

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20140627001

于永利, 陈形, 李慧蕾, 等. 福美双对斑马鱼胚胎 III 型脱碘酶基因表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 320-324

Yu Y L, Chen X, Li H L, et al. Thiram affects Diodinase3 gene expression in zebrafish embryos [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 320-324 (in Chinese)

福美双对斑马鱼胚胎 III 型脱碘酶基因表达的影响

于永利^{1,2}, 陈形¹, 李慧蕾³, 魏素香⁴, 杨景峰¹, 张学富¹, 东彦新¹, 于华荣⁵, 杨文军², 董武^{1,*}

1. 内蒙古民族大学动物科技学院 内蒙古自治区高等学校毒物与动物疾病监控重点实验室, 通辽 028000
2. 内蒙古民族大学生命科学院, 通辽 028000
3. 内蒙古民族大学附属医院, 通辽 028000
4. 百奥生生物科技公司, 美国路易斯维尔 75057
5. 内蒙古民族大学农学院, 通辽 028000

收稿日期: 2014-06-27 录用日期: 2014-08-20

摘要: 福美双是一种二硫代甲氨基甲酸盐类农药, 在我国应用较为广泛, 但其残留毒性引起广泛重视。试验采用斑马鱼胚胎作为动物模型, 探讨了福美双对斑马鱼胚胎的毒性。结果表明福美双导致斑马鱼胚胎孵化率下降, 在受精后 72 h(72 hpf), 对照组的孵化率是 100%, $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 福美双染毒组的孵化率降至 46%, 而 $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 福美双染毒致使孵化率降到 0%。III 型脱碘酶与斑马鱼的发育和变态息息相关, 以上 2 种浓度的福美双在 24 hpf 分别增高了 III 型脱碘酶基因的表达 6.71 和 14.84 倍, 结果表明福美双具有一定的内分泌搅乱作用, 也表明斑马鱼胚胎作为农药安全评价模型的理论可行性。

关键词: 福美双; 斑马鱼; 胚胎毒性; 甲状腺毒性; III 型脱碘酶

文章编号: 1673-5897(2015)2-320-05 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Thiram Affects Diodinase3 Gene Expression in Zebrafish Embryos

Yu Yongli^{1,2}, Chen Xing¹, Li Huilei³, Wei Suxiang⁴, Yang Jingfeng¹, Zhang Xuefu¹, Dong Yanxin¹, Yu Huarong⁵, Yang Wenjun², Dong Wu^{1,*}

1. Inner Mongolia Provincial Key Laboratory for Toxicants and Animal Disease, College of Animal Science and Technology, Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028042, China
2. College of Life Sciences, Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028000, China
3. Affiliated Hospital of Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028000, China
4. DNA Lab Department, Bio-Synthesis, Inc., Lewisville, TX 75057, USA
5. Agriculture Collage, Inner Mongolia University for Nationalities, TongLiao 028000, China

Received 27 June 2014 accepted 20 August 2014

Abstract: Thiram is a pesticide of the dithiocarbamate chemical family, and is extensively used in China. Its residual toxicity is a widespread problem and was voiced out by many members of the scientific community. In this study, zebrafish embryos were used as a whole animal model to understand thiram toxicity. Zebrafish em-

基金项目: 内蒙古自治区自然科学基金(2012MS1203; 2015MS0804); 国家自然科学基金项目(30360090; 21267015); 内蒙古自治区“草原英才”工程(2014)

作者简介: 于永利(1978-), 男, 讲师, 硕士, 研究方向为食品与环境卫生学, E-mail: 707928940@qq.com;

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: dongwu2002@hotmail.com

bryos hatching rate was significantly decreased from 100% in control to 46% in $1 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ thiram and even 0% in $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ thiram. At the same time, significant increase in Deiodinase 3, an enzyme crucial in embryonic development and metamorphosis, was observed at 6.71 and 14.84 folds more than control at the two different concentrations at respectively at 24 hpf. These results demonstrated that zebrafish embryo is a sensitive model to thiram toxicity and can become a useful model for pesticide environmental toxicity assessment.

Keywords: thiram; zebrafish; embryo toxicity; thyrotoxicity; diiodinase 3

福美双(thiram)又名秋兰姆,是二硫代氨基甲酸盐类农药的一种,广泛应用于蔬菜、水果、植物等多种作物的病虫害防治,属低毒杀菌剂,但具有较高蓄积性^[1]。2014 年 2 月 12 日,美国环保署发布对福美双(thiram)的残留限量要求,规定草莓的福美双残留量不得超过 20 ppm。一些国家甚至已经停止使用福美双。

有关福美双的毒性机制,国内学者有了一些报道,我们也对特异的脊索弯曲作了一些研究,但毒性机制还是不明^[2-4]。最近我们发现福美双染毒引起色素沉着的变化,这与国外学者有关甲状腺的研究结果存在一定关联性,Marinovich 等^[5]报道乙撑二硫代氨基甲酸盐(ethylenbisdithiocarbamates, EBDs)及其代谢产物(ethylenethiourea, ETU)影响甲状腺球蛋白的作用而对甲状腺有一定的毒性作用。体内的碘化甲状腺球蛋白是碘的主要储存形式,其被水解酶分解后可以生成较多四碘甲状腺原氨酸(T4),二型脱碘酶能够 T4 转换成具有极强生物活性的三型碘酪氨酸(T3)。T3 在体内的含量的动态平衡对有机体的生长、代谢具有非常重要的影响。而 T3 的转化灭活是由三型脱碘酶来完成的,即转化成二碘甲状腺原氨酸(T2)而失活达到调节的目的^[6]。Freyberger 等^[7]也报道与 ETU 类似的四甲基硫脲(N, N,N',N'-tetramethylthiourea)引起大鼠甲状腺的增生、肥大以及肿瘤的生成,其原因与甲状腺素过氧化物酶和一型脱碘酶有关。

近年来,斑马鱼的胚胎毒性实验广受重视,因为斑马鱼胚胎已知基因较多、基因组计划已基本完成、胚胎早期发育阶段透明、可对发育过程直接观察、生长速度快、短期内即可出结果、产卵较多,可提供大量测试样本^[8]。鉴于以上优点,以斑马鱼胚胎作为实验动物模型,探讨了乙撑二硫代氨基甲酸盐类农药福美双对胚胎甲状腺素三型脱碘酶的影响,从分子水平上探讨了福美双的毒性机制,为二硫代氨基甲酸盐类农药的安全毒性评价提供理论依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 仪器与试剂

仪器:尼康光学显微镜 E600,尼康 DXM 1200 数码相机,尼康 EclipseNet 图像分析软件(Nikon; Capture NX 2),5415R 型台式离心机(Eppendorf 公司),定量 PCR 仪(Applied Biosystems, 7300 Real time PCR system)。

试剂:福美双(Thiram T24201-100 g,纯度 97%(质量百分比),二甲基亚砜(DMSO)溶液等其他药物均来源于 Sigma 公司,纯度 $\geq 99.5\%$ (Sigma D-5879)。

1.2 实验动物与染毒方法

斑马鱼(*Danio rerio*, AB 系),饲养于玻璃容器中,水温 28.5°C ,光照周期为 $14 \text{ h} \cdot \text{d}^{-1}$ 。实验前一天傍晚,取 4 条雌鱼和 8 条雄鱼混养。自然交配后,挑出发育正常的受精卵,受精后 3 h(3 hpf)进行暴露实验。实验于直径为 3 cm 的培养皿中进行。暴露浓度分别为:DMSO 对照(0.1%), 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , $1 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 福美双,每暴露浓度中含有 10 粒胚胎,每组进行 3 次平行实验。染毒暴露开始后,将斑马鱼胚胎移入 28.5°C 孵化箱进行培养。福美双暴露 24 h 后,换清水继续培养至实验所需的发育时间。固定清洗后用于原位杂交试验。

1.3 原位杂交及其定位、定量分析

基本方法是按 Dong 等^[9]描述的进行,固定后的斑马鱼使用蛋白酶 K($10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)室温消化 30 min,然后加入原位杂交液(50% 甲酰胺,5 $\times$ SSC,2 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Torula RNA,200 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 肝素)放于 67°C 的恒温加热器中 1 h(预杂交),再用含有相关探针(3 型脱碘酶)的原位杂交缓冲液中更换,放于恒温加热器中过夜。次日使用 2 $\times$ SSC、0.2 $\times$ SSC 在 67°C 加热器中各清洗 30 min,然后再用顺丁烯二酸缓冲液($100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺丁烯二酸,150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,0.1% 吐温 20,pH 7.5)清洗 20 min,以及使用封闭液(blocking buffer: 2% blocking reagent,100 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 顺丁烯二酸,150 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl,0.1% 吐温 20,0.1% Triton

x-100,pH 7.5),之后固定清洗使用含有 4 000 倍稀释的抗地高辛抗体(DIG, Roche)并置于 4 ℃ 冰箱中反应过夜。在清洗液(NTMT: 100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl, pH 9.5,100 mmol·L⁻¹ NaCl,50 mmol·L⁻¹ MgCl₂,0.1 %吐温 20)中静置 20 min,使用 BM purple AP substrate pre (Roche)发色观察表达部位、范围与强度等,对特定基因的表达定位,使用 CCD 摄像系统进行解析。

1.4 RNA 的提取纯化以及定量 PCR (RT-PCR)技术

总 RNA 的制备将使用 Trizol(Gibco 产品),使用手动或者匀浆仪打碎斑马鱼胚胎后者脏器后,加入氯仿并且离心,使之分为水相和有机相两层。用移液枪转移水相(内含有 RNA),用异丙醇沉淀 RNA,经 80% 乙醇洗涤 2 遍后用水(RNase free)溶解。制备好的 RNA 样品用核酸定量分析仪检测 OD260、OD260/OD280 的值,并计算 RNA 产量。转录使用反转录酶 2 μL,5 × Buffer 4 μL,5 mmol·L⁻¹ dNTP 4 μL,反转录抑制剂 1 μL,特异下游引物 1 μL,模板 5 μL,最后加 DEPC 水至 20 μL。42 ℃、60 min 后,在冰水中冷却 2 min 备用。Sybr GreenI RT-PCR 方法的建立:在 25 μL 反应体系中,加入 sybr GreenI PCR 反应混合液 12.5 μL,上下游引物各 2.5 μL,cDNA 7.5 μL(0.1 ng)。反应条件如下:95 ℃,10 min 一个循环;然后 95 ℃,15 s,60 ℃,1 min 条件下反应 40 个循环。内参基因使用 18 s,计算采用 2^{-ΔΔCT} 方法来计算基因表达的相对变化。

1.5 数据处理

试验数据用 SPSS 统计软件进行单因素方差分析方法进行多重比较,用平均值 ± 标准误差表示,差异显著性水平设置为 $P<0.05$ 。

2 结果 (Results)

2.1 福美双影响斑马鱼胚胎的孵化

从 3 hpf 给斑马鱼胚胎染毒福美双,观察其孵化率。当实验持续到 72 hpf 时,对照组胚胎孵化率达到最大值,即 100%, 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol·L⁻¹ 福美双的孵化率分别是 98%、97%、46% 和 0% 进行各组孵化率的比较,对照组的孵化率显著的高于 1×10^{-7} mol·L⁻¹ 暴露组和 1×10^{-6} mol·L⁻¹ ($P<0.05$)。 1×10^{-9} 和 1×10^{-8} mol·L⁻¹ 福美双对斑马鱼胚胎孵化率几乎没有影响,但 1×10^{-7} mol·L⁻¹ 浓度的福美双对孵化率有显著的降低,至 1×10^{-6} mol·L⁻¹ 浓度时没有孵化。染毒组的孵化率随着福美双浓度的增加而明显下降(图 1)。

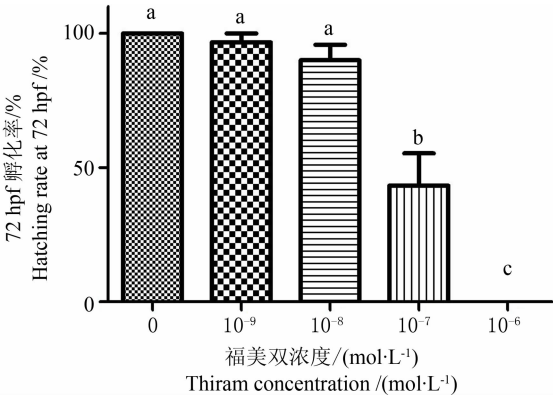


图 1 斑马鱼胚胎的孵化率 (72 hpf)

Fig. 1 Hatching rate of zebrafish emryos at 72 hpf

2.2 福美双对斑马鱼胚胎三型甲状腺脱碘酶表达的影响

在甲状腺素调节中,甲状腺素脱碘酶是一种重要的酶类,其中脱碘酶 I 型和 II 型能够使 T4 转变成成为有活性的 T3,其中 T3 是一种重要的调节生长发育与生殖相关的激素。而 III 脱碘酶能够使 T3 转变成成为 T2,继而使甲状腺素失去活性。实验克隆了斑马鱼甲状腺素 III 型脱碘酶,并且进行了原位杂交试验,发现 III 型脱碘酶主要表达在前肾管(图 2),切片进一步观察,发现 III 型脱碘酶在 24 hpf 主要表达在前肾管部位(图 2c)。使用原位杂交技术,确定基因的具体表达部位的同时,还具有一定的半定量功能,我们发现低浓度的福美双(1×10^{-6} mol·L⁻¹)有轻微的增强 III 型甲状腺素脱碘酶的表达(图 2B)。为进一步定量福美双对 III 型脱碘酶的影响,试验使用 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} mol·L⁻¹ 福美双给 4 hpf 斑马鱼胚胎染毒,直至 24 h 收集鱼卵提取整体 RNA,

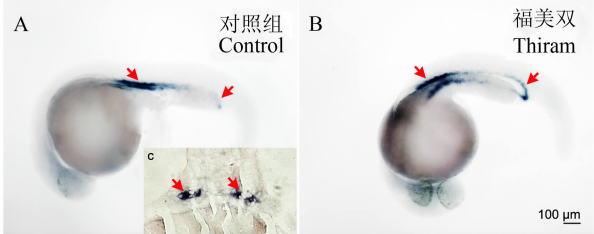


图 2 斑马鱼 III 型甲状腺素脱碘酶基因表达

注:A,对照组;B,福美双 1×10^{-9} mol·L⁻¹;

C 是 A 中虚线部位的纵切图片,红色箭头表示表示基因表达部位。

Fig. 2 Diodinase III gene expression of zebrafish embryos

Note: A, Control; B, Thiram 1×10^{-9} mol·L⁻¹; C is a section of A in imaginary line, red arrow indicate the location of gene expression.

之后转录为 cDNA,使用 18s 作为看家基因进行对比,发现 III 型脱碘酶基因表达与对照组相比较,分别增加了 1.26($P>0.05$)、4.49($P>0.05$)、6.71($P<0.05$)和 14.84($P<0.05$)倍(图 3),福美双极显著的增加了 III 型甲状腺素酶的基因表达。

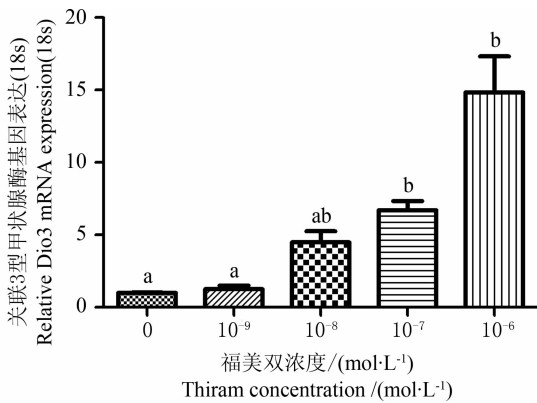


图 3 福美双对斑马鱼胚胎 III 型甲状腺素酶基因表达的影响

注:4 hpf 的斑马鱼胚胎在 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} mol·L⁻¹ 福美双农药终染毒至 24 hpf,收集提取 RNA 用于 RT-PCR 检测。不同字母表示差异及显著($P<0.05$)。

Fig. 3 Thiram affect Diodinase3 in zebrafish embryos

Note: Zebrafish embryos were exposed to thiram (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} and 1×10^{-6} mol·L⁻¹) from 4 to 24 hpf, and analyzed by RT-PCR. Different letter indicate significant different ($P<0.05$).

3 讨论 (Discussion)

本实验以斑马鱼作为实验动物模型,使用不同浓度的福美双给早期斑马鱼胚胎染毒,发现低浓度的福美双显著抑制了斑马鱼的孵化,这种抑制具有一定的浓度依存性,通过检测与变态、生长发育有密切关系的 III 型甲状腺素脱碘酶,以及原位杂交实验探明基因在前肾管部位表达,进一步定量分析发现,福美双极显著的增高了 III 型甲状腺素脱碘酶的基因表达,并且具有明确的浓度依存性。

福美双是我国生产量较大,使用非常广泛的一种低毒农药,其广泛大量的应用以及毒性蓄积作用,对人类的健康构成了潜在的威胁,各国对其的评价以及限制逐年深入与提高^[1]。斑马鱼作为实验动物模型具有非常快速、透明、费用低廉以及已知基因众多的特点,是农药评价不可多得的实验模型。本试验的染毒结果表明福美双引起的胚胎孵化率低下以及三型甲状腺素脱碘酶基因表达显著升高具有密切的关联性。孵化率的降低是生长与变态受到抑制的

一种外在表现,而三型甲状腺素脱碘酶能够降解甲状腺素(T3),而使甲状腺素失活,进而影响生长发育^[10]。当去除 III 型甲状腺素脱碘酶基因(Deiodinase knock out),小鼠血清 T3 水平较高,尤其大脑组内的表达较高,引起后期的神经系统障碍和甲状腺素机能减退^[11-12]

福美双的甲状腺毒性,已有学者进行相关报道,如 Flippin 等^[13]使用福美双类混合物给 23 d 大鼠连续染毒 4 d,发现此类农药抑制了血清 T4 高达 45%,有一定抗甲状腺的作用,慢性中毒时可发生代偿性甲状腺肿大^[14]。使用二硫代氨基甲酸酯类给大鼠染毒,可以明显降低大鼠血液中的血清的 T3、T4 含量,动物有机体反馈会提高有机体内促甲状腺素的含量,导致甲状腺发生病变和甲状腺增生。而本研究中 III 型甲状腺素酶的增高也势必引起 T3 的降低,表明最终结果具有一定的相似性^[5]。此外,与福美双同类别的代森锌也能够强烈抑制甲状腺过氧化物酶的活性,从而干扰了甲状腺激素的产生与合成^[15]。Bhaskar 与 Mohanty 报道与福美双同类的代森锰(Mancozeb)能够与 T3 竞争结合到甲状腺素受体(THR)而使 T3 简介失去活性^[16]。本试验中使用福每双引起 III 型甲状腺素脱碘酶升高也许是福美双与 THR 的可逆/不可逆结合,让有机体应急调节产生过量的 III 型甲状腺素脱碘酶以用于消解过量的 T3^[16]。总之,实验表明福美双的胚胎毒性与甲状腺系统有密切关联。

综上所述,我们所发现的福美双导致斑马鱼胚胎孵化率下降,与引起 III 型脱碘酶表达的显著提高有密切关系。从分子学角度探讨福美双的毒性机制,为食品安全及生态毒理学的研究提供一些理论基础,对新农药的开发、合理使用及安全评价具有一定的科学意义。

通讯作者简介:董武(1969-),男,教授,兽医学博士,硕士研究生导师,主要从事环境毒理学研究工作,发表学术论文 30 余篇。

参考文献(References):

[1] 覃慧丽,谭辉华,李雪生,等. 高效液相色谱法测定香蕉和土壤中福美双的残留量[J]. 农药, 2013, 52(10): 740 - 742

Qin H L, Tan H H, Li X S, et al. Determination of thiram in banana and soil by HPLC [J]. Agrochemicals, 2013, 52(10): 740 - 742 (in Chinese)

- [2] Teraoka H, Urakawa S, Nanba S, et al. Muscular contractions in the zebrafish embryo are necessary to reveal thiuram – induced notochord distortions [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 212(1): 24 – 34
- [3] van Boxel AL, Pieterse B, Cenijn P, et al. Dithiocarbamates induce craniofacial abnormalities and downregulate *sox9a* during zebrafish development [J]. *Toxicological Sciences*, 2010, 117(1): 209 – 217
- [4] 于永利, 杨景峰, 董武, 等. 高残留农药福美双对斑马鱼胚胎脊索的特异性影响[J]. *环境科学研究*, 2011, 11: 1297 – 1304
- Yu Y L, Yang J F, Dong W, et al. Specific effects of the highly – persistent pesticide thiuram on notochord development in zebrafish embryos [J]. *Research of Environmental Sciences*, 2011, 11: 1297 – 1304 (in Chinese)
- [5] Corsini E, Viviani B, Birindelli S, et al. Molecular mechanisms underlying mancozeb – induced inhibition of TNF – alpha production [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2006, 212(2): 89 – 98
- [6] Sutija M, Joss J M. Thyroid hormone deiodinases revisited: Insights from lungfish: A review [J]. *Journal of Comparative Physiology B*, 2006, 176(2): 87 – 92
- [7] Freyberger A, Ahr H J. Studies on the goitrogenic mechanism of action of N,N,N',N' – tetramethylthiourea [J]. *Toxicology*, 2006, 217(2 – 3): 169 – 175
- [8] Teraoka H, Dong W, Hiraga T. Zebrafish as a novel experimental model for developmental toxicology [J]. *Congenit Anom (Kyoto)*, 2003, 43(2): 123 – 132
- [9] Dong W, Teraoka H, Yamazaki K, et al. 2,3,7,8 – tetrachlorodibenzo – p – dioxin toxicity in the zebrafish embryo: Local circulation failure in the dorsal midbrain is associated with increased apoptosis [J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 69(1): 191 – 201
- [10] Darras V M, Houbrechts A M, Van Herck S L. Intracellular thyroid hormone metabolism as a local regulator of nuclear thyroid hormone receptor – mediated impact on vertebrate development [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1849(2): 130 – 141
- [11] Hernandez A, Martinez M E, Fiering S, et al. Type 3 deiodinase is critical for the maturation and function of the thyroid axis [J]. *Journal of Clinical Investigation*, 2006, 116(2): 476 – 484
- [12] Sharlin D S, Visser T J, Forrest D. Developmental and cell-specific expression of thyroid hormone transporters in the mouse cochlea [J]. *Endocrinology*, 2011, 152(12): 5053 – 5064
- [13] Flippin J L, Hedge J M, DeVito M J, et al. Predictive modeling of a mixture of thyroid hormone disrupting chemicals that affect production and clearance of thyroxine [J]. *International Journal of Toxicology*, 2009, 28(5): 368 – 381
- [14] Kackar R, Srivastava M K, Raizada R B. Studies on rat thyroid after oral administration of mancozeb: Morphological and biochemical evaluations [J]. *Journal of Applied Toxicology*, 1997, 17(6): 369 – 375
- [15] Marinovich M, Guizzetti M, Ghilardi F, et al. Thyroid peroxidase as toxicity target for dithiocarbamates [J]. *Archives of Toxicology*, 1997, 71(8): 508 – 512
- [16] Bhaskar R, Mohanty B. Pesticides in mixture disrupt metabolic regulation: In silico and in vivo analysis of cumulative toxicity of mancozeb and imidacloprid on body weight of mice [J]. *General and Comparative Endocrinology*, 2014, 205: 226 – 234 ◆