科学通报 2020 年 第 65 卷 第 10 期: 931 ~ 939
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

四溴双酚A对人体呼吸系统细胞16HBE和Beas2B的接触暴露毒性机制

宁美霖, 胡俊杰, 卢莉蓉, 蔡仪威, 李桂英, 安太成*

广东工业大学环境健康与污染控制研究院, 环境科学与工程学院, 广东省环境催化与健康风险控制重点实验室, 广州 510006
* 联系人, E-mail: antc99@gdut.edu.cn

2019-11-20 收稿, 2019-12-25 修回, 2020-01-07 接受, 2020-01-08 网络版发表
国家自然科学基金(41877363, 41731279)、国家杰出青年科学基金(41425015)和广东省珠江人才计划本土创新团队项目(2017BT01Z032)资助

摘要 四溴双酚A(TBBPA)是一种应用量非常大的化学品, 广泛用在印刷电路板以及其他聚合材料的阻燃剂中. 作为一种环境污染物, 其普遍存在于各种非生物和生物介质中. 本研究采用人体支气管细胞Beas2B和肺上皮细胞16HBE作为研究对象, 开展了TBBPA的接触暴露毒性研究. 结果显示, 随着TBBPA的暴露浓度从 0 μmol/L增加至50 μmol/L, 两种细胞的存活率均逐渐下降, 细胞通透性不断提高. 此外, 流式分析也表明了细胞在暴露后出现了部分凋亡, 且随着浓度的提高, 凋亡率也随之提高. 进一步通过基因表达测定分析发现, 与细胞凋亡相关基因*p53*, *Survivin*, *bax*, *bcl-2*, *Caspase-3*, *Caspase-9*的表达量均出现不同程度的上调, 其中24 h的暴露相较于12 h会激发更为强烈的表达上调. 此外, 对暴露过程中细胞胞内活性氧(ROSs)组分、抗氧化性酶SOD和CAT活力活性进行了测定. 两种细胞内的ROSs组分和抗氧化性酶均出现明显的提高, 表明细胞在TBBPA暴露过程中收到了一定的氧化损伤并出现了氧化应激.

关键词 四溴双酚A, 细胞毒性, 细胞凋亡, 氧化应激, 基因表达上调

四溴双酚A(TBBPA)是目前使用最为广泛的溴代阻燃剂(BFR), 占BRF总使用量约60%. TBBPA可以通过多种途径进入环境中, 包括在消费品中的释放、含有TBBPA废物的回收过程中的释放、电子产品制造过程中的排放等[1]. 目前, TBBPA在各种环境体系和生物体内均被大量地检测到[2,3]. 据报道在日本5个工业废物站的垃圾渗滤液中TBBPA浓度为0.3~540 ng/L[4]. 在瑞典一家塑料厂上游沉积物和下游沉积物中均能检测到TBBPA存在, 浓度分别为34和270 ng/g, 同时工厂的废水处理站沉积物中也能检测到TBBPA[5]. 此外, Abdallah等人[6]首次报道了Birmingham汽车空气和公众微环境空气中TBBPA的浓度, 平均值分别为6和220 ng/g. Zhou等人[7]也报道了中国东部典型PCB制造车间的粉尘中TBBPA平均含量为2660 ng/g dw(干重). 此外, 很多水体中均可以检测出大量TBBPA的存在[8]. 除了环境体系中TBBPA的大量检出, 目前已有报道, 在生物体如斑马鱼[9,10]和人体样品(如头发), 均检测到了TBBPA的存在[11,12]. 它主要可能是通过皮肤接触、呼吸暴露和饮食摄入等途径进入人体, 其中呼吸暴露可能是某些特殊暴露人群比较重要的暴露途径.

已有研究表明, TBBPA具有内分泌、肝、肾脏等毒性. 例如TBBPA可以导致子代小鼠肝细胞坏死以及对肝脏炎症细胞浸润产生影响, 并导致肾小管扩张或收缩增加以及肾囊肿[13]. TBBPA的卤代酚结构具有破坏氧化磷酸化的性质, 从而引起体外肝细胞细胞膜的功能性障碍并且抑制细胞色素P450 2C9(CYP450 2C9)

引用格式: 宁美霖, 胡俊杰, 卢莉蓉, 等. 四溴双酚A对人体呼吸系统细胞16HBE和Beas2B的接触暴露毒性机制. 科学通报, 2020, 65: 931–939
Ning M L, Hu J J, Lu L R, et al. Toxicity mechanism of tetrabromobisphenol A to human respiratory system cells 16HBE and Beas2B (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 931–939, doi: 10.1360/TB-2019-0764

© 2020《中国科学》杂志社

的活性[14]. Jason等人[15]对新生大鼠每天经口染毒0, 40, 200和600 mg/kg剂量的TBBPA, 连续处理18 d后, 对不同剂量处理的一半大鼠做解剖和病理研究, 剩余一半大鼠停止染毒并继续饲养80 d以检查大鼠恢复情况或延迟毒性. 结果表明, 每天200和600 mg/kg剂量染毒18 d的大鼠出现了肾囊性病变, 600 mg/kg剂量组出现了死亡个体; 继续饲养80 d后, 200和600 mg/kg剂量组的大鼠肾脏囊性病变未得到恢复, 但也未观察到其他延迟毒性. 此外, Murphy等人[16]运用放射性同位素标记法, 研究了TBBPA与人甲状腺运载蛋白(TTR)在体外的结合情况. TBBPA与TTR的结合能力为甲状腺素(T4)的10.6倍, 这表明TBBPA可能对生物体的甲状腺系统产生干扰效应. 也有研究人员还发现TBBPA可能具有一定的神经毒性[17]. 同时大量研究也揭示了TBBPA对于人类和野生动物具有明显的生物毒性, 也被国际癌症研究机构列为"人类可能致癌"组2A类污染物[18]. 然而, 目前关于TBBPA对于呼吸系统毒性影响的研究还是比较少, 因此, TBBPA对呼吸系统细胞毒性影响的研究亟待进行.

本研究主要选取人体支气管上皮细胞16HBE和肺上皮细胞Beas2B作为研究对象, 系统开展TBBPA对于这两种人体呼吸系统细胞的暴露毒性研究. 研究分别详细讨论了TBBPA对两种人体细胞的剂量效应、细胞毒性和凋亡反应的关系, 然后通过凋亡基因表达水平和氧化应激水平的检测, 进一步探讨了TBBPA对两种人体细胞毒性的致毒机制, 从而初步阐明了典型溴代阻燃剂TBBPA在体外模型中对人体呼吸系统可能的健康危害.

1 材料与方法

(ⅰ) 试剂. TBBPA(Sigma Aldrich, 美国; 纯度>97%)溶于二甲基亚砜(DMSO, Sigma Aldrich, 美国)中, 配备实验浓度分别为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 mmol/L的原液. 根据实验要求将梯度浓度TBBPA原液加入到一定体积的细胞完全生长培养基, 使得最终暴露浓度为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 μmol/L, 其中助溶剂DMSO体积分数为1‰.

(ⅱ) 人体细胞及其培养. 人支气管上皮细胞(16HBE)和人肺上皮细胞(Beas2B)获赠于广州医科大学. 在基础培养基DMEM(Gibico, 美国)中加入10%胎牛血清(Gibico)和1%双抗(青霉素-链霉素, Gibico)以配成细胞完全生长培养基, 并于37°C, 5% CO_2恒温条件下置于二氧化碳细胞培养箱中对两种细胞进行培养. 每天更换细胞培养基. 每隔3 d使用0.05%胰酶EDTA(Gibco)进行细胞传代.

(ⅲ) 细胞活力测定. 利用Cell Titer 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (Promega, 美国)进行细胞活力的测定[19]. 接种1×10^4细胞数/孔的细胞于96孔细胞培养板中, 并加入完全生长培养基使其终体积为0.1 mL, 进行细胞培养. 待细胞铺满培养孔70%~80%以上, 弃去上清液, 加入含TBBPA的完全生长培养基, 使其最终暴露浓度为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 μmol/L, 然后暴露24 h后根据说明书对其细胞活力直接进行检测. 加入20 μL MTS试剂后在培养箱内孵育1 h, 避光, 然后用酶标仪(Thermo Varioskan Lux, 美国)测定其在490 nm波长处的吸光度OD值即可.

$$\text{细胞存活率} = \frac{\text{OD(加药)}-\text{OD(空白)}}{\text{OD(0加药)}-\text{OD(空白)}}\times 100\%. \quad (1)$$

(ⅳ) 乳酸脱氢酶测定. 利用乳酸脱氢酶(LDH)检测试剂盒(南京建成, 中国)进行细胞乳酸脱氢酶释放的测定. 具体步骤如下: 接种3×10^5细胞数/孔的细胞于6孔细胞培养板中, 并加入完全生长培养基使其终体积为3 mL, 进行细胞细胞培养. 待细胞铺满培养孔70%~80%以上, 弃去上清液, 加入含TBBPA的完全生长培养基, 使TBBPA最终暴露浓度为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 μmol/L. 细胞暴露24 h后提取每个孔细胞培养液上清液的2 mL, 1000 r/min离心15 min取上清液, 并按照试剂盒说明书立即检测. 将测试所用96孔板放到酶标仪中, 在450 nm波长下进行初始吸光度检测并记录其差异.

(ⅴ) 细胞凋亡测定. 采用Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(上海生物工程股份有限公司, 中国)进行细胞凋亡的测定. 接种1×10^5 细胞数/孔的细胞于12孔细胞培养板中, 并加入完全生长培养基使其终体积为1 mL, 然后进行细胞培养. 待细胞培养孔70%~80%以上, 弃去上清液, 加入含污染物的完全生长培养基, 使TBBPA最终暴露浓度为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 μmol/L. 细胞暴露24 h后按照试剂盒说明书收集细胞. 使用成像流式细胞仪(Merck FlowSight, 美国)在488 nm波长下双通道测定荧光染料FITC和PI的荧光强度, 从而确定凋亡细胞比例, 进一步使用IDEAS 6.2软件(Merck FlowSight, 美国)对10000个细胞进行计数和分析. 其中细胞凋亡率由早期凋亡和晚期凋亡之和来进行计算.

(ⅵ) 胞内活性氧及抗氧化性酶活力的测定. 为了研究TBBPA暴露过程中的细胞氧化应激情况, 首先测定16HBE和Beas2B细胞的胞内ROSs水平. 2′,7′-二氯荧光素二乙酸盐(DCFH-DA, 上海碧云天生物技术有限公司, 中国)作为细胞内活性氧检测探针. 接种1×10^{5}细胞数/孔的细胞于12孔细胞培养板中, 并加入完全生长培养基使其终体积为1 mL, 进行细胞培养. 待细胞铺满培养孔70%~80%以上, 弃去上清液, 加入含TBBPA的完全生长培养基, 使TBBPA最终暴露浓度为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 μmol/L. 暴露24 h后, 按照说明书加入DCFH-DA探针并收集细胞进行测试.

进一步利用过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒和超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)分别测定了细胞内CAT和SOD的活力变化情况. 接种3×10^{5}细胞数/孔的细胞于6孔细胞培养板中, 并加入完全生长培养基使其终体积为3 mL, 进行细胞细胞培养. 待细胞长到铺满瓶壁70%~80%以上, 弃去上清液, 加入TBBPA的完全生长培养基, 使其最终暴露浓度为0, 0.08, 0.4, 2, 10, 50 μmol/L. 其中, 对CAT和SOD的活性测定需要利用细胞总蛋白含量进行相对定量. 采用细胞裂解缓冲液(上海碧云天生物技术有限公司)进行总蛋白的提取, 利用Pierce^{TM} BCA蛋白检测试剂盒(Thermo scientific, 美国)进行总蛋白定量.

(ⅶ) 凋亡相关基因表达的测定. 用Trizol法(Invitrogen, 美国)提取细胞内总RNA. 用Nanodrop 2000分光光度计(Thermo Scientific Wilmington DE, 美国)测定总RNA浓度和纯度. 取500 ng RNA并使用PrimeScript^{TM} RT反转录试剂盒(Takara, 日本)于10 μL反应体系进行反转录反应.

采用实时荧光定量PCR对细胞凋亡相关基因*p53*, *Survivin*, *bax*, *bcl-2*, *Caspase-3*, *Caspase-9*的表达进行了定量测定, 以*β-Actin*作为内参基因, 特异性引物由上海生工设计. 然后使用SYBR预混液Ex Taq^{TM}(Takara, 日本)在CFX96 Touch 序列检测系统(Bio-Rad CFX96, 美国)中进行Q-PCR反应. 反应体系总量为25 μL, 由12.5 μL 2×SYBR®qPCR(TaKaRa, 日本)、每个10 μmol引物1 , 2.5 μL模板DNA(基因组DNA)和7.5 μL无菌dd H_2O组成. PCR扩增程序设置如下: 预变性1次循环, 94°C下变性3 min; 45次循环, 94°C下变性30 s; 60°C下退火30 s, 72°C合成30 s.

(ⅷ) 数据分析. 采用方差分析(ANOVA)分别确定细胞活力、细胞凋亡、细胞内ROSs水平和基因表达的变化是否有显著性差异, $P < 0.05$被认为差异显著. 所有实验重复3次, 结果用均数±标准差表示.

2 结果与讨论

2.1 TBBPA暴露诱导16HBE和Beas2B细胞活力的损伤

首先, 测定了两种人体呼吸系统细胞在受到TBBPA暴露刺激后细胞活力的衰减. 如图1所示, 在TBBPA低浓度范围(0~0.4 μmol/L)暴露24 h后对两种细胞的细胞活力没有显著影响; 但是在浓度时, >10 μmol/L开始可以初步观察到对两种细胞活力起到了抑制作用(*P <0.05, **P<0.01), 50 μmol/L时16HBE和Beas2B细胞存活率为80.9%和86.2%, 这与先前文献[20~23]报道的结果基本一致. 值得注意的是, 相比较于支气管上皮细胞16HBE, 肺上皮细胞Beas2B对TBBPA具有更强的耐受性, 这可能是因为不同的细胞结构导致耐受性的差异性. 此外, 相比较于本研究中较低的TBBPA浓度, 一些研究采用更为高浓度的TBBPA, 会造成短时间内细胞存活率的急剧下降[13,24].

一般来说, 细胞质膜的损伤程度由LDH泄露水平间接反映, 所以测量细胞的LDH泄露水平可作为细胞毒性的指标. 为了进一步了解细胞的受损情况, 对两种受试细胞的LDH水平分别进行了测定. 如图2所示, 在TBBPA浓度<10 μmol/L时, 暴露24 h后对两种细胞的LDH释放活性没有显著影响(*P <0.05), 这与上述两种细胞存活率的测定结果保持一致. 经过两次不同批次重复实验均发现, 在TBBPA暴露浓度为50 μmol/L时,

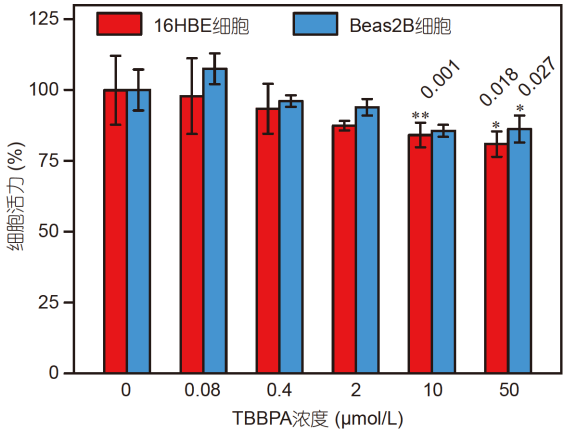


图 1 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露24 h后细胞活力
Figure 1 (Color online) Cell activity after exposure to different concentrations of TBBPA for 24 h

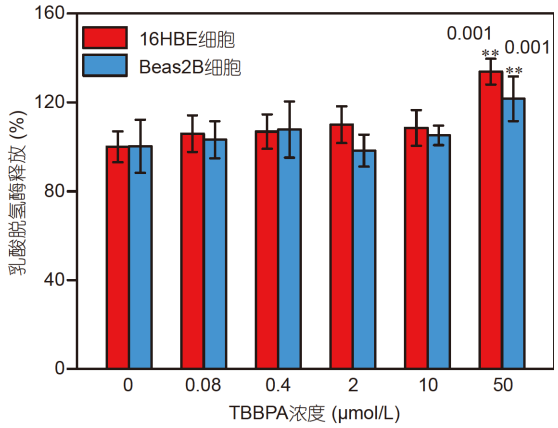


图 2 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露24 h后细胞乳酸脱氢酶释放情况

Figure 2 (Color online) The release of lactate dehydrogenase after exposure to different concentrations of TBBPA for 24 h

LDH释放比对照组升高了20%. 这表明在该浓度剂量暴露下细胞出现更多的死亡.

2.2 TBBPA暴露诱导16HBE和Beas2B两种细胞的氧化应激

细胞中ROSs的产生可能与细胞毒性、细胞凋亡和自噬有关[25~27]. ROSs是高活性粒子, 主要在线粒体内产生, 其作为细胞代谢的产物, 在生物系统中是一把双刃剑. 在生理水平上, ROSs在细胞内信号传导和调节中充当"氧化还原"的信使. 对于细胞稳态来说, 保持细胞内ROSs水平的微平衡是非常关键的, 并且细胞内ROSs不受控制的升高将通过促进内在的凋亡途径引起细胞死亡. 一般来说, 细胞内的氧化应激反应的发生是由于细胞受到一定的外来刺激, 细胞受到的氧化能力与抗氧化防御状态不平衡, 细胞中的抗氧化酶(如SOD, CAT等)的活性发生改变, 从而对细胞的保护作用减弱, 引起活性氧水平提高并对细胞造成氧化损伤作用.

首先, 我们对该体系中两种细胞内ROSs的水平进行了测定, 由图3可以看出, 两种细胞内的ROSs水平均出现迅速的上升趋势(1~20倍). 这表明细胞已经出现过氧化状态, 使得胞内的氧化还原平衡被打破, 抗氧化性酶已经无法抵御ROSs的氧化作用. 这一过程也必然会导致细胞的损伤和诱导性凋亡[28,29]. 当TBBPA的浓度提高至50 μmol/L时, 可以看到细胞胞内ROSs水平的增长有明显的减弱, 这可能是因为此计量情况下, 部分细胞已经完全失去活性并发生破裂, 导致胞内ROSs的泄露所致. 此外, 24 h的暴露体系相较于12 h的暴露, 会导致更高的ROSs水平, 这也表明更长时间的暴露会造成更为严重的细胞损伤. 另外, 通过对比两种细胞内ROSs的水平, 发现Beas2B的胞内ROSs水平相较于16HBE上升的没有那么明显. 这也可能说明Beas2B细胞的胞内过氧化水平没有16HBE高. 这与本研究前面关于细胞损伤方面的研究结果一致, 即Beas2B细胞比16HBE细胞对TBBPA具有更强的耐受性.

我们也分别对两种细胞内的SOD和CAT两种抗氧化性酶的活力进行了测定. 结果显示(图4), 在0~10 μmol/L浓度之间, 随着TBBPA浓度的上升, 两种细胞胞内的SOD酶活均出现不断的提高. 这表明细胞的氧化应激被激发了出来, 并开始挽救细胞的过氧化状态. 然而, 当浓度达到50 μmol/L时, SOD酶的活力出现急剧的下降趋势, 这可能是因为细胞破裂导致部分SOD酶的泄露所致. 总体来说, 对于SOD酶活而言具有同样的趋势, 那就是暴露24 h的两种抗氧化性酶的活力均略高于12 h的暴露水平. 与之相反的, 由图5可以看出, 两种细胞的CAT的酶活随着TBBPA暴露浓度的升高呈现缓慢

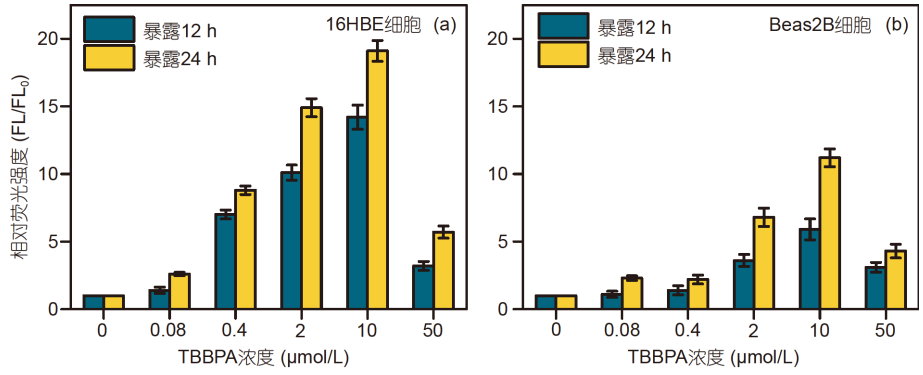


图 3 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露下16HBE(a)和Beas2B(b)细胞的胞内活性氧水平

Figure 3 (Color online) Change of intracellular ROS level in 16HBE (a) and Beas2B (b) cells exposed to different concentrations of TBBPA

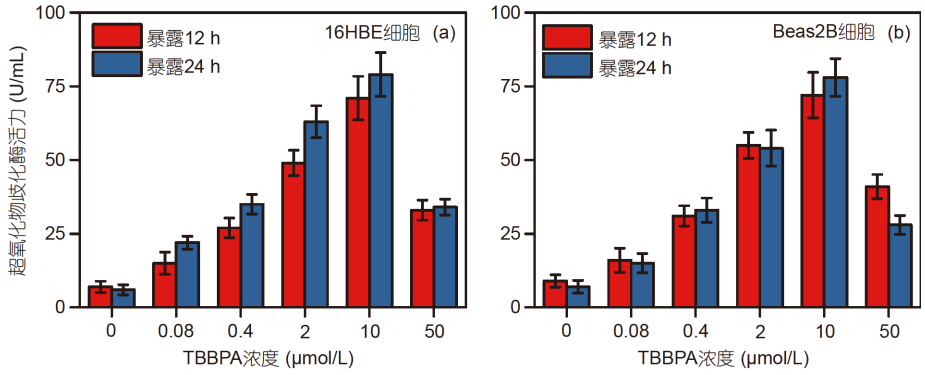


图 4 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露下16HBE(a)和Beas2B(b)细胞的胞内SOD活性
Figure 4 (Color online) SOD activity of 16HBE (a) and Beas2B (b) cells exposed to different concentrations of TBBPA

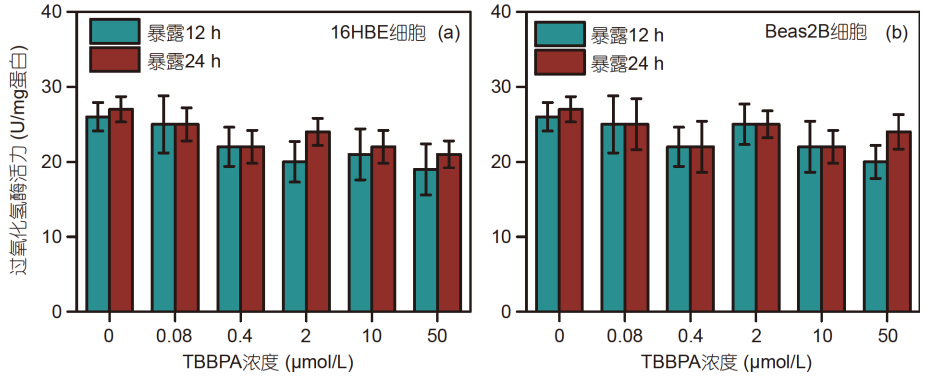


图 5 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露下16HBE(a)和Beas2B(b)细胞的胞内CAT活性
Figure 5 (Color online) CAT activity of 16HBE (a) and Beas2B (b) cells exposed to different concentrations of TBBPA

下降的趋势，浓度达到50 μmol/L时CAT酶的活力也并没有出现急剧降低的现象. 这可能是因为CAT酶在TBBPA的暴露刺激反馈过程中来不及大量地合成，随着ROSs的生成，其酶活力也被不断地消耗下降. 同时也发现，对于CAT酶活而言，暴露12 h的细胞活力与24 h的暴露水平几乎没有太多差别.

2.3 TBBPA暴露诱导16HBE 和Beas2B细胞凋亡

根据上述细胞活力损伤以及氧化应激反应的研究结果, 可以得出细胞出现了明显的过氧化情况, 发现胞内ROSs成分不断积累，这可能会导致细胞出现大面积的凋亡. 细胞凋亡通常被认为是常见细胞的主动死亡方式之一[29]. 因此，为研究TBBPA是否诱导两种人体呼吸系统细胞凋亡的发生，利用Annexin V-FITC/PI染色结合流式细胞仪对两种受试细胞进行了细胞凋亡实验. 由图6可以看出，流式细胞仪的结果显示16HBE细胞在2和50 μmol/L的TBBPA暴露24 h后出现了20%~27%的凋亡或死亡，与对照组比较分别增加约5%和7%，并且处于早期凋亡和晚期凋亡的数量都有上升, 正常活细胞的数量减少. Beas2B细胞在2和50 μmol/L的TBBPA暴露24 h后出现6.5%~12.5%的凋亡或死亡, 与对照组比较分别增加约5%和6%, 并且处于早期凋亡和晚期凋亡的数量都有上调，正常活细胞的数量减少. 这一结果再一次验证了Beas2B细胞相比于16HBE对TBBPA有更强的耐受性. 此外, 随着TBBPA暴露剂量的提高, 细胞凋亡的比例也会随之升高.

为进一步验证细胞损伤过程中出现的凋亡反应, 对细胞凋亡相关的基因表达情况进行了测定. 由图7可以看出，两种呼吸系统细胞的*Caspase-3*，*Survivin*基因在受到不同浓度的TBBPA暴露刺激后均出现了急剧的表达上调(2~9倍)，*Caspase-9*，*bcl-2*，*bax*基因出现了轻微的表达上调(1~6倍)，*p53*基因表达趋于稳定. 根据*Caspase-9*，*Caspase-3*，*bcl-2*，*bax*这4个基因表达的上调, 可以推测细胞凋亡的线粒体通路可能被激活. 在线

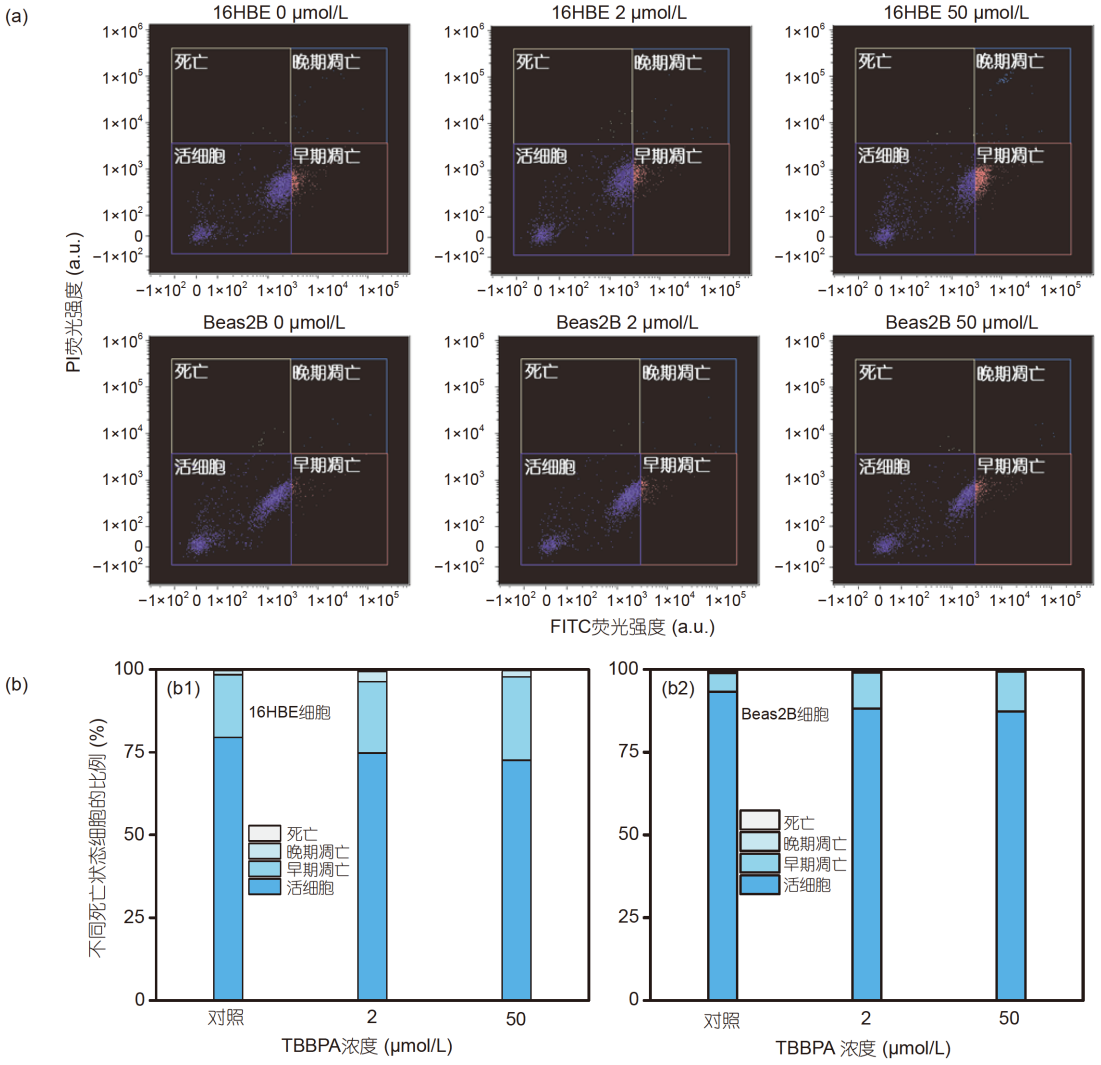


图 6 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露24 h后细胞凋亡情况. (a) 流式细胞仪测试图; (b) 比例堆叠柱状图

Figure 6 (Color online) The apoptosis of 16HBE and Beas2B cells after exposure to different concentrations of TBBPA for 24 h. (a) Flow cytometry images; (b) stacked bar charts of cell apoptosis rate

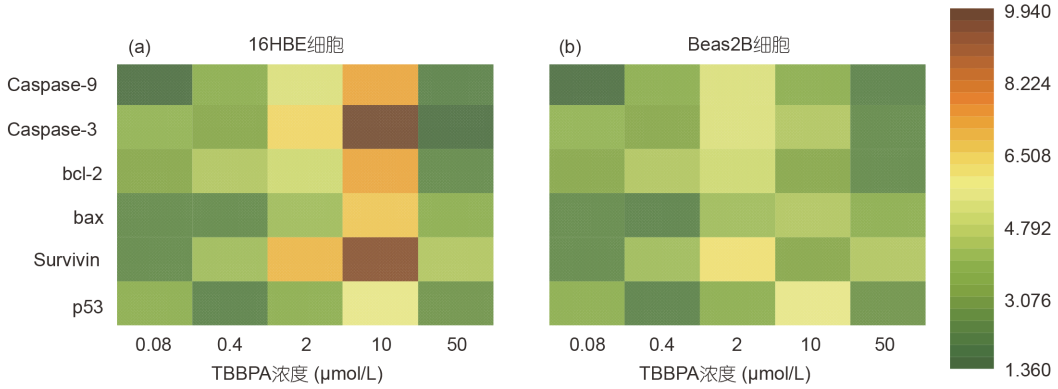


图 7 (网络版彩色)不同浓度TBBPA暴露24 h后16HBE(a)和Beas2B(b)细胞凋亡基因表达. 图例标尺中的数据代表基因表达变化的倍数

Figure 7 (Color online) Expression of apoptosis genes in 16HBE (a) and Beas2B (b) cells after exposure to different concentrations of TBBPA for 24 h. Numbers in the legend scale represent the fold change of gene expression

粒体通路中，*bcl*，*bax*基因的表达可以引起线粒体膜通透性改变, 跨膜电位丢失, 释放细胞色素*C*(*Cytc*)和其他蛋白. 释放到细胞质的细胞色素*C*在dATP存在的条件下能与凋亡相关因子1(Apaf-1)结合，使其形成多聚体, 并促使*caspase-9*与其结合形成凋亡小体，并进一步激发其他的*caspase* 如*caspase-3*，从而诱导细胞凋亡[30]. 除此之外，*bcl-2*和*bax*作为一对相互拮抗的基因[31]，均表现出相同的表达趋势. 一方面bcl-2可以抑制细胞凋亡的进行，与此同时*bax*的表达也在拮抗bcl-2的作用. 这表明细胞受到刺激后发生的凋亡也是其细胞内部平衡变化的结果. 此外，凋亡抑制蛋白Survivin的高表达可以抑制细胞的凋亡[32]. 然而, 在本研究中并没有发现*Survivin*的表达被抑制, 而是出现了上调趋势. 这可能是因为细胞在受到刺激的过程中，一方面受到了诱导凋亡作用, 另一方面, 部分细胞出现应激状态并减少细胞的凋亡. 另外，*p53*作为重要的凋亡活化基因，能够和bcl-2蛋白作用来促进细胞凋亡的进行[33]，但是本研究结果显示, 这两个基因的表达相对趋于平衡, 并没有出现急剧的上调. 这也与部分研究结果呈现一致，即*p53*基因在受到刺激损伤和凋亡的过程中表达都趋于稳定[34,35]. 此外，随着TBBPA浓度的增加，基因表达上调的程度也不断提升，这也说明细胞受到更为强烈的TBBPA暴露刺激后，出现了更为严重的细胞损伤并诱导细胞凋亡程序的发生. 但当浓度提高到50 μmol/L时, 基因表达上调的水平下降，这可能是因为细胞在受到极端浓度的刺激后出现了大量的死亡，导致其无法正常存活的应激.

3 结论

本研究主要探讨了典型的溴代阻燃剂TBBPA对人体支气管上皮细胞16HBE和肺上皮细胞Beas2B两种细胞的暴露毒性作用机制研究. 结果表明两种细胞受到TBBPA的暴露后，均发现细胞活力很低，基因表达处于低水平，并且细胞在受刺激的过程中出现了明显的氧化应激，SOD和CAT酶活性出现不同程度的变化, 最终诱导细胞发生凋亡. 通过对比研究发现Beas2B细胞相较于16HBE细胞对TBBPA具有更强的耐受性. 该文的相关研究结果可以为典型毒害污染物对人体呼吸道的暴露和毒害作用机制的研究提供一定的借鉴意义.

参考文献

1 de Wit C A. An overview of brominated flame retardants in the environment. Chemosphere, 2002, 46: 583–624
2 Jia J B, Zhu Q Q, Liu N, et al. Pollution characteristics and exposure assessment of domestic dust tetrabromobisphenol A and its analogues (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 3467–3477 [贾嘉宝, 朱青青, 刘娜, 等. 我国室内灰尘四溴双酚A及其类似物的污染特征及暴露评估. 科学通报, 2019, 64: 3467–3477]
3 Wang S F, Wu X, Wang Q L, et al. Degradation and transformation of unextractable residue of tetrabromobisphenol A in soil (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 3458–3466 [王松凤, 吴玄, 王麒麟, 等. 土壤中四溴双酚A不可提取态残留的降解转化. 科学通报, 2019, 64: 3458–3466]
4 Suzuki S, Hasegawa A. Determination of hexabromocyclododecane diastereoisomers and tetrabromobisphenol A in water and sediment by liquid chromatography/mass spectrometry. Anal Sci, 2006, 22: 469–474
5 Sellström U, Jansson B. Analysis of tetrabromobisphenol A in a product and environmental samples. Chemosphere, 1995, 31: 3085–3092
6 Abdallah A A, Bouten P C P, den Toonder J M J, et al. The effect of moisture on buckle delamination of thin inorganic layers on a polymer substrate. Thin Solid Films, 2008, 516: 1063–1073
7 Zhou X, Guo J, Zhang W, et al. Tetrabromobisphenol A contamination and emission in printed circuit board production and implications for human exposure. J Hazard Mater, 2014, 273: 27–35
8 Zhang H, Stewart J T. Improved high performance liquid chromatographic determination of chlorzoxazone and its hydroxy metabolite in human serum and urine. Anal Lett, 1993, 26: 675–687
9 Chen J, Tanguay R L, Xiao Y, et al. TBBPA exposure during a sensitive developmental window produces neurobehavioral changes in larval zebrafish. Environ Pollut, 2016, 216: 53–63
10 Chen J, Tanguay R L, Simonich M, et al. TBBPA chronic exposure produces sex-specific neurobehavioral and social interaction changes in adult zebrafish. Neurotoxicol Teratol, 2016, 56: 9–15
11 Barghi M, Shin E S, Kim J C, et al. Human exposure to HBCD and TBBPA via indoor dust in Korea: Estimation of external exposure and body burden. Sci Total Environ, 2017, 593-594: 779–786
12 Barghi M, Shin E S, Choi S D, et al. HBCD and TBBPA in human scalp hair: Evidence of internal exposure. Chemosphere, 2018, 207: 70–77
13 Tada Y, Fujitani T, Yano N, et al. Effects of tetrabromobisphenol A, brominated flame retardant, in ICR mice after prenatal and postnatal exposure. Food Chem Toxicol, 2006, 44: 1408–1413

14 Germer S, Piersma A H, van der Ven L, et al. Subacute effects of the brominated flame retardants hexabromocyclododecane and tetrabromobisphenol A on hepatic cytochrome p450 levels in rats. Toxicology, 2006, 218: 229–236
15 Jason L A, Torres-Harding S R, Jurgens A, et al. Comparing the Fukuda et al. Criteria and the Canadian case definition for chronic fatigue syndrome. J Chronic Fatigue Syndr, 2011, 12: 37–52
16 Murphy T F, Brauer A L, Aebi C, et al. Antigenic specificity of the mucosal antibody response to moraxella catarrhalis in chronic obstructive pulmonary disease. Infect Immun, 2005, 73: 8161–8166
17 Viberg H, Eriksson P. Differences in neonatal neurotoxicity of brominated flame retardants, PBDE 99 and TBBPA, in mice. Toxicology, 2011, 289: 59–65
18 Williams G M, Aardema M, Acquavella J, et al. A review of the carcinogenic potential of glyphosate by four independent expert panels and comparison to the iarc assessment. Crit Rev Toxicol, 2016, 46: 3–20
19 Tarallo V, Hirano Y, Gelfand B D, et al. DICER1 loss and Alu RNA induce age-related macular degeneration via the NLRP3 inflammasome and MyD88. Cell, 2012, 149: 847–859
20 Zhao C, Tang Z, Chung A C K, et al. Metabolic perturbation, proliferation and reactive oxygen species jointly contribute to cytotoxicity of human breast cancer cell induced by tetrabromo and tetrachloro bisphenol A. Ecotoxicol Environ Saf, 2019, 170: 495–501
21 Yu X, Yin H, Peng H, et al. OPFRs and BFRs induced A549 cell apoptosis by caspase-dependent mitochondrial pathway. Chemosphere, 2019, 221: 693–702
22 Yin N, Liang S, Liang S, et al. TBBPA and its alternatives disturb the early stages of neural development by interfering with the notch and wnt pathways. Environ Sci Technol, 2018, 52: 5459–5468
23 Honkisz E, Wójtowicz A K. Modulation of estradiol synthesis and aromatase activity in human choriocarcinoma JEG-3 cells exposed to tetrabromobisphenol A. Toxicol Vitro, 2015, 29: 44–50
24 Pullen S, Boecker R, Tiegs G. The flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrabromobisphenol A-bisallylether suppress the induction of interleukin-2 receptor α chain (CD25) in murine splenocytes. Toxicology, 2003, 184: 11–22
25 Fadoju O, Ogunsuyi O, Akanni O, et al. Evaluation of cytogenotoxicity and oxidative stress parameters in male swiss mice co-exposed to titanium dioxide and zinc oxide nanoparticles. Environ Toxicol Pharmacol, 2019, 70: 103204
26 Reyes-Becerril M, Angulo C, Sanchez V, et al. Methylmercury, cadmium and arsenic(III)-induced toxicity, oxidative stress and apoptosis in pacific red snapper leukocytes. Aquat Toxicol, 2019, 213: 105223
27 Yang L, Tu D, Wang N, et al. The protective effects of DL-Selenomethionine against T-2/HT-2 toxins-induced cytotoxicity and oxidative stress in broiler hepatocytes. Toxicol Vitro, 2019, 54: 137–146
28 Jiang B, Liang P, Deng G, et al. Increased stability of Bcl-2 in HSP70-mediated protection against apoptosis induced by oxidative stress. Cell Stress Chaperones, 2011, 16: 143–152
29 Yang F, Pei R, Zhang Z, et al. Copper induces oxidative stress and apoptosis through mitochondria-mediated pathway in chicken hepatocytes. Toxicol Vitro, 2019, 54: 310–316
30 Zhang Z, Chen J, Chen L, et al. Low frequency and intensity ultrasound induces apoptosis of brain glioma in rats mediated by caspase-3, Bcl-2, and survivin. Brain Res, 2012, 1473: 25–34
31 Murphy K M, Ranganathan V, Farnsworth M L, et al. Bcl-2 inhibits bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. Cell Death Differ, 2000, 7: 102–111
32 Ambrosini G, Adida C, Altieri D C. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. Nat Med, 1997, 3: 917–921
33 Polyak K, Xia Y, Zweier J L, et al. A model for p53-induced apoptosis. Nature, 1997, 389: 300–305
34 Lowe S W, Ruley H E, Jacks T, et al. P53-dependent apoptosis modulates the cytotoxicity of anticancer agents. Cell, 1993, 74: 957–967
35 Aubrey B J, Kelly G L, Janic A, et al. How does p53 induce apoptosis and how does this relate to p53-mediated tumour suppression? Cell Death Differ, 2018, 25: 104–113

Summary for “四溴双酚A对人体呼吸系统细胞16HBE和Beas2B的接触暴露毒性机制”

Toxicity mechanism of tetrabromobisphenol A to human respiratory system cells 16HBE and Beas2B

Meilin Ning, Junjie Hu, Lirong Lu, Yiwei Cai, Guiying Li & Taicheng An*

Guangdong Key Laboratory of Environmental Catalysis and Health Risk Control, School of Environmental Science and Engineering, Institute of Environmental Health and Pollution Control, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510006, China
* Corresponding author, E-mail: antc99@gdut.edu.cn

Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is a high-production chemical widely used in printed circuit boards and other polymeric materials for inflaming. As an environmental pollutant, it is widely found in various abiotic and biological media. Usually, the TBBPA could enter the body through skin contact, respiratory exposure and the dietary intake, among which respiratory exposure may be a most important exposure route. Previous studies reported that TBBPA possesses the endocrine, liver and kidney toxicity. However, few studies focused on the effects of TBBPA on respiratory toxicity. Therefore, it is urgent to study the toxic effects of TBBPA on respiratory system. In this study, human bronchial cells Beas2B and pulmonary epithelial cells 16HBE were used as subjects to study the exposure toxicity of TBBPA. Firstly, the viability and permeability of cells were assayed during the TBBPA exposure process. When TBBPA was in low concentration range (0−0.4 μmol/L), 24 h of exposure cannot significantly affect cell viability. When concentration of TBBPA was greater than 10 μmol/L, the inhibitory effect on cell activity was obviously observed. When concentration of TBBPA was up to 50 μmol/L, the cell viabilities of 16HBE and Beas2B cells decreased to 80.9% and 86.2%. It is worth noting that, as compared with bronchial epithelial cell 16HBE, lung epithelial cell Beas2B has a higher tolerance to TBBPA, which may be due to the different cell structures.

In addition, the oxidation stress of cells was also determined by assaying the cell intracellular reactive oxygen species (ROSs), antioxidant enzymatic activity of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) during the whole expose duration. The results showed that the levels of intracellular ROSs obviously increased in both cells, indicating that peroxidation occurred in the cells during TBBPA exposure. Correspondingly, the enzymatic activities of SOD and CAT also increased, indicating that oxidative stress happened in cells.

After that, flow cytometry was applied to analyze cell apoptosis. The results showed that partial apoptosis occurred after 24 h of TBBPA exposure, indicating that TBBPA could induce cell apoptosis. Besides, with the increase of exposure concentration, the apoptosis rate of the two kinds of cells also increased. Furthermore, the q-PCR was used to determine the apoptosis-related gene expression. The results revealed that the expression levels of apoptosis-related genes p53, *Survivin*, *bax*, *bcl-2*, *caspase-3*, *caspase-9* were all up-regulated to different degrees, further confirming that cells were apoptotic caused by TBBPA. Further, compared with the 12-h exposure data, 24-h exposure would stimulate more intense expression up-regulation.

In all, this research mainly investigated the toxicity of typical generation bromide flame retardants TBBPA on human bronchial epithelial cells 16 HBE and lung epithelial cells Beas2B. Results showed that the exposure of TBBPA could cause damage to cell viability and elicit oxidative stress in cells, which could further induce cell apoptosis. The results of cytotoxicity related to human respiratory system in this work can provide a scientific basis for revealing the health risk of toxic organic pollutants to human respiratory system.

tetrabromobisphenol A (TBBPA), cytotoxicity, cell apoptosis, oxidative stress, up-regulation of gene expression

doi: 10.1360/TB-2019-0764