

磷酸三苯酯及磷酸甲苯二苯酯的早期胚胎发育毒性：PPAR γ 的作用

黄静^a, 翟雨诺^a, 李博洋^a, 纪静^a, 李传海^a, 刘世昕^b, 刘议蔓^b, 袁骏华^b, 姜启晓^a

青岛大学 a. 公共卫生学院 b. 基础医学院, 山东 青岛 266071



DOI 10.11836/JEOM24375

摘要：

[背景] 有机磷阻燃剂属于新兴环境污染物, 已有多种毒性报道, 但其对胚胎发育毒性的研究较少。亟待阐明相关效应及机制, 以期完善风险评估, 更好地保护敏感人群。

[目的] 评价磷酸三苯酯(TPhP)和磷酸甲苯二苯酯(CDP)暴露对早期鸡胚的潜在发育毒性, 以鸡胚报告基因表达系统揭示 TPhP 和 CDP 在体激活过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ) 的能力, 并以慢病毒在体沉默为工具, 探讨 PPAR γ 在 TPhP 和 CDP 诱导鸡胚发育毒性中的作用。

[方法] 首先采用不同剂量的 TPhP 及 CDP 对受精鸡蛋进行气室注射染毒, 孵化 6d 后评价不同剂量下鸡胚发育情况, 选取最佳剂量进行后续实验; 接着采用报告基因系统来评价 TPhP 及 CDP 对 PPAR γ 的胚胎内激活情况; 最后采用慢病毒沉默 PPAR γ , 与 TPhP 及 CDP 染毒共处理, 进一步揭示 PPAR γ 在观察到的发育毒性中所发挥的作用。

[结果] TPhP 及 CDP 发育染毒后, 在孵化 6 d 时观察到 10、30 mg·kg⁻¹ 的 TPhP 及 3、10、30 mg·kg⁻¹ 的 CDP 染毒引起鸡胚重量(以蛋重标准化)降低($P < 0.05$), 提示二者均具有一般发育毒性, CDP 毒性较高。此外 CDP 染毒还引起鸡胚矢状面脑区面积(以鸡胚体重标准化)增加($P < 0.05$), 而鸡胚矢状面眼区面积(以鸡胚体重标准化)减小($P < 0.05$), 提示 CDP 具有特异性的神经及眼发育毒性。报告基因实验结果显示, 阳性对照罗格列酮、TPhP、CDP 与对照相比均能激活 PPAR γ ($P < 0.05$), 效应强度大小: 罗格列酮 > CDP > TPhP。以 PPAR γ 沉默慢病毒实现鸡胚 PPAR γ 在体沉默, 实时荧光定量多聚核苷酸链式反应(qRT-PCR)结果显示沉默效率约为 55%。PPAR γ 在体沉默可以有效地缓解 TPhP 及 CDP 染毒引起的体重下降($P < 0.05$)以及 CDP 染毒引起的脑区扩大及眼球发育不良($P < 0.05$)。

[结论] TPhP 及 CDP 染毒在早期鸡胚均可引起一般发育毒性, CDP 毒性较高。同时, CDP 还引起特异性的脑区增大及眼球发育不良, 其机制与 PPAR γ 的激活有关。

关键词：磷酸三苯酯; 磷酸甲苯二苯酯; 发育毒性; 鸡胚; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ

Early embryonic developmental toxicity of TPhP and CDP: Roles of PPAR γ HUANG Jing^a, ZHAI Yunuo^a, LI Boyang^a, JI Jing^a, LI Chuanhai^a, LIU Shixin^b, LIU Yiman^b, YUAN Junhua^b, JIANG Qixiao^a (a. School of Public Health b. School of Basic Medicine, Qingdao University, Qingdao, Shandong 266071, China)

Abstract:

[Background] Organic phosphate flame retardants are emerging environmental pollutants. While there have been multiple toxicities reported following organic phosphate flame retardants exposure, few studies focus on their potential developmental toxicities. It is necessary to elucidate these developmental toxicological effects and underlying mechanisms to improve risk assessments and better protect sensitive populations.

[Objective] To evaluate potential developmental toxicities in early chicken embryos following exposure to triphenyl phosphate (TPhP) or cresyl diphenyl phosphate (CDP), to reveal TPhP and CDP's capabilities to activate peroxisome proliferator-activated receptor γ (PPAR γ) *in vivo* in an established chicken embryo gene reporter system, and to investigate the roles of PPAR γ in TPhP/CDP-induced developmental toxicities with lentivirus-mediated *in vivo* gene silencing.

组稿专家

陈涛(苏州大学公共卫生学院), E-mail: tchen@suda.edu.cn

张蕴晖(复旦大学公共卫生学院), E-mail: yhzhang@shmu.edu.cn

基金项目

国家自然科学基金项目(82100854); 山东省博士后创新项目(SDCX-ZG-202400024)

作者简介

黄静(2000—), 女, 硕士生;
E-mail: 13569361650@163.com

通信作者

姜启晓, E-mail: jiangq@qdu.edu.cn

作者中包含编委会成员 无

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2024-07-31

录用日期 2024-11-11

文章编号 2095-9982(2024)12-1369-08

中图分类号 R11

文献标志码 A

补充材料

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24375

►引用

黄静, 翟雨诺, 李博洋, 等. 磷酸三苯酯及磷酸甲苯二苯酯的早期胚胎发育毒性: PPAR γ 的作用 [J]. 环境与职业医学, 2024, 41(12): 1369-1375, 1383.

►本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM24375

Funding

This study was funded.

Correspondence to

JIANG Qixiao, E-mail: jiangq@qdu.edu.cn

Editorial Board Members' authorship

No

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2024-07-31

Accepted 2024-11-11

Supplemental material

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24375

► To cite

HUANG Jing, ZHAI Yunuo, LI Boyang, et al. Early embryonic developmental toxicity of TPhP and CDP: Roles of PPAR γ [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2024, 41(12): 1369-1375, 1383.

► Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM24375

[Methods] Firstly, diverse doses of TPhP and CDP were injected into the air sacs of fertilized eggs to assess the development of chicken embryos after 6 d of incubation, and an optimal dose was chosen for subsequent experiments. Subsequently, the report gene system was employed to evaluate the intraembryonic activation of PPAR γ by TPhP and CDP. Eventually, PPAR γ was silenced using lentivirus, and the embryos were co-treated with TPhP and CDP to further disclose the roles of PPAR γ in the observed developmental toxicity.

[Results] Following developmental exposure to TPhP or CDP, significantly lower chicken embryo weights (normalized with egg weights) were observed in the 6 d embryos (10, 30 mg·kg⁻¹ TPhP and 3, 10, 30 mg·kg⁻¹ CDP), indicating that both chemicals have general developmental toxicities and CDP is more potent. Additionally, exposure to CDP also resulted in remarkably increased sagittal brain area (normalized to embryo weights) and decreased sagittal eye area (normalized to embryo weights) ($P < 0.05$), suggesting that CDP has specific developmental neurotoxicity and ocular toxicity. The PPAR γ reporter gene experiment results revealed that rosiglitazone (positive control), TPhP, and CDP all significantly activated PPAR γ relative to control ($P < 0.05$). The potency order was rosiglitazone > CDP > TPhP. The lentivirus microinjection successfully achieved *in vivo* silencing of PPAR γ in developing chicken embryos, and the estimated silencing efficacy was approximately 55% according to the real-time quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) results. The *in vivo* silencing of PPAR γ effectively alleviated TPhP or CDP-induced decrease of embryo weights ($P < 0.05$), as well as CDP-induced increase of brain areas and decrease of eye areas ($P < 0.05$).

[Conclusions] Both TPhP and CDP can induce general developmental toxicities in early chicken embryos, and CDP is more potent than TPhP. Meanwhile, CDP can induce specific enlarged brain area and decreased eye area. The observed toxicities are associated with *in vivo* activation of PPAR γ .

Keywords: triphenyl phosphate; cresyl diphenyl phosphate; developmental toxicity; chicken embryo; peroxisome proliferator-activated receptor γ

有机阻燃剂是多种卤代或有机磷酸盐化学品,它们被添加到制造材料中以提高其防火安全性^[1]。根据欧洲阻燃剂协会(Flame Retardants Association, FRA)的数据,欧洲阻燃剂的总消费量为46.5万t,其中10%是溴化阻燃剂,20%是磷系阻燃剂^[2]。随着全球对溴化阻燃剂限制措施逐步加强,有机磷阻燃剂(organophosphorus flame retardant, OPFR)作为其主要替代品,在过去十年中的应用量迅速增长^[3]。据报道,2018年全球对OPFR的需求达到 1.00×10^6 t,且持续增长^[4]。OPFR属于有机磷酸酯的一类,由于大多数情况下,为了降低成本和提高生产效率,有机磷酸酯被直接物理混合到材料中,而不是通过化学键与材料结合,因而很容易通过挥发和磨损,从各种消费品排放到环境中。随着使用量的增加,可能造成普遍的环境污染,影响范围包括地表水、室内空气、沉积物、饮用水、野生动物等^[5]。一些毒理学研究表明,某些有机磷酸酯暴露会干扰内分泌系统,导致发育毒性、遗传毒性和生殖毒性^[6]。

磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPhP)和磷酸甲苯二苯酯(cresyl diphenyl phosphate, CDP)属于新型OPFR^[7]。TPhP属于芳香族有机磷酸酯阻燃剂,现已被用作玩具、家具和电气产品的阻燃剂,也被广泛用作液压流体和湖泊中的增塑剂。由于TPhP不能与材料结合成化学键,所以很容易被释放到周围环境中,有研究已经表明,在各种环境和生物群样品中广泛检测

到TPhP及其代谢物^[8],例如,在废水中检测到的TPhP质量浓度(后简称为浓度)范围为4.4~14 000 ng·L⁻¹^[9],室内粉尘中TPhP的质量分数范围为34.1~62 100 ng·g⁻¹^[10]。2010年至2015年期间收集的尿样中TPhP主要的代谢物磷酸二苯酯(diphenyl phosphate, DPHP)^[11],浓度显著高于2002年和2003年收集的尿样中DDHP浓度^[12]。

CDP是OPFR中一种值得注意的新变体,其特征是芳基磷酸结构,作为新兴的阻燃剂和增塑剂,已在环境介质中检出,例如粉尘、城市地表水、污水污泥和纺织品。在英国Davyhulme污水处理厂检测的曼彻斯特运河水中,CDP浓度为53 ng·L⁻¹^[7]。在西班牙Valencia污水处理厂中,CDP浓度为23.7 μ g·L⁻¹^[13]。CDP在结构上是基于TPhP的衍生物,两者都具有芳基磷酸结构,可能具有类似的毒性作用,但是各自的特征官能团有所不同,由于CDP是新型OPFR,故缺少大规模人群暴露情况。CDP与TPhP相比是较为新型的OPFR,二者的不同作用结果可以用来探究新旧OPFR的不同危害。

TPhP是一种内分泌干扰物^[14],可诱导发育和生殖毒性^[15]、神经毒性及心脏毒性^[16]。流行病学研究表明,TPhP及其代谢物DDHP可以在人胎盘中积累,产前暴露于TPhP与儿童低出生体重或异常神经行为呈正相关^[17]。而CDP作为TPhP的新型衍生物,也具有明显的发育毒性^[18],但具体效应和分子机制还需

进一步研究。本研究选择发育毒性的经典模型——鸡胚,进一步阐明 TPhP 及 CDP 的早期发育毒性。鸡胚模型符合“3R”的替代毒理原则,已经从经典的发育生物模型变为新兴的替代毒理研究模型,其具有可精准控制暴露剂量,胚胎相对较大易于观察和操作,封闭系统排除母体效应等优点,已经成为传统哺乳动物模型的良好补充。

过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 是一种配体激活的核转录因子,属于核受体超家族,控制大量基因的表达,特别是脂代谢相关基因。PPAR γ 在各种器官组织广泛表达,对器官组织的正常发育及功能维持起重要作用^[19]。在胚胎发育过程中,PPAR γ 对神经系统和眼球的正常发育起重要作用^[20-21]。已有文献表明,TPhP 能够通过激活 PPAR γ 介导的脂质代谢诱导内质网应激和细胞凋亡,损害胎盘功能和胎儿发育^[22]。基于 TPhP 和 CDP 在结构上的相似性及实验组成员的预实验,CDP 激活 PPAR γ 的可能性大,故本研究选择 PPAR γ 为 TPhP 及 CDP 的潜在分子靶点,以体内报告基因技术及慢病毒沉默技术,揭示 PPAR γ 在 TPhP 及 CDP 诱导鸡胚发育毒性中的作用。本研究可为 TPhP 及 CDP 的发育毒性风险评估及进一步深入机制研究提供重要的依据。

1 对象与方法

1.1 实验动物

本研究中使用的受精鸡蛋(*Gallus gallus*)购自河堤农场(中国山东济宁),为纯种芦花鸡,清洗称重分组后放入孵化箱(型号 KFX,中国山东德州科裕),按标准程序进行孵化(温度 37.9 °C,湿度 50%,翻蛋间隔 180 min)至 6 d,由孵化箱自动控制条件。

1.2 主要试剂与仪器

1.2.1 试剂 碘伏消毒液(中国山东万护洁医疗用品有限公司),无水乙醇(中国国药集团化学试剂有限公司),4%多聚甲醛(中国广州赛国生物科技有限公司)。TPhP 分析标准品,≥99.8%(色谱纯);CDP 98%异构体混合物(中国上海麦克林生化科技股份有限公司)。慢病毒(对照慢病毒、报告基因病毒和 PPAR γ 沉默慢病毒)由中国上海吉凯基因医学科技股份有限公司设计和合成,具体序列及病毒设计见补充材料图 S1、表 S1、图 S2、表 S2。实验程序中涉及的其他化学品和实验室用品均为能购得的最高质量用品。

1.2.2 仪器 全自动孵化箱(KF264,中国德州市科裕

孵化设备有限公司),超速低温离心机(Sigma 1-16K,德国 Sigma),体视显微镜(XPZ-830TI,中国桂林桂光仪器制造有限责任公司),光学显微镜(BX53,日本 Olympus),荧光动物成像仪(IVIS Lumina II,美国马萨诸塞州 Caliper Life Sciences),M5 HiPer SYBR Premix EsTaq(中国北京聚合美生物科技有限公司)和 LightCycler480 II(瑞士巴塞尔 Roche)。

1.3 TPhP 和 CDP 染毒液的配制

TPhP 为不溶于油的固体,碾压为粉末后,以葵花籽油(气室注射的基本溶剂)配制成 10、30、100、300 mg·mL⁻¹ 的混悬液,充分涡旋。CDP 为液体,直接溶于葵花籽油,直接配成 10、30、100、300 mg·mL⁻¹ 的溶液。鸡胚气室染毒的染毒液配制方法参考了 Jiang 等^[23] 的研究,其中的数据证明,粉末状的全氟辛酸配为混悬液,充分振荡后气室注射能有效地令孵化雏鸡血清中全氟辛酸水平剂量依赖性升高,提示该方法配制的染毒液稳定可靠,该方法已广泛用于相关气室注射研究^[24]。TPhP 粉末性状与全氟辛酸基本相同,且数据也呈现明显的剂量依赖性。另一方面,CDP 与油互溶为稳定的液体,染毒效果亦有保证。染毒剂量依据为之前已发表的 TPhP 及 CDP 的相关研究^[13,25]。

1.4 鸡胚染毒方法

1.4.1 气室注射染毒 本实验采用经典的气室注射染毒法^[26]对胚胎孵化 0 d(ED 0)的受精鸡蛋进行 TPhP 或 CDP 染毒。首先在暗室使用专用光源照蛋,用铅笔标记气室,后以 70%的乙醇对气室注射区域灭菌,然后在气室注射区域的中心用消毒过的金属探针钻一个小孔(直径 1 mm),以 0.1 μ L·g⁻¹(以蛋重计,后同)的注射容积将配置好的染毒液注入气室中,该容积来自成熟的气室注射染毒研究^[13],结合计算好的染毒液浓度,恰好可达到要求的染毒剂量(10 mg·mL⁻¹ 染毒液对应 1 mg·kg⁻¹ 染毒剂量,以此类推)。TPhP 混悬液在每次注射前均经过充分涡旋以确保颗粒的均匀分布。注射后,用石蜡封口,鸡蛋放入孵箱开始孵化。

1.4.2 胚胎微注射慢病毒转染 按本课题组建立的胚胎微注射慢病毒转染方法^[27],进行 PPAR γ 报告基因慢病毒或 PPAR γ 沉默慢病毒的转染。以无菌生理盐水将慢病毒稀释为 3×10^8 TU·mL⁻¹ 的工作液(TU: 转导单位),在无菌橱中,将 ED 2 鸡胚的气室部分蛋壳打开一个直径 2~3 mm 的小洞,在目视确认内膜的前提下,以微量注射器将 0.05 μ L·g⁻¹ 的病毒工作液注入内膜正中深度 2~3 mm 处,后以胶带封口,鸡胚放回孵箱继续孵化。

1.5 实验设计

1.5.1 评价各剂量 TPhP 及 CDP 对鸡胚发育的影响

尚未发育的受精鸡蛋按蛋重平均分配到 9 个处理组: 对照组、TPhP 1 mg·kg⁻¹ 组、TPhP 3 mg·kg⁻¹ 组、TPhP 10 mg·kg⁻¹ 组、TPhP 30 mg·kg⁻¹ 组、CDP 1 mg·kg⁻¹ 组、CDP 3 mg·kg⁻¹ 组、CDP 10 mg·kg⁻¹ 组、CDP 30 mg·kg⁻¹ 组, 每组 8 个。以前文所述的鸡胚气室注射染毒法进行染毒, 放入孵箱孵化 6 d 取出胚胎, 称重, 以 4% 多聚甲醛固定, 以 XPZ-830TI 体视显微镜拍照, 以 ImageJ (1.53a, 美国国立卫生研究院) 对照片中胚胎矢状面脑和眼面积进行测量。

1.5.2 通过 PPAR γ 报告基因直接评价 TPhP 及 CDP 在体内激活 PPAR γ 的能力

尚未发育的受精鸡蛋按蛋重平均分配到 5 个处理组: 对照组、PPAR γ 报告基因病毒 (PPAR γ reporter virus, PRV) 组、PPAR γ 报告基因病毒+2.5 mg·kg⁻¹ 罗格列酮 (PRV+罗格列酮) 组、PPAR γ 报告基因病毒+10 mg·kg⁻¹ TPhP (PRV+TPhP) 组、PPAR γ 报告基因病毒+10 mg·kg⁻¹ CDP (PRV+CDP) 组, 每组 6 个。开始孵化前, 首先如前所述进行 TPhP 和 CDP 的气室注射染毒, 孵化 2 d, 如前所述进行报告基因病毒的微注射以及 2.5 mg·kg⁻¹ 罗格列酮气室注射, 继续孵化 6 d, 取出新鲜胚胎, 以冷的磷酸盐缓冲液 (phosphate buffered saline, PBS) 漂洗后, 使用荧光动物成像仪针对报告基因病毒所表达的绿荧光蛋白进行成像, 成像参数统一为: 荧光激发光谱 480 nm, 荧光发射光谱 520 nm, 曝光时间 90 s。后以仪器自带软件 Living image 软件 (IVIS Lumina II 美国马萨诸塞州 Caliper Life Sciences) 进行定量分析。

1.5.3 通过 PPAR γ 沉默病毒进一步确认 PPAR γ 在 TPhP 及 CDP 所诱导发育毒性中所起的作用

尚未发育的受精鸡蛋按蛋重平均分配到 7 个处理组: 对照组、CDP 10 mg·kg⁻¹ 组、TPhP 10 mg·kg⁻¹ 组、对照病毒 (control virus, CV) 组、PPAR γ 病毒组 (PPAR γ virus, PV) 组、10 mg·kg⁻¹ TPhP + PPAR γ 病毒 (TPV) 组、10 mg·kg⁻¹ CDP + PPAR γ 病毒 (DPV) 组。其中对照、CV、PV 组各 10 个, 其他组各 8 个。开始孵化前, 首先如前所述进行 TPhP 和 CDP 的气室注射染毒, 孵化 2 d, 如前所述进行对照慢病毒或 PPAR γ 沉默慢病毒的微注射, 继续孵化 6 d, 取出胚胎, 对照、CV 及 PV 组各取 3 个胚胎迅速液氮冻存以备实时荧光定量多聚核苷酸链式反应 (real-time quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR), 其余胚胎以 4% 多聚甲醛固定, 以 XPZ-830TI

体视显微镜拍照, 以 ImageJ (1.53a, 美国国立卫生研究院) 对照片中胚胎矢状面脑和眼面积进行测量。

1.6 qRT-PCR

用 Trizol 试剂 (中国上海雅酶) 从孵化 6 d 鸡胚组织中提取 mRNA, 并使用 Evo M-MLV RT Mix 试剂盒 (中国湖南艾科瑞生物工程有限公司) 进行逆转录, 然后使用 M5 HiPer SYBR Premix EsTaq 和 LightCycler480 II 对 PPAR γ 的 mRNA 表达水平进行 qRT-PCR。每组测试来自独立动物的 3 个样本。研究中使用的 PPAR γ 引物由中国生工生物工程 (上海) 股份有限公司设计和合成。本研究中使用的引物序列如下: PPAR γ , 正向引物 CGAATGCCACAAGCGGAGAAGG, 反向引物 CACTGCCTC-CACAGAGCGAAAC; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH), 正向引物 CAGGTGCTGAGTATGTTGTGGAGTC, 反向引物 CGTCTT-CTGTGTGGCTGTGATGG。

1.7 统计学分析

采用 SPSS 25.0 进行统计学分析。所有数据均采用均数±标准差表示。在仅 TPhP 或仅慢病毒实验中, 使用单因素方差分析 (方差分析) 来检测组间的差异, 当方差分析返回显著性结果时, 使用事后最小显著性差异检验来比较组间的差异。当 TPhP/CDP 和慢病毒共同应用时, 采用析因设计方差分析来分析每个因素的影响。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 TPhP 及 CDP 发育染毒后 6 d 鸡胚改变

如图 1 所示, 与对照组相比, TPhP 10、30 mg·kg⁻¹ 发育染毒后, 以及 CDP 3、10、30 mg·kg⁻¹ 发育染毒后引起全胚胎体重 (标化到蛋重) 降低 ($P<0.05$), 同时 CDP 10、30 mg·kg⁻¹ 的发育染毒还令胚胎矢状面脑区面积 (标化到胚胎重) 增大 ($P<0.05$), 而矢状面眼面积 (标化到胚胎重) 减小 ($P<0.05$)。

2.2 TPhP 及 CDP 发育染毒在 6 d 鸡胚的报告基因荧光强度测定

如图 2 所示, 2.5 mg·kg⁻¹ 罗格列酮、10 mg·kg⁻¹ TPhP 或 10 mg·kg⁻¹ CDP 的发育暴露均在以 PPAR γ 报告基因慢病毒转染后的 6 d 鸡胚引起明显的绿荧光强度上升 ($P<0.05$), 表明 TPhP 或 CDP 染毒均显著升高 PPAR γ 转录活性, 其中罗格列酮效应最强, CDP 次之, TPhP 最弱。

2.3 PPAR γ 卵内慢病毒在体沉默的验证

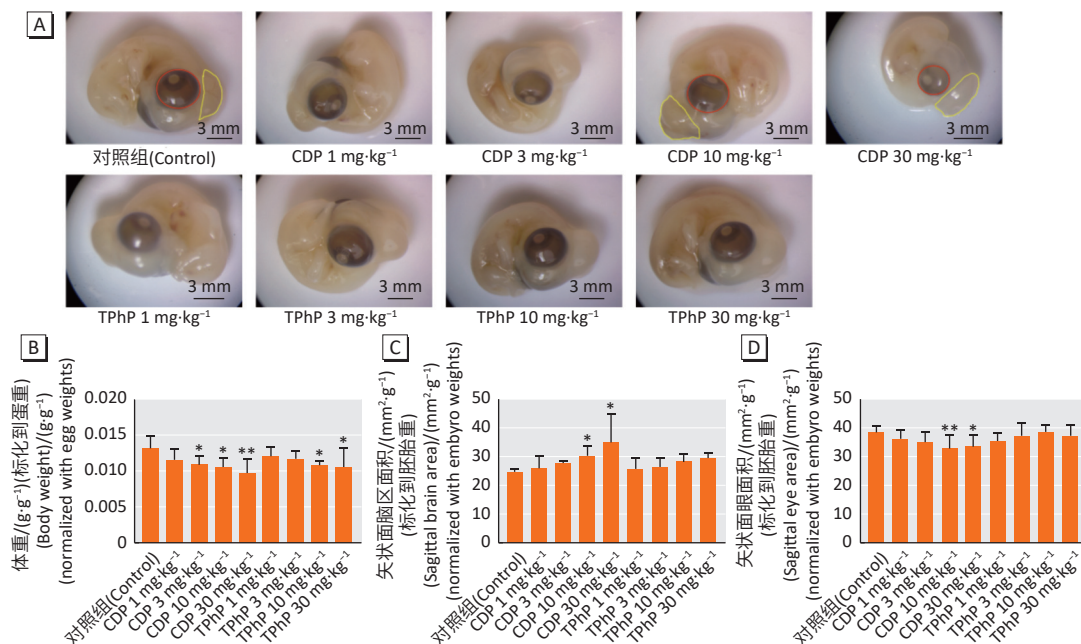
取 PPAR γ 沉默慢病毒转染后的 6 d 鸡胚行 PCR 检

测 PPAR γ 表达水平,发现沉默效率达 55%,卵内沉默有效。

2.4 PPAR γ 沉默对 TPhP 及 CDP 诱导的鸡胚毒性作用

如图 3 所示,与对照组相比,TPhP 10 mg·kg⁻¹ 或 CDP 10 mg·kg⁻¹ 发育染毒后引起全胚胎体重(标化到蛋

重)降低($P < 0.05$),而 PPAR γ 在体沉默有效逆转这一改变,与此同时,CDP 10 mg·kg⁻¹ 发育染毒引起的胚胎矢状面脑区面积(标化到胚胎重)增大及矢状面眼面积(标化到胚胎重)减小均能被 PPAR γ 在体沉默有效逆转($P < 0.05$)。

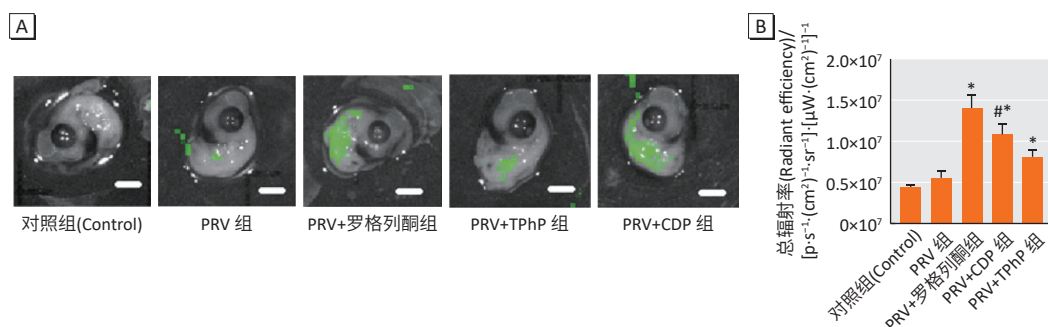


[注] A: 6 d 剂量组鸡胚组织活体成像代表性图片, $n=6\sim8$ (下同)。红色圆形区域示矢状面眼面积,黄色不规则区域示矢状面脑面积。B: 6 d 剂量组鸡胚体重量化结果。C: 6 d 剂量组鸡胚矢状面脑区面积量化结果。D: 6 d 剂量组鸡胚矢状面眼面积量化结果。与对照组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

[Note] A: Representative live imaging of chicken embryo tissue at 6 d, $n=6\sim8$ (same for subsequent figures). Red circular area indicates the area of the eye in the sagittal plane, and yellow irregular area indicates the area of the brain in the sagittal plane. B: Quantitative results of chicken embryo weight at 6 d. C: Quantitative results of the area of brain regions in the sagittal plane of chicken embryos at 6 d. D: Quantitative results of the area of the eye in the sagittal plane of chicken embryos at 6 d. Compared with the control group, *: $P < 0.05$. **: $P < 0.01$.

图 1 TPhP 及 CDP 发育染毒后 6 d 鸡胚改变

Figure 1 Evaluation of the changes in embryonic day 6 chicken embryos following developmental exposure to TPhP and CDP

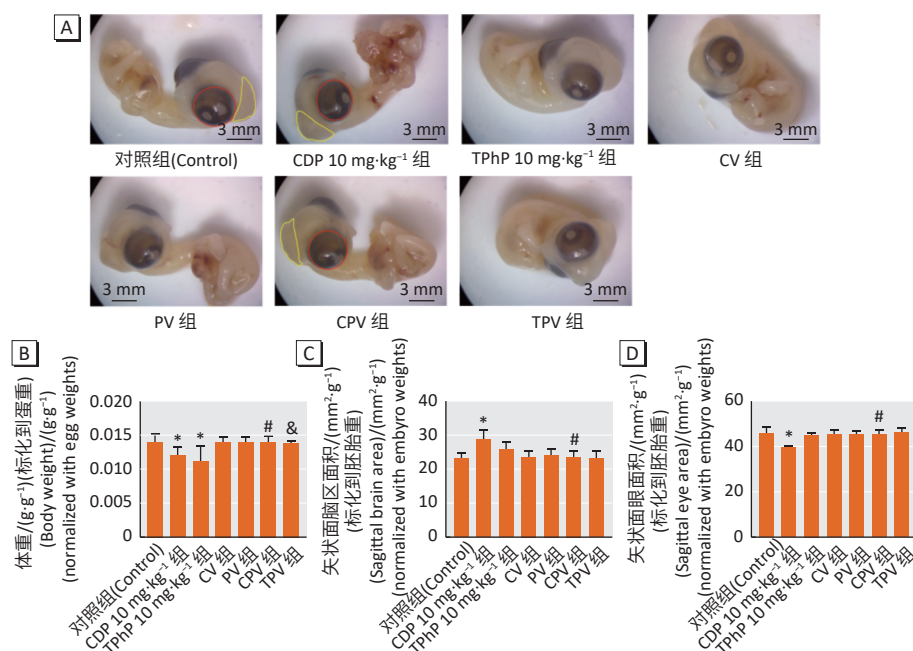


[注] A: 6 d 鸡胚报告基因代表性图片, 标尺=5 mm, PPAR γ 报告基因病毒(PPAR γ reporter virus, PRV)组、PPAR γ 报告基因病毒+ 2.5 mg·kg⁻¹ 罗格列酮(PRV+罗格列酮)组、PPAR γ 报告基因病毒+ 10 mg·kg⁻¹ TPhP(PRV+TPhP)组、PPAR γ 报告基因病毒+ 10 mg·kg⁻¹ CDP(PRV+CDP)组。B: 6 d 鸡胚报告基因成像量化结果, $n=3\sim5$ 。*: 与对照组相比, $P < 0.05$; #: 与报告基因病毒+TPhP 组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] A: Representative images of chicken embryo reporter genes at 6 d, bar=5 mm, PPAR γ reporter virus (PRV) group, PPAR γ reporter virus plus 2.5 mg·kg⁻¹ rosiglitazone (PRV+rosiglitazone) group, PPAR γ reporter virus plus 10 mg·kg⁻¹ TPhP (PRV+TPhP) group, PPAR γ reporter virus plus 10 mg·kg⁻¹ CDP (PRV+CDP) group. B: Quantitative results of 6 d chicken embryo reporter gene imaging, $n=3\sim5$. Compared with the control group, *: $P < 0.05$. Compared with the PRV+TPhP group, #: $P < 0.05$.

图 2 胚胎 PPAR γ 报告基因荧光强度测定

Figure 2 Embryonic PPAR γ reporter gene fluorescence intensity



[注] A: 6 d PPAR γ 慢病毒沉默组鸡胚活体成像代表图, 标尺=3 mm, TPhP 剂量 10 mg·kg⁻¹, CDP 剂量 10 mg·kg⁻¹, 对照病毒组(control virus, CV)、PPAR γ 病毒组(PPAR γ virus, PV)组、10 mg·kg⁻¹ TPhP+PPAR γ 病毒(TPV)组、10 mg·kg⁻¹ CDP+PPAR γ 病毒(DPV)组。n=5~6(下同)。红色圆形区域示矢状面眼区面积, 黄色不规则区域示矢状面脑区面积。B: 6 d 病毒组鸡胚体重量量化结果。C: 6 d 病毒组鸡胚矢状面脑区面积量化结果。D: 6 d 病毒组鸡胚矢状面眼区面积量化结果。*: 与对照组相比, $P<0.05$; #: 与 CDP 相比, $P<0.05$; &: 与 TPhP 相比, $P<0.05$ 。

[Note] A: *In vivo* imaging representation of chicken embryos in the 6 d PPAR γ -lentivirus silencing group, bar=3 mm, TPhP dose 10 mg·kg⁻¹, CDP dose 10 mg·kg⁻¹, control virus group (control virus, CV), PPAR γ virus group (PPAR γ virus, PV), 10 mg·kg⁻¹ TPhP + PPAR γ virus group (TPV), 10 mg·kg⁻¹ CDP + PPAR γ virus group (DPV). n=5-6 (the same below). The red circular area shows the area of the sagittal eye area, and the yellow irregular area shows the area of the sagittal brain area. B: The quantitative results of chicken embryo weight in the 6 d virus group. C: Quantitative results of sagittal brain area of chicken embryo in the 6 d virus group. D: 6 d virus group eye area quantization results, *: Compared with the control group, $P<0.05$; #: Compared with the CDP group, $P<0.05$; &: Compared with the TPhP group, $P<0.05$.

图3 PPAR γ 慢病毒沉默组鸡胚改变

Figure 3 Evaluation of the changes of chicken embryo in PPAR γ -lentivirus silencing group

3 讨论

本研究使用早期鸡胚为模型, 在多个剂量下评价了 TPhP 与 CDP 的发育毒性, 在仅使用单次染毒, 且剂量与其他研究多次染毒的每次剂量相当或更低的情况下, 观察到两者暴露对早期鸡胚均产生发育迟缓的效果, 出现一般发育毒性, 而 CDP 还明显影响了大脑及眼球发育, 机制与 PPAR γ 有关。

有机磷阻燃剂的发育毒性已经获得广泛的研究和报道。例如有机磷阻燃剂暴露可能与广泛的不良健康结果有关, 包括流产、妊娠期改变和出生体重减少、孕产妇和新生儿甲状腺功能障碍、儿童代谢失调和异常生长、神经发育受损和免疫反应变化^[28]。具体到本研究的 TPhP 及 CDP, 已有研究表明 TPhP 在胎盘中积累, 扰乱胎盘激素分泌, 损害胎盘血管生成并损害妊娠结局^[22]; 慢性暴露于 CDP 28 d 显著抑制斑马鱼的生长^[29]。在本研究中, 在鸡胚发育前进行 TPhP 或 CDP 的一次性染毒, 当鸡胚发育到 6 d 时, 观察到 TPhP(10、30 mg·kg⁻¹)及 CDP(3、10、30 mg·kg⁻¹)引起胚胎与蛋重

之比下降, 提示出现典型的发育迟缓效果。TPhP 与 CDP 的趋势类似, 但 CDP 相较 TPhP, 引起体重降低所需剂量更低, 提示其毒性更强。在已有文献中, 未找到直接的 TPhP 与 CDP 体内毒性对比的研究, 本研究首次提出 CDP 的体内一般发育毒性较 TPhP 更强。本研究中使用的剂量与已有其他研究类似或更低。例如, 产前 TPhP 暴露会损害胎盘发育一文中, 采用 1 mg·kg⁻¹·d⁻¹ TPhP 的宫内暴露, 连续暴露 12 和 18 d^[18], 而本研究中采用一次性的 1~30 mg·kg⁻¹ 暴露。与现实世界水平比较, 一般人群 TPhP 及 CDP 内暴露水平一般较低, 据 Hou 等^[30]的研究, 血清水平最高分别为 7.52 及 1.10 ng·mL⁻¹, 显著低于动物研究水平, 提示一般人群该风险低。但是环境中存在局部污染水平较高的情况, 例如丹麦环境保护署曾报告河水中 TPhP 质量浓度达 7.9 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 河泥中则可达 4 mg·kg⁻¹, 鱼肉中最高可达 0.6 mg·kg⁻¹^[2], 提示在特定高污染地区可能存在一定风险。除一般毒性之外, CDP 的发育染毒还在 6 d 鸡胚中产生两个特异的终点: 脑区的相对扩大

及眼球的相对缩小(在以胚胎重量标准化后),而TPhP的发育染毒产生了脑区扩大的趋势但未达统计学差异,对眼球则无明显效应。胚胎发育中脑区的异常扩大(包括脑室扩大、脑积水等)是典型的神经发育异常表现^[31],就我们所知,本研究是首次对CDP此效应的报告,提示CDP较TPhP具有更高的神经发育毒性风险。而胚胎发育中眼球发育不良也是一种典型改变,提示毒物干扰眼球发育所需的信号通路^[32]。综上所述,CDP出现两个TPhP不具备或者说作用很弱的特异毒性效应,提示其较TPhP具有更高的潜在发育毒性及人类健康风险。

PPAR γ 属于PPAR核受体家族,其感受脂肪酸,调控多个主要与脂肪酸代谢相关的下游基因,在脂肪酸代谢,脂肪细胞分化等方面发挥重要的调控作用^[33]。具体到胚胎发育,PPAR γ 也发挥相当重要的作用,各种应激源(包括缺氧和炎症)通过改变PPAR γ 的表达或活性,从而导致妊娠并发症^[34],也影响神经系统和眼球的发育^[20-21]。已有环境毒物通过对PPAR γ 信号通路的扰动发挥毒性作用的报道^[13]。具体到本研究,TPhP对PPAR γ 的激活作用已有明确文献报道^[35],但CDP尚未有相关研究。考虑到CDP与TPhP结构上的相似性,以及研究团队成员的预实验结果,CDP能激活PPAR γ 的可能性大。本研究中,采用PPAR γ 报告基因法,在体转染发育中的鸡胚,使之在PPAR γ 激活时合成绿荧光蛋白,以此得到相对直接的PPAR γ 是否激活的证据。结果显示,作为阳性对照的罗格列酮在鸡胚中生成最强的绿色荧光,而CDP染毒造成的绿色荧光紧随其后。TPhP也能产生阳性荧光信号,但其程度不及CDP。这些结果提示,CDP能在胚胎体内环境中有效地激活PPAR γ ,其效应较TPhP更强。综合考虑之前结果显示的CDP引起发育迟缓效应强于TPhP,以及CDP特异性地引起脑区扩大及眼球发育不良,对PPAR γ 的异常激活可能是CDP引起早期鸡胚发育毒性的关键机制之一。进一步验证该假说,合成了PPAR γ 在体沉默慢病毒,使用研究团队建立的成熟的鸡胚在体沉默技术,实现了在发育中鸡胚中PPAR γ 的敲低,在此模型中,TPhP及CDP的毒性效应均得到有效的缓解,进一步确认了PPAR γ 在TPhP及CDP毒性效应中的作用。

本研究结果提示了TPhP及CDP的早期胚胎发育毒性,特别是CDP还存在特异性的针对大脑及眼的发育毒性,但是值得注意的是,由于人群暴露数据较少,本实验所用剂量及暴露时间与人群暴露水平关系尚待进一步确认,且本实验模型为鸡胚,其结果是否能

外推到人类或其他物种,还需要进一步的研究。未来需要进一步优化染毒剂量及间隔,以求在真实世界人群暴露水平及时间下进行更完善的风险评估及机制探讨。

参考文献

- [1] BLUM A, BEHL M, BIRNBAUM LS, et al. Organophosphate ester flame retardants: are they a regrettable substitution for polybrominated diphenyl ethers?[J]. *Environ Sci Technol Lett*, 2019, 6(11): 638-649.
- [2] VAN DER VEEN I, DE BOER J. Phosphorus flame retardants: properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(10): 1119-1153.
- [3] HUANG J, YE L, FANG M, et al. Industrial production of organophosphate flame retardants (OPFRs): big knowledge gaps need to be filled?[J]. *Bull Environ Contam Toxicol*, 2022, 108(5): 809-818.
- [4] CHEN X, ZHAO X, SHI Z. Organophosphorus flame retardants in breast milk from Beijing, China: occurrence, nursing infant's exposure and risk assessment[J]. *Sci Total Environ*, 2021, 771: 145404.
- [5] SAILLENFAIT A M, NDAW S, ROBERT A, et al. Recent biomonitoring reports on phosphate ester flame retardants: a short review[J]. *Arch Toxicol*, 2018, 92(9): 2749-2778.
- [6] WANG C, CHEN H, LI H, et al. Review of emerging contaminant tris(1, 3-dichloro-2-propyl)phosphate: environmental occurrence, exposure, and risks to organisms and human health[J]. *Environ Int*, 2020, 143: 105946.
- [7] JIN Y, SHI H, ZHAO Y, et al. Organophosphate ester cresyl diphenyl phosphate disrupts lipid homeostasis in zebrafish embryos[J]. *Environ Pollut*, 2024, 342: 123149.
- [8] WU M, YU G, CAO Z, et al. Characterization and human exposure assessment of organophosphate flame retardants in indoor dust from several microenvironments of Beijing, China[J]. *Chemosphere*, 2016, 150: 465-471.
- [9] RAMESH M, ANGITHA S, HARITHA S, et al. Organophosphorus flame retardant induced hepatotoxicity and brain AChE inhibition on zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2020, 82: 106919.
- [10] PERCY Z, LA GUARDIA M J, XU Y, et al. Concentrations and loadings of organophosphate and replacement brominated flame retardants in house dust from the home study during the PBDE phase-out[J]. *Chemosphere*, 2020, 239: 124701.
- [11] SU G, CRUMP D, LETCHER R J, et al. Rapid in vitro metabolism of the flame retardant triphenyl phosphate and effects on cytotoxicity and mRNA expression in chicken embryonic hepatocytes[J]. *Environ Sci Technol*, 2014, 48(22): 13511-13519.
- [12] HONG X, CHEN R, HOU R, et al. Triphenyl phosphate (TPHP)-induced neurotoxicity in adult male Chinese rare minnows (*Gobiocypris rarus*) [J]. *Environ Sci Technol*, 2018, 52(20): 11895-11903.
- [13] JIANG D, XU Y, HAN X, et al. Cresyl Diphenyl Phosphate exposure induces reproductive functional defects in men and male mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2024, 271: 116003.
- [14] GUIGUENO M F, HEAD J A, LETCHER R J, et al. Early life exposure to triphenyl phosphate: effects on thyroid function, growth, and resting metabolic rate of Japanese quail (*Coturnix japonica*) chicks[J]. *Environ pollut*, 2019, 253: 899-908.
- [15] ZHAO F, CHEN M, GAO F, et al. Organophosphorus flame retardants in pregnant women and their transfer to chorionic villi[J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(11): 6489-6497.

(下转第 1383 页)

- [27] LIU X, CAI Y, WANG Y, et al. Effects of tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) and triphenyl phosphate (TPP) on sex-dependent alterations of thyroid hormones in adult zebrafish[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, 170: 25-32.
- [28] PERELLO M, ÇAKIR I, CYR N E, et al. Maintenance of the thyroid axis during diet-induced obesity in rodents is controlled at the central level[J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2010, 299(6): E976-E989.
- [29] CHENG H, YAN W, WU Q, et al. Parental exposure to microcystin-LR induced thyroid endocrine disruption in zebrafish offspring, a transgenerational toxicity[J]. *Environ Pollut*, 2017, 230: 981-988.
- [30] LIU Y W, LO L J, CHAN W K. Temporal expression and T3 induction of thyroid hormone receptors $\alpha 1$ and $\beta 1$ during early embryonic and larval development in zebrafish, *Danio rerio*[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2000, 159(1/2): 187-195.
- [31] REN X, WANG W, ZHAO X, et al. Parental exposure to tris(1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate results in thyroid endocrine disruption and inhibition of growth in zebrafish offspring[J]. *Aquat Toxicol*, 2019, 209: 132-141.
- [32] LAZCANO I, PECH-POOL S M, OLVERA A, et al. The importance of thyroid hormone signaling during early development: Lessons from the zebrafish model[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2023, 334: 114225.
- [33] MANCHADO M, INFANTE C, ASENSIO E, et al. Thyroid hormones down-regulate thyrotropin β subunit and thyroglobulin during metamorphosis in the flatfish Senegalese sole (*Solea senegalensis* Kaup)[J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2008, 155(2): 447-455.
- [34] MORGADO I, CAMPINHO MA, COSTA R, et al. Disruption of the thyroid system by diethylstilbestrol and ioxynil in the sea bream (*Sparus aurata*) [J]. *Aquat Toxicol*, 2009, 92(4): 271-280.
- [35] OROZCO A, VALVERDE-R C. Thyroid hormone deiodination in fish[J]. *Thyroid*, 2005, 15(8): 799-813.
- [36] HU Q, LIU Z, GAO Y, et al. Waterborne exposure to microcystin-LR alters thyroid hormone levels, iodothyronine deiodinase activities, and gene transcriptions in juvenile zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Chemosphere*, 2020, 241: 125037.
- [37] SLOTKIN T A, SEIDLER F J, FUMAGALLI F. Targeting of neurotrophic factors, their receptors, and signaling pathways in the developmental neurotoxicity of organophosphates in vivo and in vitro[J]. *Brain Res Bull*, 2008, 76(4): 424-438.
- [38] FAN C Y, COWDEN J, SIMMONS S O, et al. Gene expression changes in developing zebrafish as potential markers for rapid developmental neurotoxicity screening[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2010, 32(1): 91-98.
- [39] CHEN L, YU K, HUANG C, et al. Prenatal transfer of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) results in developmental neurotoxicity in zebrafish larvae[J]. *Environ Sci Technol*, 2012, 46(17): 9727-9734.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 张晨晨, 王晓宇)

(上接第 1375 页)

- [16] FENG L, OUYANG F, LIU L, et al. Levels of urinary metabolites of organophosphate flame retardants, TDCIPP, and TPHP, in pregnant women in Shanghai[J]. *J Environ Public Health*, 2016, 2016: 9416054.
- [17] DOHERTY B T, HOFFMAN K, KEIL A P, et al. Prenatal exposure to organophosphate esters and behavioral development in young children in the Pregnancy, Infection, and Nutrition Study[J]. *NeuroToxicology*, 2019, 73: 150-160.
- [18] LIU Q, JIANG M, LU X, et al. Prenatal triphenyl phosphate exposure impairs placentation and induces preeclampsia-like symptoms in mice[J]. *Environ Res*, 2024, 257: 119159.
- [19] JANANI C, RANJITHA KUMARI B D. PPAR gamma gene-A review[J]. *Diabetes Metab Syndr*, 2015, 9(1): 46-50.
- [20] WADA K, KAMISAKI Y. Role of PPARgamma in the development of the central nervous system[J]. *Nihon Yakurigaku Zasshi*, 2003, 122(4): 301-308.
- [21] FAN X, XU M, REN Q, et al. Downregulation of fatty acid binding protein 4 alleviates lipid peroxidation and oxidative stress in diabetic retinopathy by regulating peroxisome proliferator-activated receptor γ -mediated ferroptosis[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(4): 10540-10551.
- [22] HONG J, JIANG M, GUO L, et al. Prenatal exposure to triphenyl phosphate activated PPAR γ in placental trophoblasts and impaired pregnancy outcomes[J]. *Environ Pollut*, 2022, 301: 119039.
- [23] JIANG Q, LUST R M, STRYNAR M J, et al. Perfluorooctanoic acid induces developmental cardiotoxicity in chicken embryos and hatchlings[J]. *Toxicology*, 2012, 293(1/3): 97-106.
- [24] GUO Y, YUAN J, NI H, et al. Perfluorooctanoic acid-induced developmental cardiotoxicity in chicken embryo: roles of miR-490-5p[J]. *Environ Pollut*, 2022, 312: 120022.
- [25] HOFFMAN K, BUTT C M, WEBSTER T F, et al. Temporal trends in exposure to organophosphate flame retardants in the United States[J]. *Environ Sci Technol Lett*, 2017, 4(3): 112-118.
- [26] JIANG Q, XU X, NI H, et al. In ovo early-in-life inhalation exposure to gas/aerosol with a chicken embryo model[M]//PAN X P, ZHANG B H. Environmental Toxicology and Toxicogenomics. New York: Humana, 2021: 197-201.
- [27] ZHAO M, JIANG Q, GENG M, et al. The role of PPAR alpha in perfluorooctanoic acid induced developmental cardiotoxicity and L-carnitine mediated protection-Results of *in ovo* gene silencing[J]. *Environ Toxicol Pharmacol*, 2017, 56: 136-144.
- [28] SHAHIN S, MEDLEY E A, NAIDU M, et al. Exposure to organophosphate esters and maternal-child health[J]. *Environ Res*, 2024, 252: 118955.
- [29] YAN Z, FENG C, JIN X, et al. Organophosphate esters cause thyroid dysfunction via multiple signaling pathways in zebrafish brain[J]. *Environ Sci Ecotechnol*, 2022, 12: 100198.
- [30] HOU M, FANG J, SHI Y, et al. Corrigendum to "Exposure to organophosphate esters in elderly people: relationships of OPE body burdens with indoor air and dust concentrations and food consumption" [Environ. Int. 157 (2021) 106803][J]. *Environ Int*, 2022, 164: 107270.
- [31] DUY P Q, JUX B, ZHAO S, et al. *TRIM71* mutations cause a neurodevelopmental syndrome featuring ventriculomegaly and hydrocephalus[J]. *Brain*, 2024: awae175.
- [32] SGHARI S, GUNHAGA L. Temporal requirement of *Mab21l2* during eye development in chick reveals stage-dependent functions for retinogenesis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2018, 59(10): 3869-3878.
- [33] GASTALDELLI A, SABATINI S, CARLI F, et al. PPAR- γ -induced changes in visceral fat and adiponectin levels are associated with improvement of steatohepatitis in patients with NASH[J]. *Liver Int*, 2021, 41(11): 2659-2670.
- [34] PHAM J, ARUL NAMBI RAJAN K, LI P, et al. The role of Sirtuin1-PPAR γ axis in placental development and function[J]. *J Mol Endocrinol*, 2018, 60(4): R201-R212.
- [35] PENG C, ZHANG X, CHEN Y, et al. Toxicity assessment of organophosphate flame retardant triphenyl phosphate (TPHP) on intestines in mice[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2023, 268: 115685.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)