维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2003)04－0454－03

NF－κB 抑制剂 PDTC 增敏 TNF－α 对乳腺癌细胞的毒性作用

涂 刚，姚榛祥

(重庆医科大学临床学院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨核因子 κB(nuclear factor kappa B)活化抑制剂二硫代氨基甲酸吡咯烷(pyrrolidine dithiocarbamate,PDTC)对肿瘤坏死因子 α(tumor necrosis factor α,TNF－α)细胞毒性作用的影响。方法:用 MTT 法观察 TNF－α、PDTC 及二者联合作用对乳腺癌细胞系 MCF－7、MDA－MB－435s 体外生长的影响。将 MDA－MB－435s 细胞接种于雌性 BALB/c 纯系小鼠肾包膜下复制出移植乳腺癌动物模型,观察 TNF－α、PDTC 及联合作用对体内移植肿瘤生长的影响。结果:单用 TNF－α(小于或等于 2000U/ml)或 PDTC 均不影响两种乳腺癌细胞的体外生长,但是先 PDTC(50μmol)作用 1h,再应用 TNF－α(2000U/ml)即可明显地抑制乳腺癌细胞的生长。动物实验中治疗组应用 TNF－α(7.5×10^6U/kg/次,2 次/日,ip)＋PDTC(50mg/kg/次,2 次/日,ip),肿瘤平均体积为 $1.08\pm0.32mm^3$,明显小于对照组平均瘤体 $11.67\pm0.53mm^3$($P<0.01$),单用 TNF－α 组($10.96\pm1.04mm^3$)及 PDTC 组($11.72\pm0.73mm^3$)与对照组比较无显著差异($P>0.05$)。结论:NP－κB 抑制剂 PDTC 能够显著增敏 TNF－α 对乳腺癌细胞的毒性作用,抑制乳腺癌细胞的生长。

【关键词】乳腺癌;肿瘤坏死因子 α;核因子 κB

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2002－11－26

NF－κ B inhibitor－PDTC enhance TNF－α induced cytotoxicity in breast cancer cells

TU Gang, et al

(*Department of General Surgery, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To evaluate the effect of NF－κ B inhibitor－PDTC on TNF－α induced cytotoxicity in breast cancer cells. *Methods*: The cell survivals of breast cancer cell lines MCF－7 and MDA－MB－435s were measured by MTT assay in vitro. MDA－MB－435s cells were implanted into BALB/C mice. Animal tumor models were treated with TNF－α, PDTC and TNF－α plus PDTC. *Results*: The growth of two breast cancer cell lines was not inhibited by either TNF－α(2000U/mi or less)or PDTC. However, both breast cancer cells treated with TNF－α(2000U/mi)plus PDTC(50μ mol)showed significant growth inhibition as compared with controls. In vivo, the growth of implanted tumor was significantly reduced in volume in mice treated with TNF－α(7.5×10^6U/kg, ip, bid) plus PDTC(50mg/kg, ip, bid) as compared with controls($P<0.01$). Tumor growth was not inhibited by either TNF－α or PDTC treatment. *Conclusion*: NF－κ B inhibitor－PDTC evidently enhance TNF－α in inducing cytotoxicity in breast cancer cells, and thus inhibit the growth of cells.

【Key words】 Breast cancer; Tumor necrosis factor－α; Nuclear factor kappa B

TNF－α具有较强的抗肿瘤作用,其受体(TNFR)介导的 TNF－α 识别机制是 TNF－α 引起细胞毒性所必需的。但是大量实验证实利用重组 TNF－α 蛋白或导入 TNF－α 基因治疗肿瘤时,尽管肿瘤细胞表面并不缺乏 TNFR,但仍对 TNF－α 的细胞毒有抵抗作用。这提示 TNF－α 与 TNFR 作用可能引发细胞内效果不同的信号传导途径。新近研究发现,NF－κB 信号传导系统可以被 TNFa 激活而转录调节相关的抗凋亡的癌基因,表现抗治疗的作用[1]。NF－κB 是一种广泛存在的真核细胞的转录因子,研究发现在乳腺癌、非小细胞肺癌、甲状腺癌、T 或 B 淋巴细胞白血病等肿瘤中 NF－κB 表达增高,呈持续的激活状态[2]。本研究针对 NF－κB 是一种氧敏感转录因子,能够直接被活性氧介质(reactive oxygen species, ROS)激活这一特点[3],选择抗氧化剂 PDTC 抑制 NF－κB 的活化,再观察

作者介绍:涂 刚(1968－),男,主治医师,博士,主要研究方向:内分泌外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

TNF－α对乳腺癌细胞体内、体外生长的影响，旨在探讨 PDTC 对 TNF－α的细胞毒性作用的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF－7（雌激素受体阳性）和 MDA－MB－435s（雌激素受体阴性），美国 ATCC（American Type Culture Collection）建株。重组人 TNF－α购自军事医学科学院邦定公司，比活为 1×10^7 单位/mg（U/mg）；PDTC（美国 Sigma 公司）；酶标仪（日本岛津）。BALB/c 小鼠，2～3 月龄，体重 20～25g，雌性，购自重庆医科大学实验动物中心。

1.2 方法

1.2.1 MTT 试验：取对数生长期的 MCF－7 和 MDA－MB－435s 细胞（5×10^3/ml）接种于 96 孔板，200μl/孔，细胞贴壁后换含 0.5% 小牛血清的 RPMI－1640 培养基 5% CO_2，37℃培养 12h，加入 TNF－α终浓度分别为 100U/ml，500U/ml，1000U/ml，2000U/ml，5000U/ml，10000U/ml，以及 PDTC 终浓度分别为 10μmol，20μmol，50μmol，100μmol，150μmol，200μmol。同样条件孵育 48h，联合作用则先加入 PDTC 50μmol，孵育 1h 再加入 TNF－α 2000U/ml 共同孵育 12h，24h，36h，48h。另设阴性（PBS 液）和试剂对照组。然后加入 5mg/mlMTT20μl 继续培养 4h，吸去培养液加入 DMSO 200μl，振荡 5min 后用酶标仪 490nm 波长比色测定 OD 值。按下列公式计算肿瘤细胞存活率：肿瘤细胞存活率＝（实验组 OD 值/对照组 OD 值）×100%。

1.2.2 体内治疗试验：移植性乳腺癌小鼠模型的制作参见 Fingert 的方法[4]，将 24 只肿瘤移植模型随机分为 4 组，即对照组，TNF－α治疗组（TNF－α 7.5×10^6U/kg/次，ip，2 次/日）；PDTC 治疗组（PDTC 50mg/kg/次，ip，2 次/日）；PDTC 联合 TNF－α治疗组（PDTC 50mg/kg/次，ip，1h 后，再注射 TNF－α 7.5×10^6U/kg/次，ip，2 次/日）每组 6 只。移植次日为试验第 1 天，每日给药 2 次，连续给药 5 日，实验第 6 日处死动物，用带测微尺的解剖显微镜，测瘤块长径（L）和横径（W），按公式 $V=1/2(LW^2)$ 计算瘤块体积。

1.3 统计学分析

数据均 $\bar{x}\pm s$ 表示，计量资料两两比较采用 t 检验，P 值小于 0.05 为差异显著。

2 结果

2.1 TNF－α、PDTC 及联合作用对体外乳腺癌细胞生长的影响

MCF－7 细胞在 TNF－α浓度至 5000U/ml 作用 48h 出现生长抑制，而 MDA—MB－435s 细胞在 TNF－α浓度至 10000U/ml 作用 48h 才出现生长抑制。MCF－7 和 MDA－MB－435s 细胞在 PDTC 浓度至 200μmol 作用 48h 均未出现细胞生长抑制。两种乳腺癌细胞在 TNF－α（2000U/ml）＋PDTC（50μmol）联合作用 24h 与单用 TNF－α（2000U/ml）组比较均出现显著的生长抑制，48h 作用更为明显。（图 1）

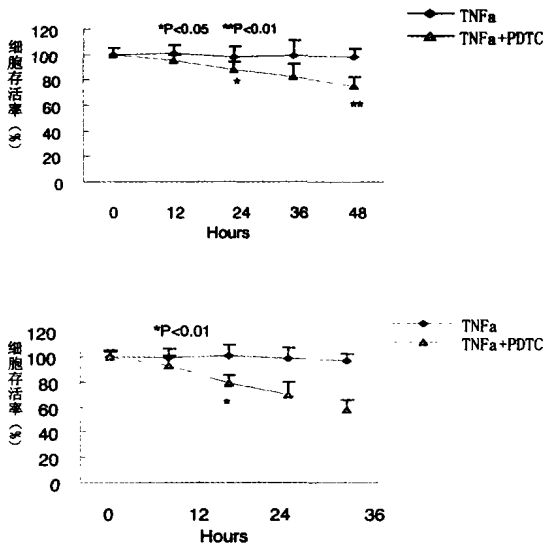


图 1 TNF－α及 TNF－α联合 PDTC 对乳腺癌细胞生长的影响

2.2 TNF－α、PDTC 及联合作用对小鼠乳腺癌移植肿瘤生长的影响

单用 TNF－α组及单用 PDTC 组的平均瘤体分别为 $10.96\pm1.04mm^3$ 和 $11.72\pm0.73mm^3$，与对照组平均瘤体 $11.67\pm0.53mm^3$ 比较无显著差异（$P>0.05$），而 TNF－α±PDTC 治疗组平均瘤体为 $1.08\pm0.32mm^3$，体积明显小于上述 3 组，差异均有显著性（$P<0.01$）。

3 讨论

新近研究发现许多高表达 NF－κB 的肿瘤细胞表现出对放疗、化疗和 TNF－α的治疗有抵抗作用，而 NF－κB 信号传导系统又极易被上述理化因素激活。实验中我们用抗氧化剂 PDTC 来抑制两株乳腺癌细胞 NF－κB 的活化后，再观察 TNF－α对两种乳腺癌细胞株生长的影响，结果发现 PDTC 体内外均能够显著地增强 TNF－α的细胞毒作用，抑制肿瘤细胞的生长。而单用 PDTC 不影响肿瘤细胞的生长。

维普资讯 http://www.cqvip.com

另外发现 ER 阳性的 MCF－7 细胞，在单用 TNF－α 治疗时剂量至 5000Unit/ml 出现生长抑制，而 ER 阴性的 MDA－MB－435s 细胞剂量至 10000Unit/ml 才出现生长抑制，MCF－7 对于单用 TNF－α 的治疗表现相对敏感。在 TNF－α 联合 PDTC 治疗时，同样剂量、时间条件下，虽然两株细胞从 24h 都开始出现生长抑制，但是 ER 阴性的 MDA－MB－435s 细胞却表现对联合治疗方案更为敏感。研究发现 ER 阴性的 MDA－MB－435s 细胞中 NF－κB DNA 结合活性显著高于 MCF－7 细胞[5]。由此可以推论，通过抑制 NF－κB 的激活来增敏 TNFa 的细胞毒作用在 NF－κB 高表达和高水平活化的细胞中更为显效。所以，在进行体内试验时选用了 NF－κB 高表达的 ER 阴性的 MDA－MB－435s 细胞复制肿瘤动物模型，结果仍然显示 TNF－α 联合 PDTC 对体内移植瘤的生长有明显的抑制作用。

PDTC 有清除氧自由基的作用，Rangan 等[6]，最早应用于体内抑制大鼠肾小管内皮细胞 NF－κB 的激活，剂量达 200mg/kg，未发现明确的毒性作用。选择抗氧化剂 PDTC 来抑制 NF－κB 的激活是依据：(1)许多已知的 IκBα 磷酸化诱导物可使活性氧产生增加。NF－κB 抑制蛋白—IκBα 的降解又是 NF－κB 活化的中心环节。(2)H_2O_2：可激活某些细胞中的 NF－κB。(3)TNF－α 诱导的信号传导可以产生活性氧介质(ROS)。因此，抗氧化剂已经成为抑制 NF－κB 的策略之一。

实验研究 TNF－α 对乳腺癌细胞的毒性效应并激活 NF－κB 的双重作用，通过 PDTC 抑制 NF－κB 的活化，观察到 PDTC 增敏 TNF－α 细胞毒作用的强大效力。进而为临床提高放化疗的敏感性，最大限度地降低细胞毒性及肿瘤细胞耐药性提供了新的策略。

参 考 文 献

[1] Beg A A, Baltimore D. An essential role for NF－κB in preventing TNF－α induced cell death[J]. Science, 1996;274(5288):782－784.

[2] Chen F, Castranova V, Shixianglin, et al. New insights into the role of nuclear factor－κB, a ubiquitous transcription factor in the initiation of diseases[J], Clin Chem. 1999;45(1):7－17.

[3] Meyer M, Schreck R and Baeuerde PA, et al. Hydrogen peroxide and antioxidants have opposite effects on activation of NF－κB and AP－1 in intact cells: AP－1 as secondary antioxidant responsive factor[J]. EMBO J, 1993;12(5):2005－2015.

[4] Fingert HJ, Chen Z, Mizrahi N, et al. Rapid growth of human cancer cell in a mouse model with fibrin clot subrenal capsule assay[J]. Cancer Res, 1987;47(15):3824－3829.

[5] Nakshatri H, Bath－Nakshatri P, Martin DA, et al. Constitutive activation of NF－κB during progression of breast cancer to hormone－independent growth[J]. Mol Cell Biol, 1997;17(7):3629－3639.

[6] Rangan G K, Wang Y, Tay Y C, et al. Inhibition of nuclear factor－κB activation reduces cortical tubulointerstitial injury in proteinuric rats[J]. Kidney International, 1999;56(1):118－134.