

E2 弱化双酚 A 雌激素活性机制

张光明^{1,2}, 郎 朗^{1,3}, 李 钰⁴, 马 军¹

(1. 哈尔滨工业大学 市政环境工程学院, 150090 哈尔滨; 2. 中国人民大学 环境学院, 100872 北京;
3. 哈尔滨商业大学 生命与环境科学研究中心, 150028 哈尔滨; 4. 哈尔滨工业大学 理学院, 150001 哈尔滨)

摘 要: 前期研究发现天然雌激素 E2 可以弱化一种常见雌激素类污染物双酚 A 的活性, 为探讨这一现象的机制, 利用人体乳腺癌细胞 MCF-7, 从细胞周期、雌激素受体途径、MAPKs 信号途径进行实验. 结果表明: E2 可诱导 DNA 合成期细胞显著增高, 抑制受体蛋白表达, 提高 ERK 蛋白的表达, 进而激活多种转录因子; 双酚 A 显著抑制受体蛋白表达, 对 MAPKs 信号通路基本没有影响, 可同时提高 DNA 分裂期与间歇期细胞比例; 两者联合后活化了受体途径和 ERK 途径, 促进 C-fos 的转录表达, 激活 cyclin D1 蛋白, 增加 S 期及 G₂ 期细胞比例. E2 弱化双酚 A 的可能机制为 C-myc 蛋白表达下降.

关键词: 雌二醇; 双酚 A; 雌激素活性; C-myc 蛋白表达; 细胞周期

中图分类号: X703.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 0367-6234(2012)04-0028-04

Mechanisms of E2 weakening effects on BPA's estrogenicity

ZHANG Guang-ming^{1,2}, LANG Lang^{1,3}, LI Yu⁴, MA Jun¹

(1. School of Municipal and Environmental Engineering, Harbin Institute of Technology, 150090 Harbin, China;

2. School of Environment and Natural Resources, Renmin Univeristy of China, 100872 Beijing, China;

3. Research Center on Life Sciences and Environmental Sciences, Harbin University of Commerce, 150028 Harbin, China;

4. School of Science, Harbin Institute of Technology, 150001 Harbin, China)

Abstract: Previous study showed that natural estrin, 17-Estradiol (E2), could weaken the estrogenicity of Bisphenol A (BPA), a common estrin in water resources. In order to learn the potential mechanisms, experiments were performed with human breast cancer cell MCF-7 on the cell cycle, estrogen receptor pathway and MAPKs pathway. Results showed that E2 worked through estrogen receptors and ERK pathway, and activated C-myc gene, C-fos gene, and cyclin D1 protein, and thus increased the S section of the cell cycle. BPA worked mainly through estrogen receptors by activating cyclin D1 protein, and increased the S and G₂ sections of the cell cycle. The mixture of BPA and E2 worked through both pathways, activated both C-fos and cyclin D1, and increased both S and G₂ sections of the cell cycle. The main mechanism of E2's weakening on BPA's estrogenicity might be the decreased expression of C-myc protein.

Key words: 17-Estradiol; BPA; estrogenicity; C-myc protein expression; cell cycle

内分泌干扰物(EDCs)可致人体内分泌失调, 引发多种疾病, 还会对后代带来不良影响. 双酚 A 是典型的雌激素类 EDCs, 可严重干扰内分泌系统, 威胁着胎儿和儿童的健康. 欧盟认为双酚 A

会诱发性早熟, 从 2011 年 3 月 2 日起, 禁止生产含双酚 A 的婴儿奶瓶. 在我国北京、上海、深圳、杭州等大中城市饮用水水源中均发现了一定浓度的双酚 A^[1], 其雌激素活性的有效控制引起广泛关注. 雌二醇(E2)是人体天然雌激素的代表物质. 前期研究发现 E2 与双酚 A 共存时可以弱化双酚 A 的雌激素活性^[2]. 这一现象对于控制双酚 A 对人体尤其是女性的毒害作用具有重要意义. 本文将深入研究这一现象发生的可能机制.

收稿日期: 2011-03-25.

基金项目: 国家高技术研究发展计划项目(2007AA06Z339); 水体污染控制与治理科技重大专项课题(2009ZX07424-005).

作者简介: 张光明(1973—), 女, 教授, 博士生导师;

李 钰(1965—), 女, 教授, 博士生导师;

马 军(1963—), 男, 博士生导师, 长江学者特聘教授.

通讯作者: 张光明, zgmm200@126.com.

1 实 验

所用乳腺癌 MCF-7 细胞为实验室自行培养. 双酚 A、E2、苯甲基磺酰氟(PMSF)、抑肽酶 A、亮抑肽酶、色胺酸等购自美国 Sigma 公司. 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、四甲基乙二胺(TEMED)购自美国 Ameresco 公司. 其他材料为国产分析纯试剂. 实验中双酚 A、E2 浓度分别为 10^{-8} 、 10^{-12} mol/L. 所用主要设备包括 GeneAmp® PCR System 9700(Applied Biosystems 公司)、DYY-6B 电泳仪(北京市六一仪器厂)、蛋白质电泳及 Western 杂交转膜系统(Bio-Rad)、LSM Meta510 激光共聚焦仪(Zeiss 公司)、IGO 150 二氧化碳培养箱(Thermo 公司).

采用流式细胞仪法测定细胞周期的变化^[3]. 细胞增殖指数 $I_p = (n_s + n_{G_2}) / (n_{G_1} + n_s + n_{G_2}) \times 100\%$, n_s 为 DNA 合成期细胞数; n_{G_1} 为第 1 间隙期细胞数; n_{G_2} 为第 2 间隙期细胞数.

采用 WESTERN BLOT 法测定乳腺癌 MCF-7 细胞内雌激素受体 α 蛋白,以及丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号转导通路相关蛋白. 该方法可检测到低至 10~100 pg 的环境雌激素的干扰效应^[4]. 蛋白样品制备、SDS-PAGE 电泳、Lowry 法测定蛋白含量、免疫反应、化学发光、显影、定影等均参照分子生物学蛋白检测方法^[5]. 以 β -Tubulin 蛋白作为内参照,对目的蛋白表达量进行校正.

采用 RT-PCR 法测定 EDCs 干扰效应相关的转录因子 C-fos、C-jun. 步骤如下:细胞培养、RNA 抽提、分离、沉淀、洗脱、再溶解、定量、逆转录(RT)、聚合酶链式反应、电泳鉴定^[5].

2 结果与讨论

2.1 对细胞周期的影响

细胞分裂复制的过程称为细胞周期. 整个细胞周期被划分为 $G_1 \rightarrow S \rightarrow G_2 \rightarrow M \rightarrow G_1$, 其中最具特征性的阶段是 S 期(DNA 合成期),经过短暂间隙(G_2),进入有丝分裂期(M 期),再经过短暂间隙(G_1),开始下一个周期. 一旦调控系统发生故障,细胞就会过度增殖导致癌症^[6].

从表 1 可以看出,E2、双酚 A 及混合物均可改变 MCF-7 细胞周期,提高增殖指数 I_p . E2 使 S 期细胞比例由 25.1% 增加到 34.2%,提高了 9.1%,由于细胞在 S 期发生 DNA 合成,S 期比例提高说明 DNA 合成增加. 双酚 A 也可提高 S 期细胞比例,但效果较 E2 弱. 而二者混合后,S 期细胞提高比例进一步降低. 此外,双酚 A 还可诱导 G_2 期细胞比例增加 5.4%,而 E2 则降低了 G_2 期细胞比例 1.3%. 上述差

异表明,E2 与双酚 A 对 MCF-7 细胞的增殖机制不同.

表 1 E2 与双酚 A 联合作用于 MCF-7 细胞的周期变化 %

样品	G_1	S	G_2	I_p
对照样	69.6	25.1	5.4	30.4
E2	61.7	34.2	4.1	38.3
双酚 A	57.3	32.1	10.7	42.7
混合物	60.3	31.9	7.8	39.7

2.2 蛋白表达

蛋白表达如图 1 所示. 显然,空白组 ER α 蛋白表达良好,ERK 系列蛋白表达较低,JNK 系列蛋白与 p38 表达极弱,C-myc 几乎不表达. 各实验组的蛋白表达详细分析见下文.

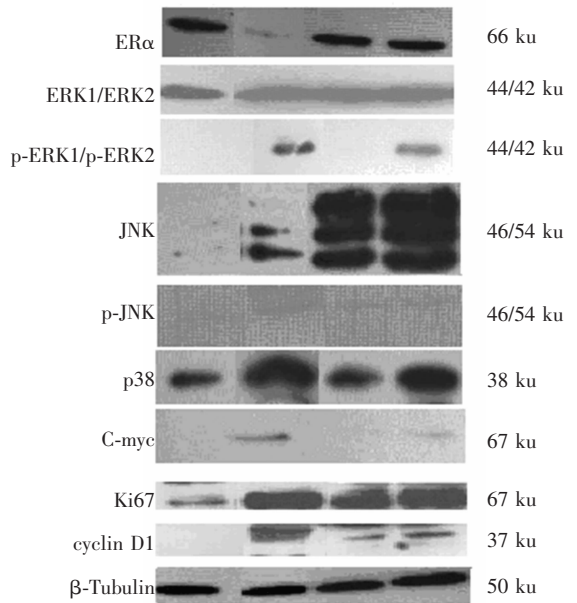


图 1 E2 与双酚 A 联合对 MCF-7 细胞内蛋白表达的影响

2.3 雌激素受体蛋白表达

EDCs 干扰内分泌系统的传统途径是与雌激素受体(ER)结合,从而使天然雌激素不能有效结合 ER. 在 MCF-7 细胞中最重要的 ER 是 ER α 蛋白^[7],因此,EDCs 发挥雌激素活性主要是与 ER α 蛋白结合,使其不能正常表达,这是雌激素作用的经典路径^[8]. 图 2 所示为 E2、双酚 A、混合物对 ER α 蛋白的影响,E2 对 ER α 蛋白的诱导能力最强、双酚 A 最弱、混合物介于二者之间. 图 2 表明,E2、双酚 A、混合物均可通过经典路径——雌激素受体途径发挥作用.

2.4 MAPK 信号转导通路研究

除了经典途径外,EDCs 起作用的另一个重要途径是干扰 MAPK 信号转导通路. MAPKs(丝裂原活化蛋白激酶)是重要的信号传递者^[9],其种类众多,最重要的有胞外信号调节蛋白激酶(ERK)、c-jun 氨基末端激酶(JNK)、p38 等^[10]. ERK1/2 信号通路是经典的 MAPK 信号转导途径. 活化的 ERK1/2 可磷酸化多种核转录因子,并诱导 C-fos 基因活化,增加 C-fos 蛋白合成^[11].

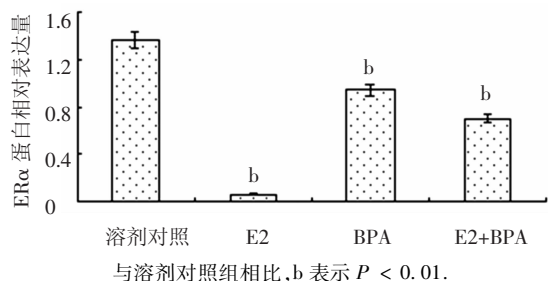


图2 E2与双酚A联合对MCF-7细胞ERα蛋白的影响

图3所示为E2、双酚A、混合物对MCF-7细胞内ERK蛋白表达的影响。E2显著提高了ERK蛋白的表达,双酚A基本没有影响,混合物效果略低于E2。图4所示为三者对活化后的ERK——p-ERK蛋白的影响。溶剂对照组p-ERK蛋白不表达,E2显著提高了p-ERK蛋白的表达量,而双酚A基本没有作用,混合物效果与E2相当^[12]。图3、4均表明,双酚A对ERK信号通路没有作用。

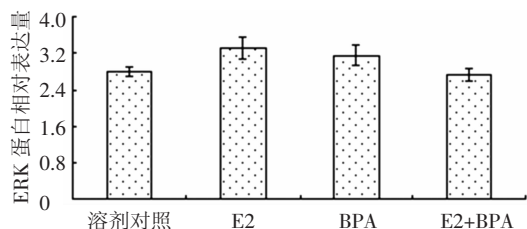


图3 E2与双酚A联合对MCF-7细胞ERK蛋白的影响

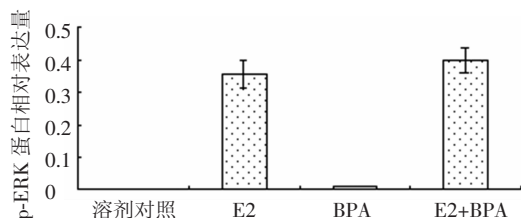


图4 E2与双酚A联合对MCF-7细胞p-ERK蛋白的影响

图5所示为E2、双酚A、混合物对另一个重要MAPKs——JNK信号通路的影响。溶剂对照组JNK蛋白基本不表达,E2对其有一定增强作用,双酚A使其大量表达,而混合物对JNK蛋白表达的促进明显高于E2或双酚A。但由图1可以看出,JNK蛋白的活化形式——p-JNK蛋白在各种条件下表达量都较低,表明E2及BPA虽然刺激了JNK蛋白表达,但最终不能提高其活性,JNK通路并非其作用途径。

p38丝裂原活化蛋白激酶是MAPKs家族中的一员,调控应激情况下的细胞增殖和凋亡^[13]。如图6所示,E2能够诱导p38蛋白的表达,而BPA使p38蛋白的表达量下降,两者混合后对p38的诱导介于两者之间。由于p-p38蛋白不表达,判断p38在E2、BPA及联合诱导增殖中不发挥作用。C-myc通过对靶基因的转录调节发挥其生物学效应^[14]。

如图7所示,溶剂组C-myc蛋白不表达,E2显著诱导其表达,双酚A对其没有影响,而混合物的诱导效应远远低于E2(0.092 vs. 0.017)。如此显著的降低表明,E2与双酚A混合后,雌激素效应降低的主要机制是C-myc蛋白表达受到了抑制。

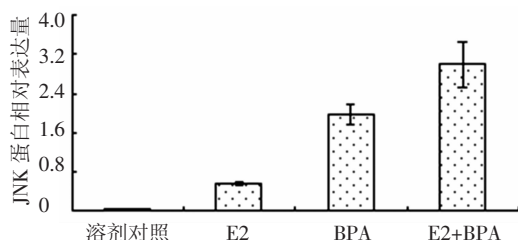


图5 E2与双酚A联合对MCF-7细胞JNK蛋白的影响

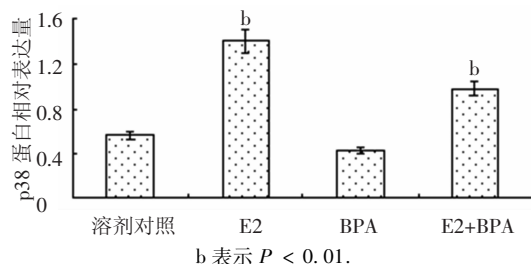


图6 E2与双酚A联合对MCF-7细胞p38蛋白的影响

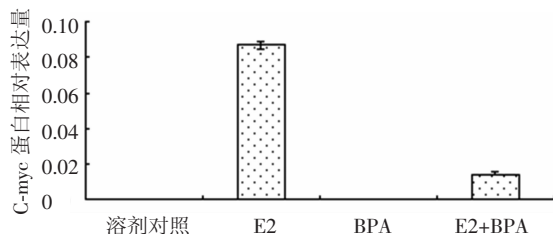


图7 E2与双酚A联合对MCF-7细胞C-myc蛋白的影响

如图8所示,E2能够诱导C-fos基因的表达,双酚A对C-fos基因基本没有影响,两者联合后作用介于两者之间。如图9所示,E2、双酚A、混合物均可减弱C-jun基因的表达,混合物效应略强,但差别不大。

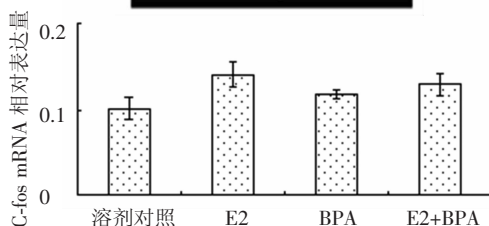
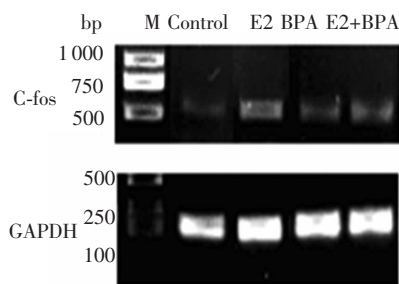


图8 E2与双酚A联合对MCF-7细胞C-fos基因的诱导

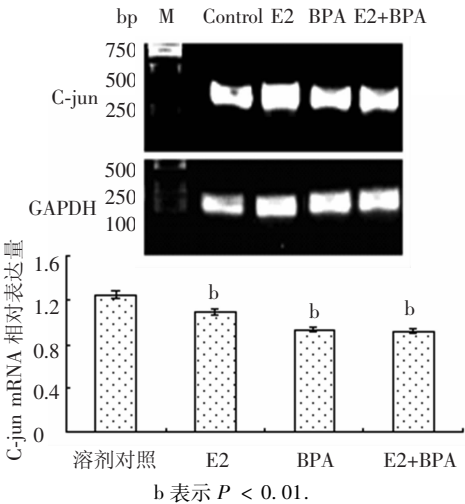


图 9 E2 与双酚 A 联合对 MCF-7 细胞 C-jun 基因的影响

如图 10、11 所示, E2、双酚 A、混合物均可诱导 Ki67 蛋白的表达且混合物表现出增强效应. E2 显著诱导 cyclin D1 蛋白表达, 双酚 A 较 E2 弱很多, 联合后 E2 使双酚 A 对 cyclin D1 蛋白的诱导增强.

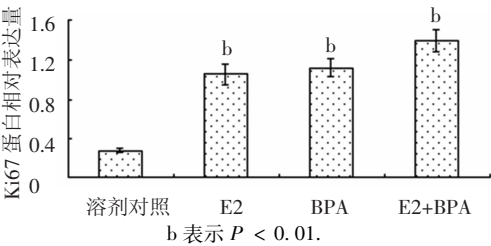


图 10 E2 与双酚 A 联合对 Ki67 蛋白的影响

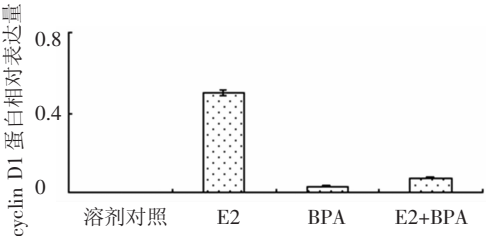


图 11 E2 与双酚 A 联合对 cyclin D1 蛋白的影响

3 结 论

1) E2、双酚 A、混合物都具有雌激素效应, 可以促进 MCF-7 细胞的增殖. E2 既可以通过经典途径 (雌激素受体) 起作用, 又可以通过非经典途径 (ERK 信号通路) 起作用.

2) E2 可以促进 C-myc 基因与 C-fos 基因表达、诱导增殖蛋白 Ki67 与 cyclin D1 蛋白表达, 增加 DNA 分裂期细胞比例, 促进细胞增殖. 而双酚 A 只通过雌激素受体途径起作用, 激活 cyclin D1 蛋白. 两者混合后, 可通过受体途径及 ERK 途径发挥作用, 促进 C-fos 基因的转录表达, 促进 Ki67 蛋白表达. 然而, C-myc 蛋白显著下降, 这可能是 E2 弱化双酚 A 雌激素效应的主要机制.

参考文献:

[1] 梁超, 邓慧萍. 水中内分泌干扰物质的研究现状及趋势[J]. 城市给排水, 2005, 19(3): 17-20.

[2] 郎朗. 水中典型环境雌激素共存对内分泌系统的影响及机制研究[D]. 哈尔滨: 哈尔滨工业大学市政环境工程学院, 2011: 23-27.

[3] VANPARYS C, MARAS M, LENJOU M, et al. Flow cytometric cell cycle analysis allows for rapid screening of estrogenicity in MCF-7 breast cancer cells [J]. Toxicol in Vitro, 2006, 20(7): 1238-1248.

[4] SADLER A J, PUGAZHENDHI D, DARBRE P D. Use of global gene expression patterns in mechanistic studies of oestrogen action in MCF7 human breast cancer cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2009, 114(1/2): 21-32.

[5] 刘志恒. 现代微生物学[M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[6] WESIERSKA-GADEK J, KRAMER M P, MAURER M. Resveratrol modulates roscovitine-mediated cell cycle arrest of human MCF-7 breast cancer cells [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(4): 1327-1333.

[7] SUKOCHEVA O A, YANG Y, GIERTHY J F. Estrogen and progesterone interactive effects in postconfluent MCF-7 cell culture [J]. Steroids, 2009, 74(4/5): 410-418.

[8] SOTOC A M, RATMAN D, SAAG van der P, et al. Phytoestrogen-mediated inhibition of proliferation of the human T47D breast cancer cells depends on the ERalpha/ERbeta ratio [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2008, 112(4/5): 171-178.

[9] WATT H L, KHARMATE G D, KUMAR U. Somatostatin receptors 1 and 5 heterodimerize with epidermal growth factor receptor: agonist-dependent modulation of the downstream MAPK signalling pathway in breast cancer cells [J]. Cell Signal, 2009, 21(3): 428-439.

[10] DAVIS R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases [J]. Cell, 2000, 103(1): 239-52.

[11] RAMOS J W. The regulation of extracellular signal-regulated kinase (ERK) in mammalian cells [J]. Int J Biochem Cell Biol, 2008, 40(12): 2707-2719.

[12] 郎朗, 张光明. E2 与 BPA 联合前后对 ERK 信号通路的诱导[J]. 哈尔滨商业大学学报, 2011, 27(2): 162-164.

[13] RIGON A P, CORDOVA F M, OLIVEIRA C S, et al. Neurotoxicity of cadmium on immature hippocampus and a neuroprotective role for p38 MAPK [J]. Neurotoxicology, 2008, 29(4): 727-734.

[14] ANDREI L, KSENYA S. Mechanisms of c-Myc-mediated transcriptional repression of growth arrest genes [J]. Exp Cell Res, 2003, 283: 17-21.

(编辑 刘 彤)