

3-氯-1,2-丙二醇对睾丸间质瘤细胞 R2C 生物活性的影响

邹飞雁¹, 白顺¹, 白卫滨², 孙建霞³, 张磊⁴, 黄亚东⁴, 孙伟伟¹

(1. 暨南大学 发育与再生生物学系, 广东 广州 510632; 2. 暨南大学 食品科学与工程系, 广东 广州 510632;

3. 广东工业大学 轻工化工学院, 广东 广州 510090; 4. 暨南大学 医药生物技术研究开发中心, 广东 广州 510632)

摘要: 为了探讨 3-氯-1,2-丙二醇 (3-Monochloropropane-1,2-diol, 3-MCPD) 对体外培养的大鼠睾丸间质瘤细胞 R2C 活性的影响, 分别用 0.5、1、2、4、6 mmol/L 的 3-MCPD 刺激 R2C 细胞, 利用 MTT 法得到 3-MCPD 对 R2C 细胞的 IC₂₅、IC₅₀ 以及 IC₇₅。取以上 3 种不同浓度的 3-MCPD 作用细胞 4 h 和 24 h, 通过单细胞凝胶电泳法 (Single Cell Gel Electrophoresis, SCGE) 检测其作用 4 h 时对 DNA 损伤的程度; 采用放射免疫法 (Radio immunoassay, RIA) 检测其作用 4 h 和 24 h 对孕酮合成的影响。结果显示: 实验组与对照组相比, 3-MCPD 能抑制 R2C 细胞的增殖, 其 IC₂₅、IC₅₀ 和 IC₇₅ 分别为 1.027、1.802、3.160 mmol/L; 浓度为 IC₇₅ 的 3-MCPD 作用 R2C 细胞 4 h 后, 对其 DNA 有损伤作用, 且孕酮的合成量降低了 16.0%; 当 3-MCPD 各浓度组作用 R2C 细胞 24 h 后, 与对照组相比孕酮合成量降低 9.5% 至 61.2%。以上结果表明, 3-MCPD 能抑制 R2C 的活性, 影响细胞孕酮的合成。

关键词: 3-氯-1,2-丙二醇; 睾丸间质瘤细胞; 孕酮

中图分类号: TS 201.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1673—1689(2013)06—0569—05

Effects of 3-Monochloropropane-1,2-Diol on the Cell Growth in Rat Leydig Tumor Cells R2C

ZOU Fei-yan¹, BAI Shun¹, BAI Wei-bin², SUN Jian-xia³,
ZHANG Lei⁴, HUANG Ya-dong⁴, SUN Wei-wei¹

(1. Department of Developmental and Regenerative Biology, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 2. Department of Food Science and Engineering, Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Faculty of Chemical Engineering and Light Industry, Guangdong University of Technology, Guangzhou 510090, China; 4. Biopharmaceutical R&D Center, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

Abstract: This research aimed to investigate the effects of 3-Monochloropropane-1,2-diol (3-MCPD) on the cell growth in Rat Leydig tumor cells R2C. R2C cells were exposed to 0.5, 1, 2, 4, 6 mmol/L 3-Monochloropropane-1,2-diol for 48 h, different concentrations (IC₂₅, IC₅₀, IC₇₅) of 3-

收稿日期: 2012-06-21

基金项目: 国家“十二五”科技支撑计划项目 (2012BAK01B00); 国家自然科学基金项目 (31201340)。

作者简介: 邹飞雁 (1963—), 女, 湖南衡阳人, 医学博士, 副研究员, 硕士研究生导师, 主要从事细胞生长、发育和分化的信号通路及恶性肿瘤病因发病学分子机理。E-mail: zoufeiyang6364@yahoo.com.cn

MCPD were elected by MTT assay. Three specific concentrations of 3-MCPD were cultured with R2C cells for 4 h and 24 h, respectively. The damage of DNAs in R2C cells was investigated by single cell gel electrophoresis (SCGE). Progesterone level in the supernatant of cell culture medium was measured by radio immunoassay (RIA). Results indicated that 3-MCPD could inhibit cells growth, the IC_{25} , IC_{50} and IC_{75} value were 1.027 mmol/L, 1.802 mmol/L and 3.160 mmol/L, respectively. Compared with the control group, IC_{75} concentration of 3-MCPD incubated R2C cells for 4h, the damage of DNAs were obviously higher and the progesterone level were decreased 16.0%. In addition, three concentrations of 3-MCPD incubated R2C cells for 24 h, the progesterone level were obviously decreased from 9.5% to 61.2%. The study suggested that 3-MCPD could directly affect cell growth and the progesterone synthesis of R2C cells.

Keywords: 3-Monochloropropane-1,2-diol, leydig tumor cells, progesterone

食品在加工贮藏过程中易受到氯丙醇污染。添加不合卫生条件的酸水解蛋白质液, 容易引起酱油、蚝油等调味品含有氯丙醇^[1]。近几年在饮用水、发酵香肠、饼干、面包、烧煮鱼、肉制品及膨化食品中检出氯丙醇化合物^[2]。此外, 家庭烹饪热加工也会导致食物中氯丙醇的产生, 危害人体健康。氯丙醇污染及残留已成为一个国际性食品安全问题, 引起人们广泛关注^[3]。氯丙醇主要有 3-氯 1,2-丙二醇、1,3-二氯-2-丙醇、2,4-二氯-1-丙醇、2-氯-1,3-丙二醇等几种同系物, 其中 3-氯 1,2-丙二醇 (3-Monochloropropane-1,2-diol, 3-MCPD) 是最常见的氯丙醇类污染物之一。研究表明, 氯丙醇具有一定的毒性作用, 特别是 3-MCPD, 具有致癌性^[4-5]。Sunahara^[6]等人经过长期对大鼠的研究发现, 喂食含 3-MCPD 的食物可能增加睾丸间质细胞瘤和乳腺癌的发病率, 其具体的毒性机理目前还不明确, 特别是体外的还未见相关报道。本研究通过 3-MCPD 对体外培养 R2C 细胞的毒性损伤情况, 探讨氯丙醇引起雄性生殖毒性的机制, 为氯丙醇的食品安全评价提供一定的依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 材料与试剂 R2C 细胞(大鼠睾丸间质瘤细胞株): 由暨南大学医药生物技术研究开发中心提供; 3-MCPD: 上海晶纯公司; F12 培养液、胰酶、胎牛血清、马血清、肌氨酸钠: 美国 Sigma 公司; MTT、DMSO: 美国 Amresco 公司; EDTA Na₂、Triton-X100、Tris: 美国 Genview 公司; 低熔点琼脂糖: 美国 FMC

公司; 正常熔点琼脂糖: 西班牙 Biowest 公司; 孕酮放免试剂盒: 北京北方生物技术研究所以。

1.1.2 仪器 CO₂ 培养箱、酶标仪: 美国 Thermo 公司; GC-1200γ 放射免疫计数仪: 安徽中科中佳公司; DDL-5 低温离心机: 上海安亭公司。

1.2 方法

1.2.1 MTT 检测 3-MCPD 对 R2C 细胞增殖的影响 R2C 细胞培养至对数期, 调整细胞浓度为 2×10^4 个/mL, 96 孔板内每孔接种 200 μ L 细胞悬液。24 h 后加入用无血清培养液稀释的 3-MCPD 溶液, 使每孔终浓度分别为 0.5、1、2、4、6 mmol/L。设有空白组 (无细胞) 和对照组 (无药物), 每组设 3 个复孔。药物作用 48 h 后, 加入 20 μ L 5 mg/mL 的 MTT。作用 4 h 后吸去孔内液体, 每孔加 200 μ L DMSO 溶解沉淀, 放于脱色摇床摇匀 10 min 后于酶标仪检测 570 nm 波长处的吸光值^[7]。通过以下公式及 SPSS 软件分析 3-MCPD 刺激细胞 48 h 后的 IC_{25} 、 IC_{50} 、 IC_{75} 。

细胞生长抑制率 (%) = $[1 - (\text{给药组吸光度} - \text{空白组吸光度}) / (\text{对照组吸光度} - \text{空白组吸光度})] \times 100\%$

1.2.2 单细胞电泳检测 3-MCPD 对 R2C 细胞 DNA 损伤情况 调整对数期 R2C 细胞悬液的浓度为 1×10^5 个/mL, 以每孔 1 mL 的细胞悬液接种到 6 孔板内。细胞培养 24 h 加入 3-MCPD, 使其终浓度为 IC_{25} 、 IC_{50} 和 IC_{75} 。培养 4 h 后收获细胞, 4 $^{\circ}$ C 冷却。

取 0.8 g/dL 正常熔点琼脂糖, 加热融化后, 冷却至 45 $^{\circ}$ C, 取 100 μ L 滴于载玻片上, 盖上盖玻片, 4 $^{\circ}$ C、10 min 后取下盖玻片。10⁴ 个细胞与 75 μ L 0.8 g/dL 的低熔点琼脂糖溶液在 37 $^{\circ}$ C 下混匀, 迅速滴在第一层琼脂糖上, 加上盖玻片, 4 $^{\circ}$ C、10 min 后取盖玻

片。玻片浸入预冷的裂解液 (25 mmol/L NaCl, 100 mmol/L Na₂EDTA, 10 mmol/L Tris, 1% Triton X 100 及 10% DMSO 组成, 临用前配用, pH 10), 4 ℃ 保持 1 h。取玻片, 蒸馏水洗 3 次后, 放入电泳槽, 加电泳液 (1 mmol/L Na₂EDTA, 300 mmol/L NaOH, pH 13), 电泳液面需高出玻片 0.25 cm, 静置 20 min 后于 25 V、200 mA 电泳 15~20 min。取玻片置于 0.4 mol/L Tris (pH 7.5) 溶液中洗涤 3 次, 每次 10 min。避光滴加 20 μL、25 μg/mL EB 染色, 盖上盖玻片后荧光显微镜下观察拍照。CASP 软件分析电泳结果。

1.2.3 放射免疫法检测 3-MCPD 对 R2C 细胞合成孕酮的影响 对数期 R2C 细胞悬液以 1×10^6 /mL 的密度接种到 6 孔板, 每孔 1 mL, 培养 24 h 后, 换上分别含 IC₂₅、IC₅₀ 和 IC₇₅ 浓度 3-MCPD 的培养液, 继续培养 4 h 或 24 h 后提取上清液, 400 g 离心 5 min, -20 ℃ 保存。用放射免疫试剂盒检测上清液中的孕酮含量。

1.2.4 统计学处理 运用 SPSS 软件 19.0 进行统计分析, 采用单因素方差分析结果, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 3-MCPD 对 R2C 细胞的生长抑制作用

不同浓度的 3-MCPD 作用 R2C 细胞 48 h 后, 细胞生长受到不同程度的抑制。由图 1 可见, 随着浓度的增加, 细胞形态和数量均发生了变化。细胞形态逐渐变圆, 且贴壁不稳定, 随着浓度的增加, 此现象越明显, 同时细胞抑制率随着 3-MCPD 浓度的增大也逐渐增大, 见表 1。通过 SPSS 软件分析得出 3-MCPD 对 R2C 细胞的 IC₂₅、IC₅₀、IC₇₅ 分别为 1.027、1.802、3.160 mmol/L。

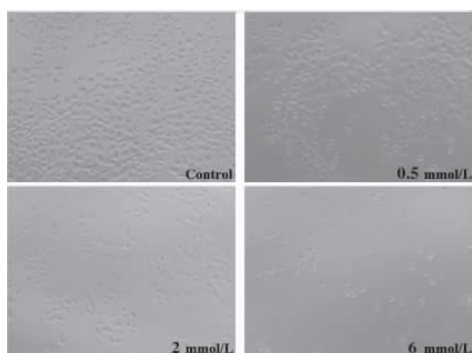


图 1 不同浓度 3-MCPD 刺激 R2C 细胞 48 h 后的细胞形态图 (200×)

Fig. 1 Morphology of R2C cells under different concentration of 3-MCPD for 48 h

表 1 不同浓度 3-MCPD 对 R2C 细胞生长抑制率的影响

Table 1 Inhibitory effect of 3-MCPD on R2C cells

3-MCPD 浓度/(mmol/L)	A ₅₇₀ (OD)	抑制率/%
0	0.777±0.013	
0.5	0.733±0.035	5.99%
1.0	0.532±0.038	33.33%
2.0	0.443±0.028	45.44%
4.0	0.183±0.001	80.88%
6.0	0.065±0.001	96.87%

2.2 3-MCPD 对 R2C 细胞 DNA 损伤的作用

不同浓度 3-MCPD 刺激 R2C 细胞 4 h 后, 细胞拖尾的长度随着浓度的增加而增长, 见图 2。通过 CASP 软件分析尾部 DNA%、尾长、尾距以及 Olive 尾距等数据得出, 见图 3。IC₇₅ 浓度组对细胞 DNA 有明显的损伤作用, 具有统计学意义, 而其他组与对照组相比没有显著性的变化。

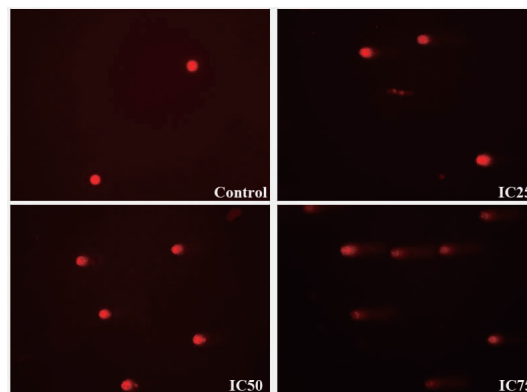


图 2 不同浓度 3-MCPD 刺激 4 h 后对 R2C 细胞 DNA 损伤作用

Fig. 2 Damage of DNAs in R2C cells after treatment with 3-MCPD

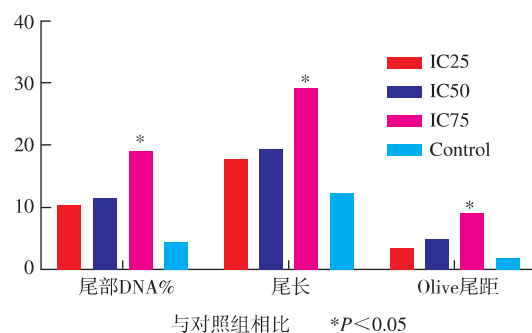


图 3 不同浓度 3-MCPD 刺激 4 h 后对 R2C 细胞尾部 DNA%、尾长、Olive 尾距的影响

Fig. 3 Effect of 3-MCPD on head DNA (%), tail length and olive tail moment in R2C cells

2.3 3-MCPD 对 R2C 细胞分泌孕酮的影响

RIA 结果显示,不同浓度 3-MCPD 作用 R2C 细胞 4 h 后,IC₇₅ 组能够明显影响细胞孕酮的合成,其他各浓度组与对照组相比对孕酮合成没有显著影响,见图 4。而在作用 24 h 后,可见孕酮合成量显著降低,且随着浓度的增加,降低也更明显,见图 5。

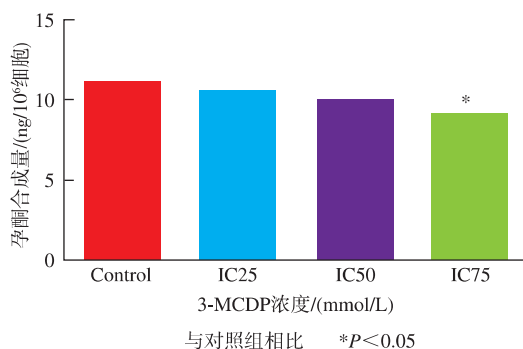


图 4 不同浓度 3-MCPD 刺激 4 h 后对 R2C 细胞孕酮合成的影响

Fig. 4 Effects of 3-MCPD on progesterone production of R2C cells for 4 h

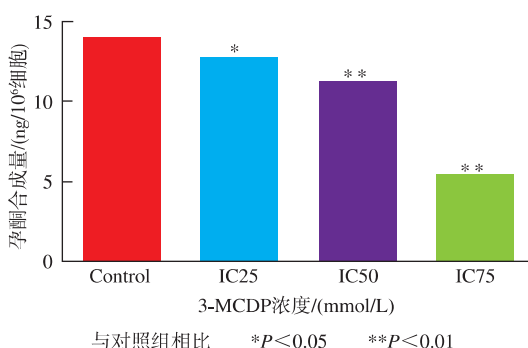


图 5 不同浓度 3-MCPD 刺激 24 h 后对 R2C 细胞孕酮合成的影响

Fig. 5 Effects of 3-MCPD on progesterone production of R2C cells for 24 h

3 结 语

生殖系统是氯丙醇主要的靶器官^[8],其中睾丸又是雄性生殖系统最主要的生殖腺。睾丸最主要的一个功能即睾丸间质细胞能够产生雄激素睾酮,睾酮

对维持正常的雄性生理功能起到至关重要的作用。

本研究首先发现了 R2C 细胞在 3-MCPD 的刺激下生长明显受抑制,3-MCPD 浓度在 0~6 mmol/L 范围内,其抑制细胞增殖的作用为 5.99%~96.87%,表明了 3-MCPD 可能是通过抑制 R2C 细胞的增殖来影响生殖系统的正常运行。体外实验表明,3-MCPD 及其代谢物缩水甘油对中国仓鼠卵巢细胞具有明显的 DNA 损伤作用^[9]。本研究的 SCGE 结果显示,浓度为 1.027、1.802、3.160 mmol/L 的 3-MCPD 刺激 R2C 细胞 4 h 后,其中 3.160 mmol/L 刺激组,其尾部 DNA%、尾长和 Olive 尾距分别增加 342.6%、137.4%和 409.7%,与对照组相比有统计学意义;而其余两组与对照组相比无明显统计学意义。这些结果显示,3-MCPD 对 R2C 细胞也具有一定程度的 DNA 损伤作用。孕酮是睾酮合成的第一步,通过检测孕酮水平可间接说明睾酮的分泌量^[10]。RIA 的结果显示,浓度为 1.027、1.802、3.160 mmol/L 的 3-MCPD 刺激 R2C 细胞 4 h 后,其中有 3.160 mmol/L 刺激组合成的孕酮与对照组相比降低了 16.0%,有统计学意义。3-MCPD 继续作用细胞 24 h 后,各浓度组孕酮合成量与对照组相比分别降低 9.5%、20.6%及 61.2%,有统计学意义。

总之,3-MCPD 对体外培养的 R2C 具有明显抑制增殖和 DNA 损伤作用,并降低 R2C 细胞合成的孕酮,进而影响睾酮合成。通过以上结果推测,3-MCPD 可通过影响 R2C 细胞孕酮合成过程相关基因的表达来调节孕酮合成。但大多数学者认为 3-MCPD 属于非遗传毒性致癌物,在体内小鼠骨髓微核和大鼠肝非程序性 DNA 合成试验中,结果均为阴性^[11]。目前对于体外试验中 3-MCPD 具有遗传毒性的解释有两种:一种认为 3-MCPD 在大鼠体内的主要代谢物为 β -氯代乳酸,并没有产生缩水甘油等其他具遗传毒性的代谢物^[4];另一种认为 3-MCPD 能与体外的培养基中某些化合物反应,产物具有遗传毒性作用^[12],其具体作用机制还需要进一步研究讨论。

参考文献:

- [1] 张烨,丁晓雯. 食品中氯丙醇污染及其毒性[J]. 粮食与油脂,2005,7:44-46.
ZHANG Ye,DING Xiao-wen. Contaminant and toxicity of chloropropanol in food [J]. *Cereals and Oils*,2005,7:44-46. (in Chinese)

- [2] 王卫华,徐锐锋,刘军,等. 食品中氯丙醇测定方法研究进展[J]. 化学分析计量,2007,16(3):74-76.
WANG Wei-hua,XU Rui-feng,LIU Jun,et al. Progress in determination method of chloropropanols in food [J]. **Chemical Analysis and Meterage**,2007,16(3):74-76. (in Chinese)
- [3] 傅武胜,李敬光,张珙,等. 我国市售酱油氯丙醇污染研究:地区间污染水平的比较[J]. 食品与发酵工业,2007,33(2):92-96.
FU Wu-sheng,LI Jing-guang,ZHANG Hong,et al. Occurrence of chloropropanols in soy sauce in retailer in China:comparison of the levels of chloropropanols of soy sauce from the various origins[J]. **Food and Fermentation Industries**,2007,33(2):92-96. (in Chinese)
- [4] HWANG Myungsil,YOON Eunkyung,KIM Jayoung,et al. Toxicity value for 3-monochloropropane-1,2-diol using a benchmark dose methodology[J]. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**,2009,53(2):102-106.
- [5] CHO W S,HAN B S,KIM C,et al. Carcinogenicity study of 3-monochloropropane-1,2-diol in sprague-dawley rats [J]. **Food Chem Toxicol**,2008,46:3172-3177.
- [6] Jones A R,Milton D H,Murcott C. The oxidative metabolism of alpha-chlorohydrin in the male rat and the formation of spermatocytes[J]. **Xenobiotica**,1978,8:573.
- [7] 陈义勇,顾小红,汤坚. 桦褐孔菌多糖的抗肿瘤活性研究[J]. 食品与生物技术学报,2011,30(1):65-69.
CHEN Yi-yong,GU Xiao-hong,TANG Jian. Study on anti-tumor activities of polysaccharides from *Inonotus obliquus* [J]. **Journal of Food Science and Biotechnology**,2011,30(1):65-69. (in Chinese)
- [8] 李宁,刘泽钦,贾旭东,等. 氯丙醇对大鼠的毒性研究[J]. 卫生研究,2003,32(4):349-352.
LI Ning,LIU Ze-qin,JIA Xu-dong,et al. Study on the toxicological effect of chloropropanols on rats [J]. **Journal of Hygiene Research**,2003,32(4):349-352. (in Chinese)
- [9] Ramy R E,Elhkim M O,Lezmi S,et al. Evaluation of the genotoxic potential of 3-monochloro- propane-1,2-diol(3-MCPD)and its metabolites,glycidol and beta-chlorolactic acid,using the single cell gel/comet assay [J]. **Food Chem Toxicol**,2007,45:41-48.
- [10] ZHANG Qi-hao,ZOU Ping,ZHAN Hai-chao,et al. Dihydrolipoamide dehydrogenase and cAMP are associated with cadmium-mediated Leydig cell damage[J]. **Toxicology Letters**,2011,205:183-189.
- [11] Piasecki A,Ruge A,Marquardt H. Malignant transformation of mouse M2 fibro-blasts by glycerol chlorohydrines contained in protein hydrolysates and commercial food[J]. **Arzneimittelforschung**,1990,40(9):1054.

会 议 信 息

会议名称(中文): 第十四届微生物学教学和科研及成果产业化研讨会

所属学科: 动植物微生物学、生物物理学、生物化学及分子生物学、细胞生物学、遗传与发育生物学、生物技术与生物工程、病毒与免疫学

开始日期: 2013-07-19

结束日期: 2013-07-22

所在城市: 江苏省 南京市

具体地点: 南京师范大学国际交流中心

主办单位: 中国微生物学会基础微生物专业委员会、农业微生物专业委员会、普及与教育工作委员会

承办单位: 南京师范大学、江苏微生物学会

全文截稿日期: 2013-06-25

联系人: 魏华老师

联系电话: 02585891895

传真: 02585891067

E-MAIL: jswsxh@163.com

通讯地址: 江苏省南京市栖霞区文苑路 1 号南京师范大学生命科学学院

邮政编码: 210023

会议网站: <http://csm.im.ac.cn/templates/team/introduction.aspx?nodeid=9&page=ContentPage&contentid=1974>