



·论 著·

雌二醇对腺样囊性癌细胞的增殖作用

董纪军¹ 通讯作者:秦洁²

1.沈阳军区总医院口腔科 100840; 2.沈阳军区总医院耳鼻喉科 100840

摘要:目的 探讨17-β雌二醇(E2)对人腺样囊性癌细胞Sacc83增殖的影响。方法 采用MTT法研究不同浓度的E2对人腺样囊性癌细胞体外增殖的影响,细胞计数法描绘细胞生长曲线,细胞计数法测定细胞分裂指数,软琼脂克隆形成实验检测细胞克隆形成率,利用流式细胞仪进行细胞周期分析。结果 10-5mol/L、10-6mol/L、10-7mol/L、10-8mol/L、10-9mol/L的E2对Sacc83均有促增殖作用,其中10-7mol/L的E2作用最显著,使Sacc83细胞增殖率增加了34.4%(P<0.01),细胞群体倍增时间缩短了17.2%,克隆形成率增加了39.0%(P<0.01)作用1,2,3天时细胞分裂指数分别增加了33.3%,40.9%,17.8%,作用12h,18h,24h时S期细胞分别增加了12.3%,3.3%和9.7%。结论 E2对人腺样囊性癌细胞有促进增殖的作用,临床应用雌激素时应慎重。

关键词:雌二醇 腺样囊性癌 细胞增殖 流式细胞术

[Abstract]Objective: To investigate the effect of 17- beta estradiol (E2) on the proliferation of human adenoid cystic carcinoma cell line Sacc83.Method: the effect of MTT of different concentrations of E2 on human adenoid cystic carcinoma cell proliferation in vitro, describe the cell growth curve cell counting method, cell counting method for the determination of cell division index, soft agar colony formation assay cell clone formation rate, the cell cycle was analyzed by flow cytometry.Results: 10-5mol/L, 10-6mol/L, 10-7mol/L, 10-8mol/L, 10-9mol/L and E2 promote the proliferation of Sacc83 were E2, the effect of 10-7mol/L was most significant, the proliferation rate of Sacc83 increased by 34.4% (P<0.01), the cell population doubling time was shortened by 17.2%, the clone formation rate increased by 39% (P<0.01) 1, 2, 3 the day when the cell mitotic index were increased by 33.3%, 40.9%, 17.8%, 12h, 18h, 24h, S phase cells were increased by 12.3%, 3.3% and 9.7%.Conclusion: E2 can promote the proliferation of human adenoid cystic carcinoma cells, and should be used carefully in clinical estrogen administration.

Estradiol; adenoid cystic carcinoma; cell proliferation; flow cytometry (FCM)

中图分类号: R132.1 文献标识码: A 文章编号: 1009-5187 (2017) 13-002-01

17-β雌二醇(E2)为代表的雌激素目前被广泛应用于治疗妇女更年期综合征、骨质疏松等疾病。然而诸多研究表明E2对某些肿瘤细胞有促增殖和促转移的作用[1]。腺样囊性癌是涎腺最常见的恶性肿瘤之一,约占全部涎腺恶性肿瘤的27%,是颌下腺及小涎腺最常见的肿瘤之一。该肿瘤生长缓慢,病程较长,但其侵袭性很强,易于侵犯神经并延神经向周围组织扩散,手术切除后容易复发[2]。目前尚未见E2是否能促进腺样囊性癌细胞增殖的研究报导,本研究表明E2对人腺样囊性癌细胞有促进增殖的作用。

1 材料和方法

1.1 主要材料 腺样囊性癌细胞系Sacc83(由北京医科大学颌面外科建立);无酚红RPMI-1640培养基(美国Gibco公司);胎牛血清(浙江省金华市青湖犊牛应用研究站);活性炭(美国SIGMA公司);17-β雌二醇(美国SIGMA公司);胰蛋白酶(美国Gibco公司);24孔、96孔平底培养板(丹麦Nunc公司产品);PBS缓冲液(博士德生物工程有限公司);MTT(美国SIGMA公司);二甲基亚砷(西安化学试剂厂);琼脂(美国FMC公司)。

1.2 方法

1.2.1 培养液配制 按产品说明书配制无酚红RPMI-1640培养基。为清除胎牛血清中的E2,按0.005g/ml剂量加入活性炭,37℃水浴2小时[3],过滤去除活性炭,56℃恒温水浴箱灭活,然后配制含10%(V/V)胎牛血清的RPMI1640培养液。

1.2.2 细胞增殖率检测 采用MTT法[4],取对数生长期状态良好的Sacc83细胞,经无酚红胰蛋白酶消化后,进行细胞计数,用培养液调细胞密度为 2×10^4 /ml。将细胞悬液以每孔 $100 \mu\text{l}$ 加入96孔培养板中间 6×10 个孔,A1孔设为调零孔,吸取生理盐水加入四周其它35孔,每孔 $100 \mu\text{l}$ 。37℃5%CO₂孵箱中培养24小时,待细胞贴壁后,吸弃中间 6×10 个孔中液体,分别加入含不同浓度E2(10-5mol/L、10-6mol/L、10-7mol/L、10-8mol/L、10-9 mol/L)的培养液 $100 \mu\text{l}$ 。加药后第四天,在A1和中间 6×10 个孔中加入5mg/mlMTT溶液 $20 \mu\text{l}$,37℃孵育4小时,吸净培养液,每孔加入 $150 \mu\text{l}$ DMSO,振荡10分钟,酶联免疫检测仪490nm测各孔OD值,计算E2作用下的细胞增殖促进率。

增殖促进率=[(实验OD-对照OD)/对照OD]×100%

1.2.3 细胞群体倍增时间测定 用细胞计数法,取对数生长期的Sacc83细胞,消化后行细胞计数,用培养液调细胞密度为 2×10^4 /ml。将细胞悬液以每孔1ml加入24孔板中,共接种四块24孔板。24小时后更换培养液,加药组E2终浓度分别为10-7mol/L、10-8mol/L、10-9 mol/L,加药后每天进行细胞计数,共计8天,其中第3、6天换液(药),每板每天计数3孔,吸尽液体,滴加消化液,消化充分后培养液终止,吹打均匀,在细胞计数板上倒置相差显微镜下计数。绘制细胞生长曲线并计算细胞群体倍增时间(DT)。DT= $t \times \log_2 / (\log N_t - \log N_0)$,t代表细胞处于对数生长期的培养时间,N₀及N_t分别代表对数生长期起始和终止时对应的细胞数。

2 结果

2.1 E2对Sacc83细胞增殖的促进作用 见表1

表1 E2对Sacc83细胞增殖的促进作用

对照	10-5	10-6	10-7	10-8	10-9	
OD值	0.288±0.0650	0.345±0.0500	0.336±0.0500	0.387±0.0370	0.324±0.0410	0.361±0.067
促进率(%)	0	19.8*	16.7	34.4*	12.5	25.3*

* P<0.01

2.2 E2对Sacc83细胞克隆形成率的影响 见表2

表2 不同浓度E2对Sacc83细胞克隆形成率的影响

	对照	10-7	10-8	10-9
克隆数	137±9.96	189±14.94	161±11.4	168±11.4
克隆形成率(%)	27.2	37.8	33.2	33.6
促进率(%)	0	39.0*	22.1	23.5

* P<0.01

3 讨论

本研究采用无酚红RPMI-1640培养基、用活性炭处理血清都是为了消除培养液中的E2对实验的影响[3]。由于雌二醇浓度在人体内变化范围较大(10-5mol/L-10-9mol/L),采用MTT法检测雌二醇在人的生理浓度范围内对腺样囊性癌细胞的影响。根据所测得的结果进一步用细胞计数法来直接观测E2在作用较强的浓度范围(10-7mol/L、10-8mol/L、10-9mol/L)对腺样囊性癌细胞的影响,通过生长曲线的描绘、细胞增殖率的计算和细胞群体倍增时间的分析,验证了在腺样囊性癌细胞的体外实验中10-7mol/L的E2对Sacc83的促增殖作用最明显。

通过细胞分裂指数曲线图可以看出对腺样囊性癌细胞施加10-7mol/L的E2对细胞分裂指数影响显著,其下降段变陡可能是由于细胞接种数量一样,因其细胞分裂快,周期变短,提前达到接触抑制,细胞分裂数减少所致。软琼脂克隆形成实验结果显示对照组和加药组的E2组有较大差异,10-7mol/L的E2组情况尤为显著(P<0.01),这与细胞增殖促进率的结果相符,说明加药后能使细胞活力增加。从细胞周期的代谢过程来看,G1期为细胞分裂后期,该段主要发生DNA合成前的有关变化,S期为细胞DNA合成期,增殖旺盛的细胞处于G1期的比例减少,S期的比例增加[4]。加药后18小时的结果与12、24小时的结果不一致可能是加药组细胞生长周期变短,大多数细胞刚完成分裂所致。

总之,本研究表明E2对人腺样囊性癌细胞有增殖作用,这类雌激素在临床应用时应慎重。

参考文献

- [1]邹自英,朱运龙,王高峰,17β-雌二醇对宫颈鳞癌HeLa细胞增殖的促进作用,医学研究生学报,2002,04
- [2]Norberg-Spaak, -L; Dardick, -I; Ledin, -T, Adenoid cystic carcinoma; use of cell proliferation, BCL-2 expression, histologic grade, and clinical stage as predictors of clinical outcome.Head-Neck.2000 Aug; 22 (5): 489-97
- [3]Philippa Darbre, JeanYates, Sally Curitis, Effect of Estradiol on Human Breast Cancer Cells in culture, Cancer-Res.1983 Jan; 43 (1): 349-54
- [4]司徒镇强,吴军正《细胞培养》西安,世界图书出版公司,1996,186,160
- [5]张盈华,流式细胞仪在医学检验中的应用,中华医学检验杂志1997,7,204

罗湘杭,廖二元,邓小戈,雌二醇对正常成人成骨细胞基质金属蛋白酶及其抑制回干的影响,现代康复2001,11,511