

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

刘园园¹, 冀秀玲^{1*}, 沈群辉¹, 钟高仁²

1. 东华大学环境学院环境科学与工程学院, 上海 201620; 2. 复旦大学放射医学研究所, 上海 201620

摘要: 研究六溴环十二烷 (HBCD) 及其复合污染对发育期幼鼠甲状腺激素代谢过程的影响。设计 HBCD 单一暴露剂量 (10、50、100、300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 及 HBCD 与等浓度商用多溴联苯醚 DE-71 按 2 : 1 复合暴露剂量 (10、50、100、300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$), 对新生 3 d 的 SD 大鼠进行为期 42 d 的暴露, 放射免疫法测定血清中甲状腺激素 (TT3, TT4, FT3, FT4, TSH) 水平, 并分别测定肝脏和脑组织中甲状腺激素脱碘酶 (D1, D2) 活性及其对应基因的相对表达水平。与对照组相比较, 经 HBCD 暴露后, 大鼠血清中 TT4、TT3、FT4、FT3 浓度随着暴露剂量增大呈现先升高后下降的趋势, 其中 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 FT3 质量分数显著升高 ($P<0.05$), 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 FT4 质量分数显著下降 ($P<0.05$); TSH 则呈现下降趋势。10、50 及 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 TSH 质量分数均显著下降 ($P<0.05$)。HBCD/DE-71 复合暴露后, 大鼠血清中 TT4、TT3、FT4、FT3 浓度随着暴露剂量的增大呈升高趋势, 其中 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 TT4 质量分数显著升高 ($P<0.05$), 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 FT4 质量分数显著升高 ($P<0.05$), 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 FT3 质量分数显著升高 ($P<0.05$)。单一暴露后, D1 活性及基因表达水平均呈下降趋势, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组基因表达水平下降显著 ($P<0.05$); D2 活性及基因表达水平则均呈现下降趋势, 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组均显著下降 ($P<0.05$); HBCD/DE-71 复合暴露后, D1、D2 活性及其基因表达水平则均呈升高趋势, 其中 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 D1 活性及基因表达水平均显著性升高 ($P<0.05$), 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 D2 活性显著性升高 ($P<0.05$)。HBCD 及 HBCD/DE-71 复合污染物均能通过改变甲状腺激素代谢酶的活性及 mRNA 表达水平进一步影响机体甲状腺激素的内稳态平衡, 且 HBCD 单一暴露与 HBCD/DE-71 复合暴露对机体毒性作用途径及所产生的毒性效果存在着很大的差异。

关键词: 六溴环十二烷 (HBCD); 多溴联苯醚; 甲状腺激素; 脱碘酶

中图分类号: X171.5

文献标志码: A

文章编号: 1674-5906 (2012) 09-1614-06

引用格式: 刘园园, 冀秀玲, 沈群辉, 钟高仁. 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 Yuanyuan, JI Xiuling, SHEN Qunhui, ZHONG Gaoren. 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.

溴化阻燃剂 (brominated flame retardants, BFRs) 被广泛应用于印刷电路板、塑料、纺织品及树脂类电子元件。近年来, 该类物质在环境及某些生物体中被频频检出^[1]。溴化阻燃剂约有 70 多种, 其中最重要的是多溴联苯醚 (PBDE)、四溴双酚 A (TBBPA) 和六溴环十二烷 (HBCD)^[2]。HBCD 作为多溴联苯醚的替代品广泛应用于产品的生产, 加工及使用。由于 HBCD 的使用量大, 且具有很强的生物蓄积能力和持久性, 已被列为欧盟 RoHS 指令管控物质, 及欧洲化学品管理局的高关注度物质; 挪威已将 HBCD 列入了国家禁止使用的化学物质; 对于是否应将其列入斯德哥

尔摩公约受控名单的相关评估正在进行^[3]。HBCD 的急性毒性不高, 但是能引起亚慢性毒性效应^[4], 虹鳟鱼口服 500 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的 HBCD 7 d 后, 血清中游离的甲状腺素 FT3 浓度下降^[5]。此外, HBCD 还是细胞色素 P450 和尿苷二磷酸醛酸转移酶的诱导物, 可通过负反馈抑制, 影响甲状腺激素受体数量, 介导基因表达, 从而导致血清促甲状腺激素水平的改变^[7-8]。另外, 有研究显示, HBCD 可使大鼠发情周期不规律, 卵细胞数量减少, 前列腺重量增加, 后代甲状腺功能减弱, 说明 HBCD 具有致畸潜力^[6, 8]。

在生物体内, 甲状腺激素 (thyroid hormones,

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20907007)

作者简介: 刘园园 (1990 年生), 女, 硕士研究生, 从事环境毒理学研究。E-mail: 526695560@qq.com

*通信作者: 冀秀玲, 副教授, 博士, 从事复合污染物生态毒理效应研究。E-mail: ling_jx@dhu.edu.cn

收稿日期: 2012-08-03

THs)保持在一个合理的水平是其正常调节生物体诸多生理过程的基础^[9]。在甲状腺激素代谢转化过程中甲状腺激素脱碘酶起着重要作用。甲状腺激素脱碘酶主要包括 I 型、II 型和 III 型脱碘酶, I 型脱碘酶 (D1) 在肝脏和肾中活性最高^[10], 主要作用是将外周组织中 T4 脱碘提供循环 T3^[12-13]; II 型脱碘酶 (D2) 在脑、棕色脂肪组织和垂体中活性最高^[11], D2 只在脑、棕色脂肪组织和垂体中催化 T4 脱碘生成 T3, 在这些组织中对甲状腺激素的调节起重要的作用^[12-13]。脱碘酶在维持整个机体碘代谢、甲状腺激素代谢平衡等过程中发挥着重要的作用。

环境中 HBCD 通常是与其替代物多溴联苯醚共存, 形成复合污染体系^[14-17]。这表明公众在真实环境中的暴露应为 HBCD 复合污染物, 尤其是 HBCD/PBDEs 复合污染物的暴露。体外实验表明, PBDEs 主要是通过与其替代物甲状腺激素 T4 竞争结合转运蛋白 (TTR), 影响甲状腺激素的转运过程; 而 HBCD 则通过对甲状腺激素 T3 的协同或替代, 进而影响甲状腺激素受体 TR 及其调控基因的表达, 目前复合污染产生的健康危害尚未见报道。本文模拟真实环境中的剂量水平, 采用 HBCD 以及 HBCD 与商用多溴联苯醚混合物 DE-71 复合污染物对新生 3 d 大鼠进行为期 42 d 的发育期暴露实验, 研究 HBCD 及 HBCD/DE-71 对大鼠血清中甲状腺激素水平、I 型和 II 型脱碘酶活性及其相应基因表达水平的影响。研究结果对进一步认识 HBCD 与 DE-71 两种污染物之间的毒性作用关系, 对认识 HBCD 实际环境的暴露风险具有重要的参考意义。

1 实验材料与方法

1.1 实验动物及分组

Sprague-Dawley (SD) 窝鼠 (清洁级), 购自中科院上海斯莱克实验动物中心。自新生仔鼠 3 日龄 (PND3) 进行为期 42 d 的暴露。室内温度为 (25±1)℃, 室内光线按亮/暗 12 h 循环。依据报道^[18-19], 同时考虑不同个体、不同区域间的情况差异^[20], 设计动物试验 HBCD 及其复合污染的暴露剂量 (以体质量计, 下同) 为 10、50、100 和 300 μg·kg⁻¹ 以反映真实环境水平暴露的特点。同一窝的仔鼠被分为对照组 (contr)、10、50、100 和 300 μg·kg⁻¹ 共 5 组, 每组共 8~10 只仔鼠, 雌雄各半。染毒方法采用灌胃法, 根据每晨称量的仔鼠体重, 按暴露剂量分别灌入溶有 HBCD (购自美国 SIGMA 公司)、HBCD/DE-71 (体积比 2:1) 的花生油, 对照组以单纯花生油代替。暴露 42 d。

1.2 样品采集

实验动物暴露 42 d 后, 处死, 腹主动脉取血, 立即取出肝脏、脑组织, 放入液氮中冻存, 之后转至 -80℃ 冰箱保存备用。

1.3 测定指标及方法

1.3.1 血清中甲状腺激素水平的测定

利用放射免疫法测定 TT3、TT4、FT3、FT4 及 TSH 水平, 碘^[125]I 游离三碘甲腺原氨酸放射免疫分析盒由深圳拉尔文生物工程技术有限公司提供。

1.3.2 肝组织 (I 型脱碘酶) 和脑组织 (II 型脱碘酶) 活力的测定

取冰冻组织称重、剪碎后放至玻璃匀浆器, 按 W:V=1:2 加入匀浆介质 (0.1 mol·L⁻¹ pH 7.3 的磷酸盐缓冲液, 含 1 mmol·L⁻¹ EDTA), 在 0~4℃ 下中速匀浆以制备组织匀浆液。采用 Chopra 法^[21], 将匀浆液离心取上清, 在试管中加入 0.15 mol·L⁻¹ pH 值为 7.35 的磷酸盐缓冲液 500 μL; 无放射活性的 T4 标准液 100 μL, 质量浓度为 5 μg·mL⁻¹; 400 μL 的上清液。37℃ 温浴 2 h, 间歇摇动。温浴后加入 2 mL 95% 乙醇提取, 终止反应。对照管所加试剂同反应管, T4 标准液在温浴 2 h 后加入, 并立即加入乙醇, 其他同上。将乙醇提取混合物振匀, 离心收集上清液。放射免疫法测定对照管和反应管上清液中的 T3 含量, 求出酶促反应中 T3 的净生成量。脱碘酶活性以每微克 T4 相当于每克组织每分钟产生的游离 T3 的量 (nmol·min⁻¹·μg⁻¹) 表示。

1.3.3 I 型、II 型脱碘酶 mRNA 水平的测定

利用实时荧光定量 PCR (Real-time PCR) 测定 I 型、II 型脱碘酶 mRNA 表达水平。分别取肝脏和脑组织 (50~80 mg) 利用 Trizol 试剂按照试剂盒方法提取总 RNA, 经逆转录系统合成 cDNA (逆转录试剂购自上海闪晶生物公司), -20℃ 保存, Trizol 试剂为碧云天生物技术研究产品。

实时荧光定量 PCR 反应体系参照 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 试剂盒 (购自上海闪晶生物公司) 说明书, 所用引物均由上海闪晶生物公司合成, 引物序列和扩增片段长度^[22-23]见表 1。I 型脱碘酶 PCR 反应条件: 95℃ 预变性 10 s, 95℃ 变性 5 s, 60℃ 退火及延伸 34 s, 进行 40 个循环; II 型脱碘酶 PCR 反应条件: 预变性 95℃, 5 min, 变性 95℃, 15 s, 退火 95℃, 15 s, 延伸 72℃, 34 s, 进行 40 个循环。在每个循环延伸阶段检测荧光信号, 进行实时监控, 最后进入解链阶段, 绘制产物的融解曲线, 以了解样品扩增的特异性, 保证测定结果的准确可靠。数据收集由 PCR 仪自带软件完成, 通过软件计算

表1 基因引物序列及扩增片段长度

Table 1 Primer sequences for target genes and length of PCR products

Seq Name	Primer sequences	Length of PCR products
D1	Fw: TCGTAGATGACTTTGCCTCCAC Rw: CCGGATGTCCACGTTGTTC	101bp
GAPDH	Fw: CATGGCCTTCCGTGTTCTA Rw: ATGCTGCTTACCACCTTCT	107bp
D2	Fw: CGCTCCAAGTCCACTCTCGG Fw: AGCCCCATCCGCCGTCTCT	195bp
β -actin	Fw: GGCTGTATTCCCCTCCATCG Rw: CCAGTTGGTAACAATGCCATGT3	154bp

所有样本目的基因和内参照基因的循环阈值(Ct)值。目的基因 mRNA 水平的测定采用相对定量法,利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行计算。

1.4 统计学分析

应 SPSS 13.0 统计软件进行数据分析和处理,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析 (One-Way ANOVA), 组间两两比较时采用 S-N-K 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 实验结果

2.1 大鼠血清中甲状腺激素水平的变化

经 HBCD 单一暴露 42 d 后, 各组大鼠血清中甲状腺激素的变化情况如表 2 所示。

如表 2 所示, 与对照组相比, 大鼠血清中 TT4、TT3、FT4、FT3 浓度随着暴露剂量增大呈现先略升高后下降的趋势, 其中 $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 FT3 浓度显著性升高 ($P < 0.05$), $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 FT4 浓度显著性下降 ($P < 0.05$)。TSH 呈现下降趋势, 10 、 50 及 $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 TSH 浓度显著下降 ($P < 0.05$)。

表2 HBCD 单一暴露下大鼠血清中甲状腺激素的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Serum thyroid hormone changes of rats by HBCD exposure

组别	TT4 (ng·mL ⁻¹)	TT3 (ng·mL ⁻¹)	FT4 (pg·mL ⁻¹)	FT3 (pg·mL ⁻¹)	TSH ($\mu\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	74.68±5.90	1.28±0.13	11.62±3.04	2.30±0.26	1.29±0.09
$10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	77.58±7.21	1.30±0.16	12.03±0.46	2.74±0.18*	1.07±0.08*
$50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	70.10±9.83	1.15±0.13	10.91±1.69	2.16±0.29	0.97±0.16*
$100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	71.7±9.59	1.21±0.17	10.89±1.76	2.39±0.28	1.18±0.14
$300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	63.22±4.81	1.02±0.09	10.56±0.69*	2.05±0.20	0.87±0.16*

*表示与对照组相比有显著差异 $P < 0.05$

表3 HBCD/DE-71 复合暴露下大鼠血清中甲状腺激素的变化 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Serum thyroid hormone changes of rats by HBCD/DE-71 compound exposure

组别	TT4 (ng·mL ⁻¹)	TT3 (ng·mL ⁻¹)	FT4 (pg·mL ⁻¹)	FT3 (pg·mL ⁻¹)	TSH ($\mu\text{IU}\cdot\text{mL}^{-1}$)
对照	52.79±10.53	0.92±0.13	8.29±1.59	1.22±0.13	0.78±0.12
$10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	53.19±14.68	0.93±0.15	8.70±2.31	1.46±0.27	0.60±0.27
$50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	69.40±8.36*	0.99±0.15	10.58±1.18*	1.37±0.21	0.84±0.12
$100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	61.51±11.17	0.95±0.12	9.60±2.13	1.32±0.20	0.81±0.11
$300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$	64.96±15.42	0.96±0.09	10.38±2.29*	2.10±0.95*	0.89±0.16

*表示与对照组相比有显著差异 $P < 0.05$

HBCD/DE-71 复合暴露 42 d 后, 各组大鼠血清中甲状腺激素的变化情况如表 3 所示。

如表 3 所示, 与对照组相比, 复合暴露后, 大鼠血清中 TT4、TT3、FT4、FT3、TSH 浓度随着暴露剂量的增大呈现升高的趋势, 其中 $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 TT4 浓度显著性升高 ($P < 0.05$), $50 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 及 $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 FT4 浓度显著性升高 ($P < 0.05$), $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 FT3 浓度显著性升高 ($P < 0.05$)。

2.2 大鼠肝脏组织中 I 型脱碘酶活力及 mRNA 表达水平的影响

经过为期 42 d 的暴露实验后, 各组大鼠肝脏中 I 型脱碘酶活力及 mRNA 表达水平的变化情况如下图 1 所示。

如图 1 所示, 经 HBCD 暴露 42 d, 与对照组相比, $10\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 暴露剂量组大鼠肝脏组织中 I 型脱碘酶活力呈下降趋势; HBCD/DE-71 复合暴露 42 d, $10\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组大鼠肝脏组织中 I 型脱碘酶活力呈升高趋势, 但单一及复合暴露各暴露组脱碘酶活力变化均无统计学差异。

如图 2 所示, 与对照组相比, HBCD 暴露 42 d 后, $10\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 暴露剂量组 I 型脱碘酶 mRNA 表达水平下降, 其中 $300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组表达水平显著下降 ($P < 0.05$); HBCD/DE-71 复合暴露 42 d 后, 与对照组相比, $10 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 I 型脱碘酶活力下降, $50\sim 300 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 I 型脱碘酶活力升高, 其中 $100 \mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组的 I 型脱碘酶活力显著升高 ($P < 0.05$)。

2.3 大鼠脑组织 II 型脱碘酶活力及 mRNA 表达水平的影响

经过为期 42 d 的暴露实验后, 各组大鼠脑组

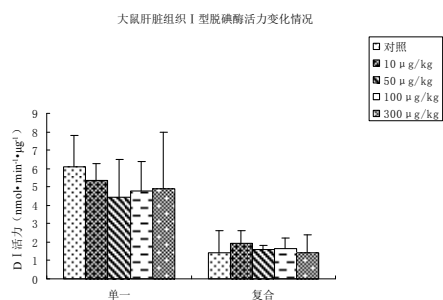


图1 不同暴露剂量组对大鼠肝脏组织 I 型脱碘酶活力的影响

Fig.1 The effect of different exposure doses on D1 activity in rat liver tissue

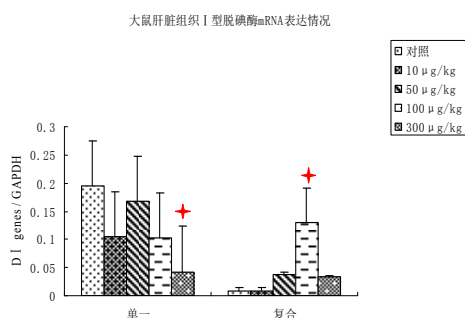


图2 不同暴露剂量组对大鼠肝脏组织 I 型脱碘酶 mRNA 表达水平的影响

Fig.2 The effect of different exposure doses on D1 gene expression level in rat liver tissue

织中 II 型脱碘酶活力及 mRNA 表达水平的变化情况如下图所示。

如图 3 所示, 经 HBCD 暴露 42 d, 10~300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组脑组织 II 型脱碘酶活力均低于对照组, 其中 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 II 型脱碘酶活力显著性降低 ($P<0.05$); 经 HBCD/DE-71 复合暴露 42 d, 50~300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 II 型脱碘酶活力均高于对照组, 其中 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组酶活性显著性升高 ($P<0.05$)。

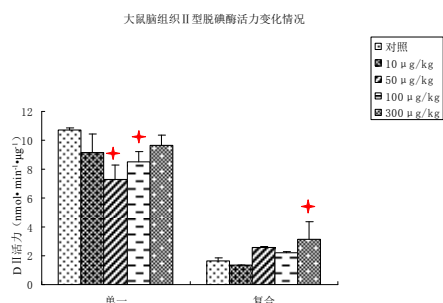


图3 不同暴露剂量组对大鼠脑组织 II 型脱碘酶活力的影响

Fig.3 The effect of different exposure doses on D2 activity in rat brain

如图 4 所示, 经 HBCD 暴露 42 d, 10~300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组脑组织 II 型脱碘酶 mRNA 表达水平均低于于对照组, 其中 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组显著性降

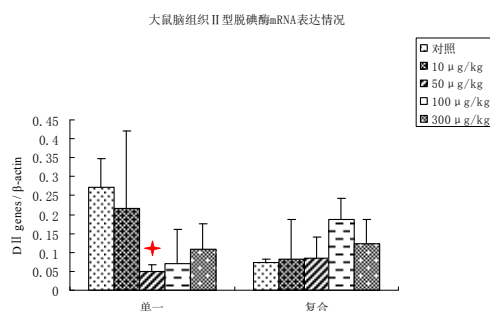


图4 不同暴露剂量组对大鼠脑组织 II 型脱碘酶 mRNA 表达水平的影响

Fig.4 The effect of different exposure doses on D2 gene expression level in rat brain

低 ($P<0.05$); 经 HBCD/DE-71 复合暴露 42 d, 10~300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 II 型脱碘酶 mRNA 表达水平均高于对照组, 但无统计学意义 ($P>0.05$)。

3 讨论

3.1 血清中甲状腺激素的影响

甲状腺激素在血液中主要以 2 种方式运输, 一种是与血液中运载蛋白结合, 以结合态方式存在; 一种是极少部分以游离态 (FT3、FT4) 的形式存在^[24]。血液中的 T3 和 γ T3 是由 T4 在外周组织如肝、肾和骨骼肌等的脱碘酶 (5'-脱碘酶或 5-脱碘酶) 作用下转变而来的^[25], 其中 γ T3 不具有甲状腺激素的生物活性, 而只有主要以游离形式存在的 T3 才具有生物活性, 进而发挥生理功能^[26]。血清中 TT4 和 TT3 水平是检测污染物对生物是否产生甲状腺激素干扰效应的常用指标^[27]。

本实验中, 与对照组相比, 经 HBCD 暴露后, 50~300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组大鼠血清中 TT4、TT3、FT4、TSH 出现了下降趋势, 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组 FT3 显著升高 ($P<0.05$), 表明低剂量的 HBCD 暴露, 对脑发育期大鼠的甲状腺激素产生干扰, 尤其是甲状腺激素 T3 的干扰。Palace 等^[28]对彩虹鳟鱼的研究显示, 幼鱼暴露于 HBCDs 56 d 后, 血液中出现 FT4 含量降低, FT3 上升的现象。由于以游离形式存在的 T3 才具有生物活性, 它可直接进入靶细胞对其发挥生物效应, 还可通过负反馈调节促甲状腺激素的分泌, 因此, 游离状态甲状腺激素的变化对机体生理过程的影响更加明显。而经 HBCD/DE-71 暴露后, TT4、TT3、FT4、TSH 均升高, 与 HBCD 单一暴露时的实验结果存在差异, 这一现象表明 HBCD 的甲状腺激素干扰机制与 DE-71 不同, Hamers 等^[29]进行的大鼠垂体细胞瘤 (GH3) 实验结果显示 HBCDs 具有对甲状腺激素 T3 的协同或替代作用; 而 DE-71 暴露文献上往往显示的是甲状腺激素水平的下降, 比如 TT4, TT3 等。但本文中 2 种污染物复合后甲状腺激素水平

反而上升,显示出2种物质复合暴露产生的毒性不同于任何一种单一物质的暴露结果。

3.2 脱碘酶活力及 mRNA 表达水平的影响

甲状腺激素的代谢主要是由脱碘酶完成,它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。I型脱碘酶(D1)主要分布于肝脏,肝脏是甲状腺激素代谢的重要器官和循环T3的主要来源^[30],II型脱碘酶(D2)主要分布于脑组织,大脑作为机体最为重要的器官,对其正常生长、发育及功能发挥具有重要作用^[31]。

本研究结果显示,与对照组相比较,HBCD与HBCD/DE-71在D1活性及其mRNA表达水平上存在很大的差异:经HBCD暴露后,D1酶活性及mRNA表达水平均降低,这一现象表明,HBCD抑制D1的转录降低了mRNA的表达水平,从而使得D1活性降低,D1活降低使得周边组织中甲状腺激素T4向T3转化的代谢速率减慢,导致体内T3水平降低,与本研究中T3水平下降相符,这表明HBCD可影响脱碘酶的活性对甲状腺激素的代谢产生潜在的影响,也显示出了甲状腺激素代谢过程的复杂性;经HBCD/DE-71暴露,D1活性及其mRNA表达水平均升高,D1活性升高表明了甲状腺激素T4向T3的转化率增大^[32],从理论上讲D1活性升高,T4下降,T3升高。但本文中D1活性的变化与对照组没有显著差异,因此并未出现所谓的T4下降,T3升高。而本文T4的水平出现升高的趋势,这可能是由于DE-71的复合作用使得D1的酶活及基因表达都发生了变化。

哺乳动物大脑中细胞内T4向T3的转化生成由D2催化,从而保证适量的T3在大脑发育及生理功能中的关键作用^[33]。有研究表明脑组织和血清T4水平相平行,故脑内T3水平由脑D2活力和血清T4水平共同决定^[34]。本实验中,经HBCD暴露,与对照组相比较,暴露剂量组的血清T4水平降低,D2活性降低,由于血清中T4的量减少进而相应到达脑组织的T4量也减少,此时,D2活性降低表明在该暴露剂量下大鼠可能为了维持脑组织T3水平的动态平衡而出现的一种自我保护现象。经HBCD/DE-71暴露,血清中的T4的含量增加,大鼠脑组织D2活性均升高,这一现象与脑内T3水平由脑D2活力和血清T4水平共同决定相符。此外,本研究结果还显示D2 mRNA表达水平与脑内T3水平的动态平衡也有着密切的联系。

4 结论

甲状腺激素维持着机体的正常代谢,对机体

的生长、发育起着至关重要的作用。本文从生化、分子生物学角度探讨HBCD及其复合污染对甲状腺激素代谢的影响。实验证明,HBCD及HBCD/DE-71污染物均能通过改变甲状腺激素代谢酶的活性及mRNA表达水平进一步影响机体甲状腺激素的内稳态平衡,且HBCD单一暴露与HBCD/DE-71复合暴露对其毒性作用途径及所产生的毒性效果存在着很大的差异。因此,本文的研究结果真实的反映出环境中HBCD的毒性作用,为HBCD及其复合污染物的环境健康效应与风险评价提供了一定的参考数据,丰富了HBCD的毒理学资料。

参考文献:

- [1] MORF L S, TREMP J, GLOOR R, et al. Brominated flame retardants in waste electrical and electronic equipment: substance flows in a recycling plant[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39: 8691-8699.
- [2] ALAEE M, ARIAS P, SDIN A, et al. An overview of commonly used brominated flame retardants, their use patterns in different countries /regions and possible modes of release[J]. *Environment International*, 2003, 29(6): 683-689.
- [3] ARONT J, MCARTY L, COUSINS I, et al. An evaluation of hexabromocyclododecane (HBCD) for Persistent Organic Pollutant (POP) properties and the potential for adverse effects in the environment[R]. European Brominated Flame Retardant Industry Panel (EBFRIP), 2009: 214.
- [4] ROBIN J, MARTIN L, Norbert V H, et al. Hexabromocyclododecane challenges scientists and regulators[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39: 282-287.
- [5] VINCEP P, KERRI P, THOR H, et al. Biotransformation enzymes and thyroid axis disruption in juvenile rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane diastereoisomers[J]. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42: 1967-1972.
- [6] 吴艳娣. 几种典型持久性有机污染物对斑马鱼胚胎发育的毒性效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [7] BARTN Z, ANCHLIQUE M, RONALD V B, et al. Levels of hexabromocyclododecane in harbor porpoises and common dolphins from Western European Seas, with evidence for stereoisomer specific biotransformation by cytochrome P450[J]. *Environmental Science and Technology*, 2005, 39: 2095-2100.
- [8] YVONNE F, INGA B. Technical pentabromodiphenyl ether and hexabromocyclododecane as activators of the pregnane-X-receptor (PXR) [J]. *Toxicology*, 2009, 264: 45-51.
- [9] POWER D M, LLEWELLYN L, FAUSTINO M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish[J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2001, 130 (4): 447-459.
- [10] BECK K B, SCHNEIDER M J, DAVEY J C, et al. The type III 5-deiodinase in *Rana Catesbeiana* tadpoles is encoded by a thyroid hormone responsive gene[J]. *Endocrinology*, 1995, 136: 4424.
- [11] BERRY J R, LARSEN P R. The role of selenium in thyroid hormone action[J]. *Endocrine Reviews*, 1992, 13 (2): 207-219.
- [12] BERRY M J, KIEFFER J D, LARSEN P R. Evidence that cysteine not selenocysteine, is in the catalytic site of type II iodothyronine deiodinase[J]. *Endocrinology*, 1991, 129: 550.
- [13] ARTHUR J R, NICOL F, BECKETT G J, et al. Impairment of iodothyronine 5'-deiodinase activity in brown adipose tissue and its acute stimulation by cold in selenium deficiency[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 1990, 69: 782.
- [14] SORMO E G, SALMER M P, JENSSEN B M, et al. Biomagnification of polybrominated diphenyl ether and hexabromocyclododecane flame retardants in the polar bear food chain in Svalbard, Norway[J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2006, 25(9): 2502-2511.

- [15] XIAN Q M, RAMU K, ISOBE T, et al. Levels and body distribution of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and hexabromocyclododecanes (HBCDs) in freshwater fishes from the Yangtze River, China[J]. *Chemosphere*, 2008, 71(2): 268-276.
- [16] LAW R J, HERZKE D, HARRAD S, et al. Levels and trends of HBCD and PBDEs in the European and Asian environments, with some information for other BFRs[J]. *Chemosphere*, 2008, 73(2): 223-241.
- [17] STAPLETON H M, ALLEN J G, KELLY S M, et al. Alternate and new brominated flame retardants detected in US house dust. *Environmental Science and Technology*, 2008, 42(18): 6910-6916.
- [18] JINPING E, JINMIN G, JING M, et al. Neurobehavioural effects, redox responses and tissue distribution in rat offspring developmental exposure to BDE-99[J]. *AchEmsphere*, 2009, 75 (7): 963-968.
- [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.
- [20] ASMITA D, SUMANTRA D, PRANAB K S, Thyroid hormone promotes glutathione synthesis in astrocytes by up regulation of glutamate cysteine ligase through differential stimulation of its catalytic and modulator subunit mRNAs[J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2007, 42: 617-626.
- [21] CHOPRA L A. A study of extrathyroidal conversion of thyroxine (T4) to 3, 3', 5-thiodothyronien(T3) in vitro. *Endocrinology*, 1977, 101(2): 453-63.
- [22] 王琨, 孙毅娜, 刘嘉玉, 等. 不同碘摄入水平对小鼠甲状腺组织 I 型脱碘酶基因表达及酶活性的影响[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2008(3): 320-326.
- [23] 商跃云, 初桂兰. 缺氧缺血性脑损伤新生大鼠中枢神经系统 2 型脱碘酶 mRNA 的变化[J]. *实用儿科临床杂志*, 2011, 26(8): 593-595.
- [24] 刘俊驰, 刘薇薇. 非甲状腺疾病中甲状腺激素水平的研究[J]. *标记免疫分析与临床*, 2004, 3(1): 57.
- [25] BECKETT G J, ARTHUR J R. Selenium and endocrine systems[J]. *The Journal of Endocrinology*, 2005, 184(3): 455-465.
- [26] 陈杰. 家畜生理学[M]. 4 版. 北京: 中国农业出版社, 2003: 368-372.
- [27] 瞿璟琰, 施华宏, 刘青坡, 等. 四溴双酚-A 和五溴酚对红鲫甲状腺激素和脱碘酶的影响[J]. *环境科学学报*, 2008, 28(8): 1625-1630.
- [28] 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 and Technology*, 2008, 42(6): 1967-1972.
- [29] HAMERS T, KAMSTRA J H, SONNEVELD E, et al. In vitro profiling of the endocrine- disrupting potency of brominated flame retardants[J]. *Toxicological Sciences*, 2006, 92(1): 157-173.
- [30] 杨雪峰, 孙秀发, 侯晓晖, 等. 硒对高碘小鼠肝脏两种含硒酶的影响[J]. *营养学报*, 2005, 27(4): 300-302, 306.
- [31] 孟列素, 谭武红, 苏敏, 等. MSeC 对鸡胚肝脏和脑组织中谷胱甘肽过氧化物酶和脱碘酶活性的影响[J]. *中国地方病学杂志*, 2005, 24(4): 382-385.
- [32] PALACE V, PARK B, PLESKACH K, et al. Altered thyroxine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) exposed to hexabromocyclododecane (HBCD), *Chemosphere*, 2010, 80: 165-169.
- [33] HALL J A, BIANCO A C. Triumphs of the thyroid despite lesser conversion [J]. *Endocrinology*, 2009, 150(6): 2502-2504.
- [34] YANG X F, HOU X H, XU J, et al. Effect of selenium supplementation on activity and mRNA expression of type I deiodinase in mice with excessive iodine intake [J]. *Biomedical Environmental Sciences*, 2006, 19: 302-308.

Disrupting Effects of Hexabromocyclododecane (HBCD) and its complex compounds on rat thyroid hormone metabolism after developmental exposure

LIU Yuanyuan¹, JI Xiuling^{1*}, SHEN Qunhui¹, ZHONG Gaoren²

1. School of Environmental Science and Engineering, Donghua University, Shanghai 201620, China;

2. Institute of Radiation Medicine Fudan University, Shanghai 201620, China

Abstract: To study the disrupting effects of Hexabromocyclododecane (HBCD) and its complex compounds on rat thyroid hormone metabolism after developmental exposure. Sprague-Dawley rats of 3-days old were exposed to different doses of HBCD (10, 50, 100, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight) and HBCD/DE-71(10, 50, 100, 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ body weight) for 42 days, Thyroid hormone levels in serum were detected using radioimmunoassay. Deiodinase I (D1) and Deiodinase II (D2) gene expressing levels were tested by Real-time fluorescence quantitative PCR assay and the enzyme activity of D1 and D2 were tested with Chopra's method. Compared with the controls, after HBCD exposure, serum TT4, TT3, FT4 and FT3 concentrations increased at first but then on a downward trend with increased exposure dosage; FT3 concentration of 10 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures increased significantly ($P<0.05$); FT4 concentration of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures decreased significantly ($P<0.05$). There was a decline trend of TSH concentration at different exposure doses. TSH concentration of 10, 50 and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures all decreased significantly ($P<0.05$). After HBCD/DE-71 complex compounds exposure, there were increased trends of serum TT4, TT3, FT4 and FT3 concentration with increased exposure dosage; TT4 concentration of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures increased significantly ($P<0.05$); FT4 concentration of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ and 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures increased significantly ($P<0.05$); FT3 concentration of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures increased significantly ($P<0.05$). After HBCD exposure, D1 activity and its gene expression level both appeared to decline, and D1 gene expression level of 300 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures decreased significantly ($P<0.05$). Also, D2 activity and its gene expression level both appeared to decline, and D2 activity and its gene expression level of 50 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures decreased significantly ($P<0.05$); After HBCD/DE-71 complex compounds exposure, enzyme activity and the gene expression of D1 and D2 were all increased. D1 activity and its gene expression level of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures increased significantly ($P<0.05$), and D2 activity of 100 $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ exposures increased significantly ($P<0.05$). HBCD and HBCD/DE-71 complex compounds both altered the activities and gene expression levels of thyroid hormone metabolic enzymes. This process can be further influenced thyroid hormone homeostasis balance. There were great difference in toxic effect way and toxic effects for HBCD single exposure and HBCD/DE-71 complex compounds exposure.

Key words: Hexabromocyclododecane (HBCD); Polybrominated Diphenyl Ethers; Thyroid hormones; Deiodinase