

研究报告

基于斑马鱼幼鱼的塑化剂肝毒性危害识别研究

王小红,方瑾,张倩男,孙拿拿,杨辉,贾旭东
(国家食品安全风险评估中心,北京 100021)

摘要:目的 采用塑化剂邻苯二甲酸二乙基己酯(DEHP)和邻苯二甲酸二丁酯(DBP)作为阳性对照,建立斑马鱼幼鱼脂肪肝毒性风险评估模型进行塑化剂邻苯二甲酸丁酯苯甲酯(BBP)肝毒性危害识别。方法 分析 DEHP 和 DBP 暴露后斑马鱼肝脏脂肪信号强度及过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)靶基因 *CD36* 的表达,初步构建斑马鱼幼鱼肝毒性模型;基于此模型对 BBP 进行肝毒性评价,此外采用肝脏表达绿色荧光转基因斑马鱼幼鱼进行肝密度分析、甘油三酯(TG)定量检测以及成鱼肝脏病理检查进一步验证模型的可靠性,应用基准剂量法(BMD)推导关键效应点。结果 DEHP、DBP 表现出极显著诱发脂肪肝风险(均 $P<0.01$),显著上调 *CD36* 相对表达量($P<0.001$, $P<0.05$),提示建模成功。BBP(0.000 012 5%、0.000 025%、0.000 05%)诱发斑马鱼幼鱼显著的脂质沉积($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$)、显著影响密度($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$)、显著增加 TG 蓄积($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$)、上调 *CD36* 基因表达。此外,BBP($\geq 0.000 012 5\%$)诱发斑马鱼成鱼肝脏部位脂质空泡形成、空泡间隙和数量减少,提示 BBP 具有明显的肝毒性。关键效应为肝脏脂肪信号强度(S),基准剂量下限(BMDL)值为 0.013 mg/L。结论 本研究成功构建了一种通过肝脏脂肪信号强度来识别塑化剂肝毒性的斑马鱼幼鱼模型,结合基准剂量法进一步为塑化剂肝毒性危害识别提供科学依据。

关键词:斑马鱼幼鱼;塑化剂;肝毒性;危害识别;BMDL

中图分类号:R155 文献标识码:A 文章编号:1004-8456(2022)05-0916-08

DOI:10.13590/j.cjfh.2022.05.009

Hazard identification of phthalates based on hepatotoxicity of zebrafish larvae

WANG Xiaohong, FANG Jin, ZHANG Qiannan, SUN Nana, YANG Hui, JIA Xudong
(China National Center for Food Safety Risk Assessment, Beijing 100021, China)

Abstract: Objective The risk assessment model of fatty liver accumulation in zebrafish larvae was established to identify the hepatotoxicity hazards of plasticizer butyl benzyl phthalate (BBP) using Di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and dibutyl phthalate (DBP) as positive control samples. This model was used to identify hepatotoxicity of butyl benzyl phthalate (BBP). **Methods** The fatty liver signal intensity and expression of peroxisome proliferator activated receptor (PPAR) target gene *CD36* in zebrafish liver after DEHP and DBP exposure were analyzed, and the hepatotoxicity model of zebrafish larvae was preliminarily constructed, which was used to evaluate the hepatotoxicity of BBP. In addition, liver density analysis, TG quantitative detection of zebrafish larvae and liver pathological examination of adult zebrafish were used to further verify the reliability of the model. The benchmark dose method (BMD) was used to derive the point of departure. **Results** DEHP and DBP showed significant risk of fatty liver induction (both $P<0.01$), and the relative expression level of *CD36* was significantly higher ($P<0.001$ and $P<0.05$), indicating the success of modeling. BBP (0.000 012 5%, 0.000 025%, 0.000 05%) induced significant lipid deposition ($P<0.05$, $P<0.001$, $P<0.001$), significantly affected liver parenchyma ($P<0.05$, $P<0.01$, $P<0.01$), increased TG accumulation significantly ($P<0.05$, $P<0.05$, $P<0.01$), and up-regulated *CD36* gene expression. Furthermore, BBP ($\geq 0.000 012 5\%$) induced the formation of lipid vacuoles in the liver of adult zebrafish, as well as the reduction of vacuolar space and number, suggesting that BBP had significant hepatotoxicity. The key effect was fatty liver signal intensity (S) and the benchmark dose lower-bound confidence limit (BMDL) value was 0.013 mg/L. **Conclusion** This study successfully established a model of liver fat

收稿日期:2021-11-12

基金项目:国家重点研发计划(2018YFC1603102);国家食品安全风险评估中心高层次人才队伍建设项目

作者简介:王小红 女 助理研究员 研究方向为食品毒理学 E-mail:wangxiaohong@cfsa.net.cn

通信作者:方瑾 女 副研究员 研究方向为食品毒理学 E-mail:fangjin@cfsa.net.cn

杨辉 男 副研究员 研究方向为食品毒理学 E-mail:yanghui@cfsa.net.cn

signal intensity to identify the hepatotoxicity of phthalates in zebrafish larvae, and preliminarily clarified the PPAR target gene *CD36* involved in hepatotoxicity, and further provided a scientific basis for the risk assessment of phthalates combined with the BMD.

Key words: Zebrafish larvae; phthalates; hepatotoxicity; hazard identification; BMDL

邻苯二甲酸酯类(Phthalate esters, PAEs)是目前塑料制品中应用最广泛的增塑剂(俗称塑化剂),用于树脂、塑料、橡胶、油漆及乳化剂等产品的加工生产中^[1]。近年来,全球塑化剂在工业产品中的使用大幅增加,2020年PAEs占全球塑化剂消费的55%,中国大陆是全球最大的塑化剂市场,2020年占全球消费量的一半以上^[2]。由于PAEs常以非共价键与塑料结合,导致其极易从塑料中迁移至环境介质,而塑料被广泛用作食品包装材料,人类可通过经口途径暴露于PAEs^[3]。

美国国家毒理学计划(National toxicology program, NTP)进行的两年致癌性试验研究发现,邻苯二甲酸二乙基己酯(Di(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)对雌、雄B6C3F1小鼠和F344大鼠均具有显著的致肝癌作用^[4],国际癌症研究机构(International Agency for Research on Cancer, IARC)将DEHP列为“可能对人类有致癌作用”的遗传毒性物质^[5],邻苯二甲酸二丁酯(Dibutyl phthalate, DBP)等塑化剂慢性经口暴露可以诱导啮齿类动物产生肝脏肿瘤^[6-7],其中DEHP^[8-9]及其代谢物邻苯二甲酸单乙基己酯(Mono-2-ethylhexyl phthalate, MEHP)^[10]能够通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体(Peroxisome proliferator activated receptor, PPAR)信号通路并对肝脏脂质代谢产生显著影响。当肝脏组织微环境中能量代谢失衡、炎症反应持续存在时会诱发脂质堆积及非酒精性脂肪肝(Nonalcoholic fatty liver disease, NAFLD或Non-alcoholic steatohepatitis, NASH),并可能进展为肝硬化和肝癌^[11]。这一过程可能是DEHP诱发啮齿动物肝癌的关键步骤。因此,脂肪肝的早期发现可能有助于识别具有慢性肝病的风险,有助于预防其发展为肝硬化和肝癌。

以往脂质代谢研究主要利用离体脂肪细胞及小鼠模型,前者无法模拟复杂的在体过程与微环境,而后者又有成本高、周期长、非高通量等局限。新型模式生物斑马鱼的肝脏是其进行毒性物质代谢的重要器官^[12],斑马鱼表达对于脂质稳态必不可少的脂联素受体^[13]和三种PPAR亚型(α 、 β 、 γ)^[14],适于脂质代谢研究。斑马鱼肝脏在细胞组成、功能、基因信号转导通路以及介导肝脏疾病的细胞过程与人类相似。此外,斑马鱼因成本相对较低、易于操作与人类基因组高度同源^[15]、与人类的CYP基

因系列高度相似,进而弥补了传统研究模型的不足,而且也更加符合国际上倡导的毒理实验3R原则。

塑化剂邻苯二甲酸丁酯苯甲酯(Butyl benzyl phthalate, BBP)是邻苯二甲酸酯的一种,作为常用的增塑剂,广泛应用于医疗、化工、食品等产品中。BBP作为一种环境雌激素,具有类雌激素效应、睾丸毒性、生殖发育毒性^[16-17]和神经毒性^[18],BBP还可引起肝脏肿大^[19],但其作用机制尚不清楚。本文采用DEHP、DBP作为阳性对照样品构建斑马鱼幼鱼脂肪肝堆积模型,基于此用斑马鱼对塑化剂——BBP的肝脏毒性风险进行识别,并在分子水平阐明受试物肝脏毒性作用机制,最后基于BBP诱发斑马鱼幼鱼肝毒性数据,应用基准剂量法计算关键效应和基准剂量下限(Benchmark dose lower-bound confidence limit, BMDL),为食品中塑化剂污染物的危害识别及管理提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

黑色素等位基因突变型半透明Albino品系斑马鱼和Tg(apo14:GFP)肝脏表达绿色荧光转基因斑马鱼繁殖成鱼由南京一树梨花生物科技有限公司提供,以自然成对交配繁殖方式进行。年龄为受精后72h(72 hours post fertilization, 72 hpf)、4~5月龄。斑马鱼均饲养于28℃的养鱼用水中(水质:每1L反渗透水中加入200mg速溶海盐,电导率为450~550 $\mu\text{S}/\text{cm}$; pH为6.5~8.5;硬度为100~300 mg/L CaCO_3)。

1.2 主要仪器与试剂

解剖显微镜(SZX7, OLYMPUS, 日本); CCD相机(VertA1, 上海土森视觉科技有限公司); 体视荧光显微镜(M165-FC, Leica, 德国); 精密电子天平(CP214, OHAUS, 美国); 6孔板(Fisher Scientific, 中国); 超微量分光光度计(NanoDrop 2000, Thermo, 美国); 普通PCR扩增仪(T100, Bio-rad, 新加坡); 荧光定量PCR仪(CFX Connect, Bio-rad, 新加坡); 低位裙边96孔板(透明)(HSP9601, Bio-rad, 美国); 光学黏性封膜B(MSB1001, Bio-rad, 美国)。

DEHP、DBP、BBP、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO)、硫代乙酰胺(Thioacetamide, TAA)、油红O

购自美国 SIGMA 公司; iTaq Universal SYBR Green Supermix 购自美国 Bio-Rad 公司; TRI reagent 购自美国 Invitrogen 公司; FastQuant RT Kit (With gDNase) 试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司; 甘油三酯(TG)含量测定试剂盒购自上海科华生物工程股份有限公司; 三卡因甲磺酸(Tricaine)由南京一树梨花生物科技公司提供; 4% 多聚甲醛购自鼎国生物; 1, 2-丙二醇、无水乙醇购自国药集团; 异丙醇购自上海生工; 氯仿购自阿拉丁试剂(上海)有限公司。

DEHP、DBP、BBP 先用 DMSO 作为助溶剂配制工作液, 再用养鱼用水作为溶剂, 配置成 DEHP 0.47%、0.94%、1.88%、3.75%、7.5% 和 15%, DBP 0.0001%、0.0005%、0.001%、0.0025%、0.005%、0.01% 和 0.02%, BBP (幼鱼: 0.00000625%、0.0000125%、0.000025% 和 0.00005%)/(成鱼: 0.0000375%、0.000075%、0.00015%、0.0003%); TAA 临用时 DMSO 配制成 1 mol/L 母液, 按需稀释, 最终各工作液中 DMSO 含量为 0.1%。

1.3 实验方法

1.3.1 脂肪信号强度检测

随机选取 60 尾发育状态良好的受精后 72 hpf 黑色素等位基因突变型半透明 Albino 品系斑马鱼于六孔板中, 每孔均处理 6 尾斑马鱼。分别给予塑化剂 DEHP (1.88%、3.75%、7.5%、15%)、DBP (0.001%、0.005%、0.01%、0.02%), 阳性对照药物 TAA 1 mmol/L、对照(养鱼用水), 每孔药液容量为 3 mL。各组处理 72 h 后, 将斑马鱼置入 4% 多聚甲醛中 4℃ 固定过夜, 用 PBS 冲洗 3 遍后丙二醇梯度脱水, 再使用新鲜配制并过滤后的 0.5% 油红 O 工作液中 28℃ 染色过夜。染色结束后每组随机取 10 尾斑马鱼在解剖显微镜下观察斑马鱼肝脏, 拍照并保存图片。用 NIS-Elements D 3.10 高级图像处理软件进行图像分析并采集数据, 分析统计斑马鱼肝脏脂肪信号强度(S), 以肝脏脂肪信号强度的统计学分析结果对受试物诱发脂肪肝风险进行评估。DEHP (0.47%、0.94%、1.88%)/DBP (0.0001%、0.0005%、0.001%)、BBP (0.00000625%、0.0000125%、0.000025%、0.00005%) 暴露后脂肪信号强度检测方法同 DEHP/DBP 高剂量组 ($n=6$)。脂肪肝诱导作用计算公式如下:

脂肪肝诱导作用(%) =

$$\frac{S(\text{供试品组}) - S(\text{正常对照组})}{S(\text{正常对照组})} \times 100$$

1.3.2 肝密度图像分析

随机选取 36 尾发育状态良好的受精后 72 hpf 的 Tg(apo14:GFP) 肝脏表达绿色荧光转基因斑马鱼

于六孔板中, 每孔均处理 6 尾斑马鱼幼鱼。分别给予塑化剂 BBP (0.00000625%、0.0000125%、0.000025%、0.00005%), 阳性对照药物 TAA 1 mmol/L、溶剂对照(0.1% DMSO), 每孔药液容量为 3 mL。各组处理 72 h 后, 取 6 尾斑马鱼幼鱼用 Tricaine 进行麻醉处理, 体视显微镜下观察斑马鱼肝脏, 拍照并保存图片。使用 Image J 软件进行图像分析并采集数据, 分析统计斑马鱼肝脏荧光表达, 以相对荧光强度的统计学分析结果快速评价受试物对斑马鱼肝毒性的影响。

$$\text{相对荧光强度} = \frac{\text{肝脏荧光强度总和}}{\text{肝脏面积}}$$

1.3.3 TG 水平的检测

随机选取 1080 尾发育状态良好的受精后 72 hpf 黑色素等位基因突变型半透明 Albino 品系斑马鱼于六孔板中, 每孔均 30 尾。分别给予塑化剂 BBP (0.00000625%、0.0000125%、0.000025% 和 0.00005%)、阳性对照 TAA 1 mmol/L、对照(养鱼用水), 每孔药液容量为 3 mL, 处理 72 h 后, 各实验组分别取 180 尾斑马鱼, 每 30 尾斑马鱼作为一个样本, Tricaine 麻醉处死后, 加入 100 μ L 的 75% 乙醇, 组织研磨仪研磨 2 min 充分提取斑马鱼体内的 TG。按照试剂盒说明书, 测定 TG 的总含量, 并计算平均每尾斑马鱼体内的 TG 水平。

1.3.4 肝组织病理学检查

随机选取 36 尾发育至 4~5 月龄的黑色素等位基因突变型半透明 Albino 品系斑马鱼成鱼于六孔板中, 每孔均处理 6 尾。分别给予塑化剂 BBP (0.0000375%、0.000075%、0.00015%、0.0003%)、阳性对照 TAA 1 mmol/L、溶剂对照(0.1% DMSO), 每孔药液容量为 3 mL, 各组处理 14 d 后, 取 6 尾受试物暴露后的斑马鱼成鱼进行 Tricaine 麻醉处死, 解剖斑马鱼肝脏, 置于 4% 多聚甲醛中固定后包埋制备组织切片。用苏木精和伊红(H&E)染色观察斑马鱼肝脏病理学变化。

1.3.5 脂肪肝相关基因 CD36 表达的检测

随机选取 1440 尾发育状态良好的受精后 72 hpf 的黑色素等位基因突变型半透明 Albino 品系斑马鱼于六孔板中, 每孔 30 尾。分别给予塑化剂 DEHP (0.94%、1.88%、3.75%), DBP (0.0025%、0.005%、0.01%)、阳性对照药物 TAA 1 mmol/L、对照(养鱼用水处理斑马鱼), 每孔药液容量为 3 mL, 各处理组共 180 尾斑马鱼, 即每 30 尾作为一个处理组的一个样本, 每个处理组 6 个样本。供试品处理 72 h 后, 使用经典 TRIzol 法提取各组斑马鱼总 RNA, 通过 q-PCR 检测目的基因 CD36 转录水平。用 β -

actin 作为基因表达的内参,计算目的基因的 RNA 相对表达量。BBP(0.000 006 25%、0.000 012 5%、0.000 025% 和 0.000 05%)暴露后脂肪肝相关基因 *CD36* 表达的检测同 DEHP/DBP。计算公式如下:

$$RNA\text{相对表达量} = 2^{(-\Delta\Delta C(t))}$$

$$\Delta C(t) = C(t)\text{目的基因} - \overline{C(t)}\beta - actin$$

1.3.6 利用基准剂量法计算出基于塑化剂诱发斑马鱼肝毒性的关键效应的基准剂量

基于塑化剂暴露后对斑马鱼幼鱼肝毒性效应(肝脏脂肪信号强度(S)、相对荧光强度、TG、*CD36*)的剂量反应关系,利用 BMD5 Version 3.2.0 软件进行分析计算基准剂量(Benchmark dose method, BMD)及 BMDL。

选用 Exponential、Power、Polynomial、Linear、Hill 模型进行数据拟合($P>0.1$),计算各个毒性终点的 BMDL。数据类型:肝脏脂肪信号强度表达量为连续型数据;BMR:一个标准差(1.0 SD)、“不良

效应方向(adverse direction)”设置为“增加(down)”。

1.4 统计学分析

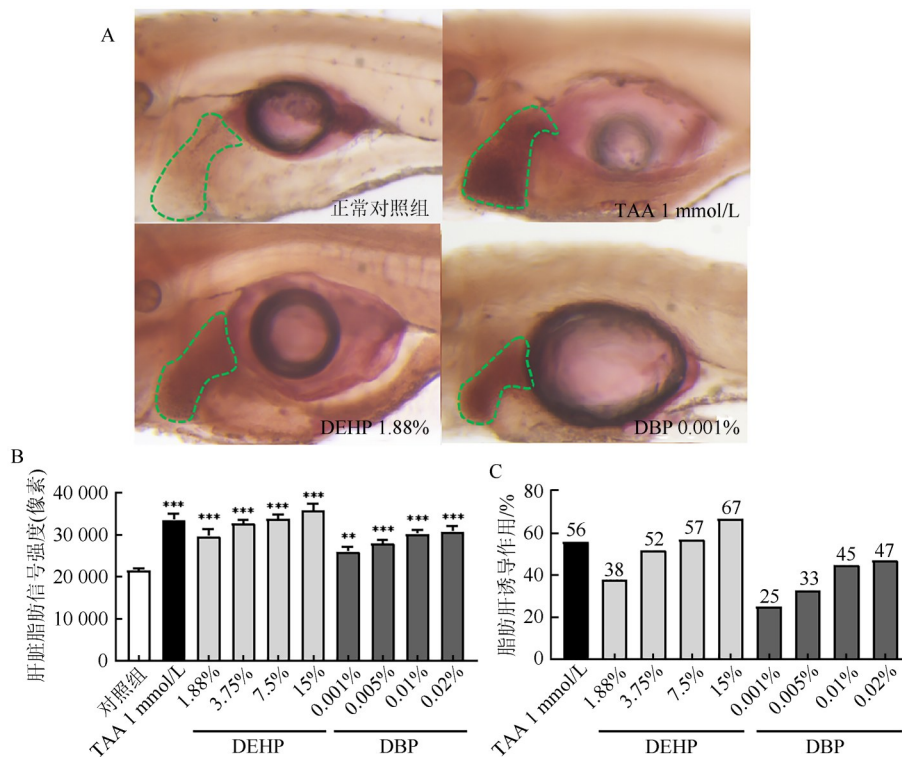
采用 Graphpad Prism(V6.0)进行统计分析和绘图。采用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验方差齐性,并用 Dunnett's *T*-检验/TTEST 进行统计学分析,结果以平均数±标准误($\bar{X} \pm SE$)表示, $P<0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 DEHP/DBP 成功构建斑马鱼幼鱼脂肪堆积模型

2.1.1 DEHP/DBP 对斑马鱼幼鱼肝脏脂肪的影响

受试物处理后斑马鱼肝脏脂肪信号强度如图 1A 所示,与对照组比较,DEHP(1.88%、3.75%、7.5%、15%)、DBP(0.001%、0.005%、0.01%、0.02%)对斑马鱼肝脏脂肪信号强度(图 B)及脂肪肝诱导作用(图 C)均呈剂量依赖性地增加。



注:A:受试物处理后斑马鱼肝脏脂肪信号强度典型图(绿色虚线区域为肝脏);B:DEHP/DBP(高剂量)处理后斑马鱼肝脏脂肪信号强度(像素)($n=6$);C:DEHP/DBP(高剂量)脂肪肝诱导作用($n=6$);与正常对照组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$

图1 塑化剂处理的斑马鱼肝脏脂肪

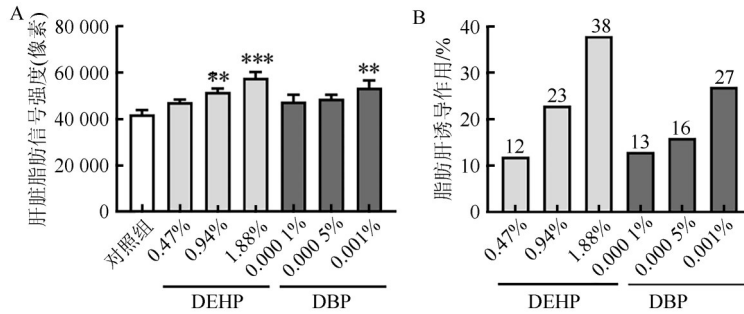
Figure 1 Liver fat in zebrafish treated with phthalates

在实验终点,DEHP 3.75%、7.5% 和 15% 浓度组分别诱发 10.0%(3/30)、16.7%(5/30)和 33.3%(10/30)斑马鱼死亡;DBP 0.02% 浓度组诱发 6.7%(2/30)斑马鱼死亡。降低受试物暴露浓度后,与对照组比较,DEHP(0.94%、1.88%)、DBP(0.001%)增加斑马鱼肝脏脂肪信号强度(图 2A)和脂肪肝诱导作用(图 2B),提示 TAA、DEHP 和 DBP 均具有明显

的诱发脂肪肝风险。

2.1.2 DEHP/DBP 对斑马鱼幼鱼 PPAR 靶基因 *CD36* 表达的影响

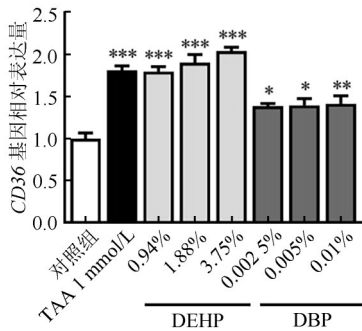
与对照组比较,TAA、DEHP(0.94%、1.88%、3.75%)、DBP(0.002 5%、0.005% 和 0.01%)可增加斑马鱼 *CD36* 基因相对表达量(图 3),提示 *CD36* 参与其肝脏毒性作用机制。



注:A:DEHP/DBP(低剂量)处理后斑马鱼肝脏脂肪信号强度(像素)(n=6);B:DEHP/DBP(低剂量)脂肪肝诱导作用(n=6);与正常对照组比较, **P<0.01,***P<0.001

图2 低剂量塑化剂处理的斑马鱼肝脏脂肪

Figure 2 Liver fat in zebrafish treated with low-dose phthalates



注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001

图3 斑马鱼幼鱼PPAR靶基因CD36相对表达量(n=6)

Figure 3 Relative expression of PPAR target gene CD36 in zebrafish larval

2.2 BBP对斑马鱼幼鱼肝脏脂肪的影响

与对照组比较,BBP(0.0000125%、0.000025%、

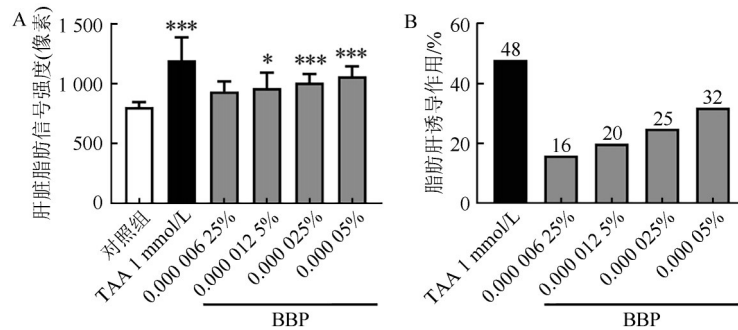
0.00005%)对斑马鱼肝脏脂肪信号强度及脂肪肝诱导作用均呈剂量依赖性地增加,提示TAA、高浓度BBP具有明显的促进脂质沉积现象(图4)。

2.3 BBP对斑马鱼幼鱼肝密度的影响

受试物处理后斑马鱼幼鱼肝密度如图5A所示。与对照组相比,TAA、BBP(0.0000125%、0.000025%、0.00005%)组转基因斑马鱼幼鱼肝脏的荧光面积和荧光强度显著降低(图5B),表明肝细胞实质受到一定程度的影响,提示肝脏发生一定程度的病变。

2.4 BBP对斑马鱼幼鱼TG水平的影响

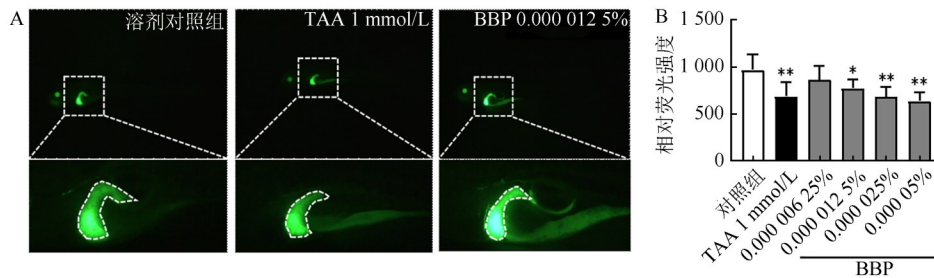
结果显示,TAA、BBP(0.0000125%、0.000025%、0.00005%)增加斑马鱼幼鱼体内TG水平含量(图6),提示BBP高浓度暴露可能会增加斑马鱼体内的甘油三酯蓄积。



注:A:BBP处理后斑马鱼幼鱼肝脏脂肪信号强度(像素)(n=6);B:BBP脂肪肝诱导作用(n=6);与正常对照组比较,*P<0.05,***P<0.001

图4 BBP处理的斑马鱼幼鱼肝脏脂肪

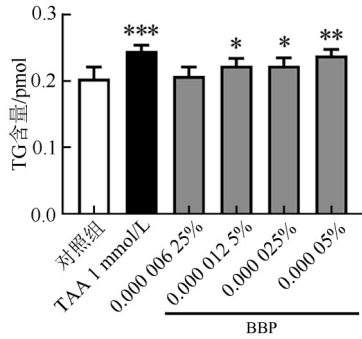
Figure 4 Liver fat in zebrafish larval treated with BBP



注:与正常对照组比较,*P<0.05,**P<0.001

图5 BBP处理的斑马鱼肝脏荧光表达(n=6)

Figure 5 Liver fluorescence expression of zebrafish treated with BBP



注:与正常对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.005$,*** $P<0.001$

图 6 BBP 处理的斑马鱼幼鱼脂质水平 ($n=6$)

Figure 6 Lipid levels in zebrafish larval treated with BBP

2.5 BBP对斑马鱼成鱼肝组织结构的影响

结果显示与对照组相比,TAA 组斑马鱼成鱼肝脏 HE 染色后发生明显的脂质空泡,BBP 暴露后,肝脏部位有少量脂质空泡形成(图 7),提示斑马鱼成鱼暴露 BBP 诱发轻微的脂肪病变。

2.6 BBP对斑马鱼幼鱼脂肪 PPAR 靶基因 CD36 表达的影响

与对照组比较,BBP(0.000 05%)、TAA 上调斑马鱼幼鱼体内 CD36 基因的表达(图 8),无明显的剂量依赖性,提示 BBP(0.000 025%、0.000 05%)可能会引起斑马鱼脂质代谢相关基因表达紊乱。

2.7 BBP 诱发斑马鱼幼鱼肝毒性的基准剂量

如表 1 所示,最优模型为 Hill,比较 Exponential、

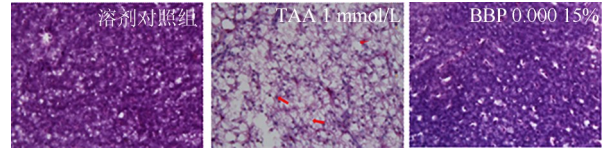
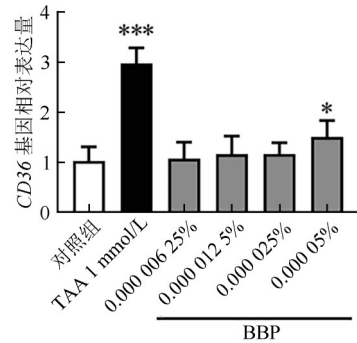


图 7 BBP 处理的斑马鱼成鱼肝脏 H&E 染色

Figure 7 H&E staining of adult zebrafish liver treated with BBP



注:与对照组比较,* $P<0.05$,*** $P<0.001$

图 8 斑马鱼幼鱼 PPAR 靶基因 CD36 相对表达量 ($n=6$)

Figure 8 Relative expression of PPAR target gene CD36 in zebrafish larval ($n=6$)

Hill、Polynomial、Power、Linear 模型下不同有害终点的 BMDL 值,确定最敏感的肝毒性效应为肝脏脂肪信号强度(S),BMDL 值为 0.013 mg/L(即 0.000 001 3%),与该研究得出的未观察到有害作用水平剂量 0.000 006 25% 较为接近,该值可作为 BBP 肝毒性效应的参考剂量。

表 1 BBP 对斑马鱼幼鱼肝脏毒性的剂量反应关系拟合优度检验

Table 1 Dose-response relationship for liver toxicity in zebrafish larvae of BBP

不同有害终点 检验类型	肝脏脂肪信号强度		肝密度		TG		CD36	
	BMDL/(mg/L)	AIC [*]	BMDL/(mg/L)	AIC	BMDL/(mg/L)	AIC	BMDL/(mg/L)	AIC
Exponential 2	0.17	361.27	0.13	378.322	0.20	-172.89	0.19	12.45
Exponential 3	0.17	361.27	0.133	378.32	0.20	-172.89	0.189	14.45
Exponential 4	0.021	356.25	0.053	379.84	0.061	-172.16	0.18	14.46
Exponential 5	0.021	356.25	0.053	379.84	0.12	-171.78	0.18	16.45
Hill	0.013	355.70	0.040	379.80	0.12	-171.76	0.026	16.45
Polynomial Degree 3	0.15	360.68	0.16	378.62	0.19	-173.00	0.18	14.44
Polynomial Degree 2	0.15	360.68	0.16	378.62	0.19	-173.00	0.18	14.45
Power	0.15	360.68	0.16	378.62	0.19	-173.00	0.18	14.45
Linear	0.15	360.68	0.19	378.62	0.19	-173.00	0.18	12.46

注:*AIC 是衡量统计模型拟合优良性的一种标准,AIC 越小说明模型的复杂程度及模型拟合数据的结果越好

3 讨论

随着塑料制品需求的增加,环境介质中 PAEs 的含量也与日俱增。我国土壤中 DEHP 的含量为 0~264 mg/kg^[20],大气中 PAEs 的含量可达 40~388 ng/m³^[21],饮水中 DEHP 的中值浓度为 1.3 μg/L^[22]。因此,人体可通过食物、饮水、呼吸、室内扬尘及经皮吸收暴露于 PAEs,其潜在健康效应已引起公众及政府高度关注。因此,对塑化剂进行危害识别并探讨其毒性机制具有重要的现实意义。PAEs 具有相似的分子结构,通常根据碳链长度和分子量进行分类。根

据碳链长度可分为短链(3~6)和长链(7~13 个碳原子)PAEs。既往研究发现肝脏为 PAEs 慢性毒性的主要靶器官^[23],DEHP^[8-9]、MEHP^[10]能够通过激活 PPAR 信号通路并对肝脏脂质代谢产生显著影响,结构相似的 PAEs 在毒性效应和作用机制上是否具有类似效应尚未明确。

近年来,采用斑马鱼开展的肝毒性研究主要集中在评价药物性肝损伤^[24-25]、中药有效成分肝毒性^[26-27]以及环境污染物^[28-30]、农药^[31-32]等方面。此外,采用斑马鱼评价塑化剂肝毒性的相关研究:暴

露于低水平的 DEHP 可调节与脂肪酸代谢相关的肝脏基因的表达^[33-34];成年斑马鱼暴露于含 DEP 的水中 4 周后,血清肝脏炎症酶水平与脂肪肝变化显著升高^[35];成年雌性斑马鱼经水暴露于 DINP(42 μg/L) 3 周后,影响脂质代谢^[36]。但目前仍未建立起完整的斑马鱼评价塑化剂肝损伤模型。

为识别具有 DEHP/DBP 类似肝毒性作用及机制的 PAEs,本文基于 AMALI 等^[37]的研究采用向饲养水中加入已知具有肝毒性的塑化剂 DEHP/DBP 作为阳性对照样品,同时设置 TAA 作为模型建立受试物对照,分析受试物暴露后肝脏脂肪信号强度以及相关基因 *CD36* 表达的改变,初步构建斑马鱼幼鱼脂肪肝堆积模型并初步探索其相关机制。DEHP (≥0.94%)/DBP(>0.001%)暴露均剂量依赖性地增加斑马鱼幼鱼肝脏脂肪信号强度及脂肪肝诱导作用,显著诱发脂肪肝风险。*CD36* 是一种清道夫受体,在长链脂肪酸的高亲和力组织摄取中发挥作用,并在过度脂肪供应下促进脂质积聚和代谢功能障碍^[38]。脂肪代谢异常及其相关病理可能与 *CD36* 介导的信号转导功能障碍以及长链脂肪酸摄取改变有关^[39]。本研究发现,DEHP (≥0.94%)/DBP (≥0.002 5%)均增加斑马鱼幼鱼 PPAR 靶基因 *CD36* 基因相对表达量,提示 *CD36* 参与其肝毒性作用机制。这与本课题组前期研究结果及 GRYTTING 等^[40]关于 DBP 加速 PMA 诱导的 THP-1 单核细胞巨噬细胞 *CD36* 表达增加的结果相一致,提示 *CD36* 可能参与 PAEs 肝毒性作用机制。

基于初步构建的模型对塑化剂 BBP 的肝毒性进行评价,BBP(≥0.000 012 5%)剂量依赖性地增加斑马鱼肝脏脂肪信号强度及脂肪肝诱导作用,显著促进脂质沉积现象,这与前期研究结果“BBP 引起肝脏肿大”相一致;BBP(0.000 05%)上调斑马鱼幼鱼体内 *CD36* 基因的表达,提示其可能会引起脂质代谢相关基因表达紊乱。此外,采用肝脏表达绿色荧光转基因斑马鱼幼鱼进行肝密度分析、TG 定量检测以及成鱼肝脏病理检查进一步验证模型的可靠性。结果表明,BBP 具有明显的肝毒性。进一步结合 BMD 基于 BBP 暴露后对斑马鱼幼鱼肝毒性效应(肝脏脂肪信号强度(S)、相对荧光强度、TG、*CD36*)的剂量反应关系计算 BMDL。最优模型为 Hill,确定最敏感的肝毒性效应为肝脏脂肪信号强度(S),BMDL 值为 0.013 mg/L(即 0.000 001 3%),为 BBP 肝毒性危害识别提供科学依据。

采用斑马鱼模式生物构建此模型有成本低、周期短、高通量的优势;也存在物种差异带来的局限性。此外,由于定量检测斑马鱼幼鱼肝脏 TG 含量有

技术难度,本文检测了全鱼的 TG 含量,不能直接反应斑马鱼肝脏 TG 含量。但总体来说,此模型对邻苯二甲酸酯类进行早期危害识别具有一定现实意义。

本研究成功构建了一种以斑马鱼幼鱼“肝脏脂肪信号强度(S)”为敏感效应终点的塑化剂肝毒性危害识别模型,提供相应的 BMDL 值,为塑化剂肝毒性危害识别及管理提供科学依据;应用基准计量法计算出 BBP 以 S 为敏感效应终点的 BMDL 为 0.013 mg/L。

参考文献

- [1] ERYTHROPEL H C, MARIC M, NICELL J A, et al. Leaching of the plasticizer di (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) from plastic containers and the question of human exposure [J]. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 2014, 98(24): 9967-9981.
- [2] Market I. Plasticizers-Chemical economics handbook[M]. London: IHS Market, 2021.
- [3] SERRANO S E, BRAUN J, TRASANDE L, et al. Phthalates and diet: A review of the food monitoring and epidemiology data [J]. *Environmental Health*, 2014, 13(1): 43.
- [4] PROGRAM N T. Carcinogenesis bioassay of di (2-ethylhexyl) phthalate (CAS no. 117-81-7) in F344 rats and B₆C₃F₁ mice (feed studies) [J]. *National Toxicology Program Technical Report Series*, 1982, 217: 1-127.
- [5] GROSSE Y, BAAN R, SECRETAN-LAUBY B, et al. Some chemicals present in industrial and consumer products, food and drinking-water [J]. *Iarc Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans*, 2013, 101: 9-549.
- [6] FRIEDMAN M, MCQUISTAN T, HENDRICKS J D, et al. Protective effect of dietary tomatine against dibenzo[*a, l*]pyrene (DBP)-induced liver and stomach tumors in rainbow trout [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2007, 51(12): 1485-1491.
- [7] RAO K, ELM M, KELLY R, et al. Hepatic hyperplasia and cancer in rats: Metabolic alterations associated with cell growth [J]. *Gastroenterology*, 1997, 113(1): 238-248.
- [8] FEIGE J N, GERBER A, CASALS-CASAS C, et al. The pollutant diethylhexyl phthalate regulates hepatic energy metabolism via species-specific PPAR alpha-dependent mechanisms [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2010, 118(2): 234-241.
- [9] ISSEMANN I, GREEN S. Activation of a member of the steroid hormone receptor superfamily by peroxisome proliferators [J]. *Nature*, 1990, 347(6294): 645-650.
- [10] MANTEIGA S, LEE K. Monoethylhexyl phthalate elicits an inflammatory response in adipocytes characterized by alterations in lipid and cytokine pathways [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2017, 125(4): 615-622.
- [11] MALAGUARNERA M, DI ROSA M, NICOLETTI F, et al. Molecular mechanisms involved in NAFLD progression [J]. *Journal of Molecular Medicine: Berlin, Germany*, 2009, 87(7): 679-695.
- [12] LAALE H W. The biology and use of zebrafish, *Brachydanio*

- erio* in fisheries research[J]. *Journal of Fish Biology*, 1977, 10(2): 121-173.
- [13] NISHIO S I, GIBERT Y, BERNARD L, et al. Adiponectin and adiponectin receptor genes are coexpressed during zebrafish embryogenesis and regulated by food deprivation [J]. *Developmental Dynamics*, 2008, 237(6): 1682-1690.
- [14] IBABE A, GRABENBAUER M, BAUMGART E, et al. Expression of peroxisome proliferator-activated receptors in zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Histochemistry and Cell Biology*, 2002, 118(3): 231-239.
- [15] HOWE K, CLARK M D, TORROJA C F, et al. The zebrafish reference genome sequence and its relationship to the human genome[J]. *Nature*, 2013, 496(7446): 498-503.
- [16] SUN G J, LIU K C. Developmental toxicity and cardiac effects of butyl benzyl phthalate in zebrafish embryos [J]. *Aquatic Toxicology*, 2017, 192: 165-170.
- [17] ROY N M, ZAMBRZYCKA E, SANTANGELO J. Butyl benzyl phthalate (BBP) induces caudal defects during embryonic development[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2017, 56: 129-135.
- [18] ZHANG C, YANG X, HE Z, et al. Influence of BBP exposure on nervous system and antioxidant system in zebrafish [J]. *Ecotoxicology: London, England*, 2014, 23(10): 1854-1857.
- [19] PIERSMA A H, VERHOEF A, TE BIESEBEEK J, et al. Developmental toxicity of butyl benzyl phthalate in the rat using a multiple dose study design [J]. *Reproductive Toxicology*, 2000, 14(5): 417-425.
- [20] LYU H, MO C H, ZHAO H M, et al. Soil contamination and sources of phthalates and its health risk in China: A review[J]. *Environmental Research*, 2018, 164: 417-429.
- [21] 张恒, 周自强, 赵海燕, 等. 青奥会前后南京PM_{2.5}重金属污染水平与健康风险评估[J]. *环境科学*, 2016, 37(1): 28-34.
- ZHANG H, ZHOU Z Q, ZHAO H Y, et al. Pollution level and health risk assessment of heavy metals in atmospheric PM_{2.5} in Nanjing before and after the youth Olympic games [J]. *Environmental Science*, 2016, 37(1): 28-34.
- [22] WANG W L, WU Q Y, WANG C, et al. Health risk assessment of phthalate esters (PAEs) in drinking water sources of China [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(5): 3620-3630.
- [23] RUSYN I, PETERS J M, CUNNINGHAM M L. Modes of action and species-specific effects of di- (2-ethylhexyl) phthalate in the liver[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2006, 36(5): 459-479.
- [24] HUANG L, LIU J P, LI W B, et al. Lenvatinib exposure induces hepatotoxicity in zebrafish via inhibiting Wnt signaling [J]. *Toxicology*, 2021, 462: 152951.
- [25] BAI Z H, JIA K, CHEN G L, et al. Carbamazepine induces hepatotoxicity in zebrafish by inhibition of the Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Environmental Pollution*, 2021, 276: 116688.
- [26] DUAN X Y, MA R J, HSIAO C D, et al. Tripterygium wilfordii multiglycoside-induced hepatotoxicity via inflammation and apoptosis in zebrafish[J]. *Chinese Journal of Natural Medicines*, 2021, 19(10): 750-757.
- [27] SUN M, LIU Q, LIANG Q, et al. Toosendanin triggered hepatotoxicity in zebrafish via inflammation, autophagy, and apoptosis pathways [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2021, 250: 109171.
- [28] MAO Y, ZONG Z, DANG Y, et al. Promotion effect of microcystin-LR on liver tumor progression in kras (V12) transgenic zebrafish following acute or subacute exposure [J]. *Ecotox Environ Safe*, 2021, 224: 112673.
- [29] MANJUNATHA B, DEEKSHITHA B, SEO E, et al. Developmental toxicity induced by particulate matter (PM_{2.5}) in zebrafish (*Danio rerio*) model [J]. *Aquat Toxicol*, 2021, 238: 105928.
- [30] LUO T, WENG Y, HUANG Z, et al. Combined hepatotoxicity of imidacloprid and microplastics in adult zebrafish: Endpoints at gene transcription [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2021, 246: 109043.
- [31] LU J, YANG Y, ZHU L, et al. Exposure to environmental concentrations of natural pyrethrins induces hepatotoxicity: Assessment in HepG2 cell lines and zebrafish models [J]. *Chemosphere*, 2021: 132565.
- [32] MARTINS R X, VIEIRA L, SOUZA J, et al. Exposure to 2,4-D herbicide induces hepatotoxicity in zebrafish larvae [J]. *Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol*, 2021, 248: 109110.
- [33] UREN-WEBSTER T M, LEWIS C, FILBY A L, et al. Mechanisms of toxicity of di (2-ethylhexyl) phthalate on the reproductive health of male zebrafish [J]. *Aquatic Toxicology*, 2010, 99(3): 360-369.
- [34] HUFF M, DA SILVEIRA W A, CARNEVALI O, et al. Systems analysis of the liver transcriptome in adult male zebrafish exposed to the plasticizer (2-ethylhexyl) phthalate (DEHP)[J]. *Scientific Reports*, 2018, 8: 2118.
- [35] KIM S M, YOO J A, BAEK J M, et al. Diethyl phthalate exposure is associated with embryonic toxicity, fatty liver changes, and hypolipidemia via impairment of lipoprotein functions[J]. *Toxicology in Vitro*, 2015, 30(1): 383-393.
- [36] FORNER-PIQUER I, MARADONNA F, GIOACCHINI G, et al. Dose-specific effects of di-isononyl phthalate on the endocannabinoid system and on liver of female zebrafish [J]. *Endocrinology*, 2017, 158(10): 3462-3476.
- [37] AMALI A A, REKHA R D, LIN C J F, et al. Thioacetamide induced liver damage in zebrafish embryo as a disease model for steatohepatitis [J]. *Journal of Biomedical Science*, 2006, 13(2): 225-232.
- [38] GLATZ J F C, LUIKEN J J F P, BONEN A. Membrane fatty acid transporters as regulators of lipid metabolism: Implications for metabolic disease[J]. *Physiological Reviews*, 2010, 90(1): 367-417.
- [39] PEPINO M Y, KUDA O, SAMOVSKI D, et al. Structure-function of CD36 and importance of fatty acid signal transduction in fat metabolism[J]. *Annual Review of Nutrition*, 2014, 34: 281-303.
- [40] GRYTTING V S, OLDERBØ B P, HOLME J A, et al. Di-n-butyl phthalate modifies PMA-induced macrophage differentiation of THP-1 monocytes via PPAR γ [J]. *Toxicology in Vitro*, 2019, 54: 168-177.