

网络出版时间:2022-12-26 17:39:58 网络出版地址:https://kns.cnki.net/kcms/detail//34.1065.R.20221226.1521.002.html

三卤甲烷对秀丽隐杆线虫生殖细胞及子代数的影响

吴佳洁^{1,2}, 周童^{1,2}, 曹振霄^{1,2}, 凤玉^{1,2}, 许安^{1,2}, 杜华^{1,2}

摘要 目的 探讨3种三卤甲烷类饮用水消毒副产物对秀丽隐杆线虫生殖细胞发育与繁殖能力的影响。**方法** 以3种三卤甲烷(三溴甲烷、三氯甲烷、三碘甲烷)为研究对象,在秀丽隐杆线虫模型中检测不同浓度三卤甲烷暴露后生殖腺细胞凋亡和卵母细胞数,及最终产生的子代数。结果 生殖腺细胞凋亡结果显示,50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组中三氯甲烷和三碘甲烷的暴露造成线虫生殖腺凋亡水平升高,且存在一定剂量依赖效应。卵母细胞数结果显示,在50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度暴露下,3种THMs的暴露均显著降低了线虫体内的卵母细胞数。子代数结果显示,仅有50 $\mu\text{mol/L}$ 处理组的三碘甲烷暴

露会显著降低线虫的子代数。**结论** THMs会造成秀丽隐杆线虫的生殖毒性,且毒性与其携带的卤族元素有关。

关键词 三卤甲烷;秀丽隐杆线虫;生殖腺细胞凋亡;卵母细胞数;子代数

中图分类号 R 123.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2023)01-0005-05

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2023.01.002

饮用水安全与我国乃至全球公共健康息息相关。为去除自然水体中存在的有害病原体,消毒处理是饮用水净化过程中必不可少的一环。然而,消毒剂同时也会和水体中的有机物反应,生成消毒副产物(disinfection by-products, DBPs)^[1]。一系列研究^[2]表明消毒副产物对生殖系统、神经系统和消化系统存在诸多不利影响。目前已有14种消毒副产物被纳入我国《生活饮用水卫生标准》的监测目录中,但大多数消毒副产物产生的健康风险仍不明确。

2022-09-20 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:22006149)

作者单位:¹中国科学院合肥物质科学强磁场科学中心,合肥 230031

²中国科学技术大学研究生院科学岛分院,合肥 230026

作者简介:吴佳洁,女,硕士研究生;

杜华,男,副研究员,硕士生导师,责任作者,E-mail: huadu@ipp.ac.cn

[10] Xu H, Ren D. Lysosomal physiology [J]. Annu Rev Physiol, 2015, 77: 57-80.

[11] Yang C, Wang X. Cell biology in China: Focusing on the lysosome [J]. Traffic, 2017, 18(6): 348-57.

[12] Raben N, Puertollano R. TFEB and TFE3: Linking lysosomes to cellular adaptation to stress [J]. Annu Rev Cell Dev Biol, 2016,

32: 255-78.

[13] Wang W, Gao Q, Yang M, et al. Up-regulation of lysosomal TRPML1 channels is essential for lysosomal adaptation to nutrient starvation [J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2015, 112(11): E1373-81.

Golgi protein GOLPH3 regulates lysosomal biogenesis through mTORC1 signaling

Sun Yuan, Qiu Rong, Cao Xinwang

(Dept of Cellular Biology, School of Life Sciences, Anhui Medical University, Hefei 230032)

Abstract Objective To explore the mechanism of Golgi phosphoprotein 3 (GOLPH3) regulating lysosomal biogenesis via mTORC1 signaling. **Methods** GOLPH3 knock-out (GOLPH3 KO) stable cell line was constructed by CRISPR Cas9. mTORC1 activity and the levels of TFEB and p-TFEB in the control cells and GOLPH3 KO cells were compared through Western blot. Further, lysosome-associated membrane protein LAMP1 was labelled by the means of immunofluorescence and the number of lysosomes in the control cells and GOLPH3 KO cells was compared. **Results** GOLPH3 KO suppressed mTORC1 activity significantly, decreased the cytoplasm level of p-TFEB, increased the nuclear localization of active TFEB, and promoted the lysosome biogenesis. **Conclusion** Golgi protein GOLPH3 regulates lysosome biogenesis through mTORC1 signaling.

Key words GOLPH3; mTORC1; Golgi apparatus; lysosome biogenesis

该文选取了消毒副产物中较为常见的3种三卤甲烷(trihalomethanes, THMs)开展研究,其中三氯甲烷(又称氯仿, trichloromethane, TCM)和TBM(又称溴仿, tribromomethane, TBM)在监测目录中,三碘甲烷(又称碘仿, triiodomethane, TIM)暂未纳入监控范围。该研究利用秀丽隐杆线虫模型^[3-4],通过检测3种典型三卤甲烷对秀丽隐杆线虫生殖腺细胞凋亡、卵母细胞数及子代数的影响,系统评估了3种三卤甲烷的生殖毒性,初步证明了三卤甲烷对秀丽隐杆线虫的生殖造成的负面影响及其规律。

1 材料与方 法

1.1 实验动物 线虫品系为野生型秀丽隐杆线虫 N2 Bristol, 购自美国秀丽隐杆线虫遗传中心(CGC)。

1.2 主要试剂 M9 缓冲液:称取 3 g KH_2PO_4 、6 g Na_2HPO_4 、5 g NaCl 溶于 1 L 超纯水中,121 °C 高压灭菌,灭菌后加入 1 ml 无菌的 1 mol/L 硫酸镁,混匀分装。NGM 固体培养基:称取 3 g NaCl、2.5 g Peptone、17 g Agar B、加水定容至 975 ml,置于 3 L 锥形瓶高压灭菌后加入 25 ml 磷酸缓冲液、1 ml 氯化钙(1 mol/L)、1 ml 硫酸镁(1 mol/L)、1 ml 胆固醇溶液(5 g/L)。混匀后均匀分装至无菌空培养皿中。静置冷却凝固后加入食物。

1.3 线虫培养及同步化 所有线虫在 20 °C 恒温避光培养,以尿嘧啶缺陷型大肠杆菌(OP50)为食物,培养基为 NGM 固体培养基或 M9 液体培养基。同步化处理:将处于产卵期的成虫冲洗至离心管中,将 M9 缓冲液、次氯酸钠溶液和 5 mol/L 的氢氧化钠溶液以 7 : 2 : 1 的体积比混合均匀,待虫体裂解后,离心去上清液,反复冲洗沉淀后,将所得受精卵均匀分散至 3 ml 的 M9 缓冲液中,20 °C 避光培养即可得到 L1 期的幼虫。将上述所得幼虫接种到平铺 OP50 的 NGM 板上培养,就可得到同步化生长的线虫。

1.4 消毒副产物处理液的配制 称取 TCM、TBM 液体与 TIM 粉末分别溶于 DMSO 中,根据其纯度与密度配成 10 g/L 溶液,记作原液,用棕色玻璃瓶分装密封后置于 -20 °C 冰箱中保存。每次实验前将原液用超纯水稀释至 1 mol/L 作为工作液。在实验中按照设计浓度将消毒副产物稀释至不同浓度作为暴露体系。本实验根据污染物的不同分为 TCM、TBM、TIM 3 组,参考饮用水中上限值及实际生活中

可能接触到的剂量,选择了 1、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 3 个处理浓度进行实验。

1.5 线虫生殖腺细胞凋亡检测 将消毒副产物工作液溶于 M9 缓冲液,添加 OP50 作为食物,配制成 500 μl 体系并使其浓度分别为 0、1、10 和 50 $\mu\text{mol/L}$ 置于 24 孔板中,转入 L4 期线虫于 20 °C 下避光暴露 24 h;收集暴露后的线虫,转入新的 24 孔板中,加入适量吖啶橙(acridine Orange, AO)原液和 M9 缓冲液配成终浓度为 25 mg/L 的 500 μl 染色体系,20 °C 下避光染色 1 h。染色完成后将线虫转入 NGM 培养基,避光恢复 45 min。收集恢复后的线虫,在载玻片中央滴加 10 μl 叠氮化钠溶液(40 mmol/L)和 10 μl 的虫液,轻轻盖上盖玻片,在 Leica 正置荧光显微镜下选择蓝色荧光(激发波长:488 nm),进行统计观察,凋亡细胞内的细胞质,凋亡小体会和吖啶橙结合形成亮黄色的斑点。一个斑点对应一个凋亡细胞,每组至少统计 20 条。

1.6 卵母细胞数测定 暴露体系的配制同 1.5 项,将 L1 期线虫培养 36 h 后转入 24 孔板中,20 °C 下避光暴露 24 h;收集暴露后的线虫转入新的 NGM 培养皿中避光恢复 12 h。收集恢复后的线虫,加入适量的 AO 原液和 M9 缓冲液配成终浓度为 25 mg/L 的 500 μl 染色体系,20 °C 下避光染色 1 h。染色完成后将线虫转入 NGM 培养基,避光恢复 30 min。在载玻片中央滴加 10 μl NaN_3 (40 mmol/L)和 10 μl 的虫液,轻轻盖上盖玻片,在荧光显微镜下选择蓝色荧光(激发波长:488 nm),统计观察到的卵母细胞数,每组至少统计 20 条。

1.7 线虫子代数的测定 将消毒副产物工作液溶于 M9 缓冲液,添加 OP50 作为食物,配制成 3 ml 体系并使其浓度分别为 0、1、10 和 50 $\mu\text{mol/L}$,置于 35 mm 培养皿中,将 L1 线虫直接转入暴露体系中,20 °C 下避光暴露 60 h。收集暴露后的线虫,将单条线虫转入含有 OP50 的 35 mm NGM 培养基中,每组至少准备 10 条。每隔 24 h 将线虫转入新的培养基,大约 5 d 后线虫停止产卵,停止转板。每天计数孵化后的幼虫,统计每组线虫平均子代数。

1.8 统计学处理 实验数据采用 IBM SPSS Statistics 23 软件进行统计分析,所有数据均由至少 3 个独立实验的 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间使用单因素方差分析。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。秀丽隐杆线虫卵子发生过程中正常生殖腺细胞凋亡个数在 2

~3 个之间,卵母细胞个数在 8~10 个之间,正常的子代个数大于 200。

2 结果

2.1 三卤甲烷诱导秀丽隐杆线虫生殖腺细胞凋亡水平增加

将同步化后的线虫培养至 L4 期后,暴露于分别含 0、1、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 不同三卤甲烷的液体环境中 24 h,探究不同浓度三卤甲烷对线虫生殖腺细胞凋亡的影响。结果如图 1 所示,在浓度为 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 TCM 和浓度为 10、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 TIM 处理线虫后,线虫的凋亡细胞水平出现不同程度上升。对图 1 结果进行分析得知,TBM 处理组虽然表现出生殖腺细胞凋亡水平上升的趋势,但组间差异并不显著;而其他 2 种三卤甲烷在 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度下都会诱导线虫生殖腺细胞凋亡显著增加,且伴随剂量依赖效应。进一步比较显示,携带不同卤族元素也会对毒性产生影响,对比 3 组生殖腺细胞凋亡的具体数值,毒性效应存在碘代 > 溴代 > 氯代的趋势。

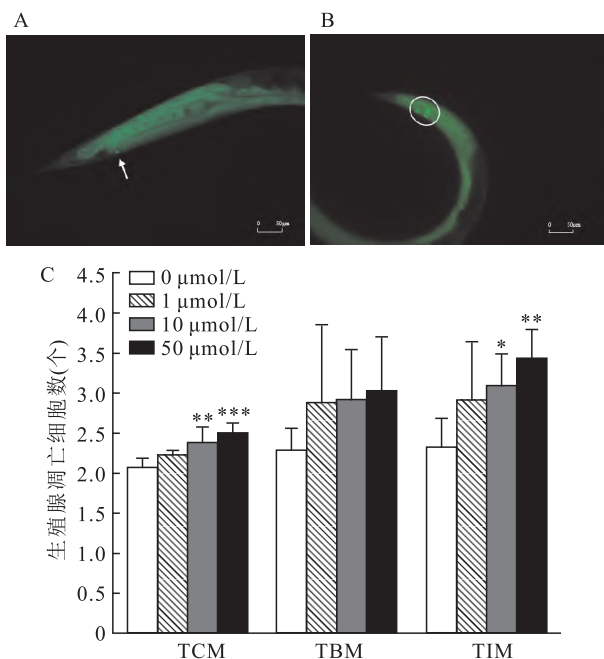


图 1 THMs 暴露后的秀丽隐杆线虫生殖腺细胞凋亡水平

A: 对照组线虫,白色圆圈内有一个荧光黄色亮点为 1 个生殖腺细胞凋亡;B:TIM 10 $\mu\text{mol/L}$ 暴露组线虫,白色圆圈内有三个荧光黄色亮点为 3 个生殖腺细胞凋亡;C:暴露于 3 种 THMs 产生的生殖腺细胞凋亡;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.2 THMs 造成秀丽隐杆线虫卵母细胞数下降

将 L3 期线虫暴露于 1、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 不同 THMs 中

24 h,恢复 12 h 后使用吖啶橙染色并统计尾部生殖腺中的卵母细胞个数。结果如图 2 所示,在浓度为 1、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 TCM 处理线虫后,线虫的卵母细胞数分别降低了 5.82%、11.76% 和 13.53%;在浓度为 1、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBM 处理线虫后,线虫的卵母细胞数分别降低了 8.45%、12.61% 和 17.91%;在浓度为 1、10、50 $\mu\text{mol/L}$ 的 TIM 处理线虫后,线虫的卵母细胞数分别降低了 11.62%、15.49% 和 18.05%。对以上结果进行分析得知,3 种 THMs 在 3 种浓度下均会使卵母细胞数显著降低,且伴随剂量依赖效应。对比具体数值显示毒性效应存在碘代 > 溴代 > 氯代的趋势,这与生殖腺细胞凋亡的结果保持一致。

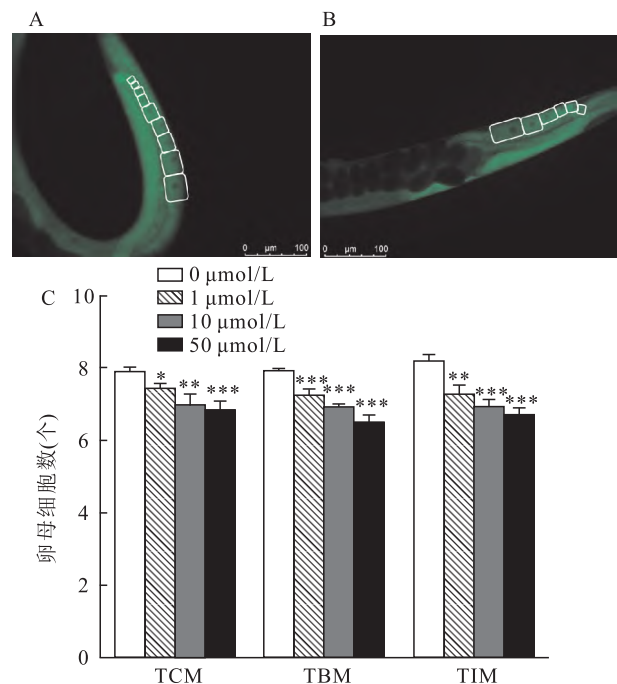


图 2 THMs 暴露后的秀丽隐杆线虫卵母细胞数

A: 对照组线虫,每个白色方形内的细胞为一个卵母细胞;B:TIM 10 $\mu\text{mol/L}$ 暴露组线虫;C:暴露于 3 种 THMs 的线虫卵母细胞数;与对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$

2.3 THMs 亲本暴露对秀丽隐杆线虫后代数的影响

选择 L1 期幼虫进行 60 h 长期暴露来研究 THMs 对秀丽隐杆线虫后代数的影响。结果如图 3 所示,在 50 $\mu\text{mol/L}$ 的浓度下,TIM 组的子代数显著降低,同时剂量依赖效应也较为明显。而其他两组虽出现了下降,但均不显著。进一步的分析显示相较于氯代和溴代 THMs,碘代 THMs 对线虫后代数的干扰更为明显。

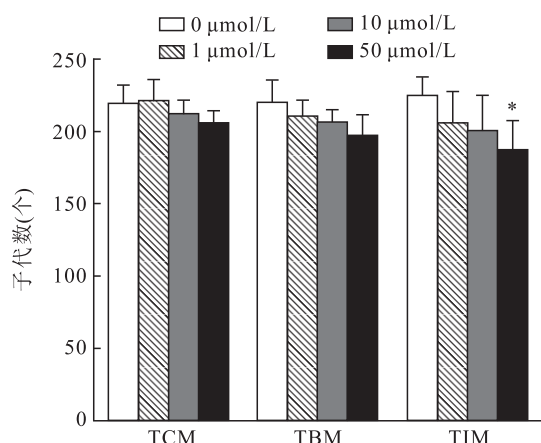


图3 THMs亲本暴露对秀丽隐杆线虫子代数的影响
与对照组比较: * $P < 0.05$

3 讨论

饮用水的安全问题一直以来都极大地影响着人类生活,国内外发生过多次水媒的传染病事件。现代饮用水消毒过程中会产生 700 多种消毒副产物,这些消毒副产物对人类的健康造成巨大威胁。基于以上原因,本文对较为常见的 3 种三卤甲烷类消毒副产物的生殖毒性进行了研究。

本研究结果表明 THMs 会增加线虫生殖腺细胞凋亡数并降低其卵母细胞数,这种毒性存在剂量依赖效应。子代数结果表明,除 50 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的 TIM 处理组的线虫子代数出现下降外,TCM 与 TBM 对线虫子代数并无显著影响。通过总结以上实验,TCM 和 TBM 处理组在同剂量下对生殖腺细胞凋亡及卵母细胞数有明显影响却没有对子代数产生显著影响。推断是因为 TCM 和 TBM 虽然减少了卵母细胞的产生,但由于雌雄同体线虫产生的子代数主要取决于其精子数量,因此 THMs 造成的卵母细胞数减少并不足以对子代数这一指标产生影响^[5]。消毒副产物的生殖毒性一直是其毒性研究的重点,早在 1986 年,就有报道指出了孕妇接触氯仿,会导致胎儿畸变,而最近的一系列研究也证明了该观点,消毒副产物暴露会增加孕妇的不良妊娠结局可能性,增加流产、早产、胎儿畸变的可能^[6-8]。同样,也有确切证据表明消毒副产物会损害雄性动物生殖能力,造成性激素分泌紊乱及精子质量降低^[9-10]。本实验也证明了 THMs 的暴露会对线虫的生殖能力造成负面影响。值得注意的是,在对比

不同化学结构的三卤甲烷对线虫生殖的影响时,三卤甲烷的毒性与其携带的卤族元素有关,呈现 TIM > TBM, TIM > TCM 的规律。推测这种规律的形成可能与卤族元素和碳原子形成的共价键相关。单卤代三卤甲烷的化学反应活性与甲基卤化物类似,是一种 SN2 型烷基化剂,这种反应活性主要取决于 α -碳与卤素形成的共价键的解离能,解离能与键长有关,遵循 C—I > C—Br > C—Cl^[11]。碘原子半径大,与 α -碳形成的 σ 键弱,由于电子云的极化和离域性,碘比溴和氯更易在亲核取代反应中离去^[12]。有报道^[1, 13]指出,化学反应活性与毒性高低存在关联,化学反应活性越大的消毒副产物更易造成 DNA 损伤,从而造成更高的毒性效应。因此,大部分卤代消毒副产物毒性显示出碘代消毒副产物 > 溴代消毒副产物 > 氯代消毒副产物的趋势,这种毒性差异可能与卤族元素和碳原子形成的共价键的键能有关,键能越小造成的毒性越大。

大量报道都证明了消毒副产物会显著增强生物体内的氧化应激水平并造成细胞损伤。在细胞实验中,消毒副产物可以通过抑制 GADPH 蛋白造成线粒体损伤,进而诱导细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平上调,造成氧化损伤引发遗传毒性^[11]。在藻类中,消毒副产物同样会引起 ROS、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 与丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平上调,造成细胞损伤^[14]。在小鼠体内,消毒副产物会造成肝细胞内 ROS 水平上升,引起 SOD 产量和分子活性增加,同时消毒副产物还能通过静电力与 SOD 分子结合,改变 SOD 酶的构象,加剧对小鼠肝脏细胞造成的氧化损伤^[15]。因此,推测 THMs 造成生殖毒可能与氧化应激有关,但具体分子机制还有待于进一步研究。

综上所述,本研究显示 THMs 的暴露导致秀丽隐杆线虫生殖腺细胞凋亡增加,同时降低了体内的卵母细胞数。其中高浓度 TIM 还会显著降低线虫的子代数。这种生殖毒性可能与 THMs 所携带的卤族元素官能团相关,呈现一定规律。本研究初步揭示了 THMs 对秀丽隐杆线虫的生殖毒性,为今后进一步开展了机制研究提供了依据。

参考文献

- [1] Cortes C, Marcos R. Genotoxicity of disinfection byproducts and disinfected waters: A review of recent literature [J]. Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen, 2018, 831: 1-12.

- [2] Villanueva C M, Gracia-Lavedan E, Bosetti C, 等. 结直肠癌与饮用水中长期暴露三卤甲烷的关系[J]. 中华预防医学杂志, 2018, 52(9): 950.
- [3] Bressers S, Tobor-Kaplon M, Beekhuijzen M. Optimization of the use of *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) in reproductive toxicology testing: describing the most optimal test conditions[J]. *Toxicol Lett*, 2018, 295: S82.
- [4] 齐晓静, 陈 斌, 赵国平. ABT-737 诱导秀丽线虫生殖腺细胞凋亡及机制研究[J]. 安徽医科大学学报, 2020, 55(8): 1194 - 8.
- [5] Corsi A K, Wightman B, Chalfie M. A transparent window into biology: A primer on *caenorhabditis elegans*[J]. *Genetics*, 2015, 200(2): 387 - 407.
- [6] Liu C, Messerlian C, Chen Y J, et al. Trimester-specific associations of maternal exposure to disinfection by-products, oxidative stress, and neonatal neurobehavioral development [J]. *Environ Int*, 2021, 157: 106838.
- [7] Mashau F, Ncube E J, Voyi K. Drinking water disinfection by-products exposure and health effects on pregnancy outcomes: a systematic review[J]. *J Water Health*, 2018, 16(2): 181 - 96.
- [8] 陈颖君, 汪一心, 刘 翀, 等. 孕早期饮用水三卤甲烷暴露对新生儿神经发育的影响[C]. 2018 环境与健康学术会议——精准环境健康:跨学科合作的挑战论文汇编, 2018: 171 - 2.
- [9] 陈颖君. 饮用水消毒副产物暴露对育龄男性精液质量影响的研究[D]. 武汉: 华中科技大学, 2020.
- [10] 黄江平, 钟格梅. 饮用水中氯化消毒副产物对人体健康影响研究进展[J]. *应用预防医学*, 2021, 27(5): 476 - 9.
- [11] Jeong C H, Gao L, Dettro T, et al. Monohaloacetic acid drinking water disinfection by-products inhibit follicle growth and steroidogenesis in mouse ovarian antral follicles *in vitro*[J]. *Reprod Toxicol*, 2016, 62: 71 - 6.
- [12] De Castro Medeiros L, De Alencar F L S, Navoni J A, et al. Toxicological aspects of trihalomethanes: a systematic review[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2019, 26(6): 5316 - 32.
- [13] Plewa M J, Simmons J E, Richardson S D, et al. Mammalian cell cytotoxicity and genotoxicity of the haloacetic acids, a major class of drinking water disinfection by-products[J]. *Environ Mol Mutagen*, 2010, 51(8 - 9): 871 - 8.
- [14] Cui H, Chen B, Jiang Y, et al. Toxicity of 17 disinfection by-products to different trophic levels of aquatic organisms: ecological risks and mechanisms[J]. *Environ Sci Technol*, 2021, 55(15): 10534 - 41.
- [15] Wang J, Jia R, Zheng X, et al. Superoxide dismutase response and the underlying molecular mechanism induced by iodoacetic acid[J]. *Chemosphere*, 2019, 234: 513 - 9.

Effect of trihalomethanes on germ cells and brood size of *Caenorhabditis elegans*

Wu Jiajie^{1,2}, Zhou Tong^{1,2}, Cao Zhenxiao^{1,2}, Feng Yu^{1,2}, Xu An^{1,2}, Du Hua^{1,2}

(¹High Magnetic Field Key Laboratory, Hefei Institutes of Physical Science, Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031;

²Science Island Branch of Graduate School, University of Science and Technology of China, Hefei 230026)

Abstract Objective To investigate the effects of 3 types of trihalomethanes (THMs), the by-products in treatment of drinking water disinfection, on the development and reproductive capacity of germ cells of *Caenorhabditis elegans*. **Methods** Tribromomethane (TBM), trichloromethane (TCM) and triiodomethane (TIM), 3 types of THMs were selected and wild type *Caenorhabditis elegans* was used as a model to detect germ cell apoptosis, oocyte number and the final brood size after exposure to different concentrations of THMs. **Results** The results of germ cell apoptosis showed that the exposure to 50 $\mu\text{mol/L}$ TCM and TIM caused elevated levels of germ cell apoptosis in a dose-dependent manner. Oocyte counting results showed that exposure to 50 $\mu\text{mol/L}$ all three THMs significantly reduced the number of oocytes. The brood size results showed that only 50 $\mu\text{mol/L}$ TIM exposure significantly decreased the brood size of nematodes. **Conclusion** THMs showed negative impacts on the reproductive system of *Caenorhabditis elegans*, and the toxicity is related to the halogenated elements of THMs.

Key words disinfection by-products; *Caenorhabditis elegans*; germ cell apoptosis; number of oocytes; brood size