实验研究
Experiment

双酚A对甲状腺乳头状癌细胞KTC-1增殖的影响

汪洁英[a]，宁博[b]，陈钰玮[a]，刘帅[b]，朱启森[b]，门可[a]

西安医学院 a. 公共卫生学院 b. 临床医学院，陕西 西安 710021

DOI 10.13213/j.cnki.jeom.2020.19811

摘要：

[背景] 双酚A（BPA）是一种常见的环境内分泌干扰物，其化学结构与雌激素类似，近年来其与肿瘤之间的关系引起普遍关注。甲状腺癌是内分泌系统中发病率最高的恶性肿瘤，BPA对其发生发展的影响值得进一步探索。

[目的] 研究BPA对人甲状腺乳头状癌细胞增殖的影响及相关机制。

[方法] 体外培养人甲状腺乳头状癌细胞KTC-1后传代，随机分为对照组、BPA处理组（BPA浓度分别为5×10^{-3}、5×10^{-4}、5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1}），染毒24、48、72 h后，细胞增殖实验（CCK-8）检测细胞增殖活性，倒置显微镜观察细胞形态学改变，流式细胞仪分析细胞周期，免疫印迹法分别检测细胞周期蛋白（Cyclin）D1和细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂（P21）的表达水平。

[结果] 5×10^{-3} mol·L^{-1} BPA诱导细胞大量死亡并漂浮于细胞培养液中，残留贴壁细胞出现较多空泡颗粒，细胞间连接消失，且时间越长形态学改变越明显；5×10^{-7}、5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA处理组细胞呈梭形，同时可观察到明显的细胞分裂现象。与对照组相比，5×10^{-3}、5×10^{-4}、5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA诱导细胞不同时间（24、48、72 h）的细胞增殖率均有下降（$P<0.05$）；5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA诱导细胞48 h增殖率较对照组明显升高（$P<0.001$）；5×10^{-6} mol·L^{-1} BPA随着染毒时间的增加细胞增殖率变化不同，在处理24 h后，较对照组下降（$P<0.05$），但在处理48、72 h后明显升高（$P<0.001$）。5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA处理细胞24 h后流式细胞仪分析结果显示：除5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA处理组，5×10^{-6}~5×10^{-9} mol·L^{-1}浓度组的细胞增殖指数（*PI*）与对照组相比呈现上升趋势，但差异未见统计学意义；但其中5×10^{-6} mol·L^{-1} BPA处理组KTC-1细胞进入DNA合成期（S期）的细胞构成比高于对照组（$P<0.05$）。与对照组相比，5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA处理组Cyclin D1蛋白表达水平下降，P21蛋白表达水平上升；5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1}浓度处理组Cyclin D1蛋白表达水平上调，P21蛋白表达水平下降，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。

[结论] BPA对人甲状腺乳头状癌细胞KTC-1的增殖具有双重效应：高剂量BPA对甲状腺乳头状癌细胞KTC-1有毒作用，导致细胞死亡；低剂量BPA对甲状腺乳头状癌细胞KTC-1有促增殖作用。不同浓度BPA可能通过调节细胞周期蛋白Cyclin D1和P21的蛋白表达水平来促进或者抑制甲状腺乳头状癌细胞KTC-1的增殖。

关键词：双酚A；人甲状腺乳头状癌细胞KTC-1；细胞增殖；细胞周期蛋白Cyclin D1；P21蛋白

Effects of bisphenol A on proliferation of thyroid papillary carcinoma KTC-1 cells

WANG Jie-ying[a], NING Bo[b], CHEN Yu-wei[a], LIU Shuai[b], ZHU Qi-sen[b], MEN Ke[a] (a.College of Public Health b.College of Clinical Medicine, Xi'an Medical University, Xi'an, Shaanxi 710021, China)

Abstract:

[Background] Bisphenol A (BPA) is a common environmental endocrine disruptor with a similar chemical structure to estrogen. In recent years, the relationship between BPA and tumors has attracted widespread attention. The effects of BPA on the development of thyroid cancer, with the highest incidence rate among endocrine system cancers, are worth exploring further.

[Objective] This experiment investigates the effects and mechanisms of BPA on the proliferation of human papillary thyroid carcinoma cells.

[Methods] Human papillary thyroid carcinoma KTC-1 cells were cultured *in vitro* and passaged before the cells were randomly divided into two groups: control group and

基金项目
国家自然科学基金面上项目（81773496，2018PT01）；陕西省教育厅专项科研计划（18JK0666）；西安医学院2017博士科研启动基金项目（2017DOC10）

作者简介
汪洁英（1985—），女，博士，讲师；
E-mail：wangjieying1234@163.com

通信作者
门可，E-mail：menke@foxmail.com

利益冲突 无申报
收稿日期 2019-11-27
录用日期 2020-05-14

文章编号 2095-9982(2020)07-0712-07
中图分类号 R114
文献标志码 A

▸引用
汪洁英，宁博，陈钰玮，等. 双酚A对甲状腺乳头状癌细胞KTC-1增殖的影响[J]. 环境与职业医学，2020，37（7）：712-718.

▸本文链接
www.jeom.org/article/cn/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19811

Funding
This study was funded.

Correspondence to
MEN Ke, E-mail: menke@foxmail.com

Competing interests None declared
Received 2019-11-27
Accepted 2020-05-14

▸To cite
WANG Jie-ying, NING Bo, CHEN Yu-wei, et al. Effects of bisphenol A on proliferation of thyroid papillary carcinoma KTC-1 cells[J]. Journal of Environmental and Occupational Medicine, 2020, 37(7): 712-718.

▸Link to this article
www.jeom.org/article/en/10.13213/j.cnki.jeom.2020.19811

BPA experiment group (subgrouping by BPA concentrations at 5×10^{-3}, 5×10^{-4}, 5×10^{-5}, 5×10^{-6}, 5×10^{-7}, 5×10^{-8}, and 5×10^{-9} mol·L^{-1}). After 24 h, 48 h, and 72 h exposure, CCK-8 experiment was used to detect the cell proliferation rate, inverted microscope was used to observe the morphological changes of cells, flow cytometry was used to analyze cell cycle, and Western blotting was used to detect the expression levels of Cyclin D1 and P21.

[Results] BPA at 5×10^{-3} mol·L^{-1} induced massive cell death as the cells were floated in the medium, residual adherent cells were vacuolated, cell connection disappeared, and the morphological changes were more obvious with extended exposure time. The cells treated with BPA at 5×10^{-7} and 5×10^{-9} mol·L^{-1} were spindle-shaped, and significant cell division was observed. Compared with the control group, BPA at 5×10^{-3}, 5×10^{-4}, and 5×10^{-5} mol·L^{-1} significantly reduced the cell proliferation rate at different time points (24 h, 48 h, and 72 h) ($P<0.05$); BPA at 5×10^{-7}, 5×10^{-8}, and 5×10^{-9} mol·L^{-1} increased the cell proliferation rate at 48 h ($P<0.001$); BPA at 5×10^{-6} mol·L^{-1} decreased the cell proliferation rate at 24 h, and increased the rate at 48 h and 72 h ($P<0.001$). The results of flow cytometry showed that the cell proliferation index (*PI*) of the subgroups except the 5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA subgroup presented a rising tendency compared with the control group, but there was no significant difference. The proportion of cells in S phase of the 5×10^{-6} mol·L^{-1} BPA subgroup was significantly higher than that of the control group ($P<0.05$). Compared with the control group, the expression level of Cyclin D1 protein decreased and the expression level of P21 protein increased in the 5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA subgroup; in contrast, the expression level of Cyclin D1 protein increased and the expression level of P21 protein decreased in the 5×10^{-8} and 5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA subgroups ($P<0.05$).

[Conclusion] BPA has dual effects on the proliferation of KTC-1 cells. High-dose BPA has a toxic effect on KTC-1 cells and leads to cell death; low-dose BPA promotes the proliferation of KTC-1 cells. Different concentrations of BPA can either promote or inhibit the proliferation of KTC-1 cells by regulating the expression of Cyclin D1 and P21.

Keywords: bisphenol A; human papillary thyroid carcinoma KTC-1 cells; cell proliferation; Cyclin D1; P21

双酚A（bisphenol A，BPA）是一类常见的环境内分泌干扰物，其与雌激素的化学结构相似，有显著的类雌激素作用。近年来随着聚碳酸酯塑料应用的增加，BPA广泛存在于生活中的各个方面，可经多种途径被人体摄入[1]，导致在全球范围的人体血液、尿液及其他体液和组织中均有检出[2-3]。BPA不仅干扰人类的生殖内分泌系统，影响胚胎发育，同时已有实验证实BPA能促进乳腺癌、子宫内膜癌及前列腺癌等恶性肿瘤的发生发展[4-6]，其与肿瘤之间的关系更加受到人们的重视。

甲状腺癌是内分泌系统中最常见的恶性肿瘤，近年来其发病率呈不断上升的趋势[7]。它分为4种病理类型：甲状腺乳头状癌、甲状腺滤泡状癌、甲状腺髓样癌和甲状腺未分化癌[8]；其中，甲状腺乳头状腺癌是最常见的病理类型[9]。目前，人群研究发现甲状腺乳头状癌病人中尿BPA的含量明显高于对照，推测BPA的代谢可能和甲状腺乳头状癌的发生及进展有关[10]。李亚男等[11]发现碘酸钾和BPA在一定浓度范围内可以促进甲状腺乳头状癌细胞的增殖，但单纯BPA对甲状腺肿瘤细胞的影响并不明确。Bilancio等[12]发现BPA可通过表皮生长因子受体/细胞外信号调节蛋白激酶/肿瘤抑制蛋白p53信号通路抑制人雄激素依赖性前列腺癌细胞增殖，但Pfeifer等[13]的实验研究结果显示低剂量BPA对雌激素受体α阴性的乳腺细胞有促增殖作用，当前的文献报道中关于BPA对人体细胞的作用有不同的结论，其影响因素可能取决于干扰剂量的不同。所以不同浓度的BPA如何干扰甲状腺乳头状癌细胞的增殖作用需要进一步研究。本项目通过体外培养甲状腺乳头状癌细胞KTC-1，旨在观察BPA对甲状腺乳头状癌细胞周期的影响，探讨BPA对甲状腺乳头状癌细胞作用的机制，阐明BPA在甲状腺肿瘤发生发展中的作用，从而为甲状腺肿瘤的防治措施的制定提供可靠的科学理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

甲状腺乳头状癌细胞KTC-1（中国科学院上海细胞库），细胞解冻后复苏，培养于10 cm细胞培养皿，37℃，5% CO_2，每3 d更换一次培养基。

1.2 主要试剂与仪器

BPA（纯度≥99.0%；Sigma，美国），二甲基亚砜（dimethyl sulfoxide，DMSO）（分析纯；MP Biomedical，美国），细胞增殖实验（cell counting kit-8，CCK-8）试剂盒、二喹啉甲酸蛋白浓度测定试剂盒、细胞周期与细胞凋亡检测试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，中国），甘油醛-3-磷酸脱氢酶抗体（glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）（Cmctag，美国），细胞周期蛋白（Cyclin）D1抗体（Abcam，英国），细胞周期蛋白依赖激酶抑制剂（P21）抗体（CST，美国），1640培养基、胎牛血清（Thermo Fisher Scientific，美国），细胞培养箱（Thermo Forma，美国），倒置相差显微镜（尼康，日本），蛋白垂直电泳仪、印迹转膜仪和

凝胶成像系统（Bio-Rad，美国），流式细胞仪（Accuri C6 Flow Cyto；BD，美国）。

1.3 KTC-1细胞培养及CCK-8细胞增殖活性测定

KTC-1细胞培养在含10%胎牛血清、1%双抗（青链霉素混合液）的1640培养基中，培养环境为37℃、5% CO_2培养箱。细胞隔天换液，待生长至80%时用0.25%胰蛋白酶消化，1∶3传代，取对数生长期细胞用于实验。BPA用DMSO配制成0.5 mol·L^{-1}的母液，1640培养基稀释后使用。

处于对数生长期的KTC-1细胞经胰酶消化后接种于96孔板，每孔细胞数量为5×10^{3}个，12 h后磷酸盐缓冲溶液（phosphate buffer saline，PBS）清洗，并加入1640培养液饥饿12 h。本研究预实验结果表明，高浓度BPA作用于甲状腺肿瘤细胞时有抑制作用，低浓度BPA显示增殖作用。为观察不同浓度的BPA对甲状腺乳头状癌细胞产生的影响，本研究采用终浓度5×10^{-3}、5×10^{-4}、5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1}的BPA处理细胞，对照组细胞则加入0.01% DMSO溶液，每组设5个复孔，继续培养细胞24、48、72 h，倒置显微镜下观察细胞形态，各组染毒结束后每孔加入10 μL CCK-8试剂，1 h后置于酶标仪（λ=450 nm）检测光密度（D）值，观察药物对细胞增殖的影响。细胞增殖率=（$D_{染毒}-D_{背景}$）/（$D_{对照}-D_{背景}$）×100%。

1.4 KTC-1细胞增殖周期的测定

处于对数生长期的KTC-1细胞经胰酶消化后接种于6孔板，每孔细胞数量为1×10^{6}个，饥饿12 h后每孔分别给予终浓度为5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1}的BPA刺激，每组设3个复孔，24 h后收集细胞，用4℃预冷的75%乙醇固定过夜，PBS清洗，分别加入核糖核酸酶、碘化丙啶染料后于流式细胞仪上用DNA定量法测定细胞周期，观察经BPA刺激后KTC-1细胞分别在DNA合成前期（G0/G1期）、DNA合成期（S期）和DNA合成后期（G2/M期）所占的构成比，并计算细胞增殖指数（proliferation index，*PI*）。*PI*为S期和G2/M期细胞构成比之和。

1.5 Western blotting检测各组细胞Cyclin D1及P21蛋白表达

处于对数生长期的KTC-1细胞经胰酶消化后接种于10 cm细胞培养皿，每皿细胞数量为1×10^{7}个，饥饿12 h后每孔分别给予终浓度为5×10^{-5}、5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1}的BPA刺激，每组设3个复皿，24 h后收集细胞，加入蛋白裂解液裂解细胞，提取总蛋白，并测定蛋白浓度。各组取30 μg蛋白于10%聚丙烯酰胺凝胶电泳中分离蛋白，转膜，封闭，含吐温-20的磷酸盐缓冲液（PBST）洗膜3次后分别加入小鼠抗人GAPDH单克隆抗体（1∶5 000）、兔抗人Cyclin D1单克隆抗体（1∶2 000）、兔抗人P21单克隆抗体（1∶1 000），4℃孵育过夜，洗膜后加入辣根过氧化物标记的山羊抗鼠或抗兔IgG（1∶1 000），室温孵育1 h。化学发光试剂盒化学发光显色。蛋白相对含量以目标蛋白条带灰度值/内参蛋白条带灰度值表示。

1.6 统计学分析

每组实验独立重复3次或以上。所有实验数据使用Graphpad prism 5.0软件进行统计分析，数据以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用方差齐性检验和单因素方差分析；进一步进行组间两两比较时，采用SNK检验。检验水准α=0.05。

2 结果

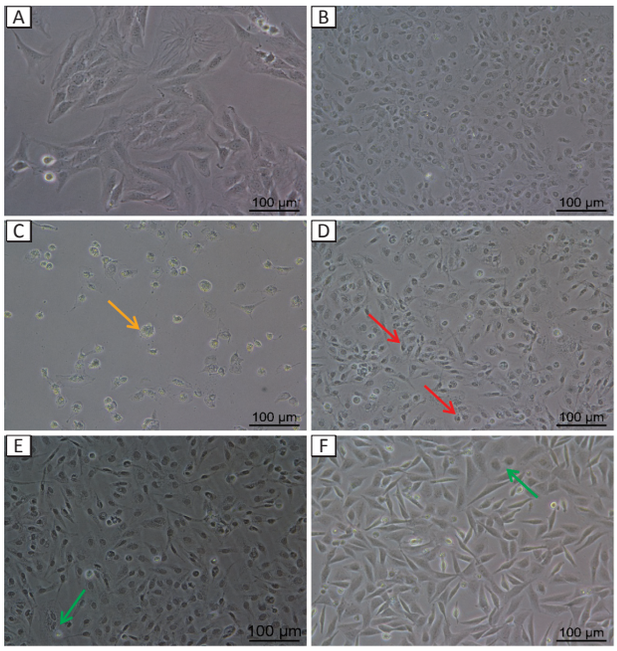
2.1 细胞形态学

倒置显微镜下可观察到正常KTC-1细胞形态均一、呈梭形，边界清晰，集落样贴壁生长（图1A）。对照组细胞与正常细胞相比较，未见到明显异常（图1B）。不同浓度BPA处理细胞后各组间细胞形态有较大差异（如图1C~F）：5×10^{-3} mol·L^{-1} BPA处理KTC-1细胞后，观察到明显的细胞毒性作用，细胞萎缩变圆效应明显，并且随着浓度梯度增大，细胞趋于离散，细胞之间连接变弱，出现细胞空泡颗粒越来越多（图1C及黄色箭头所示），培养液中出现大量漂浮的死亡细胞碎片；5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA处理组中的细胞形态较正常细胞小，胞内黑色颗粒物增多（图1D及红色箭头所示）；当KTC-1细胞暴露于5×10^{-7}、5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA中，虽然培养液中见到少量漂浮的死亡细胞，但细胞大小均一、呈梭形，贴壁生长且边界清晰，高倍镜下可见到明显的细胞核，核膜完整，胞质中细胞器完整，同时可观察到明显的细胞分裂现象（图1E、F及绿色箭头所示）。

2.2 细胞增殖活性

如图2所示，不同浓度的BPA处理KTC-1细胞24、48、72 h后，与对照组相比，5×10^{-3}、5×10^{-4}、5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA诱导细胞不同时间（24、48、72 h）的细胞增殖率明显降低（$P<0.05$），此结果和倒置显微镜下观察到的细胞形态表现一致；5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA诱导细胞48 h的细胞增殖率较对照组明显升高

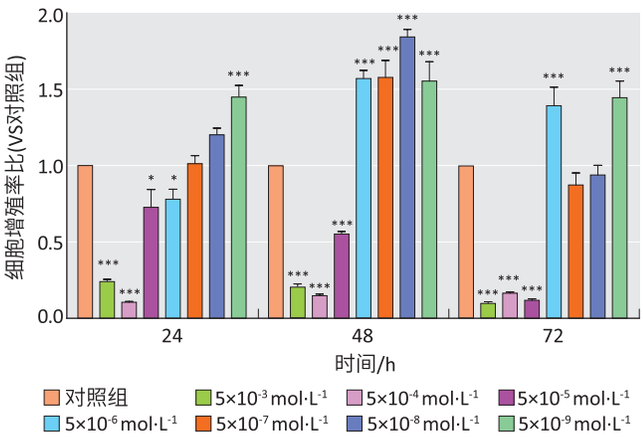
（$P<0.001$），其中 5×10^{-8} mol·L^{-1} BPA 促进作用最为明显。5×10^{-6} mol·L^{-1} BPA 随着染毒时间的增加细胞增殖率变化有所不同，处理 24 h 后，较对照组下降（$P<0.05$），而在处理 48、72 h 后明显升高（$P<0.001$）。



［注］A：正常 KTC-1 细胞；B：对照组细胞；C：5×10^{-3} mol·L^{-1} BPA 处理组细胞；D：5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA 处理组细胞；E：5×10^{-7} mol·L^{-1} BPA 处理组细胞；F：5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA 处理组细胞。黄色箭头为出现空泡颗粒的细胞；红色箭头为黑色颗粒物增多的细胞；绿色箭头为处于分裂期细胞。

图 1　不同浓度 BPA 染毒 24 h 后 KTC-1 细胞的形态变化

Figure 1　Morphological changes of KTC-1 cells exposed to different concentrations of BPA for 24 h



［注］与对照组相比，*：$P<0.05$；***：$P<0.001$。

图 2　不同浓度 BPA 染毒 24、48、72 h 后 KTC-1 细胞增殖活性的变化

Figure 2　Changes of the proliferation of KTC-1 cells exposed to different concentrations of BPA for 24, 48, and 72 h

2.3　细胞周期

流式细胞技术检测不同浓度的 BPA 处理 KTC-1 细胞 24 h 后的细胞周期，结果显示：与对照组相比，5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA 处理组细胞 *PI* 值为 1.01%，呈现 G0/G1 期细胞构成增加而 S 期、G2/M 期细胞构成减少的趋势，但差异无统计学意义；其余处理组（5×10^{-6}、5×10^{-7}、5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L-1）细胞 *PI* 分别为 10.39%、8.21%、6.74%、6.24%，与对照组相比虽均有上升趋势，但差异也未见统计学意义；而其中 5×10^{-6} mol·L^{-1} BPA 处理组 KTC-1 细胞进入 S 期的细胞构成比（4.38%±0.93%）高于对照组（1.32%±0.26%），差异有统计学意义（$P<0.05$）（表 1）。

表 1　不同浓度 BPA 染毒 24 h 后 KTC-1 细胞增殖周期的构成变化（$\bar{x}$±s，n=3）

Table 1　Changes of the cell cycle of KTC-1 cells exposed to different concentrations of BPA for 24 h（$\bar{x}$±s, n=3）

BPA 浓度 /（mol·L^{-1}）	各期细胞构成比 /%			*PI*/%
	G0/G1 期	S 期	G2-M 期	
0（对照）	96.79±0.98	1.32±0.26	1.89±0.92	3.21
5×10^{-5}	98.99±0.63	0.9±0.67	0.11±0.09	1.01
5×10^{-6}	89.62±2.92	4.38±0.93*	6.01±3.21	10.39
5×10^{-7}	91.79±4.32	2.99±1.22	5.22±3.7	8.21
5×10^{-8}	93.27±2.06	2.02±1.08	4.72±1.93	6.74
5×10^{-9}	93.76±2.65	1.59±0.61	4.65±3.03	6.24

［注］*：与对照组相比，$P<0.05$。

2.4　细胞周期相关蛋白

Western blotting 检测结果显示（如图 3）：与对照组相比，5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA 浓度组 P21 蛋白表达水平明显升高（$P<0.001$），其余 BPA 浓度组 P21 蛋白表达量呈逐渐下降趋势，其中 5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1} 处理组差异有统计学意义（$P<0.001$）（如图 4A）；5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA 浓度组 Cyclin D1 蛋白表达水平明显低于对照组，而 5×10^{-8}、5×10^{-9} mol·L^{-1} 处理组高于对照组，差异均有统计学意义（$P<0.05$）（如图 4B）。

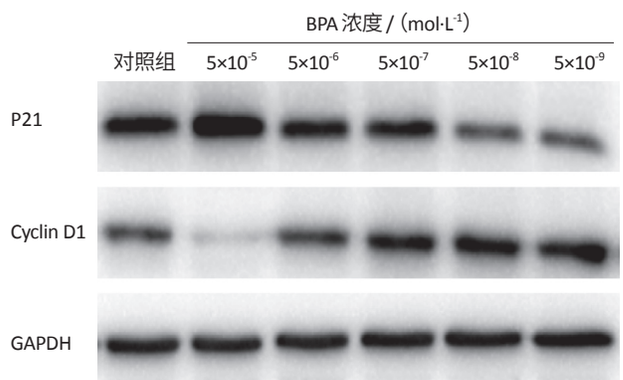
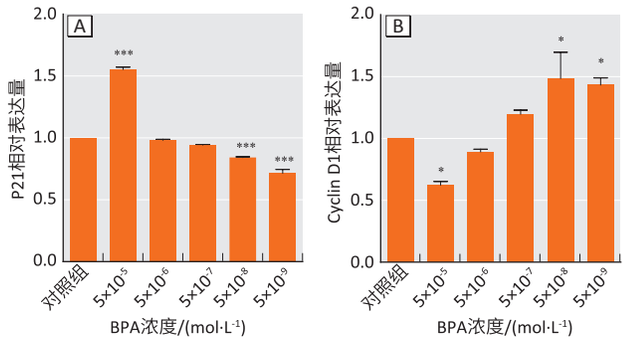


图 3　不同浓度 BPA 染毒 24 h 后 KTC-1 细胞的 Cyclin D1 及 P21 蛋白表达水平的变化

Figure 3　Changes of cyclin D1 and P21 protein expressions of KTC-1 cells exposed to different concentrations of BPA for 24 h



[注] 与对照组相比，*：$P<0.05$；***：$P<0.001$。

图4 不同浓度BPA染毒24 h后KTC-1细胞的P21（A）及Cyclin D1（B）蛋白相对表达水平的变化

Figure 4 Changes of the relative expression levels of P21 (A) and Cyclin D1 (B) in KTC-1 cells exposed to different concentrations of BPA for 24 h

3 讨论

近年来甲状腺乳头状癌发病率持续上升，环境因素可能在致病过程中有一定影响[14]。有文献报道雌激素会促进甲状腺乳头状癌细胞的增殖[15]，其中环境雌激素BPA广泛存在于环境中，具有接触剂量小但暴露时间长，且易通过多种途径进入人体的特点[16]。已有动物实验表明，过量碘和BPA两者共同作用可能促进大鼠甲状腺肿瘤的发生[17]。但目前有关BPA对人甲状腺细胞生长影响的研究较少[18-20]，且其分子生物学机制有待进一步研究。故本次研究我们采用人甲状腺乳头状癌细胞KTC-1，该细胞株源于人体，可以减少从动物源细胞株或动物实验的实验结果向人外推的不确定性。同时，采用体外细胞模型可以测试更广泛的剂量水平，能更好地了解BPA从低剂量到高剂量暴露下对人体健康的影响，并能进一步研究毒性机制。

有学者发现BPA具有一定的毒物兴奋效应，即低浓度表现出刺激作用，而高浓度表现出抑制作用，此效应经常在具有雌激素效应的环境内分泌干扰物中表现[21]，这和我们的研究结果一致。CCK-8增殖实验结果显示将甲状腺乳头状癌细胞KTC-1直接暴露于不同浓度的BPA中，BPA会干扰KTC-1细胞的增殖。当BPA浓度大于5×10^{-5} mol·L^{-1}有抑制细胞增殖的作用，具有细胞毒性，这可能和BPA具有生物毒性和内分泌干扰作用双重性质有关；当细胞暴露于5×10^{-3}~5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA中可能超过了内分泌干扰作用的最大剂量范围，达到生物毒性的阈值，导致细胞凋亡。已有学者发现BPA可抑制乳腺癌细胞株MCF-7和雌激素受体阳性卵巢癌细胞株PEO4凋亡，从而促进增殖[22]。本次实验中当BPA浓度小于5×10^{-6} mol·L^{-1}时，显示BPA诱导细胞增殖，在5×10^{-8} mol·L^{-1} BPA剂量组干预48 h后KTC-1细胞达到最大增殖效应，而5×10^{-8} mol·L^{-1}恰是人体暴露的环境浓度之一。当BPA处理KTC-1细胞72 h后，5×10^{-7} mol·L^{-1}和5×10^{-8} mol·L^{-1}细胞增殖率反而下降，推测这可能与细胞大量增殖后细胞间进行营养竞争等导致细胞凋亡有一定关系。CCK-8实验结果和国内学者马林等[23]的最新研究相符，即BPA所产生的毒作用效果并不一定遵从传统的剂量-反应关系，而会出现一种非单调性剂量-反应关系的现象。

细胞周期失控是肿瘤发生发展的一个重要环节。本次流式细胞学实验通过用标记双链DNA的荧光染料碘化丙啶检测细胞周期，结果提示5×10^{-6}~5×10^{-9} mol·L^{-1} BPA可通过促进细胞从G0/G1期进展到S期，诱导KTC-1细胞增殖；同时5×10^{-5} mol·L^{-1} BPA可将甲状腺乳头状癌细胞KTC-1细胞周期阻滞在G0/G1期，影响细胞的存活与生长。

参与细胞周期调控的因子包括Cyclin、细胞周期蛋白依赖激酶（Cyclin-dependent kinase，CDK）、磷酸化酶及细胞周期蛋白依赖激酶抑制蛋白（Cyclin-dependent kinase inhibitor，CKI）。其中，Cyclin D1通过与CDK4或CDK6形成复合物而发挥作用。Lin等[24]认为Cyclin D1基因扩增或表达增强，与癌的分化程度、转移及预后密切相关；同时CKI家族中的p21蛋白能抑制CyclinD1-CDK4和CyclinE-CDK2的活性，使视网膜母细胞瘤基因蛋白不能发生磷酸化，阻止转录因子释放，从而使细胞周期停滞在G0/G1期[25]。近年来研究显示雌激素可调控细胞周期蛋白Cyclin D1的表达，介导细胞增殖[26]。而雌激素拮抗剂可下调表达Cyclin D1，降低复合物Cyclin D1/CDK4的活性，并上调抑制因子P21和P27的表达，从而阻滞细胞通过检查点进入细胞增殖状态[27-28]。我们的Western blotting结果显示，5×10^{-5} mol·L^{-1}实验组Cyclin D1蛋白表达水平低于对照组，但P21蛋白表达水平高于对照组。而5×10^{-7}~5×10^{-9} mol·L^{-1}实验组Cyclin D1蛋白表达水平高于对照组，P21蛋白表达水平低于对照组。由此进一步表明低浓度BPA可下调细胞周期负性调节因子P21的表达，同时上调增殖启动基因细胞周期蛋白的表达等，这和Dairkee等[29]的研究结果一致。结合上述细胞增殖和流式细胞实验结果，提示在甲状腺乳头状癌细胞KTC-1中，外源性BPA可增强或减弱P21蛋白表达水平，进而调节Cyclin D1的表达水平从而使细胞增殖或者凋亡。

本研究将BPA、Cyclin D1、P21与甲状腺乳头状

癌细胞KTC-1增殖相联系，通过CCK-8、流式细胞术和Western blotting实验，证实了外源性BPA可通过调节细胞周期蛋白Cyclin D1和P21的表达水平，从而促进甲状腺乳头状癌细胞KTC-1的增殖或凋亡。这提示BPA可能是甲状腺肿瘤发生发展的外源性因素之一，随着BPA环境污染的日趋严重，它对包括甲状腺肿瘤在内的雌激素依赖性肿瘤的影响不容忽视。本研究通过BPA染毒的KTC-1细胞模型了解甲状腺乳头状癌细胞在染毒后的改变情况，为理解BPA对肿瘤影响的分子机制提供了一定的帮助，并为深入了解BPA的分子毒理提供了依据。已有研究显示BPA可能通过与细胞内雌激素受体[30]或磷脂酰肌醇3-激酶/丝-苏氨酸蛋白激酶[31]等其他信号通路结合，促进肿瘤细胞的增殖，未来可通过进一步实验证实不同浓度BPA的干扰机制及信号通路。

参考文献

[1] LEE HS，PARK EJ，OH JH，et al. Bisphenol a exerts estrogenic effects by modulating CDK1/2 and p38 MAP kinase activity [J]. Biosci Biotechnol Biochem，2014，78 (8)：1371-1375.

[2] REZG R，EL-FAZAA S，GHARBI N，MORNAGUI B，et al. Bisphenol a and human chronic diseases：current evidences，possible mechanisms，and future perspectives [J]. Environ Int，2014，64：83-90.

[3] 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.

[4] JEONG JS，NAM KT，LEE B，et al. Low-dose Bisphenol a increases bile duct proliferation in juvenile rats：a possible evidence for risk of liver cancer in the exposed population? [J]. Biomol Ther，2017，25 (5)：545-552.

[5] DEB P，BHAN A，HUSSAIN I，et al. Endocrine disrupting chemical，bisphenol-A，induces breast cancer associated gene HOXB9 expression *in vitro* and *in vivo* [J]. Gene，2016，590 (2)：234-243.

[6] HAYES L，WEENING A，MOREY LM. Differential effects of estradiol and Bisphenol A on SET8 and SIRT1 expression in ovarian cancer cells [J]. Dose Response，2016，14 (2)：1559325816640682.

[7] KITAHARA CM，SOSA JA. The changing incidence of thyroid cancer [J]. Nat Rev Endocrinol，2016，12 (11)：646-653.

[8] DELELLIS R，LLOYD RV，HEITZ P，et al. World Health Organization classification of tumours：Pathology & genetics of tumours of endocrine organs [M]. Lyon：World Health Organization，2004：52-55.

[9] HAUGEN BR，ALEXANDER EK，BIBLE KC，et al. 2015 American thyroid association management guidelines for adult patients with thyroid nodules and differentiated thyroid cancer：the American thyroid association guidelines task force on thyroid nodules and differentiated thyroid cancer [J]. Thyroid，2016，26 (1)：1-133.

[10] ZHOU Z，ZHANG J，JIANG F，et al. Higher urinary bisphenol A concentration and excessive iodine intake are associated with nodular goiter and papillary thyroid carcinoma [J]. Biosci Rep，2017，37 (4)：BSR20170678.

[11] 李亚男，蒋玲，胡秀慧，等. 碘酸钾和双酚A对甲状腺乳头状癌细胞增殖的影响 [J]. 山东大学学报（医学版），2013，51 (3)：52-57.

[12] BILANCIO A，BONTEMPO P，DI DONATO M，et al. Bisphenol A induces cell cycle arrest in primary and prostate cancer cells through EGFR/ERK/p53 signaling pathway activation [J]. Oncotarget，2017，8 (70)：115620-115631.

[13] PFEIFER D，CHUNG YM，HU MC. Effects of low-dose Bisphenol A on DNA damage and proliferation of breast cells：the role of c-Myc [J]. Environ Health Perspect，2015，123 (12)：1271-1279.

[14] SIEGEL RL，MILLER KD，JEMAL A. Cancer statistics，2015 [J]. CA Cancer J Clin，2015，65 (1)：5-29.

[15] RAJORIA S，SURIANO R，SHANMUGAM A，et al. Metastatic phenotype is regulated by estrogen in thyroid cells [J]. Thyroid，2010，20 (1)：33-41.

[16] 包汇慧，毛伟峰，雍凌，等. 双酚A对Caco-2细胞的细胞毒性及氧化应激研究 [J]. 毒理学杂志，2016，30 (2)：96-101.

[17] ZHANG J，ZHANG X，LI Y，et al. Low dose of Bisphenol A enhance the susceptibility of thyroid carcinoma stimulated by DHPN and iodine excess in F344 rats [J]. Oncotarget，2017，8 (41)：69874-69887.

[18] SHENG ZG，TANG Y，LIU YX，et al. Low concentrations of bisphenol a suppress thyroid hormone receptor transcription through a nongenomic mechanism [J]. Toxicol Appl Pharmacol，2012，259 (1)：133-142.

[19] KANEKO M，OKADA R，YAMAMOTO K，et al. Bisphenol A

acts differently from and independently of thyroid hormone in suppressing thyrotropin release from the bullfrog pituitary [J]. Gen Comp Endocrinol，2008，155 (3)：574-580.

[20] PORRECA I，ULLOA S L，D'ANGELO F，et al. "Stockpile" of slight transcriptomic changes determines the indirect genotoxicity of low-dose BPA in thyroid cells [J]. PLoS One，2016，11 (3)：e0151618.

[21] 曾妮，王霞，郑洁，等. 双酚A干扰人卵巢颗粒细胞雌二醇生成的机制 [J]. 武汉大学学报（医学版），2016，37 (5)：725-729.

[22] NAVARRO M，BASERGA R. Limited redundancy of survival signals from the type 1 insulin-like growth factor receptor [J]. Endocrinology，2001，142 (3)：1073-1081.

[23] 马林，李丹，李昀谦，等. 双酚A对小鼠睾丸间质细胞毒性及 *miR-203-3p* 表达的影响 [J]. 环境与职业医学，2019，36 (5)：484-489.

[24] LIN Y C，WU M Y，LI D R，et al. Prognostic and clinicopathological features of E-cadherin，α-catenin，β-catenin，γ-catenin and cyclin D_1 expression in human esophageal squamous cell carcinoma [J]. World J Gastroenterol，2004，10 (22)：3235-3239.

[25] GARTEL A L，RADHAKRISHNAN S K. Lost in transcription：p21 repression，mechanisms，and consequences [J]. Cancer Res，2005，65 (10)：3980-3985.

[26] SICINSKI P，DONAHER J L，PARKER S B，et al. Cyclin D1 provides a link between development and oncogenesis in the retina and breast [J]. Cell，1995，82 (4)：621-630.

[27] MUSGROVE E A，HAMILTON J A，LEE C S，et al. Growth factor，steroid，and steroid antagonist regulation of cyclin gene expression associated with changes in T-47D human breast cancer cell cycle progression [J]. Mol Cell Biol，1993，13 (6)：3577-3587.

[28] WATTS C K，BRADY A，SARCEVIC B，et al. Antiestrogen inhibition of cell cycle progression in breast cancer cells in associated with inhibition of cyclin-dependent kinase activity and decreased retinoblastoma protein phosphorylation [J]. Mol Endocrinol，1995，9 (12)：1804-1813.

[29] DAIRKEE S H，LUCIANI-TORRES M G，MOORE D H，et al. Bisphenol-A-induced inactivation of the p53 axis underlying deregulation of proliferation kinetics，and cell death in non-malignant human breast epithelial cells [J]. Carcinogenesis，2013，34 (3)：703-712.

[30] WANG T，LIU B，GUAN Y，et al. Melatonin inhibits the proliferation of breast cancer cells induced by bisphenol A via targeting estrogen receptor-related pathways [J]. Thorac Cancer，2018，9 (3)：368-375.

[31] 刘大江，杨媛，刘畅，等. 双酚A激活PI3K/AKT通路促进子宫内膜癌细胞增殖的研究 [J]. 国际妇产科学杂志，2019，46 (3)：259-262.

（英文编辑：汪源；责任编辑：丁瑾瑜）

（上接第705页）

蒙古医科大学学报，2018，40 (6)：614-617.

[28] LAN T，ZOU Y，HAMBLIN M R，et al. 5-Aminolevulinic acid photodynamic therapy in refractory vulvar lichen sclerosus et atrophicus：series of ten cases [J]. Photodiagnosis Photodyn Ther，2018，21：234-238.

[29] OSAKI T，UTO Y，ISHIZUKA M，et al. Artesunate enhances the cytotoxicity of 5-aminolevulinic acid-based sonodynamic therapy against mouse mammary tumor cells *in vitro* [J]. Molecules，2017，22 (4)：533.

[30] UCHIDA A，KIDOKORO K，SOGAWA Y，et al. 5-Aminolevulinic acid exerts renoprotective effect via Nrf2 activation in murine rhabdomyolysis-induced acute kidney injury [J]. Nephrology，2019，24 (1)：28-38.

[31] LIU C，FUJINO M，ZHU S，et al. 5-ALA/SFC enhances HO-1 expression through the MAPK/Nrf2 antioxidant pathway and attenuates murine tubular epithelial cell apoptosis [J]. FEBS Open Bio，2019，9 (11)：1928-1938.

[32] HUA H，CHENG J，BU W，et al. 5-aminolevulinic acid-based photodynamic therapy pretreatment mitigates ultraviolet A-induced oxidative photodamage [J]. Oxid Med Cell Longev，2018，2018：9420745.

（英文编辑：汪源；责任编辑：陈姣）