维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2001)04－0387－04

奥曲肽对 MCF－7 人乳腺癌细胞株生长及凋亡的影响

曾希志,姚檬祥

(重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016)

【摘 要】目的:研究生长抑素类似物奥曲肽(OCT)对乳腺癌细胞生长及凋亡的影响。方法:将 OCT 作用于体外培养的雌激素受体(ER)阳性人乳腺癌细胞株 MCF－7,应用 MTT 比色法分析细胞生长抑制作用,流式细胞术测定细胞周期分布和凋亡率,光镜、电镜观察细胞形态和超微结构。结果:OCT 可抑制 MCF－7 细胞生长、抑制细胞周期,并可诱导细胞凋亡。结论:OCT 对人乳腺癌细胞增殖具有抑制作用,其机制与诱导肿瘤细胞凋亡有关。

【关键词】乳腺肿瘤;细胞株;奥奥肽

【中图图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2001－03－01

The effect of octreotide on growth and apoptosis in human breast carcinoma cell line MCF－7

ZENG Xi－zhi, et al

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

【Abstract】 ***Objective***: To study the effect of somatostatin analogue octreotide (OCT) on growth and apoptosis in breast cancer cell. ***Methods***: Estrogen receptor(ER) – positive human bresast carcinoma cell line MCF－7 was treated with OCT in vitro. Cell proliferation was evaluated by MTT assay, distribution of cell cycle and rate of apoptosis were determined by flow cytometry, and apoptosis was confirmed by morphology and ultrastructural alternations. ***Results***: OCTcould inhibit the growth, arrest the cell cycle, and induce the apoptosis in MCF－7 cells. ***Conclusion***: OCT possessed an inhibitory effect on proliferation of breast cancer cells, and the mechanism for antitumor was associated with induction of apoptosis.

【Key words】 Breast neoplasms; Cell lines; Octreotide

奥曲肽(Octreotide,OCT)是人工合成的八肽生长抑素类似物,近年研究已证明 OCT 能抑制多种肿瘤细胞的增殖,且毒副作用小,患者耐受性好,是一种具有广泛应用前景的抗肿瘤激素剂。我们探讨了 OCT 对人乳腺癌细胞株 MCF－7 的抑制作用及其机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 药物及主要试剂 OCT 为 NOVARTIS 公司产品;MTT(四甲基偶氮唑蓝)为 FLUKA 公司产品;碘化丙啶(PI),SIGMA 公司产品;RPMI1640,GIBCO 公司产品

1.2 细胞株与培养 MCF－7 细胞引自美国斯隆凯特林癌症中心,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养基,于 37℃、5%CO_2、100%湿度的孵箱中培养,取对数生长期细胞进行实验。实验设对照组及药物处理组,处理组又分不同的浓度组。

1.3 细胞增殖抑制的测定 采用 MTT 法[1],浓度为 1×10^5个/ml 的细胞接种于 96 孔培养板内,200μl/孔,每组 8 孔。药物作用 68h 后加 5mg/ml MTT 20 μl/孔,继续培养 4h,吸去上清液,每孔加入二甲基亚砜(DMSO)200 μl,震荡 5min,以 600nm 波长,用自动酶标仪测定吸光度值(A),用以下公式计算细胞生长抑制率(IR)。IR(%)=(对照组 A 值－实验组 A 值)/对照组 A 值×100%。

1.4 细胞周期和凋亡的检测 收集对照组和 10^{-9}M OCT 作用 72h 的细胞,每组 8 例,制成单细胞悬液,PI 染色,用 Becton Dickinson 公司的 FACS Calibur 型流式细胞仪(FCM)测定细胞周期和凋亡率(激发波长 488nm)。计数 30000 个细胞,用 ModFit LT V2.0 软件对测量值进行分析。

1.5 光镜观察及图象分析 取浓度为 1×10^5 个/ml 的细胞悬液 1ml,分别种入 6 孔培养板(孔内已预置载玻片),第二

作者介绍:曾希志(1964－),男,四川广安人,讲师,博士,主要研究方向:乳腺外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com

天加入 OCT,终浓度为 10^{-9}M,培养 72h,取出载玻片,干燥后瑞氏(Wright)染色,光镜观察,并输入北航研制的 CM-2000B 型生物医学图象分析系统,计算凋亡细胞的百分比,每例计数 200 个细胞。

1.6 透射电镜观察 收集 10^{-9}M OCT 作用 72h 的细胞,作透射电镜观察。

1.7 统计学处理 实验数据以均数±标准差表示,用 t 检验和 χ^2 检验进行统计学分析,$P<0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结 果

2.1 OCT 对 MCF-7 细胞体外生长的抑制作用

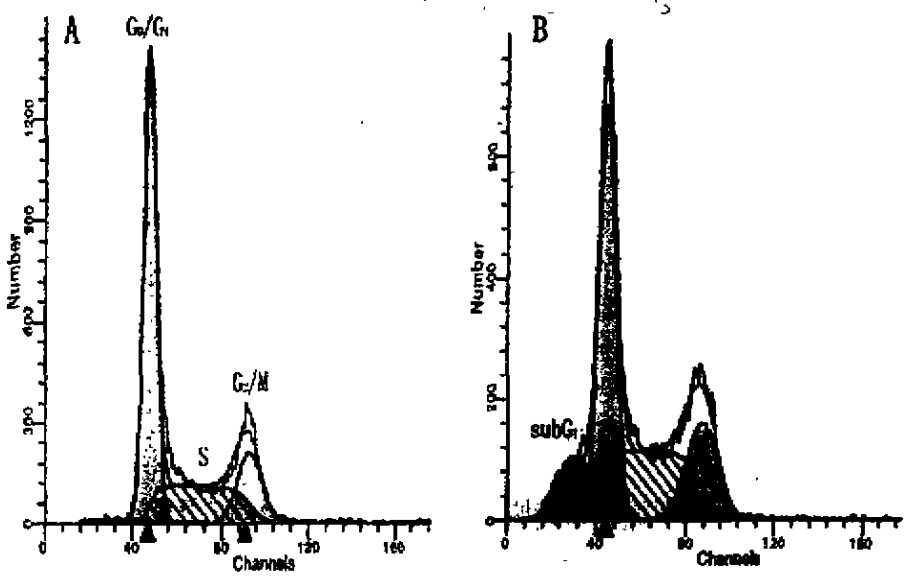
见表 1。随着药物浓度增大,抑制作用增强,以浓度为 10^{-9}M 以上时明显,而低浓度(10^{-12}M)对细胞生长有刺激作用。

表 1 不同浓度 OCT 对 MCF-7 细胞生长的抑制率(%)

药物浓度	例数	A 值	IR
对照组	8	0.835±0.038	0
10^{-12}M	8	0.920±0.041	−10.15±1.12**
10^{-11}M	8	0.828±0.031	0.86±0.16*
10^{-10}M	8	0.800±0.039	4.23±0.90*
10^{-9}M	8	0.627±0.051	24.87±3.80***
10^{-8}M	8	0.598±0.012	28.44±3.93***
10^{-7}M	8	0.516±0.021	38.17±4.45***

注:与对照组比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;*** $P<0.001$

2.2 OCT 对细胞周期和凋亡的影响 由表 2 可见,OCT 可抑制 MCF-7 细胞从 G_0/G_1 期向 S 期过渡,但处于 G_2M 期的细胞比例并无明显减少。OCT10^{-9}M 组有细胞凋亡发生,在 DNA 组方图上可见 G_1 峰之前出现典型的凋亡细胞峰(亚 G_1 峰),凋亡率为 15.5%,而对照组未见亚 G_1 峰(图 1)。



A. Control B. OCT10^{-9}M

图 1 FCM 分析 OCT 对 MCF-7 细胞周期分布和凋亡的影响

表 2 OCT 对细胞周期和凋亡的影响(%)

组别	例数	细胞周期时相分布			凋亡率
		G_0/G_1	S	G_2M	
对照组	8	51.6±3.4	38.1±3.9	10.3±1.2	
OCT10^{-9}M	8	61.4±4.2*	29.3±3.2*	9.3±0.8	15.5

注*,与对照组比较 $P<0.05$

2.3 光镜观察及图象分析 光镜下凋亡细胞核呈致密深蓝色,核浓缩,体积变小,胞质少,胞浆浓缩,并可见质膜芽生脱落(图 2、3)。经计算机图象分析发现,OCT 处理的 MCF-7 细胞凋亡的百分比为 21.5%,而对照组凋亡细胞仅占 2.8%,二者有显著性差异($P<0.05$)。

2.4 OCT 对细胞超微结构的影响 对照组 MCF-7 细胞,核大、核仁肥大,胞质内细胞器少,游离核

维普资讯 http://www.cqvip.com



图 2 对照组 MCF－7 细胞，凋亡细胞较少(Wright×400)



图 3 OCT 10^{-9}M 处理的 MCF－7 细胞：可见不同时期的凋亡细胞，部分凋亡细胞有胞核浓缩和质膜芽生现象。(Wright×400)



图 4 对照组 MCF－7 细胞，显示癌细胞低分化，核肥大、畸形，核仁两个，并可见核内假性包含物(EM×5000)



图 5 OCT 10^{-9}M 处理的 MCF－7 细胞，凋亡早期，核异染色质边集，核中央区有灶性空化，胞质肿胀(EM×12 000)



图 6 OCT10^{-9}M 处理的 MCF－7 细胞，核异染色质增多，集呈几块，核膜完整，胞质肿胀，胞膜不清(EM×15 000)

蛋白体丰富，表面有较多微绒毛，极少见到凋亡细胞(图 4)。10^{-9}M OCT 处理的 MCF－7 细胞有较多凋亡细胞，表现为核染色质边集，染色体发生固缩，核形态不规整，核碎裂，细胞体积变小(图 5、6)。

3 讨 论

目前认为 OCT 主要通过肿瘤细胞表达的生长抑素受体(SSTR)介导其效应，且发现 75% 以上的人类乳腺癌细胞具有 SSTR[2]，但 OCT 与 SSTR 结合后所产生的作用及其环节尚了解不多。MCF－7 是 ER 阳性乳腺癌细胞株，可以表达多种 SSTR 亚型[3]。本研究发现浓度为 10^{-11}M 以上的 OCT 对 MCF－7 细胞具有抑制生长作用，具呈浓度依赖性，浓度为 10^{-7}M 时抑制率为 38.17%，而比该浓度低 100 倍的 OCT(10^{-9}M)对 MCF－7 细胞仍具有较强的作用，提示 OCT 的这种抑制作用并非因本身的毒性所致，而是通过与 SSTR 结合发挥作用。本实验还观察到极低浓度(10^{-12}M)的 OCT 对细胞有轻度促生长作用，说明 OCT 对 MCF －7 细胞具双相作用，高浓度具抑制作用，而浓度很低时可促进其生长，这与 Hoelting 等[4]对 FTC133 甲状腺癌细胞的研究结果一致。

细胞通过分裂而增殖，肿瘤细胞具有无休止分裂的特点。生长抑制取决于增殖周期的延长或/和细胞凋亡的增多。关于生长抑素及其类似物对 MCF－7 细胞周期影响的报道甚少，Pagliacci 等[5]观察到 OCT 对 MCF－7 细胞周期有轻度、暂时性抑制作用，而最近 Thangaraju 等[3]研究认为 OCT 并不导致 MCF－7 细胞 G_1 期阻滞，也不影响细胞周期抑制基因 pRb 和 P21。本研究结果显示，OCT

维普资讯 http://www.cqvip.com

对 MCF－7 细胞从 G_1 期向 S 期过渡有一定程度抑制作用，但分裂期(G_2M)细胞并无明显减少，提示细胞周期抑制可能不是 OCT 抗 MCF－7 细胞生长增殖的主要机理。

Sharma 等[6]研究认为 OCT 通过选择性结合 SSTR3 亚型，诱导细胞内的酪氨酸磷酸酶 SHP－1 移位到胞膜，增加膜的 SHP－1 活性而发挥信号传递作用，激活 Ca^{2+}/Mg^{2+} 不依赖的核酸内切酶，引起 DNA 断裂，并激活促凋亡基因 Bax 和野生型 P53，从而诱导细胞凋亡的发生。本实验通过 FCM 分析发现，OCT 作用 72h，MCF－7 细胞可发生凋亡，出现明显的亚 G_1 峰，并经光镜、图象分析、电镜观察到细胞凋亡特征性的形态学和超微结构改变，这说明 OCT 具有诱发乳腺癌细胞凋亡的作用。因此我们认为 OCT 诱发细胞凋亡是其抗肿瘤作用机制的重要方面之一。

总之，本研究基于体外细胞实验，结果表明 OCT 对乳腺癌细胞具有抑制作用，其机制与诱导细胞凋亡有关，为生长抑素及其类似物用于临床治疗乳腺癌提供了实验数据。

参 考 文 献

[1] Jing Z, Zhenxiang Y. Effect of 1, 25$(OH)_2D_3$ on the growth and apoptosis of breast cancer cell line MCF－7[J]. Chin Med J, 2000;113:124－128.

[2] Evans AR, Croix T, Laws S, et al. Analysis of somatostatin receptor subtype mRNA expression in human breast cancer [J]. Br J Cancer, 1997;75:797－803.

[3] Thangaraju M, Sharma, K, Liu D, et al. Interdependent regulation of intracellular acidification and SHP－1 in apoptosis [J]. Cancer Res, 1999;59:1649－1654.

[4] Helting T, Duh QY, Clark OH, et al. Somatostatin analog octreotide inhibits the growth of differentiated thyroid cancer cell in vitro, but not in vivo[J]. J Clin Endocrinol Metab, 1996;81:2638－2641.

[5] Pagliacci MC, Tognellini R, Grignani F, et al. Inhibition of huma breast cancer cell(MCF－7)growth in vitro by the somatostatin analog SMS 201－995: effects on cell cycle parameters and apoptotic cell death[J]. Endocrinology, 1991;129:2555－2562.

[6] Sharma K, Srikant CB. Induction of wild－type p53. bax, and acidic endonuclease during somatostatin－signaled apoptosis in MCF－7 human breast cancer cells[J]. Int J. Cancer, 1998;76:259－266.

(上接第 377 页)

[7] Alsat E, Guibourdenche J, Litton D, et al. Human placental growth hormone [J]. Am J Obstet Gynecol, 1997;177:1526－1534.

[8] Garcia－Aragon J, Libel P, Muscat GEO, et al. Prenatal expression of the growth hormone receptor/binding protein in the rate: A role for GH in embryonic and fetal development [J]. Development, 1992;114:869－876.

[9] Kim JD, Nanto－Salome K, Stephanie JR, et al. Evidence for pituitary regulation of somatic growth, insulin－like growth factors I and II and their binding proteins in the fetal rats [J]. Pediatr res, 1993;33:144－151.

[10] Cowmen J, Evans D, Pogo J, et al. Decreased expression of placental growth hormone in intrauterine growth retardation [J]. Pediatr res, 1996;39:736－739.

[11] Auruup KA, Siler Choird TM. Placental IGF－I in intrauterine growth retardation [J]. J Marten Fetal Med, 1998;7(1):1.

[12] Harding JH, Liu L, Evans PC, et al. IGF－I alters feto－Placental protein and carbohydrate metabolism in fetal sheep [J]. Endocrinology, 1994;134:1509－1515.

[13] Liu L, Harding JE, Evans PC, et al. Meternal insulin－like growth factor－I infusion alters feto－placental carbohydrate and protein metabolism in pregnant sheep [J]. Endocrinology, 1994;135:895－900.

[14] Glaucoma PD, Harding JE. The physiology and path physiology of intrauterine growth retardation [J]. Hormn Res, 1997;48(s):11－16.