

用 MCF-7 细胞检测有机磷农药拟雌激素样活性

郑 光, 周志俊, 戴旭峰, 孙运光, 顾锡安

(复旦大学公共卫生学院, 上海 200032)

摘要: 目的 观察常用有机磷农药对 MCF-7 细胞增殖以及对雌激素受体基因和 *pS2* 基因表达的影响。方法 选用乐果、乙酰甲胺磷、久效磷、马拉硫磷、对硫磷、对氧磷 6 种有机磷农药进行 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖实验和转录活化实验。结果 6 种有机磷农药不能诱导 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖, 但乐果却能使 *pS2* 基因表达上调。结论 乐果可能具有拟雌激素样活性, 且引起 *pS2* 基因表达上调不通过雌激素受体介导。

关键词: 雌激素样活性; MCF-7 人乳腺癌细胞增殖实验; 转录活化实验; 有机磷农药

中图分类号: R99; Q344.13 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X (2004)05-0273-04

Detection of estrogenic effects of organophosphorus pesticides on MCF-7 human breast cancer cells

ZHENG Guang, ZHOU Zhi-jun, DAI Xu-feng, SUN Yun-guang, GU Xi-an

(School of Public Health, Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract: **Objective** To study the estrogenic effects of commonly-used organophosphorus pesticides on the proliferation of MCF-7 cells and the expression of the estrogen receptor (ER) gene and *pS2* gene. **Method** Six kinds of organophosphorus pesticides, dimethoate (Dim), acephate (Ace), monocrotophos (Mon), malathion (Mal), parathion and paraoxon were selected to perform MCF-7 human breast cancer cell proliferation assay and transcription activation assay. **Result** All these six kinds of organophosphorus pesticides were unable to induce proliferation of human breast cancer MCF-7 cells. And they could not down-regulate the expression of the ER gene, but only dimethoate could up-regulate the expression of the *pS2* gene. **Conclusion** Dimethoate possibly had estrogenic activity, which could up-regulate the expression of the *pS2* gene without mediation of ER.

Key words: Estrogenic effects; MCF-7 human breast cancer cell proliferation assay; Transcription activation assay; Organophosphorus pesticide

MCF-7 人乳腺癌细胞是最常用的检测雌激素样活性的细胞株, Soto 最早从雌激素依赖的转移性乳腺癌分离并建株。在此后的研究中, 发现该细胞含有雌激素受体, 在雌激素作用下增殖, 而且只对雌激素样物质产生效应, 对其他非雌激素样化学物无效, Soto 等把它作为检验雌激素的方法, 并称为 E-SCREEN 试验^[1]。MCF-7 细胞具有雌激素调节基因, 雌激素可以诱导这些基因的表达, 在本研究中应用 Soto 的 E-SCREEN 试验和美国内分泌筛选测试顾问委员会推荐的两级测试方案中的第一级筛选方案^[2], 对我国常用的 6 种有机磷农药乐果、乙酰甲胺磷、马拉硫磷、对硫磷、对氧磷、久效磷进行筛选测试, 半定量地分析这些基因的表达水平, 评价这 6 种有机磷农药的雌激素样活性。

1 材料与方法

收稿日期: 2004-03-03; 修回日期: 2004-05-24

基金项目: 本课题受国家 973 项目、上海市曙光学者计划基金资助。

作者简介: 郑光 (1974-), 男, 硕士研究生, 研究方向: 生殖毒理, 现在上海市徐汇区疾病预防控制中心。

通讯作者: 周志俊, 电子信箱: zjzhou@shmu.edu.cn

1.1 细胞来源

MCF-7 人乳腺癌细胞, 由中国科学院上海分院细胞研究所提供。

1.2 主要试剂与仪器

雌激素受体拮抗剂 ICI182, 780 由英国 Tocris 公司提供; 无酚红 DMEM (dulbecco's modified eagle medium) 为 Sigma 公司产品; 小牛血清购自华美生物工程公司; 胎牛血清购自杭州四季青公司; 胰酶购自华美生物工程公司 (进口分装); 雌二醇 (E_2) 由 Sigma 公司提供; 农药标准品分别由上海农药研究所、兴农药业、Sigma 公司提供 (纯度 > 98%)。CO₂ 培养箱 (REVO HABITATTM), 酶标仪 (BIO-TEK, Microplate Autoreader EL309), 25 mm² 培养瓶 (Corning-Costar), 96 孔培养板 (Corning-Costar) TRIZOL Reagent (Invitrogen 公司); RT-PCR 反应试剂盒 (Gibco 公司); 琼脂糖 (上海生工生物工程公司); 六孔板 (Corning-Costar); PCR 扩增仪 (GeneAmp 9600 型, Perkin Elmer 公司), 倒置显微镜 (Nikon 公司)。

1.3 实验溶液的准备

TE 缓冲液: Tris + HCl 10 mmol/L, EDTA 1.5 mmol/L, Na_2MoO_4 3 mmol/L, pH 7.4; 葡聚糖活性炭 (DCC) 悬液: 2.5 g 葡聚糖溶于 100 ml TE 缓冲液, 加入 25 g 活性炭, 振荡过夜, 4 °C 保存; 葡聚糖活性炭处理的胎牛血清 (DCC-FBS): FBS 于 56 °C 30 min 灭活, 取 DCC 悬液高压灭菌后, 3 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 加入等体积 FBS 混匀, 37 °C 1 h 后, 5 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 按如上操作重复一次, 取上清, -20 °C 保存; 雌二醇用乙醇配成 10^{-3} mol/L 储存液, 保存于 -80 °C, 临用前用培养液稀释至相应的浓度, 并保证乙醇浓度 $\leq 0.1\%$ 。

1.4 实验方法

1.4.1 细胞培养条件 MCF-7 乳腺癌细胞培养在不含酚红的 DMEM 培养液中, 内含 15% 小牛血清, 温度 37 °C, 二氧化碳浓度 5 %, 待细胞生长至 80% 融合时, 用 0.25 % 的胰酶 (华美生物公司) 消化, 1:3 传代, 3 d 换培养液一次。

1.4.2 细胞增殖实验 实验参照 Jones^[3] 的方法稍作修改, 以 10^4 个细胞/ml 接种于 96 孔板, 每孔接种 200 μl ^[3]。贴壁培养 24 h, 换含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液, 培养 48 h 后给药。阳性(雌二醇)对照组设 10^{-13} ~ 10^{-8} mol/L 6 个浓度, 有机磷农药组设 10^{-10} ~ 10^{-5} mol/L 6 个浓度, 同时设阴性(溶剂)对照组, 每个浓度设 6 个复孔, 培养 3 d, 同时在雌二醇、农药组和对照组加 10 $\mu\text{mol/L}$ 的雌激素受体拮抗剂 ICI182, 780。3 d 后弃上清, 每孔加四唑盐 (MTT) 25 μl 放置培养箱中, 4 h 后弃孔内液体, 每孔加入 DMSO 150 μl 振荡 10 min, 在 490 nm 波长测定吸光度。

1.4.3 转录活化实验 MCF-7 细胞用 10% 活性炭/葡聚糖处理的胎牛血清的无酚红培养液预培养 3 d, 然后给药。共分 9 组, 每组 4 瓶, 分别是对照组 (无酚红培养液)、 10^{-9} mol/L 雌二醇组、 10^{-9} mol/L 雌二醇 + 10^{-5} mol/L ICI182, 780 组、 10^{-7} mol/L 乐果、 10^{-7} mol/L 乙酰甲胺磷、 10^{-7} mol/L 久效磷、 10^{-7} mol/L 马拉硫磷、 10^{-7} mol/L 对硫磷和 10^{-7} mol/L 对氧磷组。

按 TRIZOL 试剂说明书方法收集细胞 RNA。取 1 μl 稀释 100 倍, 紫外分光光度计 (BIO-RAD Smart-specTM 3000 Spectrophotometer) 测定 RNA 纯度和浓度。

雌激素受体基因的引物序列, Left Primer: 5' ACC ACC CTG AAG TCT CTG GA3', Right Primer: 5' GAT GTG GGA GAG GAT GAG GA3', 扩增产物为 153bp。

pS2 基因的引物序列, Left Primer: 5' GCG GAT CCA CGA ACG CTG TCG TCG AA3', Right Primer:

5' GCG AAG CTT GGC CAC CAT GGA GAA CAA GG3', 扩增产物为 210bp。

人 β -actin 的引物序列为, Left Primer: 5'-GCT CGT CGT CGA CAA CGG CTC-3', Right Primer: 5'-CAA ACA TGA TCT GGG TCA TCT TCT C-3', 扩增产物为 353bp。

用 RT-PCR 反应试剂盒进行逆转录多聚酶反应。设立 25 μl 的反应体系, 各成分终浓度为: 总 RNA 1 μg 、目的基因及 β -actin 上下游引物各 0.5 μl 、dNTP-Mix 12.5 μl 、Taq 酶 0.5 μl 、用去除 RNA 酶的双蒸水补齐到 25 μl 。在同一体系中对雌激素受体基因 (ER 基因) 和 β -actin 进行逆转录和扩增。扩增条件为 50 °C 逆转录 30 min, 94 °C 灭活逆转录酶 2 min, 扩增 35 个循环: 94 °C 变性 30 s, 56 °C 退火 1 min (扩增 pS2 基因 59 °C 退火 1 min), 72 °C 延伸 2 min, 循环结束后终末延伸 10 min。反应结束后取 5 μl 反应液于含 0.5 $\mu\text{g/ml}$ 溴乙啶的 2 % 琼脂糖凝胶中电泳, 电泳结束后在 BIO-RAD 凝胶成像系统 (Gel Doc2000) 上扫描。用 Quantity One-4.01 图像分析软件进行分析, 以 ER 基因和 pS2 基因与 β -肌动蛋白扩增条带亮度平均值的比值作为 ER 基因的表达相对水平。

1.4.4 数据分析 数据以增殖指数 (PI)、相对增殖效率 (RPE) 表示。由 Excel 录入数据, 采用 SPSS 10.0 进行分析, 组间比较采用方差分析, 实验结果以 $\bar{x} \pm 1.96s$ 表示。计算公式:

(1) $PI = OD_t / OD_c$, 式中 PI: 增殖指数, OD_t : 测试物组的吸光值, OD_c : 对照组吸光值。

(2) $RPE = PI_{tmax} / PI_{emax}$, RPE: 相对增殖效率, PI_{tmax} : 测试物所致细胞最大增殖数, PI_{emax} : 雌二醇所致细胞最大增殖指数。

(3) $RPP = CON_e / CON_t$, 其中 RPP: 相对增殖能力, CON_e : 达到最大增殖所需雌二醇的最低浓度, CON_t : 达到最大效应时所需测试物的最低浓度。

2 结果

2.1 6 种有机磷农药对 MCF-7 细胞的增殖效应

阳性对照 (雌二醇) 从浓度 10^{-13} ~ 10^{-8} mol/L 对 MCF-7 人乳腺癌细胞增殖力与对照相比差异均有显著性, 并在 10^{-9} mol/L 组 MCF-7 细胞增殖力最强, 与其他各组相比差异有显著性, 10^{-13} mol/L 雌二醇增殖量为对照的 1.37 倍, 10^{-9} mol/L 雌二醇增殖达最大, 是对照的 3.55 倍, 说明本次实验结果是可靠的。各剂量组加入雌激素受体拮抗剂 ICI182, 780 之后, 雌二醇各组的增殖指数在 0.88 ~ 0.94, 说明

ICI182, 780能有效地完全阻断雌二醇对 MCF-7 细胞的增殖作用。

6 种农药引起 MCF-7 细胞的增殖与对照组相比差异均无显著性, 见图 1。加入雌激素受体拮抗剂 ICI182, 780, 未对 MCF-7 细胞的增殖产生拮抗作用。这 6 种有机磷农药均不能引起 MCF-7 细胞增殖, 因此不再描述测试物的相对增殖效率 (RPE) 和相对增殖能力 (RPP)。

2 2 6 种有机磷农药对 ER 基因和 pS2 基因表达的影响

雌二醇能够使 ER 基因表达下调, 雌二醇 + ICI 组和对照组不能使 ER 基因下调, 得到了预期的结果,

见表 1、图 2。图 3 显示, 与阳性对照一样, 乐果能使 pS2 基因表达上调。

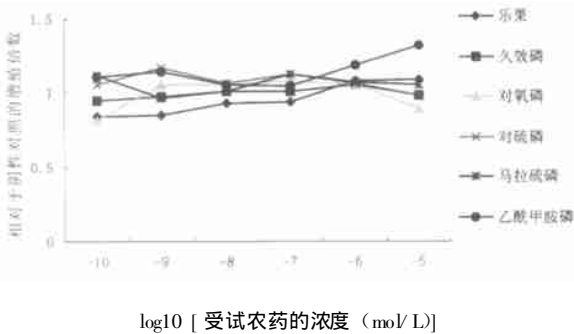
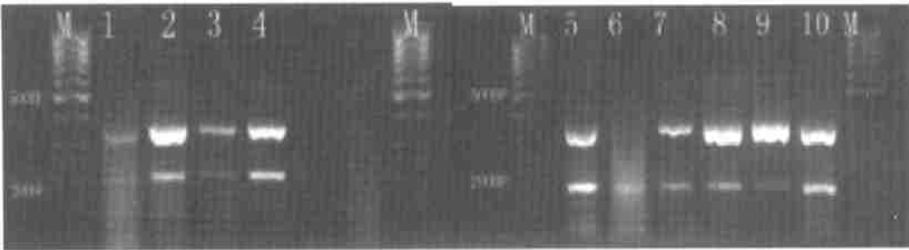
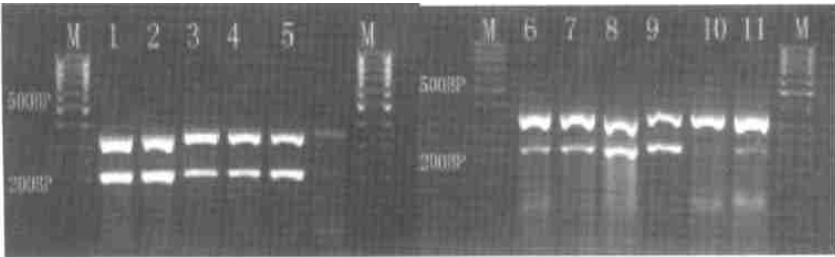


图 1 6 种有机磷农药对 MCF-7 细胞的增殖效应



M-marker, 2—对氧磷, 3—乙酰甲胺磷, 4—马拉硫磷, 5—乐果 7—雌二醇, 8—对硫磷, 9—久效磷, 10—对照
图 2 农药对 ER 基因表达的影响



M-marker, 1—雌二醇, 2—对照, 3—对硫磷, 4—对氧磷, 5—马拉硫磷, 6—乙酰甲胺磷, 7—久效磷, 8—乐果
图 3 农药对 pS2 基因表达的影响

表 1 雌二醇及有机磷农药对 ER 基因和 pS2 基因表达的影响

组别 (mol/L)	n	ER/ β -actin	pS2/ β -actin
雌二醇 (10^{-9})	4	0.727 $\pm$ 0.031 *	1.030 $\pm$ 0.045 *
雌二醇 + ICI (10^{-9} , 10^{-5})	4	0.952 $\pm$ 0.019	0.830 $\pm$ 0.069
阴性对照	4	0.898 $\pm$ 0.045	0.854 $\pm$ 0.020
乐果 (10^{-7})	4	0.872 $\pm$ 0.042	0.991 $\pm$ 0.061 *
久效磷 (10^{-7})	4	0.886 $\pm$ 0.045	0.767 $\pm$ 0.022
对氧磷 (10^{-7})	4	0.985 $\pm$ 0.025	0.853 $\pm$ 0.047
对硫磷 (10^{-7})	4	0.905 $\pm$ 0.079	0.808 $\pm$ 0.176
马拉硫磷 (10^{-7})	4	0.943 $\pm$ 0.049	0.747 $\pm$ 0.048
乙酰甲胺磷 (10^{-7})	4	0.887 $\pm$ 0.031	0.843 $\pm$ 0.042

与阴性对照组比较, * $P < 0.05$

3 讨论

MCF-7 人乳腺癌细胞对外来化学物产生应答, 生成受雌激素调节的特异性蛋白, 通过检测蛋白的含量

可以判断该受试物的拟雌激素样活性^[1,4]。MTT 实验是检测细胞存活和生长状况的常用方法, 分析以上实验结果发现, 雌二醇 (E₂) 能引起 MCF-7 细胞内蛋白增殖, 而 6 种农药不能诱导 MCF-7 细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶的增加。

在以往的报道中, 雌二醇使乳腺癌细胞的增殖指数在 2.7 ~ 6.3, 4-壬基酚、4-辛基酚、烷基酚、E₂、己烯雌酚 (DES) 和他莫西酚等都能引起 MCF-7 细胞的增殖^[3]。报道显示酚红具有雌激素样作用, 所以应用 E-SCREEN 方法评价外来化合物的活性, 要保证在培养体系中不含有雌激素样的物质^[5]。本实验选用无酚红的 DMEM 培养基, 由于培养液中的血清含有不同浓度的激素, 在本实验中用葡聚糖活性炭吸附的方法去除。国外有研究表明, 使用无酚红的 DMEM 培

培养基能使 ER 基因表达上调,从而使 ER 的数目增多,增加实验的敏感性^[6]。ICI182, 780 是一种高效的 ER 拮抗剂, Greenlee AR^[7] 认为其作用原理是 ICI182, 780 与 ER 有很强的结合力, 结合之后改变 ER 的构型, 产生异常转录。另外有学者^[8] 认为它能破坏乳腺癌细胞中的 ER, 能完全阻断通过 ER 介导的细胞增殖。本实验结果表明, 雌二醇能引起 MCF-7 细胞内蛋白增殖完全是通过 ER 介导的。由于 6 种有机磷农药均不能引起 MCF-7 细胞的增殖, 所以我们在细胞增殖实验的基础上进行了转录活化实验。

应用 ER 反应基因 (estrogen responsive gene) 作为检测终点, 不仅实验的灵敏度高, 而且可快速反应细胞或组织受外来化合物刺激后的胞内反应, 有助于对其机制的了解。常用的 ER 反应基因有: ER 基因、*pS2* 基因、孕酮受体反应基因 (progesterone receptor gene)、组织蛋白酶 D 基因 (Cathepsin D)、粘蛋白 (MUC1) 基因、角蛋白 19 基因 (keratin 19)、*efp* 基因等^[9~11]。在本实验中我们选择了 ER 基因和 *pS2* 基因作为农药诱导 MCF-7 人乳腺癌细胞的检测终点。ER 基因的表达受到雌二醇的下调^[3], 有学者认为这是 ER 的负反馈机制, 调节 ER 基因的表达水平, 因而我们可以间接地通过 ER 基因的下调, 判断外来化合物的雌激素样作用^[12]。*pS2* 基因作为检测指标具有以下明显的优势^[13]: (1) *pS2* 基因受到雌二醇的诱导在 2 h 后能很快表达; (2) *pS2*-mRNA 在人类乳腺癌细胞中仅仅受雌二醇的诱导, 不受其他甾体类激素如孕酮、雄激素和糖皮质激素的诱导。*pS2*-mRNA 在正常的乳腺组织中不表达; (3) *pS2* 是低分子质量蛋白, 仅包含 60 个氨基酸, *pS2* 基因已经完成测序, *pS2* 基因位于第 21 染色体上, 包含 3 个外显子和 2 个内含子, 3 个外显子的碱基对分别为 85、153、14; (4) 已知的环境雌激素样化合物如 TCDD 能引起 *pS2*-mRNA 的表达; (5) 在不含雌激素受体的消化道肿瘤、胃癌、胰腺癌细胞中仍然能观察到 *pS2* 基因的表达, 此外, 在缺少雌激素受体的乳腺癌细胞中 *pS2* 基因也可以表达, 在含有雌激素受体的 T47D 细胞株和不含雌激素受体的 HeLa 细胞中, 雌二醇对 *pS2* 基因的诱导不经过雌激素受体。ER 的表达水平不影响 *pS2* 基因的表达, 因此 *pS2*-mRNA 在 MCF-7 细胞中的表达是研究雌激素样物质作用于人类乳腺癌细胞, 引起基因表达的理想模型。

本实验发现, 乐果不能使 ER 受体基因下调, 却能使 *pS2* 基因上调, 可能由于乐果不与 ER 结合, 却

通过旁路激活 *pS2* 基因使之上调, 因为至少有 2 条通路, 即 ER 通路和 EGF/PKC 通路 (Epidermal growth factor/Protein kinase C, 表皮生长因子/蛋白酶 K 通路) 激活 ER 下游基因^[14]。这提示我们, 乐果可能具有雌激素样作用, 并且不通过 ER 对雌激素受体下游基因产生上调。

参考文献:

- [1] Soto AM, Sonnenschein C, Chung KL. The E-SCREEN assay as a tool to identify estrogens: An update on estrogenic environmental pollutants [J]. Environ Health Perspect, 1995, 103 (suppl. 7): 113-122.
- [2] Ankley GT, Johnson RD, Toth LC, et al. Development of a research strategy for assessing the ecological risk of endocrine disruptors [J]. Rev Toxicol, 1997, 1: 71-106.
- [3] Jones PA, Baker VA, Irwin JE, et al. Interpretation of the *in vitro* proliferation response of MCF-7 cells to potential oestrogens and non-estrogenic substances [J]. Toxicology in Vitro, 1998, 12: 373-382.
- [4] Payne J, Jones C, Lakhani S, et al. Improving the reproducibility of the MCF-7 cell proliferation assay for the detection of xenoestrogens [J]. The Science of the Total Environment, 2000, 248: 51-62.
- [5] Berthois Y, Katzenellenbogen JA, Katzenellenbogen BS. Phenol red in tissue culture medium is a weak estrogen: implications concerning the study of estrogen-responsive cells in culture [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA, 1986, 83: 2496-2500.
- [6] Odum J, Tittensor S, Ashby J. Limitations of the MCF-7 cell proliferation assay for detecting xenobiotic estrogens [J]. Toxicology in Vitro, 1998, 12: 273-278.
- [7] Greenlee AR, Quail CA, Berg RL. The antiestrogen ICI 182, 780 abolishes developmental injury for murine embryos exposed *in vitro* to *o,p'*-DDT [J]. Reproductive Toxicology, 2000, 14: 225-234.
- [8] Dauvois S, White R, Parker MG. The antiestrogen ICI 182, 780 disrupts estrogen receptor nucleocytoplasmic shuttling [J]. J Cell Sci, 1993, 106: 1377-1388.
- [9] Diel P. Tissue-specific estrogenic response and molecular mechanisms [J]. Toxicology Letters, 2002, 127: 217-224.
- [10] Jorgensen M, Vendelbo B, Skakkebaek NE, et al. Assaying estrogenicity by quantitating the expression levels of endogenous estrogen-regulated genes [J]. Environ Health Perspect, 2000, 108 (5): 403-412.
- [11] Ace CI, Okulicz WC. Differential gene regulation by estrogen and progesterone in the primate endometrium [J]. Molecular and Cellular Endocrinology, 1995, 115: 95-103.
- [12] Nagel SC, Vom Saal FS, Welshons WV. Developmental effects of estrogenic chemicals are predicted by an *in vitro* assay incorporating modification of cell uptake by serum [J]. Journal of Steroid Biochemistry Biology, 1999, 69: 343-357.
- [13] Ren L, Marquardt MA, Lech JJ. Estrogenic effects of nonylphenol on *pS2*, ER and MUC1 gene expression in human breast cancer cells-MCF-7 [J]. Chemico-Biological Interactions, 1997, 104: 55-64.
- [14] Martinez I, Dickson RB. Dual regulation of the epidermal growth factors in breast cancers by sex steroids and protein kinase [J]. Steroid Biochem Mol Biol, 1996, 57: 1-11.