

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790(2006)24-2239-03

辛基酚对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞周期及周期蛋白表达的影响

彭俊华, 张峰, 张华欣, 张全华, 赵勇, 贺晓倩 (兰州军区兰州总医院检验科, 甘肃兰州 730050)

Effects of octylphenol on cell cycle and cyclin expression of MDA-MB-231 breast cancer cells

PENG Jun-Hua, ZHANG Feng, ZHANG Hua-Xin, ZHANG Quan-Hua, ZHAO Yong, HE Xiao-Qian

Department of Clinical Laboratory, Lanzhou General Hospital, Lanzhou Military Area Command, Lanzhou 730050, China

【Abstract】 AIM: To observe the effects of octylphenol (OP) on cell cycle and cyclin expression of MDA-MB-231 breast cancer cells and to probe the molecular mechanisms of OP inhibiting MDA-MB-231 breast cancer cell proliferation. **METHODS:** The changes of cell proliferation, cell cycle, cyclinD1 mRNA, cyclinD3 mRNA, CDK2 mRNA, CDK4 mRNA and cyclinD1 protein expressions of MDA-MB-231 cells treated with OP were observed by using MTT test, flow cytometry, immunocytochemistry and RT-PCR. **RESULTS:** When MDA-MB-231 breast cancer cells were treated with 4 or 8 $\mu\text{mol/L}$ OP for 48 h, the cell inhibition rates were (17.13 \pm 4.1)%, (40.25 \pm 8.7)%, and the fluorescence values of cyclin D₁ were 55.1 \pm 10.2, 41.4 \pm 11.2, significantly decreased as compared with control group (89.9 \pm 11.2, $P < 0.05$). When MDA-MB-231 breast cancer cells were treated with 8 $\mu\text{mol/L}$ OP for 24 and 72 h, the cell ratios in the G₀/G₁ phase were (67.0 \pm 17.6)% and (44.4 \pm 11.9)%, significantly increased as compared with control group [(46.6 \pm 12.8)% at 24 h, (15.3 \pm 3.1)% at 72 h, $P < 0.05$]. OP inhibited the mRNA expressions of cyclin D₁, cyclin D₃, CDK2 and CDK4 and the protein expression of cyclin D₁. **CONCLUSION:** OP can inhibit the proliferation of MDA-MB-231 breast cancer cells, which may be related to down-regulating the expressions of cyclin D₁, cyclin D₃, CDK2 and CDK4 mRNA and cyclin D₁ protein.

【Keywords】 cell proliferation; breast neoplasms; octylphenol; cyclinD₁; cyclin-dependent kinases

【摘要】 目的: 观察辛基酚(OP)对细胞周期及周期蛋白表达的影响, 探讨 OP 抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖的可能分子机制。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 OP 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖、细胞周期、CDK2、CDK4、cyclin D₁ 和 cyclin D₃ 表达的影响。结果: 4、8 $\mu\text{mol/L}$ OP 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 48h 时, 其抑制率为 (17.1 \pm 4.1)%, (40.3 \pm 8.7)%, cyclin D₁ 表达量荧光值为 55.1 \pm 10.2, 41.4 \pm 11.2, 比对照组 (89.9 \pm 11.2) 明显降低 ($P < 0.05$)。8 $\mu\text{mol/L}$ OP 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 24 h 和 72 h, G₀/G₁ 期细胞为 (67.0 \pm 17.6)% 和 (44.4 \pm 11.9)%, G₀/G₁ 期细胞比对照组 [24 h (46.6 \pm 12.8)%, 72 h (15.3 \pm 3.1)%] 明显增高 ($P < 0.05$)。OP 导致 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 CDK2、CDK4、cyclin D₁ 和 cyclin D₃ mRNA 的表达降低, 且 cyclin D₁ 蛋白的表达也降低。结论: OP 能抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖, 其机制可能与 OP 能降低乳腺癌细胞中 CDK2、CDK4、cyclin D₁ 和 cyclin D₃ mRNA 及其蛋白的表达有关。

【关键词】 细胞增殖; 乳腺癌; 辛基酚; 细胞周期蛋白 D₁; 细胞周期蛋白质依赖激酶类

【中图分类号】 R730.231

【文献标识码】 A

0 引言

辛基酚(octylphenols, OP)是一种环境雌激素, 近年来对它的雌激素活性检测及其生殖毒性效应研究较多^[1]。OP 能促进 ER α ⁺ MCF-7 乳腺癌细胞的增殖, 表现雌激素活性, 却抑制 ER α ⁻ MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖^[2]。细胞增殖与细胞周期密切相关, 本研究将 OP 作用于 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 观察细胞的增殖和 CDK2、CDK4、cyclin D₁、cyclin D₃ 表达的改变, 探讨 OP 影响 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 试剂中 OP 纯度 >98%, sigma 产品。cyclinD1 抗体为兔抗人抗体, 使用浓度为 1:75 倍稀释, FITC 标记羊抗兔抗体, 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 OP。MDA-MB-231 乳腺癌细胞由中科院上海细胞所提供。实验前将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞在无酚红的 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 3 组: 对照组, 给予 DMSO; 4 $\mu\text{mol/L}$ OP 组; 8 $\mu\text{mol/L}$ OP 组。

收稿日期 2006-06-21; 接受日期 2006-09-12

作者简介 彭俊华, 博士, 副主任医师。Tel: (0931)8975629 Email: junhua_p@sohu.com

1.2 方法

1.2.1 MTT 试验 以 492 nm 波长测定活细胞的吸光度(A),抑制率(PR)=(对照组A值-实验组A值)/对照组A值×100%,每次试验设2个平行孔,试验重复3次^[3].

1.2.2 细胞周期相及凋亡检测 实验各组细胞处理24,48和72 h,收获细胞,700 mL/L 冷乙醇固定,RNase 消化,碘化丙啶(PI)染色,流式细胞仪检测,每次试验设2个平行孔,试验重复3次.

1.2.3 cyclin D₁ 表达分析 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,加荧光素标记二抗孵育20 min,甘油封片,Leica-NT 激光共聚焦显微镜观察、照相及数据分析,实验重复2次.计算荧光强度时每组实验取3张片子,每张图片取3-6个视野,每个视野取5个细胞,计算其平均荧光强度.

1.2.4 RT-PCR 检测 CDK2,CDK4,cyclin D₁,cyclin D₃ 的 mRNA 表达 实验各组细胞处理24 h,收获细胞,用 Trizol 试剂一步法提取各组细胞总 RNA,逆转录为 cDNA,置-80℃备用.引物由上海 sangon 合成,CDK2 F 5'-GCT CTC ACT GGC ATT CCT CCT-3',R 5'-CGA AAT GAA GGC ACT AGA GC-3',产物 546 bp;CDK4 F 5'-CTA CCT CTC GAT ATGAGC CAG T-3',R 5'-CAT CTG GTA GCT GTA GAT TCT G-3',产物 563 bp;cyclin D₁ F 5'-GAG GAA CAG AAG TGC GAG GA-3',R 5'-TCT GGA GAG GAA GCG TGT GA-3',产物 501 bp;cyclin D₃ F 5'-TGT CAG GAG CAG ATC GAA GC-3',R 5'-CCT TTA GAA GGC ACT AGA GC-3',产物 453 bp;β-actin:F 5'-AGG GGC CGG ACT CGT CAT ACT-3',R 5'-GGC GGC ACC ACC ATG TAC CCT-3',产物 202 bp. 25 μL 体系加样本总 cDNA,上游和下游引物各 1.5 μL,依次加入试剂盒其他成分.反应条件为 94℃ 灭活 40 s,60℃ 或 61℃ 退火 40 s,72℃ 延伸 40 s,22 个循环,20 g/L 琼脂糖电泳,照相,半定量分析以凝胶成像系统的分析软件 Q1 来分析其灰度值,每实验重复3次,以目的条带/β-actin 之比为结果,各组间进行单因素方差分析.

统计学处理:数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用 SPSS10.0 软件进行单因素方差分析.

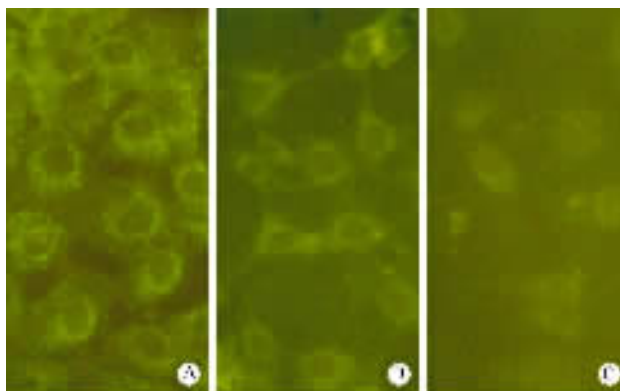
2 结果

2.1 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖 以 4,8 μmol/L OP 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 48 h,细胞抑制率为(17.1±4.1)% (40.3±8.7)%.

2.2 MDA-MB-231 乳腺癌细胞周期相分布 8

μmol/L OP 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 24 h 和 72 h,G0/G1 期细胞分别为(67.0±17.6)%和(44.4±11.9)%,G0/G1 期细胞比对照组[24 h (46.6±12.8)%;72 h (15.3±3.1)%]明显增高(P<0.05).

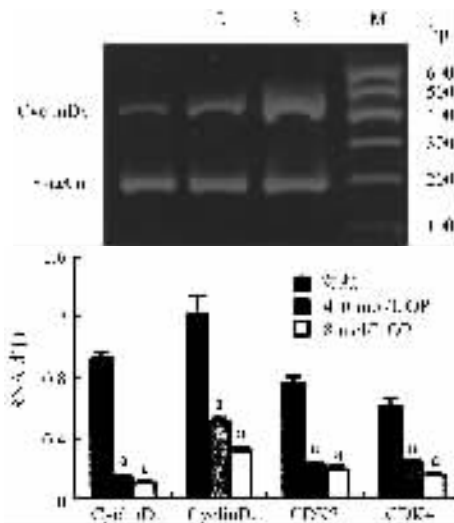
2.3 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 cyclin D₁ 蛋白表达 cyclin D₁ 蛋白主要表达于细胞的胞浆中(图1),4,8 μmol/L OP 组 cyclin D₁ 表达量荧光值分别为 55.1±10.2,41.4±11.2,比对照组(89.9±11.2)明显降低(P<0.05).



A:对照组 B:4 μmol/L OP 组 C:8 μmol/L OP.

图1 OP 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 cyclinD1 表达的影响 SP-FITC ×400

2.4 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 CDK2,CDK4,cyclin D₁,cyclin D₃ mRNA 表达 mRNA 的表达以电泳条带的亮度来判断,亮度值越强,mRNA 量越高,经凝胶成像系统软件处理,与对照组比较,OP 组 CDK2,CDK4,cyclin D₁ 及 cyclin D₃ mRNA 表达均降低(图2).



M:marker;1:8 μmol/L OP;2:4 μmol/L OP;3:对照.*P<0.05 vs 对照. 图2 OP 对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞中 cyclin D₃,cyclin D₁,CDK2,CDK4 mRNA 表达的影响

3 讨论

雌激素是哺乳动物体内分泌的一种性激素,起着调节动物生长、分化和生殖的作用。OP 是一种苯环类化合物,能与 ER α 结合,显示出雌激素活性。OP 主要用于生产非离子表面活性剂、增塑剂、热稳定剂、光稳定剂等,广泛存在于生活、工作环境的水体、淤泥、土壤和食物如鱼类、贝类及饮用水中^[4]。MDA-MB-231 乳腺癌细胞是一株 ER α ⁻ 的细胞, >15 $\mu\text{mol/L}$ OP 对 MCF-7 乳腺癌细胞会产生毒性作用,1 ~ 10 $\mu\text{mol/L}$ OP 会对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞产生毒性效应,抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖^[1]。以植物雌激素三羟异黄酮作用 184-B5/HER 细胞,结果发现活细胞数量减少,呈剂量-效应关系,同时 G0/G1 期细胞增高,细胞凋亡也增多。本研究结果显示 4, 8 $\mu\text{mol/L}$ OP 均能抑制 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖,并呈时间-效应和剂量-效应。

细胞增殖依赖于细胞周期的顺利进行,该过程受 G1/S, G2/M 两个关键点调控。植物雌激素三羟异黄酮能将 MDA-MB-231 乳腺癌细胞阻滞于 G2/M 期,细胞凋亡增加^[5],超二倍体增加。本研究结果显示 OP 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞 24h, G0/G1 期细胞(凋亡峰)明显增加($P < 0.05$)表明 OP 具有急性毒性作用,细胞迅速凋亡。OP 引起 MDA-MB-231 乳腺癌细胞周期阻滞与三羟异黄酮不同,这可能与三羟异黄酮具有多种生物活性有关。

细胞增殖依赖于细胞周期的顺利进行,细胞周期的正常进行又依赖于细胞周期调控蛋白如 cyclinD, cyclinA, cyclinE 等及细胞周期依赖性激酶(CDK)的正常表达。cyclin D -CDK4 是 G0/G1 期的限速步骤,过度表达 G1 期的周期蛋白如 cyclinD, cyclinE 能加速细胞快速通过 G1 期。cyclinD1 蛋白表达与细胞周期运行有关^[6],抑制肿瘤组织生长与 P53 的高表达及 cyclin D₁ 低表达相关^[7]。以 17- β -雌二醇作用雌性 Wistar 大鼠 60 d,发现雌二醇通过减少 CDK2, CDK4

的表达以及降低 CDK2 活性,将细胞阻滞于 G₁/S 期^[8]。本研究结果表明,OP 作用 MDA-MB-231 乳腺癌细胞后,能降低 CDK2, CDK4, cyclin D₁ 及 cyclin D₃ mRNA 的表达,降低 cyclin D₁ 蛋白的表达,抑制乳腺癌细胞的增殖,细胞阻滞于 G₁/S 期,导致 MDA-MB-231 乳腺癌细胞的增殖受抑,并呈剂量-效应和时间-效应。

【参考文献】

- [1] Yoshida M, Takenaka A, Katsuda S, et al. Neonatal exposure to p-tert-octylphenol causes abnormal expression of estrogen receptor alpha and subsequent alteration of cell proliferating activity in the developing Donryu rat uterus [J]. *Toxicol Pathol*, 2002, 30(3): 357 - 364.
- [2] Verma SP, Goldin BR. Effects of soy-derived isoflavonoids on the induced growth of MCF-7 cells by estrogenic environmental chemicals [J]. *Nutr Cancer*, 1998, 30(3): 232 - 239.
- [3] 艾金霞, 刘良, 王冰梅. SBHL 对 HeLa 细胞生长抑制作用的影响 [J]. *第四军医大学学报*, 2004, 25(19): 1791 - 1793.
- [4] 彭俊华, 张峰. 辛基酚对机体健康的影响及其机理的研究进展 [J]. *西北国防医学杂志*, 2004, 25(6): 445 - 446.
- [5] Po LS, Chen ZY, Tsang DS, et al. Baicalein and genistein display differential actions on estrogen receptor (ER) transactivation and apoptosis in MCF-7 cells [J]. *Cancer Lett*, 2002, 187(1-2): 33 - 40.
- [6] 黄安汤, 章翔, 曹云新, 等. cyclin D₁ 在胶质瘤细胞系中表达分布模式初探 [J]. *第四军医大学学报*, 2003, 24(22): 2024 - 2026.
- [7] Umemura S, Takekoshi S, Suzuki Y, et al. Estrogen receptor-negative and human epidermal growth factor receptor 2-negative breast cancer tissue have the highest Ki-67 labeling index and EGFR expression: gene amplification does not contribute to EGFR expression [J]. *Oncol Rep*, 2005, 14(2): 337 - 343.
- [8] Koronenidou L, Ohlson LC, Porsch Hallstrom I. Long-term 17 α -ethinyl estradiol treatment decreases cyclin E and cdk2 expression, reduces cdk2 kinase activity and inhibits S phase entry in regenerating rat liver [J]. *J Hepatol*, 2005, 43(3): 478 - 484.

编辑 吴涛