论著

文章编号:1000-5404(2006)22-2234-03

# Herceptin 和 9-顺式视黄酸对 MDA-MB-453 乳腺癌细胞协同抑制作用的研究

柴雅明,糜漫天,郎海滨 (第三军医大学军事预防医学院营养与食品卫生学教研室,重庆 400038)

**提 要:目的** 探讨 Herceptin 和 9-顺式视黄酸联合用药对 MDA-MB-453 乳腺癌细胞的协同抑制效应。**方法** 用 Herceptin、9-顺式视黄酸单独和联合处理 MDA-MB-453 细胞 24~72 h,用 MTT 法观察其对乳腺癌细胞的增殖抑制效应,通过流式细胞仪法检测乳腺癌细胞周期相的分布,用 TUNEL 法检测细胞凋亡的情况。**结果** Herceptin 和 9-顺式视黄酸联合作用组较对照和单独作用组能够显著抑制 HER2/neu 阳性乳腺癌细胞的增殖活性,并将其细胞周期进程阻遏于 $G_0/G_1$ 期,同时还能有效诱导其发生凋亡。**结论** Herceptin 和 9-顺式视黄酸联合用药可有效协同抑制 HER2/neu 阳性乳腺癌细胞的增殖活性。

**关键词:** Herceptin;9-顺式视黄酸;HER2;细胞周期;细胞凋亡;MDA-MB-453 细胞

**中图法分类号:** R329.28;R737.9;R979.1 **文献标识码:** A

# Synergistic effects of Herceptin and 9-cis-RA on MDA-MB-453 breast cancer cells

CHAI Ya-ming, MI Man-tian, LANG Hai-bin (Department of Nutrition and Food Hygiene, College of Preventive Medicine, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract:** Objective To investigate the synergistic effects of Herceptin and 9-cis-RA on the proliferation, cell cycle and apoptosis of HER2-positive breast cancer cells. Methods MDA-MB-453 breast cancer cells were treated with 5 μg/ml Herceptin or 1 μmol/L 9-cis-RA or both for 24, 48 or 72 h. The proliferation of MDA-MB-453 breast cancer cells was determined by MTT, the pro-apoptotic effects were detected by TUNEL, the cell cycle phase was detected by FCM. Results As compared with control group, Herceptin and 9-cis-RA synergistically inhibited the proliferation of MDA-MB-453 breast cancer cells, and the percentage of $G_0/G_1$ cells increased after treatment with Herceptin and 9-cis-RA for 72 h. Simultaneously, Herceptin and 9-cis-RA synergistically induced the apoptosis of MDA-MB-453 cells. Conclusion Herceptin and 9-cis-RA could synergistically and effectively inhibit MDA-MB-453 breast cancer cells by blocking their cell cycle progression and inducing their apoptosis.

**Key words:** Herceptin; 9-cis-RA; HER2; cell cycle; apoptosis; MDA-MB-453

乳腺癌是威胁妇女健康的主要恶性肿瘤,化疗和内分泌治疗是乳腺癌主要的全身治疗手段,曲妥珠单抗(trastuzumab,商品名赫赛汀,Herceptin)作为针对肿瘤细胞 HER2 基因靶点的第 1 个分子靶向药物,为乳腺癌尤其是 HER2 阳性乳腺癌的临床治疗带来了新的突破,已有研究证实 Herceptin 可与紫杉醇,多西紫杉醇,阿霉素等多种化疗药物联合用药治疗 HER2 阳性乳腺癌,均具有协同效应而同时几乎不增加毒性[1,2]。9-顺式视黄酸是视黄酸 X 类受体 RXR 的选择性配体,能够有效抑制包括乳腺癌在内的多种肿瘤细胞。本研究拟以 HER2 表达阳性的 MDA-MB-453 细胞为研究对象,观察 Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对其增殖能力,细胞周期进程以及细胞凋亡的影响。

**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30300285)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30300285)

**作者简介:** 柴雅明(1981-),女,河北省石家庄市人,硕士研究生,主要从事营养与肿瘤方面的研究。电话:(023)68753361, E-mail: cqlang@sohu.com

**通讯作者:** 糜漫天,电话:(023)68752292

**收稿日期:** 2006-03-01;**修回日期:** 2006-07-07

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂与仪器

DMEM/F12 培养基购自 Hyclone 公司;新生胎牛血清购自天津 TBD 公司;Herceptin 购自美国 Genentech 公司;9-顺式视黄酸购自美国 Sigma 公司;MTT 购自北京鼎国生物技术公司;TUNEL 凋亡检测试剂盒购自瑞士 Roche 公司;DAB 购自北京中杉公司。

### 1.2 细胞及细菌菌株

MDA-MB-453 细胞(人 HER2/neu 受体阳性乳腺癌细胞株)购自中科院上海细胞库。

### 1.3 实验方法

1.3.1 MDA-MB-453 细胞培养 参照《细胞培养》[3] 相关方法,常规培养 MDA-MB-453 细胞。

1.3.2　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞数的增殖抑制能力　　将 MDA-MB-453 细胞以 $3\times10^4$/ml的浓度接种于铺有盖玻片的 96 孔培养板中，分别以 5 μg/ml 浓度的 Herceptin，1 μmol/L 的 9-顺式视黄酸单独或联合处理 24、48 h 和 72 h，同时设置未处理组为对照。用 MTT（四甲基偶氮唑盐）法测定各组细胞的增殖活性。

1.3.3　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞周期相分布的影响　　将 MDA-MB-453 细胞以 $5\times10^4$/ml的浓度接种于培养瓶中，分别以 5 μg/ml 浓度的 Herceptin，1 μmol/L 浓度的 9-顺式视黄酸单独或联合处理 24、48 h 和 72 h，同时设置未处理组为对照。收获细胞时，以 0.25% 的胰酶消化细胞，然后用冰预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，最后用 75% 乙醇固定细胞后用流式细胞仪检测细胞周期相的分布。

1.3.4　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞凋亡的影响　　将 MDA-MB-453 细胞以 $3\times10^4$/ml 的浓度接种于铺有盖玻片的 24 孔板中，分别以 5 μg/ml 浓度的 Herceptin，1 μmol/L 浓度的 9-顺式视黄酸单独或联合处理 72 h，同时设置未处理组为对照。参照 Roche 公司 TUNEL 试剂说明书进行实验，用普通光学显微镜观察阳性结果，并计算出各组的凋亡率。

### 1.4　统计学处理

Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞数的增殖抑制能力数据以 $x\pm s$ 表示，采用 SPSS 12.0 统计软件，行 $t$ 检验。Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞凋亡的影响采用两样本率比较的 $\chi^2$ 检验。

## 2　结果

### 2.1　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独或联合用药对 MDA-MB-453 细胞增殖能力的影响

分别以 5 μg/ml 浓度的 Herceptin，1 μmol/L 浓度的 9-顺式视黄酸单独和联合处理 MDA-MB-453 细胞 24～72 h 后，与对照组相比，Herceptin 和 9-顺式视黄酸联合处理组的 MDA-MB-453 细胞的增殖活性被显著抑制，与单独处理组相比，具有明显的协同抑制效应，并呈时间－效应依赖的关系（表 1）。

### 2.2　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞周期相分布的影响

MDA-MB-453 细胞经 Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独或联合处理 24～72 h 后，流式细胞仪检测结果显示，联合处理组 $G_0/G_1$ 期细胞所占比例与对照组相比明显升高，至 72 h 后，联合处理组 $G_0/G_1$ 期细胞已占细胞总数的 79.29%，S 期和 $G_2$/M 期细胞减少，提示细胞周期进程被阻遏于 $G_0/G_1$ 期。Herceptin 处理组细胞周期虽然也在一定程度上受到抑制，但不如联合处理组效果明显，而 9-顺式视黄酸处理组细胞周期分布较对照组变化则不明显（$P>0.05$）（图 1）。

**表 1　MTT 实验检测 Herceptin、9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞增殖功能的影响**

| 组别 | 处理时间（h） | | |
|---|---|---|---|
| | 24 | 48 | 72 |
| 对照组 | 0.364 ± 0.024 | 0.642 ± 0.036 | 0.993 ± 0.053 |
| IgG 抗体对照 | 0.357 ± 0.028 | 0.656 ± 0.034 | 0.975 ± 0.046 |
| 9-顺式视黄酸 | 0.343 ± 0.027 | 0.608 ± 0.043 | 0.837 ± 0.043 |
| Herceptin | 0.327 ± 0.041 | 0.559 ± 0.047[a] | 0.766 ± 0.046[a] |
| 9-顺式视黄酸 + Herceptin | 0.299 ± 0.027[a] | 0.496 ± 0.044[ab] | 0.541 ± 0.041[abc] |

a：$P<0.05$，与对照组比较；b：$P<0.05$，与 9-顺式视黄酸组比较；c：$P<0.05$，与 Herceptin 组比较

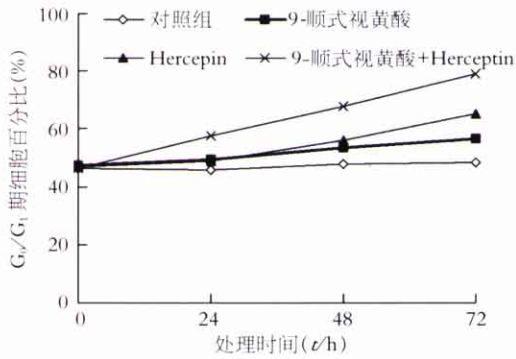
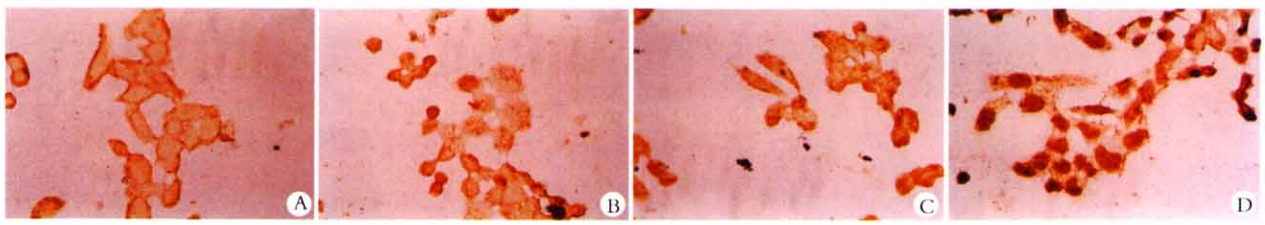



**图 1　9-顺式视黄酸、Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独或联合处理 MDA-MB-453 细胞 24～72 h 后细胞周期相分布的变化**

### 2.3　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合用药对 MDA-MB-453 细胞凋亡的影响

通过 TUNEL 检测显示，MDA-MB-453 细胞经 Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独或联合处理 72 h 后，各组均有部分细胞发生了凋亡，尤其是联合处理组，其细胞凋亡率达到了 22.7%，显著高于对照组和单独处理组。各单独处理组的细胞凋亡率则分别仅为 Herceptin 组 12.6%，9-顺式视黄酸组 5.3%，并且联合处理组 TUNEL 阳性着色也相对较深（图 2）。提示，Herceptin 和 9-顺式视黄酸联合作用能够较单独作用有效诱导 MDA-MB-453 乳腺癌细胞发生凋亡从而起到抑制肿瘤的作用。




A：对照组；B：9-顺式视黄酸组；C：Herceptin 组；D：9-顺式视黄酸 + Herceptin 组

**图 2　Herceptin 和 9-顺式视黄酸单独和联合处理 72 h 后对 MDA-MB-453 细胞凋亡的影响**　（TUNEL × 400）

## 3 讨论

乳腺癌是威胁妇女健康的主要恶性肿瘤，尤其是HER2阳性乳腺癌以肿瘤恶性程度高，预后差，易复发，病死率高而倍受关注。HER2是一个分子量为$185\times10^3$的跨膜受体[4]，其过表达可激活细胞内PI3K和MAPK信号通路，并导致下游基因表达失控，与包括乳腺癌在内的多种肿瘤的发生和预后有密切关系，并可作为预测恶性乳腺癌长期生存率的独立指标[5]。Herceptin可特异性识别并结合肿瘤细胞HER2胞外区的抗原决定簇，从而阻断其信号传导路径，并可通过上调$p27^{kipl}$的活性以及抑制其降解来阻遏细胞周期进程[6]。与此同时，Herceptin还能通过诱导细胞凋亡、抑制血管生成等机制来发挥其对肿瘤细胞的抑制作用[7,8]。已有研究证实Herceptin不但可单独抑制HER2/neu阳性乳腺癌乳腺癌细胞的增殖活性，还可与紫杉醇，多西紫杉醇，阿霉素，诺维本[9]等多种化疗药物联合作用治疗HER2阳性乳腺癌，并取得了较好的疗效。9-顺式视黄酸属于维生素A类衍生物，能够选择性的结合并激活视黄酸X类受体的各种亚型（RXRα，RXRβ，RXRγ）。相关研究证实9-顺式视黄酸而非全反式视黄酸能够通过抑制COX-2的基因表达来抑制肿瘤细胞的活性，提示存在着一条依赖于RXR而非RAR抑制肿瘤细胞的信号路径[10]。还有研究表明这种RXR选择性配体能够显著抑制HER2转基因小鼠乳腺肿瘤的生成，同时其毒副作用与传统的视黄酸相比也有明显的降低，提示作为RXR选择性配体的9-顺式视黄酸可能对那些高表达HER2基因且对全反式视黄酸耐药的乳腺肿瘤具有潜在的疗效[11]。

本研究利用HER2特异性抗体Herceptin和RXR选择性配体9-顺式视黄酸联合处理MDA-MB-453细胞24～72 h后，与单独处理组和对照组相比，肿瘤细胞的增殖活性受到了明显抑制，其抑制效果呈时间－效应依赖关系。流式细胞仪检测结果显示，与单独作用组和对照组相比，在经过Herceptin和9-顺式视黄酸联合处理72 h后，MDA-MB-453细胞大部分被阻止在$G_0/G_1$期，S期和$G_2/M$期细胞比例则显著下降。与此同时，部分Herceptin和9-顺式视黄酸联合处理组的细胞发生了凋亡，其凋亡率显著高于单独处理组和对照组，提示二者联合用药可通过抑制细胞周期进程和促进细胞凋亡来发挥其对HER2/neu阳性乳腺癌细胞的协同抑制效应，并有效降低各自的作用剂量，为临床上治疗HER2/neu阳乳腺癌提供了新的策略。

## 参考文献：


[1] EXTRA J M, COGNETTI F, MARANICHI D, *et al*. Trastuzumab (Herceptin) plus docetaxel versus docetaxel alone as first-line treatment of HER2-positive metastatic breast cancer (MBC): results of a randomised multicentre trial[J]. Eur J Cancer Suppl, 2004, 2(3): 125－126.

[2] BASELGA J, CLIMENT M A, LLUCH A, *et al*. Results of a phase II study of liposomal doxorubicin (Myocet) in combination with weekly paclitaxel and trastuzumab (Herceptin) In patients with HER2-positive locally advanced or metastatic breast cancer (LA/MBC)[J]. Eur J Cancer Suppl, 2004, 2(3): 132.

[3] 司徒镇强，吴军正. 细胞培养(修订版)[M]. 北京：世界图书出版公司，2004：78－88，235－245.

[4] SCHECHTER A L, STERN D F, VAIDYANATHAN L, *et al*. The neu oncogene: an erb-B-related gene encoding a 185, 000-Mr tumour antigen[J]. Nature, 1984, 312(5994): 513－516.

[5] SLAMON D J, GODOLPHIN W, JONES L A, *et al*. Studies of the HER-2/neu proto-oncogene in human breast and ovarian cancer[J]. Science, 1989, 244(4905): 707－712.

[6] NAHTA R, ESTEVA F J. Herceptin: mechanisms of action and resistance[J]. Cancer Lett, 2006, 232(2): 123－138.

[7] GENNARI R, MENARD S, FAGNONI F, *et al*. Pilot study of the mechanism of action of preoperative trastuzumab in patients with primary operable breast tumors overexpressing HER2[J]. Cancer Res, 2004, 10(17): 5650－5655.

[8] KLOS K S, ZHOU X, LEE S, *et al*. Combined trastuzumab and paclitaxel treatment better inhibits ErbB-2-mediated angiogenesis in breast carcinoma through a more effective inhibition of Akt than either treatment alone[J]. Cancer, 2003, 98(7): 1377－1385.

[9] UNTCH M, KAHLERT S, PETRUZELKA L, *et al*. A multinational phase II study of Navelbine (N) and Herceptin (H) as first-line therapy for patients with HER2-positive metastatic breast cancer (HER2+ MBC)[J]. Eur J Cancer Suppl, 2004, 2(3): 127.

[10] KANEKURA T, HIGASHI Y, KANZAKI T, *et al*. Inhibitory effects of 9-cis-retinoic acid and pyrrolidinedithiocarbamate on cyclooxygenase (COX)-2 expression and cell growth in human skin squamous carcinoma cells[J]. Cancer Lett, 2000, 161(2): 177－183.

[11] WU K, ZHANG Y, XU X C, *et al*. The retinoid X receptor－selective retinoid, LGD1069, prevents the development of estrogen receptor－negative mammary tumors in transgenic mice[J]. Cancer Res, 2002, 62(22): 6376－6380.


（编辑 龙 亮）