短篇论著

文章编号:1000-5404(2011)04-0428-03

三氧化二砷对人乳腺癌雌激素受体蛋白表达的影响

杨建华[1],饶石磊[1],王 冰[2],刘 剑[3],王留兴[1] (450052 郑州,郑州大学第一附属医院肿瘤科[1];450002 郑州,河南中医学院第一附属医院肿瘤科[2];450052 郑州,郑州大学第五附属医院肿瘤科[3])

【摘要】 **目的** 本实验通过三氧化二砷(As_2O_3)对人雌激素受体-α(estrogen receptor alpha,Erα)阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231进行药物诱导,使其重新表达ERα的可能性及机制。**方法** 用含As_2O_3终浓度分别为0.5、2.0、4.0 μmol/L的1640培养液连续培养MDA-MB-231细胞72 h。以不加药同期培养的231细胞作为阴性对照,以MCF-7为阳性对照。分别用Western blot和免疫组化法检测ERα蛋白的重新表达情况。**结果** ①Western blot检测结果证实经2.0、4.0 μmol/L As_2O_3处理的MDA-MB-231细胞组在相对分子质量66 000处显示出ERα蛋白带。②免疫组织化学结果显示0.5 μmol/L组阳性染色细胞<10%,与阴性对照组比较差异无统计学意义($P=0.064$);2.0 μmol/L组阳性染色细胞>70%,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P=0.001$);4.0 μmol/L组阳性染色细胞>40%,与阴性对照组比较差异有统计学意义($P=0.03$)。**结论** 适当浓度As_2O_3能诱导ERα蛋白表达,可以使雌激素受体阴性的乳腺癌细胞重新表达雌激素受体。

【关键词】 三氧化二砷;乳腺肿瘤;雌激素受体

【中图法分类号】 R730.23;R737.9;R995 **【文献标志码】** A

乳腺癌是近年发病率和死亡率增长最高的恶性肿瘤之一[1],全世界每年约有120万妇女患乳腺癌,50万人死于乳腺癌。我国虽属乳腺癌低发区,但近年来发病率增长趋势明显,20年后将是我国发病率最高的恶性肿瘤。在乳腺癌中,雌激素受体(estrogen receptor,ER)作为一个重要分子标志物来评估激素依赖性、预测内分泌治疗的效果。30%~45%乳腺癌患者ERα为阴性,由于缺乏相应受体不能进行内分泌及生物治疗,目前这类特殊类型乳腺癌的治疗仅限于化疗,但效果欠佳,患者的局部复发和远处转移率较高,预后较差[2]。近来研究,ERα阴性乳腺癌中ERα基因缺失的主要学说有DNA甲基化和染色体重组[3]。DNA甲基化是一可逆过程,是肿瘤发生过程中的早期事件;若对甲基化的癌基因和抑癌基因人为进行药物逆转,可为乳腺癌早期治疗提供新的思路[4-5]。三氧化二砷(As_2O_3)对白血病、肝癌等多种肿瘤细胞具有细胞毒作用,并可诱导多种细胞分化。本研究通过试验不同浓度As_2O_3对人ER阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-231进行药物诱导,使其重新表达Erα,从而为雌激素受体阴性乳腺癌患者治疗提供新的可能。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

雌激素受体阴性人乳腺癌细胞株MDA-MB-231购于中科院上海细胞库、雌激素受体阳性人乳腺癌细胞株MCF-7购于北京中科院肿瘤医院细胞库。三氧化二砷注射液购自哈尔滨伊泰达药业公司(规格10 mg/10 ml)。PRMI-1640培养基购自GIBCO公司,硝酸纤维素膜购自北京索莱宝生物公司,兔抗人ER多抗购自武汉博士德生物技术公司,鼠抗人ER单抗、DAB显色试剂盒、小鼠SP检测试剂盒均购自北京中杉公司。CO_2细胞培养箱(150)购自HERAEUS公司,湿式电转移槽购自北京六一试验仪器厂。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及药物处理 MDA-MB-231、MCF-7细胞均用1640培养基在37 ℃、5% CO_2细胞培养箱中培养。调整细胞浓度为5×10^5/ml,换含As_2O_3的培养液,至As_2O_3终浓度分别为0.5、2.0、4.0 μmol/L,连续培养72 h。以不加药同期培养的细胞作为阴性对照,以MCF-7为阳性对照。

1.2.2 Western blot 收集细胞混悬液弃上清,加入细胞裂解液混匀置冰上重悬沉淀1 h,收集上清。加入上样缓冲液,混匀,煮沸5 min使蛋白变性。进行考马斯亮蓝法绘制蛋白浓度标准曲线和在260 nm波长处检测蛋白浓度。配胶、加样,以80 V恒压电泳2.5 h后进行SDS-PAGE电泳。100 V恒压转移100 min进行转膜(湿转)。转膜结束用丽春红染膜。封闭2 h。加一抗(TBST 1∶100稀释)于4 ℃过夜。TBST震荡洗3次后加二抗(TBST 1∶4 000稀释)震荡2 h。TBST洗3次。ECL发光2 min,放入X线片夹中曝光、显影、定影及拍照。用凝胶图像处理系统分析目标带的光密度值。

1.2.3 免疫组化 细胞悬液加入放有盖玻片的24孔板中,以1640培养液连续培养48 h使细胞爬片。4%多聚甲醛固定30 min,PBS清洗3次,滴加0.5% Triton-100 37 ℃ 30 min,按照小鼠S-P检测试剂盒和DAB显色试剂盒说明进行免疫组化操作。按每高倍镜视野下(40×)观察100个不重复细胞,计算细胞的阳性率,实验重复3次,以3次染色的细胞阳性率的结果计算均值。阳性判断标准为ER表达定位于胞核和细胞质,以出现棕黄色颗粒为阳性。阳性细胞25%以下为(±),25%~50%为(+),50%~75%(++),75%以上为(+++);阳性的强

【通信作者】 王留兴,E-mail:wlx2246@yahoo.com

度,弱阳性(±),阳性(+),强阳性(++)。

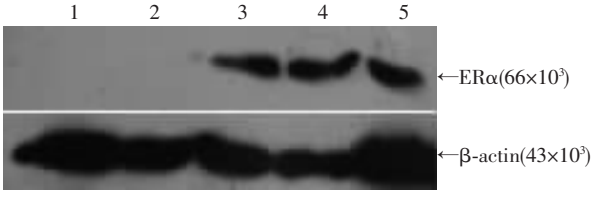
1.3 统计学分析

计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 16.0 统计学处理软件进行统计学分析,采用独立样本 t 检验。

2 结果

2.1 Western blot 检测各组 ERα 蛋白表达情况

阴性对照组和 0.5 μmol/L 组未显示 ER 蛋白带,但 2.0、4.0 μmol/L 组在 66 000 处显示出 ERα 蛋白带。阳性对照 MCF-7 组显示出 ERα 蛋白带。2.0、4.0 μmol/L 组和 MCF-7 组蛋白条带平均光密度值分别为:(0.398 ± 0.020)、(0.384 ± 0.010)、(0.422 ± 0.020)。见图 1。



1:阴性对照组;2:0.5 μmol/L 组;3:2.0 μmol/L;4:4.0 μmol/L 组;5:阳性对照组

图 1 Western blot 检测 ERα 蛋白表达

2.2 免疫组化检测各组 ERα 蛋白表达情况

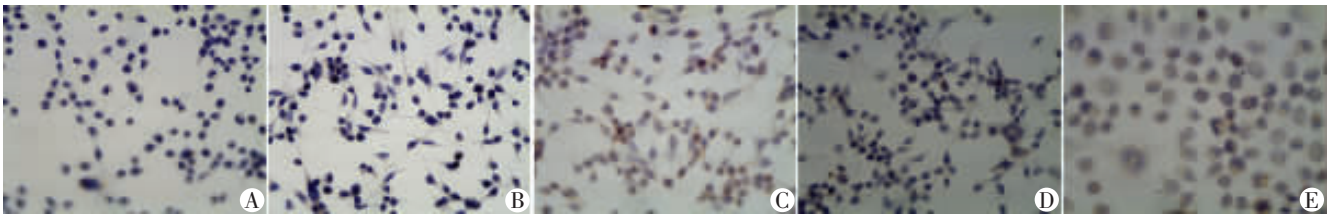
阴性对照组阳性染色细胞数 < 10% (6.00 ± 1.15),染色结果为阴性。0.5 μmol/L 组阳性染色细胞数 < 10% (20.00 ± 6.83),染色结果为阴性。与阴性对照组比较,差异无统计学意义($t = -3.594$, $P = 0.064$)。2.0 μmol/L 组阳性染色细胞数 > 70% (64 ± 8.12)。染色结果为强阳性,与阴性对照组比较,$t = -14.137$, $P = 0.001$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。4.0 μmol/L 组阳性染色细胞数 > 40% (34.50 ± 8.31) 染色结果为阳性,与阴性对照组比较,$t = -8.441$, $P = 0.03$,差异有统计学意义($P < 0.05$)。阳性对照组阳性染色细胞数 > 80% (72.00 ± 1.11),染色结果为强阳性(图 2)。

3 讨论

ERα 在乳腺癌的发生、发展中具有重要作用。其存在和缺失是一个重要的预后指标,同时也是内分泌治疗的预测分子。ERα 阴性者分化较差,手术后易出现复发,多向内脏转移;而受体阳性者乳腺癌细胞分化及预后较好。有关研究[6]表明,ERα 阴性乳腺癌中 ERα 基因缺失、重组及重排等遗传学改变发生率低,推测与其启动子区 CpG 岛甲基化和组蛋白去乙酰化有关。有研究[7]表明,用 DNA 甲基化酶抑制剂和去乙酰化酶抑制剂拮抗上述遗传学改变,可恢复 ERα 表达。所以探索 ERα 基因表达沉默机制和诱导重新表达,对于 ERα 阴性乳腺癌治疗有重要意义。

三氧化二砷作为我国传统中药,在肿瘤的治疗中发挥一定的作用。早在急性早幼粒细胞白血病、原发性肝癌等实体肿瘤的治疗取得了显著的疗效。大多数研究显示 As_2O_3 抗肿瘤作用主要为诱导细胞凋亡和细胞分化,但是关于 As_2O_3 去甲基化作用报道很少。As_2O_3 诱导重新表达 ERα 蛋白的作用机制可能为:As_2O_3 在细胞和体内代谢所需的甲基来自 S-腺苷蛋氨酸(SAM),而 DNA 甲基化也需要 S-腺苷蛋氨酸作为甲基供体[8]。砷剂进入人体后,竞争性利用 DNA 甲基化过程中甲基供体 S-腺苷蛋氨酸,被还原发生甲基化,形成一甲胂酸或二甲胂酸而导致细胞内缺甲基状态[9],而起到去甲基化作用。

本实验选用 ER 阴性人乳腺癌细胞株 MDA-MB-231 为研究对象,观察不同浓度 As_2O_3 诱导细胞 ERα 蛋白表达作用,同期以 ER 阳性人乳腺癌细胞株 MCF-7 作为阳性对照。本研究发现:适当浓度的 As_2O_3 能诱导 ERα 阴性乳腺癌细胞 ERα 蛋白表达。0.5 μmol/L 的 As_2O_3 不能诱导 ERα 重新表达,可能与其降低甲基化程度不足有关。2.0 μmol/L 及其以上的 As_2O_3 浓度则可诱导 ERα 蛋白的重新表达。在 Western blot 中,2.0 μmol/L 组和 4.0 μmol/L 组的灰度值比较,差别不明显。但免疫组化实验中可看到浓度 2.0 μmol/L 的 As_2O_3 可能是 MDA-MB-231 细胞去甲基化的最合适剂量。4.0 μmol/L 组的阳性染色细胞较少,可能与 As_2O_3 的诱导细胞凋亡作用有关。张丽娜[10]、曲志博等[11]发现,4.0 μmol/L 及以上浓度 As_2O_3 作用于人乳腺癌细胞后细胞发生凋亡。本实验结果表明,适当浓度 As_2O_3 能诱导 ERα 蛋白表达,可以使雌激素受体阴性的乳腺癌细胞重新表达雌激素受体,从而为雌激素受体阴性乳腺癌患者治疗提供新的可能。本试验是研究 As_2O_3 诱导作用机制的其中一部分,研究尚浅,需要多种试验方法和动物试验来进一步验证。



A:阴性对照组;B:0.5 μmol/L 组;C:2.0 μmol/L 组;D:4.0 μmol/L 组;E:阳性对照组

图 2 免疫组化检测各组细胞 ERα 的表达 (S-P ×400)

参考文献：

[1] 杨玲，李连弟，陈育德，等. 中国乳腺癌发病死亡趋势的估计与预测[J]. 中华肿瘤杂志，2006，28(6)：438－440.

[2] 齐小伟，范林军. 三阴性乳腺癌患者的新辅助化疗疗效及生存分析[J]. 中华乳腺病杂志：电子版，2009，3(1)：109－112.

[3] Brinkman J A，El-Ashry D. ER re-expression and re-sensitization to endocrine therapies in ER-negative breast cancers [J]. J Mammary Gland Biol Neoplasia，2009，14(1)：67－78.

[4] 李新娟，崔静，朱慧芳，等. HPV16 E7蛋白阳性和阴性乳癌组织中P16蛋白与p16基因启动子区甲基化检测[J]. 郑州大学学报：医学版，2009，44(4)：729－731.

[5] 赵玉凤，李锋，曹玉文，等. 乳腺癌相关基因启动子甲基化的研究进展[J]. 临床与实验病理学杂志，2010，26(3)：350－352.

[6] Widschwendter M，Siegmund K D，Muller H M，*et al*. Association of breast cancer DNA methylation profiles with hormone receptor status and response to tamoxifen[J]. Cancer Res，2004，64(11)：3807－3813.

[7] Giacinti L，Claudio P P，Lopez M，*et al*. Epigenetic information and estrogen receptor alpha expression in breast cancer [J]. Oncologist，2006，11(1)：1－8.

[8] Gonzalez-Fraile M I，Garcia-Sanz R，Mateos M V，*et al*. Methylenetetrahydrofolate reductase genotype does not play a role in multiple myeloma pathogenesis[J]. Br J Haemato，2002，117(4)：890－892.

[9] 傅海英，沈建箴，沈松菲，等. 巢式MSP检测砷剂诱导人多发性骨髓瘤U266细胞系p16基因去甲基化及转录[J]. 中国实验血液学杂志，2007，15(1)：79－85.

[10] 张丽娜，王留兴，樊青霞，等. 三氧化二砷诱导雌激素受体阴性乳腺癌细胞株MDA-MB-435s凋亡和Bcl-2、Bax表达关系的研究[J]. 肿瘤基础与临床，2007，20(3)：203－206.

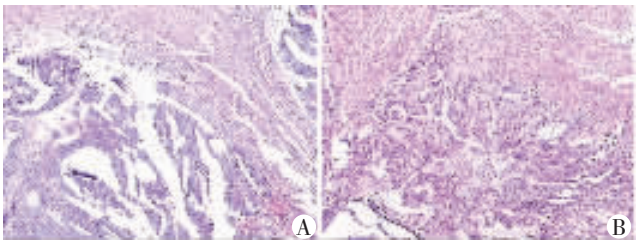
[11] 曲志博，刘连新，陈炜，等. 三氧化二砷抑制乳腺癌裸鼠移植瘤的生长及其作用机制的探讨[J]. 中国普通外科杂志，2007，16(1)：65－68.

（收稿：2010-09-15 修回：2010-10-29）

（编辑　吴培红）

（上接425页）

9、10、11月各进行1次化疗，选用PT方案（奥沙利铂＋多西他赛），因患者不合作，未严格按时进行化疗。11月化疗前CA 125为39.99 U/ml，CEA为94.44 ng/ml。之后失访。至2010年3月9日，患者因右下肢疼痛1月余第5次入院。入院后查CA 125为167.1 U/ml、CEA为164.5 ng/ml。B超示：盆腔混合回声包块可见丰富血流信号，右侧髂血管周边多发淋巴结肿大（最大36×26 mm），考虑癌复发可能性大，患者转放疗中心接受放射治疗。



A：腺癌巢，癌组织源自腺肌病区域的上皮；B：肌层内可见异位分化腺癌组织，周围残留正常异位子宫内膜间质成分

图1　子宫腺肌病恶变病理学观察　（HE ×10）

2　讨论

子宫腺肌病是指子宫内膜腺体及间质侵入子宫肌层，为异位子宫内膜引起的疾病。子宫腺肌病恶变实属罕见，多为个案报道，且为术后病理诊断确诊[2－3]。其诊断标准同时符合下列3点：①在正常位置宫内膜或盆腔其他部位的内膜中无癌组织；②癌组织源自腺肌病区域的上皮，而非其他来源肿瘤侵入的；③在癌变的腺体周围可见宫内膜间质包绕，以支持子宫腺肌病的诊断。由于目前暂无该病的分期标准，故多借鉴子宫内膜癌的FIG 0分期[1,4]。由于癌灶的超声回声、CT值和子宫肌瘤相似，故术前易误诊为子宫肌瘤。肿瘤多发生在近绝经或已经绝经的老年妇女，肿瘤组织ER多为（－），部分病人PR（＋）[1]，部分病人血清CA125升高[5]。子宫腺肌病癌变的术前诊断非常困难，临床表现无特异性，可表现为绝经前后阴道流血或下腹隐痛等[5－6]。治疗需根据分期不同而采用不同治疗方案，但由于术前诊断率很低，故多采用了子宫全切及双侧附件切除，有些病例同时行盆腔淋巴结清扫和腹主动脉旁淋巴结切除。术后是否需要化疗或放疗等辅助治疗则参照子宫内膜的治疗原则[1]。本例患者为围绝经期妇女，因为下腹隐痛而就诊，无痛经史，无高血压和糖尿病史，术前未发现腺肌病，无异常阴道流血，术前多次超声检查均提示为子宫肌瘤，直至术中快速病检方确诊。患者术后由于不规范的化疗且没有接受放疗，术后6个月很快出现了新的盆腔癌灶。但此例除CA125轻度上升外，CEA亦明显上升，这点是否与腺肌病癌变相关尚需要进一步探讨。从目前有限的文献报道分析，老年妇女宫体部的肿瘤伴异常阴道流血或下腹痛，且CA125上升者需要注意与子宫腺肌病恶变相鉴别。

参考文献：

[1] Koshiyama M，Suzuki A，Ozawa M，*et al*. Adenocarcinomas arising from uterine adenomyosis：a report of four cases[J]. Int J Gynecol Pathol，2002，21(3)：239－245.

[2] Ismiil N，Rasty G，Ghorab Z，*et al*. Adenomyosis involved by endometrial adenocarcinoma is a significant risk factor for deep myometrial invasion[J]. Ann Diagn Pathol ，2007，11(4) ：252－257.

[3] Puppa G，Shozu M，Perin T，*et al*。Small primary adenocarcinoma in adenomyosis with nodal metastasis：a case report[J]. BMC Cancer ，2007，7：103.

[4] Ismiil N D，Rasty G，Ghorab Z，*et al*. Adenomyosis is associated with yometrial invasion by FIGO 1 endometrial adenocarcinoma[J]. Int J Gynecol Pathol，2007，26(3)：278－283.

[5] Hirabayashi K，Yasuda M，Kajiwara H，*et al*. Clear cell adenocarinoma arising from adenomyosis [J]. Int J Gynecol Pathol，2009，28(3)：262－266.

[6] Izadi-Mood N，Sanadi N，Sarmadi S，*et al*. Papillary serous carcinoma arising from adenomyosis presenting as intramural leiomyoma[J]. Arch Iran Med，2007，10(2)：258－260.

（收稿：2010-09-18 修回：2010-11-10）

（编辑　吴培红）