

沈铨澄,杨先海,刘会会.有机磷阻燃剂对人肺癌 A549 细胞的毒性效应及机制 [J]. 中国环境科学, 2025,45(6):3451-3459.

Shen C C, Yang X H, Liu H H. Study on the toxic effect and mechanism of organophosphorus flame retardants on the human lung cancer A549cell [J]. China Environmental Science, 2025,45(6):3451-3459.

有机磷阻燃剂对人肺癌 A549 细胞的毒性效应及机制

沈铨澄,杨先海,刘会会* (南京理工大学环境与生物工程学院,江苏 南京 210000)

摘要: 以 A549 人肺癌细胞作为体外模型,选取环境中检出频率较高的 3 种有机磷阻燃剂:磷酸三(2-丁氧基)乙酯(TBOEP)、磷酸三(2-氯丙基)酯(TCIPP)和磷酸三异丙基苯酯(IPPP)作为代表性物质,通过多种毒性测试终点,研究它们对人肺癌 A549 细胞的毒性效应.结果表明,3 种 OPFRs 均能抑制细胞活力、刺激其产生过量的活性氧、降低细胞内线粒体膜电位、诱导细胞产生炎症、引起 DNA 损伤.每个细胞毒性指标都呈现出剂量依赖性.低浓度的 OPFRs 影响较小,随着 OPFRs 浓度升高,毒性效应越来越大.对比 3 种 OPFRs,A549 细胞毒性作用顺序为 TBOEP > TCIPP ≈ IPPP.特别是在高浓度 500 $\mu\text{mol/L}$ 的 TBOEP 暴露下,细胞活力不到 5%,细胞内活性氧水平上升 3 倍,线粒体膜电位降低了 46.5%,炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌量上升了 124.4%和 262.7%,DNA 损伤标记物含量显著增加.本研究结果为揭示不同 OPFRs 的毒性差异提供了新的实验数据和思路,为评估环境中 OPFRs 对人体健康风险提供了新的见解.

关键词: 有机磷阻燃剂; 细胞毒性; 氧化应激; DNA 损伤; 线粒体损伤

中图分类号: X503.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-6923(2025)06-3451-09

Study on the toxic effect and mechanism of organophosphorus flame retardants on the human lung cancer A549cell. SHEN Cheng-cheng, YANG Xian-hai, LIU Hui-hui* (School of Environmental and Biological Engineering, Nanjing University of Science and Technology, Nanjing 210000, China). *China Environmental Science*, 2025,45(6): 3451-3459

Abstract: Human lung cancer cell A549 were used as the test cell. Three kinds of organophosphorus flame retardants, i.e., tris(2-butoxyethyl) phosphate (TBOEP), tris(1-chloro-2-propyl)phosphate (TCIPP), and tri(4-isopropylphenyl)phosphate (IPPP), were selected as representative compounds, which are frequently detected in the environment. The toxic effects of the three compounds on A549cell were studied through multiple toxicity test endpoints. Results showed that the three OPFRs could inhibit cell viability, stimulate the production of excessive reactive oxygen species and reduce the mitochondrial membrane potential in cell, induce cell inflammation and cause DNA damage. All the cytotoxicity indicators were dose-dependent. OPFRs with low concentrations had less effect, and the toxic effect enhanced with the increase of OPFRs concentrations. Compared with the three OPFRs, their toxic effects on A549cells ranked as TBOEP > TCIPP \approx IPPP. Especially, when the cells were exposed to TBOEP with a high concentration of 500 $\mu\text{mol/L}$, the cell viability was less than 5%, the amount of reactive oxygen species in cell increased by three times, the mitochondrial membrane potential decreased by 46.5%, the secretion of inflammatory factors IL-6 and TNF- α increased by 124.4% and 262.7%, and the content of DNA damage markers increased significantly.

Key words: organophosphate flame retardants; cytotoxicity; oxidative stress; DNA damage; mitochondrial damage

有机磷阻燃剂(OPFRs)可以长时间存在于不同的环境介质中,例如土壤、空气、灰尘、水和食品等^[1].环境中常检出的 OPFRs,按取代基结构可以分为烷基-OPFRs,卤代-OPFRs 和芳基-OPFRs,不同种类的 OPFRs 理化性质和毒性差异较大^[2].越来越多的证据表明 OPFRs 会对人类健康和生态环境产生负面影响.人的一生大约有 80%~90%的时间处于室内环境中,特别是老人和儿童停留在室内环境时间可能更长,这意味着室内环境中的 OPFRs 污染可能有更高的环境风险^[3].

近年来,OPFRs 在世界各地室内环境中高频检

出率和高浓度引起人们担忧.室内粉尘和污染空气吸入是人体摄入室内环境中 OPFRs 最主要的方式^[3],目前已在人体尿液、血液、血清、指甲、母乳和头发等检出了多种 OPFRs^[4-6].Wong 等^[7]研究的 72 份空气样品中都检测到 OPFRs.类似的,在土耳其收集的空气样本中也检测到 OPFRs^[8].在东京和瑞士室内中,磷酸三(2-氯丙基)酯(TCIPP)浓度分别高达 1260 和 1179 ng/m^3 ,高于同期溴代阻燃剂的浓

收稿日期: 2024-11-08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(22176097)

* 责任作者, 副教授, hhlui@njjust.edu.cn

度^[9-10].另外,在日托中心中 OPFRs 最高浓度达 2080ng/m³,其中磷酸三(2-正丁氧乙基)酯(TBOEP)是最主要的污染物^[11].

据统计,成人每日在室内环境中吸入 OPFRs 量约为 14000pg/(kg-bwd)^[3],而直接暴露于 OPFRs 污染的呼吸道、消化道可能遭受更大的损伤.毒理学研究表明,OPFRs 可以在动植物体内积累并造成多种不良反应,包括脏器毒性、神经毒性、生殖毒性、呼吸道疾病、内分泌干扰效应和基因毒性^[12].体外细胞实验证明,OPFRs 对细胞生长普遍存在抑制作用,高剂量或是长时间暴露更容易造成严重的细胞损伤,引起细胞功能障碍,甚至导致细胞死亡.例如,OPFRs 会引起的人肝癌细胞脂质代谢破坏,产生过量的活性氧自由基(ROS),并且导致线粒体功能障碍^[13];氯代-OPFRs 引起人体肠道菌群细胞毒性,诱导 ROS 产生和降低线粒体膜电位(MMP)^[14].然而,当前关于 OPFRs 的毒理学研究报道集中于消化道和内分泌系统,而有关呼吸系统的毒理学数据很少.现有相关报道指出,磷酸三(2-正丁氧乙基)酯、磷酸三(2-氯丙基)酯、磷酸三(1,3-二氯-2-丙基)酯可以降低人正常支气管上皮细胞 BEAS-2B 细胞活力^[15].多种 OPFRs 会导致人肺腺癌细胞 NCI-H1975 细胞活性降低,氧化应激和细胞凋亡^[16].磷酸三(2-氯乙基)酯、磷酸三甲苯酯和磷酸三苯酯可降低肺癌人类肺泡基底上皮细胞 A549 细胞活力,促进 ROS 产生并导致细胞凋亡^[17].

人肺癌 A549 细胞是一种被广泛应用于呼吸系统毒理学研究的体外模型,对多种刺激因素敏感,故适用于研究大气污染物对人体呼吸道的影 响^[18].本文选择了环境中典型的 OPFRs:烷基-OPFRs(磷酸三(2-丁氧基)乙酯,TBOEP)、卤代-OPFRs(磷酸三(2-氯丙基)酯,TCIPP)和芳基-OPFRs(磷酸三异丙基苯酯,IPPP)作为代表性物质,通过人肺癌 A549 细胞毒性测试,考察 OPFRs 对肺细胞的细胞毒性及其作用机制.本文旨在:通过研究不同 OPFRs 的细胞毒性(包括细胞活性,氧化应激,线粒体膜损伤和 DNA 损伤等)影响,探究 OPFRs 对细胞的致毒机理,以期为室内环境中 OPFRs 的风险和健康评估提供参考.

1 材料与方法

1.1 主要化学试剂

磷酸三(2-正丁氧乙基)酯 [TBOEP;CAS: 78-51-3]、磷酸三(2-氯丙基)酯 [TCIPP;CAS: 13674-84-5]、三异丙苯基磷酸酯 [IPPP;CAS: 26967-76-0]购自阿拉丁公司,纯度均高于 98%.二甲基亚砜(DMSO)购自兰杰柯科技有限公司,胎牛血清(FBS)购自浙江天杭生物科技股份有限公司.DMEM 高糖培养基、PBS 缓冲液、0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液和青霉素/链霉素混合溶液购自美国 Gibco 公司,CCK-8 细胞活力检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒和 DNA 损伤检测试剂盒购自上海碧云天生物科技有限公司,人白细胞介素 6(IL-6)和人肿瘤坏死因子 α (TNF- α)ELISA 试剂盒购自江苏菲亚生物科技有限公司.人非小细胞肺癌细胞 A549 细胞购自上海信裕生物科技有限公司.

1.2 细胞培养

复苏冻存细胞并接种在含 6mL 完全培养基(体积分数为 89%DMEM、10%FBS 和 1%青霉素/链霉素混合溶液)的细胞培养瓶,于 CO₂ 恒温培养箱(37℃、体积分数 5%CO₂)培养细胞.细胞培养基每 2d 进行一次更换并在细胞生长至 80%进行 1:3 传代.实验过程中选择 3 至 15 代的细胞进行实验.

1.3 细胞染毒

1.3.1 OPFRs 母液配制 TBOEP、TCIPP、IPPP 在常温下均为液态,纯度均高于 98%.各取一定体积的 OPFRs 溶液置于 DMSO 中,配制浓度为 500mol/L 的 OPFRs 母液,再分别用 DMSO 稀释母液,获得不同浓度的 OPFRs 溶液,经 0.22 μ m 有机相滤膜过滤后置于-20℃冰箱保存.

通过污染空气吸入和吸入粉尘估计 OPFRs 的肺摄入量,计算方法如下:

$$\text{肺摄入量} (\mu\text{g}/\text{d}) = \frac{C_{\text{空气}} \times R_{\text{R}} + C_{\text{灰尘}} \times \text{DIG}}{1000} \quad (1)$$

式中: $C_{\text{空气}}$ 表示空气中 OPFRs 的浓度,ng/m³;R_R为呼吸速率,成人 为 20m³/d,儿童为 4.5m³/d^[3]. $C_{\text{灰尘}}$ 表示灰尘中 OPFRs 的浓度, μ g/g;DIG 表示为估计的摄尘量(成人 为 2.5mg/d,儿童为 41mg/d)^[19];1000 用于单位间的转换.

研究发现,TBOEP 是污染空气和室内粉尘中最主要的 OPFRs,污染空气和粉尘中 TBOEP 最高浓度分别为 130ng/m³和 1900 μ g/g^[7-8,11,19-20],其相对分子质量为 398.47g/mol,那么成人和儿童肺摄入量

分别为 7.3 和 78.49 μg 。人肺液体积为 10~15mL,可估计成人肺中 TBOEP 浓度范围为 1.2~1.8 $\mu\text{mol/L}$,儿童为 13.14~19.71 $\mu\text{mol/L}$ 。可知儿童的 OPFRs 暴露风险更高,更应关注 OPFRs 对儿童肺损伤情况,故本文设置的低浓度(15.63 $\mu\text{mol/L}$)具有儿童在污染环境短期暴露的实际意义。考虑到 OPFRs 在人体肺部的累积效应,中浓度(125 $\mu\text{mol/L}$)和高浓度(500 $\mu\text{mol/L}$)分别以一周和一个月作为累积时间,以评估 OPFRs 长期累积后对人肺的影响。TCIPP 和 IPPP 的浓度选取方法与 TBOEP 相同,经综合评估后,选择统一的实验浓度。

1.3.2 细胞染毒 用 DMEM 培养液以 1000:1 的倍数稀释不同种类、不同浓度的 OPFRs 母液至工作浓度。随后,用 0.25%胰蛋白酶-EDTA 溶液消化细胞至离心管,离心去除上清液后加入完全培养基,分别以 1.0×10^4 或 5.0×10^5 个细胞/孔的初始密度接种于 96 孔或 12 孔细胞培养板。孵育 24h,待细胞完全贴壁后,去除原有培养基,加入 OPFRs 工作液暴露 24h 后进行相关指标的测试。

1.4 细胞活力测试

利用 CCK-8 细胞活力检测试剂盒测试 OPFRs 对 A549 细胞活力的影响。主要步骤如下:96 孔板中的细胞暴露在 100 μL 的 OPFRs 工作液 24h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,37 $^\circ\text{C}$ 孵育 2h 后,使用多功能酶标仪在 450nm 处测定每孔对应的吸光度(OD)。细胞活力计算公式如下:

$$\text{细胞活力}(\%) = \frac{(\text{OD}_{\text{实验}} - \text{OD}_{\text{空白}})}{(\text{OD}_{\text{对照}} - \text{OD}_{\text{空白}})} \times 100\% \quad (2)$$

1.5 细胞内 ROS 变化水平的检测

采用 2,7-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针检测 A549 细胞内 ROS 水平,DCFA-DA 荧光强度与细胞内 ROS 水平正相关。A549 细胞暴露 OPFRs 工作液 24h 后,胰酶消化收集细胞,并用 PBS 冲洗 2 次。之后,将细胞重悬在含 DCFH-DA (10 $\mu\text{mol/L}$)的 DMEM 培养基中,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30min,再用 PBS 洗去多余的 DCFH-DA 探针。然后,加入适量的缓冲液重悬细胞,使用荧光分光光度计在激发波长为 488nm,发射波长为 525nm 的条件下测定荧光强度。

1.6 细胞内线粒体膜电位变化的测定

荧光探针 JC-1 常用于评估线粒体膜电位(MMP)

变化,被广泛用于表征线粒体早期凋亡和去极化水平。本文通过测量 JC-1 聚集体(红色)与 JC-1 单体(绿色)的比例来定量 MMP 去极化率。A549 细胞染毒 24h 后,胰酶消化收集细胞,并用 PBS 冲洗 2 次。根据试剂盒说明书配制 JC-1 染色工作液和 JC-1 染色缓冲液,将细胞重悬在含 JC-1 染色工作液,37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 30min,然后用冷 JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次,并加入适量的缓冲液重悬细胞。最后,使用荧光分光光度计测量 JC-1 的荧光强度来确定 MMP 的变化。

1.7 Elisa 法检测细胞内炎症因子水平

炎症因子存在于细胞外泌体中,超速离心法是目前外泌体分离最常用的方法。待暴露结束后,收集细胞上清,在 4 $^\circ\text{C}$ 下以 300r/min 的转速离心 10min,去除活细胞和死细胞,并收集细胞上清液。然后以 2000r/min 的转速离心 10min 去除细胞凋亡碎片,并收集细胞上清。最后,以 10000r/min 的转速离心 20min,去除大泡膜,收集细胞上清于-80 $^\circ\text{C}$ 冰箱保存。炎症因子 IL-6(白细胞介素-6)和 TNF- α (肿瘤坏死因子- α)是人体免疫系统中起关键作用的重要蛋白质分子。根据试剂盒说明书,采用双抗夹心法 ELISA 测定细胞外泌体中炎症因子 IL-6 和 TNF- α 的分泌情况。

1.8 γ -H2AX 免疫荧光测定

H2AX 磷酸化产生的 γ -H2AX 含量水平可以清楚地反映出 DNA 的损伤程度及修复情况,而被广泛应用于 DNA 损伤和细胞凋亡研究中,成为一种重要的 DNA 损伤标记物^[21]。预先在 12 孔细胞培养板中放置细胞爬片,然后将处于对数增长期的 A549 细胞接种于细胞爬片。待细胞生长密度 80%时,加入不同的 OPFRs 溶液处理。暴露 24h 后,各孔用 PBS 洗涤 2 次,并加入适量的 4%多聚甲醛进行固定 15min。吸除固定液,PBS 洗 3 次,加入免疫荧光染色封闭液(含 0.3% Triton X-100)封闭 15min。吸除封闭液,加入兔 γ -H2AX 单克隆抗体(1:500 稀释)4 $^\circ\text{C}$ 孵育过夜。PBS 洗 3 次,加入 Alexa Fluor 488 标记山羊抗兔抗体(1:500 稀释)37 $^\circ\text{C}$ 避光孵育 1h,PBS 清洗 3 次后,加入 DAPI 室温染色 5min。最后,将细胞爬片倒扣到载玻片,中性树脂封片后用荧光显微镜进行拍摄。

1.9 数据处理

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析和图片绘制。实验结果为 3 个独立重复实验的平

均值±标准差.各暴露组与对照组之间的显著性水平采用方差分析检验. $P<0.05$ 被认为具有统计学意义.

1.10 质量控制与质量保证

细胞毒性试验在 96 孔板中进行,每个暴露组,设置 5 个平行样,并进行 3 个独立重复实验.每组数据的标准差控制在 10%以内.OPFRs 的助溶剂采用对生物毒性较小的 DMSO,各暴露组中的 DMSO 浓度均低于 0.1%(V/V),以确保 DMSO 对 A549 细胞生长无影响.空白对照组是加入含有 0.1%(V/V) DMSO 的 DMEM 培养基,每个毒性效应指标均以空白对照组为参考,图表的绘制都包含对照组的数据.OPFRs 的浓度采用液质联用仪(Triple TOF 5600+)进行检测,结果表明细胞暴露前后,OPFRs 的浓度均保持恒定.

2 结果与讨论

2.1 体外细胞毒性

细胞活力是评价污染物对细胞毒性影响的关键指标,如图 1 显示,OPFRs 均不同程度地降低了 A549 细胞活力,且具有剂量依赖性,与之前研究结果一致^[22].24h 暴露后,在低浓度下,OPFRs 对 A549 细胞活力均无显著影响,细胞活力均高于 90%;在较高浓度下,细胞活力均有所下降,TBOEP、TCIPP 和 IPPP 暴露后的细胞活力分别为 78.4%,84.31%和 92.7%,TBOEP 降低细胞活力效应略高于 TCIPP 和 IPPP;在 500 $\mu\text{mol/L}$ 高浓度暴露下,TBOEP 使细胞活力不到 5%,远低于 TCIPP 和 IPPP 暴露后的细胞活力.对比 3 种物质可以看出,TBOTP 对细胞活力抑制作用最强,而 TCIPP 对细胞活力抑制作用略高于 IPPP,毒性作用顺序为 TBOEP>TCIPP>IPPP.OPFRs 毒性强弱与 Yu 研究呼吸细胞结果一致,毒性作用顺序为 TBOEP>TCIPP>芳基 OPFRs^[18].在另一项实验中,研究员使用含脂量高的 HepG2 肝癌细胞研究不同取代基的 OPFRs 的细胞毒性,毒性作用顺序为芳基 OPFRs>TBOEP>TCIPP^[23].这表明不同的取代基结构的 OPFRs 对细胞产生的毒性作用和毒性机制也不同.此外,由于构效关系不同,同分异构体的 OPFRs 毒性也并不完全相同,例如三(2-氯异丙基)磷酸(TCIPP)和三(2-氯乙基)磷酸(TCEP),TCIPP 对 NCI-H1975 的细胞活力损伤高于 TCEP^[16].

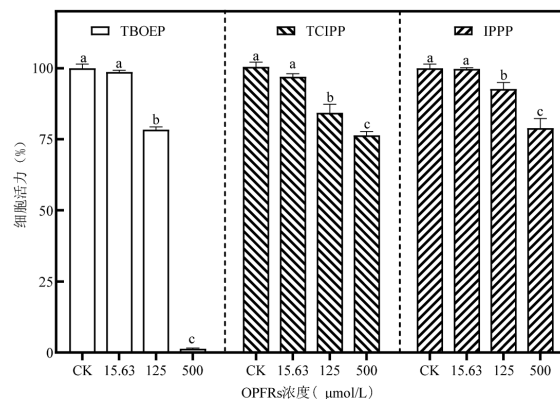


图 1 不同浓度 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 对 A549 细胞活力的影响

Fig.1 Effects of TBOEP, TCIPP and IPPP on the viability of A549 cells under different concentrations

字母相同表示组间无显著性差异($P>0.05$),字母不同表示组间有显著性差异($P<0.05$)

2.2 OPFRs 对细胞内活性氧水平的影响

ROS(活性氧)在正常生理状态下参与细胞信号传导和调节,影响细胞增值与分化,但细胞在受到外界刺激后,ROS 可能会过量产生,从而导致细胞损伤^[24].故此,ROS 的过量产生是评估细胞受到污染物毒性影响的重要指标之一.

作用 24h 后,根据图 2 所示,ROS 水平与 OPFRs 呈剂量依赖关系,OPFRs 浓度越高,细胞内 ROS 水平也越高.与对照组相比,低中高浓度的 TBOEP 使 A549 内活性氧水平分别上升了 18.0%,40.8%,297.6%;低中高浓度的 TCIPP 使其分别上升了 17.3%,33.3%,69.0%;低中高浓度的 IPPP 使其分别上升了 14.6%,30.6%,43.2%.在低浓度 OPFRs 暴露下,ROS 有所上升,此时细胞未大量死亡.然而,在高浓度 TBOEP 暴露后,活性氧水平增加了 3 倍,结合上述细胞活力的抑制作用,可以推测出过量活性氧可能是导致 A549 细胞死亡的重要因素.类似的报道指出,TCEP 和 TPHP 可以通过氧化应激方式降低大肠杆菌的细胞活力^[25].An 等^[18]也发现,OPFRs 可以在较高浓度下诱导各种细胞系产生过量 ROS 并降低细胞活性^[18].溴化阻燃剂和部分 OPFRs 已被证实会诱导细胞产生过量的 ROS,进而产生其他毒性损伤,例如细胞脂质过氧化、线粒体损伤与 DNA 损伤等^[17].不同的 OPFRs 对细胞氧化应激的作用机制并不一致,一项使用大鼠肝细胞系细胞的研究表明,TBOEP 增加谷胱甘肽过氧化物酶活性并降低谷

胱甘肽还原酶活性,而 TPHP 则产生相反的效果^[26]。

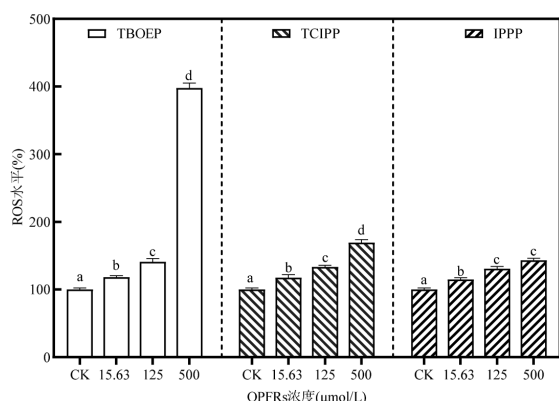


图 2 不同浓度 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 对 A549 内活性氧水平的影响

Fig.2 Effects of TBOEP, TCIPP and IPPP on the ROS of A549 cells under different concentrations

字母相同表示组间无显著性差异($P>0.05$),字母不同表示组间有显著性差异($P<0.05$)

2.3 OPFRs 对 A549 线粒体膜电位的影响

线粒体是胞内细胞器负责细胞能量代谢, MMP(线粒体膜电位)是线粒体功能的重要指标,可以反映有害物质对细胞的毒性损伤程度^[27]。通过测量 JC-1 聚集体(红色)与 JC-1 单体(绿色)的比例来定量 MMP 去极化率, MMP 下降通常是细胞凋亡和坏死的信号。图 3 显示, 3 个不同浓度的处理组与对照组相比, TBOEP 暴露后的荧光比分别下降了 6.6%, 33.1% 和 46.5%, TCIPP 暴露后的荧光比分别下降了 5.0%, 18.9% 和 29.9%, IPPP 暴露后的荧光比分别下降了 5.6%, 17.5% 和 30.3%。研究结果可知, 3 种 OPFRs 对细胞膜均有损伤, TBOEP 损伤程度高于 TCIPP 和 IPPP, 后两者对细胞膜损伤程度接近。此外, 研究显示 MMP 降低与 ROS 上升存在一定关系。过量 ROS 可以改变线粒体通透性过渡孔(MPTP)的构象, 从而触发 MPTP 的开放, 并破坏离子平衡, 导致呼吸链解耦联, 进而释放细胞色素 c 进入细胞质, 导致 MMP 减小^[28]。当细胞处于氧化应激状态时, 线粒体内产生大量的 ROS, 从而导致线粒体膜电位降低。反过来, 线粒体膜电位的降低又会进一步增加 ROS 的产生, 形成一个恶性循环。另外有研究报道, 线粒体凋亡的根本原因是 Ca^{2+} 过载, 当细胞内活性氧 ROS 含量升高时, 可导致 Ca^{2+} -ATPase 活性降低, 从而致使线粒体 Ca^{2+} 内流增加使线粒体凋亡^[29]。

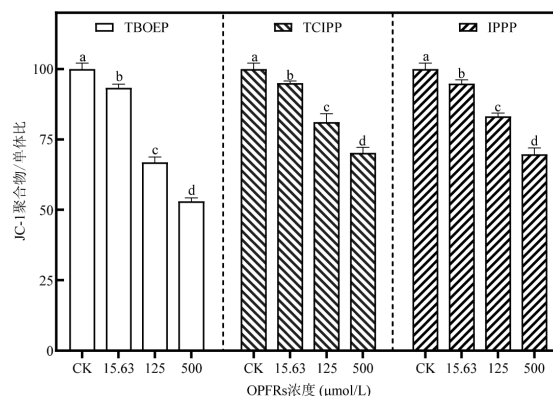


图 3 不同浓度 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 对 A549 线粒体膜电位的影响

Fig.3 Effects of TBOEP, TCIPP and IPPP on the MMP of A549 cells under different concentrations

字母相同表示组间无显著性差异($P>0.05$),字母不同表示组间有显著性差异($P<0.05$)

2.4 OPFRs 对 A549 细胞炎症因子水平的影响

炎症反应是机体对于细菌、病毒及其他有害刺激的保护性反应^[30]。当机体受到药物刺激时, 细胞会释放生物活性细胞因子, 例如炎症细胞因子、炎症介质和细胞粘附因子等, 引起炎症反应, 以缓解有害物质的毒性或是修复受损组织^[31]。过量的炎症因子会导致细胞发生程序性死亡。本研究表明(图 4), TBOEP、TCIPP 和 IPPP 可诱导细胞分泌炎症因子 IL-6 和 TNF- α 。与对照组相比, 3 种 OPFRs 均会导致细胞内 IL-6 和 TNF- α 含量上升, 且呈剂量依赖性关系。OPFRs 浓度越高, IL-6 和 TNF- α 表达水平也越高。3 个不同浓度的 TBOEP 暴露后 IL-6 分别上升了 18.8%, 82.8% 和 124.4%, TNF- α 含量分别上升了 33.5%, 103.9% 和 262.7%。TBOEP 对炎症因子的刺激作用远高于 TCIPP 和 IPPP。TCIPP 导致 A549 细胞炎症因子水平上升程度略高于 IPPP。氧化应激和炎症因子水平变化趋势相似, 这表明两者可能存在某种联系。根据以往的研究, 氧化应激可激活转录因子激活蛋白-1 和 NF- κ B 信号通路, 导致 NF- κ B 的磷酸化进而导致促炎症因子和趋化因子相关基因的表达, 从而在免疫和炎症反应中发挥关键作用^[32]。另外有研究报道, OPFRs 也可以增加细胞内 NLRP3 炎症小体水平, 加重细胞炎症反应, 促使半胱天冬酶激活和白细胞介素分泌^[33]。本研究表明炎症加重是 OPFRs 诱导细胞毒性的潜在机制。

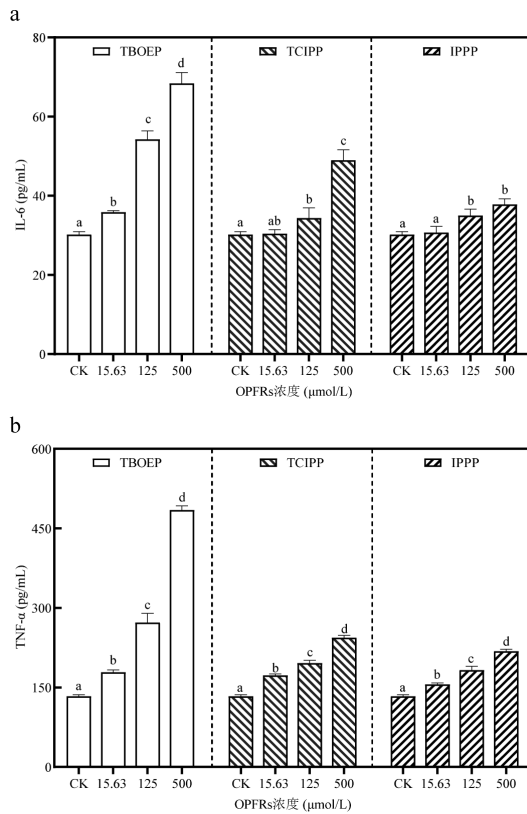


图 4 不同浓度 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 暴露 24h 后对 A549 炎症因子(a)IL-6,(b)TNF-α 的影响

Fig.4 Effects of TBOEP, TCIPP and IPPP on the inflammatory factor (a)IL-6, (b)TNF-α of A549 cells under different concentrations

字母相同表示组间无显著性差异($P>0.05$),字母不同表示组间有显著性差异($P<0.05$)

2.5 OPFRs 对 A549 细胞 DNA 的损伤

DNA 损伤是氧化应激的常见后果,环境污染物可直接或间接引起活性氧攻击细胞核内的 DNA,导致 DNA 断裂^[21].如图 5 所示,根据免疫荧光染色显示,OPFRs 暴露导致 γ -H2AX 的升高,这与氧化应激一致.此外,A549 细胞内 γ -H2AX 含量呈浓度依赖性增加,OPFRs 在高浓度下,会引发更严重的 DNA 损伤.值得注意的是,TBOEP 对 A549 细胞 DNA 损伤高于 TCIPP 和 IPPP,在高浓度下, γ -H2AX 数量点数最多,这说明高浓度的 TBOEP 对细胞有明显的 DNA 损伤作用.Rendic 等^[34]均发现 TBOEP 可以特异性激活细胞色素 P450 酶导致人肝癌细胞内 γ -H2AX 表达上升.相同浓度暴露下,TBOEP 对 A549 细胞 DNA 损伤高于 TCIPP 和 IPPP,这表明 TBOEP 具有更高的毒性效应.TCIPP 和 IPPP 对 A549 细胞损伤能力相近,这可能与 TCIPP 和 IPPP 的诱导 A549 产生氧化应激

能力相近有关.在过去的研究中,氧化应激与 DNA 损伤之间的密切关系已被广泛研究^[35],氧化性 DNA 损伤是最常见的细胞遗传学损伤之一^[36].故此,本文猜测 OPFRs 对 A549 细胞的 DNA 损伤很可能是氧化性损伤.

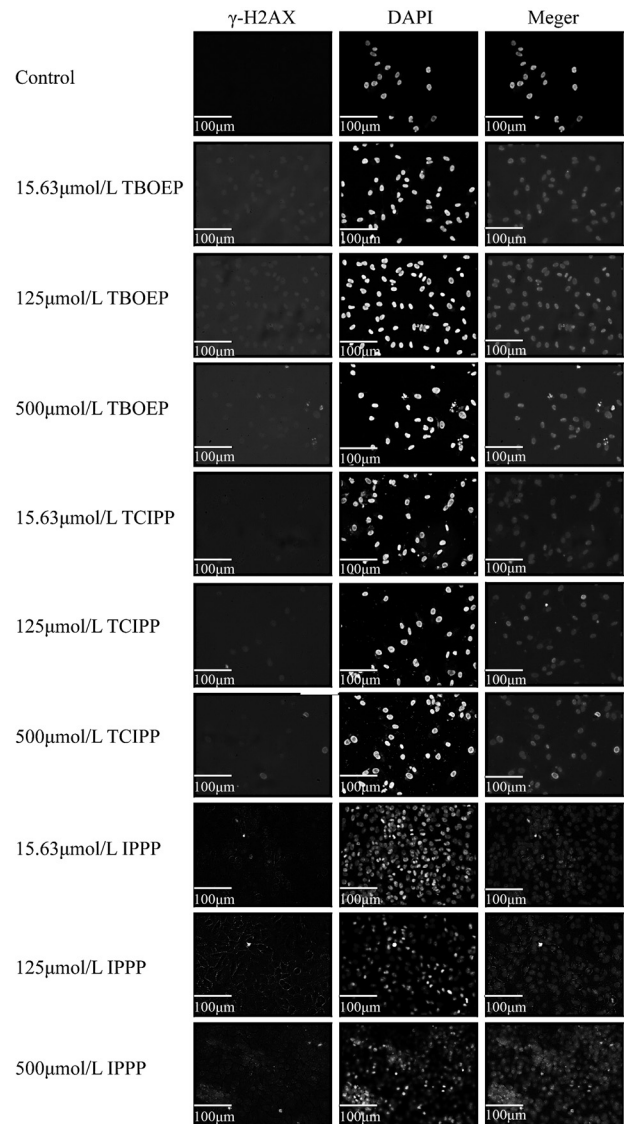


图 5 不同浓度 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 对 A549 的 DNA 损伤情况

Fig.5 Effects of TBOEP, TCIPP and IPPP on the viability of A549 cells under different concentrations

第 1 列表示 γ -H2AX,第 2 列表示 DAPI 染色细胞核.比例尺=100μm

2.6 OPFRs 对 A549 细胞毒性影响的综合评估

比较 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 对 A549 细胞的综合影响,首先将细胞活力、ROS 水平、MMP 水平、IL-6 和 TNF-α 做归一化处理,然后分别以雷达图形式表示在低浓度(15.63μmol/L)、中浓度(125μmol/L)

和高浓度(500 $\mu\text{mol/L}$)的不同指标间的差异.如图 6 所示,本实验中 OPFRs 导致细胞炎症因子水平变化水平最为显著,其次为 ROS 水平.在不同浓度下,TBOEP 引起 A549 炎症水平变化(IL-6 和 TNF- α)均高于同浓度下的 TCIPP 和 IPPP,并且随着剂量上升,TBOEP 与 TCIPP、IPPP 变化差值增大.随着浓度的升高,TBOEP 与 TCIPP 组的归一化后 TNF- α 差值从 0.04 上升至 1.8,TBOEP 与 IPPP 差值从 0.17 上升至 1.99,这表明 TBOEP 更能引起 A549 细胞发生炎症反应.相同的,ROS 变化也十分显著,TBOEP 与 TCIPP 组的归一化后 TNF- α 差值从 0.01 上升至 2.29,TBOEP 与 IPPP 差值从 0.04 上升至 2.55,这表明氧化应激是 TBOEP 主要的致毒机制.然而,在低浓度时,暴露在不同 OPFRs 中的 A549 细胞的细胞活力、ROS 水平和 MMP 水平差异不显著;在中浓度时,TBOEP 暴露下的 A549 细胞的细胞活力和 MMP 水平低于 TCIPP 和 IPPP 暴露组;在高浓度时,TBOEP 暴露后的细胞活力和 MMP 水平显著低于其余组.总体来看,3 种 OPFRs 对 A549 细胞毒性作用顺序为 TBOEP > TCIPP \approx IPPP.

2.7 OPFRs 对 A549 细胞的致毒机制

通过研究细胞活力、氧化应激、凋亡指标和炎症反应的相关性,分析了 OPFRs 的细胞毒性机制.以 TBOEP、TCIPP 和 IPPP 浓度为自变量,以细胞毒性参数和 4 个参数(ROS、MMP、IL-6 和 TNF- α)为因变量,进行 Pearson(双尾)相关性分析.由表 1 可知,OPFRs 的细胞活力与 MMP 呈正相关,与 ROS、IL-6、TNF- α 水平呈负相关,差异有统计学意义($P < 0.01$).值得注意的是,与其他 OPFRs 相比,TBOEP 暴露组中的细胞活力与 ROS、TNF- α 的相关性系数绝对值更高,分别为-0.993 和-0.981,具有很强的负相关性.因此,烷基-OPFRs 可能带来更强的氧化应激和炎症风险,这与 Zhu 等^[37]研究结果一致.

通过表 1 中的数据发现,细胞内 ROS 与 IL-6、TNF- α 呈正相关,与 MMP 呈负相关.有研究表明,OPFRs 可导致细胞内 ROS 水平超载,通过氧化应激方式诱导 DNA 损伤与细胞死亡,加剧细胞炎症反应^[38].另外,线粒体已被证明在炎症水平的调节中起关键作用^[39].OPFRs 会破坏 MMP 的完整性,增加线粒体膜的通透性,导致 MMP 降低^[28],引发线粒体功能障碍,甚至诱导细胞凋亡^[40].然而,线粒体功能障碍

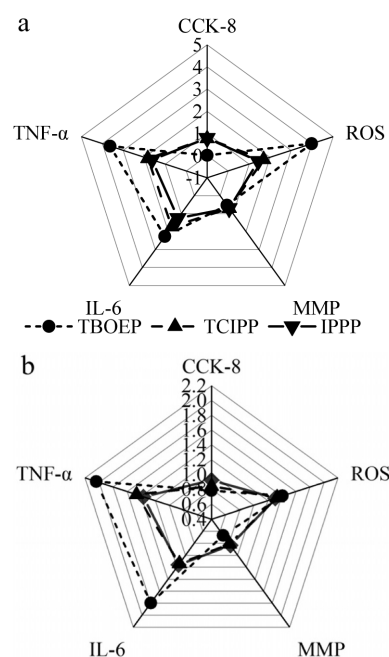
以及细胞凋亡都可能会促使细胞分泌炎症因子,加重细胞炎症损伤状况^[39].在本研究中,ROS、炎症因子与细胞毒性的显著相关性可能是由于 ROS 增加引起氧化应激损伤,以及炎症因子水平升高引发炎症反应导致细胞活性降低.故此,OPFRs 对 A549 细胞的毒性机制主要为 ROS 超载导致的氧化应激以及炎症损伤,氧化应激和炎症会损害个体的防御机制,诱导多种自身免疫性疾病.

表 1 OPFRs 的细胞活力、氧化应激、细胞凋亡和炎症反应之间的相关性

Table 1 Correlation coefficients between cell viability, oxidative stress, apoptosis and inflammation

OPFRs	指标	细胞活力	ROS	MMP	IL-6	TNF- α
TBOEP	细胞活力	1	-0.993**	0.879**	-0.909**	-0.981**
	ROS		1	-0.830**	0.865**	0.964**
	MMP			1	-0.991**	-0.943**
	IL-6				1	0.960**
	TNF- α					1
TCIPP	细胞活力	1	-0.952**	0.981**	-0.866**	-0.943**
	ROS		1	-0.965**	0.914**	0.982**
	MMP			1	-0.889**	-0.953**
	IL-6				1	0.875**
	TNF- α					1
IPPP	细胞活力	1	-0.894**	0.935**	-0.882**	-0.922**
	ROS		1	-0.962**	0.897**	0.966**
	MMP			1	-0.917**	-0.981**
	IL-6				1	0.920**
	TNF- α					1

注:*表示显著性水平 $P < 0.05$,**表示显著性水平 $P < 0.01$.



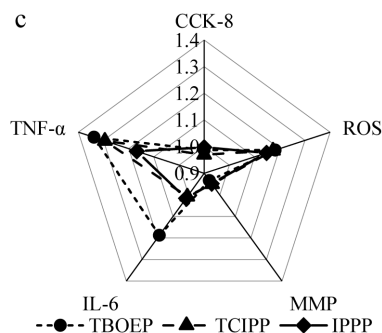


图6 不同浓度的OPFRs对A549细胞毒性的差异性比较

Fig.6 Comparison of the cytotoxicity of A549 cells under different concentrations of OPFRs

(a)、(b)、(c)分别表示3种OPFRs在浓度为500,125,15.63 $\mu\text{mol/L}$ 下的指标差异

3 结论

3.1 所有OPFRs均可抑制细胞活力、促使过量ROS的产生、引起线粒体功能障碍、诱导细胞炎症反应和细胞DNA损伤。

3.2 TBOEP对A549细胞的细胞毒性最强,TCIPP和IPPP毒性效应相近。值得注意的是,在低浓度下三者毒性表现差异并不大,在中高浓度时,毒性表现差异较大。特别是在高浓度500 $\mu\text{mol/L}$ 的TBOEP暴露下,细胞活力不到5%,细胞内活性氧水平上升3倍,线粒体膜电位降低了46.5%,炎症因子IL-6和TNF- α 的分泌量上升了124.4%和262.7%。

参考文献:

- [1] Yao C, Yang H, Li Y. A review on organophosphate flame retardants in the environment: Occurrence, accumulation, metabolism and toxicity [J]. *Science of the Total Environment*, 2021,795:148837.
- [2] Zhou Y, Liao H, Yin S, et al. Aryl-, halogenated- and alkyl-organophosphate esters induced oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and NLRP3 inflammasome activation in HepG2 cells [J]. *Environmental Pollution*, 2023,316:120559.
- [3] He C, Wang X, Thai P, et al. Organophosphate and brominated flame retardants in Australian indoor environments: Levels, sources, and preliminary assessment of human exposure [J]. *Environmental Pollution*, 2018,235:670-679.
- [4] Guo Y, Liang C, Zeng M-X, et al. An overview of organophosphate esters and their metabolites in humans: Analytical methods, occurrence, and biomonitoring [J]. *Science of the Total Environment*, 2022, 848:157669.
- [5] Chen Y, Cao Z, Covaci A, et al. Novel and legacy flame retardants in paired human fingernails and indoor dust samples [J]. *Environment International*, 2019,133:105227.
- [6] 李晓静,李琴,周金华,等.广州人群尿液有机磷阻燃剂的暴露与健康风险 [J]. *中国环境科学*, 2022,42(3):1410-1417.
Li X J, Li Q, Zhou J H, et al. Urinary metabolites of organophosphorus flame retardants in Guangzhou population: Exposure and health risk. [J]. *China Environmental Science*, 2022,42(3):1410-1417.
- [7] Wong F, Dewit C A, Newton S R. Concentrations and variability of organophosphate esters, halogenated flame retardants, and polybrominated diphenyl ethers in indoor and outdoor air in Stockholm, Sweden [J]. *Environmental Pollution*, 2018,240:514-522.
- [8] Kurt Karakus P, Alegria H, Birgul A, et al. Organophosphate ester (OPEs) flame retardants and plasticizers in air and soil from a highly industrialized city in Turkey [J]. *Science of the Total Environment*, 2018,625:555-565.
- [9] Tokumura M, Hatayama R, Tatsu K, et al. Organophosphate flame retardants in the indoor air and dust in cars in Japan [J]. *Environmental Monitoring and Assessment*, 2017,189(2):48.
- [10] Luongo G, Ostman C. Organophosphate and phthalate esters in settled dust from apartment buildings in Stockholm [J]. *Indoor Air*, 2016, 26(3):414-425.
- [11] Bergh C, Torgrip R, Emenius G, et al. Organophosphate and phthalate esters in air and settled dust - a multi-location indoor study [J]. *Indoor Air*, 2011,21(1):67-76.
- [12] 沈扬,于畅,孔东东.有机磷阻燃剂甲状腺干扰效应及其作用机制研究——以磷酸三(2-氯丙基)酯(TCPP)为例 [J]. *中国环境科学*, 2018,38(6):2337-2344.
Shen Y, Yu C, Kong D D. Thyroid hormone disrupting effects of organophosphorus flame retardants and its mechanisms of action, take TCPP as an example [J]. *China Environmental Science*, 2018, 38(6):2337-2344.
- [13] An J, Hu J, 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*, 2016,51(11):980-988.
- [14] Huang W T, Jin L Z, Yin H, et al. Assessments of the effects of tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate (TDCPP) on human intestinal health from the aspects of intestinal flora changes and cytotoxicity to human cells [J]. *Science of the Total Environment*, 2023,894:164823.
- [15] 郝蕴,吴琰婕,韩培,等.三种有机磷阻燃剂对BEAS-2B细胞联合毒性的联合指数法测定 [J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2022,57(5): 604-608.
Hao Y, Wu L J, Han P, et al. Determination of combined toxicity of three organophosphate flame retardants to BEAS-2B cells by combination index [J]. *Journal of Zhengzhou University (Medical Sciences)*, 2022,57(5):604-608.
- [16] Meng Y, Xu X, Niu D, et al. Organophosphate flame retardants induce oxidative stress and Chop/Caspase 3-related apoptosis via Sod1/p53/Map3k6/Fkbp5in NCI-1975 cells [J]. *Science of the Total Environment*, 2022,819:153160.
- [17] Yu X, Yin H, Peng H, et al. OPFRs and BFRs induced A549 cell apoptosis by caspase-dependent mitochondrial pathway [J]. *Chemosphere*, 2019,221:693-702.
- [18] An J, Hu J, 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.
- [19] Tajima S, Araki A, Kawai T, et al. Detection and intake assessment of organophosphate flame retardants in house dust in Japanese dwellings [J]. Science of the Total Environment, 2014,478:190-199.
- [20] Pantelaki I, Voutsas D. Organophosphate esters in the urban atmosphere of Thessaloniki city, Greece [J]. Chemosphere, 2024,351:141125-141125.
- [21] Kuo L J, Yang L X. γ -H2AX γ : A novel biomarker for DNA double-strand breaks [J]. In Vivo, 2008,22(3):305-309.
- [22] Li Z, Sun J, Liu W, et al. Changes in the circRNA expression profile of PC12 cells induced by TDCIPP exposure may regulate the downstream NF- κ B pathway via the *Traf2* gene [J]. Chemosphere, 2020,254:126834.
- [23] Yu D W, Hales B F, Robaire B. Organophosphate ester flame retardants and plasticizers affect the phenotype and function of HepG2 liver cells [J]. Toxicological Sciences, 2024,199(2):261-275.
- [24] Wang C, Li T, Tang S, et al. Thapsigargin induces apoptosis when autophagy is inhibited in HepG2 cells and both processes are regulated by ROS-dependent pathway [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2016,41:167-179.
- [25] Wang J, Yuan L, Wu W, et al. Characterization of the phosphotriesterase capable of hydrolyzing aryl-organophosphate flame retardants [J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2022,106(19/20):6493-6504.
- [26] Mennillo E, Krokje A, Pretti C, et al. Biotransformation and oxidative stress responses in rat hepatic cell-line (H4IIE) exposed to racemic ketoprofen (RS-KP) and its enantiomer, dexketoprofen (S(+)-KP) [J]. Environmental Toxicology and Pharmacology, 2018,59:199-207.
- [27] Jiang Q, Li Q, Han J, et al. rLj-RGD3 induces apoptosis via the mitochondrial-dependent pathway and inhibits adhesion, migration and invasion of human HeyA8 cells via FAK pathway [J]. International Journal of Biological Macromolecules, 2017,96:652-668.
- [28] Xiao Y, Yi J, Karam C, et al. Dysregulation of mitochondrial permeability transition pore (MPTP) is associated with enhanced ROS production in skeletal muscle of an ALS mouse model [J]. Biophysical Journal, 2017,112(3):325A.
- [29] Busi M V, Gómez Casati D F, Mariano P A, et al. Nuclear-encoded mitochondrial complex I gene expression is restored to normal levels by inhibition of unedited *ATP9* transgene expression in *Arabidopsis thaliana*. [J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2006,44(1):1-6.
- [30] Mattioda V, Benedetti V, Tessarolo C, et al. Pro-inflammatory and cytotoxic effects of polystyrene microplastics on human and murine intestinal cell lines [J]. Biomolecules, 2023,13(1):140.
- [31] Ferrara F, Ivarsson J, Vallese A, et al. Comparison of pollutant effects on cutaneous inflammasomes activation [J]. Free Radical Biology and Medicine, 2024,218:27.
- [32] Lingappan K. NF- κ B in oxidative stress [J]. Current Opinion in Toxicology, 2018,7:81-86.
- [33] Cui H, Chang Y, Jiang X, et al. Triphenyl phosphate exposure induces kidney structural damage and gut microbiota disorders in mice under different diets [J]. Environment International, 2020,144:106054.
- [34] Rendic S, Guengerich F P. Contributions of human enzymes in carcinogen metabolism [J]. Chemical Research in Toxicology, 2012, 25(7):1316-1383.
- [35] Jin Y, Zheng S, Pu Y, et al. Cypermethrin has the potential to induce hepatic oxidative stress, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*) [J]. Chemosphere, 2011,82(3):398-404.
- [36] Chen H, Wang P, Du Z, et al. Oxidative stress, cell cycle arrest, DNA damage and apoptosis in adult zebrafish (*Danio rerio*) induced by tris (1,3-dichloro-2-propyl) phosphate [J]. Aquatic Toxicology, 2018, 194:37-45.
- [37] Zhu X, Zheng H, Zhang Z, et al. Cytotoxicity evaluation of organophosphorus flame retardants using electrochemical biosensors and elucidation of associated toxic mechanisms [J]. Water Research, 2024,265:122262.
- [38] Meng Y, Xu X, Xie G, et al. Alkyl organophosphate flame retardants (OPFRs) induce lung inflammation and aggravate OVA-simulated asthmatic response via the NF- κ B signaling pathway [J]. Environment International, 2022,163:107209.
- [39] Xian H, Watari K, Sanchez Lopez E, et al. Oxidized DNA fragments exit mitochondria via mPTP- and VDAC-dependent channels to activate NLRP3 inflammasome and interferon signaling [J]. Immunity, 2022,55(8):1370-1385.
- [40] Dong W, Yang B, Wang Y, et al. Polybrominated diphenyl ethers quinone induced parthanatos-like cell death through a reactive oxygen species-associated poly(ADP-ribose) polymerase 1 signaling [J]. Chemical Research in Toxicology, 2018,31(11):1164-1171.

作者简介：沈铖澄(1999-),男,浙江绍兴人,南京理工大学硕士研究生,主要从事环境毒理学.发表论文 1 篇.122102222168@njjust.edu.cn.