

双酚 A 与苯并[a]芘联合作用 对三种乳腺上皮细胞的 DNA 损伤效应

杨淋清¹, 龚春梅², 吴德生¹, 周明¹, 罗凌凤¹, 周丽¹, 黄新凤¹, 刘建军¹, 庄志雄¹

摘要: [目的] 观察双酚 A (BPA) 与苯并[a]芘 (BaP) 联合作用对三种乳腺上皮细胞 DNA 损伤的影响。[方法] 采用对 DNA 双链断裂标志 pH2AX 免疫荧光检测的方法, 观察环境相关剂量水平 (10^{-9} , 10^{-7} mol/L) BPA、 10^{-9} mol/L 17- β -雌二醇 (雌激素对照) 及其与 10^{-6} mol/L BaP 联合作用对人乳腺上皮细胞 (HMEC)、人永生化乳腺上皮细胞 MCF-10A (CRL-10317) 和人乳腺上皮肿瘤细胞 MCF-7 三种乳腺上皮细胞的 DNA 损伤效应 (以二甲亚砜作为溶剂对照), 并应用实时荧光定量聚合酶链反应法检测三种细胞雌激素受体 α 和雌激素受体 β 的基因 *ESR1*、*ESR2* mRNA 水平的相对表达量。[结果] BPA 对三种类型乳腺上皮细胞 pH2AX 阳性率均无明显影响。BaP 可明显增加 HMEC 和 MCF-7 两种乳腺上皮细胞 pH2AX 阳性率: 单独染毒时两种细胞 pH2AX 阳性率分别由 $(34.7 \pm 2.2)\%$ 和 $(3.1 \pm 0.3)\%$ 增至 $(63.6 \pm 1.2)\%$ 和 $(13.3 \pm 0.4)\%$; 与 10^{-7} mol/L BPA、 10^{-9} mol/L 17- β -雌二醇分别联合作用可使 MCF-7 的 pH2AX 阳性率增至 $(15.1 \pm 0.2)\%$ 、 $(17.5 \pm 1.0)\%$, 与单独染毒组相比, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。三种细胞内 *ESR1*、*ESR2* 基因表达有差异, 其中 *ESR1* 基因表达差异明显, 在 MCF-7 中的表达水平最高, 为 HMEC 的 1080 倍、MCF-10A 的 5222 倍。[结论] BPA 与 BaP 联合作用与 BaP 单独作用相比, 可引起 MCF-7 的 DNA 双链断裂损伤加剧, 该作用可能与雌激素受体表达水平相关。

关键词: 双酚 A; 苯并[a]芘; 人乳腺上皮细胞; DNA 损伤; 雌激素受体

DNA Damage Effect of Combination of Bisphenol A and Benzo[a]pyrene on Three Human Mammary Epithelial Cells YANG Lin-qing¹, GONG Chun-mei², WU De-sheng¹, ZHOU Ming¹, LUO Ling-feng¹, ZHOU Li¹, HUANG Xin-feng¹, LIU Jian-jun¹, ZHUANG Zhi-xiong¹ (1.Key Laboratory of Modern Toxicology, Shenzhen Center for Disease Control and Prevention, Shenzhen, Guangdong 518055, China; 2.Shenzhen Center for Chronic Disease Control, Shenzhen, Guangdong 518021, China). Address correspondence to ZHUANG Zhi-xiong, E-mail: zxzhuang2007@126.com • The authors declare they have no actual or potential competing financial interests.

Abstract: [Objective] To observe the DNA damage effect of Bisphenol A (BPA) in combination with benzo[a]pyrene (BaP) on three human epithelial cell lines, i.e. human mammary epithelial cells (HMEC), MCF-10A, and MCF-7. [Methods] Immunofluorescence was applied to observe the biomarker of DNA double-strand break in three human epithelial cells caused by a combination exposure to BPA (10^{-9} mol/L, 10^{-7} mol/L) and BaP (10^{-6} mol/L). The blank controls were administrated with dimethyl sulfoxide (DMSO) and the positive controls with 17- β -estradiol. Real-time polymerase chain reaction (PCR) was used to detect the relative mRNA expression levels of estrogen receptors (*ESR1* and *ESR2*) in three cell lines. [Results] No notable differences in the pH2AX positive rates were detected between the BPA alone and the control groups. The pH2AX positive rates were increased remarkably after treatment of BaP to HMEC [from $(34.7 \pm 2.2)\%$ to $(63.6 \pm 1.2)\%$] and MCF-7 [from $(3.1 \pm 0.3)\%$ to $(13.3 \pm 0.4)\%$] cell lines. Compare with the BaP alone group, combination of 10^{-7} mol/L BPA or 10^{-9} mol/L 17- β -estradiol with BaP increased the pH2AX positive rate to $(15.1 \pm 0.2)\%$ and $(17.5 \pm 1.0)\%$, respectively. The expression levels of estrogen receptor genes varied among three cell lines, and the expression level of *ESR1* gene in MCF-7 cells were 1080 folds as high as in HMEC cells and 5222 folds as in MCF-10A cells. [Conclusion] Compare with the BaP alone exposure, the combination exposure to BPA and BaP can intensify the DNA double-strand break in MCF-7 cell line, and the effect may depend on the expression level of estrogen receptors.

Key Words: bisphenol A; benzo[a]pyrene; human mammary epithelial cell; DNA damage; estrogen receptor

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (编号: 81172710); 深圳市科技研发资金基础研究计划项目 (编号: JC201105180762A); 深圳市科技计划项目 (编号: 201202097)

[作者简介] 杨淋清 (1978—), 女, 博士生, 副主任医师; 研究方向: 生化与分子毒理学; E-mail: linqingyang@126.com

[通信作者] 庄志雄教授, E-mail: zxzhuang2007@126.com

[作者单位] 1. 深圳市疾病预防控制中心现代毒理学重点实验室, 广东 深圳 518055; 2. 深圳市慢性病防治中心, 广东 深圳 518020

双酚 A (bisphenol A, BPA) 是一类作用较弱的环境雌激素, 亦是环境中广泛存在的外源化学物质之一。其相关产品大部分用于生产日常消费品, 考虑到 BPA 在工业、制造业应用的广泛性, 在生产过程中对水、土壤、空气的污染也不容忽视。有研究报道其普遍存在于人体组织和体液中, 脐带血、胎儿和婴幼儿体液中尤为明显^[1]。20 世纪末期有科学家提出, BPA 可能在低剂量水平对实验动物生殖系统产生毒性影响^[2]。此后, 相继有科学研究报道指出, 在特定的剂量水平下, BPA 可能有机体生殖系统、神经系统、免疫系统的毒性作用。我国毒理学家通过动物实验发现, BPA 能抑制胚胎发育^[3], 虽然没有足够证据可以说明其有致畸作用, 但 BPA 的低剂量效应不容忽视^[4]。

乳腺组织作为 BPA 可能的靶器官一直以来就是一个颇具争议的研究热点。2008 年美国国家毒理学会 (National Toxicology Program) 的人类生殖危险评价中心, 首次应用 5 个水平关注度来评价 BPA 对人体可能的毒性作用, 提出其对女性婴幼儿乳腺组织的发育可能产生一定影响^[5]。同时各学科领域的科学家从各自角度对低剂量长期反复接触 BPA 对体外培养乳腺细胞、实验动物乳腺组织的影响进行了研究。研究结果显示, 子鼠通过吸食母乳接触低剂量的 BPA, 可以增加其成年后对二甲基苯蒽 (dimethyl benzantracene) 引起的乳腺肿瘤的多发, 并缩短肿瘤潜伏期^[6], 但尚未有直接证据证明 BPA 可以在人群中引起乳腺癌, 其引起实验动物罹患乳腺癌风险增高的作用机制也尚未完全明了。本研究拟应用三种不同类型的人乳腺上皮细胞, 以体外激素 17- β -雌二醇 (17- β -estrogen, E2) 作为雌激素对照, 观察 BPA 与最为常见的环境污染物苯并[a]芘 (benzo[a]pyrene, BaP) 联合作用对其 DNA 损伤的影响, 为阐明 BPA 在乳腺癌发生过程中可能发挥的作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞

人乳腺上皮细胞 (human mammary epithelial cells, HMEC) 购自瑞士 LONZA 公司, 人永生化乳腺上皮细胞 MCF-10A (CRL-10317) 和人乳腺上皮肿瘤细胞 MCF-7 (HTB-22) 均购自美国模式培养物集存库 (American Type Culture Collection, ATCC)。

1.2 细胞培养及化学物处理

HMEC 细胞与 MCF-10A 细胞均使用含 52 mg/L 牛垂体提取物, 5 μ g/L 氢化可的松, 10 μ g/L 表皮生长因子, 50 μ g/L 胰岛素的乳腺上皮细胞基础培养基 (MEBM) (瑞士, LONZA) 进行正常培养, 化学物处理前换为无酚红的 MEBM 培养基 (瑞士, LONZA)。MCF-7 则应用含 10% 胎牛血清的杜伯克改良培养基 (DMEM)/汉姆氏 F12 培养基 (1:1) (美国, GIBCO) 进行正常培养, 化学处理前换为含 10% 经活性炭处理胎牛血清 (美国, Hyclone) 的无酚红 DMEM/F12 培养基 (美国, GIBCO)。细胞 DNA 损伤标志应用 DNA 损伤检测试剂盒 (美国, Invitrogen) 进行检测。BPA (10^{-4} mol/L、 10^{-6} mol/L) 和 E2 (10^{-6} mol/L) 用二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO) 溶解, 并系列稀释至特定浓度, 4℃避光保存, 接种细胞 24 h 后, 与培养基以 1:1000 比例混合持续处理细胞 48 h, 最终 BPA 染毒浓度为 10^{-9} mol/L、

10^{-7} mol/L, E2 为 10^{-9} mol/L; BaP 以 DMSO 溶解, 稀释至 10^{-3} mol/L, 4℃避光保存, 待细胞经 BPA 处理后, 与培养基以 1:1000 比例混合持续处理细胞 24 h, 最终染毒浓度为 10^{-6} mol/L。2 次染毒均以等体积 DMSO 作为溶剂对照。

1.3 DNA 损伤标志检测

在哺乳动物细胞中, 基因组 DNA 的双链断裂 (double-strand break) 是一种可致死的损伤类型, DNA 损伤物质可以在双链断裂位点形成磷酸化组蛋白 (gamma-H2AX phosphorylation, γ H2AX), 后者有利于招募相关蛋白参与双链断裂修复。 γ H2AX 是双链断裂的一种常见反应, 近年来多被用作 DNA 损伤标志。本研究应用 DNA 损伤检测试剂盒, 通过对 γ H2AX 的免疫荧光检测观察细胞 DNA 损伤。操作步骤简述为: 细胞染毒结束后, 弃去培养基, 磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗细胞 1 次, 4% 多聚甲醛温固定 15 min, 弃去固定液并用 PBS 洗细胞 1 次, 2.5% 曲拉通-100 室温下透化 15 min, 弃去透化液并用 PBS 洗细胞 1 次, 加入 1% 牛血清白蛋白室温封闭 60 min, 弃去封闭液, 加入 1% γ H2AX 一抗溶液, 室温孵育 60 min, 弃去一抗溶液, PBS 洗细胞 3 次, 加入羊抗鼠的二抗及细胞核染料赫斯特 (Hoechst) 33342 复染溶液室温避光孵育 60 min, 弃去复染溶液, PBS 洗 3 次, 加入适量 PBS, 应用全自动活细胞影像分析测定系统 (IN Cell Analyzer) 2000 (美国, GE Healthcare) 进行图像观察及分析。

1.4 雌激素受体表达水平检测

细胞染毒结束后, 应用 RNA 提取试剂 TRIZOL (美国, Invitrogen) 抽提 RNA, 并逆转录成 cDNA。以 β -actin 为内参照, 在 ABI7500 定量聚合酶链反应 (PCR) 仪 (美国, ABI) 上进行实时荧光定量 PCR 检测雌激素受体 α (estrogen receptor alpha, ER α) 和雌激素受体 β (estrogen receptor beta, ER β) 的基因 *ESR1*、*ESR2* mRNA 表达水平。PCR 反应条件为: 95℃预变性 10 s; 95℃变性 5 s, 60℃退火 30 s, 共 40 个循环。反应体系系用 *ESR1* 和 *ESR2* 荧光定量 PCR 反应体系 (美国, ABI)。

1.5 统计学分析

统计分析使用 SPSS 16.0 软件, 数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。首先采用单因素方差分析 (one-way ANOVA) 的方法分析不同处理组及对照组间差异, 进一步采用单因素方差分析中的 LSD 两两比较法检验不同处理组与对照组间的差异。检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

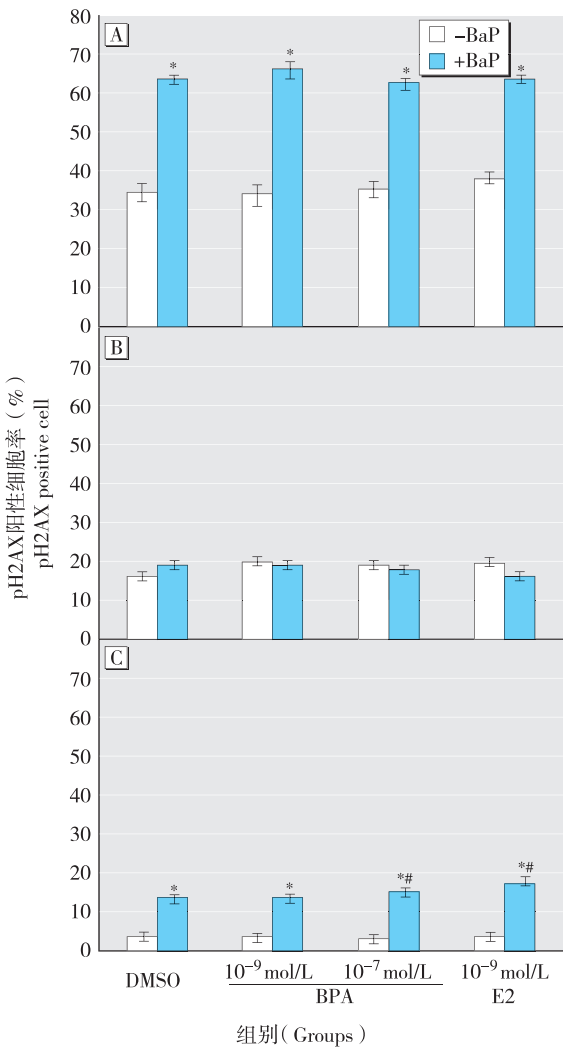
2.1 三种类型细胞 γ H2AX 检测结果

三种类型乳腺上皮细胞对 γ H2AX 的敏感性不同。其中, HMEC 最为敏感, 对照组细胞 γ H2AX 阳性率为 (34.7 ± 2.2)%; MCF-10A 次之, 对照组 γ H2AX 阳性率为 (16.1 ± 1.0)%; MCF-7 对照组细胞 γ H2AX 阳性率仅为 (3.1 ± 0.3)% (图 1)。

2.2 BPA 或 E2 单独及其与 BaP 联合对三种类型细胞的 DNA 损伤效应

BPA 和 E2 单独作用对三种类型乳腺上皮细胞 γ H2AX 阳性率均无明显影响, 提示实验中应用的低剂量 BPA 和 E2 单独作用不能造成乳腺上皮细胞 DNA 损伤。BaP 可明显增加 HMEC 和 MCF-7 两种乳腺上皮细胞 γ H2AX 阳性率, 在对照组两种种

胞 pH2AX 阳性率分别增至 $(63.6 \pm 1.2)\%$ 和 $(13.3 \pm 0.4)\%$ ；在 HMEC 细胞中，低剂量 BPA/E2 和 BaP 联合作用与 BaP 单独作用引起的 pH2AX 阳性率相比无明显差异，提示应用实验剂量 BPA/E2 不能增强 BaP 引起 DNA 损伤的作用；而在 MCF-7 细胞中， 10^{-7} mol/L BPA 及 10^{-9} mol/L E2 与 BaP 联合作用可明显增加其引起的 pH2AX 阳性率，与 DMSO 组和 BaP 联合作用组 $[(13.3 \pm 0.4)\%]$ 相比，pH2AX 阳性率分别增至 $(15.1 \pm 0.2)\%$ 和 $(17.5 \pm 1.0)\%$ ，见图 1。



[注] A: HMEC; B: MCF-10A; C: MCF-7。*: 与 -BaP 组相比 (Compared with the -BaP group), $P < 0.05$; #: 与 DMSO+ BaP 组相比 (Compared with the DMSO+ BaP group), $P < 0.05$ 。

图 1 BPA 在与 BaP 联合作用对三种乳腺上皮细胞 DNA 损伤的效应
Figure 1 DNA damage effect of BPA and BaP on three human mammary epithelial cell lines

2.3 三种类型细胞雌激素受体表达水平

荧光定量 PCR 结果显示，两种雌激素受体基因的表达水平在三种细胞中各不相同，但分布趋势相似，均在 MCF-7 细胞中表达最高，HMEC 次之，MCF-10A 细胞中最低。其中 *ESR1* 基因表达差异明显，在 MCF-7 中的表达水平最高，为 HMEC 的 1080 倍、MCF-10A 的 5222 倍，见图 2。

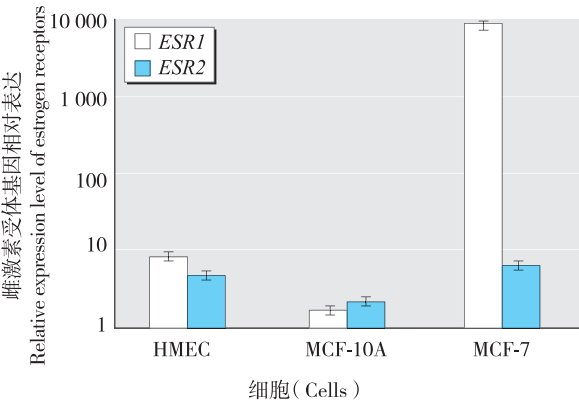


图 2 三种乳腺上皮细胞中两种雌激素受体基因在 mRNA 水平的相对表达量

Figure 2 Relative expression of *ESR1* and *ESR2* genes in three human mammary epithelial cell lines

3 讨论

如前所述，虽然有很多研究结果提示 BPA 可能增加乳腺癌发生的危险性，但尚未明确提出相关的作用机制^[7-8]。既往有学者应用体外培养乳腺上皮细胞来观察 BPA 的潜在毒性，但因为所用细胞类型不同，所得结果也有较大差异。例如，不同的研究分别应用 HMEC 和 MCF-7 观察 BPA 对其增殖特性的影响，结果显示 MCF-7 对 BPA 的促进增殖作用更为敏感，而且这种增殖效应与 ER α 受体的表达密切相关^[9-10]。相应的分子机制研究也提示，不同的乳腺上皮细胞类型对 BPA 引起的表观遗传学改变，差别也较大^[11-12]。

DNA 双链断裂作为一种常见的 DNA 损伤类型，也是在遗传水平常见的化学致癌机制之一。有研究发现 BPA 在较高剂量水平可以引起多种机体细胞如精子细胞、淋巴细胞、乳腺上皮细胞^[13]的 DNA 损伤及 DNA 双链断裂，同时还可以干扰 DNA 双链断裂的修复及引起染色体结构异常^[14]，而在较低剂量水平 (低于 10^{-6} mol/L) 时，则未见到有明显的 DNA 损伤效应。而人体在非职业暴露情况下的 BPA 暴露水平处于较低剂量范围 (10^{-8} mol/L 左右)，且与不同的环境化学污染物联合暴露的情况较为常见。本研究应用三种类型乳腺上皮细胞研究低剂量水平 BPA 与 BaP 联合作用对其 DNA 双链断裂作用的差异，结果发现三种细胞 pH2AX 的阳性率的基准值不同，三种细胞对 BaP 及 BPA 与 BaP 联合作用引起的 pH2AX 阳性率增加水平也各不相同，其中 HMEC 细胞 pH2AX 的阳性率最高，而 MCF-7 对 BaP 及 BPA 与 BaP 联合作用引起的 pH2AX 阳性率增加幅度最高。三种类型乳腺上皮细胞虽然均分离自人的乳腺组织，细胞的生物学性状却有较大差异。HMEC 来源于正常乳腺组织，在体外可以在有限代数内培养、增殖，最终会到达生长的平台期，出现细胞衰老和死亡^[15]；而 MCF-10A 则是对正常乳腺上皮细胞进行永生化处理后得到的永生化的乳腺上皮细胞系；MCF-7 分离于人的乳腺肿瘤组织，在体外培养可以无限传代，也属于永生化细胞系，但其同时具有恶性肿瘤细胞株的特性。三种细胞的生物学特性可能是影响其 pH2AX 的阳性率的主要原因，HMEC 具有正常有限增殖细胞的特性，在体外持续培养 18 代左右细胞会进入生长平台期，同时出现细胞衰老、死亡。

本研究所应用的 HMEC 细胞在体外增殖至第 9 代, pH2AX 阳性率可能作为一种与细胞衰老相关的 DNA 损伤标志出现, 而 MCF-10A 和 MCF-7 两种细胞株因永生化的细胞特性表现出较低的 pH2AX 阳性率。

除以上生物学性状外, 三种乳腺上皮细胞雌激素受体的表达水平也有较大差异。通常认为经典的雌激素受体有 ER α 和 ER β 两种, 分别由 *ESR1* 基因和 *ESR2* 基因编码, 其主要功能是作为 DNA 结合转录因子, 调节基因表达, 并在靶器官的细胞水平调节增殖和分化。有研究表明雌激素受体活性在某些化学物质引起的 DNA 损伤中起着关键作用^[16], 本研究通过定量 PCR 的方法检测三种细胞内 *ESR1* 和 *ESR2* 基因的相对表达水平, 发现 *ESR1* 基因在三种细胞中表达差异巨大, 其中 MCF-7 中表达水平最高, 是 HMEC 细胞的近 1000 倍、MCF-10A 的近 5000 倍。提示 MCF-7 可能引起 *ESR1* 基因的高表达而对雌激素(包括 BPA 和 E2)引起的 DNA 双链断裂及对该损伤的修复的干扰作用更为敏感, 而 BPA 与 ER α 的结合能力约为 E2 的 1/1000, 这可能是文中低剂量水平 BPA 与 BaP 联合作用未能引起 DNA 损伤效应增加的原因之一。

·作者声明本文无实际或潜在的利益冲突。

参考文献:

- [1] VANDENBERG LN, CHAHOUD I, HEINDEL JJ, et al. Urinary, circulating, and tissue biomonitoring studies indicate widespread exposure to bisphenol A[J]. *Environ Health Perspect*, 2010, 118(8): 1055-1070.
- [2] NAGEL SC, VOM SAAL FS, THAYER KA, et al. Relative binding affinity-serum modified access (RBA-SMA) assay predicts the relative *in vivo* bioactivity of the xenoestrogens bisphenol A and octylphenol[J]. *Environ Health Perspect*, 1997, 105(1): 70-76.
- [3] XING L, XU Y, XIAO Y, et al. Embryotoxic and teratogenic effects of the combination of bisphenol A and genistein on *in vitro* cultured postimplantation rat embryos[J]. *Toxicol Sci*, 2010, 115(2): 577-588.
- [4] XIAO Y, LIU R, XING L, et al. Combined developmental toxicity of bisphenol A and genistein in micromass cultures of rat embryonic limb bud and midbrain cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2011, 25(1): 153-159.
- [5] SHELBY MD. NTP-CERHR monograph on the potential human reproductive and developmental effects of bisphenol A[J]. NTP CERHR MON, 2008(22): v, vii-ix, 1-64 passim.
- [6] JENKINS S, RAGHURAMAN N, ELTOUM I, et al. Oral exposure to bisphenol a increases dimethylbenzanthracene-induced mammary cancer in rats[J]. *Environ Health Perspect*, 2009, 117(6): 910-915.
- [7] WEBER LOZADA K, KERI RA. Bisphenol A increases mammary cancer risk in two distinct mouse models of breast cancer[J]. *Biol Reprod*, 2011, 85(3): 490-497.
- [8] DAIRKEE SH, SEOK J, CHAMPION S, et al. Bisphenol A induces a profile of tumor aggressiveness in high-risk cells from breast cancer patients[J]. *Cancer Res*, 2008, 68(7): 2076-2080.
- [9] QIN XY, FUKUDA T, YANG L, et al. Effects of bisphenol A exposure on the proliferation and senescence of normal human mammary epithelial cells[J]. *Cancer Biol Ther*, 2012, 13(5): 296-306.
- [10] MIYAKOSHI T, MIYAJIMA K, TAKEKOSHI S, et al. The influence of endocrine disrupting chemicals on the proliferation of ER α knockdown-human breast cancer cell line MCF-7; new attempts by RNAi technology[J]. *Acta Histochem Cytochem*, 2009, 42(2): 23-28.
- [11] WENG YI, HSU PY, LIYANARACHCHI S, et al. Epigenetic influences of low-dose bisphenol A in primary human breast epithelial cells[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 248(2): 111-121.
- [12] FERNANDEZ SV, HUANG Y, SNIDER KE, et al. Expression and DNA methylation changes in human breast epithelial cells after bisphenol A exposure[J]. *Int J Oncol*, 2012, 41(1): 369-377.
- [13] ISO T, WATANABE T, IWAMOTO T, et al. DNA damage caused by bisphenol A and estradiol through estrogenic activity[J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(2): 206-210.
- [14] ALLARD P, COLAIACOVO MP. Bisphenol A impairs the double-strand break repair machinery in the germline and causes chromosome abnormalities[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2010, 107(47): 20405-20410.
- [15] ROMANOV SR, KOZAKIEWICZ BK, HOLST CR, et al. Normal human mammary epithelial cells spontaneously escape senescence and acquire genomic changes[J]. *Nature*, 2001, 409(6820): 633-637.
- [16] MOBLEY JA, BRUEGGEMEIER RW. Estrogen receptor-mediated regulation of oxidative stress and DNA damage in breast cancer[J]. *Carcinogenesis*, 2004, 25(1): 3-9.

(收稿日期: 2012-02-20)

(英文编审: 金克峙; 编辑: 王晓宇; 校对: 徐新春)