维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号：0253-3626(2001)02-0151-03

TUNEL法检测ER$^{(-)}$乳癌细胞凋亡和Ki-67表达的研究

刘大川，姚榛祥

（重庆医科大学临床学院普外科 重庆 400016）

【摘 要】目的：探讨雌激素受体阴性乳癌细胞中Ki-67与细胞凋亡之间的关系。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-435s凋亡，采用MTT法检测细胞增殖情况，TUNEL法检测细胞凋亡指数，免疫组化法检测Ki-67阳性表达指数，进行相关性分析。结果：在10^{-8}mmol/L 1,25$(OH)_2D_3$诱发MDA-MB-435s凋亡过程中，肿瘤细胞凋亡指数与Ki-67阳性表达指数呈负相关。结论：对凋亡指数及Ki-67阳性表达指数的综合分析，可全面反映细胞凋亡和增殖的平衡状态，对于判断肿瘤细胞的增生具有参考价值。

【关键词】1,25$(OH)_2D_3$；雌激素受体阴性；MDA-MB-435s；凋亡；Ki-67

【中国图书分类法分类号】R737.9；R655.8 【文献标识码】A 【收稿日期】2000-10-20

Study of the expression of Ki-67 and apoptosis tested by TUNEL in the ER$^{(-)}$ breast cancer cell line

LIU Da-chuan, et al

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

【Abstract】 *Objective*: To test the relationship between Ki-67 index and apoptosis in the ER$^{(-)}$ breast cancer cell line. *Methods*: Apoptosis was induced by 1,25$(OH)_2D_3$ in the ER$^{(-)}$ breast cancer cell line. We compared the cell number by MTT, determined quantitatively apoptosis cells by TUNEL, and detected the expression of Ki-67 index immunohistochemically. *Results*: The expression of the Ki-67 index was decreased during apoptosis that induced by 10^{-8}mmol/L 1,25$(OH)_2D_3$ in MDA-MB-435s cell line, there was negative correlation between the apoptosis and the expression of Ki-67 index. *Conclusion*: A comprehensive analysis of the apoptosis and Ki-67 index reflected the balance of proliferation and apoptosis.

【Key words】1,25$(OH)_2D_3$; ER$^{(-)}$; MDA-MB-435s; Apoptosis; Ki-67

Ki-67是细胞的核增殖抗原[1]，反映细胞的增殖情况。本研究以具有促进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[2]，进行原位DNA末端标记，计算凋亡细胞指数，通过与Ki-67表达的对比，进一步明确在雌激素受体阴性乳癌细胞中增殖与凋亡的关系。

1 材料与方法

1.1 材料

乳癌细胞株MDA-MB-435s：购于中科院上海细胞生物研究所。

RPMI 1640（Hyclone）

1,25$(OH)_2D_3$（Sigma）

DAB显色试剂盒（中山公司）

TUNEL法凋亡检测试剂盒（Roche, Germany）

免疫组化试剂盒(Maxim Biotech, Inc. USA)

Ki-67单抗（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160U/L胰岛素、10%胎牛血清的 RPMI 1640完全培养基中，培养条件为：37℃，5%CO_2，100%湿度，待细胞刚刚长满培养瓶底部时，0.125%胰酶消化成单个细胞，继续传代。将其配成2×10^4个/ml细胞悬液，并分为4组，A：正常对照组，B：10^{-7}mmol/L 1,25$(OH)_2D_3$组，C：10^{-8}mmol/L 1,25$(OH)_2D_3$组，D：10^{-9}mmol/L 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 TUNEL法原位检测细胞凋亡

2×10^5个/ml细胞悬液接种于预置盖玻片的24孔板中，

作者介绍：刘大川（1970- ），男，辽宁锦州人，住院医师，博士研究生

主要研究方向：乳腺疾病基础与临床研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

将细胞分为3组。A: 正常对照组、B: 10^{-7}mmol/L 1,25$(OH)_2D_3$组、C: 10^{-8}mmol/L1,25$(OH)_2D_3$组、每组设8个平行对照。分别于加入不同浓度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Ki-67

2×10^5个/ml细胞悬液接种于预置盖玻片的24孔板中、将细胞分为2组。A:正常对照组、B:10^{-8}mmol/L1,25 $(OH)_2D_3$组、每组设8个平行对照。分别于加入不同浓度1,25$(OH)_2D_3$后1天、2天、3天、4天、5天取出盖玻片、按试剂盒说明作免疫组化染色并计数。

1.3 统计处理

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周期和凋亡率、秩和检验法比较Ki-67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法检测结果见表1。10^{-5}mmol/L1,25$(OH)_2D_3$组第2天表现出抑制肿瘤细胞的生长、随时间的延长、抑制肿瘤细胞生长的作用更加明显、而10^{-7}

表1 1.25$(OH)_2D_3$及作用时间对细胞生长的影响（Ab）

时间 (d)	正常对照组	1,25$(OH)_2D_3$浓度分组		
		10^{-7}mmol/L D_3	10^{-8}mmol/L D_3	10^{-9}mmol/L D_3
1d	0.51±0.02	0.50±0.09	0.53±0.18	0.62±0.21
2d	0.67±0.01	0.53±0.14	0.47±0.08*	0.64±0.12
3d	0.53±0.15	0.52±0.05	0.39±0.03**	0.70±2.10
4d	0.57±0.32	0.45±0.08*	0.33±0.04**	0.64±0.11
5d	0.64±0.34	0.40±0.09**	0.28±0.05**	0.60±0.13

* 与对照组相比 $P<0.05$，** 与对照组相比 $P<0.01$

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

* 与对照组相比 $P<0.05$

** 与对照组相比 $P<0.01$

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

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

表3 Ki-67表达变化(%)

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
1d	4.75±0.46	78.62±17.73	3.25±1.04*	53.11±18.71*
2d	4.25±0.27	73.31±16.58	2.75±0.89**	42.10±14.99**
3d	3.85±0.87	69.71±14.31	1.25±0.46**	15.84±6.64**
4d	4.15±0.35	72.69±13.57	1.65±0.52**	21.57±5.35**
5d	3.75±0.33	68.52±9.33	1.38±0.52**	17.84±3.79**

* 与对照组相比 $P<0.05$、** 与对照组相比 $P<0.01$

维普资讯 http://www.cqvip.com

mmol/L $1,25(OH)_2D_3$组在第4天才出现细胞生长抑制。10^{-8}mmol/L $1.25(OH)_2D_3$组是最适药物浓度组。

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}mmol/L $1,25(OH)_2D_3$组同正常组相比，$P<0.01$，同10^{-7}mmol/L $1.25(OH)_2D_3$组相比，$P<0.05$。第2天，10^{-9}mmol/L $1.25(OH)_2D_3$组同正常组及10^{-7}mmol/L $1,25(OH)_2D_3$组相比，$P<0.01$。第3天，10^{-7}mmol/L $1,25(OH)_2D_3$组、10^{-8}mmol/L $1,25(OH)_2D_3$组同正常组相比，$P<0.01$。第4天，第5天10^{-8}mmol/L组同10^{-7}mmol/L组凋亡百分数相比，$P<0.01$。说明10^{-8}mmol/L $1,25(OH)_2D_3$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，且呈时间依赖性。

2.3 免疫组化检测Ki-67阳性细胞百分率

采用半定量方法对Ki-67阳性细胞进行评价。（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）根据染色的强度评分：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。同时计数阳性细胞表达指数，见表3。第1天10^{-8}mmol/L $1,25(OH)_2D_3$组Ki-67的阳性表达指数同对照组相比$P<0.05$，第2天、第3天、4天、5天，$P<0.01$。

3 讨 论

本研究采用的DNA断裂位点的3'-羟基末端标记法结合组织化学方法，可以准确定位，有利于发现凋亡发生中早期的DNA断裂[3]，本法较形态学标准，可发现更多的凋亡细胞，凋亡指数也相对提高可更准确反映凋亡程度[4]。Ki-67是核增殖抗原，它在细胞周期的G_1、S、G_2、M表达，静息期不表达[5]，由于Ki-67在细胞活动周期的广泛表达性，通过对Ki-67的检测可以反映肿瘤细胞的增殖活性。研究发现Ki-67在雌激素受体阴性的乳癌细胞株MDA-MB-435s中阳性表达率为78.62%。在$1,25(OH)_2D_3$作用下MDA-MB-435s的凋亡率逐渐增加，Ki-67的表达逐渐降低，Ki-67的弱表达与MDA-MB-435s细胞的凋亡呈负相关。

细胞的增殖和凋亡是反映细胞生长状态的两个方面，无论是对Ki-67的免疫组化检测还是Tunel法的凋亡检测均不能反映细胞的增殖状况，只有Ki-67指数及凋亡指数的联合检测可以反映细胞增殖和凋亡程度，对于临床动态观察肿瘤细胞生长变化，判断其复发和预后具有临床价值。

参 考 文 献

[1] Mastronardi L, Guiducci A, Puzzilli F, et al. Relationship between Ki-67 labeling index and survival in high-grade glioma patients treated after surgery with tamoxifen[J]. J Neurosurg Sci, 1999; 43(4):263-270.

[2] 张 静，姚榛祥. 1,25二羟维生素D3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.

[3] Sgone R, Wick G. Methods for the detection of apoptosis [J]. Int Arch Allergy Immunol, 1994;105:327-332.

[4] Kerr JFR, Winterford CM, Harmon BN. Apoptosis : its significance in cancer and cancer therapy[J]. Cancer, 1994;73: 2013-2026.

[5] Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the know and the unkonw[J]. J Cell Physiol, 2000;182(3): 311-322.