

BDE-47 对斑马鱼胚胎氧化应激与 DNA 损伤的毒性研究

赵雪松¹, 任 新¹, 杨春维¹, 尤 宏², 任百祥^{1*}

(1. 吉林师范大学环境科学与工程学院, 吉林 四平 136000; 2. 哈尔滨工业大学, 哈尔滨 150090)

摘 要:以斑马鱼胚胎为受试对象,研究了 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)对胚胎的氧化应激及 DNA 损伤。通过对不同浓度 BDE-47(1、5、10、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)暴露 5 d 后胚胎/幼鱼体内超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽 S 转移酶(GSH)的活性及丙二醛(MDA)、活性氧(ROS)含量变化的分析以及 *Sod1*、*Ucp-2*、*Gstp2* 及 *Nqo1* 基因相对量表达的测定,考查 BDE-47 对斑马鱼胚胎/幼鱼的氧化应激效应;通过单细胞凝胶电泳(SCGE)对尾矩值的分析,探讨 BDE-47 对斑马鱼胚胎/幼鱼的 DNA 损伤。结果显示, BDE-47 能够显著诱导 ROS 与 MDA 的产生,并呈现浓度效应依赖关系;50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 能够显著增加 SOD 与 CAT 的活性,降低 GSH 的浓度。BDE-47 暴露后 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组基因 *Ucp-2* 的表达显著上调 4.12 倍($p<0.01$), *Gstp2* 与 *Nqo1* 表达分别显著下调至对照组的 0.62 倍与 0.55 倍($p<0.01$),而基因 *Sod1* 相对表达量没有显著变化。同时,5、10、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎/幼鱼尾矩值显著增加并伴随着 ROS 的浓度升高。结果表明, BDE-47 能够诱导斑马鱼胚胎/幼鱼产生氧化应激,ROS 是诱发胚胎发生 DNA 损伤的导火索。

关键词:BDE-47; 斑马鱼胚胎; 氧化应激; DNA 损伤

中图分类号: X171.5 文献标志码: A 文章编号: 1672-2043(2015)12-2280-07 doi:10.11654/jaes.2015.12.005

Oxidative Stress and DNA Damage in Zebrafish Embryos Exposed to BDE-47

ZHAO Xue-song¹, REN Xin¹, YANG Chun-wei¹, YOU Hong², REN Bai-xiang^{1*}

(1. College of Environmental Science and Engineering, Jilin Normal University, Siping 136000, China; 2. Harbin Institute of Technology, Harbin 150090, China)

Abstract: Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), widely used flame retardants, have been detected in environment, biota, and even human blood serum. Currently, little is known about their toxicity to fish. This experiment was designed to explore the oxidative stress and DNA damage of 2,2',4,4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) to zebrafish embryos. Superoxide dismutase (SOD), catalase (CAT), total glutathione (GSH), malondialdehyde (MDA), and relative mRNA expression levels of genes (*Sod1*, *Ucp-2*, *Gstp2* and *Nqo1*) were assessed in zebrafish embryos exposed to 1, 5, 10, and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of BDE-47 for 96 hours. The single cell gel electrophoresis was performed to observe the DNA damage caused by BDE-47. Compared with control, reactive oxygen species (ROS) and MDA were increased by BDE-47 treatments in a dose-effect manner. Exposure to 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ of BDE-47 for 96 hours significantly increased the activities of SOD and CAT, but significantly decreased GSH levels. Moreover, the transcription of *Ucp-2* was significantly up-regulated to 4.12 folds ($p<0.01$) while that of *Gstp2* and *Nqo1* was significantly down-regulated to 0.62 folds and 0.55 folds ($p<0.01$), respectively, by 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47. There was no significant difference observed in the expressions of *Sod1* between the treatments and the control. Under exposure of 5, 10, and 50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, olive tail moment increased significantly with increasing concentrations of ROS. These results indicate that BDE-47 could induce oxidative stress in zebrafish embryos and ROS is the trigger inducing embryos DNA damage.

Keywords: BDE-47; zebrafish embryos; oxidative stress; DNA damage

多溴联苯醚(Polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)作为一种人工添加型阻燃剂被广泛地应用于塑料、纺织、电子、电器、化工等生产领域中^[1]。由于大部

分 PBDEs 以非共价键结合到各种产品中,使其极容易从这些物质中直接释放进入环境。过去的 20 年, PBDEs 在沉积物、鱼类、人类乳汁以及脂肪组织中的含量不断增加^[2],在哺乳动物、人体以及水生生物中, BDE-47 检出率最高^[3-4],成为 PBDEs 的显著代表。目前,关于 PBDEs 的生物毒性研究多集中在哺乳动物模型和细胞模型等方面,有关 PBDEs 对鱼类毒性的研究则相对较少,对复杂水环境进行生态风险评价的现

收稿日期: 2015-06-24

基金项目: 四平市科技发展规划项目(四科合字第 2014050 号); 吉林师范大学 2015 年大学生创新创业计划项目

作者简介: 赵雪松(1983—),女,吉林双辽人,博士,讲师,主要从事环境毒理学研究。E-mail: zhaoxuesong008@163.com

* 通信作者: 任百祥 E-mail: renbaixiang008@126.com

实意义不大。有限的鱼类毒性研究多集中于 PBDEs 对鱼类甲状腺功能的影响,如:BDE-47^[9]与 DE-71^[10]暴露后斑马鱼血浆中甲状腺素 T4 含量降低并伴随下丘脑-垂体-甲状腺相关的功能基因的表达发生显著变化。

斑马鱼,又名蓝条鱼,成鱼体长 4~5 cm。由于斑马鱼具有养殖方便,产卵量大,胚胎透明,发育迅速,敏感性高,遗传背景清楚等特点,近年来作为理想的实验模型被广泛地应用于遗传学和毒理学研究。本实验采用国际上通用的斑马鱼胚胎作为受试生物,以在鱼体中检出率最高的 BDE-47 为研究对象,考察急性暴露对斑马鱼胚胎的氧化应激效应以及 DNA 的损伤,并从分子学的角度分析可能的致毒机制。

1 材料和方法

1.1 实验生物

成年的斑马鱼(AB 品系)购自中科院武汉水生生物研究所,饲养在曝气的重组水内($64.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{NaHCO}_3$, $5.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{KCl}$, $123.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 和 $294 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} \text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$),水温保持在 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$, pH 值控制在 7~8 之间,光暗周期为 14 h/10 h,早晚各投喂鲜活的丰年虫一次,进食 30 min 后,清理残食与粪便。用于本次试验的性成熟斑马鱼均在本实验室饲养了 2 周以上。选取鳞片完整、游动性强、个体健康的性成熟斑马鱼(雌雄比例为 1:2)加入水温 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 孵化箱中混合饲养,避光隔夜后,次日早晨灯光刺激雌雄鱼自然交配产卵,30 min 后收集受精卵,用重组水迅速清洗,在解剖镜下挑选受精后发育正常,囊胚期的胚胎进行毒性实验,暴露时间为受精后的 120 h(Hour post-fertilization, hpf)。

1.2 实验试剂与仪器

BDE-47 (2,2',4,4'-tetrabromodi-phenyl ether, Wellington, 加拿大),纯度>99.9%,DMSO 购自 Sigma 公司。RNA 提取液 Trizol 购自 Invitrogen 公司,DNase 和 M-MLV 以及逆转录试剂盒和荧光定量试剂盒购自 Takara 公司,随机引物由 Invitrogen 公司合成。测试试剂盒均购自南京建成生物工程研究所。实验中所需要的其他化学试剂均为国药分析纯试剂。

1.3 暴露实验

由于 BDE-47 微溶于水,本实验选取 DMSO 为助溶剂,配置 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BDE-47 储备液,用 $(28 \pm 1)^\circ\text{C}$ 的重组水稀释为 $1, 5, 10, 50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 BDE-47 暴露溶液。对照组与暴露组 DMSO 的最终浓度小于 0.003%。实验在 180 mm 的结晶皿中进行,每个结晶

皿中放置约 400 个胚胎。每个浓度实验组和对照组做 3 组重复实验。暴露期间,每天更换 50%的暴露液。

1.4 抗氧化酶与 MDA 的测定

在受精 120 hpf 后,每个暴露浓度取出 80 条幼鱼,用磷酸盐缓冲液(PBS, pH 7.4)进行清洗后,去除多余水分并称重,加入预冷的 pH 为 7.4 的匀浆介质后用手提式电动匀浆器在冰水浴中进行充分匀浆,配置成 10%的组织匀浆液。匀浆介质成分如下: $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$, $0.000 1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{EDTA-2Na}$, $0.01 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 蔗糖, 0.8% NaCl。每个浓度 3 个平行样品,于 4°C 、 $6000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min,根据南京建成生物有限公司试剂盒的操作说明书测定超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)以及谷胱甘肽 S 转移酶(GSH)及丙二醛(MDA)。

1.5 活性氧(Reactive oxygen, ROS)测定

ROS 测定方法参照文献[7]并有所改进。受精 120 hpf 后,每个暴露浓度取出 40 条幼鱼置离心管中,用 PBS(pH 7.4)进行清洗后,去除多余水分,加入预冷的匀浆介质用手提式电动匀浆器将离心管置于冰水浴中进行充分匀浆。每个浓度 3 个平行样品,于 4°C 、 $12000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,收集上清液。蛋白浓度采用 GE 公司(2-D Quant Kit)试剂盒进行测定。ROS 的测定采用荧光探针 2,7-dichlorofluorescein diacetate (DCF-DA)进行。取 $20 \mu\text{L}$ 上清液,加到 96 孔板中,室温条件下孵育 5 min,然后加入 $100 \mu\text{L}$ PBS(pH 7.4)和 $8.3 \mu\text{L}$ 的 DCFH-DA 储备液(溶于 DMSO 中, $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$), 37°C 在暗处孵育 30 min,用酶标仪在激发波长 485 nm 和发射波长 535 nm 处测定吸光度,最后的结果是吸光度/蛋白浓度,表示为 $\text{DCF} \cdot \text{mg}^{-1} \text{protein}$ 。

1.6 单细胞凝胶电泳(SCGE)测定 DNA 损伤

DNA 损伤的测定方法参照文献[8]并进行了优化。挑选 10 个胚胎(24 hpf)用 PBS 漂洗两次,并在室温下用胰酶消化 10 min,在显微镜下观察细胞悬液消化完全。移液枪吸取琼脂糖,加上洁净的盖玻片,置冰袋冷却,迅速将细胞悬浮液与低熔点琼脂糖的混合液滴到第一层胶上,待琼脂固化;待第 2 层琼脂糖凝固后,再滴加琼脂糖,并迅速盖上盖玻片,将载玻片浸入新配制的 4°C 裂解液中,再将载玻片水平并列置于电泳槽阳极端,使电泳仪的电压为 25 V(恒压),电流为 300 mA,电泳 15 min。电泳结束后取出玻片用蒸馏水冲洗 3 次,将载玻片淹没于 $0.4 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1} \text{Tris-HCl}$ (pH 7.5)缓冲液中 15 min,再将载玻片浸埋 1 h,晾干或室温下过夜。各实验组的载玻片经染色剂处理 15 min

后,迅速置于 BX53 荧光显微镜下观察,最后应用 CASP 软件对 DNA 迁移的各种参数进行测量。

1.7 功能基因相对定量分析

RNA 的抽提参考文献[6]的方法。简单说,首先用 Trizol 进行 RNA 的提取,为了消除内源性 DNA 的污染,粗提物的总 RNA 用 RNase 的 DNI 进行消化并纯化。测定样品在 260 nm 与 280 nm 下的吸光度值,可以用 A260/280 的比值和 1% 的琼脂糖凝胶电泳来检测总 RNA 的纯度。cDNA 的合成依据 RNA、随机引物以及 M-MLV 逆转录试剂盒进行。完成转录后的 cDNA 放入 -80 °C 冰箱保存。荧光定量 PCR (qT-PCR) 根据 Takara 公司的 SYBR GREEN Real-time PCR Master Mix 进行实时测定,每个基因的表达情况做 3 个重复,每个重复 3 个平行样,使用 β -actin 作为内参。所有数据均转化为实验组与对照组的变化倍数以做统计分析,运用公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 计算目的基因差异的表达倍数,公式为:

$$\Delta\Delta Ct = (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{实验组}} - (Ct_{\text{目的基因}} - Ct_{\text{管家基因}})_{\text{对照组}}$$

$2^{-\Delta\Delta Ct}$ 表示的是实验组目的基因的表达相对于对照组的变化倍数。氧化应激基因主要测定 *Sod1*、*Ucp-2*、*Gstp2*、*Nqo1*。

本实验测定的基因及引物序列如下: β -actin forward:CGGGTGGAGTTTGACACTT,reverse:CTCCCTGATGCTGGGTCGTC;*Sod1* forward:GGCCAACGATAGTTTAGA,reverse:CCAGCGTTGCCAGTTTTTAG;*Ucp-2* forward:TGGCTAACCCACTGATGTA,reverse:CAATGCTCCGATATGCGTC;*Gstp2* forward:CACTCCACATAC TTCGCTATAC,reverse:TTTGTCCGCCGAGGATCTT;*Nqo1* forward:CACAGGATTGCCTTACGC,reverse:CGTCTATGCAGGA GACCAGA。

1.8 数据统计

采用 Kolmogorov-Smirnov 检验数据分布形式。通过 Levene's 检验法分析数据的方差同质性。采用 SPSS 17.0 软件 (SPSS, Chicago, USA) ANOVA 进行方差分析, Turkey 法进行实验组与对照组间的比较, $p < 0.05$ 即有显著性差异。所有数据都用平均值 $\pm$ 标准误差 (SEM) 来表示。

2 结果

2.1 BDE-47 对斑马鱼胚胎生化系统影响

SOD、CAT、GSH 的活性与 MDA 水平的变化如图 1 所示。BDE-47 暴露后, SOD 的活性随着暴露浓度的

升高而增加, 其中 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BDE-47 显著诱导了 SOD 的活性 ($p < 0.05$, 图 1a)。1、5、10 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组胚胎 CAT 的活性增加, 但与对照组没有显著差异, 只有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BDE-47 使 CAT 的活性显著增加 ($p < 0.05$, 图 1b)。除 $1 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 外, 其余浓度暴露组斑马鱼胚胎的 MDA 水平显著性增加 ($p < 0.05$), 并且呈现剂量效应关系 (图 1c)。与对照组相比, GSH 活性在每个暴露组均有明显的降低, 其中 5、10、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组 GSH 活性显著降低 ($P < 0.05$, 图 1d)。

2.2 ROS 的测定

由图 2(a) 可见, 所有暴露组 ROS 水平均显著高于对照组。与对照组相比, 随着暴露浓度由 $5 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 增加至 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, ROS 水平由 1.62 倍显著上调至 2.49 倍 ($p < 0.01$)。同时, 在本试验研究的浓度范围内, MDA 与 ROS 表现出良好的相关性, 其 $R^2 = 0.90$ 。

2.3 BDE-47 对斑马鱼胚胎氧化应激功能基因表达影响

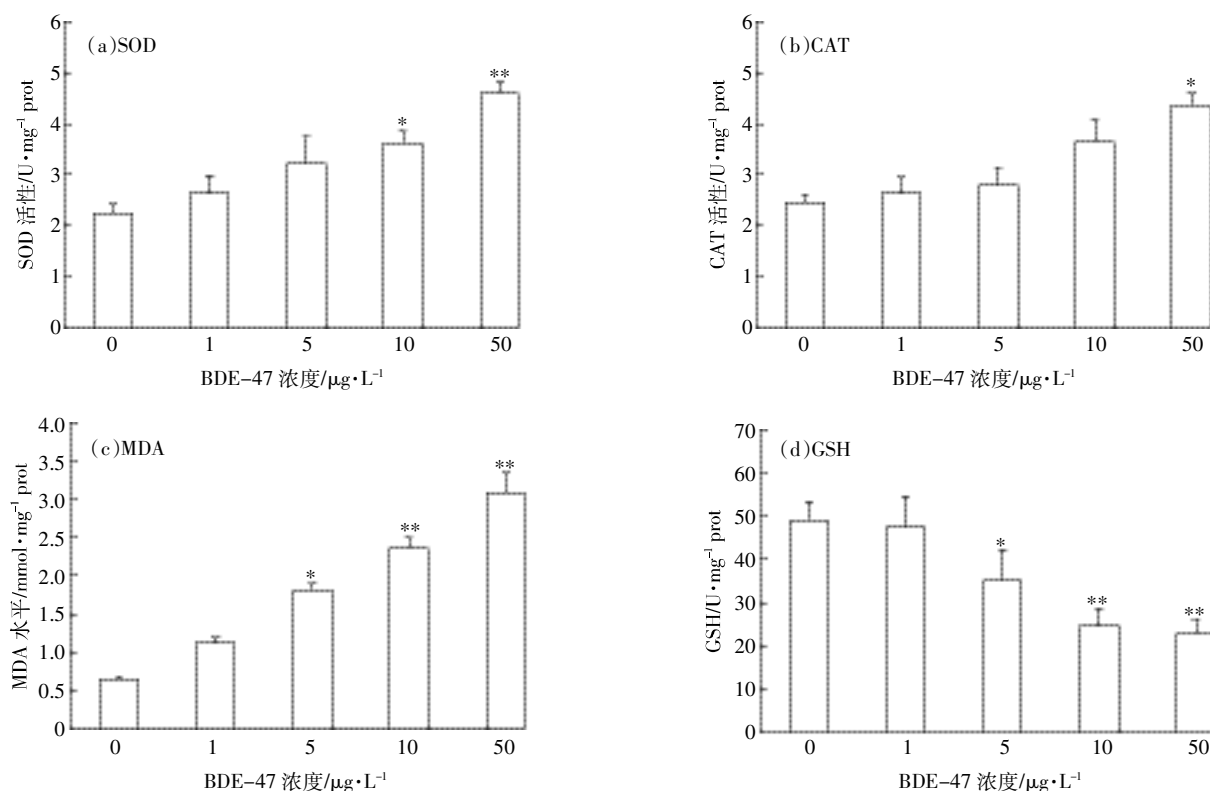
如图 3 所示, 与对照组相比, 随着暴露浓度的增加, *Sod1* 基因表达呈现降低趋势, 但与对照组之间不存在显著差异。*Ucp-2* 表达与暴露浓度呈现明显的浓度剂量关系, 其中 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 与 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组 *Ucp-2* 表达分别显著上调至对照组的 3.89 倍与 4.12 倍 ($p < 0.01$)。随着 BDE-47 暴露浓度的增加, *Gstp2* 与 *Nqo1* 表达呈现下调趋势, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组 *Gstp2* 与 *Nqo1* 表达分别显著下调至对照组的 0.62 倍与 0.55 倍 ($p < 0.01$)。

2.4 BDE-47 诱发斑马鱼胚胎 DNA 的损伤分析

由图 4(a) 可见, 随着 BDE-47 暴露浓度的增加, Olive 尾矩的值有所增加, 当 BDE-47 浓度为 5、10、50 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 尾矩值增加更为显著, 说明高浓度 BDE-47 处理组对斑马鱼胚胎细胞 DNA 有损伤作用。由图 4(b) 可见, 暴露组 Olive 尾矩的值与 ROS 呈正相关 ($R^2 = 0.93$), 说明 ROS 的产生是诱发 DNA 损伤的导火索。

3 讨论

本研究的目的是从氧化应激与 DNA 损伤的角度探讨 BDE-47 对斑马鱼胚胎的致毒机理。研究表明, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 急性暴露能够显著诱导 ROS 的产生, 抗氧化酶 SOD、CAT 活性及 MDA 水平显著提高, 并使 GSH 的浓度显著降低, 产生的 ROS 与 MDA 之间存在相关性, 同时与氧化应激相关的功能基因 *Ucp-2*、*Gstp2* 与 *Nqo1* 的相对表达量也发生了不同程



实验数据以平均值 $\pm$ 标准误差表示(mean $\pm$ SEM),每个浓度 3 个平行样;* $p<0.05$,** $p<0.01$ 与*** $p<0.001$ 表示暴露组和溶剂组之间的差异。下同
Data are mean $\pm$ SEM of three replicates. * $p<0.05$, ** $p<0.01$, and *** $p<0.001$ indicate significant differences between exposure and control groups. The same as below

图 1 BDE-47 对 120 hpf 斑马鱼幼鱼 SOD、CAT、MDA 与 GSH 水平的影响

Figure 1 Effect of BDE-47 on SOD, CAT, MDA, and GSH of zebrafish larvae at 120 hpf

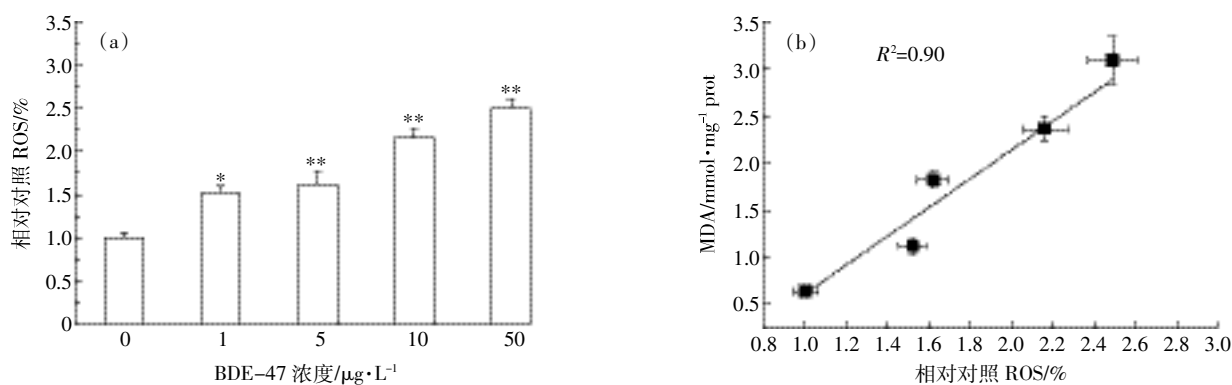


图 2 BDE-47 对 120 hpf 斑马鱼胚胎 ROS 水平的影响(a)和 ROS 与 MDA 之间的相关性(b)

Figure 2 ROS level(a) and correlation between ROS and MDA(b) of zebrafish eggs at 120 hpf under exposure to BDE-47

度的改变。

ROS 是生理性氧的代谢物,是广泛存在于生物体内的活性物质。在一般情况下,线粒体是大多数细胞产生 ROS 的来源。正常情况下,组织细胞内 ROS 浓度在抗氧化系统的调控下保持在生理水平,即其产生和消除处于平衡状态。当生物体遭受外源刺激时,ROS

大量产生时机会通过改变细胞内 SOD、CAT 等抗氧化酶的活性或其基因表达量的途径发生氧化应激,以提高机体清除 ROS 的能力,减少氧化损害^[6]。本研究结果显示,BDE-47 暴露后,胚胎/幼鱼 ROS 的水平显著增加且与暴露浓度呈现浓度依赖关系,表明 BDE-47 能够诱导胚胎产生 ROS。其他研究者也阐述了类

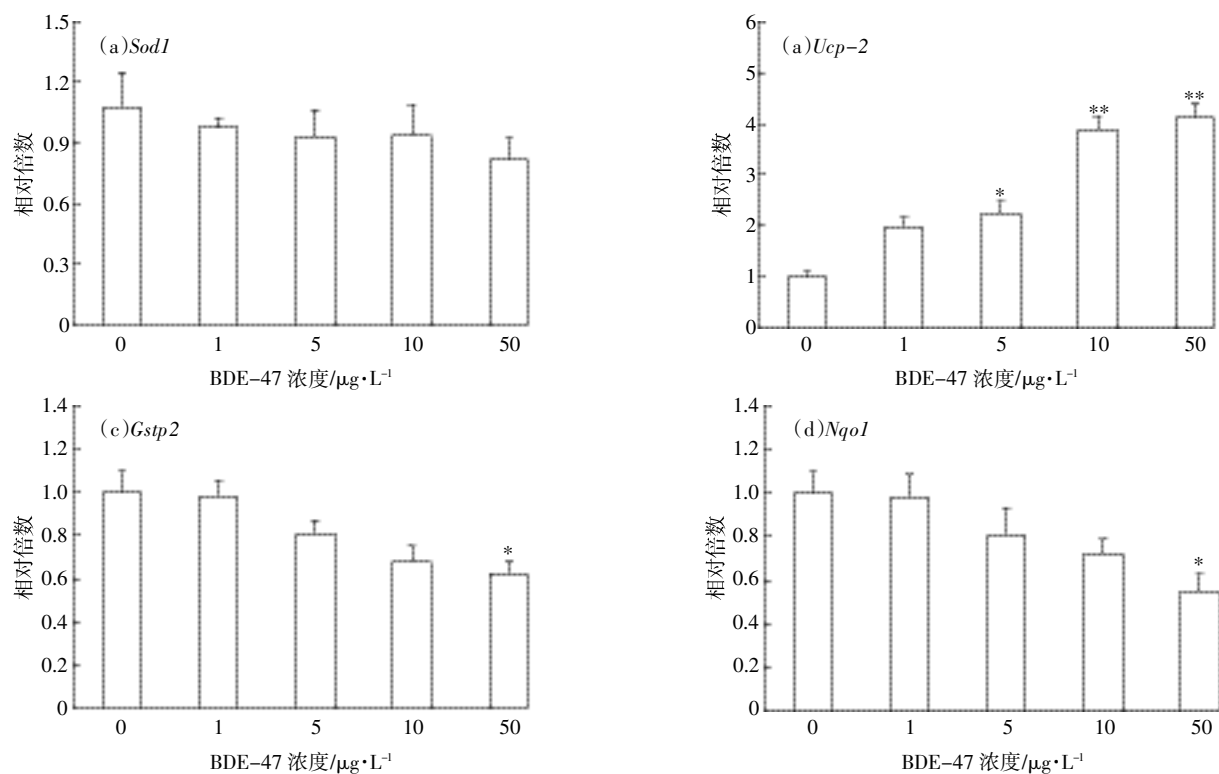
图3 BDE-47对120 hpf斑马鱼胚胎 *Sod1*、*Ucp-2*、*Gstp2*与 *Nqo1* 基因表达的影响

Figure 3 Effect of BDE-47 exposure on gene expression of zebrafish eggs at 120 hpf

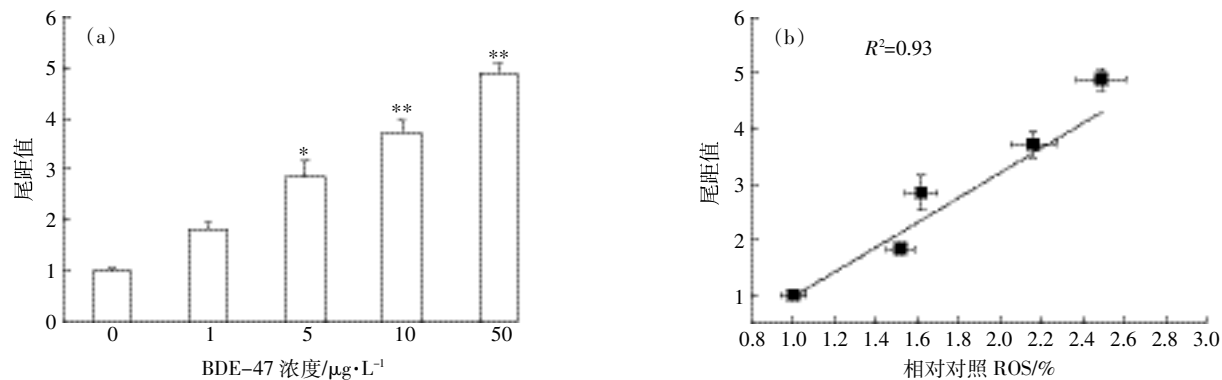


图4 BDE-47暴露对胚胎DNA损伤程度(Olive尾距值)的影响(a)和ROS与尾距值之间的相关性(b)

Figure 4 DNA damage(a) and correlation between DNA damage and ROS(b) of zebrafish embryos under exposure to BDE-47

似结论, Shao等^[10]发现BDE-47暴露后, 虹鳟鱼 (*Oncorhynchus mykiss*) 肝脏细胞 RTL-W1 内 ROS 水平显著增加; Jin等^[11]发现性腺细胞 RTG-2 内 ROS 水平也显著增加。Han等^[12]的近期研究也显示, BDE-47 的外源刺激能够导致水生生物体内 ROS 含量增加。

SOD 是普遍存在于水产动物体内的机体防御氧化损害系统的关键酶之一, 它是超氧阴离子自由基最有效的清除剂, 可以通过催化歧化反应来清除体内过量的 $\text{O}_2^{\cdot-}$, 将其分解为 H_2O_2 和 O_2 , 保护细胞免受活性氧自由基氧化损伤^[6]。CAT 是生物体 H_2O_2 和过氧化

物清除剂, 为防止外源刺激使机体产生的自由基 $\text{O}_2^{\cdot-}$ 、 $\text{OH}\cdot$ 、 H_2O_2 后引起的 DNA 断裂、脂质过氧化、酶蛋白失活等, CAT 能够将 H_2O_2 及其他过氧化物转变为无毒性产物^[9]。本实验结果显示, SOD 与 CAT 活性较对照组增加且存在浓度效应依赖关系, $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 能够显著诱导 SOD 与 CAT 活性 ($p < 0.05$)。这是因为斑马鱼胚胎受到高浓度 BDE-47 的胁迫而产生大量的 ROS, 为了清除多余的 ROS 使机体免于遭受氧化损伤, 胚胎自身的抗氧化系统启动, 激活体内的 SOD 及 CAT 用以清除由 ROS 产生的 $\text{O}_2^{\cdot-}$ ^[13]。Albin等^[14]研

究发现,BDE-99 能够显著抑制鼠肝脏中 SOD 活性,在最高剂量暴露组 CAT 的活性降低而在肾脏中 SOD 和 CAT 的活性都随暴露剂量的增加而降低。这说明,受到外来物质刺激后,生物体内 SOD 和 CAT 活性的变化存在物种的特异性与组织的特异性。

GSH 是生物体内重要的非酶抗氧化剂,是一种生物功能比较特殊的氨基酸衍生物,属于含有巯基的小分子肽类物质。在外源物质的刺激下,GSH 会被诱导,有效地清除生理性的或病理性的氧自由基,同时还作为必需的辅助因子参与 GSH 相关酶调控氧化应激的状态^[13]。当 GSH 逐渐减少至耗尽时,将导致机体产生中毒效应。本实验结果显示,随着 BDE-47 暴露浓度的增加,GSH 水平呈降低趋势且 $10 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $50 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 显著降低胚胎 GSH 水平($P<0.01$),表明 BDE-47 能够刺激胚胎产生大量的 ROS,导致细胞内氧自由基的含量增加。机体启动自身的抗氧化防御系统后,为了维持机体内氧自由基与抗氧化防御系统之间动态的平衡,GSH 被消耗用于清除机体内多余的氧自由基,因而 GSH 的含量下降。Wang 等^[15]研究的 BDE-47 对小鼠的氧化应激与本实验得到了一致性的结论。生物体的生物膜中含有多种不饱和脂肪酸,当生物体受到外来刺激,体内自由基含量增加时,不饱和脂肪酸将在自由基攻击下形成脂质过氧化产物即 MDA,其含量常常反映机体内脂质过氧化的程度,间接地反映出细胞损害的程度。对于鱼类模型而言,脂质过氧化物常常作为环境污染物如重金属、多环芳烃(PAHs)及多氯联苯(PCBs)等毒性效应的敏感指示物。在本实验中,随着 BDE-47 暴露浓度的增加,胚胎内 MDA 水平显著增加($p<0.05$),且 MDA 与胚胎内 ROS 的水平具正相关性($R^2=0.90$),说明 BDE-47 暴露产生的氧自由基攻击机体内的不饱和脂肪酸,进而形成了 MDA。基于抗氧化系统 GSH 含量及 MDA 的变化,BDE-47 可以诱导斑马鱼胚胎/幼鱼产生氧化应激。吉贵祥等^[16]研究也得到了相似的结论, $2.0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 短期暴露导致斑马鱼体内 SOD 显著升高,MDA 含量与 BDE-47 暴露浓度呈正相关,同时 $0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ BDE-47 能诱导细胞凋亡。本研究除了从斑马鱼生化指标的变化体现其氧化损伤外,同时从分子生物学的角度出发,分析了与氧化应激相关的目标基因的表达,从分子层面揭示氧化应激产生的可能机制。范灿鹏等^[17]研究的 BDE-47 对剑尾鱼抗氧化系统的影响与本文略有不同,他们除了选择 GST、MDA 与 CAT 作为分析指标外,还考查了 BDE-47 暴露对剑尾

鱼脱乙基酶(EROD)活性的影响,结果显示 BDE-47 暴露能显著诱导剑尾鱼肝脏 EROD 活性,鉴于 EROD 与 MDA 活性响应敏感且变化稳定,可将二者作为 BDE-47 暴露的生物标记物,因此,后续将考虑研究低浓度全生命周期暴露 BDE-47 对斑马鱼 EROD 活性的影响及性别差异性。

为了进一步从分子生物学的角度揭示 BDE-47 产生氧化应激的机制,本实验选取 *Sod1*、*Ucp-2*、*Gstp2* 及 *Nqo1* 作为目标基因。由本实验结果可见,BDE-47 暴露后,*Sod1* 与对照组不存在显著差异,与抗氧化酶 SOD 呈现了不同的变化趋势。研究结果表明,在本试验条件下,抗氧化酶与生物体中酶的活性相关,它们不受抗氧化蛋白基因的调控。产生这种现象的原因可能是因为 mRNA 是生物体细胞活性的即时反应,而蛋白则是受 mRNA 翻译后进行调节的,影响蛋白表达的复杂因素是造成抗氧化酶编码基因 *Sod1* 与抗氧化蛋白 SOD 呈现不同趋势的根本原因。本课题组前期的实验显示纳米氧化锌能显著诱导斑马鱼胚胎 *Ucp-2* 基因的表达^[18],与本研究得到一致性的结论,后续实验重点研究将 *Ucp-2* 作为持久性有毒物质(PTS)引发氧化应激评估的目的基因的可行性。Chen 等^[19]采用食物暴露的方式发现 BDE-47 能够抑制斑马鱼幼鱼的体重与体长,并且显著降低细胞色素 P450(*CYP1A1*)基因的表达。研究显示,PBDEs 能够与机体内的芳香烃受体(AhR)、雄激素受体(AR)、孕酮受体(ER)相结合,从而造成内分泌干扰效应,而 *CYP1A1* 是芳香烃受体(AhR)最为典型的目标基因^[20]。Chen 等研究结果从另一个角度证实了 BDE-47 的生物毒性效应。

SCGE 是近年发展起来的一种研究 DNA 损伤的快速方法。本实验应用 SCGE 技术检测到 BDE-47 对斑马鱼胚胎细胞 DNA 均有显著的损伤作用。与本研究结论相似,吴伟等^[21]研究结果显示 BDE-47 对鲫鱼组织产生 DNA 损伤,具有遗传毒性;许超群等^[22]发现 BDE-47 暴露导致菲律宾蛤仔组织抗氧化酶活性受到显著抑制,DNA 损伤显著。与上述研究不同,本实验着重分析了 ROS 与 Olive 尾矩值的相关性,由 ROS 与 Olive 尾矩值呈现的显著正相关分析得到 BDE-47 诱发斑马鱼胚胎细胞 DNA 损伤的主要原因是:外界 BDE-47 的刺激诱发使胚胎体内自由基含量增加,抗氧化系统首先启动以抵御增加的自由基,但仍有部分自由基与 DNA 发生反应,导致 DNA 链断裂和损伤。综上所述,抗氧化酶活力和组织 DNA 损伤可作为

BDE-47 污染评价的生物标志物。

4 结论

(1)BDE-47 能够显著诱导 ROS, 并引起抗氧化指标(SOD、CAT、MDA 和 GSH)产生不同程度的变化, 表明 BDE-47 诱导斑马鱼胚胎产生氧化应激效应。

(2)BDE-47 暴露后 *Sod1* 基因表达没有显著变化; $50 \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ 暴露组 *Ucp-2* 表达显著上调 ($P < 0.01$), *Gstp2* 与 *Nqo1* 表达显著下调 ($P < 0.05$)。

(3)BDE-47 暴露诱导胚胎细胞 DNA 产生损伤作用, ROS 的产生是诱发 DNA 损伤的导火索。

参考文献:

- [1] Besis A, Samara C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in the indoor and outdoor environments: A review on occurrence and human exposure[J]. *Environmental Pollution*, 2012, 169: 217–229.
- [2] Huang F F, Wen S, Li J G. The human body burden of polybrominated diphenyl ethers and their relationships with thyroid hormones in the general population in Northern China[J]. *Science of the Total Environment*, 2014, 466–467: 609–615.
- [3] Kaperta A, Ptak A, Gergoraszczyk E. Different action of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and its hydroxylated metabolites on *ERα* and *ERβ* gene and protein expression[J]. *Toxicology Letters*, 2014, 29(1): 250–256.
- [4] 王维契, 周俊丽, 裴淑玮, 等. 多溴联苯醚在环境中的污染现状研究进展[J]. *环境化学*, 2014, 33(7): 1084–1091.
WANG Wei-qi, ZHOU Jun-li, PEI Shu-wei, et al. Research progress on status of environmental pollutions of polybrominated diphenyl ethers[J]. *Environmental Chemistry*, 2014, 33(7): 1084–1091.
- [5] 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.
- [6] Yu L Q, Lam J C W, Guoy Y, et al. Parental transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and thyroid endocrine disruption in zebrafish [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(24): 10652–10659.
- [7] Bestman J B, Stackley K D, Rahn J J. The cellular and molecular progression of mitochondrial dysfunction induced by 2, 4-dinitrophenol in developing zebrafish embryos[J]. *Differentiation*, 2015, 89(3/4): 51–69.
- [8] Tang S, Cai Q S, Chibli C. Cadmium sulfate and CdTe–quantum dots alter DNA repair in zebrafish (*Danio rerio*) liver cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 272(2): 443–452.
- [9] Morely Y, Barouki R. Repression of gene expression by oxidative stress[J]. *Biochemical Journal*, 1999, 342(3): 481–496.
- [10] Shao J, Eckert T M L, Lee L E J, et al. Comparative oxygen radical formation and toxicity of BDE-47 in rainbow trout cell lines[J]. *Marine Environmental Research*, 2008, 66(1): 7–8.
- [11] Jin S W, Yang F X, Hui Y, et al. Cytotoxicity and apoptosis induction on RTG-2 cells of 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) and decabrominated diphenyl ether (BDE-209)[J]. *Toxicology in Vitro*, 2010, 24(4): 1190–1196.
- [12] Han J, Won E, Lee M, et al. Developmental retardation, reduced fecundity, and modulated expression of the defensome in the intertidal copepod *Tigriopus japonicus* exposed to BDE-47 and PFOS[J]. *Aquatic Toxicology*, 2015, 165: 136–143.
- [13] Jin Y X, Zhang X X, Shu L J, et al. Oxidative stress response and gene expression with atrazine exposure in adult female zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Chemosphere*, 2010, 78(7): 846–852.
- [14] Albin M L, Alonso V, Linares V, et al. Effects of exposure to BDE-99 on oxidative status of liver and kidney in adult rats[J]. *Toxicology*, 2010, 271(1/2): 51–56.
- [15] Wang H, Tang X, Sha J. The reproductive toxicity on the rotifer *Brachionus plicatilis* induced by BDE-47 and studies on the effective mechanism based on antioxidant defense system changes[J]. *Chemosphere*, 2015, 135: 129–137.
- [16] 吉贵祥, 石利利, 刘济宁, 等. BDE-47 对斑马鱼胚胎-幼鱼的急性毒性及氧化应激作用[J]. *生态毒理学报*, 2013, 8(5): 731–736.
JI Gui-xiang, SHI Li-li, LIU Ji-ning, et al. Acute toxicity and oxidative stress effects of BDE-47 on zebrafish embryos and larvae[J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2013, 8(5): 731–736.
- [17] 范灿鹏, 王 奇, 刘昕宇, 等. 四溴联苯醚对剑尾鱼毒性及其抗氧化系统的影响[J]. *环境科学学报*, 2011, 31(3): 642–648.
FAN Can-peng, WANG Qi, LIU Xi-yu, et al. Toxicity and effect of tetrabromodiphenyl ether upon the antioxidant defense system of sword-tail fish (*Xiphophorus helleri*)[J]. *Acta Scientiae Circum Stantiae*, 2011, 31(3): 642–648.
- [18] Zhao X S, Wang S T, Wu Y, et al. Acute ZnO nanoparticles exposure induces developmental toxicity, oxidative stress and DNA damage in embryo–larval zebrafish[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 136–137: 49–59.
- [19] Chen T H, Cheng Y M, Cheng J O, et al. Growth and transcriptional effect of dietary 2, 2', 4, 4'-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47) exposure in developing zebrafish (*Danio rerio*)[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2010, 73(3): 377–383.
- [20] Hamers T, Kamstra J H, Sonneveld E, et al. *In vitro* profiling of the endocrine-disrupting potency of brominated flame retardants[J]. *Toxicology Science*, 2006, 92(1): 157–173.
- [21] 吴 伟, 瞿建宏, 陈家长, 等. 多溴联苯醚对鲫鱼组织 DNA 损伤及 p53 蛋白表达的影响[J]. *农业环境科学学报* 2011, 30(9): 1836–1841.
WU Wei, QU Jian-hong, CHEN Jia-zhang, et al. Effects of polybrominated diphenyl ethers on DNA damage and p53 protein expression in *Carassius auratus* Linn[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2011, 30(9): 1836–1841.
- [22] 许超群, 潘鲁青, 王 琳. 四溴联苯醚 (BDE-47) 对菲律宾蛤仔组织解毒代谢酶活力与 DNA 损伤的影响[J]. *海洋环境科学*, 2011, 30(5): 653–658.
XU Chao-qun, PAN Lu-qing, WANG Lin. Effects of tetrabromodiphenyl ether (BDE-47) on metabolic enzymes and DNA damages in tissues of *Ruditapes philippinarum*[J]. *Marine Environmental Science*, 2011, 30(5): 653–65.