

文章编号: 1000-5641(2008)06-0075-07

三丁基锡对非洲爪蟾甲状腺组织结构的影響

王 蕾, 刘青坡, 郭素珍, 钱丽娟, 施华宏

(华东师范大学 环境科学系 上海市城市化过程与生态恢复重点实验室, 上海 200062)

摘要: 幼龄非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)暴露于低浓度三丁基锡($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)中2个月, 运用组织学切片的方法观测甲状腺组织结构的变化. 结果表明, TBT暴露1个月能引起爪蟾甲状腺滤泡胶质减少甚至空泡化, 暴露2个月后, 甲状腺滤泡的变形率也显著增加, 相对甲状腺横截面积和滤泡面积仅为平行对照的35.3%和45.6%, 而滤泡数目没有明显变化. 空白组和暴露组均未观察到明显的滤泡上皮增厚或肥大等现象. 由此可见, 甲状腺萎缩是由于滤泡面积减小而不是滤泡数目减少所引起的; 滤泡中胶质的减少和变形等与常见的滤泡上皮代偿性增生或肥大无关. 所用低浓度的TBT能对爪蟾甲状腺组织结构造成严重损伤, TBT可以被认定为一种环境甲状腺激素干扰物.

关键词: 三丁基锡; 甲状腺激素干扰物; 组织学; 非洲爪蟾

中图分类号: X 171.5 **文献标识码:** A

Effects of tributyltin on thyroid histology of *Xenopus laevis*

WANG Lei, LIU Qing-po, GUO Su-zhen, QIAN Li-juan, SHI Hua-hong

(Shanghai Key Laboratory of Urbanization Processes and Ecological Restoration,
Department of Environment Science, East China Normal University, Shanghai 200062, China)

Abstract: Larval African clawed frogs (*Xenopus laevis*) were exposed to a low dose of tributyltin ($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI) for 2 months for thyroid histology observation. For one month after exposure, TBT could induce the depletion of colloid and vacuolation. And for two months after exposure, the incidence of follicle malformation also significantly increased, the relative transverse thyroid gland area and follicle area decreased sharply, and the number of follicle did not show any significant changes. Neither hypertrophy nor hyperplasia was observed between exposure groups and control ones. Therefore, the shrink of thyroid gland was arisen from the reduction of follicle area but not follicle number, and the depletion of colloid and follicle malformation was nothing with hypertrophy or hyperplasia. This study indicates that the low concentration of TBT can heavily damage thyroid histology of *X. laevis*, and TBT can be regarded as one of thyroid disrupting chemicals (TDCs).

Key words: tributyltin (TBT); thyroid disrupting chemicals (TDCs); histology; *Xenopus laevis*

收稿日期: 2007-12

基金项目: 国家自然科学基金(20877023); 近岸海洋与环境国家重点实验室开放课题(MEL0503); 上海市城市化过程与生态恢复重点实验室开放基金(UPER0606)

第一作者: 王蕾, 女, 硕士研究生. E-mail: snowdrop-2005@hotmail.com.

通讯作者: 施华宏, 男, 副教授, 研究方向为生态毒理学. E-mail: hhshi@des.ecnu.edu.cn.

0 引 言

用于船舶防污漆的三丁基锡(TBT)被认为是人为引入海洋环境中毒性最大的物质之一。国际海事组织(IMO)规定从2003年开始全面禁止船体上涂含有TBT的防污漆^[1]。然而,有机锡化合物仍广泛应用于杀菌剂和防腐剂等,并对淡水生态系统造成影响^[2,3]。我国内陆淡水水域的TBT浓度高达 $425 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ ^[4]。因此,有必要加强TBT对淡水生物的生态毒性效应研究。

TBT由于能引起腹足类的性畸变而被认为是一种典型的环境内分泌干扰物^[5,6]。最近有研究表明,TBT能与视黄酸-X核受体(RXR)结合^[7],而RXR与甲状腺激素核受体(TR)同属核受体超家族成员,且二者形成二聚体与甲状腺激素结合。因此,在脊椎动物中,TBT具有干扰甲状腺激素系统的可能。以前的研究多集中在TBT的雄激素干扰效应上^[5,6],而对其甲状腺激素干扰效应还未见报道。

发育生物学模式生物非洲爪蟾(*Xenopus laevis*)由于具有饲养简单,长年排卵,产卵量大和终生生活在水中等优点,适用于生态毒理学领域的研究^[8]。甲状腺组织结构是评价甲状腺激素干扰效应最敏感的指标之一^[9]。本文对幼龄非洲爪蟾进行低浓度TBT的长期暴露,运用组织学切片的方法观测甲状腺组织结构的变化,探讨TBT对脊椎动物的甲状腺激素干扰效应,为TBT的生态和健康风险评价提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 药品

氯化三丁基锡(TBTCl,97%)购自Merck公司;二甲基亚砜(DMSO)购自Sigma-Aldrich公司;其余试剂均为国产分析纯。

1.2 幼蛙的饲养与管理

非洲爪蟾蝌蚪由上海生命科学研究院神经科学研究所人工孵化获得,在室内循环水系统中将蝌蚪养成幼蛙。幼蛙每天喂食一次丰年虾,室温 $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$,光照周期为12L/12D;自来水经活性炭和微孔过滤系统处理后进入养殖箱循环,硬度 $150 \sim 250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} (\text{CaCO}_3)$,余氯浓度低于 $3 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$,pH值为 $7.0 \sim 8.0$,溶解氧浓度高于 $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

1.3 暴露实验

将40只3个月龄的幼蛙随机分到两个20L聚丙烯酰胺材料的白色塑料箱中,每个箱中20只蛙,12L水。一组加入 $25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCl,用二甲基亚砜助溶,另一组加等体积的二甲基亚砜作为空白对照。每天定时喂食,全换水并染毒,温度、光照与饲养条件均相同。

1.4 取材

分别于暴露1个月和2个月后,每组取10只幼蛙。快速冷冻后称重、测体长;之后活体解剖,取蛙的下颌沿两眼前、后位置横切,将正中样品放置于4%的甲醛溶液中固定24h以上。

1.5 组织切片的制备

取出固定后的组织,自来水反复冲洗后放置于KD-TS1脱水机内经梯度酒精脱水和二甲苯渗透等步骤,在KD-BM冷冻包埋机上将组织包埋于石蜡中;在YD-1508R切片机上进行连续切片,厚度 $6 \text{ } \mu\text{m}$;脱蜡制水后,经苏木精-伊红(H. E.)染色,中性树胶封片。

1.6 组织学观测

在光学显微镜下观测甲状腺组织结构并拍照,采用 Photoshop 软件进行图像的处理和分析.主要观测甲状腺滤泡变形、胶质减少、空泡化、增生和肥大等现象,并统计如下指标.滤泡变形率(IFM)和胶质减少率(ICD):在同一个体的所有连续切片中,选取滤泡数最多的10个切片,统计其滤泡发生变形和胶质减少的数目及其滤泡总数,变形数或胶质减少数占滤泡总数的百分比即为滤泡变形率或胶质减少率.相对甲状腺横截面积(RTA)和滤泡面积(RFA):同一个体所有连续切片中10个最大甲状腺横截面的平均面积和10个最大滤泡的平均面积,用数码图像像素大小的相对值表示.甲状腺滤泡数目(NOF):同一个体所有连续切片中甲状腺滤泡的最大数目.

1.7 数据处理

实验数据用 SPSS13.0 进行统计分析,结果以平均值(mean)±标准差(S. D.)表示,用单因素方差分析(One-way ANOVA)检验组间数据差异性,用 OriginPro 7.5 作图.

2 结 果

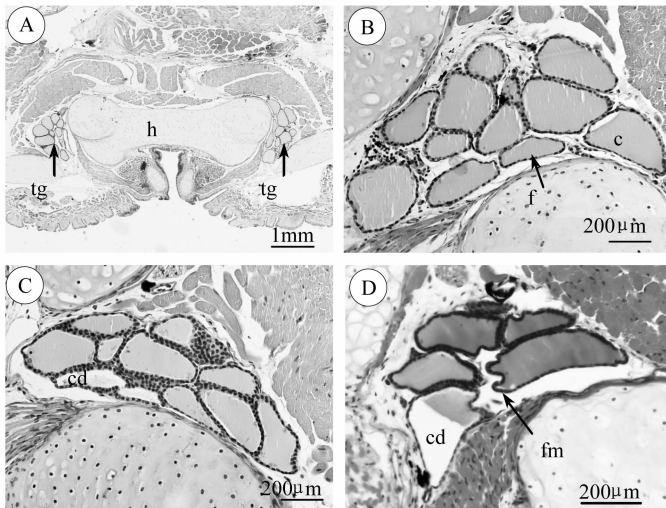
2.1 TBT 对爪蟾体长和体重的影响

在两个月实验期间,对照组和暴露组均未出现死亡、畸形或行为异常情况.组间体重和体长指标无显著差异(数据未列出).

2.2 TBT 对爪蟾甲状腺组织结构的影响

爪蟾的甲状腺主要分布在下颌部舌骨后角和舌骨后侧突之间(见图 1A).对照组爪蟾的甲状腺滤泡大多呈圆形或椭圆形,滤泡周围均匀分布单层的上皮细胞,细胞呈扁平状,滤泡腔内充满均匀的胶质,较少观察到滤泡的变形和胶质减少等现象(见图 1B).

TBT 暴露 1 个月后,甲状腺滤泡出现轻微和中等程度的变形(见图 1C-E),滤泡细胞的形态分化增大,局部区域出现内包的乳头状突起(见图 1D);同时,部分滤泡出现明显的胶质减少(见图 1D),甚至全部消失(见图 1E),胶质减少率较平行对照组显著升高(见图 2).相对甲状腺横截面积、滤泡面积和滤泡数目与对照组相比无明显变化(见图 3).



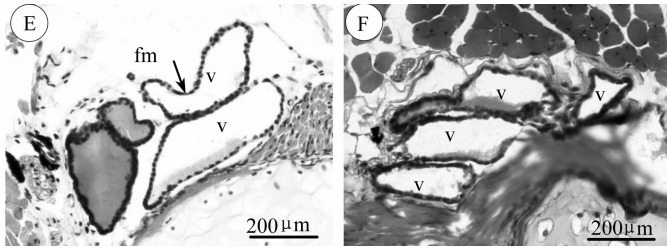


图 1 三丁基锡($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)对非洲爪蟾甲状腺组织结构影响的横切图(H. E. 染色)

Fig. 1 Transverse section photographs of thyroid histology (H. E.) in *Xenopus laevis* exposed to tributyltin ($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)

注:A-B 对照组甲状腺(A)及其放大图(B), C-E TBT($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)暴露 1 个月后滤泡胶质轻微减少(C),胶质减少和变形程度加剧(D),甚至出现空泡化现象(E), F 暴露 2 个月后滤泡变形和空泡化严重;
c 胶质, cd 胶质减少, f 滤泡, fm 滤泡变形, h 舌骨, v 空泡化, tg 甲状腺

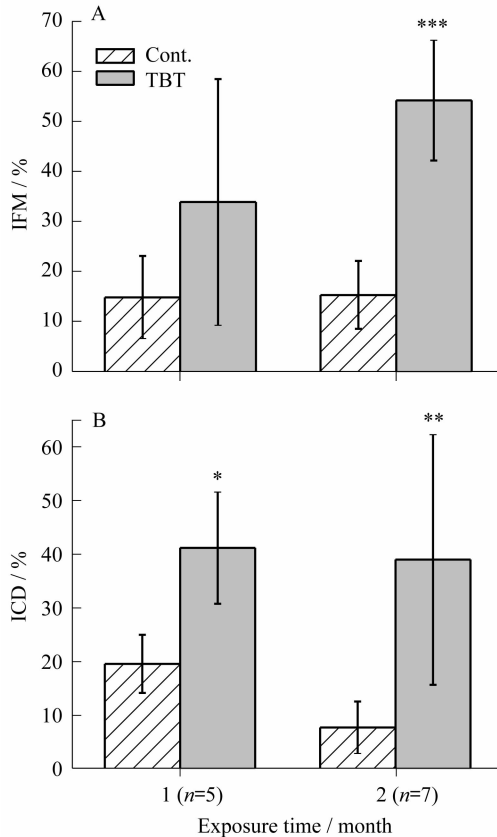


图 2 三丁基锡($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)对非洲爪蟾甲状腺滤泡变形率(IFM)和胶质减少率(ICD)的影响

Fig. 2 Effects of tributyltin ($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI) on incidence of follicle malformation (IFM) and incidence of colloid depletion in *Xenopus laevis*

注:暴露组与平行对照组相比, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$

暴露 2 个月后,滤泡的变形率和胶质减少率较平行对照组明显增加,半数以上的滤泡发

生变形,近40%的滤泡出现胶质减少现象(见图2),少数个体甚至出现滤泡全部变形和空泡的现象.相对甲状腺横截面积和滤泡面积仅为平行对照的35.3%和45.6%,滤泡数目无明显变化(见图3).

除上述现象外,暴露组滤泡中还出现颗粒状胶质和上皮细胞缺失等现象,未发现明显的上皮增厚或细胞增生等现象(见图1).

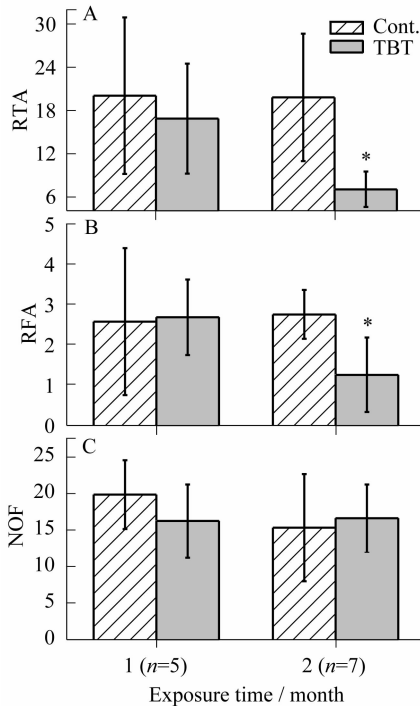


图3 三丁基锡($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI)对非洲爪蟾相对甲状腺横截面积(RTA)、滤泡面积(RFA)和滤泡数目(NOF)的影响

Fig. 3 Effects of tributyltin ($25 \text{ ng} \cdot \text{L}^{-1}$ TBTCI) on relative thyroid gland area (RTA), relative follicle area (RFA) and number of follicle (NOF) in *Xenopus laevis*

注:暴露组与平行对照组相比, * $P < 0.05$

3 讨 论

3.1 TBT对爪蟾的甲状腺激素干扰效应

目前,越来越多的研究表明环境中许多化学污染物可以影响生物体甲状腺激素的合成、分泌、运输、生理作用和代谢等过程,这类污染物被统称为甲状腺激素干扰物(TDCs)^[10].甲状腺组织结构的变化是一类对甲状腺激素干扰物敏感的检测指标,各种变化方式出现的先后次序以及变化幅度反映了污染物对甲状腺的干扰程度,其灵敏性高于对甲状腺激素水平等生化指标的检测^[9].本研究中,尽管对照组也出现轻微的变形和胶质减少等现象,但TBT暴露1个月后胶质减少率明显升高,2个月后滤泡变形率明显增加,甲状腺和滤泡面积减小.甲状腺面积的减小表明甲状腺出现了萎缩,但滤泡数目并没有发生改变,由此可以推断甲状腺萎缩是由滤泡面积减小而不是其数目减少引起的.甲状腺滤泡由滤泡上皮细胞和胶

质组成,滤泡的变形和胶质的减少导致其面积的减小。

甲状腺是合成和分泌甲状腺激素的器官,滤泡变形、胶质减少和甲状腺萎缩等表明甲状腺的功能受到了损伤.实验中使用的 TBT 浓度相当于甚至低于我国部分水域 TBT 的环境浓度,由此可见,环境浓度的 TBT 能够导致爪蟾甲状腺形态结构的严重损伤.在 OECD 最新的甲状腺激素干扰物筛选方案中,爪蟾蝌蚪变态实验被认为是筛选甲状腺激素干扰物最敏感的方法,变态后的幼蛙由于对甲状腺激素稳态的变化不敏感而较少被采用.本文采用变态完成后的幼蛙进行实验,体长和体重指标在组间没有明显的变化,表明与变态实验相比,生长指标的敏感性有所降低.但本文发现在较低浓度下 TBT 对幼蛙的甲状腺组织却会产生明显影响.由于甲状腺激素对众多生理功能的调节作用并不仅仅表现在生长过程上,甲状腺的变化或许会对幼蛙的其他生理过程产生影响.因此,可以认定 TBT 为一种环境甲状腺激素干扰物. OECD 将甲状腺组织结构作为一个主要的评价指标,包括滤泡上皮细胞高度、滤泡上皮厚度以及滤泡面积等,而没有变形率和胶质减少率的报道^[9].本文采用变形率和胶质减少率这两项指标对甲状腺组织进行评价,表明它们是比较敏感的检测指标.

3.2 TBT 对爪蟾甲状腺组织结构损伤的可能机理

甲状腺激素干扰物能够通过反馈调节机制对甲状腺的组织结构造成影响.如高氯酸盐和丙硫氧嘧啶等甲状腺激素阻抗剂能抑制甲状腺激素的合成,从而导致甲状腺滤泡的代偿性增生,常表现为滤泡上皮增厚、细胞增生和胶质减少等现象^[11].本文并未观察到 TBT 导致的甲状腺滤泡代偿性增生的现象.而所观察到的滤泡严重变形在其他污染物中还未见报道.有研究者认为,滤泡上皮的内包是由于上皮细胞的增生而导致部分细胞突起^[12].但本文并未在变形的滤泡上皮发现细胞间隙明显紧缩的现象.因此,可以排除滤泡的变形是由于细胞增生并形成乳突而引起的.虽然一些甲状腺激素阻抗剂也能导致胶质的减少,但这种减少一般是伴随滤泡上皮的严重增厚而形成的,在一定程度上是滤泡上皮挤压的结果.而本文中并未形成多层滤泡上皮,因此也可以排除滤泡上皮增生的影响.同时,由于幼蛙对甲状腺激素稳态的变化没有变态期敏感,TBT 通过影响激素水平进而负反馈影响甲状腺组织结构的可能性较小.

TBT 是否通过与 RXR 结合来干扰爪蟾的甲状腺结构呢?根据上述分析,至少可以认为 TBT 不可能以甲状腺激素阻抗剂的形式与 RXR 结合,进而通过负反馈调节来影响甲状腺的结构.由于污染物对甲状腺系统影响的复杂性和本文仅研究了甲状腺的组织结构,根据已知典型的甲状腺激素干扰物的毒作用模式还无法对本文所观察到的现象做出合理的解释.此外,有最新研究表明,TBT 还可以起到“环境肥胖素”的作用,引起人类“肥胖症”等代谢性疾病的发生^[13],对人类健康构成的潜在风险.TBT 的甲状腺激素干扰与其肥胖激素效应是否有内在关联也有待进一步研究.

4 结 论

研究结果表明环境浓度的 TBT 能对爪蟾甲状腺组织结构造成严重损伤,可以认定 TBT 为一种甲状腺激素干扰物.甲状腺激素对两栖类的变态、生长发育和繁殖等具有重要的作用,TBT 对爪蟾甲状腺系统的干扰势必对其生存造成严重的影响.因此,需进一步加强 TBT 的甲状腺激素干扰效应及其作用机制的研究.

[参 考 文 献]

- [1] CHAMP M A. Economic and environmental impacts on ports and harbors from the convention to ban harmful marine anti-fouling systems [J]. Mar Pollut Bullet, 2003, 46(8): 935-940.
- [2] RÜDEL H E, MÜLLER J, STEINHANSES J, et al. Retrospective monitoring of organotin compounds in freshwater fish from 1988 to 2003; results from the German environmental specimen bank [J]. Chemosphere, 2007, 66: 1884-1894.
- [3] SAYER C D, HOARE D J, SIMPSON G L, et al. TBT causes regime shift in shallow lakes [J]. Environ Sci Technol, 2006, 40: 5269-5275.
- [4] JIANG G B, ZHOU Q F, LIU J Y, et al. Occurrence of butyltin compounds in the waters of selected lakes, rivers and coastal environments from China [J]. Environ Pollut, 2001, 115 (1): 81-87.
- [5] SHI H H, HUANG C J, YU X J, et al. Generalized system of imposex and reproductive failure of females in gastropods along the coastal waters of Mainland China [J]. Mar Ecol Prog Ser, 2005, 304: 179-189.
- [6] OEHLMANN J, BENEDETTO P D, TILLMANN M, et al. Endocrine disruption in prosobranch molluscs: evidence and ecological relevance [J]. Ecotoxicology, 2007, 16: 29-43.
- [7] NISHIKAWA J, MAMIYA S, KANAYAMA T, et al. Involvement of the retinoid X receptor in the development of imposex caused by organotins in gastropods [J]. Environ Sci Technol, 2004, 38: 6271-6276.
- [8] 秦占芬, 徐晓白. 非洲爪蟾在生态毒理学研究中的应用: 概述和实验动物质量控制 [J]. 科学通报, 2006, 51(8): 873-887.
- [9] FORT D J, DAGITZ S, TIETGE J, et al. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in frogs and its role in frog development and reproduction [J]. Crit Rev Toxicol, 2006, 37(1-2): 117-161.
- [10] BOAS M, FELDT-RASMUSSEN U, SKAKKEBAK N E, et al. Environmental chemicals and thyroid function [J]. European J Endocrinol, 2006, 154: 599-611.
- [11] OPITZ R, HARTMANN S, BLANK T, et al. Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles [J]. Toxicol Sci, 2006, 90(2): 337-348.
- [12] ESKLOCAK S, DUNDAR C, BSOGLU T, et al. The effects of taking chronic nitrate by drinking water on thyroid functions and morphology [J]. Clin Exp Med, 2005(5): 66-71.
- [13] BLUMBERG B, CRÜN F. Perturbed nuclear receptor signaling by environmental obesogens as emerging factors in the obesity crisis [J]. Rev Endocrinol Metabol Disorder, 2007(8): 161-171.