

# 双酚 S 暴露对秀丽隐杆线虫行为学及生长发育的影响

周兴华, 张晓伟, 肖香, 周越, 赵延胜, 祝莹, 张家艳, 董英

(江苏大学食品与生物工程学院, 江苏镇江 212013)

**摘要:** 双酚 S (BPS) 作为双酚 A (BPA) 的替代物, 在各个产品中(奶瓶、食品罐和热敏纸等)已经得到广泛应用, 但是目前关于 BPS 的毒理学研究甚少。本文以 BPS 为研究对象, 秀丽线虫为模式生物, 分析其对运动行为能力及生长发育的影响。研究表明, 急性毒性试验中, 暴露浓度达到 1  $\mu\text{M}$  时, 运动行为学指标身体弯曲频率显著下降, 暴露浓度达到 10  $\mu\text{M}$  时, 运动行为学指标头部摆动频率显著下降; 随着浓度的增加, BPS 还会影响秀丽隐杆线虫的寿命和子代数, 导致寿命缩短和子代数目的减少, BPS 浓度达到 100  $\mu\text{M}$  时, 与对照组相比, 寿命下降了 35.42%, 子代数下降了 30.47%; BPS 暴露会导致秀丽线虫体内活性氧自由基含量显著上升, 推测高浓度的 BPS 可能造成秀丽线虫的氧化损伤, 进而影响运动行为能力、寿命及子代数数量。

**关键词:** 双酚 S; 秀丽隐杆线虫; 内分泌干扰物; 行为学; 生长发育; 食品包装材料; 安全评价

文章编号: 1673-9078(2018)01-1-4

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.1.001

## Effects of Bisphenol S Exposure on Behavior and Growth of *Caenorhabditis elegans*

ZHOU Xing-hua, ZHANG Xiao-wei, XIAO Xiang, ZHOU Yue, ZHAO Yan-sheng, ZHU Ying, ZHANG Jia-yan, DONG Ying

(School of Food and Biological Engineering, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China)

**Abstract:** Bisphenol S (BPS) has been widely used as a substitute for bisphenol A (BPA) in various products (bottles, food cans, thermal paper, etc.), but there were few studies on toxicology of BPS. In this study, BPS was used as the research object, and *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) was used as model organism to analyze its effect on the motor behavior and growth of *C. elegans*. The results showed that when the exposure concentration reached 1  $\mu\text{M}$ , the frequency of body movement was significantly decreased. And when the exposure concentration reached 10  $\mu\text{M}$ , the thrashing frequency of the head was significantly decreased in the acute toxicity test. With the increase of concentration, BPS also affected the life span and the number of progeny of *C. elegans*, resulting in shortened life span and fewer brood size. When the concentration of BPS reached 100  $\mu\text{M}$ , the life span decreased by 35.42% and the brood size decreased by 30.47% as compared with the control group; BPS exposure could lead to a significant increase of the reactive oxygen species (ROS) free radicals content in the *C. elegans*, suggesting that high concentrations of BPS might cause oxidative damage to the *C. elegans*, and further affect the motor behavioral capacity, life span and the number of offspring.

**Key words:** Bisphenols (BPS); *C.elegans*; endocrine disruptors; behavioristics; growth and development; food packaging materials; safety evaluation

双酚 A(BPA)自 1960 年工业化生产后, 由于其加工材料无色透明、轻便及耐腐蚀等优点, 被广泛应用于食品塑料包装材料、金属内涂层及供水管的制造等<sup>[1]</sup>。但是由于 BPA 具有内分泌干扰物的性质, 其安全性一直受到质疑<sup>[2-7]</sup>。目前为止, 中国、欧美、美

收稿日期: 2017-10-05

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (31501569); 江苏大学高级专业人才专项 (13JD6037)

作者简介: 周兴华 (1982-), 女, 讲师, 研究方向: 食品安全

通讯作者: 董英 (1954-), 女, 教授, 博士生导师, 研究方向: 食品营养与安全

国等国家已经禁止了 BPA 在婴幼儿奶瓶的使用, 法国禁止了 BPA 在所有食品包装材料的应用<sup>[8]</sup>, 人们把目光转向了与 BPA 结构高度相似的双酚 S(BPS)<sup>[9]</sup>, 于是 BPS 作为替代品广泛应用于各种食品包装材料中。与此同时, BPS 的产量每年都在增加, Liao 等<sup>[10]</sup>研究发现在美国及 7 个亚洲国家 (中国、印度、日本、韩国、科威特、马来西亚和越南) 的 315 份尿样检查报告中, 其中 81% 的样品检出了双酚 S, 而且随着 BPS 替代使用范围的扩大, 人群暴露量会更大。尽管 BPS 具有更好的化学稳定性, 但与 BPA 相比, 具有更强的皮肤渗透性, 更好的吸收率, 可能造成更重的人体负担<sup>[10-13]</sup>。

体内及体外实验表明, BPS 及其代谢中间体具有抗雌激素或甲状腺激素作用<sup>[14]</sup>, 还能引起大鼠生殖系统的损伤, 影响睾丸及附睾病理形态学特征及精子形成<sup>[15]</sup>。目前 BPS 在应用之前并没有对其毒理学进行充分研究, 因此 BPS 的安全性问题越来越受到关注<sup>[9]</sup>, 尤其是 BPS 的低毒性效应。秀丽线虫 (*Caenorhabditis elegans*, *C.elegans*) 是一种能够在土壤中自由生活的, 常见的小型线虫, 成虫体长约在 1 mm 左右, 以细菌为食, 与其他模式生物相比, 具有体积小、繁殖能力强、易于培养、成本低、易保藏、传代快和身体透明等特点, 秀丽线虫对外源化合物十分敏感, 因此也是毒理学评价中的经典模式生物<sup>[16]</sup>。本实验以 BPS 为研究对象, 秀丽线虫为模式生物, 研究 BPS 暴露对秀丽线虫的急性毒性、运动行为指标、寿命及子代数目的影响, 为 BPS 在食品包装材料中的应用提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要材料与仪器设备

BPS, 美国 Sigma 公司; 活性氧 ROS 试剂盒, 南京生物建成生物有限责任公司; 其他生化试剂, 国药集团化学试剂有限责任公司。体视显微镜, 南京江南永新光学有限公司; 多功能酶标仪, 帝肯(上海)贸易有限公司。

### 1.2 秀丽线虫的培养

秀丽隐杆线虫 N2 野生型, 东南大学王大勇实验室惠赠。

### 1.3 秀丽线虫的同步化

将大量处于产卵期的雌雄同体的秀丽隐杆线虫成虫从 NGM 固体培养基冲洗下来, 加入 1 mL 的裂解液, 裂解 5 min, 3000 r/min 离心 1.5 min, 弃上清, 得到沉淀的虫卵。反复清洗 3 次, 以充分去除裂解液成分。最后将虫卵转移到涂有新鲜食物的 NGM 培养基上, 在 20 °C 培养箱中培养。

### 1.4 实验设计

根据试验设计配制浓度分别为 100、10、1、0.1、0.01、0.001、0 mM 的 BPS 染毒液, 染毒液中乙醇的终浓度全部为 0.1%。将处于 L4 期的秀丽隐杆线虫分别转移到含有不同浓度染毒液的培养基中, 进行急性毒性暴露, 24 小时后进行各项指标测定。

### 1.5 指标测定

#### 1.5.1 运动行为指标的测定

##### 1.5.1.1 头部摆动频率

头部摆动频率: 滴取适量 M9 于载玻片上, 挑取暴毒后的线虫于 M9 液滴中, 在体式显微镜下观察, 头部摆动频率的标准为 1 min 内头部从一侧摆到另一侧再摆回来的次数。

##### 1.5.1.2 身体弯曲频率

将暴毒后的线虫依次挑起置于没有涂布大肠杆菌的 NGM 培养基上, 在体式显微镜下观察。记线虫身体向前走过一个波长为一次身体弯曲, 记录 30 s 内线虫的身体弯曲次数。

#### 1.5.2 子代数目的测定

暴毒结束后, 在涂有大肠杆菌 OP50 的 NGM 培养基上挑 1 只待产卵的线虫, 并保证在产卵期内每天将线虫转移到新的 NGM 培养基内, 含有虫卵的旧平板继续放置培养箱内培养 24 h, 然后对每个平板内的线虫的数目进行统计、相加。等到线虫的排卵期结束后, 计算每条线虫总的子代数目的。

#### 1.5.3 寿命的测定

暴毒结束后, 将秀丽隐杆线虫挑到新的培养基上, 产卵期内每天将线虫转移到新的平板上, 后期每两天转移一次。

线虫的寿命是指从线虫的卵开始直到死亡的这段时间。

#### 1.5.4 活性氧自由基<sup>[17]</sup>的测定

暴毒结束后, 每个浓度挑取 50 只待测线虫至 Costar 24 孔板内, 然后每个孔内分别加入 ROS 试剂, 使荧光探针 CM-H2DCFDA 的终浓度为 1 μmol/L。在无菌生化培养箱内培养 2 h 后取出处理后的受试线虫, 用 M9 缓冲液冲洗 3 次, 以去除残留的 ROS 试剂。用多功能酶标仪来检测各个浓度的受试线虫的 ROS 水平, 激发波长和发射波长分别设置为 485 nm 和 535 nm, 读出 ROS 的平均荧光强度。ROS 水平的单位定义为相对荧光强度/50 条受试线虫。

## 1.6 统计分析

利用 origin 8.5 对结果进行统计分析, 并用 SPSS 做显著性分析, 与对照组相比较, 显著水平设定为 \* $p < 0.05$  和 \*\* $p < 0.01$ 。

## 2 结果与分析

### 2.1 BPS 急性暴毒对秀丽隐杆线虫运动行为

的影响

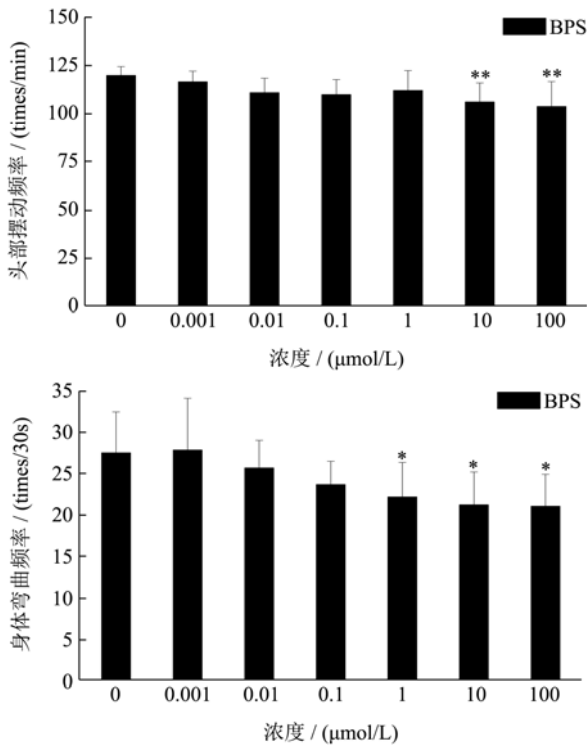


图1 BPS 急性暴露对秀丽隐杆线虫运动行为的影响

Fig.1 Effects of BPS acute exposure on the movement behavior of *C. elegans*

注: 所有数据均表示为平均值±标准误差, \* $p<0.05$ , \*\* $p<0.01$ 。

图1显示了不同浓度的BPS急性暴露对秀丽隐杆线虫运动行为的影响。如图所示,当BPS浓度达到10 μmol/L时,秀丽线虫的头部摆动频率显著下降( $p<0.01$ )。BPS浓度为100 μmol/L时,与对照组相比,头部摆动频率下降13.49%。而当BPS浓度达到1 μmol/L时,秀丽线虫的身体弯曲频率显著下降( $p<0.05$ ),BPS浓度为100 μmol/L时,与对照组相比,身体弯曲频率下降23.64%。研究表明,BPS可以显著地抑制秀丽线虫运动行为能力,BPS浓度越高,秀丽线虫的运动行为能力抑制越显著。

## 2.2 BPS 对寿命的影响

图2显示了不同浓度的BPS对秀丽线虫的寿命的影响。如图所示,与对照组相比,当BPS浓度达到0.001 μmol/L时,秀丽线虫的寿命显著降低( $p<0.01$ )。BPS浓度越高,秀丽线虫寿命的负面影响越显著。BPS浓度为100 μmol/L时,与对照组相比,寿命下降35.42%。研究表明,BPS可以显著降低秀丽线虫的寿命,并与浓度呈现出一定的线性关系。

## 2.3 BPS 对秀丽隐杆线虫子代数目的影响

不同浓度的BPS对秀丽线虫子代数目的影响如

图3所示,与对照组相比,浓度越高,子代数目下降越明显。BPS为10 mol/L时,与对照组相比,秀丽线虫子代数目下降28.13%,浓度为100 μmol/L时,子代数目下降30.47%。研究表明,BPS可以显著影响秀丽线虫的子代数目。

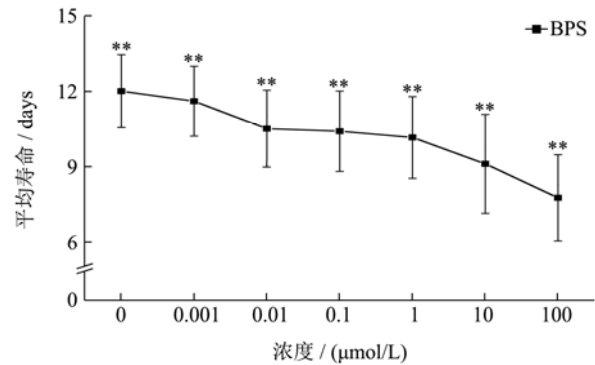


图2 BPS 急性暴露对秀丽隐杆线虫寿命的影响

Fig.2 Effects of BPS acute exposure on the lifespan of *C. elegans*

注: 所有数据均表示为平均值±标准误差, \* $p<0.05$ ,

\*\* $p<0.01$ 。

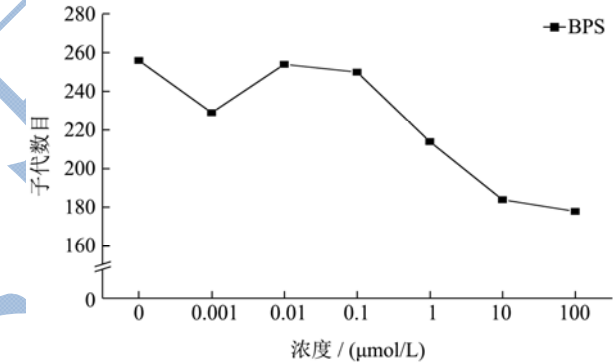


图3 BPA 急性暴露对秀丽隐杆线虫子代数目的影响

Fig.3 Effects of BPS acute exposure on the brood size of *C. elegans*

注: 所有数据均表示为平均值±标准误差, \* $p<0.05$ ,

\*\* $p<0.01$ 。

## 2.4 BPS 对秀丽线虫 ROS 的影响

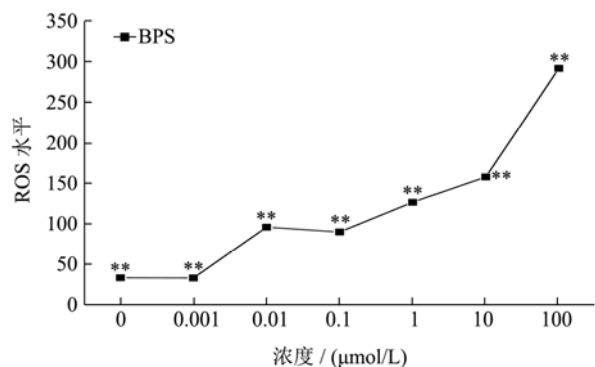


图4 BPS 急性暴露对秀丽线虫 ROS 水平的影响

Fig.4 Effects of BPS acute exposure on ROS level of *C. elegans*

注：所有数据均表示为平均值±标准误差，\* $p<0.05$ ，\*\* $p<0.01$ 。

图 4 显示了不同浓度 BPS 急性暴露对秀丽线虫 ROS 水平的影响，如图所示，与对照组相比，BPS 浓度达到  $0.01 \mu\text{mol/L}$  时，秀丽线虫的 ROS 水平显著升高 ( $p<0.01$ )。BPS 浓度越高，ROS 水平越高。BPS 浓度为  $100 \mu\text{mol/L}$  时，与对照组相比，ROS 水平升高了 776.64%。研究表明，BPS 可以显著升高秀丽线虫 ROS 水平，推测 BPS 可能通过氧化应激途径进而损害秀丽线虫。

### 3 结论

随着 BPA 逐渐进入公众的视野，其安全性备受质疑，很多食品包装材料及婴幼儿奶瓶也打上了“无 BPA”的字眼，却使用了另外一种结构高度相似的化合物 BPS，然而关于 BPS 的毒理学研究甚少，尤其是以秀丽线虫作为模式生物，目前仅有两篇相关报道<sup>[1,18]</sup>。本论文研究了 BPS 急性暴露对秀丽线虫毒性作用，选取了不同的低浓度水平分析 BPS 对秀丽线虫运动行为、生长发育及繁殖能力的影响。研究发现，当 BPS 浓度达到  $1 \mu\text{mol/L}$  时，BPS 显著性的抑制了秀丽线虫的运动行为能力，其中头部摆动频率和身体弯曲频率显著下降，同时子代数量也在下降。Mersh 等<sup>[1]</sup>研究了 BPS 胚胎期暴露对秀丽线虫的非联合型学习能力，研究发现，与对照组相比，浓度达到  $0.1 \mu\text{mol/L}$  时，对秀丽线虫刺激次数显著性增加，也就是说，低浓度的 BPS 也能影响秀丽线虫的习惯化学习能力，需要更多的外部刺激才能使秀丽线虫适应环境的变化，推测这种习惯化学习行为的改变可能是 BPS 与雌二醇结构的相似性，干扰了神经细胞突触可塑性的变化，进而影响了秀丽线虫的学习记忆及运动行为能力<sup>[19]</sup>，研究也发现浓度超过  $1 \mu\text{mol/L}$  时，子代数量也在显著降低。Chen 等<sup>[18]</sup>研究了 BPS 对秀丽线虫的生殖细胞及繁殖功能的影响，结果发现 BPS 和 BPA 均能引起的生殖系统损伤，增加生殖细胞的凋亡，导致胚胎致死率上升，而研究也发现，BPS 和 BPA 可能是通过不完全相同途径作用生殖系统。我们研究还发现，低浓度的 BPS 能够显著缩短秀丽线虫的寿命，促进 ROS 的生成，推测 ROS 的过度产生可能是加速秀丽线虫的衰老的主要原因。

### 参考文献

[1] Mersha M D, Patel B M, Patel D, et al. Effects of BPA and BPS exposure limited to early embryogenesis persist to impair non-associative learning in adults [J]. Behavioral &

Brain Functions, 2015, 11(1): 27

- [2] Miyawaki J, Sakayama K, Kato H, et al. Perinatal and postnatal exposure to bisphenol a increases adipose tissue mass and serum cholesterol level in mice [J]. Journal of Atherosclerosis & Thrombosis, 2007, 14(5): 245
- [3] Moral R, Wang R, Russo I H, et al. Effect of prenatal exposure to the endocrine disruptor bisphenol A on mammary gland morphology and gene expression signature [J]. Journal of Endocrinology, 2008, 196(1): 101
- [4] Zhang X, Chang H, Wiseman S, et al. Bisphenol A disrupts steroidogenesis in human H295R cells [J]. Toxicological Sciences An Official Journal of the Society of Toxicology, 2011, 121(2): 320
- [5] Rochester J R. Bisphenol A and human health: a review of the literature [J]. Reproductive Toxicology, 2013, 42(12): 132-155
- [6] Rezg R, Elfazaa S, Gharbi N, et al. Bisphenol A and human chronic diseases: current evidences, possible mechanisms, and future perspectives [J]. Environment International, 2014, 64(3): 83
- [7] Rubin B S, Paranjpe M, Dafonte T, et al. Perinatal BPA exposure alters body weight and composition in a dose specific and sex specific manner: the addition of peripubertal exposure exacerbates adverse effects in female mice [J]. Reproductive Toxicology, 2016, 68: 130-144
- [8] Amat E, Rihouey-Robini L. Bisphenol A in January 2015: French prohibition and EFSA study [J]. European Food and Feed Law Review, 2015, 10(2): 138-138
- [9] Glausiusz, Josie. Toxicology: The plastics puzzle [J]. Nature, 2014, 508(7496): 306-308
- [10] Liao C, Liu F, Alomirah H, et al. Bisphenol s in urine from the united states and seven asian countries: occurrence and human exposures [J]. Environmental Science & Technology, 2012, 46(12): 6860-6866
- [11] Ike M, Chen M Y, Danzl E, et al. Biodegradation of a variety of bisphenols under aerobic and anaerobic conditions [J]. Water Science & Technology A Journal of the International Association on Water Pollution Research, 2006, 53(6): 153-159
- [12] Danzl E, Sei K, Soda S, et al. Biodegradation of Bisphenol A, Bisphenol F and Bisphenol S in Seawater [J]. International Journal of Environmental Research & Public Health, 2009, 6(4): 1472-1484
- [13] Héliers-Toussaint C, Peyre L, Costanzo C, et al. Is bisphenol S a safe substitute for bisphenol A in terms of metabolic

- function? An *in vitro* study[J]. Toxicology & Applied Pharmacology, 2014, 280(2): 224-235
- [14] Skledar D G, Schmidt J, Fic A, et al. Influence of metabolism on endocrine activities of bisphenol S [J]. Chemosphere, 2016, 157: 152
- [15] Ullah H, Jahan S, Ain QU, et al. Effect of bisphenol S exposure on male reproductive system of rats: A histological and biochemical study [J]. Chemosphere, 2016, 152: 383-391
- [16] Corsi A K, Wightman B, Chalfie M. A Transparent Window into Biology: A Primer on *Caenorhabditis elegans* [J]. Genetics, 2015, 200(2): 387-407
- [17] Rosenfeldt E J, Linden K G. Degradation of endocrine disrupting chemicals bisphenol A, ethinyl estradiol, and estradiol during UV photolysis and advanced oxidation processes [J]. Environmental Science & Technology, 2004, 38(20): 5476-5483
- [18] Chen Y, Shu L, Qiu Z, et al. Exposure to the BPA-Substitute Bisphenol S Causes Unique Alterations of Germline Function [J]. Plos Genetics, 2016, 12(7): e1006223
- [19] Baudry M, Bi X, Aguirre C. Progesterone-estrogen interactions in synaptic plasticity and neuroprotection [J]. Neuroscience, 2013, 239: 280-294