论著

文章编号:1000-5404(2006)15-1578-04

辛基酚和三羟异黄酮联合作用对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响

彭俊华，糜漫天，朱俊东 （第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室，重庆 400038）

提 要：目的 观察辛基酚(octylphenols，OP)、三羟异黄酮(genistein，GEN)联合作用对乳腺癌 MCF-7 细胞增殖的影响，并探讨其分子机制。**方法** 以 MTT 试验、流式细胞分析、免疫细胞化学和 RT-PCR 等方法观察辛基酚、三羟异黄酮对 MCF-7 细胞增殖、细胞周期、雌激素受体 α(estrogen receptor α，ERα)及磷酸化酪氨酸蛋白、ERα 及乳腺癌共激活因子 1(amplified in breast cancer 1，AIB1) mRNA 的影响。**结果** 8×10^{-6} mol/L OP、5×10^{-5} mol/L GEN 及其两者联合作用 MCF-7 细胞 72 h 时，其增殖率分别为 114.82%、65.98% 和 56.90%，G_2/M 期细胞分别为 12.98%、46.16% 和 36.44%，细胞凋亡率分别为 3.57%、11.41% 和 8.24%，磷酸化酪氨酸蛋白表达量荧光值分别为(62.84±9.80)、(26.75±5.09)、(39.15±7.83)。OP 能增加细胞核中 AIB1 mRNA 的表达。GEN 及其与 OP 联合组均降低 ERα 蛋白的表达，抑制细胞核中 AIB1 mRNA 的表达。**结论** OP 能促进 MCF-7 细胞增殖，GEN 及其与 OP 联合均抑制 MCF-7 细胞增殖，其机制可能是通过调节细胞中 ER、AIB1、磷酸化酪氨酸蛋白的表达来作用的。

关键词：细胞增殖；乳腺癌；辛基酚；三羟异黄酮；雌激素受体；AIB1

中图法分类号：R329.28；R737.9；R977.12 **文献标识码**：A

Effect of octylphenol or/and genistein on proliferation of MCF-7 cells

PENG Jun-hua, MI Man-tian, ZHU Jun-dong (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Military Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the effect of genistein, octylphenol, and their combination on proliferation of MCF-7 cells and explore the molecular mechanisms. Methods The MCF-7 cells were divided into four groups: control, 5×10^{-5} mol/L genistein treated, 8×10^{-6} mol/L octylphenol treated, genistein and octylphenol treated. The cell proliferation, cell cycle, phospho-L-tyrosine protein (PTPr), ERα, ERα mRNA and AIB1 mRNA expression of MCF-7 cells was observed by MTT test, flow cytometry, immunocytochemistry and RT-PCR. Results When MCF-7 cells were treated with 8×10^{-6} mol/L octylphenol or 5×10^{-5} mol/L genistein, or both for 72 h, the proliferation ratio was 12.98%, 46.16% and 36.44% respectively; the percentage of MCF-7 cells at G_2/M were 12.98%, 46.16% and 36.44% respectively; the apoptosis ratio of MCF-7 cells were 3.57%, 11.41% and 8.24% respectively; the expression of PTPr was (62.84±9.80), (26.75±5.09), (39.15±7.83) respectively. Octylphenol increased the expression of AIB1 mRNA, but genistein and its combination with octylphenol inhibited the expression of ERα and decreased the expression of AIB1 mRNA in nucleus. Conclusion Octylphenol can promote the proliferation of MCF-7 cells, while genistein and its combination with octylphenol inhibit, which mechanism may be related to regulation of PTPr, AIB1 and ER expression.

Key words: cell proliferation; breast cancer; octylphenol; genistein; estrogen receptor; amplified inhibited breast cancer 1(AIB1)

近年来，环境雌激素(environmental estrogens，EEs)的污染及其类雌激素效应备受人们关注。辛基酚(octylphenol，OP)是一种具有雌激素活性的化工产品，在地面水、自来水、食品、饮料中均发现了 OP 的污染[1]。三羟异黄酮(genistein，GEN)是膳食中的一种雌激素物质，主要来源于大豆，高浓度抑制 MCF-7 细胞增殖，具有抗乳腺癌发生的效应。GEN 与 OP 共存时能抑制 MCF-7 细胞增殖，但对其作用机制的研究尚少见报道。本研究将 OP 和 GEN 联合作用于 MCF-7 细胞，通过流式细胞仪、电镜、免疫组化、RT-PCR 等方法来观察 MCF-7 细胞的增殖和雌激素受体 α(estrogen receptor α，ERα)、乳腺癌共激活因子 1(amplified in breast cancer 1，AIB1)的改变，从雌激素受体方面探讨 OP 和 GEN 联合作用影响 MCF-7 增殖的作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

OP，纯度 >98%，Sigma 产品。GEN，纯度 >98%，购自西安

作者简介：彭俊华(1966－)，男，湖南省祁东县人，博士，副主任医师，主要从事环境毒理和营养与肿瘤方面的研究，发表论文 7 篇，现在兰州军区总医院检验科。电话：(023)68752291，E-mail：junhua_p@sohu.com

通讯作者：糜漫天，电话：(023)68752292，E-mail：mimt@vip.sina.com

收稿日期：2005-07-08；修回日期：2006-02-20

交大保赛生物技术公司。磷酸化酪氨酸抗体为小鼠抗人、ER 抗体为兔抗人抗体,使用浓度分别为 1∶75、1∶40 倍稀释,羊抗兔 S-P 试剂盒及 DAB 显色试剂盒,博士德产品。罗明丹标记羊抗小鼠抗体,北京中杉产品。RT-PCR 试剂盒,上海 Sangon 产品。二甲亚砜(DMSO),纯度 >98%,进口分装试剂,用于配制三羟异黄酮和辛基酚。

1.2　MCF-7 细胞培养及分组

人乳腺癌 MCF-7 细胞由中科院上海细胞所提供。实验前将乳腺癌 MCF-7 细胞在无酚红的 DMEM/F12 中培养 24 h,以耗尽细胞的内源性雌激素,然后以该培养基进行实验。实验分为 4 组:对照组,给予 DMSO;GEN 组,给予 5×10^{-5} mol/L 的 GEN;OP 组,给予 8×10^{-6} mol/L 的 OP;GEN + OP 组,给予 5×10^{-5} mol/L 的 GEN 和 8×10^{-6} mol/L 的 OP。

1.3　MTT 试验

参照文献[2]的方法进行,用酶标仪在 492 nm 波长测定活细胞的吸光度值[$D(492)$]。增殖率(PR) = 实验组 $D(492)$/溶剂对照组 $D(492)\times100\%$ 。

1.4　细胞周期相及凋亡检测

实验各组细胞处理 72 h,收获细胞,70% 冷乙醇固定,RNase 消化,碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪检测。

1.5　细胞超微结构观察

各组处理 72 h 后收获细胞,以 3% 的戊二醛固定,常规包埋、切片,Philips 公司 TCNAI-19 型透射电镜观察并照像。

1.6　ERα 和磷酸化酪氨酸的蛋白检测

细胞生长于小盖玻片上,多聚甲醛固定,血清封闭,加一抗于 37 ℃孵育 50 min,ER 按 SABC 试剂盒操作,DAB 显色,脱水、透明,显微镜观察并照像,磷酸化酪氨酸滴加荧光素标记二抗孵育 20 min,甘油封片,德国的 Leica-NT 激光共聚焦显微镜观察、照像及数据分析。

1.7　RT-PCR 检测 ERα、AIB1

实验各组细胞处理 72 h,收获细胞,用 Turipure 试剂一步法提取各组细胞总 RNA,逆转录为 cDNA 置 −80 ℃备用。引物由北京赛百盛公司合成,AIB1:上游 5′-TCTTGAGGTCTTGAGGGAATAGTG-3′,下游 5′-CTGGCTGTTCTGGGTACTGAGTT -3′,扩增产物 939 bp;ERα:上游 5′-GCTAATGGGTCAGTGGGTTCT-3′,下游 5′-GATGGCATTATAGAATCATTACGC -3′,扩增产物 713 bp;β-actin,上游 5′-ATCCATCCGACATTGAAGT-3′,下游 5′-CTCTAAGTTGCCAGCCCT-3′,扩增产物 449 bp 。取样本总 cDNA、上游和下游引物各 3 μl,依次加入试剂盒其他成分。反应条件:94 ℃灭活 40 s,50.5 ℃退火 40 s,72 ℃延伸 40 s,30 个循环,2.0% 琼脂糖凝胶电泳,照像。

1.8　统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　GEN 和 OP 对 MCF-7 细胞增殖的影响

环境雌激素对 MCF-7 细胞增殖的影响见图 1,8×10^{-6} mol/L 的 OP 能促进 MCF-7 细胞增殖;5×10^{-5} mol/L 的 GEN 抑制细胞的增殖;当两者联合作用时,抑制细胞的增殖更明显。OP、GEN 及两者联合作用 72 h,MCF-7 细胞的增殖率分别为 114.82%、65.98%、56.90%。

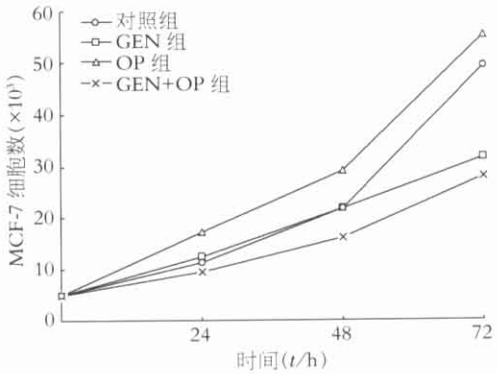


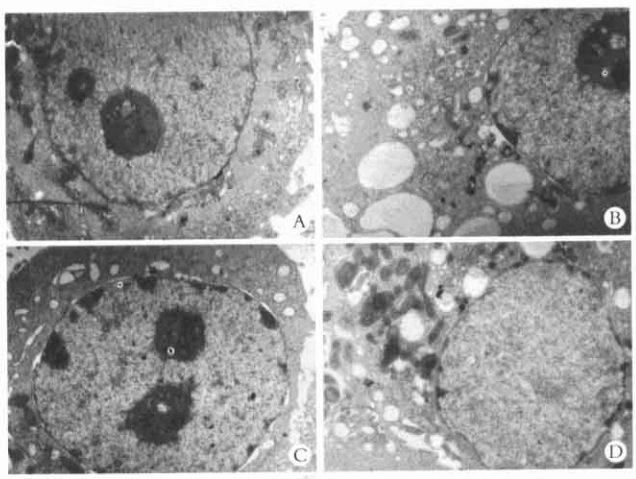
图 1　GEN、OP 联合作用 MCF-7 细胞的生长曲线

2.2　GEN 和 OP 对 MCF-7 细胞周期相分布的影响

流式细胞分析结果显示,GEN 作用 MCF-7 后,细胞主要阻滞于 G_2/M 期,G_2/M 期细胞由 11.81% 上升到 46.16%,细胞凋亡增加。OP 对细胞周期的影响较小,细胞凋亡减少。GEN 与 OP 联合作用,仍有一定阻滞细胞于 G_2/M 的效应,G_2/M 期细胞由 OP 作用时的 12.98% 上升到 36.44% 。

2.3　GEN 和 OP 对 MCF-7 细胞超微结构的改变

经环境雌激素处理 72 h 后,电镜结果显示与对照组相比较,GEN 组细胞分化程度较高。GEN 组细胞核仁大,细胞内质网丰富,线粒体发达并扩张,细胞中微腺腔和微绒毛较多;OP 组细胞核/浆比大,细胞核仁多而大,线粒体、内质网减少,细胞中微腺腔和微绒毛少见,可见细胞分裂像,细胞增殖较明显;GEN + OP 组细胞核/浆比例较对照组小,染色质多且分布均匀,微绒毛和分泌颗粒较多,细胞分化程度较对照组和 OP 组高,见图 2。



A:对照组;B:GEN 组;C:OP 组;D:GEN + OP 组

图 2　GEN 和 OP 对 MCF-7 细胞超微结构的改变　(TEM × 7 000)

2.4　GEN 和 OP 对 MCF-7 细胞中磷酸化酪氨酸蛋白、ERα 蛋白表达的影响

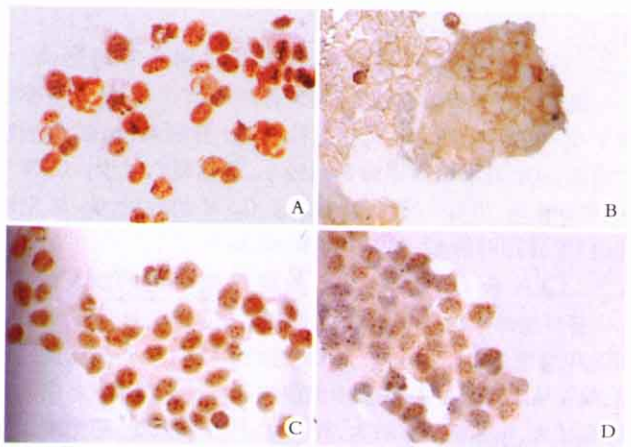
与对照组相比,GEN 能抑制 MCF-7 细胞中磷酸化酪氨酸蛋白的表达,且在 3 个时相点(24、48、72 h)抑制作用显著($P <$

0.01)；OP 能促进磷酸化酪氨酸蛋白的表达，但差异不显著($P>0.05$)。GEN 与 OP 联合作用时，与对照组及 OP 组相比较，细胞中磷酸化酪氨酸蛋白的表达在 3 个时相点下相比均显著降低($P<0.01$)(表 1)。与对照组相比，GEN 组及 GEN + OP 组 MCF-7 细胞中的 ERα 蛋白表达降低，而 OP 组 ERα 表达升高(图 3)。

表 1 GEN 和 OP 对 MCF-7 乳腺癌细胞中磷酸化酪氨酸蛋白表达的影响(荧光值)

组别	24 h	48 h	72 h
对照组	80.17 ± 24.5	65.83 ± 15.34	59.00 ± 11.17
GEN	54.79 ± 10.98[a]	31.75 ± 9.57[a]	26.75 ± 5.09[a]
OP	82.28 ± 15.12	70.28 ± 10.51	62.84 ± 9.80
GEN + OP	44.09 ± 10.47[ab]	42.76 ± 6.48[ab]	39.15 ± 7.83[ab]

a：$P<0.01$，与对照组比较；b：$P<0.01$，与 OP 组比较

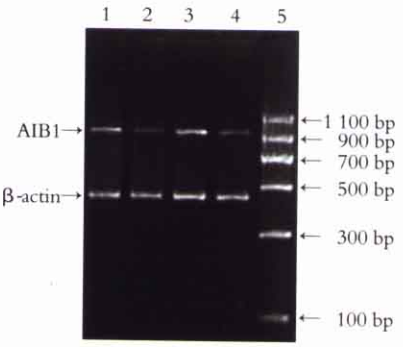


A：对照组；B：GEN 组；C：OP 组；D：GEN + OP 组

图 3 GEN 与 OP 作用 72 h 对 MCF-7 细胞中 ERα 表达的影响 (SABC ×400)

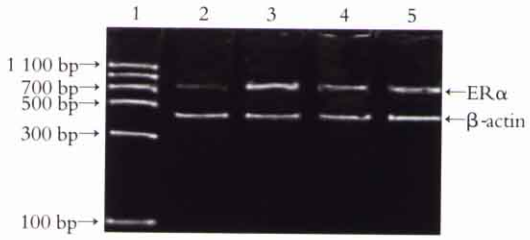
2.5 GEN 和 OP 对 MCF-7 细胞中 ERα、AIB1 mRNA 表达的影响

OP 促进 MCF-7 细胞中 AIB1 mRNA 表达，而 GEN 及其与 OP 联合均能抑制 AIB1 mRNA 表达(图 4)，GEN 及其与 OP 联合均能抑制 MCF-7 细胞中 ERα mRNA 表达，OP 对 ERα mRNA 的影响不明显(图 5)。



1：对照组；2：GEN + OP 组；3：OP 组；4：GEN 组；5：标准

图 4 GEN 和 OP 作用 24 h 对 MCF-7 乳腺癌细胞中 AIB1 mRNA 表达的影响



1：标准；2：GEN 组；3：OP 组；4：GEN + OP 组；5：对照组

图 5 GEN 和 OP 作用 24 h 对 MCF-7 乳腺癌细胞中 ERα mRNA 表达的影响

3 讨论

EEs 是指能够模拟或干扰机体内源性雌激素的合成、分泌、转运、结合、排泄、生理作用等一类外源性化学物质。OP 广泛用于生产非离子表面活性剂、增塑剂、热稳定剂、燃料油稳定剂等，研究表明 OP 具有生殖、发育毒性，降低精子质量和精子数量，使雄性生育能力降低，OP 还引起生殖道畸形、性行为改变和激素依赖性肿瘤发病的增加[3]。GEN 是一种植物雌激素，大量存在于豆类作物中。人群流行病学资料和动物实验证实女性青春前期摄入大豆异黄酮能抑制乳腺癌的发病。体外研究显示，低于 10^{-5} mol/L 的 GEN、5×10^{-6} mol/L 的 OP 能促进 MCF-7 增殖，但 2.5×10^{-5} mol/L 以上的 GEN 则可抑制 OP 诱导的促细胞增殖作用[4]。

本研究结果显示，5×10^{-5} mol/L 的 GEN 能明显抑制 MCF-7 细胞的增殖，8×10^{-6} mol/L 的 OP 能促进 MCF-7 乳腺癌细胞的增殖，GEN 与 OP 联合作用对 MCF-7 乳腺癌细胞的抑制增殖作用更强，提示 GEN 与其他环境雌激素共存时，GEN 能表现更强的抗雌激素作用。细胞增殖依赖于细胞周期的顺利进行，细胞经有丝分裂，将细胞一分为二，该过程受 G_1/S、G_2/M 2 个关键点调控。本研究结果显示，GEN 和 GEN + OP 组的 MCF-7 细胞阻滞于 G_2/M 期，细胞凋亡增加，OP 组的细胞变化不大。电镜观察发现，GEN、GEN + OP 组细胞核浆比例减少，核仁大，细胞质中内质网、线粒体丰富，微腺腔和微绒毛多见，细胞中分泌颗粒较多，细胞的分化程度高，这与 Cotroneo 等[5]以 GEN 作用 21 d 龄雌鼠引起大鼠乳腺细胞分化、成熟，最终降低乳腺癌的发病结果相类似。OP 组细胞核浆比例大，核仁大而多，细胞中微绒毛少见，细胞分裂像多见，细胞分化程度低，细胞增殖明显，这与前面的 MTT 实验、细胞周期分析结果相一致[6,7]。

EEs 作为一种外源性雌激素,与雌激素受体(ER)形成配体-受体复合物,诱导或抑制有关调节细胞生长和发育的靶基因的转录。EEs 通过影响与 ER 结合和 ER mRNA 或蛋白的表达量从 ER 途径影响细胞的增殖。ERα 是一种配体活化的转录调控因子,雌激素如雌二醇与 ERα 结合,通过经典的雌激素反应元件途径,调控基因表达。AIB1 是一种核受体协同激活因子,它能增强 ERα 和除核受体外的其他转录因子的转录活性。AIB1 mRNA 表达与乳腺癌和卵巢癌发病有关,下调 AIB1 的表达能降低裸鼠 MCF-7 移植瘤的生长[8]。乳腺肿瘤中存在 AIB1 过度表达,AIB1 缺失能明显抑制转 MMTV/v-Ha-ras 鼠肿瘤的发生、发展[8]。本研究表明,GEN 和 GEN + OP 组 AIB1 mRNA、ERα mRNA 及 ERα 蛋白的表达量均降低,OP 组 AIB1 mRNA 和 ERα 蛋白的表达增高,提示 GEN 通过抑制 AIB1、ERα mRNA 的表达,降低 ERα 蛋白的表达,抑制细胞增殖,而辛基酚则通过相反的作用促进 MCF-7 细胞增殖,Khurana 等[9]发现大鼠注射 OP 能增加垂体中 ERα 和 ERβ 的表达水平,这与本研究结果相一致。

细胞中酪氨酸蛋白磷酸化及脱磷和酪氨酸蛋白激酶(PTK)活性的改变是细胞活化、增殖、转化、癌变等的信号传导枢纽[5],磷酸化酪氨酸蛋白(phospho-L-tyrosine protein, PTPr)是 PTK 催化反应产物。细胞中磷酸化酪氨酸水平增高,会导致细胞过度增殖,细胞发生癌变。GEN 是一种植物雌激素,它具有抑制酪氨酸激酶的作用,它能降低细胞中磷酸化酪氨酸的含量,使细胞增殖降低,凋亡增加。核受体 AIB1 的定位受与膜相关的酪氨酸激酶受体调控, MAPK 可激活 AIB1 发生磷酸化,协同激活 ER 依赖性转录[10]。本研究结果显示 GEN 和 GEN + OP 组的 MCF-7 细胞磷酸化酪氨酸蛋白表达量明显降低,GEN + OP 组与 OP 组相比,其磷酸化酪氨酸蛋白表达量仍明显降低,提示 GEN 通过降低细胞中磷酸化酪氨酸蛋白表达,抑制了细胞核中 AIB1 mRNA、ERα mRNA 的表达,降低了 ERα 的表达,抑制细胞的过度增殖,降低肿瘤的发生。

总之,5×10^{-5} mol/L 的 GEN 能明显抑制 MCF-7 细胞的增殖,8×10^{-6} mol/L 的 OP 能促进细胞的增殖,GEN 与 OP 联合作用时,GEN 仍能抑制 OP 的促细胞增殖能力,最终降低细胞的增殖。该抑制作用可能是由于 GEN 一方面通过抑制细胞中的磷酸化酪氨酸蛋白的表达,使下游的信号传导受阻,抑制细胞增殖;另一方面还抑制了细胞核中的核共激活因子 AIB1 mRNA、核转录因子 ERα mRNA 的表达,最终抑制了 ERα 蛋白的表达,使细胞阻滞于 G_2/M 期,细胞表现为分化程度增高,分泌颗粒较多,细胞凋亡增加。OP 则通过与 GEN 相反的作用促进 MCF-7 细胞的增殖。

参考文献:

[1] YING G G, WILLIAMS B, KOOKANA R. Environmental fate of alkylphenols and alkylphenol ethoxylates--a review[J]. Environ Int, 2002, 28(3): 215 - 226.

[2] 涂　刚,姚榛祥. NF-κB 抑制剂 PDTC 增敏 TNF-α 对乳腺癌细胞的毒性作用[J]. 重庆医科大学学报, 2003, 28(4): 454 - 456.

[3] KNORR S, BRAUNBECK T. Decline in reproductive success, sex reversal, and developmental alterations in Japanese medaka (Oryzias latipes) after continuous exposure to octylphenol[J]. Ecotoxicol Environ Saf, 2002, 51(3): 187 - 196.

[4] FREY R S, LI J, SINGLETARY K W. Effects of genistein on cell proliferation and cell cycle arrest in nonneoplastic human mammary epithelial cells: involvement of Cdc2, p21 (waf/cip1), p27 (kip1), and Cdc25C expression[J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61(8): 979 - 989.

[5] COTRONEO M S, WANG J, FRITZ W A, *et al*. Genistein action in the prepubertal mammary gland in a chemoprevention model[J]. Carcinogenesis, 2002, 23(9): 1467 - 1474.

[6] 王　斌,糜漫天,彭俊华,等. 辛基酚和三羟异黄酮对大鼠乳腺癌发生及细胞增殖影响的研究[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(12):119 - 122.

[7] 彭俊华,糜漫天,朱俊东,等. 辛基酚和三羟异黄酮对二甲基苯蒽诱发大鼠乳腺肿瘤的影响[J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(23): 2317 - 2320.

[8] LIAO L, KUANG S Q, YUAN Y, *et al*. Molecular structure and biological function of the cancer-amplified nuclear receptor coactivator SRC-3/AIB1[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2003, 83(1 - 5): 3 - 14.

[9] KHURANA S, RANMAL S, BEN-JONATHAN N. Exposure of newborn male and female rats to environmental estrogens: delayed and sustained hyperprolactinemia and alterations in estrogen receptor expression[J]. Endocrinology, 2000, 141(12): 4512 - 4517.

[10] FONT-DE-MORA J, BROWN M. AIB1 is a conduit for kinase-mediated growth factor signaling to the estrogen receptor[J]. Mol Cell Biol, 2000, 20(14): 5041 - 5047.

(编辑　陈聪连)