

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20141205002

曹璐璐, 李斐, 吴惠丰. BDE-47 对人胚肾细胞 HEK293 的毒理效应及作用机制[J]. 生态毒理学报, 2015, 10(2): 236-242

Cao L L, Li F, Wu H F. The toxicological effects and mechanisms of BDE-47 on HEK293 cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2015, 10(2): 236-242 (in Chinese)

BDE-47 对人胚肾细胞 HEK293 的毒理效应及作用机制

曹璐璐^{1,2}, 李斐^{1,*}, 吴惠丰^{1,#}, 赵建民¹

1. 中国科学院烟台海岸带研究所 中国科学院海岸带环境过程与生态修复重点实验室,烟台 264003
2. 中国科学院大学,北京 100049

收稿日期:2014-12-05 录用日期:2015-01-05

摘要: 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47)是生物体中含量最高且毒性最强的 PBDEs 之一,有关 BDE-47 对肾细胞的毒性及其作用机制的研究仍有待补充。选取 3 个剂量组(低:10⁻⁶ mol·L⁻¹、中:10⁻⁵ mol·L⁻¹、高:10⁻⁴ mol·L⁻¹)及溶剂对照组,研究了 BDE-47 对人胚肾细胞(HEK293)的细胞凋亡率及活性氧(ROS)水平的影响;并从分子水平对细胞氧化损伤、凋亡相关蛋白(APE1 及 p53)及凋亡相关基因 mRNA (*p53*、*Bax*、*Caspase 3*、*Caspase 8*)的表达量进行测定。实验结果显示:与对照组相比,中、高剂量组细胞凋亡率显著增加($P < 0.05$);ROS 水平在中剂量组显著上升($P < 0.01$);随 BDE-47 浓度的变化,APE1 蛋白表达量与细胞 ROS 水平存在一致性;*p53*、*Bax*、*Caspase 8* mRNA 表达量与 BDE-47 的浓度间存在剂量-效应关系。结果表明,BDE-47 可诱导 HEK293 细胞凋亡及氧化应激,APE1 可能是细胞 ROS 升高与细胞凋亡间重要的中介因子;BDE-47 可以通过影响 *Caspase 8* 及线粒体途径中 *p53* 及 *Bax* 的表达诱导细胞凋亡。

关键词: 2,2',4,4'-四溴联苯醚(BDE-47);人胚肾细胞;细胞凋亡;氧化损伤;p53;Bax

文章编号: 1673-5897(2015)2-236-07 **中图分类号:** X171.5 **文献标识码:** A

The Toxicological Effects and Mechanisms of BDE-47 on HEK293 Cells

Cao Lulu^{1,2}, Li Fei^{1,*}, Wu Huifeng^{1,#}, Zhao Jianmin¹

1. Key Laboratory of Coastal Environmental Processes and Ecological Remediation of Chinese Academy of Sciences, Yantai Institute of Coastal Zone Research (YIC), Chinese Academy of Sciences, Yantai 264003, China
2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Received 5 December 2014 **accepted** 5 January 2015

Abstract: Three BDE-47 concentration groups (low: 10⁻⁶ mol·L⁻¹, medium: 10⁻⁵ mol·L⁻¹, high: 10⁻⁴ mol·L⁻¹) and one control group were chosen to investigate the toxic effects of BDE-47 on HEK293 cells, including cell apoptosis ratio and ROS level. Furthermore, the abundance of several proteins (APE1 and p53) and expression level of *p53*, *Bax*, *Caspase 8* were also detected at molecular level. It was found that cell apoptosis was significantly increased in the medium and high concentration groups ($P < 0.05$) compared with the control. ROS level also increased significantly in the medium concentration group ($P < 0.01$). With the increase of BDE-47 concentrations, the variation trend of APE1 abundance was coincident with that of ROS level. Moreover, the mRNA expression level of apoptosis-related genes (*p53*, *Bax* and *Caspase 8*) was up-regulated with the increase

基金项目:国家自然科学基金(21107136);国际科学基金(F/5230-1);中国科学院重点部署项目(KZZD-EW-14);中国科学院战略性先导科技专项(A类)(XDA11020405)

作者简介:曹璐璐(1989-),女,学士,研究方向为海洋生态毒理,E-mail: llcao1026@126.com;

* 通讯作者(Corresponding author), E-mail: fli@yic.ac.cn

共同通讯作者(Co-corresponding author),E-mail: hfwu@yic.ac.cn

of BDE-47 concentrations. These results showed that BDE-47 could cause several toxic effects on HEK293 cells, including induction of cell apoptosis and oxidative stress. APE1 was perhaps an important mediator of cell apoptosis and oxidative stress. BDE-47 could induce cell apoptosis by affecting the expression of Caspase 8 and p53, Bax through the mitochondria signal pathway.

Keywords: BDE-47; HEK293; cell apoptosis; oxidative damage; p53; Bax

多溴联苯醚(polybrominated diphenyl ethers, PBDEs)是一类溴代芳香族化合物,现今作为阻燃剂被广泛应用^[1]。由于其难以降解且可远距离迁移,目前,已经从多种环境介质及生物体中检测到 PBDEs 的存在,如土壤、大气、沉积物、室内空气、贻贝、鱼类、家禽及人体组织、体液等^[2-4]。研究者综合分析了全球已公布的人群监测结果,认为 2,2',4,4'-四溴联苯醚(2,2',4,4'-tetra-bromodiphenyl ether, BDE-47)是与人群关系最密切的 PBDEs 同系物之一,而且它也是分布最广、在生物体中含量最高、对人体和动物毒性最强的 PBDEs 之一^[5]。因此,BDE-47 对于人体的潜在毒性作用受到了国内外研究者的广泛关注。体内及体外实验表明,BDE-47 具有神经毒性、肝肾毒性、生殖毒性及内分泌干扰作用^[6-13]。围绕 BDE-47 细胞毒性的研究工作也已展开。那广水等^[14]研究发现,BDE-47 浓度达 $20 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 以上便会对人肝细胞(L02)的增殖造成抑制。此外,有研究报道,一定剂量的 BDE-47 ($> 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)可引起 L02 细胞乳酸脱氢酶(LDH)漏出率增加、细胞丙二醛(MDA)含量增加、谷胱甘肽-S-转移酶(GST)以及超氧化物歧化酶(SOD)活力降低,表明 BDE-47 可诱导 L02 细胞出现氧化应激^[13]。He 等^[15]研究发现,BDE-47 对于人成神经细胞瘤细胞(SH-SY5Y)存在毒物兴奋效应,且不同浓度 BDE-47($1, 2, 4, 8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$)暴露细胞 24 h 后,细胞在 $8 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 表现出明显的凋亡、氧化应激及 DNA 损伤现象。Yan 等^[16]通过研究指出,BDE-47 诱导的细胞凋亡现象可能与活性氧(reactive oxygen species, ROS)水平增高所造成的线粒体功能障碍有关。李晋等^[17]则认为,BDE-47 导致的细胞周期阻滞与凋亡可能与 p53 蛋白表达水平增加有关。肾脏是重要的排毒器官,若肾脏细胞受损,很可能影响肾脏功能的正常发挥^[18-19]。目前,关于 BDE-47 的肾细胞毒性的研究尚不充分,且其毒性机制尚不明晰,本实验以人胚肾细胞(HEK293)为研究对象,采用低、中、高 3 种剂量 BDE-47 对其进行暴露,观察 BDE-47 对 HEK293 细胞凋亡及细胞内 ROS 水平的影响,并从分子水平初步探究这一系列毒理效应的作用机制,为进一步开展 BDE-47 的毒性作

用机制研究提供实验数据。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验细胞

HEK293 细胞,由烟台毓璜顶医院中心实验室连培文博士赠予。

1.2 仪器与试剂

仪器:SW-CJ-1FD 型洁净工作台(上海博迅实业有限公司);INCO₂/108 型二氧化碳培养箱(德国 Memmert 公司);XDS-1B 型倒置生物显微镜(重庆光学仪器厂);YXQ-LS-50SII 立式压力蒸汽灭菌锅(上海博迅实业有限公司);5804R 台式高速冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司);FACSAria 流式细胞仪(美国 BD 公司);Nanodrop2000 微量紫外分光光度计(美国 Thermo 公司);7500Fast 实时荧光定量 PCR 仪(美国 Applied Biosystems 公司);MiniVE 电泳及转膜装置(美国 GE 公司)。

试剂:BDE-47(纯度为 99.5%,美国 Chem Service 公司);胎牛血清、DMEM 培养基、胰蛋白酶、青霉素及链霉素溶液(双抗)以及磷酸盐溶液(PBS)均购自美国 Hyclone 公司;二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO, 纯度 $> 99\%$, 美国 MP Biomedicals 公司);BCA 蛋白浓度测定试剂盒、Annexin V-FITC 细胞凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司;2',7'-二氯荧光素双乙酸盐(2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA, 美国 Sigma 公司);TRIzol 总 RNA 提取试剂(日本宝生物工程株式会社);SYBR Green 实时定量 PCR 试剂盒(美国 Applied Biosystems 公司);脱嘌呤/脱嘧啶核酸内切酶-1(APE1)兔抗人多克隆抗体购自美国 Abcam 公司;p53 及甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)兔抗人多克隆抗体购自美国 Cloud-clone Corp 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG 二抗(杭州华安生物技术有限公司);HRP-DAB 底物显色试剂盒(天根生化科技北京有限公司);脱脂奶粉(纯度 $> 99\%$)及聚偏二氟乙烯膜(PVDF)均购自北京索莱宝科技有限公司。其他试剂均为国产分析纯,实验用水为超纯水。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞培养

HEK293 细胞复苏后,培养在含 10% (体积百分数)胎牛血清、1% (体积百分数)双抗的 DMEM 培养基中,培养条件为:37 ℃、5% CO₂、相对湿度 95%。3~4 d 进行传代,直至细胞达到对数生长期。

1.3.2 BDE-47 暴露溶液的配制

称取适量的 BDE-47 溶于 DMSO 制成标准储备液(0.2 mol·L⁻¹),于暴露前用 DMEM 培养基稀释成不同浓度的 BDE-47 暴露溶液,溶剂对照组则向培养基中加入等量的 DMSO,各浓度组中 DMSO 的终浓度为 0.1% (体积百分数)。

1.3.3 细胞暴露及收集

结合以往研究^[15, 20-23],BDE-47 暴露浓度共分 4 组,即溶剂对照组和低、中、高剂量组(10⁻⁶、10⁻⁵、10⁻⁴ mol·L⁻¹),每组设 3 个平行样。将处于对数生长期细胞接种于直径为 10 cm 的培养皿中,接种密度约为 10⁵个·mL⁻¹,当细胞融合度达到 80% 时,吸弃上清培养液,加入不同浓度 BDE-47 暴露溶液;经 24 h 暴露培养后吸弃上清溶液,用胰蛋白酶消化细胞 2 min,加胎牛血清终止消化后加入 PBS 吹打洗涤细胞 2 次,离心收集细胞团块于 1.5 mL 离心管中,进行相关指标检测。

1.3.4 细胞凋亡及 ROS 水平检测

细胞凋亡:经暴露收集后,取约 1 × 10⁵ 个细胞,加入 500 μL 凋亡试剂盒缓冲液使其重悬;将 5 μL Annexin V-FITC 加入细胞悬液中,混匀,室温(18~20 ℃)避光孵育 5 min;之后加入 5 μL 碘化丙啶(PI)混匀,再次室温避光孵育 5 min。使用流式细胞仪于 500 nm 激发波长和 530 nm 发射波长下检测,计数 1 × 10⁴ 个细胞,用 Cell Quest 软件获取数据并分析细胞凋亡率。

细胞内 ROS 水平:经暴露收集后,取约 1 × 10⁵ 个细胞,加入 500 μL PBS 缓冲液使其重悬;向细胞悬液中加入 5 × 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 的 DCFH-DA 溶液 5 μL,混匀,18 ℃ 避光孵育 1 h。使用流式细胞仪测定细胞内 DCFH 荧光强度,激发波长为 488 nm,发射波长为 525 nm。

1.3.5 细胞内 APE1 及 p53 蛋白的表达量检测

选取与细胞氧化应激及细胞凋亡有关的 2 个分子标记蛋白 APE1 及 p53,采用蛋白免疫印迹(Western Blot)检测 BDE-47 对这些蛋白表达量的影响。细胞经暴露收集,加入 200 μL 预冷的细胞裂解液吹打

混匀,4 ℃ 裂解 20 min 后,经 14 000 × g 离心 10 min,吸取上清液;使用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度并调整各组蛋白浓度一致,按体积比例(蛋白:上样缓冲液 = 7:1)加入十二烷基磺酸钠(SDS)上样缓冲液后,煮沸变性 10 min,室温冷却后,4 ℃ 保存备用。蛋白上样量为每孔 50 μg,采用 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳分离蛋白质,并通过电转将蛋白转移至 PVDF 膜上;PVDF 膜经 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h 后,分别加入 5 mL 目的蛋白及内参蛋白(GAPDH)的一抗稀释液(APE1 一抗稀释比例为 1:1 000,p53 为 1:500,GAPDH 为 1:2 000),4 ℃ 过夜。次日,用含 0.05% 吐温-20 的 PBS 缓冲液(PBST)漂洗 PVDF 膜 3 次,每次 10 min;加入含 HRP 标记的羊抗兔 IgG 二抗的 PBST 缓冲液,室温孵育 1 h,再用 PBST 缓冲液漂洗 PVDF 膜 3 次;使用 HRP-DAB 底物显色试剂盒孵育 10 min 显色,扫描后用凝胶定量分析软件(Gel-Pro Analyzer, Version 3.0)对蛋白结果进行分析。采用目的条带与内参条带灰度值的比值作为结果,将对照组的值设为 1,其余各组以相对倍数表示。

1.3.6 细胞凋亡相关基因的转录水平表达量检测

采用实时荧光定量 PCR 法(quantitative real-time PCR, qRT-PCR)检测 BDE-47 对细胞凋亡相关基因 mRNA 表达量的影响。细胞经暴露收集,利用 TRIzol 法提取总 RNA,采用微量紫外分光光度计测定总 RNA 质量,A_{260/280} 在 1.8~2.0 为宜;总 RNA 经 70 ℃ 热变性 5 min 后,通过反转录获取 cDNA,反应条件为:42 ℃,1 h;95 ℃,5 min。以 SYBR Green 作为染料,经实时荧光定量 PCR 仪,采用两步法进行 PCR 扩增,所得数据采用 2^{-ΔΔCT} 分析法进行相对定量分析。目的基因及内参基因(*HPRT1*)的引物序列见表 1。

1.4 数据整理与统计分析

采用 SPSS 16.0 统计分析软件,对各组实验数据进行单因素方差分析(One-Way ANOVA),显著性检测采用最小显著差数法(LSD),以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果 (Results)

2.1 BDE-47 暴露对 HEK293 细胞凋亡及 ROS 水平的影响

细胞凋亡率及 ROS 水平如表 2 所示。与对照组相比,中、高剂量组细胞凋亡率显著增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。中剂量组细胞内的 ROS 水平显著高于对照组($P < 0.01$),而在高剂量组中,ROS 含量则显著降低($P < 0.01$)。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 qRT-PCR primer sequences

基因名称	GenBank 编号	上游引物(5'-3')	下游引物(5'-3')
Gene name	GenBank number	Forward primer(5'-3')	Reverse primer(5'-3')
<i>HPRT1</i>	NM_000194	TGACACTGGCAAAACAATGCA	GGTCCTTTTCACAGCAAGCT
<i>Bax</i>	NM_001291428	GCGTCCACCAAGAAGCTGAG	ACCACCTGGTCTTGGAATCC
<i>p53</i>	NM_000546	TCTCCCCAGCCAAAGAAGAAA	TTCCAAGGCCTCATTCAGCTC
<i>Caspase3</i>	NM_004346	CAGTGGAGGCCGACTTCTTG	TGGCACAAGCGACTGGAT
<i>Caspase8</i>	NM_001228	GGA TGGCCACTGTGAATAACTG	TCGAGGACATCGCTCTCTCA

表 2 BDE-47 对 HEK293 细胞凋亡率及 ROS(活性氧)水平的影响

Table 2 Effects of BDE-47 on HEK293 cells apoptosis and ROS (reactive oxygen species) level

组别	细胞凋亡率/%	ROS 水平(与对照组比值)
Groups	Cell apoptosis ratio/%	ROS level (Compared with control)
溶剂对照组(0.1% DMSO)	8.50 ± 2.50	1.00 ± 0.03
Control group(0.1% DMSO)		
低剂量组(10^{-6} mol·L ⁻¹)	10.73 ± 1.39	1.04 ± 0.05
Low concentration group(10^{-6} mol·L ⁻¹)		
中剂量组(10^{-5} mol·L ⁻¹)	20.37 ± 3.26 [*]	1.28 ± 0.04 ^{**}
Medium concentration group(10^{-5} mol·L ⁻¹)		
高剂量组(10^{-4} mol·L ⁻¹)	16.50 ± 2.79 [*]	0.67 ± 0.09 ^{**}
High concentration group(10^{-4} mol·L ⁻¹)		

注:与溶剂对照组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Notes: The level of significance is set at ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs. control.

2.2 BDE-47 暴露对 HEK293 细胞中 APE1 及 p53 蛋白表达水平的影响

BDE-47 暴露对 HEK293 细胞氧化应激及细胞凋亡途径产生影响,并且与浓度相关。由图 1 中可以看出,相比对照组,APE1 仅在中剂量组表达量较对照组显著升高($P < 0.01$);而 p53 蛋白的表达量随浓度的升高表现出先增加后减少的现象($P < 0.05$)。

2.3 BDE-47 暴露对 HEK293 细胞凋亡相关基因转录水平的影响

BDE-47 对凋亡相关基因 mRNA 表达量的影响如表 3 所示。与对照组相比,*Caspase 3* mRNA 表达水平并未随 BDE-47 浓度而产生明显变化,而其他基因的 mRNA 表达量随 BDE-47 浓度的升高而逐渐增加。*Bax* mRNA 的表达水平在高剂量组中明显升高($P < 0.05$);而 *p53* mRNA 的表达量在中、高剂量组均显著增加($P < 0.05$);此外,*Caspase 8* mRNA 在高剂量组的表达量显著高于对照组($P < 0.05$)。

3 讨论 (Discussion)

细胞凋亡是由基因调控的细胞自主程序性死亡,用以保障生命的稳定性^[24]。诱导细胞凋亡的信号通路复杂多样,而 ROS 作为细胞凋亡相关信号通

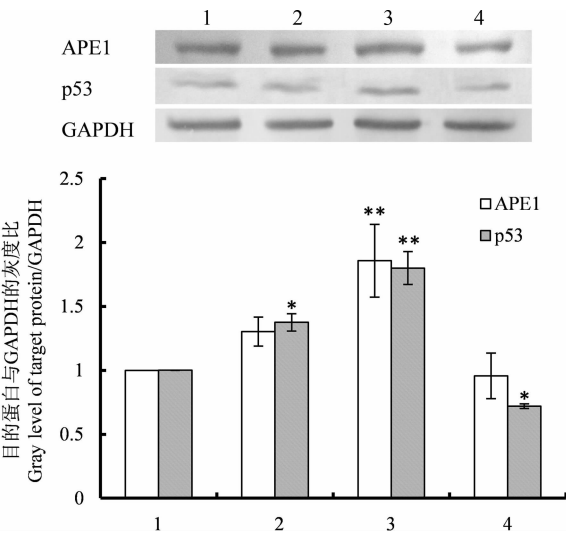


图 1 BDE-47 对 HEK293 细胞中 APE1 及 p53 蛋白表达水平的影响

注:图中 1 为溶剂对照组(0.1% DMSO),2 为低剂量组(10^{-6} mol·L⁻¹),3 为中剂量组(10^{-5} mol·L⁻¹),4 为高剂量组(10^{-4} mol·L⁻¹);与对照组相比,^{*} $P < 0.05$,^{**} $P < 0.01$ 。

Fig. 1 Effects of BDE-47 on proteins (APE1 and p53) expression level in HEK293 cells

Notes: 1 is control group (0.1% DMSO), 2 is low concentration group (10^{-6} mol·L⁻¹), 3 is medium concentration group (10^{-5} mol·L⁻¹) and 4 is high concentration group (10^{-4} mol·L⁻¹). The level of significance is set at ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs. control.

表 3 BDE-47 对 HEK293 细胞中凋亡相关基因 mRNA 表达量的影响

组别 Groups	Bax	p53	Caspase 3	Caspase 8
溶剂对照组 (0.1% DMSO)	1.02 ± 0.15	1.01 ± 0.04	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.04
Control group (0.1% DMSO)				
低剂量组 (10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹)	1.01 ± 0.13	1.04 ± 0.08	1.01 ± 0.04	1.03 ± 0.08
Low concentration group (10 ⁻⁶ mol·L ⁻¹)				
中剂量组 (10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹)	1.16 ± 0.15	1.27 ± 0.05 [*]	0.96 ± 0.04	1.81 ± 0.27
Medium concentration group (10 ⁻⁵ mol·L ⁻¹)				
高剂量组 (10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹)	1.57 ± 0.19 [*]	1.39 ± 0.13 ^{**}	1.00 ± 0.02	2.74 ± 0.72 [*]
High concentration group (10 ⁻⁴ mol·L ⁻¹)				

注:与溶剂对照组相比,* P<0.05,** P<0.01。
Notes: The level of significance is set at * P<0.05, ** P<0.01 vs. control.

路的重要参与者,亦引起了国内外学者的广泛研究^[13,15-16]。本实验结果显示,在 BDE-47 中剂量组中,细胞凋亡率与细胞内 ROS 水平均有所上升。结合以往研究成果^[15],推测 BDE-47 暴露使 HEK293 细胞内 ROS 水平升高,导致 DNA 损伤,进而诱发细胞凋亡现象。而高剂量的 BDE-47 使细胞凋亡增加,但细胞内 ROS 水平显著降低,这可能由于过高剂量的 BDE-47 造成大量细胞死亡并形成细胞碎片,造成细胞内 ROS 无法被检测。

结合细胞水平的毒理效应表现,从分子水平进一步研究了 BDE-47 对细胞氧化应激及凋亡相关的两个蛋白(APE1 及 p53)表达量的影响及对细胞凋亡相关基因(*p53*、*Bax*、*Caspase 3*、*Caspase 8*)转录水平的影响,以系统阐明 BDE-47 对 HEK293 细胞的毒性作用机制。APE1 作为重要的氧化还原因子,可以通过改变半胱氨酸残基在 DNA 中的定位,激活受控转录因子而发挥重要的生理作用,这些转录因子涉及细胞增殖、分化和凋亡等重要细胞效应^[25]。已有研究指出,APE1 在细胞中受 ROS 调控,氧化应激状态的细胞中 APE1 表达量明显增加^[26]。在本实验中,APE1 蛋白的表达量与细胞内 ROS 水平在不同的剂量组中存在一致性,推测细胞内 ROS 水平的上升造成 APE1 表达量上调。此外,随细胞功能状态的不同,APE1 既可发挥抑制凋亡的作用又可发挥促凋亡作用。其促凋亡机制主要通过激活下游的转录因子 AP-1 及 p53 蛋白介导凋亡^[27-28]。本实验中,中剂量组同时检测到 APE1、p53 蛋白表达量的上调与细胞凋亡率的上升,推测 APE1 的高表达可能促进 p53 依赖的细胞凋亡。

p53 是重要的细胞周期与细胞凋亡的调控者,

当外源污染物刺激或内源 ROS 升高导致细胞 DNA 损伤无法修复时,p53 可通过多种途径诱导细胞凋亡^[29];Bax 作为 Bcl-2 家族成员之一,具有促凋亡作用,其基因启动子区域有 p53 的结合位点,所以 p53 能够促进 Bax 的表达^[30]。已有研究指出,在 1 ~ 10 μmol·L⁻¹ 范围内,SH-SY5Y 细胞中 p53 及 Bax mRNA 表达量与 BDE-47 剂量呈现正向剂量效应关系^[31],本实验在 10⁻⁶ ~ 10⁻⁴ mol·L⁻¹ 检测到相似现象,推测 BDE-47 暴露使 HEK293 细胞内 p53 水平上调,进而促进 Bax 的表达,Bax 转移至线粒体与 Bcl-2 家族成员协同调节使通透性转换孔(PTP)开放,造成线粒体中凋亡相关因子(细胞色素 c 或凋亡诱导因子 AIF 等)被释放至胞质中,激活下游凋亡因子,诱导细胞凋亡^[32-33]。p53 蛋白与 mRNA 在高剂量组的表达水平存在差异,推测为翻译后修饰的结果。Caspase 家族是凋亡的主要参与者,Caspase 8 属于凋亡启动因子,位于凋亡级联效应的顶端,几乎可以激活所有下游的 Caspase^[34];同时,Caspase 8 也可以启动线粒体凋亡途径,其可将 Bid (Bcl-2 家族促凋亡因子)剪切为 tBid,tBid 转移定位于线粒体,与 Bcl-2 家族其他成员共同作用促使凋亡的进行^[35-36]。已有研究指出,一定剂量(5、10 μmol·L⁻¹)的 BDE-47 可导致 SH-SY5Y 细胞中 *Caspase 8* mRNA 表达量上调^[37],与本实验结果具有一致性,说明外源死亡受体途径激活 Caspase 8 后,其可能通过 Caspase 家族的凋亡级联效应或线粒体途径参与 HEK293 的细胞凋亡过程。线粒体除释放细胞色素 c 激活 Caspase 依赖的凋亡途径外,还可通过释放 AIF 等启动非 Caspase 依赖的凋亡途径^[38]。凋亡执行因子 Caspase 3 mRNA 表达量在各剂量组中均无明显变

化,指示 HEK293 细胞在凋亡最后的执行阶段,可能通过 Caspase 家族其他凋亡执行因子(Caspase 6 及 Caspase 7)或非 Caspase 依赖的途径实现细胞凋亡。

综上所述,一定剂量的 BDE-47 可诱导 HEK293 细胞凋亡产生 ROS;结合翻译水平及转录水平结果推测:ROS 的产生可诱导 APE1 的上调,进而激活下游转录因子 p53;p53 可促使 Bax 高表达并转移至线粒体,造成其中凋亡相关因子的释放;Caspase 8 可启动 HEK293 细胞凋亡,但其是否通过线粒体途径介导凋亡仍有待进一步研究。本实验揭示了 BDE-47 对 HEK293 细胞的毒理效应,并初步探究了效应机制,为 BDE-47 的肾细胞毒理效应研究提供了理论支持。

通讯作者简介:李斐(1982-),女,工学博士,助理研究员,主要从事生态毒理与计算毒理学方面的研究。

吴惠丰(1977-),男,理学博士,研究员,主要从事海洋生态毒理方面的研究。

参考文献(References):

- [1] Shin J H, Boo H O, Bang E, et al. Development of a cleanup method for polybrominated diphenyl ether (PBDE) in fish by freezing-lipid filtration [J]. *European Food Research and Technology*, 2012, 235(2): 295 - 301
- [2] Chen D, Hale R C. A global review of polybrominated diphenyl ether flame retardant contamination in birds [J]. *Environment International*, 2010, 36(7): 800 - 811
- [3] Shen H T, Yu C, Ying Y, et al. Levels and congener profiles of PCDD/Fs, PCBs and PBDEs in seafood from China [J]. *Chemosphere*, 2009, 77(9): 1206 - 1211
- [4] Talsness C E. Overview of toxicological aspects of polybrominated diphenyl ethers: A flame-retardant additive in several consumer products [J]. *Environmental Research*, 2008, 108(2): 158 - 167
- [5] Hites R A. Polybrominated diphenyl ethers in the environment and in people: A meta-analysis of concentrations [J]. *Environmental Science & Technology*, 2004, 38(4): 945 - 956
- [6] Costa L G, Giordano G. Developmental neurotoxicity of polybrominated diphenyl ether (PBDE) flame retardants [J]. *Neurotoxicology*, 2007, 28(6): 1047 - 1067
- [7] Viberg H, Ponten E, Eriksson P, et al. Neonatal ketamine exposure results in changes in biochemical substrates of neuronal growth and synaptogenesis, and alters adult behavior irreversibly [J]. *Toxicology*, 2008, 249(2 - 3): 153 - 159
- [8] He P, He W H, Wang A G, et al. PBDE-47-induced oxidative stress, DNA damage and apoptosis in primary cultured rat hippocampal neurons [J]. *Neurotoxicology*, 2008, 29(1): 124 - 129
- [9] 叶细标,傅华.多溴联苯醚的环境暴露及健康危害[J]. *环境与职业医学*, 2007, 24(1): 95 - 101
Ye X B, Fu H. Environmental exposure and health risks of polybrominated diphenyl ethers (PBDEs) [J]. *Journal of Environmental & Occupational Medicine*, 2007, 24(1): 95 - 101 (in Chinese)
- [10] 张慧慧,于国伟,牛静萍.多溴联苯醚健康效应的研究进展[J]. *环境与健康杂志*, 2011, 28(12): 1124 - 1127
Zhang H H, Yu G W, Niu J P. Health effects of polybrominated diphenyl ethers: A review of recent studies [J]. *Journal of Environment and Health*, 2011, 28(12): 1124 - 1127 (in Chinese)
- [11] Zhou T, Ross D G, DeVito M J, et al. Effects of short-term in vivo exposure to polybrominated diphenyl ethers on thyroid hormones and hepatic enzyme activities in weanling rats [J]. *Toxicological Sciences*, 2001, 61(1): 76 - 82
- [12] 王兴华,张照祥,丁书姝,等. PBDE-209 致小鼠肝脏病理学改变及其氧化应激机制研究[J]. *中华疾病控制杂志*, 2012, 16(3): 187 - 190
Wang X H, Zhang Z X, Ding S S, et al. Study on pathological changes in mice liver induced by PBDE-209 and the mechanism of oxidative stress [J]. *Chinese Journal of Disease Control Prevention*, 2012, 16(3): 187 - 190 (in Chinese)
- [13] 贾晓栋,张建清,黄海燕. 2,2',4,4'-四溴联苯醚的肝细胞氧化损伤毒性效应研究[J]. *毒理学杂志*, 2012, 26(2): 117 - 120
- [14] 那广水,孙丽娟,张雯雯,等. 溴阻燃剂对肝细胞的毒性[J]. *生态毒理学报*, 2012, 7(5): 570 - 573
Na G S, Sun L J, Zhang W W, et al. Hepatotoxicity of brominated flame retardants [J]. *Asian Journal of Ecotoxicology*, 2012, 7(5): 570 - 573 (in Chinese)
- [15] He W H, He P, Wang A G, et al. Effects of PBDE-47 on cytotoxicity and genotoxicity in human neuroblastoma cells in vitro [J]. *Mutation Research*, 2008, 649(1-2): 62 - 70
- [16] Yan C, Huang D J, Zhang Y M. The involvement of ROS overproduction and mitochondrial dysfunction in PBDE-47-induced apoptosis on Jurkat cells [J]. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2011, 63(5): 413 - 417
- [17] 李晋,匡刚,赵国栋,等. 2,2',4,4'-四溴联苯醚对人神经母细胞瘤 SH-SY5Y 细胞周期、凋亡及 p53 蛋白表达的影响[J]. *环境与健康杂志*, 2012, 29(8): 675 - 678

- Li J, Kuang G, Zhao G D, et al. Effects of PBDE-47 on cell cycle, apoptosis and p53 protein expression in human neuroblastoma SH-SY5Y cells [J]. *Journal of Environment and Health*, 2012, 29(8): 675 – 678 (in Chinese)
- [18] 袁海平, 陈佩杰, 史仍飞, 等. 运动性蛋白尿与肾脏细胞凋亡及氧自由基代谢关系的研究[J]. *中国运动医学杂志*, 2003, 22(3): 254 – 257
- Yuan H P, Chen P J, Shi R F, et al. Studies on the association of the exertional proteinuria with apoptosis and oxidative free radical metabolism of renal cells [J]. *Chinese Journal of Sports Medicine*, 2003, 22(3): 254 – 257 (in Chinese)
- [19] 刘祥梅, 谭军, 吴宇强, 等. 前健脾后补肾对力竭运动大鼠肾功能和肾细胞凋亡的影响[J]. *中医杂志*, 2007, 48(12): 1116 – 1118
- Liu X M, Tan J, Wu Y Q, et al. Effect of strengthening the spleen and tonifying the kidney on the function and apoptosis of kidney in rats after exhaustive exercise [J]. *Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2007, 48(12): 1116 – 1118 (in Chinese)
- [20] Shao J, White C C, Dabrowski M J, et al. The role of mitochondrial and oxidative injury in BDE 47 toxicity to human fetal liver hematopoietic stem cells [J]. *Toxicological Sciences*, 2008, 101(1): 81 – 90
- [21] An J, Yin L L, Shang Y F, et al. The combined effects of BDE47 and BaP on oxidatively generated DNA damage in L02 cells and the possible molecular mechanism [J]. *Mutation Research*, 2011, 721(2): 192 – 198
- [22] Zhong Y F, Wang L L, Yin L L, et al. Cytotoxic effects and oxidative stress response of six PBDE metabolites on human L02 cells [J]. *Journal of Environmental Science and Health Part A*, 2011, 46(12): 1320 – 1327
- [23] Hua X Z, Hua D C, Xu Y. Effects of tetrabrominated diphenyl ether and hexabromocyclododecanes in single and complex exposure to hepatoma HepG₂ cells [J]. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2009, 27(3): 327 – 337
- [24] Kerr J F, Wyllie A H, Currie A R. Apoptosis: A basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics [J]. *British Journal of Cancer*, 1972, 26(4): 239 – 257
- [25] McNeill D R, Wong H K, Narayana A, et al. Lead promotes abasic site accumulation and co-mutagenesis in mammalian cells by inhibiting the major abasic endonuclease Ape1 [J]. *Molecular Carcinogenesis*, 2007, 46(2): 91 – 99
- [26] 李梦侠, 王东. APE1/Ref-1 基因结构及其表达调控[J]. *医学分子生物学杂志*, 2006, 3(5): 350 – 353
- Li M X, Wang D. Genetic structure and expression regulation of APE1/Ref-1 [J]. *Journal of Medical Molecular Biology*, 2006, 3(5): 350 – 353 (in Chinese)
- [27] Shaulian E, Karin M. AP-1 as a regulator of cell life and death [J]. *Nature Cell Biology*, 2002, 4(5): E131 – E136
- [28] Evans A R, Limp-Foster M, Kelley M R. Going APE over ref-1 [J]. *Mutation Research-DNA Repair*, 2000, 461(2): 83 – 108
- [29] Fridman J S, Lowe S W. Control of apoptosis by p53 [J]. *Oncogene*, 2003, 22(4): 9030 – 9040
- [30] Haupt S, Berger M, Goldberg Z, et al. Apoptosis-the p53 network [J]. *Journal of Cell Science*, 2003, 116(20): 4077 – 4085
- [31] Zhang S, Kuang G, Zhao G D, et al. Involvement of the mitochondrial p53 pathway in PBDE-47-induced SH-SY5Y cells apoptosis and its underlying activation mechanism [J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2013, 62: 699 – 706
- [32] Wolter K G, Hsu Y T, Smith C L, et al. Movement of Bax from the cytosol to mitochondria during apoptosis [J]. *Journal of Cell Biology*, 1997, 139(5): 1281 – 1292
- [33] Daugas E, Susin S A, Zamzami N, et al. Mitochondrial nuclear translocation of AIF in apoptosis and necrosis [J]. *Faseb Journal*, 2000, 14(5): 729 – 739
- [34] 袁长青, 丁振华. Caspase 的活化及其在细胞凋亡中的作用[J]. *生理科学进展*, 2002, 33(3): 220 – 224
- Yuan C Q, Ding Z H. Activation and function of Caspases in apoptosis [J]. *Progress in Physiological Sciences*, 2002, 33(3): 220 – 224 (in Chinese)
- [35] Kim K H, Fisher M J, Xu S Q, et al. Molecular determinants of response to TRAIL in killing of normal and cancer cells [J]. *Clinical Cancer Research*, 2000, 6(2): 335 – 346
- [36] Li H L, Zhu H, Xu C J, et al. Cleavage of BID by caspase 8 mediates the mitochondrial damage in the Fas pathway of apoptosis [J]. *Cell*, 1998, 94(4): 491 – 501
- [37] 高丽娟. Fas/FasL 途径在 PBDE-47 致 SH-SY5Y 细胞凋亡中的作用[D]. 武汉: 华中科技大学, 2009: 20-21
- Gao L J. The effect of Fas/FasL pathway on PBDE-47-induced apoptosis in SH-SY5Y cells [D]. Wuhan: Huazhong University of Science & Technology, 2009: 20-21 (in Chinese)
- [38] Norberg E, Orrenius S, Zhivotovsky B. Mitochondrial regulation of cell death: Processing of apoptosis-inducing factor (AIF) [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2010, 396(1): 95 – 100