维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)03-0270-04

五溴联苯醚影响乳腺癌 MCF-7 细胞增殖和凋亡的机制探讨

罗 东,詹 平

(重庆医科大学公共卫生学院环境卫生教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察环境化合物五溴联苯醚(Penta-brominated diphenyl ethers,5-BDE)影响人乳腺癌细胞 MCF-7 增殖和凋亡的分子生物学作用机制。方法:将 MCF-7 细胞在 DMEM 培养液中进行常规传代培养。采用 MTT 比色法观察 5-BDE 对 MCF-7 细胞增殖的影响,用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)技术和免疫组化方法检测 5-BDE 对 Bcl-2 和 Bax 基因表达的影响。结果:与溶剂对照组相比,在 $1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L 浓度范围内,5-BDE 与 1×10^{-8}mol/L 雌二醇作用类似,可显著促进 MCF-7 细胞增殖($P<0.05$),并表现出良好的剂量-效应和时间-效应关系。RT-PCR 及免疫组化结果显示,5-BDE 可促进 MCF-7 细胞 Bcl-2 和抑制 Bax 蛋白表达。结论:5-BDE 可通过影响细胞增殖和凋亡相关调节基因 Bcl-2 和 Bax 表达而调节人乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖和凋亡作用。

【关键词】五溴联苯醚;MCF-7 细胞;Bcl-2;Bax

【中国图书分类法分类号】R12 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-14

Molecular mechanism of proliferation and apoptosis in breast cancer MCF-7 cells by penta-brominated diphenyl ethers

LUO Dong, et al

(*Department of Environment Hygiene, College of Public Health, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the molecular mechanisms of proliferation and apoptosis by penta-brominated Diphenyl Ethers through regulation of mRNA and protein expression of Bcl-2 and Bax in breast cancer MCF-7 cells. *Methods*: Human breast cancer MCF-7 cells were grown in DMEM medium, MTT assay was employed to investigate cell proliferation. RT-PCR and immunohistochemistry was performed to determine mRNA and protein expression of Bcl-2 and Bax, *Results*: Within the range of $1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L, 5-BDEs stimulated proliferation in MCF-7 cells with a dose-dependent and time-dependent fashion. RT-PCR and immunohistochemistry analyses revealed that treatment with $1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L for 72h resulted in increased mRNA and protein expression of Bcl-2 and inhibition of Bax. *Conclusion*: 5-BDE possessed estrogenic activity and could markedly stimulate proliferation in estrogen responsive breast cancer MCF-7 cells. Up-regulation of Bcl-2 mRNA and protein expression was suggested to be involved in this biological effect.

【Key words】5-BDE; MCF-7 cell; Bcl-2; Bax

近半个世纪以来随着工农业的快速发展,环境污染越来越严重,许多有雌激素效应的人工合成化合物被排放到环境中,这类化合物通过各种途径进入体内,与雌激素受体结合,启动细胞内不同的信号传导途径,发挥拟雌激素样作用,增加了体内雌激素的实际负荷量;致使乳腺癌、卵巢癌及子宫内膜癌等与雌激素相关的肿瘤发病率呈现上升趋势[1]。研究资料表明,乳腺癌的发病与雌激素调节和代谢失调有密切的关系。5-BDE 被大量生产并用于聚合物中作阻燃剂,尤其在电器制造(电视机、计算机线路板和外壳)、建筑材料、泡沫、室内装潢、家具、汽车内层、装饰织物纤维等[2-4]。本研究观察 5-BDE 对乳腺癌 MCF-7 细胞 Bcl-2 和 Bax mRNA 及蛋白表达的影响,以探讨 5-BDE 雌激素活性的分子生物学作用机制。

作者介绍:罗 东(1974-),男,硕士,研究方向:环境卫生与环境毒理。

通讯作者:詹 平,女,教授,E-mail:zanpingcqums@163.com。

基金项目:校创新课题基金(CX200308)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞 MCF-7 细胞株由四川大学华西基础医学院生

维普资讯 http://www.cqvip.com

化教研室提供。

1.1.2 试剂 Trizol RNA 抽提试剂盒 DMEM 培养基(Gibco 公司),活性碳 - 葡聚糖苷处理过的胎牛血清(CDT-FBS, Hyclone),雌二醇(Sigma 公司),Bax 和 Bcl-2 免疫组化试剂盒(北京中杉公司),一步法 RT-PCR 试剂盒由 Takara Shuzo 公司提供,所用引物由大连宝生物公司合成,BDE-99 来自山东烟台金都化工有限公司。

1.1.3 细胞培养 MCF-7 细胞在高糖 DMEM 培养液(含 10%小牛血清)中采用开放式单层贴壁培养。加受试物前 4 d 将细胞用 PBS 洗涤后改为在无酚红 DMEM 培养液(含 5% CDT-FBS)中培养,目的是耗尽细胞内储存的雌激素。

1.1.4 仪器 CO_2 孵箱,倒置显微镜,BIO-RAD 凝胶成像系统,Mias2000 图像分析仪。

1.2 *方法*

1.2.1 实验分组 实验分组和各受试物终浓度:(1) 溶剂对照(ethanol,EtOH):只加入无水乙醇,体积含量比为 0.1%;(2) 雌激素对照 (E2):1×10^{-8}mol/L;(3)5-BDE 组 :$1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L。

1.2.2 MTT 法观察细胞增殖 将 MCF-7 细胞接种于 96 孔培养板(1×10^3 个 / 孔)中培养,24h 待细胞贴壁后,加入不同浓度的各种受试物(总体积 200μl / 孔),每一剂量组设 5 个复孔,分别于 24、48、72、96h,加入 MTT(5mg/ml,20μl/ 孔),继续孵育 4h,弃去培养液,每孔加 DMSO 100μl,以 DMSO 调零,在酶联免疫检测仪以 490nm 波长测定各孔吸光值(A),计算平均 A 值和增殖率:

$$\text{细胞增殖率(Proliferation Rate, PR)}=\frac{\text{实验组}}{\text{溶剂对照组}}\times100\%$$

1.2.3 免疫组化染色及其结果分析 将待试细胞接种到 6 孔板(内置盖玻片)内,各处理化合物对细胞处理 72h 后,取出盖玻片,自然干燥,丙酮(浓度为 80%)固定 30min 后,按操作程序说明书作免疫组化染色。用 Mias 2000 图像分析系统对免疫组化结果进行半定量分析。所测定的灰度分为 256 个等级,平均灰度反映免疫反应产物颜色的深浅,颜色越浅,灰度值越高。

1.2.4 半定量 RT-PCR RNA 按操作程序说明书提取,用紫外可见分光光度计对 RNA 样品进行定量。每个实验样本定量取 1μg 的总 RNA 进行逆转录和 PCR 放大,PCR 产物用 1.5%琼脂糖凝胶电泳观察并用 BIO-RAD 凝胶成像系统进行半定量分析(用 18S 作内对照,将各组结果标准化后求取平均值,资料用实验组 / 对照组比值来表示)。各基因的上下游引物及产物大小见(表 1)。逆转录条件均为 50℃30min,94℃ 4min 灭活 RNase,各目标基因的 PCR 反应条件如下。Bax:94℃变性 1min,60℃退火 1min,72℃延伸 45s,30 个循环,72℃再延伸 7min。Bcl-2:94℃变性 30s,61℃退火 1min,72℃延伸 45s,35 个循环,72℃再延伸 6min。

1.3 *统计学处理*

用 SPSS11.5 统计软件对结果进行分析, 各组间指数的比较采用单因素方差分析和 LSD-t 检验。

2 结 果

2.1 MTT 检测结果

统计结果表明(表 2),与溶剂对照组相比,$1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L 5-BDE 对 MCF-7 细胞处理 24h 可显著促进 MCF-7 细胞增殖($P<0.05$),随着作用时间和作用剂量的提高,其促进增殖效应存在剂量 -

表 1 RT-PCR 技术所检测基因的相应上下引物序列及产物

目标基因	上游引物	下游引物	产物(bp)
Bax	CTGACATGTTTTCTGACGGC	TCAGCCCATCTTCTTCCAGA	387
Bcl-2	ATGTCCAGCCAGCTGCACCT	CACAAAGGCATCCCAGCCTC	265
18S	TTGACGGAAGGGCACCACCAG	GCACCACCACCCACGGAATCG	133

表 2 用 MTT 法测 5-BDE对 MCF-7 细胞增殖的影响

组别及剂量	24h		48h		72h		96h	
(mol/L)	PR%	*P*	PR%	*P*	PR%	*P*	PR%	*P*
EtOH 对照	100.00		100.00		100.00		100.00	0.000 1
E_2 1×10^{-8}	113.46	0.001	119.75	0.000 1	124.65	0.000 1	130.00	0.000 1
5-BDE 1×10^{-8}	103.17	0.227	106.36	0.001 0	109.61	0.000 1	112.68	0.000 1
1×10^{-7}	106.09	0.052	108.47	0.000 1	113.72	0.000 1	117.54	0.000 1
1×10^{-6}	107.40	0.015	112.97	0.000 1	117.29	0.000 1	121.48	0.000 1
1×10^{-5}	109.62	0.003	115.34	0.000 1	119.07	0.000 1	124.23	0.000 1
1×10^{-4}	111.63	0.002	117.88	0.000 1	122.25	0.000 1	127.11	0.000 1

维普资讯 http://www.cqvip.com

依赖和时间 - 依赖关系。

2.2 对 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响

与溶剂对照组相比，1×10^{-8}mol/L E2 和 $1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L 5-BDE 分别对 MCF-7 细胞处理 72h 可显著促进 Bcl-2 和抑制 Bax 蛋白的表达($P<0.01$)。用 Mias2000 图像分析系统对免疫组化结果进行半定量分析结果见表 3，用 SPSS11.5 统计软件处理所得数据见图 1。

2.3 对 Bax，Bcl-2 mRNA 表达的影响

与溶剂对照组相比，1×10^{-8}mol/L E2 和 $1\times(10^{-8}\sim10^{-4})$mol/L 5-BDE 分别对 MCF-7 细胞处理 72h 可明显促进细胞原癌基因 Bcl-2 和抑制抑癌基因 Bax mRNA 的表达，RT-PCR 电泳结果见图 2 和图 3。用 SPSS11.5 统计软件处理所得数据见图4，此

表 3 5-BDE 对 Bax，Bcl-2 蛋白质表达的影响

组别及剂量(mol/L)	灰度值($\bar{x}\pm s$, n=5)					
	Bax	t	P	Bcl-2	t	P
EtOH 对照	160.87 ± 4.69			113.4 ± 6.43		
E_2 1×10^{-8}	107.3 ± 4.20	19.00	0.000	169.6 ± 3.56	-17.11	0.000
5-BDE 1×10^{-8}	151.0 ± 5.79	2.94	0.019	125.8 ± 4.35	-3.57	0.007
1×1010^{-8}	144.1 ± 5.72	5.08	0.001	133.6 ± 3.84	-6.03	0.000
1×10^{-6}	140.2 ± 3.88	7.60	0.000	142.9 ± 4.05	-8.70	0.000
1×10^{-5}	133.9 ± 5.42	8.37	0.000	152.5 ± 3.79	-11.70	0.000
1×10^{-4}	121.2 ± 7.08	10.44	0.000	160.3 ± 4.63	-13.25	0.000

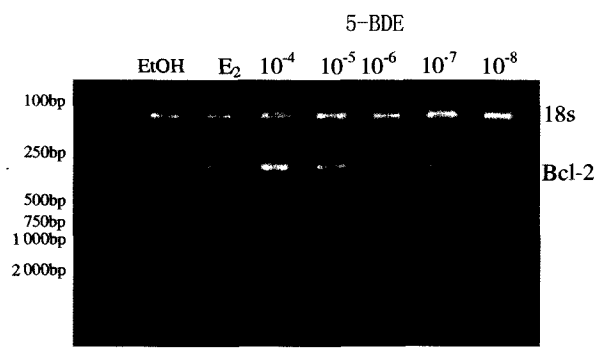


图 2 5-BDE 对 Bcl-2 mRNA 表达的影响电泳图

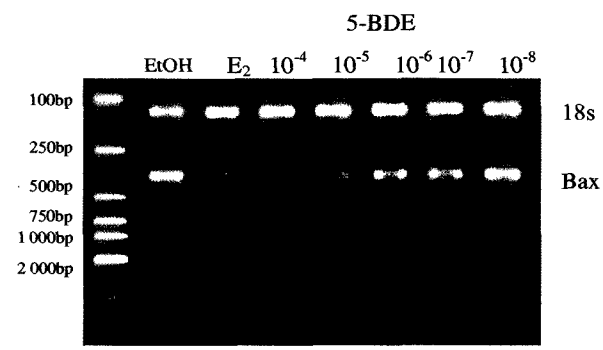


图 3 5-BDE 对 Bax mRNA 表达的影响电泳图

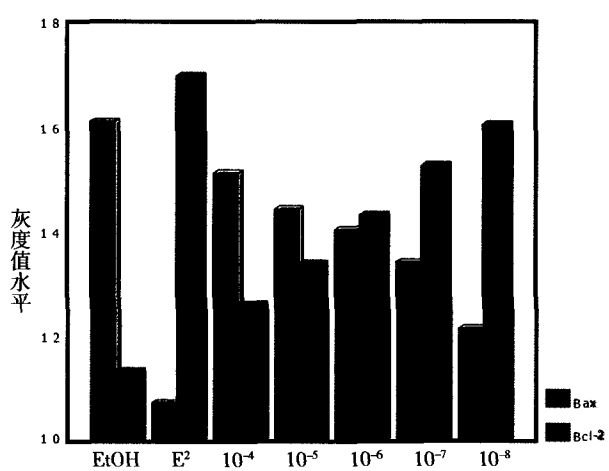
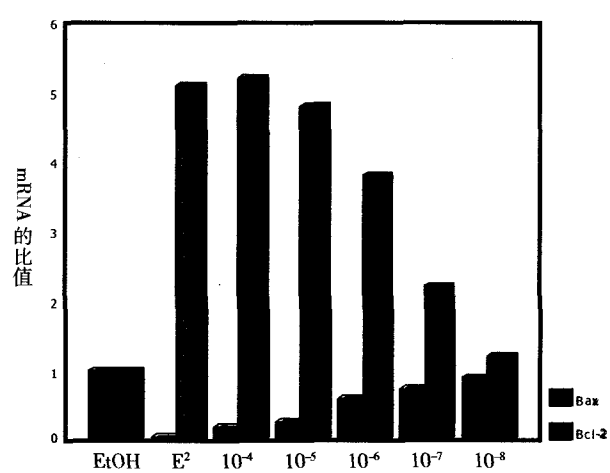


图 1 5-BDE 对 Bax、Bcl-2 蛋白表达的影响



与溶剂对照组相比，*：$P<0.01$

图 4 5-BDE 对 Bax 和 Bcl-2mRNA 表达的影响

维普资讯 http://www.cqvip.com

结果提示环境类雌激素的促有丝分裂作用主要通过影响 Bcl-2 途径而实现的。

3 讨 论

MCF-7 细胞为雌激素受体阳性，雌激素是其有效的促有丝分裂剂[5]。本次实验观察了 5-BDE 对 MCF-7 细胞增殖的影响，并对其生物活性的分子生物学作用机制进行了探讨。结果表明，在 1×(10^{-8}~10^{-4})mol/L 浓度范围内，5-BDE 可显著促进 MCF-7 细胞增殖，此效应存在良好的剂量－效应和时间－效应关系。免疫组化和 RT-PCR 结果显示，5-BDE 同雌激素类似可促进 MCF-7 细胞 Bcl-2 和抑制 Bax mRNA 及蛋白质的表达。

细胞凋亡在多细胞有机体的发育和生长过程中起着重要的调节作用。1994 年，Reed 等确认了 Bcl-2 为一个重要的细胞凋亡调节癌蛋白，其表达在肿瘤组织往往增高，该基因通过抑制肿瘤细胞凋亡、延长肿瘤细胞生命周期而促进肿瘤组织的生长作用[6]。Bax 属于 Bcl-2 家族，但其作用与 Bcl-2 相反，Bax 的主要功能是抑制细胞增殖、促进细胞凋亡，并对 Bcl-2 的功能有重要调节作用。Bax 和 Bcl-2 构成一对负反馈调节因子，二者的平衡是决定细胞死亡或存活的重要因素，因此 Bax/Bcl-2 蛋白表达比例有着重要的生理意义。本次结果表明，5-BDE 同雌二醇类似，可上调 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达并抑制 Bax 的表达，使 Bax/Bc1-2 比值降低，从而抑制细胞凋亡的发生，向细胞增殖的方向发展。此结果也提示，外源性类雌激素对细胞癌基因具有调节作用，因而对相关肿瘤的发生、发展有一定的影响。

参 考 文 献

[1] Clarke R, Hilakivi-Clarke L, Trock B. Breast cancer: dietary and environmental oestrogens[J]. Biologist, 2001; 48(1): 21-26.

[2] WHO. Environmental health criteria: brominated dipheny ethes [M]. World Health Organization, 1994.162.

[3] Damerud PO, Eriksen GS, et al. Polybrominated diphenyl ethers: occurrence, dietary exposure, and toxicology[J]. Environ Health Perspect, 2001; 109(S): 49-68.

[4] Hale RC, La Guardia MJ, Harvey EP, et al. Flame retardants: Persistent pollutants in land-applied sludges[J]. Nature, 2001; 412: 140-141.

[5] Gadd SL, Hobbs G, Miller MR. Acetaminophen-induced proliferation of estrogen-responsive breast cancer cells is associated with increases in c-myc RNA expression and NF-kappaB activity [J]. Toxicol Sci, 2002; 66(2): 233-243.

[6] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol, 1994; 124(1-2): 1-6.

(责任编辑：冉明会)

(上接第 263 页)

有 20 种以上的生长因子作用于血管内皮细胞，其中多种生长因子是通过诱导 VEGF 表达实现的[9]。VEGF 作用于相应的受体，不仅促进内皮细胞的增殖和迁移，还诱导生成一些降解基底膜的蛋白水解酶及表达某些整合素。VEGF 在血管生成中发挥了十分重要的作用。本实验 CAM 血管生成模型表现出的抗血管生成作用，推测其作用机理可能是抑制了血管生成相关因子如 VEGF 的表达，进而抑制了血管生成。因此对 CAM 血管进行了 VEGF 的免疫组化标记，并计数，结果表明 HpSDT 组 VEGF 要少于其他组。但目前 SDT 的机制还不明确，还需作进一步的研究。

本实验证实，Hp 介导的声动力作用可显著抑制 CAM 的 VEGF 表达，从而抑制新生血管形成。

参 考 文 献

[1] 姚 昶，薛 涛，朱永康，等.鸡胚绒毛尿囊膜模型在微血管实验研究中的应用[J]. 微循环学杂志，2005；15(4)：70-73.

[2] 许以伴，陈爱军，刘鼎新，等. H-Hp 衍生物在载瘤小鼠体内的分布[J]. 白求恩医科大学学报，1985；11(2)：126-128.

[3] 石焕文，尚志远，谢 娟，等.超声声化学激活 Hp 效应的研究[J]. 声学技术，2000；19(4)：193-196.

[4] Uchida T, Tachibana K, Hisano S, et al. Elimination of adult T cell leukemia cells by ultrasound in the presence of porfimer sodium[J]. Anticancer Drugs, 1997; 8(4): 329-335.

[5] 许川山，王志刚，虞乐华，等.肿瘤声动力学疗法的研究现状与展望[J]. 临床超声医学杂志，2005；7(1)：37-38.

[6] 李 军，俞 兰.VEGF、肿瘤血管再生及抗肿瘤血管生成治疗[J].医师进修杂志(外科版)，2004；27(4)：52-54.

[7] 王淑美，徐晓玉，陈伟海，等. 26 种活血化瘀中药对鸡胚绒毛尿囊膜血管生成的影响[J]. 重庆医科大学学报，2006；31(3)：401-407.

[8] 张树成，吴志奎，王 蕾，等. 研究中药血管生成活性和作用的鸡胚绒毛尿囊膜实验模型的应用[J]. 中国中医基础医学杂志，1999；5(5)：16-19.

[9] Roberts WG, Palade GE. Neovascular induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated[J]. CancerRes, 1997; 5(7): 765-772.

(责任编辑：冉明会)