

孕激素受体拮抗剂 ZXH951 对乳腺癌细胞生长抑制作用 及对端粒酶活性的影响

周龙恩, 韩 锐*

(中国医学科学院, 中国协和医科大学药物研究所, 北京 100050)

摘要: 目的 研究 ZXH951 在体外对乳腺癌细胞的生长抑制作用及对端粒酶活性的影响。方法 分别用细胞生长曲线、集落形成及竞争性配体与受体结合法, 测定 ZXH951 的体外抗肿瘤作用及其与孕激素受体(PR)、雌激素受体(ER)结合活性; 用流式细胞术及多聚酶链反应-端粒重复序列扩增法探讨 ZXH951 对人乳腺癌 T47D 细胞周期及端粒酶活性的影响。结果 ZXH951 对 ER 和 PR 双阳性的乳腺癌细胞 T47D 体外增殖有较强的抑制作用, 而对 ER 和 PR 双阴性的人乳腺癌细胞 MDA-MB-231 无明显抑制作用; ZXH951 与 PR 有较强结合活性, 而与 ER 无明显结合活性; 可将 T47D 细胞阻滞在 G₁ 期, 并对端粒酶活性有一定抑制作用。结论 ZXH951 是一个有发展前景的新型抗孕激素类化合物, 在体外对乳腺癌细胞有较强的抑制作用, 其作用机制可能与其通过 PR 介导的细胞增殖及对端粒酶活性抑制有关。

关键词: 孕激素受体拮抗剂; 乳腺癌; 端粒酶

中图分类号: R977.1; R979.1

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870(2000)10-0733-06

临床发现, 大多数乳腺癌呈激素依赖性, 60%~80% 的原发性乳腺癌为雌激素受体(ER)阳性, 其中一半以上同时表达孕激素受体(PR)。对于受体阳性的患者用内分泌药物治疗有效率达 50% 以上^[1]。目前临床常用的乳腺癌内分泌药物有抗雌激素类如他莫昔芬(tamoxifen)和托瑞米芬(toremifene), 孕激素激动剂甲羟孕酮(medroxyprogesterone acetate, MPA), 芳香化酶抑制剂如氨鲁米特(aminoglutethimide)和福美斯坦(formestane)等。近年来报道孕激素受体拮抗剂米非司酮(RU486)在体外对 ER 和 PR 双阳性的乳腺癌细胞株及体内对激素依赖的乳腺肿瘤均有较强的抑制作用^[2,3]。ZXH951 是从 RU486 的母核结构改造而来, 为一种新型的孕激素受体拮抗剂。本文报道 ZXH951 的体外抗肿瘤作用, 并对其作用机制进行初步探讨。

材 料 和 方 法

细胞株 ER 和 PR 双阳性的人乳腺癌细胞株 T47D 及 ER 和 PR 双阴性的人乳腺癌细胞株 MDA-

MB-231 由美国 Mount Sinai 医学院景永奎博士赠送^[4]。ER 和 PR 双阳性的人乳腺癌细胞株 MCF-7 由北京肿瘤防治研究所刘叙仪教授赠送。

药物及试剂 ZXH951 由上海中西药业股份有限公司提供; 米非司酮(RU486)及甲地孕酮(MPA)由浙江仙居制药厂提供。RPMI 1640 培养液购自 Gibco, 胰岛素及孕酮均购自 Sigma, 胎牛血清为杭州四季青生物工程材料研究所产品, 人重组孕激素受体-A 亚型、³H 孕酮、人重组雌激素受体及 ³H 雌二醇均由美国加州 Ligand 公司 Dale Mais 博士惠赠, Taq DNA 聚合酶、dNTP、TS 和 CX 引物均由北京鼎国公司提供, [^α-³²P]dCTP 购自北京亚辉生物医学工程公司。

细胞培养 T47D, MCF-7 或 MDA-MB-231 细胞接种于含 10% 胎牛血清、10 μg·mL⁻¹ 胰岛素、100 u·mL⁻¹ 青霉素、100 μg·mL⁻¹ 链霉素的 RPMI 1640 培养液中, 在 37℃ 5% CO₂ 温孵箱中培养传代。

1 ZXH951 对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

1.1 T47D 细胞生长曲线测定 取对数生长期细胞, 配成浓度为 1 × 10⁴ 个·mL⁻¹ 细胞悬液, 接种于 24 孔培养板中, 24 h 后加入药物, 对照组加入等体积的溶媒, 每一浓度 4 个复孔, 于给药后不同时间, 用 0.25% 胰蛋白酶-0.025% EDTA 液消化细胞, 轻轻吹打均匀后, 台盼蓝染色计数, 光镜下计数活细胞

收稿日期: 1999-12-28

作者简介: 韩锐, 男, 研究员, 博士生导师。

* 联系人 Tel: (010) 631 65204, Fax: (010) 631 01 7757,

E-mail: ruihan@public.east.cn.net

数。用常规 MTT 法检测药物对细胞增殖的抑制活性。

1.2 集落形成率的测定 取对数生长期的 T47D 或 MDA-MB-231 细胞,经 0.25% 胰蛋白酶-0.025% EDTA 液消化为单细胞悬液,用培养液稀释成浓度为 500 个/mL 的细胞悬液,取 2 mL 该细胞悬液接种到直径为 33 mm 的培养皿中,次日加不同浓度的药物或溶媒 2 μ L,每一浓度 3 个平皿,摇匀后置于 37 $^{\circ}$ C 5% CO_2 温孵箱中培养 8~9 d,弃去培养液, Wright-Giemsa 染色后,在 20 倍解剖显微镜下计数含 50 个细胞以上的集落,计算集落形成率。

2 人重组孕激素受体配体结合活性测定^[5]

将 10 μ g 孕激素受体-A 亚型蛋白加入结合缓冲液(10% glycerol, 10 mmol \cdot L⁻¹ Tris, 2 mmol \cdot L⁻¹ CHAPS, 12 mmol \cdot L⁻¹ DTT, 1 mmol \cdot L⁻¹ EDTA, pH 7.5) 中,同时加入 5 nmol \cdot L⁻¹ ³H-孕酮、不同浓度的竞争性结合配体及 1 μ mol \cdot L⁻¹ 孕酮,总反应体积为 500 μ L,混匀后,4 $^{\circ}$ C 冰浴 18 h,加入 7.5% 明胶磷酸盐缓冲液(NaCl 8.75 g \cdot L⁻¹, Na₂SO₄ 0.975 g \cdot L⁻¹, NaH₂PO₄ 1.42 g \cdot L⁻¹, Na₂HPO₄ 5.5 g \cdot L⁻¹, pH 7.0) 配制的葡聚糖包被的活性碳,充分混匀后,继续冰浴 10 min,800 \times g 4 $^{\circ}$ C 离心 10 min,取 700 μ L 上清液加到闪烁液中进行放射活性测定,根据 Cheng-Prusoff 公式计算 K_i 值并绘制竞争性结合曲线。

3 人重组雌激素受体配体结合活性测定^[5]

将雌激素受体蛋白 10 μ g 加入结合缓冲液(KCl 0.3 mol \cdot L⁻¹, Tris 10 mmol \cdot L⁻¹, DTT 5 mmol \cdot L⁻¹, pH 7.5) 中,同时加入 5 nmol \cdot L⁻¹ 的 ³H-雌二醇、不同浓度的竞争性结合配体及 1 μ mol \cdot L⁻¹ 雌二醇,总反应体积为 500 μ L,混匀后,4 $^{\circ}$ C 冰浴 16 h,加 6.0% 羟磷灰石(用结合缓冲液配制) 100 μ L,冰浴 15 min,3 000 r \cdot min⁻¹ 4 $^{\circ}$ C 离心 2 min,测定沉淀物放射活性,根据 Cheng-Prusoff 公式计算 K_i 值并绘制竞争性结合曲线。

4 细胞周期分析^[6]

用 0.25% 胰蛋白酶-0.025% EDTA 液消化经不同浓度药物处理 72 h 的细胞,1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,PBS 缓冲液(pH 7.4) 洗涤细胞 1 次,1 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,弃上清液,将细胞沉淀用 70% 乙醇在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中固定至少 12 h 以上。取固定后的细胞约 10⁶ 个,加入 0.5% 胃蛋白酶 0.5 mL,室温条件下消化 10 min,加入 1 mL 含 2.5 mg \cdot mL⁻¹ DAPI 和 30 μ g \cdot mL⁻¹ SRI 01 混合溶液,摇匀,

在 PAS II 型流式细胞光度计上进行单参数测定,每样品测定 2 \times 10⁴ 细胞,测定结果以直方图表示。实验数据采用累积曲线分割法,经 SPU68K 微机处理,计算各期细胞所占比例。

5 端粒酶提取、端粒重复序列的扩增及 Trap PCR 产物分析^[7,8]

用 0.25% 胰蛋白酶-0.025% EDTA 液消化并收集经不同浓度的药物处理的细胞,用冷 PBS 液洗涤 1 次,3 000 r \cdot min⁻¹ 离心 5 min,重悬于 1 mL 冷洗涤缓冲液中,4 $^{\circ}$ C 10 000 g 离心 1 min,弃上清液,加入 100 μ L 预冷的裂解液,4 $^{\circ}$ C 裂解 40 min,4 $^{\circ}$ C 21 880 r \cdot min⁻¹ 离心 1 h,吸取上清液,-70 $^{\circ}$ C 冻存。使用前,用考马斯亮蓝法对提取物进行蛋白定量,将蛋白浓度调整到 3 μ g \cdot mL⁻¹。采用 Kim 法进行端粒酶活性测定,方法略有改进。50 μ L 总反应体积中包括 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液(200 mmol \cdot L⁻¹ Tris-HCl (pH 8.3), MgCl₂ 15 mmol \cdot L⁻¹, KCl 0.63 mol \cdot L⁻¹, 5% Tween-20, EGTA 10 mmol \cdot L⁻¹, BSA 1 mg \cdot mL⁻¹), 2 μ L 端粒酶提取物,1 μ L TS 引物,2 U 的 Taq DNA 聚合酶,50 μ mol \cdot L⁻¹ dNTP, 0.4 μ L [α -³²P]dCTP (10 mCi \cdot mL⁻¹),混匀,30 $^{\circ}$ C 保温 30 min,90 $^{\circ}$ C 90 s 灭活端粒酶,加 CX 引物 2 μ L,混匀,覆盖石蜡油 20 μ L,在 PCR 仪(MJ Research 公司)上进行 31 个循环的 PCR 反应,每个循环由 94 $^{\circ}$ C 40 s, 50 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1.5 min 组成,最后于 72 $^{\circ}$ C 延长 10 min。实验中增设端粒酶灭活对照组,即另取一份对照组端粒酶提取物经 90 $^{\circ}$ C 水浴灭活 90 s。取 100 μ L PCR 产物经 10% 聚丙烯酰胺凝胶电泳,放射自显影,照像,条带用英国 UVI 凝胶图像扫描仪扫描并进行量化分析。

统计学处理 所有数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较用 *t* 检验, *P* < 0.05 被认为有统计学意义。

结 果

1 ZXH951 对 T47D 细胞生长曲线的影响

用不同浓度的 ZXH951 处理 T47D 细胞,可见 ZXH951 对 ER 和 PR 双阳性的 T47D 细胞生长有明显抑制作用,呈时间和浓度依赖性(图 1)。

2 ZXH951 对肿瘤细胞增殖的抑制作用

MTT 法检测 ZXH951 对培养的 T47D, MCF-7, MDA-MB-231 的 IC₅₀ 值见表 1。结果表明,ZXH951 对 ER 和 PR 受体阳性的人乳腺癌 T47D 及 MCF-7 细胞较敏感,而对 ER 和 PR 受体双阴性的人乳腺癌

细胞 MDA-MB-231 抑制作用较弱, 其抑制作用较 RU486 及 MPA 强, 较 tamoxifen 稍弱。

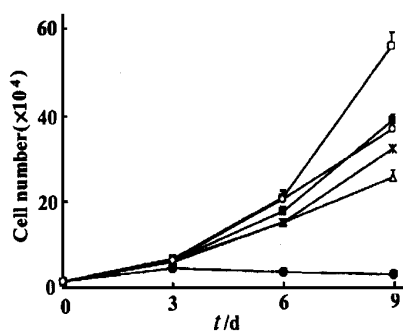


Fig 1 Effect of ZXH951, RU486 and MPA on the growth curve of T47D cells. Cells were incubated with ZXH951 and RU486 for indicated days. Data are presented as means of triplicate determinations from separate experiments based on counting of surviving cells

□—□ Control; ■—■ ZXH951 0.1 μmol·L⁻¹; △—△ ZXH951 1 μmol·L⁻¹; ●—● ZXH951 10 μmol·L⁻¹; ×—× RU486 1 μmol·L⁻¹; ○—○ MPA 1 μmol·L⁻¹

3 对 T47D 细胞及 MDA-MB-231 细胞集落形成率

Tab 2 Effect of ZXH951 on colony formation of T47D human breast carcinoma cells (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Concentration/ μmol·L ⁻¹	No. of colony per flask	Rate of colony formation/ %	Inhibition/ %
Control		270 ± 5	54.0 ± 1.0	
ZXH951	0.1	207 ± 26	41 ± 5	23.3
	1.0	158 ± 20	32 ± 4*	41.5
	10.0	101 ± 14	20.1 ± 2.7*	62.7
RU486	1.0	191 ± 4	38.2 ± 0.7	29.3

1000 cells were seeded in each 33 mm culture dish and grow under conditions as described in Materials and Methods. Cells were treated with ZXH951, RU486 or DMSO for 9 days. * P < 0.05 compared with control

Tab 3 Effect of ZXH951 on colony formation of MDA-MB-231 human breast carcinoma cells (n = 3, $\bar{x} \pm s$)

Group	Concentration/ μmol·L ⁻¹	No. of colony per flask	Rate of colony formation/ %	Inhibition/ %
Control		105 ± 13	52 ± 6	
ZXH951	0.1	104 ± 4	51.9 ± 2.3	1.1
	1.0	105 ± 8	50 ± 4	5.7
	10	104 ± 3	47.7 ± 1.8	9.1
RU486	1.0	105 ± 9	50.8 ± 0.9	3.2

1000 cells were seeded in each 33 mm culture dish and grow under conditions as described in Materials and Methods. Cells were treated with ZXH951, RU486 or DMSO for 8 days

4 人重组孕激素受体 雌激素配基结合活性

采用活性碳吸附法测出 3 个结构不同的化合物与孕激素受体-A 的结合活性, ZXH951, RU486 及 MPA 与孕激素受体结合的 K_i 值分别为 0.814,

的影响

ZXH951 可使 T47D 细胞的集落形成率明显减少, 呈明显的量效关系。10 μmol·L⁻¹ 的 ZXH951 作用后的细胞集落形成率仅为 20.1%, 抑制率为 62.7%, 而对 ER 和 PR 受体阴性的人乳腺癌细胞集落形成率无明显的影响(表 2, 3)。

Tab 1 Cytotoxic activity of ZXH951, RU486, tamoxifen and MPA on human breast carcinoma cell lines

Cell line	EC ₅₀ / μmol·L ⁻¹			
	ZXH951	Tamoxifen	RU486	MPA
T47D	4.14	1.91	4.63	>100
MCF-7	4.98	2.42	5.04	31.0
MDA-MB-231	15.6	11.6	19.1	>100

2000 cells were seeded in each well and grow under conditions as described in Materials and Methods. 24 h later, cells were treated with ZXH951 and RU486 or DMSO for 5 ~ 6 days. Survival cells were measured by MTT method. Values are means of triplicate determinations from three separate experiments. MPA: medroxyprogesterone acetate

1.221, 2.305。显示 ZXH951 与 PR-A 有较强的亲和力, 其结合的强弱顺序为 ZXH951 > RU486 > MPA(图 2)。上述 3 个化合物与雌激素受体均无明显的结合活性。

5 对细胞周期的影响

经不同浓度的药物作用后,细胞周期动力学发生明显改变。随药物浓度加大,作用时间延长,G₁期细胞百分率明显增高,S期和G₂+M期细胞百分率明显降低。结果表明ZXH951将T47D细胞阻滞在G₁期(表4)。

Tab 4 Cytokinetic characteristics of T47D human breast carcinoma cells treated with ZXH951

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Exposure time/ h	Cell cycle distribution/ %		
			G ₁	S	G ₂ + M
Control		48	73.74	19.18	7.08
ZXH951	1	48	76.19	18.22	5.59
	5	48	83.54	12.55	3.91
	10	48	90.04	6.52	3.4
Control		96	69.76	24.47	5.77
ZXH951	0.2	96	76.97	18.63	4.40
	1	96	79.56	17.56	2.85
	5	96	86.98	10.32	2.70
	10	96	93.91	4.16	1.93

Cells were incubated with ZXH951 or DMSO for 2 or 4 days. FACS analysis was performed after staining with DAPI and SR101 as described in the Materials and Methods. Data are presented as means of triplicate determinations from three separate experiments

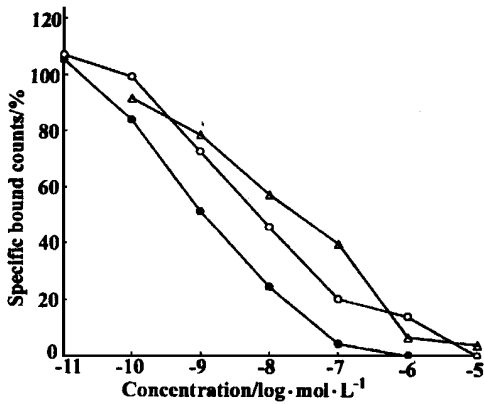


Fig 2 Binding of ZXH951, RU486 and medroxyprogesterone acetate (MPA) to human progesterone receptor (PR-A). PR-A was expressed in a baculovirus expression system in Sf21 insect cells. Binding assay was performed on crude whole cell extracts. The final volume was 500 μL and contained 10 μg protein for PR-A and 5 $\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ [³H] progesterone and varying concentrations of competing ligands. Incubations were carried out at 4 °C for 18 h. Non-specific binding was defined as binding remaining in the presence of 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of progesterone. At the end of the incubation period, bound ligand was separated from the free by dextran-coated charcoal method. Percent of specifically bound radiolabelled progesterone is plotted versus concentration of compound
 •—• ZXH951 ; ○—○ RU486 ; △—△ MPA

6 对端粒酶活性的影响

Trap PCR的测定结果显示,对照组T47D细胞端粒酶活性较高,ZXH951在0.4, 2.0, 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 连续作用72 h的条件下可明显抑制端粒酶活性,其中10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ZXH951抑制率达41.2%(表5)。

Tab 5 Effect of ZXH951 on telomerase activity of T47D human breast carcinoma cells

Group	Concentration/ $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	Relative activity/ %
Control		100
ZXH951	0.4	87.7
	2	71.4
	10	58.8

Cells were treated with different concentrations of ZXH951 for 72 h. Cell extracts were prepared as described in the Materials and Methods. Telomerase activities were measured by PCR-based telomeric repeat amplification protocol (Trap PCR). The levels of telomerase activity were semiquantified by comparing the signal intensity of 6-base ladders using UVI system

讨 论

孕激素受体拮抗剂是一类作用机制独特的乳腺癌内分泌治疗药物。Michna等报道RU486对ER和PR阳性的乳腺癌细胞株及激素依赖性乳腺肿瘤均具有较强的抗肿瘤活性,其作用机制可能是通过PR介导的抗细胞增殖效应及诱导终末分化等^[9~11]。本文报道的新化合物ZXH951体外在0.1~10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 范围内对ER和PR双阳性人乳腺癌细胞株T47D及MCF-7的增殖均有明显的抑制作用,而对ER和PR双阴性人乳腺癌细胞株MDA-MB-231的增殖却无明显的抑制作用。我们

在实验中观察到 ZXH951 在 $25 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 以上较高浓度条件下才表现出非受体途径介导的细胞毒作用。受体结合实验表明 ZXH951 与 PR 具有较强的结合活性, 而与 ER 无明显的结合活性。这些结果表明, 通过 PR 介导的抗细胞增殖(包括生长抑制和细胞毒)可能是 ZXH951 选择性地抑制受体阳性的乳腺癌细胞株的作用机制之一。细胞周期动力学的结果表明, ZXH951 的抗细胞增殖是将细胞阻滞在 G_1 期。

端粒与端粒酶是近年来肿瘤学领域的研究热点之一。“端粒-端粒酶”假说已为越来越多的研究结果所证实。人类端粒由 6 碱基重复序列 (TTAGGG) 和结合蛋白组成, 有维持染色体的稳定性和 DNA 完整复制的功能。端粒酶是一种核糖核蛋白, 由小分子 RNA 和蛋白质组成, 其 RNA 组份包含与端粒 DNA 重复序列互补的顺序^[12,13]。研究发现, 随着细胞的不断分裂, 端粒逐渐缩短, 当端粒缩短到一定程度时, 可能触发某种信号, 导致细胞衰老和死亡^[14]。与正常组织或良性病变相比, 大多数人类恶性肿瘤中的端粒酶活性显著升高^[15,16]。大量的临床数据表明, 绝大多数乳腺癌均能检测到端粒酶活性, 提示端粒酶的激活在乳腺癌的发生过程中起重要作用。本文的研究结果表明, ZXH951 在终浓度为 $0.4, 2, 10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的条件下, 连续作用 72 h, 可明显抑制端粒酶活性, 提示 ZXH951 的抑制端粒酶活性与其抑制细胞增殖有一定的相关性。至于其抑制端粒酶活性是否与细胞分化有关有待于进一步研究。此外, 其抑制端粒酶活性的确切机制如何, 是通过影响端粒酶相关基因的表达或通过影响细胞周期特异性的调控因子, 有待进一步深入研究。

致谢: Dale Mais 博士赠送受体结合用试剂, 景永奎博士赠送人乳腺癌细胞株 T47D 和 MDA-MB-231, 刘叙仪教授赠送人乳腺癌细胞株 MCF-7, 本实验室刘红岩老师及博士生赵万洲在细胞周期分析及端粒酶活性测定方面给予帮助和支持。

REFERENCES:

[1] Goldhirsch A, Gelber RD. Endocrine therapies of breast cancer [J]. *Semin Oncol*, 1996, **23**:494 - 505.
 [2] Etreby MF, Liang Y, Wrenn RW, et al. Additive effect of mifepristone and tamoxifen on apoptotic pathways in MCF-7 human breast cancer cells [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1998, **51**:149 - 168.

[3] Schneider MR, Michna H, Nishino Y, et al. Antitumor activity of the progesterone antagonists ZK98, 299 and RU38, 486 in the hormone-dependent MXT- mammary tumor model of the mouse and the DMBA- and the MNU-induced mammary tumor models of the rat [J]. *Eur J Cancer Clin Oncol*, 1989, **25**:691 - 701.
 [4] Classen S, Possinger K, Pelka-fleischer R, et al. Effect of onapristone and medroxyprogesterone acetate on the proliferation and hormone receptor concentration of human breast cancer cells [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1993, **45**:315 - 319.
 [5] Mais DE, Hayes JS, Heap RB, et al. Specific interaction of progestins and anti-progestins with progesterone antibodies plasma binding proteins and the human recombinant receptor [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1995, **54**:63 - 69.
 [6] Xia LJ, Han R. Differentiation of B16 melanoma cells induced by ginsenoside RH2 [J]. *Acta Pharm Sin* (in Chinese), 1996, **31**:742 - 745.
 [7] Kim NW, Piatyszek MA, Prowse KR, et al. Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer [J]. *Science*, 1994, **266**:2011 - 2015.
 [8] Aldous KW, Marean AJ, Dehart MJ, et al. Effects of tamoxifen on telomerase activity in breast carcinoma cell lines [J]. *Cancer*, 1999, **85**:1523 - 1529.
 [9] Michna H, Schneider MR, Nishino Y, et al. Antitumor activity of the progesterone antagonists ZK98, 299 and RU38, 486 in the hormone-dependent rat and mouse mammary tumors: mechanistic studies [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1989, **14**:275 - 288.
 [10] Schneider MR, Michna H, Nishino Y, et al. Antitumor activity and mechanism of action of different antiprogestins in experimental breast cancer models [J]. *J Steroid Biochem Mol Biol*, 1990, **37**:783 - 787.
 [11] Bardon S, Vignon F, Montcourrier P, et al. Steroid receptor mediated cytotoxicity of an antiestrogen and an antiprogestin in breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1987, **47**:1441 - 1448.
 [12] Rhyu MS. Telomeres, telomerase and immortality [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1995, **87**:884 - 894.
 [13] Nakamura TM, Morin GB, Chapman KB, et al. Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human [J]. *Science*, 1997, **277**:955 - 959.
 [14] Harley CB, Futcher AB, Greider CW. Telomeres shorten during aging of human fibroblasts [J]. *Nature*, 1990, **345**:458 - 460.
 [15] Hiya ma E, Gollahon L, Kodama T, et al. Telomerase activity in human breast tumors [J]. *J Natl Cancer Inst*, 1996, **88**:116 - 122.
 [16] Sugino T, Yoshida K, Bolodeoku, et al. Telomerase activity in human breast cancer and benign breast lesions: diagnostic applications in clinical specimens, including fine aspirates [J]. *Int J Cancer*, 1996, **69**:301 - 306.

EFFECTS OF A NOVEL ANTIPROGESTIN DERIVATIVE ZXH951 ON PROLIFERATION AND TELOMERASE ACTIVITY OF HUMAN BREAST CARCINOMA CELL LINES

ZHOU Longen, HAN Rui

(*Institute of Materia Medica, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100050, China*)

ABSTRACT: **AIM** To investigate the antiproliferative activity of a new synthetic steroid ZXH951 structurally related to mifepristone (RU486) and its effects on cell cycle traverse and telomerase activity in human breast carcinoma cell lines. **METHODS** Antiproliferative activity was determined by cell growth curve, MTT reduction and colony formation. Receptor binding affinities were measured by competitive binding assay using radiolabelled ligands. Cell cycle distribution was analyzed by flow cytometry. Telomerase activity was investigated by TRAP-PCR. **RESULTS** ZXH951 exhibited potent antiproliferative activity in estrogen receptor and progesterone receptor positive human breast carcinoma cell lines *in vitro*, high affinity with human progesterone receptor A, little affinity with estrogen receptor and blockade the cells in G₁ phase. Moreover, when T47D cells were exposed to 0.4, 1.0 and 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ of ZXH951 for 72 h, the telomerase activity was significantly decreased. **CONCLUSION** ZXH951 is a promising progesterone receptor antagonist. It significantly inhibits the growth of estrogen receptor and progesterone receptor positive human breast carcinoma cells. Its mechanism of action may be related to its antiproliferation mediated by progesterone receptor and inhibition of telomerase activity.

KEY WORDS: progesterone receptor antagonist; breast cancer; telomerase