

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20180624001

郝小吉, 尚小娜, 于海华, 等. 六溴环十二烷(HBCD)对H4细胞和SK-N-AS细胞脱碘酶2和3表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2019, 14(3): 112-120
Hao X J, Shang X N, Yu H H, et al. Effect of hexabromocyclododecane (HBCD) on the expressions of deiodinases 2 and 3 in the human neuroglioma H4 cells and neuroblastoma SK-N-AS cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2019, 14(3): 112-120 (in Chinese)

六溴环十二烷(HBCD)对H4细胞和SK-N-AS细胞脱碘酶2和3表达的影响

郝小吉¹, 尚小娜^{1,3}, 于海华², 么建萍², 韩璐², 刘晓晖¹, 李亚晨^{1,#}, 邵静^{1,*}

1. 大连医科大学公共卫生学院, 大连市血液病重点实验室, 辽宁省造血干细胞移植医学中心, 辽宁省造血干细胞移植临床转化医学研究重点实验室, 大连 116044

2. 大连市妇幼保健院, 大连 116033

3. 康龙化成(北京)新药技术股份有限公司, 北京 100176

收稿日期: 2018-06-24 录用日期: 2018-08-03

摘要: 六溴环十二烷(hexabromocyclododecane, HBCD)与多溴联苯醚(polybrominated diethyl ethers, PBDEs)复合污染体系, 对人类健康尤其其神经系统所造成的潜在危害及其机制一直是笔者课题组的研究方向。HBCD是广泛使用的溴化阻燃剂, 与PBDEs一样, 会通过干扰内分泌系统、影响甲状腺激素分泌及损伤神经系统, 对生物体产生发育神经毒性。作为系列研究之一, 本研究以H4人脑神经胶质瘤细胞和SK-N-AS人神经母细胞瘤细胞为体外生物模型, 通过观察HBCD对H4细胞Ⅱ型脱碘酶(Dio2)和SK-N-AS细胞Ⅲ型脱碘酶(Dio3)表达的调控, 初步探讨了HBCD对神经系统局部甲状腺激素水平的潜在影响。H4细胞和SK-N-AS细胞分别暴露于0、1、3和9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HBCD 24 h后, 采用MTT法检测细胞活力, Western Blot和RT-PCR法分别分析Dio2和Dio3蛋白和基因的表达, 酶联免疫吸附测定(ELISA)法检测H4细胞脑源性神经细胞营养因子(BDNF)的分泌。结果表明, HBCD以剂量依赖方式降低H4细胞和SK-N-AS细胞生存率, 引起H4细胞Dio2蛋白和基因表达下调, 而致SK-N-AS细胞Dio3蛋白和基因表达上调。此外, HBCD还降低H4细胞BDNF的分泌。这表明, HBCD很可能通过影响神经和胶质细胞脱碘酶的表达, 影响脑局部甲状腺激素水平, 从而引起神经系统损伤及发育神经毒性。

关键词: 六溴环十二烷; H4细胞; SK-N-AS细胞; 神经毒性; 脱碘酶

文章编号: 1673-5897(2019)3-112-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effect of Hexabromocyclododecane (HBCD) on the Expressions of Deiodinases 2 and 3 in the Human Neuroglioma H4 Cells and Neuroblastoma SK-N-AS Cells

Hao Xiaoji¹, Shang Xiaona^{1,3}, Yu Haihua², Yao Jianping², Han Lu², Liu Xiaohui¹, Li Yachen^{1,#}, Shao Jing^{1,*}

1. School of Public Health, Dalian Medical University, Dalian Key Laboratory of Hematology, Liaoning Medical Center for Hematopoietic Stem Cell Transplantation, Liaoning Key Laboratory of Hematopoietic Stem Cell Transplantation and Translational Medicine, Dalian 116044, China

基金项目: 国家自然科学基金(81773389, 81273031); 大连医科大学教学改革研究项目(DY LX16053)

作者简介: 郝小吉(1991-), 男, 硕士研究生, 研究方向为劳动卫生与环境卫生学, E-mail: 849246840@qq.com

* **通讯作者** (Corresponding author), E-mail: jshao@uw.edu; js.jshao@gmail.com

共同通讯作者 (Co-corresponding author), E-mail: 2461178934@qq.com

2. Maternal and Child Care Service Centre of Dalian, Dalian 116033, China

3. Pharmaron Beijing Co., Ltd. (China), Beijing 100176, China

Received 24 June 2018 **accepted** 3 August 2018

Abstract: Being one of the chemicals in the complex of persistent organic pollutants, hexabromocyclododecane (HBCD), as a widely used brominated flame retardant, has been known to cause disturbance in the endocrine system, in particular, the thyroid hormone system, which may underlie its neurotoxicity and developmental neurotoxicity. This current study used the human H4 neuroglioma cells and human SK-N-AS neuroblastoma cells as the *in vitro* models, to investigate the effects of HBCD on the type 2 iodothyroninedeiodinase (Dio2) expression in the H4 cells and the type 3 iodothyroninedeiodinase (Dio3) expression in the SK-N-AS cells. Briefly, the H4 and SK-N-AS cells were separately exposed to HBCD for 24 h, and the cell viability was examined by the methyl-thiazolyl-tetrazolium (MTT) method; the levels of Dio2 and Dio3 protein and mRNA expression were quantitated by the Western Blot and the qRT-PCR, respectively; in addition, the secretion of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) was examined by the ELISA in the H4 cells. The data showed that HBCD led to a loss of cell viability in both cell types in a dose-dependent manner; HBCD caused the reduction of both Dio2 protein and mRNA expressions in the H4 cells, and the elevation in the Dio3 protein and mRNA expressions in the SK-N-AS cells; moreover, HBCD also reduced the secretion of BDNF in the H4 cells as detected in the culture medium. Our data suggest that HBCD is likely to modulate the local level of thyroid hormones (in particular T3) in the brain by affecting the expression of deiodinated enzymes in the neurons and the glia, thereby resulting in the HBCD-mediated neurotoxicity and developmental neurotoxicity.

Keywords: hexabromocyclododecane (HBCD); human neuroblastoma cells (SK-N-AS); human neuroglioma cells (H4); neurotoxicity; deiodinase

六溴环十二烷(hexabromocyclododecane, HBCD)是一种高溴含量的脂环族添加型阻燃剂,与多溴联苯醚(PBDEs)均属于溴系阻燃剂(BFRs),作为PBDEs替代物被广泛使用,同样应用于电子、电器、化工、交通、建材、纺织、石油和采矿等领域。与PBDEs类似,HBCD易于从产品中游离、释放到环境介质中,具有持久性和蓄积性,从而成为一种新型环境有机污染物^[1-2]。有研究认为,HBCD可能与PBDEs形成复合污染体系,二者共同作用,对人类健康造成潜在危害^[3]。

HBCD毒性作用主要表现为肝脏损伤^[4]、内分泌干扰^[5-6]和神经毒性^[7]等方面。尤其,处于脑发育期的婴幼儿及儿童是HBCD及HBCD/PBDEs复合污染物暴露的高风险人群。HBCD诱导的发育神经毒性效应主要来源于神经发育时期^[8]。研究表明,HBCD引起发育神经毒性的机制可能与2个因素有关:(1)引起脑局部神经细胞损伤,而直接影响神经系统发育;(2)通过影响脑局部甲状腺激素水平,间接影响神经发育水平,但二者的联系机制尚不清楚。

机体不同组织细胞对甲状腺激素的生理需求不

同,需要对来自循环的甲状腺激素在局部细胞中进行调节,使组织局部甲状腺激素并不完全依赖外周循环水平。组织中脱碘酶(deiodinase, Dio)对此起着关键作用。Dio是一组含硒蛋白酶,分三型(Dio1、Dio2和Dio3),各自以独特的脱碘方式调节其所分布组织细胞内甲状腺激素(thyroxine, TH)的生物活性。Dio2功能是通过外环脱碘在细胞内将四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T4)转化为活性三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3),并通过特异的T3受体发挥生物功能,在机体生长发育中起重要作用,是哺乳动物胚胎中主要的脱碘酶^[9];在脑组织中,Dio2主要分布于神经胶质细胞中^[10-11]。Dio3主要分布于神经元细胞,特别是胎脑、1月龄以内的婴儿皮肤、胎盘和胎儿肠组织中,是通过内环脱碘将细胞外T4和T3分别转化为无活性的反三碘甲状腺原氨酸(reverse triiodothyronine, rT3)和二碘甲状腺原氨酸(diiodothyronine, T2),调节组织细胞内T3水平,避免发育中的胎儿和胎儿组织暴露于高浓度活性甲状腺激素中^[11-12]。Dio1具有内、外环脱碘的双重活性,可在外周组织中清除rT3,并介导血清T3生成^[13-14]。

作为环境有机污染物神经毒性研究的一部分,本研究以人脑神经母细胞瘤细胞(SK-N-AS)和人神经胶质瘤细胞(H4)作为体外生物模型,初步探讨HBCD对2种神经细胞的细胞毒性,以及对2种脱碘酶在不同细胞中表达特征的影响,明确Dio2和Dio3在HBCD诱导神经毒性中的作用,以期探索孕期HBCD暴露是否通过影响胚胎脑局部脱碘酶表达、调控局部甲状腺激素水平,进而导致子代神经系统发育损伤。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试剂与材料

HBCD(纯度95%,美国Sigma公司),胎牛血清(Gibco公司,北美),DMEM低糖、高糖培养基(Hyclone公司,美国),兔抗人多克隆抗体Dio2、Dio3及BDNF脑源生长因子ELISA试剂盒(Abcom公司,美国),Dio2和Dio3基因引物、RNA提取及反应试剂盒PrimeScript™ RT reagent Kit、SYBR® Premix Ex Taq™(TaKaRa公司,日本),BCA蛋白浓度测定试剂盒、预染彩色蛋白分子量Marker、RIPA裂解液、四甲基乙二胺(TEMED)等(碧云天生物技术有限公司,北京),HRP标记的羊抗兔二抗(Proteintech公司,美国),ECL检测试剂盒(南京凯基生物科技发展有限公司),氯仿、乙醇和异丙醇等均为分析纯,分别购自天津市科密欧化学试剂有限公司和天津市化学试剂一厂。SK-N-AS、H4细胞来自美国ATCC细胞库。

1.2 仪器

细胞培养箱(Thermo 3111,赛默飞世尔科技(中国)有限公司),354型多功能酶标仪(Thermo公司,美国),CKX41型倒置相差荧光显微镜(Olympus公司,日本),电泳系统(EP-300,上海天能),梯度PCR仪(T100™ Thermal Cycler,美国Bio-RAD公司),实时PCR系统(Takara Thermal Cycler Dice TP800,宝生物公司),高速冷冻离心机(HERMLE公司,德国),化学发光凝胶成像系统(UVP公司,美国),Biodrop-sis超微量核酸分析仪(BD-1000,北京五洲东方科技发展有限公司)。

1.3 样品采集及指标检测

1.3.1 细胞的复苏及培养

将冻存的SK-N-AS、H4细胞复苏,SK-N-AS用DMEM低糖培养基,H4用DMEM高糖培养基培养,其中各加入10%的胎牛血清及1%的青-链霉素双抗,将细胞放置于37℃、5% CO₂培养箱中,待细胞融合将近80%时,用0.25%胰酶消化为细胞传

代,培养过程中及时换液,保证细胞生长状态良好。

1.3.2 MTT检测细胞存活率

收集对数生长期的细胞,调整细胞悬液浓度为 8×10^4 个·mL⁻¹,铺于96孔板底100 μL·孔⁻¹,设置5个复孔。置37℃、5% CO₂培养箱中培养8~24 h,弃清液;加入不同浓度HBCD(0、1、3、9 μmol·L⁻¹),100 μL·孔⁻¹,置37℃、5% CO₂培养箱染毒24 h,弃清液;每孔加100 μL新鲜配制的MTT应用液,继续置37℃、5% CO₂培养箱中2 h,弃清液;每孔加100 μL二甲基亚砷(DMSO),置37℃、5% CO₂培养箱中1 h,使结晶物充分溶解。用酶标仪于波长595 nm测定各孔OD值,计算细胞在不同浓度下的存活率。保证实验条件的稳定性,结果重复3次以上。

1.3.3 实时荧光定量PCR(qRT-PCR)检测脱碘酶Dio2和Dio3基因表达

取生长对数期的SK-N-AS、H4细胞,分别用0、1、3和9 μmol·L⁻¹ HBCD处理24 h,用TransZol Up试剂盒提取总RNA,超微量核酸分析仪分析RNA的纯度,保证无污染及降解。Dio2、Dio3以及GAPDH基因引物序列见表1。将1 μg的总RNA逆转录成cDNA,按照PrimeScript™ RT reagent Kit的说明操作,具体反应步骤如下:首先去除基因组DNA(表2),再进行反转录(表3),然后按照SYBR® Premix Ex Taq™试剂盒说明,构建qRT-PCR的反应体系(表4)。反应在八联管中进行,置于PCR仪上

表1 引物GAPDH、Dio2、Dio3的基本参数

基因名称 Gene name	序列(5'-3') Sequence (5'-3')	扩增片段大小/bp Product size/bp
GAPDH	RQ-F CATGTTTCGTCATGGGTGTGAA	154
	RQ-R GGCATGGACTGTGGTCATGAG	
Dio2	RQ-F AGCAGCTTCTGGAGCGTTTC	150
	RQ-R GGCCCTTCTCCAGATAA	
Dio3	RQ-F GCTCTGGCTCCGACACCAT	164
	RQ-R TCATCATAGCGTTCCAACCAAGT	

表2 去除基因组DNA反应

试剂 Reagent	用量 Dose
5×g DNA Eraser Buffer	2.0 μL
gDNA Eraser	1.0 μL
Total RNA	1 μg
RNase Free dH ₂ O	up to 10 μL

进行实时荧光定量反应。PCR 反应条件为:预变性 95 °C、30 s;95 °C、3 s,60 °C、30 s,循环 40 次;95 °C、15 s,60 °C、30 s,95 °C、15 s;每次实验均设置阴性对照,检验引物质量。观察目的基因的扩增曲线及溶解曲线,需满足特异性及灵敏性的要求,以 GAPDH 的表达量对结果进行标准化,实验重复 3 次以上。

1.3.4 Western Blot 检测 Dio2 和 Dio3 蛋白表达

取生长对数期的 SK-N-AS、H4 细胞,调整细胞浓度为 2×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$,铺于 10 cm 的培养皿中,分别用 0、1、3、9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 处理 24 h。(1)提取总蛋白及定量保存:用 RIPA 裂解液提取总蛋白,用 BCA

蛋白浓度测定试剂盒对蛋白定量,用蛋白变性剂及煮沸的方法使蛋白变性。(2)电泳分离蛋白及免疫印迹:按表 5 分别配制 12% 分离胶和 5% 浓缩胶,上 40 μg 的蛋白样品。电泳条件为恒压 100 V、90 min;根据预染彩色蛋白分子量 Maker,切取所需的蛋白凝胶,采用槽式湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上,转膜条件为恒流 220 mA、90 min。(3)封闭:5% 脱脂奶粉封闭 2 h。(4)孵育一抗:用 1% 的脱脂奶按 1:400、1:200 和 1:1 000 的比例分别稀释 Dio2、Dio3 和 β -actin 抗体,4 °C 孵育过夜。(5)孵育二抗:取一抗孵育的 PVDF 膜,摇床上 TBST 洗膜 3×10 min,用 1% 的脱脂奶按 1:2 000、1:3 000 分别稀释 HRP 标记的二抗,室温孵育 2 h。(6)显影:用 TBST 洗膜 3×10 min,按 ECL 检测试剂盒用 UVP 化学发光凝胶成像系统检测蛋白的相对表达量。

1.3.5 HBCD 对 H4 细胞 BDNF 分泌的影响

星形胶质细胞(例如 H4)分泌的生长因子包含纤维细胞生长因子(bFGF)、内皮生长因子(EGF)、IL-6 和 BDNF 等,不仅影响星形胶质细胞的生长状态,还影响神经元细胞的分裂、分化和迁移、树突和轴突的生长及突触的生成等。其中,BDNF 是一种促进受损伤的神经元再生及分化的营养因子,在正常大脑中,介导胶质细胞与神经元细胞之间的相互影响。本实验通过检测 HBCD 对 H4 细胞分泌 BDNF 水平的影响,即细胞上清液中 BDNF 含量,可初步了解在神经元和胶质细胞共培养体系中或体内生理条件下,HBCD 对 2 种细胞相互作用的改变。

具体方法:细胞经 0、1、3 和 9 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 处理 24 h 后,收集细胞存活率实验中结果稳定且有意义的细胞上清液,保存于 -80 °C,用于检测 BDNF

表 3 反转录反应

Table 3 Reaction for reverse transcription

试剂 Reagent	体积/ μL Volume/ μL
Step 1 Reaction solution	10.0
PrimeScript RT Enzyme Mix I	1.0
RT Primer Mix * 4	1.0
5 \times PrimeScript Buffer 2(for Real Time)	4.0
RNase Free dH_2O	4.0

表 4 qRT-PCR 反应体系

Table 4 qRT-PCR reaction

试剂 Reagent	体积/ μL Volume/ μL
SYBR Premix Ex Taq(Tli RNaseH Plus)(2 \times)	10
PCR Forward Primer($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.4
PCR Reverse Primer($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)	0.4
DNA template(<100 ng) * 2	2
Sterile water	7.2
Total	20

表 5 分离胶(12%)和浓缩胶(5%)的配制

Table 5 Preparation of separation gel (12%) and stacking gel (5%)

试剂 Reagent	体积/mL Volume/mL	试剂 Reagent	体积/mL Volume/mL
Deionized water	1.6	Deionized water	1.4
30% Acrylamide	2.0	30% Acrylamide	0.33
1.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris(pH 8.8)	1.3	1.0 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Tris(pH 6.8)	0.25
10% SDS	0.05	10% SDS	0.02
10% APS	0.05	10% APS	0.02
TEMED	0.002	TEMED	0.002
Total volume	5	Total volume	2

注:SDS 表示十二烷基硫酸钠,APS 表示过硫酸铵,TEMED 表示 N,N,N',N'-四甲基乙二胺。

Note: SDS stands for sodium dodecyl sulfate; APS stands for ammonium persulfate; TEMED stands for N,N,N',N'-tetramethylethylenediamine.

含量,上清经 $2\ 000\ \text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 去除细胞碎片,按照 ELISA 试剂盒的说明进行实验,每个染毒浓度设置 3 个复孔,每次实验均制作标准曲线,准确计算上清中 BDNF 的含量。

1.4 统计分析

结果表示为均值 \pm 标准差(Mean \pm SD),用 Graph Prism 7.0 进行统计分析和制图。用单因素方差分析(ANOVA test)进行组间比较,方差不齐则用 Dunnett's T3 直接进行多重比较。*表示,与对照组比较差异具有统计学意义($P<0.05$)。

2 结果(Results)

2.1 HBCD 对 SK-N-AS 细胞生存率及脱碘酶表达的影响

2.1.1 细胞生存率

人神经元细胞 SK-N-AS 细胞分别暴露于 0、1、3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 24 h,以 MTT 法检测细胞活力,发现其存活率下降,并具有一定剂量依赖性。由图 1 可知,与对照组比较,1、3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 染毒组细胞存活率分别为对照组的 89%、76% 和 53%,其中 3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 染毒组具有统计学意义($P<0.05$)。

2.1.2 Dio3 基因和蛋白表达

脑局部神经元主要表达 Dio3,因此,本研究考察 HBCD 对 SK-N-AS 细胞中 Dio3 基因和蛋白表达的影响。细胞暴露于 0、1、3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 24 h 后,用 qRT-PCR 法分析 SK-N-AS 中 Dio3 基因表达水平,由图 2 可知,低剂量 HBCD 使 Dio3 表达略有下降,而高剂量($9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)则引起 Dio3 表达显著上调($P<0.05$)。

WesternBlot 分析 Dio3 蛋白表达水平。由图 3 可知,Dio3 的蛋白表达水平变化与基因基本相似,低剂量组略有下降趋势,而 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组则明显上调($P<0.05$)。

2.2 HBCD 对 H4 细胞生存率、脱碘酶表达和 BDNF 分泌的影响

2.2.1 细胞生存率

人神经胶质细胞 H4 细胞分别暴露于 0、1、3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 24 h,以 MTT 法检测细胞活力。与 SK-N-AS 细胞相似,H4 细胞存活率下降,并具有一定剂量依赖性。由图 4 可知,与对照组比较,1、3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 染毒组细胞存活率分别为对照组的 $\sim 80\%$ 、 69% 和 60% ,其中 3 和 $9\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HBCD 染毒组具有统计学意义($P<0.05$)。

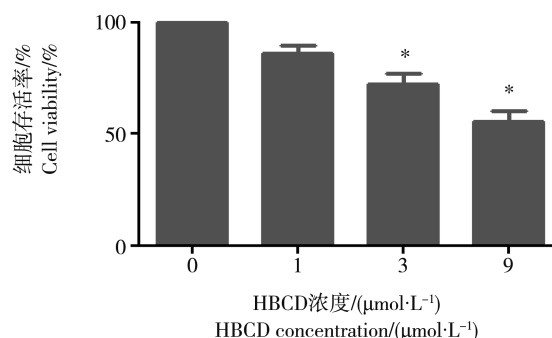


图 1 六溴环十二烷(HBCD)对 SK-N-AS 细胞存活率的影响

Fig. 1 Effect of hexabromocyclododecane (HBCD) on cell viability of SK-N-AS cells

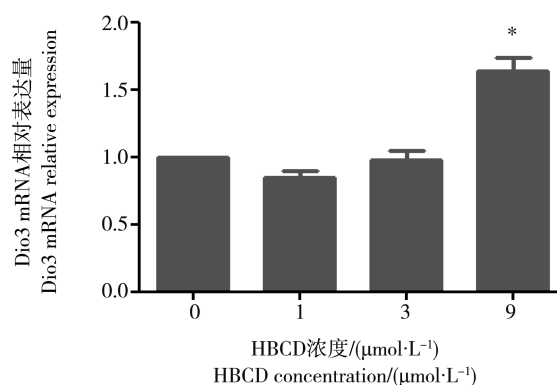


图 2 HBCD 对 SK-N-AS 细胞 Dio3 基因表达的影响

Fig. 2 Effect of HBCD on Dio3 gene expression in SK-N-AS cells

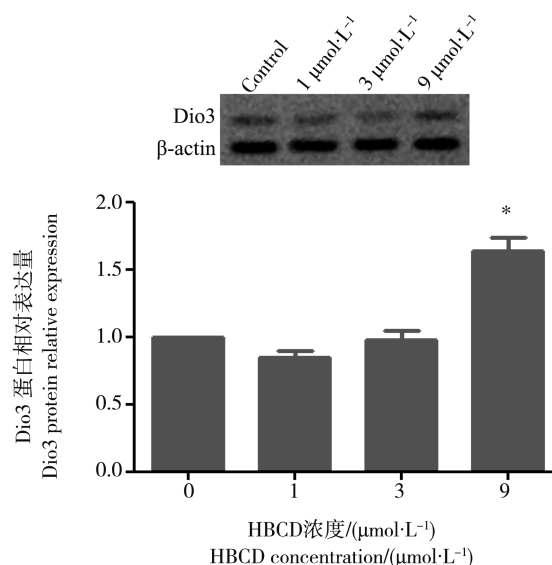


图 3 HBCD 对 SK-N-AS 细胞 Dio3 蛋白表达的影响

Fig. 3 Effect of HBCD on Dio3 protein expression in SK-N-AS cells

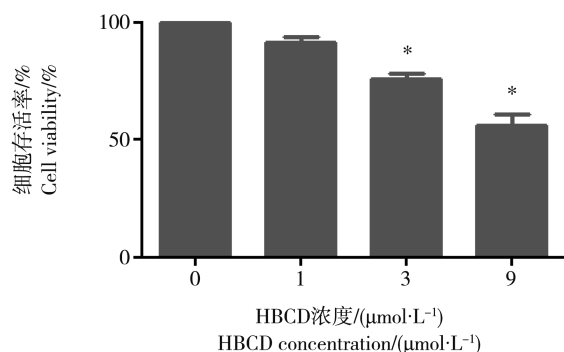


图4 HBCD对H4细胞存活率的影响

Fig. 4 Effect of HBCD on cell viability of H4 cells

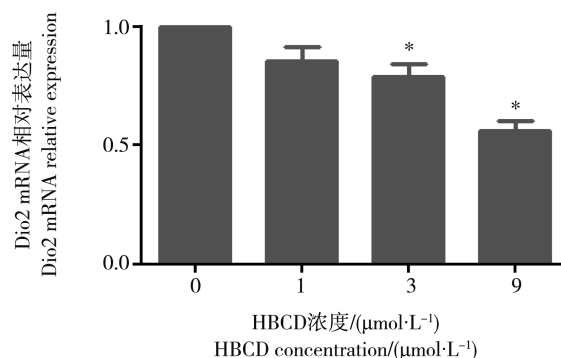


图5 HBCD对H4细胞Dio2基因表达的影响

Fig. 5 Effect of HBCD on Dio2 gene expression in H4 cells

2.2.2 Dio2 基因和蛋白表达

脑局部神经胶质细胞主要表达 Dio2,本研究考察 HBCD 对 H4 细胞中 Dio2 基因和蛋白表达的影响。细胞暴露于 0、1、3 和 9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HBCD 24 h,用 qRT-PCR 法分析 H4 细胞中 Dio2 基因表达变化。由图 5 可知,HBCD 引起基因表达下调,且具有剂量依赖性,其中,3 和 9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有统计学意义($P < 0.05$)。

Western Blot 分析 H4 细胞中 Dio2 蛋白表达水平。由图 6 可知,HBCD 对 Dio2 蛋白表达的影响与对基因表达影响一致,亦可引起蛋白表达下调,且具有剂量依赖性,其中,3 和 9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2.3 对 BDNF 分泌的影响

H4 细胞暴露于 0、1、3 和 9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HBCD 24 h,ELISA 分析细胞外 BDNF 蛋白含量,由图 7 可知,HBCD 暴露可致 H4 细胞分泌的 BDNF 蛋白明显减少,其中,3 和 9 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ HBCD 组与对照组相比有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

环境有机污染物对甲状腺激素水平影响已成为发育神经毒性研究的重点之一,甲状腺激素对脑发育的影响逐渐受到重视。甲状腺激素水平的相对稳态主要是靠下丘脑-腺垂体-甲状腺轴(HPT 轴)调控。HPT 轴是一个复杂的甲状腺激素(TH)代谢和作用调节网络,TH 受体、脱碘酶、甲状腺素转运蛋白(TTR)和钠碘转运体被认为是重要的功能基因参与 TH 合成、运输、代谢和发挥生物活性^[15],并且可能是暴露于环境污染物的生物体甲状腺破坏的敏感分子生物标志物^[16-17]。

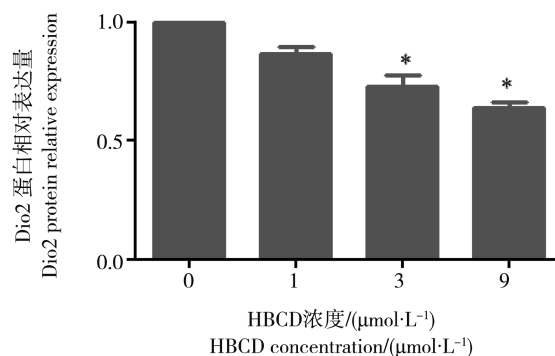
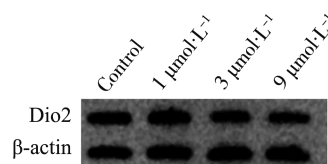


图6 HBCD对H4细胞Dio2蛋白表达的影响

Fig. 6 Effect of HBCD on Dio2 protein expression in H4 cells

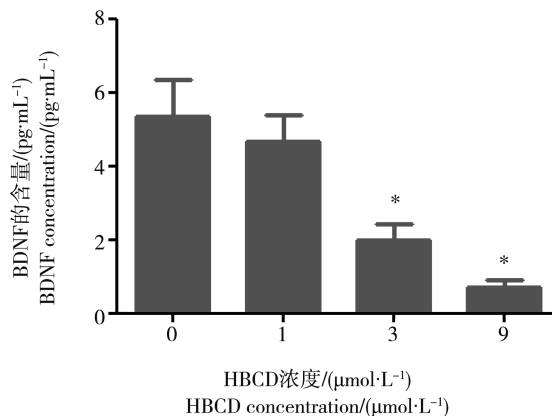


图7 HBCD对H4细胞BDNF分泌的影响

Fig. 7 Effect of HBCD on BDNF secretion in H4 cells

HBCD 与 PBDEs 均具有内分泌干扰作用,其中,孕期 PBDEs 对甲状腺激素的干扰作用,已在动物实验研究中得到证实,主要表现为血液中 T4 浓度降低。脱碘酶是甲状腺激素代谢中最重要的转化酶,对维持机体甲状腺激素水平起着决定作用。脱碘酶不仅参与甲状腺激素的合成与活化,而且对甲状腺功能具有重要的调节作用。组织中脱碘酶对来自循环的甲状腺激素在局部细胞中的调节起着关键作用。笔者课题组的前期研究发现,孕哺期 BDE 209 暴露能够影响出生后子代甲状腺激素脱碘酶基因的表达,同时伴有学习记忆能力下降^[18]。由于 HBCD 与 PBDEs 和甲状腺激素结构不相似,因此, HBCD 被认为具有较低干扰甲状腺轴的可能性。然而,最近研究表明, HBCD 与 PBDEs 一样可干扰生物体内甲状腺稳态^[5,19],从而影响机体生长发育,特别是脑的正常发育。

研究证实, HBCD 暴露能够影响脱碘酶的活性和基因表达,从而干扰生物体内甲状腺稳态。Palace 等^[20]研究发现,虹鳟鱼用含 HBCD 饲料喂养 32 d 后,肝脏 II 型外环脱碘酶活性显著升高,而虹鳟鱼幼鱼经 HBCD 暴露后,血浆游离三碘甲状腺原氨酸(free triiodothyronine, FT3)和游离甲状腺素(free tetraiodothyronine, FT4)水平改变,14 d 后肝微粒体 T4 外环脱碘酶(T4ORD)活性未受到影响,但 56 d 后 T4 外环脱碘酶活性显著降低。刘园园等^[21]研究发现,脑发育期大鼠,经 HBCD 暴露后,血清中总甲状腺素(total tetraiodothyronine, TT4)、总三碘甲状腺原氨酸(total triiodothyronine, TT3)、FT4、FT3 浓度随着暴露剂量增大呈现先升高后下降的趋势,并且肝脏 D1 活性及基因表达水平和脑 D2 活性及基因表达水平均呈下降趋势。García 等^[22]研究发现,循环 T3 和 T4 通过改变 II 型脱碘酶活性影响脱碘作用的速度。此外, HBCD 暴露可通过增强葡萄糖苷酸化来提高甲状腺激素的分泌^[23],通过增强组织结合能力^[24]或增强脱碘和消除作用^[21]提高甲状腺激素从循环中的摄取,这些都能影响循环甲状腺激素的水平,继而影响脱碘酶活性。这些研究显示了 HBCD 对甲状腺激素代谢过程影响的复杂性。HBCD 暴露是直接影 响脱碘酶转录或翻译,还是通过改变外周甲状腺激素水平间接影响脱碘酶尚不能确定。本研究中,笔者调查了 HBCD 对 H4 人脑神经胶质瘤细胞 II 型脱碘酶(Dio2)和 SK-N-AS 人神经母细胞瘤细胞 III 型脱碘酶(Dio3)表达的影响,结果显示, HBCD 以剂量

依赖方式降低 H4 细胞和 SK-N-AS 细胞生存率,引起 H4 细胞 Dio2 蛋白和基因表达下调,而致 SK-N-AS 细胞 Dio3 蛋白和基因表达上调。这些结果提示, HBCD 可能通过抑制 Dio2 的表达,减少脑细胞内由 T4 向 T3 的转化,而通过增加 Dio3 的表达,将细胞外 T4 和 T3 分别转化为无活性的 rT3 和 T2,从而使脑局部 T3 水平降低,影响脑发育。为明确 HBCD 对脱碘酶表达的影响是否对局部 T3、T4 水平有干扰作用,本研究试图检测 SK-N-AS 和 H4 这 2 种细胞上清液中 T3、T4 和 rT3 含量,但由于体外表达和分泌量很低,检测结果非常不稳定,笔者课题组未来将在体内研究中探讨 HBCD 对脱碘酶以及 T3、T4 的毒理学效应。

另外,值得注意的是,本研究发现, HBCD 对 SK-N-AS 中 Dio3 表达具有浓度效应,在低浓度下致 Dio3 表达略有下降,尽管未见统计学意义,而在高浓度下则致 Dio3 表达显著增高。Dio3 是细胞表面受体,环境有机污染物在低浓度下对其 RNA 或蛋白表达影响不明显,但可能通过氧化应激、经由其他生物分子而改变 Dio3 结构和功能,从而影响局部甲状腺激素水平^[25-27]。而在高浓度下,环境有机毒物可能通过甲基化或 microRNA 调控 Dio3 表达,影响局部组织甲状腺激素水平,从而可能引起神经系统损伤^[28]。

神经营养因子如脑源性神经营养因子(BDNF)在 TH 介导的脑发育中起关键作用^[29]。在脑发育中, BDNF 广泛涉及神经元增殖和分化^[30],特别是 BDNF 促进神经突迁移和伸长^[31]。此外,小鼠 BDNF 基因缺失显示的脑发育异常类似于甲状腺功能减退的动物^[32]。BDNF 表达在甲状腺机能减退的小鼠中也受到抑制^[33]。Ibhaziebo 等^[34]报道 BDNF 能缓解 HBCD 引起的甲状腺激素诱导的颗粒细胞轴突延长抑制。因此,本研究初步探讨 HBCD 对 H4 细胞 BDNF 分泌的影响,结果显示, HBCD 可以降低 H4 细胞 BDNF 的分泌,而 BDNF 降低,很可能加剧 HBCD 对神经元的损伤,或阻碍神经元的修复和再生过程。笔者课题组今后将在 SK-N-AS 和 H4 这 2 种细胞共培养体系以及在体内研究中,进一步探讨 BDNF 和其他生长因子在 HBCD 神经毒性中的作用。

综上,本研究结果表明, HBCD 暴露可能通过影响胚胎脑局部脱碘酶表达、调控局部甲状腺激素水平,影响 BDNF 的分泌,导致子代神经发育异常。

下一步将进行动物实验,研究孕期 HBCD 暴露对胚胎脑局部脱碘酶表达的影响及甲状腺激素水平的调控,以阐明 HBCD 引起子代神经发育毒性的机制。

通讯作者简介: 邵静(1965-),女,环境卫生学与毒理学博士,教授,主要研究方向为环境污染与健康。

共同通讯作者简介: 李亚晨(1965-),女,环境与生命科学博士,教授,主要研究方向为生态与环境毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Law R J, Covaci A, Harrad S, et al. Levels and trends of PBDEs and HBCDs in the global environment: Status at the end of 2012 [J]. *Environment International*, 2014, 65: 147-158
- [2] Covaci A, Gerecke A C, Law R J, et al. Hexabromocyclododecanes (HBCDs) in the environment and humans: A review [J]. *Environmental Science & Technology*, 2006, 40(12): 3679-3688
- [3] Aylward L L, Hays S M. Biomonitoring-based risk assessment for hexabromocyclododecane (HBCD) [J]. *The International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2011, 214: 179-187
- [4] Cantón R F, Peijnenburg A A, Hoogenboom R L, et al. Subacute effects of hexabromocyclododecane (HBCD) on hepatic gene expression profiles in rats [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2008, 231: 267-272
- [5] van der Ven L T, Verhoef A, van de Kuil T, et al. A 28-day oral dose toxicity study enhanced to detect endocrine effects of hexabromocyclododecane in Wistar rats [J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 94: 281-292
- [6] Kim U J, Oh J E. Tetrabromobisphenol A and hexabromocyclododecane flame retardants in infant-mother paired serum samples, and their relationships with thyroid hormones and environmental factors [J]. *Environmental Pollution*, 2014, 184: 193-200
- [7] Lilienthal H, van der Ven L T, Piersma A H, et al. Effects of the brominated flame retardant hexabromocyclododecane (HBCD) on dopamine-dependent behavior and brainstem auditory evoked potentials in a one-generation reproduction study in Wistar rats [J]. *Toxicology Letters*, 2009, 185: 63-72
- [8] Saegusa Y, Fujimoto H, Woo G H, et al. Transient aberration of neuronal development in the hippocampal dentate gyrus after developmental exposure to brominated flame retardants in rats [J]. *Archives of Toxicology*, 2012, 86: 1431-1442
- [9] Dentice M, Marsili A, Zavacki A M, et al. The deiodinases and the control of intracellular thyroid hormone signaling during cellular differentiation [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2013, 1830(7): 3937-3945
- [10] Bocco B M, Werneck-de-Castro J P, Oliveira K C, et al. Type 2 deiodinase disruption in astrocytes results in anxiety-depressive-like behavior in male mice [J]. *Endocrinology*, 2016, 157(9): 3682-3695
- [11] Hernandez A, Morte B, Belinchón M M, et al. Critical role of types 2 and 3 deiodinases in the negative regulation of gene expression by T3 in the mouse cerebral cortex [J]. *Endocrinology*, 2012, 153(6): 2919-2928
- [12] Martinez M E, Charalambous M, Saferali A, et al. Genomic imprinting variations in the mouse type 3 deiodinase gene between tissues and brain regions [J]. *Molecular Endocrinology*, 2014, 28(11): 1875-1886
- [13] Darras V M, Van Herck S L. Iodothyronine deiodinase structure and function: From ascidians to humans [J]. *Journal of Endocrinology*, 2012, 215(2): 189-206
- [14] Galton V A, de Waard E, Parlow A F, et al. Life without the iodothyronine deiodinases [J]. *Endocrinology*, 2014, 155(10): 4081-4087
- [15] Ortiga-Carvalho T M, Chiamolera M I, Pazos-Moura C C, et al. Hypothalamus-pituitary-thyroid axis [J]. *Comprehensive Physiology*, 2016, 6(3): 1387-1428
- [16] Scholz S, Mayer I. Molecular biomarkers of endocrine disruption in small model fish [J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2008, 293: 57-70
- [17] Yu L, Deng J, Shi X, et al. Exposure to DE-71 alters thyroid hormone levels and gene transcription in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis of zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 97: 226-233
- [18] 钱波, 王健, 朱春艳, 等. 甲状腺激素脱碘酶在孕期 BDE209 暴露致子代小鼠神经发育毒性中的潜在作用 [J]. *生态毒理学报*, 2014, 9(3): 459-466
Qian B, Wang J, Zhu C Y, et al. The role of thyroid hormone deiodinase in developmental neurotoxicity in newborn mice mediated by decabromodiphenyl ether (BDE209) exposure during pregnancy and lactation [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2014, 9(3): 459-466 (in Chinese)
- [19] 冀秀玲, 刘洋, 刘芳, 等. 六溴环十二烷转甲状腺素蛋白结合活性及其发育期暴露的甲状腺激素干扰效应研究 [J]. *环境科学*, 2009, 31(9): 2191-2195
Ji X L, Liu Y, Liu F, et al. Transthyretin-binding activity of hexabromocyclododecanes (HBCDs) and its thyroid hormone disrupting effects after developmental exposure [J]. *Environmental Science*, 2009, 31(9): 2191-2195 (in Chinese)

- Chinese)
- [20] Palace V P, Pleskach K, Halldorson T, et al. Biotransformation enzymes and thyroid axis disruption in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane diastereoisomers [J]. Environmental Science & Technology, 2008, 42(6): 1967-1972
- [21] 刘园园, 冀秀玲, 沈群辉, 等. 六溴环十二烷及其复合污染脑发育期暴露对大鼠甲状腺激素代谢过程的影响[J]. 生态环境学报, 2012, 21(9): 1614-1619
- Liu Y Y, Ji X L, Shen Q H, et al. Disrupting effects of hexabromocyclododecane (HBCD) and its complex compounds on rat thyroid hormone metabolism after developmental exposure [J]. Ecology and Environmental Sciences, 2012, 21(9): 1614-1619 (in Chinese)
- [22] García G C, Jeziorski M C, Valverde R C, et al. Effects of iodothyronines on the hepatic outer-ring deiodination pathways in killifish [J]. General and Comparative Endocrinology, 2004, 135: 209-210
- [23] Germer S, Piersma A H, van der Ven L, et al. Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol-A on hepatic cytochrome P450 levels in rats [J]. Toxicology, 2006, 218: 229-236
- [24] Legler J. New insights into the endocrine disrupting effects of brominated flame retardants [J]. Chemosphere, 2008, 73: 216-222
- [25] Shao J, White C C, Dabrowski M J, et al. The role of mitochondrial and oxidative injury in BDE 47 toxicity to human fetal liver hematopoietic stem cells [J]. Toxicological Science, 2008, 101(1): 81-90
- [26] Shao J, Dabrowski M J, White C C, et al. Flow cytometric analysis of BDE 47 mediated injury to rainbow trout gill epithelial cells [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 97(1): 42-50
- [27] Liu X, Wang J, Lu C, et al. The role of lysosomes in BDE 47-mediated activation of mitochondrial apoptotic pathway in HepG2 cells [J]. Chemosphere, 2015, 124: 10-21
- [28] Franco R, Schoneveld O, Georgakilas A G, et al. Oxidative stress, DNA methylation and carcinogenesis [J]. Cancer Letters, 2008, 266(1): 6-11
- [29] Gilbert M E, Lasley S M. Developmental thyroid hormone insufficiency and brain development: A role for brain-derived neurotrophic factor (BDNF)? [J]. Neuroscience, 2013, 239: 253-270
- [30] Wei Z, Liao J, Qi F, et al. Evidence for the contribution of BDNF-TrkB signal strength in neurogenesis: An organotypic study [J]. Neuroscience Letters, 2015, 606: 48-52
- [31] Pajenda G, Hercher D, Márton G, et al. Spatiotemporally limited BDNF and GDNF overexpression rescues motoneurons destined to die and induces elongative axon growth [J]. Experimental Neurology, 2014, 261: 367-376
- [32] Borghesani P R, Peyrin J M, Klein R, et al. BDNF stimulates migration of cerebellar granule cells [J]. Development, 2002, 129: 1435-1442
- [33] Sui L, Li B M. Effects of perinatal hypothyroidism on regulation of reelin and brain-derived neurotrophic factor gene expression in rat hippocampus: Role of DNA methylation and histone acetylation [J]. Steroids, 2010, 75(12): 988-997
- [34] Ibhazehiebo K, Iwasaki T, Xu M, et al. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) ameliorates the suppression of thyroid hormone-induced granule cell neurite extension by hexabromocyclododecane (HBCD) [J]. Neuroscience Letters, 2011, 493(1-2): 1-7 ◆