

DOI:10.7524/j.issn.0254-6108.2023052702

CSTR:32061.14.hjhx.2023052702

史志鹏, 秦华, 高捷, 等. 双酚类物质对外泌体分泌的影响[J]. 环境化学, 2024, 43(11): 3651-3657.

SHI Zhipeng, QIN Hua, GAO Jie, et al. The effect of bisphenols on the secretion of exosomes[J]. Environmental Chemistry, 2024, 43(11): 3651-3657.

双酚类物质对外泌体分泌的影响*

史志鹏^{1,2,3} 秦华^{2,4} 高捷^{1,2}** 曲广波^{1,2} 江桂斌^{1,2}

(1. 中国科学院大学, 杭州高等研究院, 杭州, 310024; 2. 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, 北京, 100085; 3. 中国科学院大学, 中丹学院, 北京, 101408; 4. 东北大学理学院, 沈阳, 110057)

摘要 双酚类物质是一种常见的内分泌干扰物, 广泛应用于工业生产. 其中, 双酚 A (bisphenol A, BPA) 及其替代物双酚 S (bisphenol S, BPS) 和双酚 AF (bisphenol AF, BPAF) 可通过饮食、呼吸、皮肤吸收等途径进入人体, 并影响机体健康. 外泌体作为细胞分泌的囊泡, 在细胞通讯中起重要作用, 参与多种生理和病理过程. 研究表明, 环境污染物可影响外泌体的分泌过程. 然而, 双酚类物质对外泌体分泌的影响未见报道. 因此, 本文以双酚类物质为研究对象, 研究其对细胞外泌体分泌的影响. 通过超高速离心法提取高浓度外泌体, 并结合透射电子显微镜、纳米颗粒追踪分析技术 (Nanoparticle Tracking Analysis, NTA) 和蛋白免疫印迹技术对外泌体进行表征. 结果表明, 200 nmol·L⁻¹ 和 500 nmol·L⁻¹ BPA 暴露 HepG2 细胞 24 h 后, 会显著促进外泌体的分泌, 而 BPS 和 BPAF 在人体相关浓度下 (50 nmol·L⁻¹) 对外泌体的分泌无影响. 本研究结果将为双酚类物质的毒性评估和机制研究提供新的思路.

关键词 双酚类物质, 外泌体, 人体相关浓度.

中图分类号 X-1; O6 文献标识码 A

The effect of bisphenols on the secretion of exosomes

SHI Zhipeng^{1,2,3} QIN Hua^{2,4} GAO Jie^{1,2}** QU Guangbo^{1,2} JIANG Guibin^{1,2}

(1. Advanced Research Institute of Hangzhou, University of Chinese Academy of Sciences, Hangzhou, 310024, China; 2. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing, 100085, China; 3. Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing, 101408, China; 4. College of Sciences, Northeastern University, Shenyang, 110057, China)

Abstract Bisphenols are common endocrine-disrupting contaminants that are widely used in industrial production. Among them, bisphenol A (BPA) and its substitutes bisphenol S (BPS) and bisphenol AF (BPAF) can enter the body through diet, respiration, and skin absorption, and affect the health of the body. Exosomes, as vesicles secreted by cells, play an important role in cellular communication and are involved in a variety of physiological and pathological processes. The secretion of exosomes can be influenced by environmental pollutant. However, the effects of bisphenols on exosome secretion have not been reported. This study focuses on bisphenols and investigates their effects on the secretion of exosome. High-concentration exosomes are extracted using ultracentrifugation method, and the exosomes are characterized through transmission electron microscopy, nanoparticle tracking analysis (NTA), and western blot techniques. Our results

2023年5月27日收稿(Received: May 27, 2023).

* 青年科学基金(22206037)和中国博士后科学基金(2021M703403)资助.

Supported by the National Natural Science Foundation of China(22206037) and China Postdoctoral Science Foundation(2021M703403).

** 通信联系人 Corresponding author, E-mail: jiegao@ucas.ac.cn

demonstrated that BPA significantly promoted exosome secretion of HepG2 cells at the concentration of $200 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ and $500 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ after exposed for 24 h, while BPS and BPAF had no effect on exosome secretion at physiologically relevant concentrations ($50 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$). The study will provide new view for toxicity evaluation and mechanism research of bisphenols.

Keywords bisphenols, exosome, human-relevant concentration.

双酚类物质是常见的内分泌干扰物,作为添加剂被广泛用于塑料、树脂、涂料、胶水和防腐剂等工业产品的生产中^[1-3],在环境介质、野生动物和人群中均有检出^[4-7].双酚类物质主要经口、呼吸道和皮肤等途径进入体内^[8-11],可通过干扰内分泌系统、生殖系统、神经系统的正常功能而影响健康^[12-15].双酚 A (bisphenol A, BPA) 是目前应用最广的双酚类物质^[1].双酚 S (bisphenol S, BPS) 和双酚 AF (bisphenol AF, BPAF) 作为重要的 BPA 替代品(结构如图 1 所示),是目前人体和环境样品中检出率较高的双酚类物质^[16-19].研究表明, BPA 在孕妇血液和尿液中的浓度分别可以达到 $291 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $567 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[20-21], BPS 在男性尿液样本中浓度可达 $48.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[22], BPAF 在人血浆中浓度可达 $49.3 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[23].有研究表明, BPA 在 $1000 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下暴露 HepG2 细胞, 5 d 后细胞活力显著降低, 在 $100 \text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度下可诱导细胞发生胰岛素抵抗^[24]. BPS 和 BPAF 分别在 $80 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $45 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的浓度下暴露细胞, 72 h 后导致 20% 的细胞死亡^[25].体内实验结果显示, BPA 在 $5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ 的暴露剂量下对小鼠生殖和发育无明显损害作用,但会导致小鼠脾脏中 T helper cell 17 (Th17) 细胞数量的增加^[26-27].基于 BPA 对免疫的影响欧洲食品安全局设立了可耐受每日摄入量(TDI)为 $0.2 \text{ ng}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ ^[28].目前的研究显示, BPA 进入人体后主要被代谢成葡萄糖醛酸盐和硫酸盐缀合物,并最终通过尿液排出体外,其人体半衰期大约为 1.5 h ^[26]. BPS 主要在肝脏中代谢为葡糖苷酸,半衰期大约为 6.8 h ^[29]. BPAF 在体内主要代谢为相应的葡糖苷酸^[30],但 BPAF 人体代谢周期目前未见报道.一项在大鼠体内的研究表明, BPAF 在血浆中半衰期约为 3.35 h ^[31].虽然双酚类物质在人体中代谢速度较快,但在长期稳定暴露下的情况下,双酚类物质仍然存在环境暴露风险.

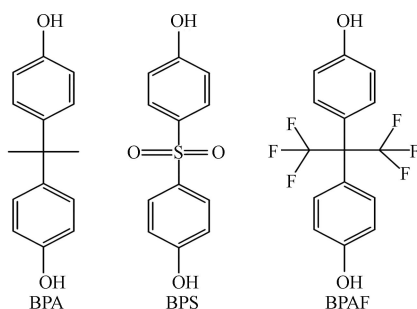


图 1 BPA、BPS、BPAF 化学结构图

Fig.1 Chemical structure of BPA, BPS, BPAF

外泌体是由细胞分泌的直径为 30—150 nm 的双层膜囊泡,包含蛋白质、核酸、脂质等功能性分子,在细胞通讯中发挥重要作用^[32-38].外泌体包含的分子是其信息传递的物质基础,而外泌体的数量决定了信号的强弱.外泌体由细胞器多泡体向内出芽形成,通过多泡体与质膜融合释放^[32],该过程受外界刺激干扰^[39-41].已有研究证明,多环芳烃可促进肝细胞释放外泌体^[41],表明环境污染物可通过干扰外泌体的分泌过程导致毒性,促进疾病的发生发展.然而,目前双酚类物质对外泌体分泌的影响尚不明确.因此,本文研究了 BPA、BPS、BPAF 在人体可检出浓度范围内对外泌体分泌的影响,从而更全面地评估双酚类物质的毒性效应,为相关政策的制定提供更全面的依据.

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 实验材料

甲基纤维素 (R097528-100g)、草酸 (R096488-25g), 购自上海易恩化学技术有限公司; 戊二醛

(P1126), 购自北京索莱宝科技有限公司; 细胞增殖/毒性检测试剂盒 (BMU106-CN), 购自亚科因(武汉)生物技术有限公司; CD81 抗体 (ab109201)、TSG101 抗体 (ab125011)、钙连蛋白 (Calnexin) 抗体 (ab133615), 购自艾博抗(上海)贸易有限公司; DMEM 培养基 (C11995500BT)、胎牛血清 (FBS, 10099141)、青霉素-链霉素溶液 (15140 - 122), 购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司; 活性炭吸附血清 (CS - FBS, 04 - 201 - 1B), 购自 Biological Industries; 双酚 A (BPA, CAS: 80-05-7, B108652, >99.0%), 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; 双酚 S (BPS, CAS: 80-09-1, B0495, >98.0%)、双酚 AF (BPAF, CAS: 1478-61-1, B0945, >98.0%), 购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司。

实验所用无外泌体血清使用超滤管 (UFC910024, 100K 默克密理博公司) 在 3000 g, 55 min, 4 °C 条件下超滤获得^[42]。

1.2 实验方法

1.2.1 双酚类物质配制与暴露

BPA、BPS、BPAF 溶于二甲基亚砜 (DMSO) 配制成 $100 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的原液, 并在 $-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 下保存。使用时, 在无菌条件下对各原液进行梯度稀释以得到不同浓度的工作液。根据这 3 类物质的人体检测浓度, BPA 暴露浓度为 50、100、200、500 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$, BPS 和 BPAF 暴露浓度为 50 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。细胞暴露时 DMSO 的最终浓度不超过 0.1%。细胞培养和污染物的暴露实验所用细胞培养液配方见表 1。

表 1 细胞培养所用试剂配方
Table 1 Reagent formula for cell culture

名称 Name	配方 Formula
完全培养液	DMEM(高糖)培养基加入10%FBS和1%双抗
暴露培养液	无酚红DMEM培养基加入10% CS - FBS和1%双抗
外泌体提取培养液	无酚红DMEM培养基加入10% 无外泌体CS - FBS和1%双抗

人肝癌细胞系 HepG2 使用完全培养液在 $37 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 5% CO_2 条件下培养。细胞汇合度达到 90% 时进行传代。双酚类物质暴露前 24 h 将完全培养液换成暴露培养液以消耗激素成分, 排除其对双酚类物质效应的干扰。在检测双酚类物质对细胞活性的影响时, 用分别含有 0、10、100、1000、10000、10000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 双酚类物质的暴露培养液处理细胞 24 h; 在检测双酚类物质对外泌体分泌的影响时, 用含有双酚类物质的外泌体提取培养液处理细胞 24 h, 以 0.1% DMSO 处理的细胞为对照组。

1.2.2 双酚类物质对细胞活性的影响

取对数生长期细胞, 以每孔 8000 个的细胞密度铺于 96 孔板中, 铺板时使用暴露培养液以消耗激素成分。24 h 后弃掉原培养基, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 清洗细胞 1 次, 分别使用含有 0、10、100、1000、10000、10000 $\text{nmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 双酚类物质的暴露培养液培养 24 h。培养结束后将培养基换成含有 10% 细胞增殖/毒性检测试剂的培养基在细胞培养箱中孵育 40 min。使用酶标仪检测各个孔在 450 nm 波长处的 OD 值, 计算各剂量组相对于对照组的相对细胞活性。

1.2.3 外泌体的提取和表征

(1) 外泌体提取

取对数生长期细胞, 以每皿 3×10^5 个的细胞密度在 60 mm 皿中铺板, 24 h 后用 PBS 清洗细胞 3 次, 并换用外泌体提取培养液培养细胞, 24 h 后收集细胞培养上清液并对细胞进行计数。将收集到的细胞培养上清液在 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 条件下依次经 $1983 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 5 min; $3967 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 10 min; $8870 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 30 min, $28000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 70 min 离心, 以获取外泌体。向外泌体沉淀加入 PBS 以重悬外泌体, 再次于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$, $28000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 70 min 以达到清洗外泌体的目的。弃去上清液用 100 μL PBS 重悬外泌体用于后续表征或放于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存。

(2) 外泌体透射电镜表征

本实验使用 Théry 改良方法进行外泌体透射电镜样品制备^[43]。使用 4% PFA 和 1% 戊二醛对外泌体样本进行固定并装载至铜网, 使用 pH 为 7 的草酸铈酰溶液和甲基纤维素-UA 包埋样品并增强样品反差, 将铜网转移到滤纸上干燥后使用透射电子显微镜进行观察。

(3) 外泌体粒径与浓度表征

本实验使用纳米颗粒追踪分析仪(NanoSight NS300, 英国马尔文公司)对外泌体的粒径范围和浓度进行测量, 其有效检测浓度大约在 10^7 — 10^9 个· mL^{-1} . 测量不同样本时, 使用超纯水对样品池及管路进行充分清洗. 单次采集影像 1 min, 每个样品采集 5 次, 软件自动计算样品中外泌体的浓度.

(4) 免疫印迹试验

采用免疫印迹技术对外泌体标志性蛋白进行检测, 以表征外泌体. 使用 RIPA 裂解液(Radio Immunoprecipitation Assay Lysis buffer)裂解外泌体或细胞以获得蛋白, 使用 BCA(Bicinchoninic Acid Assay)蛋白定量试剂盒对其浓度定量. 使用 SDS-PAGE 凝胶电泳对蛋白进行分离, 并转移至硝酸纤维素膜上. 使用脱脂牛奶粉封闭. 外泌体表征使用 TSG101、CD81、Calnexin 抗体孵育, 其中 Calnexin 作为外泌体的阴性对照蛋白. 抗体孵育结束后使用化学发光剂进行显色, 并使用成像系统(ChemiDocTM MP, 美国伯乐)进行成像. 通过 ImageJ 软件对图像进行定量分析.

1.2.4 统计分析

所有结果由 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析和作图. 实验数据以平均值 \pm 标准差表示. 多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA)进行统计分析. $P \leq 0.05$ (*) 表示组间有统计学差异, $P \leq 0.01$ (**) 表示组间有显著统计学差异, $P \leq 0.001$ (***) 表示组间有极显著统计学差异.

2 结果与讨论(Results and discussion)

2.1 外泌体的表征

通过超速离心法获得的外泌体形态如图 2(a), 其整体呈圆形并有明显的凹陷. NTA 的结果表明其粒径主要分布为 $(141.3 \pm 54.1) \text{nm}$ (图 2(b)). 正常情况下外泌体的粒径在 30—150 nm 左右, 在我们的结果中观察到的粒径略大, 可能是由于在超高速离心过程中部分外泌体发生了团聚^[44]. 进一步通过免疫印迹技术对所提取的外泌体进行表征, 以外泌体来源的 HepG2 细胞作为参照, 检测了外泌体的标志性蛋白 TSG101 和 CD81, 以及内质网标志性蛋白 Calnexin. 如图 2(c) 所示, 外泌体样本的 TSG101 和 CD81 含量高于细胞样本, 而 Calnexin 含量低于细胞样本, 这表明本实验提取的外泌体没有受到破碎细胞的污染.

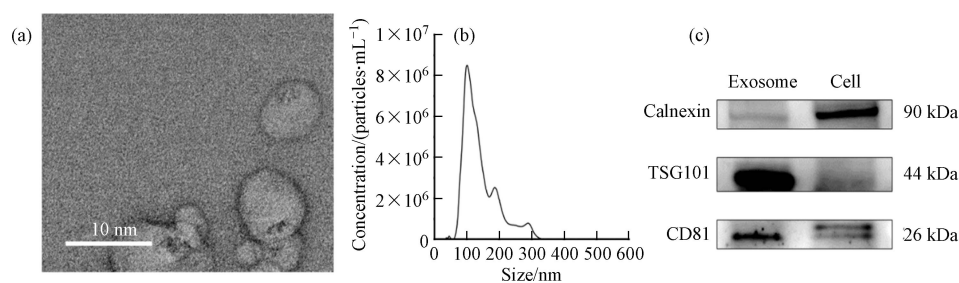


图 2 外泌体表征(a)透射电镜表征;(b)纳米颗粒追踪分析;(c)蛋白免疫印迹

Fig.2 Characterization of exosomes (a) Transmission electron microscopy; (b) Nanoparticle tracking analysis; (c) Western blot

2.2 人体剂量下 BPA、BPS、BPAF 对外泌体分泌的影响

细胞毒性检测结果表明, BPA、BPS 和 BPAF 在 $10 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 及以下暴露剂量下对细胞活性无影响 (图 3a). 这表明在人体相关浓度下, BPA、BPS、BPAF 在 24 h 内对 HepG2 细胞的活性不会产生显著影响.

在不影响细胞活性的情况下, 进一步检测 BPA、BPS、BPAF 对细胞外泌体分泌的影响. 实验结果显示, 在人体相关浓度 ($50 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$) 下, BPS 和 BPAF 对细胞外泌体的分泌没有明显影响 (图 3b). 然而, 当 BPA 的浓度达到 $200 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 或 $500 \text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时, 外泌体的分泌量显著增加 (图 3c). 以上结果表明在人体相关浓度范围内, BPS 和 BPAF 对 HepG2 细胞外泌体的分泌不产生影响, 而 BPA 可以促进外泌体的分泌.

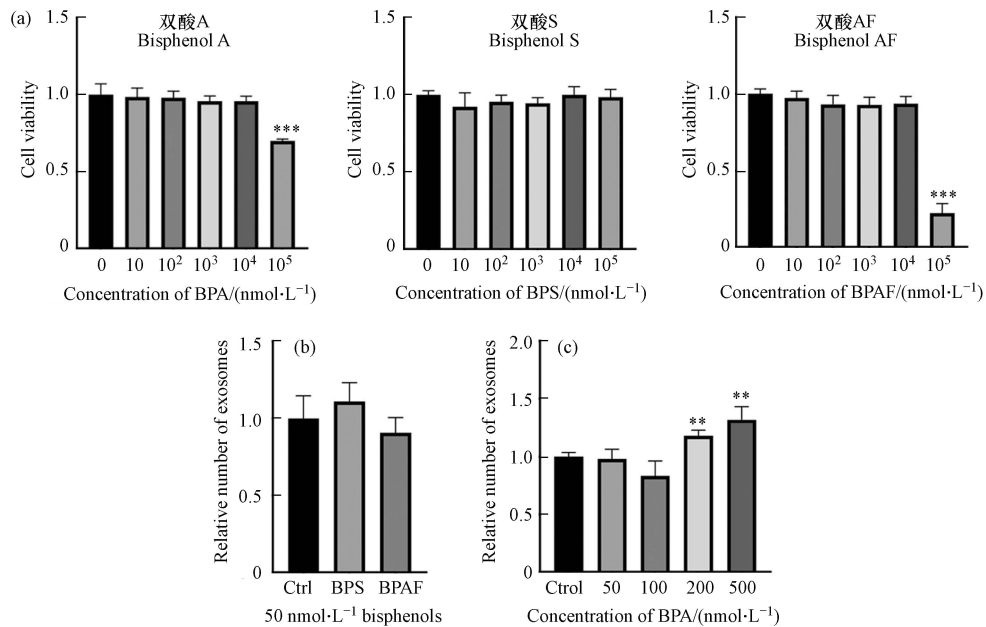


图3 双酚类物质对细胞活性和外泌体分泌的影响

(a)不同浓度双酚类对 HepG2 细胞活性的影响; (b)50 nmol·L⁻¹ 浓度下 BPS、BPAF 对 HepG2 外泌体释放的影响; (c)不同浓度 BPA 对外泌体分泌的影响

Fig.3 The effect of bisphenols on cell viability and the secretion of exosomes

(a) The effect of different concentrations of bisphenols on the viability of HepG2 cells; (b) The effect of BPS/BPAF on the secretion of HepG2 exosomes at 50 nmol·L⁻¹; (c) The effect of different concentrations of BPA on the secretion of exosomes

外泌体释放过程具有复杂性. 首先, 细胞质膜发生内陷并形成内体, 内体经历物质筛选和内向出芽等步骤, 进而演变为多泡体. 多泡体可与溶酶体或自噬体融合被降解, 或者与细胞质膜融合, 从而释放内腔囊泡, 形成外泌体^[32]. 该过程涉及多个蛋白质和分子的调控, 例如磷脂和四次跨膜蛋白等^[32]. 有研究表明, BPA 可抑制磷脂合成酶的活性, 降低细胞内磷脂的合成^[45], 进而可能对外泌体的释放产生影响. 外泌体作为细胞之间重要的信息传递媒介, 可释放代谢调节和神经调节相关分子^[34,36]. 已知双酚类物质可干扰激素作用并进一步导致代谢紊乱、神经毒性等不良效应^[12,14]. 因此, 双酚类物质可能通过影响细胞外泌体的分泌来干扰细胞代谢或神经调节过程, 进而导致相关疾病的发生, 其相关生物学过程和潜在分子机制还需要进一步探究.

目前针对内分泌干扰物对外泌体分泌的影响研究很少. 已知一项研究在体外利用鼠原代肝细胞研究了 3 种多环芳烃, 包括苯并 [a] 芘 (Benzo[a]pyrene, BP)、二苯并 [a,h] 蒽 (Dibenzo[a,h]anthracene, DBA)、芘 (Pyrene, PYR), 在 100 nmol·L⁻¹ 浓度下对以外泌体为主的细胞外囊泡分泌的影响^[41]. 该研究表明在 100 nmol·L⁻¹ 浓度下, 暴露 5 h 后, 3 种物质均可促进以外泌体为主的细胞外囊泡的分泌, 并呈现出时间依赖性. 结合本实验结果, 这提示了特定污染物的暴露可影响外泌体的分泌.

需要注意的是, 本实验仅检测了双酚类物质暴露 24 h 对外泌体分泌的影响, 而污染物对机体的暴露往往是长期低剂量的, 因此在未来的研究中需要延长暴露时间以进一步评估 BPA、BPS、BPAF 影响外泌体分泌的长期效应. 此外, 本研究结果仅基于 HepG2 细胞模型, 双酚类物质可能对其它细胞类型有不同的效应. 人群中存在个体差异且暴露途径多样, 这些因素可能对双酚类物质的毒性作用产生影响. 进一步的研究应该更多考虑实际暴露场景, 并扩大样本规模以提高结果的可靠性和结论的普适性.

综上所述, 本研究结果显示, BPA 在人体内暴露相关浓度下可以促进细胞分泌更多外泌体, 虽然不直接影响细胞活性, 但它的暴露可能通过影响细胞外泌体的正常分泌而对机体产生不良影响. 这对于深入了解双酚类物质的潜在健康风险具有重要意义.

3 结论(Conclusion)

本文研究了 BPA、BPS、BPAF 在人体相关浓度下对细胞外泌体分泌的影响. 结果表明, 3 种双酚

类物质对外泌体的分泌干扰表现出差异。BPS、BPAF 不会影响外泌体的分泌, 而 BPA 可显著促进外泌体分泌。BPA 干扰细胞外泌体正常分泌的分子机制有待进一步探究。

参考文献 (References)

- [1] HAHLADAKIS J N, IACOVIDOU E, GERASSIMIDOU S. An overview of the occurrence, fate, and human risks of the bisphenol-a present in plastic materials, components, and products[J]. *Integrated Environmental Assessment and Management*, 2023, 19(1): 45-62.
- [2] MOLINA-MOLINA J M, AMAYA E, GRIMALDI M, et al. *In vitro* study on the agonistic and antagonistic activities of bisphenol-S and other bisphenol-a congeners and derivatives via nuclear receptors[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2013, 272(1): 127-136.
- [3] CAO X L, CORRIVEAU J, POPOVIC S. Migration of bisphenol A from can coatings to liquid infant formula during storage at room temperature[J]. *Journal of Food Protection*, 2009, 72(12): 2571-2574.
- [4] ARIS A. Estimation of bisphenol A (BPA) concentrations in pregnant women, fetuses and nonpregnant women in Eastern Townships of Canada[J]. *Reproductive Toxicology*, 2014, 45: 8-13.
- [5] NAHAR M S, LIAO C Y, KANNAN K, et al. Fetal liver bisphenol A concentrations and biotransformation gene expression reveal variable exposure and altered capacity for metabolism in humans[J]. *Journal of Biochemical and Molecular Toxicology*, 2013, 27(2): 116-123.
- [6] EDLOW A G, CHEN M, SMITH N A, et al. Fetal bisphenol A exposure: Concentration of conjugated and unconjugated bisphenol A in amniotic fluid in the second and third trimesters[J]. *Reproductive Toxicology*, 2012, 34(1): 1-7.
- [7] LI J F, WU C S, ZHAO H Z, et al. Exposure assessment of bisphenols in Chinese women during pregnancy: A longitudinal study[J]. *Environmental Science & Technology*, 2019, 53(13): 7812-7820.
- [8] GEENS T, GOEYENS L, COVACI A. Are potential sources for human exposure to bisphenol-a overlooked?[J]. *International Journal of Hygiene and Environmental Health*, 2011, 214(5): 339-347.
- [9] ZALKO D, JACQUES C, DUPLAN H, et al. Viable skin efficiently absorbs and metabolizes bisphenol A[J]. *Chemosphere*, 2011, 82(3): 424-430.
- [10] VASILJEVIC T, HARNER T. Bisphenol A and its analogues in outdoor and indoor air: Properties, sources and global levels[J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 789: 148013.
- [11] CHEN D, KANNAN K, TAN H L, et al. Bisphenol analogues other than BPA: Environmental occurrence, human exposure, and toxicity-a review[J]. *Environmental Science & Technology*, 2016, 50(11): 5438-5453.
- [12] SANTORO A, CHIANESE R, TROISI J, et al. Neuro-toxic and reproductive effects of BPA[J]. *Current Neuropharmacology*, 2019, 17(12): 1109-1132.
- [13] BARBONETTI A, D'ANDREA S, BERNABÒ N, et al. Editorial: Bisphenols and male reproductive health[J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2020, 11: 597609.
- [14] McDONOUGH C M, XU H S, GUO T L. Toxicity of bisphenol analogues on the reproductive, nervous, and immune systems, and their relationships to gut microbiome and metabolism: Insights from a multi-species comparison[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2021, 51(4): 283-300.
- [15] DALLIO M, MASARONE M, ERRICO S, et al. Role of bisphenol A as environmental factor in the promotion of non-alcoholic fatty liver disease: *In vitro* and clinical study[J]. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, 2018, 47(6): 826-837.
- [16] SONG S M, DUAN Y S, ZHANG T, et al. Serum concentrations of bisphenol A and its alternatives in elderly population living around e-waste recycling facilities in China: Associations with fasting blood glucose[J]. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, 2019, 169: 822-828.
- [17] ZHANG H F, ZHANG Y P, LI J B, et al. Occurrence and exposure assessment of bisphenol analogues in source water and drinking water in China[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 655: 607-613.
- [18] YANG Y J, GUAN J, YIN J, et al. Urinary levels of bisphenol analogues in residents living near a manufacturing plant in South China[J]. *Chemosphere*, 2014, 112: 481-486.
- [19] JIN H B, ZHU J, CHEN Z J, et al. Occurrence and partitioning of bisphenol analogues in adults' blood from China[J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(2): 812-820.
- [20] GERONA R, VOM SAAL F S, HUNT P A. BPA: Have flawed analytical techniques compromised risk assessments?[J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2020, 8(1): 11-13.
- [21] LEE Y J, RYU H Y, KIM H K, et al. Maternal and fetal exposure to bisphenol A in Korea[J]. *Reproductive Toxicology*, 2008, 25(4): 413-419.
- [22] LIAO C Y, 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.
- [23] LIANG X X, YIN N Y, LIANG S X, et al. Bisphenol A and several derivatives exert neural toxicity in human neuron-like cells by

- decreasing neurite length[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2020, 135: 111015.
- [24] GENG S S, WANG S J, ZHU W W, et al. Curcumin attenuates BPA-induced insulin resistance in HepG2 cells through suppression of JNK/p38 pathways[J]. *Toxicology Letters*, 2017, 272: 75-83.
- [25] HERCOG K, MAISANABA S, FILIPIČ M, et al. Genotoxic activity of bisphenol A and its analogues bisphenol S, bisphenol F and bisphenol AF and their mixtures in human hepatocellular carcinoma (HepG2) cells[J]. *Science of the Total Environment*, 2019, 687: 267-276.
- [26] HENGSTLER J G, FOTH H, GEBEL T, et al. Critical evaluation of key evidence on the human health hazards of exposure to bisphenol A[J]. *Critical Reviews in Toxicology*, 2011, 41(4): 263-291.
- [27] LUO S M, LI Y, LI Y P, et al. Gestational and lactational exposure to low-dose bisphenol A increases Th17 cells in mice offspring[J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2016, 47: 149-158.
- [28] LAMBRÉ C, BARAT BAVIERA J M, et al. Re-evaluation of the risks to public health related to the presence of bisphenol A (BPA) in foodstuffs[J]. *EFSA Journal*, 2023, 21(4): e06857.
- [29] OH J, CHOI J W, AHN Y A, et al. Pharmacokinetics of bisphenol S in humans after single oral administration[J]. *Environment International*, 2018, 112: 127-133.
- [30] GRAMEC SKLEDAR D, TRONTELJ J, TROBERG J, et al. Data on biosynthesis of BPAF glucuronide, enzyme kinetics of BPAF glucuronidation, and molecular modeling[J]. *Data in Brief*, 2019, 22: 977-986.
- [31] WAIDYANATHA S, BLACK S R, AILLON K, et al. Toxicokinetics and bioavailability of bisphenol AF following oral administration in rodents: A dose, species, and sex comparison[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2019, 373: 39-47.
- [32] KALLURI R, LeBLEU V S. The biology, function, and biomedical applications of exosomes[J]. *Science*, 2020, 367(6478): eaau6977.
- [33] GUAY C, REGAZZI R. Exosomes as new players in metabolic organ cross-talk[J]. *Diabetes, Obesity & Metabolism*, 2017, 19(Suppl 1): 137-146.
- [34] CASTAÑO C, KALKO S, NOVIALS A, et al. Obesity-associated exosomal miRNAs modulate glucose and lipid metabolism in mice[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2018, 115(48): 12158-12163.
- [35] KAPUSTIN ALEXANDER N, MICHAEL S, SCHURGERS LEON J, et al. Prothrombin loading of vascular smooth muscle cell-derived exosomes regulates coagulation and calcification[J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2017, 37(3): e22-e32.
- [36] WANG X Y, ZHOU Y X, GAO Q N, et al. The role of exosomal microRNAs and oxidative stress in neurodegenerative diseases[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020: 3232869.
- [37] LI X, LI C Y, ZHANG L P, et al. The significance of exosomes in the development and treatment of hepatocellular carcinoma[J]. *Molecular Cancer*, 2020, 19(1): 1.
- [38] ZOU J L, PENG H Y, LIU Y Z. The roles of exosomes in immunoregulation and autoimmune thyroid diseases[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 757674.
- [39] NGALAME N N O, LUZ A L, MAKIA N, et al. Arsenic alters exosome quantity and cargo to mediate stem cell recruitment into a cancer stem cell-like phenotype[J]. *Toxicological Sciences*, 2018, 165(1): 40-49.
- [40] DU X H, ZHANG Q L, JIANG Y X, et al. Characterization of plasma-derived exosomal miRNA changes following traffic-related air pollution exposure: A randomized, crossover trial based on small RNA sequencing[J]. *Environment International*, 2022, 167: 107430.
- [41] van METEREN N, LAGADIC-GOSSMANN D, CHEVANNE M, et al. Polycyclic aromatic hydrocarbons can trigger hepatocyte release of extracellular vesicles by various mechanisms of action depending on their affinity for the aryl hydrocarbon receptor[J]. *Toxicological Sciences*, 2019, 171(2): 443-462.
- [42] KORNILOV R, PUHKA M, MANNERSTRÖM B, et al. Efficient ultrafiltration-based protocol to deplete extracellular vesicles from fetal bovine serum[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2018, 7(1): 1422674.
- [43] THÉRY C, AMIGORENA S, RAPOSO G, et al. Isolation and characterization of exosomes from cell culture supernatants and biological fluids[J]. *Current Protocols in Cell Biology*, 2006, Chapter 3: Unit3.22.
- [44] JEPPESEN D K, HVAM M L, PRIMDAHL-BENGTSON B, et al. Comparative analysis of discrete exosome fractions obtained by differential centrifugation[J]. *Journal of Extracellular Vesicles*, 2014, 3(1): 25011.
- [45] LI X Y, HE X X, LIN X N, et al. Effects of bisphenols on lipid metabolism and neuro-cardiovascular toxicity in marine medaka larvae[J]. *Aquatic Toxicology*, 2023, 259: 106551.