

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20151208001

刘畅, 朱春艳, 钱波, 等. 十溴联苯醚(BDE 209)孕哺期及出生后暴露对子代小鼠血液系统影响初探[J]. 生态毒理学报, 2016, 11(2): 315-324

Liu C, Zhu C Y, Qian B, et al. The effect of perinatal and post-birth exposure of BDE 209 on the developmental hematological system in offspring mice [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2016, 11(2): 315-324 (in Chinese)

# 十溴联苯醚(BDE 209)孕哺期及出生后暴露对子代小鼠血液系统影响初探

刘畅<sup>1</sup>, 朱春艳<sup>1,2</sup>, 钱波<sup>1,3</sup>, 李振伟<sup>1</sup>, 刘晓晖<sup>1,\*</sup>, 邵静<sup>1,#</sup>

1. 大连医科大学公共卫生学院, 大连 116044
2. 山东省青州市卫生和计划生育局, 青州 262500
3. 桂林医学院公共卫生学院, 桂林 541004

收稿日期: 2015-12-08 录用日期: 2016-01-18

**摘要:** 本研究旨在探讨 BDE 209 长期暴露对出生后不同发育阶段子鼠血液系统的影响。将 75 只雌性昆明小鼠随机分为对照组、低剂量组( $1.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )和高剂量组( $225 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ )。BDE 209 暴露 10 d 后, 将雌鼠与雄鼠合笼。选取怀孕时间相近(相差不过 2 d)的 10 只孕鼠持续染毒直至自然分娩。出生后子鼠在哺乳期通过母乳染毒, 断乳后则按照与母鼠相同的方式进行染毒, 并在不同时间点进行外周血常规、外周血形态学、骨髓细胞形态学、骨髓细胞染色体组型和数目分析。血常规结果显示, 低、高剂量 BDE 209 暴露对出生后不同发育阶段子鼠的白细胞计数没有影响, 即白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞的数量均无显著变化( $P > 0.05$ ); 红细胞系统检查显示一定性别差异, 即低剂量和高剂量 BDE 209 染毒的雄性小鼠在 PND 30 出现红细胞(RBC) ( $P < 0.05$ )、血红蛋白(Hb) ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )及红细胞压积( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )的显著降低; 而雌性小鼠只在 PND 30 出现红细胞压积的降低( $P < 0.05$ ); 在 PND 30, 高剂量暴露组的雌性及雄性小鼠, 低剂量暴露组的雌性小鼠均出现血小板计数的显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ ); 而 PND 60、PND 90 的实验组血小板均未观察到显著改变( $P > 0.05$ )。外周血形态学检查表明, 低剂量组在 PND 30、PND 60, 及高剂量组在 PND 90 检测到典型异常结果多表现为白细胞数的增多。而低剂量组在 PND 90 检测到的典型异常结果多表现为异型深染淋巴细胞( $P < 0.05$ )。骨髓形态学检测表明, 低剂量组子代雄性及雌性小鼠在 PND 60、PND 90 骨髓涂片可检测到骨髓细胞的异常结果, 表现为骨髓增生活跃, 高剂量组雄性小鼠在 PND 90 观察到 3 例异常涂片, 表现为骨髓增生异常( $P < 0.05$ )。研究结果表明, BDE 209 长期暴露可能导致出生子代外周血和骨髓的毒性, 提示具有血液系统发育毒性。

**关键词:** 十溴联苯醚(BDE 209); 小鼠; 发育毒性; 孕哺期; 出生后暴露; 血液系统

文章编号: 1673-5897(2016)2-315-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

## The Effect of Perinatal and Post-birth Exposure of BDE 209 on the Developmental Hematological System in Offspring Mice

Liu Chang<sup>1</sup>, Zhu Chunyan<sup>1,2</sup>, Qian Bo<sup>1,3</sup>, Li Zhenwei<sup>1</sup>, Liu Xiaohui<sup>1,\*</sup>, Shao Jing<sup>1,#</sup>

1. Department of Environmental Health and Toxicology, School of Public Health, Dalian Medical University, Dalian 116044, China
2. Health and Family Planning Bureau of Qingzhou City, Shandong Province, Qingzhou 262500, China
3. School of Public Health, Guilin Medical University, Guilin 541004, China

Received 8 December 2015 accepted 18 January 2016

基金项目: 国家自然科学基金(No. 81273031, 81302400); 大连医科大学引进人才基金(201069);

作者简介: 刘畅(1989-), 女, 硕士, 研究方向为劳动卫生与环境健康, E-mail: 1056134135@qq.com;

\* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: liuxh892@126.com;

# 共同通讯作者(Co-corresponding author), E-mail: jshao@uw.edu

**Abstract:** To explore the effect of perinatal and post-birth exposure of BDE 209 on the developmental hematological system in offspring mice, we randomly assigned 75 Kunming female mice to the control and two experimental groups through gavage for 10 days before mating. Ten mice with the similar fertilization day were selected for each group and continued to gavage through pregnancy and lactation, until weaning. Then the offspring mice were exposed following the same exposure protocol. The peripheral blood routine and morphology, bone marrow karyotyping and number were analyzed at different PND. The results showed that no significant difference was observed in the number of white blood cells, neutrophil granulocytes, lymphocytes and mononuclear cells ( $P > 0.05$ ). The gender difference was found in the red blood system in both low and high BDE 209 groups, that is, the cell counts, hemoglobin and hematocrit were significantly decreased in the male mice at PND 30 ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ), while only the red cell count was decreased significantly in the female mice ( $P < 0.05$ ). At PND 30, the number of thrombocytes was significantly decreased in the male mice of both exposure groups and the female mice of low BDE 209 exposure ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). However, no significant changes were observed on PND 60 and 90 ( $P > 0.05$ ). The morphological examination on the peripheral blood showed that the number of white blood cells was increased at PND 30 and 60 in low BDE 209 exposure, and at PND 90 in high BDE 209 exposure. In addition, exposure to low dose BDE 209 resulted in increased hyperchromatic lymphocytes at PND 90 ( $P < 0.05$ ). The morphological examination on the bone marrow showed hyperplasia in both male and female mice at PND 60 and 90 in low BDE 209 exposure group, while bone marrow hyperplasia was found in 3 male mice at PND 90 in high BDE 209 exposure ( $P < 0.05$ ). Our data suggest that perinatal and post-birth exposure of BDE 209 may lead to developmental toxicity on the hematological system of offspring mice including some adverse effects in peripheral blood and bone marrow system.

**Keywords:** decabromodiphenyl ether (BDE 209); mice; developmental toxicity; perinatal exposure; post-birth exposure; hematological system

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)是目前使用最广泛的溴代阻燃剂,根据苯环上溴原子的数目和位置,分为 209 种同系物。PBDEs 与产品以非共价键结合,易从产品中释放,致生态和生活环境污染<sup>[1-2]</sup>。至今,PBDEs 不仅在大气、水和土壤等多种环境介质中被检出,而且许多生物组织也检测到 PBDEs 的存在<sup>[3]</sup>。人群调查显示,育龄妇女的脂肪、血液、胎盘,哺乳期妇女的乳汁,新生儿脐血及胚胎肝脏均已检测到 PBDEs 多种同系物,并且新生儿脐血与母体血液 PBDEs 水平具有相关性<sup>[4]</sup>,提示 PBDEs 可通过胎盘屏障或以哺乳方式进入胎儿及婴幼儿体内,对胚胎发育和婴幼儿健康产生潜在损害。目前,动物研究已证实,PBDEs 具有神经、肝肾和生殖等多种毒性和毒性效应<sup>[5-6]</sup>,但对造血系统的影响尚未见报道。

研究表明,室内装修材料、建筑材料、家具及家用电器含有多种 PBDEs 同系物,是室内空气和粉尘中 PBDEs 的主要来源<sup>[7-8]</sup>,而通过家庭尘土摄入是婴幼儿等敏感人群接触 PBDEs 的一个重要途径<sup>[9]</sup>。现有观点认为,室内有机污染物暴露可能是儿童血

液疾病,如急性白血病的危险因素。张茂东等<sup>[10]</sup>报道,家庭装修与儿童白血病的发生有关。尽管以往的病例-对照研究显示,建筑和装修材料中的某些有害物质如氡、甲醛、苯等导致的室内空气污染可能是近年儿童急性白血病高发的诱因<sup>[11-12]</sup>。然而,随着人们对健康的日益关注和建筑材料技术的改善,这些污染物在室内的暴露水平有下降的趋势,而 PBDEs 的室内暴露水平却逐年增高,因此明确 PBDEs 孕期暴露对子代血液系统的毒性效应十分必要。

PBDEs 各类同系物的毒性以低溴联苯醚的生物毒性较大(如 BDE 47),而高溴联苯醚较弱(如 BDE 209)。因此 2009 年联合国环境规划署正式将四溴、五溴、六溴和七溴联苯醚作为持久性有机污染物列入《斯德哥尔摩公约》,而美国及欧盟等许多国家早已开始禁止这些低溴 PBDEs 的生产和限制家庭使用<sup>[13]</sup>。然而近年来的研究显示,高溴联苯醚也具有与低溴联苯醚相似的毒性和效应,而且高溴联苯醚可在环境和生物体内可转化为低溴产物,从而发挥毒性作用。我国 PBDEs 生产和使用量巨大,而且增长速度较快,主要为十溴联苯醚(BDE 209)。

本研究通过建立孕哺期 BDE 209 暴露小鼠模型,初步探讨 BDE 209 孕哺期及长期暴露对子代小鼠外周血和骨髓的影响,为明确 PBDEs 血液系统毒性提供依据。

## 1 材料与方法 (Materials and methods)

### 1.1 实验材料

试剂: BDE 209 (纯度 > 98%, 美国, Sigma-ALDRICH 公司);骨髓细胞培养瓶(中国,青岛莱佛生物工程研究所);RPMI-1640(美国, Hyclone 公司);磷酸二氢钾;磷酸二氢钠;磷酸二氢钠均购于国药集团化学试剂有限公司。氯化钠、氯化钾均购于凯信化学工业有限公司。浓盐酸、异丙醇、正己烷、甲基叔丁基醚、浓硫酸、硫酸镁、葡萄糖、酚红、氯化钙、甲醇、冰乙酸均购于科密欧化学试剂有限公司。Wright-Giemsa 复合染液、EDTA-Na<sub>2</sub> 购于北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为分析纯。

仪器:外周血分析仪(Sysmex XE-2100 五分类全自动血细胞分析仪,日本),正置电子显微镜(Olympus BX-63,日本)。

### 1.2 实验动物和染毒模型

选用 4 周龄 SPF 级昆明雌性小鼠 75 只(大连医科大学实验动物中心提供),随机分为 3 组(对照组、低剂量暴露组、高剂量暴露组),每组 25 只。将 BDE 209 溶于精炼花生油中,根据小鼠体重,按不同暴露剂量(低剂量暴露组:1.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,高剂量暴露组:225 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)每天避光灌胃一次。对照组灌胃等量花生油。BDE 209 暴露 10 d 后,将雌鼠与同龄 SPF 级雄性昆明小鼠按 2:1 合笼,次日清晨进行阴道分泌物涂片检查,查看精子或阴栓,以检出精子或阴栓日为妊娠第 0 天。待确定雌鼠受孕后,将雄鼠取出。选取怀孕时间相近(相差不过 2 d)的 10 只孕鼠持续染毒直至自然分娩。出生的子鼠在哺乳期通过母乳染毒,断乳后则按照与母鼠相同的方式进行染毒,并在不同时间点进行外周血常规、外周血形态学、骨髓细胞形态学、骨髓细胞染色体核型分析。所有动物均自由进食、饮水。室内温度为 20~25 °C,光线按亮/暗 12 h 循环。

### 1.3 样品采集及指标检测

#### 1.3.1 实验动物一般动态观察

自子鼠出生,每天观察记录子鼠的行为表现,并在出生后第 16、30、60、90 天测量子鼠体重。

#### 1.3.2 血常规检测分析

子鼠出生后按照不同时间点、不同性别,每组

随机取 10 只子鼠,禁食 12 h 经戊巴比妥钠腹腔内注射(45 g·kg<sup>-1</sup>)麻醉,打开胸腔心脏取血,注入肝素钠抗凝管,送于大连医科大学第二附属医院检验科进行外周血常规指标分析。

#### 1.3.3 外周血涂片及形态学检查

根据子鼠出生时间点和性别,每组随机取 8 只子鼠,尾静脉取血并进行 Wright-Giemsa 染色,电子显微镜下观察各细胞系的形态特征及百分比。

#### 1.3.4 骨髓涂片及形态学检查

根据子鼠出生时间点和性别,每组随机取 8 只子鼠,收集骨髓行 Wright-Giemsa 染色,电子显微镜下对涂片进行检查,并根据 5 级分类法(见表 1)判定骨髓增生程度。

#### 1.3.5 骨髓细胞染色体核型分析

根据子鼠出生时间点和性别,每组随机取 5 只子鼠,制备骨髓细胞悬液后,采用短期培养法制备骨髓细胞染色体,行 Wright-Giemsa 染色,电子显微镜观察分裂相(每个样本不少于 20 个)并计数。

### 1.4 统计分析

计量资料以均值±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 SPSS 13.0 统计软件进行数据管理与分析。计量资料组间差异比较采用单因素方差分析(ANOVA),方差齐时 LSD 法比较两两差异;方差差不齐时 Dunnett's T3 法比较两两差异。计数资料组间差异比较采用卡方检验。

## 2 结果 (Results)

### 2.1 BDE 209 染毒出生子鼠生长动态观察

随着生长期的延长,BDE 209 染毒组出生子鼠饮食量减少,行为稍有异常,多表现为亢奋、易激怒

表 1 骨髓增生级别

Table 1 The level of bone marrow hyperplasia

分级 Level	成熟红细胞:有核细胞 Mature erythrocyte: nucleated cell
增生极度活跃 (I) Hyperactivity	1:1
增生明显活跃 (II) Hyperplasia obviously active	10:1
增生活跃 (III) Active proliferation	20:1
增生减低 (IV) Hypoplasia	50:1
增生极度减低 (V) Hyperplasia of extreme to reduce	300:1

状态。体重动态观察结果如表2所示,与对照组相比,低剂量组雌、雄性小鼠体重只在PND 30显著降低( $P < 0.01$ );高剂量组雄性小鼠体重在PND 16、60、90均显著降低( $P < 0.01$ ),而雌性小鼠体重只在PND 30显著降低( $P < 0.01$ )。高剂量组与低剂量组比较,BDE 209染毒雄性小鼠体重有降低趋势,但无显著性差异( $P > 0.05$ );雌性子鼠体重无显著性差异( $P > 0.05$ )。

## 2.2 BDE 209 染毒出生子鼠外周血常规检测结果

### 2.2.1 外周血白细胞分类计数

BDE 209 暴露对出生子鼠的外周血白细胞及分

类计数结果如表3、4所示,与对照组相比,低、高剂量PBDEs暴露对出生后不同发育阶段子鼠的白细胞系统没有影响,其中白细胞、中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞的数量均无显著变化( $P > 0.05$ )。

### 2.2.2 外周血红细胞计数

BDE 209 染毒对不同发育阶段子鼠外周血红细胞影响结果如表5、6所示。与对照组比较,低剂量和高剂量BDE 209染毒的雄性小鼠在PND 30出现红细胞数(RBC) ( $P < 0.05$ )、血红蛋白(Hb) ( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )及红细胞压积( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )的显著

表2 BDE 209 染毒对子代小鼠体重动态影响 (n=10)

Table 2 Effect of BDE 209 exposure on the body weight in offspring mice (n=10)

性别 Sex	组别 Group	16 d	30 d	60 d	90 d
雌性 Female	对照组 Control	15.9±2.26	29.3±0.64	46.0±1.21	47.0±6.83
	低剂量组 Low	14.1±2.07	27.0±1.64**	45.8±2.48	43.1±3.65
	高剂量组 High	12.2±2.07**	30.2±1.87	39.9±2.48**	41.0±3.33**
雄性 Male	对照组 Control	15.1±1.57	26.5±2.04	33.8±2.50	36.8±3.12
	低剂量组 Low	14.5±1.04	23.3±1.19**	37.0±4.53	39.3±6.23
	高剂量组 High	13.1±1.89	23.1±1.09**	35.1±2.61	39.3±3.91

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ .

表3 BDE 209 暴露对子代小鼠白细胞和中性粒细胞数的影响 (n=10)

Table 3 Effect of BDE 209 exposure on the white blood cells and neutrophile granulocytes in offspring mice (n=10)

性别 Sex	组别 Group	白细胞数( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )			中性粒细胞数( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )		
		White blood cells( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )			Neutrophile granulocytes( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )		
		30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d
雄性 Male	对照组 Control	2.18±0.14	3.08±0.14	2.73±1.27	0.32±0.11	0.45±0.18	0.44±0.30
	低剂量组 Low	1.86±0.82	2.55±1.06	2.75±2.56	0.30±0.14	0.58±0.18	0.26±0.19
	高剂量组 High	2.06±0.90	2.99±1.57	2.63±1.38	0.27±0.09	0.62±0.17	0.72±0.63
雌性 Female	对照组 Control	1.75±0.54	2.69±1.28	2.29±0.57	0.24±0.10	0.44±0.44	0.44±0.17
	低剂量组 Low	2.13±0.93	2.13±0.44	2.62±1.30	0.42±0.13	0.42±0.14	0.43±0.46
	高剂量组 High	1.67±0.58	2.37±0.65	2.05±0.85	0.34±0.15	0.41±0.15	0.36±0.19

表4 BDE 209 暴露对子代小鼠淋巴细胞和单核细胞数的影响 (n=10)

Table 4 Effect of BDE 209 exposure on the lymphocytes and mononuclear cells in offspring mice (n=10)

性别 Sex	组别 Group	淋巴细胞数( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )			单核细胞数( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )		
		Lymphocytes( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )			Mononuclear cells( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )		
		30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d
雄性 Male	对照组 Control	1.77±0.23	2.55±0.30	2.09±1.05	0.07±0.07	0.06±0.01	0.19±0.28
	低剂量组 Low	1.52±0.74	1.88±0.92	1.02±0.86	0.04±0.03	0.05±0.05	0.20±0.35
	高剂量组 High	1.76±0.87	2.27±1.32	1.17±0.78	0.02±0.01	0.09±0.09	0.09±0.11
雌性 Female	对照组 Control	1.48±0.44	1.48±1.33	1.80±0.41	0.02±0.03	0.08±0.06	0.04±0.04
	低剂量组 Low	1.63±0.90	1.62±0.37	1.72±1.28	0.08±0.07	0.08±0.02	0.05±0.06
	高剂量组 High	1.33±0.42	1.87±0.57	1.62±0.64	0.01±0.01	0.07±0.04	0.07±0.05



降低;而雌性小鼠只在 PND 30 出现红细胞压积的降低( $P < 0.05$ );在其他时间点及实验组中均未观察到其他红细胞系统的显著改变。高剂量组与低剂量组比较,BDE 209 染毒雄性小鼠红细胞系统各项指标无显著性差异( $P > 0.05$ );雌性小鼠红细胞系统各项指标无显著性差异( $P > 0.05$ )。

### 2.2.3 外周血小板计数

BDE 209 暴露对不同发育阶段子鼠外周血小板

影响结果如表 7 所示。与对照组比较,在 PND 30,高剂量暴露 BDE 209 的雌性及雄性小鼠,低剂量暴露 BDE 209 的雌性小鼠均出现血小板计数的显著降低( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ );而 PND 60、90 的实验组血小板均未观察到显著改变( $P > 0.05$ )。高剂量组与低剂量组比较,BDE 209 染毒雄性小鼠血小板计数无显著性差异( $P > 0.05$ );雌性小鼠血小板计数无显著性差异( $P > 0.05$ )。

表 5 BDE 209 暴露对子代小鼠红细胞数及血红蛋白影响 (n=10)

Table 5 Effect of BDE 209 exposure on the red cell count and hemoglobin in offspring mice (n=10)

性别 Sex	组别 Group	红细胞数/( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ ) Red cell count/( $\times 10^{12} \cdot L^{-1}$ )			血红蛋白/( $g \cdot L^{-1}$ ) Hemoglobin/( $g \cdot L^{-1}$ )		
		30 d	60 d	90 d	30 d	60 d	90 d
		对照组 Control	9.41 $\pm$ 0.52	9.39 $\pm$ 0.09	7.84 $\pm$ 1.26	145 $\pm$ 13.23	131 $\pm$ 5.66
雄性 Male	低剂量组 Low	8.13 $\pm$ 0.50**	8.96 $\pm$ 0.76	8.39 $\pm$ 0.49	127 $\pm$ 11.14*	133 $\pm$ 7.86	123 $\pm$ 11.84
	高剂量组 High	7.29 $\pm$ 0.38**	9.15 $\pm$ 0.57	8.04 $\pm$ 1.17	114 $\pm$ 6.85**	138 $\pm$ 11.99	120 $\pm$ 6.30
雌性 Female	对照组 Control	8.24 $\pm$ 0.36	8.55 $\pm$ 1.33	8.18 $\pm$ 0.35	130 $\pm$ 5.06	123 $\pm$ 34.68	122 $\pm$ 10.18
	低剂量组 Low	8.09 $\pm$ 0.55	8.50 $\pm$ 1.12	8.23 $\pm$ 2.44	129 $\pm$ 10.67	132 $\pm$ 20.07	138 $\pm$ 20.84
	高剂量组 High	8.16 $\pm$ 0.15	8.83 $\pm$ 0.46	8.39 $\pm$ 0.50	132 $\pm$ 3.95	137 $\pm$ 3.69	128 $\pm$ 8.16

注: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

表 6 BDE 209 暴露对子代小鼠红细胞积影响 (n=10)

Table 6 Effect of BDE 209 exposure on the hematocrit in offspring mice (n=10)

性别 Sex	组别 Group	红细胞积%/ Hematocrit/%		
		30 d	60 d	90 d
雄性 Male	对照组 Control	54.41 $\pm$ 5.00	51.11 $\pm$ 3.12	43.20 $\pm$ 4.81
	低剂量组 Low	48.75 $\pm$ 3.49*	49.02 $\pm$ 4.02	45.70 $\pm$ 4.52
	高剂量组 High	45.13 $\pm$ 2.47**	52.13 $\pm$ 3.24	42.17 $\pm$ 6.08
雌性 Female	对照组 Control	51.00 $\pm$ 2.27	47.03 $\pm$ 7.14	47.08 $\pm$ 2.89
	低剂量组 Low	47.32 $\pm$ 3.13*	47.44 $\pm$ 7.09	50.87 $\pm$ 5.31
	高剂量组 High	48.45 $\pm$ 1.62	51.41 $\pm$ 4.11	49.03 $\pm$ 4.45

注: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.05$ ; \*\* $P < 0.01$ 。

表 7 BDE 209 暴露对子代小鼠血小板系统的影响 (n=10)

Table 7 Effect of BDE 209 exposure on the thrombocytes in offspring mice (n=10)

性别 Sex	组别 Group	血小板/( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ ) Thrombocytes/( $\times 10^9 \cdot L^{-1}$ )		
		30 d	60 d	90 d
雄性 Male	对照组 Control	531.50 $\pm$ 85.48	589.60 $\pm$ 12.02	619.50 $\pm$ 103.84
	低剂量组 Low	515.09 $\pm$ 67.19	543.28 $\pm$ 298.71	740.34 $\pm$ 326.82
	高剂量组 High	359.40 $\pm$ 79.61**	645.94 $\pm$ 169.61	474.29 $\pm$ 145.65
雌性 Female	对照组 Control	543.93 $\pm$ 34.90	463.18 $\pm$ 128.94	528.50 $\pm$ 84.45
	低剂量组 Low	330.38 $\pm$ 130.25**	433.14 $\pm$ 106.43	458.42 $\pm$ 100.36
	高剂量组 High	333.30 $\pm$ 99.52*	475.58 $\pm$ 143.88	501.40 $\pm$ 106.94

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

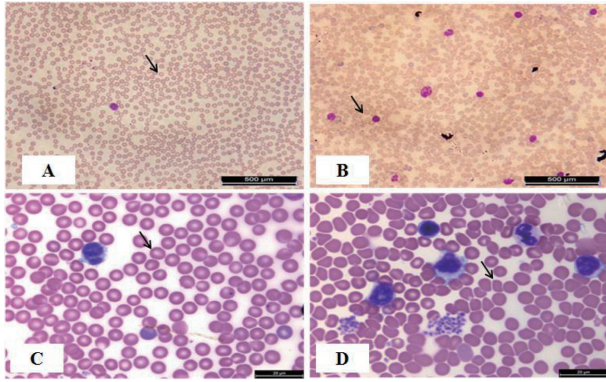


图1 BDE 209 暴露引起子代小鼠外周血涂片白细胞增多  
注:A, 20 倍镜下正常小鼠外周血涂片;B, 20 倍镜下白细胞增多的异常小鼠外周血涂片;C, 100 倍镜下正常小鼠外周血涂片;D, 100 倍镜下白细胞增多的异常小鼠外周血涂片。

Fig. 1 Increased number of white blood cells in offspring mice after BDE 209 exposure

Note: The white blood cells in normal (A,  $\times 20$ ; C,  $\times 100$ ) and abnormal (B,  $\times 20$ ; D,  $\times 100$ ).

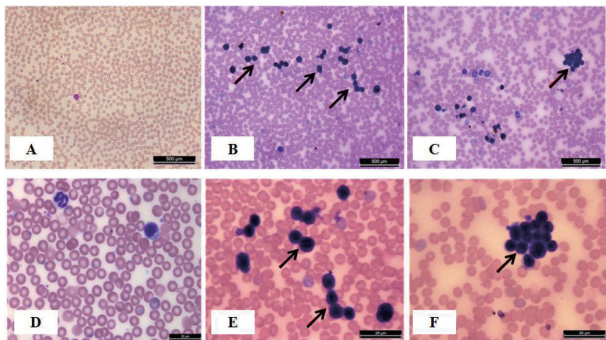


图2 BDE 209 暴露引起小鼠外周血涂片出现异常淋巴细胞  
注:A, 20 倍镜下正常小鼠外周血涂片;B, 20 倍镜下异型深染的淋巴细胞外周血涂片;C, 20 倍镜下成簇出现的异型深染的淋巴细胞血涂片。D、E、F 图对应 A、B、C 的 100 倍镜下图。

异常表现如黑色箭头所示。

Fig. 2 Abnormal lymphocytes in offspring mice after BDE 209 exposure

Note: The normal (A,  $\times 20$ ; D,  $\times 100$ ), hyperchromatism and pleomorphism (B,  $\times 20$ ; E,  $\times 100$ ) and crowded

(C,  $\times 20$ ; F,  $\times 100$ ) of lymphocytes. Arrow presents the abnormal.

## 2.3 BDE 209 染毒子鼠外周血和骨髓细胞形态学检测结果

### 2.3.1 外周血细胞异常检测率和病理形态

BDE 209 暴露对出生小鼠外周血的异常检出率如表 8 所示。低剂量组在 PND30、60, 高剂量组在 PND 90 检测到典型异常结果多表现为白细胞数的增多( $P < 0.05$ , 见图 1)。而低剂量组在 PND 90 检测到的典型异常结果多表现为异型深染淋巴细胞, 且可观

察到异型深染淋巴细胞成簇出现( $P < 0.05$ , 见图 2)。

### 2.3.2 骨髓细胞形态学检查结果

BDE 209 暴露对不同发育阶段子鼠的骨髓细胞形态学异常检出率如表 9 所示。低剂量组子代雄性及雌性小鼠在 PND 60、90 骨髓涂片可检测到骨髓细胞的异常结果, 表现为骨髓增生活跃( $P < 0.05$ , 见图 3)。高剂量组雄性小鼠在 PND90 观察到 3 例异常涂片, 表现为骨髓增生异常, 且镜下出现较多的巨形裸核细胞( $P < 0.05$ , 见图 4)。

### 2.3.3 骨髓染色体核型分析

为探讨 BDE 209 能否引起染色体畸变, 我们进行了染色体组型、数目和核型的分析, 正常的昆明小鼠体细胞中染色体数目为  $2n = 40$ 。本研究对超二倍体进行了计数, 目前只完成部分子代小鼠的检测, 检出率如表 10 所示, 在组型和数目上尚未发现有异常, 染色体组图如图 5 所示。

表 8 BDE 209 暴露子代小鼠外周血涂片异常检出率

Table 8 Effect of BDE 209 exposure on the rate of abnormal peripheral blood smear in offspring mice ( $n=8$ )

性别 Sex	时间点 Time	异常检出数/样本数 Abnormal rate/Sample		
		对照组 Control	低剂量组 Low	高剂量组 High
雌性 Femal	30 d	0/8	3/8*	0/8
	60 d	0/8	4/8*	1/8
	90 d	0/8	4/8*	3/8*
雄性 Male	30 d	0/8	3/8*	1/8
	60 d	0/8	3/8*	0/8
	90 d	0/8	4/8*	3/8*

注: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

Note: \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ 。

表 9 BDE 209 暴露后子鼠骨髓细胞涂片异常检出率

Table 9 Effect of BDE 209 exposure on the rate of abnormal bone marrow cell in offspring mice ( $n=8$ )

性别 Sex	时间点 Time	检出率/样本数 Abnormal rate/Sample		
		对照组 Control	低剂量组 Low	高剂量组 High
雄性 Male	30 d	0/8	1/8	0/8
	60 d	0/8	4/8*	1/8
	90 d	0/8	3/8*	3/8*
雌性 Female	30 d	0/8	0/8	0/8
	60 d	0/8	3/8*	0/8
	90 d	0/8	3/8*	0/8

注: \*  $P < 0.05$ 。

Note: \*  $P < 0.05$ 。

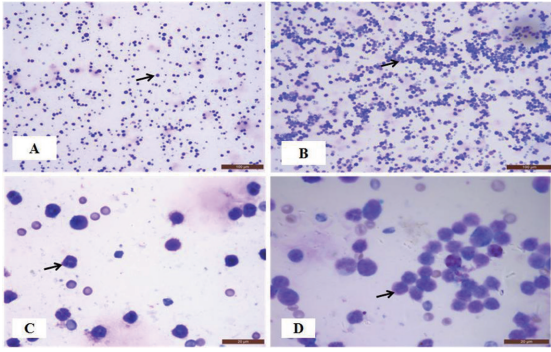


图 3 BDE 209 暴露引起子鼠骨髓增生活跃

注:A,20 倍镜下正常小鼠骨髓象;B,20 倍镜下低剂量染毒组子鼠骨髓增生活跃象。C、D 图为对应 A、B 图 100 倍镜下骨髓象。

Fig. 3 Effect of BDE 209 exposure on the active proliferation of bone marrow cell in offspring mice

Note: The normal (A, ×20; C, ×100) and dysplasia (B, ×20; D, ×100) in bone marrow cell.

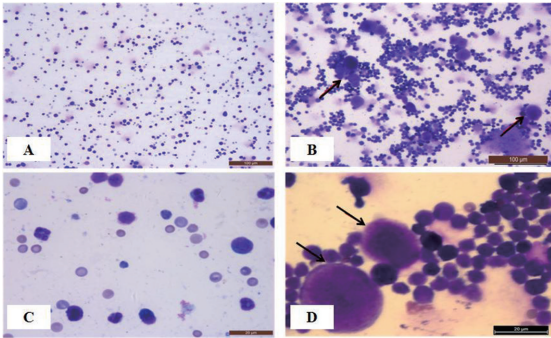


图 4 BDE 209 暴露剂量组 PND 90 雄性小鼠异常骨髓象

注:A,20 倍镜下正常小鼠骨髓象;B,20 倍镜下高剂量染毒组雄性小鼠异常骨髓象。C、D 图为对应 A、B 图 100 倍镜下骨髓象。黑色箭头所示为巨型裸核细胞。

Fig. 4 Effect of BDE 209 exposure on the rate of abnormal bone marrow cells in offspring mice (PND 90)

Note: The normal (A, ×20; C, ×100) and dysplasia (B, ×20; D, ×100) in bone marrow cell. Arrow presents the giant naked nucleus of the cell.

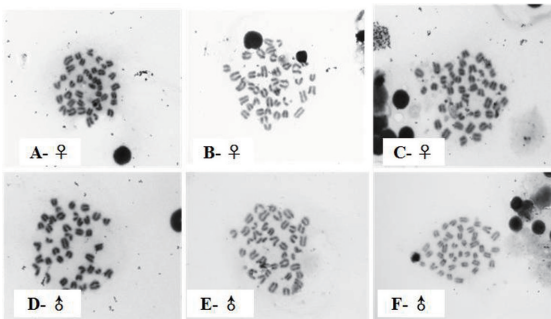


图 5 BDE 209 暴露对小鼠骨髓细胞染色体组型及数目的影响

注:A、D, 对照组小鼠染色体;B、E, 低剂量组小鼠染色体; C、F, 高剂量组小鼠染色体。

Fig. 5 Effect of BDE 209 exposure on the rate of karyotype and number in bone marrow cell in offspring mice

Note: A, D, Control; B, E, Lowdose; C, F, Highdose

### 3 讨论 (Discussion)

流行病学研究显示,室内有机污染物可能是儿童血液疾病,如儿童白血病的危险因素<sup>[10-12]</sup>,尽管尚未有资料显示 PBDEs 参与其中,但鉴于目前 PBDEs 在室内空气和粉尘含量中的上升趋势,以及孕期妇女,婴幼儿及儿童作为室内有机污染物的主要敏感人群,推测 PBDEs 暴露可能对出生儿童的血液系统具有一定的毒性作用。本研究用环境相关剂量的 PBDEs 模拟人类暴露模式,在孕前、孕期、哺乳期及断乳期对母鼠及出生子鼠进行长期,持续染毒,并在不同发育阶段对子鼠外周血液系统和骨髓系统进行检测,结果显示,PBDEs 暴露对外周血细胞和骨髓具有一定的毒性。

血液学常规指标不仅是临床,也是毒理学评价苯<sup>[14-16]</sup>、甲醛<sup>[17-19]</sup>等具有血液毒性物质的常规指标。本研究用外周血白细胞分类计数对 PBDEs 暴露后不同发育阶段子鼠的外周白细胞系统进行评价,结果发现 PBDEs 对子鼠白细胞系统未有明显影响。然而外周血涂片形态学检测显示,PBDEs 染毒,特别是低级量组,导致出生 30 和 60 d 子鼠外周血白细胞升高的机率高于对照组,而高剂量染毒对出生 90 d 子鼠外周血也有相同的结果。另外,低 PBDEs 染毒可导致出生 90 d 子鼠外周血的异型深染淋巴细胞检出率增高。白细胞作为机体抵御各种异物入侵的主要防线,由粒细胞、淋巴细胞和单核细胞组成,其中以中性粒细胞数目最多。中性粒细胞的运动能

表 10 BDE 209 暴露对子代小鼠骨髓细胞染色体组型和数目的异常检出率 (n=5)

Table 10 Effect of BDE 209 exposure on the rate of abnormal karyotype in bone marrow cell in offspring mice (n=5)

性别 Sex	时间点 Time	检出率/样本数 Abnormal rate/Sample		
		对照组 Control	低剂量组 Low	高剂量组 High
雌性 Female	30 d	0/5	0/5	0/5
	60 d	0/5	0/5	0/5
	90 d	0/5	0/5	0/5
雄性 Male	30 d	0/5	0/5	0/5
	60 d	0/5	0/5	0/5
	90 d	0/5	0/5	0/5



力及其吞噬系统决定了其具备防止进入体内异物扩散的作用。BDE 209 进入体内后可能刺激白细胞增生,但随着染毒时间的延长及小鼠的成熟发育,白细胞系统可以得到平衡而呈现恢复的趋势,但是仅以此数据还不足以证明 BDE 209 对小鼠白细胞系统的毒性作用,其机制需要进一步深入研究。

成熟红细胞以无氧酵解代谢供给能量维持自身的生理功能,没有细胞核和线粒体,红细胞中的血红蛋白,结合肺泡中的氧进行运输。本研究观察到,与对照组相比,BDE 209 染毒导致出生 30 d 雄性小鼠外周血红细胞,血红蛋白及红细胞压积的显著下降,但对雌性小鼠无明显影响。正常机体主要通过外周血破坏引起的红细胞数量和血红蛋白数量的变化对骨髓进行反馈调节,经过一系列复杂的互相关联、制约机制来刺激造血组织生成新的红细胞和血红蛋白进行补充,以维持自身的生理平衡。当机体暴露 BDE 209 后,通过一系列机制破坏外周血中红细胞,从而引起红细胞数量和血红蛋白数量的下降,进而反馈调节骨髓细胞增生,这与本研究在低剂量组子代雄性小鼠的骨髓涂片中检测到骨髓增生活跃现象一致。

血小板由骨髓造血组织中的巨核细胞产生,对骨髓有损害作用的因素侵害骨髓而造成造血功能低下的疾病时,都会影响血小板的质和量。本研究结果显示,在 PND 30,高剂量暴露 BDE 209 的雌性小鼠,低剂量暴露 BDE 209 的雌性小鼠均出现血小板计数的显著降低。造成血小板计数减少的原因主要有 2 个:(1) 血小板产生量减少(由骨髓巨核细胞成熟障碍引起);(2) 血小板的破坏增多(机体免疫功能紊乱,产生抗血小板抗体)<sup>[20]</sup>。已有研究显示,PBDEs 能够引起免疫毒性<sup>[13]</sup>,BDE 209 暴露早期可能引起免疫系统紊乱而造成血小板的破坏增多,造成数量的降低,这可能是子鼠血小板降低的一个机制。另外,血小板减少可能反馈引起骨髓增生异常,导致骨髓巨核细胞增生,使外周血小板数量在出生 60 d 后得以恢复,因此,在 PND 60、90 PBDEs 染毒的子鼠外周血小板均未观察到显著改变,以及骨髓巨核细胞增多。

在白血病分子遗传学研究发现,急性淋巴细胞白血病的基因变异主要包括原癌基因的异常表达及染色体畸变,而染色体畸变可表现为染色体数目异常和结构的畸变。大量临床研究发现,大部分急性淋巴细胞患者的骨髓细胞均可见异常核

型<sup>[21-23]</sup>,且复杂多见,其中亚二倍体和超二倍体均可见,且不仅仅数目异常,结构亦发生了畸变,本研究选用结果较为准确稳定的超二倍体作为指标,但尚未发现异常结果,需在进一步实验中探讨 BDE 209 对骨髓细胞染色体的影响。

值得注意的是,PBDEs 暴露对子鼠血液系统的影响在某些方面具有性别差异和剂量差异,例如,对雄性小鼠外周红细胞系统的毒性高于对雌性小鼠,而对血小板的影响则相反;另外,低剂量 PBDEs 暴露可导致外周及骨髓细胞形态学异常检出率增高,而高剂量则影响较小或没有影响。越来越多的研究显示,很多毒物的效应呈现非单一剂量-效应关系,低剂量的毒性效应往往高于高剂量的毒性,尤其是涉及内分泌系统的毒性<sup>[24-25]</sup>。许多研究显示 PBDEs 具有内分泌毒性,包括甲状腺激素和性腺分泌毒性<sup>[13]</sup>,上述结果是否与此有关,有待于进一步研究。

本研究对出生后子鼠的生长体重进行了动态观察,结果显示低剂量组雌、雄性小鼠体重只在 PND 30 显著降低;高剂量组雄性小鼠体重在 PND 16、60、90 均显著降低,而雌性小鼠体重只在 PND 30 显著降低,这与我们以前用相同剂量孕哺期染毒的研究结果相似<sup>[26]</sup>。在动物实验中,体重作为一个非特异性常规指标,可以系统性地反映出全身的毒性作用。PBDEs 有多种毒性和毒性效应,PBDEs 暴露对小鼠生长发育的影响是否与血液毒性有关尚不清楚,可能与其多种毒性有关。

综合上述结果和分析,BDE 209 长期暴露对子代血液系统,包括外周血和骨髓系统具有一定的毒性,未来的研究将集中于 PBDEs 影响的靶点和机制。

通讯作者简介:邵静(1965—),女,博士,教授,主要研究方向为环境污染健康与评价。

刘晓晖(1981—),女,博士,副教授,主要研究方向为生态与环境毒理学。

#### 参考文献 (References):

- [1] Johnson A, Olson N. Analysis and occurrence of polybrominateddiphenyl ethers in Washington State freshwater fish [J]. Archives of Environmental Contamination and Toxicology, 2001, 41(3): 339-344
- [2] Kalantzi O I, Martin F L. Different levels of polybrominateddiphenyl ethers (PBDEs) and chlorinated compounds in breast milk from two U. K. regions [J]. Environmental Health Perspectives, 2004, 112(10): 1085-1091



- [3] Anderson H A, Imm P, Knobeloch L, et al. Polybrominated diphenyl ethers (PBDE) in serum: Findings from a US cohort of consumers of sport-caught fish [J]. *Chemosphere*, 2008, 73(2): 187-194
- [4] Foster W G, Gregorovich S, Morrison K M, et al. Human maternal and umbilical cord blood concentrations of polybrominated diphenyl ethers [J]. *Chemosphere*, 2011, 84(10): 1301-1309
- [5] Darnerud P O. Toxic effects of brominated flame retardants in man and wildlife [J]. *Environment International*, 2003, 29(6): 841-853
- [6] McDonald T. A perspective on the potential health risks of PBDEs [J]. *Chemosphere*, 2002, 46(5): 745-755
- [7] Butt C M, Diamond M L, Truong J, et al. Spatial distribution of polybrominated diphenyl ethers in southern Ontario as measured in indoor and outdoor window organic films [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(3): 724-731
- [8] Allen J G, McClean M D, Stapleton H M, et al. Personal exposure to polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) in residential indoor air [J]. *Environmental Science & Technology*, 2007, 41(13): 4574-4579
- [9] 黄玉妹, 陈来国, 许振成, 等. 家庭尘土中多溴联苯醚的含量及人体暴露水平初步研究[J]. *环境科学*, 2010, 31(1): 168-172  
Huang Y M, Chen L G, Xu Z G, et al. Preliminary study of PBDE levels in house dust and human exposure to PBDEs via dust ingestion [J]. *Environmental Science*, 2010, 31(1): 168-172 (in Chinese)
- [10] 张茂东, 武光林, 刘晓杰, 等. 家居装修及 DNA-PKcs 表达与儿童白血病发病的关系[J]. *天津医科大学学报*, 2007, 13(1): 29-30  
Zhang M D, Wu G L, Liu X J, et al. A case-control study on the relationship between household decoration, the expression of DNA-PKcs and risk of childhood leukemia [J]. *Journal of Tianjin Medical University*, 2007, 13(1): 29-30 (in Chinese)
- [11] 孙慧琴, 龙理良, 李凤华, 等. 室内氡暴露致儿童白血病的病例对照研究[J]. *中国现代医生*, 2010, 48(4): 50-51  
Sun H Q, Long L L, Li F H, et al. Leukemia in children caused by indoor radon exposure: A case-control study [J]. *China Modern Doctor*, 2010, 48(4): 50-51 (in Chinese)
- [12] 曹露露, 颜崇淮, 沈晓明. 孕期化学污染物暴露对胎儿及儿童生长发育的影响[J]. *中国儿童保健杂志*, 2008, 16(4): 433-435
- [13] 万斌, 郭良宏. 多溴联苯醚的环境毒理学研究进展[J]. *环境化学*, 2011, 30(1): 143-152
- Wan B, Guo H L. Research progress on the investigation of environmental toxicology of polybrominated diphenyl ethers [J]. *Environmental Chemistry*, 2011, 30(1): 143-152 (in Chinese)
- [14] 韩磊, 朱宝立, 张恒东. 苯的血液毒性研究[J]. *工业卫生与职业病*, 2014, 40(1): 66-73
- [15] 夏昭林, 袁弥满, 金锡鹏, 等. 苯对骨髓造血干细胞和造血微环境的毒作用[J]. *国外医学卫生学分册*, 1994, 21(2): 75-77
- [16] 邢彩虹, 纪之莹, 李桂兰, 等. 苯作业工人外周血细胞 DNA 损伤检测[J]. *卫生研究*, 2005, 34(1): 22-24  
Xing C H, Ji Z Y, Li G L, et al. Detection of DNA damage of peripheral white blood cells in benzene-exposed workers [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2005, 34(1): 22-24 (in Chinese)
- [17] 朱善良, 孙文, 杨传浩, 等. 甲醛染毒对小鼠血液的毒性作用[J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26(2): 149-151  
Zhu S L, Sun W, Yang C H, et al. Hematotoxic effect of formaldehyde in mice [J]. *Journal of Environmental Health*, 2009, 26(2): 149-151 (in Chinese)
- [18] Marsh G M, Youk A O. Reevaluation of mortality risks from leukemia in the formaldehyde cohort study of the National Cancer Institute [J]. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*, 2004, 40(2): 113-124
- [19] Zhang L, Freeman L E B, Nakamura J, et al. Formaldehyde and leukemia: Epidemiology, potential mechanisms, and implications for risk assessment [J]. *Environmental and Molecular Mutagenesis*, 2010, 51(2): 181-191
- [20] 杨艳梅, 熊德上, 徐西华, 等. 宁血饮对 ITP 模型小鼠血小板系统和免疫功能的影响[J]. *重庆医学*, 2011, 40(22): 2199-2205  
Yang Y M, Xiong D S, Xu Y H, et al. Effect of Ningxueyin on platelet system and immune function of mice in ITP model [J]. *Chongqing Medical*, 2011, 40(22): 2199-2205 (in Chinese)
- [21] Pui C H, Carroll A J, Raimondi S C, et al. Clinical presentation, karyotypic characterization, and treatment outcome of childhood acutelymphoblastic leukemia with a near-haploid or hypodiploid less than 45 line [J]. *Blood*, 1990, 75: 1170-1177
- [22] Pui C H, Schrappe M, Masera G, et al. Ponte di Legno Working Group: Statement on the right of children with leukemia to have full access to essential treatment and report on the Sixth International Childhood Acute Lymphoblastic Leukemia Workshop [J]. *Leukemia*, 2004, 18: 1043-1053

- [23] 帖利军, 顾龙君, 陈静, 等. 儿童急性淋巴细胞白血病的细胞遗传学表现与预后的关系[J]. 中华血液学杂志, 2006, 27(5): 339-343  
Tie L J, Gu L J, Chen J, et al. Correlation between karyotypic characteristics and treatment outcome in childhood acute lymphoblastic leukemia [J]. Chinese Journal of Hematology, 2006, 27(5): 339-343 (in Chinese)
- [24] Andrade A J M, Grande S W, Talsness C E, et al. A doseresponse study following in utero and lactational exposure to di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP): Non -monotonic dose - response and low dose effects on rat brain aromatase activity [J]. Toxicology, 2006, 227(3): 185-192
- [25] Narita S, Goldblum R M, Watson C S, et al. Environmental estrogens induce mast cell degranulation and enhance IgE -mediated release of allergic mediators [J]. Environmental Health Perspectives, 2007, 115 (1): 48-52
- [26] 钱波, 王健, 朱春艳, 等. 甲状腺激素脱碘酶在孕哺期 BDE 209 暴露致子代小鼠神经发育毒性中的潜在作用 [J]. 生态毒理学报, 2014, 9(3): 459-466  
Qian B, Wang J, Zhu C Y, et al. The role of thyroid hormone deiodinase in developmental neurotoxicity in newborn mice mediated by BDE 209 exposure during pregnancy and lactation [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2014, 9(3): 459-466 (in Chinese) ◆