

DOI: 10.7524/AJE.1673-5897.20220314002

李思琦, 许彤, 徐丽, 等. 人乳腺癌细胞(MCF-7)中溴代咔唑与雌激素受体和芳香烃受体的交叉作用[J]. 生态毒理学报, 2022, 17(5): 13-23

Li S Q, Xu T, Xu L, et al. Cross-talk of bromocarbazoles between estrogen receptor pathway and aryl hydrocarbon receptor pathway in human breast cancer cells (MCF-7 cells) [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2022, 17(5): 13-23 (in Chinese)

人乳腺癌细胞 (MCF-7) 中溴代咔唑与雌激素受体和芳香烃受体的交叉作用

李思琦^{1,2}, 许彤¹, 徐丽¹, 陈旻升¹, 郑丽萍^{1,3,4}, 谢群慧¹, 赵斌^{1,2,*}

1. 中国科学院生态环境研究中心, 环境化学与生态毒理学国家重点实验室, 北京 100085

2. 中国科学院大学中丹学院, 北京 100049

3. 生态环境部南京环境科学研究所, 南京 210042

4. 国家环境保护土壤环境管理与污染控制重点实验室, 南京 210042

收稿日期: 2022-03-14 录用日期: 2022-04-20

摘要: 卤代咔唑是一类与二噁英结构类似的杂环芳香烃化合物, 在环境和生物体内均有检出。研究表明, 溴代咔唑(bromocarbazoles, BCZs)是具有代表性的卤代咔唑, 有较强的持久性和生物累积性, 且在不同生物体内表现出类二噁英毒性以及内分泌干扰效应, 对人类的健康有潜在风险。研究表明 BCZs 可以在不同细胞中分别激活芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)和雌激素受体(estrogen receptor, ER)。乳腺癌的发生发展不仅与 ER 通路密切相关, 也与 AhR 通路有关, 但在乳腺癌细胞中 BCZs 对 2 种通路的相互作用机制尚不明确。因此, 本研究以 BCZs 对 ER 和 AhR 通路的作用为目标, 有助于我们借助不良结局途径(adverse outcome pathway, AOP), 从分子层面了解 BCZs 对乳腺癌细胞毒理学作用机制。实验选取 5 种 BCZs, 以 ER 阳性的人乳腺癌细胞(MCF-7)为研究对象, 探究 BCZs 在 MCF-7 细胞中对 ER 和 AhR 通路的激活作用, 并筛选激活能力最强的 BCZs, 探究 2 个通路之间的相互作用。结果表明, 1,3,6,8-四溴咔唑(1,3,6,8-tetrabromo-9H-carbazole, 1368-BCZ)可以同时激活 ER 和 AhR 通路, 上调 ER 通路靶基因三叶因子 1(trefoil factor 1, *tff1*)和 AhR 通路靶基因细胞色素 P450 酶 1A1(cytochrome P450 1A1, *cyp1a1*)和细胞色素 P450 酶 1B1(cytochrome P450 1B1, *cyp1b1*)的表达水平; 1368-BCZ 对 ER 通路的激活部分依赖于 *ahr* 的介导, 而干扰 ER 通路的激活作用后, AhR 通路下游代表性目的基因的表达水平提高。因此, 1368-BCZ 是一种可以同时激活 ER 和 AhR 通路的 BCZs, 且被激活的 ER 和 AhR 通路之间存在相互作用。本实验补充了 BCZs 在 ER 阳性乳腺癌细胞中的可能作用机制, 为新型污染物 BCZs 的毒性效应机制研究提供了数据支持。

关键词: 溴代咔唑; 人乳腺癌细胞; 毒性效应; 雌激素受体通路; 芳香烃受体通路

文章编号: 1673-5897(2022)5-013-11 中图分类号: X171.5 文献标识码: A

Cross-talk of Bromocarbazoles between Estrogen Receptor Pathway and Aryl Hydrocarbon Receptor Pathway in Human Breast Cancer Cells (MCF-7 Cells)

Li Siqui^{1,2}, Xu Tong¹, Xu Li¹, Chen Yangsheng¹, Zheng Liping^{1,3,4}, Xie Qunhui¹, Zhao Bin^{1,2,*}

1. State Key Laboratory of Environmental Chemistry and Ecotoxicology, Research Center for Eco-Environmental Sciences, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100085, China

2. Sino-Danish College, University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

基金项目: 国家重点研发计划课题(2018YFA0901101, 2018YFA0901103); 国家自然科学基金资助项目(22076216, 21976201, 21836004)

第一作者: 李思琦(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为分子环境毒理学, E-mail: lisiqui19@mails.ucas.ac.cn

* **通讯作者** (Corresponding author), E-mail: binzhao@rcees.ac.cn

3. Nanjing Institute of Environmental Sciences, Ministry of Ecology and Environment of China, Nanjing 210042, China

4. State Environmental Protection Key Laboratory of Soil Environmental Management and Pollution Control, Nanjing 210042, China

Received 14 March 2022 accepted 20 April 2022

Abstract: Polyhalogenated carbazoles are heterocyclic aromatic hydrocarbon compounds with a similar structure to dioxins, which have been detected in environments and organisms. Among them, bromocarbazoles (BCZs) present strong persistence and bioaccumulation potential, and have shown dioxin-like toxicity and endocrine disrupting effects in different organisms, posing potential risks to human health. Studies have shown that BCZs can activate aryl hydrocarbon receptor (AhR) and estrogen receptor (ER) in different types of cells. The ER and AhR pathway are closely related to the occurrence and development of breast cancer. However, the interactions between the ER and AhR pathways induced by BCZs in human breast cancer cells remained unclear. Therefore, the aim of this study is to shed light on the interaction of BCZs with the ER and AhR signaling pathways in breast cancer cells in order to provide a new perspective for clarifying the breast cancer-related adverse outcome pathways that BCZs may trigger. In this study, we selected 5 BCZs to explore the activation effects of BCZs on ER and AhR pathways in ER-positive human breast cancer cells MCF-7. Interactions between the AhR and ER signaling pathways were also studied for BCZs, which has the strongest receptor activation capabilities. The results showed that 1,3,6,8-tetra-bromo-9H-carbazole (1368-BCZ) activated both ER and AhR pathways, and upregulated the expression of ER pathway target gene trefoil factor 1 (*tff1*) and AhR pathway target genes cytochrome P450 1A1 (*cyp1a1*) and cytochrome P450 1B1 (*cyp1b1*). The activation of the ER pathway induced by 1368-BCZ was partly dependent on the presence of AhR, while the upregulation of the AhR pathway target genes was further enhanced with the addition of ER blocker. Therefore, 1368-BCZ can activate both the ER and AhR pathways and cause interactions between them. This study supplemented the understanding of the action mechanisms of BCZs in ER-positive breast cancer cells.

Keywords: bromocarbazoles; human breast cancer cell; toxic effects; estrogen receptor pathway; aryl hydrocarbon receptor pathway

卤代咔唑是一类杂环芳香烃化合物,根据取代元素不同,可以分为溴取代、氯取代、碘取代和混合取代等。卤代咔唑的主要来源是卤代靛蓝染料工业生产中的副产物^[1]、光电材料的中间体^[2]和除草剂^[3],也有可能是在自然条件下通过生物体内的氯过氧化物酶催化产生^[4]。在北美洲和欧洲等地的土壤和水体底泥中较早检测到不同种类的溴代咔唑(bromocarbazoles, BCZs),例如五大湖中检测到了总量超过3 000 t的卤代咔唑,其中1,3,6,8-四溴咔唑(1,3,6,8-tetrabromo-9H-carbazole, 1368-BCZ)在美国密歇根湖中的含量高达112 ng·g⁻¹^[5];3,6-二溴咔唑(3,6-dibromo-9H-carbazole, 36-BCZ)在德国土壤中的浓度范围是0.2~19.8 ng·g⁻¹^[6]。我国的太湖底泥中也检测到多种BCZs,22个检测位点中的20个位点都检测到36-BCZ,另外,3-溴咔唑(3-bromo-9H-carbazole, 3-BCZ)、2,7-二溴咔唑(2,7-dibromo-9H-carbazole, 27-BCZ)和1,3,6-三溴咔唑(1,3,6-tribromo-9H-carbazole, 136-BCZ)也是较易检出的BCZs种类^[7]。

研究人员预测了具有代表性的卤代咔唑的理化性质,相较于其他种类的BCZs,1368-BCZ在土壤中的半衰期为360 d,在自然环境中具有较大的积累潜力,且具有较高的持久性和生物累积性,毒性方面也具有较强的水生生物毒性;36-BCZ也具有土壤中难生物降解的特性^[8]。另外,在鱼类、海豹和鸟蛋中也检测到了不同浓度的BCZs^[9-12],在鸕鹚蛋中,136-BCZ的含量最高^[11]。由此可见,BCZs已经从环境进入到动物体内,并具有一定的生物积累效应,提示其可能具有潜在的人类暴露风险,因此近年来受到了许多关注。

研究人员对BCZs进行了不同生物体内和体外的相关毒性研究。研究表明1368-BCZ能对乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, AChE)表现出抑制作用,对蚯蚓产生神经毒性^[13]。27-BCZ、36-BCZ和1368-BCZ都对斑马鱼产生了毒性效应:27-BCZ暴露后不仅对斑马鱼肌肉发育产生不良影响,也会导致胚胎脊柱弯曲,还展现出明显的心脏发育毒性等典型的二噁英毒性^[14];36-BCZ暴露可以导致心脏畸形发

育和血液阻塞^[15];1368-BCZ 暴露提高了斑马鱼胚胎畸形率,也会导致心脏轻微变形^[14-15],还能促进活性氧的产生,诱导斑马鱼细胞凋亡^[16]。可见,BCZs 对神经系统、胚胎发育以及重要的生物过程都表现出类二噁英毒性。

BCZs 的类二噁英毒性作用机制的相关研究表明,36-BCZ 可以在大鼠肝癌细胞中通过乙氧基间苯二酚-*o*-脱乙基酶(ethoxyresorufin-*o*-deethylase, EROD)诱导类二噁英活性^[6]。BCZs 可以在稳定感染了含有二噁英反应元件(dioxin response element, DRE)质粒的小鼠的肝癌细胞 CBG2.8D 中激活芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, AhR)通路^[17],还可以在 MDA-MB-468 细胞中上调细胞色素 P450 酶 1A1(cytochrome P450 1A1, *cyp1a1*)和细胞色素 P450 酶 1B1(cytochrome P450 1B1, *cyp1b1*)的基因表达水平^[18]。除 AhR 外,BCZs 还可以作用于其他受体,例如 27-BCZ 和 3-BCZ 能够显著增加大鼠子宫质量和上皮细胞质量;同时对仓鼠卵巢细胞的雌激素受体(estrogen receptor, ER)通路具有一定的激活效应,表现出内分泌干扰效应^[19]。因此,BCZs 还可能通过 ER 通路影响某些生殖系统的疾病,这也是未来健康效应的研究方向。

乳腺癌是全世界各地女性最常见的生殖系统癌症之一。流行病学研究表明,终生暴露于某些雌激素是乳腺癌的已知风险因素^[20]。AhR 也已被报道可以在乳腺癌的发生中发挥作用,例如,乳腺癌细胞中敲除 AhR 可抑制 MCF-7 细胞增殖^[21],大鼠乳腺癌细胞比正常乳腺组织表达更高水平的 AhR^[22]。可见,乳腺癌的发生发展与 ER 和 AhR 通路都有所联系。ER 信号通路与 AhR 信号通路有许多相似之处,AhR 可以通过多种机制与 ER 相互作用^[23],例如 AhR 与 ER 靶基因的启动子结合可以削弱 ER 介导的转录^[24];竞争共同的辅助因子^[25];促进 ER 的降解、抑制 17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)合成^[26];同时,AhR 靶基因的激活也可以被雌激素和雌激素样化合物所抑制^[27]。因此,细胞中 AhR 和 ER 之间的相互作用是复杂的。目前尚不清楚 BCZs 这种新型污染物是否可以在乳腺癌细胞中同时激活 ER 和 AhR 通路从而对乳腺癌产生影响,以及其中复杂的机制和相互作用关系。

BCZs 作为一类新型的环境污染物,在底泥沉积物、土壤甚至动物体内均有检出,具有一定的持久性和生物累积能力;BCZs 也被用于研究多卤代呋啉对

不同生物的毒理学效应,因此探究 BCZs 的毒理学机制具有一定的意义,但目前还缺少系统全面的基于人群的毒理学数据,与人类相关疾病的研究尚不充分。因此,本实验选取 5 种 BCZs 进行研究,分别为 3-BCZ、27-BCZ、36-BCZ、136-BCZ 和 1368-BCZ,借鉴不良结局途径(adverse outcome pathway, AOP)的思路^[28-29],即从某些分子开始,研究关键事件、关键事件的关系以及造成的不良结局,来评估化学物质的效应和危害,对 BCZs 的毒理学机制进行研究。本实验以 ER 和 AhR 这 2 个通路为切入点,首先研究 BCZs 是否可以在 ER 阳性乳腺癌细胞 MCF-7 中激活 ER 和 AhR 通路,筛选出激活能力最强的 BCZs;进一步分别干扰 *ahr* 或 ER 通路,研究具有共激活效应的 BCZs 与 2 个通路之间的交叉作用,明确 BCZs 对乳腺癌细胞的毒理学作用机制,补充 BCZs 的 AOP 相关数据,对于研究新型污染物的毒理效应具有一定的参考价值,也能为 BCZs 的毒性评估提供新的思路。

1 材料与方法 (Materials and methods)

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 购自中国医学科学院细胞资源中心。无酚红高糖 DMEM 培养基、无酚红胰酶、青霉素/链霉素混合物和减血清培养基(Gibco);活性炭处理的胎牛血清(Biological Industries);3-BCZ、27-BCZ、36-BCZ、136-BCZ、1368-BCZ 和四氯二苯并-*p*-二噁英(tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin, TCDD)(Wellington Laboratory);17 β -雌二醇(17 β -estradiol, E2)(Sigma)、二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO)(Sigma),pER-*Luc* Reporter (Yeasen),pGL4.43[*luc2P*/XRE/Hygro] Vector (Promega)。超微量分光光度计(Nanodrop 2000, Thermo),滤光片型多功能酶标仪(Infinite F200 Pro, Tecan),Glomax 多功能检测系统(E7081, Promega),PCR 仪(T100TM, BIO-RAD),qPCR 仪(4485694, Life)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养

MCF-7 细胞所需的完全培养基为无酚红高糖 DMEM 培养基,添加 10% 活性炭处理的胎牛血清和 1% 青霉素/链霉素混合物。MCF-7 细胞在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养,隔天换液一次,在细胞生长至 80% ~ 90% 时用含量为 0.25% 无酚红胰酶消化后按照 1:3 进行传代。

1.2.2 CCK-8 法测细胞毒性

MCF-7 细胞接种于 96 孔板中,贴壁培养 24 h 后,吸出原培养基,向孔中加入含有不同浓度 BCZs 的新培养基,同时设置空白组(只含有细胞和培养基)和对照组(含有细胞、培养基和 0.1% DMSO)。Xu 等^[30]根据密歇根湖中 1368-BCZ 的浓度^[5]经过换算得到浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,本实验依照该环境浓度进行设置,5 种 BCZs 浓度分别为 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、 $10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 和 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,每个浓度设置 6 个复孔。继续培养 24 h 后,每孔加入 10 μL CCK-8 试剂,继续在培养箱孵育 1 h,用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光值。

1.2.3 质粒转化、提取和转染

向感受态细胞中转化含有雌激素反应元件(estrogen response element, ERE)或二噁英反应元件(dioxin response element, DRE)序列的质粒,转化后的细胞进行扩增培养。质粒提取采用 GeneJET Plasmid Maxiprep Kit (Thermo)试剂盒。质粒转染采用 Lipofectamine LTX and PlusTM Reagent (Thermo)试剂盒,转染 12 h。转染的质粒用于双荧光素酶报告基因检测中判定 BCZs 对 ERE 或 DRE 的激活作用。

1.2.4 双荧光素酶报告基因检测

双荧光素酶报告基因检测使用 Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Kit (Promega)试剂盒。96 孔板倒掉培养基,加入 150 μL 磷酸缓冲液淋洗,轻轻敲打。去除磷酸缓冲液后,用白色胶纸密封 96 孔板底部。每孔加入 50 μL 细胞裂解液(1 \times),放至振荡

器上避光振荡 15 min。使用 Glomax 多功能检测系统进行检测。

1.2.5 实时荧光定量 PCR(qPCR)法检测基因表达水平

使用 Gene JET RNA Purification Kit (Thermo)试剂盒提取总 RNA。用超微量分光光度计测量总 RNA 浓度,计算所需总 RNA 体积。反转录过程按照 RevertiAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo)试剂盒说明书进行。检测的基因分别为:三叶因子家族 1(trefoil factor family 1, *tff1*)、芳香烃受体(aryl hydrocarbon receptor, *ahr*)、*cyp1a1* 和 *cyp1b1*。*tff1* 是 ER 通路靶基因^[31-32],*cyp1a1* 和 *cyp1b1* 是 AhR 通路经典靶基因^[33-34]。引物序列基于 GenBank 获得的序列,采用 Primer-BLAST 设计引物并进行验证,由生工生物科技公司合成,引物序列如表 1 所示。按照说明书在 qPCR 仪中设定程序进行实验。qPCR 实验以甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, *gapdh*)为内参,用 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 方法进行数据计算^[35]。

1.2.6 siRNA 干扰 *ahr* 表达

siRNA 由 SyngenTech 公司(北京)设计合成,siRNA 的终浓度为 $2 \times 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,序列如表 2 所示。按照 RNAiMAX Transfection Reagent (Invitrogen)转染试剂盒说明书进行转染。BCZs 的暴露浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,TCDD 和 E2 暴露浓度为 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$,暴露 24 h 后再测定 *ahr* 和 *tff1* 的基因表达水平。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因 Gene	引物序列(5' ~ 3')	
	Primer sequences (5' ~ 3')	
<i>gapdh</i>	(F) AGTCCTTCCACGATACCAAAGT	(R) CATGAGAAGTATGACAACAGCCT
<i>tff1</i>	(F) TCCTGAGTGAACGAACAGAGC	(R) CACTTCTCAACCACCCGGAC
<i>ahr</i>	(F) AACATCACCTACGCCAGTCG	(R) GGTCTCTATGCCGCTTGGA
<i>cyp1a1</i>	(F) TAGACACTGATCTGGCTGCAG	(R) GGGAAGGCTCCATCAGCATC
<i>cyp1b1</i>	(F) TCCAGCTTTGTGCCTGTCACTAT	(R) CTTCACTGGGTCATGATTCACAGA

表 2 siRNA 序列

Table 2 siRNA sequence

基因 Gene	干扰 RNA 序列(5' ~ 3')	
	siRNA sequence (5' ~ 3')	
Negative control (NC)	(F) UUCUCCGAACGUGUCACGUTT	(R) ACGUGACACGUCGGAGAATT
<i>ahr</i>	(F) AGGGAAAGAUGGAUCAAUATT	(R) UAUUGAUCCAUCUUCCUTT

1.2.7 ICI-182780(ICI)拮抗 ER 通路

实验组按照体积比 1 : 1 000 用 $10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 雌激素拮抗剂 ICI 预处理 3 h, 对照组用 0.1% DMSO 预处理 3 h。BCZs 暴露浓度为 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, TCDD 为 $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 按照体积比 1:1 000 添加, 暴露 24 h 后再测定 AhR 通路下游相关基因表达水平。

1.2.8 数据统计分析

数据统计和分析使用 GraphPad prism 软件(version 6, La Jolla, CA)。实验进行 3 次独立重复, 实验结果表示为均值 \pm SEM ($n=3$)。数据统计采用单向或双向方差分析, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$, **** 表示 $P<0.0001$ 。

2 结果 (Results)

2.1 细胞毒性检测

5 种 BCZs 与 TCDD 的结构式如图 1 所示。采用 CCK-8 法检测 BCZs 暴露对 MCF-7 细胞毒性的

影响。由图 2 可知, 在 3 种浓度暴露 24 h 条件下, 5 种 BCZs 对 MCF-7 细胞均不产生细胞毒性, 因此选取最高浓度 $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 作为后续实验的暴露浓度。

2.2 BCZs 对 ER 通路的激活作用

通过含 ERE 序列的双荧光素酶报告基因检测以及 ER 通路下游 *tff1* 基因表达水平, 来评估 MCF-7 细胞中 BCZs 对 ER 通路的激活作用。5 种 BCZs 中, 1368-BCZ 能够显著激活 ERE(图 3(a)); 36-BCZ、136-BCZ 和 1368-BCZ 都能使 *tff1* 的基因表达水平显著升高, 其中最为显著的是 136-BCZ, 其次为 1368-BCZ(图 3(b))。因此, 对 ER 通路激活作用较强的是 1368-BCZ。

2.3 BCZs 对 AhR 通路的激活作用

AhR 信号通路的激活也是通过含 DRE 序列的双荧光素酶报告基因检测以及 AhR 通路下游经典靶基因 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 的表达来体现。5 种 BCZs 中, 对 DRE 激活能力最强的是 1368-BCZ(图 4(a));

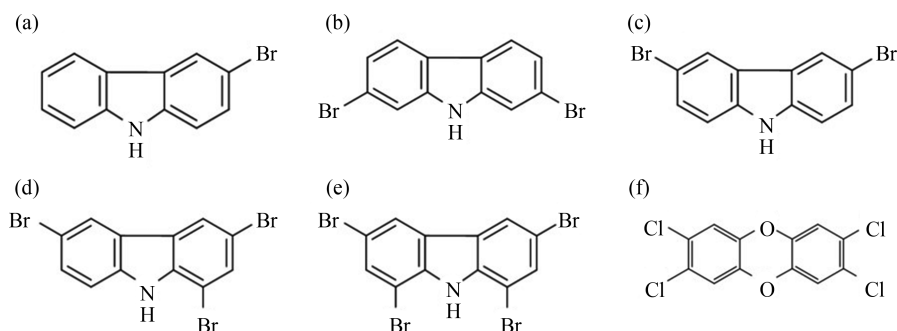


图 1 BCZs 和 TCDD 结构式

注: BCZs 表示溴代呋唑, TCDD 表示四氯二苯并-*p*-二噁英; (a) 3-BCZ, (b) 27-BCZ, (c) 36-BCZ, (d) 136-BCZ, (e) 1368-BCZ, (f) TCDD。

Fig. 1 Structure formulas of BCZs and TCDD

Note: BCZs stands for bromocarbazoles and TCDD stands for tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin; (a) 3-BCZ, (b) 27-BCZ, (c) 36-BCZ, (d) 136-BCZ, (e) 1368-BCZ, (f) TCDD.

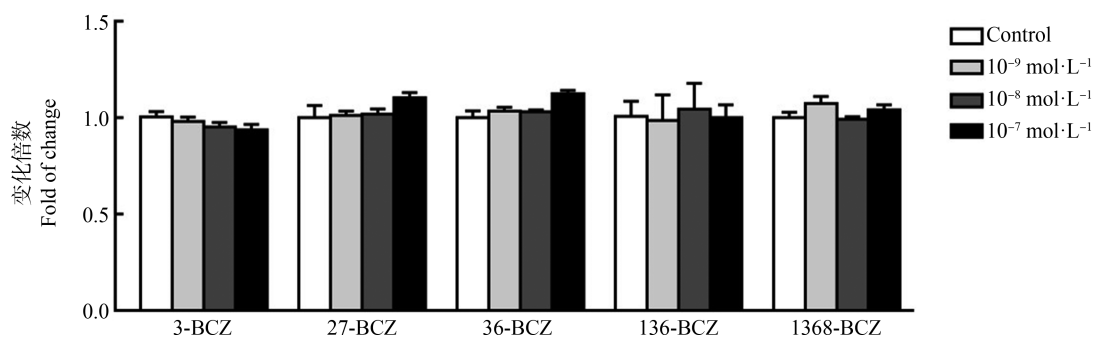


图 2 BCZs 的细胞毒性检测

注: 对照组添加 0.1% DMSO, DMSO 表示二甲基亚砷。

Fig. 2 Cytotoxicity of BCZs

Note: Control group is 0.1% DMSO and DMSO stands for dimethyl sulfoxide.

同样,1368-BCZ能使 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 的基因表达水平显著升高(图 4(b)和 4(c))。因此,对 AhR 通路激活作用最强的是 1368-BCZ。

由此结果发现,1368-BCZ对 ER 和 AhR 通路均具有较强的激活作用。因此,以 1368-BCZ 为主要研究对象,探讨 1368-BCZ 激活的 ER 和 AhR 通路之间的相互作用。

2.4 ER 通路与 AhR 通路的相互作用

转染 *ahr*-siRNA 后, *ahr* 的表达显著下降, TCDD 引起 *ahr* 表达下降了 75.60%, 1368-BCZ 引起的 *ahr* 表达下降了 74.35%(图 5(a)),说明设计的 siRNA 可以有效干扰 *ahr* 表达。*ahr* 被干扰后, E2 对 *tff1* 的激活并没有受到显著影响,但是 1368-BCZ 激发的 *tff1* 表达相较 NC 对照组下降了 21.25%,具有显著性差

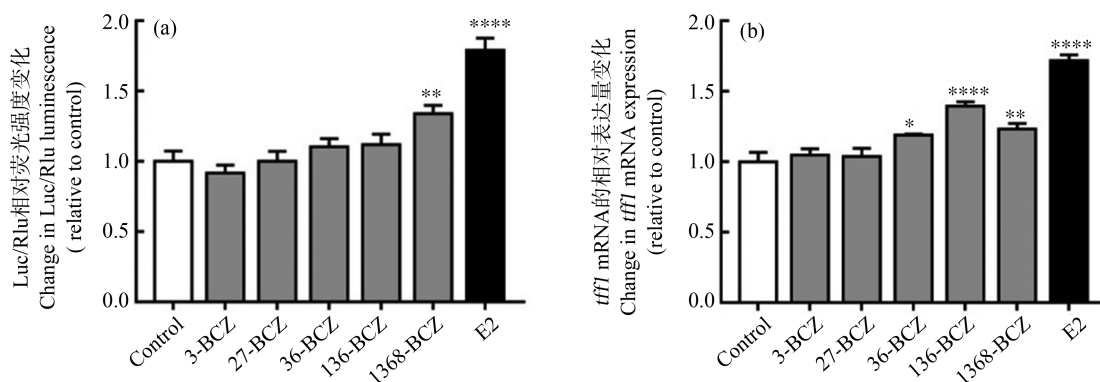


图3 BCZs对雌激素受体(ER)通路的激活

注: E2 代表 17 β -雌二醇; (a) BCZs 与 E2 对雌激素反应元件(ERE)的激活作用; (b) BCZs 和 E2 诱导三叶因子家族 1(*tff1*) 基因表达水平的变化; BCZs 浓度为 10^{-7} mol·L $^{-1}$, E2 浓度为 10^{-9} mol·L $^{-1}$; qPCR 检测以 GAPDH 为内参; 与 0.1% DMSO 对照组相比, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$, **** 表示 $P<0.0001$ 。

Fig. 3 Activation of estrogen receptor (ER) pathway induced by BCZs

Note: E2 stands for 17 β -estradiol; (a) Activation of estrogen response element (ERE) by BCZs and E2; (b) Gene expression level change of trefoil factor family 1 (*tff1*) induced by BCZs and E2; the concentrations of BCZs and E2 were 10^{-7} mol·L $^{-1}$ and 10^{-9} mol·L $^{-1}$, respectively; GAPDH was used as internal control in qPCR; compared with 0.1% DMSO control group, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$, and **** represents $P<0.0001$.

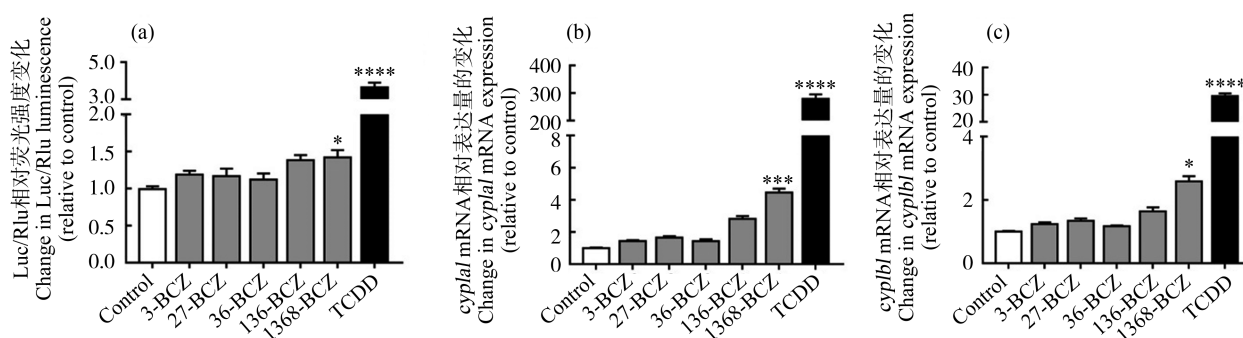


图4 BCZs对芳香烃受体(AhR)通路的激活

注: (a) BCZs 与 TCDD 对二噁英反应元件(DRE)的激活作用; BCZs 和 TCDD 诱导 (b) 细胞色素 P450 酶 1A1(*cyp1a1*) 和 (c) 细胞色素 P450 酶 1B1(*cyp1b1*) 基因的表达水平变化; BCZs 浓度为 10^{-7} mol·L $^{-1}$, TCDD 浓度为 10^{-9} mol·L $^{-1}$; qPCR 检测以 GAPDH 为内参; 与 0.1% DMSO 对照组相比, * 表示 $P<0.05$, ** 表示 $P<0.01$, *** 表示 $P<0.001$, **** 表示 $P<0.0001$ 。

Fig. 4 Activation of AhR pathway induced by BCZs

Note: (a) Activation of dioxin response element (DRE) by BCZs and TCDD; gene expression level change of (b) cytochrome P450 1A1 (*cyp1a1*) and (c) cytochrome P450 1B1 (*cyp1b1*) induced by BCZs and TCDD; the concentrations of BCZs and TCDD were 10^{-7} mol·L $^{-1}$ and 10^{-9} mol·L $^{-1}$, respectively; GAPDH was used as internal control in qPCR; compared with 0.1% DMSO control group, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$, and **** represents $P<0.0001$.

异(图5(b))。

ICI处理后,1368-BCZ可以显著上调MCF-7细胞中 *cyp1a1*(图6(a))和 *cyp1b1*(图6(b))的表达水平,

其中, *cyp1a1* 表达提升至4.17倍, *cyp1b1* 表达提升至1.40倍。另外,ICI拮抗后, *ahr* 表达水平也所有提升,是原来的2.05倍(图6(c))。

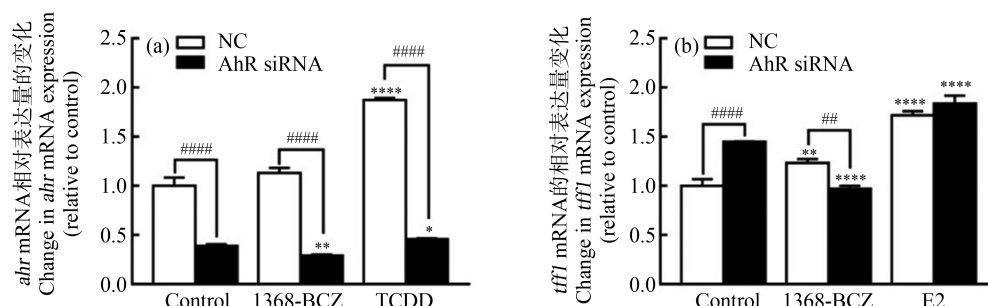


图5 *ahr*对ER通路的影响

注:siRNA处理后(a) *ahr*和(b) *tff1*基因表达的变化;1368-BCZ浓度为 10^{-7} mol·L $^{-1}$,TCDD和E2浓度为 10^{-9} mol·L $^{-1}$;qPCR检测以GAPDH为内参;与0.1% DMSO对照组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$;与NC组相比,#表示 $P<0.05$,##表示 $P<0.01$,###表示 $P<0.001$,####表示 $P<0.0001$ 。

Fig. 5 Effect of *ahr* on ER pathway

Note: Gene expression level change of (a) *ahr* and (b) *tff1* after treated by siRNA; the concentration of 1368-BCZ was 10^{-7} mol·L $^{-1}$ and the concentrations of TCDD and E2 were 10^{-9} mol·L $^{-1}$; GAPDH was used as internal control in qPCR; compared with 0.1% DMSO control group, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$, and **** represents $P<0.0001$; compared with NC group, # represents $P<0.05$, ## represents $P<0.01$, ### represents $P<0.001$, and #### represents $P<0.0001$.

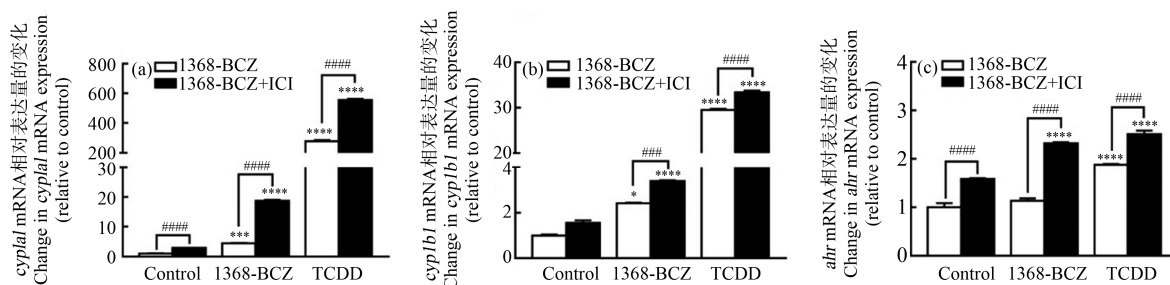


图6 ER通路对AhR通路的影响

注:ICI预处理后(a) *cyp1a1*、(b) *cyp1b1*和(c) *ahr*的基因表达水平变化;1368-BCZ浓度为 10^{-7} mol·L $^{-1}$,TCDD浓度为 10^{-9} mol·L $^{-1}$;qPCR检测以GAPDH为内参;与0.1% DMSO对照组相比,*表示 $P<0.05$,**表示 $P<0.01$,***表示 $P<0.001$,****表示 $P<0.0001$;ICI预处理组与DMSO预处理组对比,#表示 $P<0.05$,##表示 $P<0.01$,###表示 $P<0.001$,####表示 $P<0.0001$ 。

Fig. 6 Effect of ER pathway on AhR pathway

Note: Gene expression level change of (a) *cyp1a1*, (b) *cyp1b1* and (c) *ahr* after treated by ICI; the concentrations of 1368-BCZ and TCDD were 10^{-7} mol·L $^{-1}$ and 10^{-9} mol·L $^{-1}$, respectively; GAPDH was used as internal control in qPCR; compared with 0.1% DMSO control group, * represents $P<0.05$, ** represents $P<0.01$, *** represents $P<0.001$, and **** represents $P<0.0001$; compared between ICI and DMSO pre-treatment group, # represents $P<0.05$, ## represents $P<0.01$, ### represents $P<0.001$, and #### represents $P<0.0001$.

3 讨论 (Discussion)

本实验以ER阳性乳腺癌细胞MCF-7为实验对象,选取5种BCZs在 10^{-7} mol·L $^{-1}$ 的浓度下暴露24h,探究BCZs对ER和AhR通路的激活作用,并筛选激活作用最显著的BCZs探究通路间的相互作用。分析双荧光素酶报告基因检测结果(图3(a))和

图4(a))以及ER通路下游 *tff1*(图3(b))和AhR通路下游 *cyp1a1*和 *cyp1b1*基因的表达结果(图4(b))和图4(c)),1368-BCZ可以同时激活ER和AhR通路并上调2个通路下游基因的表达水平。BCZs在稳定转染了含有DRE序列的小鼠肝癌细胞CBG 2.8D中也可以激活AhR通路, Ma等^[7]通过分子对接实验

发现,BCZs均与小鼠 AhR 的配体结合域形成了稳定结合构象,表明 BCZs 也可能是 AhR 的一种配体。文献表明,内源或者外源 AhR 的配体也可以激活 ER 通路,在 MCF-7 细胞中表现出对 2 个通路的激活作用,外源配体如吡啶[3,2-b]咪唑^[36]、6-甲基-1,3,8-三氯代二苯并咪唑、3,39-二吡啶甲烷、苯并[a]芘和多氯联苯^[37];内源配体如植物激素染料木素、大豆黄酮、S-雌马酚和甘草素^[38]。这些具有共激活能力的物质,对乳腺癌细胞的毒理学效应也不尽相同,例如染料木素、大豆黄酮和白杨素等植物雌激素可以抑制乳腺癌细胞的增殖^[39];苯并[a]芘可以干扰 DNA 甲基化^[40]。由于 1368-BCZ 对 ER 和 AhR 通路及下游基因都有显著的激活作用,也可以列为具有共激活能力的物质。这也为今后研究 BCZs 与这些化合物的共性和差异性,以及是否能产生类似的毒理学效应提供思路 and 方向。

1368-BCZ 在 MCF-7 细胞中对 ER 和 AhR 通路的激活作用最为显著,可能与其卤族元素取代个数较多和本身理化性质较强有关。结构方面,1368-BCZ 拥有 4 个卤素取代个数,Riddell 等^[18]在三阴乳腺癌细胞 MDA-MB-468 中发现 1368-BCZ 和 2367-CCZ 比取代个数较少的卤代咪唑更能诱导 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 基因的表达。理化性质方面,根据 Mumbo 等^[8]的预测结果,1368-BCZ 相对于其他 BCZs 在自然环境中具有较高的持久性、生物累积性和水生生物毒性。其他毒理学研究也表明 1368-BCZ 具有较强的毒性,例如高胚胎畸形率^[44],引起氧化应激反应以及 DNA 损伤,诱导斑马鱼细胞凋亡^[46],还可以抑制 AChE 并对蚯蚓产生神经毒性^[13]。我们的实验结果同样证明了 1368-BCZ 在 MCF-7 细胞中对 ER 和 AhR 通路的激活作用比其他低取代个数的 BCZs 效果更强,但是高取代咪唑可引起较强的毒理学效应的机制仍然不清楚。

ER 与 AhR 的交叉作用十分复杂。接下来,本研究选取对 2 个通路均有显著激活作用的 1368-BCZ 进行后续 ER 和 AhR 通路交叉作用的研究。使用 siRNA 对 MCF-7 细胞中的 *ahr* 进行干扰后,1368-BCZ 暴露后 ER 通路经典靶基因 *tff1* 的表达下降(图 5(b)),说明 1368-BCZ 的雌激素效应部分依赖于 *ahr*。相关研究表明,在 T47D 乳腺癌细胞中,AhR 的异源二聚体芳香烃受体核转运因子(aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, ARNT)可以作为 ER 通路的辅助因子,结合在 TFF1 的启动子区

域^[41];但也有研究表明 AhR 可以从不同途径对 ER 产生抑制作用^[23]。用 ICI-182780 拮抗 ER 通路后,1368-BCZ 激活的 AhR 通路中,*cyp1a1* 和 *cyp1b1* 的表达水平显著提高(图 6(a)和 6(b)),说明 ER 通路的激活对 AhR 通路相关基因的表达产生了一定的抑制。这种抑制作用可能是由于 ER 的激活抑制了 *ahr* 的表达,因为在 ER 被拮抗后,*ahr* 的基因表达水平也显著提升(图 6(c))。因此,1368-BCZ 作为可以同时激活 ER 和 AhR 通路的一种污染物质,其激活的 AhR 通路对 ER 通路有一定促进作用,而激活的 ER 通路对 AhR 通路又有一定抑制作用。相关研究也有发现,共激活物质对 ER 通路的激活会抑制 AhR 通路下游基因的表达。当 ER α 被 ICI 抑制或被 siRNA 干扰时,染料木素、大豆黄酮、S-雌马酚和甘草素这些植物雌激素可以使 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 的表达水平增加^[38]。对于这些共激活物质的研究大多是以 ER 对 AhR 通路的抑制作用为主,AhR 对 ER 通路的影响研究相对较少,本实验补充了这一方面的相关研究结果。我们同样也发现,AhR 通路对 E2 激活的 ER 通路没有显著影响(图 5(b)),这可能由于 E2 是 ER 通路作用效果较为专一的强配体^[38],ER 通路对 AhR 通路的抑制作用占了主导,因此并没有表现出 AhR 通路对其的促进作用。与之类似的是,TCDD 是 AhR 的强配体,具有极高的结合能力,只有当 AhR 表达缺失的时候,TCDD 才可以表现出弱雌激素效应^[42]。

综上所述,BCZs 这类新型污染物在乳腺癌细胞 MCF-7 中可以同时激活 ER 和 AhR 通路,其中效应最为显著的是 1368-BCZ,表明了 1368-BCZ 是最具有潜力的 ER 和 AhR 激动剂。1368-BCZ 激活的 AhR 通路有助于 ER 通路靶基因 *tff1* 表达水平的提高,而 1368-BCZ 激活的 ER 通路可以抑制 AhR 通路靶基因 *cyp1a1* 和 *cyp1b1* 的表达,在 ICI 处理后,这种抑制作用被解除。ER 和 AhR 通路都可以影响乳腺癌的发生和发展,雌激素可以通过 ER 通路促进 ER 阳性乳腺癌细胞的增殖,一些药物如他莫昔芬可以治疗 ER 阳性乳腺癌^[43-44];MCF-7 细胞中敲除 AhR 也会抑制细胞增殖^[21]。本研究有助于人们更好地了解作为 ER 和 AhR 激动剂的 BCZs 的毒理学机制,为研究乳腺癌细胞中 ER 和 AhR 通路之间的交叉作用提供了数据,也为今后研究 BCZs 对乳腺癌细胞的毒理学效应打下基础。

通讯作者简介:赵斌(1975—),男,博士,教授,主要研究方向

为分子环境毒理学。

参考文献 (References):

- [1] Parette R, McCrindle R, McMahon K S, et al. Halogenated indigo dyes: A likely source of 1,3,6,8-tetrabromocarbazole and some other halogenated carbazoles in the environment [J]. *Chemosphere*, 2015, 127: 18-26
- [2] Karon K, Lapkowski M, Juozas G. Electrochemical and UV-Vis/ESR spectroelectrochemical properties of polymers obtained from isomeric 2,7- and 3,6- linked carbazole trimers; influence of the linking topology on polymers properties [J]. *Electrochimica Acta*, 2014, 123: 176-182
- [3] Amine-Khodja A, Boukamh A, Boule P. Photochemical behaviour of phenylurea herbicides [J]. *Photochemical & Photobiological Sciences*, 2004, 3(2): 145-156
- [4] Mumbo J, Lenoir D, Henkelmann B, et al. Enzymatic synthesis of bromo- and chlorocarbazoles and elucidation of their structures by molecular modeling [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2013, 20(12): 8996-9005
- [5] Guo J H, Li Z N, Ranasinghe P, et al. Spatial and temporal trends of polyhalogenated carbazoles in sediments of upper great lakes: Insights into their origin [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(1): 89-97
- [6] Mumbo J, Pandelova M, Mertes F, et al. The fingerprints of dioxin-like bromocarbazoles and chlorocarbazoles in selected forest soils in Germany [J]. *Chemosphere*, 2016, 162: 64-72
- [7] Wu Y, Qiu Y L, Tan H L, et al. Polyhalogenated carbazoles in sediments from Lake Tai (China): Distribution, congener composition, and toxic equivalent evaluation [J]. *Environmental Pollution*, 2017, 220(Pt A): 142-149
- [8] Mumbo J, Henkelmann B, Abdelaziz A, et al. Persistence and dioxin-like toxicity of carbazole and chlorocarbazoles in soil [J]. *Environmental Science and Pollution Research International*, 2015, 22(2): 1344-1356
- [9] Kaehler S, Williams G A. Distribution of algae on tropical rocky Shores: Spatial and temporal patterns of non-coral-line encrusting algae in Hong Kong [J]. *Marine Biology*, 1996, 125(1): 177-187
- [10] Lee S C, Williams G A, Brown G D. Maculalactone L and three halogenated carbazole alkaloids from *Kyrtuthrix maculans* [J]. *Phytochemistry*, 1999, 52(3): 537-540
- [11] Wu Y, Tan H L, Sutton R, et al. From sediment to top predators: Broad exposure of polyhalogenated carbazoles in San Francisco Bay (U.S.A.) [J]. *Environmental Science & Technology*, 2017, 51(4): 2038-2046
- [12] Wu Y, Tan H L, Zhou C L, et al. Bioaccumulation and spatiotemporal trends of polyhalogenated carbazoles in Great Lakes fish from 2004 to 2016 [J]. *Environmental Science & Technology*, 2018, 52(8): 4536-4545
- [13] 周音巧. 土壤中的 1,3,6,8-四溴咔唑在蚯蚓体内的积累及生态毒性[D]. 杭州: 浙江工业大学, 2019: 37-38
Zhou Y Q. Accumulation and ecotoxicities of 1,3,6,8-tetrabromocarbazole in earthworms (*Eisenia foetida*) from spiked artificial soils [D]. Hangzhou: Zhejiang University of Technology, 2019: 37-38 (in Chinese)
- [14] Ji C Y, Yan L, Chen Y C, et al. Evaluation of the developmental toxicity of 2,7-dibromocarbazole to zebrafish based on transcriptomics assay [J]. *Journal of Hazardous Materials*, 2019, 368: 514-522
- [15] Fang M L, Guo J H, Chen D, et al. Halogenated carbazoles induce cardiotoxicity in developing zebrafish (*Danio rerio*) embryos [J]. *Environmental Toxicology and Chemistry*, 2016, 35(10): 2523-2529
- [16] Zhang J W, Zhang C, Du Z K, et al. Emerging contaminant 1,3,6,8-tetrabromocarbazole induces oxidative damage and apoptosis during the embryonic development of zebrafish (*Danio rerio*) [J]. *Science of the Total Environment*, 2020, 743: 140753
- [17] Ma D, Xie H Q, Zhang W L, et al. Aryl hydrocarbon receptor activity of polyhalogenated carbazoles and the molecular mechanism [J]. *The Science of the Total Environment*, 2019, 687: 516-526
- [18] Riddell N, Jin U H, Safe S, et al. Characterization and biological potency of mono- to tetra-halogenated carbazoles [J]. *Environmental Science & Technology*, 2015, 49(17): 10658-10666
- [19] Yue S Q, Zhang T, Shen Q Q, et al. Assessment of endocrine-disrupting effects of emerging polyhalogenated carbazoles (PHCZs): *In vitro*, *in silico*, and *in vivo* evidence [J]. *Environment International*, 2020, 140: 105729
- [20] Hsieh C C, Lambe M, Trichopoulos D, et al. Early life exposure to oestrogen and testicular cancer risk: Evidence against an aetiological hypothesis [J]. *British Journal of Cancer*, 2002, 86(8): 1363-1364
- [21] Salisbury T B, Morris G Z, Tomblin J K, et al. Aryl hydrocarbon receptor ligands inhibit igf-ii and adipokine stimulated breast cancer cell proliferation [J]. *ISRN Endocrinology*, 2013, 2013: 104850
- [22] Trombino A F, Near R I, Matulka R A, et al. Expression of the aryl hydrocarbon receptor/transcription factor (AhR) and AhR-regulated *CYP1* gene transcripts in a rat model of mammary tumorigenesis [J]. *Breast Cancer Re-*

- search and Treatment, 2000, 63(2): 117-131
- [23] 谢昕岑, 于森, 汝少国. 基于 AhR 信号通路的抗雌激素效应及其机制研究进展[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(5): 148-159
- Xie X C, Yu M, Ru S G. Research advances of anti-estrogenic effect based on AhR signaling pathway and its mechanism [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(5): 148-159 (in Chinese)
- [24] Ahmed S, Valen E, Sandelin A, et al. Dioxin increases the interaction between aryl hydrocarbon receptor and estrogen receptor alpha at human promoters [J]. Toxicological Sciences, 2009, 111(2): 254-266
- [25] Shanle E K, Xu W. Endocrine disrupting chemicals targeting estrogen receptor signaling: Identification and mechanisms of action [J]. Chemical Research in Toxicology, 2011, 24(1): 6-19
- [26] Safe S, Wormke M. Inhibitory aryl hydrocarbon receptor-estrogen receptor alpha cross-talk and mechanisms of action [J]. Chemical Research in Toxicology, 2003, 16(7): 807-816
- [27] Beischlag T V, Luis Morales J, Hollingshead B D, et al. The aryl hydrocarbon receptor complex and the control of gene expression [J]. Critical Reviews in Eukaryotic Gene Expression, 2008, 18(3): 207-250
- [28] 张婉君, 范瑞祺, 黄超, 等. 有害结局路径在农药风险评估及管理中的探讨[J]. 生态毒理学报, 2021, 16(6): 60-69
- Zhang W J, Fan R Q, Huang C, et al. Discussion on application of adverse outcome pathway in pesticides risk assessment and management [J]. Asian Journal of Ecotoxicology, 2021, 16(6): 60-69 (in Chinese)
- [29] 李子璇, 杨雪葳, 任利翔, 等. 有机氯农药介导的内分泌干扰相关不良结局通路(AOP)的研究进展[J]. 农药, 2021, 60(10): 703-711
- Li Z X, Yang X W, Ren L X, et al. Advances in studies on endocrine disruption-related adverse outcome pathways (AOP) mediated by organochlorine pesticides [J]. Agrochemicals, 2021, 60(10): 703-711 (in Chinese)
- [30] Xu T, Hu X X, Yang G L, et al. HIF-1 α /VEGF pathway mediates 1,3,6,8-tetrabromo-9 H-carbazole-induced angiogenesis: A potential vascular toxicity of an emerging contaminant [J]. Journal of Hazardous Materials, 2022, 432: 128718
- [31] Prest S J, May F E B, Westley B R. The estrogen-regulated protein, TFF1, stimulates migration of human breast cancer cells [J]. FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology, 2002, 16(6): 592-594
- [32] Pelden S, Insawang T, Thuwajit C, et al. The trefoil factor 1 (TFF₁) protein involved in doxorubicin-induced apoptosis resistance is upregulated by estrogen in breast cancer cells [J]. Oncology Reports, 2013, 30(3): 1518-1526
- [33] Do M T, Kim H G, Tran T T, et al. Metformin suppresses CYP1A1 and CYP1B1 expression in breast cancer cells by down-regulating aryl hydrocarbon receptor expression [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2014, 280(1): 138-148
- [34] Kerzee J K, Ramos K S. Constitutive and inducible expression of *cyp1a1* and *cyp1b1* in vascular smooth muscle cells [J]. Circulation Research, 2001, 89(7): 573-582
- [35] Hindiyeh M Y, Moran-Gilad J, Manor Y, et al. Development and validation of a real time quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction (qRT-PCR) assay for investigation of wild poliovirus type 1-South Asian (SOAS) strain reintroduced into Israel, 2013 to 2014 [J]. Euro Surveillance, 2014, 19(7): 20710
- [36] Liu H, Wormke M, Safe S H, et al. Indolo[3, 2-b]carbazole: A dietary-derived factor that exhibits both antiestrogenic and estrogenic activity [J]. Journal of the National Cancer Institute, 1994, 86(23): 1758-1765
- [37] Liu S X, Abdelrahim M, Khan S, et al. Aryl hydrocarbon receptor agonists directly activate estrogen receptor alpha in MCF-7 breast cancer cells [J]. Biological Chemistry, 2006, 387(9): 1209-1213
- [38] Gong P, Madak-Erdogan Z, Flaws J A, et al. Estrogen receptor- α and aryl hydrocarbon receptor involvement in the actions of botanical estrogens in target cells [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 2016, 437: 190-200
- [39] 孙佳琦, 张甘霖, 于明薇, 等. 植物雌激素与乳腺癌发病发展的研究进展[J]. 现代生物医学进展, 2016, 16(12): 2368-2371
- Sun J Q, Zhang G L, Yu M W, et al. Research progress of phytoestrogen in incidence and development of breast cancer [J]. Progress in Modern Biomedicine, 2016, 16(12): 2368-2371 (in Chinese)
- [40] Sadikovic B, Rodenhiser D I. Benzopyrene exposure disrupts DNA methylation and growth dynamics in breast cancer cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2006, 216(3): 458-468
- [41] Brunnberg S, Pettersson K, Rydin E, et al. The basic helix-loop-helix-PAS protein ARNT functions as a potent coactivator of estrogen receptor-dependent transcription [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2003, 100(11): 6517-6522

- [42] Abdelrahim M, Smith R 3rd, Safe S. Aryl hydrocarbon receptor gene silencing with small inhibitory RNA differentially modulates Ah-responsiveness in MCF-7 and HepG2 cancer cells [J]. *Molecular Pharmacology*, 2003, 63(6): 1373-1381
- [43] Yip C H, Rhodes A. Estrogen and progesterone receptors in breast cancer [J]. *Future Oncology*, 2014, 10(14): 2293-2301
- [44] Saito R, Miki Y, Hata S, et al. Aryl hydrocarbon receptor induced intratumoral aromatase in breast cancer [J]. *Breast Cancer Research and Treatment*, 2017, 161(3): 399-407
- ◆