论著

DOI:10.16016/j.1000-5404.201411023

ER-α36 对乳腺癌细胞 Herceptin 敏感性的影响

邓婷婷[1],邹 娇[2],陈 彬[2],王 杨[2],姜晓梅[2],王继红[1] (400010 重庆,重庆医科大学生物化学与分子生物学教研室[1];400038 重庆,第三军医大学生物化学与分子生物学教研室[2])

[摘要] **目的** 探讨乳腺癌细胞中雌激素受体 α36(estrogen receptor α36,ER-α36)对人表皮生长因子受体 2(human epidermal growth factor receptor 2,HER2)人源化单克隆抗体赫赛汀(Herceptin)治疗敏感性的影响。**方法** Western blot 对 G418 筛选的 BT474/ER-α36 细胞和对照细胞 BT474/V 进行表型鉴定;细胞增殖分析观察常规培养条件下和雌二醇(E2)存在与否的条件下配对细胞对 Herceptin 敏感性的差异;Western blot 检测 Herceptin 处理前后配对细胞中 E2 诱导的 Akt 及 MAPK 磷酸化差异。**结果** 筛选并鉴定了 ER-α36 过表达的 BT474/ER-α36 细胞及对照细胞 BT474/V;常规培养下,Herceptin 对 BT474/ER-α36 和 BT474/V 细胞的增殖抑制率分别为(22.00±0.06)%和(42.00±0.06)%,与对照细胞比较,BT474/ER-α36 细胞对 Herceptin 的敏感性明显减弱($P<0.01$);细胞经去类固醇处理后,在 E2 存在的情况下,Herceptin 对 BT474/ER-α36 和 BT474/V 细胞的增殖抑制率分别为(34.00±0.06)%和(53.00±0.06)%,E2 显著降低了 BT474/ER-α36 对 Herceptin 的敏感性($P<0.01$);BT474/ER-α36 细胞 E2 诱导的 HER2 下游信号分子 Akt 和 MAPK 磷酸化水平分别上调了 3.08 倍和 2.63 倍,而 BT474/V 细胞 E2 诱导的 Akt 和 MAPK 磷酸化水平仅分别上调了 2.37 倍和 1.72 倍,与对照细胞比较,BT474/ER-α36 细胞具有更强的 E2 非基因组活性,并且该细胞中 Herceptin 抑制 Akt 及 MAPK 磷酸化的效应明显减弱($P<0.01$)。**结论** ER-α36 可通过非基因组活性影响乳腺癌细胞 Herceptin 的敏感性。

[关键词] Herceptin;乳腺癌;抵抗;ER-α36

[中图法分类号] R73-36; R737.9; R979.1 [文献标志码] A

Estrogen receptor α36 affects sensitivity of breast cancer cells to Herceptin

Deng Tingting[1], Zou Jiao[2], Chen Bin[2], Wang Yang[2], Jiang Xiaomei[2], Wang Jihong[1] ([1]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing, 400016; [2]Department of Biochemistry and Molecular Biology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing, 400038, China)

[**Abstract**] **Objective** To determine the effect of estrogen receptor α36 (ER-α36) on the sensitivity to Herceptin, a humanized monoclonal antibody directed against human epidermal growth factor receptor 2 (HER2), in breast cancer cell lines. **Methods** G418 was used for the screening for ER-α36 over-expressing breast cancer cell line BT474/ER-α36 and control cell line BT474/V, and then the phenotype of the paired cells was identified by Western blotting. The sensitivity of the paired cells to Herceptin was observed in normal culture condition and in the presence or absence of estrogen (E2) by cell proliferation assay. Western blotting was used to detect the different phosphorylation levels of E2-induced Akt and MAPK in the paired cells before and after Heceptin treatment. **Results** ER-α36 over-expressing breast cancer cell line BT474/ER-α36 and control cell line BT474/V had been screened successfully. In normal culture condition, the inhibitory ratio of Herceptin on the proliferation of BT474/ER-α36 and BT474/V cells was (22.00±0.06)% and (42.00±

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81272908)

[通信作者] 王继红,E-mail:wjhkyh@163.com

[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150421.0952.001.html(2015-04-21)

0.06)%, respectively, indicating that the sensitivity of BT474/ER-α36 cells to Herceptin was obviously attenuated, compared with control cells ($P<0.01$). In the presence of E2, the inhibitory ratio of Herceptin on the proliferation of BT474/ER-α36 and BT474/V cells deprived of steroid hormones was (34.00±0.06)% and (53.00±0.06)%, respectively, indicating that E2 significantly decreases the sensitivity of BT474/ER-α36 cells to Herceptin. E2-induced phosphorylation of Akt or MAPK, a downstream molecule of HER2 pathway, was up-regulated over 3.08 fold or 2.63 fold, in BT474/ER-α36 cells, but only was up-regulated over 2.37 fold or 1.72 fold, in BT474/V cells. Compared with BT474/V control cells, the higher E2-induced ERα-36 non genomic activities and the weaker inhibition of phosphorylation of Akt and MAPK caused by Herceptin were found in BT474/ER-α36 cells ($P<0.01$). **Conclusion** ER-α36 can affect the sensitivity of breast cancer cells to Herceptin through non-genomic activity.

[**Key words**] Herceptin; breast cancer; resistance; estrogen receptor α36

Supported by the General Program of National Natural Science Foundation of China (81272908). Corresponding author: Wang Jihong, E-mail: wjhkyh@163.com

表皮生长因子受体(epidermal growth factor receptor,EGFR)和雌激素受体(estrogen receptor,ER)途径是乳腺癌细胞增殖、存活、发育和分化等生理活动所依赖的主要信号途径[1]。表皮生长因子受体超家族包括HER1、HER2、HER3和HER4[2],赫赛汀(Herceptin, HPT)是针对HER2的人源化单克隆抗体,用于HER2阳性的乳腺癌患者治疗,但临床70% HER2过表达的乳腺癌患者对Herceptin的治疗没效果,而且治疗初始对Herceptin有效的大多数患者在1年以内也很快出现Herceptin抵抗[3-4]。Herceptin抵抗的产生涉及多种机制,比如p27蛋白的下调,组成性激活的Akt、胰岛素样生长因子受体IGF-1R过表达或激活,PTEN基因功能的失活、ErbB受体家族成员间的相互作用[5]以及HER2变异体的生成[6-8]等,但其确切的机制或始发因素尚待进一步研究。

ER属于核受体超家族成员,包括ER-α66、ER-α36、ER-α46、ER-β等,ER-α66即我们通常所说的ER-α,进入细胞核的ER-α66可直接结合靶基因启动区的雌激素反应元件并通过募集核受体辅调节蛋白(coregulator)调节基因转录(即发挥基因组活性);而细胞膜和细胞质中的ER-α66通过与信号中间分子如Shc等的相互作用,激活生长因子酪氨酸激酶受体如HER2或胰岛素样生长因子受体(IGF-1R),导致其下游激酶MAPK和Akt的活化,活化的MAPK和Akt可磷酸化位于细胞核的ER及其辅调节蛋白,导致靶基因的快速转录(即发挥非基因组活性)[9]。我们以前的工作发现ER-α66的非基因组活性参与了Herceptin抵抗[10]。与ER-α66类似,ER-α36也具有这两种活性,由于ER-α36主要表达于乳腺癌细胞膜和细胞质中并介导雌激素的非基因组活性[11-12]。因此,ER-α36很可能通过快速的非基因组活性和HER2途径之间进行广泛的串话,影响乳腺癌细胞Herceptin的治疗效果。本研究筛选和鉴定了BT474/ER-α36以及BT474/V细胞作为研究对象,观察了乳腺癌细胞中ER-α36对Herceptin敏感性的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与细胞株 野生型BT474细胞株由本教研室保存。ER-α36表达质粒与空载体质粒由美国Creighton大学医学院王兆一教授惠赠。为了获取BT474/ER-α36及BT474/V细胞株,我们将ER-α36表达质粒与空载体质粒分别转染BT474/细胞,采用500 μg/mL的G418筛选3周,获取的单克隆用100 μg/mL G418维持培养和扩增。

1.1.2 主要试剂 DMEM高糖培养基、1640培养基、无酚红的DMEM培养基、胎牛血清、经木炭葡聚糖处理的胎牛血清(CD-FBS, Gibco公司),100×NEAA和100 mmol/L丙酮酸钠(HyClone公司),G418、Herceptin、Cocktail蛋白酶抑制剂(Roche公司),雌二醇(17β-estradiol, E2)、二甲基亚砜(Sigma公司),CCK-8试剂、RIPA裂解液、SDS-PAGE凝胶配制试剂盒、BCA浓度测定试剂盒(Beyotime公司),ECL化学发光显色试剂盒,ERK及其磷酸化抗体、Akt及其磷酸化抗体、HER2抗体、ER-α66抗体(CST公司),ER-α36抗体(Cell Applications公司),GAPDH抗体(北京中杉公司),Herceptin(HPT, Roche公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养与分组 BT474/ER-α36与BT474/V细胞株常规培养于含10%胎牛血清、1% NEAA、1 mmol/L丙酮酸钠、100 U/mL青霉素、100 μg/mL链霉素、100 μg/mL G418的DMEM培养基中。E2处理的细胞需经去内源性激素的上述DMEM培养基(10% CD-FBS/无酚红DMEM)继续培养72 h,然后分别用含

10×10^{-9} mol/L E2, 1×10^{-6} mol/L Herceptin, 10×10^{-9}mol/L E2 + 1×10^{-6}mol/L Herceptin 的细胞培养液处理15 min(用于Western blot检测)或7 d(用于细胞增殖分析),以DMSO作为对照。实验细胞分为4组($n=5$):DMSO组(对照组)、E2组、HPT组和E2+HPT组。

1.2.2 Cell Counting Kit 细胞增殖分析 BT474/ER-α36与BT474/V细胞在常规培养基中培养接种于96孔板,10×10^3个/孔,每个样品设置5个复孔,过夜,然后各组细胞分别用含DMSO,1×10^{-6} mol/L Herceptin的培养基处理5 d;BT474/ER-α36与BT474/V细胞在无酚红去类固醇激素的DMEM培养基中培养72 h后接种到96孔板,10×10^3/孔,每个样品设置5个复孔,过夜,然后各组细胞分别用含DMSO,10×10^{-9} mol/L E2,1×10^{-6} mol/L Herceptin,10×10^{-9} mol/L E2 + 1×10^{-6} mol/L Herceptin的1%无酚红DMEM培养基处理7 d,每隔3 d换1次培养基。在相应处理天数后将CCK-8试剂与细胞培养基按10 μL∶100 μL均匀混合,吸弃旧培养基,加入110 μL/孔,放入CO_2孵箱,分别在1、2、3、4 h后用酶标仪测定样品在波长450 nm处的光密度值[$D(450)$]。

1.2.3 Western blot检测 按上述处理的细胞用预冷PBS洗2次,加入适量的细胞裂解液(含Cocktail蛋白酶抑制剂),细胞悬液放置冰上裂解30 min,BCA浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。80 μg细胞列解物进行SDS-PAGE凝胶电泳后,用半干转仪将蛋白转移到PVDF膜上,然后用1×TBST缓冲液配制的5%封闭液(p-ERK、p-Akt用含5%牛血清蛋白V的TBST)封闭1 h,用相应的封闭液1∶1 000稀释ER-α66、ER-α36、HER2、t-ERK、t-Akt抗体;1∶5 000稀释GAPDH抗体,与膜4 ℃孵育过夜,用TBST漂洗5次,每次5 min。用相应的封闭液1∶5 000稀释二抗,与膜37 ℃缓慢震荡1 h。TBST漂洗5次,每次5 min。将PVDF膜浸入显影液,置于机器中曝光。

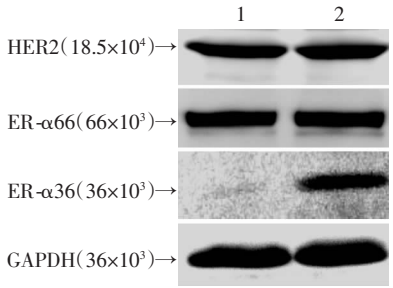
1.3 数据采集与统计学分析

数据以$\bar{x} \pm s$表示,使用Quantity One软件采集Western blot结果中各条带的光密度值,采用SPSS 13.0统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 细胞株模型的选择与鉴定

为了观察ER-α36对乳腺癌细胞Herceptin敏感性的影响,我们筛选了稳定转染ER-α36的BT474/ER-α36细胞系和转染空质粒的BT474/V细胞系(作为对照),采用Western blot检测了两种细胞中ER-α66、ER-α36及HER2的表达(图1)。BT474/ER-α36的表型为ER-α36(+)/ER-α66(+)/HER2(+);BT474/V的表型为ER-α36(−)/ER-α66(+)/HER2(+)。

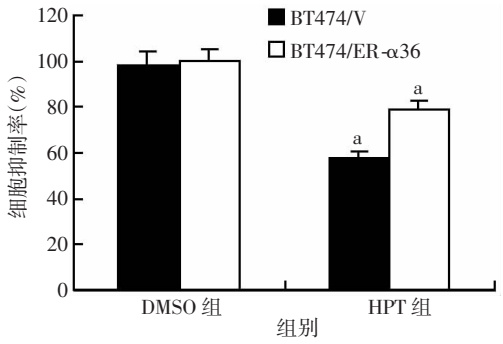


1:BT474/V;2:BT474/ER-α36

图1 Western blot检测BT474/ER-α36与BT474/V细胞中ER-α66、ER-α36和HER2的表达

2.2 常规培养条件下BT474/V与BT474/ER-α36细胞对Herceptin敏感性的差异

CCK-8用于检测在常规培养下Herceptin抑制BT474/V与BT474/ER-α36细胞增殖的差异。Herceptin对BT474/V细胞的增殖抑制率明显优于BT474/ER-α36细胞,两组比较有显著差异($P<0.01$,图2),表明ER-α36显著降低了BT474细胞对Herceptin的敏感性。

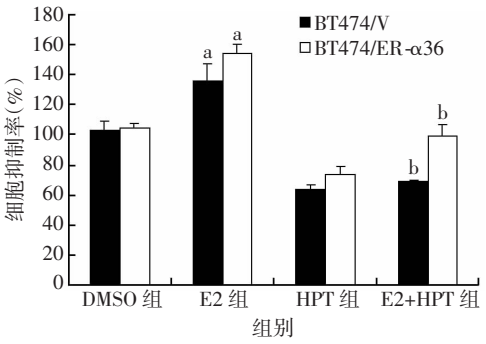


a:$P<0.01$,与DMSO对照组比较

图2 CCK-8检测Herceptin抑制BT474/V与BT474/ER-α36细胞增殖的差异($n=5$, $\bar{x} \pm s$)

2.3 E2存在与否的条件下BT474/V与BT474/ER-α36对Herceptin敏感性的差异

细胞经去类固醇处理后,在E2不存在的情况下,Herceptin对BT474/V与BT474/ER-α36细胞增殖抑制率近似,两组比较无显著差异($P>0.01$)。E2显著增强了BT474/V与BT474/ER-α36细胞的增殖率($P<0.01$);但E2存在的情况下,Herceptin对BT474/V细胞的增殖抑制率明显优于BT474/ER-α36细胞,两组比较有显著差异($P<0.01$,图3),表明E2通过ER-α36显著降低了BT474细胞对Herceptin的敏感性。



a: $P<0.01$,与 DMSO 对照组比较;b:$P<0.01$,与 HPT 处理组比较

图 3　BT474/V 与 BT474/ER-α36 在 E2 存在与否的条件下对 Herceptin 抵抗的差异($n=5$, $\bar{x}\pm s$)

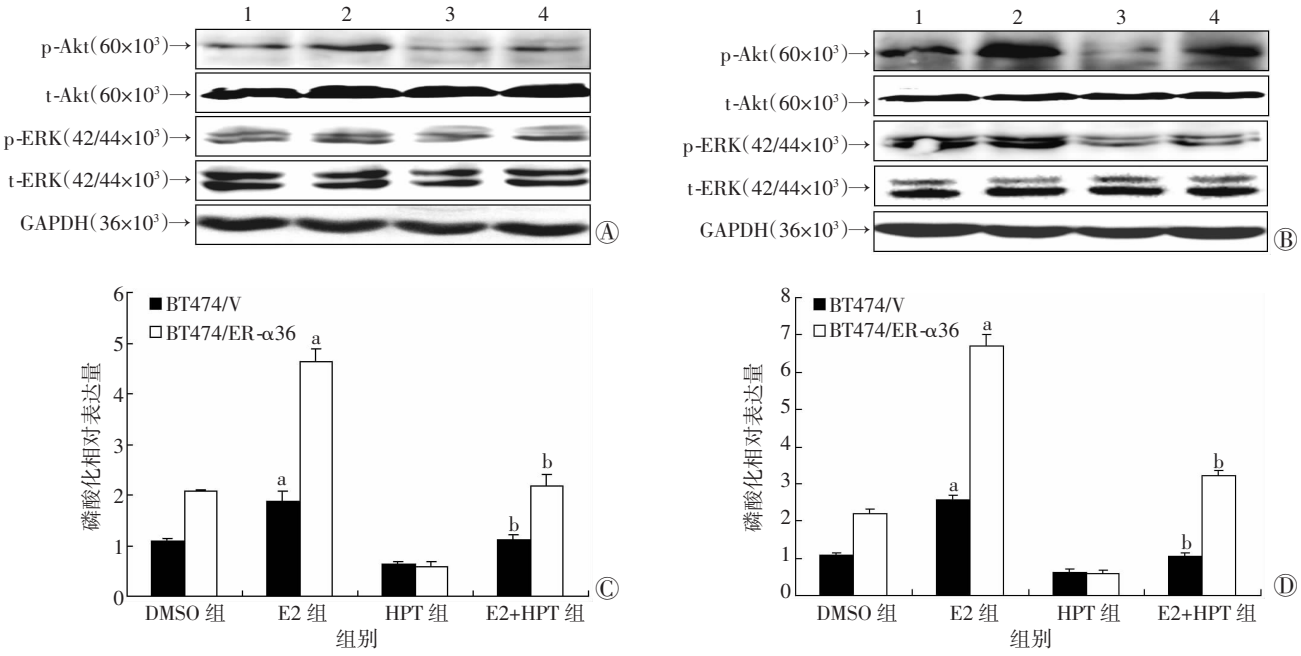
2.4　Herceptin 处理前后 BT474/V 与 BT474/ER-α36 细胞中 E2 诱导的 Akt 及 MAPK 磷酸化差异

2.4.1　Akt 磷酸化水平的改变　　HER2 下游信号分子 Akt 及 MAPK 的磷酸化水平检测用于反映 ER-α36 介导的非基因组活性对 Herceptin 抑制 HER2 下游信号分子机制的干扰效应,结果见图 4。与相应的 DMSO 组比较,BT474/V 细胞在 E2 作用下 Akt 磷酸化水平上调了 2.37 倍($P<0.01$);BT474/ER-α36 细胞 E2 诱导的 Akt 磷酸化水平上调了 3.08 倍($P<0.01$);与单独的 Herceptin 组比较,E2 + Herceptin 使 BT474/V 与 BT474/ER-α36 细胞 Akt 磷酸化水平分别上调了 3.06 倍($P<0.01$)和 5.63 倍($P<0.01$)。

2.4.2　MAPK 磷酸化水平的改变　　与相应的 DMSO 组比较,BT474/V 与 BT474/ER-α36 细胞在 E2 作用下,MAPK 磷酸化水平分别上调了 1.72 倍($P<0.01$)和 2.63 倍($P<0.01$),结合上述 Akt 磷酸化水平的改变结果,表明 BT474/ER-α36 细胞比对照细胞具有更强的非基因组活性。与相应的 Herceptin 组比较,E2 + Herceptin 使 BT474/V 与 BT474/ER-α36 细胞 MAPK 磷酸化水平分别上调了 1.74 倍($P<0.01$)和 3.66 倍($P<0.01$),结合上述 Akt 磷酸化水平的改变结果,表明 E2 刺激的 ER-α36 非基因组活性显著干扰了 Herceptin 抑制 HER2 下游信号分子磷酸化的效应。

3　讨论

ER 超家族成员包括 ER-α66、ER-α36、ER-α46、ER-β 等, ER-α66 我们通常所说的 ER-α,它是被最早发现的雌激素受体,ER-α36 是新发现的 ER-α66 的变异体,与 ER-α66 相比较,ER-α36 缺少 AF-1 和 AF-2 两个转录激活结构域,仍保留 DNA 结合结构域和部分二聚体化及雌激素结合结构域,不具有 ER-α66 外显子 7 和 8,因此在 C 末端形成了一个特异的由 27 氨基酸组成的结构域[13-14]。由于 ER-α36 缺少 ER-α66 的 AF-1 和 AF-2 两个反式激活结构域,但保留了 DNA 结构域,它与 ER-α66 共存于细胞核中,可能通过与 ER-α66 竞争结合雌激素反应基因上的雌激素反应元件而发挥抑制ER-α66E2依赖和E2非依赖的反式激活功



1:DMSO 组;2:E2 组;3:HPT 组;4:E2 + HPT 组;a: $P<0.01$,与 DMSO 对照组比较;b:$P<0.01$,与 HPT 处理组比较
A:Western blot 检测 BT474/V 细胞中 Akt 和 MAPK 磷酸化水平;B:Western blot 检测 BT474/ER-α36 细胞中 Akt 和 MAPK 磷酸化水平;C:MAPK 磷酸化相对表达量;D:Akt 磷酸化相对表达量

图 4　Western blot 检测 E2 对 BT474/V 与 BT474/ ER-α36 细胞中 Akt 和 MAPK 磷酸化的影响

能的作用。因此,ER-α36 被认为是雌激素经典基因组信号通路的一个潜在抑制分子[15]。

大量实验证明 ER-α36 主要定位于细胞膜和细胞质中[16-17],研究表明,ER-α36 与雌激素结合后可迅速引发生长因子酪氨酸激酶受体如 HER2 和 IGF-1R(胰岛素样生长因子受体)相关的信号通路的下游信号转导事件,如有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)/细胞外信号调节激酶(ERK)信号转导通路、磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3-K)/蛋白激酶 B(Akt)信号通路,胞内钙离子浓度上调,同时上调众多基因的表达,即定位于细胞膜和细胞质中的 ER-α36 介导了雌激素的非基因组活性[18]。

由于 ER-α36 主要参与雌激素介导的非基因组活性,推测其可能在乳腺癌内分泌治疗抵抗中发挥重要作用。他莫昔芬(tamoxifen,Tam)是最常见的内分泌治疗一线药物,但只有一半的乳腺癌患者对 Tam 治疗有效,即 Tam 抵抗在临床内分泌治疗抵抗中十分常见,研究表明 ER-α36 可通过其非基因组活性导致乳腺癌 Tam 的抵抗,此时 Tam 不能作为治疗药物而是作为 ER-α36 的激动剂发挥作用。

我们以前的研究发现 E2 可通过 ER-α66 非基因组活性影响 ER^+ 的乳腺癌细胞 Herceptin 的治疗效果并可能参与了 Herceptin 抵抗的发生[10]。由于位于细胞膜或细胞质中的 ER-α36 可通过非基因组活性激活作为 Herceptin 治疗靶点的 HER2 途径并且 ER-α36 与雌激素结合后可迅速引发生长因子相关的信号通路的下游信号转导事件,激活 MAPK 与 Akt,产生相应的生理效应,因此,ER-α36 很可能通过快速的非基因组活性和 HER2 途径之间进行广泛的串话,影响乳腺癌细胞 Herceptin 的治疗效果。本研究筛选和鉴定了 BT474/ ER-α36 及其野生型 BT474/V 细胞株,以这一配对细胞作为研究对象,研究了 ER-α36 在乳腺癌细胞 Herceptin 治疗抵抗中的影响及其作用机制。我们的研究发现,常规培养下 ER-α36 过表达的细胞株对 Herceptin 的敏感性减弱;细胞经去类固醇处理后,E2 通过 ER-α36 显著降低了 BT474 细胞对 Herceptin 的敏感性,表明 ER-α36 干扰了乳腺癌细胞 Herceptin 的治疗效果。进一步的研究发现,ER-α36 过表达的细胞株比对照细胞具有更强的非基因组活性,E2 刺激的 ER-α36 非基因组活性干扰了 Herceptin 抑制 HER2 下游信号分子磷酸化的效应,这可能是 ER-α36 对乳腺癌细胞 Herceptin 治疗效果产生干扰效应的信号机制之一。关于 ER-α36 是否通过与 HER2 相互作用影响乳腺癌细胞 Herceptin 的治疗效果,还需进一步研究证实。

综上所述,ER-α36 在乳腺癌细胞 Herceptin 治疗抵抗中可能发挥了重要的作用,该效应涉及了 ER-α36/MAPK/Akt 途径。该研究结果可为乳腺癌细胞 Herceptin 治疗抵抗提供一个新的重要机制,为临床乳腺癌患者基于 Herceptin 的联合应用治疗策略的实施提供新的理论依据。

参考文献:

[1] Lopez-Garcia M A, Geyer F C, Lacroix-Triki M, *et al*. Breast cancer precursors revisited: molecular features and progression pathways[J]. Histopathology, 2010, 57(2): 171-192.

[2] Moasser M M. The oncogene HER2: its signaling and transforming functions and its role in human cancer pathogenesis[J]. Oncogene, 2007, 26(45): 6469-6487.

[3] Curtis C, Shah S P, Chin S F, *et al*. The genomic and transcriptomic architecture of 2, 000 breast tumours reveals novel subgroups[J]. Nature, 2012, 486(7403): 346-352.

[4] Mukai H. Treatment strategy for HER2-positive breast cancer[J]. Int J Clin Oncol, 2010, 15(4): 335-340.

[5] Bender L M, Nahta R. Her2 cross talk and therapeutic resistance in breast cancer[J]. Front Biosci, 2008, 13: 3906-3912.

[6] Leary A F, Hanna W M, van-de-Vijver M J, *et al*. Value and limitations of measuring HER-2 extracellular domain in the serum of breast cancer patients[J]. J Clin Oncol, 2009, 27(10): 1694-1705.

[7] Sasso M, Bianchi F, Ciravolo V, *et al*. HER2 splice variants and their relevance in breast cancer[J]. J Nucleic Acids Investig, 2011, 2(1): 52-59.

[8] Mitra D, Brumlik M J, Okamgba S U, *et al*. An oncogenic isoform of HER2 associated with locally disseminated breast cancer and trastuzumab resistance[J]. Mol Cancer Ther, 2009, 8(8): 2152-2162.

[9] Kang L, Wang L, Wang Z Y. Opposite regulation of estrogen receptor-α and its variant ER-α36 by the Wilms' tumor suppressor WT1[J]. Oncol Lett, 2011, 2(2): 337-341.

[10] 姜晓梅, 陈彬, 韩谊, 等. 非基因组活性对雌激素受体阳性乳腺癌细胞 Herceptin 敏感性的影响[J]. 第三军医大学学报, 2011, 33(9): 908-911.

[11] Lin S L, Yan L Y, Zhang X T, *et al*. ER-alpha36, a variant of ER-alpha, promotes tamoxifen agonist action in endometrial cancer cells *via* the MAPK/ERK and PI3K/Akt pathways[J]. PLoS One, 2010, 5(2): e9013.

[12] Rao J, Jiang X, Wang Y, *et al*. Advances in the understanding of the structure and function of ER-α36, a novel variant of human estrogen receptor-alpha[J]. J Steroid Biochem Mol Biol, 2011, 127(3/5): 231-237.

[13] Deng H, Huang X, Fan J, *et al*. A variant of estrogen receptor-alpha, ER-alpha36 is expressed in human gastric cancer and is highly correlated with lymph node metastasis[J]. Oncol Rep, 2010, 24(1): 171-176.

[14] Fu Z, Deng H, Wang X, *et al*. Involvement of ER-α36 in the malignant growth of gastric carcinoma cells is associated

with GRP94 overexpression[J]. Histopathology, 2013, 63(3): 325-333.
[15] Wang Z, Zhang X, Shen P, *et al*. A variant of estrogen receptor{alpha}, hER-{alpha}36: transduction of estrogen- and antiestrogen-dependent membrane-initiated mitogenic signaling[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2006, 103(24): 9063-9068.
[16] Vranic S, Gatalica Z, Deng H, *et al*. ER-α36, a novel isoform of ER-α66, is commonly over-expressed in apocrine and adenoid cystic carcinomas of the breast[J]. J Clin Pathol, 2011, 64(1): 54-57.
[17] Pelekanou V, Notas G, Kampa M, *et al*. ERα36, a new variant of the ERα is expressed in triple negative breast carcinomas and has a specific transcriptomic signature in breast cancer cell lines[J]. Steroids, 2012, 77(10): 928-934.
[18] Su X, Xu X, Li G, *et al*. ER-α36: a novel biomarker and potential therapeutic target in breast cancer[J]. Onco Targets Ther, 2014, 7: 1525-1533.

(**收稿**:2014-11-15;**修回**:2015-01-20)
(编辑 栾 嘉)

DOI:10.16016/j.1000-5404.201410072

经验交流

结核感染T细胞斑点试验在结节性红斑诊疗中的价值

成琼辉,陈 年,张道军,伍津津,雷 霞 (400042 重庆,第三军医大学大坪医院野战外科研究所皮肤科)

[**关键词**] 结节性红斑;结核;T细胞斑点试验
[**中图法分类号**] R758.61 [**文献标志码**] B

结节性红斑(erythema nodosum)是一种常见的炎症性脂膜炎。其病因尚不十分清楚,目前认为与致病微生物感染、药物或自身免疫性疾病相关。其中结核杆菌感染被认为是结节性红斑的一个重要病因,且抗结核治疗有一定疗效。多数结节性红斑患者并无结核感染的证据,抗结核治疗并无循证依据,限制了抗结核疗法的应用。结核感染T细胞斑点试验(T-spot)是一种敏感性及特异性均较强的诊断结核菌感染的方法[1]。我们尝试以T-spot检查指导结节性红斑的诊疗,以期为此类患者采用抗结核疗法提供依据。

1 资料与方法

1.1 研究对象

收集2011年6月至2012年6月在本科就诊并行皮肤病理检查明确诊断为结节性红斑患者67例。满足如下标准:①无明确的结核感染史,如肺结核、肠结核、皮肤结核等;②无严重肝肾功能障碍;③未合并其他自身免疫性疾病;④均接受T-spot检查;⑤随访1年,且临床资料完整。

1.2 方法

67例患者均接受T-spot检查,具体为:抗凝管采集患者外周血5 mL,采用T-spot检测试剂盒检测,阳性结果定义为测量孔点数比阴性对照多5个点或点数为阴性对照组的2倍以上[2]。51例阳性患者依据随机数字表将患者分为两组,其中观察组(接受抗结核治疗)27例,对照组(未接受抗结核治疗)24例。两组患者一般资料比较差异无统计学意义($P>0.05$,表1)。

急性期嘱患者休息,抬高患肢,避免过度运动;合并感染者可视情况给予抗生素;疼痛较重者可给予止痛药;重症患者给予糖皮质激素。观察组除以上一般治疗外给予为期6个月的抗结核治疗,抗结核方案具体为:异烟肼(H)0.3 g/d,乙胺丁醇0.75 g/d,利福平(R)0.45 g/d[3]。

1.3 观察指标

分析结节性红斑T-spot检查阳性率;比较观察组及对照组治疗后1年结节性红斑复发率。

1.4 统计学方法

采用SPSS 19.0统计软件。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,比较采用 t 检验。率的比较采用 χ^2 检验。累积复发率应用Kaplan-Meier曲线计算,复发率的比较采用Log-rank检验。

2 结果

67例患者中T-spot检查结果阳性的有51例,阳性率为76.12%。两组患者经治疗后皮损均于1~4周内消退,未出现治疗无效的病例。观察组在抗结核治疗过程中有部分出现药物毒副作用,其中4例出现胃肠道反应;3例谷丙转氨酶轻度升高;3例出现皮疹。无患者因药物毒副作用停药。观察组治疗后1年累积复发率显著低于对照组($P<0.01$,表1)。

(下转1119页)

[**通信作者**] 雷 霞,电话:(023)68757593,E-mail:leixia1979@sina.com
[**优先出版**] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20150310.1618.002.html(2015-03-10)