

文章编号:1005-6947(2005)09-0676-03

· 实验研究 ·

尿多酸肽对乳腺癌细胞凋亡的影响

郑伟¹, 马林², 陈凜¹, 李荣¹, 蒋彦永¹

(解放军总医院 1. 普通外科 2. 放疗科, 北京 100853)

摘要:目的 研究肿瘤细胞分化诱导剂尿多酸肽(CDA-II)对乳腺癌细胞凋亡的影响。方法 将CDA-II与不同生物学特性的乳腺癌细胞株MCF-7和MDA-MB-231进行体外培养,同时以维甲酸为阳性对照,观察CDA-II对乳腺癌细胞生长曲线、细胞凋亡及形态学等方面的影响。结果 CDA-II可减缓两株乳腺癌细胞的生长和增殖能力,诱导乳腺癌细胞凋亡。结论 CDA-II可抑制MCF-7和MDA-MB-231两株乳腺癌细胞的生长和增殖能力,诱导乳腺癌细胞凋亡。本研究为CDA-II治疗乳腺癌提供了实验依据。

关键词: 乳腺肿瘤; 细胞凋亡; 尿多酸肽

中图分类号: R737.9; Q329.25

文献标识码: A

Effect of uroacitides on apoptosis of breast cancer cells

ZHENG Wei¹, MA Lin², CHEN Lin¹, LI Rong¹, JIANG Yan-yong¹

(1. Department of General Surgery, 2. Department of Radiotherapy, General Hospital of PLA, Beijing 100853, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effect of CDA-II on apoptosis of breast cancer cells. **Methods** The effects of CDA-II on growth curve, cell apoptosis and morphology of breast carcinoma cell lines MCF-7 and MDA-MB-231 were observed by in vitro cultures, and compared with the classical cell differentiation inducer ATRA. MCF-7 and MDA-MB-231 cell lines have their different biologic characteristics. **Results** CDA-II can reduce growth and proliferation ability and induce cell apoptosis of breast cancer cell lines (MCF-7 and MDA-MB-231). **Conclusions** CDA-II has remarkable effect of anti-cell-proliferation and induction of apoptosis on breast cancer cells MCF-7 and MDA-MB-231. Our results provide experimental bases for the treatment of breast carcinoma with CDA-II.

Key words: Breast Neoplasms; Apoptosis; Uroacitides

CLC number: R737.9; Q329.25

Document code: A

喜滴克癌细胞分化剂-尿多酸肽(CDA-II)是从健康人尿中提取和纯化的一组天然活性成分的抗肿瘤制剂,通过抑制异常甲基转移酶而诱导肿瘤细胞分化^[1]。为了研究CDA-II对乳腺癌的抗肿瘤作用,笔者以全反式维甲酸(ATRA)为阳性对照,选用不同生物学特性的两种乳腺癌细胞株,观察CDA-II对乳腺癌细胞的增殖、凋亡以及细胞形态的影响,以期为CDA-II治疗乳腺癌提供一定的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 所选用的MCF-7和MDA-MB-231两种人乳腺癌细胞株,购自中国医学科学院基础研究所细胞中心。MCF-7细胞,雌激素受体(ER)(+),分化高,表达野生型p53,恶性程度较低;MDA-MB-231,ER(-),分化差,表达突变型p53,恶性程度较高^[2]。

1.1.2 主要实验试剂 DMEM培养液购自Gibco公司;胎牛血清购自Biowhittaker公司;喜滴克癌细胞分化剂-尿多酸肽(CDA-II)购自中美合肥永生制药厂;全反式维甲酸(ATRA)购自Sigma公司。

1.1.3 主要实验设备仪器 RevcoCO₂细胞培养孵化箱购自Asheville NC公司;光学显微镜、倒置显微镜购自Olympus公司;透射电子显微镜购自Hitachi

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30171066)。

收稿日期:2005-02-24; **修订日期:**2005-08-18。

作者简介:郑伟(1966-),男,四川渠县人,解放军总医院副主任医师,主要从事普通外科临床方面的研究。

通讯作者:郑伟 电话:13910806702 或 010-66937217-808;

E-mail: zhengwei301@yahoo.com

公司;FACS Calibur 型流式细胞仪购自 Becton-Dickinson 公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养^[3] (1) DMEM 培养液:配制 DMEM 液,分装成 180 mL/瓶。4℃ 冰箱保存,用前加入双抗生素(青、链霉素)至终浓度分别为 100 U/mL 和 100 μg/mL。胎牛血清浓度为 10%,用于培养 MCF-7 细胞株。(2) L15 培养液:购于中国医学科学院基础研究所细胞中心。分装成 180 mL/瓶,4℃ 冰箱保存。用前加入双抗生素(青、链霉素)至终浓度分别为 100 U/mL 和 100 μg/mL。胎牛血清浓度为 10%,用于培养 MDA-MB-231 细胞株。

1.2.2 实验分组 (1) 对照组:两种细胞均不加药。(2) CDA-II 实验组:两种细胞培养液中均加入 CDA-II(终浓度为 1.5 mg/mL)。(3) ATRA 组:两种细胞培养液中均加入 ATRA(终浓度为 1 μmol/L)。

1.2.3 乳腺癌细胞生长曲线的观察 方法同文献报道^[3,4]。

1.2.4 乳腺癌细胞凋亡的观察 取对数生长期的乳腺癌细胞,胰酶消化成单细胞悬液;以 2×10^5

个细胞接种,各组在培养瓶中培养 6~7 d,胰酶消化成单细胞悬液;用冰预冷的 PBS(0.01 mol/L, pH 7.4)漂洗细胞 2 次,1 000 r/min 离心 5 min,去上清,1 × 结合缓冲液重悬细胞至 1×10^6 个细胞/mL。取 100 μL 细胞(1×10^5)至 5 mL 试管,加入 Annexin V-FITC,10 μL PI,混匀;室温下避光孵育 15 min 后,每管加入 400 μL 1 × 结合缓冲液,1 h 内上机进行 FACS 检测,方法同文献^[5,6]。

1.2.5 乳腺癌细胞形态学的观察 光镜检查:将乳腺癌细胞接种在放有盖玻片的 6 孔板中培养 6~7 d;弃上清液,取出 6 孔板中盖玻片固定后,进行 HE 染色。电镜检查:各组培养瓶中培养 6~7 d,胰酶消化成单细胞悬液,离心、固定,进行常规电镜标本处理,观察细胞的超微结构。

2 结果

2.1 细胞增殖的变化

CDA-II(1.5 mg/mL)和 ATRA(1 μmol/L)对乳腺癌细胞 MCF-7 和 MDA-MB-231 的生长、增殖均有不同程度的抑制作用,细胞倍增时间均延长(图 1,2)。

图 1 乳腺癌 MCF-7 细胞生长曲线

图 2 乳腺癌 MDA-MB-231 细胞生长曲线

2.2 CDA-II 对乳腺癌细胞凋亡的影响

两株乳腺癌细胞经不同处理培养后,流式细胞仪检测细胞凋亡的结果显示,CDA-II 和 ATRA 诱导 7 d 后 MCF-7 细胞的凋亡率分别为 18.60% 和 15.43%,而对照组细胞凋亡率仅为 1.09%。CDA-

II 和 ATRA 诱导 6 d 后 MDA-MB-231 细胞的凋亡率分别为 15.12% 和 17.67%,对照组为 2.93%。提示 CDA-II 和 ATRA 能诱导两种乳腺癌细胞凋亡(图 3,4,附表)。

图 3 MCF-7 细胞凋亡分布图

图 4 MDA-MB-231 细胞凋亡分布图

附表 CDA-II 对乳腺癌各细胞株细胞凋亡的影响

分组	凋亡细胞(%)	
	MCF-7 细胞株	MDA-MB-231 细胞株
对照组	1.09	2.93
CDA-II 组	18.60	15.12
ATRA 组	15.43	17.67

2.3 光镜检查结果

对照组细胞体积小,生长密集,细胞成异型性;CDA-II 和 ATRA 组细胞体积增大,生长密度稀疏,细胞间隙拉宽,胞质增多,核/质比例下降,核仁小而少,细胞固缩、退变。

2.4 电镜检查结果

乳腺上皮细胞脂质合成形成的脂质小体,表现为细胞浆内的空泡小体。MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞多型性,细胞结构完整,细胞器发达、多见。细胞表面覆有较多的微绒毛,细胞核异型性,异染色质多见。加药培养后,细胞外形变化不大,细胞出现较多脂质空泡小体,细胞表面覆盖的微绒毛减少,线粒体肿胀、嵴消失,细胞固缩退变,核染色质碎片,细胞碎片多见。

2.5 凋亡细胞的形态学

对照组极少出现凋亡细胞,CDA-II 组和 ATRA 组在培养过程中可见许多肿瘤细胞从培养瓶壁脱落,悬浮在培养液中,这是细胞凋亡的典型表现^[7]。同时可见部分细胞浓缩,染色质高度浓缩,细胞体积缩小,细胞裂解成为膜完整的凋亡小体。

3 讨论

诱导肿瘤细胞凋亡是治疗肿瘤的一种新的思路^[4],而且治疗肿瘤的有效性主要表现在肿瘤细胞生长抑制和/或诱导凋亡^[2,8]。本实验结果表明,CDA-II 与 ATRA 同样能诱导乳腺癌细胞株的凋亡。CDA-II 和 ATRA 诱导 7d 后 MCF-7 细胞的凋亡率分别为 18.60% 和 15.43%,而对照组细胞凋亡率仅为 1.09%;CDA-II 和 ATRA 诱导 6d 后 MDA-MB-231 细胞的凋亡率分别为 15.12% 和 17.67%,同样高于对照组的 2.93%。处理后的乳腺癌细胞出现细胞凋亡形态学的改变,如培养细胞从培养瓶壁脱落,悬浮在培养液中;电镜下,MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞核染色质碎片,细胞碎片多见。这与文献报道相符^[7]。

分化诱导剂在诱导肿瘤细胞凋亡时,常有 p53, p21, BRCA1 水平升高, bcl-2 表达明显下降^[8-10]。CDA-II 诱导乳腺癌细胞凋亡的机制可能是通过其抑制肿瘤细胞异常甲基转移复合酶活性,改变了肿瘤细胞相关基因的表达,从而引起细胞凋亡^[1]。

参考文献:

- [1] 廖明征. 聪明的抗癌药 CDA-II [M]. 台北:世茂出版社,1999. 139-213.
- [2] Chow LWC, Loo WTY. The differential effects of cyclophosphamide, epirubicin and 5-fluorouracil on apoptotic marker (CPP-32), pro-apoptotic protein (p21 waf-1) and anti-apoptotic protein (bcl-2) in breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 80(3):239-244.
- [3] Hayden LJ, Satre MA. Alteration in cellular retinal metabolism contribute to differential retinoid responsiveness in normal human mammary epithelial cells versus breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 72(2):95-105.
- [4] Wang JJ, Chang YF, Chern YT, *et al.* Study of in vitro and in vivo effects of 1,6-Bis[4-(4-amino-3-hydroxyphenoxy)phenyl]diamantine (DPD), a novel cytostatic and differentiation inducing agent, on human colon cancer cells [J]. *Br J Cancer*, 2003, 89(10):1995-2003.
- [5] 周军,汤恢焕. 三氧化二砷诱导人类胆管癌 QBC939 细胞凋亡的初步研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(4):281-285.
- [6] 黄文广,李杰,王峰,等. 维甲酸诱导肝癌细胞株凋亡及其与 midkine 基因表达关系的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(10):783-785.
- [7] Gaschott T, Maaben CU, Stein J. Tributyrin, a butyrate precursor, impairs growth and induces apoptosis and differentiation in pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(5):2815-2820.
- [8] Elstner E, Williamson EA, Zang C, *et al.* Novel therapeutic approach: ligands for PPAR γ and retinoid receptors induce apoptosis in bcl-2-positive human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 74(2):155-165.
- [9] Zhou Q, McCracken MA, Strobl JS. Control of mammary tumor cell growth in vitro by novel cell differentiation and apoptosis agents [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 75(2):107-117.
- [10] Baj G, Arnulfo A, Deaglio S, *et al.* Arsenic trioxide and breast cancer: analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 73(1):61-73.