

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200302003

尹晓宇, 董文静, 李嘉伟, 等. 室内灰尘中五溴联苯醚(BDE-99)干扰 *Dio3* 影响斑马鱼甲状腺功能调节[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 219-226
Yin X Y, Dong W J, Li J W, et al. BDE-99 from indoor dust interferes with *Dio3* and affects thyroid function regulation in zebrafish [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 219-226 (in Chinese)

室内灰尘中五溴联苯醚(BDE-99)干扰 *Dio3* 影响斑马鱼甲状腺功能调节

尹晓宇, 董文静, 李嘉伟, 齐澈力木格, 于永利, 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: 2020-03-02 录用日期: 2020-05-13

摘要: 多溴联苯醚(PBDEs)是一种溴化阻燃剂, 在办公室和家庭的灰尘中均有检出。PBDEs 会对内分泌造成干扰, 主要影响甲状腺激素的调节功能。使用斑马鱼胚胎为动物模型, 评价办公室和家庭灰尘萃取物以及 BDE-99 对斑马鱼胚胎的影响。结果显示, 灰尘萃取物和 BDE-99 同样导致斑马鱼眼部色素降低, GC-MS 检测发现灰尘中含有 BDE-99 和 BDE-47, 且 BDE-99 含量远高于 BDE-47, 通过评估 BDE-99 在斑马鱼体内代谢及其对甲状腺激素脱碘酶 III (*Dio3*) 表达的影响, 发现 *Dio3* 在斑马鱼胚胎原肾管部位表达, 且表达量显著增加, 72 hpf 斑马鱼胚胎的甲状腺素含量显著降低。研究表明, BDE-99 对斑马鱼胚胎早期 *Dio3* 的活性有干扰作用, 并导致甲状腺素含量降低, 由此可知, 斑马鱼胚胎色素变化和 *Dio3* mRNA 表达有可能作为 PBDEs 的生物学评价指标。

关键词: PBDEs; 灰尘; 斑马鱼胚胎; *Dio3*; BDE-99

文章编号: 1673-5897(2021)2-219-08 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

BDE-99 from Indoor Dust Interferes with *Dio3* and Affects Thyroid Function Regulation in Zebrafish

Yin Xiaoyu, Dong Wenjing, Li Jiawei, Qi Chelimuge, Yu Yongli, 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 2 March 2020 accepted 13 May 2020

Abstract: PBDEs are brominated flame retardants that have been detected in dust in offices and homes. PBDEs can cause endocrine disruption by mainly affecting the regulation of thyroid hormones. This study used zebrafish embryos as a test species to evaluate the effects of the extracts of office and household dust and BDE-99 on zebrafish embryos. The results showed that dust extracts and BDE-99 both caused a decrease in the pigmentation of the zebrafish eyes. GC-MS analysis found that BDE-99 and BDE-47 were contained in the dust and the content of

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21567019, 81360508); 内蒙古民族大学特色交叉学科群建设项目(MDXK008); 内蒙古自治区自然科学基金资助项目(2018MS08033); 内蒙古自治区高等学校科学研究项目(NJZC17203); 内蒙古草原英才 2020 年度滚动支持(董武); 内蒙古毒物监测及毒理学重点实验室开放项目(MDK2019074, MDK2019076); 内蒙古民族大学研究生科研创新项目(NMDSS1860); 蒙药研发国家地方联合工程研究中心开放基金资助项目(MDK2019051)

第一作者: 尹晓宇(1994—), 男, 硕士研究生, 研究方向为毒理学, E-mail: yinxiaoyu344@163.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: dongwu@imun.edu.cn

BDE-99 was much higher than BDE-47. By evaluating the effects of BDE-99 on zebrafish metabolism and the expression of the thyroid hormone deiodinase III (*Dio3*), it was found that the expression of *Dio3* was significantly enhanced in the protoneural duct of the zebrafish embryo. The thyroid hormone content in the 72 hpf zebrafish embryo was significantly reduced. The above results show that BDE-99 interferes with the activity of *Dio3* in zebrafish embryos and leads to a decrease in thyroxine content. This study indicates that alterations in pigment of the zebrafish embryo and *Dio3* mRNA expression may be used as biological indicators of PBDEs.

Keywords: PBDEs; dust; zebrafish embryos; *Dio3*; BDE-99

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)是溴化阻燃剂(BRF)类的化学物质,由于其高性能、低成本和独特的理化性质,已成为世界上使用最广泛的阻燃剂之一。它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,PBDEs可分为209种同分异构体^[1]。虽然,PBDEs作为阻燃剂使用成本低廉,但由于它们在环境中不易降解,且具有较高的生物累积潜力以及潜在毒性,导致它们被归类为新型持久性环境有机污染物^[2]。研究者发现,PBDEs在家庭灰尘中、鱼体内和淤泥中大量蓄积,且PBDEs在人体内蓄积,可能会导致胎儿畸形和甲状腺功能失调。Johnson-Restrepo和Kannan^[3]比较了室内灰尘和摄入食物中的PBDEs浓度,认为室内灰尘是PBDEs暴露的主要途径。Smielowska和Zabiegala^[4]发现,PBDEs沉积在由于重力下落而产生的粉尘(即悬浮颗粒物)上,因此,粉尘是PBDEs的重要储藏环境和来源。Bu等^[5]研究发现,BDE-209、BDE-47和BDE-99是室内沉降尘埃中最主要的化合物。Zhu等^[6]也发现,室内灰尘被PBDEs污染,并且中国东部地区的PBDEs浓度高于西部地区,城市地区的PBDEs浓度高于农村地区,这表明,社会经济发展对PBDEs污染水平具有重大影响。尘土中的PBDEs很难降解,因此,被联合国环境规划署(UNEP)和联合国工业开发组织(UNIDO)列为持久性有机污染物(POPs),被叫做POP-PBDEs^[7],且尘土中的PBDEs易被生物利用并具有生物活性。尘土中的PBDEs可通过呼吸进入肺部,从而进入血液循环,对健康造成一定的威胁。尤其办公室环境中PBDEs的暴露,可能导致上班人群受PBDEs的严重危害^[8-9]。

有关多溴联苯醚的毒性机理,可能与改变血液中的甲状腺激素水平及其受体有关,PBDEs对甲状腺功能的影响,主要表现在影响甲状腺素在血清中的水平^[10]或甲状腺素调控相关的基因表达。Arkoosh等^[11]发现,鲑鱼中BDE-99的摄入会降低血液

循环中四碘甲状腺原氨酸(T4)和三碘甲状腺原氨酸(T3)的浓度。Qian等^[12]发现,小鼠在妊娠和哺乳期暴露于BDE-209,其甲状腺素脱碘酶的mRNA表达和蛋白表达受到影响,后代血清中的甲状腺激素(THs)水平进而受到破坏,从而可能导致后代小鼠的神经功能受损。Han等^[13]发现,斑马鱼亲本暴露于BDE-209,会对F1代产生发育毒性,并破坏后代的甲状腺内分泌系统。

斑马鱼作为实验动物模型,因其具有胚胎透明、发育迅速、便于观察和操作、对药物极其敏感及可利用资源极其丰富等诸多优势,而被广泛应用。使用斑马鱼胚胎评价PBDEs的毒性及其作用机制,具有独特优势。在本研究中,针对家庭及办公室灰尘中的PBDEs含量进行了检测,特别是针对BDE-99进行了研究,评估其对斑马鱼代谢以及相关甲状腺素及甲状腺素脱碘酶III(*Dio3*)的影响,探讨了BDE-99对甲状腺功能的影响,为今后对PBDEs的研究提供了参考,BDE-99和BDE-47的化合物结构如图1所示。

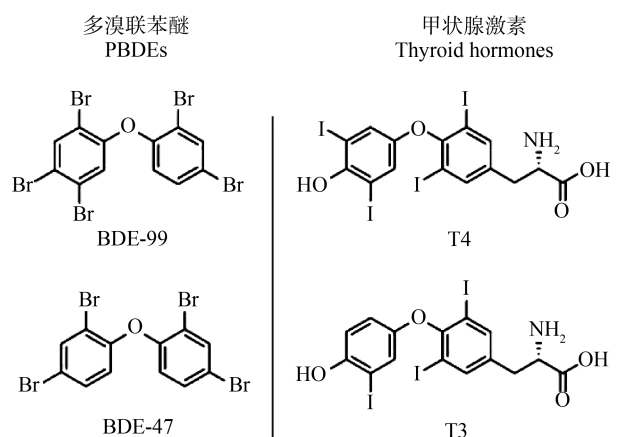


图1 多溴联苯醚(PBDEs)中BDE-99和BDE-47以及甲状腺激素中三碘甲状腺原氨酸(T3)和四碘甲状腺原氨酸(T4)的化学结构式

Fig. 1 The chemical structural formulas of BDE-99 and BDE-47 of polybrominated diphenyl ethers and T3 (triiodothyronine) and T4 (tetraiodothyronine) of thyroid hormones

1 材料与与方法 (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), 雌雄鱼分开饲喂, 每天 14 h : 10 h 的光: 暗周期。养殖温度 (28 ± 1) °C, pH 保持在 7.0 ~ 7.6 之间, 电导率保持在 440 ~ 640 μS 之间。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, 待第 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 °C 恒温培养箱中孵化。

1.2 粉尘样品收集与处理

在 2018 年 5—10 月收集并处理企业办公室(电脑较多)和家庭(没有电脑)中 4 个地点(办公室桌面、办公室地面、家庭桌面和家庭地面)的室内灰尘样品^[14] ($n=80$), 并且灰尘收集在纤维素套管中^[15]。除取样地点不同外, 其他取样条件均保持一致。样品过筛至 500 μm 以下, 并储存在 -20 °C。用二氯甲烷和己烷 ($V : V=50 : 50$) 萃取约 100 mg 的粉尘, 超声处理后, 萃取液使用氮气吹干浓缩。一半萃取液通过 GC/MS 鉴定阻燃剂^[14]; 另一半蒸干使用 100 μL 二甲基亚砜 (DMSO) (纯度为 99.5%, 西格玛) 溶解定容用于生物监控, DMSO 最终浓度 < 0.1%。

1.3 GC-MS 检测

参考 Fulton 等^[16] 的方法, 使用 GC-MS 检测灰尘中 BDE-99 和 BDE-47 的含量, 选择办公室和家庭中 2 个地点的灰尘进行检测。将灰尘萃取液重新溶于 100 mL 异辛烷中, 并添加 BDE-47 和 BDE-99 作为回收率测定标准品。使用配有 HP-5MS 色谱柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 mm) 的 Agilent 6850 GC 和 Agilent 5975C MS 进行样品分析。使用氮气作为载气, 以脉冲不分流模式进样 1 mL 样品。最初将 GC 柱箱设置为 80 °C, 以 20 °C \cdot min⁻¹ 的速度升至 100 °C, 保持 2 min。然后, 将烤箱以 30 °C \cdot min⁻¹ 的速度加热到 220 °C, 再将速率降低到 1 °C \cdot min⁻¹, 直到温度达到 225 °C, 并在其中保持 5 min。然后以 5 °C \cdot min⁻¹ 的速度将温度升至 280 °C, 并且以 20 °C \cdot min⁻¹ 的速率达到 300 °C, 此时为最终温度, 保持 3 min。入口温度为 260 °C, 离子源和四重离子均设置为 150 °C。最终通过色谱图分析所得数据。

1.4 暴露方法

暴露溶液用鱼类养殖系统水对原液进行稀释获得。鱼类养殖系统水为空白对照组, 浓度为 100

nmol \cdot L⁻¹ 的 BDE-99 作为阳性对照组, 4 个不同地点的灰尘萃取液为实验组。暴露试验在六孔板中进行, 每孔放入正常斑马鱼胚胎 10 粒, 并置于 28 °C 恒温培养箱 (Heratherm IGS180, Thermo Fisher Scientific) 中培养, 每组进行 5 次以上的重复试验。暴露时间为 4 ~ 36 hpf, 观察斑马鱼胚胎眼部色素强度变化, 用 ImageJ 对眼部色素沉着水平进行量化。

1.5 BDE-99 在斑马鱼体内的转化检测

收集经 100 nmol \cdot L⁻¹ BDE-99 暴露后的斑马鱼胚胎 (幼鱼) 和经暴露后的幼鱼长成的成年鱼, 解剖取出成年鱼肝脏, 利用 GC-MS 检测 24 hpf、48 hpf、96 hpf 和 10 dpf 斑马鱼胚胎 (幼鱼) 和成年鱼肝脏体内的 BDE-99 和 BDE-47 的含量。

1.6 整体原位杂交

当斑马鱼胚胎达到实验所需要的发育阶段, 将其固定在含 4% (w/V) 多聚甲醛 (分析纯, 纯度为 98.5%, 福晨化学) 的磷酸盐缓冲溶液 (PBS) 中 (pH 7.4) 过夜, 之后用 PBS 清洗后浸泡于 100% 甲醇中, 可放置于 -20 °C 冰箱中储存。整体原位杂交 (WISH) 是按照 Dong 等^[17] 方法进行的。基本原理是斑马鱼胚胎与 809 个碱基对的斑马鱼 *Dio3* 的反义杂交链结合。然后使用以下引物进行克隆并且做 *Dio3* 探针 (正向引物 5' -TAGACGTGCAGCACCGCGGA-3'; 反向引物 5' -CGCTCCAGCCAGTCTCTGAG-3'), 在 64 °C 杂交过夜后, 胚胎用 $2 \times \text{SSC}$ (300 mmol \cdot L⁻¹ NaCl, 30 mmol \cdot L⁻¹ 柠檬酸钠, pH 7.0) 洗 3 次, 然后用 $0.2 \times \text{SSC}$ 洗 3 次, 每次 30 min。接下来的胚胎是用 2% 的封闭剂封闭 (Roche 公司, 德国)。然后在 4 °C 用 3 000 \times 稀释的 DIG 抗体与碱性磷酸酶偶联 (Roche 公司, 德国); 最后, 与 BM-Purple 底物 (Roche 公司, 德国) 发色。

1.7 总 RNA 提取、cDNA 生成和荧光定量 PCR

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, 使用 Nano Drop2000 测定提取的总 RNA 浓度。纯化的总 RNA 立即用于 cDNA 合成。cDNA 的产生用大容量 cDNA 反转录试剂盒 (Applied Biosystems Inc.) 完成, 反应方法按照厂家说明书进行, cDNA 样本使用前将其保持在 -20 °C 冷冻。使用 TaqMan 进行基因表达测定和基因表达分析 (Applied Biosystems Inc.; 4331182)。反转录加入 0.2 ng cDNA 后进行反应, 与 TaqMan Universal PCR Master Mix 混合, 并使用实时荧光定量 PCR 仪 (7900HT, Applied Biosystems, 美国) 进行 PCR 检测, 用 Sequence Detection System 2.0 软件分析, 实验方

法与步骤基本与 Dong 等^[17]描述的相同。样品的 *Dio3* 基因 (正向引物 5'-AGATGTTACGCTG-GAGTCG-3', 反向引物 5'-CGAAGTTGAGGAT-CAGCGGT-3') 表达数据使用 18s RNA 作为内参基因 (正向引物 5'-TCGCTAGTTGGCATCGTTTATG-3', 反向引物 5'-CGGAGGTTCAAGACGATCA-3'), 来补偿在胚胎之间 RNA 量的内在变异性。

1.8 ELISA 法检测 TT3 和 TT4 水平

挑选出 4 hpf 的斑马鱼胚胎, 经不同浓度的 BDE-99 暴露至 72 hpf, 收集 0 (对照)、1、10、50 和 100 nmol·L⁻¹ 浓度组胚胎各 10 粒, 每个浓度组设立 3 个重复。用去离子水清洗, 弃掉清洗液后, 称重, 按照每组鱼的质量与 PBS (pH=7.2) 体积比为 1:20 的比例, 加入 PBS, 在 0 °C 下进行匀浆, 匀浆后在 10 000 r·min⁻¹、4 °C 离心 5 min, 取上清液, 用 Elisa 试剂盒 (上海圻明生物技术有限公司) 检测斑马鱼体内总 T3 (total T3, TT3) 和总 T4 (total T4, TT4) 的含量^[18]。

1.9 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。差异显著性使用单因素方差分析。P < 0.05 的情况下被认为是统计学上的差异显著。

2 结果 (Results)

2.1 办公室及家庭灰尘中 PBDEs 的化学检测

BDE-99 和 BDE-47 的检出率都是 100%, 但检出浓度范围较大。BDE-99 在办公室和家庭中的检出浓度分别为 0.01 ~ 159.32 ng·g⁻¹ 和 0.06 ~ 49.32 ng·g⁻¹, 中间值浓度分别为 6.275 ng·g⁻¹ 和 1.835 ng·g⁻¹, BDE-47 在办公室和家庭中的检出浓度分别为 0.01 ~ 148.32 ng·g⁻¹ 和 0.04 ~ 49.21 ng·g⁻¹, 中间值浓度分别是 2.090 ng·g⁻¹ 和 1.860 ng·g⁻¹。结果表明, BDE-99 比 BDE-47 有更高的浓度残留, 办公室比家庭有更高的残存 (图 2)。考虑到可能是办公室的电脑产品比家庭的多, 造成了更多的阻燃剂残留。

2.2 灰尘中 PBDEs 毒性效应的初期生物学检测

笔者先前的研究表明^[9], 选择眼部作为评价的标准时, BDE-99 能够引起 36 hpf 斑马鱼胚胎整体色素的降低。同样地, 使用灰尘提取物经过 100× 稀释后, 斑马鱼胚胎暴露于灰尘提取物组与 BDE-99 阳性对照组相似, 在斑马鱼胚胎发育到 36 hpf 时, 斑马鱼胚胎眼部色素的沉着显著降低 (图 3 (f) 和 3 (g))。这说明, 使用生物学方法可以进行 PBDEs 的初期高通量筛选。

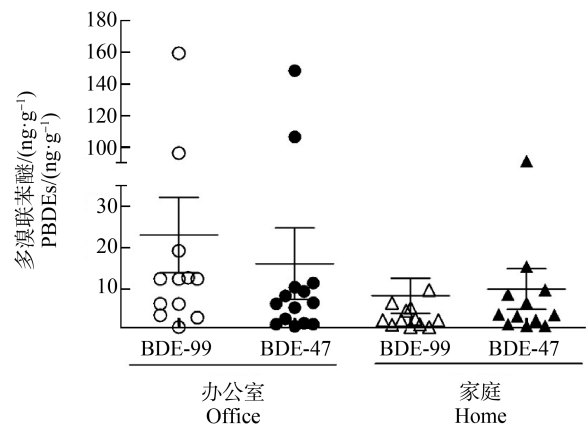


图 2 BDE-99 和 BDE-47 在办公室和家庭的灰尘中的浓度
Fig. 2 BDE-99 and BDE-47 concentrations in offices and homes dust

2.3 BDE-99 在斑马鱼体内的转化

PBDEs 在动物体内会被代谢, BDE-99 在灰尘中的检出率达 100%, 而 BDE-99 在动物体内经过脱溴作用主要降解为 BDE-47^[20]。使用 GC-MS 检测了 BDE-99 在不同发育阶段斑马鱼体内的分解代谢情况。试验分别检测了 24 hpf、48 hpf、96 hpf 和 10 dpf 斑马鱼胚胎 (幼鱼) 和成年鱼肝脏中 BDE-99 的降解情况, 结果表明, 24 hpf 和 48 hpf 时, 无明显降解, BDE-47 也没有被明显检测到 (图 4), 这说明, 斑马鱼胚胎在此时期对 BDE-99 几乎无降解作用。进而推测灰尘萃取液对 36 hpf 斑马鱼胚胎色素的降低作用可能主要由 BDE-99 引起, 而非 BDE-47。

2.4 BDE-99 对 *Dio3* 基因表达的影响

为考察 BDE-99 对斑马鱼胚胎 *Dio3* 的影响, 将 4 hpf 斑马鱼胚胎暴露于 BDE-99 溶液中直至胚胎发育到 22 hpf 和 72 hpf。采用 WISH 和 RT-PCR 方法检测了 *Dio3* mRNA 的表达。WISH 方法的检测结果证明了暴露于 1、10、50 和 100 nmol·L⁻¹ BDE-99 的斑马鱼胚胎, 其 *Dio3* mRNA 表达有增加趋势, 表达位置主要位于原肾管部位 (图 5 (a) ~ 5 (e))。RT-PCR 定量检测结果表明, *Dio3* mRNA 表达随 BDE-99 暴露浓度的增加而升高 (1、10、50 和 100 nmol·L⁻¹)。22 hpf 时, BDE-99 表现为诱导 *Dio3* mRNA 表达的提高 (图 6 (a)), 暴露于 10、50 和 100 nmol·L⁻¹ BDE-99 后的斑马鱼胚胎, *Dio3* mRNA 表达均升高了 2.47 倍以上 (P < 0.05)。72 hpf 时, 暴露于 BDE-99 的斑马鱼胚胎, *Dio3* mRNA 表达随着浓度增加 (1、10、50 和 100 nmol·L⁻¹) 均升高了 1.64 倍以上 (图 6 (b)), 但在统计学上差异不显著 (P > 0.05)。

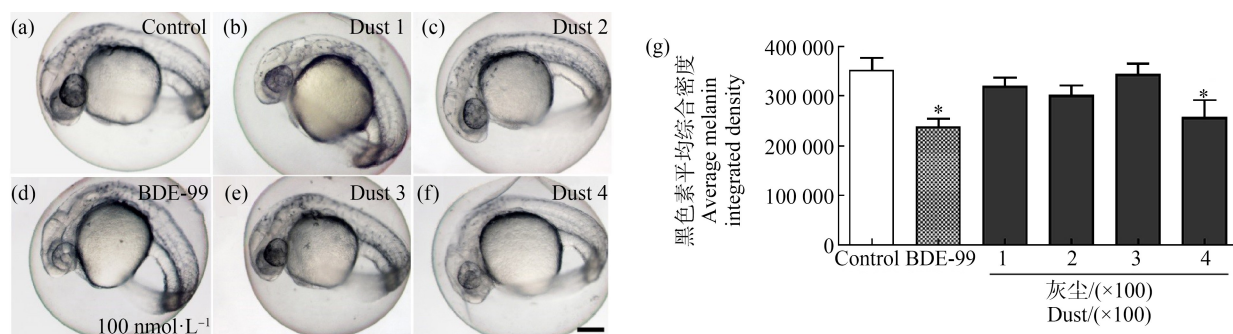


图 3 灰尘提取物降低斑马鱼眼睛色素沉着强度

注:胚胎暴露于灰尘提取物和 BDE-99 (4 ~ 36 hpf);用 ImageJ 对眼部色素沉着水平进行量化;(a)对照组,(d) BDE-99 阳性暴露组,(b),(c),(e)和(f)灰尘提取物暴露组,其中,(b)和(c)分别为家庭中地面和桌面的灰尘提取物暴露组,(e)和(f)分别为办公室地面和桌面(电脑附近)的灰尘提取物暴露组,(g)胚胎的色素强度柱状图(每组 20 个胚胎),* 表示与对照组有显著差异($P<0.05$),比例尺为 100 μm , $\times 100$ 为稀释 100 倍。

Fig. 3 Dust extract reduces eye pigmentation intensity of zebrafish

Note: The embryo was exposed to dust extract and BDE-99 (4 ~ 36 hpf); ImageJ was used to quantify the level of eye pigmentation; (a) control group; (d) BDE-99 positive exposure group; (b), (c), (e) and (f) dust extract exposure group, where (b) and (c) are the ground and desktop dust extract exposure group in the family, (e) and (f) are respectively exposure group of dust extracts on office floor and desktop (near computer); (g) is the histogram of the pigment intensity of embryos (20 embryos per group);

* indicates a significant difference from the control group ($P<0.05$); the scale bar is 100 μm ; $\times 100$ means 100 times dilution.

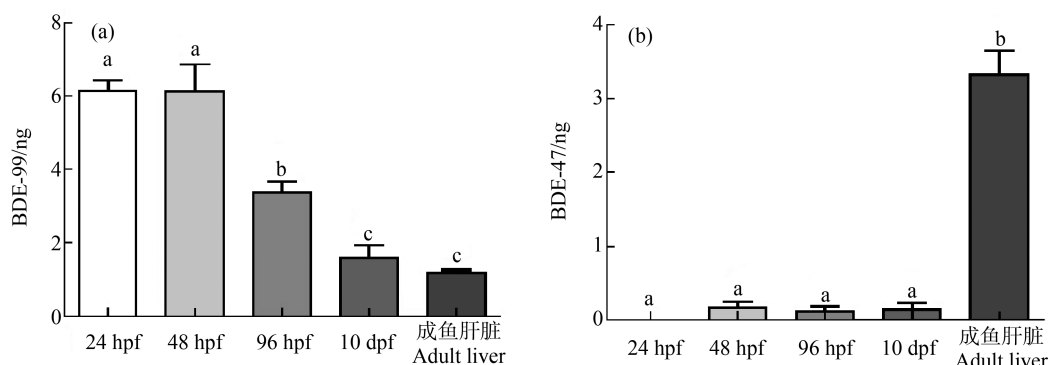


图 4 斑马鱼胚胎(幼鱼)和成年鱼肝脏中 BDE-99 的降解

注:将不同发育时期(24 hpf, 48 hpf, 96 hpf 和 10 dpf)斑马鱼(或者成年鱼肝脏)制成匀浆,提取溶酶体后作用于 BDE-99,然后使用 GC-MS 检测 BDE-99 和 BDE-47 的含量;不同字母表示差异显著($P<0.05$)。

Fig. 4 Zebrafish embryo (juvenile fish) and adult fish liver degrading BDE-99

Note: Zebrafish at different developmental stages (24 hpf, 48 hpf, 96 hpf and 10 dpf) or adult fish liver are made into a homogenate, and lysosomes are extracted and then applied to BDE-99;

the content of BDE-47 and BDE-99 are detected by GC-MS; the different letters indicate significant difference ($P<0.05$).

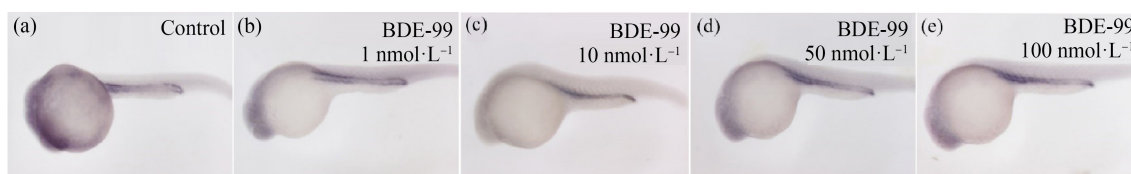


图 5 *Dio3* 基因表达在斑马鱼胚胎原肾管部位

注:胚胎在 4 ~ 22 hpf 暴露于 BDE-99;蓝色部位是 *Dio3* 表达部位;比例尺为 100 μm 。

Fig. 5 *Dio3* gene is expressed in the protorenal duct of the zebrafish embryo

Note: Embryos were exposed to BDE-99 from 4 to 22 hpf; the blue part is the *Dio3* gene expression part; bar=100 μm .

2.5 BDE-99 对甲状腺素的影响

斑马鱼胚胎在经过 1、10、50 和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度的 BDE-99 处理后,在 72 hpf 进行甲状腺素 TT3 和 TT4 的检测。与对照组相比,TT3 含量在 10、50

和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组都有显著降低,分别降低至对照组的 81%、79% 和 73% ($P<0.05$) (图 7(a)),TT4 含量在 50 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度组都显著降低,分别降低至对照的 84% 和 85% (图 7(b))。

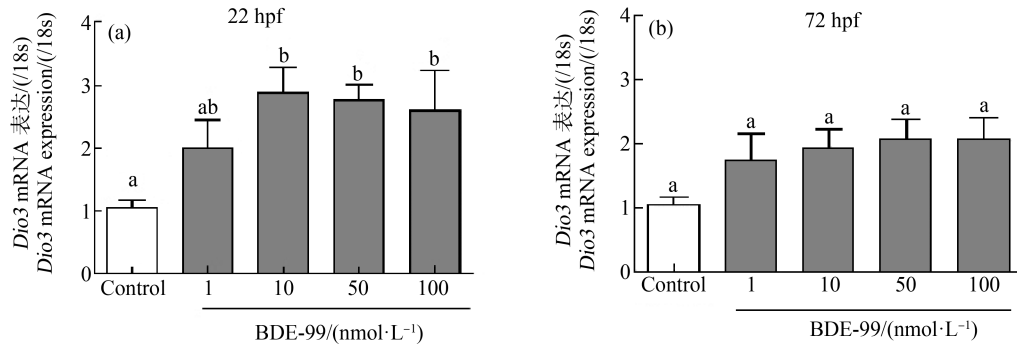


图 6 BDE-99 上调了斑马鱼胚胎 *Dio3* mRNA 表达

注:斑马鱼胚胎暴露于 0(对照)、1、10、50 和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BDE-99,当胚胎发育到 22 hpf 和 72 hpf 时,使用 RT-PCR 检测 *Dio3* mRNA 表达;每组包含 10 个胚胎,每组 3 个重复;不同的字母表示显著差异(平均值 \pm SEM, $P<0.05$)。

Fig. 6 BDE-99 up-regulated the expression of *Dio3* mRNA in zebrafish embryos

Note: Zebrafish embryos were exposed to BDE-99 at 0 (control), 1, 10, 50 and 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; when the embryos reached 22 hpf and 72 hpf, RT-PCR was used to detect *Dio3* mRNA expression; each group contains 10 embryos, with 3 replicates in each group; different letters indicate significant differences (mean \pm SEM, $P<0.05$).

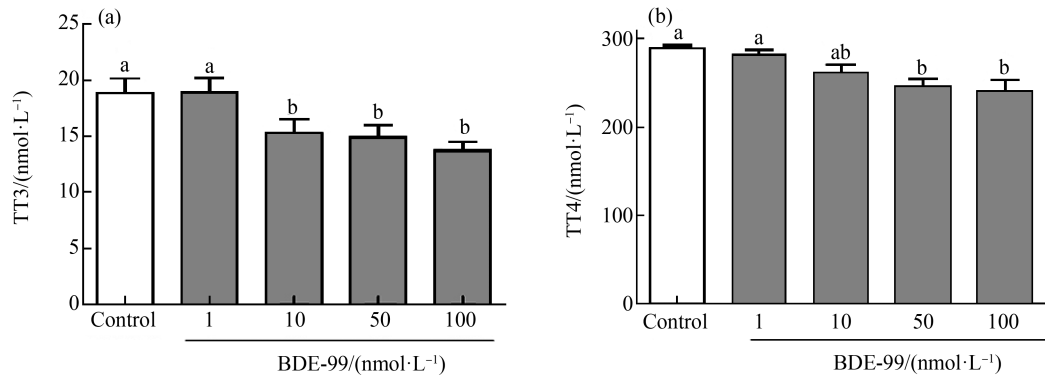


图 7 BDE-99 降低斑马鱼体内总三碘甲状腺原氨酸 (TT3) 和总四碘甲状腺原氨酸 (TT4) 含量

注:斑马鱼胚胎暴露于 0(对照)、1、10、50 和 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BDE-99;使用 Elisa 法检测 72 hpf 斑马鱼胚胎的甲状腺素含量;每组包含 10 个胚胎,每组 3 个重复;不同的字母表示显著差异(平均值 \pm SEM, $P<0.05$)。

Fig. 7 BDE-99 reduces the content of total triiodothyronine (TT3) and total tetraiodothyronine (TT4) in zebrafish

Note: Zebrafish embryos were exposed to BDE-99 at 0 (control), 1, 10, 50, and 100 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$; the thyroxine content of 72 hpf zebrafish embryos was measured using the Elisa method; each group contains 10 embryos, with 3 replicates in each group; different letters indicate significant differences (mean \pm SEM, $P<0.05$).

3 讨论 (Discussion)

本研究结果表明,在灰尘中含有 BDE-99 和 BDE-47,且 BDE-99 的含量大于 BDE-47,且办公室灰尘中的 BDE-99 和 BDE-47 含量比家庭中的多,可能是由于办公室的电脑产品比家庭应用得更多,电

脑附近会释放更多的 BDE-99 和 BDE-47。将斑马鱼胚胎暴露于办公室和家庭灰尘的萃取液中,会导致斑马鱼眼部色素沉着减少,与 BDE-99 有着相似的现象。已知 BDE-99 在动物体内能够降解为 BDE-47,GC-MS 检测结果表明,斑马鱼胚胎内的

BDE-99 在 24 hpf 和 48 hpf 基本无降解,也没有明显检测到 BDE-47,进一步说明灰尘萃取液对 36 hpf 斑马鱼胚胎色素的降低作用主要是 BDE-99 引起的。将斑马鱼胚胎暴露于 BDE-99,结果显示, *Dio3* 表达量升高,TT3 和 TT4 含量降低,这表明,BDE-99 会增强 *Dio3* 活性,*Dio3* 会介导甲状腺激素的调节, *Dio3* mRNA 表达量升高导致甲状腺激素分泌减少,对机体代谢造成影响。

Wang 等^[21]在 90% 的房屋粉尘中,检测到 BDE-47、BDE-99、BDE-153、BDE-18 和 BDE-209,其中,BDE-209 居多。本研究也在灰尘中检测到了 BDE-47 和 BDE-99。Li 等^[22]在研究中提到,旧计算机相较于新计算机释放更多的 PBDEs。Zheng 等^[23]在手机和个人计算机表面检测到 BDE-209。Lee 等^[24]的定量物质流分析结果显示,电视和电脑显示器中含有大量的 PBDEs。这表明,电子产品会释放更多的 PBDEs,本研究也有证实了这一点。

色素沉积的降低与甲状腺激素脱碘酶有一定关联,本研究结果也证实了 BDE-99 会造成 *Dio3* mRNA 表达量的升高,这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 $1\ 813\ \text{GBq}\cdot(\text{mol}\cdot\text{L}^{-1})^{-1}$ 与 BDE-99),1.5 d 后在视网膜黑色素层中发现了放射性物质,表明眼部区域已经有 BDE-99 累积,导致色素沉着的降低^[25]。Yoo 等^[26]的研究结果表明,甲状腺激素通过分泌黑素细胞刺激素(MSH)参与黑色素的合成和色素细胞活力的调节,在控制正常色素的形成中起着重要作用。色素沉着的机理很大程度上取决于甲状腺激素。Dong 等^[27]使用 6-羟基-四溴联苯醚(6-OH-BDE-47)对斑马鱼进行染毒,发现 6-OH-BDE-47 会诱导 *Dio3* mRNA 表达升高。Wang 等^[28]的研究结果表明,BDE-47 显著增加了 *Dio1* 和 *Dio3* 的表达,并导致 T4 和 T3 的水平降低,表明 *Dio1* 和 *Dio3* 在 BDE-47 诱导的甲状腺激素代谢中具有重要作用。在本研究中,BDE-99 造成斑马鱼胚胎体内 *Dio3* 表达量升高,TT3 和 TT4 含量降低,进而导致 BDE-99 对机体代谢产生影响,也进一步证实了 *Dio3* 与机体代谢之间的联系。

综上所述,室内灰尘中含有 BDE-99 和 BDE-47,而电子产品会产生更多的 BDE-99 和 BDE-47,暴露于 BDE-99 会造成斑马鱼胚胎中 *Dio3* mRNA 表达量升高,进而使 TT3 和 TT4 含量降低,这可能是由于 BDE-99 对 *Dio3* 有诱导作用,影响 *Dio3* 活性,

从而造成甲状腺功能的调节紊乱,影响机体代谢。

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] 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
- [3] Johnson-Restrepo B, Kannan K. An assessment of sources and pathways of human exposure to polybrominated diphenyl ethers in the United States [J]. *Chemosphere*, 2009, 76(4): 542-548
- [4] Smielowska M, Zabiegala B. Matrix solid-phase dispersion (MSPD) as simple and useful sample preparation technique for determination of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in dust [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2019, 1084: 33-42
- [5] Bu Z, Xu X, Xu Q, et al. Indoor polybrominated diphenyl ethers in urban China: An exposure and risk assessment based on settled dust from selected urban regions [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 714: 136808
- [6] Zhu N Z, Liu L Y, Ma W L, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor dust in China: Levels, spatial distribution and human exposure [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2015, 111: 1-8
- [7] Babayemi J O, Osibanjo O, Sindiku O, et al. Inventory and substance flow analysis of polybrominated diphenyl ethers in the Nigerian transport sector-end-of-life vehicles policy and management [J]. *Science of the Total Environment*, 2018, 25(32): 31805-31818
- [8] Huwe J K, Hakk H, Smith D J, et al. Comparative absorption and bioaccumulation of polybrominated diphenyl ethers following ingestion via dust and oil in male rats [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(7): 2694-2700
- [9] Watkins D J, McClean M D, Fraser A J, et al. Associations between PBDEs in office air, dust, and surface

- wipes [J]. *Environment International*, 2013, 59: 124-132
- [10] Zhao X, Wang H, Li J, et al. The correlation between polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and thyroid hormones in the general population: A meta-analysis [J]. *PLoS One*, 2015, 10(5): e0126989
- [11] Arkoosh M R, Van Gaest A L, Strickland S A, et al. Alteration of thyroid hormone concentrations in juvenile Chinook salmon (*Oncorhynchus tshawytscha*) exposed to polybrominated diphenyl ethers, BDE-47 and BDE-99 [J]. *Chemosphere*, 2017, 171: 1-8
- [12] Qian B, Wang C, Zhao C, et al. Effects of maternal exposure to BDE209 on neuronal development and transcription of iodothyronine deiodinase in offspring mice [J]. *Toxicology Mechanisms and Methods*, 2019, 29(8): 569-579
- [13] Han Z, Li Y, Zhang S, et al. Prenatal transfer of decabromodiphenyl ether (BDE-209) results in disruption of the thyroid system and developmental toxicity in zebrafish offspring [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 190: 46-52
- [14] Hoffman K, Lorenzo A, Butt C M, et al. Exposure to flame retardant chemicals and occurrence and severity of papillary thyroid cancer: A case-control study [J]. *Environment International*, 2017, 107: 235-242
- [15] Stapleton H M, Misenheimer J, Hoffman K, et al. Flame retardant associations between children's handwipes and house dust [J]. *Chemosphere*, 2014, 116: 54-60
- [16] Fulton C A, Huff Hartz K E, Fell R D, et al. An assessment of pesticide exposures and land use of honey bees in Virginia [J]. *Chemosphere*, 2019, 222: 489-493
- [17] Dong W, Wang F, Fang M, et al. Use of biological detection methods to assess dioxin-like compounds in sediments of Bohai Bay, China [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 173: 339-346
- [18] 康桂英, 董武, 杨景峰, 等. 对乙酰氨基酚对斑马鱼胚胎甲状腺激素相关基因表达的影响[J]. *中国药理学与毒理学杂志*, 2019, 33(4): 288-294
Kang G Y, Dong W, Yang J F, et al. Effect of acetaminophen on expression of thyroid hormone related genes in zebrafish embryo [J]. *Chinese Journal of Pharmacology and Toxicology*, 2019, 33(4): 288-294 (in Chinese)
- [19] 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 THR β 影响斑马鱼胚胎眼部色素的沉着[J]. *生态毒理学报*, 2021, DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20191114001
- 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 THR β [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2021, DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20191114001 (in Chinese)
- [20] Stapleton H M, Letcher R J, Baker J E. Debromination of polybrominated diphenyl ether congeners BDE 99 and BDE 183 in the intestinal tract of the common carp (*Cyprinus carpio*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(4): 1054-1061
- [21] Wang B L, Pang S T, Zhang X L, et al. Levels of polybrominated diphenyl ethers in settled house dust from urban dwellings with resident preschool-aged children in Nanjing, China [J]. *Archives of Environmental Contamination and Toxicology*, 2015, 68(1): 9-19
- [22] Li Y, Chen L, Wen Z H, et al. Characterizing distribution, sources, and potential health risk of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in office environment [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 198: 25-31
- [23] Zheng X, Sun R, Qiao L, et al. Flame retardants on the surface of phones and personal computers [J]. *Science of the Total Environment*, 2017, 609: 541-545
- [24] Lee S, Jang Y C, Kim J G, et al. Static and dynamic flow analysis of PBDEs in plastics from used and end-of-life TVs and computer monitors by life cycle in Korea [J]. *Science of the Total Environment*, 2015, 506-507: 76-85
- [25] 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
- [26] Yoo J H, Takeuchi T, Tagawa M, et al. Effect of thyroid hormones on the stage-specific pigmentation of the Japanese flounder *Paralichthys olivaceus* [J]. *Zoological Science*, 2000, 17(8): 1101-1106
- [27] Dong W, Macaulay L J, Kwok K W, et al. Using whole mount *in situ* hybridization to examine thyroid hormone deiodinase expression in embryonic and larval zebrafish: A tool for examining OH-BDE toxicity to early life stages [J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 132-133: 190-199
- [28] Wang C, Zhu J, Zhang Z, et al. Rno-miR-224-5p contributes to 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether-induced low triiodothyronine in rats by targeting deiodinases [J]. *Chemosphere*, 2020, 246: 125774 ◆