DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.08.010
第25卷第8期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 8
2003年4月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Apr. 2003

文章编号:1000-5404(2003)08-0673-03

论著

辛基酚体外类雌激素效应观察

朱 毅,舒为群,田怀军,余 楠,李 祥 (第三军医大学预防医学系环境卫生学教研室、重庆市三峡库区生态环境与人群健康研究重点实验室,重庆 400038)

提 要:目的 评价辛基酚(OP)的类雌激素活性,并对其作用机制进行初步研究。方法 采用了体外MCF-7细胞增殖试验检测了OP的类雌激素活性,并用生长曲线分析、细胞周期分析、他莫昔芬拮抗试验和凋亡检测对其作用机制进行了初步探讨。结果 OP有明显刺激MCF-7细胞增殖的类雌激素活性;细胞周期分析OP、E_2组细胞增殖指数均明显高于溶剂对照组;OP、E_2刺激MCF-7细胞增殖的类雌激素活性可被Tam拮抗;OP、E_2均能明显抑制MCF-7细胞凋亡的发生。结论 OP具有刺激MCF-7细胞增殖的类雌激素活性,其机制可能是与雌激素受体结合后,影响细胞增殖及细胞凋亡过程,从而产生一系列生物效应。

关键词:环境雌激素;辛基酚;MCF-7细胞增殖试验;他莫昔芬;细胞凋亡
中图法分类号:R12;R329.28;R977.12 文献标识码:A

Observation of the estrogenic activity of Octylphenol *in vitro*

ZHU Yi, SHU Wei-qun, TIAN Huai-jun, YU Lan, LI Xiang (Department of Environmental Hygiene, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To observe the estrogenic activity of octylphenol (OP) *in vitro* and to conduct a preliminary study of its mechanism. Methods The estrogenic activity of OP was detected by cell proliferation test of MCF-7 cells *in vitro* and the mechanism was preliminarily studied by growth curve analysis, cell cycle analysis, tamoxifen (Tam) antagonistic test and apoptosis detection. Results OP was found to have estrogenic activity to stimulate the proliferation of MCF-7 cells. Cell cycle analysis revealed that the cell proliferation indexes of OP and 17β-estradiol (E_2) were higher than those of alcohol. The estrogenic activities of OP and E_2 to stimulate the proliferation of MCR-7 could be antagonized by Tam. Both OP and E_2 could inhibit the cell apoptosis of MCF-7 cells. Conclusion OP possesses estrogenic activity to stimulate the proliferation of MCF-7 cells. The mechanism may be due to binding to the estrogen receptor, which may have effect on cell proliferation and apoptosis.

Key words: environmental estrogen; octylphenol; cell proliferation test of MCF-7 cells; tamoxifen; apoptosis

环境雌激素(Environmental estrogens, EE)是指能够模拟或干扰机体内天然雌激素的合成、分泌、转运、结合、排泄、生理作用等的一类外源性化学物质。1995年Jensen等[1]研究认为,雌激素和一些具有雌激素活性的外来化合物可能是造成人类精子质量下降和男性生殖系统发育异常的共同原因。也有研究认为女性青春期提早、子宫内膜异位症及乳腺癌发病率增加可能与孕妇产前或产后早期暴露于环境雌激素水平的增加有关[2]。环境雌激素对人类及动物的健康影响已引起人们的重视,成为目前内分泌干扰物的重要研究方向之一。

烷基酚类化合物(Alkylphenols, APs)在塑料生产、洗涤用品方面应用极其广泛,已有报道在地面水、自来水、食品、饮料中发现APs污染。辛基酚(Octylphenol OP)是烷基酚类化合物中有代表性的环境污染物,其类雌激素活性在国外已有报道[3],但对其作用机制未见研究报道。国内现还未见辛基酚类雌激素活性方面的报道。本研究采用了体外MCF-7细胞增殖试验检测了OP的类雌激素活性,并用生长曲线分析、细胞周期分析、他莫昔芬拮抗试验和凋亡检测对其作用机制进行了初步探讨。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39800127)
作者简介:朱 毅(1967—),男,重庆市人,硕士,讲师,主要从事环境卫生及环境毒理方面的研究 电话:(023)68752293
通信作者:舒为群,电话:(023)68752294
收稿日期:2002-09-05;修回日期:2003-01-20

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1 材料和方法

1.1 MCF-7 细胞株

四川大学(原华西医科大学)公共卫生学院环卫教研室惠赠。

1.2 主要试剂

17β-雌二醇(17β-estradiol, E_2)、辛基酚(Octylphenol, OP)、他莫昔芬(Tamoxifen, Tam)、含酚红 DMEM 培养粉、不含酚红 DMEM 培养粉、不含酚红 DMEM 培养粉、葡聚糖 4 万(Dextran)、新生小牛血清(NBS)、细胞凋亡检测试剂盒(*In Situ* Cell Death Detection, POD)等。

1.3 主要器材

24 孔细胞培养板、CO_2 孵箱、SW-CJ-2F(A)双人单面净化工作台、XDS-1 实验室倒置显微镜、血球计数板、流式细胞仪(FACS Calibur)、显微镜等。

1.4 方法

1.4.1 去激素小牛血清(CD-NBS)制备[4] NBS 中加入葡聚糖 25 mg/100 ml, 待其完全溶解后再加活性炭 250 mg/100 ml, 在 55 ℃水浴中作用 45 min, 3 000× g 离心 10 min, 取上清液。连续处理 2 次以除去血清中的雌激素。处理后的血清用金属滤器(0.45、0.22 μm 两层滤膜)过滤除菌后, 于-20 ℃保存备用。

1.4.2 MCF-7 细胞系维持 MCF-7 细胞培养在含 10% NBS/DMEM 培养基中(含胰岛素 0.2 U/ml、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml), 在 37 ℃、5% CO_2、100%湿度下培养。用含 0.25%胰酶、0.02% EDTA 的消化液消化传代。

1.4.3 MCF-7 细胞增殖试验[4] 将常规培养 MCF-7 细胞转入去激素培养基(含 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养基、青霉素 100 U/ml、链霉素 100 U/ml)中培养 2 周。消化接种于 24 孔培养板, 细胞 1× 10^4/孔, 每孔加 1 ml 去激素培养基, 预培养 24 h 后, 弃去陈旧培养基, 每孔加 2 ml 含去激素培养基, 内含各剂量受试物。以无水乙醇(0.1%)为溶剂对照, E_2(10^{-8} mol/L)为阳性对照, OP 设 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} mol/L 等 5 个剂量组。各组均设 3 个以上平行样, 在 37 ℃、5% CO_2、100%湿度下培养 5 d 后, 用含 0.25%胰酶、0.02% EDTA 的消化液消化, 用吸管吹打均匀, 用血球计数板计数。以增殖效应(Proliferative effect, PE)、相对增殖效应(Relative proliferative effect, RPE)作为评价指标, 计算公式为:

增殖效应(PE)= 试验组各剂量组的细胞数/溶剂对照组细胞数

相对增殖效应(RPE)=(试验组增殖效应-1)/(阳性对照组增殖效应-1)× 100%

1.4.4 Tamoxifen(Tam)拮抗试验 细胞培养同 MCF-7 细胞增殖试验, OP 剂量为 10^{-5} mol/L, E_2 10^{-8} mol/L 为阳性对照, 溶剂对照为 0.1%无水乙醇。各组同时加 Tam 10^{-7} mol/L。计数时间及方法同 MCF-7 细胞增殖试验。

1.4.5 OP 对 MCF-7 细胞生长曲线的影响 细胞培养同 MCF-7 细胞增殖试验, OP 剂量为 10^{-5} mol/L, E_2 10^{-8} mol/L 为阳性对照, 溶剂对照为 0.1%无水乙醇。培养 1、3、5、7 d 消化后, 用血球计数板计数并绘出各组 MCF-7 细胞生长曲线。

1.4.6 细胞周期分析 细胞培养在细胞培养瓶内, 其余同 MCF-7 细胞增殖试验。OP 剂量为 10^{-5} mol/L, E_2 10^{-8} mol/L 为阳性对照, 溶剂对照为 0.1%无水乙醇。培养 1、3、5、7 d 消化后, 用吸管吹打均匀, 取 1× 10^6 个细胞/组, 固定于 70%无水乙醇内, PI 染色 30 min, 用流式细胞仪进行细胞周期分析。

评价指标: 细胞增殖指数 CPI(Cell preliferation index, CPI) % $=(S+G_2-M)/(G_0-G_1+S+G_2-M)\times 100\%$

1.4.7 细胞凋亡检测 将细胞消化后接种于 18 mm× 18 mm 盖玻片上, 培养 24 h 后, 弃去陈旧培养基, 加去激素培养基, 内含各种受试物(溶剂对照无水乙醇 0.1%、阳性对照 E_2 10^{-8} mol/L、OP10^{-5} mol/L)。培养 5 d 后取出盖玻片, TULEL 法用凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡。镜下计数 1 000 个细胞, 计算凋亡率。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 软件进行方差分析。

2 结果

2.1 OP 对MCF-7 细胞增殖的影响

在去激素培养基培养中, OP 在 10^{-8} ~ 10^{-5} mol/L 可诱导 MCF-7 细胞明显增殖, 在 10^{-5} mol/L 可诱导 MCF-7 细胞最大增殖, 其相对增殖效应(RPE)为 92.20%。见表 1。

表 1 OP 对 MCF-7 细胞增殖的影响

Tab 1 Effect of OP at different dosages on the proliferation of MCF-7 cells

Group	Cell number(10^4/well)	PE	RPE(%)
Control	2.11±0.26	1.00	—
OP 10^{-8} mol/L	2.65±0.24 *	1.26	5.96
OP 10^{-7} mol/L	5.24±0.37 **	2.48	33.94
OP 10^{-6} mol/L	8.98±0.42 **	4.26	74.77
OP 10^{-5} mol/L	10.60±0.51 **	5.02	92.20
OP 10^{-4} mol/L	0.40±0.15 **	0.19	—
E_2 10^{-8} mol/L	11.30±0.69 **	5.36	100.00

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2 OP 对MCF-7 细胞生长曲线的影响

OP 在 10^{-5} mol/L 刺激 MCF-7 细胞增殖的生长曲线与 E_2 10^{-8} mol/L 相似, 从 3 d 开始曲线明显上移, 细胞数明显高于溶剂对照组。培养 3~7 d 细胞处于对数生长期, 见图 1。

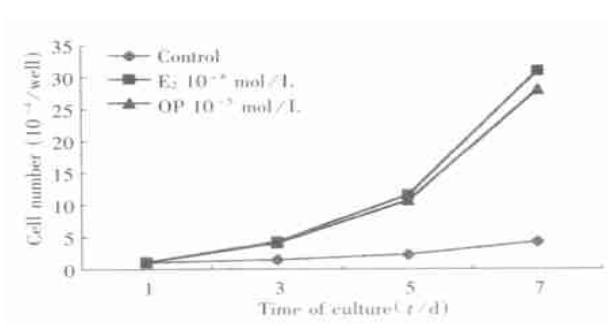


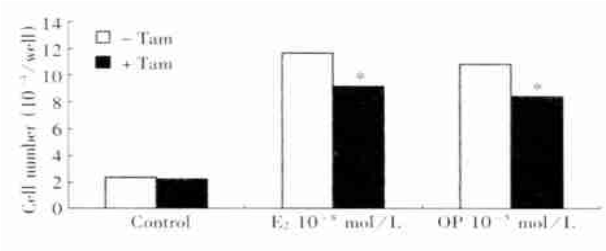
图 1 OP 对 MCF-7 细胞生长曲线的影响

Fig 1 Effect of OP on the cell proliferation of MCF-7 cells

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.3　Tamoxifen(Tam)拮抗试验

在去激素培养基中, 除溶剂对照组外, 其余各组加 Tamoxifen(+Tam)组细胞数量明显低于不加 Tamoxifen(−Tam)组, Tam 对 OP、E_2 刺激 MCF-7 细胞增殖有明显的抑制作用。见图 2。



*: $P<0.01$ *vs* −Tam

图 2　Tam 对雌激素活性的拮抗作用

Fig 2　Antagonism of Tam to estrogenic activity

2.4　OP 对MCF-7 细胞细胞周期的影响

在去激素培养基中培养 5 d 后, OP 组和阳性对照组细胞增殖指数比溶剂对照组高。溶剂对照组细胞主要阻滞于 G_0-G_1 期, 见表 2。

表 2　OP 对 MCF-7细胞细胞周期的影响

Tab 2　Effect of OP on cell cycle of MCR-7 cells

Group	G_0-G_1(%)	S(%)	G_2-M(%)	CPI(%)
Control	90.73	6.44	2.83	9.27
E_2 10^{-8} mol/L	74.71	19.50	5.79	25.29
OP 10^{-5} mol/L	75.85	18.05	6.10	24.15

2.5　OP 对MCF-7 细胞凋亡的影响

在去激素培养基中培养 5 d 后, TULEL 法检测细胞凋亡, 溶剂对照组凋亡率为 15.4%> OP 组(3.2%)> 阳性对照组(0.4%)。

3　讨论

环境中的化学物质是否具有雌激素活性, 目前还不能从分子结构上加以推测, 结构相似的酚类化学物仅一部分具有雌激素活性。因此, 评价环境中化学物质是否具有雌激素活性主要通过测定该化学物质诱导雌激素生理效应的能力来进行。本实验采用的 MCF-7 细胞增殖试验所用 MCF-7 细胞来源于人乳腺癌细胞, 是一种雌激素受体表达阳性、对雌激素敏感细胞, 广泛应用于评价环境雌激素。Soto 等[5] 最早提出用 MCF-7 细胞增殖试验来评价环境雌激素, 称为雌激素筛检(E-screen)试验。

MCF-7 细胞增殖试验显示, OP 在 10^{-5} ~ 10^{-8} mol/L 有明显刺激MCF-7细胞增殖的类雌激素活性; 而在 10^{-4} mol/L 则显示出明显的细胞毒性作用, 其机制有待研究。该结果与 White[6] 试验结果基本一致。生长曲线分析也显示 OP、E_2 生长曲线明显上移, 有明显刺激 MCF-7 细胞增殖的类雌激素活性, 培养第 5 天细胞处于对数生长期, 此时细胞最适合作各种生物学试验。细胞周期分析提示, OP、E_2 能促使MCF-7 细胞由 G_0-G_1 期进入 S 期。

根据雌激素作用原理, 雌激素要产生生物学效应, 必须先与雌激素受体结合, 进而调节相应的基因转录, 从而产生相应的生物学效应。Tamoxifen(Tam)是一种雌激素受体拮抗剂[7]。本试验发现 Tam 能拮抗 OP、E_2 的刺激 MCF-7 细胞生长的类雌激素活性, 说明 OP 刺激MCF-7 细胞生长的类雌激素活性与 E_2 一样, 是经与雌激素受体结合而产生的生物学效应。

细胞凋亡结果显示, OP、E_2 均能明显抑制 MCF-7 细胞凋亡的发生, 该结果在国内外均未见报道。因凋亡的抑制可引起细胞死亡减少, 从而导致细胞数增加。所以, 凋亡抑制可能是 OP、E_2 组细胞数增加的机制之一。此外, 在肿瘤的发生过程中, 细胞凋亡有着极其重要的作用, 细胞凋亡功能的抑制将导致肿瘤的发生[8]。该试验结果为环境雌激素导致一些肿瘤发生提供了新的试验依据。

参考文献:

[1] Jensen T K, Toppari J, Keiding N, *et al*. Do environmental estrogens contribute to the decline in male reproductive health[J]? Clin Chem, 1995, 41(12 Pt 2): 1896−1901.

[2] Jones L A, Hajek R A. Effects of estrogenic chemicals on development[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(Suppl 7): 63−67.

[3] White R, Jobling S, Hoare SA, *et al*. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic[J]. Endocrinology, 1994, 135(1): 175−182.

[4] Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines[J]. Cell, 1980, 20: 353−362.

[5] Soto A M, Sonnenschein C, Chung K L, *et al*. The E−SCREEN assay as a tool to identify estrogens: an update on estrogenin environmental pollutants [J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(7): 113−122

[6] White R, Jobling S, Hoare S A, *et al*. Environmentally persistent alkylphenolic compounds are estrogenic[J]. Endocrinology, 1994, 135(1): 175−182.

[7] Ericque C, Jean Louis B, Henri R, *et al*. Tamoxifen and metabolitesin MCF7 cells: correlation between binding to estrogen receptor and inhibition of cell growth[J]. Cancer Research, 1982, 42(1): 317−321

[8] Zazami N, Susin S A, Marchetti P, *et al*. Mitochondrial control of nuclear apoptosis[see comments][J]. J Exp Med, 1996, 183(4): 1533−1544.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net