

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0186-04

降钙素对人乳腺癌细胞系 T47D 作用的体内外研究

赵 丽, 曹英林, 孙汶生, 张志强 (山东大学医学院免疫学研究所, 济南 250012)

[摘 要] **目的:** 研究降钙素对人乳腺癌细胞系 T47D 的作用。**方法:** 将鲑鱼降钙素(sCT)作用于体外培养的 T47D 细胞, MTT 法观察细胞生长抑制率, PCR-ELISA 法分析细胞端粒酶活性, 透射电镜观察细胞凋亡。将 T47D 细胞接种至裸鼠皮下并肌注 sCT, 30 d 后测量瘤体直径, 扫描电镜比较第三腰椎的结构。**结果:** sCT 能抑制 T47D 细胞的生长, 降低端粒酶活性, 诱导细胞凋亡。体内试验未观察到瘤体缩小, 扫描电镜发现 sCT 使第三腰椎骨质结构增粗致密。**结论:** 降钙素诱导 T47D 细胞凋亡并降低其端粒酶活性是其抑制乳腺癌细胞体外生长的新机制。体内试验未得到理想的抑瘤效果, 可能与机体复杂的内分泌反应有关。对于无骨质疏松的裸鼠, 降钙素亦能发挥促骨质沉积作用。

[关键词] 降钙素; 乳腺癌; 凋亡; 端粒酶; 裸鼠

[中图分类号] R737.9 [文献标识码] A

The Effects of Calcitonin on Human Breast Cancer Cell Line T47D *in vitro* and *in vivo*

ZHAO Li, CAO Ying-lin, SUN Wen-sheng, ZHANG Zhi-qiang (Department of Immunology, Medical College of Shandong University, Jinan 250012, China)

[**Abstract**] **Objective:** To investigate the effects of calcitonin on human breast cancer cell line T47D. **Methods:** The inhibition rates of salmon calcitonin (sCT) on T47D cells were measured by MTT methods. Then telomerase activity of T47D cells was detected using PCR-ELISA methods. Cell apoptosis was observed by transmission electron microscope (TEM). Animal models *in vivo* were constructed by implanting T47D cells subcutaneously into nude mice. After injection of sCT for 30 days, tumor diameters were measured. The structure of lumbar 3 were separated and compared by a scanning electron microscope (SEM). **Results:** The inhibitory effects of sCT on T47D cells was observed by MTT method. The PCR-ELISA method discovered that sCT could decrease the telomerase activity of T47D cells. TEM found cell apoptosis induced by sCT. Tumor diameters in sCT treatment group showed no statistical difference compared with the control group. SEM of lumbar 3 discovered that sCT could strengthen the bone structure of nude mice. **Conclusions:** The decrease of telomerase activity and induction of apoptosis are new mechanisms of sCT inhibition on T47D cells. The tumor inhibition *in vivo* was not observed. This may be attributed to the complicated endocrine response *in vivo*. sCT is still effective in strengthening the bone structure of those nude mice without osteoporosis.

[**Key words**] calcitonin; breast cancer; apoptosis; telomerase; nude mice

* 降钙素(calcitonin, CT)是哺乳动物的甲状腺滤泡旁 C 细胞分泌的激素, 主要功能是抑制骨再吸收并降低血浆中的钙浓度。目前已分离提纯了 8 种动物 CT, 其氨基酸的序列有所不同, 其中以鲑鱼降钙素(salmon calcitonin, sCT)生物效价最高, 因而在科研和临床被广泛应用^[1]。

CT 抑制乳腺癌细胞系的作用研究起始于本世纪 80 年代。CT 能调节乳腺癌细胞系 T47D 的生长, 是由

于 T47D 具有高亲和力的降钙素受体(calcitonin receptor, CTR)和敏感的腺苷酸环化酶。胞外的 CT 与胞膜上的 CTR 结合后, 间接激活腺苷酸环化酶, 使胞内

* [基金项目] 山东省科学技术基金资助项目(No. 98101010)

[作者简介] 赵 丽(1974-), 女, 河南省陕县人, 免疫学在读硕士研究生, 主要从事肿瘤免疫的研究。

[通讯作者] 曹英林, E-mail: caoyinglin@263.net; zhaoliangy@yaho.com

cAMP 浓度升高,激活蛋白激酶,通过调节磷酸化反应,最终抑制细胞生长。cAMP 作为第二信使,是 CT 发挥作用的基础^[2]。本研究旨在探讨 CT 对 T47D 细胞凋亡和端粒酶活性的影响,并通过动物试验,摸索 CT 在体内发挥抑癌作用的条件和伴随效应。

1 材料与方法

1.1 材料

细胞株 T47D 细胞购自北京医科大学临床肿瘤学院,培养于含 5% 小牛血清的 1640 培养液中,实验用对数生长期细胞。sCT 系瑞士 Sandoz 药厂出品,用培养液稀释成 3×10^{-8} mol/L 浓度。端粒酶 PCR-ELISA 检测试剂盒,德国宝灵曼公司产品。BALB/c 裸鼠,6 周龄,雌性,体重 (18 ± 2) g,12 只,购自军事医学科学院。

1.2 MTT 比色法测细胞生长的抑制率

3×10^{-8} mol/L 浓度的 sCT 对 T47D 细胞作用 24 h, 48 h, 72 h 后,与未加药的空白对照组细胞同时在培养液中加入 MTT 20 μ l,继续培养 4 h,弃培养液,加入 DMSO (二甲基亚砷)150 μ l 溶解结晶,酶标仪测 490 nm 处吸光度 A 值,计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = \left(1 - \frac{\text{实验组吸光度 } A_{490\text{nm}} \text{ 值}}{\text{空白对照组吸光度 } A_{490\text{nm}} \text{ 值}}\right) \times 100\%$$

1.3 PCR-ELISA 法检测细胞端粒酶活性

实验组和空白对照组细胞在分别培养 24 h, 48 h, 72 h 后,参照端粒酶试剂盒说明操作。具体步骤:①制备细胞提取物:收集各组培养细胞 2×10^6 个,加入 200 μ l 裂解液,冰浴 30 min,低温离心,吸取上清。②RT-PCR 扩增:取细胞提取物,加入 PCR 反应混合液(含地高辛标记的特异性引物),逆转录合成 cDNA 并扩增。③杂交:扩增产物变性后。与地高辛标记的探针杂交,杂交混合液移入预包被的反应板(MTP),使杂交产物与 MTP 上的链霉菌素蛋白结合。④ELISA:将过氧化物酶标记的抗地高辛抗体加入 MTP,反应后加入酶作用底物,显色后在酶标仪上测定吸光值 A。阳性对照:恒表达端粒酶活性的 293 细胞抽提物(试剂盒内备有),阴性对照:对细胞抽提物进行 65℃ 的热处理 10 min。

1.4 透射电镜(transmission electron microscope, TEM)观察凋亡用细胞刮刀分别收集实验组和对照组 2×10^6 个细胞,常规制片,JEOL JEM-1220EX 型 TEM 观察细胞形态。

1.5 建立荷瘤鼠模型和分组

在接种细胞前 2 周,肌注 2 mg 雌二醇。收集对数生长期的 T47D 细胞 5×10^7 个,接种于裸鼠皮下,之后

每周肌注 2 mg 雌二醇。当皮下肿瘤直径达到 0.5 cm,将 12 只裸鼠随机分为 2 组:①治疗组,隔日肌注 sCT 1 μ g,共注射 15 次;②对照组,隔日注射等体积注射用水 15 次。30 d 后处死裸鼠,分离瘤体后测量直径,计算肿瘤体积, $V = 1/2ab^2$ (a 为最大长径,b 为横径)。取第三腰椎,横断锯开,生理盐水冲洗,常规制片,JEOL JSMT-300 型扫描电镜(scanning electron microscope, SEM)观察骨质结构。

1.6 统计学方法

采用 *t* 检验,数值以均数 \pm 标准差表示。

2 结果

2.1 sCT 对乳腺癌 T47D 细胞生长的抑制现象

3×10^{-8} mol/L 的 sCT 作用 24 h, 48 h, 72 h, 对 T47D 细胞的抑制率分别为 20.3%, 87.8% 和 66.7%。吸光度值见图 1。

2.2 sCT 对乳腺癌 T47D 细胞端粒酶活性的影响

对照组 T47D 细胞在 24 h, 48 h, 72 h 后的端粒酶活性分别为 1.25, 1.42, 1.46, sCT 作用组则分别为 0.56, 0.42, 0.11。试剂盒的阳性对照值为 1.51, 阴性对照值 0.04。这表明 sCT 能抑制 T47D 细胞的端粒酶活性,且作用呈时间依赖性(见图 2)。

图 1 T47D 细胞 490nm 处吸光度

Fig. 1 The absorbance of T47D cells at 490 nm

图 2 T47D 细胞端粒酶活性的改变

Fig. 2 Telomerase activity variation of T47D cells

2.3 细胞 TEM 结果

TEM 观察发现,在 sCT(3×10^{-8} mol/L)作用组的细胞出现染色质边集、浓缩,形成凋亡小体;而对照组细胞无此现象(见图 3)。

图 3 sCT 对 T47D 细胞形态的影响

Fig. 3 Conformation effects of sCT on T47D cells

A: T47D cells of control group;

B: T47D cells of sCT treatment group with apoptosis body

2.4 体内抑瘤效果

瘤体测量并经统计分析,对照组为(198 ± 104) mm^3 ,治疗组为(167 ± 99) mm^3 ,治疗组和对照组无显著性差异($P > 0.05$)。2组裸鼠的饮食和生活习性无明显不同。

2.5 骨质结构 SEM 结果

SEM 观察发现,sCT 作用组的裸鼠第三腰椎骨质结构较对照组增粗、致密(见图 4)。

3 讨论

降钙素抑制乳腺癌细胞系生长的作用已被多项试验验证。乳腺癌细胞系 T47D 内 cAMP 水平的变化是其发挥作用的分子基础。降钙素的具体抑癌机制包括调节多种基因的表达,如 c-fos, c-jun 和甲状旁腺激素相关蛋白(parathyroid hormone-related protein)等^[3-4]。

由于降钙素可用于治疗癌性高钙血症(malignancy-associated hypercalcemia, MAH)和骨转移性疼痛,不仅改善肿瘤患者的生活质量,更延长了生存期^[5-7],因此很有可能成为一种治疗乳腺癌的药物,既能抑制癌症,又治疗癌症的并发症。尤其适用于患乳腺癌的骨质疏松症患者^[8]。本研究的目的在于进一步观察降钙素对 T47D 细胞凋亡和端粒酶活性的影响,并尝试进行体内作用的研究。

图 4 sCT 对裸鼠第三腰椎骨质结构的影响

Fig. 4 The effects of sCT on lumbar 3 bone structure of nude mice

A: Lumbar 3 of nude mice in control group;

B: Lumbar 3 of nude mice in sCT treatment group

降钙素对不同细胞系凋亡的影响不同。例如,sCT 能加强神经元细胞凋亡^[9],抑制骨细胞和成骨细胞的凋亡^[10],又能诱导 3 个前列腺癌细胞系抵抗化疗药物诱导的凋亡^[11]。以上不同的试验结果可能是由于细胞系对 CT 的敏感性和作用机理的差异。由于凋亡失活是一项重要的肿瘤发病机制,能否诱导肿瘤细胞的凋亡是抗癌研究的重点之一。sCT 对乳腺癌细胞系凋亡的影响究竟如何呢?透射电镜发现,sCT(3×10^{-8} mol/L)能诱导 T47D 细胞发生凋亡。

端粒酶的活性对细胞端粒长度的维持、细胞永生生化有重要作用,因而已成为肿瘤治疗的新靶点。本研究采用 PCR-ELISA 法,对培养 24 h, 48 h 和 72 h 的 sCT 治疗组和空白对照组细胞分别检测端粒酶活性的

数值,发现此浓度在 24 h 即可抑制 T47D 细胞的端粒酶活性,且作用呈时间依赖性增强。

体内抑癌试验未获得理想的结果,可能与以下因素有关:1)作为内分泌激素,降钙素自有拮抗激素,因此体内应用需考虑机体复杂的内分泌反应。2)用药的时间、剂量和用药方式是决定试验结果的重要因素,将来的试验可尝试加大药物剂量和瘤内注射法给药,有可能获得理想效果。

已有试验通过扫描电镜证实降钙素对骨质疏松的大鼠有治疗作用^[12]。本实验则发现,对于无骨质疏松的裸鼠,降钙素亦能增强其骨质结构。

[参 考 文 献]

- [1] 陈执中,章月华. 现代生化药物与基因工程药物分析[M]. 上海:上海医科大学出版社,2000. 105-106.
- [2] Gillespie MT, Thomas RJ, Pu ZY, *et al.* Calcitonin receptors, bone sialoprotein and osteopontin are expressed in primary breast cancers[J]. *Int J Cancer*, 1997, 73 (6): 812-815.
- [3] Lacroix M, Body JJ. Regulation of c-fos and c-jun expression by calcitonin in human breast cancer cells[J]. *Calcif Tissue Int*, 1997, 60(6): 513-519.
- [4] Rong H, Ji H, Tsai JA, *et al.* Calcitonin-suppressed expression of parathyroid hormone-related protein in breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265(1): 260-264.

- [5] Masuda N, Yagoi E, Furukawa J, *et al.* Analysis of 18 breast cancer patients with hypercalcemia[J]. *Gan To Kagaku Ryoho*, 1998, 25(6): 845-851.
- [6] Sekine M, Takami H. Combination of calcitonin and pamidronate for emergency treatment of malignant hypercalcemia[J]. *Oncol Rep*, 1998, 5(1): 197-199.
- [7] Mystakidou K, Befon S, Hondros K, *et al.* Continuous subcutaneous administration of high-dose salmon calcitonin in bone metastasis: Pain control and beta-endorphin plasma levels[J]. *J Pain Symptom Manage*, 1999, 18(5): 323-330.
- [8] Mincey BA, Moraghan TJ, Perez EA. Prevention and treatment of osteoporosis in women with breast cancer[J]. *Mayo Clin Proc*, 2000, 75(8): 821-829.
- [9] Asrari M, Lobner D. Calcitonin potentiates oxygen-glucose deprivation-induced neuronal death[J]. *Exp Neurol*, 2001, 167(1): 183-188.
- [10] Plotkin LI, Weinstein RS, Parfitt AM, *et al.* Prevention of osteocyte and osteoblast apoptosis by bisphosphonates and calcitonin [J]. *J Clin Invest*, 1999, 104(10): 1363-1374.
- [11] Salido M, Vilches J, Lopez A. Neuropeptides bombesin and calcitonin induce resistance to etoposide induced apoptosis in prostate cancer cell lines[J]. *Histol Histopathol*, 2000, 15(3): 729-738.
- [12] 施德源,俞超,陈统一,等. 成骨生长肽促进大鼠骨量增加的作用[J]. *上海医科大学学报*, 1999, 26(3): 187-190.

[收稿日期] 2002 - 01 - 24

[修回日期] 2002 - 04 - 01

第 8 届全国肿瘤生物治疗学术会议征文通知

中国免疫学会肿瘤免疫和生物治疗分会、中华医学会肿瘤学分会、中国抗癌协会生物治疗专业委员会和中国病理生理学会肿瘤免疫专业委员会联合主办,由广州第一军医大学珠江医院承办,“第 8 届全国肿瘤生物治疗学术会议”将于 2003 年 11 月 18 ~ 21 日(周二至周五)在广州市召开。诚邀国内各位专家与同行投稿与参加会议交流,会议期间将邀请国内外著名专家介绍本领域新理论、新技术和应用现状以及发展趋势。

征文要求: 凡未在国内外公开刊物发表过的研究资料均可向会议投稿,请向会议承办单位提交 800 ~ 1000 字中文摘要,加盖单位公章(请附软盘,用 word98 或 word2000 输入)。来稿经专家评审后选择优秀论文作大会发言。所接受的论文摘要将录入会议文集。

征文主题: 1. 肿瘤生物治疗的新理论与新策略; 2. 肿瘤生物治疗的新技术; 3. 肿瘤生物治疗的临床应用与评价; 4. 细胞治疗(包括造血干细胞和骨髓移植); 5. 细胞因子治疗; 6. 抗体治疗; 7. 疫苗治疗; 8. 基因治疗; 9. 中药治疗; 10. 与常规治疗相结合而组成的新疗法。

征文截稿日期: 2003 年 8 月 31 日(周日),以邮戳为准。

来稿请挂号寄:广州市工业大道中 253 号,第一军医大学珠江医院细胞治疗中心

邮政编码: 510282

联系人: 郭坤元, 李江琪