

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2009.07.004

雌激素对 ER 阴性的子宫内膜腺癌细胞 JEC 增殖的作用

徐 静, 吴中明

Effect of Estrogen on Growth of Estrogen Receptor Negative Endometrial Adenocarcinoma Cell Line JEC *in vitro*

XU Jing, WU Zhong-ming

Department of Microbiology, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China

Corresponding Author: WU Zhong-ming, E-mail: zhongmingwu0552@sina.com

Abstract: Objective To study the effect of different concentration of estrogen(E_2) on the growth of estrogen receptor negative of endometrial adenocarcinoma cell line JEC *in vitro*. **Methods** Endometrial adenocarcinoma cell line JEC originated from human endometrial adenocarcinoma was cultured *in vitro*. Two groups were set up: sample group (17- β estradiol at different concentrations) and control group without estrogen. The proliferative capacity of endometrial adenocarcinoma cell line JEC in the culture medium with 17- β estradiol was assessed by cell counting on a haemocytometer and evaluated by the means of 3-(4,5-dimethylthiazol-z-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium blue (MTT) and cell cycle was analyzed by flow cytometry (FCM). The expression of cyclin A of JEC was examined by immunocytochemical staining and using automatic image analysis technology. **Results** (1) The cell numbers in the fourth day after dealing with 1×10^{-7} and 1×10^{-6} mol/L concentrations of E_2 were more than that in control group. The optical density of JEC cell in the 72th hour after dealing with 1×10^{-6} mol/L concentration of E_2 was higher than that in control group ($P < 0.01$). There was no statistics significant difference in the other experimental groups compared with the control group ($P > 0.05$). (2) FCM showed that 17- β E_2 (1×10^{-6} mol/L) increased the cells percentage at the S and G_2/M phases of cell cycle and decreased the cells percentage in G_0/G_1 phases of cell cycle. (3) Analysis on expression of intracellular cyclin A protein showed that estradiol could obviously up-regulate cyclin A protein by the immunohistochemical method of SABC. **Conclusion** It is suggested in the present study that estrogen can stimulate the proliferation of endometrial adenocarcinoma cell line JEC *in vitro*. There is an accordant dose-response and time-response relationship. In addition, its effect may be associated with the change in the expression of cyclin A.

Key words: Endometrial adenocarcinoma; Estrogen; cyclin A

摘要:目的 研究不同浓度的雌激素(17- βE_2)对雌激素受体(ER)阴性的子宫内膜腺癌细胞系 JEC 增殖和细胞周期的影响。**方法** 采用细胞计数法、四甲基偶氮唑蓝比色法(MTT)和流式细胞术(FCM)的方法,观察人子宫内膜腺癌细胞系 JEC 在加入 17- βE_2 后的增殖活性和细胞周期时相变化;同时用免疫组化及图像分析,检测 JEC 细胞在加入 17- βE_2 前后细胞周期调控蛋白 cyclin A 表达的变化。**结果** (1) 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L 的雌激素作用 JEC 细胞 4 天后,细胞计数均明显高于对照组,而其余浓度 E_2 无明显作用。不同浓度 E_2 作用 JEC 24 h、48 h 后,MTT 法测 OD 值和对照组相比无明显差异; 1×10^{-6} mol/L 的 E_2 作用 JEC 72 h 后,其 OD 值较对照组显著增高;(2) 17- βE_2 (1×10^{-6} mol/L) 作用 JEC 细胞 72 h 后使 S 期及 G_2/M 期的细胞比例增加, G_0/G_1 期细胞比例减少。但作用 48 h 后细胞周期时相分布无明显变化;(3) 17- βE_2 作用 JEC 后可使细胞内 cyclin A 蛋白表达明显增加。**结论** 一定浓度的雌

激素能促进 JEC 细胞体外增殖,且具有剂量和时间效应性。研究提示,这种调控作用可能与 cyclin A 表达的变化有关。

关键词: 子宫内膜腺癌; 雌激素; cyclin A
中图分类号: R737.33 **文献标识码:** A
文章编号: 1000-8578(2009)07-0552-04

收稿日期:2008-05-06;修回日期:2008-09-17

基金项目:贵州省省长基金资助项目(2005:313)

作者单位:563003 贵州遵义医学院微生物学教研室

通信作者:吴中明, E-mail: zhongmingwu0552@sina.com

作者简介:徐静(1971-),男,硕士,主治医师,主要从事肿瘤免疫的研究

0 引言

子宫内膜癌(endometrial carcinoma)是妇科常见的三大恶性肿瘤之一。近年来,全球子宫内膜癌的发病率有上升趋势,我国尤其明显^[1]。目前,多数学者认为子宫内膜癌的发病,与雌激素长期持续刺激子宫内膜并且缺乏孕激素拮抗密切相关,各种原因的雌激素过剩,是子宫内膜癌发病的主要原因^[2]。但是,另有一小部分病理表现为低分化的浆液性子官内膜腺癌,其发生似乎与雌激素没有明确关系^[3]。因此,子宫内膜癌的发生机制仍需要深入研究。

过去有大量的文献报道雌激素对子宫内膜癌细胞的作用研究,它们都是建立在 ER 阳性基础上的。对缺乏 ER 的子宫内膜癌细胞,雌激素与之关系如何,它们能否发挥调控作用,怎样发挥调控作用?至今国内外文献均未见报道。对此问题的探索,将能加深对细胞,尤其是 ER 和 PR 阴性子宫内膜细胞的增殖、分化与癌变机制的认识,也为子宫内膜肿瘤的防治提供新的思考。

本文通过体外试验,研究雌激素对 ER 和 PR 阴性的子宫内膜腺癌细胞系 JEC 体外增殖及细胞周期的影响,并初步探讨其影响细胞周期的机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株

子宫内膜腺癌细胞系 JEC 来源于人子宫内膜中度分化腺癌,已证实 ER 和 PR 均为阴性^[4],由本实验室建立保存。

1.1.2 主要试剂

水溶性 17- β 雌二醇、及 PI 染液(碘化丙啶)均由美国 Sigma 公司提供。RPMI 1640 完全培养液(购自 Gibco 公司)。MTT 与二甲基亚砷(购自华美生物工程公司)。兔抗人 cyclin A 与 SABC 免疫组织化学染色试剂盒(购自武汉博士德公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞的培养

JEC 细胞按常规方法培养于含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 完全培养液中。每 2~3 d 换液 1 次,4~5 d 传代 1 次。

1.2.2 细胞计数法观察细胞增殖

采用对数生长期 JEC 细胞,以 5.0×10^4 个细胞每孔的密度加入 24 孔培养板中。次日 4℃ 培养 1 h,以促成细胞同步化生长。按实验设计分组: E2 实验组终浓度设为 1×10^{-12} 、 1×10^{-10} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L,另设不加药物的细胞对照组。每一浓度均设 6 个平行孔,培养 4 d 后胰酶消化

制成单细胞悬液,用血细胞计数板计数结果。

1.2.3 MTT 法观察细胞增殖

JEC 细胞接种于 96 孔培养板,密度为 2.0×10^4 /孔。细胞生长良好后按上法进行同步化处理。加入不同浓度的 E₂,使其终浓度分别为 1×10^{-12} 、 1×10^{-10} 、 1×10^{-9} 、 1×10^{-8} 、 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L,另设不加药物的对照组。每一浓度均设 8 个平行孔。继续培养 24、48 及 72 h 后,每孔加入 20 μ l MTT 溶液(5 mg/ml),轻振培养板,培养箱内再孵育 4 h 后,吸尽上清液,每孔中加入二甲基亚砷 150 μ l,振荡器上振荡 5~10 min,用酶联免疫测定仪在波长为 490 nm 时测定每孔的吸光度(OD)值^[5]。

1.2.4 细胞周期分析

将生长良好的 JEC 细胞进行细胞同步化后,加入含 1×10^{-6} mol/L E₂ 的培养液,并设对照组(同上),每组 3 瓶,培养 48 h 及 72 h 后,胰酶消化收集细胞,用冷 PBS 液重悬后缓慢加入 70% 的冰乙醇 3 ml 中固定,PBS 洗涤 2 次,300 目筛网过滤,调整每组样品细胞浓度为 1×10^6 /ml,加入含有 RNase(10 mg/L)和 Triton X-100 的 PI 染液 1 ml,4℃ 避光染色 30 min,离心后上流式细胞仪检测。

1.2.5 免疫细胞化学法检测细胞内 cyclin A 蛋白表达变化

将 JEC 细胞以 3.0×10^4 /ml 细胞浓度接种于 6 孔培养板(预先放有多聚赖氨酸处理过的无菌盖玻片)中,制成细胞爬片。设 1×10^{-6} mol/L E₂ 组及无药对照组。培养箱中培养 72 h 后,PBS 液漂洗,冷丙酮固定,用 SABC 法进行免疫细胞化学检测。以博士德公司提供的肿瘤细胞切片作阳性对照,阴性对照以 PBS 代替一抗。结果判断:以细胞核或胞质呈棕黄色或褐色者确定为阳性细胞。光镜下观察,摄片,BI-2000 图像分析系统软件分析 JEC 的平均吸光度。

1.2.6 统计学方法

采用 SPSS(Ver. 11.5)统计软件进行成组 *t* 检验分析,检测各不同浓度实验组与对照组间的差异。实验数据以均数 \pm 标准差表示, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞计数法观察雌激素对 JEC 细胞增殖的影响

用 1×10^{-7} 和 1×10^{-6} mol/L 的雌激素作用于 JEC 细胞 4 d 后,细胞数均明显升高,与对照组比较有差异有统计学意义($P < 0.01$);而其余浓度的雌激素作用 JEC 细胞后,细胞数虽有不同程度升高,

但差异均无统计学意义($P>0.05$)。上述结果具有剂量效应性,结果见表 1。

表 1 不同浓度雌激素对 JEC 细胞增殖的影响(1×10^5 , $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effects of estrogen at different concentrations on the proliferation of JEC cells(1×10^5 , $\bar{x} \pm s$)

Groups	Concentrations(mol/L)	Quantity of cell
Control	0	3.12 ± 0.29
a	1×10^{-6}	4.76 ± 0.54**
b	1×10^{-7}	4.32 ± 0.42**
c	1×10^{-8}	3.40 ± 0.64*
d	1×10^{-9}	3.35 ± 0.73*
e	1×10^{-10}	3.30 ± 0.42*
f	1×10^{-12}	3.15 ± 0.29*

The experimental groups compared with the control group in statistics, *: $P>0.05$, **: $P<0.01$

2.2 MTT 法观察雌激素对 JEC 细胞增殖的影响

作用 24 h 及 48 h 后各 E_2 浓度组和对照组相比,OD 值有不同程度升高,但差异均无统计学意义($P>0.05$);72 h 时仅 1×10^{-6} 组 OD 值较对照组明显升高($P<0.01$),且与其他浓度组相比较,差异有统计学意义($P<0.05$ 或 $P<0.01$),见表 2。其 OD 值的变化与剂量、时间有关。

2.3 细胞周期时相改变

表 3 可见, 1×10^{-6} mol/L 的 $17-\beta E_2$ 作用 JEC 细胞 48 h 后,细胞的生长周期有所变化,但差异均无统计学意义($P>0.05$)。72 h 后可见细胞的生长周期有明显改变,使 G_0/G_1 期的细胞由 68.35% 减少为 55.64% ($P<0.01$), S 及 G_2/M 期的细胞由 31.65% 增加到 44.36% ($P<0.01$)。上述结果提示雌激素改变 JEC 细胞周期的作用有时间效应性。

表 3 雌激素影响 JEC 细胞周期时相分布的结果(% , $\bar{x} \pm s$)

Table 3 The cell cyclic distributions after dealing with estrogen(% , $\bar{x} \pm s$)

T/h	Cell cycle	Control	E_2
48	G_0/G_1	66.98 ± 0.59	65.20 ± 1.32*
	S + G_2/M	32.99 ± 0.55	34.80 ± 1.33*
72	G_0/G_1	68.35 ± 0.41	55.64 ± 2.06**
	S + G_2/M	31.65 ± 0.40	44.36 ± 2.06**

The experimental group compared with the control group in statistics, *: $P>0.05$; **: $P<0.01$

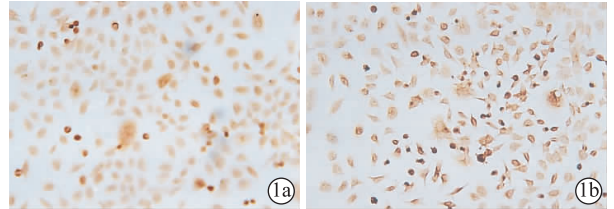
表 2 不同浓度 E_2 作用不同时间后的吸光值[OD, ($\bar{x} \pm s$)]

Table 2 The absorbency at different time after dealing with varies concentration of E_2 [OD, ($\bar{x} \pm s$)]

T/h	Control	E_2					
		1×10^{-12}	1×10^{-10}	1×10^{-9}	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}
24	0.413 ± 0.014	0.429 ± 0.030	0.417 ± 0.171	0.431 ± 0.033	0.444 ± 0.045	0.453 ± 0.011	0.472 ± 0.041
48	0.641 ± 0.018	0.648 ± 0.032	0.657 ± 0.023	0.660 ± 0.040	0.670 ± 0.050	0.673 ± 0.030	0.679 ± 0.026
72	0.767 ± 0.065	0.771 ± 0.071	0.796 ± 0.044	0.791 ± 0.062	0.825 ± 0.042	0.835 ± 0.139	0.954 ± 0.068

2.4 细胞内 cyclin A 蛋白表达检测

镜下 cyclinA 阳性染色主要位于细胞核,阳性细胞核较大,染色深浅不一。无药对照组 cyclin A 阳性表达细胞呈黄色或棕黄色,见图 1a。在相同反应条件下, E_2 组 cyclin A 阳性反应强度明显增加,染色变深,见图 1b。经图像分析系统软件分析各组 JEC 平均吸光度,对照组 cyclin A 平均吸光度为(61.54 ± 4.67), E_2 组的平均吸光度为(89.67 ± 0.78),与对照组相比,差异有统计学意义($P<0.01$)。



1a: Positive cyclin A staining in JEC cells; 1b: Strong positive cyclin A staining of JEC cell 72 hour after dealing with 1×10^{-6} mol/L concentration of E_2

图 1 cyclin A 蛋白在 JEC 细胞中的表达(SABC×200)
Figure 1 Expression of cyclin A in JEC cells(SABC×200)

3 讨论

3.1 雌激素对 ER 阴性的 JEC 细胞体外生长的影响

长期以来,如何有效防治子宫内膜癌和合理使用雌激素制剂是人们所关注的问题。雌激素在体内具有广泛的生物学活性,在不同组织中的作用不尽相同,其具体机制还不十分明确。女性进入绝经期后,体内雌激素水平显著下降,出现与之相关的绝经期综合征,以及心血管疾病如冠心病、动脉粥样硬化和骨质疏松等。因而使用激素替代疗法能明显减少上述疾病的发生。但长期应用雌激素又会增加患子宫内膜癌和乳腺癌的风险,因此大大限制了其在临床上的应用。目前,大多数学者认为,雌激素与子宫内膜癌的发生、发展和临床治疗均有密切联系,其中外源性雌激素的应用是最值得重视的问题。然而,临床观察发现,一部分低 ER 和 PR 或缺乏 ER 和 PR 的子宫内膜癌病人似乎与雌激素无明确关系,

故有人认为雌激素本身并非人类女性中子宫内膜癌发生的真正原因。

我们通过研究发现,一定浓度(1×10^{-6} mol/L)的 $17\text{-}\beta$ E_2 能明显促进 ER 和 PR 阴性的 JEC 细胞体外增殖, $17\text{-}\beta$ E_2 可以明显改变 JEC 细胞的生长周期,即作用 JEC 细胞 72 小时后使 S 期及 G_2/M 期的细胞比例明显增加, G_0/G_1 期细胞比例明显减少。此外,Yoo 等^[6]研究发现, 1×10^{-6} mol/L 的 $17\text{-}\beta$ 雌二醇可明显抑制 ER 阴性的人乳腺癌细胞系 AU-565 细胞的增殖。由此提示,雌激素对一些 ER 阴性细胞的体外生长有明显调控作用,这与我们的研究结果有一致性。上述研究进一步表明雌激素仍可能与 ER 阴性的子宫内膜癌的发生、发展密切相关。通过本研究,对指导人们认识子宫内膜癌的发生、发展原因和如何正确防治子宫内膜癌,以及临床合理使用雌激素制剂都将起到一定作用。

3.2 雌激素影响 JEC 细胞周期的机制

研究表明,雌激素可以调节缺乏 ER 细胞的生长。Yoo 等^[6]研究发现, $17\text{-}\beta$ 雌二醇对 ER 阴性的人乳腺癌细胞系 AU-565 细胞的增殖有明显抑制作用,该作用与 c-myc 的异常表达有关。Tsai 等^[7]对 ER 阴性的乳腺癌细胞进行了研究,发现雌激素可以诱导该细胞的 AKT 酶活化,从而进一步激活 PI3K/AKT 信号转导通路。Chen 等^[8]发现 p21 (WAF1/CIP1) 在 ER 阴性的乳腺癌细胞信号转导中起重要作用,认为 p21 与雌激素作用密切相关。

现在认为,肿瘤是以细胞过度生长为特征的疾病,它与细胞周期调节障碍密切相关。cyclin A 是最重要的细胞周期调控蛋白之一,它通过与 CDK2 相互作用而影响细胞周期 G_0/G_1 时相转换,在 G_1 期向 S 期转变的过程中,可以观察到高表达,其作用可延续至整个 S 期,并与 S 期的进程密切相关,同时,还可能为 G_2/M 转换所必需。Kyushima^[9] 研究发现,子宫内膜组织细胞的异常增殖与恶性进展和 cyclin A 的表达变化有关。Jenkins 等^[10] 研究表明,雌激素影响缺乏 ER 和 PR 的 CD4^+ T 淋巴细胞的细胞周期并诱导凋亡的作用,主要是通过抑制 cyclin A 和 bcl-2 的表达而发生。

本研究对雌激素影响 JEC 细胞周期的机制进行了初步探讨。我们研究发现,一定浓度的雌激素能明显促进 JEC 细胞内 cyclin A 蛋白的表达。由此推测,雌激素可能通过调节 cyclin A 蛋白的表达,影响 JEC 的细胞周期,进而促进 ER 阴性的子宫内

膜癌细胞 JEC 的增殖。研究进一步表明,雌激素对 JEC 细胞甚或 ER 阴性细胞的作用可能是通过另外一种尚未发现的受体或特异性结合位点介导的途径,它与传统的雌激素信号转导模式不同。这同时提示我们,必须从新的角度去进一步研究雌激素调控机制,以补充和阐明甾体激素的作用途径,为合理应用雌激素制剂,开发更有效更安全的雌激素替代药物提供基础理论依据。本研究将能加深对细胞,尤其是 ER 和 PR 阴性子宫内膜细胞的增殖、分化与癌变机制的认识,也为子宫内膜肿瘤的防治和抗癌药物的使用提供新的思考。

参考文献:

- [1] 郎景和. 子宫内膜癌诊治的几个问题[J]. 中华妇产科杂志, 2000,35(5):261-263.
- [2] Potischman N, Hoover RN, Brinton LA, et al. A case-control study of endogenous steroid hormones and endometrial cancer [J]. J Natl Cancer Inst, 1996,88(16): 1127-1135.
- [3] Sherman ME, Sturgeon S, Brinton LA, et al. Risk factors and hormone levels in patients with serous and endometrioid uterine carcinomas[J]. Mod Pathol, 1997, 10(10): 963-968.
- [4] 吴中明,张逸群,刘祖林,等. 子宫内膜腺癌细胞系的建立及其生物学特性[J]. 中国肿瘤临床, 1999,26(10):779-781.
- [5] 方蓉,李芳秋,武建国,等. MTT 比色法的条件探讨[J]. 临床检验杂志, 2003,21(1):34-35.
- [6] Yoo JY, Lessor T, Hamburger AW. Inhibition of cell proliferation by 17β -estradiol and heregulin beta1 in estrogen receptor negative human breast carcinoma cell lines[J]. Breast Cancer Res Treat, 1998,51(1):71-81.
- [7] Tsai EM, Wang SC, Lee JN, et al. Akt activation by estrogen in estrogen receptor-negative breast cancer cells[J]. Cancer Res, 2001,61(23):8390-8392.
- [8] Chen X, Danes C, Lowe, M, et al. Activation of the estrogen-signaling pathway by p21(WAF1/CIP1) in estrogen receptor-negative breast cancer cells[J]. J-Natl-Cancer-Inst, 2000, 92(17): 1403-1413.
- [9] Kyushima N, Watanabe J, Hata H, et al. Expression of cyclin A in endometrial adenocarcinoma and its correlation with proliferative activity and clinicopathological variables[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2002,128(6):307-312.
- [10] Jenkins JK, Suwannaroj S, Elbourne KB, et al. 17β -estradiol alter Jurkat lymphocyte cell cyclin and induces apoptosis through suppression of bcl-2 and cyclinA [J]. Int Immunopharmacol, 2001,1(1):1897-1911.

[编辑:周永红;校对:刘红武]