

顺式联苯菊酯对映体对 H295R 细胞肾上腺皮质激素分泌的选择性干扰效应

王春蕾, 杨叶, 朱光平, 刘克澄, 姚春冀, 吴南翔

浙江省医学科学院卫生学研究所, 浙江 杭州 310013

摘要:

[背景] 手性农药是指分子结构中含有手性中心的农药化合物, 含有一对或多对呈镜像关系的对映异构体 (简称对映体)。顺式联苯菊酯 (*cis*-bifenthrin, *cis*-BF) 是当前应用较为广泛的一种手性拟除虫菊酯农药, 含有 1*S*-*cis*-BF 和 1*R*-*cis*-BF 两个对映体。*cis*-BF 是一种潜在的内分泌干扰物, 有研究发现, *cis*-BF 对下丘脑-垂体-肾上腺 (HPA) 轴分泌的糖皮质激素和盐皮质激素受体具有明显的拮抗效应, 但关于 *cis*-BF 对映体对 HPA 轴激素合成分泌的选择性干扰效应及其机制仍不甚明了。

[目的] 探讨手性农药 *cis*-BF 对映体对人肾上腺皮质癌 (H295R) 细胞肾上腺皮质激素 (皮质醇和醛固酮) 分泌水平的影响及其分子机制。

[方法] 利用高效液相色谱仪对 *cis*-BF 进行手性拆分, 用圆二色谱仪对单个对映体 (1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF) 构型进行鉴定, 用气相色谱对单个对映体浓度进行分析。体外培养 H295R 细胞, 以不同浓度 (0、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF 染毒细胞, 用单溶液噻唑兰 (MTS) 比色法检测细胞增殖活性, 确定染毒浓度。以无细胞毒性浓度 (0、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L) 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF 处理细胞 24 h, 采用实时荧光定量-聚合酶链式反应 (real-time PCR) 检测肾上腺皮质激素合成相关酶基因的表达水平, 用酶联免疫吸附实验 (ELISA) 测定细胞内环磷酸腺苷 (cAMP) 含量和细胞上清液中皮质醇、醛固酮水平。

[结果] 利用高效液相色谱仪完成 *cis*-BF 对映体的拆分, 两种对映体 1*S*-*cis*-BF 和 1*R*-*cis*-BF 纯度分别高达 99.5% 和 99.2%。MTS 实验结果显示, 与对照组相比, 1×10^{-6} 和 1×10^{-5} mol/L 浓度组细胞增殖活性升高 ($P < 0.05$), 而 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 和 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF 对 H295R 细胞增殖活性无明显影响。PCR 结果显示, 相对于对照组, 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 可下调类固醇合成急性调节蛋白 (StAR)、细胞色素 P450 胆固醇侧链裂解酶 (P450_{sc})、 β -羟基类固醇脱氢酶 (β HSD2) 和 17α -羟化酶 (CYP17) 的 mRNA 水平 ($P < 0.05$); 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF 可下调 β HSD2 mRNA 水平 ($P < 0.05$), 且在 1×10^{-7} mol/L 浓度组 StAR、 β HSD2 和 CYP17 mRNA 水平具有对映体差异, 1*S*-*cis*-BF 的抑制作用分别是 1*R*-*cis*-BF 的 2.23、2.04 和 5.00 倍 ($P < 0.05$)。cAMP 测定结果显示, 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 染毒致细胞内 cAMP 含量相对于对照组下降了 8.10% ($P < 0.05$), 而 1*R*-*cis*-BF 与对照组差异无统计学意义; 且 1×10^{-7} mol/L 浓度组 cAMP 含量有明显的对映体差异, 1*S*-*cis*-BF 的抑制作用高于 1*R*-*cis*-BF ($P < 0.05$)。激素测定结果显示, 与对照组相比, 所有浓度组 (1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L) 皮质醇分泌水平均明显降低 ($P < 0.05$), 1×10^{-9} 、 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 及 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF 组醛固酮分泌水平明显降低 ($P < 0.05$); 其中在 1×10^{-8} mol/L 浓度组, S 型对映体对皮质醇分泌水平的抑制作用是 R 型对映体的 1.68 倍, 在 1×10^{-7} mol/L 浓度组, S 型对映体对醛固酮分泌水平的抑制作用是 R 型对映体的 2.16 倍, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。

[结论] *cis*-BF 对映体通过降低 cAMP 水平, 下调 cAMP 依赖性类固醇激素合成酶 mRNA 的表达而抑制 H295R 细胞内皮质醇和醛固酮的分泌水平, 且 1*S*-*cis*-BF 的干扰效应明显高于 1*R*-*cis*-BF。

关键词: 手性; 拟除虫菊酯; 顺式联苯菊酯; 肾上腺皮质激素; H295R 细胞

Selective disruption of *cis*-bifenthrin enantiomers on secretion of adrenocortical hormones in H295R cells WANG Chun-lei, YANG Ye, ZHU Guang-ping, LIU Ke-cheng, YAO Chun-ji, WU Nan-xiang (Institute of Hygiene, Zhejiang Academy of Medical Science, Hangzhou, Zhejiang 310013, China)

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2019.19502

组稿专家

周志俊 (复旦大学公共卫生学院),
E-mail: zjzhou@fudan.edu.cn

基金项目

浙江省自然科学基金 (LY17B070009); 浙江省科技计划项目 (2017F30003); 浙江省医药卫生科技计划项目 (2017KY036)

作者简介

王春蕾 (1992—), 女, 硕士生;
E-mail: 1970387925@qq.com

通信作者

杨叶, E-mail: yangye19870604@163.com

利益冲突 无申报

收稿日期 2019-07-26

录用日期 2019-08-20

文章编号 2095-9982(2019)10-0909-07

中图分类号 R114

文献标志码 A

引用

王春蕾, 杨叶, 朱光平, 等. 顺式联苯菊酯对映体对 H295R 细胞肾上腺皮质激素分泌的选择性干扰效应 [J]. 环境与职业医学, 2019, 36 (10): 909-915.

本文链接

www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19502

Funding

This study was funded.

Correspondence to

YANG Ye, E-mail: yangye19870604@163.com

Competing interests None declared

Received 2019-07-26

Accepted 2019-08-20

To cite

WANG Chun-lei, YANG Ye, ZHU Guang-ping, et al. Selective disruption of *cis*-bifenthrin enantiomers on secretion of adrenocortical hormones in H295R cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2019, 36(10): 909-915.

Link to this article

www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2019.19502

Abstract:

[Background] Chiral pesticides are pesticide compounds with chiral centers in their molecular structures, containing one or more pairs of enantiomers which are mirror images of each other. *Cis*-bifenthrin (*cis*-BF) is one of the most widely used chiral pyrethroid insecticides, containing two enantiomers: 1*S*-*cis*-BF and 1*R*-*cis*-BF. *Cis*-BF is a potential endocrine disruptor. Previous studies have found that *cis*-BF exhibits an antagonistic effect on the receptors of glucocorticoids and corticosteroids secreted by hypothalamic-pituitary-adrenal (HPA) axis, but limited evidence has been available concerning the enantioselective disruption effects of *cis*-BF on the hormone synthesis and secretion of HPA axis as well as the potential mechanisms.

[Objective] This experiment investigates the effects of enantiomers of chiral pesticide *cis*-BF on the secretion levels of adrenocortical hormones (cortisol and aldosterone) as well as the potential molecular mechanisms in human adrenocortical carcinoma (H295R) cells.

[Methods] Chiral resolution of *cis*-BF was carried out by high-performance liquid chromatography. The configuration of the individual enantiomers (1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF) was identified by circular dichroism, and their concentrations were analyzed by gas chromatography. H295R cells were cultured *in vitro* and exposed to different concentrations (0, 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , 1×10^{-7} , 1×10^{-6} , and 1×10^{-5} mol/L) of 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF, and exposure concentrations were determined by testing the cell viability via 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium assay. Then the cells were treated with non-cytotoxic concentrations (0, 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , and 1×10^{-7} mol/L) of 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF for 24 h. The expression levels of genes encoding enzymes involved in adrenocortical hormone synthesis were determined by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (real-time PCR), and the level of intracellular cyclic adenosine monophosphate (cAMP) as well as the levels of cortisol and aldosterone in supernatant were measured by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA).

[Results] The enantiomers of *cis*-BF were successfully separated by high-performance liquid chromatography, and the purities of 1*S*-*cis*-BF and 1*R*-*cis*-BF were 99.5% and 99.2% respectively. The results of MTS assay showed that the cell viability was elevated in the 1×10^{-6} and 1×10^{-5} mol/L groups ($P < 0.05$), but the 1×10^{-9} , 1×10^{-8} , and 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF had no significant effect on cell viability compared with the control group. The PCR data showed that, in comparison with the control group, the 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF significantly down-regulated the mRNA levels of steroidogenic acute regulatory protein (StAR), cytochrome P450 cholesterol side-chain cleavage enzyme (P450_{scc}), 3 β -hydroxysteroid dehydrogenase (3 β HSD2), and 17 α -hydroxylase (CYP17) ($P < 0.05$); the 1×10^{-8} and 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF significantly down-regulated the 3 β HSD2 mRNA levels ($P < 0.05$). Moreover, there were enantiomeric differences in the mRNA levels of StAR, 3 β HSD2, and CYP17 in the 1×10^{-7} mol/L group with 2.23-, 2.04-, and 5.00-fold higher inhibitory effects of 1*S*-*cis*-BF than the effects of 1*R*-*cis*-BF ($P < 0.05$). The data of cAMP revealed a decrease of 8.10% in the intracellular cAMP content in the 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF group compared with the control group ($P < 0.05$), while there was no significant difference between the 1*R*-*cis*-BF group and the control group. A significant enantiomeric difference was found in the cAMP content in the 1×10^{-7} mol/L group, with higher inhibitory effect of 1*S*-*cis*-BF than that of 1*R*-*cis*-BF ($P < 0.05$). The results of hormone determination indicated that the cortisol levels in all concentration (1×10^{-9} , 1×10^{-8} , and 1×10^{-7} mol/L) groups as well as the aldosterone levels in the 1*S*-*cis*-BF (1×10^{-9} and 1×10^{-7} mol/L) and the 1*R*-*cis*-BF (1×10^{-7} mol/L) groups were significantly decreased compared with the control group ($P < 0.05$). In the 1×10^{-8} mol/L group, 1*S*-*cis*-BF showed 1.68-fold higher inhibitory effect on cortisol level compared with 1*R*-*cis*-BF, and in the 1×10^{-7} mol/L groups, 1*S*-*cis*-BF showed 2.16-fold higher inhibitory effects on aldosterone levels than 1*R*-*cis*-BF, and the differences were significant ($P < 0.05$).

[Conclusion] The enantiomers of *cis*-BF could inhibit the secretion of cortisol and aldosterone in H295R cells via reducing cAMP level and down-regulating the gene expressions of cAMP-dependent enzymes related to steroidogenesis. Comparatively, the inhibitory effects of 1*S*-*cis*-BF is more potent than those of 1*R*-*cis*-BF.

Keywords: chirality; pyrethroids; *cis*-bifenthrin; adrenocortical hormone; H295R cell

手性农药是指分子结构中含有手性中心的农药化合物,其含有一对或多对呈镜像关系的对映异构体(简称对映体)。在当今的农药市场中,手性农药约占25%^[1],而在中国手性农药的比例高达40%^[2]。拟除虫菊酯作为一类新型高效的仿生杀虫剂,是典型的手性农药;其中,联苯菊酯是当前应用较多的拟除虫菊酯农药之一。目前市售的是顺式联苯菊酯(*cis*-bifenthrin, *cis*-BF)外消旋体,含有1*S*-*cis*-BF和1*R*-*cis*-BF两个对映体^[3],对映体比例为1:1。研究发现,*cis*-BF对靶标生物和非靶标生物的毒性存在明显的对映体差异。张聪等^[4]发现1*R*-*cis*-BF对靶标生物菜青虫的毒性比1*S*-*cis*-BF强300倍以上,而1*S*-*cis*-BF对人肝癌

细胞(human hepatocellular carcinoma cell, HepG2)的毒性显著大于1*R*-*cis*-BF。目前,拟除虫菊酯农药的内分泌干扰效应及其对映体选择性引起了广泛关注^[5-7]。

肾上腺内分泌系统是生物体三大内分泌系统之一,对外界刺激条件下机体的应激反应起关键作用,其分泌的肾上腺皮质激素(包括糖皮质激素和盐皮质激素)主要参与机体能量代谢、水盐代谢和电解质平衡的调节,是在下丘脑-垂体-肾上腺(hypothalamic-pituitary-adrenal, HPA)轴调控作用下,由胆固醇在类固醇合成急性调节蛋白(steroidogenic acute regulatory protein, StAR)、细胞色素P450胆固醇侧链裂解酶(cytochrome P450 cholesterol side-chain

cleavage enzyme, P450scc)、 3β -羟基类固醇脱氢酶 (3β -hydroxysteroid dehydrogenase, 3β HSD2) 和 17α -羟化酶 (steroid 17α -hydroxylase, CYP17) 等类固醇激素合成酶作用下生成^[8]。研究发现, *cis*-BF 具有明显的抗糖皮质激素和抗盐皮质激素效应^[9-10], 但目前关于 *cis*-BF 对映体对肾上腺皮质激素合成分泌的干扰作用及其内在机制仍不甚明了。人肾上腺皮质癌细胞 (human adrenocortical carcinoma cells, H295R) 来源于人肾上腺皮质瘤, 容易获得、培养简单、可稳定传代, 能表达所有类固醇激素生成相关酶^[11], 并与正常的人肾上腺皮质细胞对毒物的反应水平一致^[12], 是研究污染物类固醇激素干扰活性常用的体外模型。本研究以 H295R 细胞为研究模型在对映体水平上探究 *cis*-BF 对肾上腺皮质激素 (皮质醇和醛固酮) 合成分泌的干扰效应, 同时通过检测类固醇激素合成相关酶基因 (*StAR*、*P450scc*、 3β HSD2 以及 *CYP17*) 的表达水平以及细胞内环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的含量探究相关分子机制, 为手性农药的环境安全性提供理论依据和参考价值。

1 材料与方法

1.1 主要试剂和仪器

DMEM/F12 (1:1) 培养液、青/链霉素混合液 (HyClone, 美国), 无酚红 DMEM/F12 培养液、血清替代物、胰岛素-转铁蛋白-硒 (insulin transferrin selenium, ITS) (Gibco, 美国), 胰蛋白酶-EDTA (Cellmax, 中国), *cis*-BF (纯度 >98%)、二甲基亚砜 (dimethyl sulfoxide, DMSO, 分析纯) (Sigma, 美国), CellTiter 96 AQueous 细胞增殖试剂盒 (Promega, 美国), Trizol 试剂 (Invitrogen, 美国), 人皮质醇、醛固酮和环磷酸腺苷酶联免疫吸附实验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所, 中国), 反转录试剂盒、实时定量 PCR 荧光染料 (SYBR Green Real-time PCR Master Mix) (TOYOBO, 日本), 甲醇、正己烷、乙腈 (JTBaker, 美国)。

高效液相色谱 (high-performance liquid chromatography, HPLC) 仪 (Waters, 美国), Lux Cellulose-3 液相手性柱 (Phenomenex, 美国), 气相色谱 (gas chromatograph, GC) 系统 (Agilent, 美国), 圆二色光谱 (circular dichroism, CD) 仪 (JASCO, 日本), CO₂ 细胞恒温培养箱 (SANYO, 日本), 核酸蛋白分析仪 (Thermo Scientific, 美国), 实时荧光定量 PCR 仪 (Applied

Biosystems, 美国), 超低温 (-80℃) 冰箱 (中国海尔电器有限公司, 中国), 低温高速离心机 (湖南湘仪离心机仪器有限公司, 中国), 水平高速离心机 (湖南可成离心机仪器有限公司, 中国), 多功能酶标仪 (Biotek, 美国)。

1.2 *cis*-BF 对映体的制备与构型鉴定

采用高效液相色谱仪和 Lux Cellulose-3 液相手性柱 (4.6 mm×250 mm×5 μm) 对 *cis*-BF 进行手性分离, 以甲醇:水 (90:10, 体积比) 为流动相, 1 mL/min 的流速, UV 检测器波长为 220 nm, 柱温 25℃。拆分开的两个对映体用正己烷复溶, 利用配有电子捕获检测器的气相色谱系统对单个对映体进行定量分析。然后取适量溶于正己烷的对映体储备液, 将正己烷氮吹浓缩至干后用乙腈复溶, 再利用 CD 仪在 220~420 nm 波长范围内, 扫描单个对映体及溶剂乙腈的 CD 谱图, 扣除溶剂的 CD 背景值, 完成对单个对映体的构型鉴定。CD 仪的扫描速度为 100 nm/min, 分辨率为 1 nm。

1.3 H295R 细胞培养与增殖活性测定

H295R 细胞购自美国典型菌种保藏中心。H295R 细胞培养使用含有 1% 血清替代物、1% 青/链霉素混合液和 1% ITS 的 DMEM/F12 高糖培养基, 培养于 37℃、5% CO₂ 的恒温培养箱中。隔天更换一次培养液, 待细胞增殖至 80%~95% 后, 用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 溶液消化传代, 传代比例为 1:3。

H295R 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 96 孔板中, 培养 24 h, 用无酚红 DMEM/F12 培养液饥饿处理 24 h 后, 以不同浓度 (0 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L) 对映体 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF 染毒处理, 保证每组 0.1% DMSO, 对照组为 0.1% DMSO 溶剂对照, 每组设 3 个平行样, 共重复 3 次实验。染毒 24 h 后, 每孔加入 20 μL 单溶液噻唑兰 [3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium, MTS] 试剂, 孵育 4 h, 用酶标仪测定波长 490 nm 处各个孔的光密度 (*D*) 值, 并计算细胞的相对存活率 ($D_{\text{实验组}}/D_{\text{对照组}} \times 100\%$)。

1.4 实时荧光定量 PCR 检测

将对数生长期细胞以 3×10^5 个/mL 接种至 24 孔板, 饥饿处理 24 h, 以不同浓度 (0 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L) 的 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF 进行染毒处理, 溶剂对照组为 0.1% DMSO。染毒 24 h 后收集细胞, 用 Trizol 试剂提取总 mRNA, 用反转录试剂盒合成 cDNA, 然后用 SYBR Green Real-time PCR Master Mix 进行实时

荧光定量PCR检测。

所需引物由上海桑尼生物科技有限公司合成(表1), 反应体系为20 μ L, 包括cDNA 5 μ L、SYBR Green PCR master mix 10 μ L、上下游引物(10 μ mol/L)各0.5 μ L以及灭菌ddH₂O 4 μ L。反应程序为: 95℃预变性1 min, 95℃变性15 s, 60℃复性15 s, 72℃延伸45 s, 重复40个循环, 最后进行融解曲线分析。以 β -actin为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算各目的基因的相对表达量。

表1 实时荧光定量PCR的引物序列
Table 1 Primer sequences for real-time PCR

基因 Gene	引物序列 (5'-3') (Primer sequence)		长度 (bp) Length
	正向 (Forward)	反向 (Reverse)	
β -actin	CACTCTTCCAGCCTTCCTCC	AGGTCCTTGCGGATGTCCAC	100
StAR	GTCCACCCCTGCCTCTGAAG	CATACTCTAAACACGAACCCACCC	168
P450 _{sc}	GAGATGGCAGCAACCTGAAG	CTTAGTGTCTCCTTGATGCTGGC	137
3 β HSD2	AGCATCTTCTGTTTCTGGCA	TCTCCTTCAGTTCCTTCTCTTC	142
CYP17	AGCCGCACACCAACTATCAG	TCACCGATGCTGGAGTCAAC	134

1.5 细胞内人环磷酸腺苷含量检测

将对数生长期细胞以 6×10^5 个/mL接种于12孔板, 饥饿处理24 h, 以不同浓度(0、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L)的1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF进行染毒处理, 溶剂对照组为0.1% DMSO。细胞染毒24 h后, 除去培养液, 用0.9% NaCl清洗细胞两次, 再每孔加1.2 mL 0.1 mol/L HCL, 在室温条件下裂解20 min, 收集细胞裂解液于1.5 mL离心管中, 旋涡震荡后, 1000 $\times g$ 离心10 min, 按照人环磷酸腺苷ELISA试剂盒提供的操作方法测定其含量, 并计算各组的相对cAMP水平(实验组/对照组 $\times 100\%$)。

1.6 细胞上清液激素水平检测

将对数生长期细胞以 3×10^5 个/mL接种至24孔板, 饥饿处理24 h后以不同浓度(0、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L) 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF染毒处理, 溶剂对照组为0.1% DMSO。染毒24 h后, 收集细胞培养液于1.5 mL离心管中, 1000 $\times g$ 离心20 min。然后收集上清液于新的1.5 mL离心管中, 用于激素检测。根据人皮质醇和醛固酮ELISA试剂盒提供的操作方法测定其含量, 并计算各组的相对激素水平(实验组/对照组 $\times 100\%$)。

1.7 统计学分析

计量资料结果用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用SPSS 16.0软件对数据进行统计学分析。多组间均数差异性比较采用单因素方差分析, 组间两两比较方差齐时采用LSD检验, 方差不齐时采用Dunnett-*t*检验。检

验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 *cis*-BF的手性拆分为构型鉴定

如图1所示, 在设定的液相色谱条件下, *cis*-BF在Lux 3u Cellulose-3手性柱上得到基线分离。从图2的CD谱图可以看出, 在220~420 nm波长范围内, *cis*-BF两个对映体的CD谱图互为镜像关系, 对比图1, HPLC谱图中第一个和第二个峰的CD谱图分别呈现出正科顿效应和负科顿效应。参考Liu等^[13]的研究, 具有正科顿效应(峰1)的为1*S*-*cis*-BF, 具有负科顿效应(峰2)的为1*R*-*cis*-BF。在对映体制备和构型鉴定过程中, 没有对映体相互转化现象发生, GC纯度分析结果表明, 1*S*-*cis*-BF和1*R*-*cis*-BF纯度分别高达99.5%和99.2%。

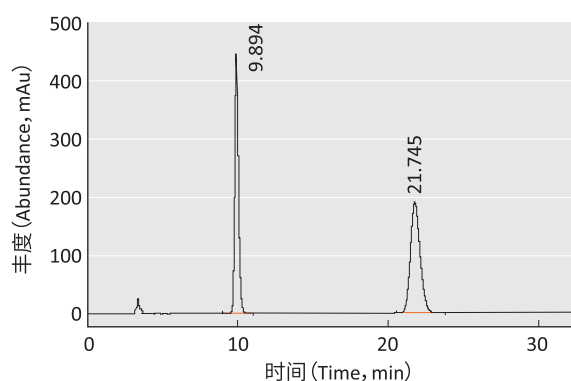


图1 *cis*-BF手性分离的HPLC谱图

Figure 1 HPLC chromatogram of *cis*-BF chiral separation

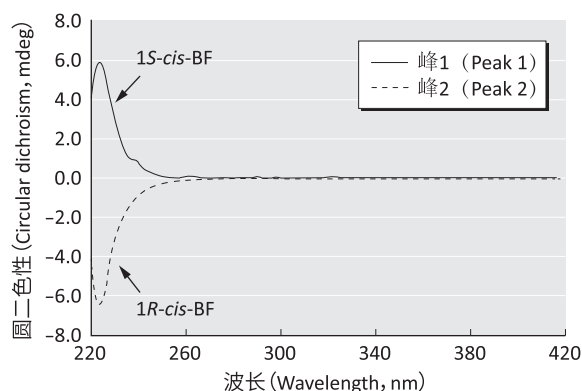


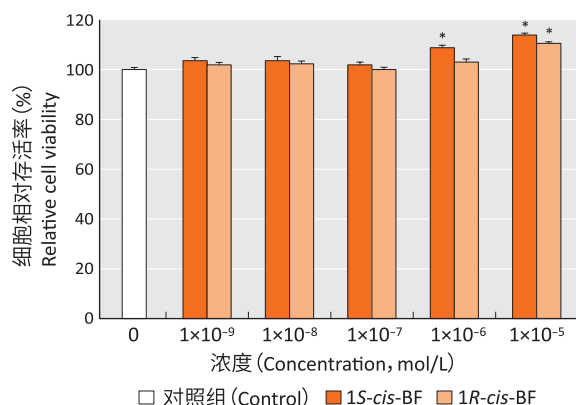
图2 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF在220~420 nm的CD谱图

Figure 2 CD chromatogram of 1*S*-*cis*-BF/1*R*-*cis*-BF at 220-420 nm

2.2 对H295R细胞增殖活性的影响

MTS结果显示, 与对照组相比, 较低浓度的1*S*-*cis*-BF(1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L)及1*R*-*cis*-BF(1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} mol/L)细胞增殖活性均无明显变化, 而高浓度的1*S*-*cis*-BF(1×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol/L)和

1*R*-*cis*-BF (1×10^{-5} mol/L) 细胞增殖活性明显升高 ($P < 0.05$) (图3)。



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$.

图3 1*S*-*cis*-BF /1*R*-*cis*-BF 对 H295R 细胞增殖活性的影响
Figure 3 Effects of 1*S*-*cis*-BF /1*R*-*cis*-BF on the proliferation activity of H295R cells

2.3 对肾上腺皮质激素生成相关酶 mRNA 水平的影响

与对照组相比, 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 染毒组细胞内 *StAR*、*P450_{scc}* 和 *CYP17* 基因表达明显降低 ($P < 0.05$), 而 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF 染毒对上述 3 种酶的基因表达无明显影响; 且在 1×10^{-7} mol/L 组, *StAR* 和 *CYP17* 的 mRNA 水平有明显的对映体差异, 1*S*-*cis*-BF 的抑制作用分别是 1*R*-*cis*-BF 的 2.23 和 5.00 倍 ($P < 0.05$) (图 4 A、B、D)。此外, 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 和 1*R*-*cis*-BF 染毒均可抑制 *3βHSD2* 酶基因的表达 ($P < 0.05$), 且在 1×10^{-7} mol/L 组有明显的对映体差异, *S* 型对映体的抑制作用是 *R* 型的 2.04 倍 ($P < 0.05$) (图 4 C)。

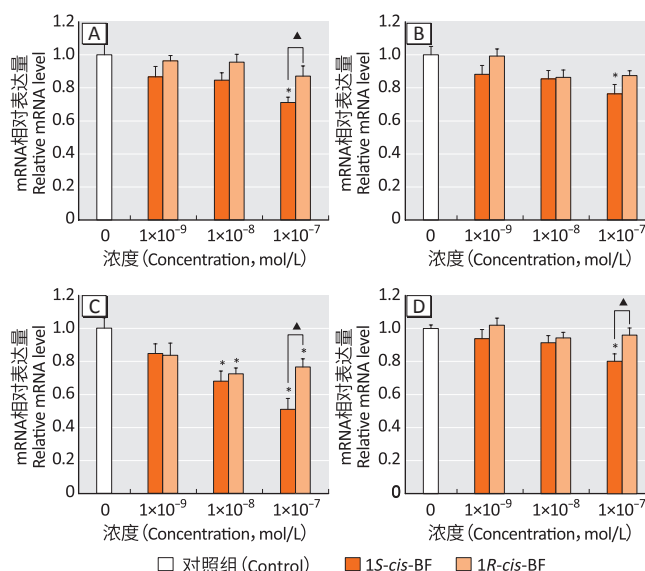
2.4 对 cAMP 含量的影响

与对照组相比, 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} mol/L 1*S*-*cis*-BF 和 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} mol/L 1*R*-*cis*-BF 均不影响 H295R 细胞内 cAMP 的含量, 而 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 染毒致细胞内 cAMP 含量相较于对照组下降了 8.10% ($P < 0.05$), 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF 染毒后细胞内 cAMP 含量与对照组差异无统计学意义; 且 1×10^{-7} mol/L 浓度组 cAMP 含量具有明显的对映体差异 ($P < 0.05$), 1*S*-*cis*-BF 的抑制作用比 1*R*-*cis*-BF 强 (图 5)。

2.5 对 H295R 细胞皮质醇和醛固酮分泌水平的干扰

皮质醇测定结果显示 (图 6 A), 1*S*-*cis*-BF 和 1*R*-*cis*-BF 染毒均可抑制细胞皮质醇的分泌水平, 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 染毒组皮质醇含量分别较对照组下降了 59.79%、64.65%、69.89%, 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF 染毒组分别较对照组下

降了 40.21%、38.52%、67.26% ($P < 0.05$), 各浓度组 *S* 型对映体的抑制作用分别是 *R* 型对映体的 1.49、1.68 和 1.04 倍, 其中 1×10^{-8} mol/L 浓度组皮质醇水平具有对映体差异 ($P < 0.05$)。醛固酮测定结果显示 (图 6 B), 与对照组相比, 1×10^{-9} 、 1×10^{-7} mol/L 1*S*-*cis*-BF 染毒组醛固酮水平分别下降了 29.48% 和 37.80%, 1×10^{-7} mol/L 1*R*-*cis*-BF 染毒组下降 17.54% ($P < 0.05$), 其中 1×10^{-7} mol/L 浓度组 1*S*-*cis*-BF 对醛固酮分泌的抑制作用是 1*R*-*cis*-BF 的 2.16 倍, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。

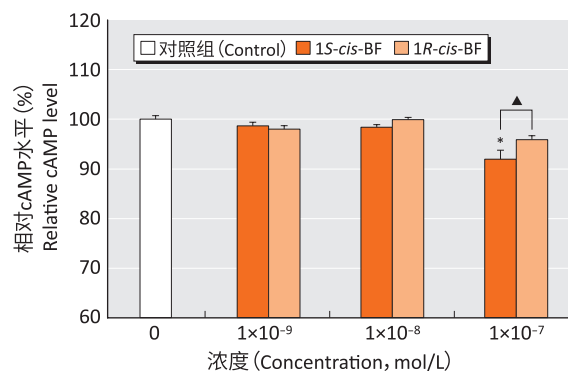


[注] A: *StAR*; B: *P450_{scc}*; C: *3βHSD2*; D: *CYP17*. *: 与对照组相比, $P < 0.05$; ▲: 对映体之间的差异, $P < 0.05$ 。

[Note] A: *StAR*; B: *P450_{scc}*; C: *3βHSD2*; D: *CYP17*. *: Compared with the control group, $P < 0.05$; ▲: Between enantiomers, $P < 0.05$.

图4 1*S*-*cis*-BF /1*R*-*cis*-BF 对肾上腺皮质激素生成相关酶基因表达水平的影响

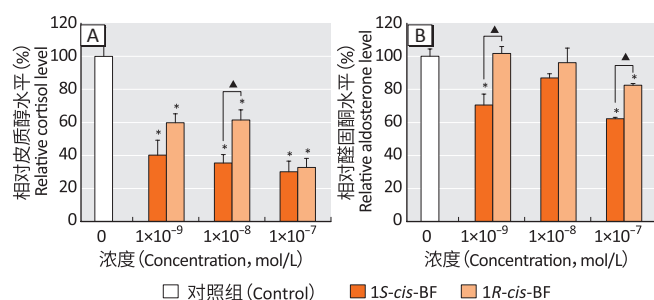
Figure 4 Effects of 1*S*-*cis*-BF /1*R*-*cis*-BF on the expression levels of genes encoding enzymes involved in adrenocortical hormone synthesis



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$; ▲: 对映体之间的差异, $P < 0.05$ 。

[Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$; ▲: Between enantiomers, $P < 0.05$.

图5 1*S*-*cis*-BF /1*R*-*cis*-BF 对 H295R 细胞内 cAMP 含量的影响
Figure 5 Effects of 1*S*-*cis*-BF /1*R*-*cis*-BF on the content of cAMP in H295R cells



[注] *: 与对照组相比, $P < 0.05$; ▲: 对映体之间的差异, $P < 0.05$ 。
 [Note] *: Compared with the control group, $P < 0.05$; ▲: Between enantiomers, $P < 0.05$.

图6 1S-*cis*-BF/1R-*cis*-BF对皮质醇(A)和醛固酮(B)分泌水平的影响

Figure 6 Effects of 1S-*cis*-BF/1R-*cis*-BF on the secretion levels of cortisol (A) and aldosterone (B)

3 讨论

肾上腺内分泌系统又称应激系统,主要由HPA轴调控^[8]。受到外界刺激时,生物体内HPA轴被激活,垂体分泌的促肾上腺皮质激素(adrenocorticotrophic hormone, ACTH)与肾上腺皮质细胞膜的受体结合,使腺苷酸环化酶活化,导致肾上腺皮质细胞内的第二信使cAMP含量增加,进一步激活下游cAMP依赖的类固醇激素合成酶,诱导肾上腺皮质激素合成分泌,参与机体的应激反应^[14-15]。*cis*-BF是当前应用较多的手性农药之一,且在环境中频繁检出^[3]。本研究发现,*cis*-BF对H295R细胞内肾上腺皮质激素(皮质醇和醛固酮)的分泌水平具有抑制作用,且S型对映体作用更强。Liu等^[7]也发现,1S-*cis*-BF染毒明显抑制了卵巢颗粒细胞内孕酮和前列腺素E2的含量,而1R-*cis*-BF无明显影响。Jin等^[16]发现青春期雄鼠经口暴露1S-*cis*-BF和1R-*cis*-BF三周后,1S-*cis*-BF处理组动物体内睾酮水平明显低于1R-*cis*-BF处理组。由此可见,*cis*-BF中S型对映体对类固醇激素(性激素、肾上腺皮质激素等)分泌的干扰效应高于R型对映体。

类固醇激素合成相关酶(*StAR*、*P450scc*、*3βHSD2*、*CYP17*等)主要是由细胞内第二信使cAMP依赖的信号通路调节,研究表明,多种外源化学物可通过影响cAMP依赖的信号通路干扰类固醇激素的合成分泌^[17-18]。例如, Ma等^[18]发现五氯苯酚和三氯苯酚暴露可降低H295R细胞内cAMP水平,下调*StAR*、*3βHSD2*、*P450scc*、*CYP17*、芳香酶(aromatase, *CYP19*)以及17β-羟基类固醇脱氢酶(17β-hydroxysteroid dehydrogenase, *17βHSD4*)基因表达水平,最终引起性激素睾酮和17β-雌二醇分泌减少。本研究也发现, *cis*-BF (1x10⁻⁷ mol/L) 对映体能够抑制H295R细

胞内cAMP含量,下调皮质激素生成相关酶(*StAR*、*P450scc*、*3βHSD2*和*CYP17*) mRNA的表达水平,且S型对映体的抑制作用更强。Jin等^[16]通过体内研究发现,1S-*cis*-BF染毒导致青春期雄鼠体内睾酮合成关键基因*P450scc*和*CYP17*的表达水平均明显下调,与本研究结果一致。

综上,手性农药*cis*-BF对映体可能是通过降低H295R细胞内cAMP含量,下调cAMP依赖性类固醇激素合成酶基因的表达,从而抑制肾上腺皮质激素的合成分泌水平,其中,杀虫活性较低的S型对映体具有更强的内分泌干扰效应。但本研究尚存在一些不足,关于*cis*-BF对应激条件下细胞内肾上腺激素合成分泌的影响仍不明了,未来工作将考虑选择cAMP类似物处理细胞,模拟外界应激条件,同时结合体内动物实验,完善*cis*-BF的内分泌干扰效应数据。

参考文献

- [1] GARRISON A W. Probing the enantioselectivity of chiral pesticides [J]. *Environ Sci Technol*, 2006, 40 (1): 16-23.
- [2] ZHOU Y, LI L, LIN K, et al. Enantiomer separation of triazole fungicides by high-performance liquid chromatography [J]. *Chirality*, 2009, 21 (4): 421-427.
- [3] YANG Y, WU N, WANG C. Toxicity of the pyrethroid bifenthrin insecticide [J]. *Environ Chem Lett*, 2018, 16 (4): 1377-1391.
- [4] 张聪, 刘慧刚, 章晓凤. 联苯菊酯对靶标生物及非靶标生物毒性的对映体差异 [J]. *浙江工业大学学报*, 2009, 37 (4): 366-371.
- [5] 杨咏, 李晓凤, 周义军. 氰戊菊酯宫内暴露对雄性仔鼠雄性特征的影响 [J]. *环境与职业医学*, 2012, 29 (5): 321-323.
- [6] 张晶晶, 户宜, 高宇. 拟除虫菊酯类农药对雄性生殖功能的影响及机制 [J]. *环境与职业医学*, 2017, 34 (4): 367-372.
- [7] LIU J, YANG Y, ZHUANG S, et al. Enantioselective endocrine-disrupting effects of bifenthrin on hormone synthesis in rat ovarian cells [J]. *Toxicology*, 2011, 290 (1): 42-49.
- [8] HARVEY P W. Adrenocortical endocrine disruption [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2016, 155: 199-206.
- [9] ZHANG J, ZHANG J, LIU R, et al. Endocrine-disrupting effects of pesticides through interference with human glucocorticoid receptor [J]. *Environ Sci Technol*, 2015, 50 (1): 435-443.
- [10] ZHANG J, HUANG X, LIU H, et al. Novel pathways of endocrine disruption through pesticides interference with

- human mineralocorticoid receptors [J]. *Toxicol Sci*, 2018, 162 (1) : 53-63.
- [11] LIU C, ZHANG X, CHANG H, et al. Effects of fluorotelomer alcohol 8 : 2 FTOH on steroidogenesis in H295R cells : targeting the cAMP signalling cascade [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2010, 247 (3) : 222-228.
- [12] 周景明, 路纪琪. H295R 细胞系筛选环境类固醇激素干扰物的研究进展 [J]. *环境与健康杂志*, 2009, 26 (4) : 374-375.
- [13] LIU H, ZHAO M, ZHANG C, et al. Enantioselective cytotoxicity of the insecticide bifenthrin on a human amnion epithelial (FL) cell line [J]. *Toxicology*, 2008, 253 (1/2/3) : 89-96.
- [14] MALIK S, DOLAN TM, MABEN ZJ, et al. Adrenocorticotrophic hormone (ACTH) responses require actions of the melanocortin-2 receptor accessory protein on the extracellular surface of the plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 2015, 290 (46) : 27972-27985.
- [15] WANG C, RUAN T, LIU J, et al. Perfluorooctyl iodide stimulates steroidogenesis in H295R cells via a cyclic adenosine monophosphate signaling pathway [J]. *Chem Res Toxicol*, 2015, 28 (5) : 848-854.
- [16] JIN Y, WANG J, PAN X, et al. Enantioselective disruption of the endocrine system by *cis*-bifenthrin in the male mice [J]. *Environ Toxicol*, 2015, 30 (7) : 746-754.
- [17] YAN X, HE B, LIU L, et al. Organotin exposure stimulates steroidogenesis in H295R Cell via cAMP pathway [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 156 : 148-153.
- [18] MA Y, LIU C, LAM PKS, et al. Modulation of steroidogenic gene expression and hormone synthesis in H295R cells exposed to PCP and TCP [J]. *Toxicology*, 2011, 282 (3) : 146-153.
- (英文编辑: 汪源; 编辑: 丁瑾瑜; 校对: 王晓宇)

· 告知栏 ·

欢迎订阅 2020 年《环境与职业医学》杂志

《环境与职业医学》杂志 (www.jeom.org) 创刊于 1984 年, 系由上海市疾病预防控制中心、中华预防医学会主办, 国内外公开发行的专业性学术期刊 (ISSN 2095-9982, CN 31-1879/R)。目前已入选中国科学引文数据库 (CSCD-C) 源期刊、中文核心期刊 (预防医学、卫生学类核心期刊)、中国科技论文统计源期刊 (中国科技核心期刊)、RCCSE 中国核心学术期刊 (A), 并被多家国际知名数据库如: 乌利希国际期刊指南、英国国际农业与生物科学研究中心、英国全球健康及美国剑桥科学文摘 (自然科学) 等收录。

本刊内容主要介绍国内外劳动卫生与职业病防治工作, 环境危害因素及其治理, 以及有关职业和环境卫生学的学术研究、科研成果及实践经验, 包括职业与环境流行病学、环境检测、毒理学、环境生态学和职业病临床、应急救援、卫生管理、环境污染与治理、职业病防治实践等方面的论著、实验研究、调查研究、综述、短篇报道、病例报告等。可供广大疾病控制、卫生监督、厂矿劳动安全、职业卫生与职业病防治、环境保护、环境科学研究等相关单位专业人员, 医学院校教学和科研等人员参考。

本刊为月刊, 大 16 开, 96 页, 每月 25 日出版, 定价每期 20 元, 全年 240 元 (含包装及平邮邮资, 需挂号或速递者邮资另计)。由邮局及自办结合发行, 邮发代号: 4-568, 邮局可办理 2020 年征订工作。

汇款可通过如下两种方式,

1. 银行汇款

户名: 上海市疾病预防控制中心; 账号: 3166 3803 0016 65382; 开户行: 上海银行白玉支行。

2. 邮局汇款

上海市延安西路 1326 号 (生物大厦) 22 楼《环境与职业医学》杂志编辑部, 邮编: 200052。

读者如需单行本或合订本, 可直接向编辑部联系邮购。

对历年本刊所出的专题专刊 (含会议论文集), 需要者亦可联系邮购。

联系人: 葛宏妍; 电话与传真: 021-62084529; E-mail: zazhi2@scdc.sh.cn