

HPV 与多环芳烃协同导致 DNA 损伤的研究

庄琢琛¹, 贾帅楠¹, 李劲涛¹, 崔鑫¹, 孙国辉¹, Pramod Upadhyaya², 赵丽娇^{*1}, 钟儒刚¹

(1. 北京工业大学 生命科学与生物工程学院 环境与病毒学北京市重点实验室 北京 100124;

2. 明尼苏达大学 Masonic 癌症中心 美国明尼苏达州 明尼阿波利斯市 55455)

摘要: 苯并[a]芘(B[a]P) 和人乳头瘤病毒(HPV) 均是导致人类癌症的重要因素, 前者是环境中广泛存在的致癌物, 后者可诱导皮肤和黏膜鳞状上皮细胞异常增殖进而诱发癌症。流行病学证据表明烟草烟气与 HPV 协同作用可促进口咽鳞癌、头颈部鳞状细胞癌和肺癌等恶性肿瘤的发生, 然而关于 HPV 与多环芳烃(PAHs) 的协同致癌作用机制尚不明确。通过平板克隆形成实验、细胞划痕实验以及细胞侵袭实验对 B[a]P 和 HPV 的协同致癌作用进行了研究, 比较了经 B[a]P 处理后人宫颈癌 HeLa 细胞(HPV 阳性) 和 C33A 细胞(HPV 阴性) 表型的变化; 用高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS) 法对 B[a]P 导致的主要 DNA 加合物——二氢二醇环氧化物-N²-脱氧鸟苷(BPDE-N²-dG) 进行了定量分析。结果表明, 浓度为 10 μmol/L 的 B[a]P 能够显著促进 HeLa 和 C33A 细胞的侵袭和克隆形成能力, 且呈剂量效应关系; 经 B[a]P 处理后 HeLa 细胞的侵袭和克隆形成能力均显著高于 C33A 细胞($p < 0.01$), 并显著高于对照组 HeLa 细胞($p < 0.01$)。经浓度为 10 μmol/L 的 B[a]P 处理后 HeLa 细胞及 C33A 细胞中 BPDE-N²-dG 水平均最高, 分别为 (4 172±124) fmol/mg DNA 和 (1 255±228) fmol/mg DNA; 且各 B[a]P 处理浓度下的 HeLa 细胞中 BPDE-N²-dG 的水平均显著高于 C33A 细胞($p < 0.01$), 证明了 HPV 能显著促进 B[a]P 对 DNA 的损伤作用, 为进一步揭示 B[a]P 和 HPV 的协同致癌作用提供了依据。不仅为 B[a]P 和 HPV 相关癌症的防治提供了新策略, 而且将为癌症病因学研究提供新的方法。
关键词: 苯并[a]芘; 人乳头瘤病毒; 协同致癌; DNA 加合物; 高效液相色谱-电喷雾质谱联用

中图分类号: R914.2 文献标识码: A 文章编号: 0258-3283(2019)10-1002-09

Synergistic Effect on DNA Damage Induced by HPV and Polycyclic Aromatic Hydrocarbons ZHUANG Zhuo-chen¹, JIA Shuai-nan¹, LI Jin-tao¹, CUI Xin¹, SUN Guo-hui¹, UPADHYAYA Pramod², ZHAO Li-jiao^{*1}, ZHONG Ru-gang¹ (1. Beijing Key Laboratory of Environmental and Viral Oncology, College of Life Science and Bio-Engineering, Beijing University of Technology, Beijing 100124, China; 2. Masonic Cancer Center, University of Minnesota, Minneapolis 55455, United States), Huaxue Shiji, 2019 41(10) 1002~1010

Abstract: Both benzo[a]pyrene (B[a]P) and human papillomavirus (HPV) are important factors inducing human cancer. The former is a carcinogen widely found in the environment and the latter can induce cancer by resulting in abnormal proliferation of cutaneous and mucosal squamous cells. Epidemiological evidence suggests that tobacco smoke and HPV can synergistically promote the development of malignant tumors such as oropharyngeal squamous cell carcinoma, head and neck squamous cell carcinoma and lung cancer. However, the mechanism of the synergistic carcinogenesis of HPV and PAHs is unclear. Cell colony formation assay, cell scratch assay and cell invasion assay were conducted to assess the synergistic carcinogenesis of HPV and B[a]P and the cell phenotypic changes of the human cervical carcinoma HeLa cells (HPV positive) and C33A cells (HPV negative) exposed to B[a]P. High performance liquid chromatography-electrospray tandem mass spectrometry (HPLC-ESI-MS/MS) was used to quantitatively determine the main DNA adduct caused by B[a]P, dihydroglycol epoxide-N²-deoxyguanosine (BPDE-N²-dG). The results showed that the ability of cells invasion and colony formation of HeLa and C33A were significantly promoted by 10 μmol/L B[a]P with a dose-response relationship. The invasion and colony formation of B[a]P-treated HeLa cells were significantly higher than those of C33A cells ($p < 0.01$) and those of HeLa cells without B[a]P treatment ($p < 0.01$). The group treated

收稿日期: 2019-01-24; 网络首发日期: 2019-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(21778011); 北京市长城学者支持计划项目(CIT&TCD20180308); 北京市教委重点实验室项目(PXM2015_014204_500175); 北京市自然科学基金资助项目(7184192); 中国博士后基金资助项目(2017M620567); 北京博士后基金资助项目(2018-ZZ-022)。

作者简介: 庄琢琛(1994-), 女, 北京人, 硕士生, 主要从事致癌作用机理研究。

通讯作者: 赵丽娇, E-mail: zhaolijiao@bjut.edu.cn。

with 10 $\mu\text{mol/L}$ B[a]P in HeLa cell and C33A cell induced the highest levels of BPDE- N^2 -dG 4172 ± 124 fmol/mg DNA and 1255 ± 228 fmol/mg DNA, respectively. The levels of BPDE- N^2 -dG in HeLa cells treated with B[a]P were significantly higher than those in C33A cells ($p < 0.01$). These combined results suggest that HPV could effectively promote DNA damage induced by B[a]P, which provide a reasonable explanation for the results of cellular experiments described above. It provides not only a new strategy for the prevention and treatment of B[a]P and HPV-related cancer, but also a new method for cancer etiology research.

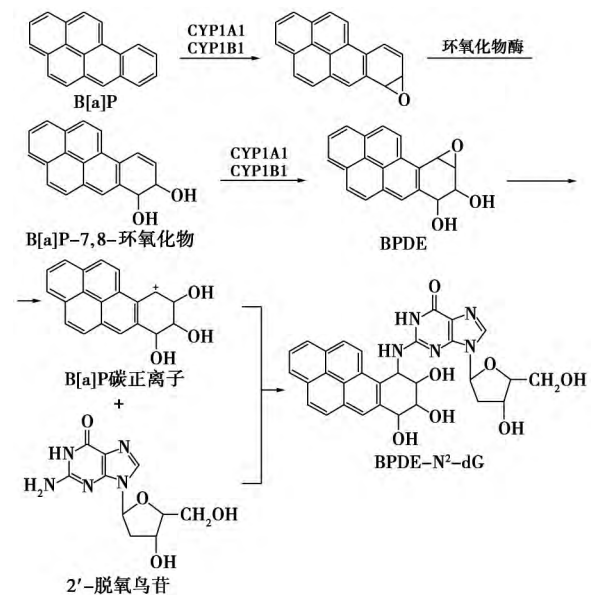
Key words: benzo[a]pyrene; human papillomavirus; synergetic carcinogenesis; DNA adducts; HPLC-ESI-MS/MS

多环芳烃(PAHs)是一类广泛存在于环境中的致癌物,也是烟草烟气的主要成分。在目前已发现的 400 多种 PAHs 中,苯并[a]芘(B[a]P)是一种具有强致癌性的典型 PAHs,被国际癌症研究机构(IARC)列为 I 级人类致癌物^[1]。研究表明,B[a]P 本身并不具有致癌活性,需在进入体内后经混合功能氧化酶 P450 作用下代谢活化生成终致癌物二氢二醇环氧化物(BPDE),与 DNA 共价结合,进而诱发癌症^[2]。如右图所示,BPDE- N^2 -dG 是 B[a]P 代谢活化后导致的主要 DNA 加合物,与 B[a]P 的致癌作用密切相关,已被应用于 B[a]P 暴露致癌生物标志物的研究^[3-6]。

人乳头瘤病毒(HPV)是一类高度组织特异性的无包膜环状 DNA 病毒,可诱导皮肤和黏膜鳞状上皮细胞异常增殖^[7],分为高危型和低危型两大类^[8]。目前已证实高危型 HPV 是诱导宫颈癌和食管癌发生的关键因素之一,尤其是高危型 HPV16 的持续感染与宫颈癌、食管癌和阴茎癌等多种癌症关系密切^[9,10]。

癌症的发生可能与多因素共同作用有关,流行病学研究表明,烟草烟气与 HPV 协同作用可促进宫颈癌和肺癌等恶性肿瘤的发生和发展^[11]。Peña 等^[12]发现转染 HPV16 E6 和 E7 的肺上皮细胞暴露于香烟烟气冷凝物后,DNA 损伤水平明显升高;香烟烟气能够作用于细胞长调控区激活 HPV16 p97 启动子,使启动子活化水平呈现剂量依赖性增长。Trushin 等^[13]利用 B[a]P 处理转染 HPV 基因的人角质细胞,发现转染 HPV 的细胞的 B[a]P 代谢活化水平与未转染的细胞相比明显升高,表明 HPV 能通过提高宿主细胞中 P450 表达水平从而促进 B[a]P 的代谢活化。以上研究表明,B[a]P 暴露与 HPV 感染可能协同诱发癌症。此外, Park 等^[14]发现细胞暴露于烟草特异亚硝胺 N^2 -亚硝基去甲烟碱(NNN)或 4-(N -甲基- N^2 -亚硝基氨基)-1-(3-吡啶基)-1-丁酮(NNK)后,感染单纯疱疹病毒(HSV)导致的恶性转化频率显著增强,从而证实了 NNN 和 NNK 与 HSV 具有

协同致癌作用。本研究通过细胞生物学实验和高效液相色谱-电喷雾串联质谱(HPLC-ESI-MS/MS)分析对 B[a]P 和 HPV 协同作用下宫颈癌细胞的侵袭和迁移能力以及 DNA 损伤水平进行了研究,以期阐明二者之间的协同致癌作用及相关癌症的防治提供依据。



B[a]P 经过代谢活化导致 DNA 损伤形成 BPDE- N^2 -dG 的机理^[4]

Mechanism on the metabolic activation of B[a]P inducing DNA damages and formation of BPDE- N^2 -dG

1 实验部分

1.1 主要仪器与试剂

Heracell 150i 型 CO_2 细胞培养箱、Thermo-Finnigan SURVERYOR 型高效液相色谱仪、TSQ Quantum Discovery MAX 型三重四极杆液质联用仪、Speedvac 型低温冷冻离心浓缩仪(美国赛默飞世尔科技有限公司); 320A 型台式低速离心机(北京白洋医疗器械有限公司); HC-3018R 型高速冷冻离心机(安徽中科中佳科学仪器有限公司)。

BPDE、B[a]P(分析纯,上海冠翔生物技术有限公司); [$^{13}\text{C}_{10}$, $^{15}\text{N}_5$]-2'-脱氧鸟苷(dG,分析纯,

美国剑桥同位素标准品公司); 甲醇、乙腈(色谱纯,百灵威科技有限公司); 其他试剂均为分析纯,采购自百灵威科技有限公司。

DNase I 酶、碱性磷酸酶、RNase A 酶(宝生物工程(大连)有限公司); 小牛胸腺 DNA(CT-DNA)、蛇毒磷酸二酯酶 I、蛋白酶 K、结晶紫染液(西格玛奥德里奇(上海)贸易有限公司); **S9 混合功能氧化酶(武汉普莱特生物医药技术有限公司)**; DMEM 培养基、磷酸缓冲液(PBS)、双抗(青链霉素混合液)、胰蛋白酶-EDTA(0.25%)(美国 Hyclone 公司); 胎牛血清(FBS,美国 Gibco 公司); HPV 阳性人宫颈癌细胞 HeLa、HPV 阴性人宫颈癌细胞 C33A(中国医学科学院基础医学研究所基础医学细胞中心)。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养

HeLa 和 C33A 细胞均使用 DMEM 高糖培养基(含 10%FBS 和 1%双抗),置于 37 °C 5% CO₂ 培养箱中培养。细胞融合度达 80%~90%进行传代,用 PBS 洗涤细胞,并在胰蛋白酶消化后以 1 000 r/min 离心 2 min 收获细胞,随后按比例分装至新培养瓶中,于培养箱中继续培养。

1.2.2 细胞划痕实验

取对数生长期的两种细胞用胰酶消化,调整细胞密度分别为 3×10⁶ 个/孔(HeLa)和 3.4×10⁶ 个/孔(C33A)接种至六孔板中,置于培养箱过夜孵育。待细胞贴壁后弃去原培养液,用 10 μL 枪头在每孔中进行划痕处理,随后向各孔中加入浓度为 0.1、1、10、40 和 200 μmol/L B[a]P 的培养基孵育 24 h,加入不含 B[a]P 的培养基作为对照组。每个浓度设置 3 个复孔。在 0 h 拍照记录划痕的初始宽度和拍照位置,并分别在 12 h 和 24 h 再次拍照,观察划痕愈合情况。

1.2.3 细胞侵袭实验

首先以浓度为 1、10 μmol/L 的 B[a]P 培养液处理细胞 24 h,然后在不含 FBS 的培养基中饥饿处理细胞 12 h。用 Matrigel 基质胶包被 Transwell 小室底部膜的上室面以模拟细胞外基质,用不含 FBS 的培养基将 HeLa 细胞密度调整为 2.5×10⁵ 个/mL, C33A 细胞密度调整为 6.5×10⁵ 个/mL,均取 200 μL 细胞悬液加至 Transwell 小室的上室中;在下室加入 600 μL 含 10% FBS 的 DMEM 培养基,置于培养箱中分别孵育 48 h(HeLa)和 72 h(C33A),每个浓度设置 3 个平行

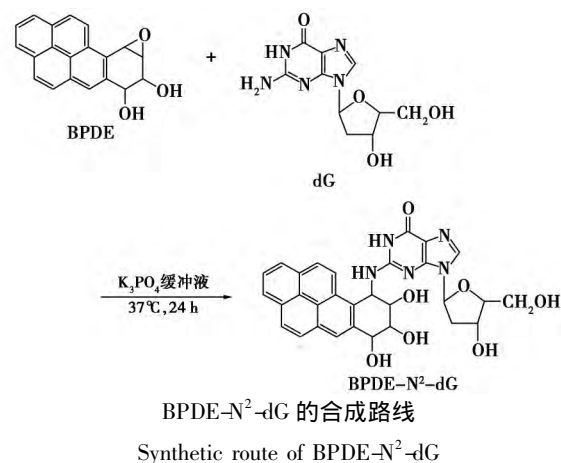
实验。培养结束后,用 0.1%的结晶紫染液室温染色 20 min,经 PBS 漂洗至细胞不再脱色为止,用湿棉签擦去基质胶和 Transwell 小室膜上层细胞,在显微镜下观察并拍照计数。

1.2.4 细胞克隆形成实验

将细胞以 500 个/孔接种至六孔板中,加入含 B[a]P 的培养基, B[a]P 浓度为 0.1、1、10、40 和 200 μmol/L,每个浓度设置 3 个复孔;同时设置不含 B[a]P 的对照组。将细胞放入培养箱中培养 15 d,每 3 d 换液一次。然后,用 0.1%的结晶紫染液染色 20 min,再用 PBS 漂洗至背景透明,进行拍照计数。以 ≥50 个细胞/集落为标准计算克隆形成率,克隆形成率=(细胞集落数/初始接种细胞数)×100%。

1.2.5 BPDE-N²-dG 标准品的制备

将 1 mg 脱氧鸟苷(dG)溶于 750 μL(0.1 mol/L)的 K₃PO₄ 缓冲液(pH 7.4)中,加入 250 μL(1 μg/μL)BPDE 水溶液,涡旋振荡至充分溶解,于 37 °C 下反应 24 h,合成路线如下所示。用同样的方法合成内标物 [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG。使用 Oasis HLB 小柱对反应混合物进行固相萃取。首先,用 1 mL 甲醇活化固相萃取小柱,然后用 1 mL 去离子水冲洗小柱残留的甲醇;将反应混合液上样至小柱中,然后用 1 mL V(甲醇):V(去离子水)=5:95 溶液淋洗小柱以除去未反应的 dG;最后用 1 mL 甲醇洗脱两次,并收集含有 BPDE-N²-dG 的洗脱液。将洗脱液去除溶剂后复溶于 400 μL V(甲醇):V(去离子水)=20:80 溶液中,以备 HPLC 纯化。



将上述 BPDE-N²-dG 粗产品溶液通过 HPLC 进行纯化。使用 Agilent Zorbax SB C18(250 mm×4.6 mm 5 μm) 反向色谱柱;柱温为 25 °C;流动相 A

为去离子水,流动相 B 为甲醇;流速为 0.7 mL/min;进样量为 25 μ L;检测波长为 346 nm(二级管阵列检测器);50% A+50% B 等度洗脱。BPDE-N²-dG 的出峰时间为 27.07 min。收集含有 BPDE-N²-dG 的组分,经浓缩干燥后得到 BPDE-N²-dG 标准品。用同样的方法对内标物 [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 进行纯化。BPDE-N²-dG 和 [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 均经过高分辨质谱进行结构确证,测得的 [M+H]⁺ 分别为 m/z 570.198 9(计算值为 m/z 570.198 3) 和 m/z 585.217 6(计算值为 m/z 585.217 0)。

1.2.6 细胞中 BPDE-N²-dG 的定量分析

将两种细胞用 B[a]P 进行处理。向培养基中加入 1% 或 10% 的 S9 工作液,再分别加入 B[a]P 溶液,使培养基所含 B[a]P 浓度分别为 0.1、1、10、100 和 200 μ mol/L,随后加入到融合度达 70%~80% 的细胞中,在培养箱中孵育 24 h 后提取细胞 DNA 以备 BPDE-N²-dG 的检测。同时设置未经 B[a]P 处理的细胞作为对照组。

将培养后的细胞经胰酶消化,1 000 r/min 离心 2 min 收集,加入 15 mL 细胞裂解缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl、100 mmol/L EDTA、0.5% SDS, pH 8.0)、60 μ L(20 mg/mL)蛋白酶 K 溶液和 150 μ L(5 mg/mL)RNaseA 溶液,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中孵育 12 h。随后加入等体积的冰异丙醇溶液,颠倒离心管使 DNA 析出,转移团状 DNA 于 2 mL 离心管中,加入 800 μ L TE 缓冲液(10 mmol/L 三羟甲基氨基甲烷(Tris)、1 mmol/L 乙二胺四乙酸二钠(EDTA),pH 7.4)溶解 DNA。再依次用 V(酚):V(氯仿):V(异戊醇)=25:24:1 和 V(氯仿):V(异戊醇)=24:1 溶液抽提 DNA,分别经 13 000 r/min 离心 8 min 后取上清液。随后加入等体积冰异丙醇沉淀 DNA,先后以 75% 和 100% 的冰乙醇洗涤,最后氮气吹干,得到干燥的 DNA 样品。加入 114 μ L Tris-HCl 溶液溶解 DNA。

向 DNA 溶液中依次加入 [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 内标溶液(终浓度为 10 nmol/L)、7.5 U DNase I 溶液、1.5 U 碱性磷酸酶溶液及 0.037 5 U 蛇毒磷酸二酯酶溶液,于 37 $^{\circ}$ C 酶解 3 h。随后加入 850 μ L V(甲醇):V(去离子水)=5:95 溶液,充分振荡混匀,取 20 μ L 用于后续 dG 测定,剩余样品用固相萃取进行纯化。收集纯化后的液体并去除溶剂后,复溶于 50 μ L V(甲醇):V(去离子水)=20:80 溶液,以备 HPLC-ESI-MS/MS 检测。

HPLC-ESI-MS/MS 分析采用 Agilent Zorbax SB C18(150 mm \times 2.1 mm, 5 μ m) 反向色谱柱;柱温为 25 $^{\circ}$ C;流动相 A 为 0.01% 冰乙酸水溶液,流动相 B 为乙腈;流速为 0.1 mL/min;进样量为 20 μ L;梯度洗脱程序为 0~8 min,95%~20% A,5%~80% B;8~23 min,20% A,80% B;23~25 min,20%~95% A,80%~5% B;25~40 min,95% A,5% B。质谱条件如下:采用电喷雾离子源(ESI)正离子检测模式;喷雾电压为 4 000 V;鞘气(N₂)压力为 35 psi;辅气(N₂)压力为 5 psi;碰撞诱导解离能(CID)为 11 V;源内碰撞诱导解离能(源内 CID)为 8 V;离子传输管温度为 300 $^{\circ}$ C;采用选择反应扫描模式(SRM),离子通道为 m/z 570 \rightarrow 454 和 m/z 585 \rightarrow 464。

采用 HPLC 测定脱氧鸟苷(dG)的浓度,选用 Agilent Zorbax SB C18(250 mm \times 4.6 mm, 5 μ m) 反向色谱柱,柱温为 25 $^{\circ}$ C;流动相 A 为水,流动相 B 为甲醇;流速为 0.7 mL/min;进样量为 20 μ L,梯度洗脱程序为:0~15 min,95%~64% A,5%~36% B;15~17 min,64%~20% A,36%~80% B;17~19 min,20% A,80% B;19~21 min,20%~95% A,80%~5% B;21~36 min,95% A,5% B。根据式 1 换算出酶解前 DNA 的浓度,式 1 中 C_{dG} 为 dG 的浓度(单位为 μ mol/mL)。因 dG 含量在 4 个碱基中占比约为 22%,且 1 mg DNA 相当于 3 μ mol 脱氧核苷,故由该式计算 DNA 含量^[15]。

$$C_{DNA} = C_{dG} / (0.22 \times 3) = 1.515 \times C_{dG} \quad (1)$$

DNA 加合物含量按式 2 计算。其中 $C_{加合物}$ 为 BPDE-N²-dG 的浓度(单位为 fmol/mL),计算得出的 BPDE-N²-dG 含量表示为 fmol BPDE-N²-dG/mg DNA。

$$\text{BPDE-N}^2\text{-dG 含量} = C_{加合物} / C_{DNA} \quad (2)$$

1.2.7 统计学分析

采用 SPSS 统计软件进行数据分析,结果以平均值 \pm 标准偏差(S.D.)表示,组间差异使用 T 检验。 $p < 0.05$ 表示不同组之间存在显著差异, $p < 0.01$ 表示存在极显著差异。

2 结果与讨论

2.1 细胞划痕实验

如图 1a、1b 所示,HeLa 细胞的迁移率随 B[a]P 浓度的升高而增加,在 10 μ mol/L 时迁移率达到最大值 24.73%(24 h);当 B[a]P 浓度升高至 200 μ mol/L 时,细胞迁移率降低至 11.21%

(24 h) 这是由于 B[a]P 的毒性作用抑制了细胞的生长,进而降低了细胞的迁移能力。C33A 细胞经不同浓度 B[a]P 处理后,细胞迁移率变化趋势与 HeLa 细胞一致,表明 B[a]P 对两种宫颈癌细胞的迁移能力均有促进作用。如图 1c 所示,对比 HeLa 和 C33A 细胞的迁移率发现,B[a]P 处理 24 h 时,HeLa 细胞的迁移率明显高于 C33A 细胞,这表明 B[a]P 对 HPV 阳性细胞的迁移能力有更显著的促进作用,且在低浓度时($B[a]P < 10 \mu\text{mol/L}$) 呈良好的剂量效应关系。当 B[a]P 浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 时,HeLa 细胞的划痕愈合能力显著高于 C33A 细胞($p < 0.01$),且 HeLa 细胞的迁移率(24.73%,24 h) 大于 C33A 细胞的迁移率(15.49%,24 h) 与 HeLa 细胞对照组迁移率(7.83%,24 h) 的总和,这表明 B[a]P 与 HPV 二者间存在协同作用。

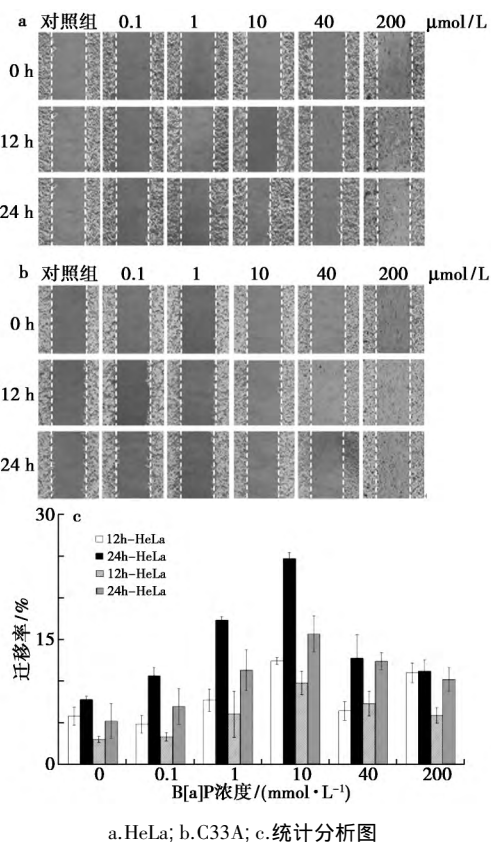


图 1 不同浓度 B[a]P 对 HeLa 和 C33A 细胞迁移的影响(200 \times)

Fig.1 Influence of the B[a]P concentration of on the migration of HeLa and C33A cells (200 \times)

2.2 细胞侵袭实验

细胞侵袭实验结果如图 2 所示,暴露于 B[a]P 的 HeLa 细胞和 C33A 细胞穿膜数量均明显增加($p < 0.01$),且细胞数量随 B[a]P 浓度的升高

而增加。以浓度为 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 B[a]P 处理细胞时,对比穿膜细胞数量发现,HeLa 侵袭细胞数(60 ± 12) 显著高于 C33A 细胞(30 ± 6) ($p < 0.01$),表明 B[a]P 对两种宫颈癌细胞的侵袭能力均具有促进作用,且对 HeLa 细胞的促进作用显著高于 C33A 细胞。此外,HeLa 细胞侵袭数(60 ± 12) 大于 C33A 细胞侵袭数(30 ± 6) 与 HeLa 对照组细胞侵袭数(7 ± 3) 的总和,这进一步说明了 B[a]P 与 HPV 可协同促进宫颈癌细胞的侵袭能力,为二者之间的协同作用提供了直接证据。

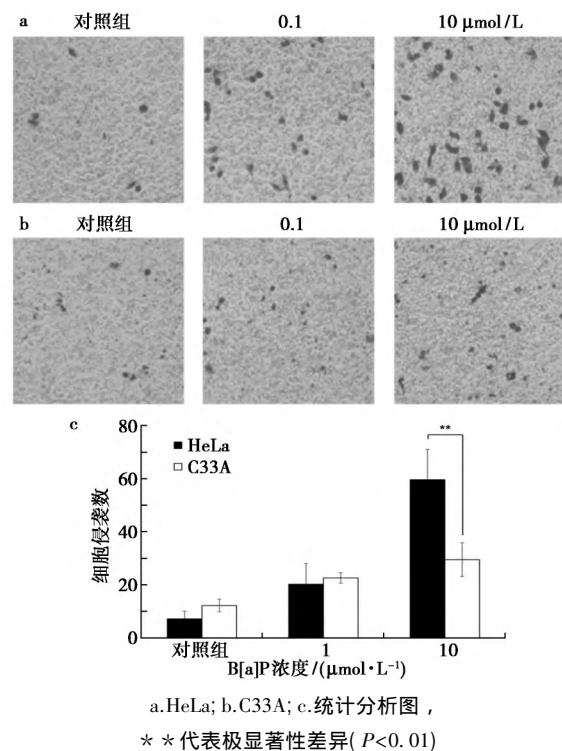


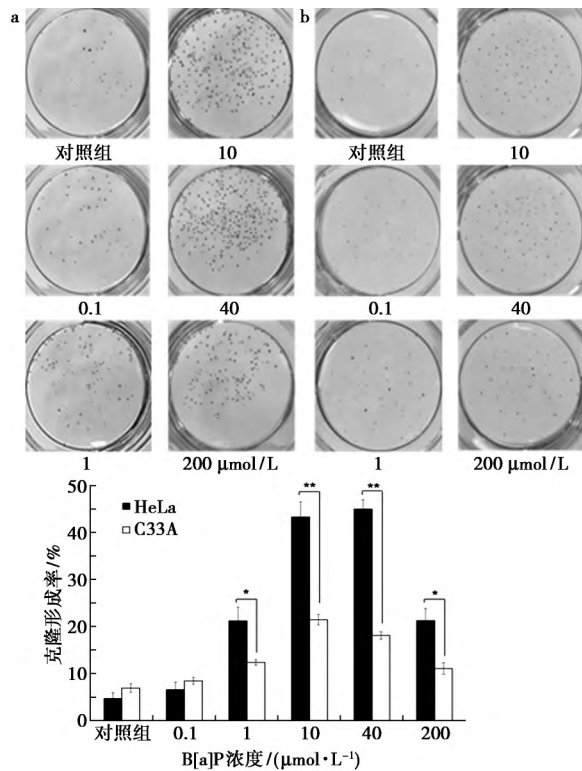
图 2 不同浓度 B[a]P 对 HeLa 和 C33A 细胞侵袭能力的影响(400 \times)

Fig.2 Effects of different concentration of B[a]P on HeLa and C33A cells invasion (400 \times)

2.3 细胞克隆形成实验

如图 3 所示,经 B[a]P 处理后,HeLa 细胞和 C33A 细胞的克隆形成率分别为 9.6%~45.0% 和 8.5%~21.5%,在 $1 \sim 200 \mu\text{mol/L}$ 浓度范围内均显著高于空白对照组($p < 0.05$),说明 B[a]P 对两种细胞的恶性程度均有促进作用。在各 B[a]P 浓度下,HeLa 细胞的克隆形成率均显著高于相应处理浓度下的 C33A 细胞($p < 0.05$);其中,经 $10 \mu\text{mol/L}$ B[a]P 处理的 HeLa 细胞的克隆形成率($43.3 \pm 3.3\%$) 大于相同处理浓度下 C33A 细胞的克隆形成率($21.5 \pm 1.1\%$) 与 HeLa 细胞对照组的克隆形成率($4.7 \pm 1.2\%$) 之和,表明 B[a]P 能

够与 HPV 协同促进宫颈癌细胞的克隆形成能力, 这与划痕实验和侵袭实验的结果完全一致。



a. HeLa; b. C33A; c. 统计分析图 * 代表显著性差异 ($P < 0.05$), ** 代表极显著性差异 ($P < 0.01$)

图 3 不同浓度 B[a]P 对 HeLa 和 C33A 细胞平板克隆形成的影响

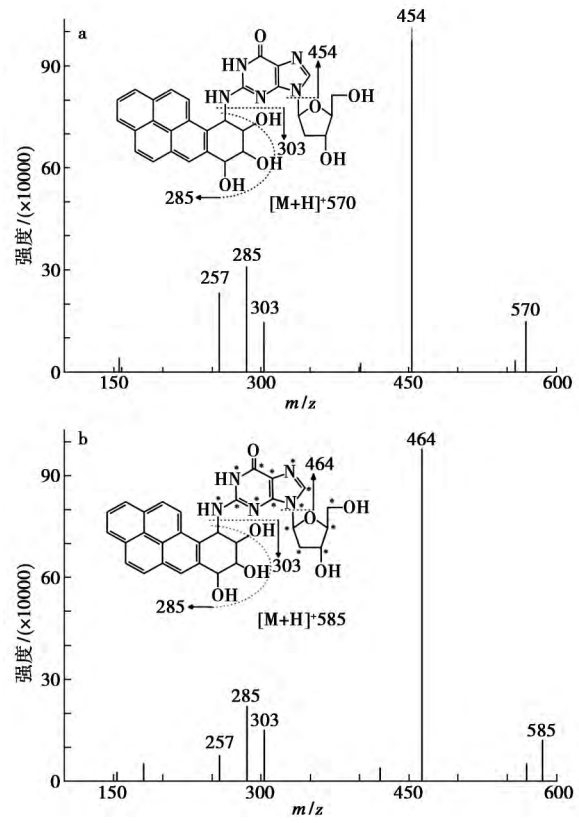
Fig.3 Effects of different concentration of B[a]P on the colony formation of HeLa and C33A cell

2.4 HPLC-ESI-MS/MS 法测定细胞中 BPDE-N²-dG 的含量

2.4.1 定量分析方法学研究

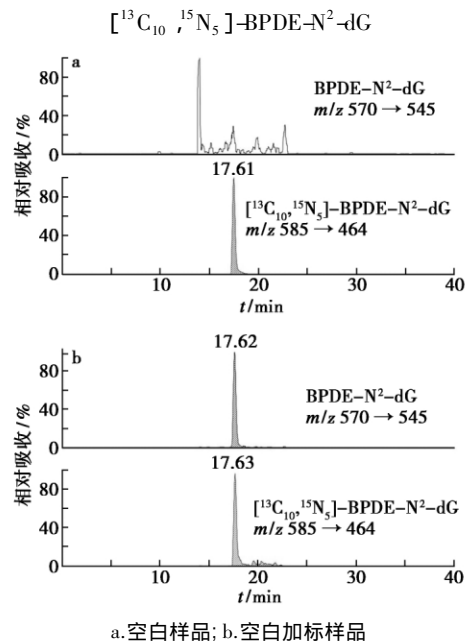
目标化合物 BPDE-N²-dG 的二级质谱图如图 4a 所示, 图中 m/z 570 $[M+H]^+$ 为分子离子峰, m/z 454 为分子离子失去一分子脱氧核糖后的碎片离子峰 $[M-dR]^+$, m/z 303 为分子离子失去鸟嘌呤后的碎片离子峰 $[M-dG]^+$, m/z 285 为 m/z 303 脱去一分子水后的碎片离子峰, m/z 257 为 m/z 285 脱去一分子一氧化碳后的碎片离子峰; 其中 m/z 454 为主要碎片离子。内标物 [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 的二级质谱图如图 4b 所示, 可以看出内标物的质谱碎裂方式与 BPDE-N²-dG 相同 m/z 464 为主要碎片离子。

采用 SRM 模式对目标化合物和内标物进行监测, 分别选取离子通道 m/z 570→454 和 m/z 585→464。空白样品的 SRM 离子流图如图 5a 所示, 未检出 BPDE-N²-dG 信号, 表明该检测方法和



a. BPDE-N²-dG; b. [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG
图 4 BPDE-N²-dG 和 [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 的二级全扫描质谱图

Fig.4 MS2 Full scan mass spectrum of BPDE-N²-dG and [¹³C₁₀, ¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG



a. 空白样品; b. 空白加标样品
图 5 空白样品和空白加标样品的 SRM 离子流图
Fig.5 SRM Ion chromatograms for blank and blank sample added with BPDE-N²-dG standard

样品前处理过程中不存在 BPDE-N²-dG 污染, 对后续的样品分析无干扰。对 BPDE-N²-dG 标准品

进行检测,所得 SRM 离子流图如图 5b 所示,目标化合物与内标物的保留时间完全一致,均为 17.6 min。以上结果表明该方法具有良好的专属性。

梯度稀释 BPDE-N²-dG 标准品,在设定好的检测条件下,以 3 倍信噪比(S/N)测得 BPDE-N²-dG 的检出限(LOD)为 3 fmol,以 10 倍 S/N 测得 BPDE-N²-dG 的定量限(LOQ)为 6 fmol。配制 BPDE-N²-dG 浓度为 1~500 nmol/L 的标准溶液(含浓度为 10 nmol/L 的 [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 内标),以 BPDE-N²-dG 和 [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 的浓度比为横坐标,峰面积比为纵坐标,绘制标准曲线如图 6 所示。得到标准曲线的相关系数为 $R^2 = 0.9999$,表明该方法在 1~500 nmol/L 范围内线性关系良好,满足定量分析的要求。

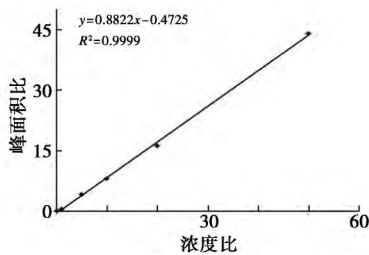


图 6 BPDE-N²-dG 和 [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG 的 SRM 峰面积比对浓度比的标准曲线

Fig.6 Calibration curve of BPDE-N²-dG constructed by plotting SRM peak area ratio versus the concentration ratio between BPDE-N²-dG and [¹³C₁₀,¹⁵N₅]-BPDE-N²-dG

如表 1 所示,本方法的日内准确度和精密度($n=6$)分别为 93.0%~100.8%和 1.0%~3.5%;日间准确度和精密度($n=18$)分别为 92.9%~101.2%和 0.4%~1.8%,表明此方法具有较好的稳定性和可重复性,满足定量分析要求。将含不同浓度 BPDE-N²-dG 的空白加标样品经酶解、固相萃取、浓缩等前处理后,进行定量分析,计算加

表 1 BPDE-N²-dG 定量分析方法准确度和精密度测定结果

Tab.1 Precision and accuracy of the method for BPDE-N²-dG quantitation

样品浓度/ (nmol·L ⁻¹)	日内准确度和精密度 ($n=6$)			日间准确度和精密度 ($n=18$)		
	均值/ (nmol·L ⁻¹)	RSD/ %	准确 度/%	均值/ (nmol·L ⁻¹)	RSD/ %	准确 度/%
10	9.3	3.5	93.0	9.3	1.1	92.9
100	100.5	3.0	100.5	101.2	1.8	101.2
200	199.2	1.7	99.6	201.4	1.0	100.7
500	504.1	1.0	100.8	505.1	0.4	101.0

标回收率。结果如表 2 所示,该方法的加标回收率为 99.7%~105.1%。

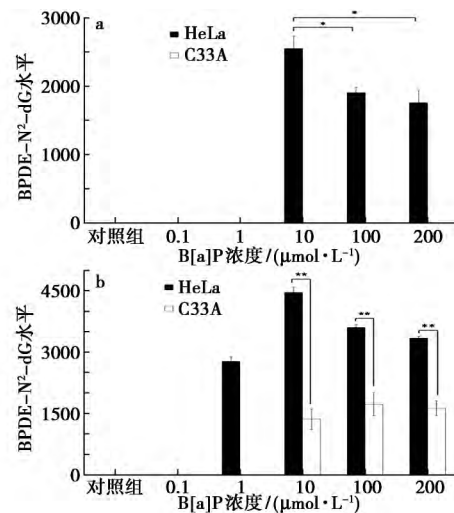
表 2 BPDE-N²-dG 定量分析方法的加标回收率测定结果

Tab.2 Recovery of the method for

BPDE-N ² -dG quantitation		($n=3$)
加标浓度/(nmol·L ⁻¹)	检测浓度/(nmol·L ⁻¹)	回收率/%
10	10.5±2.2	105.1
100	100.2±0.4	100.2
200	199.4±1.4	99.7
500	499.3±1.5	99.9

2.4.2 细胞中 BPDE-N²-dG 的定量分析

如图 7a 所示,在 1%大鼠肝 S9 的体系中,HeLa 细胞中生成的 BPDE-N²-dG 为:(2 550±187) fmol/mg DNA(10 μmol/L B[a]P)、(1 905±79) fmol/mg DNA(100 μmol/L B[a]P)和(1 759±174) fmol/mg DNA(200 μmol/L B[a]P),其他 B[a]P 浓度实验组和对照组均未检测到目标化合物;所有浓度 B[a]P 处理的 C33A 细胞中均未检测到目标化合物。结果表明,HPV 可促进细胞中 B[a]P 的代谢活化,从而增强 B[a]P 对 DNA 的烷化损伤能力。



* 代表显著性差异($P < 0.05$),

** 代表极显著性差异($P < 0.01$)

a.不同浓度 B[a]P 与 1% S9 处理;

b.不同浓度 B[a]P 与 10% S9 处理

图 7 HeLa 和 C33A 细胞经不同浓度 B[a]P 与 1% S9 和 10% S9 处理 24 h 测得的 BPDE-N²-dG 含量比较

Fig.7 Comparison of BPDE-N²-dG amounts in HeLa and C33A cells treated with different concentration of B[a]P for 24 h with 1% S9 and 10% S9

当培养基中的大鼠肝 S9 含量增加至 10%

时, B[a]P 导致的 DNA 加合物生成量显著高于 1% 大鼠肝 S9 的体系, 表明 S9 可促进细胞中 B[a]P 的代谢活化, 使 BPDE-N²-dG 的水平升高。如图 7b 所示, 在含 10% S9 的体系中, B[a]P 处理 C33A 细胞中生成的 BPDE-N²-dG 为 (1 255 ± 228) fmol/mg DNA (10 μmol/L B[a]P)、(1 590 ± 264) fmol/mg DNA (100 μmol/L B[a]P) 和 (1 503 ± 166) fmol/mg DNA (200 μmol/L B[a]P), 其他浓度实验组和对照组均未检测到目标化合物。相同条件下, HeLa 细胞中生成的 BPDE-N²-dG 为 (2 557 ± 102) fmol/mg DNA (1 μmol/L B[a]P)、(4 172 ± 124) fmol/mg DNA (10 μmol/L B[a]P)、(3 323 ± 62) fmol/mg DNA (100 μmol/L B[a]P) 和 (3 080 ± 49) fmol/mg DNA (200 μmol/L B[a]P), 最低 B[a]P 浓度实验组 (0.1 μmol/L) 和对照组均未检测到目标化合物。当 B[a]P 浓度为 10 μmol/L 时, HeLa 细胞中的 BPDE-N²-dG 水平为最高; 且大于相同浓度 B[a]P 处理后 C33A 细胞中的加合物含量与对照组 HeLa 细胞中加合物含量的总和。经不同浓度 B[a]P 处理的 HeLa 细胞中 BPDE-N²-dG 的含量呈先升高后下降的趋势, 可能是由于高浓度 B[a]P 对细胞的毒性作用导致细胞死亡而使测得的 BPDE-N²-dG 水平降低。以上结果表明, 在各 B[a]P 浓度处理组中, HeLa 细胞中的加合物水平均显著高于 C33A 细胞 ($p < 0.01$), 进一步证明了在 HPV 阳性细胞中 B[a]P 更容易代谢活化导致 DNA 损伤生成 BPDE-N²-dG。

3 结论

本研究对 B[a]P 处理后的人宫颈癌 HeLa 细胞 (HPV 阳性) 和 C33A 细胞 (HPV 阴性) 进行了研究, 分析了 B[a]P 对两种细胞生物学行为的影响。结果表明, B[a]P 与 HPV 能够协同促进细胞的克隆形成能力及细胞迁移和侵袭能力, 说明 B[a]P 能够与 HPV 协同促进人宫颈癌细胞的恶化。使用 HPLC-ESI-MS/MS 方法对暴露于不同浓度 B[a]P 的 HeLa 细胞和 C33A 细胞中的 DNA 损伤产物 BPDE-N²-dG 进行了分析, 建立了具有高灵敏度、高准确性和高专属性的定量分析方法。定量分析结果表明, 混合功能氧化酶 S9 能够明显促进 B[a]P 的代谢活化, 使得 BPDE-N²-dG 的生成量增加; HPV 能够明显促进 B[a]P 代谢活化

后对 DNA 的损伤作用, 导致 BPDE-N²-dG 水平显著升高。

本研究不仅观察到了 B[a]P 和 HPV 能够协同促进肿瘤细胞的恶性程度, 而且从分子水平上确证了二者能够协同导致 DNA 损伤产物 BPDE-N²-dG 水平的升高, 从而为深入揭示二者的协同致癌作用机制提供了有力的实验证据, 为 B[a]P 和 HPV 相关癌症的防治提供新策略, 同时为癌症病因学研究提供新方法。

参考文献:

- [1] IARC. Some non-heterocyclic polycyclic aromatic hydrocarbons and some related exposures [M]. France: IARC, 2010, 394-422.
- [2] IFEGWU O C, ANYAKORA C. Polycyclic aromatic hydrocarbons: part II, urine markers [J]. *Adv. Clin. Chem.*, 2016, **75**: 159-183.
- [3] LIN P, CHANG J T, KO J L, et al. Reduction of androgen receptor expression by benzo [a] pyrene and 7,8-dihydro-9,10-epoxy-7,8,9,10-tetrahydrobenzo [a] pyrene in human lung cells [J]. *Biochem. Pharmacol.*, 2004, **67**(8): 1 523-1 530.
- [4] SINGH R J, MARGARET G, RACHEL C L, et al. Detection and quantitation of benzo [a] pyrene-derived DNA adducts in mouse liver by liquid chromatography-tandem mass spectrometry: comparison with ³²P-Postlabeling [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 2006, **19**(6): 868-878.
- [5] STRAUB K M, MEEHAN T, BURLINGAME T, et al. Identification of the major adducts formed by reaction of benzo [a] pyrene diol epoxide with DNA in vitro [J]. *P. Natl. A. Sci.*, 1978, **74**(12): 5 285-5 289.
- [6] CHENG S C, HILTON B D, ROMAN J M, et al. DNA Adducts from carcinogenic and noncarcinogenic enantiomers of benzo [a] pyrene dihydrodiol epoxide [J]. *Chem. Res. Toxicol.*, 1989, **2**(5): 334-340.
- [7] ZUR H H. Papillomavirus infections: a major cause of human cancers [J]. *BBA-Biomembranes*, 1996, **1 288**(2): 55-78.
- [8] ZUR H H. Papillomaviruses in the causation of human cancers—a brief historical account [J]. *Virology*, 2009, **384**(2): 260-265.
- [9] MAUCORT-BOULCH D, FRANCESCHI S, PLUMMER M. International correlation between human papillomavirus prevalence and cervical cancer incidence [J]. *Cancer Epi-*

- demol Biomarkers Prev.* 2008, **17**(3): 717-720.
- [10] MADKAN V K, COOK-NORRIS R H, STEADMAN M C, et al. The oncogenic potential of human papillomaviruses: a review on the role of host genetics and environmental cofactors [J]. *Br. J. Dermatol.*, 2007, **157**(2): 228-241.
- [11] CASTELLSAGUE X, BOSCH F X, MUNOZ N. Environmental co-factors in HPV carcinogenesis [J]. *Virus Res.*, 2002, **89**(2): 191-199.
- [12] PEÑA N, CARRILLO D, MUNOZ J P, et al. Tobacco smoke activates human papillomavirus 16 p97 promoter and cooperates with high-risk E6/E7 for oxidative DNA damage in lung cells [J]. *PLoS One*, 2015, **10**(4): 1-16.
- [13] TRUSHIN N, ALAM S, ELBAYOUMY K, et al. Comparative metabolism of benzo[a]pyrene by human keratinocytes infected with high-risk human papillomavirus types 16 and 18 as episomal or integrated genomes [J]. *J. Carcinog.* 2012, **11**(1): 427-438.
- [14] PARK N H, DOKKO H, LI S L, et al. Synergism of herpes simplex virus and tobacco-specific N'-nitrosamines in cell transformation [J]. *J. Oral. Maxil. Surg.*, 1991, **49**(3): 276-281.
- [15] GUPTA R C, REDDY M V, RANDERATH K. ³²P-post-labeling analysis of nonradioactive aromatic carcinogen-DNA adducts [J]. *Carcinogenesis*, 1982, **3**(9): 1 081-1 092.

《化学试剂》征稿简则

《化学试剂》于 1979 年创刊,是我国中文化学类核心期刊,中国科技核心期刊,中国石油和化工行业优秀期刊;是《中国科技期刊数据库》、《中国学术期刊综合评价数据库》、《中国学术期刊(光盘版)》收录期刊;是美国化学文摘(CA)主要摘录的千种期刊。

本刊优势

期刊专业性

《化学试剂》是由全国化学试剂信息总站(原化工部化学试剂信息站)编辑出版的化学试剂及相关领域的专业性刊物。

涵盖范围广

主要报道的学科关注点包括:报道和介绍化学试剂、精细化学品、专用化学品及相关领域的最新研究进展、理论知识、科研成果、技术经验,新产品的合成、分离、提纯以及各种分析测试技术、分析仪器、行业动态等。

栏目丰富

主要栏目包括:聚焦、研究报告、综述与进展、分析与测试、标准物质与标准品、试剂与应用、合成与工艺技术、提纯与分离、动态与信息。

网络首发

投稿论文经过审稿专家和编辑部的审核,录用后可以通过中国知网进行录用稿网络首发。

投稿方式

请登录我刊唯一官方网站(www.chinareagent.com.cn)进行在线投稿,概不接受其他任何形式的投稿,稿件要求及论文模板请参考投稿须知。

请勿一稿多投,稿件需附纸质版介绍信,内容包括稿件不涉及保密可以公开发表、著者排名没有争议、未一稿多投等内容,同时加盖单位公章。

介绍信邮寄地址:北京市西城区太平街 8 号院 6 号楼 2 层 107 室《化学试剂》编辑部收