

镉对 MCF-7 细胞生长和雌激素受体表达影响

徐孝娜¹, 李娅², 季爱玲¹, 刘寒强¹, 张磊¹, 邱雅¹, 侯祥红¹, 王枫¹

摘要:目的 观察镉对 MCF-7 人乳腺癌细胞生长和雌激素受体表达的影响。方法 四甲基偶氮噻唑蓝 (MTT) 法筛选镉促进 MCF-7 细胞增殖的最佳作用时间和剂量, 用流式细胞术观察细胞死亡情况, 划痕实验评价细胞迁移能力, western-blot 检测雌激素受体 α 、雌激素受体 β 蛋白表达, 同时加入雌激素受体阻断剂氟维司群观察细胞增殖和 2 种雌激素受体表达的变化情况。结果 1 $\mu\text{mol/L}$ 镉处理 24 h 和 1 nmol/L 镉处理 72 h 对 MCF-7 细胞的促增殖效应最明显, 增殖率 (PR) 分别为 133%、138%; 1 nmol/L 镉处理 72 h 能明显抑制 MCF-7 细胞死亡, 死亡细胞比例为 28.5%, 低于对照组的 44.5% ($t=4.557, P<0.05$); 增强细胞迁移能力, 划痕伤口愈合率为 25.7%, 与对照组比较差异有统计学意义 ($t=5.696, P<0.05$); 增加雌激素受体 α 蛋白的表达; 雌激素受体阻断剂能够抑制镉对 MCF-7 细胞的促增殖作用和拮抗镉对雌激素受体 α 蛋白表达增加的效应。结论 长时间低剂量处理镉对 MCF-7 乳腺癌细胞生长有促进作用并可能与激活雌激素受体 α 表达有关。

关键词: 镉; 乳腺癌细胞; 雌激素受体

中图分类号: R 155.3⁺3

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)05-0710-04

Effects of cadmium on growth of MCF-7 cells and estrogen receptor expression

XU Xiao-na^{*}, LI Ya, JI Ai-ling, et al (^{*} Department of Nutrition and Food Hygiene, The Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi Province 710032, China)

Abstract: Objective To investigate the effects of cadmium on the growth of MCF-7 breast cancer cells and estrogen receptor expression. **Methods** Methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) assay was used to estimate the best time and dose of cadmium to promote the proliferation of MCF-7 cells. The death of cells was measured via flow cytometry. The ability of cell migration was evaluated with wound healing assay. The protein expression of estrogen receptor was detected by western blot. The changes of cell proliferation and estrogen receptors expression while estrogen receptors were blocked by estrogen receptor antagonist were observed. **Results** The effect of cadmium exposure on MCF-7 cell proliferation promotion was most significant for the cadmium treatment of 1 $\mu\text{mol/L}$ for 24 hours and 1 nmol/L for 72 hours, with the proliferation rate of 133.0% and 138.0%. Cadmium exposure of 1 nmol/L for 72 hours could significantly inhibit the death of MCF-7 cells, with a lower proportion of dead cell (28.5%) compared to that of the control group (44.5%) ($t=4.557, P<0.05$); the cell migration ability was enhanced; the scratch wound healing rate was 25.7%, with a significant difference compared with that of the control group; the estrogen receptor α protein expression was increased. The estrogen receptor antagonist could suppress the effect of cadmium treatment on proliferation of MCF-7 cells and antagonize the increase of estrogen receptor α protein expression. **Conclusion** Long-time low-dose cadmium treatment can promote the proliferation of MCF-7 breast cancer cells and the effect maybe relate to the activation of estrogen receptor α .

Key words: cadmium; breast cancer cell; estrogen receptor

镉是危及人类健康的有毒重金属, 由环境污染影响农产品质量安全, 并通过食物链传输威胁人体健康。国内外流行病学研究显示, 镉暴露与妇女乳腺癌的患病风险增加有关, 镉与乳腺癌发生和发展的关系日益受到人们的关注^[1-4]。近年来关于镉对乳腺癌细胞生长的影响及其机制研究已有报道, 但是结果不尽相同^[5-6]。镉的半衰期长达几十年, 不同作用剂量和时间对肿瘤细胞生长的影响有差异^[7-8], 尤其是长时间低剂量作用下的影响更应引起关注。本实验于 2012 年以雌激素受体 (estrogen

receptor, ER) 阳性人乳腺癌细胞 MCF-7 为研究对象, 通过体外实验研究镉对 MCF-7 细胞生长的影响, 并进一步研究镉对 ER 表达的影响及镉影响乳腺癌细胞生长的机制, 为乳腺癌发生、发展的原因提供体外证据。

1 材料与方法

1.1 试剂 高纯镉 (天津化学试剂三厂); 达尔伯克改良伊格尔培养基 (Dulbecco's modified eagle's medium, DMEM) (美国 Hyclone 公司); 无酚红 DMEM 培养基 (美国 Hyclone 公司); 新生胎牛血清 (杭州四季青公司); 人乳腺癌细胞系 MCF-7 (第四军医大学生物化学与分子生物学教研室馈赠); 17β -雌二醇 (estradiol, E_2) (美国 Cayman 公司); ICI

作者单位: 1. 第四军医大学营养与食品卫生学教研室, 陕西 西安 710032; 2. 第四军医大学航空航天卫生与卫生勤务学教研室

作者简介: 徐孝娜 (1983-), 女, 陕西西安人, 实验师, 本科, 研究方向: 营养与食品卫生。

通讯作者: 王枫, E-mail: wfeng@fmmu.edu.cn

182,780(Fulvestrant, ICI)(美国 Sigma 公司);ER α 兔抗人单克隆抗体(美国 Epitomics 公司);ER β 兔抗人单克隆抗体(美国 Epitomics 公司); β -actin(北京康为公司);辣根过氧化物酶标记山羊抗兔抗体(北京康为公司);二喹啉甲酸(bicinchoninic acid, BCA)蛋白定量试剂盒(天津原平皓公司)。

1.2 仪器 二氧化碳孵箱(Forma 371,美国 Thermo 公司);倒置相差显微镜(CKX41,日本 OLYMPUS 公司);低温高速离心机(5424R,德国 Eppendorf 公司);流式细胞仪(BD FACSAria,美国 Becton Dickinson 公司);化学发光成像系统(ChemiDoc-It 410,美国 UVP 公司);酶标仪(Lab systems MK3,美国 Thermo 公司);蛋白电泳仪(Mini-p3,美国 Bio-rad 公司)。

1.3 细胞培养 含 10% 胎牛血清和 20 U/100 mL 胰岛素的 DMEM 高糖培养基常规培养人乳腺癌细胞系 MCF-7,为了排除细胞内源雌激素对细胞生长的影响,所有试验加入处理因素的前 1 周换用含 10% 去激素胎牛血清(经过活性炭和葡聚糖处理)的无酚红 DMEM 高糖培养基培养细胞。培养条件为:5% CO₂、37 °C、饱和湿度。

1.4 四甲基偶氮噻唑蓝(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)细胞增殖实验 以 1.0×10^3 /孔的密度接种 MCF-7 细胞于 96 孔板,铺设 10^{-5} 、 10^{-6} 、 10^{-7} 、 10^{-8} 、 10^{-9} 、 10^{-10} 、 10^{-11} 、 10^{-12} mol/L 8 个浓度,对照组为不含镉的培养液,同时以能明显促进细胞增殖的 E₂(1 nmol/L)为阳性对照,每组设 6 个复孔。分别于 24、48、72、96 h 后加入 MTT 溶液 20 μ L/孔,继续孵育 4 h 后终止培养,吸弃培养液,每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜(dimethyl sulfoxide, DMSO),低速震荡 10 min,酶联免疫法 490 nm 波长检测吸光度(A)值。计算平均 A 值和增殖率(proliferation rate, PR)。PR = (实验组 A 值/对照组 A 值) \times 100%。

1.5 流式细胞术检测细胞死亡 以 1.0×10^5 /皿的密度接种于细胞培养皿。实验组分为 1 μ mol/L 镉处理 24 h、1 nmol/L 镉处理 72 h,阳性对照为 1 nmol/L E₂ 处理 72 h,阴性对照组加入等体积完全培养液。培养结束后收集细胞,用磷酸盐缓冲液洗涤 2 次后加入 binding buffer 和 FITC 标记的钙依赖性磷脂结合蛋白 annexin V(annexin V-FITC),避光染色 30 min,再加入碘化丙啶(propidium iodide, PI)避光 5 min,进行流式细胞仪检测。

1.6 划痕实验测定细胞迁移能力 以 1.0×10^5 /孔的密度接种细胞于六孔板,用无菌中枪头在培养板底部划一直线,加入含处理因素的无血清培养液继

续培养,实验组分为 1 μ mol/L 镉处理 24 h、1 nmol/L 镉处理 72 h,阴性对照组加入等体积无血清培养液。用伤口愈合率评价细胞的迁移能力:伤口愈合率(%) = 处理后伤口愈合面积/处理前伤口面积 \times 100%。

1.7 Western blot 检测 ER α 、ER β 表达 MCF-7 细胞分别经过 1 μ mol/L 镉处理 24 h、1 nmol/L 镉处理 72 h、1 nmol/L E₂ 处理 72 h 后,western blot 法检测 ER α 、ER β 蛋白表达,化学发光成像仪获取图像,进行灰度分析。

1.8 雌激素受体拮抗实验 ICI 是一种雌激素受体拮抗剂,能够与 ER 结合促进受体降解。ICI(0.1 μ mol/L)与处理因素同时加入到培养液中进行细胞培养,进行 MTT 实验观察细胞增殖的变化和 Western blot 实验检测 ER α 、ER β 表达的变化。

1.9 统计分析 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,用 SPSS 18.0 软件进行单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 镉对 MCF-7 细胞的增殖效应(表 1) 与对照组比较, $10^{-7} \sim 10^{-12}$ mol/L 镉在实验的 4 个处理时间均能促进细胞明显增殖, 10^{-6} mol/L 镉在作用 24、48、72 h 能够促进细胞明显增殖,而 10^{-5} mol/L 镉只有在处理 24 h 能够促进细胞明显增殖。观察各组 PR 发现,镉在 10^{-6} mol/L(1 μ mol/L)处理 24 h 以及 10^{-9} mol/L(1 nmol/L)处理 72 h 促进细胞增殖效果最明显,前者属于短时高剂量处理方式,后者是长时低剂量处理,这 2 种方式作为典型处理条件,后续试验选用这 2 种处理条件进行。

2.2 镉对细胞死亡情况的影响 流式细胞术检测细胞死亡情况,BD FACSDiva 软件分析显示,对照组死亡细胞比例为 44.5%,与对照组比较,1 μ mol/L 镉处理 24 h 对细胞死亡无明显影响(死亡细胞比例为 43.5%),而 1 nmol/L 镉处理 72 h 能明显抑制 MCF-7 细胞死亡(死亡细胞比例为 28.5%),差异有统计学意义($t = 4.557, P < 0.05$)。

2.3 镉对细胞迁移能力的影响 1 nmol/L 镉处理的 MCF-7 细胞划痕损伤 72 h 之后,划痕伤口愈合率为 25.7%,高于对照组伤口愈合率的 15.3%,差异有统计学意义($t = 5.696, P < 0.05$);1 μ mol/L 镉处理的 MCF-7 细胞划痕损伤 24 和 72 h 划痕伤口愈合率无明显变化。提示 1 nmol/L 镉处理 72 h 能使 MCF-7 细胞迁移能力明显增强,而 1 μ mol/L 镉处理 72 h 之内对 MCF-7 细胞迁移能力无影响。

表 1 不同浓度镉对 MCF-7 细胞增殖影响 (n=6)

组别 (mol/L)	24 h		48 h		72 h		96 h	
	吸光度 (A)	PR (%)	吸光度 (A)	PR (%)	吸光度 (A)	PR (%)	吸光度 (A)	PR (%)
对照组	0.30 ± 0.01		0.40 ± 0.01		0.47 ± 0.04		0.60 ± 0.02	
E ₂ 组 10 ⁻⁹	0.39 ± 0.01 ^a	130	0.52 ± 0.00 ^a	130	0.64 ± 0.02 ^a	136	0.79 ± 0.02 ^a	132
镉组 10 ⁻⁵	0.33 ± 0.03 ^a	110	0.42 ± 0.03	105	0.48 ± 0.03	102	0.59 ± 0.01	98
10 ⁻⁶	0.40 ± 0.02 ^a	133	0.46 ± 0.01 ^a	115	0.53 ± 0.02 ^a	113	0.62 ± 0.03	103
10 ⁻⁷	0.37 ± 0.01 ^a	123	0.46 ± 0.03 ^a	115	0.55 ± 0.05 ^a	117	0.65 ± 0.02 ^a	108
10 ⁻⁸	0.34 ± 0.03 ^a	113	0.43 ± 0.02 ^a	108	0.58 ± 0.02 ^a	123	0.62 ± 0.04 ^a	103
10 ⁻⁹	0.33 ± 0.03 ^a	110	0.50 ± 0.03 ^a	125	0.65 ± 0.03 ^a	138	0.72 ± 0.02 ^a	120
10 ⁻¹⁰	0.33 ± 0.04 ^a	110	0.47 ± 0.01 ^a	118	0.59 ± 0.01 ^a	126	0.70 ± 0.04 ^a	117
10 ⁻¹¹	0.31 ± 0.03 ^a	103	0.49 ± 0.02 ^a	123	0.53 ± 0.03 ^a	113	0.69 ± 0.03 ^a	115
10 ⁻¹²	0.31 ± 0.00 ^a	103	0.48 ± 0.01 ^a	120	0.58 ± 0.04 ^a	123	0.70 ± 0.05 ^a	117

注:与对照组比较, a P < 0.05。

2.4 ICI 对镉增殖效应的拮抗作用 (表 2) ICI 是一种 ER 拮抗剂,能够拮抗 E₂ 对 MCF-7 细胞的增殖作用。MTT 实验结果表明,与 E₂ 相似,镉对 MCF-7 细胞的增殖作用同样能被 ICI 阻断。由于 E₂ 对 MCF-7 细胞的增殖作用与 ER 激活有关,推测镉的促增殖作用可能和 E₂ 相同也与 ER 激活有关,因此后续试验验证镉是否引起 ER 蛋白表达的变化。

表 2 ICI 拮抗镉对 MCF-7 细胞增殖效应 (n=6)

组别	吸光度 (A)		
	24 h	48 h	72 h
对照组	0.30 ± 0.01	0.40 ± 0.01	0.47 ± 0.04
ICI 组	0.21 ± 0.01	0.29 ± 0.03	0.33 ± 0.02
镉 (1 μmol/L) 组	0.40 ± 0.03	0.46 ± 0.03	0.53 ± 0.04
镉 (1 μmol/L) 组 + ICI 组	0.23 ± 0.02	0.35 ± 0.03	0.39 ± 0.02
镉 (1 nmol/L) 组	0.33 ± 0.03	0.50 ± 0.04	0.65 ± 0.04
镉 (1 nmol/L) 组 + ICI 组	0.21 ± 0.03	0.35 ± 0.01	0.42 ± 0.03
E ₂ (1 nmol/L) 组	0.42 ± 0.03	0.55 ± 0.04	0.70 ± 0.05
E ₂ (1 nmol/L) 组 + ICI 组	0.29 ± 0.00	0.37 ± 0.02	0.44 ± 0.02

2.5 镉对 MCF-7 细胞 ERα、ERβ 蛋白表达影响及 ICI 的拮抗作用 (图 1、表 3) Western-blot 实验结果条带见图 1,灰度扫描结果显示见表 3。与 E₂ 相似,1 nmol/L 镉处理 72 h 后,MCF-7 细胞 ERα 表达明显升高,并且该效应能够被 ICI 阻断。1 μmol/L 镉处理 24 h ERα 表达无明显变化。而 1 μmol/L 镉处理 24 h、1 nmol/L 镉处理 72 h 和 E₂ 处理后,与对照组比较 ERβ 表达均无明显差异。提示镉对 MCF-7 细胞的增殖作用可能与 E₂ 相似,均与激活 ERα 表达有关。

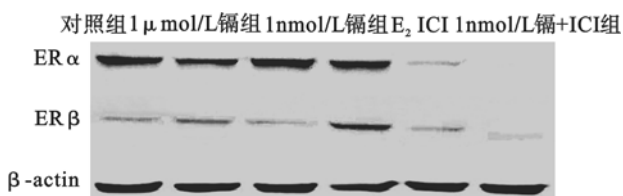


图 1 Western-blot 法检测 ERα、ERβ 蛋白的表达

表 3 ERα、ERβ 与 β-actin 条带灰度比值

组别	ERα/β-actin	ERβ/β-actin
对照组	0.35 ± 0.04	0.14 ± 0.02
镉 (1 μmol/L) 组	0.29 ± 0.02	0.15 ± 0.02
镉 (1 nmol/L) 组	0.53 ± 0.03 ^a	0.12 ± 0.01
E ₂ (1 nmol/L) 组	0.60 ± 0.05 ^a	0.18 ± 0.03
ICI 组	0.07 ± 0.01	0.05 ± 0.01
镉 (1 nmol/L) 组 + ICI 组	0.05 ± 0.00	0.03 ± 0.00

注:与对照组比较, a P < 0.05。

3 讨论

环境污染物引起的健康危害日益受到关注,尤其是环境和职业中慢性低剂量接触重金属镉引起机体的不良反应更值得深入探讨。本研究结果显示,长时间低剂量处理镉能够促进 MCF-7 细胞增殖、抑制死亡、增强细胞迁移能力。镉与 E₂ 对细胞增殖的机制类似,可能是通过 ERα 介导而产生。

多项研究表明镉能够促进大鼠乳腺和子宫生长,并且与乳腺癌的发展有关。因此,关于镉是否作为金属雌激素从而对内分泌进行干扰的讨论也逐渐增多。乳腺癌分为 ERs 阳性和阴性,取决于 ERα 的存在与否^[6]。ERα 和 ERβ 是 ER 的 2 种主要类型,但是 2 种类型在乳腺癌中的作用不同。ERα 是乳腺生长的重要调节剂,也是乳腺癌发展的关键预后标志物。ERα 主要是基因转录的激动剂,而 ERβ 主要是基因转录的抑制剂。对于 MCF-7 细胞,ERα 有促细胞增殖的作用,而 ERβ 能够对抗这种作用,抑制肿瘤细胞增殖,诱导肿瘤细胞凋亡。镉对肿瘤细胞作用的文献报道较多,但本实验着重于低剂量长时间处理镉对乳腺癌细胞的影响,结果显示该处理方式对细胞的作用与相对高剂量短时处理产生的效应不一致,低剂量长时间处理镉能够激活 ERα 表达,为镉作为金属雌激素提供了证据,进一步的研究需要从 ER 下

游通路入手探讨镉发挥雌激素样作用的机制。

近年来镉污染事件频发,重金属比较稳定,不易被降解,镉的半衰期长达几十年,长期低剂量暴露引起的生物学效应亦会对人体健康造成危害,在外似非常安全的剂量下可能依然发挥其毒性作用。乳腺癌是一种女性常见的恶性肿瘤,乳腺癌的病因学中提示,环境中模仿雌激素效应的物质暴露可能是该病的潜在致病原因。关于环境中的化学雌激素(如双酚 A、邻苯二甲酸酯类等)以及饮食中的植物雌激素(大豆异黄酮等)所产生雌激素效应方面的研究已经很多,但是不容忽视的是环境中具有内分泌干扰效应的金属雌激素也与日常生活息息相关,目前关于这方面的研究还未深入,今后需进一步探讨其机制,为雌激素依赖疾病的发生和发展提供部分理论依据。

参考文献

[1] Byrne C, Divekar SD, Storch GB, et al. Cadmium-a metallohor-

mone? [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2009, 238: 266 - 271.

- [2] Akesson A, Julin B, Wolk A. Long-term dietary cadmium intake and postmenopausal endometrial cancer incidence: a population-based prospective cohort study [J]. Cancer Res, 2008, 68: 6435 - 6441.
- [3] Satarug S, Garrett SH, Sens MA, et al. Cadmium, environmental exposure, and health outcomes [J]. Environ Health Perspect, 2010, 118: 182 - 190.
- [4] 刘安平, 彭良斌, 吴瑞肖, 等. 环境镉污染健康损害分级判定标准研究 [J]. 中国公共卫生, 2011, 27(6): 791 - 792.
- [5] Slebos RJ, Li M, Evjen AN, et al. Mutagenic effect of cadmium on tetranucleotide repeats in human cells [J]. Mutat Res, 2006, 602(1-2): 92 - 99.
- [6] Zang Y, Odwin-DaCosta S, Yager JD. Effects of cadmium on estrogen receptor mediated signaling and estrogen induced DNA synthesis in T47D human breast cancer cells [J]. Toxicol Lett, 2009, 184(2): 134 - 138.
- [7] Aimola P, Carmignani M, Volpe AR, et al. Cadmium induces p53-dependent apoptosis in human prostate epithelial cells [J]. Plos One, 2012, 7(3): e33647.
- [8] 刘瑾, 吴婷婷, 沈晓华, 等. 低剂量接触镉对未成年大鼠卵巢发育影响 [J]. 中国公共卫生, 2012, 28(9): 1218 - 1219.

收稿日期: 2012-12-11

(郑新编辑 刘铁校对)

· 实验研究 ·

甲基汞污染大米对大鼠机体氧化损伤及神经毒性作用

陈富强, 杨君微, 李平, 李百祥

关键词: 大米; 甲基汞; 神经毒性; 氧化损伤

中图分类号: R 994. 6

文献标志码: A

文章编号: 1001-0580(2013)05-0713-03

贵州是中国最主要的汞产地,境内分布着大量的汞矿床,著名的矿床有万山、务川、铜仁等。汞资源长期开发,造成了矿区和周围环境大气、水体、土壤的严重汞污染^[1-2]。最近的研究表明,贵州汞矿区大米有很强的甲基汞积累能力^[3],且大米甲基汞含量明显高出玉米及蔬菜类作物^[3]。李平等^[4]以贵州万山、铜仁、务川汞矿区的居民为对象,对其食用的大米、蔬菜、猪肉及饮水进行总汞和甲基汞含量调查,同时进行头发总汞和甲基汞含量测定,发现食用大米是贵州汞矿区居民甲基汞摄入主要途径;贵州汞矿区居民存在通过食用大米甲基汞暴露的潜在风险。本研究利用甲基汞污染大米对大鼠进行 90 d 饲养试验,研究甲基汞污染大米对大鼠的机体氧化损伤及神经毒性。

作者单位: 哈尔滨医科大学卫生毒理学教研室,黑龙江 哈尔滨 150081

作者简介: 陈富强(1986-),男,山东泰安人,硕士在读,研究方向: 卫生毒理学。

通讯作者: 李百祥, E-mail: libaixiangmu@yahoo.com.cn

1 材料与方 法

1.1 实验动物 清洁级 SD 大鼠 60 只,雌雄各半,体重(70 ± 5)g, (北京维通利华实验动物技术有限公司),许可证号: SCXK(京)2006-0004。

1.2 主要仪器与试剂 80-2 型离心机沉淀机(江苏金坛市中大仪器厂); HWS24 型电热恒温水浴锅(上海一恒科技有限公司); UV-8500 分光光度计(上海元析仪器有限公司)。考马斯亮蓝、还原性谷胱甘肽(reduced glutathione, GSH)、谷胱甘肽过氧化物酶(gutathione peroxidase, GSH-Px)、乙酰胆碱(actylcholine, AChE)及乙酰胆碱酯酶(acetylcholinesterase, Ach)测试盒(南京建成生物工程研究所);氯化甲基汞(中国科学院地球化学研究所提供)。

1.3 方 法

1.3.1 实验动物暴露及处理 实验动物自由摄食饮水,光暗比 12/12 h, (24 ± 1) °C 条件下饲养 10 d 后开始暴露。60 只大鼠随机分为对照组、低剂量