

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20160731001

任文娟, 汪贞, 王蕾, 等. 双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎及幼鱼的毒性效应[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(1): 184-192

Ren W J, Wang Z, Wang L, et al. Effects of bisphenol A and its analogues on zebrafish embryos and larvae [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(1): 184-192 (in Chinese)

双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎及幼鱼的毒性效应

任文娟^{1,2}, 汪贞¹, 王蕾¹, 杨先海¹, 刘济宁^{1,*}

1. 环境保护部南京环境科学研究所, 南京 210042

2. 南京工业大学 生物与制药工程学院, 南京 211816

收稿日期: 2016-07-31 录用日期: 2016-08-28

摘要: 为探讨双酚 A 及其类似物对鱼类早期生长发育的毒性效应, 研究了双酚 A 及其 7 种类似物对斑马鱼胚胎及仔鱼的毒性效应。通过对胚胎的孵化率、心率、仔鱼体长等指标进行测定分析, 结果显示: (1) 双酚 A 及其 7 种类似物都可使斑马鱼胚胎出现心包水肿、卵黄囊肿、脊柱弯曲和尾部弯曲等症状。 (2) 综合考虑斑马鱼 78 hpf 胚胎心率、120 hpf 胚胎孵化率及 7 dpf 仔鱼体长抑制率等指标, 8 种受试物中双酚 P(BPP) 的毒性最大, 其次是双酚 AP(BPAP)、双酚 AF(BPAF)、双酚 Z(BPZ), 然后是双酚 A(BPA)、双酚 B(BPB)、双酚 F(BPF)、双酚 S(BPS) 的毒性最小, 每种受试物的浓度与受精卵的孵化率、仔鱼心率呈明显负相关关系, 与体长抑制率呈明显正相关关系。8 种受试物毒性与辛醇-水分配系数($\log K_{ow}$) 呈正相关关系, $\log K_{ow}$ 越大毒性则越大。

关键词: 双酚 A; 双酚 A 类似物; 斑马鱼; 胚胎; 仔鱼; 毒性

文章编号: 1673-5897(2017)1-184-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of Bisphenol A and Its Analogues on Zebrafish Embryos and Larvae

Ren Wenjuan^{1,2}, Wang Zhen¹, Wang Lei¹, Yang Xianhai¹, Liu Jining^{1,*}

1. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Environmental Protection, Nanjing 210042, China

2. School of Biotechnology and Pharmaceutical Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China

Received 31 July 2016 accepted 28 August 2016

Abstract: We evaluated the toxic effect of bisphenol A (BPA) and its seven analogues on zebrafish embryos and larvae. Based on the results of the hatching rate (120 hpf), heart rate (78 hpf), body length of larvae (7 dpf), it is indicated that: (1) BPA and its analogues caused cardiac edema, cyst vitelline, spinal curvature and tail bending; (2) the order of the toxicity is bisphenol P (BPP) > bisphenol AP (BPAP) > bisphenol AF (BPAF) > bisphenol Z (BPZ) > bisphenol A (BPA) > bisphenol B (BPB) > bisphenol F (BPF) > bisphenol S (BPS). The concentrations of the test substances were negatively correlated with the embryo hatching rate and the heart rate of larvae, while positive correlation with inhibition rate of larval length. In addition, the toxicity of these eight kinds of BPA analogues and the values of octanol-water partition ($\log K_{ow}$) were positively correlated.

Keywords: bisphenol A; bisphenol A analogues; zebrafish; embryo; larvae; toxicity

基金项目: 江苏省自然科学基金资助项目(No. BK20151100)

作者简介: 任文娟(1989-), 女, 硕士, 研究方向为生态毒理学, E-mail: rwj123123@126.com

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: ljn@nies.org

双酚 A(bisphenol A, BPA)是全球生产量最大的化学原料之一,是生产高分子材料如聚碳酸酯、环氧树脂、增塑剂等的前体物质,广泛应用于杀菌剂、染料、医疗器械、食品包装材料和饮料容器、餐具、婴儿奶瓶及某些家庭用具等的生产,还可作为牙齿密封剂、牙科填充剂使用^[1]。当含有 BPA 的生活用品不完全聚合或暴露于高温、碱性等环境中时,BPA 就会释放或溶出^[2],通过环境暴露进入人体,危害人体健康。目前研究发现 BPA 不仅广泛存在于食物、水、车间空气等外环境中,在人类尿液、血液中也检出报道^[3],并且在胎盘组织、脐带血和羊水中均监测到 BPA^[4]。双酚 A 进入生物体内很难被降解,会对机体产生严重伤害,已有研究表明高剂量的双酚 A 会改变小鼠和大鼠的肝脏重量^[5-6],会降低大鼠的肝脏活力^[7],还有研究表明,BPA 具有内分泌干扰等毒性作用,对雄性生殖系统有一定的损害^[8],可能会引起性早熟^[9],长期暴露在低剂量的 BPA 中还可能引发癌症^[10]、糖尿病^[11]、肝功能紊乱^[12]等多种疾病。考虑到 BPA 潜在的低剂量效应以及动物实验的不确定性,部分国家已经限制 BPA 在工业上的应用,因此一些 BPA 类似物被越来越多地用于工业生产中。

双酚 A 类似物一般是指一类具有 2 个羟苯基结构的物质,根据羟苯基和碳桥上取代基不同又可分为不同的类似物,其中最常见 BPA 类似物有:双酚 AF(bisphenol AF, BPAF)、双酚 S(bisphenol S, BPS)、双酚 F(bisphenol F, BPF)、双酚 B(bisphenol B, BPB)、双酚 AP(bisphenol AP, BPAP)、双酚 P(bisphenol P, BPP)、双酚 Z(bisphenol Z, BPZ)等。一些 BPA 类似物似乎比 BPA 更加安全,如 BPS 在高温下比较稳定,并且对光照有一定的耐受性,因此其产量逐年增高^[13-15],但由于 BPA 类似物的分子结构与 BPA 类似,毒性大小可能也类似,甚至会大于 BPA 毒性,对生物体造成伤害^[16],BPAF 是已被证实的具有内分泌干扰性质的 BPA 类似物^[17-18]。Matsushima 等^[19]研究发现,BPAF 和 BPA 的结构相似,但其具有的 $-CF_3$ 基团的电负性和活性均较高,猜测 BPAF 具有更强的内分泌干扰效应。

现阶段,对双酚 A 类似物已经有一些生物体效应方面的研究。Zhou 等^[20]将斑马鱼胚胎分别暴露于 0.05、0.2、2、10 $mg \cdot L^{-1}$ 的 BPA 溶液中,结果显示,随着 BPA 浓度的升高,胚胎的孵化率明显降低,畸形率明显上升;Shi 等^[21]将斑马鱼胚胎暴露于 5、25、125 $\mu g \cdot L^{-1}$ 的 BPAF 溶液中至受精后 120 d,结果显

示,其子代斑马鱼的畸形率随浓度升高而增大,存活率随浓度升高而降低。虽然已经有了双酚 A 类似物对水生生物毒性效应的研究,但还没有对几种检出率较高的双酚 A 类似物做系统研究。

由于斑马鱼(*Danio rerio*)生长繁殖周期短,产卵量大,体外受精、胚胎透明、胚胎早期发育快,价格便宜,并且其相关基因与人类有较高的同源性^[22](有研究表明,斑马鱼相关基因与人类神经系统的同源基因具有高度保守性^[23]),因此斑马鱼是一种良好的发育毒性评价模型。因此本实验采用斑马鱼为模式生物,通过研究双酚 A 及其 7 种类似物(BPA、BPB、BPF、BPAP、BPAF、BPZ、BPP、BPS)对其胚胎及仔鱼的亚慢性毒性,揭示 8 种化学品对斑马鱼的毒性效应大小,并探讨毒性效应与化学品分子结构之间的关系,为双酚 A 类似物的生态风险评价及针对该类化学品的环境管理决策提供科学依据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

1.1.1 受试生物

斑马鱼胚胎购于尧舜禹生物科技有限公司。

1.1.2 试剂

BPA、BPB、BPF、BPAF、BPZ、BPAP、BPP、BPS 由百灵威科技有限公司(上海)提供,以丙酮(色谱纯,德国 Merck 公司)做溶剂配制成浓度为 $10^3 \sim 10^5 mg \cdot L^{-1}$ 的储备液(置于 4 $^{\circ}C$ 冰箱避光保存)。本实验所有梯度稀释操作时均用丙酮作溶剂,去离子水出自 Mini-Q 超纯水机(购自美国 Miliipore 公司)。

1.1.3 仪器设备

硬度计(16 900 型,美国哈希公司),多功能水质参数测定仪(HQ40d,美国哈希公司),溶解氧测定仪(HQ30d,美国哈希公司)、电子分析天平(AG135,美国 Mettler Toledo 公司)、生态培养箱(CLIMACELL 型,德国 MMM 公司)。

1.2 试验方法

斑马鱼胚胎的短期毒性试验方法参照 OECD 化学品测试导则:鱼类胚胎-卵黄囊吸收阶段的短期毒性实验进行^[24]。

1.2.1 受试物浓度设置

在正式实验之前先对 8 种物质进行较大范围浓度系列(0.1、1、10、100、1 000 $mg \cdot L^{-1}$)的预实验(以 p 计),不设平行组,各浓度的实验容器中加入 10 颗斑马鱼受精卵,观察记录 96 h 胚胎死亡数。根据预实验得出的结果,斑马鱼胚胎实验设置浓度梯度如表 1。



图1 斑马鱼胚胎的双酚A及其类似物染毒症状

注:图11, 24 h发育正常胚胎;图12,卵黄囊肿、心包水肿胚胎;图13,脊柱弯曲胚胎;图14, 24 h死亡胚胎;图21, 48 h发育正常仔鱼;图22,发育缓慢、心包水肿、卵黄囊肿胚胎;图23,发育缓慢胚胎;图24, 48 h死亡胚胎;图31, 96 h发育正常仔鱼;图32,发育缓慢、脊柱弯曲胚胎;图33, 96 h发育缓慢胚胎;图34, 96 h死亡胚胎;图41, 120 h发育正常仔鱼;图42,心包水肿、卵黄囊肿仔鱼;图43,尾部弯曲仔鱼;图44,脊柱弯曲仔鱼。ce:心包水肿;cv:卵黄囊肿;sc:脊柱弯曲;tb:尾部弯曲。

Fig. 1 Toxic effects of bisphenol A and its analogues on embryo and larvae of zebrafish

Note: Fig.11, 24 h normal embryonic development; Fig.12, cyst vitelline, cardiac edema embryo; Fig.13, 24 h spinal curvature embryo; Fig.14, 24 h dead embryo; Fig.21, 48 h normal zebrafish larvae development; Fig.22, development block, cardiac edema, cyst vitelline embryo; Fig.23, 48 h development block embryo; Fig.24, 48 h dead embryo; Fig.31, 96 h normal zebrafish larvae development; Fig.32, 96 h spinal curvature zebrafish larvae; Fig.33, 96 h development block embryo; Fig.34, 96 h dead embryo; Fig.41, 120 h normal zebrafish larvae development; Fig.42, cyst vitelline, cardiac edema zebrafish larvae; Fig.43, tail bending; Fig.44, 120 h spinal curvature zebrafish larvae. ce: cardiac edema; cv: cyst vitelline; sc: spinal curvature; tb: tail bending.

表1 双酚A及类似物的浓度设置

Table 1 Concentration of bisphenol A and its analogues

受试物 Chemical	暴露浓度/(mg·L ⁻¹) Exposure concentration/(mg·L ⁻¹)
BPA	1, 2, 4, 6, 8
BPB	1, 2, 4, 6, 8
BPF	1, 2, 4, 6, 8
BPZ	0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4
BPAF	0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4
BPAP	0.25, 0.5, 1, 2, 3, 4
BPP	0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8
BPS	150, 200, 250, 300, 350, 400

注: BPA, BPB, BPF, BPZ, BPAF, BPAP, BPP, BPS 表示双酚A、双酚B、双酚F、双酚Z、双酚AF、双酚AP、双酚P、双酚S。

Note: BPA, BPB, BPF, BPZ, BPAF, BPAP, BPP, BPS stand for bisphenol A, bisphenol B, bisphenol F, bisphenol Z, bisphenol AF, bisphenol AP, bisphenol P, bisphenol S.

1.2.2 实验水质参数测定

在实验期间即0~10 d,实验用水的硬度为180~190 mg·L⁻¹(以CaCO₃计);pH为7.0~7.2;溶解氧为7.68~7.98 mg·L⁻¹。

1.2.3 实验操作

将斑马鱼受精卵放入50 mL小烧杯中,每个烧杯20粒卵,每个浓度设置3个平行,将烧杯置于生态培

养箱中,设定光照强度50 lux、光照周期14 h:10 h(光照:黑暗)、温度为(26±0.5)℃。每天统计胚胎死亡数、孵化数,用显微镜观察胚胎或幼鱼的畸形情况、统计受精78 h后斑马鱼胚胎的心率,测量受精7 d后仔鱼的体长,实验过程中及时清除死亡胚胎及仔鱼。

1.3 统计学方法

EC₅₀及95%置信区间的计算采用美国环境保护局的改进的斯皮尔曼-卡伯分析软件(Trimmed Spearman-Kärber Method);根据单因素方差分析(ANOVA)法多重比较分析斑马鱼的胚胎心率及孵化率,结果用平均值±标准差来表示,暴露组与对照组间各观测指标的显著性差异P<0.05(记作*)、P<0.01(记作**)认为差异显著。

2 结果(Results)

2.1 斑马鱼胚胎的中毒现象

早期阶段的受精卵在高浓度组出现颜色上的变化,由透明变成白色半透明死卵。早期仔鱼中毒后出现畸形或死亡。8种受试物均都可导致斑马鱼胚胎及幼鱼出现不同程度的心包水肿、卵黄囊肿、脊柱弯曲和尾部弯曲等畸形现象(见图1)。

2.2 双酚A及其类似物对斑马鱼胚胎心率的影响

8种受试物对78 hpf(受精后78 h, 78 hours post

fertilizer)斑马鱼胚胎心跳的影响如图 2 所示,78 hpf 的胚胎心率与各受试物浓度均呈负相关关系,空白对照组中 78 hpf 斑马鱼胚胎心率为 152 次·min⁻¹,当 ρ(BPA、BPB、BPF)为 1 mg·L⁻¹,ρ(BPS)为 150 mg·L⁻¹,ρ(BPP)为 0.1、0.2 mg·L⁻¹,ρ(BPZ)为 0.25、0.5、1 mg·L⁻¹,ρ(BPAF)为 0.25 mg·L⁻¹,ρ(BPAP)为 0.25、0.5 mg·L⁻¹时,斑马鱼胚胎心率与空白对照组相比无显著差异($P>0.05$);ρ(BPA)为 2 mg·L⁻¹,ρ(BPS)为 200 mg·L⁻¹,ρ(BPP)为 0.4 mg·L⁻¹,ρ(BPAF)为 0.5、1 mg·L⁻¹时,暴露组胚胎心率与空白对照组相比显著减少($P<0.05$);ρ(BPA、BPB)为 4、6、8 mg·L⁻¹,ρ(BPF)为 6、8 mg·L⁻¹,ρ(BPS)为 250、300、350、400 mg·L⁻¹,ρ(BPP)为 0.6、0.8 mg·L⁻¹,ρ(BPAF)为 2、3、4 mg·L⁻¹,ρ(BPAP)为 1、2、3、4 mg·L⁻¹,ρ(BPZ)为 2、3、4 mg·L⁻¹时,暴露组胚胎心率与空白对照组相比显著减少($P<0.01$)。

暴露于 BPS 中的 78 hpf 斑马鱼胚胎的心率由 144 次·min⁻¹(150 mg·L⁻¹)下降至 64 次·min⁻¹(400 mg·L⁻¹),暴露于相同浓度梯度 BPAF、BPAP、BPZ 中斑马鱼胚胎的心率分别由 140、143、144 次·min⁻¹(0.25 mg·L⁻¹)下降至 29、28、30 次·min⁻¹(4 mg·L⁻¹),暴露于相同浓度梯度 BPF、BPA、BPB 中斑马鱼胚胎的心

率分别由 146、145、141 次·min⁻¹(1 mg·L⁻¹)下降至 74、72、32 次·min⁻¹(8 mg·L⁻¹)。

8 种受试物都会对斑马鱼胚胎心率造成影响,且随浓度的升高影响增大,其中 BPS 的效应值最大,其次是 BPF、BPA、BPB、BPZ、BPAF、BPAP、BPP。8 种受试物对 78 hpf 的胚胎心率影响的效应值及 95% 置信区间如表 2 所示。根据《化学品分类和标

表 2 双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎心率的半抑制浓度(EC₅₀)
Table 2 Median effect concentration (EC₅₀) of bisphenol A and its analogues on heart rate of zebrafish embryo

受试物 Chemical	EC ₅₀ /(mg·L ⁻¹)	95% 置信区间/(mg·L ⁻¹) 95% Confidence interval/(mg·L ⁻¹)
BPP	0.74	0.62~0.90
BPS	318	279~361
BPA	6.93	4.94~9.72
BPB	3.88	3.37~4.47
BPF	7.63	5.07~11.5
BPAF	1.43	1.21~1.69
BPAP	1.27	1.09~1.48
BPZ	1.99	1.77~2.24

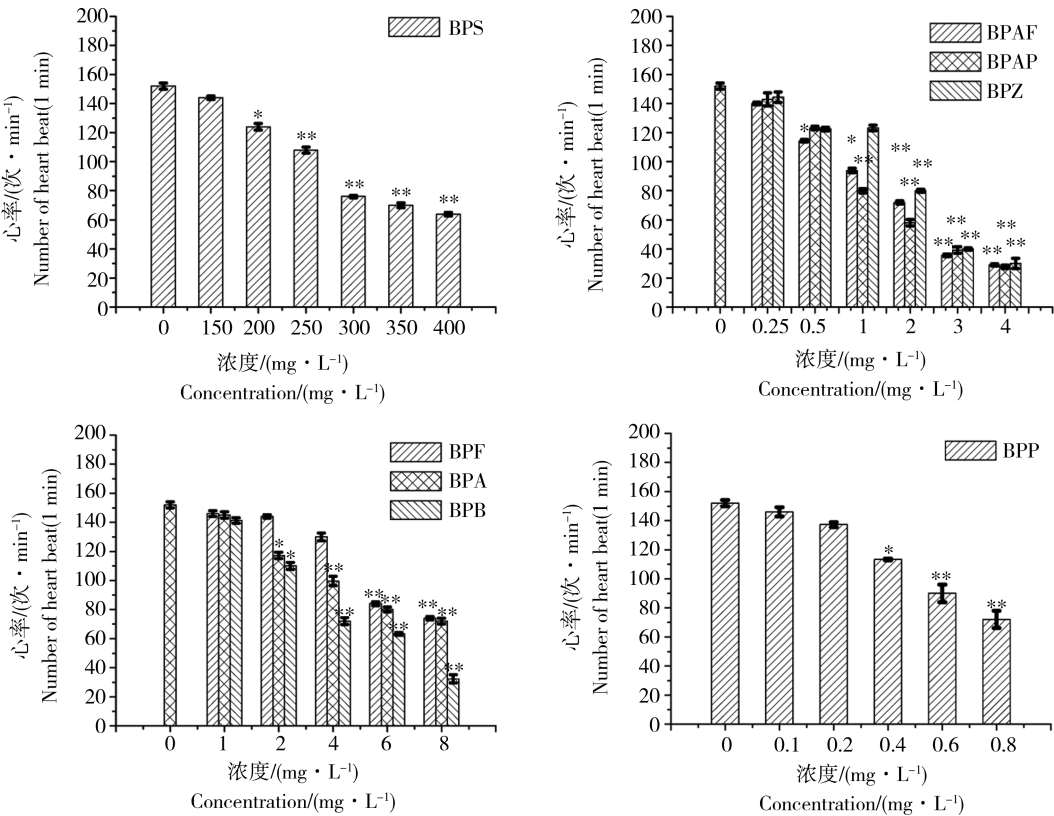


图 2 双酚 A 及其类似物对 78 hpf 的斑马鱼胚胎心率的影响
Fig. 2 Heart rate of 78 hpf zebrafish embryo after exposure to bisphenol A and its analogues

签规范-第28部分:对水生环境的危害》对受试物的急性水环境毒性的分级标准($78\text{ h-EC}_{50} \leq 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为I级, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} < 78\text{ h-EC}_{50} \leq 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为II级, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} < 78\text{ h-EC}_{50} \leq 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为III级)^[25], 结合图2和表2, 判定BPP为毒性I级, BPA、BPB、BPF、BPZ、BPAP、BPAF为毒性II级。

2.3 双酚A及其类似物对斑马鱼孵化率的影响

双酚A及其类似物对120 hpf(受精后120 h, 120 hours post fertilizer)的斑马鱼胚胎孵化率的影响如图3所示, 空白对照组孵化率达到93.3%, 当 ρ (BPB)为6、8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPA)为8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAP)为2、3、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAF)为3、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPZ)为4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时孵化率均为0; 当 ρ (BPA)、 ρ (BPF)为1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPP)为0.1、0.2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAF)为0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAP)为0.25、0.5 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPZ)为0.25、0.5、1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 120 hpf的斑马鱼胚胎孵化率与空白对照组相比无显著差异($P > 0.05$); 当 ρ (BPA)为2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPB)为1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPF)为2、4、6 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPP)为0.4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPS)为150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAF)

为0.5、1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAP)为1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 120 hpf斑马鱼胚胎孵化率与空白对照组相比显著降低($P < 0.05$); 当 ρ (BPA)为4、6、8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPB)为2、4、6、8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPF)为8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPP)为0.6、0.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPS)为200、250、300、350、400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$, ρ (BPAF)、 ρ (BPAP)、 ρ (BPZ)为2、3、4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 120 hpf斑马鱼胚胎孵化率与空白对照组相比显著降低($P < 0.01$)。

图3可以看出8种受试物对斑马鱼孵化率均有抑制作用, 且随着浓度上升, 孵化率随之降低, 暴露于相同浓度梯度BPA、BPB、BPF中的斑马鱼胚胎的孵化率分别由72.0%、65.0%、78.3% (1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)分别下降至0、0、40% (8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 可见3种受试物中BPF的毒性效应最弱; 暴露在BPP、BPS中的斑马鱼胚胎, 其孵化率分别由82.7% (0.1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、64.4% (150 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)分别下降至4.12% (0.8 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)、3.33% (400 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$), 暴露在相同浓度梯度BPAF、BPAP、BPZ中的斑马鱼胚胎的斑马鱼孵化率分别由88.3%、89.0%、90.0% (0.25 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)均下降至0 (4 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)。

表3为8种受试物对120 hpf斑马鱼胚胎孵化

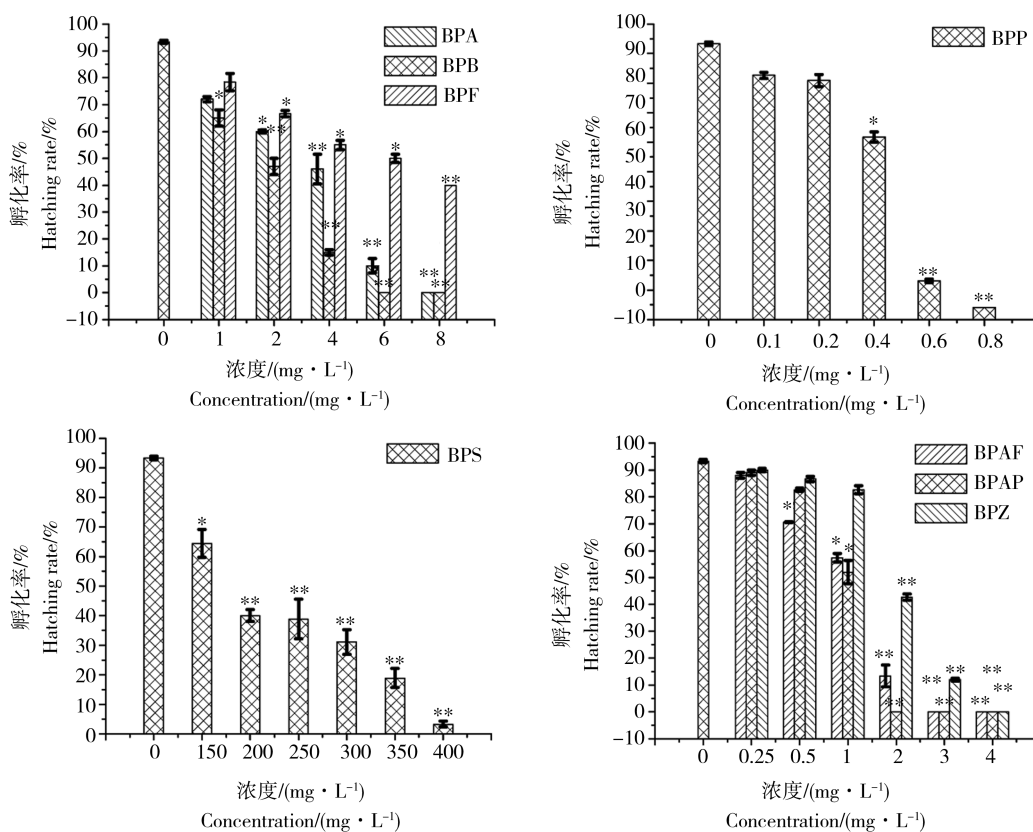


图3 双酚A及其类似物对120 hpf斑马鱼胚胎孵化率的影响

Fig. 3 Hatching rate of 120 hpf zebrafish embryo after exposure to bisphenol A and its analogues

率的半效应浓度(median effect concentration, EC_{50})及 95% 置信区间,BPS 的 EC_{50} 最大,其次分别为 BPF、BPA、BPB、BPZ、BPAF、BPAP、BPP,根据《化学品分类和标签规范-第 28 部分:对水生环境的危害》对受试物的急性水环境毒性的分级标准($120\text{ h-}EC_{50} \leq 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 I 级, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} < 120\text{ h-}EC_{50} \leq 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 II 级, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} < 120\text{ h-}EC_{50} \leq 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 III 级)^[25],结合图 3 和表 3,判定 BPP、BPAP、BPAF 为毒性 I 级,BPA、BPB、BPF、BPZ 为毒性 II 级。

表 3 双酚 A 及其类似物对斑马鱼胚胎孵化率的半效应浓度 (EC_{50})

Table 3 Median effect concentration (EC_{50}) of bisphenol A and its analogues on hatching rate of zebrafish embryo

受试物 Chemical	$EC_{50}/(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	95% 置信区间/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
		95% Confidence interval/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
BPA	3.02	2.56~3.57
BPB	1.86	1.56~2.23
BPF	6.55	4.88~8.77
BPP	0.42	0.38~0.46
BPS	200	182~220
BPAF	0.99	0.88~1.10
BPAP	0.98	0.90~1.08
BPZ	1.71	1.59~1.90

表 4 双酚 A 及其类似物对斑马鱼体长的无可观察和最低可观察效应浓度

Table 4 No observed and lowest observed effect concentration of bisphenol A and its analogues on body length of zebrafish larvae

受试物 Chemical	NOEC/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$	LOEC/ $(\text{mg}\cdot\text{L}^{-1})$
BPA	2	4
BPB	1	2
BPF	6	8
BPP	0.2	0.4
BPS	300	350
BPZ	0.5	1
BPAP	0.25	0.5
BPAF	0.5	1

2.4 双酚 A 及其类似物对斑马鱼体长的影响

双酚 A 及其类似物对斑马鱼体长影响的无可观察效应浓度(7 d-NOEC)和最低可观察效应浓度(7

d-LOEC)如表 4 所示,BPS 的无可观察效应浓度和最低可观察效应浓度最高,分别是 $300\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 、 $350\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$;BPP 的无可观察效应浓度和最低可观察效应浓度最低,分别是 $0.2\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.4\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 。根据《化学品分类和标签规范-第 28 部分:对水生环境的危害》对受试物的急性水环境毒性的分级标准(7 d NOEC/LOEC $\leq 1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 I 级, $1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} < 7\text{ d NO-EC/LOEC} \leq 10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 II 级, $10\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} < 7\text{ d NO-EC/LOEC} \leq 100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 为 III 级)^[25],根据表 4,判定 BPP、BPAP、BPAF、BPZ 为毒性 I 级,BPA、BPB、BPF 为毒性 II 级。

3 讨论 (Discussion)

现阶段,由于双酚 A 及其类似物具有潜在的低剂量效应,因此受到越来越多的关注,尤其是对婴幼儿等敏感人群神经发育的影响,本研究发现,在发育早期(2~120 hpf)暴露于双酚 A 及其类似物中,导致斑马鱼胚胎出现一系列畸形表型,多种畸形效应往往出现于各种化合物的较高浓度组,这与其他学者的研究结果基本一致。Siew 等^[26]研究了双酚 A 对早期生命阶段斑马鱼的毒性效应,结果显示较高浓度组(1.5 、 $4.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)的双酚 A 能够引起心包水肿、卵黄囊肿、尾部弯曲等症状;Song 等^[27-28]的研究表明 BPAF 会导致斑马鱼胚胎孵化率降低,还会引发胚胎、幼鱼期斑马鱼出现心包水肿、卵黄囊肿、出血等症状。

双酚 A 不仅具有神经毒性,还具有基因毒性^[26]、内分泌干扰效应等,现有的研究表明双酚 A 类似物和 BPA 具有类似的生物毒性,Kuruto-Niwa 等^[29]将斑马鱼暴露在浓度为 $0.5\sim 50\text{ }\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 BPS 溶液中 21 d,结果显示,雌性和雄性斑马鱼血浆中雌二醇的含量均显著升高,造成斑马鱼内分泌紊乱。有少量的研究也表明 BPS、BPB、BPF 具有和 BPA 类似的毒性,包括基因毒性、急性毒性、类雌激素活性^[30-33]。虽然已有研究表明双酚 A 类似物和 BPA 具有类似的生物毒性,但是对这几种检出率高的双酚 A 类似物的系统研究结果却很少。本实验采用模式生物斑马鱼的胚胎做受试生物,采用 8 种双酚类化合物进行了比较研究,系统测定了不同受试物下对斑马鱼 78 hpf 胚胎心率、120 hpf 胚胎孵化率以及 7 dpf 仔鱼体长的影响。

对于不同指标,其具体的毒性作用机制尚有待研究,但本研究发现,8 种受试物的毒性与辛醇-

水分配系数($\log K_{ow}$)具有一定相关性,图4是8种受试物的辛醇-水分配系数(K_{ow})与78 h心率的 EC_{50} 和120 h孵化率的 EC_{50} 的线性关系,可以看出拟合度较好。 $\log K_{ow}$ 反映化合物的脂溶性大小, $\log K_{ow}$ 越大的化合物,脂溶性越好,表明化合物从水相分配到生物相的能力越强,越易穿过细胞膜在生物体内富集,进而毒性效应增大^[34],8种受试物的 $\log K_{ow}$ 如表5所示(化合物 $\log K_{ow}$ 值由EPI Suit 4.1软件计算^[35]),可得到BPP的毒性最大,其次是BPZ、BPAP、BPAF、BPB、BPA、BPF、BPS的毒性最小,这与本研究结果基本一致。

由以上结果可知双酚A类似物的毒性并非都弱于BPA,而现如今这些双酚A类似物在水体中已被广泛检出,Eriko等^[36]对广东珠江流域的河水进行了检测,发现水样中BPA的浓度范围是 $<LOQ \sim 98 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,BPS的浓度范围是 $NA \sim 135 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,BPF的浓度范围是 $448 \sim 1110 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ 。Yang等^[37]对浙江杭

州湾嘉兴段河水进行检测,发现BPAF的浓度高达 $254.59 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$,并同时检测出了不同浓度的BPA、BPF、BPS。虽然检出浓度尚未达到效应值,但由于双酚A及其类似物的消耗量逐年增多,且较难降解,因此这类物质仍需受到关注。

表5 双酚A及其类似物的辛醇-水分配系数

Table 5 The octanol-water partition coefficient of bisphenol A and its analogues

受试物 Chemical	CAS	$\log K_{ow}$
BPS	000080-09-1	1.65
BPA	000080-05-7	3.32
BPP	002167-51-3	6.25
BPAP	001571-75-1	4.86
BPB	000077-40-7	4.13
BPF	000620-92-8	2.91
BPAF	001478-61-1	4.47
BPZ	000843-55-0	5.00

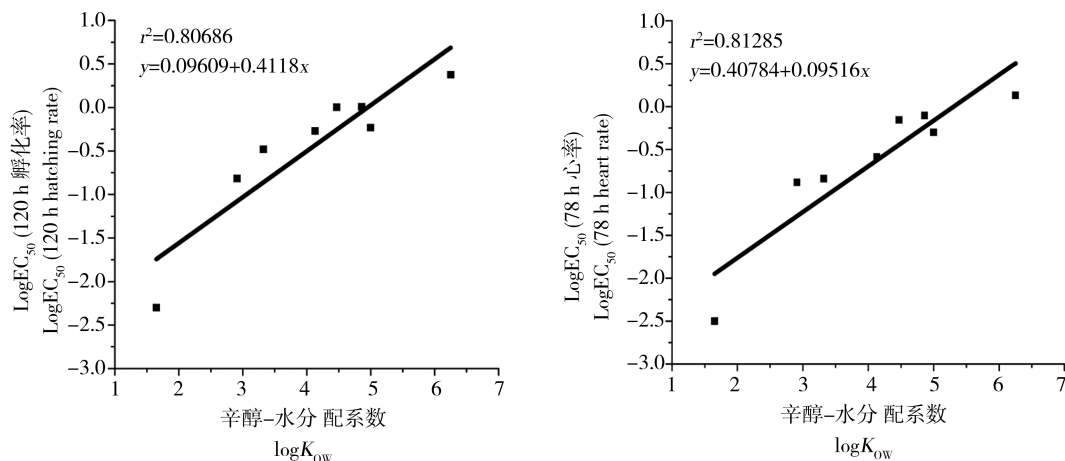


图4 双酚A及其类似物的辛醇-水分配系数($\log K_{ow}$)与其毒性的相关性

Fig. 4 Correlation of octanol-water partition ($\log K_{ow}$) with the toxicity of bisphenol A and its analogues

综上所述:1)结合BPA及其类似物对78 hpf斑马鱼胚胎心率、120 hpf孵化率以及7 d体长的影响,并根据GHS分类标准,得到BPP的毒性最大,其次是BPAP、BPAF、BPZ,然后是BPA、BPB、BPF、BPS的毒性最小。

2)8种双酚类化合物的毒性大小与辛醇-水分配系数($\log K_{ow}$)具有相关性, $\log K_{ow}$ 越大,化合物从水相分配到生物相的能力就越强,导致生物体暴露于化合物的概率就越大,因此对生物体的毒性越强。

通讯作者简介:刘济宁(1977-),男,博士,副研究员,主要从事

化学品风险评估研究工作。

参考文献(References):

- [1] Kuruto-Niwa R, Nozawa R, Miyakoshi T, et al. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19(1): 121-130
- [2] Nam S H, Seo Y M, Kim M G. Bisphenol A migration from polycarbonate baby bottle with repeated use [J]. Chemosphere, 2010, 79(9): 949-952
- [3] Vandenberg L N, Chahoud I, Heindel J J, et al. Urinary,

- circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(8): 1055-1070
- [4] Schönfelder G, Wittfoht W, Hopp H, et al. Parent bisphenol A accumulation in the human maternal-fetal-placental unit [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2002, 110(11): 703-707
- [5] Tyl R W, Myers C B, Marr M C, et al. Three-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 68(1): 121-146
- [6] Tyl R W, Myers C M, Sloan C, et al. Two-generation reproductive toxicity study of dietary bisphenol A in CD-1 (Swiss) mice [J]. *Toxicological Sciences*, 2008, 104(2): 362-384
- [7] Nakagawa Y, Tayama S. Metabolism and cytotoxicity of bisphenol A and other bisphenols in isolated rat hepatocytes [J]. *Archives of Toxicology*, 2000, 74(2): 99-105
- [8] Li D K, Zhou Z J, Miao M, et al. Urine bisphenol-A (BPA) level in relation to semen quality [J]. *Fertility and Sterility*, 2011, 95(2): 625-630
- [9] 乔丽丽, 郑力行, 蔡德培. 性早熟女童血清中双酚A、辛基酚、4-壬基酚测定和分析[J]. *卫生研究*, 2010, 39(1): 9-12
- Qiao L L, Zheng L X, Cai D P. Study on the levels of the bisphenol A, octylphenol, 4-nonylphenol in serum of precocious girls [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2010, 39(1): 9-12 (in Chinese)
- [10] Mihi Y, Jae-Ha R, Raok J, et al. Effects of bisphenol A on breast cancer and its risk factors [J]. *Archives of Toxicology*, 2009, 83: 281-285
- [11] Grün F, Blumberg B. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis [J]. *Reviews in Endocrine & Metabolic Disorders*, 2007, 8(2): 161-171
- [12] Marmugi A, Ducheix S, Lasserre F, et al. Low doses of bisphenol A induce gene expression related to lipid synthesis and trigger triglyceride accumulation in adult mouse liver [J]. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 2012, 55: 395-407
- [13] Liao C, Liu F, Kannan K. Bisphenol S, a new bisphenol analogue, in paper products and currency bills and its association with bisphenol A residues [J]. *Environmental Science & Technology*, 2012, 46: 6515-6522
- [14] Kitamura S, Suzuki S, Kohta R, et al. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds [J]. *Toxicological Sciences*, 2005, 84(2): 249-259
- [15] Liao C, Kannan K. Concentrations and profiles of bisphenol A and other bisphenol analogues in foodstuffs from the United States and their implications for human exposure [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2013, 61: 4655-4662
- [16] Rochester J R, Bolden A L. Bisphenol S and F: A systematic review and comparison of the hormonal activity of bisphenol A substitutes [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2015, 123(7): 643-650
- [17] Liu H L, Liu X H, Wang X Y, et al. Toxicity of BPA and TBBPA to *Daphnia magna* and zebrafish *Brachydanio rerio* [J]. *Environmental Science*, 2007, 28(8): 1784-1787
- [18] Duan Z H, Zhu L, Wang P, et al. Toxicities of bisphenol A on different developed stages of zebrafish (*Danio rerio*) and their mechanisms [J]. *Environmental Chemistry*, 2007, 26(4): 491-494
- [19] Matsushima A, Liu X H, Okada H, et al. Bisphenol AF is a full agonist for the estrogen receptor ER α but a highly specific antagonist for ER β [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(9): 1267-1272
- [20] Zhou J, Zhu X S, Cai Z H. The impacts of bisphenol A (BPA) on abalone (*Haliotis diversicolor supertexta*) embryonic development [J]. *Chemosphere*, 2011, 82: 443-450
- [21] Shi J C, Jiao Z H, Zheng S, et al. Long-term effects of bisphenol AF (BPAF) on hormonal balance and genes of hypothalamus-pituitary-gonad axis and liver of zebrafish (*Danio rerio*), and the impact on offspring [J]. *Chemosphere*, 2015, 128: 252-257
- [22] Guo S. Linking genes to brain, behavior and neurological diseases: What can we learn from zebrafish [J]. *Genes Brain and Behavior*, 2004, 3(2): 63-74
- [23] Lein P, Locke P, Goldberg A. Meeting report: Alternatives for developmental neurotoxicity testing [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2007, 115(5): 764-768
- [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. GB 21807—2008 化学品 鱼类胚胎和卵黄囊仔鱼阶段的短期毒性实验[S]. 北京: 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, 2008
- [25] 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. GB 30000—2013 化学品分类和标签规范-第28部分: 对水生环境的危害[S]. 北京: 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, 2013
- [26] Lam S H, Hlaing M M, Zhang X, et al. Toxicogenomic and phenotypic analyses of bisphenol -A early-life exposure toxicity in zebrafish [J]. *Plos One*, 2011, 6(12): e28273

- [27] 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
- [28] 杨晓溪. 双酚 AF 和全氟化合物对斑马鱼的毒性效应研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2014: 28-32
Yang X X. Toxicity of bisphenol AF and perfluorinated chemicals on zebrafish[D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2014: 28-32 (in Chinese)
- [29] Kuruto-Niwa R, Nozawa R, Miyakoshi T, et al. Estrogenic activity of alkylphenols, bisphenol S, and their chlorinated derivatives using a GFP expression system [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2005, 19: 121-130
- [30] Gallart-Ayala H, Moyano E, Galceran M T. Analysis of bisphenols in soft drinks by on-line solid phase extraction fast liquid chromatography-tandem mass spectrometry [J]. Analytica Chimica Acta, 2011, 683(2): 227-233
- [31] Viñas P, Campillo N, Martínez-Castillo N, et al. Comparison of two derivatization-based methods for solid-phase microextraction-gas chromatography-mass spectrometric determination of bisphenol A, bisphenol S and bisphenol migrated from food cans [J]. Analytical and Bioanalytical Chemistry, 2010, 397(1): 115-125
- [32] Pisapia L, Del Pozzo G, Barba P, et al. Effects of some endocrine disruptors on cell cycle progression and murine dendritic cell differentiation [J]. General and Comparative Endocrinology, 2012, 178(1): 54-63
- [33] Okuda K, Fukuuchi T, Takiguchi M, et al. Novel pathway of metabolic activation of bisphenol A-related compounds for estrogenic activity [J]. Drug Metabolism and Disposition, 2011, 39(9): 1696-1703
- [34] 顾云兰, 张淦杰. 酚类化合物对梨形四膜虫毒性的构效关系解析[J]. 化学研究与应用, 2016, 28(6): 810-817
Gu Y L, Zhang G J. Studies on QSAR for the toxicity of phenols against tetrahymena pyriformis [J]. Chemical Research and Application, 2016, 28(6): 810-817 (in Chinese)
- [35] United States Environmental Protection Agency. Estimation Programs Interface Suite™ for Microsoft® Windows, v 4.10 [CP]. Washington D C: United States Environmental Protection Agency, 2012
- [36] Eriko Y, Nobuyoshi Y, Sachi T, et al. Bisphenol A and other bisphenol analogues including BPS and BPF in surface water samples from Japan, China, Korea and India [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2015, 122: 565-572
- [37] Yang Y, Lu L, Zhang J, et al. Simultaneous determination of seven bisphenols in environmental water and solid samples by liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. The Journal of Chromatography A, 2014, 1328: 26-34 ◆