DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.11.018
第25卷第11期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 11
2003年6月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jun. 2003

文章编号:1000-5404(2003)11-0977-03

论著

影响MCF-7细胞增殖试验相关因素的初步研究

朱 毅,舒为群,田怀军 (第三军医大学预防医学系环境卫生学教研室,重庆 400038)

提 要:目的 了解影响MCF-7细胞增殖试验相关因素,为MCF-7细胞增殖试验检测环境雌激素方法的标准化提供试验依据。方法 对不同来源的MCF-7细胞雌激素敏感性进行检测,对筛选出的敏感细胞在不同培养条件、去激素培养基中培养不同时间进行细胞增殖试验。结果 不同来源MCF-7细胞对雌激素敏感不同;培养基中酚红、血清中内源性雌激素对MCF-7细胞有刺激增殖作用;MCF-7细胞在去激素培养基中培养时间越长,对雌激素越敏感。结论 进行MCF-7细胞增殖试验前应进行雌激素敏感试验,选用敏感细胞;应在去激素培养基中培养适当时间后进行试验。

关键词:环境雌激素;MCF-7细胞;17β-雌二醇;细胞培养
中图法分类号:R-331;R12 文献标识码:A

Study of the related influencing factors of MCF-7 cells proliferation test *in vitro*

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

Abstract: Objective To study the related influencing factors of MCF-7 cells proliferation test *in vitro* to provide some criteria for the standard detection of environmental estrogens (EE) by cell proliferation test of MCF-7 cells *in vitro*. Methods The sensitivity to E_2 stimulation of different sources of MCF-7 cell lines was detected. Cell proliferation test was performed on the screened sensitive cells in different culture conditions. Results In the estrogen-free medium, C cell line of MCF-7 was more sensitive to E_2 stimulation than A and B cell lines ($P<0.01$). The phenolsulfonphthalein in medium and the endogenous estrogen in NBS had stimulating effect on the cell proliferation of MCF-7. The longer MCF-7 was cultured in estrogen-free medium, the more sensitive was the cell to the stimulation of estrogen ($P<0.01$). Conclusion Evaluation of the estrogenic activity by MCF-7 cell proliferation test *in vitro* may be influenced by many factors.

Key words: environmental estrogen (EE); MCF-7cells; cell proliferation test

20世纪90年代以来,环境雌激素(Environmental estrogens, EE)对人类的危害已越来越引起公众和学术界的重视,在国际上已成为毒理学界的研究热点。环境雌激素由于种类繁多,结构差异较大,与天然雌激素结构也有很大差别,故很难仅从化学结构上来判断某种化合物是否具有类雌激素活性。因此,建立一种敏感可靠而快速简便的检测方法进行识别和筛检,对于减少和控制环境雌激素污染,降低人们对环境雌激素的暴露水平,减少相关疾病的发生有重要的现实意义。MCF-7细胞增殖试验是国外最常用的检测环境雌激素的方法之一,具有灵敏度高、可同时检测多种环境雌激素、快速简便的特点,但也存在许多影响因素,Villalobos等[1]研究发现,不同来源MCF-7细胞对雌激素敏感性不同。本实验对影响MCF-7细胞增殖试验的相关因素,不同来源MCF-7细胞、不同培养条件等进行了初步研究。

1 材料和方法

1.1 MCF-7细胞株

共A、B、C 3个不同来源MCF-7细胞,分别来源于中科院细胞所及国内同行惠赠。

1.2 主要试剂

17β-雌二醇(17β-estradiol, E_2)、活性炭(Charcoal)购于Sigma,含酚红DMEM培养粉、不含酚红DMEM培养粉、活性炭/葡聚糖处理小牛血清(CD-NBS)购于Hyclone,葡聚糖4万(Dextran)购于上海化学试剂公司,新生小牛血清购于郑州佰安生物工程有限公司。

1.3 主要器材

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、YXQ.SG41.280电热式压力蒸汽灭菌器、台式离心机、24孔细胞培养板。

1.4 试验方法

1.4.1 去激素小牛血清(CD-NBS)制备[2] 向NBS中加入葡

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:2002-05-30;修回日期:2003-02-24

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

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 μm、0.22 μm 两层滤膜）过滤除菌后，于－20 ℃保存备用。

1.4.2 受试物溶液配制 雌二醇（E_2）用无水乙醇配成各种受试浓度（10^{-4}～10^{-7} mol/L）。

1.4.3 MCF-7 细胞系维持 MCF-7 细胞培养在含 10% NBS/DMEM 培养基中（含 20 U 胰岛素/100 ml、100 U 青霉素/ml、100 U 链霉素/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。

1.4.4 不同来源 MCF-7 细胞对雌激素（E_2）的敏感性试验 将贴壁生长的 MCF-7 细胞用 PBS 液洗 3 次，再加去激素培养基（含 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养基、100 U 青霉素/ml、100 U 链霉素/ml）培养 2 周。消化细胞，将细胞接种于 24 孔培养板，1 万个细胞/孔，每孔加 1 ml 去激素培养基，培养 24 h 后，弃去陈旧培养基，每孔加 2 ml 去激素培养基，内含 E_2，浓度分别为 10^{-10}、10^{-9}、10^{-8}、10^{-7} mol/L。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）[3] 作为评价指标，计算公式为：

$$\text{增殖效应(PE)} = \frac{\text{试验组各剂量组的细胞数}}{\text{溶剂对照组细胞数}}$$

1.4.5 不同培养条件对 MCF-7 细胞增殖的影响 对雌激素最敏感 MCF-7 细胞在去激素培养基中培养 2 周后，消化接种于 24 孔培养板，1 万个细胞/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，分别加入 10% NBS/含酚红 DMEM、10% NBS/无酚红 DMEM、10% CD-NBS/含酚红 DMEM、10% CD-NBS/无酚红 DMEM、10% 进口 CD-NBS/无酚红 DMEM 培养液 2 ml。各剂量组均设 3 个以上平行样，在 37 ℃、5% CO_2、100% 湿度下培养 5 d 后，计数、评价方法同上。

1.4.6 MCF-7 细胞在去激素培养基中培养不同时间对雌激素的敏感性试验 对雌激素最敏感 MCF-7 细胞在去激素培养基中培养 1、2、4 周后，消化接种于 24 孔培养板，1 万个细胞/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，设 3 个以上平行样，在 37 ℃、5% CO_2、100% 湿度下培养 5 d 后，计数方法同上。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 中的方差分析。

2 结果

2.1 不同来源 MCF-7 细胞对雌激素（E_2）的敏感性试验

从图 1 可见，不同来源 MCF-7 细胞对 E_2 的敏感性不同，C＞B＞A。故以下试验均选用来源于 C 的 MCF-7 细胞进行。

2.2 不同培养条件对 MCF-7 细胞增殖的影响

在去激素培养基中培养 MCF-7 细胞 2 周，在不同培养基中生长有明显差异。MCF-7 细胞在 10% CD-NBS/含酚红 DMEM 培养液中生长细胞数明显高于 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养液中生长细胞数（$P<0.01$），说明酚红对细胞生长有刺激作用。细胞在 10% NBS/无酚红 DMEM 培养液中生长细胞数明显高于 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养液中生长细胞数（$P<0.01$）。细胞在 10% 进口 CD-NBS/无酚红 DMEM 培养液中生长细胞数与 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养液中生长细胞数无显著差异，说明我们在本试验中选用血清去激素处理方法能够去除血清中的内源性雌激素，去除效果与进口 CD-NBS 相当。见图 2。所以，在后续试验中，为避免培养体系对细胞增殖的影响，试验时我们选择 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养液进行细胞培养。

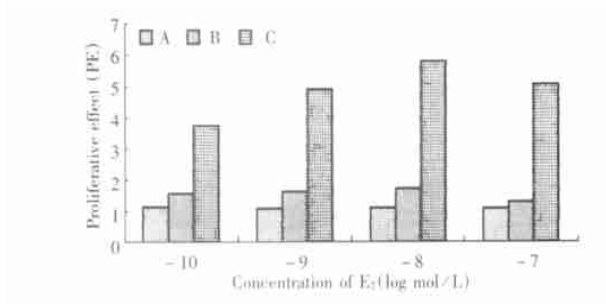
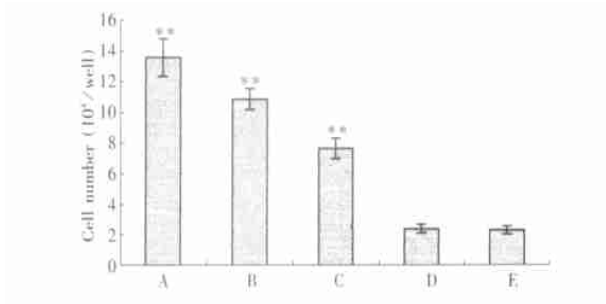


图 1 不同来源 MCF-7 细胞对 E_2 的敏感性

Fig 1 The sensitivity to E_2 stimulation of different sources of MCF-7 cells



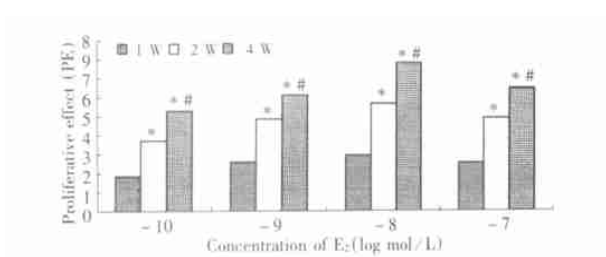
A：DMEM/NBS；B：Red-free DMEM/NBS；C：DMEM/CD-NBS；D：Red-free DMEM/CD-NBS；E：Red-free DMEM/import CD-NBS；**：$P<0.01$ *vs* phend red-free DMEM/import CD-NBS

图 2 不同培养条件对 MCF-7 细胞增殖的影响

Fig 2 Effect of different culture conditions on MCF-7 cell proliferation

2.3 在去激素培养基中培养时间对 MCF-7 细胞增殖的影响

图 3 结果显示，MCF-7 细胞在去激素处理培养基中培养时间越长，细胞对雌激素刺激生长的敏感性越高。



*：$P<0.01$ *vs* one week；#：$P<0.01$ *vs* two weeks

图 3 在去激素培养液中培养时间对 E_2 刺激 MCF-7 细胞生长的影响

Fig 3 Effect of the sensitivity to E_2 stimulation of MCF-7 stimulation of MCF-7 cells proliferation at different culture time in Phenol red-free DMEM/CD-NBS

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

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 细胞增殖实验所用 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、对雌激素敏感的细胞, 广泛应用于评价环境雌激素。Soto 等[4] 最早提出用 MCF-7 细胞增殖实验来评价环境雌激素, 称为雌激素筛检(E-screen)实验。其原理是血清中含有一种能特异抑制雌激素敏感细胞增殖的物质, 名为雌激素抑素(Estrocolyone-1), 而雌激素可以通过中和此物质特异地清除其抑制效应, 从而诱导细胞增殖。血清中的其它不具有雌激素活性的类固醇激素和生长因子则不能中和该物质。雌激素抑素(Estrocolyone-1)[5] 是一种对热稳定、可被蛋白质水解、不能盐析、不能用有机溶剂提取、分子质量为(70 ~ 80)×10^3、等电点为 4.5 ~4.8 的大分子物质。

本实验比较了来自于不同实验室的 A、B、C 3 种来源 MCF-7 细胞对雌激素的敏感性, 结果显示, 不同来源 MCF-7 细胞对 E_2 的敏感性, C> B> A, 说明不同来源 MCF-7 细胞对雌激素的敏感性有所不同, Villalobos 等[1] 也有类似报道。用 MCF-7 细胞增殖实验检测环境雌激素应选择对雌激素最敏感 MCF-7 细胞, 所以本实验采用来源于 C 实验室的 MCF-7 细胞进行实验。

在用 MCF-7 细胞增殖实验检测环境雌激素时, 培养基中不能含有具有雌激素活性的物质, 如培养基中作为 pH 指示剂的酚红、血清中的内源性雌激素等。本实验结果表明, 酚红对 MCF-7 细胞有较强的细胞增殖作用, 说明酚红有刺激 MCF-7 细胞生长的类雌激素活性, Berthois[6] 有类似报道。本实验结果同时显示, 血清中的内源性雌激素对 MCF-7 细胞有明显的细胞增殖作用, 在其它实验条件相同的情况下, 经活性炭/葡聚糖处理的小牛血清组细胞数明显低于未经活性炭/葡聚糖处理的小牛血清组细胞数, 说明本实验中采用的血清去激素处理方法是有效的, 其处理后雌激素水平与进口 CD-NBS 中的雌激素水平相近, 达到本实验的要求。

实验结果显示, MCF-7 细胞在去激素培养基中培养时间与其对雌激素敏感性有关。其 E_2 的增殖效应 4 周> 2 周> 1 周, 说明 MCF-7 细胞在去激素培养基中培养时间越长, 其对雌激素刺激越敏感。但在因 CD-NBS/无酚红培养基中培养不是 MCF-7 细胞的最适培养条件, MCF-7 细胞在该培养基中培养 4 周左右, 其贴壁、生长状况明显减弱。因 MCF-7 细胞在去激素培养基中培养 2 周对雌激素已非常敏感, 而且此时细胞生长状况良好, 故本实验采用在去激素培养基中培养 2 周 MCF-7 细胞进行实验。White 等[7] 采用在去激素培养基中培养 1 周 MCF-7 细胞进行实验, 但未对不同培养时间 MCF-7 细胞对雌激素敏感性进行比较, 也未见其它相关文献报道。

以上说明, 用 MCF-7 细胞增殖实验检测环境雌激素, 其影响因素很多, 包括 MCF-7 细胞来源、培养条件、在去雌激素培养基中培养时间等。因此, 实验方法的标准化对保证不同实验室间实验结果的重现性非常重要。本实验对各种影响因素进行了初步探讨, 对用 MCF-7 细胞增殖实验检测环境雌激素方法的标准化具有一定的现实意义。本实验结果显示, 选用对雌激素敏感的 MCF-7 细胞, 细胞系维持培养基用 10%NBS/含酚红 DMEM 培养基, MCF-7 细胞增殖实验前转入 10% CD-NBS/无酚红 DMEM 培养基(去激素培养基)中培养 2 周后进行相关实验效果最好。

参考文献:

[1] Villalobos M, Olea N, Brotons J A, *et al*. The E-screen assay: a comparison of different MCF-7 cell stocks[J]. Environ Health Perspect, 1995, 103(9): 844—850.

[2] Westley B, Rochefort H. A secreted glycoprotein induced by estrogen in human breast cancer cell lines[J]. Cell, 1980, 20(2): 353—362.

[3] Schlumpf M, Cotton B, Conscience M, *et al*. *In vitro* and *in vivo* estrogenicity of UV screens[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109(3): 239—244.

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

[5] Soto A M, Silvia R M, Sonnenschein C. A plasma-born specific inhibitor of the proliferation of human estrogen-sensitive tumor cancer cells(estrolycone-1)[J]. J Steroid Biochem Mol Boil, 1992, 43(7): 703—712.

[6] Berthois Y, Katzenellenbogen J A, Katzenellenbogen B S. Phenol red in tissue culture media is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83(8): 2496—2500.

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

(编辑　薛国文)

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