

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20170605001

叶婷, 董四君, 王佳, 等. DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成基因表达的影响[J]. 生态毒理学报, 2018, 13(3): 78-86

Ye T, Dong S J, Wang J, et al. Effects of DEHP and MEHP on the expression of steroidogenic genes in the H295R cells [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2018, 13(3): 78-86 (in Chinese)

DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成基因表达的影响

叶婷¹, 董四君², 王佳³, 杨丹¹, 杨文佳¹, 李灿^{1,*}

1. 贵阳学院生物与环境工程学院 贵州省山地珍稀动物与经济昆虫重点实验室, 贵阳 550005

2. 中国科学院城市环境研究所 中国科学院城市环境与健康重点实验室, 厦门 361021

3. 泰山医学院公共卫生学院, 泰安 271016

收稿日期: 2017-06-05 录用日期: 2017-09-14

摘要: 为探讨邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-(2-ethylhexyl) phthalate, DEHP)及其代谢产物邻苯二甲酸单-2-乙基己酯(mono-(2-ethylhexyl) phthalate, MEHP)对 H295R 细胞类固醇激素合成关键基因表达的影响, 本实验将 H295R 细胞分别暴露于 DEHP (0、1、10、100、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)和 MEHP(0、1、10、100、1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 24 h, 用 MTT 法检测细胞活性, 并应用荧光定量 PCR 法分析细胞类固醇激素合成过程中关键酶的基因表达水平。结果显示, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞染毒 24 h 显著降低 H295R 细胞活力, 所以本研究采用了较低的染毒浓度(0、1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对 H295R 细胞染毒 24 h 来评估 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成通路的影响。1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 显著增加醛固酮合成酶 CYP11B2 的基因表达水平。10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 显著上调了 3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD2)的基因表达水平。1、10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 显著下调了 3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD1 和 3 β -HSD2)、17 β 羟基类固醇脱氢酶 17 β -HSD4、17 α 羟化酶/17,20 裂解酶 CYP17 和芳香酶 CYP19a 的基因表达水平。10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 染毒 H295R 24 h 显著下调了 CYP21 和 STAR 的基因表达水平, 然而, 10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 显著上调了 CYP11B2 的基因表达水平。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 显著下调了 17 β -HSD1 的基因表达水平。上述研究结果表明, DEHP、MEHP 都可不同程度影响 H295R 细胞类固醇激素合成过程中关键基因的表达。MEHP 可以通过抑制 STAR 基因的表达, 从而将影响胆固醇在细胞内的转运; 并能显著性抑制类固醇激素合成过程中 CYP17、CYP19a、3 β -HSD1、3 β -HSD2、17 β -HSD1、17 β -HSD4、CYP21 基因的表达, 最终将抑制 H295R 细胞中类固醇激素的合成。与 DEHP 相比, MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成关键基因表达的影响较明显。

关键词: 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP); 邻苯二甲酸单乙基己基酯(MEHP); H295R; 类固醇激素合成

文章编号: 1673-5897(2018)3-078-09 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Effects of DEHP and MEHP on the Expression of Steroidogenic Genes in the H295R Cells

Ye Ting¹, Dong Sijun², Wang Jia³, Yang Dan¹, Yang Wenjia¹, Li Can^{1,*}

1. College of Biology and Environmental Engineering, Guiyang University/Guizhou Provincial Key Laboratory for Rare Animal and E-

基金项目: 贵州省大鲵可持续利用协同 2011 创新中心(黔教合协同创新字[2015]06); 国家自然科学基金(21507099, 31600442); 山东省自然科学基金(ZR2015PB011); 贵州省一流学科建设项目贵阳学院学科建设项目(黔教科研发[2017]85); 贵州省科学技术基金项目(黔科合基础[2018]1005); 贵州省联合基金项目(黔科合 LH 字[2014]7182 号); 贵州省高层次人才“百”层次人才(黔科合人才(2016)4020 号); 贵阳学院引进人才启动资金科研项目(20160375112);

作者简介: 叶婷(1988-), 女, 博士, 研究方向为环境分子毒理学, E-mail: tyerfhu@126.com

* 通讯作者 (Corresponding author), E-mail: lican790108@163.com

conomic Insects of the Mountainous Region, Guiyang 550005, China

2. Key Lab of Urban Environment and Health, Institute of Urban Environment, Chinese Academy of Sciences, Xiamen 361021, China

3. School of Public Health, Taishan Medical University, Tai'an 271016, China

Received 5 June 2017 **accepted** 14 September 2017

Abstract: To study the effects of exposure to di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) and its main metabolite mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on the expression of steroidogenic genes in the H295R cells, H295R cells were exposed to DEHP (0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) and MEHP (0, 1, 10, 100, 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) respectively for 24 h, cell viability was assessed by MTT assay, and real time quantitative PCR method was conducted to explore the mRNA expression levels of the key enzymes involved in steroid hormone synthesis. The results showed that 1 000 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP or MEHP significantly reduced cell viability of H295R cells. Therefore, the lower concentrations of DEHP and MEHP were selected to evaluate the effects of DEHP and MEHP on the steroid synthesis pathway of H295R cells in the present study. The expression of aldosterone synthase (CYP11B2) was upregulated significantly upon DEHP at different dose compared to that of the control. Moreover, the transcript level of 3-beta hydroxy steroid dehydrogenase (3 β -HSD2) was also increased significantly during exposure to 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP. In contrast, The mRNA levels of 3 β -HSD1, 3 β -HSD2, 17 β -hydroxy steroid dehydrogenase (17 β -HSD4), P450 17 alpha-hydroxylase/C17-20-lyase gene (Cyp17) and aromatic enzyme (CYP19a) were significantly decreased in H295R cells after exposure to 1, 10 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP. Exposure to MEHP of 10 and 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 24 h significantly down-regulated the mRNA levels of CYP21 and STAR and up-regulated the expression of CYP11B2 in H295R cells. 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP significantly down-regulated the expression levels of 17 β -HSD1. Thus, DEHP and MEHP can affect the expression of key genes involved in steroid synthesis in H295R cells to a certain extent. MEHP can inhibit the expression of STAR gene and affect the transport of steroid hormone in cells, then significantly inhibit the expression of CYP17, CYP19a, 3 β -HSD1, 3 β -HSD2, 17 β -HSD1, 17 β -HSD4, CYP21, which were all involved in steroid hormone biosynthesis, and ultimately inhibit the synthesis of steroid hormones in H295R cells. The effects of MEHP on the expression of steroidogenic genes in the H295R cells were more obvious than that of DEHP.

Keywords: di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP); monoethylhexyl phthalate (MEHP); H295R cells; steroidogenic

邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(di-(2-ethylhexyl)-phthalate, DEHP)作为增塑剂普遍用于聚氯乙烯(poly vinyl chloride, PVC)材料中,如地板、电缆和房屋装饰材料等建筑材料,还普遍用于血袋、血管和透析仪等医疗器械^[1]。DEHP与聚氯乙烯材料不是以化学键结合,而是以普通的分子间作用力结合,所以容易从塑料材料中释放进入环境中^[2],然后通过食物链在生物体内富集,引起神经、免疫、肝脏、生殖等毒性作用^[3-4]。人体通过食品摄入、呼吸空气、饮用水、皮肤吸收及静脉注射等多种途径暴露于DEHP^[5-7],其中摄入被DEHP污染的食品是暴露DEHP的主要途径,人体内超过90%的DEHP来自食品摄入^[8]。DEHP进入机体后,一部分以原型直接被吸收,另一部分受胰腺酶和肠道内一些酶的作用,迅速由双酯转化为单酯,主要代谢产物是邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(mono-(2-ethylhexyl)phthalate, MEHP)^[9]。很

多哺乳动物研究显示DEHP的代谢产物MEHP的毒性效应强于DEHP,并且DEHP产生的毒性效应主要是由其代谢产物引起的^[10]。许多动物研究表明DEHP和MEHP影响了类固醇合成活性^[3-4],但对其机制缺乏系统的认识。目前大多数关于DEHP和MEHP的研究局限于体内研究,而且关于DEHP和MEHP对类固醇激素合成的影响,还没有相关体外研究进行全面的评价。Harvey等^[11]提出了H295R细胞系类固醇合成干扰实验可作为评价化学物对类固醇激素生成过程干扰的策略,并指出H295R细胞系是一种有效的体外筛选环境类固醇激素干扰物的细胞模型。美国国家环境保护署也正在建立利用H295R细胞系检测环境污染物对类固醇激素生成干扰效应的方法来研究环境中污染物的内分泌干扰效应^[12]。相对基于组织评价类固醇激素干扰的方法,H295R细胞评价的优势还在于它能评价环境中

的污染物对细胞活力和细胞毒性的影响,这是一个重要的特征,以区别化学物是通过直接的细胞毒性作用还是间接的生成类固醇通路的影响产生效应,这点是体外培养的多细胞组织方法不能做到的。并且 H295R 细胞容易获得、培养简单并可稳定传代,可有效代替动物和组织实验方法,简单且经济。因此 H295R 细胞系成为体外筛选环境类固醇激素干扰物及研究其机制的最具潜力的工具,能同时从基因表达、酶活力和激素水平几个层面进行检测^[13]。

本研究采用 H295R 细胞模型类固醇激素合成干扰试验,从细胞活力、类固醇激素合成关键基因表达、关键调控因子和关键受体的基因表达等方面,对 DEHP 及其主要代谢产物 MEHP 的类固醇激素合成干扰效应进行分子机制层面的研究。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 实验材料

人肾上腺皮质腺癌细胞 H295R 细胞系购自国家实验细胞资源共享平台。细胞培养: H295R 细胞系常规培养于 37 °C、5% CO₂ 恒温培养箱中。细胞培养采用 DMEM/F12(1 : 1)培养基,培养基中需添加成分包括 2.5% Nu-Serum I, 15 mmol·L⁻¹ HEPES, 0.00625 mg·mL⁻¹ insulin+0.00625 mg·mL⁻¹ transferrin+6.25 ng·mL⁻¹ selenium+1.25 mg·mL⁻¹ bovine serum albumin+0.00535 mg·mL⁻¹ linoleic acid。2~3 d 更换一次培养液,待细胞单层生长至 80%~95%后,用 PBS 溶液轻洗 2 次,加入适量 0.05%胰酶-EDTA 溶液消化 2 min, 800~1 000 r·min⁻¹ 离心 5 min 后弃上清液,加入培养基重悬细胞,按照 1 : 3 比例传代。

1.2 仪器与试剂

仪器: CO₂ 细胞恒温培养箱(日本 SANYO 公司); Spectra Max M5 多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司); HR40-IIA2 超净工作台(中国 Haier 公司); UNIVERSAL 320R 台式(常温/低温)离心机(德国 Hettich Zentrifugen 公司); ND1000 超微量紫外可见分光光度计(美国 Gene Company Limited 公司); Mastercycler[®] personal PCR 仪(德国 EPPENDORF 公司), Lightcycler 480 实时荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司); 生物显微镜(上海长方光学仪器有限公司, 中国); Cascada I 超纯净水系统(美国 Cascada 公司); HS-840-U 无菌工作台(中国苏州安泰空气技术有限公司); 细胞培养瓶、培养板(丹麦 NUNC 公司)。

试剂: DEHP, 优级纯, 购于美国 Supelco 公司,

溶于二甲基亚砜(DMSO, 优级纯, 美国 Sigma-Aldrich 公司), 浓度为 1 g·mL⁻¹, 将母液用 DMSO 稀释至 0.001 g·mL⁻¹ 备用; MEHP, 优级纯, 购于美国 AccuStandard 公司。将 MEHP 用 DMSO 配成 0.001 g·mL⁻¹ 母液备用; DMEM/F12(1 : 1)(美国, HyClone 公司); 胎牛血清(美国, Life Technologies 公司); 0.05% 胰酶 EDTA 溶液(美国, Life Technologies 公司); Hepes(美国, Sigma 公司); Nu Serum I(美国, BD Biosciences 公司); MTT(美国, Sigma 公司); ITS + Premix A(美国, Life Technologies 公司); RNA 提取试剂盒(美国, Omega 生物技术公司); 反转录试剂盒(PrimeScript[™] RT-PCR Kit, 宝生物工程(大连)有限公司); SYBR Premix Ex Taq[™] 试剂盒(宝生物工程(大连)有限公司)。

1.3 MTT 实验

MTT 法检测细胞活力的实验原理是活细胞线粒体中存在的琥珀酸脱氢酶可以使黄色的 MTT 还原为不溶性的蓝紫色结晶化合物甲瓩(formazan)沉积于细胞内,而死细胞中此酶消失,MTT 不能被还原。在一定细胞数范围内,甲瓩形成的量与活细胞数目成正比。二甲基亚砜(DMSO)溶解细胞中的甲瓩后,用酶标仪检测 490 nm 波长处的吸收值,从而间接反映活细胞数量。MTT 法检测细胞活力具体的实验步骤为:用胰酶-EDTA 溶液消化对数期 H295R 细胞并收集计数,然后调整细胞悬液浓度,每孔加入 100 μL 细胞悬液,细胞接种密度根据细胞生长速度调整约为 1×10³~1×10⁵ 个细胞/孔,边缘孔用无菌 PBS 填充,5% CO₂、37 °C 培养 24 h。随后,弃去培养基,DEHP 和 MEHP 母液用 DMSO 和培养基稀释,调节各孔 DMSO 含量为 0.1%,加入用新培养基稀释的不同浓度的 DEHP 和 MEHP(0、1、10、100、1 000 μmol·L⁻¹) 在 5% CO₂、37 °C 继续培养 24 h,接着,每孔加入 10 μL MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹, 即 0.5% MTT),继续培养 4 h。小心吸去孔内培养液,每孔加入 150 μL DMSO,置摇床上低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶标仪 OD 490 nm 或者 550 nm 处测量各孔的吸光值。同时设置调零孔(含有培养基、MTT 和 DMSO),对照孔(含有细胞、培养液、MTT、DMSO)。细胞存活率% = [(染毒孔 OD - 调零孔 OD) / (对照孔 OD - 调零孔 OD)] × 100%。

1.4 RT-PCR 分析 H295R 细胞基因表达变化

将 H295R 细胞接种到 6 孔板中,每孔 2 mL,在 37 °C、5% CO₂ 培养箱内培养 24 h 后,除去旧培养基,用新鲜的培养基将 DEHP 和 MEHP 配制成以下

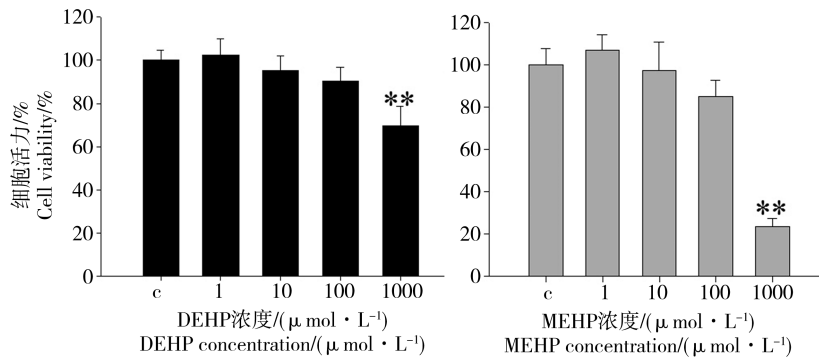


图 1 邻苯二甲酸二(2-乙基己基)酯(DEHP)和邻苯二甲酸单(2-乙基己基)酯(MEHP)对H295R细胞活性的影响

注:数值以 Mean±SEM (n=6)表示;与对照相比,* P<0.05,** P<0.01。

Fig. 1 Effects of di-(2-ethylhexyl)-phthalate (DEHP) and mono (2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) on cell viability of H295R cells

Note: the representative data are expressed as the mean±SEM, n=6 for each replicate. * P < 0.05, ** P < 0.01 vs. control.

表 1 用于实时荧光定量 PCR 分析的引物序列

Table 1 Primers used in the real-time quantitative RT-PCR analysis

基因 Gene	引物序列(5' to 3') Primer sequences (5' to 3')	基因序列号 Accession number
3β-HSD1	F: AGCATCTTCTGTTTCCTGGTG R: TCTCCTTCAGTCCTTCTCCTT	NM_000862
3β-HSD2	F: AGCATCTTCTGTTTCCTGGCA R: TCTCCTTCAGTCCTTCTCTTC	NM_000198
CYP11A	F: GAGATGGCAGCAACCTGAAG R: CTTAGTGTCTCCTTGATGCTGGC	NM_000781
CYP11B1	F: GGTTTGCCAGGCTAAGC R: CAAACTGCCAGAGGACAG	NM_000497
CYP11B2	F: TCCAGGTGTGTTTCAGTAGTCC R: GAAGCCATCTCTGAGGTCTGTG	NM_000498
CYP17	F: GGCACCAAGACTACAGTGATTG R: AGAGTCAGCGAAGGCGATAAC	M14564
CYP19a	F:AGGTGCTATTGGTCATCTGCTC R: TGGTGGAAATCGGGTCTTTATGG	NM_000103
CYP21	F: ACCTCAGTTTCTCCTTTATTGC R: AGAGCCAGGGTCCTTCAC	NM_000500
STAR	F: ATGAGTAAAGTGGTCCCAGATG R: ACCTTGATCTCCTTGACATTGG	NM_000349
NR5A1	F: TGGAGCTGACCACAGTGGC R: GGAACCTCAAATCCAGGCTGAA	NM_004959.3
17β-HSD1	F: AGAGGCATACCCAGGGGAATCTG R: AACAAACTGTCTGGTTGCTGGT	NM_000413.2
17β-HSD4	F: GTGGTGGGGAGGGGAATGGTTATT R: CAATCCTGCTTGAGAGACCAGGTG	NM_000414.3
GAPDH	F: GGAGAAGGCTGGGGCTCAT R: TGATGGCATGGACTGTGGTC	NM_001256799.2

浓度:0、1、10、100 μmol·L⁻¹染毒,继续培养 24 h。接着,除去培养液,用 PBS 洗 2 次,细胞染毒后总 RNA 的提取采用 Omega RNA 提取试剂盒,流程按照说明书进行,稍加改动,改动如下:染毒后的细胞,增加了消化步骤以获得更多的细胞,然后每孔加入 1 mL RNA-Solv Reagent,用枪头反复吹打,使细胞充分裂解;为了使得细胞充分裂解,低温冰上孵育较长时间(10 min 左右)。提取后采用分光光度法鉴定 RNA 质量,测定 RNA 浓度,采用反转录试剂盒进行反转录,获得 cDNA。用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒在罗氏 480 仪器上进行荧光定量 PCR 反应。用于荧光定量 PCR 的引物序列见表 1。以 GAPDH 为内参基因,采用 2^{-ΔΔCT} 方法分析各染毒组 mRNA 水平相对于对照组的变化倍数^[14]。

1.5 数据统计分析

所有实验数据采用平均值±标准误差表示。并进行方差齐性检验和正态性检验,如有必要需进行对数转换。采用 SPSS16.0 软件进行单因素方差分析(One-Way ANOVA)和 Turkey's 检验。置信水平 P<0.05 时差异显著。

2 结果 (Results)

2.1 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞活力的影响

为了检测 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞的毒性,同时为了确定类固醇合成实验的处理剂量,本研究采用 MTT 法对细胞的活性进行分析。如图 1 所示,用 DEHP 处理 H295R 细胞 24 h 后,同对照相比,10 和 100 μmol·L⁻¹ DEHP 使细胞活性略有下降,但差异未达到统计学意义;1 000 μmol·L⁻¹ DE-

HP使细胞活力显著降低($P < 0.05$)(图1)。MEHP处理H295R细胞24 h后,同对照相比,10和100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MEHP使细胞活性略有下降,但差异未达到统计学意义;1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ MEHP使细胞活力显著降低($P < 0.01$)(图1)。为了检测类固醇合成相关基因表达的改变,DEHP和MEHP的处理剂量应保持低于对细胞致死效应较强的剂量。因此在H295R类固醇合成实验中选择了0、1、10、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEHP和MEHP。

2.2 DEHP对H295R细胞类固醇激素合成通路的影响

在细胞活力测试中,1 000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEHP和MEHP对H295R细胞染毒24 h显著降低H295R细胞活力,对细胞活力影响较强,所以本研究采用了较低的染毒浓度(0、1、10和100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)对H295R细胞染毒24 h来评估DEHP和MEHP对H295R细胞类固醇合成通路的影响。H295R细胞暴露于DEHP和MEHP(0、1、10、100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)24 h后,检测细胞

类固醇激素合成过程中关键酶基因(CYP11A、CYP11B1、CYP11B2、CYP17、CYP19a、CYP21、17 β -HSD1、17 β -HSD4、3 β -HSD1、3 β -HSD2、STAR)和关键调控因子NR5A1基因表达水平的变化。

如图2所示,与对照相比,1、10和100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEHP对H295R细胞系染毒24 h后,对编码类固醇合成通路涉及的多种酶CYP11A、CYP21、CYP11B1、CYP17、3 β -HSD1、17 β -HSD1、17 β -HSD4、CYP19a和STAR的基因表达水平无显著影响。Nuclear receptor subfamily 5、group A、member 1(NR5A1/SF-1)类固醇合成因子是在类固醇合成组织中起到关键作用的核受体,在肾上腺和性腺的功能和发育过程中起到关键的调节作用。DEHP对关键类固醇合成因子NR5A1基因表达水平也无显著影响。然而,1、10和100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEHP显著增加醛固酮合成酶CYP11B2的基因表达水平($P < 0.01$)。10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DEHP显著上调了3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD2)的基因表达水平($P < 0.01$)。

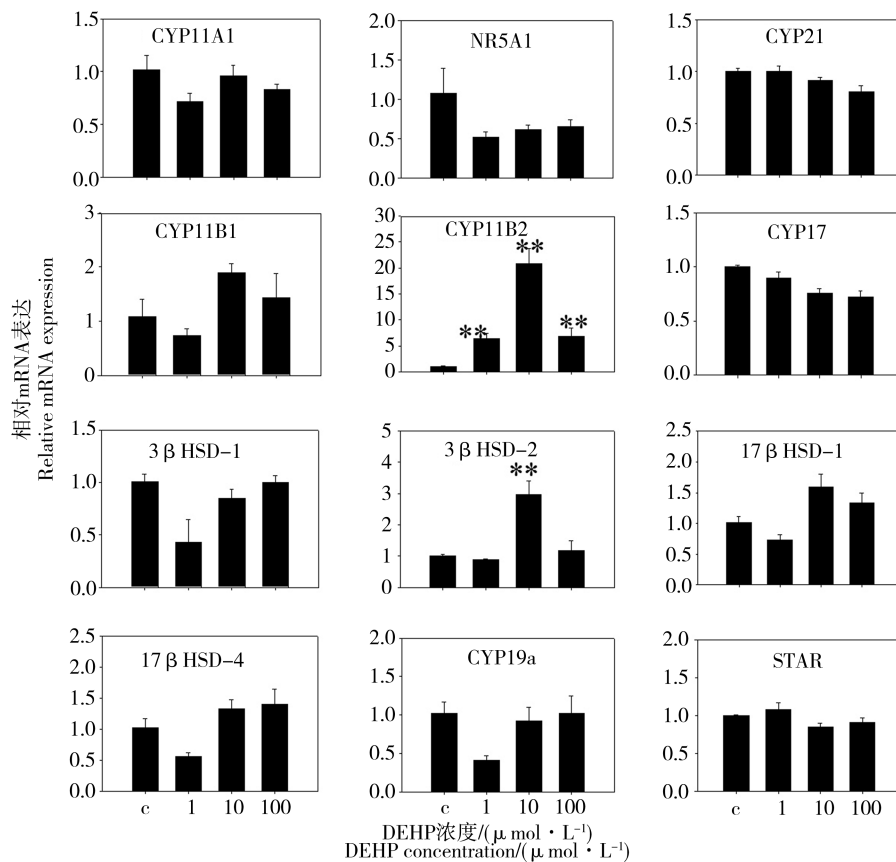


图2 DEHP暴露对H295R细胞类固醇合成通路相关基因表达的影响

注:数值以 Mean \pm SEM 表示($n=3$);与对照组相比,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。

Fig. 2 Effects of DEHP on the expression of steroidogenic genes in the H295R cells

Note: the representative data are expressed as the mean \pm SEM, $n=3$ for each replicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

2.3 MEHP对H295R细胞类固醇激素合成通路的影响

如图3所示,与对照相比,1、10和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP对H295R细胞系染毒24 h后,对编码类固醇合成通路涉及的多种酶如侧链裂解酶CYP11A、CYP11B1和关键类固醇合成因子NR5A1基因表达水平也无显著影响。然而,与对照相比,1、10和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP显著下调了3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD1和3 β -HSD2)、17 β 羟基类固醇脱氢酶17 β -HSD4、17 α 羟化酶/17,20裂解酶CYP17和芳香酶CYP19a的基因表达水平。10和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP染毒H295R 24 h显著下调了CYP21和STAR的基因表达水平,然而,10和100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP显著上调了CYP11B2的基因表达水平。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP显著下调了17 β -HSD1的基因表达水平。基因表达结果显示,DEHP、MEHP都可影响H295R细胞类固醇激素合成过程中关键

基因的表达。

3 讨论(Discussion)

本试验研究了DEHP及其主要代谢产物MEHP对H295R细胞类固醇合成过程的影响,主要包括对类固醇激素合成过程中关键酶、关键调控因子和关键受体基因表达的影响,用以评价DEHP和MEHP的类固醇激素合成干扰效应。研究发现,DEHP、MEHP可不同程度地改变类固醇合成过程中关键酶、关键调控因子和受体基因的表达。类固醇激素合成是一个复杂的过程,涉及了许多酶、因子和受体的调控,任一调控点的干扰如编码类固醇合成相关酶的基因表达水平的干扰会引起酶活力的改变,直至激素水平的变化。类固醇合成过程中关键酶、因子和受体基因转录表达的改变可能造成类固醇激素分泌的紊乱,由于基因表达水平的改变相对于其他毒理效应检测指标较灵敏^[15],为了揭示DEHP和MEHP

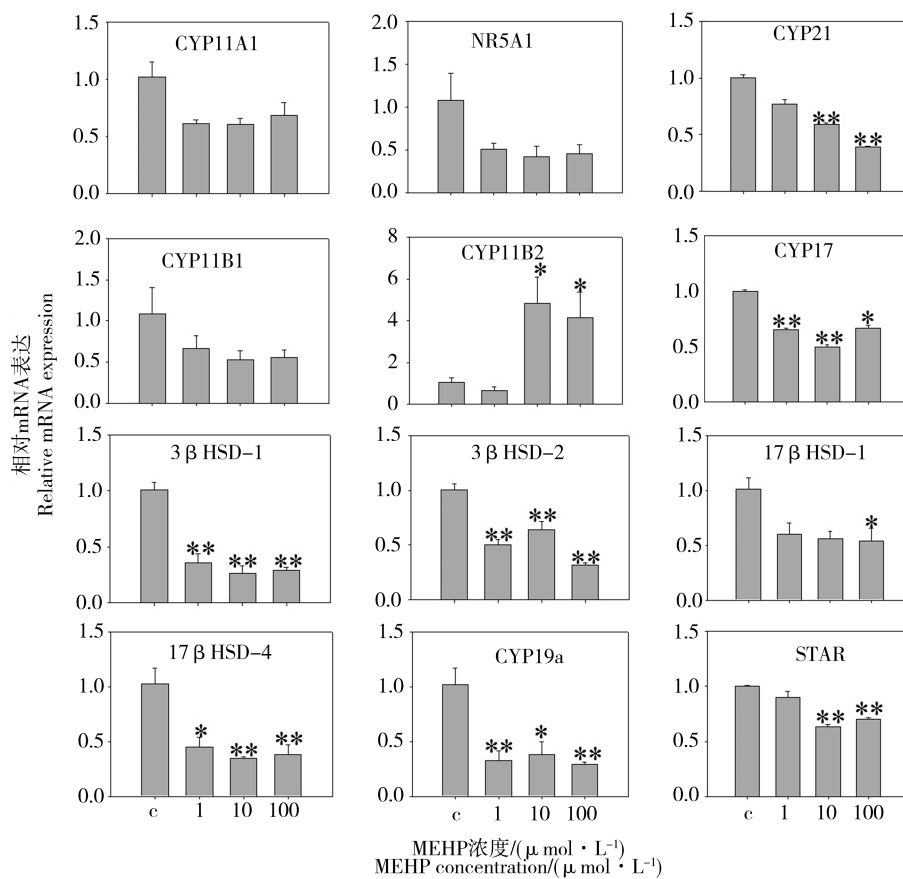


图3 MEHP暴露对H295R细胞类固醇合成通路相关基因表达的影响

注:数值以 Mean \pm SEM 表示($n=3$);与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$ 。

Fig. 3 Effects of MEHP on the expression of steroidogenic genes in the H295R cells

Note: the representative data are expressed as the mean \pm SEM, $n=3$ for each replicate. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. control.

对 H295R 细胞产生类固醇激素合成干扰效应的分子机制,我们选择基因表达水平的改变来评估 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成干扰的影响。H295R 细胞在许多研究中已被用于评估一些内分泌干扰化合物改变类固醇合成通路相关基因表达的能力^[6]。

3.1 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞中类固醇生物合成关键基因表达水平的影响

荧光定量 qRT-PCR 用于检测 DEHP 和 MEHP 调节 H295R 细胞中类固醇生物合成关键基因表达水平。DEHP 显著增加醛固酮合成酶 CYP11B2 的基因表达水平,对 CYP11B1 基因表达水平无显著影响。类似地 10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 显著上调了 CYP11B2 的基因表达水平,而 MEHP 染毒对 CYP11B1 基因表达水平无显著影响。DEHP 和 MEHP 对 CYP11B1 和 CYP11B2 基因在转录水平上产生了不同程度的影响,这可能和 CYP11B1 和 CYP11B2 的结构差异和调节通路不同有关系。CYP11B1 是一种催化皮质醇生物合成过程的最后步骤线粒体细胞色素酶,CYP11B1 和 CYP11B2 的内含子共享了 90% 的核酸序列,外显子区域共享了 95% 的核酸序列,并且 CYP11B1 在染色体 8q 上靠近 CYP11B2,然而这 2 个基因的表达定位于肾上腺皮质不同的带状区域^[6]。CYP11B1 和 CYP11B2 调节模式的不同还可能是由于 CYP11B1 和 CYP11B2 是通过不同通路调节的,CYP11B2 是 ACTH/cAMP、血管紧张素 angiotensin II、类固醇合成因子 1(SF-1) 结合位点和 cAMP 响应元素(CRE) 2 种元素来调节的^[17],然而,CYP11B1 的表达是 ACTH 通过 cAMP 和蛋白激酶 A 依赖于 cAMP 响应结合蛋白家族成员(ATF-2)而非 SF-1 来激活的^[18]。DEHP 对 3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD1)的基因表达水平无显著影响,而 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 显著上调了 3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD2)的基因表达水平,3 β 羟化类固醇脱氢酶(3 β -HSD)对包括醛固酮、皮质醇和睾酮在内的所有类固醇激素的生物合成都很重要。3 β -HSD1 和 3 β -HSD2 是定位于染色体 1p13.1 的 2 个基因,编码不同的 3 β -HSD 同工酶^[19]。3 β -HSD1 和 3 β -HSD2 的 DNA 序列和编码序列之间的内含子部分高度同源^[20]。这说明尽管 H295R 细胞 3 β -HSD1 和 3 β -HSD2 在基因序列和酶的功能具有很大的相似性,但它们的表达调节模式可能不同。然而各 MEHP 处理组显著下调了 H295R 细胞 3 β -HSD1 和

3 β -HSD2 基因表达水平。DEHP 对 H295R 细胞芳香化酶 CYP19a 的基因表达水平无显著影响,而各 MEHP 处理组显著下调了 H295R 细胞 CYP19a 基因表达水平。CYP19a 是负责将雄激素转化为雌激素的最后步骤限速酶,最近很多研究提出具有改变 CYP19 活性能力的化合物具有内分泌干扰效应^[21],所以 MEHP 具有内分泌干扰效应。

DEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成过程中其他的关键酶和调节因子的基因表达水平无显著改变。然而 10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 染毒 H295R 24 h 显著下调了 CYP21 基因表达水平,CYP21 基因产物是在醛固酮和皮质类固醇合成过程中需要的酶,这种酶的缺失可导致不产生皮质醇和醛固酮^[22]。并且,各 MEHP 处理组显著下调了 CYP17 的基因表达水平,CYP17 催化了醛固酮向皮质类固醇底物的转化并最终向性固醇激素底物的转化,MEHP 通过抑制 CYP17 的基因表达可能抑制了性固醇激素底物的合成,一些化合物如酮康唑(ketoconazole)也同时抑制 CYP21 和 CYP17 的基因表达水平^[23]。17 β -HSD 是类固醇合成酶的一个相对较大的家族,17 β -HSD1 催化还原反应,17 β -HSD1 将雌酮转化为生物学活性更强的 17 β 雌二醇,相反,17 β -HSD4 是将生物学活性较强的类固醇如雌二醇转换为生物学活性较弱的类固醇如雌酮的氧化酶^[24]。100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 显著抑制 17 β -HSD1 的基因表达水平,可能导致雌酮向雌二醇的转化受到抑制。而各 MEHP 处理组显著抑制 17 β -HSD4 的基因表达水平,可能抑制雌二醇转换为雌酮。许多化合物如异黄酮等也抑制 17 β -HSD 的表达水平^[24]。10 和 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ MEHP 染毒 H295R 24 h 显著抑制 STAR 的基因表达水平,从而可能抑制胆固醇从线粒体外膜向线粒体内膜的转运,从而影响类固醇激素的合成。

3.2 DEHP 及 MEHP 干扰 H295R 细胞类固醇合成机制的异同点

DEHP 和 MEHP 对类固醇激素合成相关基因表达的影响既有相同之处又有不同之处。在本研究中 DEHP 和 MEHP 都显著上调了 CYP11B2 的基因表达水平,而对 CYP11B1 基因表达水平无显著影响。DEHP 对 3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD1)的基因表达水平无显著影响,而 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DEHP 显著上调了 3- β 羟基类固醇脱氢酶(3 β -HSD2)的基因表达水平,然而各 MEHP 处理组显著下调了 H295R 细胞 3 β -HSD1 和 3 β -HSD2 基因表达水平。DEHP 对

H295R 细胞芳香化酶 CYP19a 的基因表达水平无显著影响,而各 MEHP 处理组显著下调了 H295R 细胞 CYP19a 基因表达水平。DEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成过程中其他的关键酶和调节因子的基因表达水平无显著改变。而 MEHP 抑制了 STAR、CYP17、CYP19a、 3β -HSD1、 3β -HSD2、 17β -HSD1、 17β -HSD4、CYP21 基因的表达,所以 MEHP 可以通过抑制 STAR 基因的表达,从而将影响类固醇激素合成前体胆固醇在细胞内的转运;并能显著性抑制类固醇激素合成过程中 CYP17、CYP19a、 3β -HSD1、 3β -HSD2、 17β -HSD1、 17β -HSD4、CYP21 基因的表达,最终将抑制 H295R 细胞中类固醇激素的合成。并且与 DEHP 相比,MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成关键基因表达的影响较明显。所以在评价 DEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成通路影响时,可选择 CYP11B2 和 3β -HSD2 作为分子靶标,而对于评价 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成通路影响时,可选择 STAR、CYP17、CYP19a、 3β -HSD1、 3β -HSD2、 17β -HSD1、 17β -HSD4、CYP21 基因作为分子靶标。类似地,文献研究显示 MEHP 暴露囊状卵泡导致类固醇激素合成过程涉及的关键酶 CYP19A1、 3β -HSD1、STAR、CYP11A1、CYP17A1、 17β -HSD1 mRNA 水平,最终导致睾酮、雌酮和雌二醇水平下降^[25],该研究结果也显示 DEHP 和 MEHP 对类固醇激素合成过程的干预模式是不同的。一些文献研究也报道 DEHP 的毒性效应是由 MEHP 介导的,体外 MEHP 暴露抑制了类固醇激素合成^[26-27]。体内实验研究显示围产期暴露于 DEHP 下调了睾丸间质细胞类固醇激素合成相关基因如 StAR、Cyp11a1、 3β -HSD、 17β -HSD 和 Cyp-19 等的表达,从而显著降低血清睾酮和雌二醇水平并导致内分泌干扰生殖毒性效应^[28]。然而,也有报道显示体外研究中低剂量 DEHP 和 MEHP($0.001 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $0.1 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)暴露 MLTC-1 细胞增加了类固醇激素合成相关基因 CYP11A1、CYP17 和 3β -HSD 从而刺激了睾酮的分泌^[29],这种研究结果的差异可能是由于种属差异导致的。DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成相关基因表达水平影响的差异可能是由于 DEHP 在 H295R 细胞内并非完全发生代谢转化为 MEHP,H295R 细胞体内负责将 DEHP 转化为 MEHP,次级代谢产物的代谢酶如乙醛脱氢酶、酒精脱氢酶和脂蛋白酯酶的水平 and 活性受到 DEHP 暴露的影响,DEHP 代谢转化为 MEHP 的转化率以

及 MEHP 进一步代谢转化为其他次级代谢产物的转化率需要进一步的研究,以便解释 DEHP 和 MEHP 对类固醇生成相关基因表达影响的差异机制。

对比 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成通路的影响,可知 DEHP 和 MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成通路相关酶、因子和受体基因表达水平的影响不同,并且与 DEHP 相比,MEHP 对 H295R 细胞类固醇激素合成关键基因表达的影响较明显。

通讯作者简介:李灿(1987—),男,博士,教授,研究方向为有害生物控制与资源利用。

参考文献 (References):

- [1] Oehlmann J, Oetken M, Schulte-Oehlmann U. A critical evaluation of the environmental risk assessment for plasticizers in the freshwater environment in Europe, with special emphasis on bisphenol A and endocrine disruption [J]. *Environmental Research*, 2008, 108(2): 140-149
- [2] Tsutsumi O. Assessment of human contamination of estrogenic endocrine-disrupting chemicals and their risk for human reproduction [J]. *Journal of Steroid Biochemistry and Molecular Biology*, 2005, 93(2-5): 325-330
- [3] Wang Y, Yang Q, Liu W, et al. DEHP exposure in utero disturbs sex determination and is potentially linked with precocious puberty in female mice [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2016, 307: 123-129
- [4] Ha M, Guan X, Wei L, et al. Di-(2-ethylhexyl) phthalate inhibits testosterone level through disturbed hypothalamic-pituitary-testis axis and ERK-mediated 5α -Reductase 2 [J]. *Science of the Total Environment*, 2016, s563-564: 566-575
- [5] Guo Y, Kannan K. Comparative assessment of human exposure to phthalate esters from house dust in China and the United States [J]. *Environmental Science & Technology*, 2011, 45(8): 3788-3794
- [6] Guo Z, Wei D, Wang M, et al. Determination of six phthalic acid esters in orange juice packaged by PVC bottle using SPE and HPLC-UV: Application to the migration study [J]. *Journal of Chromatographic Science*, 2010, 48(9): 760-765
- [7] Zimmermann S, Gruber L, Schlummer M, et al. Determination of phthalic acid diesters in human milk at low ppb levels [J]. *Food Additives & Contaminants Part A Chemistry Analysis Control Exposure & Risk Assessment*, 2012, 29(11): 1780-1790
- [8] Wittassek M, Koch H M, Angerer J, et al. Assessing ex-

- posure to phthalates—The human biomonitoring approach [J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2011, 55(1): 7-31
- [9] Wittassek M, Angerer J. Phthalates: Metabolism and exposure [J]. *International Journal of Andrology*, 2008, 31(2): 131-138
- [10] Wang W, Craig Z R, Basavarajappa M S, et al. Di (2-ethylhexyl) phthalate inhibits growth of mouse ovarian antral follicles through an oxidative stress pathway [J]. *Toxicology & Applied Pharmacology*, 2012, 258(2): 288-295
- [11] Harvey P W, Everett D J, Springall C J. Adrenal toxicology: A strategy for assessment of functional toxicity to the adrenal cortex and steroidogenesis [J]. *Journal of Applied Toxicology JAT*, 2010, 27(2): 103-115
- [12] Villeneuve D L, Ankley G T, Makynen E A, et al. Comparison of fathead minnow ovary explant and H295R cell-based steroidogenesis assays for identifying endocrine-active chemicals [J]. *Ecotoxicology & Environmental Safety*, 2007, 68(1): 20-32
- [13] Bláha L, Hilscherová K, Mazurová E, et al. Alteration of steroidogenesis in H295R cells by organic sediment contaminants and relationships to other endocrine disrupting effects [J]. *Environment International*, 2006, 32(6): 749-757
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method [J]. *Methods*, 2001, 25(4): 402-408
- [15] Mw V D D, Rijk J C, Kampman E, et al. Steroid hormone related effects of marine persistent organic pollutants in human H295R adrenocortical carcinoma cells [J]. *Toxicology in Vitro An International Journal Published in Association with Bibra*, 2015, 29(4): 769-778
- [16] Zhang X, Yu R M, Jones P D, et al. Quantitative RT-PCR methods for evaluating toxicant-induced effects on steroidogenesis using the H295R cell line [J]. *Environmental Science & Technology*, 2005, 39(8): 2777-2785
- [17] Lehoux J G, Dupuis G, Lefebvre A. Control of CYP11B2 gene expression through differential regulation of its promoter by atypical and conventional protein kinase C isoforms [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(11): 8021-8028
- [18] Wang X L, Bassett M, Zhang Y, et al. Transcriptional regulation of human 11beta-hydroxylase (hCYP11B1) [J]. *Endocrinology*, 2000, 141(10): 3587-3594
- [19] Simard J, Durocher F, Mébarki F, et al. Molecular biology and genetics of the 3 beta-hydroxysteroid dehydrogenase/delta5-delta4 isomerase gene family [J]. *Endocrine Reviews*, 1996, 26(4): 525-582
- [20] McBride M W, Mcvie A J, Burridge S M, et al. Cloning, expression, and physical mapping of the 3beta-hydroxysteroid dehydrogenase gene cluster (HSD3BP1-HSD3BP5) in human [J]. *Genomics*, 1999, 61(3): 277-284
- [21] Heneweer M, Berg M V D, Sanderson J T. A comparison of human H295R and rat R2C cell lines as *in vitro* screening tools for effects on aromatase [J]. *Toxicology Letters*, 2004, 146(2): 183-194
- [22] Richmond E J, Flickinger C J, McDonald J A, et al. Lipoid congenital adrenal hyperplasia (CAH): Patient report and a mini-review [J]. *Clinical Pediatrics*, 2001, 40(7): 403-407
- [23] Lund B O. Effects of 3-MeSO₂-DDE and some CYP inhibitors on glucocorticoid steroidogenesis in the H295R human adrenocortical carcinoma cell line [J]. *Toxicology in Vitro An International Journal Published in Association with Bibra*, 2002, 16(2): 113-121
- [24] Whitehead S A, Rice S. Endocrine-disrupting chemicals as modulators of sex steroid synthesis [J]. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2006, 20(1): 45-61
- [25] Hannon P R, Brannick K E, Wang W, et al. Mono(2-ethylhexyl) phthalate accelerates early folliculogenesis and inhibits steroidogenesis in cultured mouse whole ovaries and antral follicles [J]. *Biology of Reproduction*, 2015, 92(5): 120
- [26] Reinsberg J, Wegener-Topper P, van der Ven K, et al. Effect of mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroid production of human granulosa cells [J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2009, 239: 116-123
- [27] Inada H, Chihara K, Yamashita A, et al. Evaluation of ovarian toxicity of mono-(2-ethylhexyl) phthalate (MEHP) using cultured rat ovarian follicles [J]. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2012, 37: 483-490
- [28] Sekaran S, Jagadeesan A. In utero exposure to phthalate downregulates critical genes in Leydig cells of F1 male progeny [J]. *Journal of Cellular Biochemistry*, 2015, 116(7): 1466-1477
- [29] Chen X, Zhou Y N, Zhou Q H, et al. Effects of low concentrations of di-(2-ethylhexyl) and mono-(2-ethylhexyl) phthalate on steroidogenesis pathways and apoptosis in the murine Leydig tumor cell line MLTC-1 [J]. *Biomedical and Environmental Sciences*, 2013, 26(12): 986-989 ◆