

专栏:环境污染与健康

【特约主持人】陈联合国:“国家青年海外人才计划”和中科院“百人计划”入选者

【主持人按语】环境污染与生态健康危害是环境科学研究领域的前沿和热点,也是我国亟待解决的重大环境安全问题.围绕典型污染物和新污染物的环境监测、毒理效应与机制、以及危害控制等方面,我国已经开展了大量的研究工作,为认识污染物暴露风险、并消减其生态健康威胁奠定了理论基础和技术储备.但是,目前污染物毒理学机制研究仍不够透彻深入,毒性的源头分子起始靶点有待鉴定,这阻碍了有害结局通路的构建.此外,传统危害控制措施经济社会成本巨大,需要结合毒理学研究发现、继续探索方便可行的治理手段,有效保护生态系统和人民健康.本期专栏以“环境污染与健康”为主题,展示了典型污染物的毒理学效应和分子机制研究进展,并基于肠道微生物调控、提出采用益生菌等食品添加剂抑制污染物毒性危害的新思路.

全氟丁烷磺酸与益生菌对斑马鱼甲状腺内分泌系统的联合效应研究

陈联合国,唐丽珠,白雅琛

(中国科学院 淡水生态与生物技术国家重点实验室;水生生物研究所,武汉 430072)

摘要:全氟丁烷磺酸(Perfluorobutanesulfonate, PFBS)是一种新污染物,对鱼类甲状腺内分泌系统具有一定损害效应.益生菌能在一定程度上减轻环境污染物对生物体造成的危害,但其能否调节 PFBS 的甲状腺内分泌干扰效应尚不清楚.通过将成年斑马鱼暴露于不同质量浓度(0、10 和 100 $\mu\text{g/L}$)PFBS 的养殖水中 28 d,投喂添加或不添加益生菌(鼠李糖乳杆菌, *Lactobacillus rhamnosus*)的饲料,测定亲代下丘脑-垂体-甲状腺轴关键基因,以及亲代大脑、血液和子代胚胎中甲状腺激素水平,以探究 PFBS 与益生菌共暴露对斑马鱼甲状腺内分泌系统的联合效应.结果显示,在激素水平上,PFBS 降低了亲代血液 T3 水平,而添加益生菌能减轻雄鱼血液 T3 水平的降低.在基因水平上,100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露促进雄鱼大脑 *tsh β* 基因表达以应对低水平的 T3,并与相应 PFBS 单独暴露相比差异显著,表明添加益生菌可以减轻高质量浓度 PFBS 诱导的雄鱼大脑 T3 水平的降低;PFBS 单独暴露能上调雌鱼大脑 *tra* 基因表达,而 PFBS 与益生菌共暴露则上调 *tra* 和 *tr β* 基因表达,表明添加益生菌能使机体积极地应对 PFBS 诱导的雌鱼大脑 T3 水平降低.研究发现 PFBS 单独暴露能引起斑马鱼的甲状腺内分泌系统紊乱,而 PFBS 与益生菌共暴露后,益生菌能在一定程度上通过甲状腺激素水平和基因表达调节 PFBS 的毒性效应.研究结果可为后续 PFBS 毒性效应的研究及毒性缓解措施的开发提供重要参考.

关键词:全氟丁烷磺酸;益生菌;甲状腺内分泌;基因转录;激素

中图分类号:Q89

文献标志码:A

收稿日期:2021-08-11;修回日期:2021-09-02.

基金项目:国家自然科学基金(22006159);淡水生态与生物技术国家重点实验室开放课题基金(2019000153).

作者简介(通信作者):陈联合国(1986—),男,山东潍坊人,中国科学院水生生物研究所研究员,博士,研究方向为环境毒理,

E-mail:lchenam@ihb.ac.cn.

全氟辛烷磺酸盐(Perfluorooctanesulfonate, PFOS)具有很好的(热、化学和生物)稳定性,并且疏水疏油,从20世纪中叶开始就被广泛应用于泡沫灭火剂、表面活性剂、厨具不粘涂层、速食品包装等多种工业和生活用品。然而,PFOS进入环境介质后,持久性长、生物蓄积性高、毒性大,已于2009年被斯德哥尔摩公约列为环境持久性有机污染物,在全球逐步禁止其生产和使用^[1]。此后,为了应对市场需求,碳链较短、生物富集性相对较小的全氟丁烷磺酸(Perfluorobutanesulfonate, PFBS)作为PFOS的替代物,开始规模化生产和使用,导致其环境浓度逐渐增高。据报道,湖北省汤逊湖水中PFBS质量浓度高达 $8.0 \mu\text{g/L}$ ^[2];新加坡一处垃圾填埋场的渗滤液中也检测到约 $1.9 \mu\text{g/L}$ 的PFBS^[3]。另外,多种生物体中也发现高浓度PFBS,如汤逊湖鲫鱼体内PFBS的生物富集系数为 1 L/kg ^[2];LAM等^[4]在2002至2014年的连续监测中也发现,鲸类肝脏内PFBS质量浓度逐年增长,并已渐渐替代PFOS,成为主要污染物。PFBS进入环境后不断积累,对水生生物的健康产生威胁。SANT等^[5]的研究结果表明PFBS暴露能干扰胚胎发育、脂质代谢相关基因表达和胰腺器官形成。PFBS还能严重损害海洋青鲙的视网膜膜功能^[6],引起甲状腺及生殖内分泌系统紊乱^[7-9],并且能够通过睾丸的甲基化标记遗传给子代,从而影响胚胎生长和发育^[10]。然而,目前PFBS对水生生物甲状腺内分泌系统的影响还缺少深入研究。

益生菌(Probiotics)是一类对宿主健康有益的活性微生物的总称,它们能够定植于肠道,调节肠道菌群组成和代谢,改善宿主肠道微生态平衡,发挥确切的健康功效。例如,鼠李糖乳杆菌 ATCC 7469对虹鳟鱼生长性能、肉质和免疫反应有改善作用^[11]。DAVIS等^[12]发现摄入植物乳杆菌能减轻斑马鱼的焦虑行为。对环境污染引起的生物体损伤,益生菌也表现出一定的调节作用。例如,ZHAI等^[13]在脱脂牛奶中添加植物乳杆菌 CCFM8610每天对小鼠进行灌胃,发现其能减弱镉诱导的炎症症状。同时,鼠李糖乳杆菌能缓解PFBS对斑马鱼造成的脂质代谢紊乱^[14]、视黄醇代谢失调^[15]以及神经毒性损伤^[16-17]。当益生菌与PFBS共暴露时,益生菌能否对PFBS引起的水生生物甲状腺内分泌系统的干扰造成影响,二者的联合效应如何还未可知。因此,本研究将成年斑马鱼暴露于含有0、10和 $100 \mu\text{g/L}$ PFBS的养殖水中28 d,每天投喂添加或不添加益生菌(鼠李糖乳杆菌)的饲料,通过测定亲代下丘脑-垂体-甲状腺轴关键基因,以及亲代大脑、血液和子代胚胎中甲状腺激素(Thyroid Hormones, TH)水平的变化情况,探究PFBS与益生菌单独及共同暴露对斑马鱼甲状腺内分泌的影响及其机制,为深入研究PFBS毒性效应和寻找毒性缓解措施提供参考。

1 材料与方法

1.1 试剂及主要仪器

PFBS(质量分数 $>98.0\%$)购自日本东京化学工业公司。使用二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide, DMSO;质量分数 $>99.0\%$,美国Sigma-Aldrich公司)做溶剂配制PFBS母液。TRIzol购自美国Invitrogen公司;第一链cDNA反转录试剂盒和实时荧光定量PCR试剂盒均购自上海翊圣生物科技有限公司;蛋白浓度测定试剂盒购自碧云天生物技术有限公司;甲状腺激素酶联免疫分析试剂盒购自美国Cayman公司。其他所用试剂均为分析纯。主要仪器有离心机(德国Sigma公司);精密天平(美国Mettler Toledo公司);多功能微孔板检测系统(英国Molecular Devices公司);水平电泳仪(北京六一生物科技有限公司);Nanodrop 2000超微量分光光度计(美国DeNovix公司);T100 Thermal Cycler PCR仪(美国Bio-Rad公司);CFX384 Touch实时荧光定量PCR仪(美国Bio-Rad公司)。

1.2 PFBS单独或与益生菌共暴露实验

实验用鱼为斑马鱼(Danio rerio)野生型品系(AB),由中国科学院水生生物研究所提供。斑马鱼在生物炭过滤的全曝气自来水的半静态系统中培养,环境温度为 $28 \pm 0.5 \text{ }^\circ\text{C}$,光照周期为14 h(L):10 h(D)。斑马鱼驯化2周后,将雌雄各20尾随机分配到30 L玻璃缸(含20 L养殖水)中进行不同质量浓度(0、10和 $100 \mu\text{g/L}$)的PFBS暴露,并分别饲喂添加或不添加鼠李糖乳杆菌GG冻干粉(10^8 cells/g , Culturelle, Italy)。整个实验共6组,每组设置3个平行($n=3$)。利用DMSO配制PFBS母液,每缸暴露液中DMSO体积分数小于 0.001% ,并每日更换暴露液。暴露结束前一周开始,每天收集斑马鱼胚胎,并用纸巾吸干表面水分,10颗胚胎合并在1个离心管中($n=3$)进行称量。暴露结束后,记录每条斑马鱼体长和体质量,并收集其大脑、血液

和肝脏样品。

1.3 甲状腺激素测定

PFBS 单独或与益生菌共暴露结束后,将每个暴露组收集的 10 条同性鱼的尾静脉血样、5 条同性鱼的大脑组织和 50 颗胚胎($n=3$),根据试剂盒说明书,使用多功能微孔板检测系统测定包括三碘甲状腺原氨酸(Triiodothyronine, T3)和四碘甲状腺原氨酸(Tetraiodothyronine, T4)的甲状腺激素水平。

1.4 基因表达测定

将每个暴露组收集的 5 个大脑组织、5 个肝脏组织作为一个重复($n=3$),利用 TRIzol 试剂提取总 RNA。用质量分数为 1% 琼脂糖凝胶电泳和 Nanodrop 2000 微量分光光度计测定 RNA 样品的完整性、纯度和质量浓度。按照试剂盒说明书合成 cDNA 并进行实时荧光定量 PCR 分析。将核糖体蛋白 18(*rpl8*)作为看家基因,使用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法计算靶基因的转录水平,并将其归一化为 *rpl8* 的转录水平。

1.5 统计分析

实验结果用平均值±标准误表示。使用 SPSS 22.0 软件进行统计分析。各组实验数据均进行正态性(Shapiro-Wilk 法)和方差齐性(Leven 法)检验。采用单因素方差分析(ANOVA)来确定组间的显著差异,并进行 post hoc 中 LSD 检验。当数据不满足正态分布或方差不齐时,将数据进行对数转换后再做单因素方差分析。如数据对数变换后仍不能满足正态性和方差齐性时,采用非参数 Kruskal-Wallis 单因素方差分析来确定组间差异是否显著,并进行 Dunn-Bonferroni post-hoc 比较。 $P<0.05$ 为统计显著差异的阈值,* $P<0.05$ 、** $P<0.01$ 和 *** $P<0.001$ 表示暴露组与对照组之间存在显著差异,# $P<0.05$ 、## $P<0.01$ 和 ### $P<0.001$ 表示共暴露组与相应 PFBS 单独暴露组之间存在显著差异。

2 结果与讨论

2.1 亲代体长体质量变化

实验结束后,测量斑马鱼体长和体质量,观察 PFBS 单独或与益生菌共暴露对斑马鱼生长的影响。结果显示,当暴露于 10 和 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 时,雄鱼体长显著增加,但添加益生菌的共暴露时,体长没有明显变化(表 1)。然而,益生菌与 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露时,雄鱼体长与 PFBS 单独暴露组相比,反而显著减小,趋向对照水平。在体质量上,10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露对雄鱼体质量没有显著影响,而 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 则显著增加雄鱼体质量(表 1);PFBS 与益生菌共暴露不影响雄鱼体质量,但益生菌的添加显著降低了 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 诱导的体质量增加(表 1)。CHEN 等^[7]的研究结果与本研究相反,他们发现 PFBS 暴露后海洋青鳉雄鱼体长明显缩短、体质量显著降低,物种差异可能是两项研究结果不同的原因。在丰满系数(体质量/(体长³×100))方面,仅 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 显著增加雄鱼丰满系数(表 1)。以上结果表明,PFBS 能促进雄鱼体长和体质量增加,而添加益生菌能拮抗高质量浓度 PFBS 诱导的体长和体质量变化。

表 1 雄鱼基本指标

Tab. 1 Basic indicators of male fish

实验组	体长/cm	体质量/g	丰满系数	实验组	体长/cm	体质量/g	丰满系数
0 $\mu\text{g/L}$ PFBS	3.54±0.02	0.38±0.01	0.85±0.02	0 $\mu\text{g/L}$ PFBS+益生菌	3.59±0.02	0.39±0.01	0.84±0.01
10 $\mu\text{g/L}$ PFBS	3.64±0.02**	0.39±0.01	0.81±0.01*	10 $\mu\text{g/L}$ PFBS+益生菌	3.60±0.02	0.38±0.01	0.81±0.01
100 $\mu\text{g/L}$ PFBS	3.64±0.02**	0.41±0.01**	0.84±0.01	100 $\mu\text{g/L}$ PFBS+益生菌	3.56±0.02##	0.38±0.01##	0.83±0.01

注:* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$,与对照组相比。

$P<0.05$,## $P<0.01$,### $P<0.001$,共暴露组与相应质量浓度 PFBS 单独暴露组相比。下表同。

不同的是,对于雌鱼,10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 显著增加其体长,而 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 对雌鱼体长没有显著影响(表 2)。在 PFBS 与益生菌共暴露条件下,雌鱼体长明显变长,但与相应 PFBS 单独暴露相比没有显著差异(表 2)。CHEN 等^[7]研究发现,PFBS 暴露能减轻雌鱼体质量,然而可能由于物种差异,本研究中 PFBS 单独暴露后雌鱼体质量没有明显变化,但 PFBS 与益生菌共暴露可使雌鱼体质量显著增加(表 2)。与 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露相比,益生菌对雌鱼体质量的增加也具有显著效应(表 2)。PFBS 单独或与益生菌共暴露均不影

响丰满系数,但与 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露相比,共暴露使雌鱼丰满系数显著上升(表 2)。结果表明,PFBS 能在体长与体质量上促进斑马鱼雌鱼生长,而益生菌能促进低质量浓度 PFBS 的作用。PFBS 与益生菌共暴露对雌雄鱼影响不同,表明益生菌对 PFBS 效应的调节作用存在性别差异。

表 2 雌鱼基本指标

Tab. 2 Basic indicators of female fish

实验组	体长/cm	体质量/g	丰满系数	实验组	体长/cm	体质量/g	丰满系数
0 $\mu\text{g/L}$ PFBS	3.57 \pm 0.02	0.45 \pm 0.01	0.99 \pm 0.02	0 $\mu\text{g/L}$ PFBS+益生菌	3.62 \pm 0.03	0.47 \pm 0.01	1.00 \pm 0.03
10 $\mu\text{g/L}$ PFBS	3.70 \pm 0.03***	0.48 \pm 0.01 [#]	0.95 \pm 0.02	10 $\mu\text{g/L}$ PFBS+益生菌	3.71 \pm 0.04***	0.53 \pm 0.01***	1.04 \pm 0.03 [#]
100 $\mu\text{g/L}$ PFBS	3.63 \pm 0.03	0.48 \pm 0.02	0.99 \pm 0.02	100 $\mu\text{g/L}$ PFBS+益生菌	3.70 \pm 0.03***	0.49 \pm 0.01*	0.97 \pm 0.02

2.2 亲代甲状腺内分泌系统变化

2.2.1 亲代血液 T3 与 T4 变化

检测亲代血液 T3 和 T4 变化情况,可以观察到 PFBS 暴露后,斑马鱼血液 T3 水平呈下降趋势,而 T4 水平变化趋势不明显(图 1)。在 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露条件下,雄鱼 T3 水平趋向对照水平(图 1(A)),而雌鱼 T3 水平则呈进一步下降趋势(图 1(B))。100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露后,雌雄鱼 T3 水平趋向对照水平(图 1(A)和(B))。有趣的是,单独添加益生菌后,斑马鱼血液 T4 水平呈上升趋势,而 PFBS 与益生菌共暴露后,这种上升趋势逐渐减小(图 1(C,D))。甲状腺激素的升高可能是由于益生菌刺激下丘脑分泌促甲状腺激素释放激素(Thyrotropin-Releasing Hormone, TRH),进而刺激垂体前叶分泌促甲状腺激素(Thyroid Stimulating Hormone, TSH)^[18]。此外,益生菌还可能增强促肾上腺皮质激素释放因子(Corticotrophin Releasing Factor, CRF)的活性,刺激促甲状腺激素的释放,从而促进 T4 的分泌^[19]。甲状腺激素在促进许多其他激素、酶和结构蛋白的合成方面发挥着重要作用^[20]。因此,可以推测益生菌诱导的甲状腺激素水平升高可能有助于鱼类的消化和新陈代谢。在雄鱼中,PFBS 单独或与益生菌共暴露后,T3/T4 比值呈减小趋势,其中仅 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露时 T3/T4 比值显著减小(图 1(E))。T3 和 T3/T4 比值的降低可能表明 T4 转化为 T3 的能力降低^[21]。不同的是,PFBS 单独暴露后,雌鱼 T3/T4 比值变化不大。而 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露时,雌鱼 T3/T4 比值呈增大趋势(图 1(F))。总体来看,血液中 T3 和 T4 水平变化情况与在体长体质量中观察到的益生菌在雄鱼体内抑制 PFBS 作用、在雌鱼体内促进低质量浓度 PFBS 作用的结果类似。

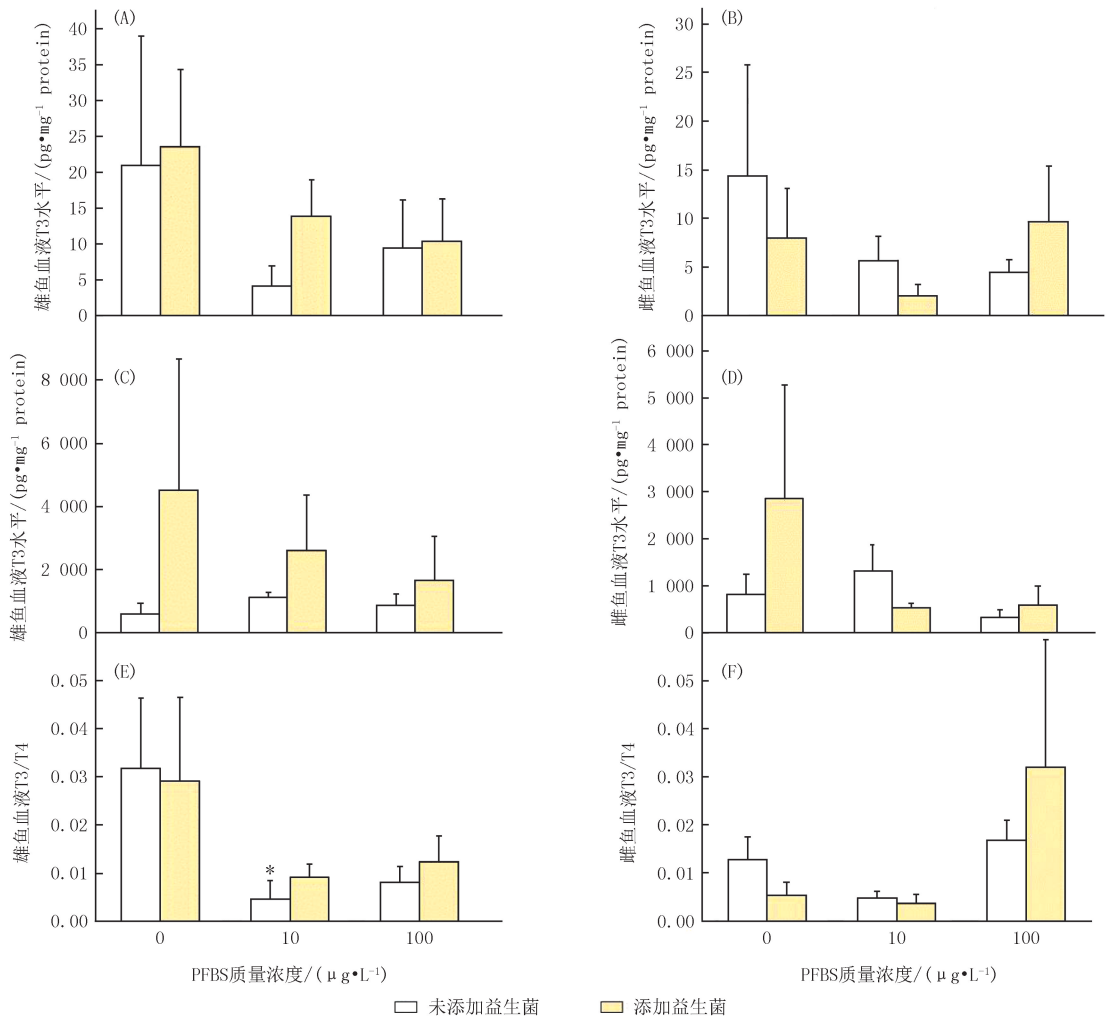
2.2.2 亲代大脑 T3 与 T4 变化

收集亲代大脑组织,检测 T3 和 T4 变化情况。结果显示,PFBS 单独或与益生菌共暴露对雄鱼大脑 T3 和 T4 水平没有显著影响(图 2(A,C))。然而,PFBS 使雌鱼大脑 T3 和 T4 水平显著降低,添加益生菌对此效应影响不大(图 2(B))。值得注意的是,益生菌单独暴露后,雌鱼大脑 T3 水平显著降低(图 2(B)),T4 水平也呈降低趋势(图 2(D))。PFBS 单独或与益生菌共暴露对雄鱼大脑 T3/T4 比值的影响不显著,但比值呈低质量浓度降低、高质量浓度升高的趋势(图 2(E))。而在雌鱼大脑中,PFBS 暴露使 T3/T4 比值呈升高趋势,添加益生菌后比值升高趋势更明显,尤其是 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露显著增大 T3/T4 比值(图 2(F))。有报道称较高的 T3/T4 水平可能会对鱼的特异性免疫反应产生负面影响,导致对感染的高易感性^[22]。因此,100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露诱导 T3/T4 比值显著增大可能不利于雌鱼的特异性免疫反应。

2.2.3 大脑相关基因变化

甲状腺激素对生物机体十分重要,参与调控机体发育代谢和调节内分泌^[23],HPT 轴相关基因表达能影响机体内甲状腺激素水平变化,因此除了检测甲状腺激素水平变化外,探究甲状腺相关基因转录是否异常同样重要。检测亲代大脑相关基因变化,结果如图 3 所示。在雄鱼大脑中,PFBS 单独暴露对促甲状腺激素释放激素基因(*trh*)和促甲状腺激素释放激素受体-1 基因(Thyrotropin-Releasing Hormone Receptor-1, *trhr1*)转录影响不明显,而在 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 条件下,促甲状腺激素基因(*tsh β*)转录显著上调,100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 条件下,*tsh β* 基因转录呈上调趋势(图 3(A))。与 PFBS 单独暴露相比,共暴露后 *trh* 和 *trhr1* 基因转录无明显变化,而在 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露下,*tsh β* 基因转录呈下调趋势,100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露下 *tsh β* 基因转录显著上调(图 3(A))。*tsh* 基因是甲状腺激素下调基因之一,其表达在转录和转录后水平受 T3 控制,在甲状腺机能减退时 *tsh* 基因转录增加^[24-26]。雄鱼血液中的 T3 水平呈降低趋势,且在 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 下降趋势更明

显(图 1(A)),这可能是 *tshβ* 基因转录上调的原因。



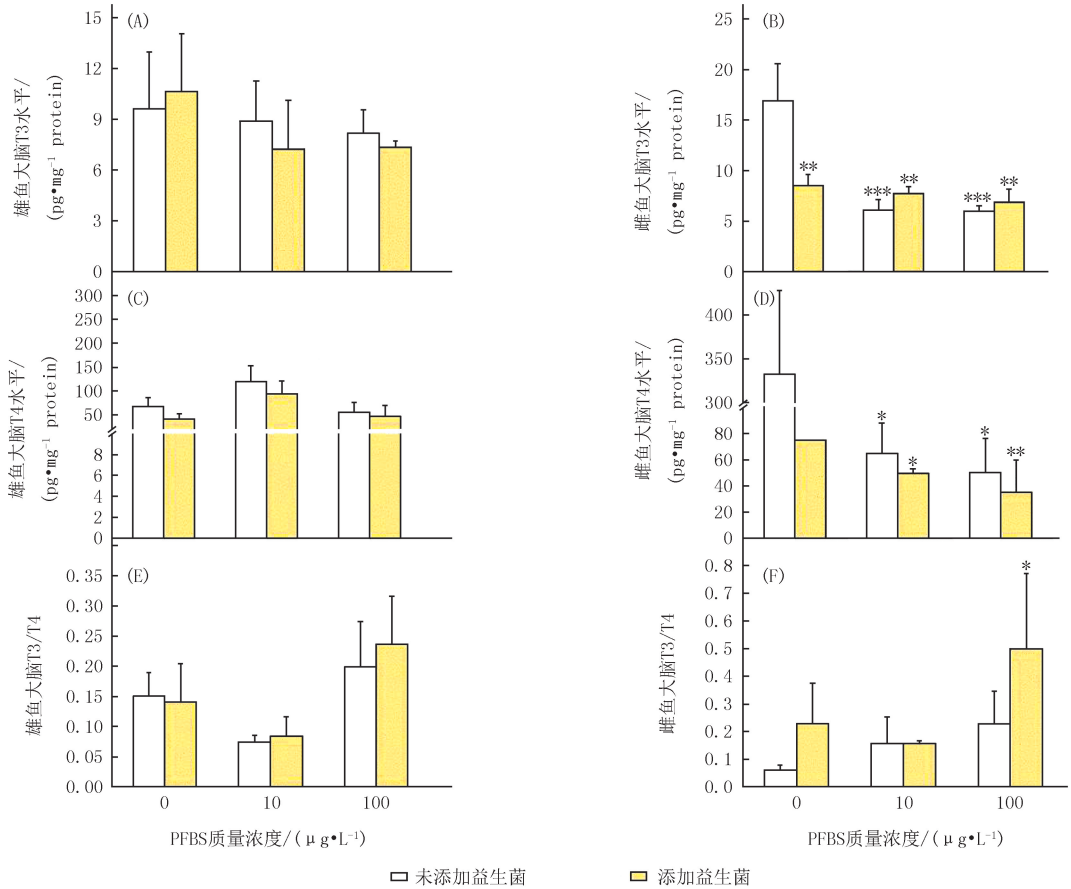
(A) 雄鱼血液T3水平; (B) 雌鱼血液T3水平; (C) 雄鱼血液T4水平; (D) 雌鱼血液T4水平; (E) 雄鱼血液T3/T4比值; (F) 雌鱼血液T3/T4比值。实验结果用平均值±标准误表示, 每个质量浓度设置3个平行(n=3)。* $P < 0.05$ 表示暴露组和对照相比差异显著。

图1 PFBS (0, 10和100 $\mu\text{g/L}$)单独或与益生菌共暴露28 d对斑马鱼血液中甲状腺激素水平的影响
Fig.1 Effects of PFBS (0, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) alone or combined with probiotics on blood thyroid hormone levels in zebrafish after 28 days of exposure

在雌鱼大脑中,PFBS单独或与益生菌共暴露后,*trh* 基因转录呈降低趋势,其中 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露显著降低了 *trh* 基因转录,而暴露后 *trhr1* 基因转录变化不大(图 3(B)).*tshβ* 基因转录在 PFBS 单独暴露后呈升高趋势,0 和 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露后 *tshβ* 基因转录升高趋势更明显,而 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露下 *tshβ* 基因转录却呈下降趋势(图 3(B)),这可能是暴露后血液中 T3 水平不同的应对策略。

血液中的甲状腺激素能与甲状腺激素受体(Thyroid Hormone Receptors, TRs, 包括 $\text{TR}\alpha$ 和 $\text{TR}\beta$) 结合并介导靶器官的作用^[27]。本研究中,PFBS 单独暴露时,雄鱼大脑中甲状腺激素受体基因(*tra* 和 *trβ*) 转录轻微下调,当 PFBS 质量浓度为 100 $\mu\text{g/L}$ 时,*tra* 基因转录显著下调(图 3(A)).类似地,在 CHEN 等^[7]的研究中,亲代 PFBS 暴露后,子代 *tra* 和 *trβ* 基因显著下调。与 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露相比,添加益生菌后,*tra* 和 *trβ* 基因转录显著上调至对照水平(图 3(A)),表明益生菌可能通过拮抗高质量浓度 PFBS,减轻 *tra* 和 *trβ* 基因的转录下调。在雌鱼大脑中,PFBS 单独或与益生菌共暴露后,*tra* 基因转录轻微上调,其中 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独或与益生菌共暴露显著上调 *tra* 基因转录(图 3(B)).*trβ* 基因转录在 PFBS 单独暴露后出现上调趋势,而共暴露后则显著上调。T3 可通过 HPT 轴的反馈机制上调 *tra* 和 *trβ* 基因的表达^[28]。本研究中,添加益生菌共暴露后,*tra* 和 *trβ* 基因表达上调可能是由于雌鱼大脑较低水平的 T3 引起的,表明益生菌可能有助

于减轻 PFBS 诱导的雌鱼大脑 T3 水平降低。



(A) 雄鱼大脑T3水平; (B) 雌鱼大脑T3水平; (C) 雄鱼大脑T4水平; (D) 雌鱼大脑T4水平; (E) 雄鱼大脑T3/T4比值; (F) 雌鱼大脑T3/T4比值. 实验结果用平均值±标准误差表示, 每个质量浓度设置3个平行($n=3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 和*** $P<0.001$ 表示暴露组和对照相比差异显著。

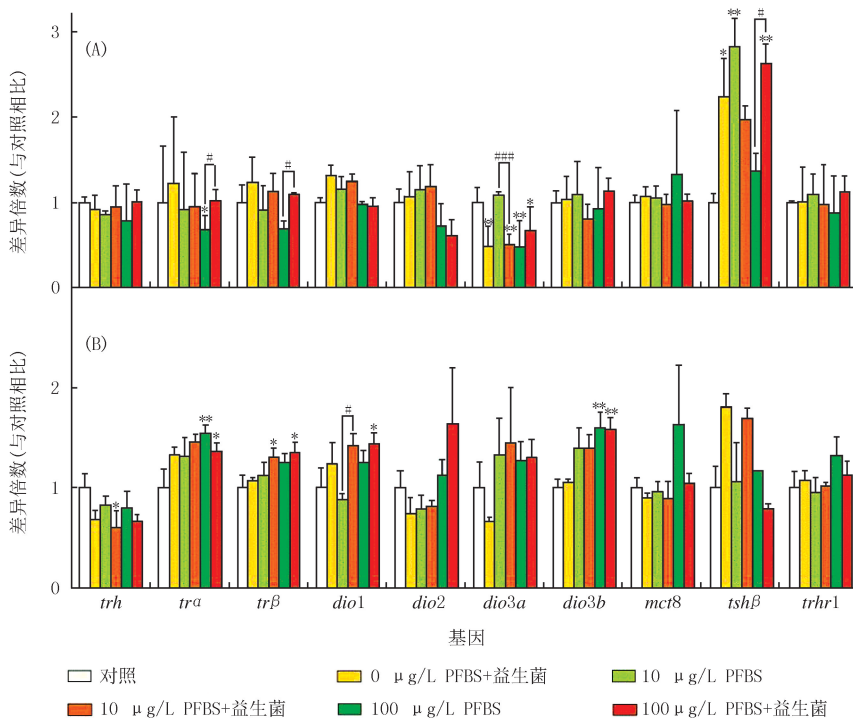
图2 PFBS(0,10和100 $\mu\text{g/L}$)单独或与益生菌共暴露28 d对斑马鱼大脑中甲状腺激素水平的影响
Fig.2 Effects of PFBS(0,10 and 100 $\mu\text{g/L}$) alone or combined with probiotics on brain thyroid hormone levels in zebrafish after 28 days of exposure

单羧酸转运蛋白8(Monocarboxylate Transporter 8, MCT8)是非常活跃且具有特异性的甲状腺激素转运蛋白,基因转录分析表明,MCT8负责甲状腺激素跨膜穿过血脑屏障(Blood Brain Barrier, BBB)进入神经元^[29].检测单羧酸转运蛋白8基因(*mct8*)转录情况,发现仅100 $\mu\text{g/L}$ PFBS单独暴露后,雄鱼和雌鱼大脑中的*mct8*基因转录出现上调趋势,而添加益生菌的共暴露对*mct8*基因转录影响不大(图3(A,B)).

甲状腺激素脱碘酶(Iodothyronine Deiodinase, DIO)作为甲状腺激素代谢中重要的转化酶,可以调节甲状腺激素生成,对维持机体甲状腺激素水平起着决定作用.在雄鱼大脑中,甲状腺激素脱碘酶基因(*dio*)*dio1*,*dio2*和*dio3b*基因表达无显著变化,除10 $\mu\text{g/L}$ PFBS单独暴露外,其他条件暴露后*dio3a*基因表达均显著下调,且10 $\mu\text{g/L}$ PFBS共暴露与单独暴露相比,*dio3a*基因表达显著下调(图3(A)).类似地,CHEN等^[7]发现海洋青鳉全生命周期暴露于PFBS后,子代幼鱼*dio3a*基因表达显著下调.*Dio3a*基因表达除了受PFBS单独或与益生菌共暴露影响,还会受到HPT轴(如*tsh β* 基因)的负反馈调节^[7].而在本研究中,确实观察到PFBS(0和100 $\mu\text{g/L}$)与益生菌共暴露后*tsh β* 基因表达上调.然而*dio3a*基因表达下调并没有影响雄鱼大脑中甲状腺激素水平变化(图2(A)).

在雌鱼大脑中,PFBS单独暴露对4种脱碘酶基因表达影响不大,仅100 $\mu\text{g/L}$ PFBS单独暴露显著上调*dio3b*基因表达(图3(B)).10 $\mu\text{g/L}$ PFBS共暴露与单独暴露相比,*dio1*基因表达显著上调,*dio2*,*dio3a*和*dio3b*基因表达差异不显著;而100 $\mu\text{g/L}$ PFBS与益生菌共暴露使*dio1*基因表达显著上调,*dio2*基因表达出现上调趋势,*dio3a*和*dio3b*基因表达无显著差异,但*dio3b*基因表达与对照相比显著上调.对于斑马鱼幼

鱼全身 T4 含量降低、T3 水平升高,CHEN 等人认为这些变化与 *deio1* 和 *deio2* 基因表达上调有关^[30].本研究中,100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独或与益生菌共暴露后,雌鱼大脑中 T4 水平降低(图 2(D))可能是因为大脑中 *dio1*,*dio2* 和 *dio3b* 基因表达上调所导致.然而,本研究中雌鱼大脑 T3 水平显著下降可能与其他因素有关.



(A) 雄性斑马鱼; (B) 雌性斑马鱼. 实验结果用平均值±标准误差表示. 每个质量浓度有3个平行 ($n=3$). * $P<0.05$ 和 ** $P<0.01$ 表示暴露组和对照相比差异显著. # $P<0.05$ 和### $P<0.001$ 表示共暴露组与单独暴露组相比差异显著.

图3 PFBS (0, 10和100 $\mu\text{g/L}$) 单独或与益生菌共暴露28 d后, 斑马鱼大脑中HPT轴关键基因表达量的变化情况
Fig.3 Changes in the expression levels of key genes of HPT axis in zebrafish brain after 28 days of exposure to PFBS (0, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) alone or combined with probiotics

2.2.4 肝脏相关基因变化

甲状腺激素进入血液后,与血液中特定的甲状腺激素运载蛋白(Transthyretin, TTR)结合,然后被送到外周组织或靶器官.与对照相比,PFBS 单独暴露使雄鱼肝脏中甲状腺激素运载蛋白基因(*ttr*)转录出现下调趋势,而共暴露则对 *ttr* 基因转录影响不大(图 4(A)).在雌鱼肝脏中,与对照相比,PFBS 单独暴露后,雌鱼肝脏中 *ttr* 基因转录呈下降趋势,而添加益生菌的共暴露条件下, *ttr* 基因转录呈上升趋势(图 4(B)).

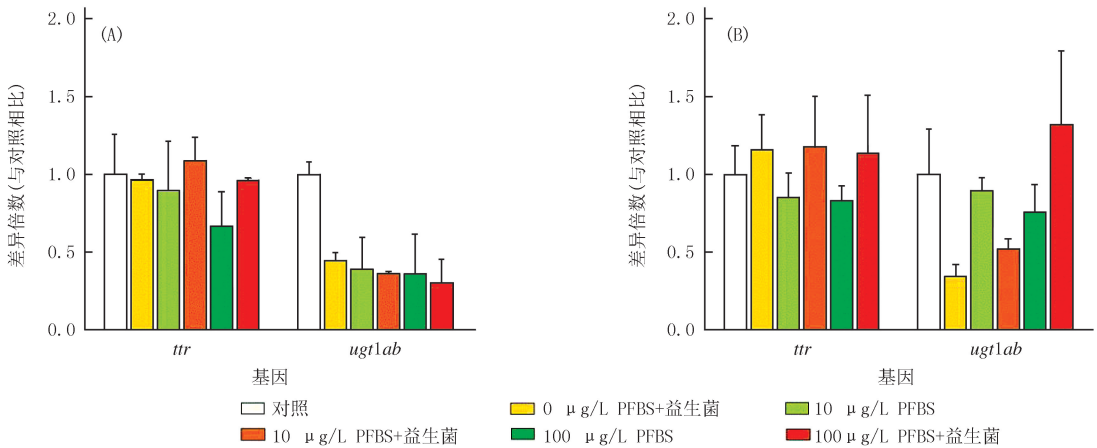
本研究发现,在所有暴露条件下,雄鱼肝脏葡萄糖醛酸转移酶基因(Uridine Diphosphate Glucuronosyl-transferase, *ugt1ab*)表达均出现下调趋势(图 4(A)).而在雌鱼肝脏中,PFBS 单独暴露后, *ugt1ab* 基因表达出现轻微下调趋势(图 4(B)).而有趣的是,益生菌单独暴露使 *ugt1ab* 基因表达出现较大下调趋势,随着 PFBS 质量浓度升高,共暴露条件下 *ugt1ab* 基因表达逐渐上调,并在 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 共暴露中, *ugt1ab* 基因表达略高于对照(图 4(B)).葡萄糖醛酸转移酶能介导 T4 发生葡萄糖醛酸化作用,在斑马鱼体内的甲状腺激素稳态中发挥关键作用^[31-33].本研究中,益生菌单独使用后, *ugt1ab* 基因表达呈下调趋势,可能导致 T4 葡萄糖醛酸化过程受阻,进而使血液中 T4 水平呈上调趋势.

综合甲状腺激素和相关基因表达变化,可以看出 PFBS 暴露干扰甲状腺内分泌系统,而益生菌能在一定程度上调节 PFBS 的作用.除此以外,暴露后甲状腺关键基因的转录存在性别差异,突出了生态风险评估中考虑性别特异性的必要性.

2.3 子代胚胎重量变化

在暴露结束前,收集子代胚胎,测量胚胎质量变化.结果显示,亲代 PFBS 单独暴露不影响子代胚胎质量(图 5).TANG 等^[33]的研究同样未发现亲代 PFBS 暴露后对子代胚胎质量产生影响.共暴露条件下,仅 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露显著增加后胚胎质量.同时,与 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露相比,亲代添加益生

菌共暴露的子代胚胎质量显著增加(图5),可能是低质量浓度PFBS与益生菌之间存在某种相互作用使子代胚胎质量增加。



(A) 雄性斑马鱼, (B) 雌性斑马鱼. 实验结果用平均值±标准误差表示, 每个质量浓度有3个平行($n=3$).

图4 PFBS (0, 10, 100 $\mu\text{g/L}$) 或与益生菌共暴露28 d后, 斑马鱼肝脏中 *ttr* 与 *ugt1ab* 基因表达的变化情况

Fig. 4 Changes in the expression levels of *ttr* and *ugt1ab* gene in zebrafish liver after 28 days of exposure to PFBS (0, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) alone or combined with probiotics

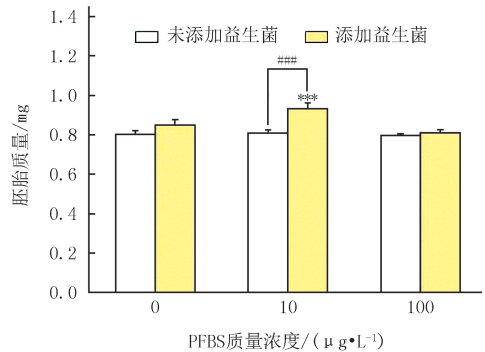
2.4 子代胚胎甲状腺激素水平变化

PFBS 单独或与益生菌共暴露于亲代后, 子代甲状腺激素水平是否受到影响值得关注. 检测结果显示, 仅益生菌单独暴露后, 子代胚胎 T3 水平呈升高趋势(图 6(A)), 其他暴露条件对其影响不大. 10 和 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 单独暴露后, 胚胎中 T4 水平呈先降低和升高的趋势(图 6(B)). 与 PFBS 单独暴露相比, 10 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露后, 子代胚胎 T4 水平变化不大, 而 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露后, 子代胚胎 T4 水平呈下降趋势. 在 T3/T4 比值上, PFBS 或益生菌单独暴露时, 其比值呈增大趋势(图 6(C)). 10 $\mu\text{g/L}$ PFB 与益生菌共暴露相比于 PFBS 单独暴露, T3/T4 比值差异不显著, 而 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露后, T3/T4 比值呈减小趋势, 并趋向对照水平(图 6(C)).

PFBS 能损害海洋青鳉甲状腺轴的多个过程, 并且能够通过亲代影响 F1 代和 F2 代的甲状腺内分泌系统紊乱^[6]. 然而, 可能是物种差异, 本研究未发现子代甲状腺激素紊乱. 另外, POWER 等^[34]研究表明, 卵子发育过程中, 大量的甲状腺激素从母体转移到鱼卵中, 以维持胚胎早期发育的充足供应. 硬骨鱼会在胚胎形成过程中合成更多的甲状腺激素, 以抵消母体库的减少^[35]. 因此, 在胚胎早期的发育过程中, 其甲状腺激素水平不稳定, 这可能是本研究观察到子代胚胎甲状腺激素水平出现轻微波动的原因.

3 结论

本研究结合基因转录和激素水平变化为终点指标, 探讨 PFBS 单独或与益生菌共暴露对亲代及子代甲状腺内分泌系统的影响. 在激素水平上, PFBS 降低了血液 T3 水平, 而添加益生菌能减轻雄鱼血液 T3 水平降低; PFBS 显著降低雌鱼大脑甲状腺激素水平, 而益生菌未能挽救这种效应. 在基因水平上, 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS 与益生菌共暴露促进雄鱼大脑 *tsh β* 基因表达以应对低水平的 T3, 并与相应 PFBS 单独暴露相比差异



实验结果用平均值±标准误差表示, 每个质量浓度有3个平行($n=3$). *** $P < 0.001$ 表示暴露组和对照相比差异显著; *** $P < 0.001$ 表示共暴露组与单独暴露组相比差异显著.

图5 PFBS (0, 10和100 $\mu\text{g/L}$) 单独或与益生菌共暴露28 d后, 斑马鱼子代胚胎质量的变化情况

Fig. 5 Changes in embryonic weight of zebrafish after 28 days of exposure to PFBS (0, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) alone or combined with probiotics

显著,表明添加益生菌可以减轻高质量浓度 PFBS 诱导的大脑 T3 水平降低;PFBS 单独暴露上调雌鱼大脑 *tra* 基因表达,而 PFBS 与益生菌共暴露上调 *tra* 和 *trβ* 基因表达,表明添加益生菌能使机体更积极地应对 PFBS 诱导的雌鱼大脑 T3 水平降低.亲代 PFBS 单独或与益生菌共暴露后对子代胚胎重量和甲状腺激素影响不大.综上,PFBS 单独暴露能引起斑马鱼的甲状腺内分泌系统紊乱,而 PFBS 与益生菌共暴露后,益生菌能在一定程度上通过甲状腺激素水平和基因表达调节 PFBS 的毒性效应.本研究结果可为后续 PFBS 毒性效应的研究及毒性缓解措施的开发提供重要参考.

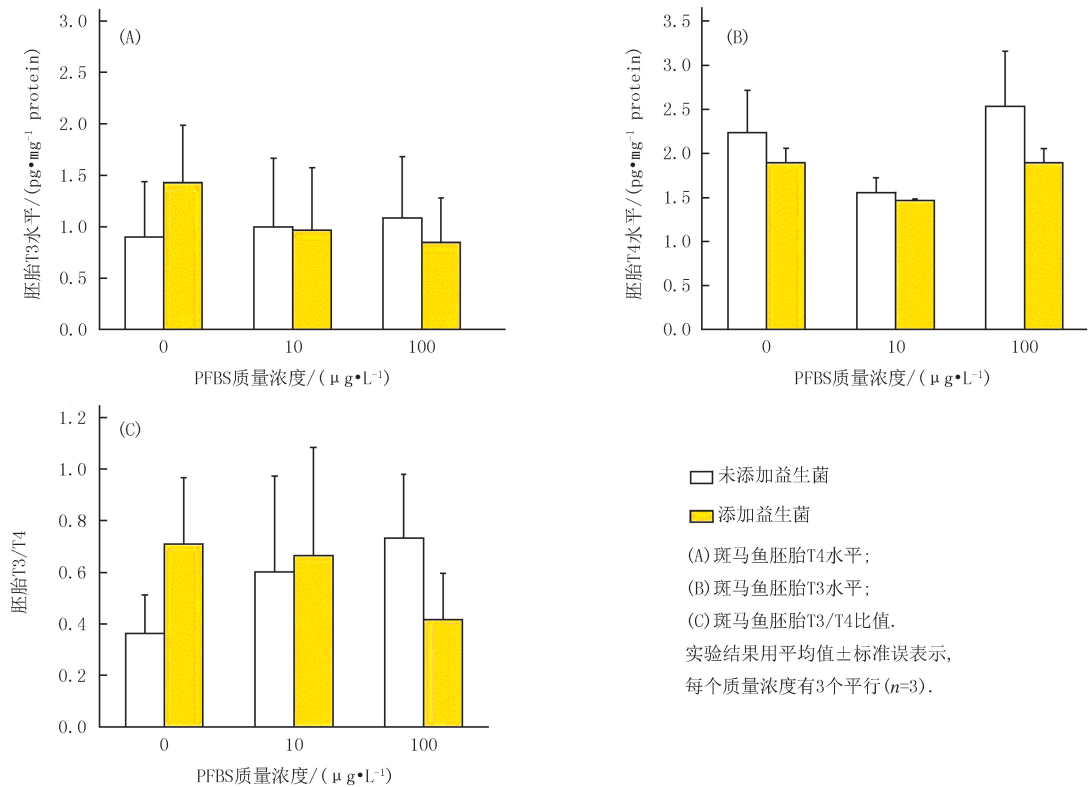


图6 PFBS(0,10和100 $\mu\text{g}/\text{L}$)单独或与益生菌共暴露28 d对斑马鱼子代胚胎中甲状腺激素水平的影响
Fig.6 Effects of PFBS(0,10 and 100 $\mu\text{g}/\text{L}$) alone or combined with probiotics on thyroid hormone levels in zebrafish embryos after 28 days of exposure

参 考 文 献

- [1] TIAN X Z, YU Z S, FENG P Y, et al. *Lactobacillus plantarum* TW1-1 alleviates diethylhexylphthalate-induced testicular damage in mice by modulating gut microbiota and decreasing inflammation[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2019, 9:221.
- [2] SHI Y L, VESTERGRN R, NOST T H, et al. Probing the differential tissue distribution and bioaccumulation behavior of per- and polyfluoroalkyl substances of varying chain-lengths, isomeric structures and functional groups in crucian carp[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(8):4592-4600.
- [3] YIN T R, CHEN H T, REINHARD M, et al. Perfluoroalkyl and polyfluoroalkyl substances removal in a full-scale tropical constructed wetland system treating landfill leachate[J]. *Water Research*, 2017, 125:418-426.
- [4] LAM J C W, LYU J L, KWOK K Y, et al. Perfluoroalkyl substances (PFASs) in marine mammals from the South China sea and their temporal changes 2002-2014: concern for alternatives of PFOS? [J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(13):6728-6736.
- [5] SANT K E, VENEZIA O L, SINNO P P, et al. Perfluorobutanesulfonic acid disrupts pancreatic organogenesis and regulation of lipid metabolism in the zebrafish, *Danio rerio* [J]. *Toxicological Sciences*, 2019, 167(1):258-268.
- [6] CHEN L G, TSUI M M P, SHI Q P, et al. Accumulation of perfluorobutane sulfonate (PFBS) and impairment of visual function in the eyes of marine medaka after a life-cycle exposure[J]. *Aquatic Toxicology*, 2018, 201:1-10.
- [7] CHEN L G, HU C Y, TSUI M M P, et al. Multigenerational disruption of the thyroid endocrine system in marine medaka after a life-cycle exposure to perfluorobutanesulfonate[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(7):4432-4439.
- [8] CHEN L G, LAM J C W, HU C Y, et al. Perfluorobutanesulfonate exposure skews sex ratio in fish and transgenerationally impairs repro-

- duction[J].Environmental Science & Technology,2019,53(14):8389-8397.
- [9] TANG L Z,LIU M Y,SONG S W,et al.Interaction between hypoxia and perfluorobutane sulfonate on developmental toxicity and endocrine disruption in marine medaka embryos[J].Aquatic Toxicology,2020,222:105466.
- [10] CHEN L G,TSUI M M P,HU C Y,et al.Parental exposure to perfluorobutanesulfonate impairs offspring development through inheritance of paternal methylome[J].Environmental Science & Technology,2019,53(20):12018-12025.
- [11] HOOSHYAR Y,ABEDIAN KENARI A,PAKNEJAD H,et al.Effects of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 on different parameters related to health status of rainbow trout(*Oncorhynchus mykiss*) and the protection against *Yersinia ruckeri*[J].Probiotics and Antimicrobial Proteins,2020,12(4):1370-1384.
- [12] DAVIS D J,DOERR H M,GRZELAK A K,et al.*Lactobacillus plantarum* attenuates anxiety-related behavior and protects against stress-induced dysbiosis in adult zebrafish[J].Scientific Reports,2016,6:33726.
- [13] ZHAI Q X,WANG G,ZHAO J X,et al.Protective effects of *Lactobacillus plantarum* CCFM8610 against chronic cadmium toxicity in mice indicate routes of protection besides intestinal sequestration[J].Applied and Environmental Microbiology,2014,80(13):4063-4071.
- [14] CHEN L G,LAM J C W,TANG L Z,et al.Probiotic modulation of lipid metabolism disorders caused by perfluorobutanesulfonate pollution in zebrafish[J].Environmental Science & Technology,2020,54(12):7494-7503.
- [15] HU C Y,TANG L Z,LIU M Y,et al.Probiotic modulation of perfluorobutanesulfonate toxicity in zebrafish:Disturbances in retinoid metabolism and visual physiology[J].Chemosphere,2020,258:127409.
- [16] LIU M Y,SONG S W,HU C Y,et al.Dietary administration of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* modulates the neurological toxicities of perfluorobutanesulfonate in zebrafish[J].Environmental Pollution,2020,265:114832.
- [17] BORRELLI L,ACETO S,AGNISOLA C,et al.Probiotic modulation of the microbiota-gut-brain axis and behaviour in zebrafish[J].Scientific Reports,2016,6:30046.
- [18] ALUWONG T,HASSAN F,DZENDA T,et al.Effect of different levels of supplemental yeast on body weight,thyroid hormone metabolism and lipid profile of broiler chickens[J].Journal of Veterinary Medical Science,2013,75(3):291-298.
- [19] KLIEVERIK L P,JANSSEN S F,VAN RIEL A,et al.Thyroid hormone modulates glucose production via a sympathetic pathway from the hypothalamic paraventricular nucleus to the liver[J].Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,2009,106(14):5966-5971.
- [20] ABDEL-MONEIM A M E,ELBAZ A M,KHIDR R E S,et al.Effect of in ovo inoculation of *Bifidobacterium* spp.on growth performance,thyroid activity,ileum histomorphometry, and microbial enumeration of broilers[J].Probiotics and Antimicrobial Proteins,2020,12(3):873-882.
- [21] MOUSTAFA S A.Effect of glutathione(GSH)depletion on the serum levels of triiodothyronine(T3),thyroxine(T4),and T3/T4 ratio in allyl Alcohol? Treated male rats and possible protection with zinc[J].International Journal of Toxicology,2001,20(1):15-20.
- [22] KANWAL Z,TAYYEB A.Role of dietary probiotic Ecotec in growth enhancement,thyroid tuning,hematomorphology and resistance to pathogenic challenge in *Labeo rohita* juveniles[J].Journal of Applied Animal Research,2019,47(1):394-402.
- [23] 田娟.鲟类变态发育基因($TR\alpha$ 、 $TR\beta$ 和ALP)的表达及其与甲状腺激素的关系[D].上海:上海海洋大学,2010.
TIAN J.The Expression of metamorphosis Genes ($TR\alpha$, $TR\beta$ and ALP) and relationship between thyroid hormone and metamorphosis genes of flatfish[D].Shanghai:Shanghai Ocean University,2010.
- [24] GOULART-SILVA F,DE SOUZA P B,NUNES M T.T3 rapidly modulates TSH β mRNA stability and translational rate in the pituitary of hypothyroid rats[J].Molecular and Cellular Endocrinology,2011,332(1/2):277-282.
- [25] YUSTA B,ALARID E T,GORDON D F,et al.The thyrotropin beta-subunit gene is repressed by thyroid hormone in a novel thyrotrope cell line,mouse T alphaT1 cells[J].Endocrinology,1998,139(11):4476-4482.
- [26] STATON J M,LEEDMAN P J.Posttranscriptional regulation of thyrotropin beta-subunit messenger ribonucleic acid by thyroid hormone in murine thyrotrope tumor cells;a conserved mechanism across species[J].Endocrinology,1998,139(3):1093-1100.
- [27] LIU Y W,CHAN W K.Thyroid hormones are important for embryonic to larval transitory phase in zebrafish[J].Differentiation,2002,70(1):36-45.
- [28] LIU M L,YI S J,CHEN P Y,et al.Thyroid endocrine disruption effects of perfluoroalkyl phosphinic acids on zebrafish at early development[J].Science of the Total Environment,2019,676:290-297.
- [29] FRIESEMA E C H,GANGULY S,ABDALLA A,et al.Identification of monocarboxylate transporter 8 as a specific thyroid hormone transporter[J].Journal of Biological Chemistry,2003,278(41):40128-40135.
- [30] CHEN Q,YU L Q,YANG L H,et al.Bioconcentration and metabolism of decabromodiphenyl ether(BDE-209)result in thyroid endocrine disruption in zebrafish larvae[J].Aquatic Toxicology,2012(110/111):141-148.
- [31] YU L Q,LAM J C W,GUO Y Y,et al.Parental transfer of polybrominated diphenyl ethers(PBDEs)and thyroid endocrine disruption in zebrafish[J].Environmental Science & Technology,2011,45(24):10652-10659.
- [32] WANG Q W,LIANG K,LIU J F,et al.Exposure of zebrafish embryos/larvae to TDCPP alters concentrations of thyroid hormones and

transcriptions of genes involved in the hypothalamic-pituitary-thyroid axis[J]. *Aquatic Toxicology*, 2013, 126: 207-213.

- [33] TANG L Z, SONG S W, HU C Y, et al. Parental exposure to perfluorobutane sulfonate disturbs the transfer of maternal transcripts and offspring embryonic development in zebrafish[J]. *Chemosphere*, 2020, 256: 127169.
- [34] POWER D M, LLEWELLYN L, FAUSTINO M, et al. Thyroid hormones in growth and development of fish[J]. *Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology*, 2001, 130(4): 447-459.
- [35] PORAZZI P, CALEBIRO D, BENATO F, et al. Thyroid gland development and function in the zebrafish model[J]. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 2009, 312(1/2): 14-23.

Combination effect of perfluorobutanesulfonate and probiotics on thyroid endocrine system of zebrafish

Chen Lianguo, Tang Lizhu, Bai Yachen

(State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology; Institute of Hydrobiology,
Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China)

Abstract: Perfluorobutanesulfonate (PFBS), an emerging pollutant, could disturb the thyroid endocrine system of fish, while probiotics can potentially mitigate the harmful effect of environmental pollutants on organisms. However, it remains unknown whether probiotics can modulate the toxicity of PFBS in the thyroid endocrine system of aquatic organisms. In this study, adult zebrafish were exposed to a series of PFBS concentrations (0, 10 and 100 $\mu\text{g/L}$) for 28 days, and fed with or without probiotics (*Lactobacillus rhamnosus*). Genes related to the parental hypothalamic-pituitary-thyroid axis as well as thyroid hormone levels in the parental brain, blood and offspring embryos were investigated to explore the thyroid endocrine disruption effect induced by combined exposure of PFBS and probiotics. The results showed that PFBS decreased the T3 level of parental blood, which was alleviated by probiotics in male fish blood. At the gene level, exposure of 100 $\mu\text{g/L}$ PFBS with probiotics promoted the *tsh β* gene expression of male fish brain as stimulated by the decreased T3, which is significantly different from that of the PFBS exposure alone, suggesting that the addition of probiotics could also alleviate the decrease of brain T3 induced by high concentration of PFBS. Exposure to PFBS alone up-regulated the expression of *tra* gene in female fish brain, while co-exposure to PFBS and probiotics up-regulated the expression of *tra* and *tr β* genes, implying that the addition of probiotics could react to the T3 decrease induced by PFBS in female fish brain more actively. In conclusion, exposure to PFBS alone could cause thyroid endocrine system disruption in zebrafish, while in the combination of PFBS and probiotics, probiotics could modulate these effects of PFBS through thyroid hormone levels and gene expression. Based on the above findings, this study can provide reference for the follow-up study on the toxic effects of PFBS and toxicity mitigation measures.

Keywords: perfluorobutanesulfonate; probiotics; thyroid endocrine; gene transcription; hormone

[责任编辑 刘洋 杨浦]