

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20190310001

王晓丽, 张运超, 夏沪彬, 等. 四溴双酚 A 对人体正常肝细胞毒性效应及作用机制[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(2): 245-253

Wang X L, Zhang Y C, Xia H B, et al. Toxic effects and mechanism of tetrabromobisphenol A on human normal liver cells L02 [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(2): 245-253 (in Chinese)

四溴双酚 A 对人体正常肝细胞毒性效应及作用机制

王晓丽^{1,2}, 张运超¹, 夏沪彬¹, 陈超², 刘勇弟^{1,*}

1. 华东理工大学资源与环境工程学院, 上海 200237

2. 华东理工大学生物工程学院, 上海 200237

收稿日期: 2019-03-10 录用日期: 2019-06-01

摘要: 四溴双酚 A (TBBPA) 作为目前用量最大的一种溴系阻燃剂, 在含 TBBPA 用品的生产、使用和废弃处置过程中, 能够通过多种途径进入环境介质, 造成持久性污染, 危害生态系统和人体健康。为探明 TBBPA 对人体健康的潜在毒性效应及作用机制, 选取人体正常肝细胞 L02 作为模型, 通过分析暴露后细胞形态、存活率、胞内活性氧(ROS)含量、DNA 损伤及细胞凋亡等变化。结果表明, TBBPA 暴露导致 L02 细胞形态发生明显改变、存活率显著降低, 细胞彗星实验拖尾现象明显增强; 随着暴露浓度的升高, L02 细胞胞内 ROS 含量、丙二醛(MDA)含量和氧化型谷胱甘肽/还原型谷胱甘肽(GSSG/GSH)比值均呈现剂量依赖性增加。40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露条件下胞内 ROS 含量升高 3.1 倍; 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 暴露条件下, 细胞凋亡率分别增加了 3.2 倍和 4.8 倍。推测 TBBPA 暴露对 L02 细胞的毒性效应作用机制为, 暴露引起细胞氧化应激水平升高, ROS 升高再引起 DNA 损伤程度增强, 最终导致细胞凋亡率增加。上述研究结果将为评估 TBBPA 的毒性效应和健康风险提供科学依据。

关键词: TBBPA; L02 细胞; 氧化应激; 细胞凋亡

文章编号: 1673-5897(2021)2-245-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Toxic Effects and Mechanism of Tetrabromobisphenol A on Human Normal Liver Cells L02

Wang Xiaoli^{1,2}, Zhang Yunchao¹, Xia Hubin¹, Chen Chao², Liu Yongdi^{1,*}

1. School of Resource and Environmental Engineering, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

2. School of Biotechnology, East China University of Science and Technology, Shanghai 200237, China

Received 10 March 2019 accepted 1 June 2019

Abstract: Tetrabromobisphenol A (TBBPA) has become one of the most widely used brominated flame retardants. During the production, application and waste disposal of materials containing TBBPA, TBBPA can enter the environment through several ways, and result in the persistent organic pollution, which is harmful to the ecosystem and human health. In order to explore the potentially toxic effects of TBBPA on human health, L02 selected as model cells were exposed to TBBPA, and their morphology, survival rate, intracellular reactive oxygen species (ROS) content, DNA damage and apoptosis levels were detected. The results showed that the cellular morphology was

基金项目: 国家重点研发计划资助项目(2016YFC0206200); 中国环境科学研究院环境基准与风险评估国家重点实验室开放基金(SKLEC-RA2016OFP19); 国家自然科学基金资助项目(41877377, 51578240); 上海市学术/技术研究带头人项目(18XD1424100)

第一作者: 王晓丽(1980—), 女, 助理研究员, 研究方向为环境毒理学, E-mail: xlwang@ecust.edu.cn

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: ydliu@ecust.edu.cn

changed, the survival rate was reduced significantly by TBBPA at the exposed concentration more than $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. And the trailing phenomenon of cell comet experiment was significantly enhanced. The intracellular ROS content, malondialdehyde (MDA) content and the ratio of oxidized/reduced glutathione (GSSG/GSH) increased with the concentration of TBBPA in well dose-dependent manner. The intracellular ROS content, MDA content and GSSG/GSH ratio increased by 3.1, 3.3 and 7.5 times, respectively, at the exposed concentration of $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. The apoptosis rate increased by 3.2 and 4.8 times at the exposed concentration of $20 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$, respectively. It is speculated that the increase of TBBPA concentration induce the increase of ROS level which enhanced the DNA damage and eventually led to the increase of apoptosis rate. The results presented in this study will provide basic data for evaluating the toxic effects and health risk of TBBPA.

Keywords: TBBPA; human normal hepatocytes; oxidative stress; apoptosis

四溴双酚 A(TBBPA)是目前产量最大的溴系阻燃剂,由于其良好的阻燃、耐热性能等优点,广泛应用于生活的各个方面,如家用电器、家具、塑料和电子产品等。TBBPA 可阻止或降低燃烧的速度,同时也可以防止添加的材料燃烧^[1]。TBBPA 可分为添加型和反应型 2 种类型,其中,添加型未形成新的化学键,易释放至环境中;反应型通过化学反应加入阻燃成分,以形成化学键的形式与材料结合,这种结合方式相对稳定,但是其中未聚合的 TBBPA 也会释放到环境中。在含有 TBBPA 的产品生产、使用及产品废弃之后堆放、填埋或者焚烧等处理过程中, TBBPA 通过挥发、渗透等途径进入环境。TBBPA 进入环境后,在不同介质之间进行迁移转化。在大气、土壤、水体沉积物及生物体中已被检出。土壤中 TBBPA 的污染状况已有报道。Yu 和 Hu^[2]在垃圾填埋场附近的土壤中测得 TBBPA 浓度为 $1.4 \sim 1.8 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重)。彭浩等^[3]研究发现,在电子厂周围的土壤样本中 TBBPA 的浓度为 $(25.2 \pm 2.7) \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。Öberg 等^[4]在 22 处用市政废水浇灌的土壤中取 116 个污泥样品,测定出 TBBPA 的含量在 $220 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 范围内;清远的电子废物回收站点土壤中 TBBPA 污染水平极高,其浓度高达 $780 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。电子废物回收站点的 TBBPA 浓度明显高于农田土壤,但与某些工业区土壤的污染水平相当,表明电子废物回收和工业场所是这些地区 TBBPA 的主要来源^[5]。水环境中 TBBPA 的污染状况也有很多报道,Watanabe 等^[6]1983 年在日本的 Neya 河的淤泥中检出了 TBBPA,其含量为 $1.8 \sim 20 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重)。Chu 等^[7]测定了加拿大的废水处理厂样本中 TBBPA 含量,其范围为 $2.1 \sim 28.3 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重);Saint-Louis 和 Pelletier^[8]测定了加拿大 Saint Lawrence 河底泥中 TBBPA 含量,为 $300 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (干重)。在中国,除了黄河和巢

湖外,其余水体中检测到的 TBBPA 浓度普遍 $<10 \text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$;黄河和巢湖水系 TBBPA 浓度较高,安徽省巢湖水样中 TBBPA 含量最高,远高于环境水域的全球水平^[9]。大气中的 TBBPA 主要来源于电子产品的生产及回收。Takigami 等^[10]测定了在日本北海道采集的 2 个室内灰尘样本,其中, TBBPA 含量分别为 $49 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 和 $52 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$,室内空气中的 TBBPA 分别为 $12 \sim 20 \text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $8 \sim 10 \text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$,室外空气中分别为 $9.5 \text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$ 和 $7.1 \text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$ 。在中国贵屿的一个电子废物回收站点检测到的 TBBPA 的浓度平均值为 $82\ 850 \text{pg}\cdot\text{m}^{-3}$ ^[5]。Yu 和 Hu^[2]测定了从中国一个办公室的计算机房内采集到的 4 个灰尘样品,其 TBBPA 含量为 $18.9 \sim 39.6 \mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$ 。TBBPA 会对生物体造成危害。Herzke 等^[11]采集分析了挪威 6 种食肉性鸟类的鸟蛋中溴代阻燃剂的浓度水平,8 个样品中都检出 TBBPA 且含量约为 $13 \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ (湿重);Law 等^[12]测定了英国海域的 68 个海豚脂肪样品,其中,18 个样品中检出的 TBBPA 浓度为 $6 \sim 35 \text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ (湿重)。最近人体内 TBBPA 含量的报道主要集中在母乳和血液样本。Shi 等^[13]调查了中国 24 组母乳样品和食物样品,其中,肉、蛋和水产品中 TBBPA 的平均含量分别为 263 、 194 和 $738 \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ (脂重),母乳中 TBBPA 的含量为 $5\ 124 \text{pg}\cdot\text{g}^{-1}$ (脂重),婴儿通过母乳每日 TBBPA 的摄入量为 $320 \sim 37\ 240 \text{pg}\cdot\text{kg}^{-1}$,平均为 $5\ 094 \text{pg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (体重),成人日摄入 TBBPA 的平均值为 $256 \text{pg}\cdot\text{kg}^{-1}$ (体重),肉类产品是人类摄入 TBBPA 的主要来源。

TBBPA 可通过皮肤接触、呼吸和进食等途径进入生物和人体内,TBBPA 对生物体有很强的毒性效应,目前研究的重点是内分泌干扰性、神经毒性和生殖发育毒性等。研究表明,TBBPA 在中国仓鼠卵巢细胞和蝌蚪变态过程中表现出抗甲状腺激素活

性^[4]。神经行为学研究表明,TBBPA 急性暴露 3 h 会增加小鼠的运动行为,0.1 mg·kg⁻¹ 和 5 mg·kg⁻¹ 剂量的处理组中小鼠相比对照组有更强的恐惧行为表现^[5]。研究表明,当 TBBPA 浓度<1.5 μmol·L⁻¹ 时,会使斑马鱼早熟,产卵率、孵化率和仔鱼成活率下降^[6]。但是 TBBPA 对人体肝脏毒性的研究尚且不足,对 TBBPA 的人体肝毒性报道相当有限,未对其凋亡机制进行具体研究。另外,肝脏是人体主要的代谢和解毒器官,可以促进多种酶的合成进而对进入体内的外源毒性物质进行清除。探究 TBBPA 的肝毒性对于评价其对人体健康的毒性效应具有十分重要的意义。

在本研究中,用 L02 细胞作为受体模型来研究 TBBPA 的肝细胞毒性,并探讨细胞内活性氧(ROS)含量变化、细胞 DNA 损伤和细胞凋亡的变化,阐明 TBBPA 对 L02 细胞的细胞毒性作用及相关机制。进一步拓宽了 TBBPA 毒性研究的领域,并为相关的环境管理提供毒理学参考。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 L02 细胞来源

人体肝细胞 HL-7702(L02)细胞系购自中国科学院的细胞库类型培养物保藏中心(上海,中国)。

1.2 L02 细胞实验预处理

取对数期细胞,培养瓶中贴壁细胞密度达到 70%~80%,用磷酸缓冲溶液(PBS)洗涤细胞 2 次,消化后加入 DMEM 培养基制成细胞悬液,依次接种于灭菌后的 6 孔板中,每孔加入 2 mL,在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养 15 h。弃上清液,用 PBS 洗涤细胞 2 次,加入含有 5、10、20 和 40 μmol·L⁻¹ TBBPA 的培养基用于胁迫实验,溶剂对照组为含 0.1% 二甲基亚砜(DMSO)的完全培养基,每组浓度设 3 个平行。在 37 °C、5% CO₂ 下孵育 48 h 后,用移液枪吸出培养基,用 PBS 缓慢洗涤细胞 2 次。

1.3 L02 细胞形态变化

细胞预处理同 1.2 部分,立即在倒置显微镜 (IX71-F22RC, OLYMPUS, 日本)(200×)下观察,并拍照。

1.4 L02 细胞活力检测

胁迫细胞预处理同 1.2 部分,加入 2.5、5、10、20、40、80、100 和 200 μmol·L⁻¹ 的 TBBPA 进行胁迫实验,在 37 °C、5% CO₂ 的条件下继续培养 24、48 和 72 h。每孔加入 20 μL MTT 液(5 g·L⁻¹),继续孵

化 4 h。弃去上清液,向每个孔里加入 170 μL DM-SO,在 37 °C 振荡 15 min,用酶标仪 (Elx808, BIOTEK, 美国)检测每个孔在 490 nm 处吸光度值 (OD),并按式(1)计算细胞相对活力。

$$RAC = \frac{(OD_{\text{浓度}} - OD_{\text{调零}})}{(OD_{\text{对照}} - OD_{\text{调零}})} \times 100\% \quad (1)$$
式中:RAC 为细胞相对活力(%);OD_{浓度} 为实验组吸光度值;OD_{调零} 为调零组吸光度值;OD_{对照} 为对照组吸光度值。

1.5 L02 细胞内氧化应激指标的测定

细胞收集和处理参照 1.2 部分。在 37 °C、5% CO₂ 下孵育 12 h 后,对细胞进行消化并收集在离心管中,1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液。收集细胞并悬浮在用无血清培养液稀释的 DCFH-DA 中,在 37 °C 细胞培养箱内孵育 15 min,探针和细胞充分接触。使用流式细胞仪检测 ROS,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm。使用脂质过氧化测定试剂盒测量丙二醛(MDA)含量。将细胞收集在离心管中,离心后,弃去上清液并提取 MDA。将样品在离心管中混合,在水浴中保温 30 min 后,进行冰浴和离心以测量 532 nm 和 600 nm 的吸光度;收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次。分光光度计将波长调节至 412 nm,测量在 412 nm 处 30 s 和 150 s 的吸光度 (A1 和 A2),并制成标准曲线。最后,将样品的吸光度引入标准曲线公式,计算每 0.1 g 细胞样品中还原型谷胱甘肽(GSH)或氧化型谷胱甘肽(GSSG)的含量。

1.6 L02 细胞内 DNA 损伤的测定

细胞收集和处理参照 1.2 部分。将细胞消化并在离心管中收集,1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,弃去上清液,PBS 洗涤细胞 2 次。铺片、细胞进行裂解、漂洗,将载玻片置于冷却至 4 °C 的碱性电泳液,解旋后电泳、加 PI、盖玻片,荧光显微镜 (Eclipse 80i, NIKON, 日本)下观察、拍照(激发波长 530 nm,观察波长>630 nm)。用 CASP 图像分析软件分析彗星图像,本实验采用尾部 DNA 百分含量(Tail DNA%)作为定量衡量彗星拖尾程度的指标。

1.7 L02 细胞凋亡分析

细胞收集和处理参照 1.2 部分。将细胞消化并在离心管中收集,1 200 r·min⁻¹ 离心 5 min,消化细胞收集在离心管中,离心后弃去上清液;加入预冷 PBS,重悬细胞,再次离心弃上清;分别加入 5 μL 的 FITC-Annexin V 及 PI 染液,室温下避光染色 5~10 min,在 1 h 内用流式细胞仪进行检测,结果使用 FACSDiva 4.1 软件分析。

1.8 数据统计与分析

本实验所有数据的表达均采用平均值±标准误差的形式,数据统计分析采用的处理软件是SPSS18.0(SPSS, Chicago, IL, USA),统计分析方法是方差分析(analysis of variance, ANOVA)。绘图采用Origin 8.0 软件(OriginLab, Northampton, MA, USA)。显著性水平达 $P<0.05$ 和 $P<0.01$ 为差异显著。

2 结果(Results)

2.1 TBBPA 对细胞形态影响

TBBPA 处理 L02 细胞 48 h 后其形态变化如图 1 所示。由图 1 可知,正常 L02 细胞数量多,边界清楚,细胞折光率良好,L02 细胞形态具有良好梭形,并且边缘清晰、肝细胞明亮。TBBPA 处理 48 h 后,与对照组相比,5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组中 L02 细胞未显示显著形态学的变化。随着 TBBPA 浓度的增加,L02 细胞的数目慢慢减少,死亡细胞数量增多,细胞形态改变,并且大部分细胞倾向于变扁、变小和变圆。当浓度达到 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,L02 细胞数量显著减少,细胞体积变小,部分细胞出现边缘模糊,甚至消失;在 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 剂量组暴露 48 h 后,细胞形态变圆,并且贴壁细胞形态趋于扁平,贴壁细胞减少,与周围的细胞脱离。细胞数量也达到最低。这表明,TBBPA 对 L02 肝细胞具有毒性。

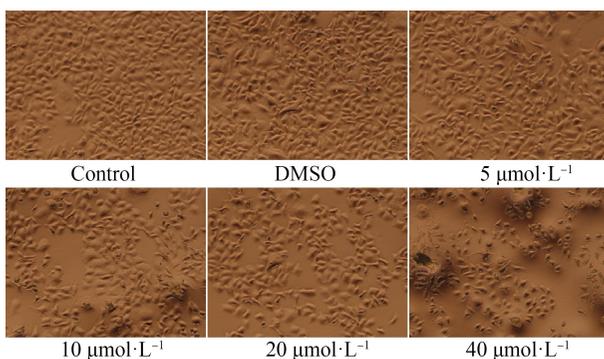


图 1 L02 细胞形态变化

注:DMSO 表示二甲亚砜溶剂组。

Fig. 1 Morphological changes of L02 cells

Note: DMSO means dimethyl sulfoxide solvent control.

2.2 TBBPA 对细胞活力的影响

为了研究 TBBPA 对 L02 细胞活力的影响,用不同剂量的 TBBPA 处理 L02 细胞 24、48 和 72 h 后,MTT 法测定细胞存活率。如图 2 所示,随着 TBBPA 剂量和胁迫时间的增加,L02 细胞活力降低

的程度不同。TBBPA 浓度为 5、10、20、40、80、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,48 h 暴露使细胞活力呈浓度依赖方式显著降低($P<0.05$)。浓度为 2.5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时未发现显著的细胞死亡。当细胞暴露于 5、10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 48 h 后,观察到明显的细胞死亡(图 2)。TBBPA 将细胞活力分别降低至 $82.2\% \pm 1.05\%$ 、 $80.7\% \pm 0.63\%$ 、 $72.3\% \pm 0.89\%$ 和 $57.5\% \pm 0.79\%$ 。结果表明,TBBPA 能够显著降低 L02 细胞活性。

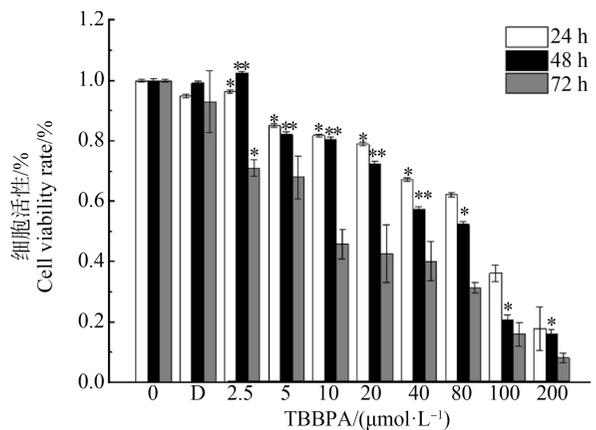


图 2 2.5 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 四溴双酚 A (TBBPA) 暴露 24、48 和 72 h 后对 L02 细胞增殖的影响

注:数据表示为平均值±标准误差, $n=6$; D 表示 DMSO 溶剂对照组; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 DMSO 对照组相比。

Fig. 2 Effects of 2.5 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ tetrabromobisphenol A (TBBPA) on the proliferation of the L02 cell after 24, 48 and 72 h exposure

Note: All data were expressed as mean±S.E.M, $n=6$; D represents DMSO solvent control; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DMSO control.

2.3 TBBPA 对细胞内氧化应激的影响

在本实验中,通过荧光探针 DCFH-DA 检测 L02 细胞内的 ROS 水平,结果如图 3 所示,图 3 中流式图的横轴表示 DCF 的荧光强度,反映细胞内 ROS 浓度,纵轴表示对应细胞的数量。用 TBBPA 处理 L02 细胞 12 h 引起胞内 ROS 浓度呈剂量依赖性增加。如图 4 所示,5、10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 处理组的胞内 ROS 浓度与 DMSO 对照组细胞相比,分别增加至 DMSO 对照组的 1.26 倍、1.63 倍、2.51 倍和 3.07 倍。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组中 ROS 含量与 DMSO 对照组之间没有显著性差异。20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组中 ROS 含量与 DMSO 对照组比较差异性显著($P<0.05$)。随着 TBBPA 剂量的增加,ROS 的产量增加。高剂量的

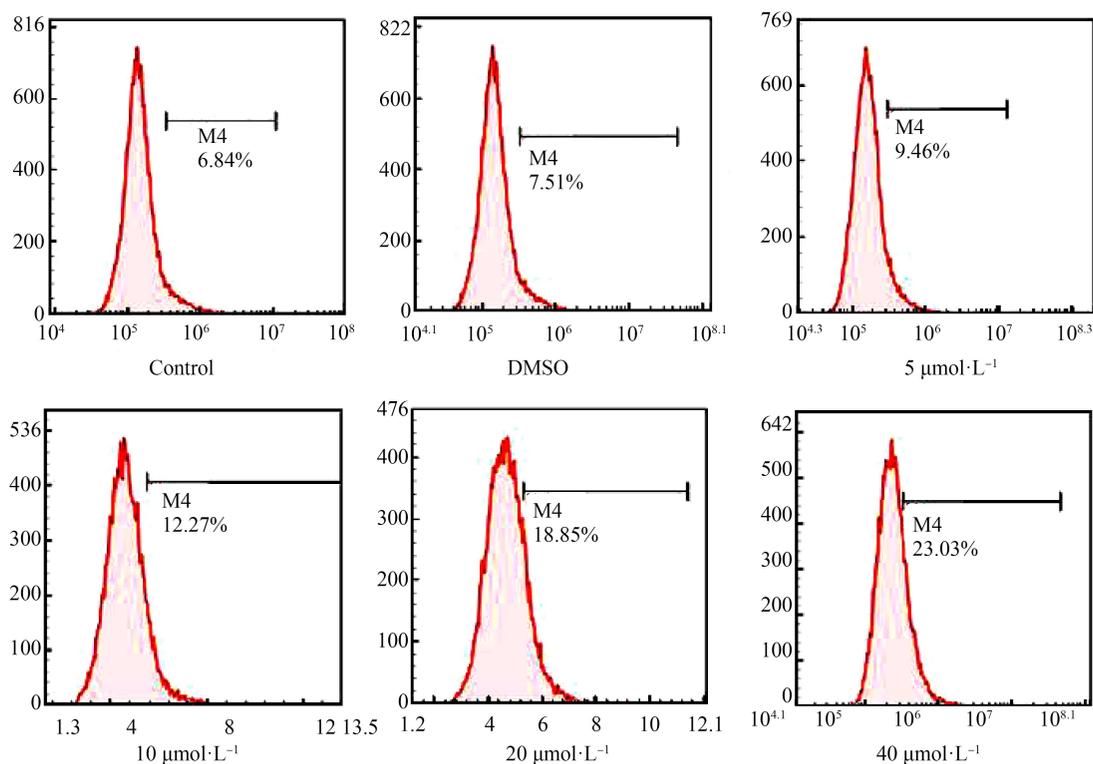


图 3 流式细胞术分析 L02 细胞活性氧 (ROS) 水平

Fig. 3 Analysis of reactive oxygen species (ROS) levels in L02 cells by flow cytometry

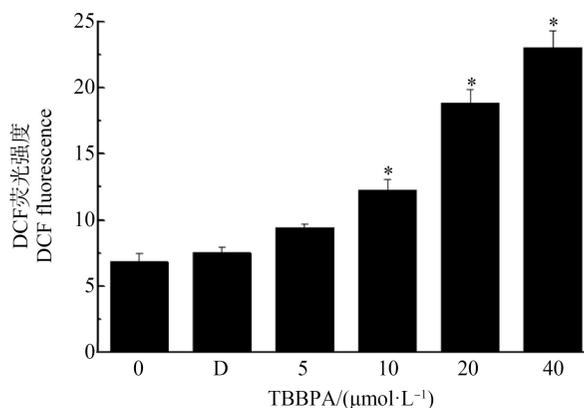


图 4 TBBPA 对 L02 细胞内的 ROS 水平的影响

注:数据表示为平均值±标准误差, $n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 DMSO 对照组相比。

Fig. 4 Effects of TBBPA on cellular ROS level in L02 cells

Note: All data were expressed as mean±S.E.M, $n=6$;

* $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DMSO control.

TBBPA 可刺激 L02 细胞中产生大量的 ROS,并使细胞中发生氧化应激。

如表 1 所示, TBBPA 导致 MDA 含量显著增加。与 DMSO 对照组相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组的 MDA 含量增加至对照的约 2.6 倍

和 3.3 倍($P<0.05$)。实验结果表明, TBBPA 可增加 L02 细胞内 MDA 含量, 导致细胞处于氧化应激状态。如表 1 所示, TBBPA 引起胞内抗氧化物质 GSH 含量降低。与 DMSO 对照组相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组的 GSH 含量降低至 DMSO 对照组的 0.38% 和 0.29% ($P<0.05$)。这表明, TBBPA 可导致 L02 细胞内 GSH 含量降低; TBBPA 导致 GSSG 水平显著升高。与 DMSO 对照组相比, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 暴露组的 GSSG 含量升高为 DMSO 对照组的 1.89 倍和 2.18 倍($P<0.05$)。这表明, TBBPA 可导致 L02 细胞中抗氧化能力降低。

2.4 TBBPA 对 DNA 损伤的影响

DNA 主要存在于细胞核的染色质中, 作为基因的载体, 是贮存全部遗传信息的分子^[17]。选取了彗星头部和尾部 DNA 分布的相对含量作为参考指标来评价分析 DNA 损伤程度, 经 5、10、20 和 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 处理后, 彗星头部 DNA 分布的相对含量分别为 91.8% ± 0.25%、89.7% ± 0.43%、82.6% ± 1.09% 和 69.4% ± 3.37% (图 5 和图 6)。尾部 DNA 分布的相对含量分别为 8.2% ± 0.25%、10.3% ± 0.43%、

17.4%±1.09%和30.6%±3.37%(图5和图6)。随着TBBPA浓度的增加,彗星头部DNA含量明显降低,尾部DNA含量增加。40 μmol·L⁻¹ TBBPA处理组细胞尾部DNA的相对量是DMSO对照组的6.5倍。这表明,随着TBBPA浓度的增加,拖尾现象愈加明显,DNA损伤程度逐渐增强。

2.5 TBBPA对细胞凋亡的影响

流式细胞术通过Annexin V/PI染色考察了TBBPA对L02细胞凋亡的影响。图7中流式图横轴表示膜联蛋白V(Annexin V)的绿色荧光强度,纵轴表示PI的红色荧光强度。Annexin V阳性且PI阴性表示是早期凋亡细胞,Annexin V阳性且PI阳性表示是晚期凋亡细胞。流式检测结果显示,TBBPA可以浓度依赖性地诱导L02细胞凋亡($P<0.05$) (图8),L02细胞分别经5、10、20和40 μmol·L⁻¹ TBBPA处理48 h后细胞凋亡率分别为12.63%、15.11%、30.69%和42.88%。在处理组、空白对照组和DMSO对照组之间观察到统计学显著性($P<0.05$)。如图8所示,细胞凋亡率随着TBBPA浓度的增加而增加,与DMSO对照组相比,20 μmol·L⁻¹和40 μmol·L⁻¹ TBBPA处理组细胞凋亡率分别增加了3.2倍和4.8倍,诱导L02细胞的凋亡的效果明显。

3 讨论(Discussion)

肝脏是人体主要的代谢和解毒器官,可以促进多种酶的合成,对进入体内的外源毒性物质进行清除。环境中的TBBPA可通过多种途径进入人体后,在肝脏中积累,增加肝脏的代谢负担并对人体肝脏造成损伤。本研究的结果显示,TBBPA抑制L02细胞增殖,与对照组比较,随着TBBPA浓度的增加,L02细胞数量明显减少,死亡细胞数量增多。细胞形态改变,细胞体积变小,突触变短,甚至消失;贴壁细胞减少,与周围的细胞脱离。MTT实验结果显

示,TBBPA能不同程度地降低L02细胞的活性,对L02细胞有致毒性,TBBPA可以浓度依赖性地诱导L02细胞凋亡。Tada等^[18]的研究表明,TBBPA处理组小鼠的肝细胞凋亡率明显高于对照组。Nakagawa等^[19]研究了TBBPA对原代大鼠肝细胞毒性,发现TBBPA可以诱导细胞凋亡进而造成肝功能损伤。

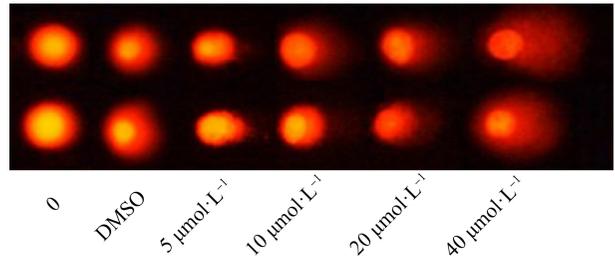


图5 彗星实验的荧光照片(200×)

Fig. 5 Photographs of Comet assay by fluorescence microscopy (200×)

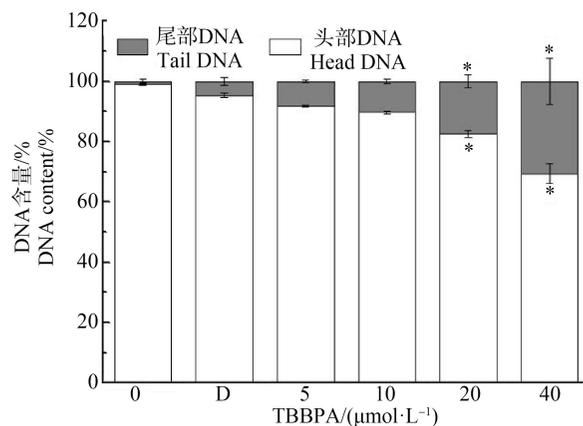


图6 细胞头部和尾部DNA相对含量

注:数据表示为平均值±标准误差, $n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$,与DMSO对照组相比。

Fig. 6 Relative content of DNA in the head and tail of cells

Note: All data were expressed as mean±S.E.M, $n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DMSO control.

表1 L02细胞内丙二醛(MDA)、还原型谷胱甘肽(GSH)和氧化型谷胱甘肽(GSSH)的含量

Table 1 Contents of malondialdehyde (MDA), reduced glutathione (GSH) and oxidized glutathione (GSSH) in L02 cells

	DMSO(0.1%)	5 μmol·L ⁻¹ TBBPA	10 μmol·L ⁻¹ TBBPA	20 μmol·L ⁻¹ TBBPA	40 μmol·L ⁻¹ TBBPA
MDA/(nmol·mg ⁻¹)	1.032±0.071	1.403±0.079	1.972±0.254	2.619±0.275*	3.298±0.726*
GSH/(μg·mL ⁻¹)	221.13±8.9	189.99±10.2	127.18±11.6	84.91±16.2*	63.65±9.6*
GSSG/(μg·mL ⁻¹)	150.98±6.6	188.71±13.4	237.21±13.8	285.71±12.3*	328.82±17.6*

注:数据表示为平均值±标准误差;* $P<0.05$,** $P<0.01$,与DMSO对照组相比。

Note: All data were expressed as mean±S.E.M; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DMSO control.

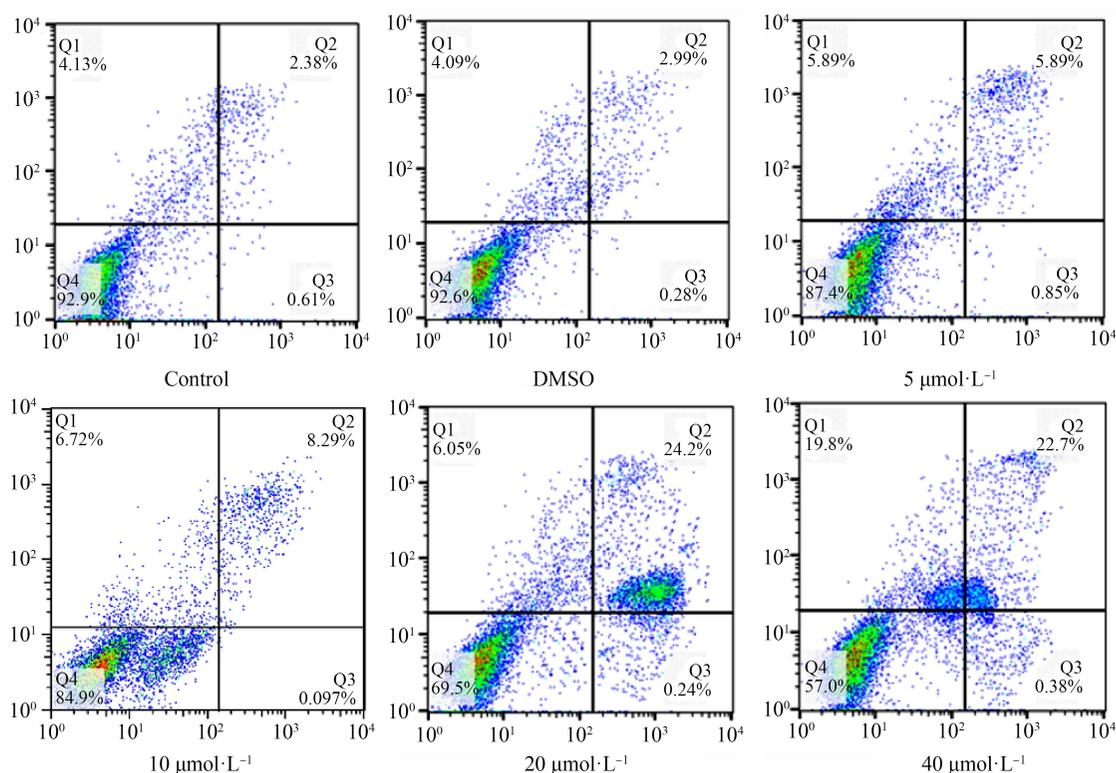


图 7 流式细胞术检测细胞凋亡

Fig. 7 Representative graphs of cell apoptosis obtained from flow cytometry analysis

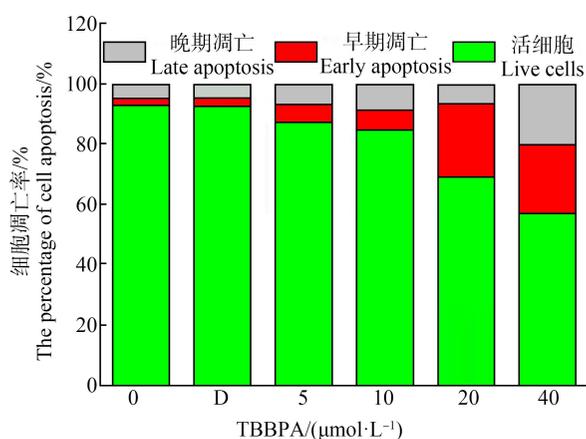


图 8 TBBPA 对 L02 细胞凋亡率的影响

注:数据表示为平均值 \pm 标准误差, $n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, 与 DMSO 对照组相比。

Fig. 8 Effect of TBBPA on the apoptosis rate of L02 cells

Note: All data were expressed as mean \pm S.E.M, $n=6$; * $P<0.05$, ** $P<0.01$, compared with DMSO control.

TBBPA 暴露可诱导大鼠小脑颗粒细胞^[20]和 大鼠胰腺腺细胞凋亡^[21]。Grasselli 等^[22]发现 TBBPA 会影响田鼠肝癌细胞的基因表达异常和细胞凋亡; Wikoff 和 Birnbaum^[23]认为是 TBBPA 通过诱导细胞内产生

氧化应激造成细胞凋亡对肝脏产生毒性作用, 研究氧化应激机制对于研究的细胞凋亡调控具有非常重要的理论意义。向明灯等^[24]结果显示, 随着 TBBPA 处理浓度增加, HepG2 细胞存活率下降, 凋亡率增加。以上结果均说明 TBBPA 对肝细胞有毒性效应。

肝细胞代谢时会产生 ROS^[25]。在正常的生理条件下, 细胞内产生和消除的 ROS 处于平衡状态, 以维持细胞的氧化还原稳定。当细胞受到外界环境刺激时 ROS 会过量产生, 引起细胞内 ROS 的积累^[26]。脂质过氧化反应是细胞内氧化损伤的一个重要指标, MDA 是脂质过氧化反应的代谢产物, 其含量可以间接反映细胞内氧化损伤的程度, 如果细胞内 MDA 含量增加, 则表明细胞 ROS 过多而造成氧化攻击^[27]。TBBPA 可以引起 L02 细胞中 MDA 含量增加, 细胞处于氧化应激状态。当细胞处于氧化应激状态时, 细胞内氧化还原状态不平衡, 细胞自发产生抗氧化酶以维持氧化还原平衡。GSH 是体内的重要的抗氧化剂, 负责去除多余的 ROS。GSSG 为 GSH 的氧化形式, 在氧化剂作用下 GSH 通过谷胱甘肽过氧化物酶被氧化成 GSSG, 调节细胞内氧化还原平衡状态^[28]。GSSG/GSH 是体内主要的内源

性氧化还原调节剂。细胞内 GSH 水平与细胞凋亡密切相关,过度消耗 GSH 可引发细胞凋亡^[29]。在正常生理条件下,GSSG/GSH 的比例保持在一定水平,而在氧化应激下,GSH 被氧化成 GSSG,导致 GSSG/GSH 比率上升。因此,GSSG/GSH 可用于评估细胞内氧化应激水平。本研究结果显示,随着 TBBPA 浓度的增加,GSSG/GSH 比率也显著增加。这表明,细胞内氧化还原稳态偏移至氧化态。

细胞内 ROS 大量积累而使细胞处于氧化应激状态,对细胞中的 DNA 分子造成不同程度的氧化损伤,诱导肝细胞凋亡,对肝脏造成损伤^[30]。据相关文献报道,细胞内源性产生和清除的 ROS 之间的不平衡导致 ROS 持续升高,可直接或间接造成 DNA 损伤,导致基因突变,激活细胞敏感信号通路^[31]。Zhao 等^[32]的研究表明,阻燃剂暴露诱导细胞过量产生 ROS,引起氧化应激和炎症反应,进而诱导细胞损伤。在本研究中,笔者发现 $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 处理组的胞内 ROS 含量显著增加,MDA 和 GSSG/GSH 明显高于对照组和低剂量组,说明细胞处于氧化应激状态, $40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TBBPA 处理后细胞尾部 DNA 相对含量增加至 DMSO 对照的 6.5 倍,细胞凋亡率比 DMSO 对照组增加了 4.8 倍。DNA 损伤程度和 L02 细胞凋亡水平比对照组都有显著增强,这些结果表明氧化应激对 DNA 损伤和细胞凋亡有重要作用。

通讯作者简介:刘勇弟(1963—),男,博士,教授,主要研究方向为水污染控制理论研究与技术开发。

参考文献(References):

- [1] Covaci A, Voorspoels S, Abdallah M A, et al. Analytical and environmental aspects of the flame retardant tetrabromobisphenol-A and its derivatives [J]. *Journal of Chromatography A*, 2009, 1216(3): 346-363
- [2] Yu C H, Hu B. Novel combined stir bar sorptive extraction coupled with ultrasonic assisted extraction for the determination of brominated flame retardants in environmental samples using high performance liquid chromatography [J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1160(1-2): 71-80
- [3] 彭浩, 金军, 王英, 等. 液相色谱-电喷雾离子阱质谱分析土壤中四溴双酚-A[J]. *分析化学*, 2007, 35(4): 549-551
- [4] Peng H, Jin J, Wang Y, et al. Determination of tetrabromobisphenol-A in soil by high performance liquid chromatography-electrospray ion trap mass spectrometry [J]. *Chinese Journal of Analytical Chemistry*, 2007, 35(4): 549-551 (in Chinese)
- [5] Öberg K, Warman K, Öberg T. Distribution and levels of brominated flame retardants in sewage sludge [J]. *Chemosphere*, 2002, 48(8): 805-809
- [6] Liu K, Li J, Yan S J, et al. A review of status of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in China [J]. *Chemosphere*, 2016, 148: 8-20
- [7] Watanabe I, Kashimoto T, Tatsukawa R. Identification of the flame retardant tetrabromobisphenol-A in the river sediment and the mussel collected in Osaka [J]. *Bulletin of Environmental Contamination and Toxicology*, 1983, 31(1): 48-52
- [8] Chu S G, Haffner G D, Letcher R J. Simultaneous determination of tetrabromobisphenol A, tetrachlorobisphenol A, bisphenol A and other halogenated analogues in sediment and sludge by high performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry [J]. *Journal of Chromatography A*, 2005, 1097(1-2): 25-32
- [9] Saint-Louis R, Pelletier E. LC-ESI-MS-MS method for the analysis of tetrabromobisphenol A in sediment and sewage sludge [J]. *The Analyst*, 2004, 129(8): 724-730
- [10] Zhang X L, Luo X J, Chen S J, et al. Spatial distribution and vertical profile of polybrominated diphenyl ethers, tetrabromobisphenol A, and decabromodiphenylethane in river sediment from an industrialized region of South China [J]. *Environmental Pollution*, 2009, 157(6): 1917-1923
- [11] Takigami H, Suzuki G, Hirai Y, et al. Brominated flame retardants and other polyhalogenated compounds in indoor air and dust from two houses in Japan [J]. *Chemosphere*, 2009, 76(2): 270-277
- [12] Herzke D, Berger U, Kallenborn R, et al. Brominated flame retardants and other organobromines in Norwegian predatory bird eggs [J]. *Chemosphere*, 2005, 61(3): 441-449
- [13] Law R J, Bersuder P, Barry J, et al. A significant downturn in levels of hexabromocyclododecane in the blubber of harbor porpoises (*Phocoena phocoena*) stranded or by-caught in the UK: An update to 2006 [J]. *Environmental Science & Technology*, 2008, 42(24): 9104-9109
- [14] Shi Z X, Wu Y N, Li J G, et al. Dietary exposure assessment of Chinese adults and nursing infants to tetrabromobisphenol-A and hexabromocyclododecanes: Occurrence measurements in foods and human milk [J]. *Environmental Science & Technology*, 2009, 43(12): 4314-4319
- [15] Kitamura S, Kato T, Iida M, et al. Anti-thyroid hormonal activity of tetrabromobisphenol A, a flame retardant, and

- related compounds: Affinity to the mammalian thyroid hormone receptor, and effect on tadpole metamorphosis [J]. *Life Sciences*, 2005, 76(14): 1589-1601
- [15] Lilienthal H, Verwer C M, van der Ven L T, et al. Exposure to tetrabromobisphenol A (TBBPA) in Wistar rats: Neurobehavioral effects in offspring from a one-generation reproduction study [J]. *Toxicology*, 2008, 246(1): 45-54
- [16] Kuiper R V, Brandhof E J, Leonards P E G, et al. Toxicity of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in zebrafish (*Danio rerio*) in a partial life-cycle test [J]. *Archives of Toxicology*, 2007, 81(1): 1-9
- [17] 姚志刚, 赵凤娟. 遗传学[M]. 2版. 北京: 化学工业出版社, 2015: 182-186
- [18] Tada Y, Fujitani T, Ogata A, et al. Flame retardant tetrabromobisphenol A induced hepatic changes in ICR male mice [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2007, 23(2): 174-178
- [19] Nakagawa Y, Suzuki T, Ishii H, et al. Biotransformation and cytotoxicity of a brominated flame retardant, tetrabromobisphenol A, and its analogues in rat hepatocytes [J]. *Xenobiotica*, 2007, 37(7): 693-708
- [20] Lenart J, Zieminska E, Diamandakis D, et al. Altered expression of genes involved in programmed cell death in primary cultured rat cerebellar granule cells acutely challenged with tetrabromobisphenol A [J]. *Neurotoxicology*, 2017, 63: 126-136
- [21] Suh K S, Choi E M, Rhee S Y, et al. Tetrabromobisphenol A induces cellular damages in pancreatic β -cells *in vitro* [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2017, 52(7): 624-631
- [22] Grasselli E, Cortese K, Fabbri R, et al. Thyromimetic actions of tetrabromobisphenol A (TBBPA) in steatotic FaO rat hepatoma cells [J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 511-518
- [23] Wikoff D S, Birnbaum L. Human Health Effects of Brominated Flame Retardants [M]// *Handbook of Environmental Chemistry*. Springer, 2011: 19-53
- [24] 向明灯, 李良忠, 玉琳, 等. 四溴双酚A对HepG2细胞线粒体膜电位及凋亡的影响[J]. *环境卫生学杂志*, 2015, 5(1): 6-9,13
- Xiang M D, Li L Z, Yu L, et al. Effect of tetrabromobisphenol A on mitochondrial membrane potential and apoptosis of HepG2 cells [J]. *Journal of Environmental Hygiene*, 2015, 5(1): 6-9,13 (in Chinese)
- [25] 张蔓, 郑敏, 吴智君, 等. 二甲基甲酰胺对大鼠肝脏抗氧化能力及PPAR mRNA的影响[J]. *卫生研究*, 2018, 47(3): 352-357
- Zhang M, Zheng M, Wu Z J, et al. Effects of N, N-dimethylformamide on hepatic antioxidant capacity and liver PPARs mRNA levels in rats [J]. *Journal of Hygiene Research*, 2018, 47(3): 352-357 (in Chinese)
- [26] Chen H M, Tang X X, Zhou B, et al. Mechanism of Deca-BDE-induced apoptosis in Neuro-2a cells: Role of death-receptor pathway and reactive oxygen species-mediated mitochondrial pathway [J]. *Journal of Environmental Sciences*, 2016, 46: 241-251
- [27] Chang C Y, Shen C Y, Kang C K, et al. Taurine protects HK-2 cells from oxidized LDL-induced cytotoxicity via the ROS-mediated mitochondrial and p53-related apoptotic pathways [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2014, 279(3): 351-363
- [28] Pearson G A, MacKenzie I Z. Factors that influence the incision-delivery interval at caesarean section and the impact on the neonate: A prospective cohort study [J]. *European Journal of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Biology*, 2013, 169(2): 197-201
- [29] Rodríguez-González J, Wilkins-Rodríguez A A, Gutiérrez-Kobeh L. Role of glutathione, ROS, and Bcl-xL in the inhibition of apoptosis of monocyte-derived dendritic cells by *Leishmania mexicana* promastigotes [J]. *Parasitology Research*, 2018, 117(4): 1225-1235
- [30] Circu M L, Aw T Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis [J]. *Free Radical Biology & Medicine*, 2010, 48(6): 749-762
- [31] Evans J L, Goldfine I D, Maddux B A, et al. Are oxidative stress-activated signaling pathways mediators of insulin resistance and beta-cell dysfunction? [J]. *Diabetes*, 2003, 52(1): 1-8
- [32] Zhao F, Wang J, Fang Y J, et al. Effects of tris(1,3-dichloro-2-propyl)phosphate on pathomorphology and gene/protein expression related to thyroid disruption in rats [J]. *Toxicology Research*, 2016, 5(3): 921-930