

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20200917003

程莹, 李思思, 刘晓晖, 等. 十溴联苯醚(BDE 209)暴露对孕期大鼠和胎鼠甲状腺激素干扰效应研究[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(4): 207-215

Cheng Y, Li S S, Liu X H, et al. *In utero* exposure to decabromodiphenyl ether (BDE 209) induced thyroid hormone disturbance in maternal and fetal rats [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(4): 207-215 (in Chinese)

## 十溴联苯醚(BDE 209)暴露对孕期大鼠和胎鼠甲状腺激素干扰效应研究

程莹<sup>1,3</sup>, 李思思<sup>1</sup>, 刘晓晖<sup>1</sup>, 李亚晨<sup>1</sup>, 邵静<sup>1</sup>, 胡宏<sup>2,\*</sup>

1. 大连医科大学公共卫生学院, 劳动卫生与环境卫生教研室, 大连 116044

2. 大连医科大学附属第二医院检验科, 大连 116027

3. 大连医科大学中山学院, 大连 116085

收稿日期: 2020-09-17

录用日期: 2020-12-22

**摘要:** 为探讨孕期十溴联苯醚(BDE 209)暴露对孕期羊水和胎鼠循环甲状腺激素(TH)的影响及其对胎脑发育的损害作用, 将24只Wistar雌性大鼠随机分为对照组、BDE 209低剂量组(100 mg·kg<sup>-1</sup> bw)和高剂量组(300 mg·kg<sup>-1</sup> bw), 与雄鼠合笼, 经阴道涂片确认受孕后, 在孕1 d给予BDE 209经口持续灌胃染毒至孕15 d(GD15)和孕20 d(GD20)。在GD15和GD20这2个时间点麻醉母鼠后剥离胎鼠称取体质量; 应用酶联免疫吸附剂测定(ELISA)检测GD15、GD20羊水及GD20胎鼠循环TH水平, 包括总三碘甲状腺原氨酸(TT3)、血清游离三碘甲状腺原氨酸(FT3)、血清总甲状腺素(TT4)、游离甲状腺素(FT4)和促甲状腺激素(TSH)水平; 应用实时荧光定量PCR(RT-qPCR)法检测胎脑促甲状腺激素释放激素(thyrotropin-releasing hormone, Trh)基因相对表达; 应用苏木精-伊红染色(HE染色)观察GD20胎鼠形态学改变。结果表明: (1)高剂量BDE 209可引起胎鼠体质量异常改变。(2)BDE 209可引起孕期羊水和孕后期胎鼠循环TH水平紊乱, 表现为GD15时, BDE 209可引起羊水FT3下降、TT4和TSH增高, 但未见统计学意义; 低、高剂量BDE 209均可引起羊水FT4水平升高( $P<0.05$ 或 $P<0.01$ ), 且具有剂量依赖性。GD20时, 与GD15相比, 对照组羊水TH水平有所变化, FT3和TT4水平均明显增高, 而TSH水平有所降低; 低、高剂量BDE 209引起FT3显著降低( $P<0.05$ ), FT4在高剂量组升高( $P<0.05$ ); 低、高剂量BDE 209引起TSH水平显著升高( $P<0.05$ )。GD20时, 胎鼠血清TH变化与同时期羊水水中的基本一致, BDE 209可致胎鼠血清FT3和TT4下降, 虽然没有显著性差异, 胎鼠血清TSH水平增高, 尤其在高剂量组( $P<0.05$ )。(3)BDE 209可导致孕育中胎鼠Trh基因表达下调( $P<0.05$ ), 并随着孕期进程而加重。(4)病理学观察发现BDE 209可引起孕末期胎鼠脑细胞结构发生变化, 使细胞数量减少, 脑组织出现萎缩。综上, 孕期BDE 209暴露可影响胚胎大鼠生长发育; 引起羊水TH水平紊乱、胚胎大鼠循环TH水平紊乱以及胚胎脑组织Trh基因表达抑制, 导致脑组织结构产生病理改变。这些可能是BDE 209致子代发育神经毒性的病理基础。

**关键词:** 十溴联苯醚; 胎鼠; 发育神经毒性; 甲状腺激素(TH)干扰

文章编号: 1673-5897(2021)4-215-09

中图分类号: X171.5

文献标识码: A

## *In utero* Exposure to Decabromodiphenyl Ether (BDE 209) Induced Thyroid Hormone Disturbance in Maternal and Fetal Rats

Cheng Ying<sup>1,3</sup>, Li Sisi<sup>1</sup>, Liu Xiaohui<sup>1</sup>, Li Yachen<sup>1</sup>, Shao Jing<sup>1</sup>, Hu Hong<sup>2,\*</sup>

1. Department of Environmental Health and Toxicology, School of Public Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, China

2. Department of Clinical Laboratory, The Second Affiliated Hospital of Dalian Medical University, Dalian 116027, China

3. Zhongshan College of Dalian Medical University, Dalian 116085, China

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81773389)

第一作者: 程莹(1994—), 女, 硕士, 研究方向为环境污染与出生缺陷, E-mail: chengying2017@qq.com

\* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: 452522789@qq.com

Received 17 September 2020      accepted 22 December 2020

**Abstract:** To investigate the effects of exposure to decabromodiphenyl ether (BDE 209) during pregnancy on thyroid hormone (TH) disturbance in fetal rats and its role in developmental neurotoxicity, 24 Wistar female rats were randomly divided into control (peanut oil only) and two experimental groups (BDE 209 resolved in peanut oil at 100 mg·kg<sup>-1</sup> bw or 300 mg·kg<sup>-1</sup> bw). The female rats were placed with the male rats periodically. After pregnancy was confirmed by vaginal smear, all pregnant rats were either fed through oral gavage with BDE 209 or peanut oil at the first day of gestation until the 15th day of gestation (GD15) and the 20th day of gestation (GD20). At each time point, the fetal rats were removed from the maternal uterus and the body mass were recorded; the amniotic fluid and the peripheral blood of the fetal rats were collected for TH hormone evaluation by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA); the fetal brain tissues were collected and the expression of thyrotropin-releasing hormone (*Trh*) gene was detected by real time-quantitative PCR (RT-qPCR); the pathological changes of fetal brain tissues were also evaluated by hematoxylin and eosin (HE) staining. Results show that: (1) High dose BDE 209 exposure could affect the growth of the fetal rats. (2) BDE 209 could cause TH disorder in amniotic fluid during pregnancy and in the circulation of the fetal rats as described below. On GD15, BDE 209 decreased the level of free triiodothyamine in serum (FT3), increased the level of total serum thyroxine (TT4) and thyroid stimulating hormone (TSH) in amniotic fluid, although no statistical significance was found; both low and high doses of BDE 209 could increase the level of FT4 in amniotic fluid ( $P<0.05$  or  $P<0.01$ ) with a dose-response dependence. On GD20, compared with GD15, the basal TH level of amniotic fluid was changed, that is, FT3 and TT4 levels were significantly increased, while TSH level was decreased; low and high dose BDE 209 significantly decreased the level of FT3 ( $P<0.05$ ), the level of free thyroxine (FT4) index increased in the high dose group ( $P<0.05$ ); the level of TSH significantly increased at low and high dose group of BDE 209 ( $P<0.05$ ). On GD20, the change of serum TH in fetal rats was basically consistent with that in amniotic fluid at the same period, that is, BDE 209 could cause the level of serum FT3 and TT4 decreased in fetal rats, although no significant difference was detected; the serum TSH level of fetal rats increased, especially in the high dose group ( $P<0.05$ ). (3) BDE 209 resulted in the down-regulation of *Trh* gene expression in gestational fetal brain ( $P<0.05$ ). (4) Pathological examinations showed that the neural injuries by BDE 209 in the fetal rats at the end of pregnancy may result in decreased cell numbers and atrophy of brain tissue. BDE 209 exposure during pregnancy can affect the growth and development of fetal rats, lead to TH disorder in amniotic fluid, TH disorder in circulation of fetal rats, and abnormal gene expression of fetal brain *Trh*, and result in brain tissue morphological deformity. These alterations may underlie the BDE 209-mediated developmental neurotoxicity in offspring.

**Keywords:** BDE 209; fetal rats; developmental neurotoxicity; thyroid hormone (TH) disturbance

阻燃剂是一类能够阻止聚合物材料引燃或抑制火焰传播的助剂,其种类繁多,但以溴系有机阻燃剂、尤其以多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)最具代表性。PBDEs 与其产品以非共价方式结合,在使用及处理回收时,可通过挥发、燃烧或与空气污染物形成复合颗粒物等方式存在于环境中,并随环境介质远距离迁移,导致全球性环境污染<sup>[1]</sup>。目前育龄妇女的脂肪、血液、胎盘,哺乳期乳汁,以及胚胎肝脏和新生儿脐血中均已检出 PBDEs 多种同系物的存在;特别是胎盘 PBDEs 负荷远

高于胚胎肝脏,且逐年增高,成为仅次于母血的 PBDEs 积攒地<sup>[2-5]</sup>。这提示 PBDEs 对胚胎发育可能产生潜在危害,日后发展为婴幼儿、儿童甚至是成人疾病的基础。

动物研究显示,PBDEs 具有发育神经毒性<sup>[6]</sup>,尽管目前人群流行病学调查证据有限,但仍显示出孕期 PBDEs 暴露与出生儿童的神经发育动作和智力障碍具有相关性<sup>[7-10]</sup>。当前,针对 PBDEs 发育神经毒性研究已得到相当规模的开展,结果也颇为一致,然而其毒作用机制仍需进一步探讨。孕期 PBDEs

暴露对子代也具有甲状腺激素(thyroid hormone, TH)干扰效应,结局表现为类似临床或亚临床甲状腺功能减退(甲减)<sup>[11]</sup>。而妊娠早期,即胎脑发生、发育的关键期,甲减会导致子代出现不可逆的脑损伤,表现为智力缺陷、活跃、认知障碍和适应能力下降等<sup>[12-13]</sup>,这与孕期PBDEs暴露导致的子代神经发育毒性效应颇为相似。因此,有观点认为PBDEs发育神经毒性可能由TH干扰(甲减)所致,无疑为PBDEs发育神经毒性机制研究提出一个重要探索方向。

十溴联苯醚(BDE 209)是PBDEs家族中含溴原子数量最多的同系物,由于其阻燃效率高、添加量较少及急性毒性相对低等特点而应用最广<sup>[14]</sup>。我国BDE209污染情况较为严重<sup>[15]</sup>。且2015年的一项研究显示,BDE 209是我国松花江流域地表沉积物中PBDEs的主要同系物,占PBDEs总量的80%以上<sup>[16]</sup>,提示其存在潜在危害。针对BDE 209孕期暴露对子代TH的干扰研究目前尚不深入,还需进一步研究。

目前对于PBDEs诱导的TH干扰效应已经在多种生物体系(细胞、动物甚至人)中得到证实<sup>[17-19]</sup>。然而,迄今多数研究是通过出生时或出生后子代血循环TH水平的检测进行推论,我们尚未发现PBDEs对孕早期胚胎TH干扰表型的直接研究。而孕早期胚胎在TH来源和调节机制上具有特殊性,出生后结果并不能反映孕早期TH真实状态。而BDE 209对于出生后子代发育神经损伤效应,本课题组前期研究已发现三代小鼠BDE 209染毒能够影响子代发育,降低子代空间学习记忆能力和空间位置记忆能力;本课题组也曾评价孕中期女性羊水PBDEs水平及其与TH干扰的潜在关系,但尚未建立完整出生队列以确定对出生子代的发育损伤<sup>[20]</sup>。因此,本研究以大鼠为研究对象,建立大鼠孕期BDE 209暴露模型,着重观察BDE 209对孕早期大鼠胚胎和胎脑TH干扰表型,并检测胎脑组织形态学改变,为深入研究BDE 209的TH干扰效应提供基础依据,并为进一步探索孕期BDE 209暴露诱导的TH干扰效应与其发育神经毒性的内在联系提供研究基础。

## 1 材料与方法(Materials and methods)

### 1.1 仪器与试剂

仪器:T100TM Thermal Cycler 梯度PCR仪(Bio-RAD,美国);TP800 实时PCR仪(TaKaRa,日

本);3550 酶标仪(Thermo,美国)。

试剂:BDE 209(纯度>99%,上海阿拉丁试剂公司,中国);Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR(湖南艾科瑞生物工程有限公司,中国);RNAiso Plus、SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞生物技术有限公司,中国);大鼠三碘甲状腺原氨酸(TT3)、总甲状腺激素(TT4)、游离甲状腺素(FT3)、游离甲状腺素(FT4)和促甲状腺素(TSH)免疫试剂盒(上海朗顿生物科技有限公司,中国);其他试剂均为分析纯,购于中国天津科密欧化学试剂有限公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 BDE 209 孕期染毒大鼠模型建立及生物材料采集

(1)动物模型建立:实验动物均在大连医科大学重大疾病基因工程模式动物研究所维护及喂养。10周龄Wistar雌性大鼠24只,称取体质量后排序,按照随机数字表法随机分为3组(对照组、低剂量和高剂量组,每组8只),不同剂量组间母鼠体质量差异无显著性( $P>0.05$ )。选择阶段合笼法与10周龄Wistar雄鼠按照雌:雄=2:1合笼交配,次日清晨检查阴道涂片,发现精子则记为妊娠第0天(GD0)。避光称取一定量BDE 209粉末溶于花生油中,涡旋摇匀。根据孕鼠体质量,按分组剂量染毒如下:对照组(花生油)、低剂量组( $100\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ bw}$ )、高剂量组( $300\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\text{ bw}$ )<sup>[15]</sup>。染毒采用每天避光灌胃一次,最长至GD20(仔鼠出生前一天)。所有动物均自由进食、饮水;室内温度 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $40\%\sim 70\%$ 、光照按亮/暗12 h循环。

(2)生物样品采集:在GD15和GD20这2个时间点,4%水合氯醛麻醉母鼠,剖开子宫,小心吸取羊水(作为一个独立样本)至无菌管并放入液氮中速冻,标记后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于羊水TH水平测定;记录每窝胚胎大鼠体质量;GD20胎鼠每窝断头后取血(作为一个独立样本),室温静置10 min后, $2\ 500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心20 min,吸取上层血清,标记后转入 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存,用于GD20胎鼠血清中TH水平测定;采集GD15和GD20胎脑组织,用于检测胎脑下丘脑-垂体-甲状腺素轴(hypothalamic-pituitary-thyroxine axis, HPT轴)功能变化;采集GD20胎脑,浸泡于4%多聚甲醛溶液中24 h,隔日换液,用作孕后期胎脑形态学检测。

#### 1.2.2 RT-qPCR

本研究通过检测不同胚胎发育时期胚胎大鼠脑

组织促甲状腺激素释放激素 (thyrotropin-releasing hormone, Trh) 的表达, 观察孕期 BDE 209 暴露对胎脑 HPT 轴功能的影响, 初步分析其在胎鼠循环和干扰胎脑组织 TH 中的作用。

(1) 总 RNA 提取及质量控制: 取出适量  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冻存组织, 用  $500\sim 1\,000\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$  Trizol 将称量质量后的组织置于  $4\text{ mL}$  无菌管中, 高速研磨  $20\text{ s}$ 。冰上静置  $10\text{ min}$  后转移至  $1.5\text{ mL}$  离心管中,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $5\text{ min}$ 。吸取上清至新的  $1.5\text{ mL}$  离心管中置于冰上。按照 RNAiso Plus 试剂盒(南京诺维赞公司, 中国)说明书, 提取总 RNA, 通过紫外吸收值 A260/280 进行质量控制。A260/280 比值在  $1.8\sim 2.0$  之间时, 可进行后续实验。

(2) RNA 反转录: 按照 Evo M-MLV RT Kit with gDNA Clean for qPCR 试剂盒说明书常规操作, 将总 RNA 反转录为 cDNA, 反转录条件为  $37\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ min}$ ,  $85\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\text{ s}$ ,  $4\text{ }^{\circ}\text{C}\ \infty$ 。

(3) 引物设计和合成: 大鼠来源 *GAPDH* 和 *Trh* 引物系委托大连万泽贸易有限公司设计合成。名称和序列详见表 1。

(4) PCR 反应: 根据 SYBR qPCR Master Mix 试剂盒配制  $20\text{ }\mu\text{L}$  体系上机反应。反应条件为预变性  $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$ ,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 5\text{ s}$ ,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$ , 共 40 个循环,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$ ,  $60\text{ }^{\circ}\text{C}\ 30\text{ s}$ ,  $95\text{ }^{\circ}\text{C}\ 15\text{ s}$ 。

(5) 结果分析: 应用 TP800 v4.01 软件, 以 *GAPDH* 表达量对 mRNA 表达进行标准化。实验重复 3 次以上。

### 1.2.3 ELISA

从  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出组织样品,  $2\,500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心  $20\text{ min}$ , 上清转移至新  $1.5\text{ mL}$  离心管中, 组别中上样量不足时吸取各组最低量后加入同等量三蒸水补齐。由  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  冰箱中取出试剂盒, 置于室温平衡  $30\text{ min}$  以上。按照试剂盒说明书操作。在  $450\text{ nm}$

波长处测定各孔的 OD 值。根据标准品浓度及各孔 OD 值绘制标准曲线, 将各样品孔 OD 值带入公式, 计算样品浓度。实验重复 3 次。

### 1.2.4 HE 染色

将固定好的 GD20 胎鼠脑组织取出后放入包埋盒中, 按照分组情况以序号标记。从低浓度酒精 (40%) 开始向高浓度酒精依次脱水, 再将其依次置于二甲苯 I、二甲苯 II 中透明。将已透明的组织块用镊子小心夹取, 大脑皮层朝上置于已溶化好的石蜡中, 放入冷却箱中冷却。待石蜡完全凝固取下组织蜡块, 固定在切片机载物台上, 切片的厚度为  $3\text{ }\mu\text{m}$ 。将切好的蜡片置于  $50\text{ }^{\circ}\text{C}$  温水中, 待蜡片平展后, 用防脱载玻片捞出,  $70\text{ }^{\circ}\text{C}$  烤箱烤片, 干燥后可置于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  恒温箱备用。染色时经二甲苯逐级脱蜡过酒精后清洗, 经苏木素、伊红染色, 逐级酒精脱水, 用中性树胶封片, 干燥后盖片, 在光学显微镜下观察。

### 1.3 统计分析

本实验所有数据均来源于至少 3 次独立实验, 所有结果以“均值 $\pm$ 标准差”表示, 统计分析软件为 SPSS 13.0, 统计分析方法采用方差分析 (ANOVA) 检验。按检验水准  $\alpha=0.05$ ,  $P<0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 孕期 BDE 209 暴露对胚胎大鼠生长发育状况的影响

大鼠 2 月龄时性成熟, 妊娠期 (GD) 通常为  $19\sim 22\text{ d}$ 。GD15 为胎鼠甲状腺功能完全建立之前, GD20 时胎鼠甲状腺功能基本达到高峰<sup>[21-22]</sup>。因此, 本实验选取 GD15 和 GD20 这 2 个时间点进行相关生物样品采集和检测。由表 2 可知, GD15 低剂量组胎鼠体质量与对照组差异不明显, 高剂量组胎鼠体质量与对照组相比明显升高 ( $P<0.01$ ); GD20 低剂量组胎鼠体质量相比对照组亦有下降趋势, 但无统计学意义 ( $P>0.05$ ), 高剂量组体质量则显著低于对照组 ( $P<0.01$ )。

### 2.2 孕期 BDE 209 暴露对羊水和胎鼠血清 TH 水平的影响

在 GD15 和 GD20 采集孕鼠子宫羊水, 并在 GD20 剥离胎鼠, 断头取血。GD15 仔鼠胚胎由于个体较小, 无法采集其血液, 故仅收集 GD20 胎鼠外周血液。对羊水和外周血 TH 的评价指标包括 TT3、FT3、TT4、FT4 和 TSH。

表 1 大鼠 mRNA 表达引物序列

Table 1 Primer sequences for mRNA expression in fetal rats

| 基因<br>Gene name | 引物序列 (5' ~ 3')<br>Primer sequence (5' ~ 3') |
|-----------------|---------------------------------------------|
| <i>GAPDH</i>    | F-ATGCCGCCTGGAGAAACC                        |
|                 | R-GCATCAAAGGTGGAAGAATGG                     |
| <i>Trh</i>      | F-GGCAGATGAGGAGGACAGTGA                     |
|                 | R-TGCCTCTTGGTGACATCAGACT                    |

2.2.1 孕期 BDE 209 暴露对 GD15 羊水 TH 的影响

如表 3 所示, GD15 羊水中 TT3 含量有升高趋势, 尤其低剂量组, 但未见显著性差异; 而 FT3 含量在低、高剂量组均有下降趋势, 但与对照组无显著性差异。TT4 和 FT4 含量在低、高剂量组均有升高趋势, 尤其 FT4 差异具有统计学意义( $P<0.05$  或  $P<0.01$ )。TSH 在高剂量组水平上升, 与对照组之间未见统计学差异。

2.2.2 孕期 BDE 209 暴露对 GD20 羊水和胚胎大鼠外周血 TH 的影响

GD20 羊水 TH 水平由表 4 所示, BDE 209 低剂量组 TT3 水平有增高趋势, 但未见显著差异; FT3 水平在 BDE 209 低、高剂量组均出现降低, 且具有

统计学意义( $P<0.05$ )。TT4 水平则与 GD15 时相反, 与对照组相比略有下降趋势, 但无统计学意义; FT4 水平与 GD15 的表现一致, 有上升趋势, 在高剂量组有明显差异( $P<0.05$ ); 而 TSH 水平明显增高, 在低剂量组和高剂量组均有统计学意义( $P<0.05$ )。

GD20 胚胎大鼠外周血 TH 水平如表 5 所示, TT3 水平在低剂量组虽然有所降低, 但与对照组相比无显著差异; FT3 水平与同时期羊水巾的变化趋势一致(表 4), 具有下降趋势, 尤其在低剂量时, 但未见统计学意义。TT4 和 FT4 具有下降趋势, 但未见统计学意义。TSH 水平逐渐升高, 高剂量组具有统计学意义( $P<0.05$ ), 这与同时期羊水巾的情况类似。

表 2 大鼠孕期 BDE 209 暴露对胚胎大鼠体质量的影响

Table 2 Effect of BDE 209 exposure during pregnancy on the body mass of fetal rats

|                                             | 样本量<br>Sample size | 胎鼠体质量/g<br>Body mass of fetal rats/g |              |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------|--------------|
|                                             |                    | GD15                                 | GD20         |
| 对照组 Control                                 | N=4                | 1.00±0.14                            | 5.69±0.62    |
| 低剂量组 Low dose (100 mg·kg <sup>-1</sup> bw)  | N=4                | 0.99±0.17                            | 5.60±0.47    |
| 高剂量组 High dose (300 mg·kg <sup>-1</sup> bw) | N=4                | 1.13±0.22* *                         | 4.90±0.66* * |

注: GD15 和 GD20 表示妊娠 15 d 和妊娠 20 d; \*\*  $P<0.01$ , 与对照组相比。  
Note: GD15 and GD20 indicate 15 d and 20 d of gestation; \*\*  $P<0.01$  vs control.

表 3 大鼠孕期 BDE 209 暴露对 GD15 羊水甲状腺激素 (TH) 的影响

Table 3 Effect of BDE 209 exposure during pregnancy on the amniotic fluid thyroid hormone (TH) level on GD15

|                                             | 样本量<br>Sample size | TT3<br>/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | FT3<br>/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | TT4<br>/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | FT4<br>/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | TSH<br>/(IU·mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 对照组 Control                                 | N=4                | 3.81±2.59                      | 11.23±4.48                      | 11.19±3.33                     | 1.40±0.37                       | 2.71±0.23                      |
| 低剂量组 Low dose (100 mg·kg <sup>-1</sup> bw)  | N=4                | 5.86±3.14                      | 10.55±4.44                      | 15.37±2.70                     | 2.44±0.17*                      | 2.66±0.92                      |
| 高剂量组 High dose (300 mg·kg <sup>-1</sup> bw) | N=4                | 3.73±2.37                      | 8.14±4.47                       | 15.14±6.16                     | 3.10±0.43* *                    | 3.56±0.91                      |

注: \*  $P<0.05$  \* \*  $P<0.01$ , 与对照组相比; TT3 表示总三碘甲状腺原氨酸, FT3 表示血清游离三碘甲状腺原氨酸, TT4 表示血清总甲状腺素, FT4 表示游离甲状腺素, TSH 表示促甲状腺激素。  
Note: \*  $P<0.05$ , \*\*  $P<0.01$  vs control; TT3 represents total triiodothyronine, FT3 represents free triiodothyamine in serum, TT4 represents total serum thyroxine, FT4 represents free thyroxine index, and TSH represents thyroid stimulating hormone.

表 4 大鼠孕期 BDE 209 暴露对 GD20 羊水 TH 的影响

Table 4 Effect of BDE 209 exposure during pregnancy on the amniotic fluid TH level on GD20

|                                             | 样本量<br>Sample size | TT3<br>/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | FT3<br>/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | TT4<br>/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | FT4<br>/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | TSH<br>/(IU·mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 对照组 Control                                 | N=4                | 2.28±0.96                      | 17.43±2.79                      | 28.86±12.74                    | 1.18±0.26                       | 0.96±0.74                      |
| 低剂量组 Low dose (100 mg·kg <sup>-1</sup> bw)  | N=4                | 3.90±1.99                      | 9.97±1.99*                      | 21.66±5.38                     | 2.20±0.45                       | 4.48±0.98*                     |
| 高剂量组 High dose (300 mg·kg <sup>-1</sup> bw) | N=4                | 2.69±1.58                      | 11.56±0.74*                     | 22.36±4.54                     | 2.48±0.69*                      | 4.02±1.28*                     |

注: \*  $P<0.05$ , 与对照组相比。  
Note: \*  $P<0.05$  vs control.

2.3 孕期 BDE 209 暴露对胚胎大鼠脑组织 *Trh* 基因表达的影响

通过观察孕期 BDE 209 暴露对不同胚胎发育时期胎脑 *Trh* 表达的影响,初步分析 HPT 轴功能损伤在 PBDEs 致胎鼠循环和胎脑组织 TH 干扰的可能作用。

GD15 和 GD20 胎脑 *Trh* 基因表达如图 1 所示,正常胎脑(对照组)在孕期不同时期 *Trh* 基因表达相对稳定(表 6);BDE 209 孕期暴露可显著抑制胎脑 *Trh* 表达,且随着孕期进程,对 *Trh* 抑制程度加深。低剂量组 *Trh* mRNA 水平在 GD15 时是对照组的 68.85% ( $P<0.05$ ),在 GD20 时是对照组的 57.53% ( $P<0.05$ );高剂量组 *Trh* mRNA 水平在 GD15 时是对照组的 79.44%,在 GD20 时是对照组的 62.17% ( $P<0.05$ )。这提示,孕期 BDE 209 持续暴露对 *Trh* 具有进行性抑制作用(表 7)。

2.4 孕期 BDE 209 暴露对胚胎大鼠脑组织形态学的影响

由于 GD15 胎鼠胎脑较小且含水量较多,受 HE

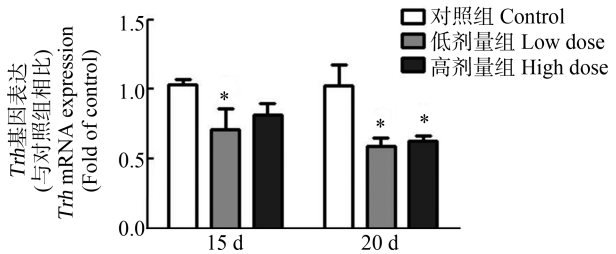


图 1 大鼠孕期 BDE 209 暴露对 GD15 和 GD20 大鼠胎脑 *Trh* mRNA 表达的影响

注: \*  $P<0.05$ , 与对照组相比。

Fig. 1 Effect of BDE 209 exposure during pregnancy on the *Trh* mRNA expression in fetal brain on GD15 and GD20

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

表 5 大鼠孕期 BDE 209 暴露对 GD20 胚胎大鼠血清 TH 的影响

Table 5 Effect of BDE 209 exposure during pregnancy on the serum TH level of fetal rats on GD20

|                                             | 样本量<br>Sample size | TT3<br>/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | FT3<br>/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | TT4<br>/(ng·mL <sup>-1</sup> ) | FT4<br>/(pmol·L <sup>-1</sup> ) | TSH<br>/(IU·mL <sup>-1</sup> ) |
|---------------------------------------------|--------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 对照组 Control                                 | N=4                | 1.69±0.62                      | 12.81±1.51                      | 34.10±6.90                     | 1.26±0.44                       | 1.53±0.34                      |
| 低剂量组 Low dose (100 mg·kg <sup>-1</sup> bw)  | N=4                | 0.84±0.37                      | 5.94±4.04                       | 31.67±14.30                    | 1.14±0.28                       | 2.45±0.23                      |
| 高剂量组 High dose (300 mg·kg <sup>-1</sup> bw) | N=4                | 1.77±0.74                      | 10.52±3.37                      | 19.72±8.25                     | 1.08±0.99                       | 2.60±0.85*                     |

注: \*  $P<0.05$ , 与对照组相比。

Note: \*  $P<0.05$  vs control.

表 6 对照组胚胎大鼠脑组织 *Trh* 基因表达

Table 6 *Trh* gene expression in the brain of control fetal rats

| GD15          |   |      | GD20 |           |
|---------------|---|------|------|-----------|
| 对照<br>Control | 1 | 1.09 | 0.77 |           |
|               | 2 | 1.05 | 1.02 | 1.02±0.21 |
|               | 3 | 0.96 | 1.28 |           |

表 7 大鼠孕期 BDE 209 暴露对胚胎大鼠脑组织 *Trh* 基因表达的影响

Table 7 Effect of BDE 209 exposure during pregnancy on *Trh* gene expression in the fetal rat brain

| GD15 (% of control)                            |   |       | GD20 (% of control) |             |
|------------------------------------------------|---|-------|---------------------|-------------|
| 低剂量组 Low dose<br>(100 mg·kg <sup>-1</sup> bw)  | 1 | 48.54 | 47.68               |             |
|                                                | 2 | 97.76 | 55.34               | 57.53±9.07* |
|                                                | 3 | 60.24 | 69.56               |             |
| 高剂量组 High dose<br>(300 mg·kg <sup>-1</sup> bw) | 1 | 92.17 | 66.50               |             |
|                                                | 2 | 81.36 | 64.46               | 62.17±6.16* |
|                                                | 3 | 64.79 | 52.54               |             |

注: \*  $P<0.05$ , 与对照组相比。

Note: \*  $P<0.05$  vs control.

染色时脱水等可操作条件的限制,检测 GD15 胎鼠脑组织发育形态学改变较为困难。因此,只选择 GD20 胎鼠观察。如图 2 所示,对照组胎鼠细胞较为完整,细胞形态正常,未见明显病理性改变。低剂量组胎鼠与对照组相比也未见明显形态学改变。高剂量组胎鼠与对照组相比,出现局域性脑细胞排列明显稀疏、核固缩和细胞间隙增大现象。可见,孕期 BDE 209 可引起胎鼠脑组织病理损伤,使孕末期胎鼠脑细胞结构发生变化,细胞数量减少,脑组织出现萎缩,可能影响后代学习和记忆能力。

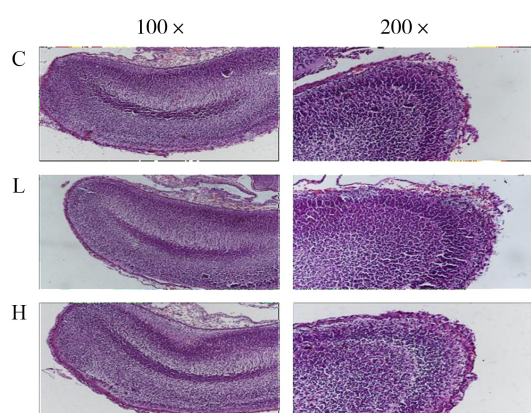


图 2 大鼠孕期 BDE 209 暴露对 GD20 胎鼠发育形态学影响

注: C 对照组; L 低剂量组( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ ); H 高剂量组( $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ ); 放大倍数 100 倍和 200 倍。

Fig. 2 Representative morphological changes induced by BDE 209 exposure during pregnancy on GD20 fetal rat brains

Note: C represents control; L represents low dose group ( $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ ); H represents high dose group ( $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ ); magnifications is 100 or 200.

### 3 讨论 (Discussion)

TH 可调节大脑皮层海马区的胆碱能和多巴胺能系统的发育,对于促进机体正常新陈代谢,维持机体骨骼和神经系统的生长发育具有重要意义。而在孕早期(即胎鼠发生发育关键期),TH 对胎鼠发育和成熟起着关键作用。大量研究显示, PBDEs 具有 TH 干扰毒性效应,如损伤甲状腺形态、改变 TH 水平、高亲和力结合 TH 转运蛋白拮抗 TH 等<sup>[23-24]</sup>。而甲状腺功能的微小改变就可能对人体健康,特别是神经系统发育产生影响。

目前有关孕期 PBDEs 暴露对胎鼠 TH 干扰的评价,多是通过检测出生子鼠循环 TH 水平的检测结果进行间接/回顾性推测<sup>[17,25]</sup>,直接研究尚未见报道。有研究认为,羊水 TH 水平与脐血激素水平有一定

的相关性,反映了胎儿 TH 的代谢,而与孕妇血激素浓度相关性不强。因此,羊水 TH 可能是反映胎儿甲状腺功能的较好指标<sup>[26]</sup>。在本实验中,孕早期(GD15)BDE 209 暴露可导致羊水 FT4 显著升高,并有一定的剂量-效应关系,同时 TT4 水平也有升高的趋势,尽管与对照相比没有显著差异。这提示,BDE 209 暴露可导致孕早期胚胎处于高 TH 状态(类 T4 甲亢)。而在孕末期(GD20),羊水 FT4 水平回降至与对照相比差别不大,虽然在高剂量组仍有显著升高; FT3 水平在低、高剂量组均出现显著降低; TSH 水平显著升高,这表明胎鼠垂体对胚胎循环 TH 水平变化的抵抗。GD20 胎鼠血清循环 TH 水平总体变化趋势与同时期羊水 TH 动态变化基本一致, TSH 水平升高,孕末期羊水 FT3 水平明显降低,且在 GD20 胎鼠血清中也显著下降,可能由于 BDE 209 损伤中枢 HPT 轴,导致胎鼠甲状腺 T3 生成不足所致。结果提示,孕末期胎鼠可能处于中枢性甲状腺功能减退状态。文献报道,孕期 BDE 209 暴露( $300 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \text{ bw}$ )可导致出生子鼠出生后 20 d(PND20)血清 T3 水平下降, TSH 水平升高<sup>[27]</sup>,这与本研究结果基本一致。孕早期胚胎在 TH 来源和调节机制上具有特殊性。在来源方面,孕(早)期胚胎甲状腺功能尚未建立完全,其主要依赖于母体循环 TH;在调节机制方面,来自母体的高浓度 TH 需要胎盘脱碘酶 3 (Dio3)调节,将细胞外 T3 和 T4 灭活,以保证胎儿 TH 处于最佳生理水平<sup>[28]</sup>。我们在前期研究中发现, PBDEs 可诱导小鼠胎盘 Dio3 表达下调,并可能与其发育神经毒性效应有关<sup>[11]</sup>。结合 PBDEs 在胎盘蓄积程度,我们推测, PBDEs 可能通过抑制胎盘 Dio3 活性,干扰胚胎 TH。而 TH 对胚胎发育过程和结局起关键作用,无论甲亢或甲减均可导致胚胎发育损害。在本实验中, BDE 209 孕期高剂量暴露可导致 GD15 胎鼠体质量升高,而 GD20 胎鼠体质量降低,这可能因为 BDE 209 对孕早、晚期胚胎 TH 的干扰表型存在差异,同时可能也与 BDE 209 或其代谢产物在胎鼠体内持续蓄积有关,导致不同发育窗口对生长发育影响的结局不同。

胎儿下丘脑在其自身 HPT 轴发育、成熟的过程中发挥重要的作用,且在孕晚期,胎鼠 HPT 轴发育基本成熟,对胚胎循环和胎鼠 TH 调节也有重要作用<sup>[29]</sup>。因此,本研究通过检测不同时期胎鼠促甲状腺激素释放激素(Trh)的表达,观察孕期 BDE 209 暴露对胎鼠 HPT 轴功能的影响,分析其在胎鼠循环和

胎脑组织 TH 干扰中的作用。研究结果显示,孕早期 BDE 209 暴露导致胎脑(GD15) *Trh* 的表达显著下调,表明在孕早期胎鼠下丘脑功能已受损。在孕末期,胎鼠本身 HPT 轴的功能基本成熟,TH 主要来自其自身甲状腺的分泌,循环 TH 水平可能取决于 BDE209 对中枢 HPT 轴功能的损伤程度。如果 HPT 轴功能失调,可能影响下丘脑 *Trh* 的生成和释放,抑制垂体对 *Trh* 的反应或 TSH 活性成熟过程,导致 T3、T4 生成不足而在血循环的水平下降,而 TSH 水平可能出现下降、不变或上升,这与 *Trh* 或 *Trh* 受体基因敲除小鼠的实验结果相似<sup>[30]</sup>,也与上述孕末期羊水和胎鼠血清中的 TH 干扰的表型基本一致。

除了前述一系列功能指标,BDE 209 对胎鼠脑组织形态学的改变,是评价其毒性效应不可或缺的指标。目前,针对 PBDEs 的 TH 干扰及发育神经毒性研究多数通过对出生子代神经行为、认知能力和学习记忆等损伤效应进行探讨,涉及体内胎脑的病理变化和分子通路的研究较少。本研究通过观察 GD20 胎鼠胎脑形态学的改变,发现孕期 BDE 209 暴露可引起孕后期胎鼠脑细胞结构发生变化,细胞数量减少,脑组织出现萎缩,从而影响出生子代神经行为、学习和记忆能力。日后,可对胎脑各功能区域细致分区,并检测胚胎脑组织 TH 信号传导分子表达,进一步探讨孕期 BDE 209 暴露对于后代的毒性效应。

目前对于 PBDEs 毒性作用研究还较为独立,而神经发育缺陷的重要机制之一即为 TH 水平不平衡,这提示,PBDEs 诱导的 TH 干扰与发育神经毒性之间可能存在内在关联。孕期是生命的初始,与生命质量关系密切。因此,深入研究 PBDEs 毒性效应的内在联系,找出特异性作用靶点即生物标志物,对防治 PBDEs 造成的早期健康损害具有深远意义,是目前急需重视的研究方向。

**通讯作者简介:**胡宏(1964—),女,学士,主任技师,主要研究方向为内分泌环境污染与内分泌紊乱。

#### 参考文献(References):

- [1] 翟金霞,童世庐.多溴联苯醚的健康效应研究进展[J].中华预防医学杂志,2016,50(6):559-562
- [2] Frederiksen M, Vorkamp K, Thomsen M, et al. Human internal and external exposure to PBDEs—A review of levels and sources [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2009, 212(2): 109-134
- [3] Ni K, Lu Y L, Wang T Y, et al. A review of human exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in China [J]. International Journal of Hygiene and Environmental Health, 2013, 216(6): 607-623
- [4] Rawn D, Gaertner D, Sun W, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in Canadian human fetal liver and placental tissues [J]. Organohalogen Compounds, 2011, 73: 563-566
- [5] Song Q B, Li J H. A systematic review of the human body burden of e-waste exposure in China [J]. Environment International, 2014, 68: 82-93
- [6] 颜世帅,徐海明,秦占芬.多溴二苯醚毒理学研究进展及展望[J].生态毒理学报,2010,5(5):609-617  
Yan S S, Xu H M, Qin Z F. Research progress and future perspectives in toxicology study on polybrominated diphenyl ethers [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2010, 5(5): 609-617 (in Chinese)
- [7] Dingemans M M, van den Berg M, Westerink R H. Neurotoxicity of brominated flame retardants: (in) Direct effects of parent and hydroxylated polybrominated diphenyl ethers on the (developing) nervous system [J]. Environmental Health Perspectives, 2011, 119(7): 900-907
- [8] Chen A M, Yolton K, Rauch S A, et al. Prenatal polybrominated diphenyl ether exposures and neurodevelopment in US children through 5 years of age: The HOME study [J]. Environmental Health Perspectives, 2014, 122(8): 856-862
- [9] Costa L G, de Laat R, Tagliaferri S, et al. A mechanistic view of polybrominated diphenyl ether (PBDE) developmental neurotoxicity [J]. Toxicology Letters, 2014, 230(2): 282-294
- [10] Blanco J, Mulero M, Heredia L, et al. Perinatal exposure to BDE-99 causes learning disorders and decreases serum thyroid hormone levels and BDNF gene expression in hippocampus in rat offspring [J]. Toxicology, 2013, 308: 122-128
- [11] European Food Safety Authority (EFSA) Panel on Contaminants in the Food Chain (CONTAM). Scientific opinion on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in food [J]. EFSA Journal, 2011, 9(5): 2156
- [12] Haddow J E, Palomaki G E, Allan W C, et al. Maternal thyroid deficiency during pregnancy and subsequent neuropsychological development of the child [J]. The New England Journal of Medicine, 1999, 341(8): 549-555
- [13] Zoeller R T, Crofton K M. Mode of action: Developmental thyroid hormone insufficiency—Neurological abnormalities resulting from exposure to propylthiouracil [J].

- Critical Reviews in Toxicology, 2005, 35(8-9): 771-781
- [14] 薛铮然, 李海静. 高效溴系阻燃剂十溴联苯醚生产工艺研究[J]. 山东化工, 2002, 31(4): 31-32
- Xue Z R, Li H J. The productive mechanism and technology research of new highly efficiency flame retardant of decabromodiphenyl ether [J]. Shandong Chemical Industry, 2002, 31(4): 31-32 (in Chinese)
- [15] Leung A O, Luksemburg W J, Wong A S, et al. Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers and polychlorinated dibenzo-*P*-dioxins and dibenzofurans in soil and combusted residue at Guiyu, an electronic waste recycling site in southeast China [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(8): 2730-2737
- [16] Meng B, Liu L Y, Ma W L, et al. Polybrominated diphenyl ethers in surface sediment from Songhua River basin, northeast of China [J]. Journal of Harbin Institute of Technology, 2015, 22(3): 63-68
- [17] 钱波, 王健, 朱春艳, 等. 甲状腺激素脱碘酶在孕哺期十溴联苯醚(BDE 209)暴露致子代小鼠神经发育毒性中的潜在作用[J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 459-466
- Qian B, Wang J, Zhu C Y, et al. The role of thyroid hormone deiodinase in developmental neurotoxicity in newborn mice mediated by decabromodiphenyl ether (BDE 209) exposure during pregnancy and lactation [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 459-466 (in Chinese)
- [18] Chevrier J, Harley K G, Bradman A, et al. Polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants and thyroid hormone during pregnancy [J]. Environmental Health Perspectives, 2010, 118(10): 1444-1449
- [19] Coburn G C. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) as environmental neuroendocrine disruptors: Effects on central vasopressin release; structure-function relationships and modes of action [D]. Riverside: University of California, Riverside, 2018: 88-105
- [20] 韩璐, 尚小娜, 于华, 等. 大连地区唐氏筛查孕中期妇女羊水中甲状腺激素水平与 PBDEs 内暴露关系初探[J]. 生态毒理学报, 2017, 12(3): 180-190
- Han L, Shang X N, Yu H, et al. Evaluation of maternal PBDEs exposure on the thyroid hormones in amniotic fluid of the women undergoing amniocentesis at late second trimester of pregnancy in Dalian City [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2017, 12(3): 180-190 (in Chinese)
- [21] Ibarrola N, Rodríguez-Peña A. Hypothyroidism coordinately and transiently affects myelin protein gene expression in most rat brain regions during postnatal development [J]. Brain Research, 1997, 752(1-2): 285-293
- [22] 乔潇, 张媛, 王帆, 等. 大鼠孕期甲状腺功能及自身抗体变化的研究[J]. 国际内分泌代谢杂志, 2015, 35(2): 80-83
- Qiao X, Zhang Y, Wang F, et al. Changes of thyroid function and autoantibodies during the pregnancy of rats [J]. International Journal of Endocrinology and Metabolism, 2015, 35(2): 80-83 (in Chinese)
- [23] Hallgren S, Darnerud P O. Polybrominated diphenyl ethers (PBDEs), polychlorinated biphenyls (PCBs) and chlorinated paraffins (CPs) in rats-testing interactions and mechanisms for thyroid hormone effects [J]. Toxicology, 2002, 177(2-3): 227-243
- [24] de-Miranda A S, Kuriyama S N, da-Silva C S, et al. Thyroid hormone disruption and cognitive impairment in rats exposed to PBDE during postnatal development [J]. Reproductive Toxicology, 2016, 63: 114-124
- [25] 李欣年, 黄敏, 虞太六. 十溴联苯醚(BDE-209)对成年大鼠甲状腺激素的影响[J]. 生态毒理学报, 2009, 4(4): 500-506
- Li X N, Huang M, Yu T L. Disturbance of decabrominated diphenyl ether (BDE-209) to thyroid hormones of adult rats *in vivo* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2009, 4(4): 500-506 (in Chinese)
- [26] Luton D, Azria E, Polak M, et al. Thyroid function in fetuses with down syndrome [J]. Hormone Research in Paediatrics, 2012, 78(2): 88-93
- [27] European Food Safety Authority (EFSA). Scientific opinion on polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in food [J]. EFSA Journal, 2011, 9(5): 2156
- [28] Galton V A, de Waard E, Parlow A F, et al. Life without the iodothyronine deiodinases [J]. Endocrinology, 2014, 155(10): 4081-4087
- [29] Zoeller R T, Tan S W, Tyl R W. General background on the hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis [J]. Critical Reviews in Toxicology, 2007, 37(1-2): 11-53
- [30] Aw D K, Sinha R A, Tan H C, et al. Studies of molecular mechanisms associated with increased deiodinase 3 expression in a case of consumptive hypothyroidism [J]. The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 2014, 99(11): 3965-3971