

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190529001

牛玥, 朱敏, 刘芃岩, 等. 四溴双酚 A 和四氯双酚 A 对非洲爪蛙蝌蚪的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2020, 15(6): 115-122

Niu Y, Zhu M, Liu P Y, et al. Toxic effects of tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A on *Xenopus laevis* tadpoles [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2020, 15(6): 115-122 (in Chinese)

四溴双酚 A 和四氯双酚 A 对非洲爪蛙蝌蚪的毒性效应

牛玥^{1,2}, 朱敏^{1,3}, 刘芃岩², 秦占芬^{1,3,*}

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

2. 河北大学化学与环境科学学院, 保定 071002

3. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2019-05-29

录用日期: 2019-07-27

摘要: 四溴双酚 A(tetrabromobisphenol A, TBBPA)和四氯双酚 A(tetrachlorobisphenol A, TCBPA)作为阻燃剂被大量生产和使用, 其毒性效应受到关注。相对鱼类和哺乳类动物, TBBPA 和 TCBPA 对两栖动物的毒性数据还比较缺乏。本文研究了 TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪的急性毒性, 并比较了二者对氧化应激标记基因和凝血相关基因转录水平的影响。结果表明, TBBPA 和 TCBPA 的 48 h 半致死浓度分别为 $4.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; 在无蝌蚪死亡浓度下, TBBPA 和 TCBPA 均能显著影响蝌蚪体内典型氧化应激标记基因的表达, 其中, 对谷胱甘肽转移酶(glutathione transferase) *gst* 基因的影响最显著, TBBPA 和 TCBPA 的效应相近; TBBPA 和 TCBPA 对蝌蚪体内热休克蛋白的转录影响不明显; 另外发现, TBBPA 和 TCBPA 可导致蝌蚪产生凝血现象, 同时凝血相关基因的转录水平被上调。综上可知, TBBPA 和 TCBPA 对蝌蚪的急性毒性都为中毒, 氧化应激效应也接近, 但不引起热休克蛋白转录的变化。

关键词: 四溴双酚 A; 四氯双酚 A; 非洲爪蛙; 急性毒性; 氧化应激; 凝血

文章编号: 1673-5897(2020)6-115-08

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

Toxic Effects of Tetrabromobisphenol A and Tetrachlorobisphenol A on *Xenopus laevis* Tadpoles

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

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

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

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

Received 29 May 2019

accepted 27 July 2019

Abstract: Tetrabromobisphenol A (TBBPA) and tetrachlorobisphenol A (TCBPA), as flame retardants, are extensively produced and used, and their toxic effects have raised more concerns. Little is known about their toxic effects on amphibians relative to fish and mammals. In this study, we investigated their acute toxicities and effects on oxidative stress markers in *Xenopus laevis* tadpoles. As a result, 48 h median lethal concentration values of TBBPA and TCBPA were $4.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ and $3.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectively. At no death concentrations, TBBPA and

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

第一作者: 牛玥(1995—), 女, 硕士, 研究方向为毒理学, E-mail: 296046855@qq.com

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

TCBPA affected transcriptional levels of typical marker genes for oxidative stress, with the most dramatic effect on glutathione transferase gene *gst*. TBBPA and TCBPA had no significant effects on heat shock protein (HSP) gene expression. Unexpectedly, we found that TBBPA and TCBPA resulted in coagulation in hearts and tails, coupled with the transcriptional up-regulation of coagulation genes. The results show that TBBPA and TCBPA had the medium toxicity to tadpoles, with similar effects on oxidative stress and no effects on HSP gene transcription.

Keywords: tetrabromobisphenol A; tetrachlorobisphenol A; *Xenopus laevis*; acute toxicity; oxidative stress; coagulation

四溴双酚 A (tetrabromobisphenol A, TBBPA) 和四氯双酚 A (tetrachlorobisphenol A, TCBPA) 作为阻燃剂在塑料、合成纤维等材料中广泛应用^[1-3]。目前, TBBPA 和 TCBPA 在多种环境介质、生物样品乃至人体样品中均有较高的检出率^[4-9]。Liu 等^[10]分析了关于我国普通水体中 TBBPA 浓度的报道, 认为平均浓度 $<10 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。但在 TBBPA 污染严重的巢湖水体中, Yang 等^[11]检测到 TBBPA 浓度为 $850 \sim 4\,870 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Wang 等^[12]的研究结果显示, TBBPA 在污水中浓度最高可达 $19.3 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。近几年, 饮用水中 TBBPA 和 TCBPA 也被检出^[13]。因此, TBBPA 和 TCBPA 的安全性受到越来越多的关注。

资料显示, TBBPA 与 TCBPA 对水生生物的毒性为中毒或极毒, 远高于哺乳动物^[14-17]。两栖动物是生物体由水生到陆生的过渡类型, 被认为是生态环境监测的重要指示类群。目前, 关于 TBBPA 和 TCBPA 对两栖动物毒性的数据还相对较少, 未见相关急性毒性的报道。另外, 化学品暴露一般会引起谷胱甘肽还原酶 (glutathione reductase, GR)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GPX)、谷胱甘肽转移酶 (glutathione transferase, GST)、硫氧还原蛋白 (thioredoxin, TRX) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 等几个氧化应激标记在转录水平或者酶活性的变化。曾有研究报道, 低浓度的 TBBPA 影响斑马鱼体内 CAT 和 GPX 酶的活性及活性氧 (ROS) 的浓度^[18-19]。巩文静等^[17]报道, 亚致死浓度下 TBBPA 导致太平洋真宽水蚤体内产生氧化应激。另外, 热休克蛋白 (heat shock protein, HSP) 也是与氧化应激相关的参数, 一些化学品也可影响 HSP27、HSP70 和 HSP90 等几个热激活蛋白的水平^[20]。Hu 等^[18]报道高浓度的 TBBPA 影响斑马鱼体内 *hsp70* 基因的表达。

本文选择生态毒理学中常用的两栖类模式种非洲爪蛙, 研究了 TBBPA 和 TCBPA 的急性毒性以及对氧化应激标记物的影响。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 试验动物

本实验室饲养的非洲爪蛙成年雌蛙和雄蛙, 分养于盛有去氯自来水的玻璃缸中, 每个玻璃缸大约 10 只成蛙, 水温 $21 \sim 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$, 明暗光周期为 12 h : 12 h。成蛙喂食猪肝和商品饲料, 每周各 1 次, 喂食 2 h 后换水。

非洲爪蛙雌蛙皮下注射 300 ~ 500 IU 促黄体素释放激素 (LHRH) 和人绒毛膜促性腺激素 (HCG), 雄蛙注射 200 ~ 300 IU。将雌雄蛙放于产卵容器中, 置于黑暗、安静的环境中让其抱对, 12 h 左右即可产卵。受精卵在 $21 \sim 22 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 的去氯自来水中孵化, 胚胎发育至 48 期的蝌蚪, 进行暴露试验。

1.2 试剂与仪器

仪器和设备: 高速冰冻离心机 (Centrifuge 5430, Eppendorf, 德国); PCR 仪 (9700, Applied Biosystem, 美国); 荧光定量 PCR 仪 (MX3500P, Strata gene, 美国); 组织碾磨仪 (MM301, Retsch, 德国); 涡旋混匀器 (Vortex3000, Wiggins, 美国); 全自动核酸提取仪 (AU1001, 北京百泰克生物技术有限公司, 中国); 电子天平 (JA2003B, 上海越平科技仪器有限公司, 中国); 移液器 (Eppendorf, 德国); 全自动凝胶成像仪 (GBOX-HR, Syn Gene, 英国); 普通 PCR 仪 (My Cycler TM, Bio-Rad, 美国); 电泳仪 (DYCP-31F, 北京六一仪器厂, 中国)。

试剂: TBBPA (纯度 97%, Acros 公司, 比利时; 分子量 543.88, CAS No. 79-94-7); TCBPA (纯度 98%, 梯希爱化成工业发展有限公司, 中国上海; 分子量 336.06, CAS No. 79-95-8); 二甲基亚砜 (DMSO) (纯度 $\geq 99.5\%$, Sigma-Aldrich 公司, 美国; CAS No. 67-68-5); 核酸染料 (G-red) 和 RNA 提取试剂盒 (北京百泰克生物技术有限公司, 中国); 反转录试剂盒 Fast Quant RT Kit 和 RT-qPCR 试剂盒 Super Real Pre Mix Plus (SYBR Green) kit (天根生化科技有限公司, 中国北京); PCR 引物 (华大基因, 中国北京)。

1.3 蝌蚪急性毒性试验

TBBPA 和 TCBPA 用助溶剂 DMSO 配成 $100\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的储备液。设置溶剂对照组,其中,溶剂的浓度与处理组溶剂浓度相同,溶剂的体积浓度不超过 0.01%。暴露试验在玻璃缸里面进行,每个缸盛有 1 L 试验液,蝌蚪随机放入 10 尾。每隔 24 h 换一次水,清除死亡个体,记录死亡数,试验持续 48 h。

在正式试验之前先对 2 种化学物质进行较大浓度范围(0.1 、 1 、 10 、 100 和 $1\ 000\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的预试验,不设平行组,各浓度的缸中加入 10 尾蝌蚪,观察记录 48 h 蝌蚪死亡数。根据预试验得出的结果,设置正式试验浓度。正式试验以 1.4 为公比设置了 7 个浓度梯度(表 1)和溶剂对照组,每组 3 个平行,每个缸中随机加入 10 尾蝌蚪;其他同预试验;重复 2 次正式试验。

1.4 RNA 提取和 RT-qPCR 实验

每个缸随机取 2 尾蝌蚪,用全自动核酸提取仪提取 RNA,超微量分光光度计(51119500C, Thermo Fisher Scientific, 美国)测定 RNA 浓度,琼脂糖凝胶电泳来确定 RNA 完整性。然后根据 Fast Quant RT Kit(with g DNase)说明书配制 $20\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系进行反转录。

根据 SYBR Green PCR Kit 说明,配制 $10\text{ }\mu\text{L}$ 反应体系进行 RT-qPCR 实验。PCR 程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 15 min , 40 个循环扩增($95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s 、退火 20 s 、 $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 20 s)。每个基因在使用之前都进行了扩增效率的验证,计算公式为 $E=(10^{-1/\text{slope}}-1)\times 100$ 。扩增效率在 90% ~ 110% 之间,溶解曲线单一且重合,不存在非特异性扩增的基因才可用于后续实验。进行基因表达分析时,以 *rpl8* 为管家基因对各个基因的表达进行标准化^[21]。基因的相对表达量根据公式 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 计算^[22]。引物及相关信息如表 2 所示。

表 1 正式暴露实验中四溴双酚 A (TBBPA) 和四氯双酚 A (TCBPA) 的浓度
Table 1 Concentrations of tetrabromobisphenol A (TBBPA) and tetrachlorobisphenol A (TCBPA) in exposure experiments

测试化学品	暴露浓度/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
Test chemical	Exposure concentrations/($\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)
TBBPA	6.00 ,4.28 ,3.06 ,2.19 ,1.56 ,1.12 ,0.79
TCBPA	8.00 ,5.71 ,4.08 ,2.92 ,2.08 ,1.49 ,1.06

表 2 RT-qPCR 引物及相关信息
Table 2 Primers sequences and relevant information on RT-qPCR

基因	引物序列(5' ~ 3')	产物大小/bp	退火温度/ $^{\circ}\text{C}$
Gene	Primer sequences (5' ~ 3')	Product size/bp	Annealing temperature/ $^{\circ}\text{C}$
<i>rpl8</i>	F: AGAAAGGGTGCTGCTAAG	120	60
	R: GATGGGTTTGTCATACG		
<i>gr</i>	F: TGGCTATTCATCCGACTTCCT	89	60
	R: TTGTCTATCAGTGCTTGTGCTT		
<i>gst</i>	F: AAGAGGCGGTATTCGGTCAG	118	60
	R: TCATCATTTGGCTCCAGTCAGT		
<i>trx</i>	F: GGATGTGGCTCAACTCTGTG	82	60
	R: ACTGAACCGCTCAACCTCTT		
<i>gpx</i>	F: TGTGGACCAGAAATCGGTGG	123	60
	R: AGGTACTTCCCTTGGTAGGCT		
<i>hsp27</i>	F: GCCTCATCGCTTTCTCCTGA	120	60
	R: GCCTCGGATGTGCCAATTTC		
<i>hsp70</i>	F: TTAGAACCGCCATAGCACA	79	60
	R: GAAGACACCCACACAGGAGT		
<i>hsp90</i>	F: ACTAGCAGACAAGATGCCAGAA	142	60
	R: GATGATCAGGGACATCAACTGC		
<i>f2</i>	F:CGTTGGGTCCAACCTGGGAAT	112	60
	R:TTTTCCAGGTCACGAGCTT		
<i>f10</i>	F:GGATTTGGGCGGTTACAGGA	113	60
	R:TCTGTGATTGCGAAGGTGCT		
<i>serpina</i>	F:CTCAGCAGTGTGACGAAAGC	121	60
	R:GGCACTGTACATTGGTGTTC		

1.5 数据统计与分析

用 SPSS 16.0 进行数据分析。统计单元为缸,即 n 值等于平行缸数^[21]。重复 2 次正式试验,得到相似的结果,在文中只呈现其中一次的试验数据^[23]。回归分析使用 Probit 模型,建立“剂量-效应”线性方程,并计算半数致死浓度(LC_{50})值及其 95% 置信区间。统计数据均以平均值 $\pm$ 标准误(standard error of mean, SEM)表示。暴露组中以各自的参照相比的显著性差异采用单因素方差(one-way ANOVA)分析, P 值 <0.05 认为有显著性差异。

2 结果 (Results)

2.1 TBBPA 与 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪的急性毒性

溶剂对照组无死亡,表明试验质量控制良好。TBBPA 和 TCBPA 暴露组蝌蚪的死亡率变化如图 1 所示。24 h 时,6.00mg·L⁻¹ TBBPA 和 8.00 mg·L⁻¹ TCBPA 暴露组的蝌蚪存活率均为 0。3.06 mg·L⁻¹ 和 4.28 mg·L⁻¹ 的 TBBPA 暴露组蝌蚪的存活率分别为 97%和 53%,4.08 mg·L⁻¹ 和 5.71 mg·L⁻¹ 的 TCB-

PA 暴露组蝌蚪的存活率分别为 27%和 10%,其他浓度暴露组的蝌蚪均无死亡现象发生。48 h 时,全部暴露组蝌蚪的存活率均未发生改变。观察蝌蚪死亡现象时发现,6 mg·L⁻¹ TBBPA 暴露组加入 TBBPA 后,蝌蚪沉到水底,不再游动,24 h 后全部死亡,8 mg·L⁻¹ TCBPA 暴露组蝌蚪的死亡现象同 6 mg·L⁻¹ TBBPA 暴露组。4.28 mg·L⁻¹ TBBPA 与 5.71 mg·L⁻¹ TCBPA 暴露组存活蝌蚪的心脏与尾部周围观察到明显的凝血现象,TBBPA 和 TCBPA 的浓度分别低于 3.06 mg·L⁻¹ 和 2.92 mg·L⁻¹ 时不再发生凝血现象。

经统计分析得到 TBBPA 和 TCBPA 对蝌蚪的 24 h- LC_{50} 分别为 4.31 mg·L⁻¹ 和 3.99 mg·L⁻¹,48 h- LC_{50} 与 24 h- LC_{50} 相同(表 3)。TBBPA 与 TCBPA 的毒性相当。

2.2 TBBPA 与 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪体内氧化应激相关基因转录的影响

RT-qPCR 结果表明,暴露 48 h 后,0.79 ~ 3.06 mg·L⁻¹ 的 TBBPA 和 1.06 ~ 2.92 mg·L⁻¹ 的 TCBPA

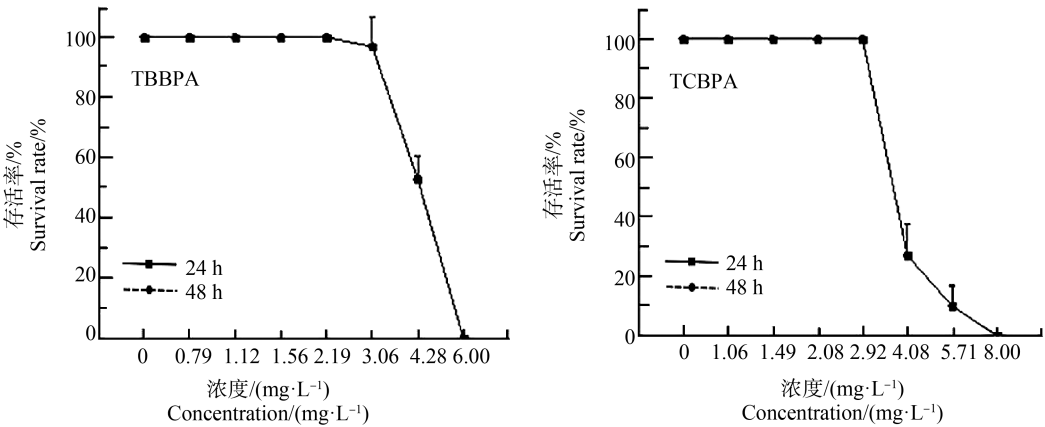


图 1 TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪存活率的影响

Fig. 1 Effects of TBBPA and TCBPA on survival rates of *Xenopus laevis* tadpoles

表 3 TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪的半数效应浓度 (LC_{50}) 及其 95% 置信区间和回归方程

Table 3 The median lethal concentration (LC_{50}), 95% confidence interval and regression equations of TBBPA and TCBPA to *Xenopus laevis* tadpoles

测试化学品 Test chemical		LC_{50} 及其 95% 置信区间/(mg·L ⁻¹) LC_{50} and its 95% confidence interval/(mg·L ⁻¹)	回归方程 Regression equations
24 h	TBBPA	4.31[4.07,4.62]	$y=-12.42+2.89x$
	TCBPA	3.99[3.11,5.66]	$y=-9.12+2.29x$
48 h	TBBPA	4.31[4.07,4.62]	$y=-12.42+2.89x$
	TCBPA	3.99[3.11,5.66]	$y=-9.12+2.29x$

显著上调蝌蚪体内 *gst* 和 *trx* 这 2 种基因的转录水平,呈线性剂量-效应关系(图 2)。3.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组与 2.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBPA 暴露组蝌蚪体内 *gr* 基因的转录水平被显著促进。0.79 ~ 3.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TBBPA 和 1.06 ~ 2.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCBPA 蝌蚪体内 *cat* 和 *gpx* 基因的转录水平呈倒“U”型趋势,0.79 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 1.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组和 1.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBPA 暴露组蝌蚪体内的 *cat* 和 *gpx* 基因的相对表达量被显著上调。

2.3 TBBPA 与 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪体内热休克蛋白转录的影响

RT-qPCR 结果表明,暴露 48 h 后,0.79 ~ 3.06 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TBBPA 和 1.06 ~ 2.92 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCBPA 对蝌蚪体内的 *hsp27* 基因的转录水平无显著性影响(图 3)。TBBPA 及 TCBPA 暴露组蝌蚪体内 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的转录水平与 TBBPA 及 TCBPA 暴露浓度呈“倒 U 型”关系,且 TBBPA 浓度为 1.12 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蝌蚪体内 *hsp70* 和 *hsp90* 的转录水平被显著上调;

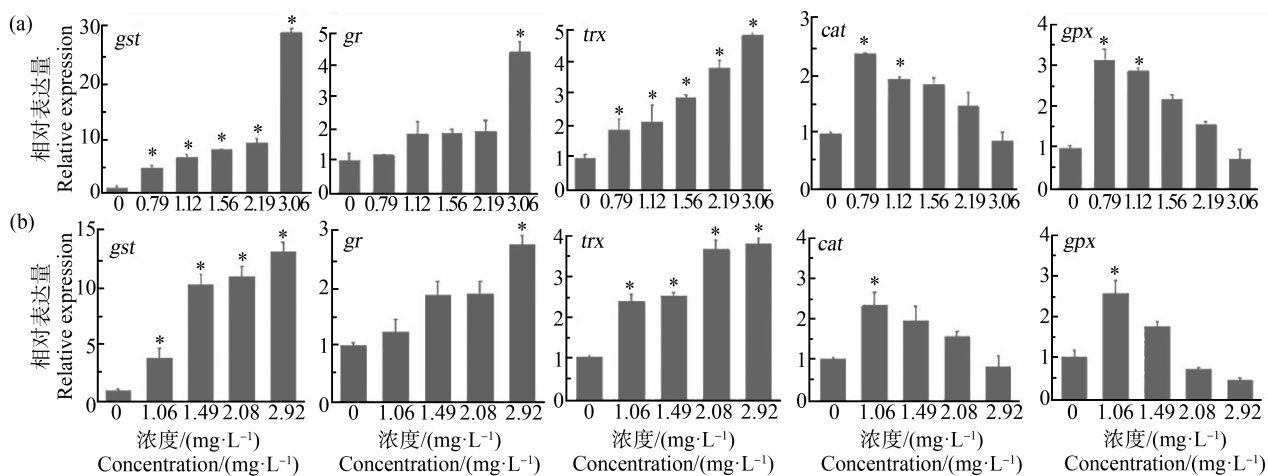


图 2 TBBPA (a) 和 TCBPA (b) 对非洲爪蛙体内氧化应激标记基因转录的影响

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比。

Fig. 2 Transcriptional effects of TBBPA (a) and TCBPA (b) on oxidative stress marker genes in *Xenopus laevis*

Note: * $P < 0.05$, compared with the control.

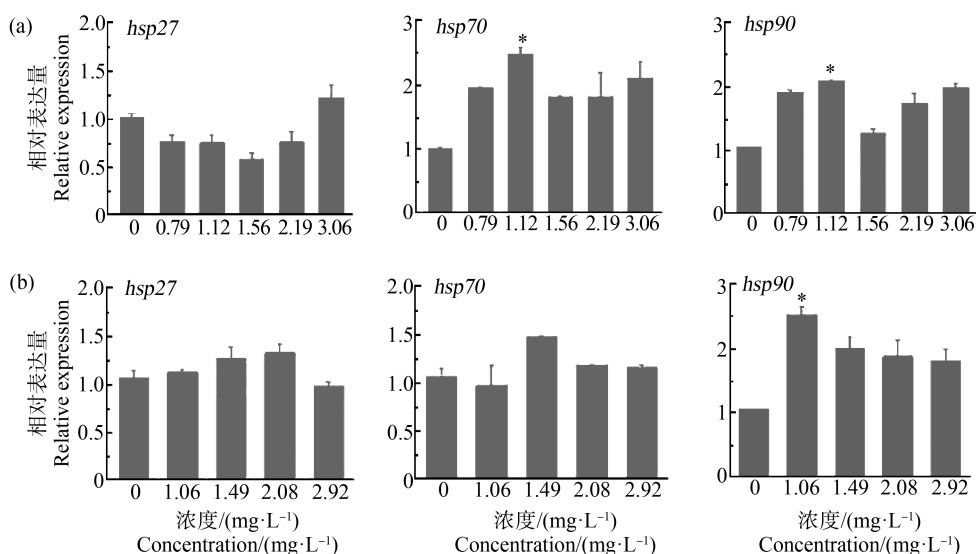


图 3 TBBPA (a) 和 TCBPA (b) 对非洲爪蛙体内热休克蛋白转录的影响

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比。

Fig. 3 Transcriptional effects of TBBPA (a) and TCBPA (b) on heat shock protein genes in *Xenopus laevis*

Note: * $P < 0.05$, compared with the control.

当TCBPA浓度为 $1.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,蝌蚪体内 *hsp90* 的转录水平被显著上调。

2.4 TBBPA 与 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪体内凝血基因转录的影响

TBBPA 和 TCBPA 暴露组蝌蚪心脏与尾部出现凝血现象(图4)。因凝血现象的出现,选择 *f2*、*f10* 和 *serpina* 基因作为指标,探究 TBBPA 与 TCBPA 对蝌蚪体内凝血基因转录水平的影响。研究发现,暴露于 TBBPA 和 TCBPA 48 h 后,凝血基因 *f2*、*f10* 和 *serpina* 的表达有一定的变化趋势(图5): $0.79 \sim 3.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TBBPA 促进蝌蚪体内凝血基因 *f2*、*f10* 和 *serpina* 的转录水平,呈线性剂量-效应关系,并在 $3.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 表现出显著性差异;TCBPA 暴露组蝌蚪体内 *f2*、*f10* 和 *serpina* 基因的转录水平与 TCBPA 浓度($1.06 \sim 2.92 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)呈“倒 U 型”关系, $1.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCBPA 显著促进蝌蚪体内 *f2* 基因的转录水平, $1.49 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 TCBPA 显著促进蝌蚪体内 *f10* 和 *serpina* 的转录水平。

3 讨论 (Discussion)

本研究结果表明,TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪的 48 h-LC₅₀ 分别为 $4.31 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $3.99 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。根据国家关于危险化学品鱼类急性毒性分类准则,TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙的毒性均为中

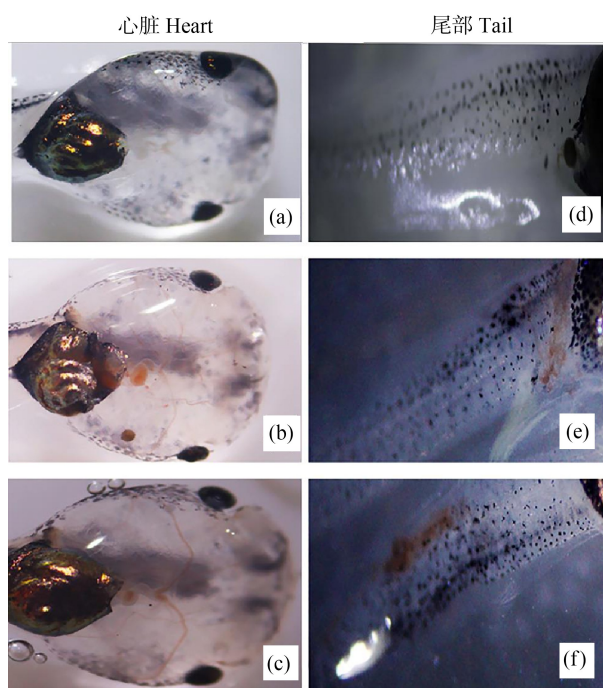


图4 TBBPA 和 TCBPA 暴露 48 h 导致的非洲爪蛙蝌蚪心脏和尾部凝血现象

注:(a)和(d)为对照;(b)和(e)为 TBBPA 暴露组;(c)和(f)为 TCBPA 暴露组。

Fig. 4 Coagulation phenomenon in hearts and tails of *Xenopus laevis* tadpoles following 48 h-exposure to TBBPA and TCBPA

Note: (a) and (d) are control group; (b) and (e) are TBBPA group; (c) and (f) are TCBPA group.

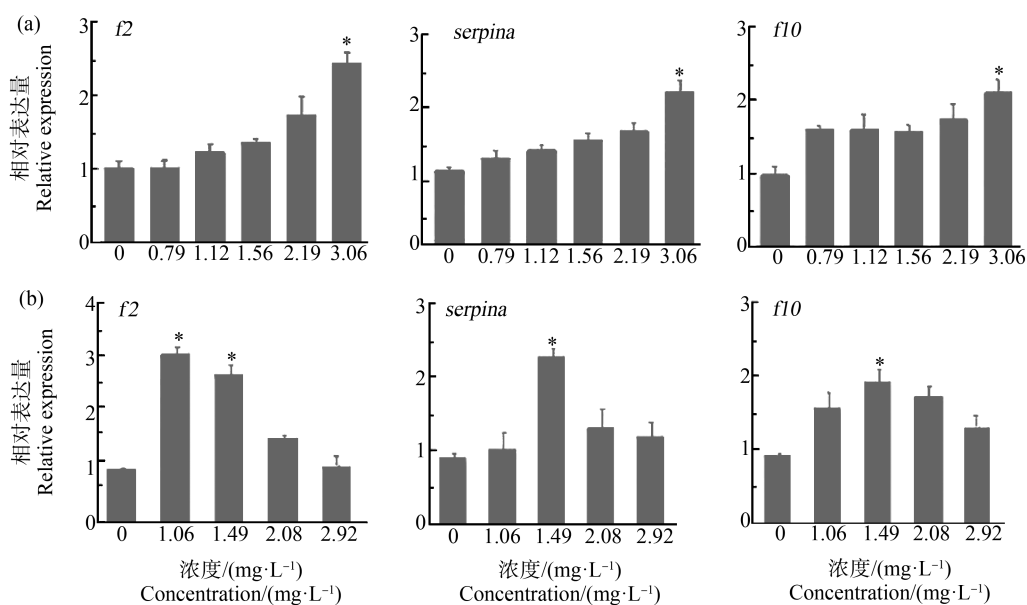


图5 TBBPA (a) 和 TCBPA (b) 对非洲爪蛙体内凝血因子转录的影响

注: * $P < 0.05$, 与对照组相比。

Fig. 5 Transcriptional effects of TBBPA (a) and TCBPA (b) on coagulation gene in *Xenopus laevis*

Note: * $P < 0.05$, compared with the control.

等毒性^[24]。Song 等^[25]的研究表明,TBBPA 和 TCBPA 对斑马鱼的 LC_{50} 分别为 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $1.24 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 毒性分别为高毒和中毒;Hallgren 等^[15]报道了 TBBPA 对大鼠的半数致死剂量(LD_{50})为 $10 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$, 毒性为微毒。总体来看,TBBPA 对非洲爪蛙的毒性与水生生物斑马鱼类类似,而远高于对哺乳动物的毒性。另外,研究发现 TBBPA 和 TCBPA 均导致蝌蚪心脏和尾部产生凝血现象,其作用机制还有待于进一步研究。

TBBPA 和 TCBPA 显著上调非洲爪蛙体内氧化应激相关基因 *gst* 和 *trx* 的转录水平,呈线性剂量-效应关系,TBBPA 和 TCBPA 对蝌蚪体内 *gr* 基因转录水平的影响呈“升高-平台期-升高”的趋势,并在 TBBPA 与 TCBPA 的最高浓度暴露组表现出显著性差异。*gst*、*trx* 和 *gr* 基因的转录水平与氧化应激效应呈正相关。对比 TBBPA 与 TCBPA 相似浓度暴露组(如 $1.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组与 $1.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBPA 暴露组)蝌蚪体内 *gst*、*trx* 和 *gr* 的转录水平后发现,TBBPA 暴露组蝌蚪体内 *gst*、*trx* 和 *gr* 基因的相对表达量均与 TCBPA 暴露组类似。TCBPA 暴露组蝌蚪体内 *cat* 和 *gpx* 基因相对表达量的变化趋势与 TBBPA 相同,呈先升高后降低的倒“U”型趋势。综上所述,TBBPA 和 TCBPA 诱导非洲爪蛙蝌蚪产生氧化应激效应,二者效应相当。结合本实验室之前关于双酚 A 替代品与双酚 A 对非洲爪蛙毒性的研究,发现无论是 BPA 及 BPA 替代品(BPF 和 BPAF)还是 BPA 的衍生物(TBBPA 和 TCBPA)对非洲爪蛙几个经典氧化应激标记基因的转录水平的影响都十分显著,尤其对 *gst* 基因的影响,均呈良好的线性剂量-效应关系。

TBBPA 与 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪体内热休克蛋白表达的影响表明,TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙体内 *hsp27* 基因的转录水平无显著性影响, $1.12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组蝌蚪体内的 *hsp70* 与 *hsp90* 转录水平被显著上调, $1.06 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ TCBPA 暴露组蝌蚪体内 *hsp90* 的转录水平被显著上调,TBBPA 和 TCBPA 对蝌蚪体内 *hsp70* 和 *hsp90* 的转录水平的影响整体均呈先升高后降低的“倒 U 型”。总体来看,TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙体内热休克蛋白的影响不大,只有个别浓度会引起 *hsp70* 和 *hsp90* 基因的微弱表达。结合本实验室之前关于双酚 A 替代品与双酚 A 对非洲爪蛙毒性的研究,发现 BPA、BPA 替代品和 BPA 的衍生物对热休克蛋白相关基

因转录水平的影响均不显著。

综上所述,TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪的毒性相近均为中毒,与对水生生物斑马鱼的毒性类似,远高于对哺乳动物的毒性;TBBPA 和 TCBPA 对非洲爪蛙蝌蚪的氧化应激效应也接近,但不引起热休克蛋白转录的变化。

通讯作者简介:秦占芬(1971—),女,博士,研究员,主要研究方向为环境激素导致的两栖动物逆转及分子机制。

参考文献 (References):

- [1] Covaci A, Voorspoels S, Abdallah M A, et al. Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(3): 346-363
- [2] Liu K, Li J, Yan S J, et al. A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China [J]. *Chemosphere*, 2016, 148: 8-20
- [3] Birnbaum L S, Staskal D F. Brominated flame retardants: Cause for concern? [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2004, 112(1): 9-17
- [4] 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
- [5] Malkoske T, Tang Y L, Xu W Y, et al. A review of the environmental distribution, fate, and control of tetrabromobisphenol A released from sources [J]. *The Science of the Total Environment*, 2016, 569-570: 1608-1617
- [6] Jakobsson K, Thuresson K, Rylander L, et al. Exposure to polybrominated diphenyl ethers and tetrabromobisphenol A among computer technicians [J]. *Chemosphere*, 2002, 46(5): 709-716
- [7] Morris S, Allchin C R, Zegers B N, et al. Distribution and fate of HBCD and TBBPA brominated flame retardants in North Sea estuaries and aquatic food webs [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(21): 5497-5504
- [8] Rodríguez-Gómez R, Jiménez-Díaz I, Zafra-Gómez A, et al. A multiresidue method for the determination of selected endocrine disrupting chemicals in human breast milk based on a simple extraction procedure [J]. *Talanta*, 2014, 130: 561-570
- [9] Chu S G, Haffner G D, Letcher R J. Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatogra-

- phy-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1097(1-2): 25-32
- [10] Liu K, Li J, Yan S J, et al. A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China [J]. *Chemosphere*, 2016, 148: 8-20
- [11] Yang S W, Wang S R, Liu H L, et al. Tetrabromobisphenol A: Tissue distribution in fish, and seasonal variation in water and sediment of Lake Chaohu, China [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2012, 19(9): 4090-4096
- [12] Wang X M, Liu J Y, Liu A F, et al. Preparation and evaluation of mesoporous cellular foams coating of solid-phase microextraction fibers by determination of tetrabromobisphenol A, tetrabromobisphenol S and related compounds [J]. *Analytica Chimica Acta*, 2012, 753: 1-7
- [13] Fan Z L, Hu J Y, An W, et al. Detection and occurrence of chlorinated byproducts of bisphenol A, nonylphenol, and estrogens in drinking water of China: Comparison to the parent compounds [J]. *Environmental Science & Technology*, 2013, 47(19): 10841-10850
- [14] US National Institute of Health (US NIH). National Library of Medicine and Toxicology Data Network, 4,4'-Methylenebis(phenol) [EB/OL]. (2014-04-28) [2019-05-29]. <http://chem.sis.nlm.nih.gov/chemid-plus/ProxyServlet?ObjectHandle=DBM aint& actionHandle = default &nextPage= jsp /chemidlite /Result-Screen. jsp&TXTSUPERLISTID=0000620928>
- [15] Hallgren S, Sinjari T, Håkansson H, et al. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice [J]. *Archives of Toxicology*, 2001, 75(4): 200-208
- [16] Chan W K, Chan K M. Disruption of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis in zebrafish embryo-larvae following waterborne exposure to BDE-47, TBBPA and BPA [J]. *Aquatic Toxicology*, 2012, 108: 106-111
- [17] 巩文静, 朱丽岩, 郝雅, 等. 四溴双酚 A 对太平洋真宽水蚤的急性毒性及氧化胁迫[J]. *生态毒理学报*, 2016, 11(4): 232-238
- Gong W J, Zhu L Y, Hao Y, et al. Acute toxicity and oxidative stress of tetrabromobis-phenol A to *Eurytemora pacifica* [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2016, 11(4): 232-238 (in Chinese)
- [18] Hu J, Liang Y, Chen M J, et al. Assessing the toxicity of TBBPA and HBCD by zebrafish embryo toxicity assay and biomarker analysis [J]. *Environmental Toxicology*, 2009, 24(4): 334-342
- [19] Wu S M, Ji G X, Liu J N, et al. TBBPA induces developmental toxicity, oxidative stress, and apoptosis in embryos and zebrafish larvae (*Danio rerio*) [J]. *Environmental Toxicology*, 2016, 31(10): 1241-1249
- [20] Finkel T, Holbrook N J. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing [J]. *Nature*, 2000, 408(6809): 239-247
- [21] Lou Q Q, Cao S, Xu W, et al. Molecular characterization and mRNA expression of ribosomal protein L8 in *Rana nigromaculata* during development and under exposure to hormones [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2014, 26(11): 2331-2339
- [22] Festing M F, Altman D G. Guidelines for the design and statistical analysis of experiments using laboratory animals [J]. *ILAR Journal*, 2002, 43(4): 244-258
- [23] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [24] 中华人民共和国国家质量监督检验检疫总局, 中国国家标准化管理委员会. 危险化学品鱼类急性毒性分级试验方法: GB/T 21281—2007[S]. 北京: 中国标准出版社, 2008
- [25] Song M Y, Liang D, Liang Y, et al. Assessing developmental toxicity and estrogenic activity of halogenated bisphenol A on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 275-281 ◆