

三苯氧胺治疗乳腺癌分子机制及其与 CDK4、PCNA 的关系

李良强

泉州市第一医院, 福建 泉州 362300

摘要:目的: 探究三苯氧胺治疗乳腺癌分子机制及其与 CDK4、PCNA 周期的关系。方法: 采用流式细胞仪检测三苯氧胺 (TAM) 作用的 ER (-) 小鼠乳腺癌 MA782 细胞的细胞凋亡率与细胞周期分布; 采用免疫法检测 CDK4、PCNA 蛋白的表达量变化情况, 并使用病理图像软件进行半定量分析; MTT 法检测细胞增殖的活性。结果: 2 μ mol/L TAM 组未见凋亡峰, S 期、G0/G1 未见明显变化; 浓度 6、10 μ mol/L TAM 组有凋亡峰, 且凋亡率、S 期、G0/G1 期与对照组相比, $P < 0.05$; MTT 检测显示, 2 μ mol/L 浓度的 TAM 作用于细胞后 48h 发生细胞生长抑制不明显, 72h 后变化明显; 6 μ mol/L 浓度的 TAM 在 2 天后发生显著性差异, $P < 0.01$; 10 μ mol/L 浓度的 TAM 在 1 天后发生显著性差异, $P < 0.01$; PCNA 免疫组织化学染色: 半定量分析平均灰度值 149.1, 判定为强阳性。2 μ mol/L TAM 作用 72h 后恢复值下降至 108.25, 于对照组相比 $P < 0.01$ 。剩余两组分别在 48h、72h 后, 平均灰度值下降最明显, 与对照组相比 $P < 0.01$; CDK4 蛋白半定量分析结果: 半定量分析平均灰度值 107.2, 不同时间 2 μ mol/L TAM 作用细胞染色结果无差异性, $P > 0.05$; 6、10 μ mol/L TAM 作用细胞 48h、72h 后的灰度值明显下降, 与对照组相比有明显差异, 两个时间段相比也有差异性, $P < 0.01$ 。结论: AM 对 ER 阴性乳腺癌细胞有明显的生长抑制和诱导凋亡作用, 这个作用可以通过 TAM 下调 PCNA、CDK4 蛋白量完成。

关键词: 三苯氧胺; 乳腺癌; 分子机制; CDK4; PCNA

三苯氧胺 (TAM) 是一种非甾体抗雌激素药物, 使用后能够与雌二醇竞争特异性受体结合, 从而形成抗激素受体复合物, 这种复合物的活性较低, 可以降低恶性肿瘤细胞的活性, 达到最终抗肿瘤的目的^[1]。TAM 是现阶段治疗乳腺癌的一线药物。但是近些年来临床对于 TAM 诱导 ER 阳性乳腺癌病细胞凋亡的研究逐渐加深, 但是关于 TAM 对于 ER 阴性乳腺癌细胞的研究相对较少, 特别是分子机制方面的研究更是非常少^[2]。本文就对 TAM 治疗乳腺癌分子机制及其与 CDK4、PCNA 的关系, 现将结果做出如下报告:

1 材料与方法

1.1 细胞收集

本次研究中使用的 MA782 细胞株来自武汉大学中国典型培养物保藏物中心, 将培养基中放入 10% 小牛血清、100U/ml 青霉素、0.2U/ml 胰岛素、100 μ g/ml 链霉素的培养基中, 将其置入恒温恒湿的培养箱中, 温度调节至 37 $^{\circ}$ C。

1.2 主要仪器和试剂

TAM; 培养基; 噻唑兰; 小牛血清; ER、CDK4、PCNA 小鼠抗单克隆抗体, DAB、SABC 试剂盒; 流式细胞仪; 酶标仪。

1.3 MTT 法检测 TAM 细胞毒性作用

使用无水乙醇溶解 TAM, 将其配制为 1mmol/L 的浓缩液, 使用是加入培养液, 调整浓度为 2、6、10 μ mol/L。选择对数生长期细胞, 常规消毒后将其接种于 96 孔培养板中, 24h 后按照实验需求加入 180 μ l TAM 培养液, 对照组中添加等量培养基, 在加药后的 24、48、72、96h 分别加入 5mg/ml MTT 20 μ l, 4h 后培养液去除, 每孔中加入 150 μ l DMSO, 同时设置只有 DMAO 没有细胞的空白对照组, 充分振荡 10min 后, 使用酶标仪检测吸光值。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期分布和凋亡率

将对数生长期调整密度后接种在 50ml 培养瓶内, 24h 后加入不同浓度的 TAM 培养液, 空白对照组加入培养基, 在加药后 24h、48h 常规消化, PBS 洗涤、离心两次后, 使用 70% 的冷乙醇固定过夜, 在使用 PBS 将固定液洗掉, 添加 1ml 碘化丙啶染色液, 将其置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱内 30min 使用流式细胞仪检测。

1.5 免疫法及判断标准

取对数生长细胞, 调整细胞密度后将其接种在载玻片的培养皿内, 24h 后添加不同浓度的 TAM 的培养液, 对照组加入培养基, 在加药后的 48、72h 停止培养, 使用 PBS 冲洗, 在用 95% 乙醇固定 15min, 所有染色步骤都严格按照试剂盒的说明进行操作, ER 只做对照组。结果判断: MA782 细胞核和/或细胞质为棕褐色者为阳性, 高倍视野下随机抽取 4 个视野的细胞总数, 根据其中的阳性细胞计算阳性率。采用病理图像软件分析蛋白表达量。

1.6 统计学方法

使用软件 SPSS23.0 对数据进行分析, 计量资料, 用 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 属于计数资料, 用 (n, %) 表示; 当 $P < 0.05$ 时, 提示比较存在意义。

2 结果

2.1 雌激素受体鉴定

对 ER 鼠抗体单克隆抗体的几免疫细胞化学染色结果显示: 淡黄色, 颗粒小小且细, 分布疏散, 细胞阳性率低于 5%, 能够判断 MA782 细胞 ER 为阴性。

2.2 细胞周期与凋亡率

三种不同浓度 TAM 作用于 MA782 细胞上, 经流式细胞仪检测显示 2 μ mol/L TAM 组未见凋亡峰, S 期、G0/G1 未见明显变化; 浓度 6、10 μ mol/L TAM 组有凋亡峰, 且凋亡率、S 期、G0/G1 期与对照组相比有明显统计学意义, $P < 0.05$, 见表 1。

表 1 三种浓度 TAM 作用细胞 24h FCM 检测结果

TAM (μ mol/L)	凋亡率	G0/G1	S	G2/M
0	0	19.82	80.15	0
2	0	20.88	79.23	0
6	7.05	35.72	64.13	0.17
10	19.05	35.15	64.85	0

2.3 TAM 对 MA782 细胞的生长抑制作用

MTT 检测显示, 2 μ mol/L 浓度的 TAM 作用于细胞后 48h 发生细胞生长抑制, 但是与对照组无统计学差异, $P > 0.05$; 作用 72h 后, 差异显著, $P < 0.05$; 6 μ mol/L 浓度的 TAM 在 2 天后发生显著性差异, $P < 0.01$; 10 μ mol/L 浓度的 TAM 在 1 天后发生显著性差异, $P < 0.01$ 。且随着时间的推移, 细胞存活率不断下降。

2.4 PCNA 免疫组织化学染色结果

胞核着色, 对照组为明显的深棕褐色, 半定量分析平均灰度值 149.1, 判定为强阳性。2 μ mol/L TAM 作用 72h 后恢复值下降至 108.25, 于对照组相比有统计学意义, $P < 0.01$ 。剩余两组分别在 48h、72h 后, 平均灰度值下降最明显, 与对照组相比有统计学意义, $P < 0.01$, 见表 2。

表 2 PCNA 免疫组织化学染色结果 ($\bar{x} \pm s$)

药物浓度	培养时间 48h	培养时间 72h
0	149.1 \pm 0.08	107.21 \pm 0.06
2	143.52 \pm 0.04	104.85 \pm 0.05
6	1.25 \pm 0.15 [△]	76.25 \pm 0.04 [○]
10	83.45 \pm 0.09 [△]	72.31 \pm 0.05 [○]

注: Δ 代表与对照组相比, $P < 0.01$; \circ 代表相同剂量组 48h 与 72h 对比, $P < 0.01$ 。

2.5 CDK4 蛋白半定量分析结果

核、浆着色, 半定量分析平均灰度值 107.2, 不同时间 2 $\mu\text{mol/L}$ TAM 作用细胞染色结果无差异性, $P > 0.05$; 6、10 $\mu\text{mol/L}$ TAM 作用细胞 48h、72h 后的灰度值明显下降, 与对照组相比有明显差异, 两个时间段相比也有差异性, $P < 0.01$, 见表 3。

表 3 CDK4 蛋白半定量分析结果 ($\bar{X} \pm s$)

药物浓度	培养 48h	培养 72h
0	107.10 \pm 0.08	107.32 \pm 0.06
2	106.85 \pm 0.05	103.75 \pm 0.05
6	91.25 \pm 0.13 [△]	76.25 \pm 0.04 [○]
10	83.52 \pm 0.07 [△]	72.05 \pm 0.05 [○]

注: △代表各剂量与对照组相比, $P < 0.01$; ○相同剂量组 48h 和 72h 对比, $P < 0.05$ 。

3 讨论

有学者认为肿瘤属于细胞周期性疾病, 细胞周期紊乱是促进肿瘤发生、发展的重要因素^[3]。细胞周期是被细胞周期调控网络系统控制的, 该系统中有细胞周期素-细胞周期蛋白依赖性激酶 (CDKS)-细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 (CKIS)。CDKS 是核心, 细胞周期素进行正性调控, 而 CKIS 进行负性调控^[4]。若细胞受到生长信号的刺激, 细胞周期素的表达会上调, 激活 CDKS, 造成 pRB 磷酸化, 进而释放核转录因子 E2F, 引起与 S 期有关的分析表达, 促进细胞完成 DNA 复制^[5]。PCNA 也是一种细胞周期素, 但是它不能与 CDKS 结合, 属于 DNA 聚合酶 S 的辅助蛋白, 能够提高 DNA 聚合酶的延伸能力^[6]。PCNA 在正常组织中的表达非常低或不表达, 但是在

癌症组织细胞中却明显升高。通过本次研究结果显示, TAM 对 ER 阴性乳腺癌细胞有明显的生长抑制和诱导凋亡作用, 这个作用可以通过 TAM 下调 PCNA、CDK4 蛋白量完成, 在 TAM 浓度超过 2 $\mu\text{mol/L}$ 时表现更加显著, 且随时间和剂量增加而增加^[7]。

参考文献

[1] 吴建芳. 三苯氧胺治疗乳腺癌分子机制及其与 CDK4、PCNA 的关系[J]. 青海医学院学报(4): 234-237.
 [2] 张瑾, 张晶红, 刘艳, et al. 乳腺癌 Her-2 过表达与内分泌状态对患者三苯氧胺治疗敏感性的观察[J]. 中华医学杂志, 2007, 87(46): 3268-3271.
 [3] 李芮, 薛东华, 商雪纯, et al. 解毒胶囊对乳腺增生大鼠 PCNA 和 Bcl-2 表达影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018(5): 155.
 [4] 贾莹莹, 张治业, 郭艳珍. 来曲唑在激素受体阳性晚期乳腺癌患者内分泌治疗中的疗效观察[J]. 药品评价, 2019(11): 89.
 [5] 刘寨东, 王海媚, 朱雪莹. 疏肝解郁方联合三苯氧胺治疗乳腺癌及对肿瘤标志物水平影响[J]. 辽宁中医药大学学报, 2018(9): 88.
 [6] 宋泽军. 曲妥珠单抗联合三苯氧胺治疗雌激素受体及人表皮生长因子受体 2 阳性晚期乳腺癌的效果观察[J]. 中国基层医药, 2018, 25(11): 1424-1427.
 [7] 李山岭. 来曲唑用于绝经后期乳腺癌治疗的疗效分析[J]. 湖北民族学院学报(医学版), 2018, 35(2): 101-102.