

Cytotoxicity of Bisphenol A and Tetrabromobisphenol A on Hep G2 Cells

Shiwei JIN¹, Yan HUANG¹, Ming LI¹, Yang HUI², Fangxing YANG²

¹School of Chemical Engineering and Pharmacy, Wuhan Institute of Technology, Key Laboratory for Green Chemical Process of Ministry of Education, Wuhan 430074, China

²State Key Laboratory of Freshwater Ecology and Biotechnology, Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China

Email: newjsw@sina.com

Abstract: Recently, the environmental residues of bisphenol A (BPA) and tetrabromobisphenol A (TBBPA) have markedly increased. In this study, the cytotoxic effects of BPA and TBBPA on Hep G2 cells were studied. Hep G2 cells were incubated with different concentrations of BPA and TBBPA for 24 h, and a set of bioassays were conducted to measure: cell viability (evaluated by MTT assay), lactate dehydrogenase (LDH) leakage, oxidative damage degree (evaluated by SOD, GSH and MDA), reactive oxygen species (ROS) formation and cell apoptosis. The results showed that BPA and TBBPA inhibited the cells viability, increased LDH leakage, malondialdehyde (MDA) content, and ROS formation, decreased SOD activity and GSH content, and induced cell apoptosis in concentration-dependent manner. All significant effects were observed at concentrations of 1 μ M and above for BPA and TBBPA ($P < 0.05$). Collectively, the results of cell viability, LDH leakage, oxidative damage degree, cell apoptosis and ROS formation demonstrated that BPA and TBBPA have cytotoxic effect and oxidative damage to Hep G2 cells, and can induce Hep G2 cells apoptosis.

Keywords: bisphenol A; tetrabromobisphenol A; Hep G2 cells; cytotoxicity; oxidative damage; reactive oxygen species

双酚 A 与四溴双酚 A 对肝癌细胞 Hep G2 的细胞毒性效应

金士威¹, 黄艳¹, 黎明¹, 惠阳², 杨方星²

¹武汉工程大学化工与制药学院, 绿色化工过程省部共建教育部重点实验室, 武汉, 中国 430074

²中国科学院水生生物研究所, 淡水生态与生物技术国家重点室, 武汉, 中国 430072

Email: newjsw@sina.com

摘要:近年来, 双酚 A(BPA)和四溴双酚 A(TBBPA)在环境中的浓度呈逐年增加的趋势。本文利用肝癌细胞 Hep G2 研究了 BPA 和 TBBPA 两种化合物的细胞毒性效应。Hep G2 细胞用不同浓度的 BPA 和 TBBPA 暴露 24h 后, 检测细胞活力(MTT)、乳酸脱氢酶(LDH)漏出率, 胞内丙二醛(MDA)和还原型谷胱甘肽(GSH)含量、超氧化物歧化酶(SOD)和活性氧(ROS)水平以及细胞凋亡情况等一系列指标。结果表明, 随着 BPA 和 TBBPA 暴露浓度的增加($> 1 \mu\text{M}$), 导致 Hep G2 细胞活力下降, LDH 漏出率升高, MDA 含量增加, SOD 活力与 GSH 含量下降, ROS 过量生成, 细胞凋亡率增加。BPA 和 TBBPA 对 Hep G2 产生细胞毒性的机理可能是氧化损伤作用。

关键词: 双酚 A; 四溴双酚 A; 肝癌细胞 Hep G2; 细胞毒性; 氧化损伤; 活性氧

1 引言

双酚A(bisphenol A, BPA), 是一种重要的有机化工原料, 作为单体物质主要用于生产聚碳酸酯、环氧树脂、

资助信息: 国家自然科学基金委员会重大项目(20890113)、湖北省教育厅青年基金项目(2004Q001)和湖北省自然科学基金项目(2006ABA284)资助

酚醛树脂等多种高分子材料及增塑剂、抗氧化剂等, 广泛应用于生产罐头内包装、食品包装材料、牙科填充剂、婴儿用品等塑料行业(Sala, et al., 2010)。BPA可以通过在生产过程中以及上述产品的使用过程中释放而进入环境。四溴双酚A (tetrabromobisphenol A, TBBPA)是BPA

的溴代衍生物，属于广泛使用的溴代阻燃剂。由于 TBBPA 相对毒性较低，并且不易在环境中累积，因而被认为是较有前途的阻燃剂而大量生产和使用。但近年的研究发现，TBBPA 会在环境中持续存在，并在生态系统中累积(de Boer et al., 1998)，并已在沉积物和大气等环境介质以及人体内检测到了它的存在(Chu, et al., 2005; Thomsen et al., 2001; Sjödin et al., 2001)。

Hep G2 细胞系是一种代谢完全的人类来源的肝肿瘤细胞株，它不仅保持了人正常肝实质细胞的许多特点和功能，还保留了一系列生物转化过程中的 I 相和 II 相酶，如 CYP1A1 等。因而 Hep G2 细胞被认为是检测外来化合物毒性的一个理想细胞系。迄今尚未见 BPA 和 TBBPA 这两种化合物对 Hep G2 肝癌细胞的毒性效应的研究报道。

2 材料和方法

2.1 主要药品与试剂

BPA, TBBPA, RNase A, 2',7'-二氢二氯荧光素二乙酸酯, 邻苯二甲醛和二甲亚砜(DMSO)购自 Sigma 公司 (St. Louis, MO, USA)。细胞培养基、抗生素和胎牛血清试剂购自 Gibco 公司。BPA 和 TBBPA 用 DMSO 配制成浓度为 1M 的储存液，并稀释成不同浓度，4 °C 保存。

2.2 仪器

CO₂ 培养箱(美国 FORMA 公司); HP8453 分光光度计(美国安捷伦公司); 酶标仪(Molecular Device, M2, Union City, CA, USA); CK2 型倒置显微镜、IX51 型荧光显微镜(日本 Olympus 公司); 流式细胞仪(Beckman-Coulter Epic AltraEpics Altra, Coulter Corp., Miami, FL)。

2.3 细胞培养与毒性检测

Hep G2 细胞株购买于武汉大学细胞保藏中心。细胞培养基选用 DMEM 培养基，含 10% 胎牛血清，100 U·mL⁻¹ 青霉素和 100 mg·mL⁻¹ 链霉素。细胞培养在 37°C, 5% CO₂ 培养箱中。

Hep G2 细胞以每孔 1×10^4 个细胞的密度接种在 96 孔板中，贴壁培养 24 小时后，移除培养基，加入 200 μL 含有不同浓度暴露化合物的新鲜培养基继续暴露 24h。以 DMSO 作为溶剂对照，DMSO 在各组培养基中的终浓度为 0.5%。同一块 96 孔板上，对照和每一个暴露浓度都设三个重复。每一个试验都重复三块 96

孔板。细胞经暴露后，分别进行 MTT 试验，LDH 释放试验，活性氧(ROS)检测，超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽(GSH)和丙二醛(MDA)含量的测定，以及细胞凋亡率检测，以评价其细胞毒性与作用机制。

2.4 数据分析

所有数据表示为平均值(means)±SD。使用单因素方差分析(ANOVA)比较暴露组的差异性， $P < 0.05$ 表示差异显著。所有的实验分析使用 SPSS 13.0 进行数据处理(SPSS, Chicago, IL, USA)。

3 结果

3.1 细胞线粒体活性

MTT 结果如图 1 所示，随着 BPA 与 TBBPA 浓度的增加，Hep G2 细胞的活性随着下降。从图 1 中可以看出，TBBPA 的毒性大于 BPA。

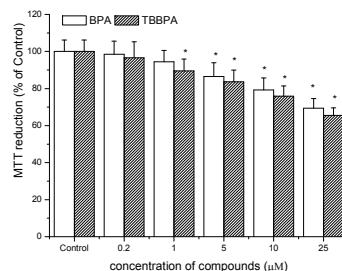


Fig. 1 Cytotoxicity of BPA and TBBPA on Hep G2 cells with MTT assay. * $P < 0.05$, compared with control.

图 1 MTT 方法检测的 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 的毒性作用。

3.2 细胞膜损伤

LDH 释放试验结果如图 2 所示，与对照组相比，LDH 的释放随着 BPA 和 TBBPA 浓度的增大而显著增加($P < 0.05$)。当暴露浓度大于 1 μM 时，TBBPA 的 LDH 漏出量比 BPA 的大。

3.3 ROS 过量生成

ROS 含量如图 3 所示，当 BPA 和 TBBPA 浓度 ≥ 5 μM 时，与对照组相比，ROS 的生成随着 BPA 与 TBBPA 浓度的增大而显著增加($P < 0.05$)，并且 TBBPA 的 ROS 生成量大于 BPA 的 ROS 生成量。

3.4 细胞内 SOD、GSH、MDA 含量

BPA 及 TBBPA 暴露对 Hep G2 细胞内 SOD、GSH、

MDA 含量的影响如图 4—6 所示。大于 1 μM 的 BPA 及 TBBPA 均可使 Hep G2 细胞内的 SOD 含量与 GSH 含量降低，而 MDA 含量升高，与对照组相比均有统计学意义。

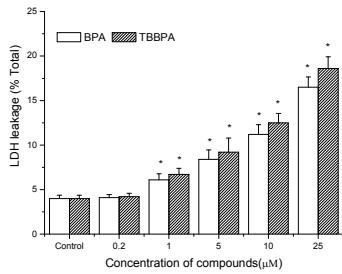


Fig. 2 Cytotoxicity of BPA and TBBPA on HepG2 cells with LDH leakage assay. * $P < 0.05$, compared with control.

图 2 用 LDH 释放方法检测的 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 的毒性作用。

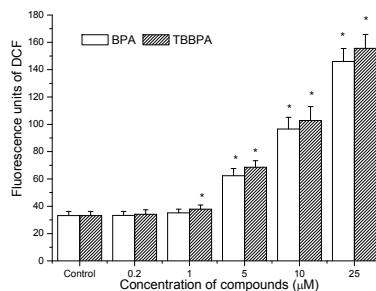


Fig.3 Effects of BPA and TBBPA treatment on ROS generation in Hep G2 cells. * $P < 0.05$, compared with control.

图 3 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 ROS 生成的影响。

3.5 流式细胞仪(FCM) 检测细胞凋亡

图 7 结果显示，随着 BPA 与 TBBPA 暴露浓度的增大，细胞凋亡率也逐渐升高，当暴露浓度达 25 μM 时，凋亡率最高。

4 讨论

文献报道，BPA 除了具有内分泌干扰作用如雌激素效应等外，还具有细胞毒性，能导致体外培养的睾丸支持细胞(Sertoli cell)的凋亡，但在<100 μM 时基本无细胞毒性(Hiroshi & Kazue, 2003)，而李华文等(2005)的结果表明， $\geq 50 \mu\text{M}$ 的 BPA 对人肝肝细胞 L202 具有细胞毒性，林勇等(2006)的结果表明 $\geq 50 \mu\text{M}$ 的 BPA 对原代培养胎鼠脑多巴胺神经元产生细胞毒性，表明

BPA 对不同类型的细胞毒性存在差异。由于 TBBPA 引起的环境污染和生态安全问题，从近年才开始受到关注，因而其毒理学的研究数据还相当缺乏。有研究显示，TBBPA 具有甲状腺干扰作用及弱雌激素效应(Kitamura et al., 2002, 2005)。

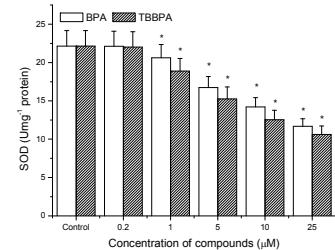


Fig. 4 Effects of BPA and TBBPA treatment on SOD generation in Hep G2 cells. * $P < 0.05$, compared with control.

图 4 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 细胞 SOD 的影响。* $P < 0.05$ 表示处理组与对照比有显著性差异。

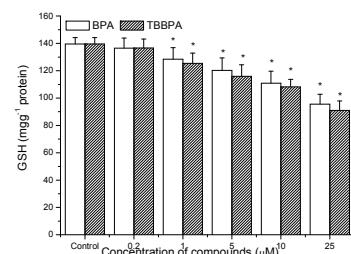


Fig. 5 Effects of BPA and TBBPA treatment on GSH generation in Hep G2 cells. * $P < 0.05$, compared with control.

图 5 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 GSH 的影响。

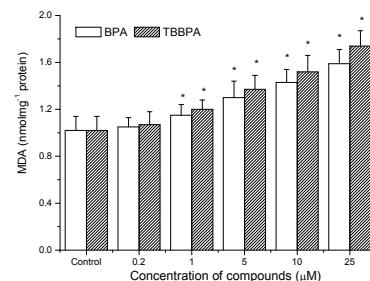


Fig. 6 Effects of BPA and TBBPA treatment on MDA generation in Hep G2 cells. * $P < 0.05$, compared with control.

图 6 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 MDA 的影响。

MTT 检测与 LDH 释放结果表明，BPA 与 TBBPA 对 Hep G2 细胞均具有细胞毒性，使细胞活力降低，

LDH 释放增加。1 μM 的 BPA 和 TBBPA 就可使 Hep G2 细胞的生长产生抑制作用, TBBPA 的毒性大于 BPA。

研究显示, 大于 1 μM 的 BPA 和 TBBPA 暴露均可导致细胞内 ROS 升高, 同时造成细胞内抗氧化酶 SOD 和 GSH 水平降低, 脂质过氧化物 MDA 含量增加, 其变化的趋势基本与细胞内 ROS 水平改变的趋势相符。表明这二种化合物在增加细胞内 ROS 的同时, 降低了细胞内的抗氧化酶的水平, 造成细胞的氧化损伤。ROS 是细胞凋亡的媒介之一, 正常情况下, 细胞内氧化与抗氧化处于平衡状态, 一旦这种平衡被打破, 就会导致“氧化应激反应”, 使 ROS 产生增多, 并可进一步触发炎症、基因突变甚至细胞凋亡, 引发脂质过氧化作用, 形成 MDA 等脂质过氧化产物; 同时机体存在清除自由基能力的物质和酶类, 如 SOD 和 GSH 等。测定这些物质和酶类的浓度、活性可评价机体抗氧化能力和氧化损伤的程度(陈媛&周玲, 2002)。动物实验发现 BPA 具有氧化损伤作用, 可对动物的肝脏、肾脏、睾丸等组织产生氧化损伤(Bindhumol et al.,2003; Kabuto et al.,2003)。本实验结果表明 1 μM 的 BPA 和 TBBPA 就可显著降低细胞的 SOD、GSH 的含量; 并使脂质过氧化产物 MDA 显著升高。显示 BPA 与 TBBPA 暴露能降低 Hep G2 细胞的抗氧化酶和抗氧化物质的水平, 使细胞发生脂质过氧化, 具有氧化损伤的作用。

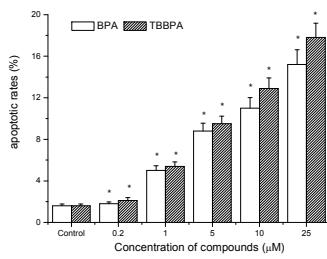


Fig. 7 Effects of BPA and TBBPA treatment on apoptotic rates in Hep G2 cells. * $P < 0.05$, compared with control.

图 7 BPA 和 TBBPA 暴露对 Hep G2 凋亡率的影响。

细胞凋亡是在基因控制下细胞自主有序的死亡, 是机体的一种生理机制, 在维护机体内环境稳定方面发挥着极为重要的作用。流式检测结果表明, 随着暴露浓度的增大, Hep G2 细胞凋亡率也随之上升, 提示 BPA 与 TBBPA 能够诱导肝癌细胞 Hep G2 发生凋亡。

TBBPA 是 BPA 的卤代衍生物, 它们结构相似, 如均具有两个羟基, 差别就是取代位的原子不同。我们进一步的试验结果(未发表的数据)表明, TBBPA 雌

激素活性低于 BPA, 可能是由于溴取代后, 溴原子体积较大产生的空间位阻效应导致雌激素活性下降。而从本研究可知, 溴原子取代的 TBBPA 对 Hep G2 的毒性效应比无卤原子的 BPA 要稍强。可能是由于二者结构的相似性, 使其可以通过相同的作用机制, 表现出类似的毒性效应, 而由于卤代原子的差异, 使二者的毒性并不完全一致(Kitamura et al.,2005)。

References (参考文献)

- [1] Bindhumol V, Chitra KC, Mathur PP. Bisphenol A induces reactive oxygen species generation in the liver of male rats [J]. *Toxicology*. 2003, 188(223): 117-124.
- [2] Chu S, Haffner GD, Letcher RJ. 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]. *J Chromatogr A*. 2005, 1097(1-2): 25-32.
- [3] de Boer J, Wester PG, Klamer HJ, Lewis WE, Boon JP. Do flame retardants threaten ocean life [J]? *Nature*. 1998, 394(6688): 28-29.
- [4] Hiroshi I, Kazue M. Bisphenol A-induced apoptosis of cultured rat sertoli cells. *Reprod Toxicol*. 2003, 17(3): 457-464.
- [5] Kabuto H, Hasuike S, Minagawa N, Shishibori T. Effects of bisphenol A on the metabolisms of active oxygen species in mouse tissues [J]. *Environ Res*. 2003, 93(1): 31-35.
- [6] Kitamura S, Jinno N, Ohta S, Kuroki H, Fujimoto N. Thyroid hormonal activity of the flame retardants tetrabromobisphenol A and tetrachlorobisphenol A [J]. *Biochem Biophys Res Commun*. 2002, 293(1): 554-559.
- [7] Kitamura S, Suzuki T, Sanoh S, Kohta R, Jinno N, Sugihara K, Yoshihara S, Fujimoto N, Watanabe H, Ohta S. Comparative study of the endocrine-disrupting activity of bisphenol A and 19 related compounds [J]. *Toxicol Sci*. 2005, 84(2): 249-259.
- [8] Sala M, Kitahara Y, Takahashi S, Fujii T. Effect of atmosphere and catalyst on reducing bisphenol A (BPA) emission during thermal degradation of polycarbonate [J]. *Chemosphere*. 2010, 78(1): 42-45.
- [9] Sjödin A, Carlsson H, Thuresson K, Sjölin S, Bergman A, Östman C. Flame retardants in indoor air at an electronics recycling plant and at other work environments [J]. *Environ Sci Technol*. 2001, 35(3): 448-454.
- [10] Thomsen C, Lundanes E, Becher G. Brominated flame retardants in plasma samples from three different occupational groups in Norway. *J Environ Monit*. 2001, 3(4): 366-370.
- [11] CHEN Yuan, ZHOU Mei. Radical medical basis and pathophysiology [M]. Beijing: People's Medical Press, 2002. 11(Ch). 陈媛, 周玲. 自由基医学基础与病理生理 [M]. 北京:人民卫生出版社, 2002. 11.
- [12] Li Huawen , Liu Yanqun, Shi Dan, Zhang Jianghua, Hao Qiaoling, Lü Bin, Zhou Yikai. Toxicity study of Bisphenol A on human embryo liver cell L-02 [J]. *J lab medicine*. 2005, 22(2): 102-104(108)(Ch). 李华文, 刘燕群, 石丹, 张江华, 郝巧玲, 吕斌, 周宜开. 双酚 A 对人胚肝细胞 L-02 的毒性作用研究 [J]. 环境与职业医学. 2005, 22(2): 102-104(108).
- [13] Lin Yong, Zeng Xiang-Gui, Wu De-sheng, Wang Xia, Qu Wei-dong. Study on bisphenol A induced primary cultured mesencephalic neuronal cell injury by oxidative stress [J]. *J hygiene res*. 2006, 35(4):419-423(Ch). 林勇, 曾祥贵, 吴德生, 王霞, 屈卫东. 双酚 A 对原代培养胎鼠脑多巴胺神经元的氧化损伤作用研究 [J]. 卫生研究. 2006, 35(4):419-423.