

BPA 与 3 种双酚类化合物的联合作用雌激素效应

张洪昌¹, 陈良燕¹, 刘树深², 尹大强^{1,2*}

(1. 南京大学环境学院, 污染控制与资源化研究国家重点实验室, 南京 210093; 2. 同济大学环境科学与工程学院, 长江水环境教育部重点实验室, 上海 200092)

摘要: 环境内分泌干扰物的联合作用已经是目前研究的重点. 采用重组基因酵母检测法, 分别测定了双酚 A (BPA)、双酚 AF (BPAF)、双酚 AP (BPAP)、双酚 F (BPF) 4 种双酚化合物的雌激素活性, 并依据其测定结果, 按照等效浓度比, 设计了浓度比分别为 EC_{10} 和 EC_{50} 的 6 种二元混合物并测定了其雌激素活性. 结果表明, 这 4 种化合物的剂量-效应关系都可以用 Weibull 函数有效描述. BPA、BPAF、BPAP、BPF 的 EC_{50} 值分别为: 6.81×10^{-6} 、 7.44×10^{-7} 、 1.43×10^{-5} 、 $7.52 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 其雌激素活性大小顺序为: BPAF > BPA > BPF > BPAP. 依据不同的联合作用判断方法对这 4 种化合物的联合效应进行判断, 结果表明, 相同化合物的不同混合比例可能对联合作用方式产生影响, 采用 DA 和 IA 预测模型可以更加直观、方便地判断联合效应的类型, 而且可以反映出不同混合比例对联合作用的影响.

关键词: 双酚化合物; 雌激素活性; 联合作用; 预测模型

中图分类号: X171.5 文献标识码: A 文章编号: 0250-3301(2009)01-0260-06

Jointed Estrogenic Activities of Bisphenol A and Three of Its Analogs

ZHANG Hong-chang¹, CHEN Liang-yan¹, LIU Shu-shen², YIN Da-qiang^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Pollution Control and Resource Reuse, School of the Environment, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Key Laboratory of Yangtze River Water Environment, Ministry of Education, College of Environmental Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract: The combined effect of environmental endocrine disruptors (EEDs) is one of the hottest topics. The estrogenic activities of BPA, BPAF, BPAP, BPF were tested based on recombinant gene yeast assay. Six mixtures were designed based on the result of the test, each of which had an equitoxic ratio ray (EC_{10} or EC_{50}). The EC_{50} values are $6.81 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $7.44 \times 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $1.43 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, $7.52 \times 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ for BPA, BPAF, BPAP and BPF respectively, which reveals that the estrogenic activities order among the four bisphenols was BPAF > BPA > BPF > BPAP. The experiment shows that when BPA mixes with BPAF, BPAP and BPF in different ratios individually, different combination effects are produced. It reveals that the combined ratios of the components may affect the combined effect. The dose addition model and the independent action model are used to identify the combined effect. They are testified to be more intuitionistic and more comprehensive than other joint effect indices.

Key words: bisphenols; estrogenic activity; combined effect; prediction model

环境内分泌干扰物 (environmental endocrine disruptors, EEDs) 危害已受到人们的广泛关注, 环境内分泌干扰物的联合作用效应与剂量-效应关系成为近年来一个研究热点^[1].

双酚 A (BPA)、双酚 AF (BPAF)、双酚 AP (BPAP)、双酚 F (BPF) 等双酚化合物广泛应用于高分子材料、精细化工和医药行业中^[2,3]. BPA 的雌激素活性已经得到了广泛的证明^[4,5], 在环境以及职业接触者和普通人群血清中均检测到 BPA 的存在^[6-8]. BPAF 的雌激素活性也经证实^[9], 可以促进人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖^[10], 也可诱导 SHE 细胞增殖^[11]. Coleman 等^[12] 已经证明 BPAP 可以与雌激素受体结合, 产生类雌激素效应. 德国和日本学者分别从环境中蜂蜜中检测到了 BPF 的存在^[10,13,14]. 有研究证明 BPF 也具有类雌激素活性, 可促进 MCF-7

细胞的增殖^[10]. 日本学者 Koichi 从蜂蜜中同时检测到了 BPA 和 BPF^[14], 德国学者 Hermann 从污水、底泥中都同时检测到 BPA 和 BPF^[13]. 因而, 这些化合物在真实环境中常常联合作用于生物机体. 然而, 这 4 种化合物联合效应的雌激素效应和作用模式不清楚, 因而难以准确预测和评价其生态和健康风险.

雌激素受体重组基因酵母检测法具有分子生物学原理简单、易于操作、费用低廉等优点, 被作为检测类雌激素物质的基础测试方法之一^[15].

本研究采用重组基因酵母检测法, 分别测定了 BPA、BPAF、BPAP、BPF 等 4 种双酚化合物单一作用

收稿日期: 2008-03-08; 修订日期: 2008-04-21

基金项目: 国家自然科学基金项目 (20577022)

作者简介: 张洪昌 (1982 ~), 男, 硕士研究生, 主要研究方向为环境生物学, E-mail: njuzhanghc@163.com

* 通讯联系人, E-mail: yindq@mail.tongji.edu.cn

的雌激素活性效应, 分析和描述其单一作用的剂量-效应关系. 依据单一化合物研究结果, 按等效效应浓度比, 设计了 6 种二元混合物并测定其雌激素活性效应, 采用不同的方法分析其联合作用模式, 以期为环境内分泌干扰物联合作用效应与预测提供科学依据和方法.

1 材料与方法

1.1 受试化合物

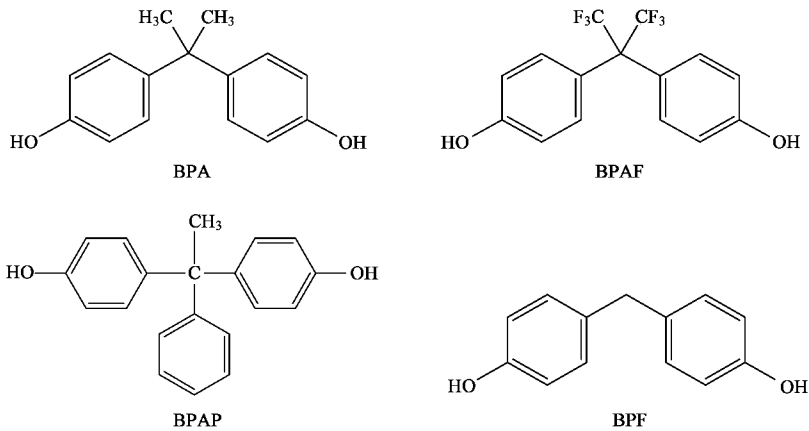


图 1 4 种化合物的结构式
Fig.1 Structures of the four bisphenols

得到单个化合物和 6 种混合物的剂量效应数据 U 之后, 用 Origin(V7.5) 进行拟合, 得到最大值 $U_{\max}$ 和最小值 $U_{\min}$, 然后将所得的半乳糖苷酶的活性按照公式(1)进行处理, 计算其相对雌激素活性.

$$E = \frac{U - U_{\min}}{U_{\max} - U_{\min}} \tag{1}$$

剂量-效应关系采用 Weibull 函数模型分析^[18, 19]. Weibull 函数及其反函数解析式见式(2)和式(3). 拟合得到的模型参数代入 Weibull 的反函数[式(3)], 即得到各个效应的浓度值 EC_x .

Weibull 函数解析式:
 $E = 1 - \exp \{- \exp[\alpha + \beta \times \log_{10}(c)]\}$ (2)

Weibull 反函数解析式:
 $c = 10^{(\ln[-\ln(1-E)] - \alpha) / \beta}$ (3)

式中, E 为相对雌激素活性, α 、 β 为 Weibull 函数的 2 个参数, c 为化合物浓度.

1.2.2 混合物组分设计与效应测定

为研究 BPA 与 BPAF、BPAP、BPF 的联合作用, 本研究依据其单一化合物的 EC_{10} 和 EC_{50} 值, 设计了 6 个等毒性浓度比混合物 MIX1 ~ MIX6, 其混合物的

BPA(CAS No: 80-05-7, 购自 Aldrich), BPAF(CAS No: 1478-61-1, 购自 Fluka), BPF(CAS No: 620-92-8, 购自 Fluka), BPAP(CAS No: 2167-51-3, 购自 Aldrich). 4 种化合物的结构如图 1 所示.

1.2 实验方法

1.2.1 雌激素活性重组基因酵母测定方法

本研究所采用的重组基因酵母由英国 Brunel 大学提供^[16], 重组基因酵母的培养参照饶凯峰等^[17]的方法进行. 依照其活性计算公式计算半乳糖苷酶活性 U .

浓度组成如表 1. 配制好这 6 种混合物后, 将各混合物视为总浓度是各单个双酚类物质浓度之和的特殊“单个”物质, 按单一物质的方法(1.2.1)测定其雌激素活性、分析剂量效应关系和计算 EC_{50} .

表 1 6 个混合物的浓度组成		
Table 1 Concentrations of the bisphenols in mixtures		
混合物	组成	浓度比
MIX1	BPA + BPAF	$EC_{10} : EC_{10}$
MIX2	BPA + BPAF	$EC_{50} : EC_{50}$
MIX3	BPA + BPAP	$EC_{10} : EC_{10}$
MIX4	BPA + BPAP	$EC_{50} : EC_{50}$
MIX5	BPA + BPF	$EC_{10} : EC_{10}$
MIX6	BPA + BPF	$EC_{50} : EC_{50}$

2 结果与分析

2.1 单个化合物的雌激素活性

采用的重组基因酵母法分别测定 BPA、BPAF、BPAP、BPF 等 4 种双酚化合物单一作用的雌激素活性, 每个化合物设 12 个浓度梯度, 并对测定数据进行拟合得到最佳剂量-效应曲线(DRC)(图 2). 结果表明, 双参数 Weibull 函数能够很好地模拟单一作用的雌激素活性曲线, 其模拟计算结果见表 2.

表 2 4 种双酚化合物单独作用的 Weibull 模型¹⁾

化合物	α	β	R^2	EC ₁₀	EC ₅₀
				/mol·L ⁻¹	/mol·L ⁻¹
BPA	22.616 05	4.507 4	0.975 01	2.12E-06	6.81E-06
BPAF	26.343 76	4.371 3	0.986 68	3.02E-07	7.44E-07
BPAP	15.396 58	3.174 3	0.987 05	2.77E-06	1.43E-05
BPF	22.899 93	4.531 8	0.985 19	3.22E-06	7.52E-06

1) α 、 β 为 Weibull 拟合所得参数, R^2 为拟合度, 下同

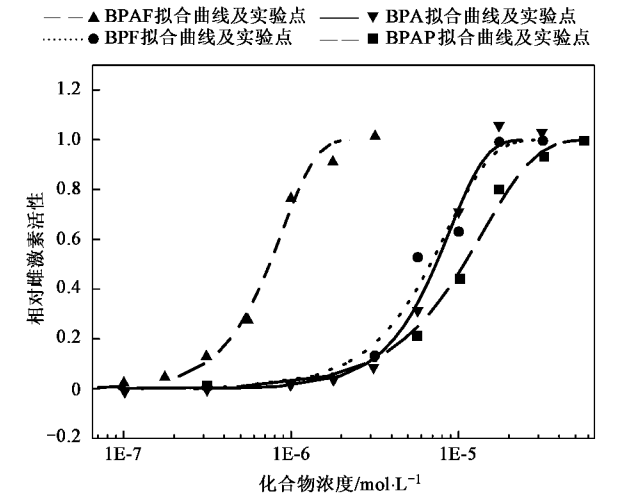


图 2 4 种化合物单独作用时的剂量-效应关系曲线
Fig. 2 Dose-response curves of the four bisphenols

由表 2 可以看出, 4 种化合物剂量-效应关系经 Weibull 函数拟合后, 除 BPA 外, 其 R^2 都大于 0.98, 拟合度较好. BPA、BPAF、BPAP、BPF 的 EC_{50} 分别为: 6.81×10^{-6} 、 7.44×10^{-7} 、 1.43×10^{-5} 、 7.52×10^{-6} mol·L⁻¹, 雌激素活性大小顺序为: BPAF > BPA > BPF > BPAP, 本研究结果与国外学者得到的结果相似^[20].

2.2 二元混合物的联合雌激素效应

2.2.1 混合物总的联合雌激素效应及其剂量-效应关系

采用与单一化合物同样的方法, 对混合物的剂量-效应数据进行拟合, 结果表明, 6 种混合物的剂量-效应曲线同样可以用 Weibull 函数有效描述, 拟合结果见表 3. 从中可以看出, Weibull 函数对于 6 种混合物的剂量-效应曲线的拟合所得的 R^2 值都大于 0.98, 拟合度较好.

将各混合物的 EC_{50} 值(表 3)与 4 种化合物单独作用的 EC_{50} 值(表 2)比较可知, 当 BPA 与 BPAF 分别以 EC_{10} : EC_{10} 和 EC_{50} : EC_{50} 比混合时(MIX1 和 MIX2), 其联合作用雌激素效应没有显著差别, 总效应均大于 BPA 单独作用而小于 BPAF 单独作用; 当 BPA 与

表 3 6 种混合物的 Weibull 模型

混合物	α	β	R^2	EC ₅₀ /mol·L ⁻¹
MIX1	27.289 01	5.184 78	0.988 20	3.371 68E-06
MIX2	28.122 16	5.247 19	0.985 03	3.774 63E-06
MIX3	15.392 01	3.184 09	0.993 93	9.692 55E-06
MIX4	18.138 50	3.575 98	0.983 51	1.056 41E-05
MIX5	19.751 44	3.877 21	0.992 32	7.217 68E-06
MIX6	23.778 13	4.977 98	0.988 29	6.187 39E-06

BPAP 分别以 EC_{10} : EC_{10} 和 EC_{50} : EC_{50} 比混合时(MIX3 和 MIX4), 其联合作用雌激素效应具有较大差别, EC_{10} 等效浓度比混合总效应(MIX3)明显大于 BPA 单独作用而略小于 BPA 单独作用, EC_{50} 等效浓度比混合总效应(MIX4)明显小于 BPA 单独作用而略大于 BPAP 单独作用; 当 BPA 与 BPF 分别以 EC_{10} : EC_{10} 和 EC_{50} : EC_{50} 比混合时(MIX5 和 MIX6), 其联合作用雌激素效应没有显著差别, EC_{10} 等效浓度比混合总效应(MIX5)与 BPF 单独作用接近, EC_{50} 等效浓度比混合总效应(MIX6)与 BPA 单独作用接近. 结果表明, BPA 与不同双酚化合物的联合雌激素效应有差别; BPA 与其他同一种双酚化合物在不同剂量混合时, 其联合作用雌激素效应也有一定差别. 研究揭示 BPA 与其他双酚化合物的联合作用在不同化合物和不同剂量时可能存在不同的联合作用方式.

2.2.2 联合作用方式分析

根据实验所得 4 种化合物和 6 种混合物的 EC_{50} 值, 分别采用毒性单位法^[21]、相加指数法^[22]和混合毒性指数法^[23]判断化合物的联合作用, 结果如表 4 所示.

根据表 4, 在以 EC_{50} 判断联合作用时, 对于 MIX1、MIX2、MIX3, 联合作用类型为加和作用与部分加和作用, MIX4、MIX5、MIX6 为协同作用. 对于同一个混合物, 不同的评价方法得出的结论具有差异. 如 MIX1 和 MIX3, 采用相加指数法得到的结论同另 2 种方法得出的结论不一致.

为了更进一步分析判断这几种化合物的联合作用, 本研究采用能够对化合物的加和作用和独立作用进行预测的剂量加和(DA)模型和独立作用模型(IA)^[24], 对 6 种混合物的雌激素效应进行联合雌激素预测. 有文献表明, DA 模型和 IA 模型对具有相似作用机制的化合物的加和作用和独立作用具有很好地预测^[25].

采用 4 个单独化合物的 Weibull 函数为基础, 计算相对雌激素活性不同的点在 DA 模型下所对应的

表 4 3 种方法对联合作用的评价
Table 4 Joint effect indices of the mixtures

混合物	毒性单位法		相加指数法		混合毒性指数法	
	M	作用类型	AI	作用类型	MTI	作用类型
MIX1	1.38	部分加和	-0.38	拮抗	0.43	部分加和
MIX2	1.01	加和	-0.01	加和	0.98	加和
MIX3	1.16	部分加和	0.16	协同	0.69	部分加和
MIX4	0.69	协同	0.26	协同	1.52	协同
MIX5	0.89	协同	0.12	协同	1.20	协同
MIX6	8.86	协同	0.16	协同	1.21	协同

的效应浓度 $EC_{\text{mix, DA}}$ 和在 IA 模型下所对应的效应浓度 $EC_{\text{mix, IA}}$ 。再将实验所得剂量-效应关系、DA 模型预测所得的剂量-效应关系、IA 模型预测所得的剂量-效应关系在同一个坐标系中作图,结果如图 3 所示。

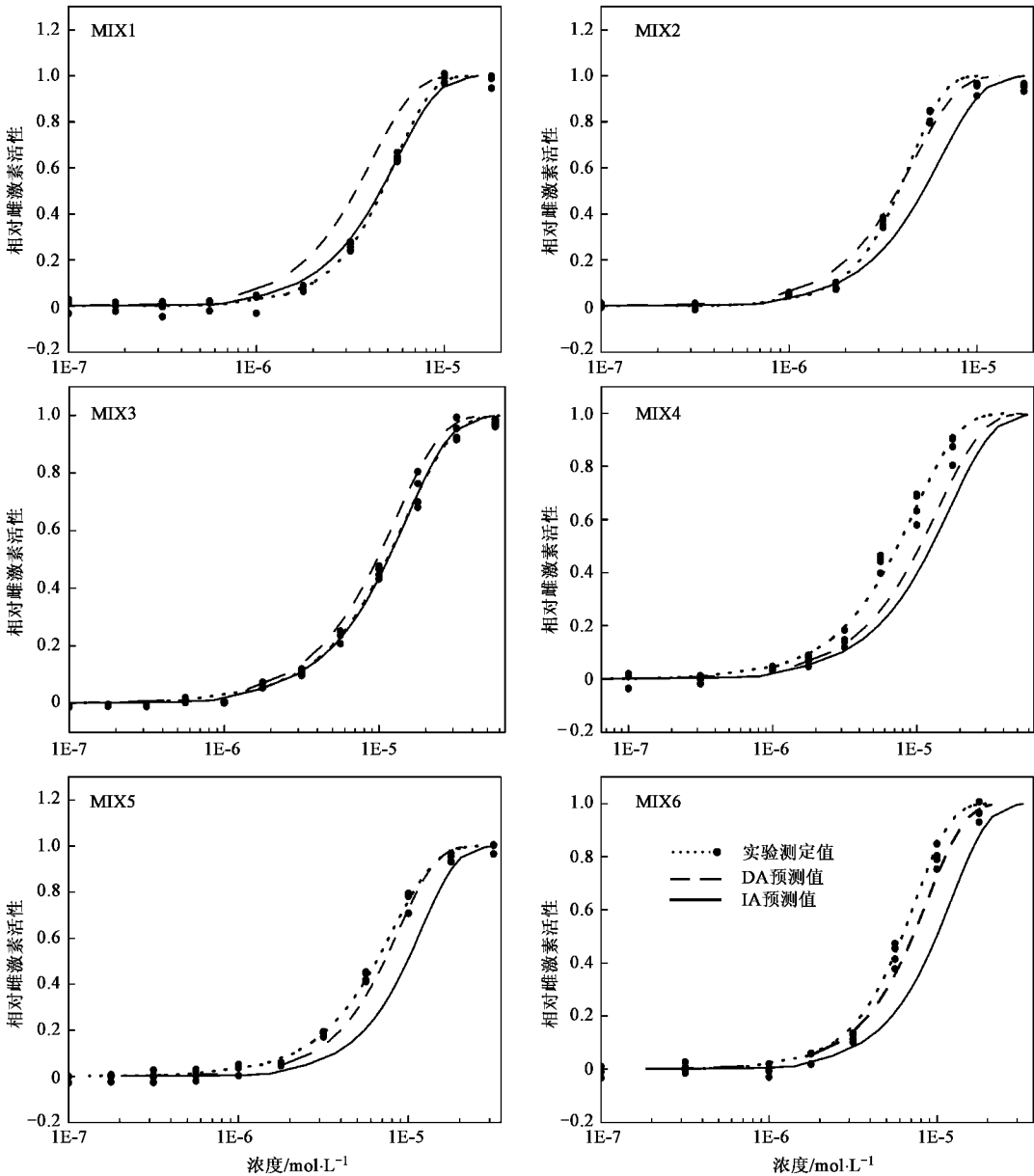


图 3 混合物实验模拟值与 DA/IA 预测值关系

Fig.3 Plots of the effects predicted by DA/IA models vs observed

剂量加和(DA)模型和独立作用模型的计算原理如式(4)和式(5)所示.

DA 模型计算公式:

$$EC_{x, \text{mix}} = \left(\sum_{i=1}^n \frac{P_i}{EC_{x,i}} \right)^{-1} \quad (4)$$

IA 模型计算公式:

$$E(c_{\text{mix}}) = 1 - \prod_{i=1}^n [1 - E(c_i)] \quad (5)$$

在图 3 中, DA 预测值的剂量-效应曲线和 IA 预测值的剂量-效应曲线将空间分为 3 部分, 可以认为, DA 预测值的剂量-效应曲线左侧区域, 是协同效应区; 2 条剂量-效应曲线之间区域, 是部分加和区; IA 预测值的剂量-效应曲线右侧的区域, 是拮抗作用区. 对于 MIX1, 实验所得剂量-效应曲线基本与 IA 预测曲线一致, 可以认为 MIX1 联合作用方式为独立作用. 对于 MIX2, 实验所得剂量-效应曲线在 EC_{50} 点刚好与 DA 预测的剂量-效应曲线相近, 其联合作用方式为相加作用. 对于 MIX3, 实验所得剂量-效应曲线与 IA 模型预测的剂量-效应曲线有较好的重合, 其联合作用方式为独立作用. 对于 MIX4, 实验所得曲线位于协同区, 且与 DA 预测曲线有较大差别, 可以判断为协同作用. MIX5 和 MIX6, 实验所得的剂量-效应曲线均在协同作用区, 但与 DA 预测曲线相距较近, 可以认为是协同作用. DA 和 IA 模型分析进一步表明, 相同化合物的不同混合比例可能对联合作用方式产生影响.

本研究建议, 对化合物联合作用应采用多种方法进行评价, 采用加和作用(DA 模型)和独立作用下(IA 模型)的剂量-效应曲线预测, 并将实验所得的剂量-效应曲线与预测所得的 2 条曲线做在同一个坐标系中, 能更加直观地、方便地判断联合作用的类型, 而且可以反映出不同混合比例对联合作用的影响.

3 结论

(1) BPA、BPAF、BPAP、BPF 都具有雌激素活性, 其活性大小顺序为: BPAF > BPF > BPA > BPAP.

(2) BPA 分别与 3 种双酚化合物联合作用时存在不同联合作用效应, 不同混合比例可能对联合作用产生影响.

(3) 不同的联合作用评价方法对于同一个混合物的联合作用类型判断并不一定相同. 对于混合物中联合作用类型的判断, 本研究建议, 可以采用先预测加和作用的剂量-效应曲线和独立作用的剂量-效

应曲线, 再同实验所得剂量-效应曲线进行对比的方法进行判断.

致谢: 中国科学院生态环境研究中心的饶凯峰老师在本研究给予了支持, 在此表示感谢.

参考文献:

- [1] Eggen R I L, Behra R, Burkhardt-Holm P, *et al.* Challenges in ecotoxicology[J]. Environmental Science & Technology, 2004, **38**(3): 58A-64A.
- [2] Wilson N K, Chuang J C, Morgan M K, *et al.* An observational study of the potential exposures of preschool children to pentachlorophenol, bisphenol-A, and nonylphenol at home and daycare[J]. Environmental Research, 2007, **103**(1): 9-20.
- [3] Kubo T, Maezawa N, Osada M, *et al.* Bisphenol A, an environmental endocrine-disrupting chemical, inhibits hypoxic response via degradation of hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α): structural requirement of bisphenol A for degradation of HIF-1 α [J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 2004, **318**(4): 1006-1011.
- [4] Letcher R J, Sanderson J T, Bokkers A, *et al.* Effects of bisphenol A-related diphenylalkanes on vitellogenin production in male carp (*Cyprinus carpio*) hepatocytes and aromatase (CYP19) activity in human H295R adrenocortical carcinoma cells [J]. Toxicology and Applied Pharmacology, 2005, **209**(2): 95-104.
- [5] Baek H J, Hwang I J, Kim K S, *et al.* Effects of BPA and DES on longchin goby (*Chasmichthys dolichognathus*) *in vitro* during the oocyte maturation[J]. Marine Environmental Research, 2007, **64**(1): 79-86.
- [6] Calafat A M, Ye X Y, Wong L Y, *et al.* Exposure of the US population to bisphenol A and 4-tertiary-octylphenol: 2003-2004[J]. Environmental Health Perspectives, 2008, **116**: 39-44.
- [7] Vandenberg L N, Hauser R, Marcus M, *et al.* Human exposure to bisphenol A (BPA)[J]. Reproductive Toxicology, 2007, **24**: 139-177.
- [8] Kang J H, Kondo F, Katayama Y. Human exposure to bisphenol A [J]. Toxicology, 2006, **226**(2-3): 79-89.
- [9] Pfeiffer E, Rosenberg B, Deuschel S, *et al.* Interference with microtubules and induction of micronuclei *in vitro* by various bisphenols[J]. Mutation Research 1997, **390**: 21-31.
- [10] Kanai H, Barrett J C, Metzler M, *et al.* Cell-transforming and estrogenicity of bisphenol-A and 4 of its analogs in mammalian cells [J]. International Journal of Cancer, 2001, **93**(1): 23-25.
- [11] Tsutsui T, Tamura Y H, Suzuki A, *et al.* mammalian cell transformation and aneuploidy induced by five bisphenols [J]. International Journal of Cancer, 2000, **86**(2): 151-154.
- [12] Coleman K P, Toscano A, Wiese T E. QSAR Models of the *in vitro* estrogen activity of bisphenol A analogs [J]. QSAR & Combinatorial Science, 2003, **22**(1): 78-88.
- [13] Fromme H, Kuchler T, Otto T, *et al.* Occurrence of phthalates and bisphenol A and F in the Environment[J]. Water Research, 2002, **36**(6): 1429-1438.
- [14] Inoue K, Murayama S, Takeba K, *et al.* Contamination of xenoestrogens bisphenol A and F in honey: safety assessment and analytical method of these compounds in honey[J]. Journal of Food

- Composition and Analysis, 2003, **16**(4): 497-506.
- [15] Wu W Z, Wang J X, Zhao G F, *et al.* The emission soot of biomass fuels combustion as a source of endocrine disrupters [J]. Journal of Environment Science Health, 2002, **A37**(4): 579-600.
- [16] Routledge E J, Sumpter J P. Estrogenic activity of surfactants and some of their degradation products assessed using a recombinant yeast screen[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 1996, **15**(3): 241-248.
- [17] 饶凯峰, 马梅, 王子健, 等. 南方某水厂处理工艺过程中内分泌干扰物的变化规律[J]. 环境科学, 2004, **25**(6): 123-126.
- [18] Scholze M, Boedeker W, Faust M, *et al.* A general best-fit method for concentration-response curves and the estimation of low-effect concentrations[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2001, **20**(2): 448-457.
- [19] 刘芳, 刘树深, 刘海玲. 部分离子液体及其混合物对发光菌的毒性作用[J]. 生物毒理学报, 2007, **2**(2): 164-171.
- [20] Hashimoto Y, Moriguchi Y, Oshima H, *et al.* Measurement of estrogenic activity of chemicals for the development of new dental polymers[J]. Toxicology in Vitro, 2001, **15**(4): 421-425.
- [21] Marking L L, Dawson V K. Method of assessment of toxicity or efficacy of mixtures of chemical[J]. US Fish Wild Serv Investsh Control, 1975, **67**: 1-8.
- [22] Marking L L. Method for Assessing Additive Toxicity of Chemical Mixtures[J]. Aquatic Toxicology and Hazard Evaluation, 1977, **34**: 99-108.
- [23] Chen J, Zhao Y, Wang L, *et al.* Quantitative structure-activity relationships and mixture toxicity studies of heterocyclic nitrogen compounds bull[J]. Environmental Contamination and Toxicology, 1996, **57**: 77-83.
- [24] Tammer B, Lehmann I, Nieber K, *et al.* Combined effects of mycotoxin mixtures on human T cell function [J]. Toxicology Letters, 2007, **170**(2): 124-133.
- [25] Altenburger R, Backhaus T, Boedeker W, *et al.* Predictability of the toxicity of multiple chemical mixtures to *Vibrio fischeri*: mixtures composed of similarly acting chemicals[J]. Environmental Toxicology and Chemistry, 2000, **19**(9): 2341-2347.