论著

文章编号:1000-5404(2009)18-1794-04

经动脉灌注新辅助化疗对局部进展期乳腺癌激素受体表达水平的上调作用

甘长清,王小毅 (重庆医科大学第一附属医院普通外科,重庆 400016)

摘 要:目的 探讨经动脉灌注化疗对乳腺癌雌激素(estrogen receptor, ER)和孕激素受体(progesterone receptor, PR)表达的影响。**方法** 应用逆转录聚合酶链式反应(RT-PCR)和免疫组化方法检测81例乳腺癌患者经动脉灌注化疗前后的雌孕激素受体表达情况。采用Western blot检测经动脉灌注化疗前后ER和PR的变化。**结果** RT-PCR结果表明,81例患者中43例(53.1%)ER mRNA水平升高,33例(40.7%)PR mRNA水平升高,25例(30.9%) ER和PR mRNA水平同时升高。免疫组织化学结果提示,35例(43.2%) ER表达水平升高,其中14例(17.3%)由阴性转为阳性;21例(26.0%) PR表达水平升高,其中10例(12.2%)由阴性转为阳性;16例(19.8%)ER和PR表达同时升高。Western blot显示,经动脉灌注化疗后,81例患者中38例(46.9%)ER蛋白水平升高,30例(37.0%)PR蛋白水平升高,21例(25.9%)ER和PR蛋白水平同时升高。**结论** 经动脉灌注化疗可有效上调ER、PR mRNA和蛋白水平的表达,有利于后续化疗药物对肿瘤细胞的杀灭。

关键词: 乳腺肿瘤;受体;雌激素;孕激素;经动脉灌注化疗

中图法分类号: R730.23;R730.53;R737.9 **文献标识码:** A

Transarterial infusion neoadjuvant chemotherapy up-regulates expressions of hormone receptors in local advanced breast cancer tissues

GAN Chang-qing, WANG Xiao-yi (Department of General Surgery, First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of transarterial infusion (TAI) chemotherapy on estrogen receptor (ER) and progesterone receptors (PR) expression in breast carcinoma tissue. **Methods** Samples of 81 patients with breast carcinoma were selected in this study. ER and PR mRNAs levels in the samples were determined by RT-PCR. Immunohistochemistry was employed to measure ER and PR expressions in different samples before and after TAI chemotherapy. Western blotting was used to assay ER and PR proteins level in the samples before and after the chemotherapy. **Results** RT-PCR results indicated that ER mRNA level was increased in 43 cases (53.1%) and PR level in 33 cases (40.7%). Meanwhile, both ER and PR mRNAs levels were increased in 25 cases (30.9%). Immunohistochemistry results showed that ER level was up-regulated in 35cases (43.2%), and PR level in 21 cases (26.0%). Both ER level and PR level were up-regulated in 16 out of 81 cases(19.8%). Western blotting also suggested that the both proteins levels of ER and PR were up-regulated in some patients after the chemotherapy. **Conclusion** Transarterial infusion neoadjuvant chemotherapy affects the mRNA and protein level of the hormone receptors, which facilitates the subsequent killing effect of chemotherapy on tumor cells. ER and PR expressions should be determined after the transarterial infusion chemotherapy, which might provide a guide for the subsequent treatment and prognosis.

Key words: breast cancer; receptor; estrogen; progestogen; transarterial infusion chemotherapy

内分泌治疗是乳腺癌综合治疗的重要手段之一,雌激素受体(estrogen receptor, ER)、孕激素受体(progesterone receptor, PR)检测对于内分泌治疗的疗效预测和乳腺癌预后判断有重要意义[1]。研究发现,乳腺癌中低水平的ER、PR可为内分泌治疗中化疗的加入提供一种有益的预测[2]。新辅助化疗(neoadjuvant chemotherapy)作为局部进展期乳腺癌一种新的治疗策略,取得了良好的效果[3,4]。而经动脉插管灌注化疗可以明显提高抗癌药物在癌组织、周围组织及其淋巴结中的药物浓度[5]。本研究通过检测经动脉灌注化疗前后ER、PR的表达情况,探讨经动脉灌注化疗对ER、PR表达的影响及其对于后续治疗、预后判断的指导意义。

作者简介: 甘长清,男,四川省邻水县人,副主任医师,主要从事乳腺癌方面的研究,发表论文9篇。E-mail: huameixinan@163.com

收稿日期: 2009-03-02;**修回日期:** 2009-04-01

1　对象与方法

1.1　研究对象

以 2004 年 12 月至 2008 年 4 月重庆医科大学第一附属医院乳腺中心治疗的 81 例局部进展期乳腺癌患者为研究对象,使用经动脉灌注化疗前均以粗针穿刺进行组织学检测,证实为浸润性乳腺癌。以 20 例整形美容样本作为正常对照。

1.2　主要试剂和仪器

反转录试剂购自 Promega 公司,PCR 相关试剂购自 TaKaRa 公司,兔抗人 ER、PR 多克隆抗体及生物素标记羊抗兔 IgG 购自中杉金桥生物有限公司,PCR 仪(Thermo,USA),凝胶成像系统、电泳仪、半干转膜仪(Bio-Rad 公司)。

1.3　方法

1.3.1　化疗方法　采用 Seldinger 技术用 6 ~ 7 号 Cobra 管经股动脉插至锁骨下动脉,经冒烟法注入造影剂,显示肿瘤血管影,灌注化疗药物。给予环磷酰胺(江苏恒瑞医药股份有限公司)600 mg/m^2,表阿霉素(江苏恒瑞医药股份有限公司)50 ~ 60 mg/m^2,5-氟尿嘧啶(5-Fu,山西耀威制药有限公司)500 mg/m^2。化疗后 3 ~ 5 d 行改良根治术或根治术。化疗前的粗针穿刺标本和化疗后的根治术标本均进行 ER 和 PR 的检测。

1.3.2　RT-PCR 检测

1.3.2.1　RNA 抽提　组织样本在冰浴上清除周围组织,PBS 清洗、剪碎、研磨,室温下放置 5 min。加入 1 ml Trizol 溶液在玻璃匀浆器中彻底匀浆,用 PBS 洗 2 次,离心后吸去上清。加入 0.2 ml 氯仿,室温下剧烈振荡 15 s,12 000 × g 离心 15 min。小心吸取上层无色液相加入异丙醇 0.6 ml,室温下静置 5 min,12 000 × g 离心 10 min。弃上清,加入 75% 乙醇 1 ml 振荡,轻轻洗涤后 12 000 × g 离心 10 min。弃上清,室温下干燥。用 30 μl RNase-free ddH_2O 充分溶解,混匀后,采用分光光度计检测 D(260)/D(280)比值验证 RNA 的纯度,比值介于1.6 ~ 2.0 时,可用于 RT-PCR 检测。RNA 的含量:RNA(μg/ml) = D(260)值 × 44 × 稀释倍数,余 RNA −20 ℃保存。

1.3.2.2　反转录(RT)　各样本均取 2 μg RNA,补 RNase-free ddH_2O 至 11 μl。于 70 ℃水浴 5 min 后立即放在冰浴上,各管中再分别加入以下试剂:5 × RT Buffer,dNTPs (10 mmol/L),RNase Inhibitor, Oligo dT, M-MLV, RT 总体系为 20 μl。于 42 ℃ 水浴 60 min,70 ℃ 热灭活 M-MLV 10 min。

1.3.2.3　PCR 检测　利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物(上海英骏生物技术有限公司合成):ER(上游:5′-TGGTC-CAGCTCCCACTCGCT-3′, 下游: 5′-TGAGACACCAGTGCAT-TCACTG-3′, 483 bp); PR(上游: 5′-CAGGAATCCACAACCA-CAAG-3′, 下游: 5′-TCGTATGCTGGAGACCTAAG-3′, 176 bp); GADPH(上游: 5′-ACGCATTTGGTCGTATTGGG-3′, 下游: 5′-TGATTTTGGAGGGATCTCGC-3′,230 bp)。

PCR:20 μl 反应体系,内含 ER、PR 或 GADPH cDNA 模板 0.5 μl (阴性对照以蒸馏水代替),10 × Buffer 2 μl,25 mmol/L $MgCl_2$ 1.2 μl,2.5 mmol/L dNTPs 0.5 μl,10 μmol/L ER、PR 或 β-actin 上、下游引物各 0.5 μl,*Taq* DNA 聚合酶 0.2 μl,蒸馏水 13.6 μl。

反应条件:94 ℃预变性 1 min,94 ℃变性 30 s,52 ℃退火 30 s,72 ℃延伸 1 min,共计 33 个循环,最后 72 ℃ 10 min。电泳:PCR 产物 10 μl 与 6 × Buffer 2 μl 混合上样,1.5% 琼脂糖凝胶电泳 150 V 15 min,紫外透析灯对凝胶成像分析。电泳条带结果判断:以 PR 或 ER 的灰度值与 GADPH 的灰度值的比值表示 PR 或 ER mRNA 的表达水平。

1.3.3　免疫组织化学检测　乳腺癌石蜡包埋标本制成 5 μm 厚的切片,二甲苯脱蜡水化后,3% H_2O_2 灭活内源性酶。PBS 洗 3 次,1 min/次。分别与一抗(兔抗人 ER、PR 多克隆抗体,1∶1 000)、二抗(生物素标记羊抗兔 IgG,1∶400)及辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素复合物(1∶400)孵育。PBS 洗 3 次,2 min/次。苏木精复染核 5 ~ 10 min。水洗、分化、蓝化、脱水、透明并封固,镜下观察。

结果判定标准:癌细胞核染色为阳性。阳性细胞占据 10% ~ 25% 为(+);棕色颗粒较深,阳性细胞占 26% ~ 50% 为(++);棕色颗粒量多,深棕色,阳性细胞数占 50% 以上为(+++);阳性细胞数少于 10% 为阴性。

1.3.4　Western blot 检测　取约 200 mg 组织置玻璃匀浆器内,立即加入 150 μl 预冷的蛋白裂解液(Pierce 公司,剧烈振荡 15 s,冰浴 10 min。随后超声破碎细胞,80 W,3 次,每次约 5 s。接着 12 000 × g、4 ℃离心 10 min。按 PIERCE 蛋白测定试剂盒说明进行蛋白质定量,样本分装于 −80 ℃冰箱中保存备用。将提取液的蛋白浓度调整一致,各取 50 μg 蛋白经 10% 十二烷基磺酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)后,半干电转移法(20 V,20 min)转至 ECL 膜(Pierce 公司)上。

转膜结束后用含 5% 脱脂奶粉封闭 6 h,TBS 洗膜 3 次,每次 5 min。随后分别加入兔抗人 ER 单克隆抗体(47×10^3)、PR 单克隆抗体(81×10^3)和 β-actin 单克隆抗体(40×10^3,1∶500,Santa Cruz 公司),4 ℃孵育 12 h。TBS 洗膜 2 次,每次 5 min。然后再加入辣根过氧化物(HRP)标记羊抗兔 IgG(1∶3 000),4 ℃ 孵育 2 h。TBS 洗膜 2 次,每次 5 min,化学发光试剂盒显色、曝光,对 ER 或 PR 表达情况进行检测。结果判断:以 ER 或 PR 的灰度值与 β-actin 的灰度值的比值表示 ER 或 PR 蛋白相对表达水平。

1.4　统计学处理

应用 SPSS 10.0 统计学软件,2 组间比较采用 t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。

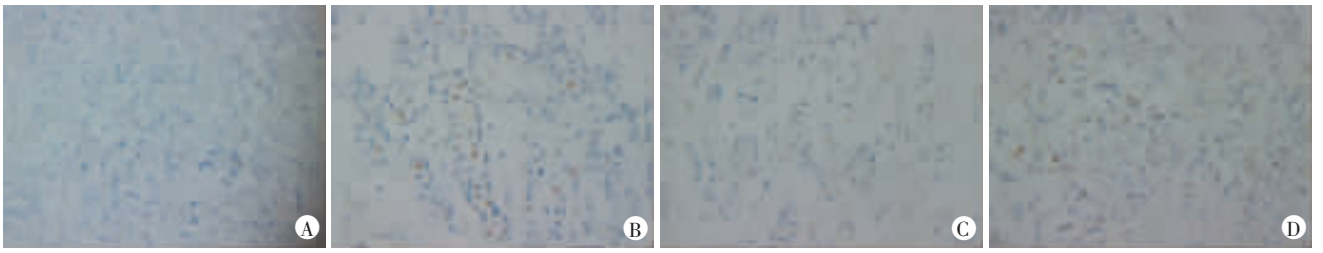
2　结果

2.1　免疫组织化学检测经动脉灌注化疗对 ER、PR 表达的影响

81 例患者中 35 例(43.2%)ER 表达水平升高,其中 14 例(17.3%)由阴性转为阳性(图 1A、B);81 例患者中 21 例(26.0%)PR 表达水平升高,其中 18 例(22.2%)由阴性转为阳性(图 1C、D)。

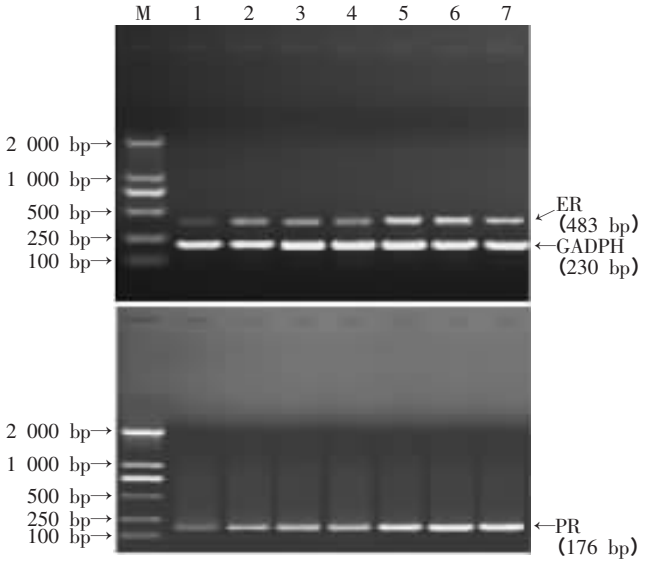
2.2　RT-PCR 检测经动脉灌注化疗前后 ER、PR mRNA 表达水平变化

81 例患者中,43 例(53.1%)ER mRNA 水平升高,33 例(40.7%) PR mRNA 水平升高,25 例(30.9%)ER 和 PR mRNA 水平同时升高;PCR 扩增产物电泳结果提示,与经动脉灌注化疗前比较,灌注后 ER、PR mRNA 表达水平明显增高(P < 0.01,图 2,表 1)。



A:经动脉灌注化疗前 ER 表达;B: 经动脉灌注化疗后 ER 表达; C: 经动脉灌注化疗前 PR 表达; D: 经动脉灌注化疗后 PR 表达

图 1 免疫组织化学检测经动脉灌注化疗前后 ER、PR 表达的变化 (SABC ×200)



M:DNA 标准(DL 2000);1: 正常对照组; 2 -4: 经动脉灌注新辅助化疗处理前组; 5 -7: 经动脉灌注新辅助化疗处理后组

图 2 RT-PCR 检测经动脉灌注新辅助化疗处理前后 ER、PR mRNA 表达的变化

表 1 经动脉灌注化疗前后 ER、PR mRNA 相对表达水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER/GADPH	PR/GADPH
正常对照组	20	0.244 ±0.002	0.251 ±0.004
经动脉灌注新辅助化疗处理前组	25	0.467 ±0.005[a]	0.491 ±0.045[a]
经动脉灌注新辅助化疗处理后组	25	0.667 ±0.039[ab]	0.733 ±0.058[ab]

a: $P<0.01$,与空白对照组比较; b: $P<0.01$,与经动脉灌注新辅助化疗处理前比较

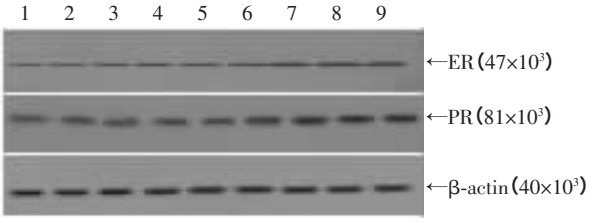
2.3 Western blot 检测经动脉灌注化疗前后 ER 和 PR 蛋白表达水平

经动脉灌注化疗后,81 例患者中 38 例(46.9%)ER 蛋白水平升高,30 例(37.0%)PR 蛋白水平升高,21 例(25.9%)ER 和 PR 蛋白水平同时升高;经动脉灌注化疗明显上调部分乳腺癌患者 ER、PR 蛋白表达水平($P<0.01$,图 3,表 2)。

表 2 经动脉灌注化疗前后 ER 和 PR 蛋白相对表达水平的变化 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ER/β-actin	PR/β-actin
正常对照组	20	0.156 ±0.014	0.292 ±0.004
经动脉灌注新辅助化疗处理前组	21	0.267 ±0.013[a]	0.327 ±0.010[a]
经动脉灌注新辅助化疗处理后组	21	0.541 ±0.014[ab]	0.604 ±0.154[ab]

a: $P<0.01$,与空白对照组比较; b: $P<0.01$,与经动脉灌注新辅助化疗处理前比较



1 -3: 正常对照组; 4 -6: 经动脉灌注新辅助化疗处理前组; 7 -9: 经动脉灌注新辅助化疗处理后组

图 3 Western blot 检测经动脉灌注新辅助化疗处理前后 ER、PR 蛋白的表达

3 讨论

乳腺癌的发生与雌激素密切相关,其可与相应受体结合,使雌激素能作用于腺上皮,促使肿瘤的发生与发展[6]。孕激素受体(PR)则与孕激素结合导致受体二聚化,与特定靶基因启动子区的顺式作用元件结合,调节敏感靶基因的转录。

近来研究发现,ER、PR 阳性乳腺癌一般分化好、发展慢, 进行内分泌治疗有效率较高; ER、PR 阴性乳腺癌则分化差、侵袭性强、恶性度高, 进行内分泌治疗效率低[2]。在本研究中,我们同样发现低分化型乳腺癌患者组织 ER、PR 呈现出低水平表达,与相关报道基本一致[2,7]。Viale 新辅助化疗对于 ER、PR 阴性的乳腺癌患者治疗效果优于内分泌治疗, 这一现象也出现在 ER、PR 低表达的乳腺癌患者中。Viale 等[2]同时指出,低水平的 ER 和 PR 是内分泌治疗中加入化疗的一种有益的预测,而低水平的 PR 可能为表达 ER 的乳腺癌患者提供进一步的诊断预测。在相关的研究中,Fuksiewicz 等[7]在乳腺癌患者血清中也发现相对低水平表达的 ER 和 PR。

经动脉灌注化疗是否影响雌孕激素受体表达目前尚无定论。Kasami 等[8]对新辅助化疗前后乳腺癌组织中 ER、PR 和 Her-2 的表达水平进行检测时发现,新辅助化疗前后 ER 或 Her-2 的表达水平没有发生改变,而 PR 的表达水平出现明显变化。Tacca 等[9]对 420 例乳腺癌患者研究也发现,新辅助化疗可使部分患者激素

受体阴性转为阳性。

在本研究中,我们发现经动脉灌注新辅助化疗后,与正常对照组比较,81 例患者中部分患者雌孕激素受体表达水平在 mRNA 和蛋白水平出现了明显上调,其结果与 Tacca 等[9]基本一致。据此,我们认为有效的动脉灌注新辅助化疗可提高 ER、PR 的表达,促使 ER(-)、PR(-)转变为 ER(+)、PR(+),其临床意义在于更好地判断乳腺癌的发生、发展及化疗的干预时机。我们推测,新辅助化疗将更倾向于杀灭受体阴性的乳腺癌细胞,保留对化疗不敏感的受体阳性细胞,从而上调新辅助化疗后的激素受体表达。事实上,在本研究中孕激素受体表达升高和雌孕激素受体双阳性患者的增多均未显示出统计学意义,这可能与样本量较小有关,有待于扩大样本量进一步研究证实。

参考文献:

[1] 程　鸿, 姜　军, 杨新华, 等. 不同方案新辅助化疗对乳腺癌激素受体表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(10): 973 - 975.

[2] Viale G, Regan M M, Maiorano E, *et al*. Chemoendocrine compared with endocrine adjuvant therapies for node-negative breast cancer: predictive value of centrally reviewed expression of estrogen and progesterone receptors-International Breast Cancer Study Group[J]. J Clin Oncol, 2008, 26(9): 1404 - 1410.

[3] Dai Z, Wan X, Kang H, *et al*. Clinical effects of shenqi fuzheng injection in the neoadjuvant chemotherapy for local advanced breast cancer and the effects on T-lymphocyte subsets[J]. J Tradit Chin Med, 2008, 28(1): 34 - 38.

[4] Eralp Y, Smith T L, Altundag K, *et al*. Clinical features associated with a favorable outcome following neoadjuvant chemotherapy in women with localized breast cancer aged 35 years or younger[J]. J Cancer Res Clin Oncol, 2009, 135(1): 141 - 148.

[5] 张　毅, 周　艳, 郭美琴, 等. 全乳大切片观察新辅助化疗后乳腺癌浸润性生长特征变化[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(21): 2083 - 2085.

[6] Cho L C, Hsu Y H. Expression of androgen, estrogen and progesterone receptors in mucinous carcinoma of the breast[J]. Kaohsiung J Med Sci, 2008, 24(5): 227 - 232.

[7] Fuksiewicz M, Kaminska J, Kotowicz B, *et al*. Serum cytokine levels and the expression of estrogen and progesterone receptors in breast cancer patients[J]. Clin Chem Lab Med, 2006, 44(9): 1092 - 1097.

[8] Kasami M, Uematsu T, Honda M, *et al*. Comparison of estrogen receptor, progesterone receptor and Her-2 status in breast cancer pre- and post-neoadjuvant chemotherapy[J]. Breast, 2008, 17(5): 523 - 527.

[9] Tacca O, Penault-Llorca F, Abrial C, *et al*. Changes in and prognostic value of hormone receptor status in a series of operable breast cancer patients treated with neoadjuvant chemotherapy[J]. Oncologist, 2007, 12(6): 636 - 643.

(编辑　吴培红)

(上接 1793 页)

2　结果

治疗组治疗前后相比, FBG、PBG、HbAic 下降程度差异有统计学意义($P < 0.05$);对照组治疗前后相比, FBG、PBG、HbAic 虽有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$);治疗后,治疗组 FBG、PBG、HbAic 与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$,表 1)。2 组均未发生严重低血糖及肝肾功能损害等副作用。

表 1　2 组治疗前后 FBG、PBG、HbAic 指标的比较 ($n = 36, \bar{x} \pm s$)

组别		FBG(mmol/L)	PBG(mmol/L)	HbAic(%)
治疗组	治疗前	10.28 ± 2.55	12.96 ± 1.87	8.72 ± 2.10
	治疗后	7.22 ± 1.70[ab]	8.62 ± 1.21[ab]	7.05 ± 1.13[ab]
对照组	治疗前	10.56 ± 2.32	13.19 ± 2.13	8.65 ± 2.02
	治疗后	7.93 ± 1.87	9.26 ± 2.12	7.81 ± 1.76

a:$P < 0.05$,与治疗前比较;b:$P < 0.05$,与对照组治疗后比较

3　讨论

2 型糖尿病的病理生理机制主要为胰岛素抵抗及胰岛 β 细胞功能受损。患者餐时异常的胰岛素分泌模式,导致餐后血糖的持续升高。瑞格列奈化学结构是氨甲酰甲基苯甲酸,作用类似胰岛素生理分泌模式,是一种餐时血糖调节剂。降糖机制在于通过与胰岛 β 细胞上相应受体的结合,关闭 ATP 敏感钾离子通道,刺激胰岛 β 细胞释放胰岛素。二甲双胍降糖机制在于抑制肝脏糖异生、肠道对葡萄糖的摄取,以及增加周围组织对葡萄糖的利用,从而达到降低血糖水平的作用。

瑞格列奈联合二甲双胍,通过不同途径调整血糖,达到协同作用。不仅很好地控制了餐后血糖及空腹血糖,而且将糖化血红蛋白控制在正常水平[2-4]。我们对 2 型糖尿病 36 例患者应用瑞格列奈联合二甲双胍治疗,并与 36 例单用瑞格列奈治疗的患者进行对照研究,治疗后,治疗组 FBG、PBG、HbAic 与对照组相比,差异有统计学意义($P < 0.05$)。可见,二甲双胍明显增加瑞格列奈的降糖作用。综上所述,瑞格列奈联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病的作用均优于单用瑞格列奈,瑞格列奈联合二甲双胍治疗 2 型糖尿病具有临床应用价值。

关键词: 2 型糖尿病;瑞格列奈;二甲双胍

中图法分类号: R587.105　　**文献标识码**: B

参考文献:

[1] 钱荣立. 关于糖尿病的新诊断标准与分型[J]. 中国糖尿病杂志, 2000, 8(1): 5 - 6.

[2] 陈新谦, 金有豫, 汤　光. 新编药物学[M]. 第 15 版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 616.

[3] 郝齐志. 罗格列酮治疗 2 型糖尿病疗效观察[J]. 郑州大学学报: 医学版, 2005, 40(5): 898 - 899.

[4] 任建如, 戈敏娟. 瑞格列奈、格列美脲分别与二甲双胍配伍治疗 2 型糖尿病 64 例对比观察[J]. 实用临床医药杂志, 2006, 10(12): 87, 89.

(编辑　王小寒)