

## · 论著 ·

# 5-氮杂-2'-脱氧胞苷序贯顺铂对 MDA-MB-231 细胞的影响

沈三弟 陈卓荣 肖高芳 刘彦明 黄湛 罗智辉

**【摘要】 目的** 探讨 5-氮杂-2'-脱氧胞苷(DAC)、顺铂(PDD)序贯应用对人三阴性乳腺癌细胞 MDA-MB-231 体外增殖、周期及凋亡的影响。**方法** 实验分 4 组:对照组、DAC 组(5  $\mu\text{mol/L}$  DAC 处理)、PDD 组(15  $\mu\text{mol/L}$  PDD 处理)、DAC 序贯 PDD 组(2.5  $\mu\text{mol/L}$  DAC 处理 24 h,再用 8  $\mu\text{mol/L}$  PDD 处理 48 h)。分别用 MTT 法、流式细胞仪测定各组 MDA-MB-231 细胞的增殖、周期及凋亡,并用金氏公式来评价两药联合效应。**结果** DAC 序贯 PDD 组较 DAC 组、PDD 组增殖抑制率高( $P<0.01$ )。DAC 序贯 PDD 组 48 h、72 h 的 q 值分别为 1.12、1.17,两药联合有增效作用。DAC 序贯 PDD 组  $G_1$ 、S 期细胞减少, $G_2$ /M 期细胞增多,DAC 序贯 PDD 组较 DAC 组、PDD 组细胞凋亡率高( $P<0.01$ )。**结论** 低剂量的 DAC 与 PDD 序贯应用可以抑制人三阴性乳腺癌 MDA-MB-231 细胞增殖,促进 MDA-MB-231 细胞凋亡。

**【关键词】** 乳腺肿瘤;细胞增殖;细胞周期;细胞凋亡;5-氮杂-2'-脱氧胞苷;顺铂

**【中图分类号】** R737.9

**【文献标志码】** A

**Effect of sequential treatment of 5-aza-2'-deoxycytidine and cisplatin in MDA-MB-231 cells** SHEN San-di\*, CHEN Zhuo-rong, XIAO Gao-fang, LIU Yan-min, HUANG Zhan, LUO Zhi-hui. \* Department of Head, Neck and Breast Surgery, Yuebei People's Hospital, Shaoguan 512026, China

Corresponding author: SHEN San-di, Email: shen3d@163.com

**【Abstract】 Objective** To evaluate the effect of sequential use of 5-aza-2'-deoxycytidine (DAC) and cisplatin(PDD) on the proliferation *in vitro*, cell cycle and apoptosis of triple-negative breast cancer(TNBC) cell line MDA-MB-231. **Methods** The cells were divided into 4 groups: control group, DAC group(treated with 5  $\mu\text{mol/L}$  DAC), PDD group (treated with 15  $\mu\text{mol/L}$  PDD), DAC→PDD group(treated with 2.5  $\mu\text{mol/L}$  DAC for 24 h and then 8  $\mu\text{mol/L}$  PDD for 48 h). MTT and flow cytometry were used to determine the proliferation rate, cells cycles and cells apoptosis rate of MDA-MB-231 cells. Jin's formula was used to evaluate the combining effect of DAC and PDD. **Results** The proliferation rate of DAC→PDD group was higher than that of the other two groups( $P<0.01$ ). The q values of DAC→PDD group were 1.12 at 48 h, 1.17 at 72 h, which indicated the synergistic effect. In DAC→PDD group, the cells in  $G_1$  and S stage were decreased, and  $G_2$ /M cells were increased. The cell apoptosis rate of DAC→PDD group was higher than that of the other two groups( $P<0.01$ ). **Conclusion** The sequential use of DAC and PDD at a low dosage can inhibit the proliferation and promote the apoptosis of human TNBC cells MDA-MB-231.

**【Key words】** breast neoplasms; cell proliferation; cell cycle; cell apoptosis; 5-aza-2'-deoxycytidine; cisplatin

5-氮杂-2'-脱氧胞苷(5-aza-2'-deoxycytidine, DAC)是一种 DNA 甲基转移酶抑制剂<sup>[1]</sup>,通过使基因启动子去甲基化而激活相应的基因表达,属于表观遗传学药物。DAC 已用于某些血液系统疾病的治疗,而其对于实体肿瘤的作用仍在探索

中<sup>[2]</sup>。由于该药不良反应大,用药剂量受限,严重影响了患者的依从性及治疗效果。因此本研究采用低剂量 DAC 序贯顺铂(cisplatin, PDD)处理三阴性乳腺癌(triple negative breast cancer, TNBC)细胞 MDA-MB-231 来了解 DAC 的作用效果。

## 1 材料和方法

### 1.1 仪器与试剂

人乳腺癌 MDA-MB-231 细胞购自美国 ATCC 公司, L-15 培养基及胎牛血清购自美国 Hyclone 公司, DAC、PDD 购自美国 Sigma Aldrich 公司,

MTT 购自美国 USB 公司, Annexin V-FITC/PI 试剂盒购自美国 Beckman-Coulter 公司, 680 型酶标仪购自美国 BIO-RAD 公司, 流式细胞仪购自美国 BD 公司。

## 1.2 实验分组

实验分 4 组。DAC 组: 将 DAC 溶于生理盐水中, 终浓度为 5.0  $\mu\text{mol/L}$ ; PDD 组: 将 PDD 溶于生理盐水中, 终浓度为 15  $\mu\text{mol/L}$ ; DAC 序贯 PDD 组: 将 2.5  $\mu\text{mol/L}$  DAC 溶液处理细胞 24 h 再加 8  $\mu\text{mol/L}$  PDD 溶液处理 48 h; 对照组: 加入等体积的生理盐水。

## 1.3 细胞培养

各组的 MDA-MB-231 细胞用含 10% 胎牛血清的 L-15 培养液(不含酚红)于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、无  $\text{CO}_2$  的孵箱内培养。

## 1.4 MTT 法检测细胞增殖抑制率

收集对数生长期细胞, 用培养液制成单细胞悬液, 调整细胞数为  $5 \times 10^4/\text{ml}$ , 每孔 100  $\mu\text{l}$  接种于 96 孔板中, 孵箱中过夜。各处理组每孔加入 100  $\mu\text{l}$  培养液及药物, 药物终浓度同前所述, 对照组每孔加入等体积的培养液, 每组设置 6 个复孔。48 h 更换培养液。

培养 20、44、68 h 后, 每孔加入 20  $\mu\text{l}$  5 mg/ml MTT, 继续培养 4 h 后, 弃培养液, 每孔加入 150  $\mu\text{l}$  DMSO, 慢速震荡 10 min 后, 在 490 nm 处测其吸光度( $D$  值), 计算肿瘤细胞增殖抑制率。增殖抑制率( $\%$ ) = (对照组  $D$  值 - 处理组  $D$  值) / 对照组  $D$  值  $\times 100\%$

用金氏公式判断序贯用药的效果<sup>[3]</sup>:  $q = E_{a+b} / (E_a + E_b - E_a \times E_b)$ 。  $E_{a+b}$  是两药同步、序贯作用时的抑制率,  $E_a$ 、 $E_b$  是两单药使用时的抑制率。若  $q < 0.85$ , 表明两药联合时有拮抗作用,  $0.85 \leq q \leq 1.15$  时, 表明两药联合使用有相加作用,  $q > 1.15$  时, 表明两药联合使用有增效作用。

## 1.5 流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡

细胞培养、处理、收集同上, 按照说明书步骤操作, 采用碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色检

测细胞周期, 采用 Annexin V-FITC/PI 双染法检测细胞凋亡, 在流式细胞仪上用 488 nm 的激发光检测细胞周期及凋亡情况。

## 1.6 统计分析

采用统计软件 SPSS 16.0, 计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA),  $P < 0.050$  为差异有统计学意义, 利用金氏公式判断序贯用药的效果。用 Lysis II 软件分析细胞凋亡率。

## 2 结果

### 2.1 DAC 与 PDD 对 MDA-MB-231 细胞增殖的影响

DAC 组、PPD 组、DAC 序贯 PPD 组细胞在 24、48、72 h 的细胞增殖率见表 1, DAC 组与 PPD 组、DAC 序贯 PPD 组均有抑制 MDA-MB-231 细胞增殖的作用, 且随着作用时间延长抑制作用愈强( $P < 0.05$ ), 其中 PPD 较 DAC 抑制细胞增殖作用更强( $P < 0.05$ )。DAC 序贯 PPD 组与 DAC 组在 24 h 的细胞增殖率差异无统计学意义( $P = 0.101$ )。DAC 序贯 PPD 组在 48、72 h 的  $q$  值分别为 1.12、1.17, 这说明 DAC 与 PDD 序贯处理 MDA-MB-231 细胞有增效作用。

### 2.2 DAC 与 PDD 对 MDA-MB-231 细胞周期的影响

对照组细胞大多数处于  $G_1$  期, S 期次之,  $G_2/M$  期最少。PDD 能使细胞周期发生变化,  $G_1$  期细胞减少,  $G_2/M$  期细胞相应增多; 而 DAC 能使 S 期细胞比例增多, DAC 明显抑制 S 期细胞进入  $G_2/M$  期; 联合用药时未见  $G_1$  期细胞蓄积, 随着时间延长,  $G_1$  期、S 期细胞减少,  $G_2/M$  期细胞比例相应增多, S 期细胞对 PDD 更加敏感。

### 2.3 DAC 与 PDD 对 MDA-MB-231 细胞凋亡的影响

对照组、DAC 组、PPD 组、DAC 序贯 PPD 组细胞在 24、48、72 h 的细胞凋亡率见表 2。对照组、DAC 组、PPD 组、DAC 序贯 PPD 组均有促进 MDA-MB-231 细胞凋亡的作用( $P < 0.05$ ), 对照组在 24 h 与 48 h 差异无统计学意义( $P = 0.329$ )。24 h 凋亡作用的强弱顺序依次为: PPD 组 > DAC 组 >

表 1 各组各时间点的增殖抑制率比较

(%,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	DAC 组	PPD 组	DAC 序贯 PPD 组	统计量	$P$ 值
24 h	8.12 $\pm$ 0.79	35.14 $\pm$ 2.00	6.84 $\pm$ 0.52	939.245	0.000
48 h	21.72 $\pm$ 2.10	49.22 $\pm$ 1.73	67.64 $\pm$ 0.91	1171.256	0.000
72 h	30.39 $\pm$ 1.20	65.52 $\pm$ 1.72	88.76 $\pm$ 1.92	1929.665	0.000
统计量	351.816	418.894	6808.238		
$P$ 值	0.000	0.000	0.000		

除 24 h 时 DAC 组与 DAC 序贯 PPD 组比较( $P = 0.101$ ), 其余差异均有统计学意义( $P < 0.050$ )

表 2 各组各时间点的细胞凋亡率比较

(%,  $\bar{x} \pm s$ )

时间	对照组	DAC 组	PPD 组	DAC 序贯 PPD 组	统计量	P 值
24 h	1.62±0.34	10.41±0.70	16.63±0.65	8.26±0.95	476.094	0.000
48 h	1.83±0.27	15.37±0.74	21.89±1.20	28.98±1.01	1037.336	0.000
72 h	2.27±0.42	21.39±1.22	30.39±1.21	41.98±1.12	1541.907	0.000
统计量	5.326	215.763	261.900	1628.279		
P 值	0.018	0.000	0.000	0.000		

除对照组[24 h 比 48 h ( $P=0.329$ ), 24 h 比 72 h ( $P=0.006$ ), 48 h 比 72 h ( $P=0.045$ )], 其余差异均有统计学意义 ( $P<0.001$ )

DAC 序贯 PDD 组>对照组 ( $P<0.05$ ); 48 h 和 72 h 凋亡作用的强弱顺序依次为: DAC 序贯 PDD 组>PPD 组>DAC 组>对照组 ( $P<0.05$ )。

### 3 讨论

TNBC 是 ER、PR、HER-2 均为阴性的乳腺癌, 局部复发及远处转移率高, 预后较差<sup>[4]</sup>。目前缺乏有效的内分泌及靶向治疗手段, 手术及全身化疗是其主要治疗手段。本研究从表观遗传学联合遗传学角度探讨 TNBC 的治疗方案。

铂类的抗癌机制类似烷化剂, 主要靶点为 DNA, 作用于 DNA 链间及链内交链, 形成 DDP-DNA 复合物, 干扰 DNA 复制, 或与核蛋白及胞浆蛋白结合, 属周期非特异性药, 常用于 TNBC 的治疗, 尤其是 BRCA1/2 突变的 TNBC 治疗<sup>[5]</sup>。但对于非 BRCA1/2 突变的 TNBC 效果欠佳, 也有研究报道其有效<sup>[6-7]</sup>。该药神经毒性、肾毒性较大, 容易耐药, 限制了其用药时间、剂量及临床效果。

MDA-MB-231 属 TNBC 细胞系, 且 BRCA1/2 非突变<sup>[8]</sup>。笔者之前的研究发现 DAC 抑制 MDA-MB-231 细胞的体内、外增殖<sup>[9-10]</sup>。本研究发现 DAC 既能抑制体外 MDA-MB-231 细胞的增殖, 也能促进其凋亡, 随作用时间延长, 效果愈明显。而 PDD 抑制 MDA-MB-231 细胞增殖, 促进其凋亡的作用较 DAC 更明显, 差异有统计学意义。低剂量的 DAC 与 PDD 序贯作用, 即使 DAC 作用时间较短(仅 24 h), 二者仍有相加、增效作用。这与 Tsai 等<sup>[11-12]</sup>报道的 DAC 短暂作用就能维持较长效果的结果一致。

本研究还发现 DAC 使 MDA-MB-231 细胞 S 期比例增多, 这与范江等<sup>[13]</sup>报道一致, 而 PDD 能干扰 DNA 的合成、复制, 这可能是二者增效作用的机制。

综上所述, 低剂量的 DAC 与低剂量的 PDD 联合应用, 能明显增加抑癌作用效果。本研究为 DAC 的临床应用提供了新的思路, 也为 TNBC 的有效治疗提供了实验证据。但是本研究是采用一个

特定剂量的 DAC 与 PDD 序贯处理 MDA-MB-231 细胞, 虽然表现出相加及增效作用, 但是 DAC 这个剂量是不是最佳剂量并不确定, 另外关于 DAC 与 PDD 序贯处理时机本研究也只是研究了 3 个时间点。故有关 DAC 与 PDD 序贯应用的最佳剂量及时机有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] Christman JK. 5-Azacytidine and 5-aza-2'-deoxycytidine as inhibitors of DNA methylation: mechanistic studies and their implications for cancer therapy[J]. *Oncogene*, 2002, 21(35): 5483-5495.
- [2] Momparler RL. Epigenetic therapy of cancer with 5-aza-2'-deoxycytidine (decitabine)[J]. *Semin Oncol*, 2005, 32(5): 443-451.
- [3] Chen J, Feng XH, Shi J, et al. The anti-nociceptive effect of BmK AS, a scorpion active polypeptide, and the possible mechanism on specifically modulating voltage-gated Na<sup>+</sup> currents in primary afferent neurons[J]. *Peptides*, 2006, 27(9): 2182-2192.
- [4] Cleator S, Heller W, Coombes RC. Triple-negative breast cancer: therapeutic options[J]. *Lancet Oncol*, 2007, 8(3): 235-244.
- [5] Silver DP, Richardson AL, Eklund AC, et al. Efficacy of neoadjuvant Cisplatin in triple-negative breast cancer[J]. *J Clin Oncol*, 2010, 28(7): 1145-1153.
- [6] Dhillon KK, Swisher EM, Taniguchi T. Secondary mutations of BRCA1/2 and drug resistance[J]. *Cancer Sci*, 2011, 102(4): 663-669.
- [7] Turner NC, Tutt AN. Platinum chemotherapy for BRCA1-related breast cancer: do we need more evidence? [J]. *Breast Cancer Res*, 2012, 14(6): 115.
- [8] Alli E, Sharma VB, Sunderesakumar P, et al. Defective repair of oxidative dna damage in triple-negative breast cancer confers sensitivity to inhibition of poly(ADP-ribose) polymerase[J]. *Cancer Res*, 2009, 69(8): 3589-3596.
- [9] 沈三弟, 吴爱国, 王纯忠, 等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷对三阴性乳腺癌细胞肺转移的抑制作用[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(5): 73-75.
- [10] 沈三弟, 吴爱国, 赵志. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷降低了乳腺癌 MDA-MB-231 细胞的体外迁移能力[J]. *重庆医学*, 2010, 39(10): 1209-1211.
- [11] Kagey JD, Kapoor-Vazirani P, McCabe MT, et al. Long-term stability of demethylation after transient exposure to 5-aza-2'-

- deoxycytidine correlates with sustained RNA polymerase II occupancy[J]. Mol Cancer Res, 2010, 8(7):1048-1059.
- [12] Tsai HC, Li H, Van Neste L, et al. Transient low doses of DNA-demethylating agents exert durable antitumor effects on hematological and epithelial tumor cells [J]. Cancer Cell, 2012, 21(3):430-446.
- [13] 范江, 陆劲松, 王磊, 等. 5-aza-2'-deoxycytidine 联合 trichostatin A 抑制乳腺癌细胞增殖能力的研究[J]. 中国癌症杂志, 2006, 16(5):329-332.
- (收稿日期:2013-01-30)  
(本文编辑:刘军兰)

沈三弟, 陈卓荣, 肖高芳, 等. 5-氮杂-2'-脱氧胞苷序贯顺铂对 MDA-MB-231 细胞的影响[J/CD]. 中华乳腺病杂志:电子版, 2013, 7(3):188-191.

