

秦晓飞, 秦占芬, 徐晓白. 2009 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, 29(8): 1589–1597
Qin X F, Qin Z F, Xu X B. 2009 Application of *Xenopus laevis* in ecotoxicology (II) — evaluating thyroid disruption [J]. Acta Scientiae Circumstantiae 29(8): 1589–1597

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

秦晓飞, 秦占芬*, 徐晓白

中国科学院生态环境研究中心, 北京 100085
收稿日期: 2008-10-14 修回日期: 2009-02-16 录用日期: 2009-05-11

摘要: 甲状腺干扰物是目前生态毒理学和环境毒理学研究的一个热点. 本文介绍了非洲爪蟾作为评价甲状腺干扰作用的模型动物的理论基础, 从变态速度、时间、甲状腺发育、甲状腺激素信号途径、促甲状腺激素表达等几个方面, 综述了目前非洲爪蟾用于评价甲状腺干扰作用的方法学及其应用的进展, 最后探讨了非洲爪蟾用于甲状腺干扰作用评价存在的问题和今后的发展趋势.
关键词: 非洲爪蟾; 生态毒理学; 甲状腺干扰作用
文章编号: 0253-2468(2009)08-1589-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Application of *Xenopus laevis* in ecotoxicology (II) — evaluating thyroid disruption

QIN Xiaofei, QIN Zhanfen*, XU Xiaobai
Research Center for Eco-environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085
Received 14 October 2008 **received in revised form** 16 February 2009; **accepted** 11 May 2009

Abstract Thyroid disruptors are one of the research focuses in ecotoxicology and environmental toxicology. In this paper, the theoretical foundation of *Xenopus laevis* as a model animal species in evaluating thyroid disruption is introduced. The recent progress in methodology and application of *X. laevis* as a model animal species for evaluating thyroid disruption is reviewed from different aspects including metamorphic rate/time, thyroid development, thyroid hormone-signalling pathway, and thyroid-stimulating hormone mRNA expression. Finally, some problems considering the application of *X. laevis* in evaluating thyroid disruption and the future developments in this area are also discussed.
Keywords *Xenopus laevis*; ecotoxicology; thyroid disruption

1 非洲爪蟾是评价甲状腺干扰作用的良好模型动物 (*Xenopus laevis* is a good model animal species to evaluate thyroid disruption)

近年来研究发现, 有些环境物质可通过影响甲状腺激素的合成分泌、转运或影响与甲状腺激素受体 (thyroid hormone receptor, TR) 结合等途径干扰甲状腺系统, 在组织器官水平、细胞水平以及分子水平产生毒理效应. 而这类能够引起甲状腺结构以及系统功能发生改变的内分泌干扰物被称为甲状腺干扰物 (Goldman *et al.*, 2000; O'Connor *et al.*,

2002). 众所周知, 甲状腺是脊椎动物的内分泌器官之一, 其分泌的甲状腺激素 T₃和 T₄由血液循环带到全身各个组织器官, 参与调控生长发育、新陈代谢和繁殖等重要的生理过程 (Tata, 1996; Crisp *et al.*, 1998; Rose, 2005; Fort *et al.*, 2007). 如果胎儿发育期间甲状腺激素缺乏将导致侏儒症, 表现为体型矮小、智力迟钝、骨骼营养不良以及新陈代谢低下等. 另外, 与中枢神经系统成熟相关的过程以及骨骼、肝脏和血液等的发育和功能维持都离不开甲状腺激素的调控. 鉴于甲状腺系统在动物和人

体发育过程和正常功能维持中的重要作用,甲状腺干扰物的毒理影响受到高度关注.大量研究显示,多氯联苯(PCBs)、二英和氯酚等污染物能够诱导动物甲状腺损伤和甲状腺激素平衡失调等(Saracci *et al.*, 1991; Kogevinas *et al.*, 1993; Hagner, 2003; Giacomini *et al.*, 2006),而且有研究证明,这些甲状腺干扰物导致的神经损伤可能与甲状腺干扰作用有关(Zoeller, 2005; Darraş, 2008).近年来,有越来越多的污染物,如双酚A(BPA)、酞酸酯和多溴二苯醚(PBDEs)等被发现可能具有甲状腺干扰作用(Goldey *et al.*, 1995; Crofton *et al.*, 2000; Meerts *et al.*, 2004; Zhou *et al.*, 2001).因此,甲状腺干扰物称为当前生态毒理学和环境毒理学研究的一个热点.

目前,有关甲状腺干扰物的筛查和甲状腺干扰作用的评价主要是基于啮齿动物鼠开展的.有研究报道,PCBs暴露大鼠可对甲状腺造成直接损伤(Langer, 1998),导致甲状腺滤泡细胞增生、细胞高度增加以及胶质面积缩小等(Collins *et al.*, 1977; Ness *et al.*, 1993).母体暴露PCBs可增加胎鼠和初生大鼠脑内II型甲状腺激素脱碘酶活性,加速 T_4 到 T_3 的转化(Morse *et al.*, 1993).围产期母鼠暴露PCBs使幼鼠血浆中甲状腺激素水平明显下降(Seo *et al.*, 1995; Damerud *et al.*, 1996; Goldey and Crofton, 1998; Meerts *et al.*, 2002; Donahue *et al.*, 2004).PBDEs暴露导致鼠血浆中甲状腺激素 T_4 浓度明显下降(Hallgren *et al.*, 2001).

随着甲状腺干扰物毒理学研究的深入,两栖动物非洲爪蟾作为一种研究甲状腺干扰作用的模型动物正受到越来越多的关注.在国外,美国内分泌干扰物筛查和确证顾问委员会(endocrine disruptor screening and testing advisory committee, EDSTAC)于1998年建议用非洲爪蟾尾吸收试验来评价内分泌干扰物的甲状腺干扰作用(USEPA, 1998).非洲爪蟾作为发育生物学的模型动物,同其它无尾两栖类动物一样,在其发育过程中要经历一个从蝌蚪到蛙的剧烈变态过程.整个过程分3个时期:从受精卵到后腿出现为变态初期;从后腿出现到前腿展开为变态前期;从前腿展开到尾完全吸收为变态高潮期.在变态初期,甲状腺萌发并发育但不分泌甲状腺激素,此时蝌蚪处于生长阶段.进入变态前期后,大概从第54阶段爪蟾蝌蚪甲状腺开始分泌甲状腺激素,但一直维持在一个相对较低的水平.此时爪

蟾蝌蚪仍处于一个相对稳定的生长阶段,后腿和前腿不断生长发育.从58阶段开始,爪蟾蝌蚪甲状腺激素水平逐渐升高,并伴随非洲爪蟾蝌蚪前腿突破鳃盖展开并同后腿一起生长,肝脏和肠等器官经重组后由蝌蚪的组织器官向蛙的组织器官转变,腮也开始吸收.伴随着形态的变化,爪蟾蝌蚪的生理过程也逐渐向蛙转变.到62阶段时,甲状腺激素水平迅速升高并达到顶峰,爪蟾变态进入高潮,表现为腮和尾迅速被吸收,蝌蚪的组织器官变态为蛙的组织器官.随后,甲状腺激素水平下降并维持在一个较低的水平(Bray *et al.*, 1982).变态初期,蝌蚪的生长发育不受甲状腺激素调节;而变态前期和变态高潮期,其生长发育直接由甲状腺激素调控(Dodd *et al.*, 1976).当甲状腺激素水平发生改变时,蝌蚪也相应地发生一系列形态及生理变化.同时,甲状腺激素水平也受许多因素的调节,其中任何一个因素发生变化都可能影响到甲状腺激素水平,进一步影响爪蟾的变态发育过程.反过来,非洲爪蟾的变态发育就可以反映出甲状腺系统受到的干扰作用.如果在变态前期或变态高潮期给予非洲爪蟾甲状腺激素或有甲状腺激素作用的甲状腺干扰物处理,将会诱导变态提前发生或促进变态过程,如前腿提前展开,尾提前完全吸收,从前腿展开到尾完全吸收的时间缩短等.相反,如果在变态前期或变态高潮期给予非洲爪蟾甲状腺激素抑制剂处理,将会延缓变态发生或抑制变态过程,如前腿延迟展开,尾延迟吸收,从前腿展开到尾完全吸收的时间延长等.因此,根据非洲爪蟾变态过程中形态的变化可以评价甲状腺干扰物的甲状腺干扰作用.

伴随着由甲状腺激素调控的变态发育过程,非洲爪蟾的甲状腺组织学结构也呈现出一个变化过程.甲状腺原基出现在40~43阶段,到45阶段甲状腺为一簇细胞群,48~49阶段开始形成滤泡结构,随后胶质和吸收囊泡出现,滤泡结构发育完整,由外围单层排列的滤泡细胞和中间的胶质组成.到53~54阶段每个甲状腺大概有20个滤泡,此时开始分泌甲状腺激素.随着甲状腺的进一步发育,滤泡体积逐渐增大,滤泡细胞由扁平状变为柱状,高度不断增加.到变态高潮期的62阶段时,胶质最多,滤泡细胞高度最高,此时分泌甲状腺激素的能力最强.62阶段后滤泡逐渐回缩,胶质变少,滤泡细胞高度变小直至成扁平状.在甲状腺发育过程中,某些甲状腺干扰物可能通过直接影响甲状腺的发育干

扰甲状腺系统. 因此, 可以根据非洲爪蟾甲状腺的形态、组织学结构以及甲状腺激素的水平来评价甲状腺干扰物的干扰作用.

甲状腺激素调控非洲爪蟾变态发育过程由甲状腺激素信号途径 (thyroid hormone-signalling pathway) 介导: 甲状腺激素进入靶细胞, 与细胞核中 TR 结合为复合物, 然后与变态相关的靶基因的 TR 反应元件 (thyroid hormone response element, TRE) 作用, 调控靶基因的表达, 最终影响变态发育的过程 (Shi *et al.*, 2002). 理论上, 某些甲状腺干扰物可通过影响这一甲状腺信号途径实现甲状腺干扰作用. 因此, 可以根据非洲爪蟾变态过程中 TR 或其它靶基因的 mRNA 表达来评价甲状腺干扰物的内分泌干扰作用.

甲状腺合成分泌甲状腺激素受下丘脑-垂体-甲状腺轴 (Hypothalamus-Pituitary-Thyroid Gland, HPT) 调控. 在某些生理因子或环境因子的作用下, 下丘脑分泌促肾上腺皮质激素释放因子 (corticotrophin-releasing factor, CRF) 和促甲状腺素释放激素 (thyrotropin-releasing hormone, TRH). CRF 从下丘脑分泌出来以后, 被运送到垂体与特异性受体结合, 刺激垂体分泌促甲状腺素 (thyroid-stimulating hormone, TSH), TSH 到达甲状腺并与特异性受体结合, 从而诱导甲状腺分泌甲状腺激素 (Yen 2001; Manzoni *et al.*, 2004; Tata 2006). TSH 也可能是甲状腺干扰物作用的一个靶环节. 因此, 其 mRNA 的表达也可以作为评价甲状腺干扰物的内分泌干扰作用的一个终点指标.

综上所述, 非洲爪蟾是评价甲状腺干扰作用的良好模型动物. 目前, 国外已有实验室以非洲爪蟾为模型动物开展甲状腺干扰作用的研究. 加拿大维多利亚大学生物化学与微生物学院 Helbing (Helbing *et al.*, 2007) 教授领导的小组对非洲爪蟾作为一种研究甲状腺干扰作用的模型动物的可行性进行了一系列的研究. 德国柏林洪堡大学生物学院内分泌系 Kloas 教授 (Opitz *et al.*, 2006) 带领的团队对用非洲爪蟾来研究甲状腺干扰作用的方法学进行了探讨. 国内也有实验室已开展这一领域的工作 (Qin *et al.* 2006; Zhou *et al.*, 2007), 但研究基础还很薄弱. 下面就非洲爪蟾用于评价甲状腺干扰作用的方法学的发展和应用作进一步的介绍.

2 非洲爪蟾用于评价甲状腺干扰作用的方法学及其应用 (Methods and application of *Xenopus laevis* in evaluating thyroid disruption)

2.1 变态速度/时间

非洲爪蟾的变态发育过程受甲状腺激素调控, 如果甲状腺干扰物影响到甲状腺激素水平的变化, 很有可能会通过变态发育的速度/时间表现出来, 所以反映变态发育速度/时间的终点指标可用来评价甲状腺干扰作用.

2.1.1 尾吸收试验 尾吸收是两栖动物变态发育的重要特征, 尾吸收速度可一定程度上标记变态发育的速度. 基于此 Fort 等发展了一种 14d 尾吸收试验, 用来研究甲状腺干扰物的干扰作用. 该试验用测试物暴露 60 阶段的非洲爪蟾蝌蚪, 直至尾完全吸收, 分别在第 63、64、65 和 66 阶段测量尾部长度, 用尾吸收速度作为终点指标来研究测试物的甲状腺干扰作用. Fort 等用此方法对美国明尼苏达州的几个水样进行测试, 结果发现, 所测试水样抑制了蝌蚪尾的吸收 (Fort *et al.*, 1999; Fort *et al.*, 2000), 显示该测试水样可能含有甲状腺干扰活性的物质. 该研究证实蝌蚪尾吸收可作为研究甲状腺干扰作用的一个方法.

离体条件下爪蟾蝌蚪的尾在甲状腺激素的作用下也可被吸收 (Shaffer 1963; Furbush *et al.*, 2004). 因此, 已有学者利用爪蟾蝌蚪尾体外吸收试验来研究甲状腺干扰作用. Iwanuro 等 (2006) 体外培养 52~54 阶段的非洲爪蟾蝌蚪的尾, 发现在 $10^{-7} \text{ mol L}^{-1} \text{ T}_3$ 的作用下, 尾会随培养时间的延长不断被吸收变短. 在这一试验体系下, Iwanuro 等还研究了 BPA (10^{-7} 、 10^{-6} 和 $10^{-5} \text{ mol L}^{-1}$) 的甲状腺干扰作用. 结果发现, BPA 能够抑制甲状腺激素诱导的尾的吸收, 而 BPA 单独暴露不影响尾的吸收. 这一结果表明, BPA 没有直接的甲状腺/甲状腺激素活性, 但可通过抑制甲状腺激素作用产生甲状腺干扰作用. Schreks 等 (2006) 用尾体外吸收试验研究了溴系阻燃剂的甲状腺干扰作用, 发现 BDE206 有甲状腺抑制作用, 六溴环十二烷 (HBCD) 有甲状腺促进作用.

2.1.2 累积变态率 某一时间段内变态成蛙的累计百分率可以反映变态发育的速度. Gutleb 等 (2000) 利用这一指标研究了 PCBs 的甲状腺干扰作用. 通过将 49 阶段的爪蟾蝌蚪食物暴露 10d 再用干净的饲料继续饲养 46d 并从暴露后第 25d 起

每两天计算变态成蛙的累积百分率直至暴露结束,统计分析各实验组间的差异.结果发现,作为阳性对照的甲硫咪唑(MM I)暴露组变态成蛙的时间明显被延迟.同样, $2\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量的工业 PCBs (Clophen A50)也延迟了蝌蚪的变态发育.研究证明,PCBs对非洲爪蟾有甲状腺干扰作用,同时也说明反映蝌蚪变态速度的累积变态率(变态成蛙时间)可以作为研究甲状腺干扰物的指标. Balch等又将这一指标变通为累积变态率为 50% 时的时间,进行甲状腺干扰物研究 (Balch *et al.*, 2006). 结果发现,一定剂量的 BDE47、BDE99 和工业 DE-71 能够延迟变态成蛙的时间,说明这些 PBDEs 具有甲状腺干扰作用.

2.1.3 累计前腿展开率 前腿展开(58阶段)是变态发育过程中一个明显的形态学变化,同变态成蛙的累计百分率一样,某一时间段内的累计前腿展开率也可以反映变态发育的速度. Opitz等(2006)将 51 阶段的非洲爪蟾蝌蚪半静态暴露于不同浓度的甲状腺抑制剂乙烯硫脲(ETU)中 90d 通过分析暴露后 20~90d 间的累计前腿展开率,发现 $25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 ETU 明显延迟了蝌蚪的前腿展开时间,而 $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露组中所有的蝌蚪到暴露结束时无一展开前腿. 该研究显示,反映蝌蚪变态速度的累计前腿展开率(前腿展开时间)可以用来研究甲状腺干扰作用.

2.1.4 某一时间点上发育阶段的分布 某一时间点上爪蟾蝌蚪所处发育阶段的分布也能反映变态发育的速度,可用来研究甲状腺干扰物的干扰作用. Degitz等(2005)用这一指标研究了甲状腺激素和甲状腺抑制剂丙基硫尿嘧啶(PTU)对爪蟾变态发育的影响. 实验将 51 阶段和 54 阶段爪蟾蝌蚪暴露在不同浓度的甲状腺激素 T_4 ($0.25\sim 4.0\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) 或 PTU ($1.25\sim 0\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 中,分别在暴露 21d 和 14d 时检查蝌蚪所处的变态阶段. 结果显示, T_4 明显加快了爪蟾蝌蚪的生长发育速度,而高剂量的 PTU 明显抑制了爪蟾蝌蚪的变态发育. 同样, Zhang等(2006)设计了类似的研究,将 54 阶段的蝌蚪进行甲状腺激素处理 14d 通过比较甲状腺激素处理与未处理蝌蚪所处的发育阶段的不同,发现甲状腺激素明显加快了蝌蚪的变态发育. 这些研究显示,某一时间点上爪蟾蝌蚪所处的发育阶段的分布可作为甲状腺干扰作用研究的终点指标之一.

PCBs 的甲状腺干扰作用. Aroclor 1254 ($5\sim 50\text{ ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 暴露 48 阶段的非洲爪蟾蝌蚪 80d 分析暴露结束时爪蟾所处的发育阶段时发现, Aroclor 1254 暴露明显地抑制了蝌蚪的变态发育. Freeman 等(2005)用相同的方法研究了除草剂阿特拉津对爪蟾变态发育的影响,结果发现, $100\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的阿特拉津暴露就能延迟非洲爪蟾的变态发育. 因此,研究人员推测阿特拉津可能有甲状腺干扰作用.

2.2 甲状腺发育

有关鼠的研究显示,有些甲状腺干扰物可能会通过影响甲状腺发育干扰甲状腺系统,表现为甲状腺整体形态、组织学形态发生变化或甲状腺激素水平发生变化. Degitz等(2005)报道了甲状腺抑制剂 MM I 和 PTU 暴露早期非洲爪蟾蝌蚪(54阶段)所导致的甲状腺代偿性增生,形态上表现为甲状腺增大,组织学结构上表现为甲状腺滤泡细胞肥大增生和胶质收缩. Opitz等(2006)的研究显示,另一种甲状腺抑制剂 ETU ($1.0\sim 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 同样能引起非洲爪蟾的甲状腺代偿性增生,并呈明显的剂量-效应关系. 由于整体形态和组织学结构的变化相对稳定,一旦发生改变,在短时期内不容易恢复,而且组织学技术相对比较简单,经固定、脱水、包埋、切片和染色等步骤后即可在显微镜下观察分析. 对非洲爪蟾来说,其甲状腺容易观察并便于获取,因此,爪蟾的甲状腺形态学和组织学结构适合被作为评价甲状腺干扰作用的终点指标.

甲状腺滤泡细胞吸收碘是甲状腺合成甲状腺激素的一个重要环节,抑制碘的吸收就会导致甲状腺激素分泌下降(Wolff 1998; Capen, 1994). 研究显示,两栖动物、鱼类以及哺乳动物等进行高氯酸盐暴露能够抑制碘的吸收,从而产生甲状腺干扰作用(Miranda *et al.*, 1996; Siglin *et al.*, 2000; Goleman *et al.*, 2002a; Goleman *et al.*, 2002b; Patiño *et al.*, 2003). Tietge等(2005)用高氯酸盐暴露爪蟾蝌蚪并对甲状腺组织学切片进行分析. 结果发现, $16\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸盐导致甲状腺滤泡细胞肥大增生,胶质收缩等; $63\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 高氯酸盐导致甲状腺滤泡细胞进一步肥大增生,胶质收缩的更多.

本实验室的相关研究也证实了长期暴露于 $2\sim 20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ Aroclor 1254 能够诱导非洲爪蟾蝌蚪甲状腺发生组织学结构的改变. 爪蟾蝌蚪从胚胎起开始暴露于 $0.4\sim 2.10$ 和 $20\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 Aroclor 1254 溶液,直至蝌蚪变态发育结束. 对甲状腺组织胶体所占的

比例以及滤泡细胞的高度进行定量测定分析. 结果显示, 非洲爪蟾蝌蚪长期暴露在 $2\mu\text{g L}^{-1}$ 以上浓度 Aroclor 1254 后, 其甲状腺组织出现明显的代偿性增生, 表现为甲状腺滤泡扩张、胶体面积减少, 滤泡细胞增殖和高度增加等, 并且随着暴露剂量的增加增生症状加剧 (Zhou *et al.*, 2007).

2.3 甲状腺信号途径

TR 是甲状腺信号途径中的关键分子. 非洲爪蟾 TR 有 α 和 β 两种亚型, 在不同的发育阶段其表达水平不同, 并且其表达水平与甲状腺激素水平密切相关 (Kawahara *et al.*, 1991; Kananori *et al.*, 1992; Krain *et al.*, 2004). 研究显示, 外源性甲状腺激素处理可快速增强爪蟾蝌蚪 TR 基因 mRNA 的表达 (Yaoita *et al.*, 1990; Kananori *et al.*, 1992; Eliceiri *et al.*, 1994; Furbw *et al.*, 1999; Shi 2000; Krain *et al.*, 2004). 某些甲状腺干扰物可能通过影响甲状腺激素水平或其它途径引起 TR mRNA 表达发生变化. 所以, TR mRNA 的表达可以作为评价甲状腺干扰作用的一种分子标记.

Cnmp 等 (Cnmp *et al.*, 2002) 最早用非洲爪蟾 TR mRNA 表达研究了乙草胺的甲状腺干扰作用, 发现 52~54 阶段的爪蟾蝌蚪暴露 48h 后, 乙草胺 (10 nmol L^{-1}) 明显增强 T_3 (100 nmol L^{-1}) 诱导的 TR mRNA 表达, 而乙草胺 (10 nmol L^{-1}) 单独作用对 TR mRNA 表达无影响. 该研究显示, 乙草胺可能通过和 T_3 联合作用产生甲状腺干扰作用.

Opitz 等 (2006) 就 TR mRNA 表达作为研究甲状腺干扰物的一个指标进行了方法学的研究. 通过比较 T_3 (1 nmol L^{-1}) 不同时间暴露诱导的尾中 TR mRNA 表达, 确定了暴露 12h 或稍后时间段是检测 TR mRNA 表达的最佳时间. 为了确定非洲爪蟾 TR mRNA 受甲状腺激素诱导的最敏感阶段, Opitz 等将 50/51、54/55、58/59 阶段的蝌蚪暴露 T_3 和 T_4 24h, 检测头和尾部组织 TR mRNA 表达, 结果显示, 50/51 阶段的蝌蚪对甲状腺激素更敏感. 该研究还显示, 甲状腺激素诱导 $TR\beta$ 基因表达比诱导 $TR\alpha$ 基因更显著. 在此基础上, Opitz 等研究了甲状腺干扰剂 NH-3 和 GC-1 对尾 $TR\beta$ mRNA 表达的影响, 结果显示, 10、50 和 250 nmol L^{-1} GC-1 诱导 $TR\beta$ mRNA 表达显著地增加. 同时, 高剂量 NH-3 (1000 nmol L^{-1}) 也能诱导 $TR\beta$ mRNA 表达. 因此, 爪蟾 TR mRNA 的表达可以作为一个研究甲状腺干扰物的终点指标. Zhang 等 (2006) 用此指标研究了 PTU、

MMI 和高氯酸盐的甲状腺干扰作用, 发现这些甲状腺抑制剂抑制脑和尾中 TR mRNA 表达.

同体内组织中 TR mRNA 表达一样, 体外培养的爪蟾尾部组织中 TR mRNA 表达也可用来研究测试物的甲状腺干扰作用. Iwanuro 等 (2006) 利用爪蟾尾体外培养体系研究了 BPA 的甲状腺干扰作用, 发现 BPA 在体外能够抑制 T_3 诱导的 TR mRNA 表达, 而 BPA 单独暴露不影响 TR mRNA 表达. 此研究表明, BPA 能够通过干扰甲状腺激素产生甲状腺干扰作用.

除 TR mRNA 表达这个自然的分子标记外, 最近还有学者建立了转基因体系以检测在甲状腺信号途径中起作用的甲状腺干扰物. 通过转基因技术将 TRE 与绿荧光蛋白基因或荧光素酶基因一同转入非洲爪蟾蝌蚪胚胎或细胞系内, 使其在甲状腺激素或抗甲状腺激素的作用下, 通过甲状腺信号途径表达绿色荧光蛋白或荧光素蛋白; 然后通过检测荧光强弱反映测试物甲状腺激素活性或抗甲状腺激素活性的强弱. 这些转基因的非洲爪蟾试验体系已被用于研究乙草胺、高氯酸盐、酞酸酯、四溴双酚 A 和 BPA 等环境物质的甲状腺干扰作用 (Turque *et al.*, 2005; Sugiyama *et al.*, 2005a; Sugiyama *et al.*, 2005b; Fini *et al.*, 2007).

2.4 TSH 等分子标记的 mRNA 表达

TSH 是脑垂体产生的糖蛋白类激素, 负责调控甲状腺分泌甲状腺激素. 当甲状腺激素水平下降时, 通过 HPT 轴的负反馈调节, TSH 水平提高. 相应地, 抑制甲状腺激素合成的甲状腺干扰物可能会通过负反馈调节提高 TSH mRNA 的表达. 因此, TSH mRNA 的表达可以作为研究甲状腺素拮抗物的分子标志物.

Helbing 等 (2007) 研究了甲状腺激素和甲状腺抑制剂 MMI、PTU 和高氯酸钠对爪蟾蝌蚪脑中 TSH mRNA 表达的影响, 结果发现, T_4 和 T_3 暴露不同程度地抑制了 TSH mRNA 的表达. 高氯酸钠 (4 mg L^{-1}) 的暴露明显地增强了 $TSH\beta$ mRNA 的表达, 而 MMI (100 mg L^{-1}) 和 PTU (20 mg L^{-1}) 对 $TSH\beta$ mRNA 表达没有显著影响. Opitz 等 (2006) 发现另一种甲状腺抑制剂 ETU (25 和 50 mg L^{-1}) 可明显地增强爪蟾脑中 TSH mRNA 的表达. 这些研究显示, TSH mRNA 表达可以作为研究甲状腺干扰物的分子标记物. Lehigh Shirey 等 (2006) 用此分子标记物研究了 Aroclor 1254 (5 和 $50\mu\text{g L}^{-1}$) 的甲

状腺干扰作用, 结果发现, 随 Aroclor 1254浓度的增加 TSH mRNA 表达呈减弱趋势, 证明 Aroclor 1254有甲状腺抑制作用。

除 TSH mRNA 外, 另外一些在非洲爪蟾变态发育中扮演重要角色的分子的 mRNA 表达也可作为评价甲状腺干扰作用的分子标记。如甲状腺激素转运蛋白 (transthyretin, TTR) 和甲状腺素脱碘酶 (D2 和 D3) 在蝌蚪尾吸收、肠和脑重塑等变态发育过程中至关重要, 它们调控着甲状腺激素的合成和转运。有研究显示, TTR、D2 和 D3 的 mRNA 表达可以作为一个检测甲状腺干扰物干扰作用的分子标志物 (Huang *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2004)。

在研究某一测试物的甲状腺干扰作用时, 某一单一指标往往不能说明问题, 一般需要结合几种指标才可有一个比较明确的结论。Opitz 等 (2005) 结合蝌蚪长度、变态阶段和尾部吸收等终点指标建立了一种非洲爪蟾变态测试法 (Xenopus metamorphosis assay, XEMA)。该方法以 48~50 阶段的爪蟾蝌蚪为材料, 暴露测试物 28d 在暴露第 0、7、14、21 和 28d 时测量蝌蚪体长和尾长, 观察发育阶段分布, 然后统计测试物暴露组和对照组在变态发育方面的差异。在该方法基础上, 经济合作与发展组织 (Organisation for Economic Co-Operation and Development, OECD) 推荐使用一套多指标的甲状腺干扰作用检测方法: 爪蟾蝌蚪从 51 阶段开始暴露测试物 21d, 首选蝌蚪所处的发育阶段、后腿长度、体长、体重以及甲状腺组织学结构等终点指标来检测待测物的甲状腺干扰作用, 另外, 甲状腺激素水平以及 TR β 等基因 mRNA 表达也可以考虑使用 (OECD, 2003, 2004)。

3 问题和展望 (Problems and Perspectives)

非洲爪蟾变态发育为环境物质甲状腺干扰作用的评价提供了一个很好的模型, 越来越多的实验室在开展这方面的研究工作, 但这一模型在实际应用中还存在一些问题。

1) 饲养条件造成的个体差异。非洲爪蟾的变态发育强烈依赖于饲养条件, 在适宜条件 (尤其是适宜饲养密度) 下, 非洲爪蟾在受精后 58d 左右就可完成变态 (Nieukoop *et al.*, 1956)。但目前大部分研究报道的变态时间都很长, 一般受精 2 个月后陆续变态成蛙一直拖到受精 3、4 个月甚至更长时间才能全部完成变态, 这给有关变态速度/时间的数据

统计造成困难; 另一方面, 客观上使同一批实验动物的不同个体发育到某一阶段时所接受的测试物暴露时间和暴露量不同, 结果在不同个体上可能出现不同的毒性效应, 给最后的数据分析和结果判定造成困难。为克服同一批蝌蚪变态发育的个体差异, Gutleb 等 (2007) 用 0.2% 的硫脲处理 50/51 阶段的蝌蚪, 使之同步化停留在 54 阶段, 除去硫脲后同步化的蝌蚪可用于甲状腺干扰物的研究。虽然这一方法克服了非洲爪蟾变态发育存在个体差异的缺陷, 但由于硫脲本身是一种甲状腺抑制剂, 其对非洲爪蟾的甲状腺干扰作用可能会影响对测试物甲状腺干扰作用的研究。因此, 本研究组不建议使用, 根据本研究组积累的实验经验, 通过优化饲养条件尤其是减少饲养密度, 可使同一批蝌蚪基本同步发育, 减少个体之间的差异。

2) 饲养条件本身对甲状腺系统和变态发育的干扰。两栖动物变态发育直接由甲状腺激素控制, 而甲状腺激素系统又受 HPT 轴调控, 光线、水质和营养状况等环境因素可通过干扰 HPT 轴影响甲状腺系统和变态发育。如暗光条件会延迟两栖动物变态, 光线和周围背景会影响黑色素的生成, 而黑色素能促进变态 (Rose *et al.*, 1998; Denver 1998)。这些饲养条件可能会因为影响甲状腺系统和变态发育而干扰到对测试物甲状腺干扰作用的研究。

3) 不同实验室间实验方案的差异。目前, 非洲爪蟾在甲状腺干扰物研究中所使用的评价指标基本一致, 但各实验室所采取的实验方案存在差异, 如暴露方式和暴露起始时间 (阶段) 等各有不同。所以, 不同实验室得到的数据往往不一致甚至相反。如有研究报道 $100\mu\text{g L}^{-1}$ 的阿特拉津暴露能延迟非洲爪蟾的变态发育 (Freeman *et al.*, 2005), 但 Sullivan 等的研究显示, $320\mu\text{g L}^{-1}$ 阿特拉津暴露对非洲爪蟾变态发育没有明显影响 (Sullivan *et al.*, 2003)。

综上所述, 为促进非洲爪蟾在甲状腺干扰物研究中的应用, 今后应从饲养条件和实验方案等环节大力开展标准化研究, 以提高不同实验室间研究结果的科学性和可比性。

责任作者简介: 秦占芬 (1971—), 女, 博士, 中国科学院生态环境研究中心环境化学与生态毒理学国家重点实验室副研究员。联系电话: 010-62919177; E-mail: qinzhafen@rice.ac.cn

参考文献 (References):

- Balch G C, Velaz-Espino L A, Sweet C, *et al* 2006. Inhibition of metamorphosis in tadpoles of *Xenopus laevis* exposed to polychlorinated diphenyl ethers (PBDEs) [J]. *Chemosphere* 64 (2): 328—338
- Bray T, Sicard R E. 1982. Correlation among the changes in the levels of thyroid hormones, thyrotropin and thyrotropin-releasing hormone during the development of *Xenopus laevis* [J]. *Exp Cell Biol* 50 (2): 101—107
- Cai L, Brown D D. 2004. Expression of type II iodothyronine deiodinase marks the time that a tissue responds to thyroid hormone-induced metamorphosis in *Xenopus laevis* [J]. *Dev Biol* 266 (1): 87—95
- Capen C C. 1994. Mechanisms of chemical injury of thyroid gland [J]. *Prog Clin Biol Res* 387: 173—191
- Collins W T Jr, Capen C C, Kasa L, *et al* 1977. Effect of polychlorinated biphenyl (PCB) on the thyroid gland of rats. Ultrastructural and biochemical investigations [J]. *Am J Pathol* 89 (1): 119—136
- Crisp T M, Clegg E D, Cooper R L, *et al* 1998. Environmental endocrine disruption: an effects assessment and analysis [J]. *Environ Health Perspect* 106 (Suppl 1): 11—56
- Crofton K M, Kodavanti P R, DerFeyllin E C, *et al* 2000. PCBs, thyroid hormones and ototoxicity in rats: cross-fostering experiments demonstrate the impact of postnatal lactation exposure [J]. *Toxicol Sci* 57 (1): 131—140
- Crump D, Weny K, Velthoen N, *et al* 2002. Exposure to the herbicide acetochlor alters thyroid hormone-dependent gene expression and metamorphosis in *Xenopus laevis* [J]. *Environ Health Perspect* 110 (12): 1199—1205
- Damen D P O, Morse D, Klason-Wehler E, *et al* 1996. Binding of a 3,3',4,4'-tetrachlorobiphenyl (CB-77) metabolite to fetal transthyretin and effects on fetal thyroid hormone levels in mice [J]. *Toxicology* 106 (1-3): 105—114
- Darras V M. 2008. Endocrine disrupting polychlorinated organic pollutants interfere with thyroid hormone signalling in the developing brain [J]. *Cerebellum* 7 (1): 26—37
- Degitz S J, Holcombe G W, Flynn K M, *et al* 2005. Progress towards development of an amphibian-based thyroid screening assay using *Xenopus laevis*: Organismal and thyroidal responses to the model compounds 6-propylthiouacil, methimazole and thyroxine [J]. *Toxicol Sci* 87 (2): 353—364
- Denver R J. 1998. Hormonal correlates of environmentally induced metamorphosis in the Western spadefoot toad, *Scaphiopus hammondi* [J]. *Gen Comp Endocrinol* 110 (3): 326—336
- Dodd M H Jr, Dodd J M. 1976. The biology of metamorphosis. In: *Physiology of Amphibia* (B. Lofts Ed.) [M]. New York: Academic Press
- Donahue D A, Dougherty E J, Meserve L A. 2004. Influence of a combination of two tetrachlorobiphenyl congeners (PCB 47, PCB 77) on thyroid status, choline acetyltransferase (ChAT) activity, and short- and long-term memory in 30-day-old Sprague-Dawley rats [J]. *Toxicology* 203 (1-3): 99—107
- Eliceiri B P, Brown D D. 1994. Quantitation of endogenous thyroid hormone receptors alpha and beta during embryogenesis and metamorphosis in *Xenopus laevis* [J]. *J Biol Chem* 269 (39): 24459—24465
- Fini J B, LeMével S, Turque N, *et al* 2007. An in vivo multiwell-based fluorescent screen for monitoring vertebrate thyroid hormone disruption [J]. *Environ Sci Technol* 41 (16): 5908—5914
- Fort D J, Propst T L, Stover E L, *et al* 1999. Effects of pond water sediment and sediment extracts from Minnesota and Vermont, USA, on early development and metamorphosis of *Xenopus laevis* [J]. *Environ Toxicol Chem* 18 (10): 2305—2315
- Fort D J, Rogers R L, Morgan L A, *et al* 2000. Preliminary validation of a short-term morphological assay to evaluate adverse effects on amphibian metamorphosis and thyroid function using *Xenopus laevis* [J]. *J Appl Toxicol* 20 (5): 419—425
- Fort D J, Degitz S, Tiege J, *et al* 2007. The hypothalamic-pituitary-thyroid (HPT) axis in frogs and its role in frog development and reproduction [J]. *Crit Rev Toxicol* 37 (1-2): 117—161
- Freeman J L, Rayburn A L. 2005. Developmental impact of atrazine on metamorphosing *Xenopus laevis* as revealed by nuclear analysis and morphology [J]. *Environ Toxicol Chem* 24 (7): 1648—1653
- Furlow J D, Brown D D. 1999. In vitro and in vivo analysis of the regulation of a transcription factor gene by thyroid hormone during *Xenopus laevis* metamorphosis [J]. *Mol Endocrinol* 13 (12): 2076—2089
- Furlow J D, Yang H Y, Hsu M, *et al* 2004. Induction of larval tissue resorption in *Xenopus laevis* tadpoles by the thyroid hormone receptor agonist GG-1 [J]. *J Biol Chem* 279 (25): 26555—26562
- Giacomini S M, Hou L, Bertazzi P A, *et al* 2006. Dioxin effects on neonatal and infant thyroid function: routes of perinatal exposure, mechanisms of action and evidence from epidemiology studies [J]. *Int Arch Occup Environ Health* 79 (5): 396—404
- Gokley E S, Kehn L S, Lau C, *et al* 1995. Developmental exposure to polychlorinated biphenyls (Aroclor 1254) reduces circulating thyroid hormone concentrations and causes hearing deficits in rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 135 (1): 77—88
- Gokley E S, Crofton K M. 1998. Thyroxine replacement attenuates hypothyroidism, hearing loss and motor deficits following developmental exposure to Aroclor 1254 in rats [J]. *Toxicol Sci* 45 (1): 94—105
- Goldman J M, Laws S C, Balchak S K, *et al* 2000. Endocrine-disrupting chemicals: prepubertal exposures and effects on sexual maturation and thyroid activity in the female rat: A focus on the EDSTAC recommendations [J]. *Crit Rev Toxicol* 30 (2): 135—196
- Goldman W L, Urquidí L J, Anderson T A, *et al* 2002a. Environmentally relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit development and metamorphosis in *Xenopus laevis* [J]. *Environ Toxicol Chem* 21 (2): 424—430
- Goldman W L, Carr J A, Anderson T A. 2002b. Environmentally

- relevant concentrations of ammonium perchlorate inhibit thyroid function and alter sex ratios in developing *Xenopus laevis* [J]. *Environ Toxicol Chem*, 21(3): 590—597
- Gutleb A C, Appelhan J, Bronkhorst M, *et al* 2000. Effects of oral exposure to polychlorinated biphenyls (PCBs) on the development and metamorphosis of two amphibian species (*Xenopus laevis* and *Rana temporaria*) [J]. *Sci Total Environ* 262(1-2): 147—157
- Gutleb A C, Schriks M, Mossink L, *et al* 2007. A synchronized amphibian metamorphosis assay as an improved tool to detect thyroid hormone disturbance by endocrine disruptors and apolar sediment extracts [J]. *Chemosphere*, 70(1): 93—100
- Hagmar L. 2003. Polychlorinated biphenyls and thyroid status in humans: a review [J]. *Thyroid* 13(11): 1021—1028
- Hallgren S, Sinjari T, Håkansson H, *et al* 2001. Effects of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) and polychlorinated biphenyls (PCBs) on thyroid hormone and vitamin A levels in rats and mice [J]. *Arch Toxicol* 75(4): 200—208
- Helbing C C, Bailey C M, Ji L, *et al* 2007. Identification of gene expression indicators for thyroid axis disruption in *Xenopus laevis* metamorphosis screening assay. Part I. Effects on the brain [J]. *Aquat Toxicol* 82(4): 227—241
- Huang H, Cai L, Remo B F, *et al* 2001. Timing of metamorphosis and the onset of the negative feedback loop between the thyroid gland and the pituitary is controlled by type II iodothyronine deiodinase in *Xenopus laevis* [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98(13): 7348—7353
- Iwanuro S, Yanada M, Kato M, *et al* 2006. Effects of bisphenol A on thyroid hormone-dependent up-regulation of thyroid hormone receptor alpha and beta and down-regulation of retinoid X receptor gamma in *Xenopus* tail culture [J]. *Life Sci* 79(23): 2165—2171
- Kanamori A, Brown D D. 1992. The regulation of thyroid hormone receptor beta genes by thyroid hormone in *Xenopus laevis* [J]. *J Biol Chem*, 267(2): 739—745
- Kawahara A, Baker B S, Tata J R. 1991. Developmental and regional expression of thyroid hormone receptor genes during *Xenopus* metamorphosis [J]. *Development* 112(4): 933—943
- Kogevinas M, Saracci R, Winkelmann R, *et al* 1993. Cancer incidence and mortality in women occupationally exposed to chlorophenoxy herbicides, chlorophenols and dioxins [J]. *Cancer Causes Control* 4(6): 547—553
- Krain L P, Denver R J. 2004. Developmental expression and hormonal regulation of glucocorticoid and thyroid hormone receptors during metamorphosis in *Xenopus laevis* [J]. *J Endocrinol* 181(1): 91—104
- Langer P. 1998. Minireview: Polychlorinated biphenyls and the thyroid gland [J]. *Endocrine Regulations* 32(4): 193—203
- Lehigh Shirey E A, Jelaso Langerveld A, Mihalko D, *et al* 2006. Polychlorinated biphenyl exposure delays metamorphosis and alters thyroid hormone system gene expression in developing *Xenopus laevis* [J]. *Environ Res* 102(2): 205—214
- Manzon R C, Denver R J. 2004. Regulation of pituitary thyrotropin gene expression during *Xenopus* metamorphosis: negative feedback is functional throughout metamorphosis [J]. *J Endocrinol* 182(2): 273—285
- Meerts I A, Assink Y, Cnijn P H, *et al* 2002. Placental transfer of a hydroxylated polychlorinated biphenyl and effects on fetal and maternal thyroid hormone homeostasis in the rat [J]. *Toxicol Sci* 68(2): 361—371
- Meerts I A, Lilienthal H, Hoving S, *et al* 2004. Developmental exposure to 4-hydroxy-2,3,3',4',5-pentachlorobiphenyl (4-OH-CB107): long-term effects on brain development, behavior and brain stem auditory evoked potentials in rats [J]. *Toxicol Sci* 82(1): 207—218
- Miranda L A, Pisan A, Casco V. 1996. Ultrastructural study on thyroid glands of *Bufo arenarum* larvae kept in potassium perchlorate solution [J]. *Bicell* 20(2): 147—153
- Morse D C, Groen D, Veeman M, *et al* 1993. Interference of polychlorinated biphenyls in hepatic and brain thyroid hormone metabolism in fetal and neonatal rats [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 122(1): 27—33
- Ness D K, Schantz S L, Moostaghian J, *et al* 1993. Effects of perinatal exposure to specific PCB congeners on thyroid hormone concentrations and thyroid histology in the rat [J]. *Toxicol Lett* 68(3): 311—323
- Nieuwkoop P D, Faber J. 1956. Normal table of *Xenopus laevis* [M]. Amsterdam: North Holland Publishing
- O'Connor J C, Cook J C, Marty M S, *et al* 2002. Evaluation of Tier I screening approaches for detecting endocrine-active compounds (EACs) [J]. *Crit Rev Toxicol* 32(6): 521—549
- OECD. Organisation for Economic Cooperation and Development 2003. Compilation of Comments on Draft DRP on Amphibian Metamorphosis Assay [S]. Washington Center (www.oecd.wash.org)
- OECD. Organisation for Economic Co-operation and Development 2004. DRP No. 46. Detailed Review Paper on Amphibian Metamorphosis Assay for the Detection of Thyroid Active Substances [S]. Washington Center (www.oecd.wash.org)
- Opitz R, Braunbeck T, Bliß C, *et al* 2005. Description and initial evaluation of a *Xenopus* metamorphosis assay for detection of thyroid system-disrupting activities of environmental compounds [J]. *Environ Toxicol Chem*, 24(3): 653—664
- Opitz R, Lutz J, Nguyen N H, *et al* 2006. Analysis of thyroid hormone receptor beta mRNA expression in *Xenopus laevis* tadpoles as a means to detect agonism and antagonism of thyroid hormone action [J]. *Toxicol Appl Pharmacol* 212(1): 1—13
- Opitz R, Hartmann S, Blank T, *et al* 2006. Evaluation of histological and molecular endpoints for enhanced detection of thyroid system disruption in *Xenopus laevis* tadpoles [J]. *Toxicol Sci* 90(2): 337—348
- Patino R, Wainwright M R, Cruz-Li E J, *et al* 2003. Effects of ammonium perchlorate on the reproductive performance and thyroid follicle histology of zebrafish [J]. *Environ Toxicol Chem*, 22(5): 1115—1121

- Qin Z F, Xu X B. 2006 Application of *Xenopus laevis* in ecotoxicology (I) — introduction and quality control of laboratory animal [J]. Chinese Science Bulletin 51(8): 873—878 (in Chinese)
- Rose M F, Rose S R. 1998. Melanin accelerates metamorphosis in *Xenopus laevis* [J]. J Pineal Res 24(2): 90—95
- Rose C S. 2005. Integrating ecology and developmental biology to explain the timing of frog metamorphosis [J]. Trends Ecol Evol 20(3): 129—135
- Saracci R, Kogevinas M, Bertazzi P A, *et al*. 1991. Cancer mortality in workers exposed to chlorophenoxy herbicides and chlorophenols [J]. Lancet 338(8774): 1027—1032
- Schriks M, Zvinavashe E, Furlow J D, *et al*. 2006. Disruption of thyroid hormone-mediated *Xenopus laevis* tadpole tail tip regression by hexabromocyclododecane (HBCD) and 2, 2', 3, 3', 4, 4', 5, 5', 6-nona brominated diphenyl ether (BDE 206) [J]. Chemosphere 65(10): 1904—1908
- Seo B W, Lim H, Hansen L G, *et al*. 1995. Effects of gestational and lactational exposure to coplanar polychlorinated biphenyl (PCB) congeners or 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin (TCDD) on thyroid hormone concentrations in weanling rats [J]. Toxicol Lett 78(3): 253—262
- Shaffer B M. 1963. The isolated *Xenopus laevis* tail: a preparation for studying the central nervous system and metamorphosis in culture [J]. J Embryol Exp Morphol 11: 77—90
- Shi Y B, Ritchie J W, Taylor P M. 2002. Complex regulation of thyroid hormone action: multiple opportunities for pharmacological intervention [J]. Pharmacol Ther 94(3): 235—251
- Shi Y B. 2000. Amphibian metamorphosis: from morphology to molecular biology [M]. New York: Wiley
- Siglin J C, Mattie D R, Dodd D E, *et al*. 2000. A 90-day drinking water toxicity study in rats of the environmental contaminant ammonium perchlorate [J]. Toxicol Sci 57(1): 61—74
- Sugiyama S, Shimada N, Miyoshi H, *et al*. 2005a. Detection of thyroid system-disrupting chemicals using in vitro and in vivo screening assays in *Xenopus laevis* [J]. Toxicol Sci 88(2): 367—374
- Sugiyama S, Miyoshi H, Yanaguchi K. 2005b. Characteristics of a thyroid hormone responsive reporter gene transduced into a *Xenopus laevis* cell line using lentivirus vector [J]. Gen Comp Endocrinol 144(3): 270—279
- Sullivan K B, Spence K M. 2003. Effects of sublethal concentrations of atrazine and nitrate on metamorphosis of the African clawed frog [J]. Environ Toxicol Chem 22(3): 627—635
- Tata J R. 1996. Metamorphosis: an exquisite model for hormonal regulation of post-embryonic development [J]. Biochem Soc Symp 62: 123—136
- Tata J R. 2006. Amphibian metamorphosis as a model for the developmental actions of thyroid hormone [J]. Mol Cell Endocrinol 246(1-2): 10—20
- Tiege J E, Holcombe G W, Flynn K M, *et al*. 2005. Metamorphic inhibition of *Xenopus laevis* by sodium perchlorate: effects on development and thyroid histology [J]. Environ Toxicol Chem 24(4): 926—933
- Turque N, Palmier K, LeMével S, *et al*. 2005. A rapid physiologic protocol for testing transcriptional effects of thyroid-disrupting agents in premetamorphic *Xenopus* tadpoles [J]. Environ Health Perspect 113(11): 1588—1593
- US EPA. Environmental Protection Agency. 1998. Endocrine Disruptor Screening and Testing Advisory Committee (EDSTAC): Final Report [R].
- Wolff J. 1998. Perchlorate and the thyroid gland [J]. Pharmacol Rev 50(1): 89—105
- Yaoita Y, Brown D D. 1990. A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis [J]. Genes Dev 4(11): 1917—1924
- Yen P M. 2001. Physiological and molecular basis of thyroid hormone action [J]. Physiol Rev 81(3): 1097—1142
- Zhang F, Degitz S J, Holcombe G W, *et al*. 2006. Evaluation of gene expression endpoints in the context of a *Xenopus laevis* metamorphosis-based bioassay to detect thyroid hormone disruptors [J]. Aquat Toxicol 76(1): 24—36
- Zhou J M, Qin X F, Qin Z F, *et al*. 2007. Effects of Polychlorinated Biphenyls (Aroclor 1254) on Metamorphic Development of *Xenopus laevis* [J]. Asian Journal of Ecotoxicology 2(1): 111—116 (in Chinese)
- Zhou T, Ross D G, DeVito M J, *et al*. 2001. Effects of short-term in vivo exposure to polychlorinated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats [J]. Toxicol Sci 61(1): 76—82
- Zoeller R T. 2005. Environmental chemicals as thyroid hormone analogues: new studies indicate that thyroid hormone receptors are targets of industrial chemicals [J]. Mol Cell Endocrinol 242(1-2): 10—15