

双氢睾酮对三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用^Δ

陈榕^{1*}, 崔军威², 韦伟^{2#}(1.北京大学深圳医院药剂科, 广东深圳 518036; 2.北京大学深圳医院乳腺外科, 广东深圳 518036)

中图分类号 R96; R979.1 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2015)10-1346-03
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2015.10.16

摘要 目的: 研究不同浓度双氢睾酮(DHT)对三阴乳腺癌MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用。方法: 采用2-(2-甲氧基-4-硝基苯基)-3-(4-硝基苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四氮唑单钠盐(CCK8)比色法检测1、10、100 nmol/L的DHT分别作用24、48、72 h后对MDA-MB-231细胞增殖的影响; 采用流式细胞检测仪分别检测上述浓度DHT作用48 h后对MDA-MB-231细胞周期的影响; 并用Agilent miRNA microarray芯片V19杂交技术分析100 nmol/L DHT作用48 h前后细胞的miRNA表达谱, 以生物学软件SAS筛选出表达差异在5倍以上的miRNA。结果: 1、10、100 nmol/L的DHT对MDA-MB-231细胞增殖均有抑制作用, 且与DHT浓度和作用时间呈正相关。与作用前比较, DHT作用于细胞48 h后S期细胞增多, 出现S期阻滞, 且与DHT浓度呈正相关。100 nmol/L DHT作用于细胞48 h后较作用前有9个miRNA表达上调大于5倍, 10个miRNA表达下调大于5倍。结论: DHT对MDA-MB-231细胞增殖具有较为明显的抑制作用, 其机制可能与阻滞细胞周期及诱导细胞miRNA表达谱改变有关。

关键词 双氢睾酮; 三阴乳腺癌; MDA-MB-231细胞; 细胞增殖; 细胞周期; miRNA表达

Inhibitory Effects of Dihydrotestosterone on Proliferation of Triple Negative Breast Cancer Cells MDA-MB-231

CHEN Rong¹, CUI Jun-wei², WEI Wei²(1. Dept. of Pharmacy, Shenzhen Hospital of Peking University, Guangdong Shenzhen 518036, China; 2. Dept. of Breast Surgery, Shenzhen Hospital of Peking University, Guangdong Shenzhen 518036, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To study the inhibitory effects of dihydrotestosterone (DHT) with different concentrations on proliferation of triple negative breast cancer cells MDA-MB-231. METHODS: 2-(2-methoxy-4-nitrophenyl)-3-(4-nitrophenyl)-5-(2,4-disulfoanilino)-2H-tetrazolium sodium salt (CCK-8) was used to determine the effects of drugs with three concentrations (1, 10, 100 nmol/L) on cells proliferation after 24 h, 48 h and 72 h. The effect of DHT with different concentrations on the cycle of MDA-MB-231 was detected by flow cytometry after 48 h. The expression of miRNA was analyzed by the Agilent miRNA microarray chip V19 hybridization before and after 48 h of 100 nmol/L DHT treatment, and the differential expression of miRNA over 5 times was screened by bioinformatics software SAS. RESULTS: DHT of 1, 10 and 100 nmol/L could inhibited MDA-MB-231 proliferation, and had positive correlation with concentration and action time. Compared with before treatment, MDA-MB-231 cells in S phase increased in a dose-dependent way after 48 h of DHT administration and had positive correlation with concentration. Compared with before treatment, there were 9 miRNAs up-regulated and 10 down-regulated over 5 times in cells with DHT administration after 48 h. CONCLUSIONS: The inhibitory effect of DHT on proliferation of MDA-MB-231 cells was obvious and the mechanism might be correlated to de-regulating cellular cycles and changing miRNA expressions.

KEYWORDS Dihydrotestosterone; Triple negative breast cancer; MDA-MB-231 cell; Cell proliferation; Cycle block; miRNA expression

三阴乳腺癌(Triple negative breast cancer, TNBC)是乳腺癌病理类型中的一种, 因其雌激素受体(Estrogen receptor, ER)、孕激素受体(Progesterone receptor, PR)和人表皮生长因子受体2(Human epidermal growth factor receptor 2, HER-2)均阴性致使传统的内分泌治疗(Endocrine therapy, ET)基本无效, 导致此类患者易出现肿瘤复发和转移。临床亟需新的治疗方案来改善TNBC患者的预后。双氢睾酮(Dihydrotestosterone, DHT)可通过作用于雄激素受体(Androgen receptor, AR)影响细胞生长。有研究发现, 高浓度DHT可通过AR激活细胞凋亡程序, 抑制肿瘤细胞增殖^[1]。TNBC患者肿瘤组织中AR

的比例为19%~45%^[2-3], 且AR与患者预后关系密切, 这为TNBC靶向ET提供了新的临床思路。但目前针对DHT影响TNBC细胞的研究很少, 且详细的机制尚不清楚。本研究拟通过体外细胞试验, 探究DHT对TNBC细胞MDA-MB-231增殖的影响, 并初步分析DHT可能存在的作用机制。

1 材料

1.1 仪器

CO₂培养箱(美国Forma公司); 超净工作台(苏州苏洁净化设备公司); A-4-81离心机(德国Eppendorf公司, 离心半径: 17.3 cm, 下同); 酶标仪(深圳雷杜生命科学股份有限公司); Agilent 2100生物分析仪(美国Agilent Technologies公司); 流式细胞检测仪(美国Beckman公司)。

1.2 药品与试剂

DHT(批号: A8380, 纯度: ≥97.5%)、二甲基亚砜(DMSO)及磷酸盐缓冲液(PBS)均购自美国Sigma公司; 2-(2-甲氧基-4-

Δ 基金项目: 深圳市科技计划项目(No.201103010)

* 副主任药师。研究方向: 抗肿瘤药物。电话: 0755-83923333-5408。E-mail: wxrong.666@163.com

通信作者: 主任医师, 博士。研究方向: 乳腺癌早期诊断及靶向治疗。电话: 0755-83923333-6026。E-mail: rxwei1123@163.com

硝苯基)-3-(4-硝苯基)-5-(2,4-二磺基苯)-2H-四唑单钠盐(CCK8,日本同仁公司,批号:40203ES76);细胞周期检测试剂盒(杭州联科生物技术有限公司,批号:LK-CCS01);达尔伯克改良伊格尔(DMEM)高糖培养基(批号:SH30243.01B)、胎牛血清(FBS,批号:SH30070.03)均购自美国Hyclone公司;MirVana™ miRNA Isolation Kit试剂盒(美国Ambion公司);Agilent miRNA microarray芯片及检测分析技术由上海伯豪生物科技有限公司提供。

1.3 细胞

TNBC细胞系MDA-MB-231(ER-/AR+)由北京大学深圳医院中心实验室冻存,细胞经复苏后用含10% FBS的DMEM高糖培养基进行培养,温箱培养条件为37℃、5% CO₂。

2 方法

2.1 DHT对MDA-MB-231细胞增殖的影响

MDA-MB-231细胞加入经DMSO溶解稀释后的DHT(1、10、100 nmol/L)^[4],反应24、48、72 h后,利用CCK-8比色法检测细胞不同时间段的存活率。采用酶标仪在450 nm波长处测定光密度(OD),试验重复进行3次。各浓度均设3个复孔,并设空白对照孔(含培养基、DMSO、细胞)和调零孔(仅含培养基)。计算细胞增殖抑制率=[1-(试验孔平均OD-调零孔平均OD)/(空白对照孔平均OD-调零孔平均OD)]×100%。

2.2 DHT对MDA-MB-231细胞周期的影响

用不同浓度(1、10、100 nmol/L)DHT分别作用于MDA-MB-231细胞48 h后,收集处理后细胞,4℃下3 000 r/min离心10 min后,用冷PBS洗涤2~3遍。收集细胞并加入预冷的70%乙醇,4℃固定细胞过夜。隔日用冷PBS洗涤离心细胞后,每管细胞样品中加入0.5 ml碘化丙啶染色液,室温下缓慢并充分重悬细胞沉淀,37℃避光温浴30 min后,采用流式细胞检测仪检测细胞周期分布。另以细胞只加入DMSO、培养基(不含DHT)为对照,其他处理条件相同。

2.3 DHT对MDA-MB-231细胞miRNA表达谱的影响

取100 nmol/L DHT作用48 h后的MDA-MB-231细胞(加药组)及未处理细胞(对照组)2×10⁶个,送上海伯豪生物科技有限公司,提取总RNA 100 ng,利用Agilent miRNA microarray芯片V19杂交技术检测细胞miRNA表达谱。由上海伯豪生物科技有限公司应用生物学软件SAS进行差异基因筛选,单荧光芯片的原始数据经过标准化处理,转化为log以2为底数的对数后,在一个二维直角坐标系平面中,绘制散点图。其中落在图形中位直线上的点,代表这个探针点在两张芯片中信号值差异倍数等于1;落在图形中位线两侧45°线之外的点,代表这个探针点在两张芯片中信号值差异倍数大于2,并且直线以上区域为大于2倍上调miRNA,直线以下区域为小于2倍下调miRNA。本课题最终结果选取差异在5倍以上的miRNA。

2.4 统计学处理

统计学分析软件为SPSS 13.0。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间均数比较采用单因素方差分析,两两比较采用t检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 MDA-MB-231细胞的增殖抑制率

在相同时间段内,1、10、100 nmol/L的DHT均对MDA-MB-231细胞具有增殖抑制作用,且随着DHT浓度的增加,细胞增殖抑制率升高。经统计学分析,高浓度(100 nmol/L)DHT

在处理细胞48 h和72 h后相对于低浓度(1 nmol/L)DHT的增殖抑制率明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。此外,针对同一浓度的DHT而言,作用细胞时间延长(72 h)较短时间(24 h),细胞增殖抑制率明显增加,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。综合考虑,选取100 nmol/L DHT作用48 h进行后续试验有助于避免较低浓度时细胞自身凋亡带来的影响,从而保证结果的稳定性及可靠性。不同浓度DHT对MDA-MB-231细胞的增殖抑制率比较见表1。

表1 不同浓度DHT对MDA-MB-231细胞增殖抑制率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

Tab 1 Comparison on the inhibitory rate of DHT with different concentrations on MDA-MB-231 cell proliferation($\bar{x} \pm s, n=3$)

DHT浓度, nmol/L	不同时间点的增殖抑制率, %		
	24 h	48 h	72 h
1	3.58 ± 0.76	3.73 ± 0.51	6.12 ± 0.35*
10	4.39 ± 0.17	4.71 ± 0.19	10.68 ± 0.73**
100	7.48 ± 0.31	12.96 ± 0.47**	19.21 ± 0.10**

注:与作用24 h比较,* $P < 0.05$;与1 nmol/L比较,** $P < 0.05$

Note: vs. 24 h administration, * $P < 0.05$; vs. 1 nmol/L, ** $P < 0.05$

3.2 MDA-MB-231细胞的周期分布

与对照比较,DHT作用后可使MDA-MB-231细胞的S期数量明显增加,表明其可促进MDA-MB-231细胞由G₁期过渡到S期。且DHT对MDA-MB-231细胞S期的阻滞效应呈浓度依赖性,即随着DHT浓度的增加,MDA-MB-231细胞S期细胞所占比例明显增加。不同浓度DHT作用于MDA-MB-231细胞48 h后的细胞周期分布见图1,细胞周期比例见表2。

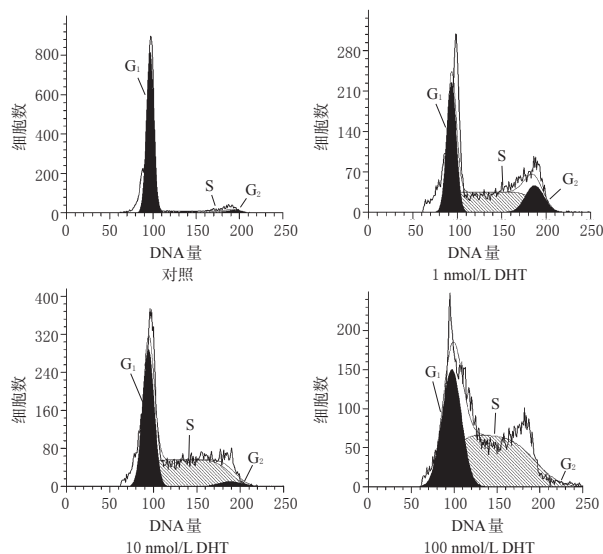


图1 不同浓度DHT作用于MDA-MB-231细胞48 h后的细胞周期分布图

Fig 1 Distribution of the cycles of MDA-MB-231 after 48 h administration of DHT with different concentrations

3.3 MDA-MB-231细胞的miRNA表达谱

研究结果显示,加药组与对照组MDA-MB-231细胞28 s/18 s的比例分别为1.1和1.2, DNA完整性数据(RIN)分别为8.7和9.1,均满足后续试验要求(注:2 100 RIN < 6.0表示样品已降解,2 100 RIN ≥ 6.0并且28 s/18 s ≥ 0.7表示样品合格,可

表2 不同浓度DHT作用于MDA-MB-231细胞48 h后的细胞周期比例($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

Tab 2 Proportion of the cell cycles of MDA-MB-231 after 48 h administration of DHT with different concentrations($\bar{x} \pm s, n=3, \%$)

DHT浓度, nmol/L	G ₁	G ₂	S
0	89.10 ± 0.12	3.04 ± 0.34	7.86 ± 0.23
1	39.70 ± 0.20	16.27 ± 0.87	44.03 ± 0.97
10	45.76 ± 0.45	3.26 ± 0.31	50.98 ± 0.16
100	39.64 ± 0.33	0.00 ± 0.42	60.36 ± 0.90

进行下一步试验)。其中,DHT处理后细胞miRNA表达上调差异达5倍以上的有9个,表达下调差异达5倍以上的miRNA有10个,具体结果见表3。

表3 DHT能导致MDA-MB-231细胞miRNA表达改变5倍以上的基因

Tab 3 Genes that the expression of MDA-MB-231 miRNA can be changed over 5 times in DHT

项目	上调	下调
miRNA	hsa-miRNA-1281	hsa-miR-1273e
	hsa-miRNA-140-5p	hsa-miR-135a-3p
	hsa-miRNA-148b-3p	hsa-miR-296-5p
	hsa-miRNA-16-2-3p	hsa-miR-3646
	hsa-miRNA-183-5p	hsa-miR-4324
	hsa-miRNA-28-5p	hsa-miR-4716-3p
	hsa-miRNA-30c-2-3p	hsa-miR-4745-5p
	hsa-miRNA-532-5p	hsa-miR-5195-3p
	hsa-miRNA-660-5p	hsa-miR-6069
		hsa-miR-766-3p

4 讨论

在对前列腺癌治疗研究中,DHT不仅是一种有意义的前列腺癌预后评估指标^[6],而且一定浓度的DHT对前列腺肿瘤细胞的生长具有较强的抑制作用。DHT通过作用于细胞内AR发挥作用,在TNBC细胞中也存在高表达的AR,并且大量研究发现AR与乳腺癌患者的预后存在密切联系^[6-7]。因此笔者对AR与TNBC细胞之间作用的关系进行了深入研究。前期试验中,笔者发现睾酮(T)作为靶向药物对MDA-MB-231(ER-/AR+)细胞增殖效果存在双重作用。而本研究中,CCK8比色法结果显示,1、10、100 nmol/L DHT对MDA-MB-231细胞均有较为明显的增殖抑制作用。作用相同时间内,增殖抑制率随DHT浓度的增加而增加,表现为一定的浓度-效应依赖关系;同一浓度的DHT对MDA-MB-231细胞增殖的抑制作用随作用时间延长而增加,表现为一定的时间-效应依赖关系。细胞的增殖作用是通过细胞周期运作来实现的,因此众多抗肿瘤药物的抑制作用也是通过干扰细胞周期来发挥特效作用的。笔者利用流式细胞检测仪对1、10、100 nmol/L DHT作用48 h后的MDA-MB-231细胞周期进行分析,发现DHT可诱导MDA-MB-231细胞周期发生S期阻滞,且随着DHT浓度增加,S期阻滞效应越明显。

细胞周期的有序运作是由多基因调控的,而DHT引起的S期细胞增加可能涉及基因层面的改变。因此,笔者对100 nmol/L DHT作用MDA-MB-231细胞48 h后对miRNA表达谱

的影响进行了后续分析。经对100 nmol/L DHT处理后的MDA-MB-231细胞miRNA表达谱进行分析后发现,与正常细胞相比,处理后的细胞有9个miRNA上调超过5倍,有10个miRNA下调超过5倍。其中,上调最明显的是hsa-miRNA-148b-3p,而下调最明显的是hsa-miRNA-135a-3p。研究发现,hsa-miRNA-148b-3p在肿瘤细胞中表达水平与细胞增殖及分化存在联系,在乳腺癌细胞中hsa-miRNA-148b-3p表达越高,细胞增殖能力越弱,其可能在乳腺癌的发生及发展阶段都发挥着重要作用^[8-9]。就本研究而言,DHT作用细胞后出现的增殖抑制作用可能与上调hsa-miRNA-148b-3p有关。hsa-miRNA-135a-3p在肿瘤细胞耐药性方面被证实存在重要作用^[10],通过DHT作用于MDA-MB-231细胞后出现了hsa-miRNA-135a-3p下调,这可能与DHT处理后诱导了细胞耐药机制方面的变化有关。可见,miRNA的改变在DHT抑制MDA-MB-231细胞的生物学过程中起着一定作用,并且有望作为评估DHT作用效果的指标,但针对DHT与miRNA作用的具体机制还需进一步研究验证。

参考文献

- [1] 李钟,莫曾南,杨小丽,等.双氢睾酮对人前列腺癌细胞株PC-3细胞生长影响的体外研究[J].临床泌尿外科杂志,2007,22(9):697.
- [2] Moinfar F, Okcu M, Tsyborvskyy O, et al. Androgen receptors frequently are expressed in breast carcinomas: potential relevance to new therapeutic strategies[J]. *Cancer*, 2003,98(4):703.
- [3] 陈学东,钱立元,易剪梅,等.三阴乳腺癌雄激素受体表达与瘤体大小、淋巴转移的关系[J].中国普通外科杂志,2014,23(5):695.
- [4] 刘睿,余明华,曹政,等.双氢睾酮对人外周血内皮祖细胞增殖能力的影响[J].重庆医学,2013,42(20):2381.
- [5] Kjellman A, Akre O, Norming U, et al. Dihydrotestosterone levels and survival in screening-detected prostate cancer: a 15-yr follow-up study[J]. *Eur Urol*, 2008, 53(1):106.
- [6] 刘恒戈.内分泌药物治疗乳腺癌的临床应用进展[J].中国药房,2005,16(10):791.
- [7] 张静,牛昀,于琦,等. AR在不同ER状态乳腺癌中的表达及临床病理意义[J].中国肿瘤临床,2012,39(3):131.
- [8] Takagi S, Nakajima M, Mohri T, et al. Post-transcriptional regulation of human pregnane X receptor by micro-RNA affects the expression of cytochrome P₄₅₀ 3A4[J]. *J Biol Chem*, 2008,283(15):9674.
- [9] 冯燕,杨畅,刘琼,等.微小RNA-148b在乳腺癌中的表达及意义[J].中国全科医学,2012,15(11C):3848.
- [10] 周丽,邱天竹,刘平,等. miR-135a/b逆转肺癌A549/CD-DP细胞对顺铂耐药性及相关机制研究[J].南京医科大学学报:自然科学版,2013,33(4):449.

(收稿日期:2014-10-09 修回日期:2014-12-01)

(编辑:邹丽娟)