

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220914001

丰一兴, 王济洲, 段鹤君, 等. 基于高内涵分析技术表征磷酸三苯酯的肺细胞毒性[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(2): 259-268

Feng Y X, Wang J Z, Duan H J, et al. Characterizing cytotoxicity of lung cells induced by triphenyl phosphate based on high content analysis [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2023, 18(2): 259-268 (in Chinese)

基于高内涵分析技术表征磷酸三苯酯的肺细胞毒性

丰一兴¹, 王济洲², 段鹤君¹, 李伟红¹, 邵兵^{1,*}

1. 北京市疾病预防控制中心食物中毒诊断溯源技术北京市重点实验室, 北京 100013

2. 中国科学院大学, 北京 100049

收稿日期: 2022-09-14 录用日期: 2022-11-20

摘要: 磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPhP)是环境中最常见的有机磷酸酯阻燃剂之一,具有较强的挥发性,每天持续摄入TPhP,可能对人体肺部组织产生不利影响。本研究以人源的非小细胞肺癌细胞系(A549)为研究对象,采用高内涵分析系统检测50、100和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP对细胞核形态、核膜通透性、线粒体纹理结构、线粒体膜电位、细胞内氧自由基水平、磷酸化组蛋白H2AX(phosphorylated histones H2AX, pH2AX)、细胞色素C和细胞凋亡等参数的影响。结果显示,与对照组相比,随着TPhP暴露浓度的增加,A549细胞活性显著下降,细胞核面积增加、核亮度降低和核碎片化程度加剧,核膜通透性增高,细胞核的各参数在200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP组变化最显著;细胞内氧自由基水平的显著升高,进一步导致线粒体损伤和细胞色素C释放,当TPhP为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,线粒体损伤程度最严重;当TPhP为100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,pH2AX含量显著升高,表明DNA受到损伤;100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP主要诱导细胞发生早期凋亡,而200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP诱导细胞发生早期凋亡和晚期凋亡。TPhP对人肺细胞呈现明显的细胞毒性,可引起氧化应激介导的DNA损伤和线粒体损伤,并最终导致人肺细胞发生凋亡。本研究结果为科学评估TPhP对人体健康的危害提供了数据支持和理论依据。

关键词: 磷酸三苯酯;人肺细胞;细胞毒性表型;高内涵筛选分析

文章编号: 1673-5897(2023)2-259-10 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Characterizing Cytotoxicity of Lung Cells Induced by Triphenyl Phosphate Based on High Content Analysis

Feng Yixing¹, Wang Jizhou², Duan Hejun¹, Li Weihong¹, Shao Bing^{1,*}

1. Beijing Center for Disease Control and Prevention, Beijing Key Laboratory of Diagnostic and Traceability Technologies for Food Poisoning, Beijing 100013, China

2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 14 September 2022 accepted 20 November 2022

Abstract: Triphenyl phosphate (TPhP) is one of the most commonly detected organophosphorus flame retardants (OPFRs) in the environment. Continuous daily exposure to TPhP may adversely impact human lung tissues due to its high volatility. In this study, human lung carcinoma cell line (A549) was selected as the cell model and the effects of 50, 100, and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP on nuclear morphology, nuclear membrane permeability, mitochondrial texture structure, mitochondrial membrane potential, intracellular reactive oxygen species, phosphorylated histones

第一作者: 丰一兴(1979—),女,副研究员,研究方向为生态毒理学, E-mail: fengyixiao@126.com

* 通信作者(Corresponding author), E-mail: shaobingch@sina.com

H2AX (pH2AX), cytochrome C and cell apoptosis were detected using the high-content screening (HCS) system. As the results shown, with the increased exposure concentration of TPhP, a decrease in cell viability, an increase in the nuclear area, a decrease in the nuclear intensity, an elevated degree of nuclear fragmentation, and an increase in the nuclear membrane permeability were observed. The changes in the nuclear multiple parameters were most significant in the 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP group. Moreover, with the increase of intracellular reactive oxygen species levels, the damage of mitochondria was aggravated and cytochrome C was released. At the dosage of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP, the degree of mitochondrial damage was the most serious. In addition, the content of pH2AX was significantly increased at the dosage of 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP, which indicated the presence of DNA damage. Finally, early apoptosis was induced by 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP treatment, while early and late apoptosis was induced after exposure to 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP. In conclusion, TPhP showed obvious cytotoxic effects on lung cells and caused oxidative stress-mediated DNA damage and mitochondrial impairment, thereby leading to the cell apoptosis of lung cells. The completion of this study provides theoretical basis and data supports for the scientific evaluation of human health risk induced by TPhP.

Keywords: triphenyl phosphate; human lung cells; cytotoxic phenotype; high content screening analysis

随着 2005 年溴代阻燃剂在全球范围内被逐步禁用,作为溴代阻燃剂的替代物,有机磷酸酯阻燃剂 (organophosphorus flame retardants, OPFRs)被广泛应用于塑料制品、装修材料、电子产品和建筑材料中,以降低各种产品的易燃性。据估计,全球 OPFRs 的年均消费增长率为 4.9%^[1]。环境调查数据显示,OPFRs 已成为环境介质中检出频率较高和存在范围较广的一类化学污染物^[2]。

磷酸三苯酯(triphenyl phosphate, TPhP)是一种最常见的芳香基 OPFRs,由于具有良好的阻燃性和增塑性,被广泛用于聚氯乙烯、电子产品及液压油中^[3]。与其他 OPFRs 类似,TPhP 主要以物理添加方式而非化学键合的方式存在,因此很容易从各种产品中释放进入环境。多项研究表明,TPhP 广泛存在于包括空气、水、土壤、灰尘和沉积物等在内的多种环境介质中,甚至在人体样本如血液、胎盘、尿液和母乳中也有较高检出,具有分布广、检出率高、浓度高等特点^[1-5]。例如,在我国的室内灰尘中,TPhP 的平均浓度为 610 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[6]。Li 等^[7]发现,在广东廉江电子垃圾回收区的沉积物中,TPhP 的浓度高达 4 260 ~ 1 710 000 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ 。在中国华北地区,95% 的河流水样中检出 TPhP,最高浓度为 15.7 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[8]。此外,在人体样本中也检测到了 TPhP,He 等^[9]研究发现,儿童尿液中的 TPhP 浓度为 0.3 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ 。我国渤海湾人体血清中,TPhP 的平均浓度为 10.2 $\text{ng}\cdot\text{g}^{-1}$ ^[10]。北京地区采集的母乳中,TPhP 是检出频率最高的有机磷酸酯阻燃剂之一,检出率高达 99%,中间浓度值为 1 070 $\text{ng}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[11]。

TPhP 引起的健康危害日益加剧,对生态稳定和人类健康的毒理效应逐步显露^[4-5]。毒理学数据表明,TPhP 具有神经毒性、生殖发育毒性、肝脏毒性及内分泌干扰作用等多种毒性效应^[2],但目前对肺脏的毒性研究明显不足,仅有的文献显示,TPhP 可导致肺细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平升高和 DNA 损伤加剧^[12]。肺脏是人体的呼吸器官,是机体进行气体交换的重要场所,TPhP 具有较高的挥发性,极易通过呼吸系统直接进入人体的肺部组织,从而对人体的肺细胞造成极大的危害,因此,有必要研究 TPhP 对肺细胞的毒理效应。

本研究拟选择人源的非小细胞肺癌细胞系(human lung carcinoma cell line, A549)为研究对象,采用高内涵细胞表型分析技术平台,系统地测定 TPhP 的肺细胞毒性表型特征,明确 TPhP 的肺细胞毒性效应,为科学评估 TPhP 的人体健康风险提供理论依据和数据支持。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 药物和试剂

Ham's F-12K 培养基购自武汉普诺赛生命科技有限公司;胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)、胰蛋白酶、抗生素、细胞核染料 Hoechst 33342、细胞核膜通透性染料 TOTO-3、活性氧染料 CM-H2DCFDA、线粒体膜电位染料 JC-1、线粒体探针 Mito Tracker Green、细胞凋亡检测染料、小鼠抗细胞色素 C 单克隆抗体(33-8200)、兔抗磷酸化组蛋白(phosphorylated histones H2AX, pH2AX)单克隆抗体(MA5-33062)、Alexa Fluor Plus 488 标记的羊抗小鼠

IgG 二抗(A32723)、Alexa Fluor Plus 555 标记的羊抗兔 IgG 二抗(A32732)均购自美国 Thermo Fisher 公司;TPhP(纯度 $\geq 99\%$,CAS 115-86-6),二甲基亚砜(dimethyl sulphoxide, DMSO)购自美国 Sigma 公司;细胞计数试剂盒(cell counting kit-8, CCK-8)和牛血清白蛋白(bovine serum albumin, BSA)购自碧云天生物科技有限公司;96 孔细胞培养板、96 孔底透黑板、6 孔细胞培养板、15 mL 无菌离心管等细胞培养器皿均购自美国 Corning 公司。多聚甲醛溶液、TritonX-100、酒精及其他常规化学试剂为国产试剂。

1.2 细胞培养与处理

A549 细胞购自上海复祥生物科技有限公司,细胞接种于含 10% FBS 的 F-12K 培养液,37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养。A549 细胞以每孔 1×10^4 接种于 96 孔细胞培养板(黑边底透)中,培养箱中培养过夜。TPhP 溶解于 DMSO 制成不同浓度的暴露溶液,等量的 DMSO 作为溶剂对照组。

1.3 细胞活性检测

A549 细胞经 0 ~ 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 染毒 24 h 后,采用 CCK-8 试剂进行细胞活性的检测。每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,在细胞培养箱中继续孵育 2 ~ 3 h。实验结束后,用多功能酶标仪测定 450 nm 处的吸光值(optical density, OD)。细胞存活率计算公式如下:

$$\text{细胞存活率}/\% = [\text{OD}(450)_{\text{实验组}} - \text{OD}(450)_{\text{调零}}] / [\text{OD}(450)_{\text{对照组}} - \text{OD}(450)_{\text{调零}}] \times 100\%。$$

1.4 细胞核和核膜通透性(nuclear membrane permeability, NMP)分析

用预热至 37 °C 的磷酸盐缓冲生理盐水(phosphate buffered saline, PBS)配制含有细胞核染料 Hoechst 33342 和核膜通透性染料 TOTO-3 的混合细胞染料。A549 细胞进行 50、100 和 200 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 染毒 24 h 后(后续实验的染毒剂量与此相同),用 PBS 洗 2 次,每孔加入 100 μL 染色工作液,于 37 °C 避光染色 15 min,洗板后,再次加入 PBS 上机检测。

1.5 细胞活性氧(ROS)和线粒体膜电位(mitochondrial membrane potential, MMP)检测

用预热至 37 °C 的 PBS 配制含有细胞核染料 Hoechst 33342 和活性氧染料 CM-H₂DCFDA 的混合细胞染料进行 ROS 的检测;用含有细胞核染料 Hoechst 33342 和线粒体膜电位染料 JC-1 的混合细

胞染料进行 MMP 的测定。染毒处理 24 h 后,用 PBS 洗涤细胞,每孔加入 100 μL 染色工作液,于 37 °C 避光染色 15 min 或 20 min。洗板后,再次加入 PBS 上机检测。MMP 以红色/绿色荧光的比值来衡量线粒体去极化的程度,比值越高表明线粒体去极化越低,MMP 增加,反之去极化增加,MMP 下降。

1.6 线粒体纹理结构分析

给药处理 24 h 后,吸弃 96 孔板中的培养基,每孔细胞用 PBS 轻轻洗涤 2 次,用预热至 37 °C 的 HB-SS 配制线粒体荧光探针染料 Mito Tracker Green,于 37 °C 避光染色 1 h。洗板后,用细胞核染料 Hoechst 33342 染色 10 ~ 15 min。洗板后,再次加入 PBS 上机检测。

1.7 pH2AX 蛋白和细胞色素 C 蛋白的检测

给药处理 24 h 后,吸弃 96 孔板中的培养基,每孔细胞用 PBS 轻轻洗涤 1 次,先用 4% 多聚甲醛溶液固定 15 min,再用 0.1% Triton X-100 透膜 10 min,吸弃透膜液,PBS 洗板后,加入含 3% BSA 的封闭液,室温孵育 30 min,吸弃封闭液,加入一抗工作液(小鼠抗细胞色素 C 抗体按 1:300 稀释,兔抗 pH2AX 抗体按 1:200 稀释),4 °C 避光孵育过夜。吸弃一抗工作液,用 PBS 清洗细胞 3 次,再加入对应的二抗工作液(Alexa Fluor Plus 488 标记的羊抗小鼠 IgG 二抗按 1:1 000 稀释,或 Alexa Fluor Plus 555 标记的羊抗 IgG 二抗按 1:500 稀释),37 °C 避光孵育 1 h。吸弃二抗工作液,用 PBS 清洗细胞 2 次,用细胞核染料 Hoechst 33342 染色 10 ~ 15 min,洗板后采用高内涵分析仪进行检测。

1.8 细胞凋亡检测

用 Annexin V 结合缓冲液配制染色工作液,染色工作液为 Annexin V、PI 和 Hoechst 33342 的混合细胞染料。给药处理 24 h 后,吸弃 96 孔板中的培养基,用预冷的 PBS 轻轻洗涤细胞 2 次,每孔加入 50 μL 染色工作液,于 37 °C 避光染色 15 min,洗板后,再次加入 PBS 上机检测。

1.9 统计学处理

采用 SPSS 21.0 统计分析软件进行单因素方差分析(ANOVA),数据结果用平均值 $\pm$ 标准误差表示, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。细胞凋亡率由高内涵分析系统的 Harmony 4.9 图像分析软件直接得出。TPhP 抑制 50% 细胞活性时的浓度值(half maximal inhibitory concentration, IC₅₀)由 GraphPad Prism 8.0 软件进行非线性回归分析得出。

2 结果 (Results)

2.1 TPhP 对 A549 细胞活性的影响

A549 细胞经 0、0.3、1、3、10、30、50、70、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TPhP 暴露 24 h 后,经 CCK-8 方法进行细胞活性的分析。结果显示,10 ~ 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组的 A549 细胞活性显著降低,分别为对照组的 88.4%、81.6%、76.9%、63.9%、38.8% 和 28.6%,其他各剂量组的肺细胞活性没有受到显著影响(图 1(a))。利用非线性回归方法分析得出 TPhP 的 IC_{50} 为 94.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图 1(b))。

2.2 TPhP 对 A549 细胞核形态的影响

高内涵分析系统可以对荧光标记的细胞核进行多参数分析,包括细胞核的形态、细胞核的均匀程度及细胞核的碎片化程度。细胞核的均匀程度可以通

过细胞核的荧光强度来表征,而细胞核碎片化程度可以通过细胞核荧光强度的变异系数(coefficient of variation, CV 值)进行评估。以 Hoechst 33342 标记细胞核,通过荧光成像及高内涵分析系统进行定量分析,获得细胞核多参数的值,以参数变化率的百分值作图,结果如图 2 所示。与对照组相比,随着 TPhP 作用浓度的增加,细胞核变化程度随之增加。在 50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,细胞核面积显著增加($P<0.05$),且与浓度呈正向的剂量-效应关系;50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组的细胞核亮度降低($P<0.05$),说明细胞核的均匀程度降低;100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组的细胞核荧光强度变异系数增大,表明细胞核碎片化程度加剧($P<0.01$)。

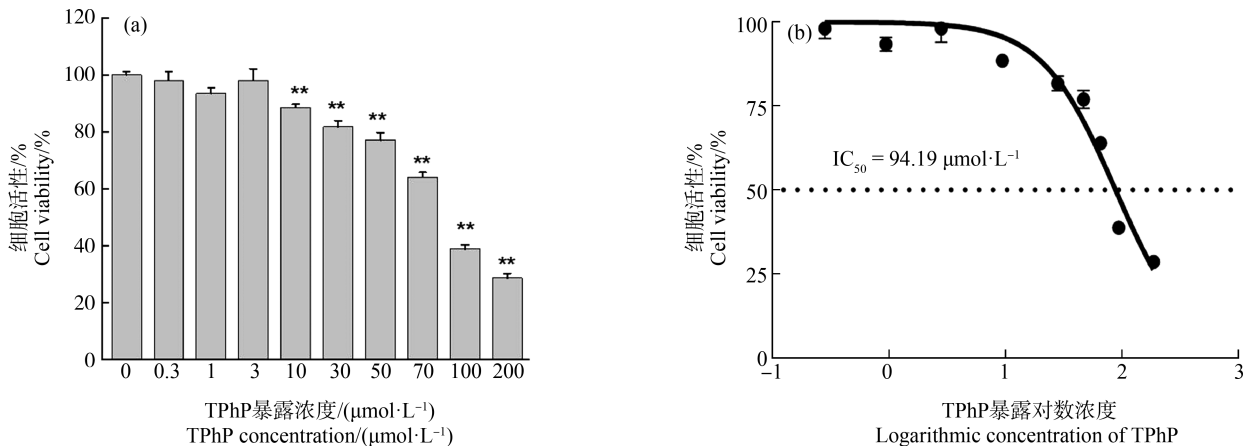


图1 磷酸三苯酯(TPhP)作用 A549 细胞 24 h 后对细胞活性的影响

注:图(a)为 A549 细胞经 50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露后的细胞活性(%),每个值代表 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差;
“*”代表不同剂量下与对照组相比有显著性差异(* $P<0.01$)。

Fig. 1 Effect of triphenyl phosphate (TPhP) on cell viability in A549 cells after 24 h treatment

Note: Figure (a), cell viability (%) induced by 50, 100 and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP in A549 cells, and results are means $\pm$ SD of three replicate experiments;
“*” represents the significant difference between the control group and the TPhP treatment groups (Compared with the control, ** $P<0.01$).

2.3 TPhP 对 A549 细胞线粒体纹理结构的影响

用 Mito Tracker Green 荧光探针标记线粒体(图 3(a)),利用高内涵纹理分析模块,对细胞线粒体的纹理结构及线粒体质量进行评估,以参数变化率的百分值作图。由图 3(b)可知,与对照组相比,在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,线粒体数量显著增加($P<0.01$),分别超过对照组数量的 128.9%和 72.6%,而在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 组,线粒体数量没有显著性变化;在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,线粒体的面积显著降低($P<0.01$),降幅分别为对照组的 16.4%和 15.0%;对线粒

体质量进行评估,发现 50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,线粒体质量均呈下降趋势($P<0.01$),分别降低 15.8%、44.1%和 32.8%,其中 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组的线粒体损伤程度最严重。

2.4 TPhP 对 A549 细胞内活性氧(ROS)水平、NMP 和 MMP 的影响

以 CM-H2DCFDA、TOTO-3 和 JC-1 分别标记 ROS(图 4(a))、NMP(图 4(b))和 MMP(图 4(c)),通过荧光成像及高内涵分析系统进行定量分析,以参数变化率的百分值作图,结果如图 4(d)所示。与对照组相比,TPhP 暴露组的 ROS 水平显著升高($P<0.05$),

在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 组达到最高水平,达到对照组的 184.7%;在 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,NMP 显著增加($P<0.01$), $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 组

没有显著性变化;在 50、100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,MMP 显著降低($P<0.01$),分别降低 35.3%、49.5% 和 61.6%,且与浓度呈一定的剂量-效应关系。

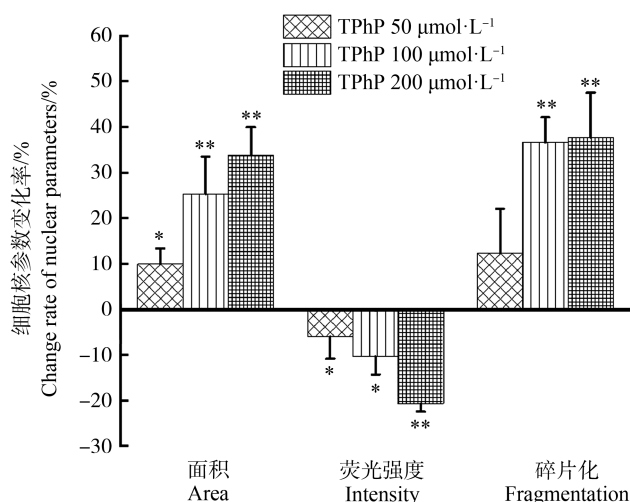


图2 磷酸三苯酯(TPhP)作用 A549 细胞 24 h 后细胞核参数的变化

注:A549 细胞经 50、100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 暴露后的细胞核参数变化率(%),每个值代表 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差;

“*”代表不同剂量下与对照组相比有显著性差异(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

Fig. 2 Change rate of cell nuclear parameters in A549 cells after 24 h treatment of triphenyl phosphate (TPhP)

Note: Change rate of nuclear parameters (%) induced by 50, 100 and $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP in A549 cells, and results are means $\pm$ SD of three replicate experiments; “*” represents the significant difference between the control group and the TPhP treatment groups

(Compared with the control, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$).

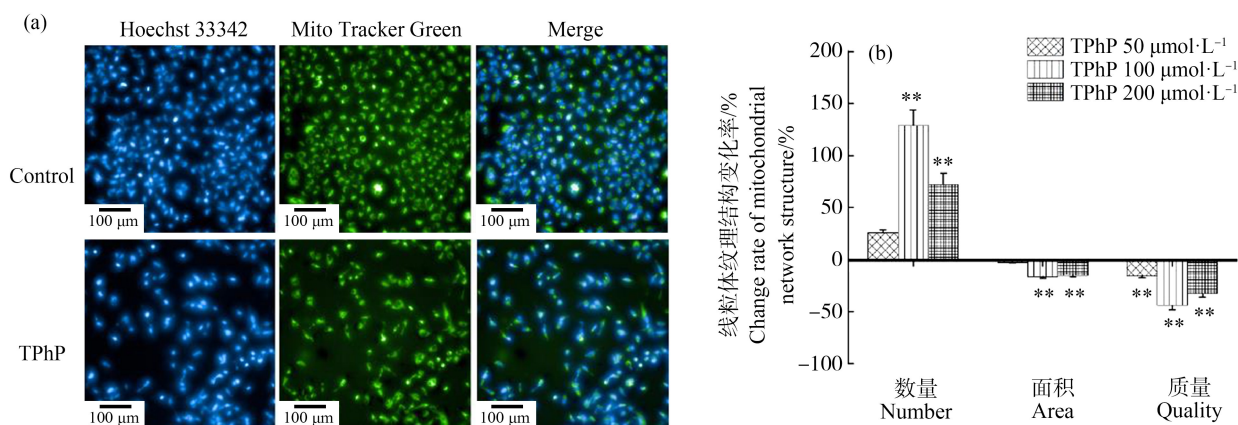


图3 磷酸三苯酯(TPhP)作用 A549 细胞 24 h 后线粒体纹理结构的变化

注:图(a)中 Control 为 DMSO 对照组,TPhP 为 $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 组,Hoechst 33342 标记细胞核,Mito Tracker Green 标记线粒体;

图(b)为 A549 细胞经 50、100 和 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP 暴露后的线粒体纹理结构变化率(%),每个值代表 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差;

“*”代表不同剂量下与对照组相比有显著性差异(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

Fig. 3 Change rate of mitochondrial network structure in A549 cells after 24 h treatment of triphenyl phosphate (TPhP)

Note: In figure (a), Control means DMSO treatment group, TPhP means $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP treatment group; nucleus was labeled with Hoechst 33342 and mitochondria was labeled with Mito Tracker Green; in figure (b), change rate of mitochondrial network structure (%) induced by 50, 100 and $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TPhP in A549 cells, and results are means $\pm$ SD of three replicate experiments; “*” represents the significant difference between the control group and the TPhP treatment groups (Compared with the control, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$).

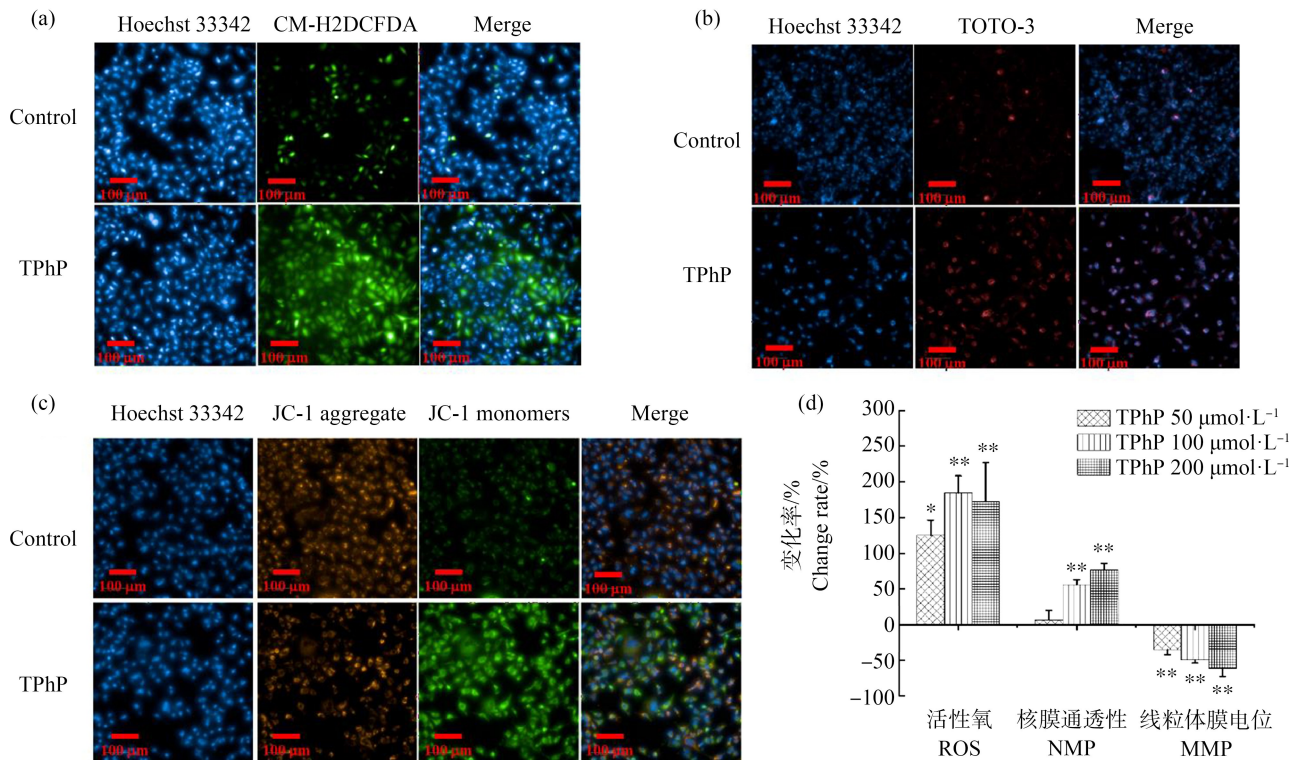


图 4 磷酸三苯酯 (TPhP) 作用 A549 细胞 24 h 后活性氧 (ROS)、核膜通透性 (NMP) 和线粒体膜电位 (MMP) 的变化

注:图(a)、图(b)和图(c)中 Control 为 DMSO 对照组, TPhP 为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 组;图(a)和图(b)中 Hoechst 33342 标记细胞核, CM-H2DCFDA 标记 ROS, TOTO-3 标记 NMP;图(c)中 Hoechst 33342 标记细胞核, JC-1 标记 MMP; JC-1 以聚集体形式存在时, 呈红色荧光(MMP 升高); JC-1 以单体形式存在时, 呈绿色荧光(MMP 降低);图(d)为 A549 细胞经 50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露后的 ROS、NMP 和 MMP 变化率(%), 每个值代表 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差;“*”代表不同剂量下与对照组相比有显著性差异(* $P<0.05$, ** $P<0.01$)。

Fig. 4 Change rate of reactive oxygen species (ROS), nuclear membrane permeability (NMP) and mitochondrial membrane potential (MMP) in A549 cells after 24 h treatment of triphenyl phosphate (TPhP)

Note: In figure (a), (b) and (c), Control means DMSO treatment group, TPhP means 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP treatment group; in figure (a) and (b), nucleus was labeled with Hoechst 33342, ROS was labeled with CM-H2DCFDA, NMP was labeled with TOTO-3; in figure (c), nucleus was labeled with Hoechst 33342 and MMP was labeled with JC-1; red fluorescence represents the aggregate of JC-1; green fluorescence represents monomer of JC-1; in figure (d), change rate of ROS, NMP and MMP (%) induced by 50, 100 and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP in A549 cells; results are means $\pm$ SD of three replicate experiments; “*” represents the significant difference between the control group and the TPhP treatment groups (Compared with the control, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$).

2.5 TPhP 对 A549 细胞 pH2AX 和细胞色素 C 表达量的影响

由图 5(a)和 5(c)可知,与对照组相比,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中细胞内 pH2AX 含量显著增加($P<0.01$),在 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组达到最高水平,含量增加 57.6%,表明 TPhP 作用可诱导细胞内 DNA 的损伤;由图 5(b)和 5(c)可知,在 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中,细胞色素 C 的含量显著增加($P<0.05$),表达量分别增加 16.9%和 13.8%。在 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组中, pH2AX 和细胞色素 C 的蛋白表达量均没有显著性变化。

2.6 TPhP 诱导 A549 细胞凋亡

采用 Annexin V 和 PI 双染法进一步检测 TPhP 对 A549 细胞凋亡的影响,当 Annexin V 染色明显, PI 染色不明显时,表示细胞发生早期凋亡;当 Annexin V 和 PI 双染明显时,表示细胞发生晚期凋亡(图 6(a))。由图 6(b)可知,与对照组相比,100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 处理 A549 细胞 24 h,诱导细胞发生早期凋亡现象明显($P<0.01$),引起的早期凋亡率分别为 30.7%和 34.9%,而细胞晚期凋亡率仅在 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 组具有显著性升高($P<0.05$),晚期凋亡率为 7.2%,其他 2 个剂量组均没有显著性变化。

3 讨论 (Discussion)

细胞的增殖活性和细胞活力是评价外界不利环境刺激对细胞毒性影响作用的关键指标。细胞活性结果显示,随着暴露浓度的增加,TPhP 呈现明显的细胞毒性作用。较高浓度(50、70、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 TPhP 作用 A549 细胞 24 h 后,细胞的活性显著下降。与此相似,Canbaz 等^[13]发现浓度高于 50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TPhP 可导致小鼠树突状细胞的存活率显著降低,An 等^[12]的研究同样发现高浓度(150 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)的 TPhP 作用 A549 细胞 24 h,可导致细胞的存活率显著降低,然而,与本文

的结果不同的是,50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TPhP 对 A549 细胞存活率无明显影响。这种差异可能与受试细胞的不同来源(虽然遗传背景相同)、不同的传代次数和生理状态有关。利用非线性回归的方法,计算 TPhP 的 IC_{50} 浓度为 94.19 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$,而中国仓鼠细胞和人肝细胞在 TPhP 处理 24 h 后的 IC_{50} 分别为 37 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 23.58 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ^[14-15]。综合以上的研究结果,可以发现,TPhP 暴露不同细胞 24 h 后, IC_{50} 基本在几十 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 左右。由此推测,低浓度 TPhP 胁迫不会引起细胞毒性,而高浓度 TPhP($\geq$ 几十 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)存在明显的急性细胞毒性。

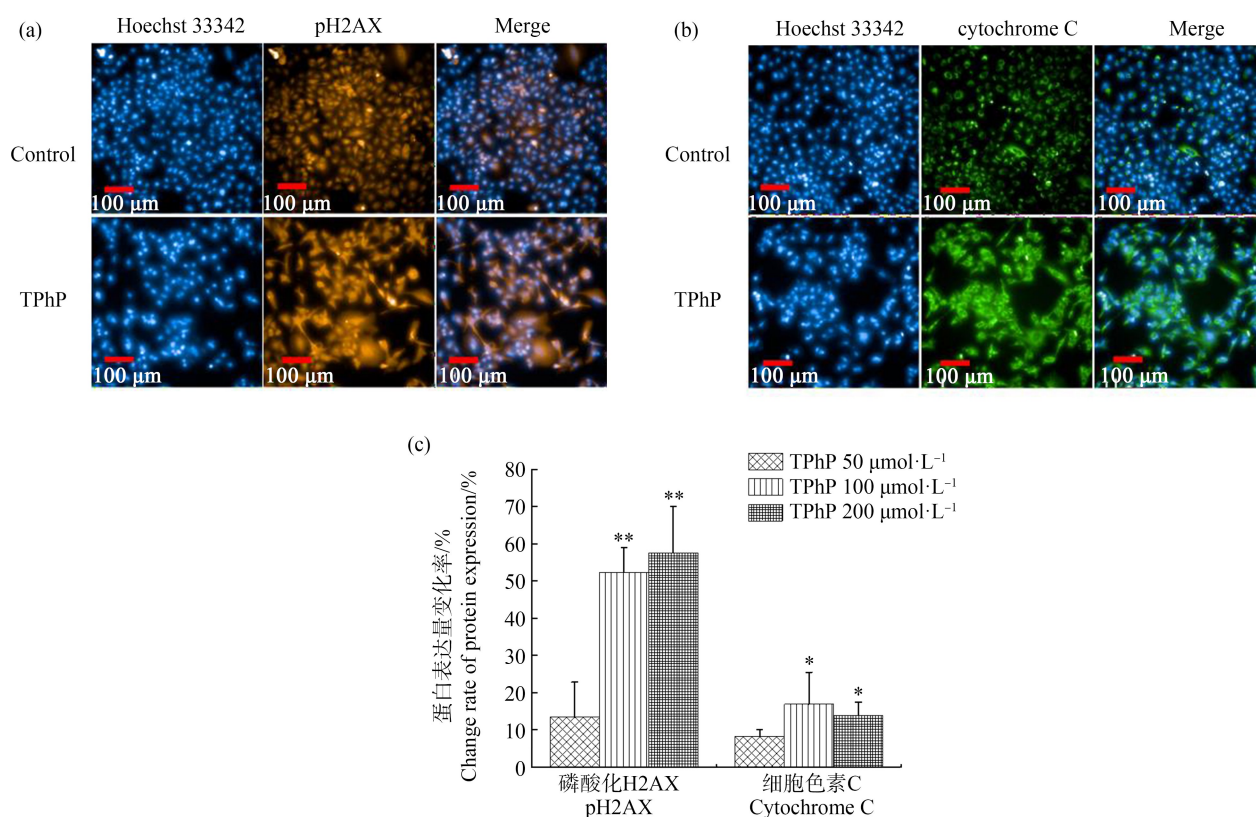


图5 磷酸三苯酯 (TPhP) 作用 A549 细胞 24 h 后磷酸化 H2AX (pH2AX) 和细胞色素 C 蛋白表达量的变化

注:图(a)和图(b)中 Control 为 DMSO 对照组,TPhP 为 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 组;Hoechst 33342 标记细胞核,pH2AX 蛋白由抗 pH2AX 的一抗和 Alexa Fluor Plus 555 标记的二抗染色,细胞色素 C 蛋白由抗细胞色素 C 的一抗和 Alexa Fluor Plus 488 标记的二抗染色;图(c)为 A549 细胞经 50、100 和 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露后的 pH2AX 和细胞色素 C 变化率(%),每个值代表 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差;“*”代表不同剂量下与对照组相比有显著性差异(* $P<0.05$,** $P<0.01$);pH2AX 为磷酸化组蛋白 H2AX。

Fig. 5 Change rate of protein expression of phosphorylated histones H2AX (pH2AX) and cytochrome C in A549 cells after 24 h treatment of triphenyl phosphite (TPhP)

Note: In figure (a) and (b), Control means DMSO treatment group, TPhP means 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP treatment group; nucleus was labeled with Hoechst 33342, pH2AX was stained with an anti-pH2AX primary antibody and an Alexa Fluor Plus 555-labeled secondary antibody, cytochrome C was stained with an anti-cytochrome C primary antibody and an Alexa Fluor Plus 488-labeled secondary antibody; in figure (c), change rate of pH2AX and cytochrome C (%) induced by 50, 100 and 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP in A549 cells, and results are means $\pm$ SD of three replicate experiments; “*” represents the significant difference between the control group and the TPhP treatment groups (Compared with the control, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$); pH2AX means phosphorylated histones H2AX.

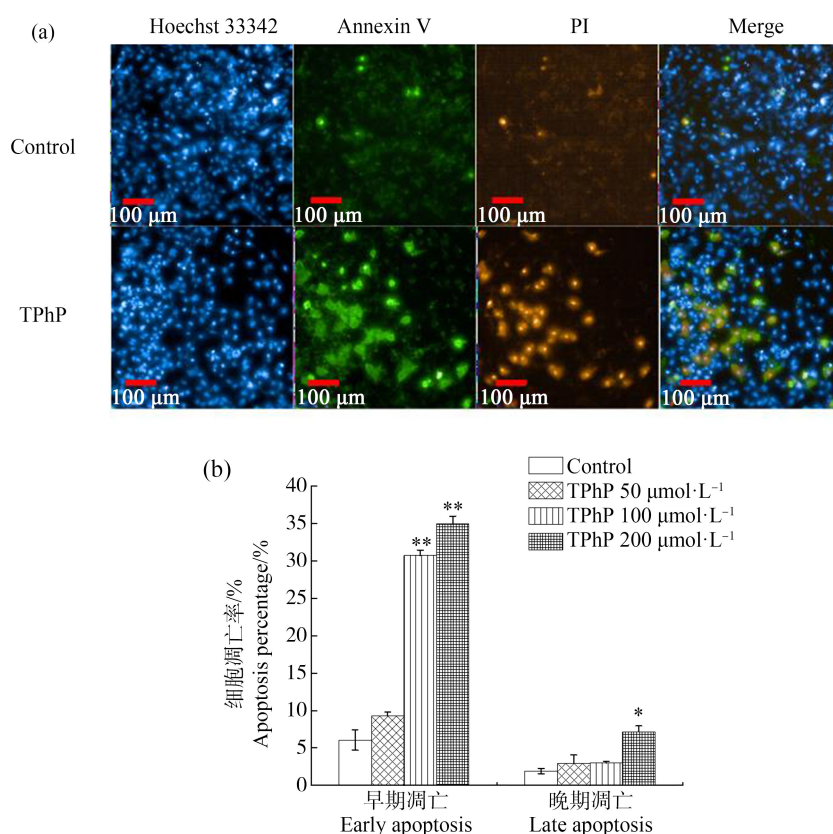


图 6 磷酸三苯酯 (TPhP) 作用 A549 细胞 24 h 后细胞凋亡率的变化

注:图(a)中 Control 表示 DMSO 对照组,TPhP 表示 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 组;Hoechst 33342 标记细胞核,Annexin V 标记早期凋亡细胞,PI 标记死亡细胞,Annexin V/PI 双染标记晚期凋亡细胞;图(b)为 A549 细胞经 50、100 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露后的细胞凋亡率(%),每个值代表 3 次重复实验的平均值 $\pm$ 标准差;“*”代表不同剂量下与对照组相比有显著性差异(* $P<0.05$,** $P<0.01$)。

Fig. 6 Apoptosis percentage of A549 cells after 24 h treatment of triphenyl phosphate (TPhP)

Note: In figure (a), Control means DMSO treatment group, TPhP means $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP treatment group; early apoptotic cells are Annexin V positive and PI negative; necrotic cells are PI positive; late apoptotic cells are both Annexin V and PI positive; in figure (b), apoptosis percentage (%) induced by 50, 100 and $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP in A549 cells, results are means $\pm$ SD of three replicate experiments; “*” represents the significant difference between the control group and the TPhP treatment groups (Compared with the control, * $P<0.05$ and ** $P<0.01$).

Hoechst 33342 染色实验观察到, $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 TPhP 仅使 A549 细胞核面积增加,细胞核的其他参数均未出现显著性变化,而在高浓度($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)TPhP 组,细胞均出现核面积增加、核碎片化程度加剧和核膜通透性增加等典型的细胞核损伤现象。进一步的免疫荧光实验结果显示, $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ TPhP 暴露组的 pH2AX 荧光强度相比对照组明显增强。pH2AX 是 DNA 损伤的重要标志物,DNA 双链断裂后会在 DNA 双链断裂点处形成 pH2AX 的聚集,它可以识别损伤后的 DNA,在保持基因组的完整性及 DNA 损伤修复中具有重要作用^[16]。因此,pH2AX 荧光强度的增强,进一步说明 TPhP 作用引起细胞内 DNA 的损伤。与本文的研究结果相似,之前关于 TPhP 的研

究同样发现,TPhP 可导致 A549 细胞 DNA 损伤加剧及 ROS 水平升高,推测过多 ROS 的产生造成 DNA 损伤^[12]。

线粒体是一种存在于大多数细胞中的由 2 层膜包被的细胞器,是细胞的动力工厂。在活细胞中,线粒体频繁地融合和分裂是细胞对抗内外环境的一种自我保护机制,这种相互拮抗的细胞功能导致线粒体在细胞中形成网状结构,线粒体在形态上表现为从分散的椭圆形或长管状到网络结构之间保持着此消彼长的动态平衡,这使得线粒体的动态变化极易受到细胞内外环境的影响^[17]。Le 等^[18]的研究显示,5 种 OPFRs 暴露 AML-12 肝细胞 24 h,导致线粒体网络结构破坏,线粒体出现碎片化现象。目前,线粒体的碎裂被作为评估环境化学物质毒性效应的敏感

生物标志物^[19]。本文的结果显示,TPHP($100\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)使 A549 细胞线粒体纹理结构受到明显损伤,线粒体网络化程度下降,呈现碎裂或断裂状,说明 TPHP 具有较强的线粒体毒性。

氧化应激是许多外源性化学污染物引起细胞毒性的主要作用机制。线粒体是细胞活性氧产生的主要场所,也是氧化损伤的主要靶点^[20]。细胞内过量 ROS 的产生会触发线粒体损伤。有研究表明,过量 ROS 可引起线粒体膜通透性转运孔道(mitochondrial permeability transition pore, MPTP)的开放^[21],释放细胞色素 C,激活半胱氨酸蛋白酶,最终导致细胞凋亡^[22]。本研究对细胞内 ROS 水平、MMP 及细胞色素 C 的定量分析结果显示,随着 TPHP 剂量的增加,细胞内 ROS 水平升高,MMP 降低,细胞色素 C 含量升高,表明 TPHP 能诱导 A549 细胞的氧化应激反应,使线粒体结构受损,MMP 下降,细胞色素 C 释放,最终导致细胞凋亡。

综上所述,本研究采用不同浓度 TPHP 处理 A549 细胞,发现较高浓度 TPHP 可抑制肺细胞的活力、损伤细胞核膜完整性、破坏线粒体网络结构和引起细胞 DNA 损伤,还可诱导线粒体途径释放细胞色素 C,最终导致细胞凋亡。虽然实验中所设定的暴露浓度高于环境中的一般浓度,但 TPHP 在短期暴露中表现出的细胞毒性,对 TPHP 的毒性评价具有一定的参考价值。而环境浓度的 TPHP 长时间暴露对人体是否存在一定的健康风险,需要更多的研究加以确证。

通信作者简介:邵兵(1973—),男,博士,教授,主要研究方向为食品中化学危害物的非靶向筛查技术,新型污染物的毒理学效应和人群健康影响。

参考文献(References):

- [1] Yang J W, Zhao Y Y, Li M H, et al. A review of a class of emerging contaminants: The classification, distribution, intensity of consumption, synthesis routes, environmental effects and expectation of pollution abatement to organophosphate flame retardants (OPFRs) [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(12): 2874
- [2] Du J, Li H X, Xu S D, et al. A review of organophosphorus flame retardants (OPFRs): Occurrence, bioaccumulation, toxicity, and organism exposure [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2019, 26(22): 22126-22136
- [3] Wei G L, Li D Q, Zhuo M N, et al. Organophosphorus flame retardants and plasticizers: Sources, occurrence, toxicity and human exposure [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 196: 29-46
- [4] Feng L P, Ouyang F X, Liu L P, et al. Levels of urinary metabolites of organophosphate flame retardants, TDCIPP, and TPHP, in pregnant women in Shanghai [J]. *Journal of Environmental and Public Health*, 2016, 2016: 9416054
- [5] He R W, Li Y Z, Xiang P, et al. Organophosphorus flame retardants and phthalate esters in indoor dust from different microenvironments: Bioaccessibility and risk assessment [J]. *Chemosphere*, 2016, 150: 528-535
- [6] Chen Y X, Liu Q Y, Ma J, et al. A review on organophosphate flame retardants in indoor dust from China: Implications for human exposure [J]. *Chemosphere*, 2020, 260: 127633
- [7] Li H R, La Guardia M J, Liu H H, et al. Brominated and organophosphate flame retardants along a sediment transect encompassing the Guiyu, China e-waste recycling zone [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 646: 58-67
- [8] Wang R M, Tang J H, Xie Z Y, et al. Occurrence and spatial distribution of organophosphate ester flame retardants and plasticizers in 40 rivers draining into the Bohai Sea, North China [J]. *Environmental Pollution*, 2015, 198: 172-178
- [9] He C, Toms L L, Thai P, et al. Urinary metabolites of organophosphate esters: Concentrations and age trends in Australian children [J]. *Environment International*, 2018, 111: 124-130
- [10] Gao D T, Yang J, Bekele T G, et al. Organophosphate esters in human serum in Bohai Bay, North China [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2020, 27(3): 2721-2729
- [11] Chen X L, Zhao X Z, Shi Z X. Organophosphorus flame retardants in breast milk from Beijing, China: Occurrence, nursing infant's exposure and risk assessment [J]. *Science of the Total Environment*, 2021, 771: 145404
- [12] An J, Hu J W, Shang Y, et al. The cytotoxicity of organophosphate flame retardants on HepG2, A549 and Caco-2 cells [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A, Toxic/Hazardous Substances & Environmental Engineering*, 2016, 51(11): 980-988
- [13] Canbaz D, Logiantara A, van Ree R, et al. Immunotoxicity of organophosphate flame retardants TPHP and TDCIPP on murine dendritic cells *in vitro* [J]. *Chemosphere*, 2017, 177: 56-64
- [14] Belcher S M, Cookman C J, Patisaul H B, et al. *In vitro* assessment of human nuclear hormone receptor activity

- and cytotoxicity of the flame retardant mixture FM 550 and its triarylphosphate and brominated components [J]. Toxicology Letters, 2014, 228(2): 93-102
- [15] Wang X Q, Li F, Liu J L, et al. New insights into the mechanism of hepatocyte apoptosis induced by typical organophosphate ester: An integrated *in vitro* and *in silico* approach [J]. Ecotoxicology and Environmental Safety, 2021, 219: 112342
- [16] Bonner W M, Redon C E, Dickey J S, et al. GammaH2AX and cancer [J]. Nature Reviews Cancer, 2008, 8 (12): 957-967
- [17] Eisner V, Picard M, Hajnóczky G. Mitochondrial dynamics in adaptive and maladaptive cellular stress responses [J]. Nature Cell Biology, 2018, 20(7): 755-765
- [18] Le Y F, Shen H P, Yang Z, et al. Comprehensive analysis of organophosphorus flame retardant-induced mitochondrial abnormalities: Potential role in lipid accumulation [J]. Environmental Pollution, 2021, 274: 116541
- [19] Perdiz D, Oziol L, Poüs C. Early mitochondrial fragmentation is a potential *in vitro* biomarker of environmental stress [J]. Chemosphere, 2019, 223: 577-587
- [20] Li R W, Zhou P J, Guo Y Y, et al. Tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate induces apoptosis and autophagy in SH-SY₅Y cells: Involvement of ROS-mediated AMPK/mTOR/ULK1 pathways [J]. Food and Chemical Toxicology, 2017, 100: 183-196
- [21] Yu X L, Yin H, Peng H, et al. OPFRs and BFRs induced A549 cell apoptosis by caspase-dependent mitochondrial pathway [J]. Chemosphere, 2019, 221: 693-702
- [22] Kluck R M, Esposti M D, Perkins G, et al. The pro-apoptotic proteins, Bid and Bax, cause a limited permeabilization of the mitochondrial outer membrane that is enhanced by cytosol [J]. The Journal of Cell Biology, 1999, 147(4): 809-822 ◆