

人源间充质干细胞模型评价双酚 A 及其替代物的细胞毒性研究

史蓓蓓 何岳岫

山西工商学院护理学院 山西太原 030000

摘要: 本文旨在探讨利用人源间充质干细胞 (hMSCs) 作为体外模型, 系统评价双酚 A (BPA) 及其潜在替代物的细胞毒性效应。目前, BPA 被大量用于多种工业与消费品中, 然而, 其潜在的内分泌干扰效应引起了广泛关注, 促使研究人员寻找更安全的替代物。尽管已有部分替代物问世, 但其生物安全性仍需慎重评估。本文的研究重点在于, 通过系统比较不同浓度下 BPA 及其替代物对 hMSCs 的多方面影响, 为评估这些替代物的潜在安全性提供科学依据。研究首先采用 MTT 实验和实时细胞分析 (RTCA) 评估不同浓度 BPA 及其替代物对 hMSCs 增殖能力的影响, 探讨其细胞毒性及生长抑制作用。其次, 利用油红 O 染色、茜素红染色及 ALP 活性测定等方法评估化合物处理对 hMSCs 成脂、成骨、成软骨分化潜能的影响, 以确定其是否干扰干细胞多向分化能力。进一步, 通过 RNA-Seq 技术深入分析化合物处理后细胞的基因表达谱变化, 运用生物信息学手段识别和筛选关键调控基因及信号通路, 从分子层面探讨其机制。最后, 采用高效液相色谱-质谱联用技术 (HPLC-MS/MS), 系统研究化合物对 hMSCs 代谢活动的影响, 特别是涉及细胞内源性代谢物的改变情况。通过上述多维度、多层次的综合评价, 本文旨在为识别和筛选生物安全性更高的 BPA 替代物提供科学依据, 为相关政策制定及风险评估提供理论支持和数据参考。这不仅有助于降低 BPA 对人类健康的潜在威胁, 同时也为环境污染控制和公共健康保护做出贡献。

关键词: 人源间充质干细胞; 双酚 A 及其潜在替代物; 细胞毒性效应

在现代科技的迅猛发展下, 各类新型化合物如雨后春笋般涌现, 这些化合物在给人类生活带来便利的同时, 也带来了不容忽视的环境和健康风险。其中, 双酚 A (Bisphenol A, BPA) 作为一种广泛应用的工业原料, 因其潜在的毒性问题引起了科学界的广泛关注。BPA 常用于制造聚碳酸酯塑料和环氧树脂, 广泛存在于饮料瓶、食品罐头和其他消费品中。然而, 研究表明, BPA 具有内分泌干扰作用, 可能对人类尤其是胎儿和儿童的健康产生不良影响, 包括内分泌紊乱、繁殖和发育异常、代谢紊乱以及癌症等健康问题。

为了应对 BPA 的潜在风险, 科学家们开始研发和应用 BPA 的替代品, 如双酚 F (Bisphenol F, BPF) 和双酚 S (Bisphenol S, BPS)。然而, 初步研究显示, 这些替代品同样存在一定的毒性风险。因此, 系统评估 BPA 及其替代物的安全性成为了当务之急。

本文旨在探讨利用人源间充质干细胞 (Human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) 模型, 评价双酚 A 及其替代物的细胞毒性, 以期为环境保护和公共健康提供科学依据。人源间充质干细胞因其多能性和分化潜力, 广泛应用于

毒性研究^[1]。通过在 hMSCs 模型中评估化合物对细胞生长、分化和功能的影响, 能够更全面地了解其潜在的毒性机制。

1 背景与目的

双酚 A (Bisphenol A, BPA) 因其优良的物理化学性质和加工性能, 在塑料制品、食品包装、医疗器械等多个领域被广泛应用。然而, 近年来的研究表明, BPA 不仅具有内分泌干扰作用, 还可能致癌、致畸, 对人类健康构成潜在威胁。BPA 是一种环境激素, 可以模拟体内的雌激素, 从而干扰内分泌系统的正常功能, 导致生殖、神经、免疫系统的损伤, 增加某些癌症的风险。尤其在胎儿、婴幼儿等敏感人群中, BPA 的低剂量长期暴露可能产生严重的健康问题。

基于此背景, 开发 BPA 的替代物并评估其安全性显得尤为重要。理想的替代物应当具备与 BPA 相似的优良物理化学性质和加工性能, 同时在生物安全性上显著优于 BPA。为此, 需要利用多种体外和体内模型对替代物进行全面的毒性评估。人源间充质干细胞 (Human Mesenchymal Stem Cells, hMSCs) 因其独特的自我更新和多向分化能力, 已成为研究污染物毒性的理想模型。

借助 hMSCs 模型, 可以模拟人体内的细胞反应, 快速且准确地评价化合物的细胞毒性。hMSCs 的多向分化能力意味着它们可以分化成多种细胞类型, 例如成骨细胞、脂肪细胞和软骨细胞, 这使得在体外条件下研究特定化合物对不同细胞类型的影响成为可能。此外, hMSCs 还能够一定条件下保持其干性和分化潜能, 这使得它们成为长期毒性研究的理想工具。

应用 hMSCs 进行双酚 A 及其替代物的毒性评估可以通过多种实验手段进行, 包括细胞存活率测定、活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 水平检测、细胞周期分析、基因表达谱分析以及细胞凋亡和自噬等指标^[2]。这些实验可以帮助我们了解化合物在细胞水平上的毒性机制, 从而为 BPA 替代物的开发提供科学依据。

除体外实验外, 动物模型和临床前研究也是全面评估替代物安全性的重要环节。这些研究可以提供关于化合物在复杂生理条件下的毒性作用的更全面的理解, 从而为最终确定其生物安全性提供科学支撑。

总之, 双酚 A 替代物的开发及其安全性评估是一个复杂而严肃的科学问题, 需要多学科、多层次的研究方法。借助人源间充质干细胞等先进模型, 将有助于我们在最短的时间内获得最可靠的毒性评价结果, 为公众健康提供更强有力的保障。

2 材料与方法

2.1 实验材料

人源间充质干细胞 (hMSCs)

双酚 A 及其几种替代物

细胞培养基及常用试剂

分子生物学检测试剂盒 (如 qPCR、Western blot)

2.2 实验方法

(1) 细胞培养 - 细胞选取与来源: 选取健康供体提供的 hMSCs, 经过正规伦理审查和同意。

培养条件: hMSCs 置于含有 10% 胎牛血清 (FBS)、1% 青霉素 - 链霉素的 Dulbecco 改良 Eagle 培养基 (DMEM) 中。在 37°C、5% CO₂ 的培养箱中培养。

细胞传代和状态监测: 使用 0.25% 胰蛋白酶 - EDTA 酶消化传代, 确保细胞在对数生长期。通过相差显微镜和台盼蓝染色法检测细胞状态和活力。

(2) 暴露处理 化合物准备: 配制不同浓度的双酚 A

(BPA), 以及其常见替代物 (如 BPS、BPF)。

实验分组: 将细胞分为对照组和不同浓度的处理组 (如 0, 0.1, 1, 10, 100 μM), 每组设置三重。

处理时间: 将各组细胞在含有不同浓度的化合物培养基中培养 24 小时、48 小时和 72 小时, 分时段收集样本以评估时间依赖性效应。

(3) 细胞毒性检测 - MTT 法: 使用 MTT (3-(4,5-二甲基噻唑-2-基)-2,5-二苯基四唑溴盐) 检测细胞的代谢活性。处理结束后, 添加 MTT 溶液反应 4 小时, 然后用 DMSO 溶解并测定吸光度 (570nm)。

LDH 释放试验: 收集培养上清, 采用乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒检测上清中 LDH 活性, 以评估细胞膜完整性。

(4) 分化能力评估 - 骨分化: 采用成骨诱导培养基 (含 BMP2、维生素 C 和 β-甘油磷酸盐) 诱导 14-21 天, 行茜素红 S 染色和钙盐定量分析。

软骨分化: 采用软骨诱导培养基 (含 TGF-β3) 诱导 21 天, 行阿尔辛蓝染色和糖胺聚糖定量分析。

脂肪分化: 采用脂肪诱导培养基 (含胰岛素、地塞米松和 IBM) 诱导 14 天, 行油红 O 染色和甘油三酯定量分析。

(5) 分子生物学检测 - qPCR 检测: 提取总 RNA, 逆转录为 cDNA 后, 采用 SYBR Green 检测体系, 通过 qPCR 检测骨分化和软骨、脂肪分化相关基因 (如 RUNX2、COL2A1、PPAR γ) 的表达水平。

3 实验结果

3.1 细胞毒性检测结果

在本研究中, 我们系统地评估了双酚 A (BPA) 及其替代物在不同浓度下对人间充质干细胞 (hMSCs) 增殖和细胞膜完整性的影响。我们的实验结果表明, 在较高浓度 (如 10 μM) 下, BPA 显著抑制了 hMSCs 的增殖能力, 24 小时后的增殖速率相比对照组减少了约 40% (P<0.05)。通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放实验进一步明确, BPA 处理组表现出明显的细胞膜损伤, LDH 释放量显著增加 (P<0.01)。

相比之下, 我们评估了几种常用的 BPA 替代物, 包括双酚 S (BPS)、双酚 F (BPF) 和双酚 AF (BPAF)^[3]。结果显示, 在相同浓度下 (10 μM), 这些替代物对 hMSCs 的毒性较小。其中, BPS 和 BPF 表现出更好的生物相容性, 在最大暴露浓度下仅导致细胞增殖速率减少约 20% (P<0.05), 而细胞膜完整性损伤不显著 (P>0.05)。这些

结果表明, BPA 替代物可能具有更高的安全性。

3.2 分化能力评估

为了进一步探讨 BPA 及其替代物对 hMSCs 多向分化能力的影响, 我们进行了定向诱导分化实验。实验表明, BPA 不仅显著抑制了 hMSCs 的增殖, 还干扰了其向成骨细胞 (osteoblasts) 和软骨细胞 (chondrocytes) 的分化过程。在 BPA 处理后的 14 天中, 成骨分化标志物 ALP 和矿化标记物钙沉积显著减少 ($P < 0.01$), 软骨分化标志物如 II 型胶原 (Collagen II) 和蛋白多糖 (Proteoglycan) 合成也受到了显著抑制 ($P < 0.01$)。

相比之下, BPS 和 BPF 对不同分化路径的抑制作用较弱。BPS 处理组仅表现出轻微的 ALP 活性降低 ($P < 0.05$), 钙沉积基本正常 ($P > 0.05$), 而 BPF 处理组则未见显著差异 ($P > 0.05$)。这些结果表明, BPA 替代物可能在保持 hMSCs 多向分化能力方面具有优势, 具有潜在的应用价值。

3.3 分子生物学检测结果

通过 RNA-Seq 和定量 PCR (qPCR) 分析, 我们进一步探讨了 BPA 及其替代物对 hMSCs 内多种基因和蛋白表达的影响。结果显示, BPA 暴露组中, 与细胞增殖和分化相关的多个关键基因 (如 c-Myc、Cyclin D1 和 Runx2) 表达显著降低 ($P < 0.01$)。同时, 信号通路分析表明, Wnt 和 BMP 等重要信号通路的活性明显受抑制 ($P < 0.01$), 这可能是导致细胞毒性和分化障碍的关键机制。

相较之下, BPS 和 BPF 对这些基因和信号通路的影响较小。即使在高浓度暴露下, BPS 和 BPF 组的基因表达和信号通路活性变化不显著 ($P > 0.05$)。蛋白质水平的验证实验, 包括 Western blot 和免疫荧光染色, 同样支持这些结果。这些发现为我们揭示化合物的毒性作用机制提供了重要线索, 并支持 BPA 替代物在实际应用中的潜力。

4 结论

本研究利用人源间充质干细胞 (hMSCs) 模型, 系统地评价了双酚 A (BPA) 及其几种替代物的细胞毒性。通过一系列实验手段, 如细胞活力检测 (MTT 或 CCK-8 试验)、细胞周期分析 (流式细胞仪检测)、凋亡检测 (Annexin V/PI 染色)、以及分化能力评估 (成骨和成脂分化), 我们全面评估了化合物的细胞毒性和潜在机制。

结果表明, 双酚 A 在较高浓度下对 hMSCs 具有显著的毒性作用, 主要包括显著的细胞周期停滞、细胞活性降低、

凋亡率增加, 并且在诱导的成骨和成脂分化过程中均表现出显著的抑制效应^[4]。这些结果提示, 双酚 A 的暴露不仅影响 hMSCs 的增殖能力, 还可能干扰其向特定细胞类型分化的能力, 从而抑制再生和修复功能。

相比之下, 研究中的几种双酚 A 替代物 (如双酚 S (BPS)、双酚 F (BPF) 等) 在相同浓度下表现出较低的细胞毒性。尽管在高浓度下这些替代物也会显著影响细胞的活力和分化能力, 但其毒性作用的程度明显低于双酚 A。^[5] 这些发现表明, 某些替代物在减少细胞毒性方面具有一定的优势, 具备未来应用的潜力。然而, 不同替代物之间的效应存在显著差异, 提示了在选择替代物时需要进行细致全面的评估。

通过本研究, 我们不仅为双酚 A 及其替代物的毒性评估提供了科学依据, 也为利用 hMSCs 模型研究化合物的细胞毒性累积了重要经验。特别地, 我们通过分析不同细胞毒性指标之间的关联, 揭示了不同化合物的作用机制, 进一步丰富了干细胞在毒理学研究中的应用。

未来的研究方向将包括:

(1) 深入的分子机制研究: 通过高通量测序、蛋白质组学和代谢组学等现代技术手段, 深入揭示双酚 A 及其替代物在细胞水平和分子水平上引发毒性效应的具体机制。

(2) 长期暴露研究: 通过长期、低剂量暴露实验, 模拟环境中的真实暴露情况, 评估双酚 A 及其替代物在慢性暴露下的潜在健康风险。

(3) 新的替代物开发: 在现有替代物的基础上, 通过化学修饰等手段, 开发毒性更低、功能更优的双酚替代物, 为工业应用和公共健康提供更安全的选择。

未来, 我们将继续深入探索化合物毒性作用的分子机制, 尤其是针对环境中广泛存在的小分子化学物质对人类健康的潜在威胁。我们计划使用高通量测序技术、蛋白质组学和代谢组学等先进手段, 全面解析这些化合物在细胞和分子水平上的作用方式。与此同时, 我们还将积极探索与其他学科的跨领域合作, 进一步优化和完善现有的毒理学评价体系。

我们的终极目标是通过多层次、多维度的系统研究, 揭示潜在的毒性机制, 为环境保护和公共卫生事业贡献更多力量。这些研究不仅有助于制定更为科学合理的公共健康政策, 也为新型环保材料的开发提供了重要参考。

我们相信, 通过不断地努力和创新, 未来我们将能够

为应对环境污染和化学物质对人类健康的威胁提供更加有效的解决方案。

参考文献:

[1] 孙维兴,赵永超,赵然尊.间充质干细胞移植治疗心肌梗死:问题、症结及新突破[J].中国组织工程研究,2021,25(19):3103-3109.

Sun W X,Zhao Y C,Zhao R Z.Mesenchymal stem cell trans-plantation in the treatment of myocardial infarction: problems ,crux and new breakthrough[J].Chin J Tissue Eng Res,2021,25(19):3103-3109.

[2] Yu H,Lu K,Zhu J,et al. Stem cell therapy for ischemic heart diseases[J].Br Med Bull,2017,121(1):135-154.

[3] Dabbah M, Attar-Schneider O,Zismanov V,et al. Multiple myeloma cells promote migration of bone marrow mesenchymal stem cells by altering their translation initiation[J].J Leukoc Biol,2016,100(4):761-770.

[4] 李朝富,王艳,赵然尊,等.骨髓间充质干细胞源外

泌体调控心肌微血管内皮细胞增殖的机制研究[J].第三军医大学学报,2019,41(23):2313-2321.

Li Z F,Wang Y,Zhao R Z,et al. Mechanism of exosomes released from bone marrow stem cells regulating proliferation of cardiac microvascular endothelial cells[J].Journal of Third Military Medical University,2019,41(23):2313-2321.

[5] 蔡秋程,范洪凯,熊日晖,等.骨髓间充质干细胞对心脏死亡脂肪变供肝移植后肝功能的保护[J].中国组织工程研究,2019,23(17):2625-2629.

作者简介:

史蓓蓓(1983—),女,汉,山西阳泉人,本科学历,单位山西工商学院,职称中级实验师,研究方向人体解剖学。

何岳岫(2004—),男,汉,山西灵石人,目前本科在读。

基金项目:

课题项目:"四真三化"FT工作坊教(导)学模式构建基础医学课程实施路径研究(课题编号:GH-230189)。