

5种药物对乳腺癌细胞分化和增殖抑制作用的比较

曹义娟, 徐惠, 权斌, 胡方方, 刘小燕, 李云鹏, 杨亚茹
(东南大学医学院附属徐州医院, 江苏 徐州 221009)

摘要: [目的] 探讨全反式维甲酸(ATRA)、 $1\alpha, 25$ -二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽对乳腺癌细胞 MCF-7 分化诱导、细胞微环境、细胞增殖影响的差异。[方法] 油红 O 染色检测上述 5 种药物对 MCF-7 细胞分化诱导作用; 台盼蓝染色检测上述 5 种药物对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用。[结果] 5 种药物对 MCF-7 均有很强的分化诱导作用, 且呈剂量依赖性。在 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 时雷洛芬的分化诱导作用最强, 盐酸强力霉素、硫链丝菌肽、 $1\alpha, 25$ -二羟维生素 D₃ 次之。诱导形成的小脂肪滴经油红 O 染色, 显示相似颜色, 但高浓度药物诱导形成的大脂肪块染色后, 显示颜色的差异, ATRA 诱导形成的大脂肪块染色后显示鲜红色, 其他 4 种药物诱导形成的大脂肪块显示较暗的紫红色。脂肪块或脂肪滴主要位于细胞间质, 少部分位于胞浆。硫链丝菌肽对 MCF-7 增殖的抑制作用远强于其他 4 种药物。[结论] 5 种药物均可诱导 MCF-7 细胞分化, 改变细胞微环境。在 0.08 $\mu\text{mol/L}$ 时, 雷洛芬的分化诱导率最高, 盐酸强力霉素、硫链丝菌肽、 $1\alpha, 25$ -二羟维生素 D₃ 次之。它们所形成的脂肪滴成分可能相似, 但有所差异。硫链丝菌肽对 MCF-7 增殖的抑制作用远强于其他 4 种药物。

关键词: 分化; MCF-7; 细胞微环境; 增殖抑制作用

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2016)06-0452-05
doi: 10.11735/j.issn.1671-170X.2016.06.B004

Effects of Five Different Drugs on Differentiation Induction and Proliferation Inhibition of Breast Cancer Cell Line

CAO Yi-juan, XU Hui, QUAN Bin, et al.

(Affiliated Xuzhou Hospital of Medical School of Southeast University, Xuzhou 221009, China)

Abstract: [Objective] To investigate the effects of different drugs on differentiation induction and proliferation inhibition of breast cancer MCF-7 cells. [Methods] Human breast cancer MCF-7 cells were treated with ATRA, calcitriol, doxycycline, raloxifene or thioestrepton in vitro, respectively. The differentiation induction of MCF-7 cells was detected by Oil Red O staining. The cell proliferation was measured by trypan blue assay. [Results] The differentiation of MCF-7 was induced by all 5 drugs in a dose-dependent manner. Among 5 different drugs, raloxifene was the most effective inducer at 0.08 $\mu\text{mol/L}$, followed by doxycycline, thioestrepton and calcitriol. The induced lipid droplets showed similar color after Oil Red O staining. However, the lipid chunks accumulated by small lipid droplets induced by the above 5 different drugs at high concentrations showed different coloring after Oil Red O staining: the lipid chunks, induced by ATRA appeared to be bright red and the ones induced by other 4 drugs were dark purple. The lipid chunks or droplets were mainly located in the extracellular matrix, with few in cytoplasm. The proliferation inhibition of MCF-7 cells by thioestrepton was much stronger than that by other 4 drugs in a dose-dependent manner. [Conclusion] ATRA, calcitriol, doxycycline, raloxifene or thioestrepton can induce the differentiation of breast cancer MCF-7 cells with various degrees. Among 5 drugs, thioestrepton has the strongest effect on the proliferation inhibition of MCF-7 cells.

Subject words: differentiation; MCF-7; microenvironment; proliferation inhibition

乳腺癌是威胁妇女身体健康的主要疾病, 其中

大约 70% 是雌激素受体阳性(ER+)乳腺癌^[1], 其生长依赖于雌激素。通常使用的乳腺癌化疗药物包括阿霉素、顺铂、多柔比星、紫杉醇等。然而这些有效的抑制乳腺癌细胞增殖的药物, 都因为毒性大, 其使用受

通讯作者: 权斌, 副主任医师, 学士; 东南大学医学院附属徐州医院 外科, 江苏省徐州市解放南路 199 号 (221009); E-mail: 1472164106@qq.com

收稿日期: 2015-11-19; **修回日期:** 2016-02-29

到了限制,为此筛选毒性小、安全性大的抗乳腺癌药物具有重要的临床应用价值^[2]。近年来,全反式维甲酸(ATRA)、1 α ,25-二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽引起该研究领域的密切关注^[3-7]。

MCF-7 是 ER+乳腺癌细胞株,分化药物可以诱导 MCF-7 在细胞胞浆及胞外间质形成脂肪滴,改变了肿瘤细胞形态学结构及微环境。细胞形态的改变参与细胞支架蛋白重新分布,影响细胞的粘连能力,对细胞的侵袭和转移起着重要的作用。十多年前,科学家提出了组织结构领域理论 (tissue organization field theory, TOFT), 此理论认为肿瘤是一个可以逆转的过程, 肿瘤细胞与周围环境之间相互作用的改变可以逆转肿瘤表现型^[8]。微环境可以影响癌细胞编码,改变癌细胞的增殖和恶性行为^[9],参与肿瘤的发病与耐药^[10,11]。药物诱导的分化治疗被认为是清除肿瘤干细胞 (CSCs) 的有效治疗方法^[12-14],目前盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽对 MCF-7 的分化诱导作用在国内外尚未见报道。本实验首次揭示 ATRA、1 α ,25-二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽对 MCF-7 的分化诱导和增殖抑制作用的差异,为 ER+乳腺癌治疗提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 研究对象

MCF-7 为人乳腺癌 ER+细胞株,购自中国科学院上海生命科学研究院。

1.2 仪 器

CO₂ 培养箱(REVCO ELITE II)。

1.3 试 剂

DMEM 培养基、小牛血清、谷氨酰胺、青霉素/链霉素、胰岛素、0.25%胰酶-EDTA、ORO、Gills hematoxylin2、ATRA、1 α ,25-二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽购自于 Sigma 公司。ATRA、1 α ,25-二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽均溶于 DMSO, 制备其储存液, 分装储存于-80℃。

1.4 方 法

1.4.1 细胞培养

MCF-7 细胞用 10% FBS-0.01mg/ml 胰岛素 DMEM 培养基置于 37℃ 恒温、5%CO₂ 饱和湿度条件下培养, 待细胞铺满 80%时用 0.25%胰酶消化传

代,经 2~3 次传代至对数生长期进行实验。

1.4.2 油红 O 染色

接种 1.24 \times 10⁵ 对数生长期 MCF-7 细胞于 6 孔培养板内,24h 后, 换含上述 5 种药物的新鲜培养基, 它们的浓度分别为 0.08 μ mol/L、0.4 μ mol/L、2 μ mol/L、5 μ mol/L,对照孔加入等体积的 DMSO。3 天后换含相同浓度药的新鲜培养基,药处理细胞 5d 后 4%多聚甲醛固定 15min,PBS 洗 2 次,ORO 液体染细胞 15min,50%酒精冲洗 3 次。用 Gills hematoxylin2 染 1min,蒸馏水冲洗,显微镜下观察。脂肪呈红色,胞浆呈粉色,细胞核呈蓝色。药物诱导的分化百分比=(分化阳性细胞数/总细胞数) \times 100%。实验重复 3 次。

1.4.3 药物对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

MCF-7 细胞接种于 15cm 细胞培养皿,24h 后换含上述 5 种药物的新鲜培养基, 药物浓度分别为 0.08 μ mol/L、0.4 μ mol/L、2 μ mol/L,对照孔加入等体积的 DMSO。3d 后换含相同浓度药的新鲜培养基,药物处理细胞 5d 后,用 0.25%胰酶-EDTA 消化细胞,用台盼蓝染色细胞计数,实验重复 3 次。

1.4.4 统计学处理

采用 SPSS17.0 统计软件进行统计分析,计量资料经正态性检验为正态分布,用均数 \pm 标准差表示; 5 种药物之间同浓度的比较采取单因素方差分析,两两比较采用 LSD 检验;每种药物不同浓度采取单因素方差分析进行趋势检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 ATRA、1 α ,25-二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽对 MCF-7 的分化诱导作用

上述 5 种药物诱导的 MCF-7 分化百分比趋势 P 值 <0.001 。5 μ mol/L 时,硫链丝菌肽几乎杀死所有 MCF-7 细胞,ATRA 分化诱导率明显高于 1 α ,25-二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬($P<0.05$),雷洛芬分化诱导率明显高于 1 α ,25-二羟维生素 D₃ ($P<0.05$);2 μ mol/L 时, 硫链丝菌肽的分化诱导率最高 ($P<0.05$),ATRA 次之($P<0.05$);0.4 μ mol/L 时,ATRA、雷洛芬、硫链丝菌肽分化诱导作用较为显著 ($P<0.05$),这 3 者之间的差异无统计学意义($P>0.05$); 0.08 μ mol/L 时,ATRA 分化诱导率低于其他 4 种药

物 ($P < 0.05$)。在分化阳性细胞中, 药物诱导形成的大脂肪块阳性细胞所占比例随药物浓度的减少而减少, 而小脂肪滴分化阳性细胞所占比例随药物浓度的减少而增加。上述 5 种药物诱导形成的小脂肪滴经油红 O 染色, 显示相似颜色, 但大脂肪块染色后, 显示颜色的差异, ATRA 诱导形成的大脂肪块染色后显示鲜红色, 其他 4 种药物诱导形成的大脂肪块染色后显示较暗的紫红色。脂肪块和脂肪滴主要位于细胞间质, 少部分位于胞浆 (Figure 1~5, Table 1)。

2.2 ATRA、 $1\alpha, 25$ -二羟维生素 D₃、盐酸强力霉素、雷洛芬和硫链丝菌肽对 MCF-7 细胞增殖的抑制作用

0.4 $\mu\text{mol/L}$ 、2 $\mu\text{mol/L}$ 硫链丝菌肽对 MCF-7 增殖的抑制作用远强于其他 4 个药物 ($P < 0.05$), 盐酸强

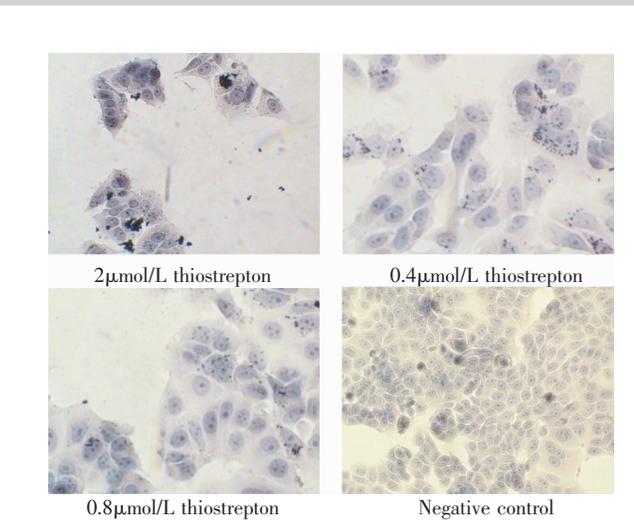
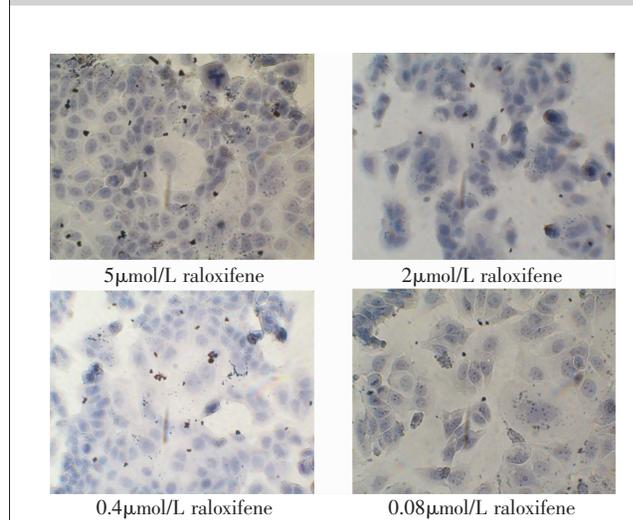
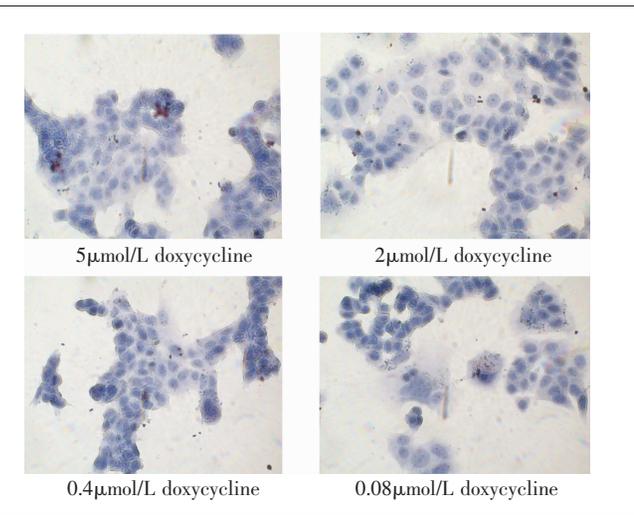
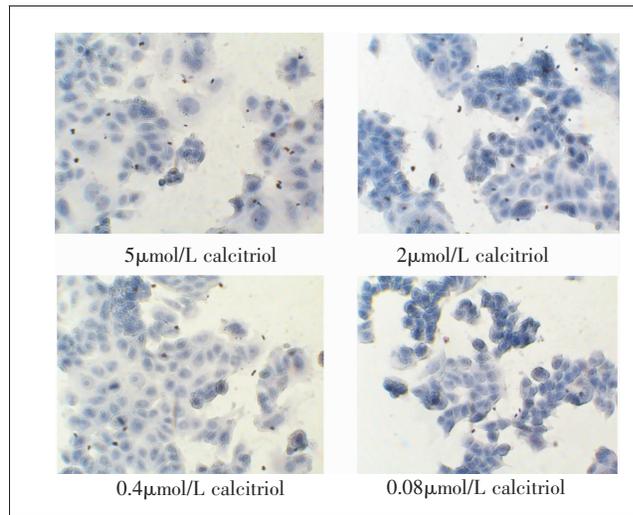
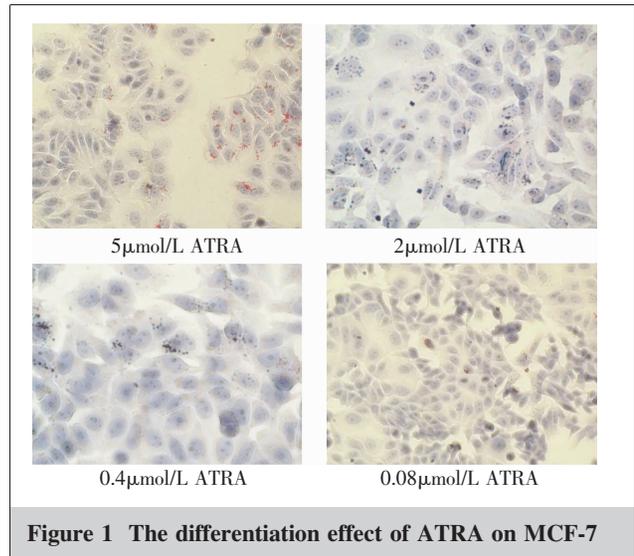


Table 1 The differentiation induction of drugs on MCF-7 measured by Oil Red O Staining

Drugs	Liquid droplet positive cell percentage(%)					F	P
	5 μ mol/L	2 μ mol/L	0.4 μ mol/L	0.08 μ mol/L	0 μ mol/L		
ATRA	65.3 \pm 3.8	40.9 \pm 2.1	26.3 \pm 2.0	8.5 \pm 0.6	2.1 \pm 0.4	388.2	<0.001
Calcitriol	25.1 \pm 3.1 ^a	17.7 \pm 2.7 ^a	16.8 \pm 2.0 ^a	13.6 \pm 2.8 ^a	2.1 \pm 0.4	36.90	<0.001
Doxycycline	28.0 \pm 2.5 ^a	30.2 \pm 3.6 ^{ab}	20.7 \pm 3.0 ^a	16.2 \pm 2.0 ^a	2.1 \pm 0.4	36.89	<0.001
Raloxifene	34.5 \pm 4.3 ^{ab}	25.4 \pm 3.1 ^{ab}	26.0 \pm 3.0 ^b	19.6 \pm 3.5 ^{ab}	2.1 \pm 0.4	89.09	<0.001
Thiostrepton	-	46.5 \pm 4.4 ^{abcd}	25.1 \pm 3.4 ^b	15.8 \pm 3.3 ^a	2.1 \pm 0.4	69.72	<0.001

Note: a, b, c and d: $P < 0.05$ in comparison with ATRA, calcitriol, doxycycline and raloxifene respectively.

Table 2 Proliferation inhibition of drugs on MCF-7

Drugs	Total cell numbers(10^7) at different drug concentrations				F	P
	2 μ mol/L	0.4 μ mol/L	0.08 μ mol/L	0 μ mol/L		
ATRA	0.99 \pm 0.04	1.20 \pm 0.03	1.23 \pm 0.04	1.24 \pm 0.04	120.83	<0.001
Calcitriol	1.13 \pm 0.03 ^a	1.22 \pm 0.03	1.23 \pm 0.06	1.24 \pm 0.04	12.61	<0.001
Doxycycline	0.85 \pm 0.04 ^{ab}	1.13 \pm 0.04 ^{ab}	1.21 \pm 0.04	1.24 \pm 0.04	205.67	<0.001
Raloxifene	0.91 \pm 0.04 ^{ab}	1.17 \pm 0.04	1.21 \pm 0.04	1.24 \pm 0.04	157.67	<0.001
Thiostrepton	0.20 \pm 0.03 ^{abcd}	0.77 \pm 0.04 ^{abcd}	1.20 \pm 0.04	1.24 \pm 0.04	1374.7	<0.001

Note: definitions of a, b, c and d were the same as Table 1.

力霉素次之。0.08 μ mol/L 时,各药物组细胞数无显著性差异($P > 0.05$)。MCF-7 经上述 5 种药物处理后细胞数的趋势 P 值 < 0.001 (Table 2)。

3 讨论

ATRA 是维生素 A 活性代谢产物, ATRA 及天然、合成的衍生物统称为视黄素, 大量科学文献 ($> 1\ 300$ 篇) 报道了视黄素对乳腺癌的治疗作用, 1 μ mol/L ATRA 能够分化乳腺上皮早期转化细胞, 调节乳腺癌 443 个相关基因的表达, 重新编码细胞^[3]。1 α , 25-二羟维生素 D3 是有活性的维生素 D 代谢产物, 它对许多恶性肿瘤, 包括乳腺癌有较强的抗增殖作用^[4]。盐酸强力霉素可根除多种不同肿瘤细胞株中肿瘤干细胞(CSCs), 预防肿瘤复发和远端转移, 其中包括乳腺癌 MCF-7 细胞^[5]。雷洛芬是第二代骨质疏松用药产品, 对雌激素受体有高度亲和力, 能够减少妇女绝经前后乳腺癌发病率 38%, 抑制 ER+ 乳腺癌细胞 MCF-7 的增殖^[6]。硫链丝菌肽是应用于动物皮肤局部感染处理的抗菌素, 近年来发现硫链丝菌肽对人肿瘤细胞有较强的抗增殖能力, FOXM1 是其抗肿瘤的靶基因, 它抑制 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞的生长^[7], 但它对非肿瘤细胞毒性非常低^[15]。

细胞膜内外周脂肪滴 (lipid droplet) 积聚, 是 MCF-7 细胞分化的标志物, 可采用油红 O 染色进行

定量测定^[16]。MCF-7 受药物诱导形成的脂肪滴主要分布于细胞膜外周, 少量位于胞浆, 这表明上述药物改变了细胞形态学结构及微环境。这 5 种药物在高浓度时, 均可诱导 MCF-7 细胞在细胞膜外周形成大的脂肪块, 在分化阳性细胞中, 大的脂肪块阳性细胞所占比例随药物浓度的减少而减少, 而小脂肪滴分化阳性细胞所占比例随药物浓度的减少而增加, 这表明脂肪滴通过微环境改变所发挥的抗癌作用呈剂量依赖性。0.08 μ mol/L 时 ATRA 诱导的分化百分比低于其他 4 种药物 ($P < 0.05$), 而 ATRA 是公认较好的分化诱导药物, 此结果表明这 5 种药物均为 MCF-7 较好的分化诱导剂, 其中雷洛芬的分化诱导百分比为最高, 硫链丝菌肽、盐酸强力霉素、1 α , 25-二羟维生素 D3 次之。诱导形成的小脂肪滴经油红 O 染色, 显示类似颜色, 而大脂肪块染色后, 显示颜色的差异, ATRA 诱导形成的大脂肪块染色后显示鲜红色, 其他 4 种药物诱导形成的大脂肪块显示较暗的紫红色, 表明上述 5 种药物诱导形成的脂肪滴或脂肪块成分可能相似, 但有所差异, 不同分化药物的分化诱导作用, 可能不完全取决于最终分化诱导百分比、脂肪块大小, 而且还与脂肪块成分有关。

在 2 μ mol/L、0.4 μ mol/L 时, 硫链丝菌肽对 MCF-7 的增殖抑制作用远高于其他 4 种药物。据报道硫链丝菌肽是叉头转录因子 (FOXM1) 的抑制剂, FOXM1 与肿瘤发展、化学耐药及 CSCs 增殖有关,

FOXM1 过度表达参与乳腺癌 CSCs 增殖,促进乳腺癌恶化和治疗抵抗基因的表达^[17];FOXM1 参与细胞增殖和凋亡,是促进进入 S 期、M 期的关键性细胞周期调节剂,其表达抑制推迟细胞的有丝分裂。“FOXM1 可能是肿瘤唯一致命的弱点”^[18]。本实验结果表明硫链丝菌肽通过负向调节 FOXM1,阻止细胞分裂,有效抑制 MCF-7 细胞增殖。本实验采用的是雌激素受体阳性细胞株 MCF-7,5 种药物的分化诱导和增殖抑制能力比较,仅仅针对于 MCF-7 细胞,对于恶性较高的 ER-乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 的分化诱导作用和增殖抑制作用,需另行研究。

综上所述,这 5 种药物在 0.08 μ mol/L 时均为 MCF-7 高分化诱导剂,其中雷洛芬分化诱导作用最强,硫链丝菌肽、盐酸强力霉素、1 α ,25-二羟维生素 D3 次之。硫链丝菌肽对 MCF-7 增殖的抑制作用远强于其他 4 种药物,为此,进一步加深硫链丝菌肽对乳腺癌治疗作用的研究具有重要的临床应用价值。

参考文献:

[1] Xiong R,Patel HK,Gutgesell LM,et al. Selective human estrogen receptor partial agonists (ShERPAs) for tamoxifen-resistant breast cancer[J]. *J Med Chem*,2016,59(1):219-237.

[2] Aseyev O,Ribeiro JM,Cardoso F. Review on the clinical use of eribulin mesylate for the treatment of breast cancer [J]. *Expert Opin Pharmacother*,2016,17(4):589-600.

[3] Arisi MF,Starker RA,Addya S,et al. All trans-retinoic acid (ATRA) induces re-differentiation of early transformed breast epithelial cells[J]. *Int J Oncol*,2014,44(6):1831-1842.

[4] Jeong Y,Swami S,Krishnan AV,et al. Inhibition of mouse breast tumor initiating cells by calcitriol and dietary vitamin D[J]. *Mol Cancer Ther*,2015,14(8):1951-1961.

[5] Lamb R,Ozsvari B,Lisanti CL,et al. Antibiotics that target mitochondria effectively eradicate cancer stem cells, across multiple tumor types: treating cancer like an infectious disease[J]. *Oncotarget*,2015,6(7):4569-4584.

[6] Kim DE,Kim Y,Cho DH,et al. Raloxifene induces autophagy-dependent cell death in breast cancer cells via the activation of AMP-activated protein kinase[J]. *Mol Cells*,2015,38(2):138-144.

[7] Wang M,Gartel AL. Combination with bortezomib en-

hances the antitumor effects of nanoparticle-encapsulated thiostrrepton[J]. *Cancer Biol Ther*,2012,13(3):184-189.

[8] Smythies J. Intercellular signaling in cancer-the SMT and TOFT hypotheses,exosomes,teocytes and metastases: is the messenger in the message[J]. *J Cancer*,2015,6(7):604-609.

[9] D'Anselmi F,Masiello MG,Cucina A,et al. Microenvironment promotes tumor cell reprogramming in human breast cancer cell lines[J]. *PLoS One*,2013,8(12):e83770.

[10] Zhang ST,Zhao WL. Tumor microenvironment in pathogenesis and drug resistance of non-Hodgkin's lymphoma [J]. *Chinese Journal of Hematology*,2014,35(5):466-469. [张晟婷,赵维莅. 肿瘤微环境与非霍奇金淋巴瘤的发病与耐药[J]. *中华血液学杂志*,2014,35(5):466-469.]

[11] Tan JJ,Liu W,Zu XY. Progress in relationship between tumor microenvironment and breast cancer development[J]. *Cancer Research on Prevention and Treatment*,2014,41(3):274-279. [谭晶晶,刘文,祖旭宇. 肿瘤微环境与乳腺肿瘤发生发展关系的研究进展[J]. *肿瘤防治研究*,2014,41(3):274-279.]

[12] Zhang L,Ren X,Cheng Y,et al. The NF κ B inhibitor, SN50,induces differentiation of glioma stem cells and suppresses their oncogenic phenotype[J]. *Cancer Biol Ther*,2014,15(5):602-611.

[13] Carnignani M,Volpe AR,Aldea M,et al. Glioblastoma stem cells: a new target for metformin and arsenic trioxide[J]. *J Biol Regul Homeost Agents*,2014,28(1):1-15.

[14] Yang M,Liu P,Huang P. Cancer stem cells,metabolism, and therapeutic significance [J]. *Tumour Biol*,2016.[Epub ahead of print]

[15] Chiu WT,Huang YF,Tsai HY,et al. FOXM1 confers to epithelial-mesenchymal transition,stemness and chemoresistance in epithelial ovarian carcinoma cells[J]. *Oncotarget*,2015,6(4):2349-2365.

[16] Vanella L,Tibullo D,Godos J,et al. Caffeic acid phenethyl ester regulates PPAR's levels in stem cells-derived adipocytes[J]. *PPAR Res*,2016,2016:7359521.

[17] Bergamaschi A,Madak-Erdogan Z,Kim YJ,et al. The forkhead transcription factor FOXM1 promotes endocrine resistance and invasiveness in estrogen receptor-positive breast cancer by expansion of stem-like cancer cells[J]. *Breast Cancer Res*,2014,16(5):436-453.

[18] Radhakrishnan SK,Gartel AL. FOXM1: the Achilles' heel of cancer[J]. *Nat Rev Cancer*,2008,8(3):c1.