

磷酸三甲苯酯对秀丽隐杆线虫的生殖毒性及机制

唐洁琳，张红丹，周沁宇，李佳忆，王彤，张娟

东南大学，公共卫生学院/环境医学工程教育部重点实验室，江苏南京 210009

摘要：

[背景] 磷酸三甲苯酯(TCP)主要用作阻燃剂。研究证实其具有细胞毒性和神经毒性,但对于其生殖毒性尚不明确。

[目的] 研究 TCP 亚急性暴露对秀丽隐杆线虫的生殖毒性以及潜在机制。

[方法] 将秀丽隐杆线虫分别暴露于溶剂对照以及 0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 的培养基 72 h, 检测后代数目和子宫内受精卵的数量, 评价生殖能力; 检测总生殖细胞数和生殖腺相对面积, 评价生殖腺发育; 检测体长和体宽, 评价生长发育; 检测秀丽隐杆线虫体内活性氧(ROS)水平、超氧化物歧化酶(SOD)活性, 利用实时荧光定量 PCR 检测 N2 线虫线粒体活性氧代谢基因(*mev-1* 和 *gas-1*)的表达, 评价氧化应激水平。WS1433 转基因线虫和野生型线虫 N2 分别暴露于溶剂对照或 TCP(0.1、1、10、100、1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)后, 检测 WS1433 转基因线虫生殖细胞 DNA 损伤情况, 实时荧光定量 PCR 检测 N2 线虫 DNA 损伤相关基因(*hus-1*、*clk-2*、*cep-1* 和 *egl-1*)的相对表达, 评价 TCP 暴露对秀丽隐杆线虫遗传损伤的影响。

[结果] 与溶剂对照组相比(217.00 ± 12.20), $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫的后代数目减少(170.80 ± 11.51 、 169.60 ± 10.52 , $P < 0.05$)。与溶剂对照组相比(18.43 ± 1.69), $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫的子宫内受精卵数目减少(13.47 ± 0.81 、 11.95 ± 0.90 , $P < 0.05$)。与溶剂对照组相比(312.46 ± 77.4), $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫的总生殖细胞数减少(281.80 ± 12.98 、 273.50 ± 8.53 , $P < 0.05$)。与溶剂对照组相比, $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫的生殖腺相对面积分别减少 13.83%、17.25%($P < 0.05$)。与溶剂对照组相比($(1058.10\pm80.12) \mu\text{m}$ 、 $(78.21\pm14.69) \mu\text{m}$), $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫的体长、体宽均减少($P < 0.05$)。与溶剂对照组相比, 10、100 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组线虫体内 ROS 相对荧光强度增加(为 $107.60\%\pm1.02\%$ 、 $105.90\%\pm1.40\%$ 、 $106.40\%\pm1.85\%$, $P < 0.05$), SOD 活性分别降低(降低 20.66%、15.88%、16.44%, $P < 0.05$)。与溶剂对照组相比(1.3 ± 1.3), 100 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 WS1433 线虫 DNA 损伤的生殖细胞数目上升(2.4 ± 0.3 、 2.7 ± 0.3 , $P < 0.05$); 10、100 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫 *mev-1* 和 *gas-1* 基因表达降低($P < 0.05$); $0.1\sim1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组线虫 *hus-1* 基因表达增加($P < 0.05$); 100 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组线虫 *clk-2* 和 *egl-1* 基因表达增加($P < 0.05$); 1 、 10 和 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组线虫 *cep-1* 基因表达增加($P < 0.05$)。

[结论] TCP 可能通过氧化应激和生殖细胞 DNA 损伤对线虫造成生殖损伤。

关键词：有机磷酸酯；秀丽隐杆线虫；生殖毒性；DNA 损伤；氧化应激

Reproductive toxicity and associated mechanism of tricresyl phosphate on *Caenorhabditis elegans* TANG Jielin, ZHANG Hongdan, ZHOU Qinyu, LI Jiayi, WANG Tong, ZHANG Juan (Key Laboratory of Environmental Medicine and Engineering, Ministry of Education/School of Public Health, Southeast University, Nanjing, Jiangsu 210009, China)

Abstract:

[Background] Tricresyl phosphate (TCP) is mainly used as a flame retardant. Studies have confirmed that it has cytotoxicity and neurotoxicity, but its reproductive toxicity is not clear.

[Objective] To investigate the reproductive toxicity and potential mechanism of TCP subacute exposure on *Caenorhabditis elegans*.

[Methods] *Caenorhabditis elegans* were exposed to solvent control and 0.1, 1, 10, 100, and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP respectively for 72 h. Brood size and number of fertilized eggs in the uterus were



DOI: 10.11836/JEOM21396

基金项目

国家自然科学基金项目(81273123)

作者简介

唐洁琳(1995—), 女, 硕士生;
E-mail: 13611511557@163.com

通信作者

张娟; E-mail: 101011288@seu.edu.cn

伦理审批 不需要

利益冲突 无申报

收稿日期 2021-08-29

录用日期 2022-03-28

文章编号 2095-9982(2022)05-0532-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

▶ 引用

唐洁琳, 张红丹, 周沁宇, 等. 磷酸三甲苯酯对秀丽隐杆线虫的生殖毒性及机制 [J]. 环境与职业医学, 2022, 39(5): 532-538.

▶ 本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.11836/JEOM21396

Funding

This study was funded.

Correspondence to

ZHANG Juan, E-mail: 101011288@seu.edu.cn

Ethics approval Not required

Competing interests None declared

Received 2021-08-29

Accepted 2022-03-28

▶ To cite

TANG Jielin, ZHANG Hongdan, ZHOU Qinyu, et al. Reproductive toxicity and associated mechanism of tricresyl phosphate on *Caenorhabditis elegans* [J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2022, 39(5): 532-538.

▶ Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.11836/JEOM21396

detected to evaluate reproductive ability. The number of total germline cells and the relative area of gonad arm were measured to evaluate the development of gonads. The body length and body width of *Caenorhabditis elegans* were detected to evaluate growth and development. The activities of reactive oxygen species (ROS) and superoxide dismutase (SOD) in *Caenorhabditis elegans*, and the mitochondrial active oxygen metabolism genes (*mev-1* and *gas-1*) of N2 nematodes were detected by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (qRT-PCR) to evaluate oxidative stress. WS1433 transgenic nematodes and wild-type nematodes N2 were exposed to solvent control or TCP (0.1, 1, 10, 100, and 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) respectively. DNA damage in germ cells of WS1433 transgenic nematodes was detected, the relative expressions of DNA damage-related genes (*hus-1*, *clk-2*, *cep-1*, and *egl-1*) in N2 nematodes were detected by qRT-PCR to evaluate the effect of TCP exposure on genetic damage.

[Results] Compared with the solvent control group (217.00 ± 12.20), the brood size of N2 nematodes in the $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups decreased (170.80 ± 11.51 , 169.60 ± 10.52 , $P < 0.05$). Compared with the solvent control group (18.43 ± 1.69), the number of fertilized eggs of N2 nematodes in the $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups decreased (13.47 ± 0.81 , 11.95 ± 0.90 , $P < 0.05$). Compared with the solvent control group (312.46 ± 77.4), the number of total germline cells of N2 nematodes in the $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups decreased (281.80 ± 12.98 , 273.50 ± 8.53 , $P < 0.05$). Compared with the solvent control group, the relative area of gonads of N2 nematodes in the $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups decreased by 13.83% and 17.25% respectively ($P < 0.05$). Compared with the solvent control group [$(1058.10 \pm 80.12) \mu\text{m}$, $(78.21 \pm 14.69) \mu\text{m}$], the body length and body width of N2 nematodes in the $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups decreased ($P < 0.05$). Compared with the solvent control group, the relative fluorescence intensity of ROS in nematodes in the 10, 100, and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups increased significantly ($107.60\% \pm 1.02\%$, $105.90\% \pm 1.40\%$, and $106.40\% \pm 1.85\%$, respectively, $P < 0.05$), and the activities of SOD were reduced (by 20.66%, 15.88%, and 16.44%, respectively, $P < 0.05$). Compared with the solvent control group (1.3 ± 1.3), the number of DNA-damaged germ cells of WS1433 nematodes in the 100 and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups increased significantly (2.4 ± 0.3 , 2.7 ± 0.3 , $P < 0.05$); the expressions of *mev-1* and *gas-1* genes in N2 nematodes in the 10, 100 and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups decreased significantly ($P < 0.05$); the expressions of *hus-1* in the $0.1\text{--}1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups significantly increased ($P < 0.05$); the expressions of *clk-2* and *egl-1* in the 100 and $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups increased significantly ($P < 0.05$); the expressions of *cep-1* in the 1, 10, and $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP groups increased significantly ($P < 0.05$).

[Conclusion] TCP may cause reproductive damage to nematodes through oxidative stress and germ cell DNA damage.

Keywords: organophosphate esters; *Caenorhabditis elegans*; reproductive toxicity; DNA damage; oxidative stress

有机磷酸酯(organophosphate esters, OPEs)阻燃剂是继无机磷酸酯、含卤素磷代阻燃物之后的第三大磷系阻燃剂^[1]。OPEs 代谢产物已在人类的胎盘、尿液、血清、母乳^[2-5]中被检出。人体暴露于 OPEs 的途径越来越多, 如通过食物和饮用水摄入、呼吸道吸入和皮肤接触等^[6]。OPEs 在环境及组织样品中的存在引起人们对环境安全和人类健康的关注, 关于 OPEs 的安全性研究也逐渐增多。以往的研究发现, 暴露于 OPEs 可能引起生殖毒性。成年斑马鱼暴露于三(2-丁氧基乙基)磷酸酯后, 可能会导致产卵量降低和卵直径减小^[7]。三(1,3-二氯-2-丙基)磷酸酯可降低大型蚤的后代数目^[8]。磷酸三丁酯暴露后海洋轮虫的产卵量减少^[9]。磷酸三甲苯酯(tricresyl phosphate, TCP)暴露会影响雌性小鼠的生殖能力^[10]。流行病学研究表明, 通过体外受精怀孕的女性, 尿液中 OPEs 代谢产物浓度与受精、着床、临床妊娠和活产成功率降低相关^[11]。TCP 是其中一种代表性毒物, 这种芳香基取代的 OPEs 阻燃剂主要应用于聚氯乙烯材料、纤维素聚合物、热塑性塑料以及合成的橡胶中。研究表明, TCP 暴露可对小鼠雄性生殖系统造成不可逆的严重损害, 减少精原干细胞并抑制 Leydig TM3 细胞的活力^[12-13], 诱导小鼠卵巢颗粒细胞自噬^[14]。然而其诱导生殖毒性的潜在机制尚不清楚,

仍需要进一步深入研究。

OPEs 的毒性作用可能是由氧化应激引起。动物和体外研究表明, 磷酸三(2-氯乙基)酯和磷酸三苯酯会引起小鼠肝脏和睾丸 Leydig TM3 细胞的氧化应激^[15], 三(1,3-二氯-2-丙基)磷酸酯诱导肾上腺 PC12 细胞的氧化应激^[16]。氧化应激具有致细胞核 DNA 和线粒体的损伤以及脂质过氧化作用^[17]。流行病学研究也表明, OPEs 暴露与氧化应激之间有关联。波多黎各北部孕妇^[18]、北海道儿童^[19]、中国南方电子垃圾回收站附近成年人^[20]尿液中 OPEs 浓度与氧化应激水平呈正相关。

秀丽隐杆线虫是环境毒理学研究的重要模式生物, 具有简单的生殖发育系统; 与传统实验动物相比, 其后代数目多, 身体透明, 在光学显微镜下清晰可见其体内的生殖器官, 并能够在整体水平下观测化学物质暴露后对其生殖器官造成的损伤。因此秀丽隐杆线虫具有研究生殖毒性的优越性。它的发育、繁殖、活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生和细胞凋亡等终点常用于评估环境有毒物质的毒性^[21-22]。目前公开发表的文献中显示世界各地环境中 TCP 的质量浓度在 $0.1\text{--}126.61 \text{ ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[1, 23-24]。本研究以 TCP 环境相关质量浓度为参考, 设置 0.1、1、10、100、 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 五个暴露剂量, 将 L1 期幼虫暴露于 TCP 72 h, 研究 TCP 对

秀丽隐杆线虫的生殖(生殖能力和生殖腺发育)和发育(体长和体宽)毒性效应,进一步从氧化应激、生殖细胞DNA损伤两个方面深入研究,为TCP的危险度评估提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验试剂与设备

TCP(CAS: 1330-78-5, 纯度 90%; 加拿大 Toronto Research Chemicals), ROS 探针 H2DCFDA(中国江苏凯基生物公司), BCA 蛋白质测定试剂盒、CuZn/Mn-超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒(WST-8 法)(中国上海碧云天生物技术有限公司), Trizol(美国 Promega), SYBR Green I Master Mix(日本 Tovobo), Prime Script TM RT Master Mix 试剂盒(日本 Takara), TB Green® Premix Ex Taq TM 试剂盒(日本 Takara)。

1.2 实验动物及染毒方法

将 N2 成虫加入现配的线虫裂解液裂解(按照 1 mL 裂解液包含 830 μL 蒸馏水、50 μL 氢氧化钠和 120 μL 次氯酸钠配制), 20 °C 孵化过夜, 获得 L1 期线虫。于直径 35 mm 的 NGM 培养基(涂有 60 μL 大肠杆菌 OP50)上分别加入 200 μL 0.1、1、10、100、1 000 μg·L⁻¹ 的 TCP 染毒液和 M9 溶液(溶剂对照; 氯化钠 2.58 g、磷酸氢二钠 3 g、磷酸二氢钾 15 g, 加蒸馏水定容到 500 mL, 高压灭菌结束后加入 1 mol·L⁻¹ 的硫酸镁 0.5 mL, 摆匀冷却至室温备用)。自然晾干后, 将同步化后孵化 L1 期的秀丽隐杆线虫分别转移到 TCP 含量为 0.1、1、10、100、1 000 μg·L⁻¹ 的培养基上, 置于 20 °C 生化培养箱内暴露 72 h。

1.3 生殖能力评估

染毒后将线虫转移至新的加有 OP50 的琼脂培养基, 每皿 1 条, 每隔 24 h 转移线虫至新的 NGM 培养基上, 至该线虫不再继续产卵, 记录该条线虫卵以上所有阶段的子代即为后代数目。将暴露后线虫用 M9 缓冲液洗 3 遍, 左旋咪唑(0.5 mmol·L⁻¹)麻醉后制片, 用显微镜观察并拍照计数子宫内受精卵数目。每剂量组检测 30 条线虫, 实验重复 3 次。

1.4 生殖腺发育评估

4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI)是一种能够与 DNA 强烈结合的荧光染料, 常用于荧光显微镜观测。将线虫转移到玻璃载玻片上, 90%(体积分数)乙醇冲洗后, 在无光的环境下, 于载玻片上滴加 DAPI, 置于室温染色 30 min 后,

荧光显微镜观察并拍照, 计算总生殖细胞数, 测量生殖腺臂相对面积。每剂量组检测 30 条线虫, 实验重复 3 次。

1.5 生长发育评估

染毒结束后, 用 M9 缓冲液分别将各剂量组线虫洗至 1.5 mL 离心管中, 自然沉降后用 M9 缓冲液洗 3 遍, 洗去多余的 OP50。于 1.5 mL 离心管中加入 200 μL 左旋咪唑(0.5 mmol·L⁻¹)麻醉线虫, 吹打均匀后转移 30 μL 线虫至玻璃载玻片上, 盖上盖玻片, 微分干涉反差显微镜下观察拍照, 利用 Image J 1.8.0 软件测量线虫的体长和体宽。每剂量组检测 30 条线虫, 实验重复 3 次。

1.6 氧化应激检测

1.6.1 ROS 水平检测 用 M9 缓冲液分别将各剂量组线虫洗至离心管中, 各管加入 1 mL H2DCFDA 溶液(10 μmol·L⁻¹), 放入 20 °C 生化培养箱反应 2 h(每隔 30 min 上下颠倒混匀), 反应结束后用 M9 缓冲液洗 3 遍, 用浓度为 0.5 mmol·L⁻¹ 的左旋咪唑 200 μL 麻醉后制片, 用荧光显微镜观察拍照。利用 Image J 1.8.0 软件分析 ROS 荧光强度, 实验重复 3 次。

1.6.2 SOD 酶活性检测 染毒结束后, 用 M9 缓冲液分别将各剂量组线虫洗至 1.5 mL 离心管中, 用 M9 缓冲液洗 3 遍。使用 BCA 蛋白质测定试剂盒测量蛋白质含量。使用 CuZn/Mn-SOD 活性检测试剂盒, 根据说明书检测 SOD 活性。实验重复 3 次。

1.6.3 线粒体活性氧代谢基因 mRNA 表达水平检测 提取线虫总 RNA, 按照 Prime Script TM RT Master Mix 试剂盒说明书步骤将线虫的总 RNA 于梯度 PCR 仪逆转录成 cDNA。按照 TB Green® Premix Ex Taq TM 试剂盒说明书步骤进行实时荧光定量 PCR(real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction, qRT-PCR), 选择 act-1 为内参基因, 检测 mev-1 和 gas-1 的相对表达量。见表 1。

表 1 线粒体活性氧代谢基因的 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences of mitochondrial reactive oxygen metabolism genes

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
act-1	ATGTGTGACGACGAGGTT	GAAGCACTTGGGTGAAC
mev-1	TCCCGCTCCTTGAAACATC	GTGGCTGGTAGACGGTGAGA
gas-1	GTCTCTACTCTGCCACCC	TCAACACGAGACGCAACACT

1.7 生殖细胞损伤检测

HUS-1::GFP 被认为是线虫中 DNA 损伤的检查点蛋白, 位于增殖和减数分裂生殖细胞的细胞核。使用 HUS-1::GFP 融合蛋白分析 WS1433 转基因线虫的

DNA 损伤。染毒结束后,用 M9 缓冲液分别将各剂量组线虫洗至 1.5 mL 离心管中,M9 缓冲液洗 3 遍。于 1.5 mL 离心管中加入 200 μL 左旋咪唑麻醉线虫,吹打均匀后转移 30 μL 线虫至玻璃载玻片上,盖上盖玻片,荧光显微镜观察拍照并计算线虫单侧生殖腺的中/晚期粗线生殖细胞中的 HUS-1::GFP 明亮焦点数。每剂量组检测 30 条线虫,实验重复 3 次。选择 *act-1* 为内参基因,利用 qRT-PCR 检测生殖细胞 DNA 损伤相关基因 *hus-1*、*clk-2*、*cep-1*、*egl-1* 表达水平。见表 2。

表 2 N2 线虫生殖细胞 DNA 损伤相关基因的 qRT-PCR 引物序列

Table 2 qRT-PCR primer sequences of germ cell DNA damage-related genes in N2 nematodes

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
<i>act-1</i>	ATGTGTGACGACGAGGTT	GAAGCACTTGCGGTGAAC
<i>hus-1</i>	GCGGCAATCGACGTTTTAT	CCGGGCAGAACACGTTAA
<i>clk-2</i>	CACAGTGCCAACAAAGTCG	TGACATGCTCGCCAGACAAT
<i>cep-1</i>	TACCGATTGCGAGACATC	GCATCGGAAATCTTGGCGT
<i>egl-1</i>	GCCTCAACCTCTCGGATCT	GCACATTGCTGCTAGCTTGG

1.8 统计学分析

采用 SPSS 22.0 进行统计分析,将实验数据以平均值±标准误表示。资料皆服从正态分布,且各组间方差齐,采用 One-Way ANOVA 进行多组比较,再采用 LSD-t 检验进行两两比较,检验水准 $\alpha=0.05$ 。

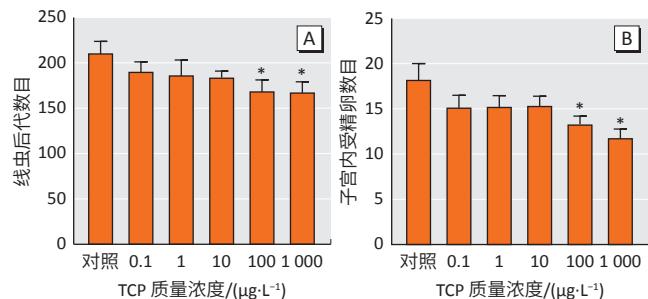
2 结果

2.1 生殖能力影响

TCP 染毒线虫 72 h 后,对各剂量组 N2 线虫的后代数目和子宫内受精卵数目进行检测,结果见图 1。与溶剂对照组相比(后代数目 217.00 ± 12.20 , 子宫内受精卵数目 18.43 ± 1.69), $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 组 N2 线虫的后代数目(170.80 ± 11.51 , $P=0.036$; 169.60 ± 10.52 , $P=0.025$)和子宫内受精卵数目(13.47 ± 0.81 , $P=0.014$; 11.95 ± 0.90 , $P<0.001$)降低,提示较高浓度 TCP 暴露降低线虫的生殖能力,从而导致生殖毒性。

2.2 生殖腺发育影响

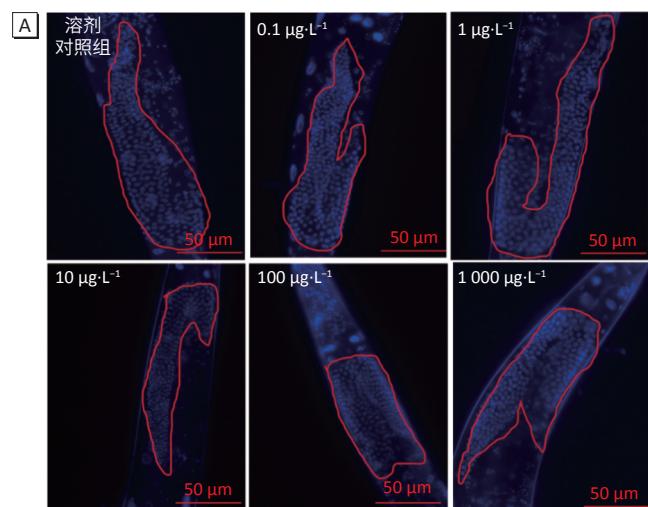
线虫的总生殖细胞数和生殖腺臂相对面积结果见图 2。与溶剂对照组(312.46 ± 77.4)相比,N2 线虫的总生殖细胞数在 $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 暴露组(281.80 ± 12.98 , $P=0.009$)和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 暴露组(273.50 ± 8.53 , $P=0.003$)降低。与溶剂对照组相比, $100 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 暴露组生殖腺臂相对面积分别减少 13.83% 、 17.25% ($P<0.05$)。



[注] A: 线虫后代数目; B: 子宫内受精卵数目。*: 与溶剂对照组相比, $P<0.05$ 。

图 1 TCP 暴露 72 h 对 N2 线虫生殖能力的影响

Figure 1 Effect of TCP exposure for 72 h on the reproductive ability of N2 nematodes



[注] A: DAPI 染色结果,红圈内为生殖腺臂相对面积; B: 总生殖细胞数; C: 生殖腺臂相对面积。*: 与溶剂对照组相比, $P<0.05$ 。

图 2 TCP 暴露 72 h 对 N2 线虫性腺臂发育的影响

Figure 2 Effect of TCP exposure for 72 h on the gonadal development of N2 nematodes

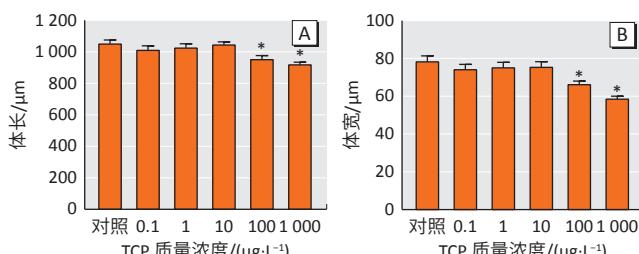
2.3 生长发育影响

N2 线虫的体长和体宽测量结果见图 3。溶剂对照组线虫体长为(1058.10 ± 80.12) μm , 体宽为(78.21 ± 14.69) μm ; 与溶剂对照组相比, 100 、 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 暴露后,线虫的体长和体宽减小($P<0.05$)。

2.4 氧化应激影响

与溶剂对照组相比, 10 、 100 和 $1000 \mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 暴露组线虫体内 ROS 相对荧光强度均增加($107.6\%\pm$

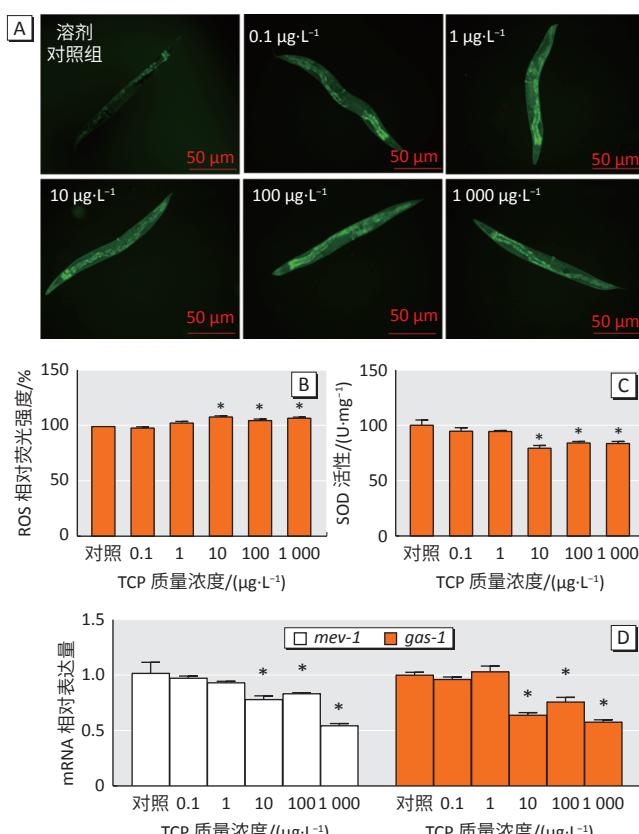
1.02%、105.9%±1.40%、106.4%±1.85%， $P < 0.05$ ），SOD 活性均降低（分别降低 20.66%、15.88%、16.44%， $P < 0.05$ ）；此外，*mev-1* 和 *gas-1* 基因的相对表达量在 10、100 和 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 暴露组降低，与溶剂对照组相比，*mev-1* 分别降低了 22%、17% 和 46%，*gas-1* 分别降低了 36%、24% 和 42% ($P < 0.05$)。见图 4。



[注] A: 线虫体长；B: 线虫体宽。*: 与溶剂对照组相比， $P < 0.05$ 。

图 3 TCP 暴露 72 h 对 N2 线虫体长体宽的影响

Figure 3 Effect of TCP exposure for 72 h on the body length and body width of N2 nematodes



[注] A: 显微镜下线虫体内 ROS 水平；B: ROS 相对荧光强度；C: SOD 活性；D: 线粒体活性氧代谢基因表达水平。*: 与溶剂对照组相比， $P < 0.05$ 。

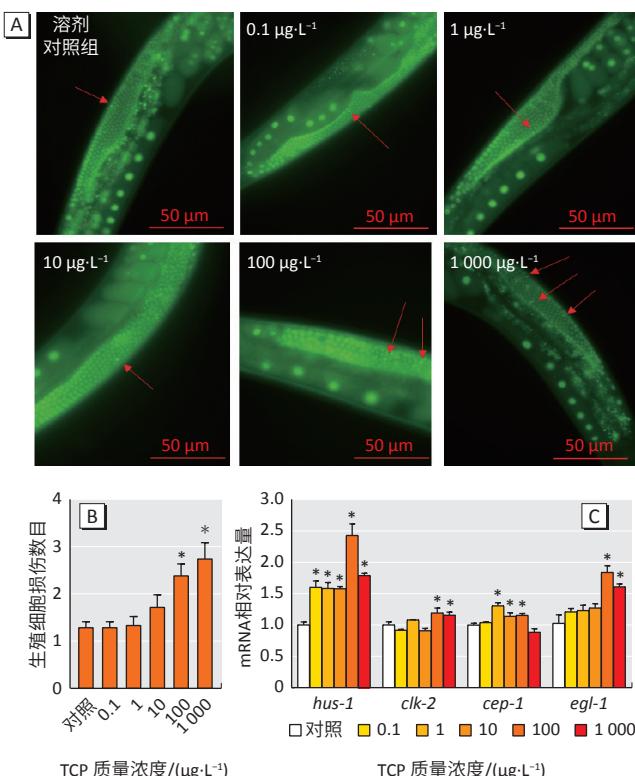
图 4 TCP 暴露 72 h 对 N2 线虫体内氧化应激水平影响

Figure 4 Effect of TCP exposure for 72 h on oxidative stress of N2 nematodes

2.5 生殖细胞损伤结果

图 5A 箭头所指高亮处为异常现象，可见随着浓度的增高，DNA 损伤生殖细胞数目逐渐增多，其统计

学结果见图 5B。与溶剂对照组 (1.3±1.3) 相比，TCP 暴露质量浓度为 100 和 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，WS1433 线虫 DNA 损伤的生殖细胞数目上升 (2.4±0.3, $P=0.002$; 2.7±0.3, $P=0.002$)。图 5C 显示，TCP 暴露质量浓度为 0.1、1、10、100 和 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，*hus-1* 基因的相对表达量增加 ($P < 0.05$)；TCP 暴露质量浓度为 100 和 1000 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，*clk-2* 和 *egl-1* 基因的相对表达量增加 ($P < 0.05$)；TCP 暴露质量浓度为 1、10 和 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 时，*cep-1* 基因的相对表达量增加 ($P < 0.05$)。结果见图 5。



[注] A: 显微镜下 WS1433 线虫生殖腺细胞 DNA 损伤，箭头所指高亮处为 DNA 损伤处；B: N2 线虫生殖细胞损伤数；C: 线虫 DNA 损伤相关基因表达水平；*: 与溶剂对照组相比， $P < 0.05$ 。

图 5 TCP 暴露 72 h 线虫生殖细胞损伤结果

Figure 5 Effect of TCP exposure for 72 h on germ cell damage of nematodes

3 讨论

TCP 是一种典型的芳基 OPEs，主要为润滑剂、液压油和发动机油的添加剂，其毒性一直备受关注。本研究结果表明，线虫暴露于一定浓度 TCP 会出现生殖毒性，主要表现为生育能力下降和生殖腺发育损伤。

在化学物对线虫生殖毒性评价中，后代数目和子宫内受精卵数目是两个常用的指标。后代数目反映生育力的强弱，子宫内受精卵数目可以同时考察繁殖能力与产卵器的生殖功能。本研究结果显示，TCP 暴露可降低线虫的后代数目、子宫内受精卵数目、总生殖

细胞数和生殖腺臂相对面积。这和先前在小鼠中的研究结果一致^[12-13], 即 TCP 暴露诱导雌性小鼠的卵巢间质细胞肥大, 同时会导致雄性小鼠的睾丸重量降低和曲细精管变性, 影响精子数量及其活性。以上研究结果均表明 TCP 会造成生物体生殖系统的损伤, 影响生殖腺发育, 降低生殖能力。

在正常情况下, 体内 ROS 的产生和消除处于动态平衡状态, 对人体无害。ROS 的过量产生会导致氧化应激, 从而导致细胞结构例如脂质、蛋白质和 DNA 的破坏^[25-26]。SOD 在细胞氧化损伤的第一道防线中起着重要作用。*mev-1* 和 *gas-1* 基因在介导秀丽隐杆线虫的氧化应激中起关键作用。*mev-1* 和 *gas-1* 基因与线粒体 ROS 的生成有关, 粒体复合酶 I 和线粒体呼吸链复合酶 II 是线粒体氧化磷酸化过程不可缺少的酶, 线粒体呼吸链复合酶 I 的完整膜蛋白由 *mev-1* 基因负责编码, 线粒体复合酶 II 的完整膜蛋白由 *gas-1* 基因负责编码^[27]。先前的研究表明, *mev-1* 和 *gas-1* 的突变会降低线粒体功能并导致 ROS 升高^[28]。在本研究中, TCP 暴露可降低线虫体内 *mev-1* 和 *gas-1* 基因的转录水平, 表明线虫体内氧化磷酸化水平降低, 能量代谢和 ROS 分解被抑制。*mev-1* 和 *gas-1* 基因参与 TCP 暴露引起的线虫氧化应激的分子控制, TCP 抑制 *mev-1* 和 *gas-1* 基因活性, 从而促进线虫体内 ROS 水平升高诱导的氧化应激。据研究报道, *mev-1* 或 *gas-1* 突变导致生殖能力下降^[29]。因此, 氧化应激与秀丽隐杆线虫生殖毒性的形成密切相关。

在秀丽隐杆线虫 DNA 损伤过程中, HUS-1、CLK-2、CEP-1 和 EGL-1 是 DNA 损伤的核心分子基础。*hus-1* 基因编码 HUS-1(DNA 损伤检查点蛋白直系同源物), 是保持端粒长度和基因组稳定的必需基因^[30]。*clk-2* 基因编码 CLK-2(Te12p 端粒长度调节蛋白直系同源物), 是线虫生殖细胞 DNA 损伤检查点蛋白编码基因^[31]。*cep-1* 基因编码 CEP-1(人类肿瘤抑制因子 p53 直系同源物), 通过激活 *egl-1* 基因的功能促进 DNA 损伤诱导的细胞凋亡^[32]。*egl-1* 基因编码 EGL-1(一种含有 BH3 结构域的蛋白质), 是在线虫核心细胞凋亡信号通路上游起激活剂作用的基因^[33]。研究发现, HepG2 细胞暴露于 100、200 和 400 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 后, 可观察到明显的 DNA 损伤^[34]。生殖腺细胞 DNA 损伤作为秀丽隐杆线虫亚致死终点, 可用于评估环境毒物的生殖毒性。

本研究结果显示, TCP 暴露可升高线虫生殖细胞 DNA 损伤数目, 表明 TCP 暴露诱导线虫生殖细胞 DNA 损伤, 从而产生生殖毒性。TCP 染毒线虫模型表明, 在

高于 100 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 时, 其致线虫生殖能力的降低有统计学意义, 在高于 0.1 $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ TCP 时, 即可在分子层面上观察到氧化应激及 DNA 损伤程度等指标的增加, 差异具有统计学意义, 说明在目前环境浓度暴露水平下存在潜在的生殖毒性, 其毒性机制与 TCP 对生殖系统氧化应激有关。以上结果为 TCP 环境暴露的安全性提供了科学依据, 但人体暴露于 TCP 的风险仍需进一步评估。

参考文献

- [1] VAN DER VEEN I, DE BOER J. Phosphorus flame retardants: Properties, production, environmental occurrence, toxicity and analysis[J]. *Chemosphere*, 2012, 88(10): 1119-1153.
- [2] DING J, XU Z, HUANG W, et al. Organophosphate ester flame retardants and plasticizers in human placenta in Eastern China[J]. *Sci Total Environ*, 2016, 554-555: 211-217.
- [3] 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.
- [4] MA Y, JIN J, LI P, et al. Organophosphate ester flame retardant concentrations and distributions in serum from inhabitants of Shandong, China, and changes between 2011 and 2015[J]. *Environ Toxicol Chem*, 2017, 36(2): 414-421.
- [5] SUNDKVIST AM, OLOFSSON U, HAGLUND P. Organophosphorus flame retardants and plasticizers in marine and fresh water biota and in human milk[J]. *J Environ Monit*, 2010, 12(4): 943-951.
- [6] HOU R, XU Y, WANG Z. Review of OPFRs in animals and humans: absorption, bioaccumulation, metabolism, and internal exposure research[J]. *Chemosphere*, 2016, 153: 78-90.
- [7] XU Q, WU D, DANG Y, et al. Reproduction impairment and endocrine disruption in adult zebrafish (*Danio rerio*) after waterborne exposure to TBOEP[J]. *Aquat Toxicol*, 2017, 182: 163-171.
- [8] LI H, YUAN S, SU G, et al. Whole-life-stage characterization in the basic biology of *Daphnia magna* and effects of TDCIPP on growth, reproduction, survival, and transcription of genes[J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(23): 13967-13975.
- [9] ZHANG X, TANG X, YANG Y, et al. Responses of the reproduction, population growth and metabolome of the marine rotifer *Brachionus plicatilis* to tributyl phosphate (TnBP)[J]. *Environ Pollut*, 2021, 273: 116462.
- [10] BOLON B, BUCCI TJ, WARBRITTON AR, et al. Differential follicle counts as a screen for chemically induced ovarian toxicity in mice: results from continuous breeding bioassays[J]. *Fundam Appl Toxicol*, 1997, 39(1): 1-10.
- [11] CARIGNAN CC, MÍNGUEZ-ALARCÓN L, BUTT CM, et al. Urinary concentrations of organophosphate flame retardant metabolites and pregnancy outcomes among women undergoing *in vitro* fertilization[J]. *Environ Health Perspect*, 2017, 125(8): 087018.
- [12] CHEN JX, XU LL, MEI JH, et al. Involvement of neuropathy target esterase in tri-ortho-cresyl phosphate-induced testicular spermatogenesis failure and growth inhibition of spermatogonial stem cells in mice[J]. *Toxicol Lett*, 2012, 211(1): 54-61.
- [13] LIU X, XU L, SHEN J, et al. Involvement of oxidative stress in tri-ortho-

- cresyl phosphate-induced autophagy of mouse Leydig TM3 cells *in vitro*[J]. *Reprod Biol Endocrinol*, 2016, 14(1): 30.
- [14] WANG J, RUAN W, HUANG B, et al. Tri-ortho-cresyl phosphate induces autophagy of mouse ovarian granulosa cells[J]. *Reproduction*, 2019, 158(1): 61-69.
- [15] CHEN G, ZHANG S, JIN Y, et al. TPP and TCEP induce oxidative stress and alter steroidogenesis in TM3 Leydig cells[J]. *Reprod Toxicol*, 2015, 57: 100-110.
- [16] DISHAW LV, POWERS CM, RYDE IT, et al. Is the PentaBDE replacement, tris (1, 3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP), a developmental neurotoxicant? Studies in PC12 cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2011, 256(3): 281-289.
- [17] BANERJEE BD, SETH V, AHMED RS. Pesticide-induced oxidative stress: perspective and trends[J]. *Rev Environ Health*, 2001, 16(1): 1-40.
- [18] INGLE ME, WATKINS D, ROSARIO Z, et al. An exploratory analysis of urinary organophosphate ester metabolites and oxidative stress among pregnant women in Puerto Rico[J]. *Sci Total Environ*, 2020, 703: 134798.
- [19] BAMAI YA, BASTIAENSEN M, ARAKI A, et al. Multiple exposures to organophosphate flame retardants alter urinary oxidative stress biomarkers among children: the Hokkaido study[J]. *Environ Int*, 2019, 131: 105003.
- [20] LU SY, LI YX, ZHANG T, et al. Effect of E-waste recycling on urinary metabolites of organophosphate flame retardants and plasticizers and their association with oxidative stress[J]. *Environ Sci Technol*, 2017, 51(4): 2427-2437.
- [21] BEHL M, HSIEH JH, SHAFER TJ, et al. Use of alternative assays to identify and prioritize organophosphorus flame retardants for potential developmental and neurotoxicity[J]. *Neurotoxicol Teratol*, 2015, 52: 181-193.
- [22] BEHL M, RICE JR, SMITH MV, et al. Editor's highlight: comparative toxicity of organophosphate flame retardants and polybrominated diphenyl ethers to *Caenorhabditis elegans*[J]. *Toxicol Sci*, 2016, 154(2): 241-252.
- [23] 徐诚, 宋宁慧, 张圣虎, 等. 长江南京段水体及市政自来水中多种OPPs的分布特征[J]. *环境监测管理与技术*, 2018, 30(4): 60-64.
- XU C, SONG NH, ZHANG SH, et al. Distribution of organophosphates in Yangtze River and running water in Nanjing[J]. *Administration and Technique*, 2018, 30(4): 60-64.
- [24] WANG T, XU C, SONG N, et al. Seasonal variation and health risk assessment of organophosphate esters in surface and drinking water in Nanjing, China [J]. *Int J Environ Sci Technol*, 2022: doi.org/10.1007/s13762-022-03987-2.
- [25] DAYEM AA, HOSSAIN MK, LEE SB, et al. The role of reactive oxygen species (ROS) in the biological activities of metallic nanoparticles[J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(1): 120.
- [26] VALKO M, LEIBFRITZ D, MONCOL J. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease[J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2007, 39(1): 44-84.
- [27] ZHAO L, RUI Q, WANG D. Molecular basis for oxidative stress induced by simulated microgravity in nematode *Caenorhabditis elegans*[J]. *Sci Total Environ*, 2017, 607-608: 1381-1390.
- [28] ISHII T, MIYAZAWA M, ONOUCHI H, et al. Model animals for the study of oxidative stress from complex II[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1827(5): 588-597.
- [29] ZHANG H, LIU T, SONG X, et al. Study on the reproductive toxicity and mechanism of tri-n-butyl phosphate (TnBP) in *Caenorhabditis elegans*[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 227: 112896.
- [30] HOFMANN ER, MILSTEIN S, BOULTON SJ, et al. *Caenorhabditis elegans* HUS-1 is a DNA damage checkpoint protein required for genome stability and EGL-1-mediated apoptosis[J]. *Curr Biol*, 2002, 12(22): 1908-1918.
- [31] AHMED S, ALPI A, HENGARTNER MO, et al. *C. elegans* RAD-5/CLK-2 defines a new DNA damage checkpoint protein[J]. *Curr Biol*, 2001, 11(24): 1934-44.
- [32] POLLI JR, ZHANG Y, PAN X. Dispersed crude oil amplifies germ cell apoptosis in *Caenorhabditis elegans*, followed a CEP-1-dependent pathway[J]. *Arch Toxicol*, 2014, 88(3): 543-551.
- [33] NEHME R, CONRADT B. *egl-1*: a key activator of apoptotic cell death in *C. elegans* [J]. *Oncogene*, 2008, 27(Suppl 1): S30-40.
- [34] AL-SALEM AM, SAQUIB Q, SIDDIQUI MA, et al. Organophosphorus flame retardant (tricresyl phosphate) trigger apoptosis in HepG2 cells: Transcriptomic evidence on activation of human cancer pathways[J]. *Chemosphere*, 2019, 237: 124519.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 汪源)

(上接第 531 页)

- [12] 郭笑笑, 刘丛强, 朱兆洲, 等. 土壤重金属污染评价方法[J]. 生态学杂志, 2011, 30(5): 889-896.
- GUO XX, LIU CQ, ZHU ZZ, et al. Evaluation methods for soil heavy metals contamination: a review[J]. *Chin J Ecol*, 2011, 30(5): 889-896.
- [13] EZIZ M, HAYRAT A, YANG X. Comparison and analysis of estimation methods for heavy metal pollution of farmland soils[J]. *J Resour Ecol*, 2020, 11(5): 435-442.
- [14] 姬超, 侯大伟, 李发志, 等. 耕地土壤重金属健康风险空间分布特征[J]. *环境科学*, 2020, 41(3): 1440-1448.
- JI C, HOU DW, LI FZ, et al. Assessment and spatial characteristics analysis of human health risk of heavy metals in cultivated soil[J]. *Environ Sci*, 2020, 41(3): 1440-1448.
- [15] 薄录吉, 李冰, 张荣全, 等. 金乡县大蒜产区土壤重金属特征及潜在生态风险评价[J]. *土壤通报*, 2021, 52(2): 434-442.

BO LJ, LI B, ZHANG RQ, et al. Characteristics and potential ecological risk assessment of heavy metals in garlic producing areas of Jinxiang[J]. *Chin J Soil Sci*, 2021, 52(2): 434-442.

- [16] 易文利, 董奇, 杨飞, 等. 陕西省宝鸡市不同功能区土壤重金属污染特征及健康风险评价[J]. *环境与职业医学*, 2018, 35(11): 1019-1024, 1030.
- YI WL, DONG Q, YANG F, et al. Pollution characteristics and health risk assessment of heavy metals in different urban functional areas of Baoji City, Shaanxi Province[J]. *J Environ Occup Med*, 2018, 35(11): 1019-1024, 1030.
- [17] 周永超, 孙慧兰, 陈学刚, 等. 绿洲城市伊宁市表层土壤重金属污染特征及其生态风险评价[J]. *干旱区资源与环境*, 2019, 33(2): 127-133.
- ZHOU YC, SUN HL, CHEN XG, et al. Heavy metal pollution characteristics and ecological risk assessment of surface soil in Yining City, Oasis[J]. *Journal of Arid Land Resources and Environment*, 2019, 33(2): 127-133.

(英文编辑: 汪源; 责任编辑: 丁瑾瑜)