维普资讯 http://www.cqvip.com



文章编号:0253－3626(2001)04－0384－03

# ER 阴性乳癌细胞株凋亡过程 Cyclin DI 表达的研究

刘大川,姚椽祥

(重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016)

【摘 要】目的:应用 DNA 末端标记法探讨激素受体阴性乳癌细胞凋亡和 Cyclin DI 之间的关系。方法:通过 $1,25(OH)_2D_3$ 诱发雌激素受体阴性乳癌细胞株 MDA－MB－$435_S$ 凋亡,采用 MTT 法检测细胞增殖情况,TUNEL 法检测细胞凋亡数、免疫组化法检测 Cyclin DI,进行相关性分析。结果:在 $10^{-8}$M $1,25(OH)_2D_3$ 诱发 MDA－MB－$435_S$ 凋亡过程中,癌细胞凋亡率与 Cyclin DI 表达呈负相关。结论:Cyclin DI 的检测可以直接反应雌激素受体阴性乳癌细胞株的凋亡,为临床评价雌激素受体阴性乳癌的治疗效果提供新的指标。

【关键词】$1,25(OH)_2D_3$;雌激素受体阴;MDA－MB－435s;凋亡;Cyclin DI

【中国图书分类法分类号】R737.9;R655.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2000－12－07

# Study on the expression of Cyclin DI and apoptosis as tested by Tunel in the ER(－)breast cancer cell line MDA－MB－453s

*LIU Da－chuan, et al*

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

【Abstract】 ***Objective***: To test the relationship between the expression of Cyclin DI and apoptosis in the ER(－) breast cancer cell line. ***Methods***: Apoptosis was induced by $1,25(OH)_2D_3$ in the ER(－)breast cell line. We compared the cell number by MTT, apoptotic cells by TUNEL, and the expression of Cyclin DI by immunohistochemistry. ***Results***: The expression of Cyclin DI was downregulated during apoptosis in MDA－MB－435s Cell line. It is a negative correlation between the apoptosis and the expression of Cyclin DI. ***Conclusion***: Cylin DI reflected the effect of treatment in ER(－)breast cancer, and it may be a new marker to predict prognosis.

【Key words】 $1,25(OH)_2D_3$; ER(－); MDA－MB－435s; Apoptosis; Cyclin DI

Cyclin DI 是细胞周期 $G_1$ 的调节因子[1],它能促进细胞由 $G_1$ 期向 S 期的过渡。在雌激素受体阳性的乳癌细胞中,Cyclin DI 的阳性表达同雌激素水平呈剂量依赖性关系[2],但 Cyclin DI 在雌激素受体阴性的乳癌细胞中的表达还不清楚。本研究以具有促肿瘤细胞凋亡作用的 $1,25(OH)_2D_3$ 诱导雌激素受体阴性乳癌细胞株 MDA－MB－435s 凋亡[3],通过 DNA 末端标记法(TUNEL)检测其凋亡与 Cyclin DI 表达的变化,进一步明确在雌激素受体阴性的乳癌细胞中 Cyclin DI 与凋亡的关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

雌激素受体阴性乳癌细胞株 MDA－MB－435s 购于中科院上海细胞生物研究所。

RPMI 1640:购于 Hyclone 公司。

$1,25(OH)_2D_3$:购于 Sigma 公司。

DAB 显色试剂盒:购于中山公司。

TUNEL 法凋亡检测试剂盒:购于 Roche(Germany)。

免疫组化试剂盒:购于 Maxim Biotech, Inc. USA。

Cyclin DI 单抗:购于 Maxim Biotech, Inc. USA。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养及 MTT 法检测

MDA－MB－435s 乳癌细胞常规培养在加入 160"/L 胰岛素、10% FBS 的 RPML1640 完全培养基中。培养条件为:37℃,5% $CO_2$,100% 湿度,待细胞刚长满培养瓶底部时,用

作者介绍:刘大川(1970－ ),男,住院医师,博士。主要研究方向:内分泌外科。

维普资讯 http://www.cqvip.com



0.15%胰酶消化成单个细胞，继续传代。将其配成 $2\times10^5$ 个/ml 细胞悬液，并分为 4 组。A：空白对照组、B：$10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组、C：$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组、D：$10^{-9}$ 1，25$(OH)_2D_3$ 组。每组设 8 个平行对照。分别接种于 24 孔板中用 MTT 法作 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天细胞计数。

1.2.2 TUMEL 法原位检测细胞凋亡

$2\times10^5$ 个/ml 细胞悬液接种于预置盖玻片的 24 孔板中，将细胞分为 3 组。A：空白对照组、B：$10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组、C：$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组，每组设 8 个平行对照。分别加入不同浓度 1，25$(OH)_2D_3$ 后，1 天、2 天、3 天、4 天、5 天取出盖玻片，按试剂盒说明作 TUNEL 染色并计数。

1.2.3 免疫组化法检测(Cyclin DI)

将 $2\times10^5$ 个/ml MDA－MB－435s 细胞悬液接种于预置盖玻片的 24 孔板中，将细胞分为 3 组。A：空白对照组、B：$10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组、C：$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组，每组设 8 个平行对照。分别加入不同浓度 1，25$(OH)_2D_3$ 后，1 天、2 天、3 天、4 天、5 天取出盖玻片，按试剂盒说明作 TUNEL 染色并计数。

1.3 统计学处理

应用 SPSS 10.0(USA)统计软件作数据处理分析。计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，$t$ 检验比较各浓度药物组间 Ab 值的差异，多因素方差分析检验细胞凋亡率，秩和检验法比较 Cyclin DI 阳性表达。

## 2 结 果

2.1 不同浓度 1，25$(OH)_2D_3$ 对 MDA－MB－435s 细胞生长的影响

MTT 法结果见表 1。$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组第 2 天出现肿瘤细胞生长抑制，随时间的延长，抑制肿瘤细胞生长的作用更加明显，而 $10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组在第 4 天才出现细胞生长抑制。$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组是最适药物浓度组。

表 1 1，25$(OH)_2D_3$ 及作用时间对细胞生长的影响(Ab)

| 时间 | 正常对照组 | 1，25$(OH)_2D_3$ 浓度分组 | | |
|---|---|---|---|---|
| | | $10^{-7}MD_3$ | $10^{-8}MD_3$ | $10^{-9}MD_3$ |
| 1 | 0.51±0.02 | 0.50±0.09 | 0.53±0.18 | 0.62±0.21 |
| 2 | 0.67±0.01 | 0.53±0.14 | 0.47±0.08* | 0.64±0.12 |
| 3 | 0.53±0.15 | 0.52±0.05 | 0.39±0.03** | 0.70±0.10 |
| 4 | 0.57±0.32 | 0.45±0.08* | 0.33±0.04** | 0.64±0.11 |
| 5 | 0.64±0.34 | 0.40±0.09** | 0.28±0.05** | 0.60±0.13 |

注：与对照组相比 $P<0.05$

** 与对照组相比 $P<0.01$

2.2 TUNEL 法观察细胞凋亡百分数

低倍镜(40×)下选择对照背景好，细胞分布较均匀的 5 个区域，于高倍镜(200×)选择 200 个细胞计数阳性细胞百分数，阳性细胞染色呈棕色，结果见表 2。在用药后第 1 天，$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组同正常组及 $10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组相比，$P<0.01$。第三天，$10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组、$10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组与正常组相比，$P<0.01$。第 4 天、第 5 天 $10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组与 $10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组凋亡百分数相比，$P<0.01$。说明 $10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组在用药后第 1 天即诱导了肿瘤细胞的凋亡，与其它组相比具有显著意义($P<0.05$)，并呈浓度及时间依赖性($P<0.01$)。

2.3 免疫组化法检测 Cyclin DI 阳性细胞百分率

采用半定量方法对 Cyclin DI 阳性细胞进行计数和染色强度评价。(1)在低倍镜下(40×)选择染色较好，细胞分布较均匀的区域，阳性细胞染色为黄色至淡黄色，在 200×倍视野下行阳性细胞计数，如无阳性细胞染色或阳性细胞染色＜10%评为 0 分；10%～30%评为 1 分；30%～60%评为 2 分；＞60%评为 3 分。(2)肿瘤细胞无染色评为 0 分；弱染色评为 1 分；中等程度的染色评为 2 分；强染色评为 3 分。将(1)(2)两种评价的得分相加，是阳性肿瘤细胞的最后评分。同时计数阳性细胞百分率，见表 3。

表 2 1，25$(OH)_2D_3$ 的浓度及作用时间与乳癌细胞凋亡指数(%)

| 时间 (d) | 对照组 | 1，25$(OH)_2D_3$ 组 | |
|---|---|---|---|
| | | $10^{-7}$M | $10^{-8}$M |
| 1 | 3.60±0.89 | 3.80±0.84 | 7.60±2.07*# |
| 2 | 5.00±1.58 | 6.80±1.92 | 13.80±3.11**## |
| 3 | 5.40±2.07 | 14.60±4.04** | 19.00±2.00** |
| 4 | 9.40±2.61 | 15.40±4.22** | 26.60±11.46** |
| 5 | 9.60±3.65 | 25.40±6.56** | 36.80±8.59** |

注：* 与对照组相比 $P<0.05$

** 与对照组相比 $P<0.01$

# $10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组同 $10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组相比 $P<0.05$

## $10^{-8}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组同 $10^{-7}$M 1，25$(OH)_2D_3$ 组相比 $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com



Cyclin DI 阳性表达用秩和检验。在 $10^{-8}$M 药物浓度作用下，第 1 天、第 2 天 $10^{-8}$ M 1,25 $(OH)_2D_3$ 组的阳性细胞表达率同正常组相比较，$P>0.05$，无显著性意义。第 3 天的 Cyclin DI 阳性细胞表达率同对照组相比较，$P<0.05$。第 4 天、第 5 天 Cyclin DI 阳性细胞表达率同对照组相比较，$P<0.01$。有非常显著意义。

表 3 Cylin DI 表达变化表(%)

| 时间(d) | 对照组 | | $10^{-8}$M 1,25$(OH)_2D_3$ 组 | |
|---|---|---|---|---|
| | 表达评分 | 表达百分率 | 表达评分 | 表达百分率 |
| 1 | 5.2±0.44 | 91.0±2.65 | 5.2±0.45 | 92.2 ± 4.14 |
| 2 | 5.1±1.01 | 92.6±2.70 | 3.6±0.55 | 80.13±13.70 |
| 3 | 5.0±1.00 | 90.4±3.51 | 2.6±1.14* | 51.97±23.73* |
| 4 | 4.4±0.54 | 90.8±1.64 | 1.6±0.55* | 40.31±8.58** |
| 5 | 4.8±0.84 | 88.0±8.86 | 1.8±0.84** | 29.37±7.19** |

注：* 与对照组相比 $P<0.05$

** 与对照组相比 $P<0.01$

2.4 $10^{-8}$M 1,25$(OH)_2D_3$ 组不同作用时间的细胞凋亡和 Cyclin DI 表达的动态关系

细胞凋亡和 Cyclin DI 表达分别在第 1 天为 0 及 92.2%、第 2 天为 11.02% 及 80.13%、第 3 天为 10.5% 及 51.97%、第 4 天为 16.09% 及 40.31%、第 5 天为 17.14% 及 29.37%。提示细胞凋亡和 Cylin DI 表达呈负相关。

## 3 讨 论

Cyclin DI 是细胞周期 G1 期合成的调节因子，在细胞由 G1 期过渡到 S 期的过程中起重要的调节作用[4]。Michalides[5]等对 248 例乳癌病人进行研究发现雌激素受体同 Cyclin DI mRNA 的表达有直接的相关性。一些研究发现 Cyclin DI 在雌激素依赖性乳癌中，对上皮细胞的增生有调节作用，认为 Cyclin DI 是雌激素促进乳癌上皮细胞增生的遥控因子[6]。但还没有关于在雌激素受体阴性的乳癌中 Cyclin DI 与凋亡关系的报道。

本研究发现 Cyclin DI 在雌激素受体阴性的乳癌细胞株 MDAMB－435s 中阳性表达率为 92.2%。在 1,25$(OH)_2D_3$ 作用下其凋亡率逐渐增加，而 Cyclin DI 的表达逐渐降低，Cyclin DI 的表达与肿瘤细胞的凋亡呈负相关。从 TUNEL 法测定的凋亡结果可以看出，在最佳药物浓度 $10^{-8}$M 1,25$(OH)_2D_3$ 作用下，随药物作用时间的延长，肿瘤细胞凋亡百分率增加，Cyclin DI 在细胞内合成逐渐降低，肿瘤细胞增长被抑制。揭示对 Cyclin DI 的检测可以反应雌激素受体阴性乳癌的细胞凋亡情况，为临床评价乳癌(无论雌激素受体是否阳性)的治疗效果提供新指标，从而起到指导化疗的作用。

## 参 考 文 献

[1] Sauter ER, Nesbit M, Litwin S, et al. Antisense Cyclind Dl induces apoptosis tumor shrinkage in human squamous carcinomas[J]. Cancer Research, 1999; 59: 4876－4881.

[2] Sabbah M, Courilleau D, Metster J, et al. Estrogen induction of the Cyclin Dl promoter: involvement of a cAMP response－like elemnt[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1999; 96: 11217－11222.

[3] 张 静，姚檬祥. 1,25 二羟维生素 $D_3$ 对乳腺癌细胞株生长及凋亡的影响[J]. 中华外科杂志，1999; 37: 497－499.

[4] Pardee AB. GI events and regulation of cell proliferation [J]. Science, 1989; 246: 603－608.

[5] Michalides R. Cell cyclie regulators: mechanisms and their role in aetiolgy, prognosis, and treatment of cancer[J]. J Clin pathol, 1999; 52: 555－568.

[6] Michalides R, Hageman P, Van Tinteren H, et al. A clinicopathological study on overexpression of Cyclin Dl and of p53 in a series of 248 with operable breast cancer [J]. Br J Cancer, 1996; 73: 728－734.