

p,p'-DDD 对人乳腺癌细胞的增殖作用

董力, 张明, 汤宁

摘要: [目的] 观察对,对-二氯二苯基二氯乙烷(p,p'-DDD)对人乳腺癌(MCF-7)细胞增殖的影响。[方法] 采用体外培养 MCF-7 细胞增殖试验检测 DDD 的类雌激素活性,并用生长曲线对其作用机制进行初步探讨。[结果] DDD 染毒剂量在 3×10^{-7} mol/L、 3×10^{-6} mol/L 时,存在刺激 MCF-7 细胞增殖的类雌激素活性($P < 0.05$),在 3×10^{-6} mol/L 剂量时其增殖效应最大。细胞生长曲线方面,DDD 组在第 3、5、7 天各时间段细胞数均明显高于溶剂对照组($P < 0.05$)。[结论] DDD 在 3×10^{-7} mol/L、 3×10^{-6} mol/L 具有刺激 MCF-7 细胞增殖的类雌激素活性。

关键词: 雌激素;对,对-二氯二苯基二氯乙烷;细胞增殖试验

Study of the Proliferation Effect of DDD on Mammary Cancer Cell MCF-7 DONG Li, ZHANG Ming, TANG Ning (Institute for Environmental Health and Related Product Safety, Chinese Center for Disease Control and Prevention, Beijing 100021, China)

Abstract: [Objective] To study the proliferation effect of p,p'-DDD on human mammary cancer cell MCF-7. [Methods] We detected estrogenic activity of DDD using the MCF-7 cell proliferation experiment in vitro, and analysed its mechanism by means of growth curve. [Results] DDD in the dose of 3×10^{-7} mol/L and 3×10^{-6} mol/L could stimulate the MCF-7 cell proliferation and produce estrogenic activity, and the most proliferation effect dose was 3×10^{-6} mol/L. Cell cycle analysis of cell proliferation index indicated that DDD group was significantly higher than the control group at the third, fifth, and seventh day. [Conclusion] DDD in the dose of 3×10^{-7} mol/L and 3×10^{-6} mol/L could stimulate the MCF-7 cell multiplication.

Key Words: estrogen; p,p'-DDD; cell proliferation

2,2-双(对氯苯基)-1,1,1-三氯乙烷(DDT),是一类持久性污染物,它的持久性和生物蓄积性决定了其对人类健康及生态环境的危害均极大^[1]。研究发现,DDT类农药具有雌激素样作用^[2,3]。作为DDT的同系物之一,对,对-二氯二苯基二氯乙烷(DDD)的雌激素效应研究尚少有报道。本研究拟就DDD对人乳腺癌(MCF-7)细胞的类雌激素样活性进行初步探讨。

1 材料与方

1.1 MCF-7 细胞

MCF-7 细胞株购自北京协和医院细胞中心。

1.2 试剂及仪器

17 β -雌二醇(17 β -Estradiol, E₂, ALFA AESAR 公司,美国);DDD(国家标准物质研究中心,北京);胎牛血清(兰州民海生物);去激素胎牛血清(BIOCHROM AG 公司,德国);含酚红及不含酚红 DMEM 培养液(HYCLONE 公司,美国);噻唑蓝(MTT, BIOMOL 公司)。

1.3 主要仪器

美国 COSTOR 24 孔细胞培养板;德国 HERAEUS CO₂ 孵

箱;SW-CJ-2F(A)双人单面净化工作台(上海华岩仪器设备有限公司);美国 BIO-RAD MODEL 550 型酶标仪;XDS-1 实验室倒置显微镜(北京瑞邦兴业科技有限公司)等。

1.4 方法

1.4.1 MCF-7 细胞培养 MCF-7 细胞在含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养基中(含 100 U 青霉素/mL、100 U 链霉素/mL),37℃、5% CO₂、相对湿度 100% 条件下培养。用含 0.25% 胰酶、0.02% 乙二胺四乙酸(EDTA)的消化液消化传代。

1.4.2 MCF-7 细胞增殖试验 将常规培养 MCF-7 细胞转入去激素培养基(含 5% 去激素胎牛血清的无酚红 DMEM 培养液、100 U 青霉素/mL、100 U 链霉素/mL)中培养 1 周。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 去激素培养基,分别加入 DDD 3×10^{-9} 、 3×10^{-8} 、 3×10^{-7} 、 3×10^{-6} 、 3×10^{-5} 、 3×10^{-4} mol/L 剂量。以无水乙醇(1%)为溶剂对照,E₂(10^{-9} mol/L)为阳性对照。各组均设 4 个平行样,在 37℃、5% CO₂、100% 湿度下培养 5 d。

1.4.3 MTT 测试 将培养后的培养板每孔中加入 200 μ L MTT 溶液,在培养箱中继续培养 4 h,培养条件同上。加入 1 000 μ L 二甲基亚砜(DMSO)溶液,在室温下振荡 600 s,振荡强度 2 级。用 DMSO 溶液终止反应溶解沉淀,得到的光密度与细胞增殖量呈正比,这样可定量反映细胞的增殖。以 DMSO 溶液调零,用酶联免疫检测仪以 490 nm 波长测定各孔光密度值(D),计算平均 D 值和增殖率(Proliferation rate, PR)。PR = ($D_{\text{实验组}} / D_{\text{溶剂对照组}}$) $\times$ 100%。相对增殖效应(Relative proliferation effect, RPE) = [(试

[基金项目] 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所青年基金

[作者简介] 董力(1968-),女,硕士,副研究员;研究方向:分子生物及环境毒理学研究;E-mail: lizi1214@sina.com

[作者单位] 中国疾病预防控制中心环境与健康相关产品安全所毒理室,北京 100021

验组增殖效应-1)/(阳性对照组增殖效应-1)]×100%。

1.4.4 DDD 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, DDD 剂量为 3×10^{-6} mol/L, 10^{-9} mol/L E₂ 为阳性对照, 溶剂对照为 0.1% 无水乙醇。培养至第 1、3、5、7 天, 分别用细胞计数板计数并测其相应 D 值, 绘出各组 MCF-7 细胞生长曲线。

1.5 统计学分析

用 SPSS 11.0 统计软件对结果进行分析, 组间均数的比较采用单因素方差分析和 t 检验。

2 结果

2.1 DDD 对 MCF-7 细胞增殖能力的影响(表 1)

在去激素培养基培养中, DDD 在 $3 \times 10^{-7} \sim 3 \times 10^{-6}$ mol/L 可诱导 MCF-7 细胞明显增殖, 与溶剂对照组比较, 其光密度值明显增高 ($P < 0.05$)。在 3×10^{-6} mol/L 可诱导 MCF-7 细胞增殖最大, 其相对增殖效应 (RPE) 为 21.86%。

表 1 DDD 对 MCF-7 细胞增殖的作用 (n=4)

Table 1 Effect of DDD on the proliferation of MCF-7 cells (n=4)

组别 Group	光密度值 (D) Absorbance ($\bar{x} \pm s$)	增殖率 (%) Proliferation rate (PE)	相对增殖效应 (%) Relative proliferation effect (RPE)
溶剂对照	0.235 ± 0.050	100.00	—
3×10^{-9}	0.252 ± 0.033	108.46	7.91
3×10^{-8}	0.255 ± 0.033	109.95	9.30
3×10^{-7}	0.273 ± 0.037*	118.91	17.68
3×10^{-6}	0.282 ± 0.040*	123.38	21.86
3×10^{-5}	0.238 ± 0.036	101.49	1.39
3×10^{-4}	0.202 ± 0.044	83.58	—
阳性对照	0.450 ± 0.045	206.97	100.00

[注]*: 与溶剂对照组比较 (Compared with control), $P < 0.05$ 。

2.2 DDD 对 MCF-7 细胞生长曲线的影响(图 1)

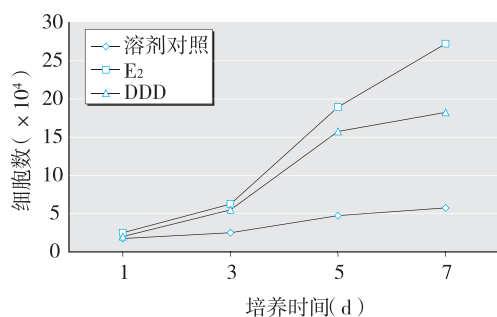


图 1 E₂, DDD 对 MCF-7 生长曲线的影响

Figure 1 Effect of E₂ and DDD on the growth curve of MCF-7

DDD 在 3×10^{-6} mol/L 刺激 MCF-7 细胞增殖的生长曲线与 10^{-9} mol/L E₂ 相似。与溶剂对照组相比, 从第 3 天开始曲线明显上移。第 3、5、7 天各时间段细胞数均明显高于溶剂对照组 ($P < 0.05$)。

3 讨论

国外有关研究发现, DDT 具有神经毒性、肝脏毒性、影响内分泌功能、生殖发育毒性和致癌性。近年来一些研究认为 DDT 及其化合物 DDD 和 DDE 具有雌激素样作用, 可对生物体的内分泌和生殖功能产生干扰作用, 可导致女性患乳腺癌、子宫癌等生殖器官的恶性肿瘤, 子宫内膜疾病危险增加, 并且可以对生物体的生殖结局产生影响^[4-6]。

根据本次的 MCF-7 细胞增殖试验显示, DDD 有明显刺激 MCF-7 细胞增殖的类雌激素活性。在 3×10^{-6} mol/L 增殖效应最大, 其 RPE 为 21.86%。根据 DDD 的剂量效应关系, 可分为 2 段: 上升期 ($3 \times 10^{-9} \sim 3 \times 10^{-6}$ mol/L) 增殖作用随浓度的升高呈线性关系 ($R = 0.969$, $P < 0.05$)。下降期 ($3 \times 10^{-6} \sim 3 \times 10^{-4}$ mol/L) 增殖作用随浓度的增加而下降。生长曲线分析也显示 DDD 组生长曲线随着时间的延长明显上移, 第 3、5、7 天各时间段细胞数均明显高于溶剂对照组 ($P < 0.05$)。这些研究提示 DDD 在细胞增殖试验中表现出促进细胞增殖作用, 提示可能有类雌激素样作用, 但要了解确切机制, 确证其为一种内分泌干扰物尚需要更多的研究证据。

参考文献:

- [1] SHARPE S, MACKAY D. A framework for evaluating bioaccumulation in food webs[J]. Environ Sci Technol, 2000, 34(12): 2373-2379.
- [2] 赵炳顺, 邹继超, 储少岗, 等. 小鼠子宫增重法检测国产三氯杀螨醇的雌激素生物活性[J]. 环境科学学报, 2000, 20(2): 244-247.
- [3] 刘国红, 杨克敌, 刘西平, 等. 人体内有有机氯农药残留对生殖内分泌的影响研究[J]. 卫生研究, 2005, 34(5): 524-528.
- [4] 联合国环境规划署. 环境卫生基准(9) DDT 及其衍生物[M]. 北京: 中国环境科学出版社, 1987: 1-151.
- [5] TURUSOV V, RAKITSKY V, TOMATIS L. Dichloro diphenyl 12 trichloroethane (DDT): ubiquity, persistence, and risks[J]. Environ Health Perspect, 2002, 110(2): 125-128.
- [6] 李延红, 郭常义, 汪国权, 等. 上海地区人乳中六六六、滴滴涕蓄积水平的动态研究[J]. 环境与职业医学, 2003, 20(3): 181-185.

(收稿日期: 2008-11-24)

(编辑: 洪琪; 校对: 吴德才)