文章编号:1000-5404(2010)11-1177-03

论著

苯并(a)芘对子宫内膜细胞中雌激素代谢相关基因的影响

张 伟,姚 婕,高 宁 (400038 重庆,第三军医大学药学院生药学教研室)

[摘要] **目的** 探讨苯并(a)芘对人子宫内膜雌激素代谢相关基因作用的分子机制。**方法** 采用人子宫内膜癌细胞株进行体外实验,研究苯并(a)芘对细胞色素P450酶的作用,以0.016、0.8、0.4、2.0、10 μmol/L BP作用RL95-2细胞12 h,2 μmol/L BP作用RL95-2细胞6、12、24、36、48 h,细胞经收集、裂解后,用Western blot分析方法检测总细胞提取液中CYP1A1、CYP1B1和CYP3A4蛋白表达,并用表达了CYP450酶的supersomes作为阳性对照来检测方法的可靠性。**结果** 不同剂量BP作用于RL95-2细胞12 h后,CYP1A1蛋白表达明显增加,2 μmol/L BP作用于RL95-2细胞不同时间后,CYP1A1随作用时间延长而逐渐增加,作用48 h后到最大值,呈现良好量效和时效关系($P<0.05$)。其他细胞相关蛋白CYP1B1和CYP3A4没有改变。**结论** 苯并(a)芘可诱导CYP1A1表达增加,可能引起雌激素代谢发生改变,并进而抑制子宫内膜癌细胞的分裂增生。

[关键词] 苯并(a)芘; CYP1A1;子宫内膜癌; 香烟烟雾
[中图法分类号] R737.33; R363.13; R730.23 **[文献标志码]** A

Effect of benzo (a) pyrene on estrogen metabolism-related genes in endometrial cells

Zhang Wei, Yao Jie, Gao Ning (Teaching and Research Section of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

[Abstract] **Objective** To study the molecular mechanism of benzo(a)pyrene underlying the role of estrogen metabolism-related genes in human endometrial cancer cells. **Methods** Effect of benzo(a)pyrene on CYP450 was studied by exposing human endometrial cancer cells (RL95-2) to benzo(a)pyrene at various concentrations (0.016, 0.8, 0.4, 2.0 and 10 μmol/L BP) for 12 h, or to 2 μmol/L BP for 6, 12, 24, 36 and 48 h. RL95-2 cells were harvested and cleaved. Expressions of CYP1A1, CYP1B1 and CYP3A4 proteins in RL95-2 supernatant were detected by Western blotting. Supersome in expressed CYP450 was used as a positive control to confirm the reliability of assay methods. **Results** The expression of CYP1A1 protein was significantly increased in RL95-2 cells 12 h after they were exposed to different concentrations of benzo(a)pyrene or to 2 μmol/L BP for different periods of time, and reached it peak at 48 h, indicating that expression of CYP1A1 protein depends on the used dose and time of benzo(a)pyrene. **Conclusion** Benzo(a)pyrene can increase the expression of CYP1A1 in human endometrial cancer cells, cause changes in estrogen metabolism, and inhibit proliferation of human endometrial cancer ells.

[Key words] benzo(a)pyrene; CYP1A1; endometrial cancer

Supported by the Foundation of the Innovative Scientific Research of Third Military Medical University (2008). Corresponding author: Gao Ning, Tel: 86-23-68753736, E-mail: gaoning59@yahoo.com.cn

子宫内膜癌(carcinoma of endometrium)是女性生殖系统3大恶性肿瘤之一。在美国,子宫内膜癌是最常见的妇科恶性肿瘤,在女性恶性肿瘤中居第4位[1,2]。在欧洲,子宫内膜癌是最常见的妇科癌症。虽然我国属于低发区,但是其发病率近20年来一直呈逐年上升的趋势。根据上海市肿瘤登记处的资料,1972-1999年上海市区人群子宫内膜癌的年龄调整发病率从2.49/10万增加到4.75/10万,目前已超出宫颈癌位居女性恶性肿瘤发病的第10位[3,4]。

流行病学研究显示子宫内膜癌是一种激素依赖型肿瘤[5,6],目前对于子宫内膜癌的发病机制尚未完全明了。但大量的研究结果显示年龄、肥胖、糖尿病、不孕、未产、初潮过早、绝经延后、大量雌激素替代疗法、三苯氧胺(tamoxifen)的使用及尚存争议的多囊卵巢综合征(polycystic ovary syndrome ,PCOS)都与子宫内膜

[基金项目] 第三军医大学科研创新基金(2008)
[通信作者] 高 宁,电话:(023)68753736,E-mail:gaoning59@yahoo.com.cn

癌的发生有密切关系[7-11]，这些因素大都通过影响机体激素的变化来发挥病理生理作用[3,4]。已有研究表明吸烟有抗雌激素作用，根据抗雌激素假说能降低子宫内膜癌的危险[1,12]。更早一些的研究表明，吸烟是子宫内膜癌一个保护因素。有前瞻性队列研究报道持续吸烟和曾经吸烟的人子宫内膜癌发病危险的降低有统计学上的意义[13]。

雌激素代谢过程中有2条主要代谢途径生成代谢2种代谢产物2-羟基雌二醇和4-羟基雌二醇，这2种代谢产物的作用不一致，2-羟基雌二醇具有抗肿瘤作用，而4-羟基雌二醇具有遗传毒性。CYP1A1和CYP1B1是细胞色素P450酶家族成员，是人体肝外将雌激素进行羟基化代谢的主要代谢酶[14]。

本研究中，我们将香烟燃烧产物中主要的有害成分苯并(a)芘作用于人子宫内膜细胞RL95-2细胞暴露于不同剂量的苯并(a)芘，检测雌激素代谢酶的变化，进而探索苯并(a)芘对子宫内膜癌细胞对雌激素代谢相关基因作用的分子机制。

1　材料与方法

1.1　细胞培养

RL95-2 cells人子宫内膜癌上皮细胞株从美国菌种保藏中心(ATCC, Manassas, VA, USA)获得。细胞于RPM1640培养基中培养，培养液中补充加入丙酮酸钠、碳酸氢钠、非必需氨基酸、L-谷氨酰胺、青霉素、链霉素和10%胎牛血清(FBS)。

1.2　化学试剂

苯并(a)芘[B(a)p]购自美国Sigma公司，蛋白C1A1、CYP1B1、CYP3A4、β-actin抗体(Santa Cruz公司, CA, USA)。蛋白测定试剂盒(Pierce Chemical, Rockford, IL)。

1.3　Western blot分析

使用美国Invitrogen公司的NuPAGE Bis-Tris electrophoresis system进行蛋白分析。细胞用冰冷PBS清洗2遍，用1×NuPAGE LDS样品缓冲液进行裂解，蛋白浓度测定采用考马斯亮蓝试剂盒检测。总蛋白进行SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳分离，然后转移至醋酸纤维素膜上，封闭2 h，加入一抗，4 ℃孵育过夜，加入二抗，37 ℃孵育2 h，化学发光法检测蛋白表达。

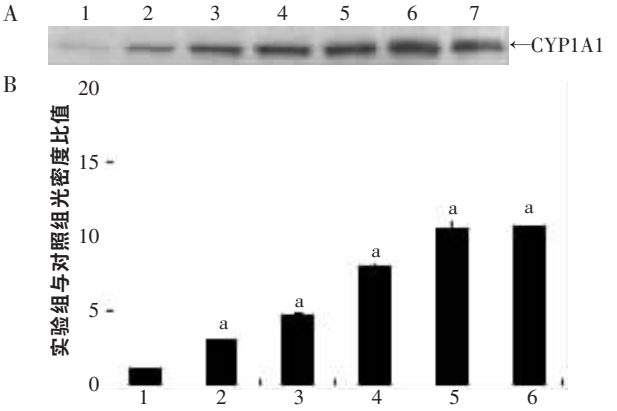
1.4　统计学分析

计量资料以$\bar{x} \pm s$表示，采用SPSS 10.0统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　BP诱导人子宫内膜癌RL95-2细胞CYP1A1蛋白表达变化

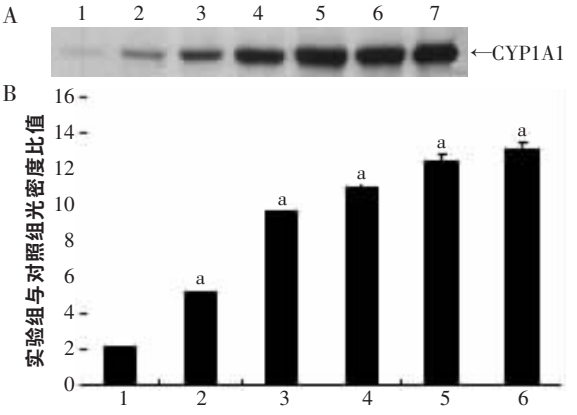
不同剂量BP作用于RL95-2细胞12 h后，CYP1A1蛋白表达明显增加(图1)。2 μmol/L BP作用于RL95-2细胞不同时间后，CYP1A1随作用时间延长而逐渐增加，作用48 h后到最大值(图2)。结果显示BP可诱导RL95-2细胞CYP1A1蛋白表达增加并呈明显的量效和时效关系($P<0.05$)。



1:对照组;2:0.016 μmol/L;3:0.8 μmol/L;4:0.4 μmol/L;5:2.0 μmol/L;6:10 μmol/L;7:supersomes阳性对照　a:$P<0.05$,与对照组比较

A:蛋白电泳结果;B:半定量分析结果

图1　不同浓度BP诱导CYP1A1蛋白表达的时效和量效关系



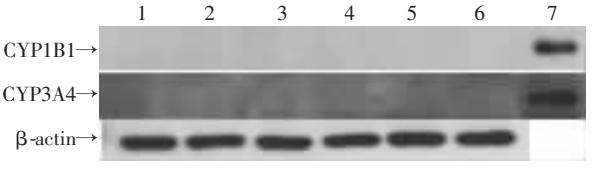
1:对照组;2:6 h;3:12 h;4:24 h;5:36 h;6:48 h;7:supersomes阳性对照　a:$P<0.05$,与对照组比较

A:蛋白电泳结果;B:半定量分析结果

图2　BP诱导不同时间CYP1A1蛋白表达的时效和量效关系

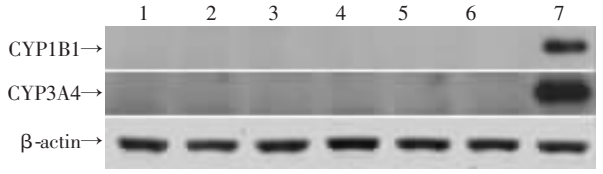
2.2　BP对人子宫内膜癌RL95-2细胞CYP1B1和CYP3A4蛋白表达的影响

不同剂量BP作用于RL95-2细胞12h后，CYP1B1和CYP3A4蛋白表达无明显增加(图3)。2 μmol/L BP作用于RL95-2细胞不同时间后，CYP1B1和CYP3A4随作用时间延长而无增加(图4)。以上结果显示BP对RL95-2细胞CYP1B1和CYP3A4蛋白表达没有影响。



1:对照组;2:0.016 μmol/L;3:0.8 μmol/L;4:0.4 μmol/L;5:2.0 μmol/L;6:10 μmol/L;7:supersomes阳性对照

图3　Western blot检测不同浓度BP对CYP1B1和CYP3A4蛋白表达的影响



1:对照组;2:6 h;3:12 h;4:24 h;5:36 h;6:48 h;7:supersomes 阳性对照

图 4　Western blot 检测 BP 作用不同时间对 CYP1B1 和 CYP3A4 蛋白表达的影响

3　讨论

子宫内膜癌又称子宫体癌,是指子宫内膜发生的癌,绝大多数为腺癌。为女性生殖道常见三大恶性肿瘤之一,高发年龄为 58 ~61 岁,约占女性癌症总数的 7%,占女性生殖道恶性肿瘤的 20% ~30%,近年发病率有上升趋势。确切病因不清楚,一般认为与雌激素代谢关系密切[10,13]。

流行病学研究发现吸烟可降低子宫内膜癌的发危险,但是其分子机制一直不太清楚。已发现香烟主流烟雾中含有近 5 000 种化学物质, 多种致癌多环芳烃是其中主要的致癌物, 苯并(a)芘是香烟燃烧产物中主要的污染物[14,15]。本实验中,我们选择苯并(a)芘作为香烟污染物代表进行研究,结果显示人子宫内膜癌细胞暴露于不同剂量苯并(a)芘可上调雌激素代谢酶 CYP1A1 表达,并呈现良好量效关系和时效关系。2 μmol/L 苯并(a)芘作用 RL95-2 细胞后 12 h,就可观察 CYP1A1 表达增加,与文献[12,16]报道一致。

我们进一步检测了雌激素代谢相关的酶基因的表达,发现苯并(a)芘作用于 RL95-2 细胞时仅有 CYP1A1 基因表达上调,对其它的代谢酶基因 CYP1B1 和 CYP3A4 均无影响。有研究发现雌激素经过 CYP1A1 酶作用后产生 2-羟基雌二醇,而 2-羟基雌二醇具有抑制细胞增殖和诱导癌细胞凋亡的作用[14]。我们的研究结果提示香烟燃烧产物苯并(a)芘可以上调雌激素谢 CYP1A1 表达,使体内生成 2-羟基雌二醇增加,2-羟基雌二醇进而抑制细胞增殖和诱导癌细胞凋亡,导致子宫内膜癌发现危险降低,我们的实验为上述推论提供了初步的研究思路,但还需进一步研究苯并(a)芘作用细胞后雌激素产物以及相关细胞效应进行证实。

总之,本研究结果为吸烟对子宫内膜癌的预防效应分子机制提供了一个新的线索, 为从烟草中寻找预防和治疗子宫内膜癌药物和方法奠定了一定基础。

参考文献:

[1] Baron J A, La-Vecchia C, Levi F. The antiestrogenic effect of cigarette smoking in women[J]. Am J Obstet Gynecol, 1990, 162(2): 502 - 514.

[2] Parkin D M, Pisani P, Ferlay J. Estimates of the worldwide incidence of 25 major cancers in 1990[J]. Int J Cancer, 1999, 80(6): 827 - 841.

[3] Persson I. Estrogens in the causation of breast, endometrial and ovarian cancers - evidence and hypotheses from epidemiological findings[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2000, 74(5): 357 - 364.

[4] 高静, 项永兵, 徐望红, 等. 吸烟、饮酒与子宫内膜癌关系的病例对照研究[J]. 复旦学报: 医学版, 2006, 33(1): 10 - 16.

[5] Brinton L A, Barrett R J, Berman M L, *et al*. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer[J]. Am J Epidemiol, 1993, 137(3): 281 - 291.

[6] Tinelli A, Vergara D, Martignago R, *et al*. Hormonal carcinogenesis and socio-biological development factors in endometrial cancer: a clinical review[J]. Acta Obstet Gynecol Scand, 2008, 87(11): 1101 - 1113.

[7] 雷玲,李力. 子宫内膜样腺癌的分子改变[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2391 - 2392.

[8] 胡卫红,乔杰,王黎娜,等. 多囊卵巢综合征患者代谢综合征发生及临床特征的相关性[J]. 北京大学学报(医学版), 2010, 42(2): 159 - 163.

[9] 谢铁男,岳瑛. 多囊卵巢综合征胰岛素抵抗研究进展[J]. 吉林大学学报(医学版), 2010, 36(2): 424 - 428.

[10] 丁岩,徐怀胜,王丽莉,等. 雌、孕激素对子宫内膜癌细胞株 HEC - 1B ERRα 表达调控的研究[J]. 现代妇产科进展, 2010, 19(3): 202 - 205.

[11] 张慧明,梁元姣. 雌激素受体与子宫内膜癌的关系[J]. 江苏医药, 2010, 36(3): 331 - 334.

[12] McGrath M, Hankinson S E, De-Vivo I. Cytochrome P450 1A1, cigarette smoking, and risk of endometrial cancer (United States) [J]. Cancer Causes Control, 2007, 18(10): 1123 - 1130.

[13] Terry P D, Rohan T E, Franceschi S, *et al*. Cigarette smoking and the risk of endometrial cancer[J]. Lancet Oncol, 2002, 3(8): 470 - 480.

[14] Zhu B T, Conney A H. Functional role of estrogen metabolism in target cells: review and perspectives[J]. Carcinogenesis, 1998, 19(1): 1 - 27.

[15] 黄曙海, 葛宪民, 汤俊豪, 等. 国产香烟主流烟雾中多环芳烃的含量[J]. 环境与健康杂志, 2006, 23(1): 46 - 48.

[16] Bao H, Vepakomma M, Sarkar M A. Benzo(a)pyrene exposure induces CYP1A1 activity and expression in human endometrial cells [J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2002, 81(1): 37 - 45.

(**收稿**:2010-01-26;**修回**:2010-03-05)

(编辑　张　维)