

低浓度 TBBPA 长期暴露对乳腺癌细胞增殖效应研究

庞晶¹, 贾斌^{1,2*}, 朱慧瑞¹, 姚杰¹, 弓韬¹, 刘志贞^{1*}, 李卓玉^{2*}

(1. 山西医科大学 生物化学与分子生物学教研室, 山西 太原 030001;

2. 山西大学 生物技术研究所, 化学生物学与分子工程教育部重点实验室, 山西 太原 030006)

摘要: 四溴双酚 A (Tetrabromobisphenol A, TBBPA) 是生产量最高的反应型和添加型溴代阻燃剂, 具有持久性有机污染物的特征, 可通过多种途径对人体进行暴露。关于 TBBPA 暴露与人体健康风险等问题亟待研究, 其中 TBBPA 作为一种潜在的环境雌激素干扰物, 对于雌激素敏感性乳腺癌细胞的促癌机制尚不明确。因此, 在本研究中将人源乳腺癌细胞 MCF-7 (ER+) 细胞系和 MDA-MB-231 (ER-) 细胞系分别连续 5 代暴露于环境浓度下人体血浆中残留的 TBBPA (10^{-8} mol/L) 以模拟长期暴露模式, 观察细胞的增殖效应并探讨可能的作用机制。CCK8 和集落形成实验的结果表明, 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露可以显著促进 MCF-7 细胞增殖。活性氧 (ROS) 生成实验表明, MCF-7 细胞在 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露下 ROS 水平升高。蛋白印迹结果表明, 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露于 MCF-7 细胞后, 上调了 Ras 信号通路中 Cyclin D1、c-Myc、p-ERK1/2 和 Ras 的蛋白表达水平。Ras 蛋白抑制剂 (FTS) 干预后阻断了 Ras/p-ERK1/2/Cyclin D1/c-Myc 并降低了细胞的增殖效应。此外, CCK8 实验结果表明 ER α 的抑制剂 Fulvestrant 预处理 MCF-7 细胞可减弱 TBBPA 诱导的细胞增殖活性, 证明 TBBPA 促进 MCF-7 细胞增殖与 ER 的存在有直接关联。同时选取 ER- 的 MDA-MB-231 细胞株进行了研究, 在相同浓度的 TBBPA 长期暴露下, 其增殖活性、ROS 水平及 Ras 信号通路相关蛋白均无显著影响。研究结果表明 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露可以通过激活 Ras 信号通路促进雌激素受体阳性的 MCF-7 细胞的增殖。

关键词: TBBPA; 乳腺癌; Ras 信号通路; 增殖效应

中图分类号: R994.6

文献标志码: A

文章编号: 0253-2395(2024)03-0647-10

Effects of Chronic Exposure to Low-concentration Tetrabromobisphenol A on the Proliferation of Breast Cancer Cells

PANG Jing¹, JIA Bin^{1,2*}, ZHU Huirui¹, YAO Jie¹, GONG Tao¹, LIU Zhizhen^{1*}, LI Zhuoyu^{2*}

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Basic Medical College, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China;

2. Institute of Biotechnology, Key Laboratory of Chemical Biology and Molecular Engineering of Ministry of Education, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: Tetrabromobisphenol A (TBBPA) is the reactive and additive brominated flame retardants (BFRs) with the highest production volume, which has the characteristics of persistent organic pollutants and can be exposed to human bodies in various ways. Thus, the relationship between TBBPA exposure and human health risks needs to be studied urgently. In particular, as a potential environmental estrogen disruptor, the carcinogenic mechanism of TBBPA on estrogen-sensitive breast cancer cells remains unclear. Therefore, in this study, human MCF-7 (ER-positive) cell lines and MDA-MB-231 (ER-negative) cell lines were

收稿日期: 2023-01-17; 接受日期: 2023-06-09

基金项目: 山西省自然科学基金(202203021211232); 山西赛奥生物科技有限公司与山西医科大学合作项目(2F022018020)

作者简介: 庞晶(1998-), 女, 山西临汾人, 硕士研究生, 研究方向为环境肿瘤学。E-mail: pangjing@sxmu.edu.cn

* 通信作者: 贾斌(JIA Bin), E-mail: bjia2006@163.com; 刘志贞(LIU Zhizhen), E-mail: zhizhenliu2013@163.com; 李卓玉(LI Zhuoyu), E-mail: lzy@sxu.edu.cn

引文格式: 庞晶, 贾斌, 朱慧瑞, 等. 低浓度 TBBPA 长期暴露对乳腺癌细胞增殖效应研究[J]. 山西大学学报(自然科学版), 2024, 47(3): 647-656. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2023108

continuously treated with the actual plasma concentration of TBBPA (10^{-8} mol/L) for five generations to simulate long-term exposure mode. The proliferation effect and the possible mechanism were examined. The data from CCK8 and colony formation experiments demonstrated that 10^{-8} mol/L TBBPA long-term exposure promoted the proliferation of MCF-7 cells. The content of ROS increased in MCF-7 cells after long-term exposure to 10^{-8} mol/L TBBPA. Western blotting results showed that 10^{-8} mol/L TBBPA upregulated the Ras expression and induced *p-ERK1/2*, *c-Myc*, and *Cyclin D1* expression in MCF-7 cells on long-term exposure. Moreover, the intervention of Ras inhibitor FTS blocked the *Ras/p-ERK1/2/Cyclin D1/c-Myc* and inhibited cell proliferation. In addition, the data from CCK8 showed that pretreatment of MCF-7 cells by Fulvestrant, an ER α inhibitor, could attenuate cell proliferation activity induced by TBBPA, suggesting that the promotion of MCF-7 cell proliferation by TBBPA was directly related to the ER. At the same time, the MDA-MB-231 (ER-negative) cell line was selected for research. Under long-term exposure to the same concentration of TBBPA, its proliferation activity, ROS level, and Ras signaling pathway related proteins were not significantly affected. These results show that long-term exposure to 10^{-8} mol/L TBBPA can accelerate MCF-7 (ER-positive) cell proliferation *via* the activation of the Ras signaling pathway.

Key words: TBBPA; breast cancer; Ras signaling pathway; proliferation effect

0 引言

四溴双酚 A (Tetrabromobisphenol A, TBBPA) 是一种性能优良的溴化阻燃剂, 广泛添加于电子设备、塑料、建筑材料、合成纺织品和食品包装材料中, 用于降低聚合材料的可燃性^[1-2]。添加于产品中的 TBBPA 可通过挥发、渗出等方式缓慢但持续地释放到周围的环境中。目前, 在室内灰尘、空气、地表水、沉积物、土壤甚至人体尿液、血清、母乳中均有检出^[3-8]。其中, 血浆中检测到的 TBBPA 的实际残留浓度为 9.5×10^{-12} mol/L 至 1.3×10^{-8} mol/L^[8-9]。TBBPA 具有生物积累性和潜在毒性, 即使在很低的暴露浓度下, 也会造成神经毒性、免疫毒性、肝肾毒性、甲状腺激素和雌激素干扰作用等^[10-14]。通过对比不同国家 TBBPA 的污染情况发现中国是 TBBPA 污染最为严重的地区^[15]。2016 年世界卫生组织国际癌症研究中心 (IARC) 将 TBBPA 列为 2A 级致癌物质^[16]。然而, 环境浓度 TBBPA 暴露在乳腺癌的发生进展中的作用有待进一步评估。

TBBPA 能够与雌激素受体 (ER) 结合, 与雌激素形成位点竞争^[17-18]。乳腺癌是雌激素高度敏感性肿瘤, TBBPA 暴露被认为具有乳腺癌恶化风险。其中, Jeong 的研究团队发现, 低剂量的 TBBPA 暴露可通过活性氧 (ROS) 依赖的 Akt/MAPK 信号通路激活 NF- κ B 和 AP-1, 增加 MMP-9 的表达从而诱导乳腺癌细胞 MCF-7 发生转移^[19]。此外, 蔡宗苇研究团队的研究结果表明, 微摩尔水平 (0~10 μ mol/L)

的 TBBPA 暴露可诱导 MCF-7 细胞增殖, 并激活糖酵解和氨基酸的能量代谢^[20]。鉴于环境暴露的普遍性与长期性, 人们经常处于低浓度的长期暴露模式下。为模拟这种暴露模式, 研究人员也做出了相应探究。如卢莉蓉通过对人肝癌细胞 HepG2 开展为期 5 代的 TBBPA 暴露实验, 发现长期暴露于 1 nmol/L TBBPA 下, 细胞增殖活性逐代提高, 自第 3 代起增殖活性为空白对照组的 130% 以上, 在第 4 代增殖活性达到最高, 为空白对照组的 156%, 第 5 代的增殖活性约为空白对照组的 140%^[21]。同时根据我们前期实验的筛选, 发现细胞经连续 5 代 TBBPA 暴露后的增殖效应较为稳定, 与上述结果一致。因此, 我们将 5 代细胞暴露认定为长期暴露模型。然而, 关于该模式下 TBBPA 对乳腺癌细胞潜在效应与机制的相关数据相对较少。因此, 亟须研究环境浓度下长时间持续 TBBPA 暴露的潜在毒性。

目前已有部分研究揭示了 TBBPA 暴露诱发癌症的效应机制。例如, Szychowski 等的研究发现, TBBPA 的主要毒理学目标之一是活性氧 (ROS), 它可以作为信号分子在肿瘤发生过程中诱导 DNA 突变^[22]。此外, 低浓度的 TBBPA 暴露与 Ras 信号通路之间具有高度相关性, TBBPA 暴露可通过生长因子 FGF17 诱导 Ras 信号途径的激活^[23]。在多种肿瘤中, Ras 蛋白以 Ras-GTP 的活化状态持续存在, 促进细胞增殖, 导致癌症的恶化^[24]。法尼基硫代水杨酸 (FTS) 是一种新型的 Ras 抑制剂, 模拟 Ras 的羧

基末端法尼半胱氨酸,通过竞争性作用阻断活性的Ras蛋白与细胞膜半乳凝素疏水性口袋结合,使Ras细胞膜锚定域游离并加速其降解,降低Ras蛋白水平,进而阻断下游信号的激活^[25-27]。低剂量TBBPA的长期暴露是否会通过干扰Ras信号通路进而影响乳腺癌细胞的增殖效应尚有待进一步研究。

本研究根据现有暴露人群血浆检出水平的TBBPA浓度(10^{-8} mol/L)作为暴露剂量,基于TBBPA在生物体内的半衰期约为2 d^[28],采用每日给细胞换液的长期暴露方式,模拟随机人群的接触暴露规律,对应随机人群的环境暴露,以此探讨低剂量TBBPA长期暴露对乳腺癌细胞增殖活性的影响及其相应机制,机制探讨主要集中于Ras信号通路,该研究为TBBPA风险评估提供了一种新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

人源乳腺癌细胞MCF-7和MDA-MB-231来源于山西医科大学。四溴双酚A(TBBPA,纯度为99.0%)购于德国Dr. Ehrenstorfer公司;RPMI-1640购自美国Hyclone公司;DMEM高糖培养基购于美国Gibco公司;青霉素、链霉素和质量分数为0.25%的胰蛋白酶购自大连美仑生物技术有限公司;胎牛血清购自北京赛奥美细胞技术有限公司;FTS(Salirasib)和Fulvestrant(ICI 182780)均购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; β -actin抗体和Cyclin D1抗体均购自武汉博士德生物工程有限公司;GAPDH抗体购于美国Bioword公司;c-Myc抗体和Ras抗体购自武汉ABclonal生物科技有限公司;p-ERK1/2抗体购于江苏Afinity生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

人乳腺癌细胞系MCF-7在含体积分数为10%的胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI-1640培养基中生长;三阴性乳腺癌细胞MDA-MB-231所用培养基为含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的DMEM-高糖培养基。两种细胞均置于37℃、体积分数为5% CO₂的加湿细胞培养箱中培养。当细胞融合度为90%

时,用0.25%的胰蛋白酶溶液进行消化和传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2.2 低浓度TBBPA的长期暴露

将粉末状的TBBPA在无菌条件下溶于DMSO溶液中配制成0.1 mol/L的母液,使用前用相应培养基稀释至工作浓度(10^{-8} mol/L)。为了模拟低浓度下的长期暴露,MCF-7细胞及MDA-MB-231细胞在含有 1×10^{-8} mol/L TBBPA的加药培养基中连续暴露5代,建立长期暴露模型。对照组给予浓度为0.1%的DMSO溶液处理。

1.2.3 CCK8检测细胞活性

分别将 10^{-8} mol/L TBBPA处理5代后的MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞以 4×10^3 个细胞/孔的密度接种于96孔板中。细胞贴壁后,弃去旧培养基,对照组换用含0.1% DMSO的相应培养基,实验组换用含 10^{-8} mol/L TBBPA的加药培养基,分别暴露24 h和48 h。暴露结束后,根据CCK8试剂使用说明,100 μ L预混合试剂(培养基和CCK-8混合比例为10:1)被添加到每一个孔中,于37℃中连续孵育4 h,利用酶标仪测量450 nm波长处每孔的吸光度,进而计算细胞的相对增殖率。

对于抑制剂处理实验,分别用Ras抑制剂法尼基硫代水杨酸(FTS, 50 μ mol/L)预处理MCF-7细胞2 h,ER α 抑制剂Fulvestrant(ICI 182780, 10^{-8} mol/L)预处理MCF-7细胞30 min,然后用含 10^{-8} mol/L TBBPA的加药培养基暴露细胞48 h。

1.2.4 集落形成实验

分别将 10^{-8} mol/L TBBPA处理5代后的MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞,以 5×10^3 个细胞/孔的密度接种于12孔板中。细胞贴壁后,用含 10^{-8} mol/L TBBPA的加药培养基进行暴露,每日更换新鲜加药培养基。待细胞形成肉眼可见的集落时,终止暴露,吸弃旧培养基,室温下用质量分数为4%的多聚甲醛固定20 min,0.1%结晶紫染色15 min。利用倒置相差显微镜对大于50个细胞的集落数进行计数。

1.2.5 活性氧测定

分别将 10^{-8} mol/L TBBPA处理5代后的MCF-7细胞和MDA-MB-231细胞,以 2×10^4 个细胞/孔的密度接种于共聚焦皿中。细胞贴壁后

继续在 10^{-8} mol/L TBBPA 的处理下分别孵育 24 h 和 48 h。暴露完成后,在 37°C 下用 10 mmol/L 2',7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)探针孵育 20 min。最后使用荧光显微镜(Olympus Corporation, FV3000)获得荧光图像,并通过 Image J 软件对荧光图像进行统计学分析。

1.2.6 蛋白印迹

收集 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞长期暴露模型在 10^{-8} mol/L TBBPA 处理 24 h 和 48 h 后的细胞,用蛋白裂解液(RIPA)加体积分数为 1% 的蛋白酶抑制剂裂解细胞,提取细胞总蛋白。应用二喹啉甲酸法(BCA)测定蛋白质浓度,取蛋白质进行 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),将电泳分离后的蛋白转移到 NC 膜上,用含 5% 脱脂奶粉的 Tris-HCl 缓冲盐溶液+Tween(TBST)室温封闭 1 h,分别加入 1:2 000 稀释的兔抗人 β -actin 抗体、1:2 000 稀释的兔抗人 GAPDH 抗体、1:1 000 稀释的兔抗人 *c-Myc* 抗体、1:2 000 稀释的兔抗人 *Cyclin D1* 抗体、1:1 000 稀释的兔抗人 *Ras* 抗体、1:2 000 稀释的兔抗人 *p-ERK1/2* 抗体, 4°C 过夜孵育。孵育结束后, TBST 洗膜 3 次后加入 1:10 000 稀释的辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG(二抗),室温反应 1 h, TBST 洗涤 3 次,应用超敏增强化学发光(ECL)化学发光试剂显色。采用 Image J 软件分析蛋白条带的灰度值,将目标蛋白条带灰度值与内参蛋白条带灰度值的比值表示为目标蛋白的相对表达水平。

1.2.7 实时荧光定量聚合酶链式反应

收集 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞长期暴露模型在 10^{-8} mol/L TBBPA 处理 24 h 和 48 h 后的细胞,通过 RNA 提取试剂盒和反转录试剂盒分别提取各组细胞的总 RNA,反转录得到 cDNA,以 cDNA 为模板,采用实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)试剂盒对各组细胞中的 mRNA 水平进行了测定,以 β -actin 为内参照,以 $2^{\Delta\Delta Ct}$ 表示 *Cyclin D1*、*c-Myc*、*Ras*、*p-ERK1*、*p-ERK2* 的 mRNA 水平的表达,引物序列见表 1。

1.3 统计学分析

实验数据应用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析,用 *t* 检验对样本均数进行比较,以平均值 \pm 标准差(Mean \pm SD)表示实验结果。实验

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

Gene	Primer	Sequence (5'→3')
<i>Cyclin D1</i>	Forward	GCTGCGAAGTGGAAACCATC
	Reverse	CCTCCTTCTGCACACATTTGAA
<i>c-Myc</i>	Forward	GGCTCCTGGCAAAAAGGTC
	Reverse	CTGCGTAGTTGTGCTGATGT
<i>Ras</i>	Forward	GGGGTTTGGTCTCTGTGCCAGC
	Reverse	GCACTGCAGTTCCTGAAGTATGGC
<i>p-ERK1</i>	Forward	TCGCCGAAGCACCATTCAAGTTC
	Reverse	TCCTGGCTGGAATCTAGCAGTCTC
<i>p-ERK2</i>	Forward	CATTGTGCAGGACCTGATGGAGAC
	Reverse	GTTGGCGGAGTGGATGTACTIONGAG
β -actin	Forward	AAACGTGCTGCTGACCCGAG
	Reverse	TAGCACAGCCTGGATAGCAAC

组与对照组相比, $*P < 0.05$ 表示差异显著而 $**P < 0.01$ 表示差异极显著,二者均有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露对乳腺癌细胞增殖活性的影响

首先采用 CCK8 法检测 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露对乳腺癌细胞增殖活性的影响情况。如图 1 所示, MCF-7 细胞的长期暴露模型持续暴露于 10^{-8} mol/L TBBPA 24 h 和 48 h,活细胞的比例明显高于对照组。其中,暴露 24 h 时,细胞增殖活性提高了 33.09%,暴露 48 h 时,细胞增殖活性提高了 38.03%,表明其增殖效应可随着暴露时间的延长而累积,这与 TBBPA 在体内的累积性相关,且 24 h 与 48 h 两个时间段的增殖活性无显著差异。相反, TBBPA 长期暴露对 ER- 的 MDA-MB-231 细胞的活力无显著影响。

此外,通过集落形成实验检测了 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露处理后 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞的集落形成情况。由图 2 可知,在 MCF-7 细胞中, 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露后大于 50 个细胞的集落数显著多于对照组,细胞集落形成能力显著增强。然而,与对照组相比, MDA-MB-231 细胞集落形成能力无显著差异。这些数据表明,与 MDA-MB-231 细胞相比, MCF-7 细胞对 TBBPA 更敏感,在 10^{-8} mol/L TBBPA 的长期暴露下,可显著促进 MCF-7 细胞的增殖活性。

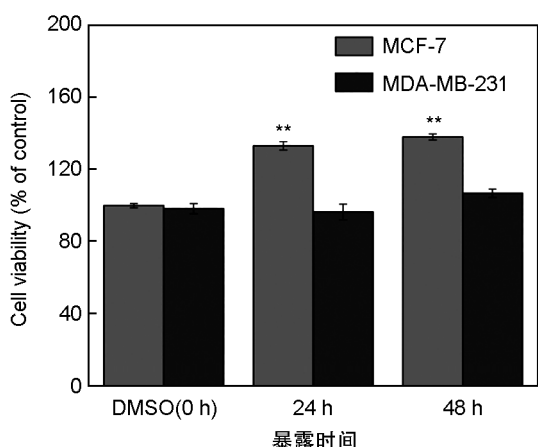


图1 10⁻⁸ mol/L TBBPA 长期暴露对 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞存活率的影响 (与对照组 DMSO 相比, *P < 0.05, **P < 0.01)

Fig. 1 Effects of long-term exposure to 10⁻⁸ mol/L TBBPA on cells viability rate of MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells (Compared with the control, *P < 0.05, **P < 0.01)

2.2 10⁻⁸ mol/L TBBPA 长期暴露对乳腺癌细胞内活性氧水平的影响

为了研究 10⁻⁸ mol/L TBBPA 长期暴露是否影响 MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞内 ROS 水平,使用 DCFH-DA 探针在激光共聚焦显微镜下观察 ROS 水平。荧光图像表明,10⁻⁸ mol/L TBBPA 暴露处理后, MCF-7 细胞 ROS 的生成明显增加,并随暴露时间的延长而增多(图 3)。然而,在 MDA-MB-231 细胞中,没有观察到 ROS 水平的显著差异。这些结果表明,10⁻⁸ mol/L TBBPA 长期暴露可以增加 MCF-7

细胞中 ROS 的生成,而对 MDA-MB-231 细胞 ROS 水平无显著影响。

2.3 10⁻⁸ mol/L TBBPA 长期暴露对乳腺癌细胞中 Ras 信号通路相关蛋白的影响

为了进一步阐明 TBBPA 诱导细胞增殖的分子机制,以 Ras 信号通路相关的 *Cyclin D1*、*c-Myc*、*p-ERK1/2*、*Ras* 蛋白为主要靶点,通过 western blotting 检测所选靶蛋白的表达,以确定激活 Ras 信号通路是否与 TBBPA 诱导的细胞增殖有关。图 4(a)—图 4(b) 的 western blotting 实验结果表明,在 MCF-7 细胞中,10⁻⁸ mol/L 的 TBBPA 上调了 Ras 和三个下游蛋白(*p-ERK1/2*、*Cyclin D1*、*c-Myc*) 的表达。除 *Cyclin D1* 外,通过实时荧光定量 PCR 获得了类似的结果(图 5),这可能是由于 TBBPA 暴露只影响 *Cyclin D1* 的翻译水平,不影响其转录水平。与对照组相比, TBBPA 长期暴露对 MDA-MB-231 细胞中选定的靶蛋白没有影响(图 4(c) —图 4(d))。这些结果表明,10⁻⁸ mol/L TBBPA 可以激活 MCF-7 细胞中 *Ras*、*p-ERK1/2*、*Cyclin D1* 和 *c-Myc* 蛋白,信号靶点的激活可能与调控 TBBPA 诱导的细胞增殖有关。

2.4 Ras 蛋白抑制剂 FTS 预处理对 TBBPA 长期暴露后 MCF-7 细胞相关蛋白的表达和增殖活性的影响

为了检查 Ras 蛋白功能的阻断是否会降低 TBBPA 对细胞增殖的影响。在 TBBPA 处理

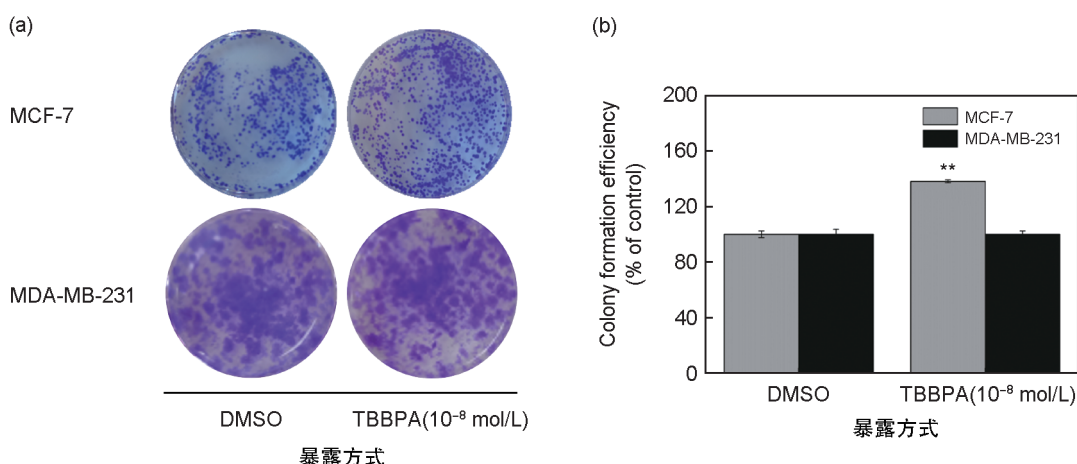


图2 定性(a)和定量(b)检测 10⁻⁸ mol/L TBBPA 长期暴露对 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞集落形成率的影响 (与对照组 DMSO 相比, *P < 0.05, **P < 0.01)

Fig. 2 Qualitative (a) and quantitative (b) detection of the effects of long-term exposure to 10⁻⁸ mol/L TBBPA on colony formation efficiency of MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells (Compared with the control, *P < 0.05, **P < 0.01)

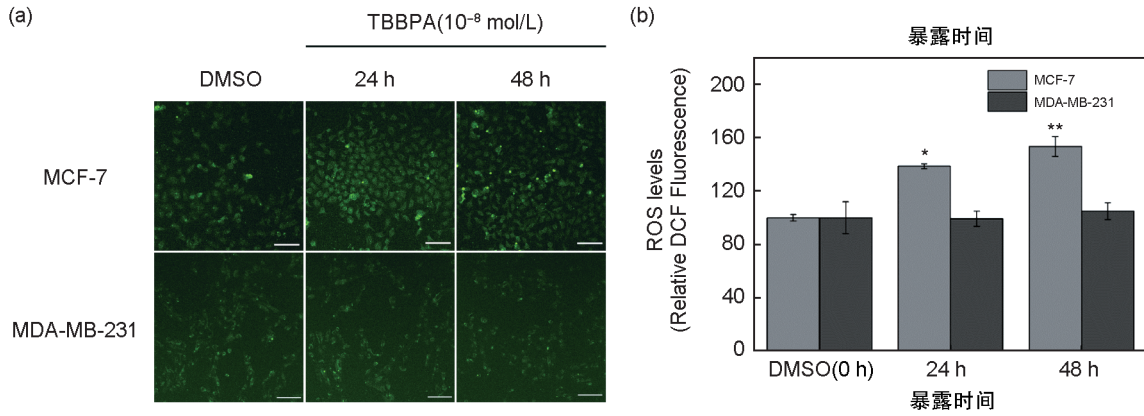


图3 定性(a)和定量(b)检测 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露对 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞 ROS 水平的影响,绿色荧光表示 ROS 的水平(标尺 = $50 \mu\text{m}$)

Fig. 3 Qualitative (a) and quantitative (b) detection of the effects of long-term exposure to 10^{-8} mol/L TBBPA on ROS generation of MCF-7 cells and MDA-MB-231 cells. Green fluorescence represents ROS levels (scalebar = $50 \mu\text{m}$)

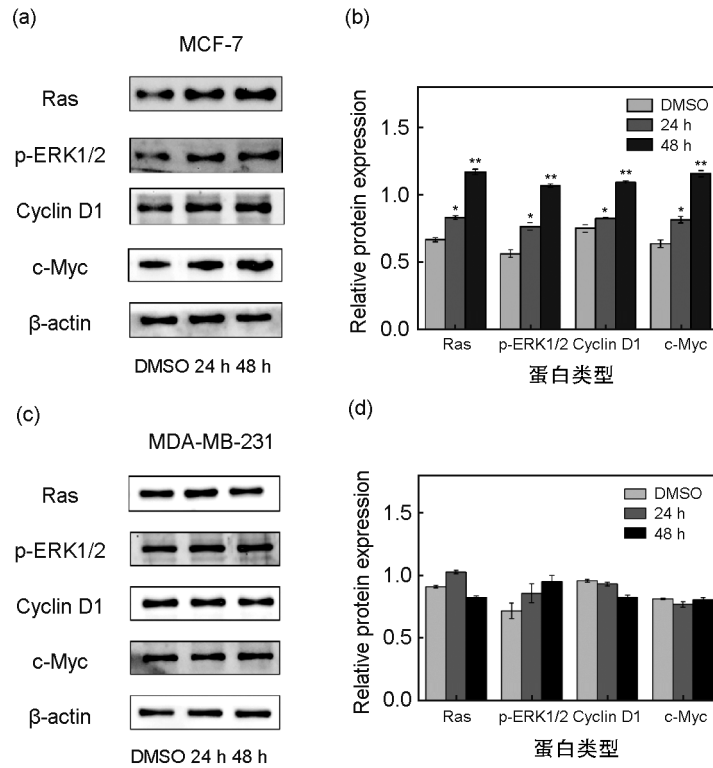


图4 定性(a)和定量(b)检测 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露对 MCF-7 细胞 (a, b) 和 MDA-MB-231 细胞 (c, d) Ras 信号通路相关靶蛋白的表达(与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

Fig. 4 Qualitative and quantitative detection of the effects of long-term exposure to 10^{-8} mol/L TBBPA on Ras signal pathway related target proteins in MCF-7 cells (a, b) and MDA-MB-231 cells (c, d) (Compared with the control, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$)

48 h 前,用 Ras 抑制剂 FTS ($50 \mu\text{mol/L}$) 处理 MCF-7 细胞 2 h。如图 6(a) — 图 6(b) 所示,western blotting 结果显示,在长期暴露模式下,经 FTS 预处理后 MCF-7 细胞中 Ras、p-ERK1/2、Cyclin D1 和 c-Myc 的蛋白表达水平降低。同时,FTS 预处理减少了 TBBPA 暴露引起的

MCF-7 细胞增殖(图 6(c))。这些结果表明,FTS 抑制了 MCF-7 细胞中 Ras 及其下游 p-ERK1/2、Cyclin D1 和 c-Myc 蛋白的表达,并且抑制了 TBBPA 暴露诱导的细胞活力。证明 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露诱导的 MCF-7 细胞的增殖活性与 Ras 信号通路的激活相关。

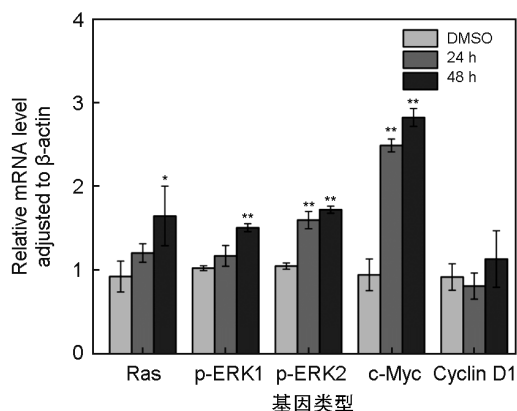


图5 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露对MCF-7细胞Ras信号通路相关靶基因的影响(与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$)

Fig. 5 Effects of long-term exposure to 10^{-8} mol/L TBBPA on Ras signal pathway related target genes in MCF-7 cells (Compared with the control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$)

2.5 ER α 抑制剂 Fulvestrant 预处理对 TBBPA 长期暴露后 MCF-7 细胞增殖效应的影响

为了研究 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露诱导 MCF-7 细胞的增殖效应是否与 TBBPA 可以与雌激素受体结合相关,我们开展了经雌激素受体拮抗剂 Fulvestrant 预处理后的 TBBPA 暴露实验。结果如图 7 所示,加入 ER α 抑制剂 Fulvestrant 可显著减弱 TBBPA 诱导的细胞增殖,证明 10^{-8} mol/L TBBPA 诱导 MCF-7 细胞的增殖效应与雌激素受体有直接关联。

3 讨论

乳腺癌是雌激素依赖的恶性肿瘤,内源性

和外源性的雌激素都能增加乳腺癌的发生率^[29]。TBBPA 具有与雌激素相似的结构,进入生物体后可以通过与雌激素受体结合发挥雌激素干扰作用,被认为是一种环境雌激素^[30]。此外,TBBPA 具有较高的亲脂性,能够促进子宫内膜癌、乳腺癌等激素依赖的肿瘤发生发展^[20,31]。Zhang 等的研究发现,暴露于环境相关浓度 TBBPA 的 BALB/c 小鼠出现了严重的子宫水肿^[32]。晋小婷等人研究发现低浓度的 TBBPA 可以促进巨噬细胞极化为 M₂ 表型,进一步诱导子宫内膜癌的恶性增殖、粘附、迁移和侵袭^[33]。TBBPA 可能通过增加雌激素水平和促进 TP53 突变而产生子宫肿瘤^[34]。此外,基于女性乳腺脂肪组织中 TBBPA 暴露和代谢组学的研究发现,TBBPA 可通过减少磷脂酰胆碱(PC)的表达促进乳腺癌的发展^[35]。本研究通过在 MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞中进行连续 5 代 10^{-8} mol/L TBBPA 的暴露实验,以模拟长期暴露模式。我们在研究中发现长期低浓度的 TBBPA 暴露能够促进 MCF-7 细胞的增殖活性,且具有时间依赖性,提示 10^{-8} mol/L TBBPA 长期暴露具有促乳腺癌风险。此外,TBBPA 在哺乳动物体内的半衰期较短^[36],长期暴露会导致 TBBPA 在体内有一定的残余量,随暴露时间的延长在各器官中长期累积^[37]。虽然长期接触低浓度 TBBPA 不会导致细胞死亡或急性疾病,但可能会破坏正常的生理和代谢活动,导致慢性疾病。与以上相反的是,低

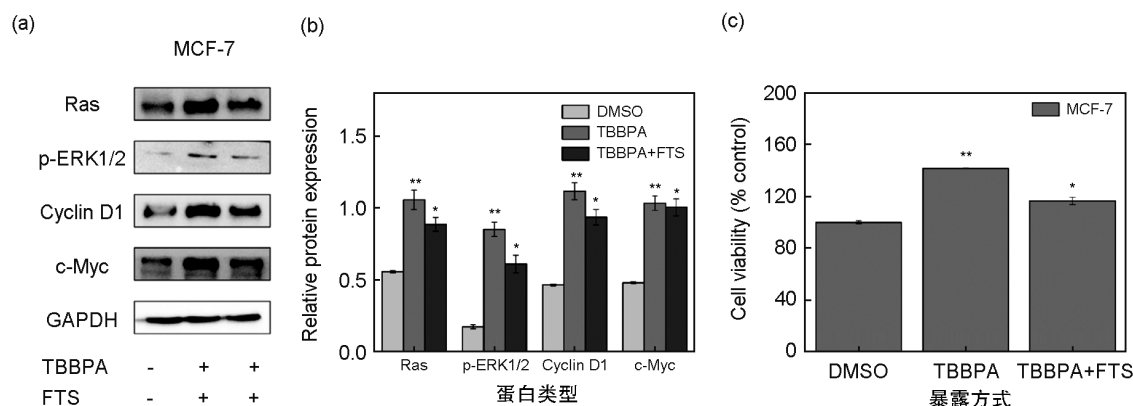


图6 定性(a)和定量(b)检测经Ras蛋白抑制剂FTS预处理后,TBBPA长期暴露对MCF-7细胞中Ras信号通路相关蛋白的表达及其增殖活力的影响(c)(与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$)

Fig. 6 Qualitative (a) and quantitative (b) detection of the expression of Ras signal pathway related proteins and their proliferation activity (c) in MCF-7 cells after pretreatment with Ras protein inhibitor FTS on long-term TBBPA exposure (Compared with the control,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$)

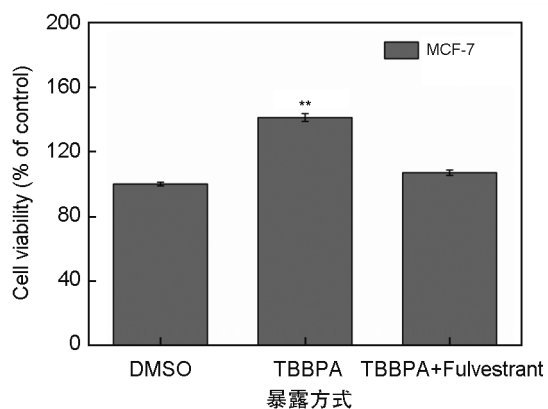


图7 经ER α 抑制剂Fulvestrant预处理后, 10^{-8} mol/L TBBPA长期暴露对MCF-7细胞存活率的影响(与对照组相比, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)

Fig. 7 Effects of long-term exposure to 10^{-8} mol/L TBBPA after pretreatment with ER α inhibitor Fulvestrant on the cells viability rate of MCF-7 cells (Compared with the control, $*P < 0.05$, $**P < 0.01$)

浓度TBBPA暴露后MDA-MB-231细胞活力未检测到显著变化,这可能与该细胞缺乏ER有关,TBBPA能够与ER结合,并与雌激素形成位点竞争,从而影响糖脱氢和硫酸盐化反应过程^[38]。缺乏ER使得环境雌激素不会诱导细胞生长的任何变化。鉴于此,我们通过采用雌激素受体拮抗剂Fulvestrant预处理MCF-7细胞发现抑制ER可显著减弱TBBPA诱导的细胞增殖活性,说明TBBPA介导的雌激素稳态破坏可能是TBBPA促进MCF-7细胞增殖效应的原因。

正常情况下,细胞内氧化与抗氧化处于平衡状态,当生物体暴露于环境污染物时,ROS的动态平衡被破坏,引起“氧化应激反应”,使ROS产生增多。ROS可作为细胞信号级联反应中的第二信使,诱导癌细胞发生DNA损伤,促进肿瘤细胞的持续增殖和存活^[39]。Zhao等的研究表明,TBBPA通过增加ROS的生成,破坏氧化与抗氧化防御过程中的平衡,最终导致细胞毒性的发生,首次为TBBPA调控ROS的代谢途径提供了证据^[20]。此外,Tajbakhsh和Deng等的研究表明,低浓度的天然或合成雌激素可以促进乳腺癌细胞中ROS的产生和细胞增殖^[40-41]。我们也得到了相似的结果, 10^{-8} mol/L TBBPA的长期暴露引起了MCF-7细胞中ROS水平的增加,增加暴露时间的同时也增加了ROS生成,提示TBBPA促进乳腺癌的恶性进

展可能影响多重肿瘤生物学特性。

Ras信号通路的激活对肿瘤细胞的生长,存活和分化具有十分重要的意义。其中,Ras/ERK通路是Ras蛋白的下游通路之一,在肿瘤细胞中经常被过度激活^[42]。Cyclin D1是Ras的下游基因之一,是一种高度保守的细胞周期蛋白,有助于调节细胞周期过程^[36]。c-Myc作为原癌基因对细胞的增殖、生长、存活和分化起着至关重要作用,当其表达紊乱时,可导致肿瘤发生^[43]。我们的机制研究支持TBBPA诱导的增殖与Ras/p-ERK1/2/Cyclin D1/c-Myc的激活密切相关,Ras蛋白抑制剂(FTS)预处理可以显著减少这种现象。TBBPA不会改变MDA-MB-231细胞中Ras通路相关蛋白的表达。因此,我们的数据揭示了长期低浓度的TBBPA暴露通过Ras信号通路刺激ER阳性的MCF-7细胞增殖,造成促癌风险,该结果为TBBPA长期暴露增加致癌风险提供实验依据。

4 结论

本研究通过将MCF-7(ER+)细胞系和MDA-MB-231(ER-)细胞系分别连续5代暴露于环境浓度下人体血浆中残留的TBBPA(10^{-8} mol/L)中以模拟随机人群的长期暴露模式,结果发现环境浓度TBBPA长期暴露可显著促进雌激素受体阳性的MCF-7细胞增殖,诱导细胞内活性氧产生,激活Ras信号通路。结果表明环境浓度TBBPA长期暴露可诱导乳腺癌的发生与发展,同时也为更深刻地探究TBBPA的内分泌干扰毒性及致癌成癌风险的形成机理提供了理论数据支撑。

参考文献:

- [1] LAW R J, ALLCHIN C R, DE BOER J, *et al.* Levels and Trends of Brominated Flame Retardants in the European Environment[J]. *Chemosphere*, 2006, **64**(2): 187-208. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2005.12.007.
- [2] LIANG Z S, LI G Y, XIONG J K, *et al.* Purification, Molecular Characterization and Metabolic Mechanism of an Aerobic Tetrabromobisphenol a Dehalogenase, a Key Enzyme of Halorespiration in *Ochrobactrum* Sp. T[J]. *Chemosphere*, 2019, **237**: 124461. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2019.124461.
- [3] XIE H J, WANG H J, JI F, *et al.* Tetrabromobisphenol a

- Alters Soil Microbial Community via Selective Antibacterial Activity[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, **164**: 597–603. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.08.053.
- [4] NI H G, ZENG H. HBCD and TBBPA in Particulate Phase of Indoor Air in Shenzhen, China[J]. *Sci Total Environ*, 2013, **458-460**: 15–19. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2013.04.003.
- [5] MCAVOY D C, PITTINGER C A, WILLIS A M. Bio-transformation of Tetrabromobisphenol a (TBBPA) in Anaerobic Digester Sludge, Soils, and Freshwater Sediments[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2016, **131**: 143–150. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2015.07.009.
- [6] BARGHI M, SHIN E S, KIM J C, *et al.* Human Exposure to HBCD and TBBPA via Indoor Dust in Korea: Estimation of External Exposure and Body Burden[J]. *Sci Total Environ*, 2017, **593/594**: 779–786. DOI: 10.1016/j.scitotenv.2017.03.200.
- [7] HO K L, YUEN K K, YAU M S, *et al.* Glucuronide and Sulfate Conjugates of Tetrabromobisphenol a (TBBPA): Chemical Synthesis and Correlation Between Their Urinary Levels and Plasma TBBPA Content in Voluntary Human Donors[J]. *Environ Int*, 2017, **98**: 46–53. DOI: 10.1016/j.envint.2016.09.018.
- [8] ABDALLAH M A E. Environmental Occurrence, Analysis and Human Exposure to the Flame Retardant Tetrabromobisphenol-A (TBBP-A)-a Review[J]. *Environ Int*, 2016, **94**: 235–250. DOI: 10.1016/j.envint.2016.05.026.
- [9] COVACI A, HARRAD S, ABDALLAH M A E, *et al.* Novel Brominated Flame Retardants: a Review of Their Analysis, Environmental Fate and Behaviour[J]. *Environ Int*, 2011, **37** (2): 532–556. DOI: 10.1016/j.envint.2010.11.007.
- [10] KITAMURA S, JINNO N, OHTA S, *et al.* Thyroid Hormonal Activity of the Flame Retardants Tetrabromobisphenol a and Tetrachlorobisphenol A[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2002, **293**(1): 554–559. DOI: 10.1016/S0006-291X(02)00262-0.
- [11] PULLEN S, BOECKER R, TIEGS G. The Flame Retardants Tetrabromobisphenol a and Tetrabromobisphenol A-bisallylether Suppress the Induction of Interleukin-2 Receptor α Chain (CD25) in Murine Splenocytes[J]. *Toxicology*, 2003, **184**(1): 11–22. DOI: 10.1016/s0300-483x(02)00442-0.
- [12] 吕良, 苏瑞军, 晋小婷, 等. 环境浓度TBBPA暴露对人正常肝细胞致癌风险研究 [J]. 山西大学学报(自然科学版), 2021, **44**(1): 142–150. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2019125.
- LÜ L, SU R J, JIN X T, *et al.* TBBPA Induced Carcinogenic Risk to Human Liver Cell Line Under the Environmental Concentration[J]. *J Shanxi Univ Nat Sci Ed*, 2021, **44**(1): 142–150. DOI: 10.13451/j.sxu.ns.2019125.
- [13] FUKUDA N, ITO Y, YAMAGUCHI M, *et al.* Unexpected Nephrotoxicity Induced by Tetrabromobisphenol a in Newborn Rats[J]. *Toxicol Lett*, 2004, **150**(2): 145–155. DOI: 10.1016/j.toxlet.2004.01.001.
- [14] YIN N Y, LIANG S J, LIANG S X, *et al.* TBBPA and Its Alternatives Disturb the Early Stages of Neural Development by Interfering with the NOTCH and WNT Pathways[J]. *Environ Sci Technol*, 2018, **52**(9): 5459–5468. DOI: 10.1021/acs.est.8b00414.
- [15] LIU K, LI J, YAN S J, *et al.* A Review of Status of Tetrabromobisphenol a (TBBPA) in China[J]. *Chemosphere*, 2016, **148**: 8–20. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2016.01.023.
- [16] LAUBY-SECRETAN B, LOOMIS D, BAAN R, *et al.* Use of Mechanistic Data in the IARC Evaluations of the Carcinogenicity of Polychlorinated Biphenyls and Related Compounds[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, **23**(3): 2220–2229. DOI: 10.1007/s11356-015-4829-4.
- [17] LI J, MA M, WANG Z J. In Vitro Profiling of Endocrine Disrupting Effects of Phenols[J]. *Toxicol Vitro*, 2010, **24**(1): 201–207. DOI: 10.1016/j.tiv.2009.09.008.
- [18] KITAMURA S, SUZUKI T, SANO S, *et al.* Comparative Study of the Endocrine-disrupting Activity of Bisphenol a and 19 Related Compounds[J]. *Toxicol Sci*, 2005, **84**(2): 249–259. DOI: 10.1093/toxsci/kfi074.
- [19] LEE G H, JIN S W, KIM S J, *et al.* Tetrabromobisphenol a Induces MMP-9 Expression via NADPH Oxidase and the Activation of ROS, MAPK, and Akt Pathways in Human Breast Cancer MCF-7 Cells[J]. *Toxicol Res*, 2019, **35**(1): 93–101. DOI: 10.5487/TR.2019.35.1.093.
- [20] ZHAO C, TANG Z, CHUNG A C K, *et al.* Metabolic Perturbation, Proliferation and Reactive Oxygen Species Jointly Contribute to Cytotoxicity of Human Breast Cancer Cell Induced by Tetrabromo and Tetrachloro Bisphenol A[J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2019, **170**: 495–501. DOI: 10.1016/j.ecoenv.2018.12.018.
- [21] 卢莉蓉. 四溴双酚A(TBBPA)低剂量暴露的细胞毒性效应及其代谢机制[D]. 广州: 广东工业大学, 2021: 31–35.
- LU L R. Cytotoxicity Effects and Metabolic Mechanisms of Low Dose Tetrabromobisphenol A(TBBPA) Exposure [D]. Guangzhou: Guangdong University of Technology, 2021:31–35.
- [22] SZYCHOWSKI K A, RYBCZYŃSKA-TKACZYK K, LEJA M L, *et al.* Tetrabromobisphenol a (TBBPA) -stimulated Reactive Oxygen Species (ROS) Production in Cell-free Model Using the 2', 7'-dichlorodihydrofluorescein Diacetate (H₂DCFDA) Assay—Limitations of Method[J]. *Environ Sci Pollut Res*, 2016, **23**(12): 12246–12252. DOI: 10.1007/s11356-016-6450-6.

- [23] LU L Y, HU J J, LI G Y, *et al.* Low Concentration Tetrabromobisphenol a (TBBPA) Elevating Overall Metabolism by Inducing Activation of the Ras Signaling Pathway[J]. *J Hazard Mater*, 2021, **416**: 125797. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125797.
- [24] THURMAN R, SIRALIEV-PEREZ E, CAMPBELL S L. RAS Ubiquitylation Modulates Effector Interactions [J]. *Small GTPases*, 2020, **11**(3): 180–185. DOI: 10.1080/21541248.2017.1371267.
- [25] WANG Y X, KAISER C E, FRETT B, *et al.* Targeting Mutant KRAS for Anticancer Therapeutics: a Review of Novel Small Molecule Modulators[J]. *J Med Chem*, 2013, **56**(13): 5219–5230. DOI: 10.1021/jm3017706.
- [26] LAHERU D, SHAH P, RAJESHKUMAR N V, *et al.* Integrated Preclinical and Clinical Development of S-trans, trans-farnesylthiosalicylic Acid (FTS, Salirasib) in Pancreatic Cancer[J]. *Invest New Drugs*, 2012, **30**(6): 2391–2399. DOI: 10.1007/s10637-012-9818-6.
- [27] SANTEN R J, LYNCH A R, NEAL L R, *et al.* Farnesylthiosalicylic Acid: Inhibition of Proliferation and Enhancement of Apoptosis of Hormone-dependent Breast Cancer Cells[J]. *Anti Cancer Drugs*, 2006, **17**(1): 33–40. DOI: 10.1097/01.cad.0000185184.64980.39.
- [28] COVACI A, VOORSPOELS S, ABDALLAH M A E, *et al.* Analytical and Environmental Aspects of the Flame Retardant Tetrabromobisphenol-A and Its Derivatives [J]. *J Chromatogr A*, 2009, **1216**(3): 346–363. DOI: 10.1016/j.chroma.2008.08.035.
- [29] LI C I, MALONE K E, PORTER P L, *et al.* Relationship between Long Durations and Different Regimens of Hormone Therapy and Risk of Breast Cancer[J]. *JAMA*, 2003, **289**(24): 3254–3263. DOI: 10.1001/jama.289.24.3254.
- [30] ZHANG J, LI T Z, WANG T Y, *et al.* Estrogenicity of Halogenated Bisphenol A: In Vitro and in Silico Investigations[J]. *Arch Toxicol*, 2018, **92**(3): 1215–1223. DOI: 10.1007/s00204-017-2127-2.
- [31] SU H L, GUAN G, AHMED R Z, *et al.* TBBPA Stimulated Cell Migration of Endometrial Cancer via the Contribution of NOX-generated ROS in Lieu of Energy Metabolism[J]. *J Hazard Mater*, 2020, **400**: 123204. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.123204.
- [32] ZHANG W J, LI A J, PAN Y, *et al.* Tetrabromobisphenol a Induces THR B-mediated Inflammation and Uterine Injury in Mice at Environmentally Relevant Exposure Concentrations[J]. *J Hazard Mater*, 2021, **407**: 124859. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2020.124859.
- [33] JIN X T, SU H L, XU L T, *et al.* Different Co-culture Models Reveal the Pivotal Role of TBBPA-promoted M2 Macrophage Polarization in the Deterioration of Endometrial Cancer[J]. *J Hazard Mater*, 2021, **413**: 125337. DOI: 10.1016/j.jhazmat.2021.125337.
- [34] KNUDSEN G A, HALL S M, RICHARDS A C, *et al.* TBBPA Disposition and Kinetics in Pregnant and Nursing Wistar Han IGS Rats[J]. *Chemosphere*, 2018, **192**: 5–13. DOI: 10.1016/j.chemosphere.2017.10.122.
- [35] ZHANG A, WANG R, LIU Q, *et al.* Breast Adipose Metabolites Mediates the Association of Tetrabromobisphenol a With Breast Cancer: A case-control Study in Chinese Population[J]. *Environ Pollut*, 2023, **316**(1): 120701. DOI: 10.1016/j.envpol.2022.120701.
- [36] SHIN E S, JEONG Y N, BARGHI M, *et al.* Internal Distribution and Fate of Persistent Organic Contaminants (PCDD/Fs, DL-PCBS, HBCDS, TBBPA, and PFASs) in a *Bos Taurus*[J]. *Environ Pollut*, 2020, **267**: 115306. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.115306.
- [37] CHEN J F, KANG D, YAN Z, *et al.* Tissue Distribution of Tetrabromobisphenol a and Cadmium in Mixture Inhalation Exposure[J]. *Toxicol Ind Health*, 2019, **35**(2): 165–176. DOI: 10.1177/0748233718820983.
- [38] SANDERS J M, COULTER S J, KNUDSEN G A, *et al.* Disruption of Estrogen Homeostasis as a Mechanism for Uterine Toxicity in Wistar Han Rats Treated with Tetrabromobisphenol A[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2016, **298**: 31–39. DOI: 10.1016/j.taap.2016.03.007.
- [39] RENAUDIN X. Reactive Oxygen Species and DNA Damage Response in Cancer[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2021, **364**: 139–161. DOI: 10.1016/bs.ircmb.2021.04.001.
- [40] TAJBAKHSI A, PASDAR A, REZAEE M, *et al.* The Current Status and Perspectives Regarding the Clinical Implication of Intracellular Calcium in Breast Cancer [J]. *J Cell Physiol*, 2018, **233**(8): 5623–5641. DOI: 10.1002/jcp.26277.
- [41] DENG W J, WANG Y Y, ZHAO S, *et al.* MICAL1 Facilitates Breast Cancer Cell Proliferation via ROS-sensitive ERK/Cyclin D Pathway[J]. *J Cell Mol Med*, 2018, **22**(6): 3108–3118. DOI: 10.1111/jcmm.13588.
- [42] WANG L H, LIU T J, NISHIOKA M, *et al.* Activation of ERK1/2 and Cyclin D1 Expression in Oral Tongue Squamous Cell Carcinomas: Relationship between Clinicopathological Appearances and Cell Proliferation [J]. *Oral Oncol*, 2006, **42**(6): 625–631. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.11.002.
- [43] YE L Y, PAN J X, LIANG M W, *et al.* A Critical Role for C-Myc in Group 2 Innate Lymphoid Cell Activation[J]. *Allergy*, 2020, **75**(4): 841–852. DOI: 10.1111/all.14149.