵育 1 h,通过 96 孔板进行检测,每个反应进行 3 个重复。偏振光强 度在 Fusion 读板仪上测量(Perkin-Elmer, excitation (485 nmol·L<sup>-1</sup>), emission (535 nmol·L<sup>-1</sup>))。制备 1 nmol·L<sup>-1</sup>~1  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>的卵白蛋白溶液作为对照。 1.5 整体原位杂交

当斑马鱼胚胎达到实验所需要的发育阶段,将 其固定在 4% (w/V)多聚甲醛(产品编号 158127 -500G, Sigma)的磷酸盐缓冲溶液(PBS)中(pH 7.4)过 夜,用PBS清洗后浸泡于100%甲醇中,可放置于 -20℃冰箱中储存。整体原位杂交(WISH)是按照 Dong 等<sup>[20]</sup>的方法进行。基本原理是斑马鱼胚胎与 1 161 个碱基对斑马鱼甲状腺激素受体 β(THRβ)的 反义杂交链结合。然后使用以下引物进行克隆并且 做 THRB 探针(正向引物为5'-ATGTCAGAGCAAG-CAGACAAATGC-3';反向引物为5'-TTCCTG-GAAGTGTTTGAAGAC-3'),在 64 ℃杂交过夜后, 胚胎用 2×SSC(300 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl(产品编号 S7653-5KG, Sigma), 30 mmol·L<sup>-1</sup> 柠檬酸钠(产品编号 71497-250G, Sigma), pH 7.0), 然后用 0.2×SSC 分别 洗3次,每次30min。接下来的胚胎是用2%的封 闭剂封闭(Roche, Mannheim, Germany;产品编号 10057177103)。使用2 mL 10% 封闭缓冲液加8 mL 马来酸配成封闭液,对 DIG 抗体进行 3 000×稀释, 然后在4℃用3000×稀释的 DIG 抗体与碱性磷酸 酶偶联 (Roche, Mannheim, Germany; 产品编号 11082736103)。最后进行显色反应,通过与 BM-Purple 底物(Roche, Mannheim, Germany;产品编号 11442074001)发色。



pET32-THR beta -LBD

图 1 THRβ-LBD 准备和确认 注:(a) THRβ-LBD 设计;(b) SDS-page;(c) 免疫印迹,箭头表示净化 THRβ。 Fig. 1 Preparation and confirmation for THRβ-LBD Note: (a) THRβ-LBD design; (b) SDS-page; (c) Western blot, arrows indicate purified THRβ.

## 1.6 色素强度的测定

用 OLYMPUS 光学显微镜(IX73)、数码相机 (DP80)和映像软件(cellSens Standard)记录 *THRβ* mRNA 表达。调整到显微镜能够清晰辨认 *THRβ* 表达位点,并且在 Zfish 图集上选择适当年龄的斑 马鱼(http://zfatlas.psu.edu/progress.php)。为了量化 *THRβ* 表达的强度,由 Image J 分析软件(National Institutes of Health Bethesda, USA)分析得到强度的总 和。接下来,将轮廓移到相邻的区域/组织,确定强 度。使用总强度除以 ROI 像素面积,计算平均强度。 1.7 总 RNA 提取、cDNA 生成和基因表达分析

使用 TRIzol 试剂处理完整的胚胎,从整体斑马 鱼胚胎中提取总 RNA (Grand Island;产品编号 12183-555)。RNA 样品的质量通过测量 260/280 nm 处的吸收率。纯化的总 RNA 立即用于 cDNA 合 成。cDNA 的产生是用高容量 cDNA 反转录试剂盒 (Applied Biosystems Inc;产品编号 4368814)进行,方 法按照厂家说明书进行, cDNA 样本使用前将其保 持在-20 ℃冷冻。使用 TaqMan 进行基因表达测定 和基因表达分析(Applied Biosystems Inc;产品编号 4331182)。反转录加入 0.2 ng cDNA 后进行反应与 TaqMan Universal PCR Master Mix 混合,并使用 Applied Biosystems 7900HT 进行 PCR 检测,用 Sequence Detection System 2.0 软件分析。样品的 THR 基因 (正向引物为5'-TGTCTCTTCGAGCAGCAGTG-3'、 反向引物为5'-GCCACCTCTGAATCGTCCAA-3')表 达数据使用 18s RNA 作为内参基因(正向引物为 5'-TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG-3',反向引物为5'-CGGAGGTTCGAAGACGATCA-3'),以此补偿在胚 胎之间 RNA 量的内在变异性。

1.8 统计分析

所有表达数据均表示为平均值±SEM,使用 GraphPad Prism software 进行统计分析。差异的显 著性使用单向方差分析。P<0.05 的情况下被认为 是统计学上的差异显著。

## 2 结果(Results)

BDE-99 和 5-OH-BDE-99 对斑马鱼胚胎眼部色 素有强烈抑制作用,为研究这种抑制机制,首先定量 了斑马鱼胚胎眼部色素强度,之后探讨了引起色素 降低的起因。笔者发现与三碘甲状腺原氨酸(T3)结 合的甲状腺素受体 THRβ 的功能失调是主要原因之 一。其中,一种原因是 BDE-99 或 5-OH-BDE-99 都 与 T3 竞争性结合 THRβ,造成 T3 功能的紊乱,另一 个原因 BDE-99 或 5-OH-BDE-99 都可以造成 THRβ 基因表达的降低。

2.1 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 对斑马鱼眼部色素 的抑制作用

在实验室条件下,正常斑马鱼眼部色素沉着开 始于22 hpf,之后色素沉着水平逐渐增加,到96 hpf 达到最大值。选择36 hpf 作为测量和比较的参考 点。在这项研究中,笔者最初选择斑马鱼整体色素 来定量,但发现不便于检测。眼睛色素沉着整体均 匀,容易定量检测,故选择了眼部作为评价的标准。 BDE-99 和5-OH-BDE-99 暴露显著降低了胚胎36 hpf 时眼睛色素沉着(图2)。相对于对照组,1、10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup>的 BDE-99 染毒组中眼睛色素沉着分 別減少18.2%(P>0.5)、31.3%(P<0.05)和32.3%(P< 0.05)(图2(a)~图2(d))。同样,1、10 和100 nmol·L<sup>-1</sup> 5-OH-BDE-99 暴露也可显著减少眼睛色素沉着,分 别降低了9%(P>0.05)、36.3%(P<0.05)和46.1%(P< 0.05)(图2(e)~图2(g))。当胚胎发育到60 hpf,眼睛 色素沉着仍然与36 hpf 有相似降低趋势。

## 2.2 THRβ与 BDE-99和 5-OH-BDE-99的结合作用

为检测 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 与 THRβ 的竞 争性结合能力<sup>[21]</sup>,用 JZ01 作为探针与 THRβ 结合发 出的偏振光强度与 THRβ 的浓度呈现正相关。而竞 争性配体 T3 能够让这种增强的偏振光降低(图 3 (b))。类似地,BDE-99 和 5-OH-BDE-99 也能够让偏 振光降低,尤其是 5-OH-BDE-99 与 T3 具有极其相 似的曲线趋势,表明 5-OH-BDE-99 具有与 T3 相互 竞争的可能性。

2.3 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 对 *THR*β 基因表达的影响

为检测 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 对斑马鱼胚 胎 *THR*β 的影响,将 4 hpf 斑马鱼胚胎暴露于 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 溶液中直至胚胎发育到 30 hpf 或 60 hpf 后实施处理。分别使用 WISH 和 RT-PCR 检测了 *THR*β mRNA 表达。WISH 方法的检测结果 证明了暴露于 1、10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup> BDE-99 和 5-OH-BDE-99 的斑马鱼胚胎,其 *THR*β mRNA 表达显 著降低,表达位置主要位于脑室周围区域(前脑)。 RT-PCR 定量检测结果显示, *THR*β mRNA 表达随 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 暴露浓度的增加而降低(1、 10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup>)。在 30 hpf 时,2 种化合物都表现 为显著降低效应(*P*<0.05)(图 4(h)), *THR*β mRNA 表达 均降低至 70.6% 以下(*P*<0.05)。在 60 hpf 时(图 4(i)),



## 图 2 多溴联苯醚 (PBDEs) 降低眼睛色素沉着强度

注:胚胎暴露于 BDE-99 或 5-OH-BDE-99(4 ~ 36 hpf);用 ImageJ 对眼部色素沉着水平进行量化;(a) 对照组,(b) ~ (d) BDE-99 暴露组, (e) ~ (g) 5-OH-BDE-99 暴露组,(h) 每组 30 个胚胎的色素强度(综合密度)的柱状图;\*表示每个浓度组分别与对照组相比,差异有统计学意义(P<0.05)。 Fig. 2 Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) decrease pigmentation intensity in eyes Note: Embryos were exposed to BDE-99 or 5-OH-BDE-99 from 4 to 36 hpf; eye pigmentation levels were quantified by ImageJ; (a) control group, (b) ~ (d) BDE-99 exposure groups, (e) ~ (g) 5-OH-BDE-99 exposure groups; (h) histograms of pigment

intensity (integrated density) established from quantification of 30 embryos per group; \* indicate significant differences (P<0.05).

THRβ-LBD Fluorescence polarization (FP) 300 (a) 卵清蛋白 Ovalbumin 偏振光强度(FP) 250 200 150 100 -13 -12 -11 -10 -9 -14 -8-7 -6 -5-4 -3  $\log C_{\text{THR}\beta\text{-LBD ligand}}$ OBDE-99 (c) ▲ 5-OH-BDE-99 Fluorescence polarization (FP) 240 偏振光强度(FP) 210 180 150 -2 -12 -11 -10 -9 -6 -5 -4 -3 13 -8 -7

 $\log C_{_{\mathrm{THR}\beta\text{-LBD ligand}}}$ 



#### 图 3 THRβ 与 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 的结合作用

注:(a) 用 THRβ 和卵清蛋白对照对 JZ01(0.5 nmol·L<sup>-1</sup>)的偏振光滴定;(b)~(c) 用三碘甲状腺原氨酸(T3) (10 nmol·L<sup>-1</sup>), BDE-99 (10 nmol·L<sup>-1</sup>)和 5-OH-BDE-99(10 nmol·L<sup>-1</sup>)进行 JZ01 (0.1 nmol·L<sup>-1</sup>)和 THRβ (20 nmol·L<sup>-1</sup>)的竞争性滴定; LBD 表示配体结合域;THRβ -LBD ligand 浓度单位为 mol·L<sup>-1</sup>。

Fig. 3 Binding effect of THR $\beta$  with BDE-99 and 5-OH-BDE-99

Note: (a) fluorescence polarization titration of JZ01 (0.5 nmol·L<sup>-1</sup>) with THR $\beta$  and ovalbumin control; (b) ~ (c) competitive titration of JZ01 (0.1 nmol·L<sup>-1</sup>) and THR $\beta$  (20 nmol·L<sup>-1</sup>) with triiodothyronine (T3) (10 nmol·L<sup>-1</sup>), BDE-99 (10 nmol·L<sup>-1</sup>),

and 5-OH-BDE-99 (10 nmol·L<sup>-1</sup>); LBD stands for ligand binding domain; the unit of THR $\beta$  -LBD ligand concentration is mol·L<sup>-1</sup>.

暴露于 BDE-99 的斑马鱼胚胎, *THR* $\beta$  mRNA 表达随着浓度增加(1、10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup>)都表现降低,具有统计学意义(P<0.05),均降低至 72.2% 以下。在 60 hpf 时,暴露于 5-OH-BDE-99 的斑马鱼胚胎, *THR* $\beta$  mRNA 表达在 10 nmol·L<sup>-1</sup>和 100 nmol·L<sup>-1</sup>剂量下显 著降低(P<0.05),与对照组相比,浓度均降低至 53.7% 以下,而 1 nmol·L<sup>-1</sup>剂量下没有显著差异(P>0.05)。

## 3 讨论(Discussion)

本研究结果表明,斑马鱼胚胎暴露于 BDE-99 或 5-OH-BDE-99,导致斑马鱼眼部色素沉着减少, *THRβ* 表达降低,尤其是 5-OH-BDE-99 在体外能够 与 THRβ 有效结合,这表明 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 有可能在体内与 T3 有竞争性结合而产生不利作 用,进而造成甲状腺激素调解失调。甲状腺激素 (THs)是非常重要的一种激素,能够调节许多细胞功 能<sup>[22-23]</sup>,THs 不仅是脊椎动物变形的诱因,也对中央 神经系统起到至关重要的作用<sup>[24-27]</sup>。*THR* $\alpha$ 与*THR* $\beta$ 介导 THs 的调节, *THR* $\beta$  mRNA 表达量降低致使 THs 分泌减少,造成机体发育迟缓以及其他影响<sup>[28]</sup>。

## 3.1 眼部色素沉着降低

Arbogast 等<sup>[29]</sup>报道了 *THRβ* mRNA 在小鼠视网 膜中的表达,免于因甲状腺激素水平的波动使视网 膜受到影响,起到保护视网膜的作用。此外,*THRβ* mRNA 在啮齿动物胚胎的视网膜外核层中表达<sup>[30]</sup>, Dong 等<sup>[20]</sup>使用 6-OH-BDE-47 对斑马鱼进行暴露, 发现了色素降低的类似现象,这可能是视网膜细胞 凋亡的原因,并进一步阐明凋亡机理可能是 PBDE 导致 *THRβ* mRNA 表达量下降造成的。色素沉积 的降低与甲状腺素受体有密切关联,在本研究中也 证实了这一点,*THRβ* mRNA 表达量的下降可能是 眼部色素沉着降低的原因之一。当非洲爪蟾暴露于 C-BDE-99(特定放射性 49 Ci,即1 813 GBq·(mol· L<sup>-1</sup>)<sup>-1</sup>与 BDE-99),1.5 d 后在视网膜黑色素层中发



## 图 4 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 降低了斑马鱼胚胎大脑中 THRβ mRNA 的表达

注:胚胎从 4 hpf 暴露于 BDE-99 或 5-OH-BDE-99 至 30 hpf 或 60 hpf;(a) ~ (g)为 30 hpf 斑马鱼胚胎;(a)为对照组,(b) ~ (g)为暴露组,与对照相比, 暴露组中胚胎大脑出现突出蓝色,显示出在 1、10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup>浓度组 *THR*β mRNA 表达降低,红色箭头指示表达的定位; (h)、(i)表示分别在 30 hpf 和 60 hpf 时 *THR*β 的 qRT-PCR 结果的柱状图,1、10 和 100 nmol·L<sup>-1</sup> BDE-99 和 5-OH-BDE-99 暴露组 与对照显著不同;\* 表示每个浓度组分别与对照相比,差异有统计学意义(*P*<0.05);使用 3 个重复,每个重复 20 个胚胎。 Fig. 4 BDE-99 and 5-OH-BDE-99 decreased *THR*β mRNA expression in the brain of zebrafish embryo Note: Embryos were exposed from 4 hpf to 30 hpf or 60 hpf to BDE-99 or 5-OH-BDE-99; (a) ~ (g) shows the zebrafish embryo at 30 hpf;

(a) is control group, (b)  $\sim$  (g) are exposure groups; compared to control group,

the prominent blue coloration was observed in the brain of embryos exposed to BDE-99 or 5-OH-BDE-99, showing that the  $THR\beta$  mRNA

 $expression \ was \ decreased \ at \ 1, \ 10 \ and \ 100 \ nmol \cdot L^{-1} \ respectively; \ red \ arrows \ indicate \ localization \ of \ expression; \ (h), \ (i) \ show \ histogram \ hi$ 

of the quantitative PCR (qRT-PCR) for THR $\beta$  at 30 hpf and 60 hpf, respectively; the results of the 1, 10 and 100 nmol·L<sup>-1</sup>

BDE-99 and 5-OH-BDE-99 exposure groups were significantly different from the control;

\* P<0.05 indicates the significant differences from the control; 3 replicates of 20 embryos each were used.

现放射性物质,表明眼部区域产生了 BDE-99 的积累,导致色素沉着的降低<sup>[31]</sup>。在笔者的研究中, BDE-99 或 5-OH-BDE-99 导致斑马鱼眼部色素沉着 减少,推测鱼体内的 BDE-99 和 5-OH-BDE-99 最后 也会在眼部积累,造成色素沉着降低,进而导致 BDE-99 或 5-OH-BDE-99 对色素沉着产生影响,但 具体是否造成视网膜细胞的凋亡,还有必要进一步 研究。

3.2 色素沉着与甲状腺激素的关联

Wu 等<sup>[32]</sup>使用 BDE-99 对斑马鱼染毒之后发现, BDE-99 使斑马鱼体内 T3 含量下降,甲状腺素(T4) 含量上升,并且造成转录组水平发生改变,后代存活 率降低,体长和畸形率升高。这说明,母本斑马鱼暴 露于 BDE-99 会导致后代发育毒性和甲状腺功能衰 竭。这与笔者的研究结果相符,BDE-99 或 5-OH-BDE-99 造成斑马鱼眼部色素沉着以及 *THRβ* mR-NA 表达量下降,也进一步证实了 THRβ 与眼部色 素沉着之间的联系。

综上所述,研究发现,暴露于 BDE-99 或 5-OH-BDE-99 造成斑马鱼胚胎眼中的黑色素色素沉着强 度降低,这种降低可能是由于 BDE-99 或 5-OH-BDE-99 与 T3 竞争性地与 THRβ 结合,造成甲状腺 素的调节紊乱。

通讯作者简介:董武(1969—),男,博士,教授,主要研究方向 为环境毒理学。

### 参考文献(References):

- [1] Zezza D, Tait S, Della Salda L, et al. Toxicological, gene expression and histopathological evaluations of environmentally realistic concentrations of polybrominated diphenyl ethers PBDE-47, PBDE-99 and PBDE-209 on zebrafish embryos [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 183: 109566
- [2] McDonald T A. A perspective on the potential health risks of PBDEs [J]. Chemosphere, 2002, 46(5): 745-755
- [3] Giraudo M, Douville M, Letcher R J, et al. Effects of food-borne exposure of juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) to emerging brominated flame retardants 1,2-bis(2,4,6-tribromophenoxy) ethane and 2-ethylhexyl-2,3,4,5-tetrabromobenzoate[J]. Aquatic Toxicology, 2017, 186: 40-49
- [4] Brown F R, Winkler J, Visita P, et al. Levels of PBDEs, PCDDs, PCDFs, and coplanar PCBs in edible fish from California coastal waters [J]. Chemosphere, 2006, 64(2):

276-286

- [5] Rose M, Fernandes A, Mortimer D, et al. Contamination of fish in UK fresh water systems: Risk assessment for human consumption [J]. Chemosphere, 2015, 122: 183-189
- [6] Guo H, Zheng X, Ru S, et al. The leaching of additivederived flame retardants (FRs) from plastics in avian digestive fluids: The significant risk of highly lipophilic FRs
   [J]. Journal of Environmental Sciences, 2019, 85: 200-207
- Boyles E, Nielsen C K. PBDEs and dechloranes in raccoons in the Midwestern United States [J]. Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology, 2017, 98(6): 758-762
- [8] Chen Y P, Zheng Y J, Liu Q, et al. PBDEs (polybrominated diphenyl ethers) pose a risk to captive giant pandas
   [J]. Environmental Pollution, 2017, 226: 174-181
- [9] Wemken N, Drage D S, Cellarius C, et al. Emerging and legacy brominated flame retardants in the breast milk of first time Irish mothers suggest positive response to restrictions on use of HBCDD and Penta- and Octa-BDE formulations [J]. Environmental Reseach, 2019, 180: 108805
- [10] Yin S, Guo F, Aamir M, et al. Multicenter biomonitoring of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in colostrum from China: Body burden profile and risk assessment [J]. Environmental Research, 2019, 179: 108828
- [11] 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 beta [J]. Aquatic Toxicology, 2015, 168: 38-47
- [12] Yang J, Zhao H, Chan K M. Toxic effects of polybrominated diphenyl ethers (BDE-47 and 99) and localization of BDE-99 induced *cyp1a* mRNA in zebrafish larvae [J]. Toxicology Reports, 2017, 4: 614-624
- [13] Chen L, Yu K, Huang C, et al. Prenatal transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) results in developmental neurotoxicity in zebrafish larvae [J]. Environmental & Science Technology, 2012, 46(17): 9727-9734
- [14] Wang F, Fang M, Hinton D E, et al. Increased coiling frequency linked to apoptosis in the brain and altered thyroid signaling in zebrafish embryos (*Danio rerio*) exposed to the PBDE metabolite 6-OH-BDE-47 [J]. Chemosphere, 2018, 198: 342-350
- [15] Linares V, Belles M, Domingo J L. Human exposure to PBDE and critical evaluation of health hazards [J]. Archives of Toxicology, 2015, 89(3): 335-356
- [16] Abolaji A O, Kamdem J P, Lugokenski T H, et al. Involvement of oxidative stress in 4-vinylcyclohexene-in-

duced toxicity in *Drosophila melanogaster* [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2014, 71: 99-108

- [17] Balch G C, Velez-Espino L A, Sweet C, et al. Inhibition of metamorphosis in tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) [J]. Chemosphere, 2006, 64(2): 328-338
- [18] Macaulay L J, Chernick M, Chen A, et al. Exposure to a PBDE/OH-BDE mixture alters juvenile zebrafish (*Danio rerio*) development [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2017, 36(1): 36-48
- [19] Levy-Bimbot M, Major G, Courilleau D, et al. Tetrabromobisphenol-A disrupts thyroid hormone receptor alpha function *in vitro*: Use of fluorescence polarization to assay corepressor and coactivator peptide binding [J]. Chemosphere, 2012, 87(7): 782-788
- [20] Dong W, Macaulay L J, Kwok K W, et al. The PBDE metabolite 6-OH-BDE-47 affects melanin pigmentation and *THRβ* mRNA expression in the eye of zebrafish embryos [J]. Endocrine Disruptors, 2014, 2(1): e969072
- [21] Zheng J, Hashimoto A, Putnam M, et al. Development of a thyroid hormone receptor targeting conjugate [J]. Bioconjugate Chemistry, 2008, 19(6): 1227-1234
- [22] Benvenuti S, Luciani P, Cellai I, et al. Thyroid hormones promote cell differentiation and up-regulate the expression of the seladin-1 gene in *in vitro* models of human neuronal precursors [J]. Journal of Endocrinology, 2008, 197 (2): 437-446
- [23] Xing W, Govoni K E, Donahue L R, et al. Genetic evidence that thyroid hormone is indispensable for prepubertal insulin-like growth factor-I expression and bone acquisition in mice [J]. Journal of Bone and Mineral Research, 2012, 27(5): 1067-1079
- [24] Helbing C C, Bailey C M, Ji L, et al. Identification of gene expression indicators for thyroid axis disruption in a

Xenopus laevis metamorphosis screening assay. Part 1. Effects on the brain [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 82(4): 227-241

- [25] Argumedo G S, Sanz C R, Olguin H J. Experimental models of developmental hypothyroidism [J]. Hormone Metabolic Research, 2012, 44(2): 79-85
- [26] Rivas M, Naranjo J R. Thyroid hormones, learning and memory [J]. Genes Brain and Behavior, 2007, 6(1): 40-44
- [27] Azadi S, Zhang Y, Caffe A R, et al. Thyroid-beta2 and the retinoid RAR-alpha, RXR-gamma and ROR-beta2 receptor mRNAs; expression profiles in mouse retina, retinal explants and neocortex [J]. Neuroreport, 2002, 13(6): 745-750
- [28] Xing W, Aghajanian P, Goodluck H, et al. Thyroid hormone receptor-betal signaling is critically involved in regulating secondary ossification via promoting transcription of the *Ihh* gene in the epiphysis [J]. American Journal of Physiology Endocrinology and Metabolism, 2016, 310 (10): E846-E854
- [29] Arbogast P, Flamant F, Godement P, et al. Thyroid hormone signaling in the mouse retina [J]. PLoS One, 2016, 11(12): e0168003
- [30] Jones I, Srinivas M, Ng L, et al. The thyroid hormone receptor beta gene: Structure and functions in the brain and sensory systems [J]. Thyroid, 2003, 13(11): 1057-1068
- [31] Carlsson G, Kulkarni P, Larsson P, et al. Distribution of BDE-99 and effects on metamorphosis of BDE-99 and -47 after oral exposure in *Xenopus tropicalis* [J]. Aquatic Toxicology, 2007, 84(1): 71-79
- [32] Wu L, Li Y, Ru H, et al. Parental exposure to 2,2',4,4'5-pentain polybrominated diphenyl ethers (BDE-99) causes thyroid disruption and developmental toxicity in zebrafish
  [J]. Toxicology Applied Pharmacology, 2019, 372: 11-18

٠