

# Combined Effects of PCB126 and B(a)P on Genotoxicity of HepG2 Cells by Its Metabolic Enzyme Changes

## 多氯联苯 126 与苯并 (a) 芘联合作用致代谢酶改变对 HepG2 细胞遗传毒性的影响

ZHANG Chi, LIN Hui, WEI Wei, LIU Ai-lin,  
CHEN Xue-min, LU Wen-qing\*

张 驰/林 辉/魏 巍/刘爱林/  
陈学敏/鲁文清\*

(Department of Occupational and Environmental Health, MOE Key Laboratory of Environment and Health, School of Public Health, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, Hubei, China)

(华中科技大学同济医学院公共卫生学院劳动卫生与环境卫生学系 环境与健康教育部重点实验室 湖北 武汉 430030)

**【摘要】**背景与目的：探讨多氯联苯 126(PCB126)对苯并(a)芘[B(a)P]遗传毒性的影响。材料与方法：设 PCB126 三个剂量(0.01、0.10、1.00 nmol/L) B(a)P 一个剂量(50 μmol/L)组,设三甲基胆蒎(3-MC)为阳性对照,二甲基亚砜(DMSO)为溶剂对照,以各 PCB126 浓度染毒 HepG2 细胞 48 h 后,再与 B(a)P 联合染毒 24 h。通过荧光分光光度法测定各组细胞 CYP1A1 酶活性(EROD),并采用胞质分裂阻滞法微核实验(CBMNT)分析各组细胞的微核率(MN%),并计算核分裂指数(NDI)。结果：与溶剂对照相比,PCB126 各浓度组和 50 μmol/L 的 B(a)P 单独作用及联合作用均可诱导 CYP1A1 酶活性显著增加,其差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。微核率显著升高仅见于 50 μmol/L 的 B(a)P 单独作用组,与溶剂对照组相比差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。0.10、1.00 nmol/L 的 PCB126 和 50 μmol/L 的 B(a)P 联合作用时,与 B(a)P 单独作用相比,CYP1A1 酶活性和微核率均显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。结论：PCB126 在本试验条件下未显示出遗传毒性作用,但对 B(a)P 的遗传毒性作用具有一定的增强效应。

**【关键词】**多氯联苯 126; 苯并(a)芘; 联合作用; 微核; CYP1A1

中图分类号: R994.6 文献标识码: A 文章编号: 1004-616X(2007)02-0093-03

**【ABSTRACT】** BACKGROUND & AIM: To study effects of polychlorinated biphenyl PCB126 on B(a)P-induced genotoxicity. MATERIALS AND METHODS: HepG2 cells were treated either with different concentrations of PCB126 (0.01, 0.10, 1.00 nmol/L) alone, or with different concentrations of PCB126 for 48 h then with B(a)P (50 μmol/L) and PCB126 together for another 24 h. DMSO and 3-MC were used as solvent control and positive control, respectively. EROD activity and micronuclei(MN) formation were analyzed through fluorescence spectrophotometry and a cytokinesis-block micronucleus(CBMN) assay, respectively. The frequencies of MN(%) and nuclei division index (NDI) were calculated. RESULTS: Comparing to solvent control, EROD levels increased markedly in HepG2 cells treated with PCB126 (0.01, 0.10, 1.00 nmol/L) and B(a)P (50 μmol/L) alone or together, and MN frequencies increased significantly only in HepG2 cells treated with B(a)P alone( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). Comparing to B(a)P treatment alone, the EROD levels and MN frequencies increased significantly in HepG2 cells treated with B(a)P and PCB126 (0.10, 1.00 nmol/L) together( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ). CONCLUSION: PCB126 at certain concentrations showed no genotoxic effect in HepG2 cells, but it might enhance the genotoxic properties of B(a)P.

**【KEY WORDS】** PCB126; B(a)P; combined effect; micronuclei; CYP1A1

多氯联苯 (polychlorinated biphenyls, PCBs) 是目前 PCB126(3, 3', 4, 4', 5 - pentachlorobiphenyl) 作为具有国际上极为关注的一类持久性有机污染物 (POPs), 面结构的多氯联苯同系物代表与 TCDD

收稿日期: 2006-09-27; 修订日期: 2006-12-05  
基金项目: 国家自然科学基金重大项目资助(No. 40590393)  
作者简介: 张 驰(1979- )女,湖北武汉人,博士研究生,研究方向:环境遗传毒理。

\* Correspondence to: LU Wen-qing Tel 027-83692715, E-mail luwq@mails.tjmu.edu.cn

CARCINOGENESIS, TERATOGENESIS & MUTAGENESIS

0 0 9 3

(tetrachlorodibenzo-p-dioxin)有着相似的毒性,是毒性最强的多氯联苯之一,在水环境和人体中均可检测到<sup>[1]</sup>。有研究表明 PCB126 可显著诱导 CYP1A1 的表达,而 CYP1A1 酶在苯并(a)芘[B(a)P]等多环芳烃化合物由前致癌物代谢活化为终致癌物的过程中起着关键作用<sup>[2]</sup>。我们采用荧光分光光度法和胞质分裂阻滞法微核实验(CBMNT),分析经不同浓度 PCB126 和 B(a)P 共同处理的 HepG2 细胞的 CYP1A1 活性和微核率,探讨 PCB126 是否对 B(a)P 的遗传毒性产生影响。

## 1 材料与方法

**1.1 材料** PCB126 购自 Accustandard 公司;B(a)P、二甲亚砜(DMSO)、细胞松弛素 B、乙甲基苈灵(7-ethoxyresorufin)、香豆素(dicumarol)均购于美国 Sigma 公司;胰蛋白酶购于 Amresco 公司;DMEM 培养基和新生小牛血清购于 Gibco 公司;其它试剂皆为国产分析纯试剂;HepG2 细胞由荷兰莱登大学 F. Darroudi 博士惠赠。

**1.2 细胞培养** HepG2 细胞在含 10% 新生小牛血清的 DMEM 培养基中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 条件下培养,待细胞处于对数生长期时进行实验。

**1.3 酶活性的检测** 将 HepG2 细胞接种于 96 孔板(1.5 × 10<sup>4</sup>/孔),于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后染毒。受试物以 DMSO 为溶剂,PCB126 设 3 个剂量:0.01、0.10 和 1.00 nmol/L, B(a)P 剂量为 50 μmol/L,三甲基胆蒎(3-MC, 5 μmol/L)和 DMSO 分别作为阳性对照和溶剂对照。先用 PCB126 染毒 48 h,更换新鲜 DMEM 培养基(含 10% 新生小牛血清)后再将 PCB126 和 B(a)P 联合染毒 24 h。染毒结束后更换培养基,加入 8 μmol/L 的 7-ethoxyresorufin 和 10 μmol/L 的 dicumarol,孵育 60 min 后将该培养基转移至新的 96 孔板中,并加入 130 μl 甲醇终止反应。用多功能荧光光度计在 550 nm 激发光波长和 585 nm 发射波长处测量样品的荧光强度。EROD(7-乙氧基-3-异吩噻唑酮-脱乙酰基酶)的活性表示单位为 pmol/(mg · min)<sup>[3]</sup>。蛋白含量的测定采用考马斯亮兰法。

**1.4 胞质分裂阻滞法微核实验(CBMNT)** 将 HepG2 细胞按 5 × 10<sup>5</sup>/L 接种于培养瓶中,于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 培养箱中培养 24 h 后染毒。受试物染毒剂量和染毒方式同上。染毒结束后更换新鲜培养基,加入细胞松弛素 B(终浓度为 3 μg/ml)轻轻混匀,孵育 24 h。收获细胞后,通过消化、低渗、反复固定等步骤,最后滴片,以 10% Giemsa 染色 10 min,冲洗晾干后封片。在光学显微镜下计数 500 个以上细胞,按下式计算核分裂指数:

$$NDI = (\text{单核数} + 2 \times \text{双核数} + 3 \times \text{三核数} + 4 \times \text{四核数}) / \text{细}$$

胞总数;

计数 1000 个双核细胞,按下式计算微核率:

$$MN\% = \text{微核细胞数} / 1000$$

**1.5 统计学方法** 采用 SPSS 统计软件计算,各組间差异采用 Dunnett-*t* 检验。

## 2 结果

**2.1 PCB126 和 B(a)P 单独作用和联合作用对 CYP1A1 活性的影响** 由表 1 可见,与溶剂对照相比,0.01、0.10、1.00 nmol/L PCB126 及 50 μmol/L B(a)P 单独作用均可诱导 CYP1A1 活性显著增强 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。与 B(a)P 单独作用相比,联合作用时酶活性增加显著 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。

表 1 PCB126 和 B(a)P 不同染毒方式对 CYP1A1 活性的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )  
Table 1 The CYP1A1 activities induced by different treated way of PCB126 and B(a)P

Groups (concentrations)	EROD [pmol/(mg · min)]
DMSO 0 (nmol/L)	0.72 ± 0.03
PCB126 0.01 (nmol/L)	1.14 ± 0.20 *
0.10 (nmol/L)	1.50 ± 0.28 **
1.00 (nmol/L)	2.10 ± 0.14 ***
B(a)P 50 (μmol/L)	1.05 ± 0.05 *
3-MC 5 (μmol/L)	3.07 ± 0.18 **
PCB126 (0.01 nmol/L) + B(a)P(50 μmol/L)	1.89 ± 0.01 **
PCB126 (0.10 nmol/L) + B(a)P(50 μmol/L)	1.90 ± 0.09 **
PCB126 (1.00 nmol/L) + B(a)P(50 μmol/L)	1.99 ± 0.18 **

Compared with DMSO: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with B(a)P: \*  $P < 0.01$ , \*\*  $P < 0.001$

**2.2 PCB126 与 B(a)P 单独作用及联合作用对 HepG2 细胞微核率及核分裂指数的影响** 由表 2 可见,与溶剂对照相比,50 μmol/L B(a)P 可引起微核率显著升高 ( $P < 0.01$ ),而 PCB126 单独作用时,各浓度组微核率的增加均不明显。与 B(a)P 单独作用相比,联合作用下,当 B(a)P 浓度不变,而 PCB126 浓度为 0.10、1.00 nmol/L 时,微核率显著升高 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.05$ )。而 1.00 nmol/L PCB126 和 50 μmol/L B(a)P 可使细胞核分裂指数明显降低,联合而作用下的细胞核分裂指数随着 PCB126 浓度的升高,有明显下降趋势 ( $P < 0.01$ )。

## 3 讨论

人类来源的肝肿瘤细胞株 HepG2 最大的优点是保留了一系列生物转化过程中的 I 相和 II 相酶,这使得该细胞株既是外来化合物攻击遗传物质的靶细胞,同时又是代谢激活外来化合物的代谢系统,从而较其他体外系统具有更大的优越性,使其成为检测外来化合物遗传毒性的一个优良细胞株。我们采用该细胞株的结果显示,PCB126 能显著增强 HepG2 细胞 CYP1A1 酶的活性,

表 2 不同染毒方式对核分裂指数和微核率的影响 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 NDI and MN in HepG2 cells after different treated way of PCB126 and B(a)P

Groups (concentrations)		MN(%)	NDI
DMSO	0 (nmol/L)	18.00 ± 7.21	1.75 ± 0.03
PCB126	0.01 (nmol/L)	22.33 ± 6.50	1.54 ± 0.16
	0.10 (nmol/L)	30.00 ± 7.77	1.52 ± 0.08
	1.00 (nmol/L)	35.50 ± 11.50	1.47 ± 0.02 *
B(a)P	50 (μmol/L)	52.00 ± 6.00 **	1.43 ± 0.02 **
PCB126 (0.01 nmol/L) + B(a)P(50 μmol/L)		52.00 ± 1.41	1.37 ± 0.07 **
PCB126 (0.10 nmol/L) + B(a)P(50 μmol/L)		73.00 ± 4.24 #	1.27 ± 0.07 **
PCB126 (1.00 nmol/L) + B(a)P(50 μmol/L)		78.50 ± 5.51 ##	1.29 ± 0.09 **

MN = micronucleus; NDI = nuclear division index; compared with DMSO : \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ ; compared with B(a)P : #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

PCB126 和 B(a)P 联合作用时, CYP1A1 酶活性较 B(a)P 单独作用显著增高, 但和 PCB126 各浓度组间相比差异无统计学意义。以上表明, 在联合作用时酶活性的改变仍是 PCB126 占主导地位, 这可能是由于 PCBs 对酶活性的强诱导性所致。本试验结果还显示, PCB126 与溶剂对照相比微核率无显著性增加, 表明在受试浓度范围内 PCB126 并无遗传毒性作用, 但是当 PCB126 和 B(a)P 联合作用后, 与 B(a)P 单独作用相比, 对微核的诱导显著增强, 并存在剂量-效应关系。由于 PCB126 单独作用不引起 HepG2 细胞微核率的升高, 而与 B(a)P 联合作用后则呈现出微核率升高, 看来并不是 PCB126 遗传毒性的结果, 鉴于 B(a)P 终致癌物的生成与 CYP1A1 密切相关, 而 PCB126 和 B(a)P 联合作用造成代谢酶活性增高很有可能是微核率升高的主要原因。

PCBs 对代谢酶的诱导早有研究, Aroclor1254 作为常用的 PCBs 混合物, 在许多毒理学实验中已经被用做代谢酶的诱导剂。有研究显示 Aroclor1254 可通过对 HepG2 细胞 CYP1A1 酶的诱导而导致对 B(a)P 代谢激活作用增强, 使 B(a)P 造成的 DNA 损伤增强, 微核率增高<sup>[4-5]</sup>。

PCB126 是芳烃受体高亲和力的 PCBs 之一, 是环境中存在的共面结构 PCB 的代表。有研究证明 PCB126 可以引起支气管上皮细胞内 CYP1A1mRNA 显著表达<sup>[6]</sup>, 并且能在大鼠和小鼠体内引起 CYP1A1 依赖的 EROD 酶活性的增高<sup>[7]</sup>。也有报道证实 PCB126 可诱导大鼠肝癌细胞株的 EROD 酶活力并具有很好的剂量效应关系<sup>[8]</sup>。由于 B(a)P 必须通过代谢酶活化生成终致癌物, 而 PCB126 又可显著诱导代谢酶活性的增高, 且本研究显示当两者同时存在的时候微核率显著上升, 因此我们认为 PCB126 很可能通过诱导 P450 酶活性的增加从而增强了 B(a)P 的遗传毒性, 其具体机制有待进一步研究。

## 参考文献:

- [1] Safe S. Toxicology, structure-function relationship, and human and environmental health impacts of polychlorinated biphenyls: progress and problems [J]. *Environ. Health Perspect*, 1992, 100(3):259-268.
- [2] Borlakoglu JT, Scott A, Wolf CR, et al. Treatment of lactating rats with PCBs induces CYP1A1 and enhances the formation of BP 7, 8-dihydrodiol, the proximate carcinogen of benzo(a)pyrene [J]. *Int J Biochem*, 1993, 25(8):1209-1214.
- [3] Donato MT, Gomez-Lechon MJ, Castell JV. A Microassay for Measuring Cytochrome P450 I A1 and P450 II B1 Activities in Intact Human and Rat Hepatocytes Cultured on 96-Well Plates [J]. *Analytical Biochemistry*, 1993, 213(1):2029-2033.
- [4] Wu XJ, Lu WQ, Sundermann VM. Benzo(a) pyrene induced micronucleus formation was modulated by persistent organic pollutants (POPs) in metabolically competent human HepG2 cells[J]. *Toxicology Letters*, 2003, 144(2):143-150.
- [5] 吴欣江, 鲁文清, Sundermann MV. Aroclor1254 预先染毒增强苯并(a)芘对 HepG2 细胞 DNA 的损伤[J]. *癌变·畸变·突变*, 2003, 15(3):141-143.
- [6] Lin PP, Chang YC, Chen CH, et al. A comparative study on the effects of 2', 3', 7', 8'-tetrachlorodibenzo-p-dioxin polychlorinated biphenyl126 and estrogen in human bronchial epithelial cells[J]. *Toxicology and Applied Pharmacology*, 2004, 195(1):83-91.
- [7] Craft ES, Devito MJ, Crofton KM. Comparative responsiveness of hypothyroxinemia and hepatic enzyme induction in Long-Evans rats versus C57BL, 6J mice exposed to TCDD-like and phenobarbital-like polychlorinated biphenyl congeners[J]. *Toxicological Sciences*, 2002, 68(2):372-380.
- [8] 黎雯, 徐盈, 吴文忠, 等. 利用离体大白鼠肝癌细胞的 EROD 诱导指示二恶英的复合毒性效应[J]. *动物学报*, 2001, 47(1):64-70.

