

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20240205001

彭九妹, 李圆圆, 秦占芬, 等. 基于两栖动物的甲状腺干扰物测试方法分析[J]. 生态毒理学报, 2024, 19(3): 131-139

Peng J M, Li Y Y, Qin Z F, et al. Analysis of amphibian-based assays for thyroid disruptors [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2024, 19(3): 131-139
(in Chinese)

基于两栖动物的甲状腺干扰物测试方法分析

彭九妹^{1,2}, 李圆圆^{2,3,#}, 秦占芬^{2,3}, 何益得^{1,*}, 张永军¹

1. 南京工业大学环境科学与工程学院, 南京 211816

2. 中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085

3. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2024-02-05 录用日期: 2024-03-20

摘要: 两栖动物经历一个主要由甲状腺激素(TH)调控的变态发育过程, 表现为外部形态和内部组织器官乃至 TH 靶基因表达的剧烈变化, 这为研究和测试甲状腺干扰物提供了一个良好的模型。自 2009 年以来, 经济合作组织(OECD)相继发布了 3 个基于两栖动物的甲状腺干扰物测试方法导则, 即两栖动物变态试验(amphibian metamorphosis assay, AMA)导则 TG 231、两栖动物幼体生长和发育试验(larval amphibian growth and development assay, LAGDA)导则 TG 241 和爪蛙活动胚胎甲状腺试验(*Xenopus* eleutheroembryo thyroid assay, XETA)导则 TG 248。目前这些方法已被纳入 OECD 的内分泌干扰物测试和评估概念框架, 用于筛查测试甲状腺干扰物。不同于以自然变态发育为基础的 AMA 和 LAGDA, 国内学者发展了筛查甲状腺干扰物的 T3 诱导爪蛙变态试验(T3-induced *Xenopus* metamorphosis assay, TiXMA)。为促进对这些方法的理解和应用, 本文综述了各方法的原理、终点指标、结果解释和应用现状, 初步比较了各方法测试甲状腺干扰物的敏感性和特异性, 并提出通过开展更多化学物质测试以对方法进行验证的必要性。

关键词: 甲状腺干扰物; 两栖动物; 变态发育; 测试方法

文章编号: 1673-5897(2024)3-131-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Analysis of Amphibian-based Assays for Thyroid Disruptors

Peng Jiumei^{1,2}, Li Yuanyuan^{2,3,#}, Qin Zhanfen^{2,3}, He Yide^{1,*}, Zhang Yongjun¹

1. School of Environmental Science and Engineering, Nanjing Tech University, Nanjing 211816, China

2. Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

3. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 5 February 2024 accepted 20 March 2024

Abstract: Amphibians undergo a metamorphic developmental process primarily regulated by thyroid hormone (TH), exhibiting dramatic changes in external morphology and internal tissues and organs and even in the expression of TH target genes, providing an ideal model for studying and testing thyroid disruptors. Since 2009, the Organization for Economic Cooperation and Development (OECD) has successively released three testing guide-

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22076211); 江苏省自然科学基金面上项目(BK20231278); 国家环境保护农药环境评价与污染控制重点实验室开放基金

第一作者: 彭九妹(2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为生态毒理学, E-mail: py3021796505@163.com

* **通信作者** (Corresponding author), E-mail: heyd@njtech.edu.cn

共同通信作者 (Co-corresponding author), E-mail: yyli@rcees.ac.cn

lines for thyroid disruptors based on amphibians, namely the amphibian metamorphosis assay (AMA, TG 231), the larval amphibian growth and development assay (LAGDA, TG 241), and the *Xenopus* eleutheroembryo thyroid assay (XETA, TG 248). These three assays are currently incorporated into The OECD Conceptual Framework for Testing and Assessment of Endocrine Disrupting Chemicals for screening and testing thyroid disruptors. Compared to AMA and LAGDA, which are based on spontaneous metamorphosis, Chinese researchers have developed the T3-induced *Xenopus* metamorphosis assay (TiXMA) for screening thyroid disruptors. To promote the understanding and application of these assays, this paper reviews the principles, endpoints, result interpretation, and the current application status of each assay, preliminarily compares their sensitivity and specificity for thyroid disruptors. It emphasized the need to validate these assays through testing more chemicals.

Keywords: thyroid disruptors; amphibian; metamorphic development; assay

内分泌干扰物(endocrine disrupting chemicals, EDCs)的生态危害和健康风险是近年来环境科学研究的热点问题,也越来越受到管理部门的关注。目前,邻苯二甲酸酯、双酚 A(BPA)等几种已知的 EDCs 已经被欧美等发达国家纳入一些监管体系^[1],特别是 2023 年欧盟的分类、标签和包装(classification, labeling and packaging, CLP)法规将内分泌干扰列作为一种新危害并要求进入欧洲市场的化学品进行相应的危害分类和标签^[2]。在我国,化妆品、儿童玩具、奶瓶等用品中邻苯二甲酸酯、双酚 A 的使用也开始受到监管^[3-4],而且 EDCs 已被列为新污染物治理行动中重点关注的一类污染物^[5]。各国监管体系对 EDCs 的关注无疑对 EDCs 的测试和评估方法提出更高的要求。

甲状腺干扰物(thyroid disrupting chemicals, TDCs)同环境雌激素和环境雄激素一样,是受到高度关注的一类 EDCs。研究显示,一些 TDCs 可能通过影响甲状腺激素(thyroid hormones, THs)即四碘甲状腺原氨酸(tetraiodothyronine, T4)和三碘甲状腺原氨酸(triiodothyronine, T3)合成、代谢、转运或与其受体(TH receptors, TRs)结合而产生甲状腺干扰作用^[6]。与环境雌激素和环境雄激素相比,TDCs 的筛查和测试方法整体发展相对落后,缺少理想的基于哺乳动物或者鱼类的测试方法。两栖动物因为经历一个主要由 TH 调控的变态发育过程,为 TDCs 的研究和测试提供了一个理想的模型^[7]。具体来说,两栖动物蝌蚪变态成蛙过程中,外部形态会发生剧烈变化,包括四肢生长、尾吸收、头重塑、口角变宽等,伴随肠、肝、肺等重要器官快速发育。这一变态过程高度依赖 TH,即 TH 与 TR 结合激活或者抑制靶基因表达而诱导变态发生。如果有外源物质影响血清或者组织内 TH 水平,或者干扰 TH 与 TR

结合进而干扰靶基因的转录,变态发育的时间、速度或一些相关的参数会发生改变。相应地,外源物质是否影响变态发育,可一定程度上反映物质是否具有甲状腺干扰作用。2009 年经济合作组织(OECD)发布两栖动物变态试验(amphibian metamorphosis assay, AMA)导则 TG 231^[8],用于筛查下丘脑-垂体-甲状腺(hypothalamic-pituitary-thyroid, HPT)轴上的干扰。之后又有长期的两栖动物幼体生长和发育试验(larval amphibian growth and development assay, LAGDA)导则 TG 241^[9]和更短期的爪蛙活动胚胎甲状腺试验(*Xenopus* eleutheroembryo thyroid assay, XETA)导则 TG 248^[10]相继出台。同时,我国学者发展了 T3 诱导爪蛙变态试验(T3-induced *Xenopus* metamorphosis assay, TiXMA),可快速筛查涉及 TH 水平或基于 TR 结合的 TH 信号干扰物^[11-13]。目前这些方法得到了不同程度的应用,但总体相关数据有限,方法的敏感性和特异性需要进一步评估。

目前,监管机构和毒理学专家正在开发包括体外实验在内的 TDCs 高通量筛选新方法。然而,未经过动物实验验证的体外测试结果,存在高假阳性率的可能性^[14]。因此,基于两栖动物变态发育的 TDCs 测试方法仍然是不可或缺的。为促进对以上几种测试方法的理解和应用,本文将对每个方法的原理、终点指标、结果解释和应用现状进行介绍,初步比较各方法测试甲状腺干扰物的敏感性和特异性,并分析进一步进行方法验证的必要性。

1 两栖动物变态试验 (Amphibian metamorphosis assay)

按照 OECD TG 231 描述,AMA 试验以筛查干扰 HPT 轴的 TDCs 为目的^[8]。下丘脑和垂体作为甲状腺的上级调控者,当受到干扰时可能导致 TH 水

平的变化;甲状腺本身受到影响也可能出现 TH 水平升高或者降低。因为两栖动物的变态发育高度依赖 TH,如果有 TDCs 干扰 HPT 导致 TH 水平升高或者降低,理论上会表现出变态发育的改变,通过发育期、后肢长度等指标可以直观指示变态发育的改变,从而间接反映对 HPT 轴的干扰。该方法推荐两栖动物模式生物非洲爪哇蝌蚪为试验生物,从 51 期开始暴露于受试物,暴露第 7 天后,称量体质量,测量吻泄长(snout to vent length, SVL)和后肢长(hindlimb length, HLL),并根据形态判断发育期(developmental stage);暴露至 21 d 后,再次检查以上指标,根据形态鉴别发育期,并固定蝌蚪下颌,后续选择性进行甲状腺形态和组织学分析。发育期和 SVL 标准化的后肢长(HLL/SVL)是判断是否影响变态发育的特异性指标。对于结果解释,TG 231 做了较明确的说明(表 1):变态发育提前(发育期提高和/或 HLL/SVL 增加)被认为是甲状腺激活的结果,不必进一步做甲状腺组织学检查;发育不同步(一些组织器官处于不同的发育期)也被认为是甲状腺干扰的作用,也不必做甲状腺组织学检查;蝌蚪发育延迟(发育期降低和/或 HLL/SVL 减小)不能单独作为具有抗甲状腺活性的诊断标志,需要结合甲状腺形态和组织学结构综合判断受试物是否有甲状腺干扰活性。甲状腺形态和组织学的诊断标准包括甲状腺肥大/萎缩、滤泡细胞肥大、滤泡细胞增生;此外还可以考虑滤泡腔面积、胶质质量、滤泡细胞高度/形状等定性指标。

目前 AMA 试验已作为第 3 级方法被列入 OECD 的内分泌干扰物测试和评估概念框架中^[15],在化学品、植物保护剂和杀生物剂的内分泌干扰筛查中得到一定程度上的应用。然而随着数据的积累,AMA 试验对于筛查 TDCs 的敏感性和特异性受到质疑。2019 年 Dang^[16]综合分析了来自美国环境保护局(US EPA)和 OECD 方法验证测试报告以及 3 篇研究论文中 57 种化学物质的 AMA 试验数据,就 12 种已知的甲状腺活性物质(甲硫咪唑、丙基硫氧嘧啶、高氯酸盐、T4 等)而言,HLL/SVL 这一指标的敏感性高于发育期,其中干扰 TH 合成的甲硫咪唑、丙基硫氧嘧啶和高氯酸盐对甲状腺组织学结构的影响比对 HLL/SVL 的影响更明显;然而除 12 种已知的甲状腺活性物质外的 45 种物质中,大概有 70% 的物质导致 HLL/SVL 或者发育期的变化,绝大部分没有伴随甲状腺组织学结构的变化。这些变态发育

指标的改变部分可以用暴露导致的急性毒性解释,认为不是特异性的甲状腺干扰导致变态发育发生改变。排除急性毒性,HLL/SVL 和发育期的改变是否特异性地指示甲状腺干扰作用还需要进一步研究。

从两栖动物变态发育的生物学过程考虑,TG 231 对 AMA 试验结果的解释过分强调了 TH 对蝌蚪变态发育的影响,而忽略了除 TH 外还有一些其他生物信号也参与。比如,目前已知皮质激素、生长激素、催乳素等激素都参与蝌蚪的发育^[17-18],此外可能还有更多未知的因素参与。因此依赖发育期的提前或者滞后不能特异性地指示是否是甲状腺的干扰,而后肢生长相对于整体发育可能比单纯发育期更能特异性地反映甲状腺干扰。总体来看,在 21 d 的 AMA 试验过程中,蝌蚪从预变态期发育到前变态期甚至变态高峰期,HLL/SVL 作为反映甲状腺活性的重要指标的特异性还需要进一步论证。因此,TG 231 给出的 AMA 数据的解释也需要重新评估,特别是变态发育提前(发育期提高和/或 HLL/SVL 增加)能否解释为甲状腺激活,或是发育延迟(发育期降低和/或 HLL/SVL 减小)需要结合怎样的甲状腺组织学结构变化或其他指标才可解释为甲状腺抑制,都有待进一步的研究。

2 两栖动物幼体生长和发育试验(Larval amphibian growth and development assay)

继 2009 年 TG 231 发布后,2015 年 OECD 又发布了关于 LAGDA 的试验导则 TG 241^[9]。LAGDA 是一个测试化学物质对两栖动物早期发育、变态发育、生长以及生殖系统发育不良影响的方法,可用于评估可疑的 EDCs,在 OECD 的内分泌干扰物测试和评估概念框架中该方法被列入第 4 级方法^[14],用以提供 EDCs 不良效应方面的数据,涉及雌激素、雄激素和甲状腺介导的生物学效应。该试验方法也推荐以非洲爪蛙为试验生物,从 8~10 期胚胎开始暴露目标物质,至 62 期时,检查体长、SVL、体质量以及到达 62 期的时间和甲状腺组织学结构,后面 2 个指标用于指示甲状腺干扰活性(表 1);之后在继续暴露 10 周,检查肝体指数、基因性别、表型性比以及性腺、生殖管、肝脏和肾脏的组织学结构,另外选择性检测血清中卵黄蛋白原水平,其中中性比、性腺和生殖管组织学结构和卵黄蛋白原水平用于反映对生殖系统发育的不良影响,部分指示雌激素和雄激素相关的内分泌干扰。

表 1 基于两栖动物的甲状腺干扰物测试方法的比较

Table 1 Comparison of thyroid disruptor assays using amphibians

暴露时间 Exposure duration	两栖动物变态试验(AMA) Amphibian metamorphosis assay (AMA)	两栖动物幼体生长和发育试验(LAGDA) Larval amphibian growth and development assay (LAGDA)	爪哇活动胚胎甲状腺试验(XETA) <i>Xenopus</i> eleutheroembryonic thyroid assay (XETA)	T3 诱导爪哇变态试验(TIXMA) T3-induced <i>Xenopus</i> metamorphosis assay (TIXMA)
21 d		16 周 16 weeks	3 d	4 d
7 d:				
终点指标 Endpoints	1) 体质量(Body weight) 2) 吻泄长(Snout-vent length) 3) 后肢长(Hindlimb length) 4) 发育期(Developmental stage) 21 d: 1) 体质量(Body weight) 2) 吻泄长(Snout-vent length) 3) 后肢长(Hindlimb length) 4) 发育期(Developmental stage) 5) 甲状腺组织学 (Thyroid histology)(可选 Optional)	1) 发育至 62 期时间 (Time to reach stage 62) 2) 吻泄长(Snout-vent length) 3) 体质量(Body weight) 4) 甲状腺组织学(Thyroid histology)	GFP 绿色荧光强度 (Fluorescence intensity of green fluorescent protein)	1) 体质量(Body weight) 2) 吻泄长(Snout-vent length) 3) 后肢长(Hindlimb length) 4) 口角宽(Mouth width) 5) 头部面积(Head area) 6) 单侧脑宽/脑长 (Unilateral brain width/length of brain) 7) 甲状腺组织学(Thyroid histology) 8) 甲状腺胶质占比(Thyroid colloid ratio)
结果解释 Result interpretation	1) 提前发育; 甲状腺激活 (Advanced development: Thyroid activation) 2) 不同步发育; 甲状腺干扰 (Asynchronous development: Thyroid disruption) 3) 延迟发育; 不确定 (Delayed development: Uncertainty)	无 None	1) 无 T3 诱导, 荧光增强; 甲状腺活性 (In the absence of T3, fluorescence increase: Thyroid active) 2) 无 T3 诱导, 荧光减弱; 甲状腺不相关 (In the absence of T3, fluorescence decrease: Not thyroid related) 3) 有 T3 诱导, 荧光增强或减弱; 甲状腺活性 (In the presence of T3, fluorescence increase/decrease: Thyroid active)	1) 无 T3 诱导, 变态不改变; 有 T3, 变态抑制; 甲状腺抑制 (No altered metamorphosis in the absence of T3 and inhibited metamorphosis in the presence of T3: Thyroid inhibition) 2) 其他场景; 不确定 (Other scenario: Uncertainty)
声明适用靶点 Declared targets	HPT 轴 (HPT axis)	无 None	1) TR 激活/拮抗(TR activation/antagonism) 2) TH 代谢(TH metabolism) 3) TH 转运(TH transfers)	1) TR 拮抗(TR antagonism) 2) HPT 轴(HPT axis)
已有数据量 Amount of data available	+++	-	++	++

注: +表示现有数据量, -表示暂无数据; TR 表示甲状腺激素受体, TH 表示甲状腺激素, T3 表示三碘甲状腺原氨酸。

Note: "+" denotes amount of data available, "-" denotes no data available; TR denotes thyroid hormone receptor, TH denotes thyroid hormone, and T3 denotes triiodothyronine.

需要指出的是, TG 241 颁布前进行方法验证的化学物质和参与验证的实验室都有限, 所以 TG 241 强调待数据充分后需要对方法进行评估。尽管欧盟已将 LAGDA 认定为识别 EDCs (包括 TDCs) 的一个方法^[19], 但目前来看, 有关 LAGDA 应用的数据依旧十分有限。最近, Dang^[19]就有限的数据对 LAGDA 和 AMA 进行比较, 认为在测试 TDCs 方面 LAGDA 不比 AMA 更敏感。实际上, 仅就试验周期过长而言, LAGDA 很难在实验室间推广。

3 爪蛙活动胚胎甲状腺试验 (*Xenopus eleuthero-embryonic thyroid assay*)

基于爪蛙活动胚胎的 XETA 是法国 Demeneix 实验室开发的一种筛查 TDCs 的方法^[20], 2019 年 OECD 就这一方法发布试验导则 TG 248^[10]。该方法以发育至 45 期的转基因 *th/bzip-eGFP* 非洲爪蛙胚胎为材料, *th/bzip* 是 TH 的靶基因, 其启动子可被 TH 或具有 TH 活性的物质由 TR 介导激活, 从而诱导表达绿色荧光蛋白 (GFP), 由此可根据是否激活 GFP 表达判断受试物是否具有 TH 活性; 另外, 在有 TH 存在时, 可根据受试物是否影响 TH 诱导的 GFP 的表达判断受试物是否具有甲状腺干扰活性, 理论上涉及 TH 与 TR 结合、TH 代谢和转运等环节的干扰都可能通过荧光强度的改变被检出, 但是因为这一时期的甲状腺尚不具备合成 TH 的能力, 该方法不能检出 HPT 轴尤其是 TH 合成环节的干扰 (表 1)。因为该试验受试物暴露在 6 孔板中进行, 暴露周期仅为 72 h, 而且直接利用荧光显微镜对荧光强度进行定量, 所以具有明显的简便快捷的优点, 并一定程度上可以实现通量检测, 适用于对大量化学物质进行 TDCs 的筛查。

利用 XETA 试验 Demeneix 实验室对多种化学物质进行了测试。他们发现 $1 \sim 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 可抑制 $5 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ T3 诱导的 GFP 的表达, 表现出 TH 信号的拮抗作用。相似地, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 四溴双酚 A (TBBPA) 也表现出 TH 信号的拮抗作用, 而更低浓度的 TBBPA 没有类似的效应^[20]。之后用这一方法筛查孕妇羊水中检出的 15 种污染物的甲状腺干扰活性, 发现有 11 种污染物影响了 T3 诱导的 GFP 的表达水平, 其中三氯生、邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯、六氯苯、4,4'-二氯二苯二氯乙烯、多氯联苯 153、十溴二苯醚、全氟辛酸和甲基氯化汞促进 T3 诱导的 GFP 的表达, 高氯酸钠和氯化铅抑制 T3 诱导的 GFP 的表达, 而全氟磺酸呈现双向剂量-效应, 而

BPA、二苯甲酮-3、邻苯二甲酸二丁酯和 2-萘酚没有效应^[21]。最近又有几个研究报道除草剂利谷隆、杀虫剂毒死蜱以及某些环境水样提取物也可影响 GFP 报告基因的表达^[22-24]。这些研究将所有影响 GFP 表达的物质都认定为 TDCs, 没有考虑是否存在假阳性的问题。实际上, 可能有些物质对 TH 报告基因 GFP 表达的影响是由于甲状腺无关的通路间接导致的。以杀虫剂毒死蜱为例, 它是一种已知通过抑制胆碱酯酶产生神经毒性的物质^[25], 在 XETA 试验中观察到的对 GFP 表达的影响有可能是它的神经毒性间接导致的, 不一定是甲状腺相关的机制。因此, 对 XETA 试验结果的解释还需要更多的论证。

4 T3 诱导爪蛙变态试验 (*T3-induced Xenopus metamorphosis assay*)

预变态期的蝌蚪可被外源性 T3 诱导提前变态, 表现为后肢伸长、腮吸收、头部和脑重塑等外部形态的变化, 同时肠、肺以及甲状腺等器官快速发育, 伴随着 TH 靶基因表达显著上调。当有甲状腺干扰物与 T3 共作用时, 可能抑制或者促进 T3 诱导的变态。Ishihara 等^[26]报道, 多氯联苯拮抗 T3 诱导的 53/54 期非洲爪蛙蝌蚪变态发育以及脑中 TH 靶基因的表达, 呈现甲状腺抑制作用。Heimeier 等^[27]发现, $100 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ BPA 拮抗 $2 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ T3 诱导的 54 期蝌蚪变态。已知的甲状腺抑制剂 TBBPA 对 T3 诱导变态的影响在更多的研究中都有报道^[20,28]。在这些研究的基础上, 我国实验室选择 52 期蝌蚪通过系统地探究 T3 诱导变态的剂量-效应关系和时间-效应关系, 发展了 TiXMA^[11,13]。该方法使用 52 期非洲爪蛙蝌蚪为材料, 单独或者与 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ T3 共暴露受试物; 1 d 后收集肠组织以备用于 TH 靶基因表达水平的检测; 4 d 后, 称量体质量并分析蝌蚪的形态学参数, 包括头部面积、吻宽度、半脑宽/脑长、后肢长、吻泄长等, 同时收集下颌以备用于甲状腺组织学检查。通过分析体质量和形态学指标, 首先确定 $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ T3 对蝌蚪变态的诱导作用, 然后确定受试物单独暴露是否具有抑制的作用, 进而分析在 T3 存在的条件下, 受试物是否抑制 T3 诱导的变态。对照组蝌蚪在暴露后与暴露前体质量和形态学没有明显变化, $1 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ T3 诱导蝌蚪体质量下降和形态学改变, 视为检测有效; 如果观察到受试物单独暴露对体质量和形态学参数没有明显影响, 而与 T3 共暴露时, 明显抑制 T3 诱导的

变态,则认为受试物具有甲状腺抑制作用;其他结果视为甲状腺干扰活性不确定。为确定甲状腺抑制的机制,可进一步通过检测肠中 TH 靶基因的表达和甲状腺组织学结构分析受试物是在与 TR 结合或者在 HPT 轴(TH 合成)环节产生甲状腺抑制作用。该试验主要针对甲状腺抑制作用,是否可检出甲状腺激活作用还需要进一步探讨。

利用 TiXMA 方法,可有效检出 TH 合成抑制剂高氯酸盐、甲巯咪唑的甲状腺抑制作用^[29]。Zhou 等^[29]报道,甲巯咪唑在 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下单独暴露蝌蚪 4 d,对体质量、形态学指标和甲状腺组织学结构都没有影响;但是在 T3 存在下, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲巯咪唑即可明显抑制 T3 诱导的所有变态指标的变化,且随浓度增加($25, 125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$)效应更明显。同样, $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 高氯酸钠暴露 4 d 对蝌蚪体质量、形态学指标和甲状腺组织学结构都没有影响,但是在 T3 的诱导下可检出 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甚至 $20 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 对变态发育的抑制作用。这一结果显示,在 4 d 的 T3 诱导变态试验中,TH 合成环节的甲状腺抑制作用很容易被检出,也就是说 T3 诱导变态对 TH 合成抑制剂有很好的敏感性。除 TH 合成抑制剂外, TiXMA 还可有效检出低浓度 TBBPA、BPA 等一些已知的 TR 拮抗剂的甲状腺抑制作用。如 Wang 等^[30]报道 $10 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ TBBPA 即可抑制 T3 诱导的蝌蚪多个形态学指标的改变,并且随 TBBPA 浓度($100, 500 \text{ nmol} \cdot \text{L}^{-1}$)的升高抑制作用更明显。BPA 和 BPF 也剂量依赖地抑制 T3 诱导的变态发育,表现甲状腺抑制作用^[13,31]。最近我们研究发现,一些异噻唑啉酮类杀菌剂也浓度依赖地抑制 T3 诱导的变态发育(未发表的数据),但这一效应是否特异性与甲状腺干扰相关还需要进一步的研究。总之,从目前研究来看, TiXMA 可敏感地检出一些已知 TDCs 的甲状腺干扰作用,但是抑制 T3 诱导变态的物质是否一定具有 TDCs 性质即 TiXMA 的特异性的问题还需要进一步研究。

5 总结和讨论 (Summary and discussion)

尽管两栖动物变态发育被认为是研究和测试甲状腺干扰作用的良好模型^[7,32],但是总体来看,无论是 OECD 的几个标准方法 AMA、LAGDA 和 XETA 还是我国实验室发展的 TiXMA,其应用都还很有有限,每个方法的敏感性和特异性都需要进一步论证。本文就目前仅有的一些数据,尝试对这些方法进行比较。

在 Zhou 等^[29]的 TiXMA 试验中,发现 4 d 的暴露处理,在 T3 存在情况下可检出 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲巯咪唑的甲状腺抑制活性,但是单独甲巯咪唑即便在 $125 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的浓度下也未表现出甲状腺抑制活性。这一结果显示 T3 诱导变态比自发变态对 TH 合成抑制剂更敏感。总结大部分关于甲巯咪唑和丙硫氧嘧啶对自然爪蛙变态影响的文献数据^[19,29,33-38](图 1),发现在相对较低的浓度下,都需要暴露比 4 d 更长的时间才可产生明显的变态抑制作用。如 Coady 等^[34]报道,在 AMA 试验中, $4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 甲巯咪唑暴露 7 d 没有产生变态抑制作用,延长至 21 d 才表现出明显的变态抑制效应。由此可以认为,与 AMA 试验比较, TiXMA 不仅缩短试验周期,而且提高了检出甲状腺抑制作用(TH 合成)的敏感性。就特异性而言, AMA 试验中蝌蚪 7 d 或者 21 d 的发育,除 TH 的调控还有其他多种信号的参与,其发育期和 HLL/SVL 的改变很难说是与甲状腺干扰相关。而在 TiXMA 试验中, T3 诱导的 4 d 内的变态,更加突出了 TH 的作用,可能一定程度上屏蔽一些其他信号的参与,所以受试物导致的变态影响比 AMA 试验中的影响更可能与甲状腺干扰相关。

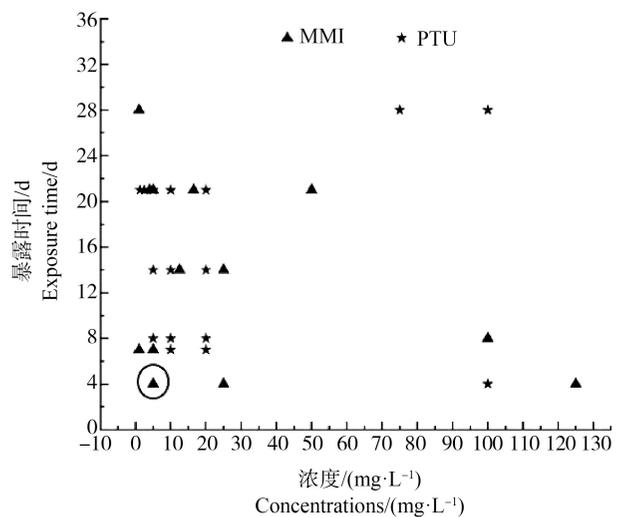


图1 甲巯咪唑 (MMI) 和丙硫氧嘧啶 (PTU) 对非洲爪蛙自然变态和 T3 诱导变态 (圈) 抑制作用的有效浓度和时间

Fig. 1 Concentrations and time for methimazole (MMI) and propylthiouracil (PTU) to inhibit spontaneous or T3-induced metamorphosis in *Xenopus laevis*

TiXMA 与 XETA 比较,都采用了受试物单独暴露及其与 T3 共暴露的设计,以此检测受试物是否

具有甲状腺抑制活性。如前所述,因为 XETA 在孔板中进行,而且直接利用荧光显微镜对荧光强度进行定量,有明显的简便快捷的优点,并一定程度上可以实现高通量检测,适用于对大量化学物质进行筛查。然而,从现有数据来看,XETA 的敏感性可能不如 TiXMA。比如 Fini 等^[20]报道,在 XETA 试验中,1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 表现出 TH 信号拮抗作用,但更低浓度 TBBPA 没有类似的效应。然而 TiXMA 可检出 10 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 的 TH 信号拮抗作用^[60]。理论上,非洲爪蛙在预变态期对 TH 信号的响应要高于胚胎期,相应地在预变态期检测甲状腺干扰活性比在胚胎期检测更易检出。

需要强调的是,无论 TiXMA 还是 AMA 或是 XETA,高浓度产生的明显的急性毒性或潜在的压力都可能影响甲状腺干扰特异性结果的判定。TG 231 规定 AMA 试验选择最高溶解度、急性毒性的最大耐受浓度(或 96 h-LC₅₀ 的 1/3)和 100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 中最低的浓度为最高浓度。无论哪个标准下的最高浓度,尤其是最大耐受浓度,可能会在 21 d 的试验中对蝌蚪产生一定的压力,从而导致与甲状腺干扰无关的发育影响,干扰最终结果的判定。所以,选择环境相关的浓度和高于环境浓度 1~2 个数量级的浓度而不是更高的浓度,可能是排除非特异性损伤影响结果判断的一个策略。

鉴于生物体各种调控信号的高度复杂性,任何体内测试方法都不能保证内分泌干扰活性测试结果的完全特异性。所以,基于两栖动物变态发育的 AMA、LAGDA、XETA 和 TiXMA 都需要与某些体外或体内方法结合,才能更准确地评估一个物质是否具有甲状腺干扰活性。如何整合相关的方法、形成一套可有效识别 TDCs 的方法组合是今后甲状腺干扰研究的一个重要课题。

通信作者简介:何益得(1983—),男,博士,副教授,主要研究方向为水生态毒理学。

共同通信作者简介:李圆圆(1988—),女,博士,副研究员,主要研究方向为环境/生态毒理学。

参考文献 (References):

[1] 宋峙嶙,李圆圆,熊忆茗,等. 内分泌干扰物测试技术和评估体系[J]. 中国环境科学, 2023, 43(5): 2601-2612
Song S L, Li Y Y, Xiong Y M, et al. Testing techniques and assessment systems for endocrine disrupting chemi-

cals [J]. China Environmental Science, 2023, 43(5): 2601-2612 (in Chinese)

- [2] 葛海虹,胡俊杰,赵静,等. 欧盟化学物质风险评估与风险管理要点分析[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(6): 51-59
Ge H H, Hu J J, Zhao J, et al. Key points analysis of EU chemicals risk management and risk assessment [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(6): 51-59 (in Chinese)
- [3] 国家市场监督管理总局, 国家标准化委员会. 消费品中重点化学物质使用控制指南: GB/T 39498—2020[S]. 北京: 中国标准出版社, 2020
- [4] 国家卫生和计划生育委员会. 食品安全国家标准 食品接触材料及制品用添加剂使用标准: GB 9685—2016 [S]. 北京: 中国标准出版社, 2017
- [5] 孟小燕,黄宝荣. 我国新污染物治理的进展、问题及对策[J]. 环境保护, 2023, 51(7): 9-13
Meng X Y, Huang B R. The progress, problems and countermeasures of new pollutants treatment in China [J]. Environmental Protection, 2023, 51(7): 9-13 (in Chinese)
- [6] Crofton K M. Thyroid disrupting chemicals: Mechanisms and mixtures [J]. International Journal of Andrology, 2008, 31(2): 209-223
- [7] Mughal B B, Demeneix B A, Fini J B. Evaluating thyroid disrupting chemicals *in vivo* using *Xenopus laevis* [J]. Methods in Molecular Biology, 2018, 1801: 183-192
- [8] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 231: Amphibian Metamorphosis Assay [M]// OECD Guidelines for the Testing of Chemicals, Section 2. Paris: OECD, 2009
- [9] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Test No. 241: The larval amphibian growth and development assay (LAGDA) [R]. Paris: OECD, 2015
- [10] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). TG 248: *Xenopus* eleutheroembryonic thyroid assay (XETA) [R]. Paris: OECD, 2019
- [11] Yao X F, Chen X Y, Zhang Y F, et al. Optimization of the T3-induced *Xenopus* metamorphosis assay for detecting thyroid hormone signaling disruption of chemicals [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2017, 52: 314-324
- [12] Zhang Y F, Xu W, Lou Q Q, et al. Tetrabromobisphenol A disrupts vertebrate development via thyroid hormone signaling pathway in a developmental stage-dependent manner [J]. Environmental Science & Technology, 2014, 48(14): 8227-8234
- [13] Zhu M, Chen X Y, Li Y Y, et al. Bisphenol F disrupts

- thyroid hormone signaling and postembryonic development in *Xenopus laevis* [J]. Environmental Science & Technology, 2018, 52(3): 1602-1611
- [14] Eytcheson S A, Olker J H, Friedman K P, et al. Assessing utility of thyroid *in vitro* screening assays through comparisons to observed impacts *in vivo* [J]. Regulatory Toxicology and Pharmacology, 2023, 144: 105491
- [15] Organization for Economic Co-operation and Development (OECD). Revised guidance document 150 on standardised test guidelines for evaluating chemicals for endocrine disruption [R]. Paris: OECD, 2018
- [16] Dang Z C. Endpoint sensitivity in Amphibian Metamorphosis Assay [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2019, 167: 513-519
- [17] Lorenz C, Opitz R, Lutz I, et al. Corticosteroids disrupt amphibian metamorphosis by complex modes of action including increased prolactin expression [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2009, 150(2): 314-321
- [18] Huang H, Brown D D. Overexpression of *Xenopus laevis* growth hormone stimulates growth of tadpoles and frogs [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2000, 97(1): 190-194
- [19] Dang Z C. Amphibian toxicity testing for identification of thyroid disrupting chemicals [J]. Environmental Pollution, 2022, 311: 120006
- [20] Fini J B, Le Mevel S, Turque N, et al. An *in vivo* multi-well-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption [J]. Environmental Science & Technology, 2007, 41(16): 5908-5914
- [21] Fini J B, Mughal B B, Le Mével S, et al. Human amniotic fluid contaminants alter thyroid hormone signalling and early brain development in *Xenopus* embryos [J]. Scientific Reports, 2017, 7: 43786
- [22] Spiranzlova P, De Groef B, Nicholson F E, et al. Using short-term bioassays to evaluate the endocrine disrupting capacity of the pesticides linuron and fenoxycarb [J]. Comparative Biochemistry and Physiology Toxicology & Pharmacology, 2017, 200: 52-58
- [23] Spiranzlova P, Couderq S, Le Mével S, et al. Short- and long-term effects of chlorpyrifos on thyroid hormone axis and brain development in *Xenopus laevis* [J]. Neuroendocrinology, 2023, 113(12): 1298-1311
- [24] Spiranzlova P, Fini J B, Demeneix B, et al. Composition and endocrine effects of water collected in the Kibale National Park in Uganda [J]. Environmental Pollution, 2019, 251: 460-468
- [25] 王会平, 伍一军. 毒死蜱的神经毒性作用及机制[J]. 环境与职业医学, 2008, 25(3): 314-318
- Wang H P, Wu Y J. Neurotoxicity and mechanisms of chlorpyrifos [J]. Journal of Environmental & Occupational Medicine, 2008, 25(3): 314-318 (in Chinese)
- [26] Ishihara A, Makita Y, Yamauchi K. Gene expression profiling to examine the thyroid hormone-disrupting activity of hydroxylated polychlorinated biphenyls in metamorphosing amphibian tadpole [J]. Journal of Biochemical and Molecular Toxicology, 2011, 25(5): 303-311
- [27] Heimeier R A, Das B, Buchholz D R, et al. The xenoestrogen bisphenol A inhibits postembryonic vertebrate development by antagonizing gene regulation by thyroid hormone [J]. Endocrinology, 2009, 150(6): 2964-2973
- [28] Fini J B, Riu A, Debrauwer L, et al. Parallel biotransformation of tetrabromobisphenol A in *Xenopus laevis* and mammals: *Xenopus* as a model for endocrine perturbation studies [J]. Toxicological Sciences, 2012, 125(2): 359-367
- [29] Zhou W, Qin Z F, Li Y Y, et al. Methimazole and sodium perchlorate exert anti-thyroidal effects in the T3-induced *Xenopus laevis* metamorphosis assay: A rapid assay for screening thyroid disrupting chemicals [J]. Aquatic Toxicology, 2023, 257: 106431
- [30] Wang Y, Li Y Y, Qin Z F, et al. Re-evaluation of thyroid hormone signaling antagonism of tetrabromobisphenol A for validating the T3-induced *Xenopus* metamorphosis assay [J]. Journal of Environmental Sciences (China), 2017, 52: 325-332
- [31] Niu Y, Zhu M, Dong M Q, et al. Bisphenols disrupt thyroid hormone (TH) signaling in the brain and affect TH-dependent brain development in *Xenopus laevis* [J]. Aquatic Toxicology, 2021, 237: 105902
- [32] 秦晓飞, 秦占芬, 徐晓白. 非洲爪蟾在生态毒理学研究中的应用(II): 甲状腺干扰作用评价[J]. 环境科学学报, 2009, 29(8): 1589-1597
- Qin X F, Qin Z F, Xu X B. Application of *Xenopus laevis* in ecotoxicology(II)—Evaluating thyroid disruption [J]. Acta Scientiae Circumstantiae, 2009, 29(8): 1589-1597 (in Chinese)
- [33] Boran F, Güngördü A. Biochemical and developmental effects of thyroid and anti-thyroid drugs on different early life stages of *Xenopus laevis* [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2021, 87: 103738
- [34] Coady K, Marino T, Thomas J, et al. Evaluation of the amphibian metamorphosis assay: Exposure to the goitrogen methimazole and the endogenous thyroid hormone L-thyroxine [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2009, 28(12): 2453-2461

- 2010, 29(4): 869-880
- [35] Degitz S J, Holcombe G W, Flynn K M, et al. Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*. Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouracil, methimazole, and thyroxine [J]. Toxicological Sciences, 2005, 87(2): 353-364
- [36] Opitz R, Braunbeck T, Bögi C, et al. Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds [J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2005, 24(3): 653-664
- [37] Tietge J E, Butterworth B C, Haselman J T, et al. Early temporal effects of three thyroid hormone synthesis inhibitors in *Xenopus laevis* [J]. Aquatic Toxicology, 2010, 98(1): 44-50
- [38] Zhang Y F, Xu H M, Yu F, et al. Comparison the sensitivity of amphibian metamorphosis assays with NF 48 stage and NF 51 stage *Xenopus laevis* tadpoles [J]. Toxicology Mechanisms and Methods, 2019, 29(6): 421-427 ◆