

doi:10.3969/j.issn.1000-9760.2011.01.006

1,25-二羟维生素 D₃ 联合塞来昔布 对乳腺癌细胞株 HS578T 增殖的影响*

何雪琦¹ 史志涛² 鲍扬漪^{3△}

(¹ 济宁医学院临床学院, 山东 济宁 272067; ² 济宁医学院附属医院, 济宁 272029; ³ 合肥市第一人民医院, 安徽 合肥 230000)

摘要 目的 研究 1,25-二羟维生素 D₃[1,25(OH)₂D₃]联合塞来昔布对乳腺癌细胞株 HS578T 生长的影响。方法 采用四唑氮蓝比色(MTT)法检测细胞增殖,免疫组化法检测 Ki-67 表达变化。结果 10⁻⁷mol/L、10⁻⁸mol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 及塞来昔布(50μmol/L)均可抑制乳腺癌细胞增殖,呈时间与剂量依赖性。免疫组化结果显示各药物处理组细胞 Ki-67 表达率与对照组比较明显减低。结论 1,25(OH)₂D₃ 对 HS578T 细胞的体外增殖具有抑制作用,联合塞来昔布具有协同作用。

关键词 1,25-二羟维生素 D₃; 塞来昔布; 乳腺肿瘤; 细胞增殖

中图分类号:R730.53 文献标志码:A 文章编号:1000-9760(2011)02-017-03

The effect of combined treatment of 1,25(OH)₂D₃ and Celecoxib on the growth of breast cancer cell line HS578T

HE Xue-qi, SHI Zhi-tao, BAO Yang-yi

(Clinical Department, Jining Medical University, Jining 2720067, China)

Abstract: Objective To study the effects of combined 1,25-dihydroxyvitamin D₃[1,25(OH)₂D₃]and Celecoxib on the proliferation in breast cancer cell line HS578T. **Methods** We compared cell numbers by using MTT method, The expression of Ki-67 was detected by immunohistochemical method. **Results** Incubation with 10⁻⁷mol/L and 10⁻⁸mol/L 1,25(OH)₂D₃, Hs578T cells exhibited significant growth inhibition. The immunohistochemical staining showed that the expression rate of Ki-67 protein was down-regulated in any treatment group compared to normal group. **Conclusion** 1,25(OH)₂D₃ and Celecoxib could inhibit the proliferation and induce apoptosis of breast cancer cell line HS578T.

Key words: 1,25-dihydroxyvitaminD₃; Celecoxib; Breast cancer; Cell proliferation

最新研究显示,1,25(OH)₂D₃ 不但参与体内钙、磷代谢的调节和维持内环境稳定,而且对细胞的增生和分化具有一定调节作用。研究发现在多种恶性肿瘤中均发现维生素 D 受体(Vitamin D Receptor, VDR)表达,认为 1,25(OH)₂D₃ 与 VDR 结合可抑制肿瘤细胞的增殖并促进细胞分化。然而,1,25(OH)₂D₃ 抗肿瘤活性须超生理浓度,临床 I 期研究表明每日给予 8~10μg 1,25(OH)₂D₃ 治疗恶性肿瘤均出现高钙血症,无法继续增加剂量以达到抗肿瘤浓度(>1nmol/L)^[1]。目前已经确认

乳腺癌形成与恶性组织中环氧酶(Cyclooxygenase-2, COX-2)表达增加有关^[2],而 COX-2 抑制剂能够有效终止环氧酶的活性。本研究采用体外细胞培养方法,采用高度表达 VDR 及 COX-2 受体、且雌激素受体(estrogen receptor, ER)与孕激素受体(progesterone receptor, PR)阴性、具有高度侵袭性行为的乳腺癌细胞株 HS578T,研究 1,25(OH)₂D₃ 联合塞来昔布对细胞增殖的影响。

1 材料和方法

1.1 材料

HS578T 细胞株购自中科院上海细胞库;1,25(OH)₂D₃ 由罗氏公司赠送,10μg 1,25(OH)₂D₃

* 合肥市科技局重点立项项目(编号:合科 2007 第 15 号)

△[通信作者]鲍扬漪, E-mail: baoyiyi@yahoo. com. cn

溶于无水乙醇配置成 10^{-4} mol/L 母液;塞莱昔布由辉瑞公司赠送,溶于二甲亚砜(DMSO)配置成 10^{-1} mol/L 母液;阿霉素溶于生理盐水配置成 0.5mg/ml 母液,-20℃保存;MTT、胰酶、DMSO 购于 Sigma 公司;DMEM 高糖培养基购于 HyClone 公司;小牛血清购于杭州四季青公司。

1.2 方法

1.2.1 实验分组 细胞对照组、阿霉素对照组、1, 25(OH)₂D₃ (10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L) 处理组、塞莱昔布 (50μmol/L) 处理组、1, 25(OH)₂D₃ 与塞莱昔布联合处理组 [1, 25(OH)₂D₃ 与塞莱昔布交替给药]。

1.2.2 细胞培养 将乳腺癌细胞株 HS578T 培养在含有 10% 灭活小牛血清、100U/ml 青霉素、100U/ml 链霉素的 DMEM 高糖培养基中。培养条件为: 37℃, 5% 的 CO₂, 湿度为 100%。用 0.25% 胰酶消化传代。

1.2.3 四唑氮蓝比色 (MTT) 法检测细胞增殖 取对数生长期的细胞 (细胞密度为 10^4 /ml), 接种于 96 孔培养板 (每孔 200μl) 中, 待细胞长成单层后, 把培养液换成培养基以及不同药物、分别培养 1、2、3、4d。每孔再加入 MTT 20μl, 37℃ 培育箱放置 4h 后终止培养, 吸取培养孔内上清液, 每孔加入 100μl 二甲亚砜, 震荡摇匀, 酶标仪器上以波长 490nm 测定每孔吸光度 OD 值, 计算存活率 (存活率 = 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值 × 100%), 并绘制生长曲线。

1.2.4 SP 免疫组化法检测 Ki-67 表达变化 取对数生长期细胞 (细胞密度 10^5 /ml) 接种, 接种前预先在 6 孔培养板底铺盖玻片, 200μl/片, 待细胞长成单层后, 换含有 1, 25(OH)₂D₃ (10^{-7} mol/L)、塞莱昔布 (50μmol/L)、两药联合的培养基作用 48h, 取出盖玻片, 丙酮固定, 按照 SP 试剂盒说明书操作。

1.3 统计学处理

采用 SPSS11.0 统计软件分析。

2 结果

2.1 1, 25(OH)₂D₃ 联合塞莱昔布对 HS578T 生长的影响

1, 25(OH)₂D₃ 及塞莱昔布连续干预细胞生长 4d 后吸光度值较细胞对照组明显减低。 10^{-7} mol/L、 10^{-8} mol/L 的 1, 25(OH)₂D₃ 组分别在 48、72h 后细胞存活率与细胞对照组相比出现统计学差异

($P < 0.01$), 而且表现出时间、剂量依赖性。塞莱昔布对 HS578T 乳腺癌细胞株也具有抑制作用, 呈时间-效应关系, 在 48h 后细胞存活率与细胞对照组出现统计学差异 ($P < 0.01$)。然而 1, 25(OH)₂D₃ 联合塞莱昔布后细胞存活率较各单药组显著下降。但也从实验看出, 1, 25(OH)₂D₃ 联合塞莱昔布对细胞的抑制率不及萘环类抗肿瘤抗生素阿霉素。(见图 1、表 1)。

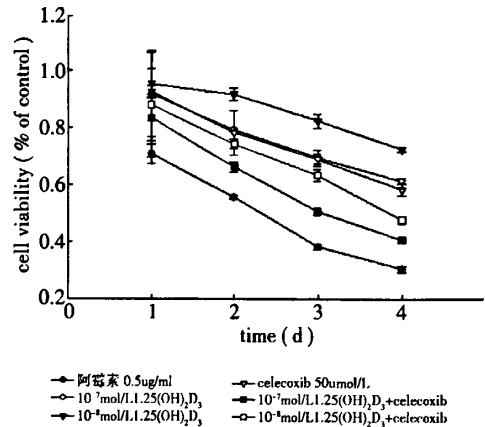


图 1 1, 25(OH)₂D₃ 联合塞莱昔布对细胞生长的影响

表 1 1, 25(OH)₂D₃ 联合塞莱昔布作用对 HS578T 细胞株生长的影响

组别	细胞存活率 (%)			
	24h	48h	72h	96h
细胞对照组	100	100	100	100
阿霉素组	70.9±3.3	55.5±0.5	38.3±0.9	30.5±1.1*
10 ⁻⁷ mol/L 1,25(OH) ₂ D ₃	91.7±1.5	79.1±0.5	69.4±2.8	61.3±1.1*★
10 ⁻⁸ mol/L 1,25(OH) ₂ D ₃	95.5±5.1	91.6±2.2	82.3±2.5	72.3±0.7*★▲
Celecoxib	92.7±2.2	78.3±7.8	69.0±1.7	58.2±2.1*★
10 ⁻⁷ mol/L 1,25(OH) ₂ D ₃ + Celecoxib	83.5±8.1	66.3±1.7	50.6±1.1	40.8±1.1*★▲●
10 ⁻⁸ mol/L 1,25(OH) ₂ D ₃ + Celecoxib	88.0±1.8	74.3±1.6	63.4±2.1	47.7±1.2*★◆☆

注: * 与细胞对照组比较, $P < 0.01$; ▲ 与 10^{-7} mol/L 的 1, 25(OH)₂D₃, $P < 0.01$; ★ 与阿霉素组比较 $P < 0.01$; ◆ 与 10^{-8} mol/L 的 1, 25(OH)₂D₃, $P < 0.01$; ● 与塞莱昔布比较 $P < 0.01$; ☆ 与 10^{-7} mol/L 1, 25(OH)₂D₃ + Celecoxib 组比较 $P < 0.01$ 。

2.2 Ki-67 表达的变化

Ki-67 阳性信号存于细胞核内, 呈棕黄色, 对照组阳性表达率为 87%, 药物处理后 Ki-67 表达明显降低 (图 2)。 10^{-7} mol/L 1, 25(OH)₂D₃ 处理组阳性表达率为 58%、塞莱昔布处理组为 45%, 两药联合组为 33% ($P < 0.05$)。

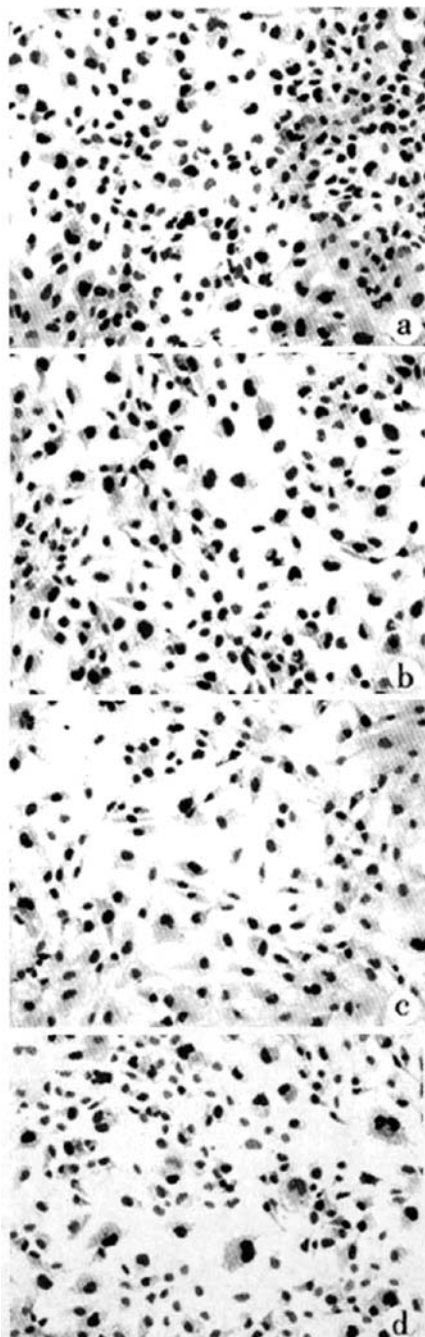


图 2 1,25(OH)₂D₃ 联合塞来昔布对 Ki-67 的影响(×200)
 a: 细胞对照组 b: 10⁻⁷ mol/L 1,25(OH)₂D₃ 组
 c: Celecoxib 组 d: 10⁻⁷ mol/L 1,25(OH)₂D₃ 联合塞来昔布组

3 讨论

虽然 1,25(OH)₂D₃ 及塞来昔布的抗癌作用

已得到初步证实,但以 1,25(OH)₂D₃ 联合塞来昔布作用于乳腺癌 HS578T 细胞株,尚未见相关报道。本实验发现 10⁻⁷ mol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 处理组在药物作用 48h 后表现出抑瘤活性。而 10⁻⁸ mol/L 的 1,25(OH)₂D₃ 在药物作用 72h 后才表现出抑瘤活性。在药物作用 96h 后,不同剂量的两组 1,25(OH)₂D₃ 间细胞存活率差异最为显著,1,25(OH)₂D₃ 表现出呈时间、剂量依赖性的抗肿瘤活性。

COX-2 是前列腺素合成酶,COX-2 过度表达增加 PG 产物,促进肿瘤的形成。COX-2 阳性表达的乳腺癌细胞系均为 ER、PR 阴性的具有高度侵袭性、高度恶性的细胞系^[3],提示 COX-2 可作为乳腺癌化学预防的靶的。本实验表明塞来昔布有效抑制高度表达 COX-2 的乳腺癌细胞增殖(图 1)。而在 1,25(OH)₂D₃ 与塞来昔布联合时显示出了协同作用,考虑与两药在阻滞细胞周期及诱导细胞凋亡方面机制不全相同而具有交叉协同作用。虽与葱环类抗肿瘤抗生素阿霉素相比抑瘤作用较弱,但相对毒副作用来讲,更容易让晚期乳腺癌患者所接受。

Welsh^[4]认为乳腺癌患者高龄、雌激素受体阴性与血清钙偏低有明显关联性,而且与处于不同期别的乳腺癌患者,血清钙含量随着期别的增加而显著降低,为 1,25(OH)₂D₃ 治疗乳腺癌奠定了理论基础。但临床试验发现 1,25(OH)₂D₃ 超生理剂量才具有抑制肿瘤的作用。该实验发现两药联合有望减少 1,25(OH)₂D₃ 及塞来昔布的用量,在降低高钙血症的发生率的同时也可减少塞来昔布的心血管毒性反应,为两药联合应用于临床奠定了一定的理论基础。

参考文献:

[1] Smith DC, Johnson CS, Freeman CC, et al. A Phase I trial of calcitriol (1,25-dihydroxycholecalciferol) in patients with advanced malignancy[J]. Clin Cancer Res, 1999, 5: 1339-1345.
 [2] Costa C. Cyclooxygenase 2 expression is associated with angiogenesis and lymph node metastasis in human breast cancer [J]. J Clin Pathol, 2002, 6: 429-434.
 [3] Gilhooly EM, Rose DP. The association between a mutated ras gene and cyclooxygenase-2 expression in human breast cancer cell lines[J]. Int J Oncol, 1999, 15: 267-270.
 [4] Welsh J. Vitamin D and breast cancer: insights from animal models[J]. Am J Clin Nutr, 2004, 80(6): 1721S-4S.

(收稿日期 2010-11-30)