

溴阻燃剂对肝细胞的毒性

那广水^{1,*}, 孙丽娟², 张雯雯², 王惠国²

1. 国家海洋环境监测中心国家海洋局近岸海域生态环境重点实验室, 大连 116023
2. 大连大学生命科学与技术学院, 大连 116622

摘要: 为评价四溴联苯醚(2, 2, 4, 4-tetrabromodiphenyl ether, PBDE-47)、五溴联苯醚(2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether, PBDE-99)、九溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers 206, PBDE-206)、六溴环十二烷(hexabromocyclododecane, HBCD)、四溴双酚 A (tetrabromobisphenol A, TBBPA) 对人肝细胞(LO₂) 的体外细胞毒性。将 5 种溴阻燃剂与人肝细胞 LO₂ 共同培养, 采用四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT 法)检测 5 种溴阻燃剂对 LO₂ 细胞的相对增殖率, 并按照 GB/T16886.5-2003/ISO10993-5:1999 标准评价 5 种溴阻燃剂对 LO₂ 的细胞毒性。体外实验表明, 5 种溴阻燃剂对 LO₂ 细胞均具有抑制作用, 其中 PBDE-47、PBDE-99 和 HBCD 呈现剂量依赖关系。

关键词: 四溴联苯醚; 五溴联苯醚; 九溴联苯醚; 六溴环十二烷; 四溴双酚 A; LO₂ 细胞;

文章编号: 1673-5897(2012)5-570-04 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

Hepatotoxicity of Brominated Flame Retardants

Na Guangshui^{1,*}, Sun Lijuan², Zhang Wenwen², Wang Huiguo²

1. Key Laboratory for Ecological Environment in Coast Areas of State Oceanic Administration, National Marine Environmental Monitoring Center, Dalian 116622, China
2. College of Life Sciences and Biotechnology, Dalian University, Dalian 116622, China

Received 21 July 2012 **accepted** 29 September 2012

Abstract: To test the toxic effects of 2, 2, 4, 4-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47), 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99), polybrominated diphenyl ethers 206 (PBDE-206), hexabromocyclododecane (HBCD) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) on normal human hepatocytes (LO₂) in vitro, the human liver cell line LO₂ was co-cultured with these five brominated flame retardants respectively. The inhibition rate of LO₂ cells was detected by MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) assay, and the cytotoxicity was evaluated in accordance with the criterion of GB/T16886.5-2003/ISO10993-5:1999. As a result, these five brominated flame retardants showed inhibiting effect on the LO₂ cells in vitro experiments. PBDE-47, PBDE-99 and HBCD showed dose-response relation.

Keywords: 2, 2, 4, 4-tetrabromodiphenyl ether (PBDE-47); 2,2',4,4',5-pentabromodiphenyl ether (PBDE-99); polybrominated diphenyl ethers 206 (PBDE-206); hexabromocyclododecane (HBCD); tetrabromobisphenol A (TBBPA); liver cell (LO₂)

多溴联苯醚类(PBDEs)、六溴环十二烷(HBCD)、四溴双酚 A(TBBPA)是当前应用比较广泛的

溴阻燃剂,主要存在于家用电器、家具填充物、塑料制品、纺织品原料和建筑材料等。近几年关于此类

收稿日期: 2012-07-21 录用日期: 2012-09-29

基金项目: 海洋公益性科研专项(201105013)

作者简介: 那广水(1977-),男,副研究员,主要研究方向: 环境新兴污染物分析与毒理研究, E-mail: gsna@nmemc.gov.cn

物质的污染不断有报道,溴阻燃剂不仅在陆地上广泛存在,同时也已经在海洋中被检测到,溴阻燃剂对环境的污染日益受到研究者的重视^[1-2]。目前,已发现 PBDEs 对实验动物的肾、甲状腺、神经、内分泌和生殖系统等均具有一定的毒性并具有一定的致癌性^[3-4]。比利时学者通过调查后检测得出,HBCD 以灰尘状态暴露水平与人血清中的浓度呈统计学相关^[5];TBBPA 毒性主要表现为实验动物肝损伤^[6],会导致幼鼠肾多囊损坏^[7]。目前,5 种溴阻燃剂在多数实验表现出对动物具有一定毒性,但尚未有针对人肝细胞的毒性报道。肝脏是人体重要的解毒器官,如果肝细胞受损,人机体解毒功能将受到严重影响,因此,本研究采用四甲基偶氮噻唑蓝比色法(MTT 法)探讨 5 种常用溴阻燃剂对人肝细胞(LO₂)的细胞毒性作用。

1 材料与方法(Materials and methods)

1.1 材料与仪器

仪器: MCO175 二氧化碳培养箱(SANYO 公司,日本); SW-CJ-HF 型净化工作台(苏州集团苏州安泰空气技术有限公司); RT-2100C 酶标仪(中国成都贝斯达仪器)。

试剂: MTT (Sigma 公司,美国); DMSO(生工生物工程上海有限公司,纯度 >99%);

实验细胞: 人肝细胞(LO₂), CCTCC 编号为 GDC079,购自武汉大学保藏中心。

1.2 实验方法

1.2.1 MTT 法测定 5 种溴阻燃剂对肝细胞生长作用的影响

细胞接种与培养: 用 0.25% 胰酶消化处理处于对数生长期的肝细胞,再将肝细胞用含 10% 胎牛血清(FCS)的 RPMI 1640 培养液配置成 5 × 10³ 个·mL⁻¹ 的细胞悬液,设阴性对照组、5 种溴阻燃剂不同实验浓度组,每孔接种 100 μL 浓度为 5 × 10³ 个·mL⁻¹ 的肝细胞。

加药干预: 细胞贴壁后,弃去孔内培养液,阴性

对照组加入新鲜含有 10% FCS 的 RPMI1640 培养液 200 μL; 5 种溴阻燃剂不同实验浓度组每孔加入对应的含药培养基各 200 μL,5 种溴阻燃剂浓度见表 1,每个药品浓度分别做 8 个平行孔,放入培养箱中孵育 24 h。呈色: 弃掉 96 孔板内培养液,每孔加入含 10% FCS 的 RPMI 1640 培养液 180 μL 和 5 mg·mL⁻¹ MTT 溶液 20 μL,放入二氧化碳培养箱中,继续孵育 4 h 后终止培养; 弃去孔内培养液,每孔加入 DMSO 溶液 150 μL,用微量振荡器振荡 10 min,使形成的甲臜完全溶解^[8]。在酶联免疫检测仪上选定 490 nm 波长处测定各组的吸光度(OD 值)。

1.2.2 5 种溴阻燃剂加药后肝细胞相对增殖率及毒性评价

根据测定的各组 OD 值计算各组细胞相对增殖率(RGR)。RGR 计算公式:

$$RGR = \text{实验组吸光值} / \text{阴性组吸光值} \times 100\%。$$

按照 GB/T16886.5-2003/ISO10993-5: 1999 标准评价各实验组细胞毒性。细胞评级标准每级毒性的 RGR 值: 0 级, ≥100%; 1 级 75% ~ 99%; 2 级 50% ~ 74%; 3 级 25% ~ 49%; 4 级 1% ~ 24%; 5 级为 0。

1.2.3 数据处理

采用 SPSS13.0 统计分析软件进行方差分析(analysis of variance, ANOVA)。

2 结果(Results)

2.1 MTT 法测定 5 种溴阻燃剂对肝细胞生长作用的影响

采用 MTT 法所测阴性对照组及 5 种溴阻燃剂各实验组细胞吸光值(OD 值)见表 2。由表 2 所示,与阴性对照组比较,当 PBDE-47 浓度为 20 μg·mL⁻¹时,LO₂细胞生长受抑制,其 OD 值低于阴性对照组(差异具有统计学意义 P < 0.05),40 ~ 80 μg·mL⁻¹时,其 OD 值显著低于阴性对照组(差异具有极其显著意义 P < 0.001); 当 PBDE-99 浓度为 31.25 ng·mL⁻¹时,其 OD 值低于阴性对照组(差异

表 1 阻燃剂实验组浓度

Table 1 Flame retardant concentrations in experimental groups

阻燃剂	阴性对照	1	2	3	4	5
PBDE47/(μg·mL ⁻¹)	0.00	5.00	10.00	20.00	40.00	80.00
PBDE99/(ng·mL ⁻¹)	0.00	7.81	15.62	31.25	62.50	125.00
PBDE206/(μg·mL ⁻¹)	0.00	1.00	2.00	4.00	8.00	16.00
HBCD/(μg·mL ⁻¹)	0.00	5.00	10.00	20.00	40.00	80.00
TBBPA/(μg·mL ⁻¹)	0.00	1.25	2.50	5.00	10.00	20.00

注: 1、2、3、4、5 分别代表表 1 中 5 种溴阻燃剂实验浓度组,下同。

表2 对照组及各实验组细胞的OD值($\bar{x} \pm s$)Table 2 Optical density of controls and five brominated flame retardant groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	PBDE-47	PBDE-99	HBCD	TBBPA	PBDE-206
阴性对照组	0.688 ± 0.076	0.676 ± 0.068	0.712 ± 0.190	0.811 ± 0.030	0.736 ± 0.110
1	0.649 ± 0.093	0.650 ± 0.110	0.640 ± 0.139	0.622 ± 0.056***	0.632 ± 0.108*
2	0.631 ± 0.074	0.625 ± 0.117	0.609 ± 0.055	0.380 ± 0.055***	0.567 ± 0.101***
3	0.591 ± 0.094*	0.534 ± 0.108*	0.607 ± 0.138	0.128 ± 0.025***	0.371 ± 0.121***
4	0.523 ± 0.089**	0.505 ± 0.092**	0.578 ± 0.058*	0.168 ± 0.026***	0.384 ± 0.039***
5	0.485 ± 0.100***	0.391 ± 0.144***	0.496 ± 0.111**	0.159 ± 0.018***	0.177 ± 0.098***

注:* 与阴性对照组相比,差异显著($P < 0.05$); 差异非常显著($P < 0.01$); 差异极其显著($P < 0.001$)。

具有统计学意义 $P < 0.05$); 125 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 OD 值显著低于阴性对照组(差异具有极其显著意义 $P < 0.001$); 当 HBCD 在 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 OD 值低于阴性对照组(差异具有统计学意义 $P < 0.05$); 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 OD 值显著低于阴性对照组(差异具有非常显著意义 $P < 0.01$); 当 TBBPA 在 1.25 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 OD 值显著低于阴性对照组(差异具有极其显著意义 $P < 0.001$); 当 PBDE-206 在 1.00 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 OD 值低于阴性对照组(差异具有统计学意义 $P < 0.05$); 2 ~ 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 其 OD 值显著低于阴性对照组(差异具有极其显著意义 $P < 0.001$)。以上结果显示, 5 种溴阻燃剂各实验浓度组对人肝体外细胞均具有不同程度的毒性。

2.2 5 种溴阻燃剂加药后肝细胞相对增殖率及毒性

依据 RGR, 判断 5 种溴阻燃剂对肝细胞 LO_2 相对增殖率及细胞毒性评级见表 3。如表 3 所示, 参照 GB/T16886.5 - 2003/ISO10993-5: 1999 标准, 以阴性对照为基准, 当 PBDE-47 浓度为 5 ~ 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 1 级, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时毒性为 2 级; 当 PBDE-99 浓度为 7.81 ~ 31.25 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 1 级, 62.5 ~ 125 $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 2 级; 当 HBCD 浓度为 5 ~ 40 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 1 级, 80 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 2 级; 当 TBBPA 浓度为 1.25 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 1 级, 5 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 4

级; 当 PBDE-206 浓度为 1 ~ 2 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 1 级; 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时, 毒性为 4 级。

3 讨论 (Discussion)

MTT 实验方法可以快速、准确地判断环境污染物的细胞毒性, 评价化学污染物的环境危害及人体健康风险^[9]。MTT 法中 OD 值的变化反映了活细胞的数量和细胞的活性, 细胞相对增殖率和体外细胞毒性评价也是多数学者采用的一种评定细胞毒性的参数。从整个实验数据来看, 5 种溴阻燃剂对肝细胞 LO_2 毒性评级由 1 级到 4 级, TBBPA 浓度为 5 ~ 20 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 和 PBDE-206 浓度为 16 $\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 时毒性最高为 4 级, 此结果可为进一步评价 5 种环境污染物的毒性及其监测奠定基础。同时通过分析实验过程中药物作用后细胞有漂浮现象, 引起深刻的思考, 最终是细胞凋亡还是细胞坏死, 此实验机制有待于进行下一步的实验研究。在本实验过程中, 仅从 PBDE-47 毒性级与 TBBPA 毒性级相比较不能证明 PBDE-47 对人体的毒性小, 还有可能是两种阻燃剂作用于细胞的机理不同, PBDE-47 是慢性毒性, 而 TBBPA 产生的是急性毒性, 实验有待于进一步的验证。笔者在完成初步细胞增殖抑制实验的基础上, 将进一步对其死亡机理进行测定。

表3 细胞相对增殖率及细胞毒性评级

Table 3 Cell proliferation percentage and cytotoxicity grade of five brominated flame retardants

组别	PBDE-47		PBDE-99		HBCD		TBBPA		PBDE-206	
	RGR/%	毒性级	RGR/%	毒性级	RGR/%	毒性级	RGR/%	毒性级	RGR/%	毒性级
阴性对照	100.00	0	100.00	0	100.00	0	100.00	0	100.00	0
1	94.13	1	96.19	1	89.81	1	76.68	1	85.79	1
2	91.66	1	92.36	1	81.19	1	46.78	3	76.96	1
3	85.95	1	79.02	1	85.19	1	15.82	4	50.38	2
4	76.05	1	74.75	2	81.19	1	20.75	4	52.15	2
5	70.56	2	57.89	2	69.56	2	19.62	4	23.97	4

注: RGR: 细胞相对增殖率。

参考文献:

- [1] 黄家乐, 朱军山, 洪在地, 等. 电子电气设备中塑料阻燃 PBDE 使用的危害性[J]. 家电科技, 2005, 7: 41 - 43
- [2] de Wit CA. An overview of brominated flame retardants in the environment [J]. Chemosphere, 2002, 46(5): 583 - 624
- [3] Darnerud P O, Wong J, Bergman A, et al. Common viral infection affects pentabrominated diphenyl ether (PBDE) distribution and metabolic and hormonal activities in mice [J]. Toxicology, 2005, 210(2/3): 159 - 167
- [4] Branchi F, Capone A, Vitalone F, et al. Early developmental exposure to BDE 99 or Aroclor 1254 affects neurobehavioral profile: Interference from the administration route [J]. Neurotoxicology, 2005, 26(2): 183 - 192
- [5] Roosens L, Abdallah M A, Harrad. Exposure to hexabromocyclododecanes (HBCDs) via dust ingestion, but not diet, correlates with concentrations in human serum: Preliminary results [J]. Environmental Health Perspective, 2009, 117(11): 1707 - 1712
- [6] Szymanska J A, Piotrowski J K. Hepatotoxicity of tetrabromobisphenol a in rats [J]. Toxicology Letters, 1998, 95(Supplement 1): 163
- [7] Fukuda N, Ito Y, Yamaguchi M, et al. Unexpected nephrotoxicity induced by tetrabromobisphenol A in newborn rats [J]. Toxicology Letters, 2004, 150(2): 145 - 155
- [8] 吕晓迎, Kappert H F. 牙科材料细胞毒性评定的新方法[J]. 中华口腔医学杂志, 1995, 30(6): 377 - 379
- [9] Wenning R J. Uncertainties and data needs in risk assessment of three commercial polybrominated diphenyl ethers: Probabilistic exposure analysis and comparison with European Commission results [J]. Chemosphere, 2002, 46(5): 779 - 796 ◆