

## 吉西他滨联合外照射诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡

李建璜<sup>1</sup>, 罗学港<sup>2,\*</sup>

( 中南大学 1. 湘雅医院肿瘤科, 长沙 410008 ; 2. 湘雅医学院解剖学与神经生物学系, 长沙 410078 )

[ 摘要 ] 目的 : 研究吉西他滨联合外照射诱导人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞产生凋亡的作用。方法 : 采用 MTT 法检测吉西他滨( D ), 外照射( R ), 吉西他滨和外照射( R + D ) 分别对 MCF-7 细胞的抑制作用, 流式细胞仪检测各组细胞凋亡指数, 电子显微镜观察 MCF-7 细胞凋亡的形态学特征。结果 : 细胞生长抑制率随吉西他滨作用浓度的增加而逐渐增大, ( R + D ) 组与 D 组及 R 组凋亡指数比较差异均有统计学意义(  $P < 0.05$  )。结论 : 吉西他滨能诱导人乳腺癌细胞产生凋亡, 并能明显增强放疗对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用。

[ 关键词 ] 乳腺癌 ; 吉西他滨 ; 外照射 ; 细胞凋亡

[ 中图分类号 ] R737.9 [ 文献标识码 ] A [ 文章编号 ] 1672-7347( 2006 )05-0710-04

## Apoptosis of breast cancer cell line MCF-7 cells induced by gemcitabine and radiation

LI Jian-huang<sup>1</sup>, LUO Xue-gang<sup>2,\*</sup>

( 1. Department of Oncology, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410078 ; 2. Department of Anatomy and Neurobiology, Xiangya School of Medicine, Central South University, Changsha 410078, China )

**Abstract :** **Objective** To investigate the apoptosis of human breast cell line MCF-7 cells induced by gemcitabine and radiation. **Methods** The MTT method was applied to study the growth inhibition of MCF-7 treated with gemcitabine, radiation, gemcitabine and radiation. The apoptosis index ( AI ) was analyzed by flow cytometry. The morphology of the MCF-7 cells apoptosis was observed by transmission electron microscopy. **Results** When MCF-7 cells were treated with gemcitabine at different concentrations for 24 h, the cell growth inhibition rate was increased in a concentration-dependent manner. The apoptotic indexes ( AI ) of MCF-7 of four groups by flow cytometry revealed. The AI of ( R + D ) group was significantly different from those of the radiation group and the gemcitabine group (  $P < 0.05$  ). Condensed chromatin, nuclear fragmentation and apoptotic body of MCF-7 cells were found by transmission electron microscope. **Conclusion** The apoptosis of human breast cancer cell line, MCF-7 cells, could be induced by gemcitabine. Gemcitabine can significantly enhance the radiation-induced apoptosis of MCF-7 cells.

**Key words :** breast cancer ; gemcitabine ; radiation ; apoptosis

[ J Cent South Univ ( Med Sci ), 2006, 31( 5 ) : 0710-04 ]

吉西他滨( gemcitabine )是一种新型的脱氧胞苷类似物,属嘧啶类抗代谢类药物。已应用于胰腺癌、肺癌、鼻咽癌及晚期乳腺癌<sup>[1]</sup>的临床治疗。凋亡已被证实是多种肿瘤细胞死亡的重要机制之

一,而吉西他滨对多种实体瘤细胞(非小细胞肺癌、胰腺癌、胃癌等)有致凋亡作用<sup>[2]</sup>。关于吉西他滨联合外照射诱导人乳腺癌细胞凋亡和增强放疗对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用,文献鲜有报道。

笔者通过在体外研究吉西他滨是否对乳腺癌 MCF-7 细胞株有致凋亡作用,并观察其凋亡特征及能否增强放疗对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用,为乳腺癌的研究,吉西他滨的临床应用及其放射增敏作用提供一定的实验依据。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 乳腺癌细胞株 MCF-7 为湘雅医院中心实验室提供。RPMI1640、小牛血清为 Hyclone 公司产品,DNA 凋亡检测试剂盒为北京宝赛公司产品,吉西他滨为连云港豪森制药公司馈赠,二甲基亚砷(DMSO)、四唑氮蓝盐(MTT)为 Sigma 公司产品。

### 1.2 方 法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌 MCF-7 细胞培养于 15% 小牛血清 RPMI-1640 培养液中,37 ℃ 5% CO<sub>2</sub>,100% 湿度的培养箱中连续培养,48 h 换液 1 次,用 2.5% 胰蛋白酶常规消化传代,取对数生长期细胞作实验。

1.2.2 MTT 实验测定吉西他滨对乳腺癌细胞抑制作用 当培养的 MCF-7 细胞呈对数生长时,取 10<sup>4</sup>/孔接种于 96 孔培养板中,每孔加入不同浓度的吉西他滨,使终浓度分别为 0,0.5,1.0,2.0,4.0 μg/mL,每组设 3 复孔。于 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 48 h 后,每孔加入新鲜配制的 0.5% MTT 20 μL 作用 4 h,出现蓝色结晶,弃去上清液,加二甲基亚砷(DMSO)150 μL,轻轻震荡 10 min 溶解后,用酶联免疫检测仪于 490 nm 波长测定吸光度值(A),根据以下公式计算:抑制率(%)=(阴性对照组平均 A 值-实验组平均 A 值)/阴性对照组平均 A 值×100%。以药物浓度为横坐标,抑制率为纵坐标,得出 50% 抑制浓度(IC<sub>50</sub>)。

1.2.3 细胞处理 取对数生长期细胞作实验,各组在实验前更换新鲜培养液,并随机分为对照组(C);单纯照射组(R),照射剂量为 6 MV-X 线 6 Gy;单纯药物组(D),采用吉西他滨 1.0 μg/mL 作用于 MCF-7 细胞;照射加药物组(R+D),照射 6 MV-X 线 6 Gy 12 h 后加入 1.0 μg/mL 的吉西他滨,各组分别经药物处理后,在 37 ℃ 5% CO<sub>2</sub> 的培养箱培养 12,24,48 h 后待测。

### 1.2.4 Annexin-V 和 PI 双染流式细胞仪检测

收集培养瓶中贴壁和悬浮细胞,用 4 ℃ 无血清 1640 液洗涤 1 遍,离心后,加入 5 μL Annexin-V 抗体染色细胞膜上的磷脂酰丝氨酸,加入 5 μL PI 标

记的 DNA,摇匀避光冰浴 15 min。加入 0.4% 孵育液,用流式细胞仪进行分析(每次检测 10<sup>4</sup> 个细胞)。

1.2.5 透射电镜观察 收集吉西他滨 1.0 μg/mL 作用 12 h 及照射 6 MV-X 射线 6 Gy 12 h 后加入吉西他滨 1.0 μg/mL 的药物作用 12 h 的细胞,PBS 液洗涤 2 次,3% 戊二酸固定悬液细胞 4 h,PBS 液洗涤 2 次,再用 1% 锇酸固定 1 h,丙酮梯度脱水,树脂包埋制成超薄切片,醋酸钠、枸橼酸铅染色、透射电镜下观察并摄影。

1.3 统计学处理 采用 SPSS11.0 统计软件,经 MTT 法检测的光密度值及抑制率以  $\bar{x} \pm s$  表示,对不同浓度吉西他滨对 MCF 细胞的抑制率采用 *t* 检验,对凋亡指数采用重复测量方差分析,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结 果

2.1 MTT 法检测吉西他滨对乳腺癌 MCF-7 细胞的生长抑制作用 MTT 法检测结果显示,不同浓度的吉西他滨处理细胞 24 h 后,细胞生长不同程度被抑制,且药物浓度增加,细胞生长抑制率逐渐增大(表 1)。

表 1 不同浓度吉西他滨对 MCF-7 细胞处理 24 h 后的抑制率比较( $\bar{x} \pm s$ )

药物浓度(μg/mL)	吸光度	抑制率(%)
0	1.26 ± 0.05	0
0.5	1.06 ± 0.07	15.8 ± 1.40
1.0	0.941 ± 0.08**	25.4 ± 4.60**
2.0	0.539 ± 0.06**	57.2 ± 3.20**
4.0	0.297 ± 0.03**	76.4 ± 2.80**

与 0 μg/mL 组比较,\*\* *P* < 0.01

IC<sub>50</sub> 为 1.80 μg/mL。本实验选择低于 IC<sub>50</sub> 的吉西他滨浓度用于诱导细胞凋亡的研究。

2.2 流式细胞仪检测各组 MCF-7 细胞的凋亡情况 流式细胞仪检测结果显示,MCF-7 细胞自发凋亡率极低(R+D)组与 D 组及 R 组相比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05 表 2)。

表 2 MCF-7 细胞经过不同方式处理后不同时间的凋亡指数(AI)

组别	AI(%)		
	12 h	24 h	48 h
C 组	0.16 ± 0.11	0.21 ± 0.17	0.28 ± 0.19
D 组	4.91 ± 0.21*	10.04 ± 0.73	8.81 ± 0.32*
R 组	0.29 ± 0.24*	0.32 ± 0.19*	8.19 ± 0.61*
(R+D)组	22.4 ± 2.91	3.34 ± 1.81	1.02 ± 0.06

与 (R+D)组比较,\* *P* < 0.05

2.3 透射电镜形态学检测 透射电镜观察到 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吉西他滨处理 12 h 后的乳腺癌 MCF-7 细胞早期凋亡细胞的形态学表现为染色质边集, 胞浆浓缩, 核固缩, 可见有膜包绕的凋亡小体(图 1); 照射剂量 6 Gy 复合 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吉西他滨处理

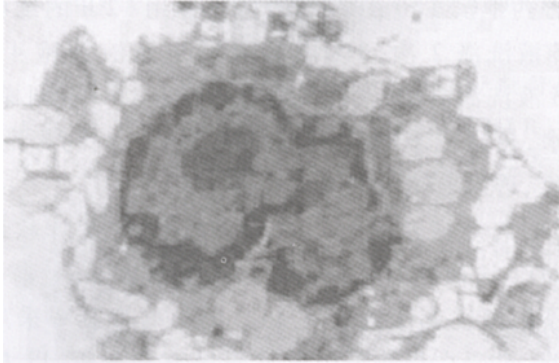


图 1 透射电镜下 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吉西他滨处理 MCF-7 细胞 12 h 后的早期凋亡细胞(  $\times 15\,000$  )

Fig. 1 Viable apoptotic cells of MCF-7 cells under transmission electron microscope after treatment with gemcitabine 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (  $\times 15\,000$  )

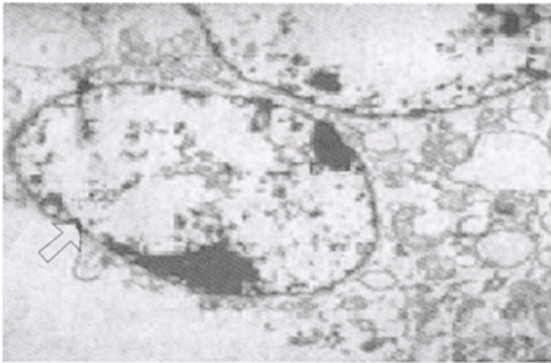


图 3 透射电镜下照射剂量 6 Gy 复合 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吉西他滨处理 MCF-7 细胞 12 h 后的坏死细胞(  $\times 16\,000$  )

Fig. 3 Necrosis cells of MCF-7 cells under transmission electron microscope after treatment with gemcitabine 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with exposure to 6 Gy radiation (  $\times 16\,000$  )

### 3 讨 论

细胞凋亡( apoptosis )在正常的胚胎发育、组织分化、个体生长、衰老及维持内环境稳定等方面都起重要作用<sup>[3]</sup>。它是一个多基因参与的细胞主动“自杀”过程,如 bcl-2, p53, Bax 等均与凋亡有密切关系<sup>[4]</sup>。不同诱发因素经不同信号途径,将胞外信号转导至胞内,激活凋亡基因,进而激活各种蛋白酶降解各自的底物,导致凋亡发生。在肿瘤化学治疗中,大多数化学治疗药物都是通过诱导细胞凋亡清除肿瘤细胞<sup>[5-6]</sup>;在肿瘤放射治疗中,肿瘤细胞受照射后, DNA 受损而发生单链断裂,而

12 h 后的晚期凋亡细胞中还可可见一些碎片(图 2); 照射剂量 6 Gy 复合 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吉西他滨处理 12 h 后的乳腺癌 MCF-7 细胞中可见到胞体肿胀, 胞内颗粒样改变的坏死细胞(图 3)。

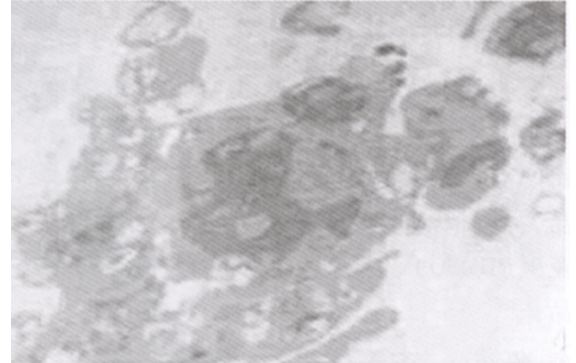


图 2 透射电镜下照射剂量 6 Gy 复合 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  吉西他滨处理 MCF-7 细胞 12 h 后的晚期凋亡细胞(  $\times 18\,000$  )

Fig. 2 non-viable apoptotic cells of MCF-7 cells under transmission electron microscope after treatment with gemcitabine 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  with exposure to 6 Gy radiation (  $\times 18\,000$  )

且其核酸内切酶活性升高,使 DNA 单链断裂变为双链断裂,诱发凋亡<sup>[7]</sup>。吉西他滨是一种新型的嘧啶类抗代谢药物, Huang 等<sup>[8]</sup>认为吉西他滨诱导凋亡的主要作用机制是抑制细胞内 DNA 合成并造成 DNA 断裂,且这种作用呈  $\text{Ca}^{2+}$  依赖性。细胞药理学显示,吉西他滨是细胞周期特异性药物,主要作用于 DNA 合成期,即 S 期,对  $G_2$  和 M 期无作用<sup>[9]</sup>。在放疗中,放疗敏感性如以死亡为标准, M 期最敏感,以分裂延缓为标准,  $G_2$  期最敏感, S 期对放疗较为抗拒<sup>[10]</sup>。本实验发现吉西他滨 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  作用 12 ~ 48 h 均可见凋亡细胞。说明细胞凋亡是化学治疗作用的一个重要组成部分。照射剂量 6 Gy 复合吉西他滨 1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  时,即可发现较多凋亡细胞,说明吉西他滨具有增强放疗对 MCF-7 细胞凋亡的诱导作用,与 Pauwels 等<sup>[11]</sup>报道一致。而单纯药物或放射治疗后,细胞凋亡出现晚,凋亡指数低,有一定的时间性和局限性。

吉西他滨诱导肿瘤细胞凋亡的机制中 p53 基因起重要作用<sup>[12]</sup>。DNA 损伤后可激活野生型 p53,诱导细胞进入  $G_0$  静止期,直到损伤 DNA 修复,若损伤得不到修复,就活化那些诱导细胞凋亡的基因转录,使细胞发生凋亡。

综上所述,吉西他滨是一种有效的凋亡诱导剂,可以抑制乳腺癌细胞生长,诱导其凋亡,并在一定条件下增强放疗对细胞凋亡的诱导作用。由

此提示诱导细胞凋亡可能是吉西他滨抗人乳腺癌作用的机制之一。

#### 参考文献:

- [ 1 ] 张志强. 吉西他滨在乳腺癌化疗中的临床应用[ J ]. 国外医学肿瘤分册, 2003, 30( 2 ): 132-135.
- [ 2 ] Ricotti L, Tesei A, de Paola F, et al. In vitro schedule-dependent interaction between Docetaxel and Gemcitabine in human gastric cancer cell lines[ J ]. Clin Cancer Res, 2003, 9( 5 ): 900-904.
- [ 3 ] Kerr J F R, Wyllie A M, Currie A R. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue Kinetics[ J ]. Cancer Boil, 1995, 6( 3 ): 3-16.
- [ 4 ] 赵卫红, 寿好长, 福岭. 细胞凋亡[ M ]. 北京: 人民卫生出版社, 1997: 19-26.
- [ 5 ] Hickman T A. Apoptosis induced by anticancer drugs[ J ]. Cancer Metastasis Rev, 1992, 11( 6 ): 121-139.
- [ 6 ] Ohmori T, Podack E R, Nishio K, et al. Apoptosis of lung cancer cells caused by some anticancer agents ( MMC, CPT-11, ADM ) is inhibited by bcl-2[ J ]. Biochem Bioph Res Commun, 1993, 192( 1 ): 30-40.
- [ 7 ] Lohmann R D, Beyersmann D. Candumium and zine mediated changes of the CA25 dependent endonuclease in apoptosis[ J ]. Biochem Biophys Res Commun, 1993, 190( 4 ): 1097-1099.
- [ 8 ] Huang P, Plunkett W. Induction of apoptosis by gemcitabine[ J ]. Semin Oncol, 1995, 22( 4 suppl 11 ): 61.
- [ 9 ] 尤长宣. 治疗非小细胞肺癌的新药吉西他滨[ J ]. 国外医学肿瘤学分册, 2000, 27( 5 ): 309-311.
- [ 10 ] 谷铎之, 殷蔚伯, 刘泰福, 等. 肿瘤放射治疗学[ M ]. 2 版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991: 238.
- [ 11 ] Pauwels B, Korst A E. Cell cycle effect of gemcitabine and its role in the radiosensitizing mechanism in vitro[ J ]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2003, 57( 4 ): 1075-1083.
- [ 12 ] 张学志. p53 在吉西他滨介导的细胞毒性和放射敏感性中的作用[ J ]. Cancer Chemotherapy Pharmacol, 2000, 45( 5 ): 369-374.

( 本文编辑 彭敏宁 )

# 《国际病理科学与临床杂志》

## 征 稿 启 事

《国际病理科学与临床杂志》是由教育部、中南大学主办的国家级医学学术期刊。原刊名《国外医学·生理、病理科学与临床分册》,更名后,本刊在保持特色,致力于介绍国外医学研究领域的新动态、新技术、新经验的基础上,加强了对国内研究成果和现状的报道。主要栏目有:研究论著、专家论坛、综述、重点实验室、成果报道等。本刊为“中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊)”,并被美国《化学文摘》(CA)等国内外多家重要数据库和检索系统收录。欢迎投稿,特别欢迎并优先刊发高水平的研究论著。

本刊具有学术水平高、指导性强、信息时效快等特点。本刊已实现“投稿—审稿—编辑”全程网上处理,敬请登陆本刊网站投稿。

网址 <http://www.gjbl.net> <http://gjbl.csu.edu.cn>

来稿请寄 湖南省长沙市湘雅路 110 号湘雅医学院 50 号信箱《国际病理科学与临床杂志》编辑部收

邮政编码 410078 编辑部电话 0731-4805495 4805496 传真 0731-4804351

E-mail [gwyxxy@126.com](mailto:gwyxxy@126.com) [gwyx@xysm.net](mailto:gwyx@xysm.net)