

DOI:10.7524/AJE.1673-5897.20240228001

李涛, 岳喜凯, 余丽琴. 2-乙基己基二苯基磷酸酯急性暴露对斑马鱼仔鱼脂质代谢和线粒体功能的影响[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(3): 9-21

Li T, Yue X K, Yu L Q. Effects of acute exposure to 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on lipid metabolism and mitochondrial function in zebrafish larvae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(3): 9-21 (in Chinese)

2-乙基己基二苯基磷酸酯急性暴露对斑马鱼仔鱼脂质代谢和线粒体功能的影响

李涛¹, 岳喜凯¹, 余丽琴^{1,2,3,*}

1. 华中农业大学水产学院, 武汉 430070

2. 湖北省池塘水产养殖工程实验室, 武汉 430070

3. 长江经济带大宗水生生物产业绿色发展教育部工程研究中心, 武汉 430070

收稿日期: 2024-02-28

录用日期: 2024-04-21

摘要: 2-乙基己基二苯基磷酸酯(2-ethylhexyl diphenyl phosphate, EHDPP)是一种典型的有机磷阻燃剂,该化合物的大量使用导致其在环境基质中被频繁检出。大量离体研究表明 EHDPP 具有干扰脂质代谢的不良影响,但其是否会引起活体脂质代谢紊乱及潜在的机制尚不明确。本研究将斑马鱼胚胎(2 hours post-fertilization, 2 hpf)暴露于环境相关浓度(0、10、100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)EHDPP 中 5 d,评估 EHDPP 对仔鱼脂质代谢和线粒体功能的影响。结果表明,和对照组相比,100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露显著降低仔鱼孵化率、体长、心率和存活率,畸形率升高,表现出显著的生长发育毒性。结果还显示 EHDPP 引发脂质紊乱,总胆固醇和甘油三酯的含量在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组较对照组显著性降低。EHDPP 暴露显著降低仔鱼三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和谷胱甘肽(glutathione, GSH)水平,活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平显著性升高,这提示 EHDPP 可能会诱发线粒体功能障碍。进一步发现 EHDPP 暴露导致仔鱼 *18s-rrn* 基因表达显著性下降,而参与调控线粒体分裂(线粒体动力相关蛋白(drp1)和线粒体分裂蛋白(fis1))、融合(视神经萎缩蛋白(opal))和自噬(PTEN 诱导激酶1(pink1)和 FUN14 域蛋白 1(fundc1))的基因表达显著性升高,表明 EHDPP 引发线粒体功能障碍。参与脂质合成的基因(脂肪酸合酶基因(*fas*)和载脂蛋白 E 基因(*apoe*))显著性降低,而调控脂质代谢的基因,如过氧化物酶体增殖物激活受体 α 基因(*ppar α*)、过氧化物酶体增殖物激活受体 β 基因(*ppar β*)和酰基辅酶 A 氧化酶 1 基因(*acox1*)显著性升高,这些结果表明 EHDPP 可能引发斑马鱼线粒体功能障碍进而干扰斑马鱼幼鱼的脂肪酸氧化和脂质合成,总的来说,本研究发现 EHDPP 可能诱发脂质紊乱,并首次在体内实验中表明 EHDPP 会引发斑马鱼线粒体功能障碍,为 EHDPP 的毒性机制的研究提供新的思路。

关键词: 2-乙基己基二苯基磷酸酯;斑马鱼;脂质紊乱;线粒体功能障碍

文章编号: 1673-5897(2024)3-009-13

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Effects of Acute Exposure to 2-ethylhexyl Diphenyl Phosphate on Lipid Metabolism and Mitochondrial Function in Zebrafish Larvae

Li Tao¹, Yue Xikai¹, Yu Liqin^{1,2,3,*}

1. College of Fisheries, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

2. Hubei Provincial Engineering Laboratory for Pond Aquaculture, Wuhan 430070, China

3. Engineering Research Center of Green Development for Conventional Aquatic Biological Industry in the Yangtze River Economic Belt, Ministry of Education, Wuhan 430070, China

基金项目:国家重点研发计划(2023YFD2400501)

第一作者:李涛(1998—),男,硕士研究生,研究方向为生态毒理学, E-mail: 656253329@qq.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: yuliqin@mail.hzau.edu.cn

Received 28 February 2024 accepted 21 April 2024

Abstract: 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP) is an aryl organophosphorus flame retardant, which is ubiquitously found in various environmental matrices. While previous *in vitro* studies have emphasized the negative impact of EHDPP on lipid metabolism, there remains a dearth of *in vivo* research exploring its potential toxic effects and underlying mechanisms. In the present study, zebrafish (*Danio rerio*) embryos (<2 hpf) were exposed to environmentally relevant concentrations (0, 1, 10, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 5 days. Results showed that 100, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP may lead to developmental toxicity, evidenced by the increased malformation rate, reduced hatching rate, heart rate, survival rate and body length, in comparison with the control. The levels of total cholesterol and triglycerides were significantly reduced in 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP group compared to the control, suggesting that EHDPP caused disorders of lipid metabolism. EHDPP resulted in a notable reduction in the concentrations of ATP, SOD, and GSH, along with an elevation in ROS levels, suggestive of mitochondrial dysfunction triggered by EHDPP. Upon further analysis, it was revealed that the transcription of the *18rs-rn* gene was significantly reduced, while the expressions of genes involved in mitochondrial division (including mitochondrial fission protein 1 (*fis1*) and dynamin-related protein (*drp1*)), fusion (optic atrophy 1 (*opa1*)), and autophagy (PTEN-induced putative kinase 1 (*pink1*) and FUN14 domain containing 1 (*fundc1*)) were notably upregulated, which may partially account for the mitochondrial dysfunction. Genes involved in lipid biosynthesis including acid synthetase (*fas*) and apolipoprotein E (*apoe*) genes were significantly downregulated, whereas genes related to lipid metabolism such as peroxisome proliferators-activated receptors (*ppar α* and *ppar β*) and acyl-CoA oxidase 1 (*acox1*) were upregulated. These results implied that EHDPP may disturb fatty acid oxidation and lipid synthesis in zebrafish larvae which might result from mitochondrial dysfunction. In conclusion, our study found that EHDPP may induce lipid metabolism disorders. For the first time, we have demonstrated mitochondrial dysfunction *in vivo* resulting from the effects of EHDPP, potentially offering novel insights into the toxicity elicited by this compound.

Keywords: 2-ethylhexyl diphenyl phosphate; zebrafish; lipid disturbance; mitochondrial dysfunction

2-乙基己基二苯基磷酸酯(2-ethylhexyl diphenyl phosphate, EHDPP)是一种典型的有机磷阻燃剂,被广泛用于油漆、橡胶、颜料分散剂、黏合剂和纺织涂料、食品包装等各种产品中用以提升材料的防火性、柔韧性和耐用性^[1]。EHDPP 主要通过物理方式添加到产品中,因此易于释放到环境中^[2]。EHDPP 的大量使用加剧了其在不同环境中的富集,在空气、灰尘、水体、沉积物和土壤等环境介质中不断检出^[3-6],甚至在食品和生物体中也能检测到 EHDPP 的存在^[7-8]。例如在韩国始华湖近海地区地表水中, EHDPP 检出浓度最高可达 94.8 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[9], Wang 等^[10]在我国吉林省松花江地表水中检出 EHDPP 浓度为 94 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。2022 年一项针对我国珠江三角洲水域中有机磷阻燃剂的研究发现, EHDPP 在表层水域水平最高可达 480 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11]。EHDPP 具有极强的亲脂性($\log K_{ow}=5.73$),易于在多种水生生物体内蓄积,有研究发现瑞典野生鱼类中 EHDPP 浓度高达 14 000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以单位脂质量计)^[12],此外, Aznar-

Alemanly 等^[13]等在地中海西北部加泰罗尼亚海岸的条纹海豚的背部肌肉中多个样本检出的 EHDPP 浓度超过 1 000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (以单位脂质量计)。EHDPP 在水体中的频繁检出以及其在水生生物体内的高蓄积性引起了人们对其毒性效应的关注。

毒理学研究表明, EHDPP 暴露会在各种生物体或细胞系中引起甲状腺内分泌干扰效应^[14]、神经毒性^[15]、生长发育毒性^[16]和生殖毒性^[17]。最近的体外研究强调了 EHDPP 引发脂质代谢毒性: Yue 等^[18]发现 EHDPP 暴露下调了前脂肪细胞的 miR-155-5p,从而增加了 CCAAT 增强子结合蛋白 β 表达并促进前脂肪细胞的脂肪生成。Negi 等^[19]发现 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 激活人 3D 肝球状细胞中核受体超家族的过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1,并增加甘油三酯(triglyceride, TG)水平。然而,已有研究大多关注 EHDPP 的体外脂质代谢影响,对生物体内的研究较少,只有少数研究报道了母源性暴露对子代的影响,例如:围产期小鼠暴露于 EHDPP

($300 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)可降低其后代中雄性小鼠的 TG 水平并诱导了肝损伤^[20]。与此同时,体外研究中 EHDPP 暴露浓度较高且目前对 EHDPP 的体内潜在脂质代谢干扰及其相关机制的研究仍旧匮乏,所以需要进一步地探索环境相关浓度 EHDPP 在活体生物内的脂质代谢机制。

线粒体功能障碍多指因线粒体膜受到破坏、mtDNA 的损伤、酶活性降低等引起的能量代谢障碍^[21]。脂代谢与线粒体功能障碍密切相关,当脂质代谢出现紊乱,脂质分解产生的脂肪酸大量蓄积会抑制呼吸链复合体,进而破坏线粒体结构,最终引发线粒体功能障碍^[22]。Liu 等^[23]发现 $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 全氟和多氟物质(PFAS)暴露斑马鱼会显著增加脂质代谢相关基因(*ppar α* 和 *acox*)的表达,并增强 β 氧化和诱发线粒体功能障碍。此外,线粒体作为生物体能量代谢的中心,为细胞提供三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP),机体产生线粒体功能障碍会损害氧化磷酸化过程,从而减少 ATP 的产生^[21],ATP 的不足会抑制脂质合成,最终导致脂质代谢失衡^[24]。线粒体功能障碍也会导致生物体活性氧(ROS)的过度积累和产生氧化应激^[25],这会进一步加速脂质过氧化^[26],从而加剧脂质代谢紊乱^[27]。因此本研究将斑马鱼从卵裂期(2 hpf)暴露于环境相关浓度(0、1、10、100、250 和 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)EHDPP 至 5 d,通过检测仔鱼甘油三酯、胆固醇水平和脂质代谢基因表达情况,初步探究了环境相关浓度 EHDPP 暴露对斑马鱼脂质代谢的影响,随后检测斑马鱼的氧化应激水平和线粒体分裂、融合和自噬基因表达探究 EHDPP 对斑马鱼脂质代谢影响的潜在机制。研究为评估 EHDPP 的脂质代谢影响提供了理论依据,对其他有机磷阻燃剂导致脂质紊乱的机制研究也有参考意义。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

2-乙基己基二苯基磷酸酯(EHDPP)纯度>90%,购自梯希爱化成工业发展有限公司(上海,中国)。用于稀释和储备 EHDPP 的二甲基亚砜(dimethylsulfoxide, DMSO)纯度>99%,购自 Sigma-Aldrich 公司(密苏里州圣路易斯,美国)。Trizol 试剂、Prime-Script[®] RT reagent 试剂盒、SYBR[®] Real-Time PCR Master 购自 Takara 公司(大连,中国)。甘油三酯(TG)检测试剂盒、胆固醇(TC)检测试剂盒、活性氧(ROS)、过氧化氢酶(CAT)测试盒和超氧化物歧化酶

(SOD)测试盒购自南京建成生物工程研究所(南京,中国),Bradford 蛋白检测试剂盒和 ATP 酶测试盒购自碧云天生物科技有限公司(上海,中国),基因引物购自中国上海生工公司(上海,中国),其他化学试剂均为分析纯级别。

1.2 斑马鱼的饲养及暴露实验

实验过程符合斑马鱼的伦理规范,按照 Shu 等^[14]的方法进行暴露实验。斑马鱼胚胎(野生型 AB 品系)购于国家斑马鱼中心(武汉,中国)。暴露最低浓度 $1 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的选择基于 EHDPP 在我国珠江三角洲水域表层水中所监测到的浓度($480 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$)^[11]。选取发育正常的卵裂期胚胎(2 hpf),随机分配至含有 0、1、10、100、250 和 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露液的培养皿中,每个皿放置 200 枚胚胎,所有实验组设置 3 个平行,所有实验组 DMSO 浓度为 0.001% (V:V)。将培养皿置于光照培养箱中,每 24 h 全部更换一次暴露液,光暗周期为 14 h:10 h,水温稳定在(28 ± 0.5) °C。每天清理卵膜及死掉的胚胎,统计 120 hpf 存活率,每个浓度随机选取 30 尾仔鱼利用荧光体式显微镜(Leica5, Germany)统计 72 hpf 斑马鱼孵化率和心率,测定 120 hpf 斑马鱼体长。在 2 hpf 至 120 hpf,荧光体式显微镜观察记录胚胎和仔鱼的畸形情况,畸形率为畸形数目和仔鱼存活数目的比值。畸形包括:胚胎畸形、心包囊水肿、脊椎弯曲、卵黄囊水肿等与正常仔鱼不一致的特点。

1.3 暴露水体和仔鱼体内的 EHDPP 检测

每个浓度 3 个平行,每个平行分别收集换水前(T_{24})和换水后(T_0)的 1 mL 暴露水体用于测定暴露水体中 EHDPP 的实际浓度。EHDPP 暴露 5 d 后,每个浓度 3 个平行,每个平行收集 100 尾仔鱼用于测定暴露仔鱼体内中 EHDPP 的实际浓度。测定方法参考文献[14]。

1.4 仔鱼甘油三酯、胆固醇的检测

暴露 5 d 后,收集仔鱼(50 尾作为一个样本)于 1.5 mL 离心管中,每个浓度设置 3 个平行。准确称取组织质量,按质量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆, $2500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,取上清液待测。仔鱼体内 TG 和 TC 的检测严格按照试验说明书进行操作,以 $\text{mmol} \cdot \text{g}^{-1}$ 表示。仔鱼的总蛋白质含量参照 Bradford 蛋白检测试剂盒说明书测定。

1.5 仔鱼 ROS 的检测

暴露 5 d 后,收集仔鱼(30 尾作为一个样本),每

个浓度设置3个平行。用刮刀轻搓组织块,边搓边用磷酸缓冲盐溶液(PBS)冲洗,收集细胞悬液,500 g 离心 10 min,去上清留沉淀,并用 PBS 洗 2 次。取不进行任何处理的细胞用 $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ PBS 重悬,设为阴性对照管。阳性对照管:用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀,同时加入活性氧供氢体诱导细胞。样本管:用稀释好的 DCFH-DA 重悬细胞沉淀。37 °C 孵育细胞 1 h。收集孵育(探针标记)后的单细胞悬液,1 000 g 离心 10 min,去上清收集细胞沉淀,用 PBS 洗涤 2 次。离心收集细胞沉淀用 1 mL PBS 重悬,最佳激发波长 488 nm,最佳发射波长 525 nm 荧光检测,结果以荧光度值表示。

1.6 仔鱼 ATP 的检测

暴露 5 d 后,收集仔鱼(120 尾作为一个样本),每个浓度设置 3 个平行。加入 200 μL 试剂盒中的 ATP 检测裂解液,冰水浴条件下机械匀浆。4 °C、12 000 g 离心 5 min,取上清测定。加 100 μL ATP 检测工作液到检测孔内。室温放置 3 ~ 5 min,消耗本底性的 ATP。随后加上 20 μL 样品或标准品,混匀,至少间隔 2 s 后,使用多功能酶标仪(SpectraMax i3x, Molecular Devices, 上海)测定化学发光。

1.7 仔鱼氧化应激水平检测

暴露 5 d 后,收集仔鱼(50 尾作为一个样本)于 1.5 mL 离心管中,每个浓度设置 3 个平行。准确称取组织质量,按质量(g):体积(mL)=1:9 的比例,加入 9 倍体积的生理盐水,冰水浴条件下机械匀浆,2 500 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,离心 10 min,取上清液待测。按照试剂盒说明书及计算公式,测定仔鱼 CAT、SOD 活力 GSH 含量。

1.8 实时荧光定量 PCR(QRT-PCR)

斑马鱼暴露 5 d 后,收集仔鱼(30 尾作为一个样本)于 1.5 mL EP 管(RNAase-free),每个浓度 3 个重复。液氮速冻,置于 -80 °C 保存。从 -80 °C 冰箱中取出样品,每管加入 4 颗直径为 1 mm 的匀浆珠和 400 μL TRIzol,充分匀浆,4 °C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,取上清,加入 100 μL 氯仿,再次离心 20 min。取上清,加入上清液等体积的异丙醇,4 °C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min。倾倒入上清液。加入 1 mL 75% 乙醇洗涤沉淀。上下颠倒 EP 管,4 °C、12 000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 5 min,弃上清保留沉淀,重复上述洗涤过程 2 ~ 3 次,无水乙醇再次洗涤 1 次。通风橱中室温放置 5 ~ 10 min 使乙醇挥发,使 RNA 沉淀晾干但不完全干燥,加入 20 μL DEPC 水溶解 RNA。使用

Epoch 微孔板分光光度计(BioTek Instruments, Inc, Winooski, VT, USA)检测 RNA 的质量并测量其浓度。使用 PrimeScript[®] reagent Kit(TaKaRa)试剂盒合成了第一链 cDNA,10 μL 反应体系最多可逆转录 500 ng RNA。实时荧光定量 PCR 参考试剂盒说明书和 Yu 等^[28]的文章,用两步法 PCR 反应程序进行 Real Time PCR 反应。两步法 PCR 扩增标准程序:95 °C 预变性 10 min,95 °C 变性 10 s,60 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 32 s,变性、退火、延伸经过 40 个循环。预实验对比内参基因:3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *gapdh*)、核糖体蛋白 L8(ribosomal protein L8, *rpl8*)和 β 肌动蛋白(β -actin)在实验条件下的稳定性,发现对照组中 *gapdh* 表达比较稳定,所以选择 *gapdh* 为内参基因。相关引物序列见表 1。目的基因转录水平的相对变化使用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法进行计算处理。

1.9 数据处理与分析

数据分析使用 SPSS Statistics 20.0 软件(IBM CorP., Armonk, NY, USA)。实验数据分别使用 Kolmogorov-Smirnov 和 Levene's 检验方法进行正态分布检验和方差齐性检验。通过单因素方差分析(one-way analysis of variance, ANOVA)评估对照组和实验组间的差异,采用 Tukey's 法检验,数据表示为平均值 $\pm$ 标准误(Mean $\pm$ SEM), $P < 0.05$ 为显著性差异。

2 结果(Results)

2.1 暴露水体和仔鱼中 EHDPP 浓度

暴露水体和仔鱼中 EHDPP 浓度如表 2 所示,实验水体 EHDPP 名义浓度为 0、1、10、100、250 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,更换暴露液(T_0)后水体实际浓度为 ND、(0.48 $\pm$ 0.11)、(6.56 $\pm$ 0.08)、(67.92 $\pm$ 2.61)、(139.26 $\pm$ 3.07)和(172.38 $\pm$ 4.57) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。更换暴露液 24 h 后(T_{24})水体实际浓度为 ND、(0.02 $\pm$ 0.01)、(0.78 $\pm$ 0.09)、(8.50 $\pm$ 1.70)、(21.44 $\pm$ 1.27)和(37.67 $\pm$ 1.63) $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。EHDPP 暴露 5 d 后,0、1、10、100、250 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组仔鱼中的 EHDPP 含量分别为 ND、(0.16 $\pm$ 0.05)、(1.48 $\pm$ 0.20)、(13.44 $\pm$ 2.38)、(58.48 $\pm$ 1.10)和(115.12 $\pm$ 2.77) $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ (以干质量计)。

2.2 仔鱼生长发育终点指标

EHDPP 暴露 5 d 斑马鱼仔鱼生长发育终点指标的影响如表 3 所示,与对照组相比,10、100、250 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组斑马鱼存活率分别显著降低 7.14% ($P < 0.01$)、8.61% ($P < 0.001$)、8.06% ($P <$

0.01)和 9.52% ($P<0.001$), 100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组孵化率分别显著降低 21.83% ($P<0.01$)、31.31%和 31.62% ($P<0.001$)。100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组畸形率分别显著升高 160.08%、170.07% ($P<0.05$)和 269.61% ($P<0.01$)。100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组,心率和体长分别显著降低 6.00%、16.10%、20.10% 和 4.37%、6.64%、6.80% ($P<0.001$)。

2.3 仔鱼 TG 和 TC 含量

如图 1(a)和 1(b)所示,与对照组相比,TG 和 TC 在 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著下调,TC 和 TG 分别显著降低 20.67% 和 36.17% ($P<0.05$)。

表 1 基因的引物序列信息

Table 1 Primers sequences for tested genes

基因名称 Gene name	正义链序列(5' ~ 3') Sense strand (5' ~ 3')	反义链序列(5' ~ 3') Antisense strand (5' ~ 3')	基因登录号 Gene ID
<i>gapdh</i>	ctggtgacccgtgctgctt	ttgccgccttctgcctta	NM_001115114
<i>pparα</i>	catcttgcttgacagacatt	cacgctcacttttcatttcac	NM_001102567.1
<i>pparβ</i>	gcgtaagctagtcgcaggtc	tgcaccagagagtcacatgtc	XM_694808.9
<i>acox1</i>	atgcctggaacaacacttc	agacccttcagcctctgtga	NM_001005933.2
<i>mtp</i>	ctcagctgggtgatgcagta	atctctgtgtgccgatctt	NM_212970.2
<i>acc</i>	ctatccgacgctgggcttac	gcgatgccgttcttgtgc	XM_009298360
<i>fas</i>	atggagtttcagggcgag	gggaataatatgcggtggc	XM_009306807
<i>dgat2</i>	catggcatcttgtgttttg	tcggtttactgggcagattc	NM_001030196
<i>apoe</i>	tgacctcaagcacgtcactc	ggggaaaaccagcacttgta	XM_689735
<i>plog1</i>	ggtgaccagtgaagaccgata	gtccactgcgctaaagaagg	XR_029715
<i>18rs-rrn</i>	agcgtgcgggaaaccacgag	aagccgcaggctccactcct	NM_001304195.1
<i>funde1</i>	agaagcagtgagtgcaatgga	tggcacaatatatctctcctg	NM_001002711.2
<i>pink1</i>	tcagcgttacataacaacactac	tcggctgagaacatgctttact	NM_001008628.1
<i>drp1</i>	cgatcctcttggcggactta	ttcactgcctcttcaccag	XM_017351314.1
<i>fis1</i>	gaaccggacaacaacaggc	ccggccacacctaataccaat	NM_001310843.2
<i>opal</i>	tctccagcgaaactactggc	ttgaactgctgtctccgct	XM_021476848.1
<i>mfn1</i>	agactcggaggaggaagg	aggccaaaacactcgaacca	XM_017351315.2

表 2 暴露液和仔鱼中 2-乙基己基二苯基磷酸酯 (EHDPP) 浓度

Table 2 Concentration of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP) in exposure solution and zebrafish larvae

名义浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Nominal concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	实际浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) Measured concentration/($\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)		斑马鱼仔鱼 EHDPP 含量 /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)(以单位干质量计) Concentration in the zebrafish larvae /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)(Based on dry mass)
	T_0	T_{24}	
0	ND ^a	ND ^a	ND ^a
1	0.48±0.11	0.02±0.01	0.16±0.05
10	6.56±0.08	0.78±0.09	1.48±0.20
100	67.92±2.61	8.50±1.70	13.44±2.38
250	139.26±3.07	21.44±1.27	58.48±1.10
500	172.38±4.57	37.67±1.63	115.12±2.77

注:ND^a 表示未检测到,实验数据以平均值±标准误差表示(mean±SEM);每组 3 个重复用以测定暴露液浓度,3 个重复样本($n=3$)用于测定仔鱼中的浓度; T_0 表示更新暴露液 0 h 后, T_{24} 表示 24 h 更新暴露液前。

Note: ND^a means not detected; data are presented as mean±SEM; each group contains 3 replicates ($n=3$) for aqueous concentration determination and three replicate samples ($n=3$), three tissues pooled as one sample for concentration determination in zebrafish larvae; T_0 means after (0 h) the renewal of exposure solutions, and T_{24} before (24 h) the renewal of exposure solutions.

表 3 EHDPP (0、1、10、100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 暴露 5 d 对斑马鱼仔鱼存活率、畸形率、孵化率、心率和体长的影响Table 3 Survival rate, malformation rate, hatching rate, heart rate and body length in zebrafish larvae exposure to EHDPP (0, 1, 10, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 5 d

	0 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$	500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$
存活率/%	91.00 $\pm$ 2.18	89.33 $\pm$ 0.29	84.50 $\pm$ 2.18**	83.17 $\pm$ 2.57***	83.67 $\pm$ 1.67**	82.13 $\pm$ 1.04***
Survival rate/%						
畸形率/%	1.67 $\pm$ 0.29	3.00 $\pm$ 0.50	3.17 $\pm$ 2.02	4.33 $\pm$ 1.14*	4.50 $\pm$ 0.50*	6.17 $\pm$ 0.29***
Malformation rate/%						
孵化率(72 h)/%	90.04 $\pm$ 3.71	82.46 $\pm$ 9.12	80.40 $\pm$ 5.40	70.39 $\pm$ 2.38**	61.85 $\pm$ 1.24***	61.57 $\pm$ 1.42***
Hatching rate (72 h)/%						
心率/(次 $\cdot\text{min}^{-1}$)	219.90 $\pm$ 8.52	216.60 $\pm$ 7.72	218.40 $\pm$ 6.83	206.70 $\pm$ 6.37***	184.50 $\pm$ 13.74***	175.90 $\pm$ 8.28***
Heart rate/(brats $\cdot\text{min}^{-1}$)						
体长/mm	3.90 $\pm$ 0.10	3.95 $\pm$ 0.07	3.95 $\pm$ 0.10	3.79 $\pm$ 0.14***	3.70 $\pm$ 0.11***	3.69 $\pm$ 0.18***
Body length/mm						

注:每个浓度 3 个平行,每个平行 200 枚胚胎;实验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示(mean $\pm$ SEM);*表示暴露组与对照组之间具有显著性差异(* P <0.05、** P <0.01、*** P <0.001)。

Note: There were three replicates and each replicate contained 200 embryos; data were expressed as mean $\pm$ SEM; * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001 indicated significant difference between exposure groups and the control group.

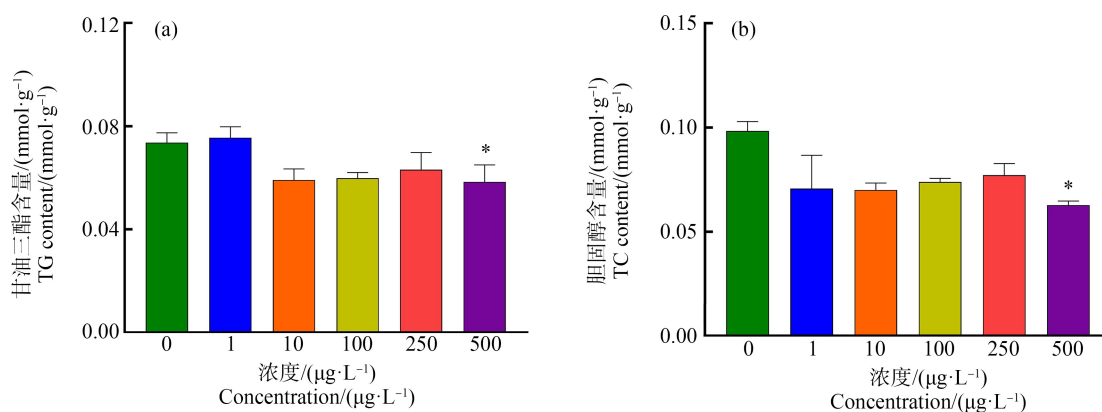


图 1 不同浓度 EHDPP 处理组仔鱼中甘油三酯 (TG) 和总胆固醇 (TC) 的含量

注:50 尾仔鱼为一个样本,每个浓度 3 个平行;实验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示(mean $\pm$ SEM);

表示暴露组与对照组之间具有显著性差异(P <0.05)。

Fig. 1 Contents of triglycerides (TG) and total cholesterol (TC) in zebrafish larvae after different EHDPP exposure

Note: Data were expressed as mean $\pm$ SEM of three replicates (50 larvae were sampled as one replicate);

* P <0.05 indicate significant difference between exposure groups and the control group.

2.4 仔鱼 ATP 和 ROS 水平

如图 2(a)所示,与对照组相比,ROS 在 250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著上调,ROS 含量分别显著升高 86.39% 和 99.49% (P <0.05)。如图 2(b)所示,与对照组相比,500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 处理组 ATP 水平显著性降低 40.20% (P <0.05)。

2.5 EHDPP 对斑马鱼早期生命阶段抗氧化系统的影响

EHDPP 暴露 5 d 后测定斑马鱼仔鱼的 SOD 活力、CAT 活力以及 GSH 含量。如图 3(a)所示,与对

照组相比,SOD 在 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 、250 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著下调,SOD 酶活力分别显著降低 30.90% (P <0.05)、44.07% (P <0.01) 和 43.95% (P <0.01)。此外,如图 3(b)所示,与对照组相比 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组的 GSH 含量显著降低 58.05% (P <0.05)。而如图 3(c)所示,CAT 酶活力与对照组相比无显著性差异。

2.6 EHDPP 暴露后斑马鱼脂质代谢和调控线粒体功能的基因表达的影响

斑马鱼脂质代谢基因表达如图 4(a)所示,与对

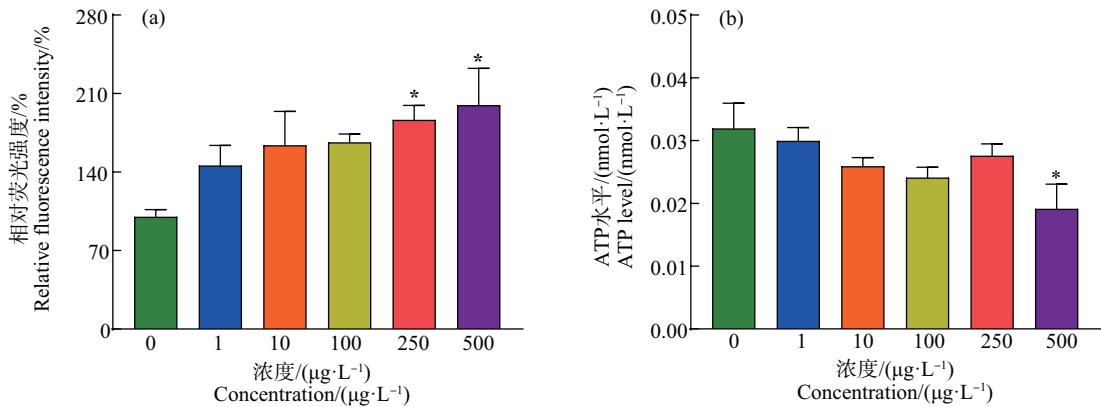


图 2 EHDPP 对斑马鱼早期生命阶段 ROS 和 ATP 的影响

注: EHDPP 暴露 5 d 后 ROS 相对荧光强度(a)和 ATP 水平(b)的变化; ROS 表示活性氧; ATP 表示三磷酸腺苷; 结果以样本的平均值±标准误表示; * $P<0.05$ 表示处理组与对照组之间有显著性差异。

Fig. 2 Effects of EHDPP on ROS and ATP during zebrafish early life stage

Note: The ROS relative fluorescence intensity (a) and the ATP level (b) in zebrafish embryos after exposure to EHDPP for 5 d; ROS represents reactive oxygen species; ATP represents adenosine triphosphate; the results were expressed as mean±SEM of three samples; * $P<0.05$ indicates significant difference between exposure groups and the control group.

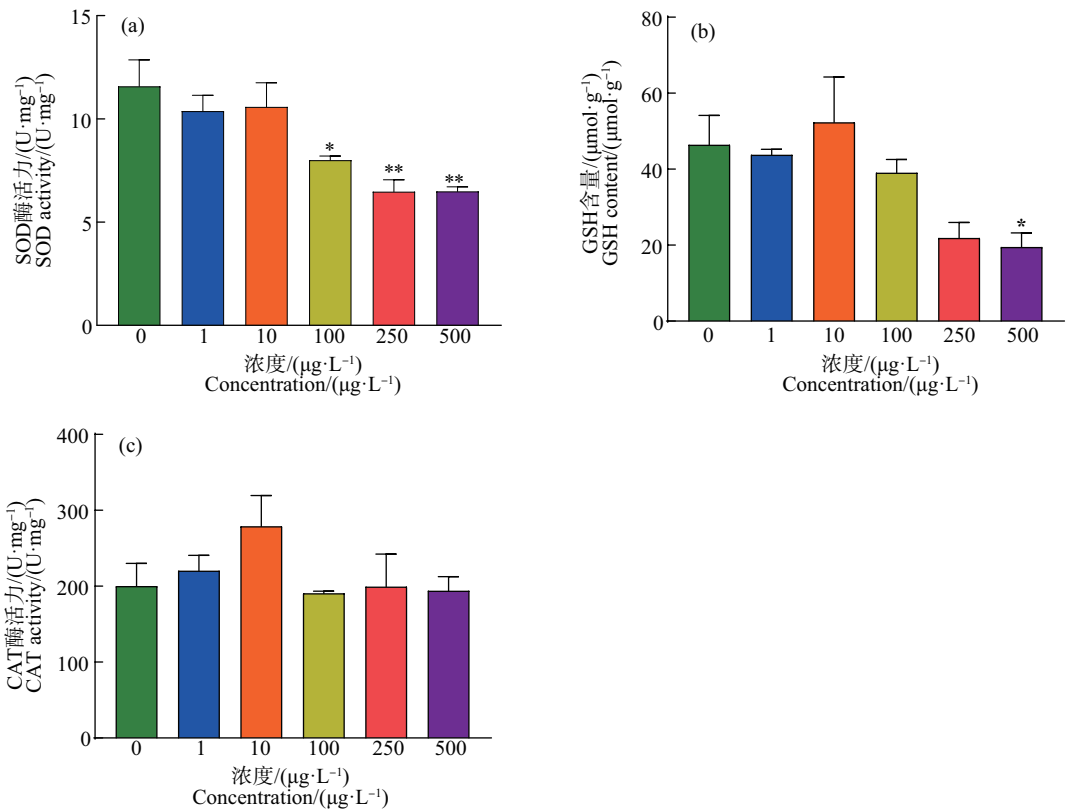


图 3 不同 EHDPP 暴露水平对斑马鱼仔鱼氧化应激指标 (SOD、GSH 和 CAT) 的影响

注: EHDPP 暴露 5 d 后指标变化; SOD 表示超氧化物歧化酶; GSH 表示还原型谷胱甘肽; CAT 表示过氧化氢酶; 结果以样本的平均值±标准误表示; 处理组与对照组之间有显著性差异, *表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effect of exposure to EHDPP on SOD, GSH and CAT in zebrafish larvae

Note: The changes of indice in zebrafish larvae after EHDPP exposure for 5 d; SOD represents superoxide dismutase; GSH represents glutathione; CAT represents catalase; the results were expressed as mean±SEM of three samples; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ indicate significant difference between exposure groups and the control group.

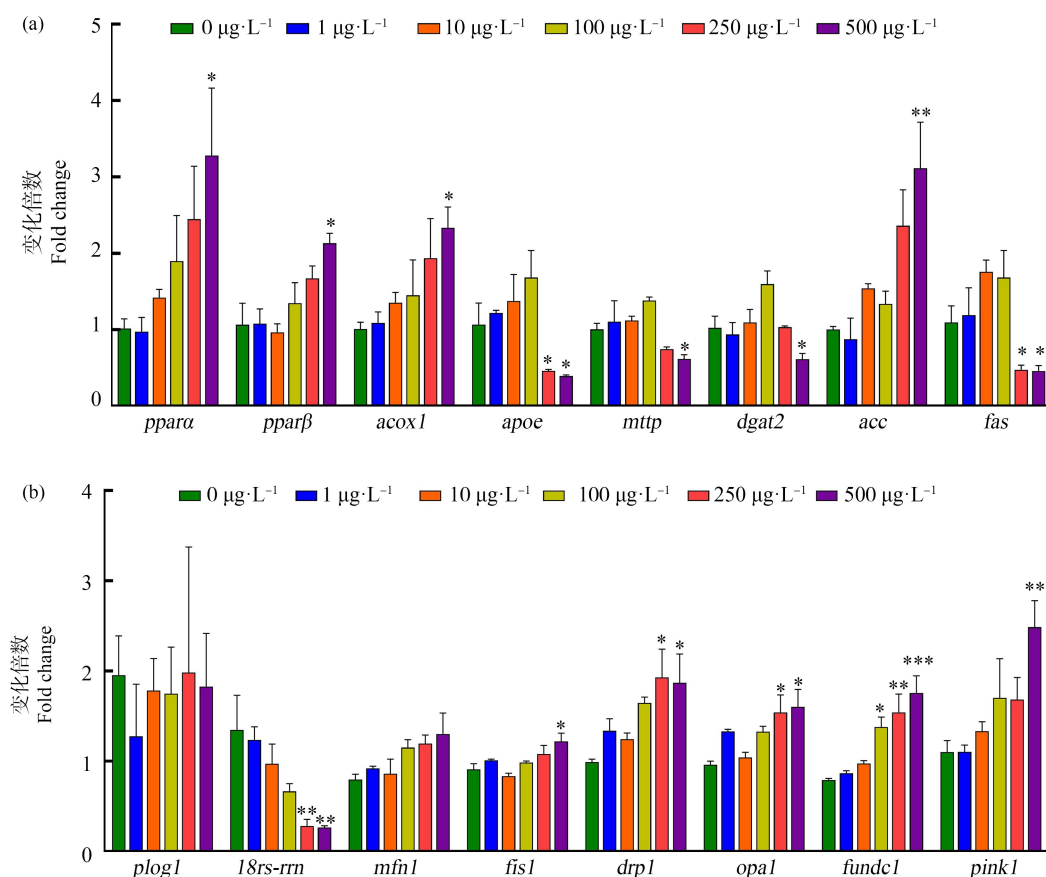
照组相比, *pparα*、*pparβ*、*acox1* 和 *acc* 基因在 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著上调, 分别下调 3.23 倍、2.31 倍、2.00 倍和 3.11 倍。而 *apoe* 基因表达量与对照组相比, 在 250 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著性下调, 分别下调 2.32 倍和 2.71 倍。与对照组相比, *mttp* 和 *dgat2* 基因表达量在 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著降低, 分别下调 1.63 倍和 1.67 倍, *fas* 基因表达量在 250 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著降低, 分别下调 2.30 倍和 2.39 倍。

斑马鱼调控线粒体功能的基因表达如图 4(b) 所示, 与对照组相比, *plog1* 和 *mfn1* 基因表达量无显著性变化, 而 *18rs-rrn* 基因表达量在 250 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著性下调, 分别下调 4.78 倍和 5.08 倍, *fis1* 基因表达量在 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著升高 1.34 倍。 *drp1* 和 *opal* 基因表达量在 250 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著升高, 分别升高 1.94 倍、1.84 倍和 1.60 倍、1.66 倍, *fundcl* 基因表达量在 100、250 和 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著性上调, 分别上调 1.74 倍、1.95 倍和 2.21 倍, *pink1* 基因表达量在 500 $\mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著性上调, 上调 2.26 倍。

EHDPP 干扰脂质代谢异常的信号通路如图 4(c) 所示, EHDPP 暴露会导致线粒体分裂和融合出现异常, ROS 升高, 斑马鱼产生线粒体功能障碍, 斑马鱼激发线粒体自噬维持自身稳态。EHDPP 暴露也会导致 ATP 含量降低, 同时调控脂肪从头合成的基因表达减少(*fas* 和 *dgat2*), 这些因素共同导致脂质合成减少。EHDPP 也可能通过引发斑马鱼线粒体功能障碍破坏脂肪酸 β 氧化, 调控脂肪酸 β 氧化的相关基因表达升高(*pparα*、*pparβ* 和 *acox1*), 致使脂肪酸 β 氧化的增强加剧脂质分解, 斑马鱼脂质分解与合成的失衡致使斑马鱼体内脂质含量减少, 同时调控脂蛋白合成转运的基因(*mttp* 和 *apoe*)表达下降, 这些影响最终导致斑马鱼幼鱼脂质代谢紊乱。线粒体功能障碍也会导致生物体 ROS 过度积累, 这可能会进一步加速脂质过氧化, 从而加剧脂质代谢紊乱。

3 讨论 (Discussion)

近年来有机磷阻燃剂的大量使用导致 EHDPP 在不同环境介质中被频繁检出^[29], EHDPP 带来的环境风险已不容忽视。多项离体研究表明 EHDPP 具有干扰脂质代谢的不良影响, 但 EHDPP 脂质代谢的



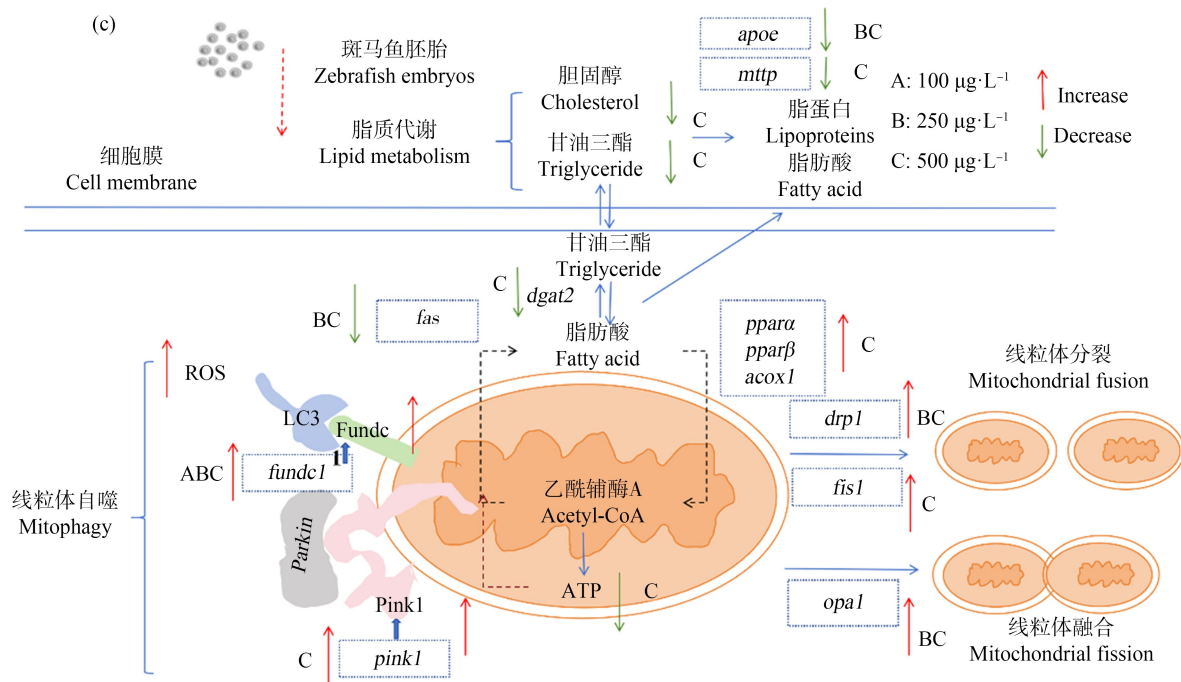


图 4 EHDPP(0、1、10、100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 暴露 5 d 对斑马鱼仔鱼基因表达的影响和 EHDPP 干扰脂质代谢异常的信号通路

注: EHDPP 暴露 5 d 后, 调控脂质代谢(a)和调控线粒体功能(b)的基因转录变化, (c) EHDPP 干扰脂质代谢异常的信号通路; 红色箭头表示 EHDPP 暴露后基因表达显著增加, 绿色箭头表示 EHDPP 暴露后基因表达显著降低; 30 尾仔鱼为一个样本, 每个浓度 3 个平行; 实验数据以平均值 $\pm$ 标准误表示(mean $\pm$ SEM); * 表示暴露组与对照组之间具有显著性差异(*表示 $P<0.05$, **表示 $P<0.01$, ***表示 $P<0.001$)。

Fig. 4 Gene transcription of zebrafish and possible pathway analysis of lipid metabolism in zebrafish larvae after exposure to EHDPP (0, 1, 10, 100, 250 and 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) for 5 d

Note: mRNA expressions of genes involved in lipid metabolism (a) and mitochondrial function (b) after EHDPP exposure for 5 d, (c) The possible pathway analysis of lipid metabolism after exposed to EHDPP; the red arrows indicate that the gene increased significantly by EHDPP exposure, and the green arrows indicate that the gene decreased significantly by EHDPP exposure when compared to the control group; data were expressed as mean $\pm$ SEM of three replicates (30 larvae were sampled as one replicate); * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$ indicate significant difference between exposure groups and the control group.

干扰效应在活体研究中仍较为匮乏。因此, 本研究将斑马鱼胚胎暴露于不同浓度 EHDPP 中 5 d, 探究 EHDPP 对斑马鱼脂质代谢的影响及其潜在的机制。

我们发现 EHDPP 急性暴露后能够在仔鱼体内蓄积。1、10、100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组仔鱼体内检测出 EHDPP 的含量分别为(0.16 $\pm$ 0.05)、(1.48 $\pm$ 0.20)、(13.44 $\pm$ 2.38)、(58.48 $\pm$ 1.10)和(115.12 $\pm$ 2.77) $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (以单位脂质量计)。该结果在斑马鱼幼鱼^[14]和日本青鲮肝脏^[30]观察到显著的 EHDPP 生物蓄积现象相似, EHDPP 的高亲脂性可能是 EHDPP 的生物蓄积的原因(log K_{ow} = 5.73)。斑马鱼经过 EHDPP 5 d 暴露后, 100、250 和 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组的仔鱼孵化率、心率、存活率和体长显著降低; 畸形率显著性升高, 表明 EHDPP 引发显著的斑马鱼生

长发育毒性。类似的研究表明 EHDPP(1、10 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)会造成斑马鱼仔鱼的生长抑制^[14], 也有研究显示 140 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 增加斑马鱼仔鱼畸形率, 1 400 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 显著抑制斑马鱼仔鱼体长^[31], 此外, Li 等^[30]发现 405 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 1 161 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露雌性日本青鲮 35 d 会导致子代仔鱼眼部畸形和视觉障碍, 对野生鱼类构成生存风险。这些研究提示 EHDPP 对水生生物具有生长发育毒性。

本研究结果显示, 与对照组相比, 500 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组的斑马鱼 TG 和 TC 显著性降低。一项新发表的研究表明, 斑马鱼仔鱼暴露于 200 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ EHDPP 7 d 后, 肝脏中的脂质积累含量会降低^[32], 其效应浓度低于本研究实验可能是由于暴露时间的不同。EHDPP 引起生物体脂质减少的现象

在哺乳动物中也有报道:围产期小鼠暴露于 EHDPP ($300 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)可降低其后代中雄性小鼠的 TG 水平^[20]。也有研究发现其他的有机磷阻燃剂(OPFRs)暴露会降低生物体 TG 和 TC,例如 $500 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯(TDCIPP)暴露小鼠 12 周后,小鼠血清中 TG 和 TC 显著性降低^[33]。为进一步探索 EHDPP 引发脂质减少的潜在机制,检测脂质代谢相关基因表达。脂肪酸合酶(FAS)催化脂肪酸合成(FAs)^[34]。辅酶 A 羧化酶 α (acc)是乙酰辅酶 A 转化为丙二酰辅酶 A 的关键限速酶,在 FAs 的从头合成途径中起重要作用^[35]。二酰基甘油酰基转移酶 2(*dgat2*)编码参与二酰基单甘油和三酰基甘油合成途径的酶进而调控脂质合成^[36]。我们观察到,EHDPP 暴露降低斑马鱼 *fas* 和 *dgat2* 的转录水平,升高 *acc* 的基因表达,提示 EHDPP 可能抑制脂质的合成。

载脂蛋白 E(APOE)作为一种经典的脂质结合蛋白,可以与胆固醇或其他脂质结合形成脂蛋白颗粒,从而介导中枢神经系统和外周组织中的脂质转运^[37]。微粒体甘油三酯转移蛋白(MTTP)是一种内质网驻留蛋白,可转移 TG 以促进脂蛋白形成^[38]。*apoe* 和 *mttp* 基因表达的下调表明 EHDPP 可能抑制脂质的转运。这也与另一项研究一致:在围产期小鼠暴露于 $300 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 EHDPP 后,后代雄性小鼠 *mttp* 基因表达量显著降低,TG 水平下降^[20]。过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) α 和 β 在线粒体 β 氧化和调节脂肪酸分解代谢中起重要作用^[39-40],酰基辅酶 A 氧化酶 1(ACOX1)是一种控制脂肪分解的限速酶,对极长链脂肪酸的 β 氧化至关重要^[41]。我们观察到 *ppar α* 、*ppar β* 和 *acox1* 基因在 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露组显著上调,这表明 EHDPP 可能通过 *ppar α* 和 *ppar β* 介导的脂质代谢途径促进脂肪酸 β 氧化加速脂质分解。与本研究结果类似,Xu 等^[32]还发现,斑马鱼仔鱼暴露于 $200 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 后会导致 *ppar α* 转录丰度增加。

ATP 参与脂肪酸从头合成过程,观察到斑马鱼暴露于 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 后,ATP 水平显著下降。ATP 水平改变提示机体可能发生线粒体功能障碍^[42]。我们推测 EHDPP 可能诱发斑马鱼线粒体功能障碍致使 ATP 减少影响脂质代谢。线粒体发生损伤和功能障碍主要表现在线粒体 ATP 水平下降、氧化应激异常、mtDNA 损伤和线粒体动力学失衡等方面^[43]。为证实 EHDPP 是否引发线粒体功能障

碍,测定线粒体氧化应激,ROS 是细胞中的氧化还原产物,是氧化应激的引发剂^[44]。我们发现, $250 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 暴露会导致斑马鱼 ROS 增多,这也在其他有机磷阻燃剂的研究中观察到,例如 $400 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TDCIPP 处理人肝细胞(HepG2)增加了细胞内 ROS 水平^[45]。我们进一步检测 SOD 酶活力和 GSH 含量,结果表明 $500 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ EHDPP 会抑制 SOD 酶活力和 GSH 含量,SOD 作为抗氧化系统中的第一道防御屏障,可催化超氧阴离子自由基转化为过氧化氢和氧气^[46],这与之前 EHDPP 的研究结果相似,顾杰等^[47]发现 EHDPP($0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)会显著抑制斑马鱼 SOD 的活力。非酶系(如 GSH)是生物体内存在清除活性氧和自由基的一大抗氧化体系,GSH 的变化可以用于检测生物的抗氧化能力^[48],SOD 和 GSH 的变化可能是机体抗氧化系统被激活,消耗 SOD 和 GSH 来清除过量 ROS,从而减轻氧化损伤。总的来说,EHDPP 会引发 ROS 异常升高导致线粒体功能障碍,机体自身产生氧化应激用以清除 EHDPP 造成的损伤。

线粒体可以融合以适应能量需求的变化,而线粒体异常损伤的部分可以通过分裂或线粒体自噬以维持适当的线粒体形态和整体功能^[43]。机体在动力蛋白超家族 GTP 酶(视神经萎缩蛋白(optic atrophy 1, *opa1*)、线粒体融合蛋白 1(mitochondrial fusion protein 1, *Mfn1*)、线粒体融合蛋白 2(*Mfn2*))的调控下会促进 2 个线粒体融合机体,也会通过动力蛋白相关蛋白受体(线粒体分裂蛋白(mitochondrial fission protein 1, *fis1*))招募线粒体动力相关蛋白(dynamin-related protein, *drp1*)到线粒体外膜,随后收缩线粒体以促进线粒体裂变^[49]。斑马鱼仔鱼暴露于 EHDPP 后 *fis1*、*drp1* 和 *opa1* 基因表达水平显著性上升,表明 EHDPP 可能促进斑马鱼线粒体的分裂和融合。*18rs-rrn* 调控线粒体 mtDNA 转录和复制^[50],我们发现 *18rs-rrn* 基因表达显著性降低,提示 EHDPP 可能会影响 mtDNA 正常功能,这也在其他阻燃剂中也有报道,例如五溴联苯醚(BDE-99)会影响神经祖细胞线粒体 mtDNA 转录复制引发线粒体疾病^[51]。ULK 复合体是细胞自噬的起始剂,其可以易位到线粒体,激活线粒体自噬受体 FUN14 域蛋白 1(FUN14 domain containing 1, *fundc1*),最终导致线粒体自噬^[52]。此外,PTEN 诱导激酶 1(PTEN induced putative kinase 1, *pink1*)是线粒体自噬的启动因子^[53]。斑马鱼仔鱼暴露于 EHDPP 后 *fundc1* 和 *pink1* 基因

表达水平显著性上升,表明斑马鱼线粒体自噬被激活,过度激活的线粒体自噬可能导致线粒体碎片化,并进一步导致线粒体损伤^[54]。EHDPP 暴露后机体线粒体正常生理功能的变化表明 EHDPP 引发线粒体功能障碍,这在其他有机磷阻燃剂的研究结果相似,例如:TDCIPP、磷酸三苯酯(TPhP)和磷酸三甲苯酯(TCP)暴露 AML12 细胞会导致细胞的线粒体结构紊乱,ROS 水平升高,引发线粒体功能障碍^[55]。总的来说,研究初步表明了 EHDPP 能够引发线粒体功能障碍,但对线粒体的结构和能量代谢有待更进一步的研究。

综上所述,结果表明 EHDPP 导致斑马鱼脂质紊乱,EHDPP 暴露减少斑马鱼的 TG 和 TC 水平。此外,我们还发现 EHDPP 暴露斑马鱼会引发线粒体功能障碍,表现在 EHDPP 暴露后斑马鱼 ATP 含量减少;ROS 水平升高;线粒体 mtDNA 转录复制受阻;线粒体动力学标志基因发生改变。EHDPP 引起生物体脂质减少的机制可能是:EHDPP 暴露导致斑马鱼产生线粒体功能障碍,最终引起 ATP 含量降低,同时调控脂肪从头合成的基因表达减少(*fas* 和 *dgat2*),这些因素共同导致脂质合成减少;EHDPP 也可能引发斑马鱼线粒体功能障碍破坏脂肪酸 β 氧化(*acox1*),致使脂肪酸 β 氧化的增强加剧脂质分解,斑马鱼脂质分解与合成的失衡致使斑马鱼体内脂质含量减少,最终导致斑马鱼幼鱼脂质代谢紊乱。线粒体功能障碍也会导致生物体 ROS 过度积累,这可能会进一步加速脂质过氧化,从而加剧脂质代谢紊乱。本研究结果为 EHDPP 的毒性机制研究提供了新的思路。

通信作者简介:余丽琴(1984—),女,博士,副教授,主要研究方向为生态毒理学。

参考文献(References):

- [1] van der Veen I, de Boer J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis [J]. Chemosphere, 2012, 88(10): 1119-1153
- [2] Wong F, de Wit C A, Newton S R. Concentrations and variability of organophosphate esters, halogenated flame retardants, and polybrominated diphenyl ethers in indoor and outdoor air in Stockholm, Sweden [J]. Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987), 2018, 240: 514-522
- [3] Violaki K, Castro-Jiménez J, Nenes A, et al. Spatial and temporal patterns of organophosphate esters flame retardants and plasticizers in airborne particles over the Mediterranean Sea [J]. Chemosphere, 2024, 348: 140746
- [4] Xie C M, Qiu N, Xie J L, et al. Organophosphate esters in seawater and sediments from the low-latitude tropical sea [J]. The Science of the Total Environment, 2024, 907: 167930
- [5] Tao F, Sjöström Y, de Wit C A, et al. Organohalogenated flame retardants and organophosphate esters from home and preschool dust in Sweden: Pollution characteristics, indoor sources and intake assessment [J]. The Science of the Total Environment, 2023, 896: 165198
- [6] Yun J, Zhang Q, Dou M S, et al. Characteristics, sources, bio-accessibility, and health risks of organophosphate esters in urban surface dust, soil, and dustfall in the arid city of Urumqi in China [J]. The Science of the Total Environment, 2024, 912: 169125
- [7] Gbadamosi M R, Moberuagba K H, Abdallah M A E, et al. Occurrence and dietary exposure to organophosphorus esters in foodstuffs of Nigerian origin [J]. Food Control, 2023, 152: 109880
- [8] Guo Y T, Chen M Q, Liao M X, et al. Organophosphorus flame retardants and their metabolites in paired human blood and urine [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2023, 268: 115696
- [9] Lee S, Cho H J, Choi W, et al. Organophosphate flame retardants (OPFRs) in water and sediment: Occurrence, distribution, and hotspots of contamination of Lake Shihwa, Korea [J]. Marine Pollution Bulletin, 2018, 130: 105-112
- [10] Wang X W, Liu J F, Yin Y G. Development of an ultra-high-performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for high throughput determination of organophosphorus flame retardants in environmental water [J]. Journal of Chromatography A, 2011, 1218(38): 6705-6711
- [11] Liang C, Mo X J, Xie J F, et al. Organophosphate tri-esters and di-esters in drinking water and surface water from the Pearl River Delta, South China: Implications for human exposure [J]. Environmental Pollution, 2022, 313: 120150
- [12] Sundkvist A M, Olofsson U, Haglund P. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk [J]. Journal of Environmental Monitoring, 2010, 12(4): 943-951
- [13] Aznar-Aleman O, Sala B, Jobst K J, et al. Temporal trends of halogenated and organophosphate contaminants in striped dolphins from the Mediterranean Sea [J]. The Science of the Total Environment, 2021, 753: 142205
- [14] Shu Y, Yuan J L, Hogstrand C, et al. Bioaccumulation and

- thyroid endocrine disruption of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate at environmental concentration in zebrafish larvae [J]. *Aquatic Toxicology*, 2024, 267: 106815
- [15] Sun L W, Xu W B, Peng T, et al. Developmental exposure of zebrafish larvae to organophosphate flame retardants causes neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2016, 55: 16-22
- [16] Behl M, Hsieh J H, Shafer T J, et al. Use of alternative assays to identify and prioritize organophosphorus flame retardants for potential developmental and neurotoxicity [J]. *Neurotoxicology and Teratology*, 2015, 52(Pt B): 181-193
- [17] Yang R Y, Wang X, Wang J W, et al. Insights into the sex-dependent reproductive toxicity of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Environment International*, 2022, 158: 106928
- [18] Yue J J, Sun C T, Tang J Y, et al. Downregulation of miRNA-155-5p contributes to the adipogenic activity of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate in 3T3-L1 preadipocytes [J]. *Toxicology*, 2023, 487: 153452
- [19] Negi C K, Gadara D, Kohoutek J, et al. Replacement flame-retardant 2-ethylhexyldiphenyl phosphate (EHDPP) disrupts hepatic lipidome: Evidence from human 3D hepatospheroid cell culture [J]. *Environmental Science & Technology*, 2023, 57(5): 2006-2018
- [20] Yan S, Wang D Z, Teng M M, et al. Perinatal exposure to 2-ethylhexyl diphenyl phosphate (EHDPP) affected the metabolic homeostasis of male mouse offspring: Unexpected findings help to explain dose- and diet-specific phenomena [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2020, 388: 122034
- [21] 申屠路媚, 牟艳玲. 线粒体功能障碍机制及其相关疾病研究进展[J]. *生命科学*, 2018, 30(1): 87-93
- Shentu L M, Mu Y L. Research progress in mitochondrial dysfunction and its related diseases [J]. *Chinese Bulletin of Life Sciences*, 2018, 30(1): 87-93 (in Chinese)
- [22] Ribas G S, Vargas C R. Evidence that oxidative disbalance and mitochondrial dysfunction are involved in the pathophysiology of fatty acid oxidation disorders [J]. *Cellular and Molecular Neurobiology*, 2022, 42(3): 521-532
- [23] Liu Y X, Liu S, Huang J, et al. Mitochondrial dysfunction in metabolic disorders induced by per- and polyfluoroalkyl substance mixtures in zebrafish larvae [J]. *Environment International*, 2023, 176: 107977
- [24] Yan H, Meng Y H, Li X, et al. FAM3A maintains metabolic homeostasis by interacting with F1-ATP synthase to regulate the activity and assembly of ATP synthase [J]. *Metabolism: Clinical and Experimental*, 2023, 139: 155372
- [25] Vaka V R, McMaster K M, Cunningham M W Jr, et al. Role of mitochondrial dysfunction and reactive oxygen species in mediating hypertension in the reduced uterine perfusion pressure rat model of preeclampsia [J]. *Hypertension*, 2018, 72(3): 703-711
- [26] Barbier O, Arreola-Mendoza L, Del Razo L M. Molecular mechanisms of fluoride toxicity [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2010, 188(2): 319-333
- [27] Teng J, Zhao J M, Zhu X P, et al. Oxidative stress biomarkers, physiological responses and proteomic profiling in oyster (*Crassostrea gigas*) exposed to microplastics with irregular-shaped PE and PET microplastic [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 786: 147425
- [28] Yu L Q, Deng J, Shi X J, 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(3): 226-233
- [29] Su Y Q, Luan M, Huang W, et al. Determinants of organophosphate esters exposure in pregnant women from East China [J]. *Environmental Pollution*, 2024, 340 (Pt 1): 122767
- [30] Li Y, Kang Q Y, Chen R C, et al. 2-ethylhexyl diphenyl phosphate and its hydroxylated metabolites are anti-androgenic and cause adverse reproductive outcomes in male Japanese medaka (*Oryzias latipes*) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2020, 54(14): 8919-8925
- [31] Ni A Y, Fang L, Xi M C, et al. Neurotoxic effects of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate exposure on zebrafish larvae: Insight into inflammation-driven changes in early motor behavior [J]. *The Science of the Total Environment*, 2024, 915: 170131
- [32] Xu S Y, Yu Y X, Qin Z, et al. Effects of 2-ethylhexyl diphenyl phosphate exposure on the glucolipid metabolism and cardiac developmental toxicity in larval zebrafish based on transcriptomic analysis [J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*, 2023, 267: 109578
- [33] Wang S M, Hu X G, Li X Y. Sub-chronic exposure to tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate induces sex-dependent hepatotoxicity in rats [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(32): 33351-33362
- [34] Henderson R J. Fatty acid metabolism in freshwater fish with particular reference to polyunsaturated fatty acids [J]. *Archiv Fur Tierernahrung*, 1996, 49(1): 5-22
- [35] Smith S, Witkowski A, Joshi A K. Structural and functional organization of the animal fatty acid synthase [J]. *Progress in Lipid Research*, 2003, 42(4): 289-317

- [36] Jin Y Z, McFie P J, Banman S L, et al. Diacylglycerol acyltransferase-2 (DGAT2) and monoacylglycerol acyltransferase-2 (MGAT2) interact to promote triacylglycerol synthesis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2014, 289(41): 28237-28248
- [37] Otis J P, Zeituni E M, Thierer J H, et al. Zebrafish as a model for apolipoprotein biology: Comprehensive expression analysis and a role for ApoA-IV in regulating food intake [J]. *Disease Models & Mechanisms*, 2015, 8(3): 295-309
- [38] Peng H, Chiu T Y, Liang Y J, et al. PRAP1 is a novel lipid-binding protein that promotes lipid absorption by facilitating MTP-mediated lipid transport [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2021, 296: 100052
- [39] Montagner A, Polizzi A, Fouché E, et al. Liver PPAR α is crucial for whole-body fatty acid homeostasis and is protective against NAFLD [J]. *Gut*, 2016, 65(7): 1202-1214
- [40] Risérus U, Sprecher D, Johnson T, et al. Activation of peroxisome proliferator-activated receptor (PPAR) δ promotes reversal of multiple metabolic abnormalities, reduces oxidative stress, and increases fatty acid oxidation in moderately obese men [J]. *Diabetes*, 2008, 57(2): 332-339
- [41] Poirier Y, Antonenkov V D, Glumoff T, et al. Peroxisomal β -oxidation: A metabolic pathway with multiple functions [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular Cell Research*, 2006, 1763(12): 1413-1426
- [42] 马学虎, 马莉花, 苟妍, 等. 线粒体功能障碍引起的相关炎症疾病及靶向治疗[J]. *生物技术通报*, 2023, 39(6): 119-125
Ma X H, Ma L H, Gou Y, et al. Related inflammatory diseases caused by mitochondrial dysfunction and targeted therapy to them [J]. *Biotechnology Bulletin*, 2023, 39(6): 119-125 (in Chinese)
- [43] 李蒙蒙, 贾岩, 王飞虾, 等. 线粒体功能障碍与慢性肝病[J]. *生理科学进展*, 2018, 49(2): 81-86
Li M M, Jia Y, Wang F X, et al. Mitochondrial dysfunction and chronic liver diseases [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2018, 49(2): 81-86 (in Chinese)
- [44] Schieber M, Chandel N S. ROS function in redox signaling and oxidative stress [J]. *Current Biology*, 2014, 24(10): R453-R462
- [45] Saquib Q, Al-Salem A M, Siddiqui M A, et al. Organophosphorus flame retardant TDCPP displays genotoxic and carcinogenic risks in human liver cells [J]. *Cells*, 2022, 11(2): 195
- [46] Ighodaro O, Ighodaro O, Akinloye O. First line defence antioxidants-superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT) and glutathione peroxidase (GPX): Their fundamental role in the entire antioxidant defence grid [J]. *Alexandria Journal of Medicine*, 2018, 54: 287-293
- [47] 顾杰, 吴江, 王宏烨, 等. 有机磷酸酯对斑马鱼的早期神经毒性作用研究[J]. *生态毒理学报*, 2019, 14(5): 152-158
Gu J, Wu J, Wang H Y, et al. Neurotoxicity of organophosphate esters on the early life stages of zebrafish [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2019, 14(5): 152-158 (in Chinese)
- [48] Shi J, Wang X T, Chen L L, et al. HBCD, TBECH, and BTBPE exhibit cytotoxic effects in human vascular endothelial cells by regulating mitochondria function and ROS production [J]. *Environmental Toxicology*, 2021, 36(8): 1674-1682
- [49] Yu Y H, Xu J P, Li H, et al. α -lipoic acid improves mitochondrial biogenesis and dynamics by enhancing antioxidant and inhibiting Wnt/Ca²⁺ pathway to relieve fluoride-induced hepatotoxic injury [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2023, 385: 110719
- [50] Artuso L, Romano A, Verri T, et al. Mitochondrial DNA metabolism in early development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2012, 1817(7): 1002-1011
- [51] Napoli E, Hung C, Wong S, et al. Toxicity of the flame-retardant BDE-49 on brain mitochondria and neuronal progenitor striatal cells enhanced by a PTEN-deficient background [J]. *Toxicological Sciences: An Official Journal of the Society of Toxicology*, 2013, 132(1): 196-210
- [52] Wu W X, Tian W L, Hu Z, et al. ULK1 translocates to mitochondria and phosphorylates FUNDC1 to regulate mitophagy [J]. *EMBO Reports*, 2014, 15(5): 566-575
- [53] Nguyen T N, Padman B S, Lazarou M. Deciphering the molecular signals of PINK1/parkin mitophagy [J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26(10): 733-744
- [54] Ma X C, Lu D Z, Liu Y, et al. Multiplexed quantitative evaluation on mitochondrial toxicity of tris (2,3-dibromopropyl) phosphate in hepatocyte [J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2021, 221: 112425
- [55] Le Y F, Shen H P, Yang Z, et al. Comprehensive analysis of organophosphorus flame retardant-induced mitochondrial abnormalities: Potential role in lipid accumulation [J]. *Environmental Pollution (Barking, Essex: 1987)*, 2021, 274: 116541 ◆