基础研究 文章编号:0253-3626(2011)01-0054-04

5-FU、ADM 联合 X 线外照射对乳腺癌 MCF-7 细胞 Livin 表达及凋亡的影响

周涛琪,张幸平,程 丽,蒋 骞,饶明月
(重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016)

【摘 要】目的:观察抗肿瘤药物氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)、阿霉素(Adriamycin,ADM)联合 X 线外照射对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Livin 基因表达的干扰效应及对细胞凋亡的影响。方法:用 MTT 法分别测定 5-FU、ADM 2 种药物作用 MCF-7 细胞 72 h 的半数抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration of a substance,IC_{50})。实验分为空白对照组、单纯照射组、5-FU+ 照射组、ADM+ 照射组。通过免疫组化法及 RT-PCR 法检测各组细胞 Livin 蛋白及 mRNA 的表达,同时应用流式细胞术检测细胞的凋亡率。结果:与空白对照组比较,单纯照射组、5-FU+ 照射组、ADM+ 照射组的 Livin 蛋白、mRNA 的表达均减少而凋亡率增加($P<0.05$),5-FU+照射组、ADM+照射组的 Livin 蛋白、mRNA 的表达较单纯照射组减少明显,且前 2 组细胞的凋亡率增加,差异具有统计学意义($P<0.05$)。结论:5-FU、ADM 联合 X 线外照射可提高乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡率,具有放射增敏作用,其作用机制可能与下调 Livin 基因的表达有关。

【关键词】Livin 基因;化疗药物;RT-PCR;免疫组化;放射增敏
【中国图书分类法分类号】R73-36 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-07-13

Effect of 5-FU, ADM combined with X-ray irradiation on livin expression and apoptosis of breast cancer cell line MCF-7

ZHOU Tao-qi, et al
(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To observe 5-FU, ADM combined with X-ray irradiation on interferring gene expression of Livin and apoptosis of human breast cancer cell line MCF-7. *Methods*: The IC50 of 5-FU, ADM were detected by MTT in the time of 72 h. The experiment had four groups: blank control group, irradiation group, 5-FU + irradiation group, ADM + irradiation group.The Immunohistochemistry and RT-PCR were used to evaluate the Livin protein and mRNA expression, the apoptosis rate was analysed by flow cytometry. *Results*: Compare the blank control group with other groups, the Livin protein and mRNA expression of irradiation group ,5-FU + irradiation group, ADM + irradiation group were reduced, and apoptosis rate increased ($P<0.05$).While the effect of 5-FU, ADM combined with irradiation inhibited Livin protein, mRNA expression significantly compared with the irradiation group, and the apoptosis rate were increased, the differences were statistically significant ($P<0.05$).*Conclusion*: 5-FU, ADM combined with irradiation can enhance MCF-7 cell apoptosis, with a radiation sensitizing effect, the mechanism may be related to reduce Livin gene expression.

【Key words】livin; chemotherapeutics; RT-PCR; immunohistochemistry; radiation sensitive

乳腺癌是女性常见恶性肿瘤之一。随着人们生活方式的改变,乳腺癌的发病率有逐渐升高及发病年龄年轻化的趋势。乳腺癌在治疗上强调综合治疗,治疗方法有手术、放射治疗、化疗、内分泌治疗、生物靶向治疗等。放射治疗是其常用治疗手段之一,但不同乳腺癌患者对放疗的敏感性存在着较大差异,有的肿瘤甚至存在着放射抵抗现象[1]。Livin 是近年来发现的一个凋亡抑制基因,研究发现其与恶性肿瘤的发生、发展、耐药等密切相关[2]。本实验通过研究乳腺癌化疗的主要药物氟尿嘧啶(5-fluorouracil,5-FU)、阿霉素(Adriamycin,ADM)联合 X 线外照射对人乳腺癌 MCF-7 细胞 Livin 基因表达及细胞凋亡的影响,为探讨放射增敏及 Livin 基因的功能提供一些实验依据。

作者介绍:周涛琪(1984-),男,硕士,
研究方向:肿瘤临床及基础研究。
通信作者:张幸平,女,教授,Email:zhang.xinping@163.com。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 由成都医学院病理科惠赠。小牛血清购自杭州四季青公司。ADM,每支 10 mg 和 5-FU,每支 250 mg 分别购自浙江海正药业和上海旭东海普制药有限公司。噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(Dimethyl sulfoxide,DMSO)购自 Sigma 公司。兔抗人 Livin 多克隆抗体及免疫组化 SABC 试剂盒均购自武汉博士德生物工程有限公司。RNAiso Plus、Prime Script RT Kit 均为大连 TaKaRa 公司产品,2*Taq PCR Master Mix 购自北京天根生物有限公司。PCR 扩增引物由上海生工合成。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人乳腺癌细胞株 MCF-7 培养于含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液中,5%CO_2,37℃细胞培养箱进行细胞培养。

1.2.2 MTT 测定药物敏感性 取对数生长期细胞,调整细胞悬液浓度为 5×10^4 个/ml,将细胞以每孔 180 μl 接种于 96 孔培养板,待细胞贴壁后,分别加入 ADM 和 5-FU 各 20 μl。药物终浓度如下:ADM:0.625、1.25、2.5、5.0、10 μg/ml;5-FU:12.5、25、50、100、200 μg/ml。每组药物浓度设 5 个复孔,另设不加药物的阴性对照组及空白调零组。细胞培养 72 h 后每孔加新鲜配制的 MTT(5 mg/ml) 20 μl 继续孵育 4 h,弃去 MTT 液,每孔加 DMSO 150 μl,酶联免疫检测仪于 570 nm 波长处测定吸光度 A 值。肿瘤细胞抑制率 = (1—实验组吸光度 A/对照组吸光度 A)×100 %。采用 SPSS 17.0 软件计算药物半数抑制浓度(Half maximal inhibitory concentration of a substance,IC_{50})。

1.2.3 免疫组化检测 Livin 蛋白表达 将对数生长期的细胞接种于 24 孔板(内置 10 mm×10 mm 玻片,用于爬片)。实验分为 4 组:(1)空白对照组、(2)单纯照射组、(3)5-FU+ 照射组、(4)ADM+照射组。除空白对照组外,其余 3 组的细胞先置于电子直线加速器(Varian 2300 C/D)下,用 6MV-X 线外照射,源皮距 100 cm,一次性照射剂量为 4 Gy。5-FU+照射组及 ADM+照射组的细胞在 X 线照射后立即予以 1/3 IC_{50} 的 5-FU 及 ADM 处理,各组于药物处理后 72 h 收集细胞。细胞经 4% 多聚甲醛固定后,先予以 3% H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶,再用一抗稀释至 1:50,于 37℃孵箱孵育 2 h,依次加入二抗、三抗后于 37℃孵箱各孵育 30 min。各步骤间以 PBS 漂洗,最后 DAB 显色。每张细胞片随机取一视野进行 200 倍拍照,并采用 Image—Pro Plus 5.0 图像分析软件计算平均光密度值。

1.2.4 RT-PCR 检测 Livin mRNA 表达 将对数生长期的细胞培养于 50 ml 培养瓶内,实验分组及处理同前。各组于培养 72 h 后收集细胞,按照试剂说明书提取细胞总 RNA 并合成 cDNA 模板。PCR 扩增引物序列如下:Livin 上游:CTGTCAGTTCCTGCTCCGGTCAA;Livin 下游:CCGCACGGCACAAAGACGATG;扩增长度为 400 bp。β-actin 上游:TGACGTGGACATCCGCAAAG;β-actin 下游:CTGGAAGGTGGACAGCGAGG;扩增长度为 200 bp。PCR 扩增条件:94℃ 3 min,1 个循环;94℃ 30 s、62℃ 30 s、72℃ 1 min,30 个循环;72℃ 5 min,1 个循环。PCR 产物进行 1.5 % 琼脂糖凝胶电泳 30 min(电压 80 V),凝胶成像系统[Chemi Doc XRS (BIO-RAD)]CCD 拍照,Quantity One 软件对条带灰度值进行分析,以 Livin 基因与 β-actin 相对浓度的比值反映 Livin 表达量。

1.2.5 Annexin V-FITC 和 PI 双染流式细胞术检测细胞凋亡 将对数生长期的细胞培养于 50 ml 培养瓶内,实验分组及处理同前。各组于处理后 72 h 予 0.25%胰酶消化培养细胞,将细胞先用 PBS 洗涤 2 次,弃上清,1×Binding Bufer 重悬细胞并调整细胞浓度至 1×10^6 个/ml 吸细胞混悬液 100 μl 至 5 ml 流式管中,加 Annexin V-FITC 和 PI 各 5 μl,充分混匀,室温避光孵育 15 min,每管加入 1xBinding Bufer 400 μl,轻微漩涡混匀,用流式细胞检测术(Flow cytometry,FCM)对凋亡细胞进行定量检测。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件对各组数据进行统计分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间比较采用 LSD 检验进行分析,以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 ADM 及 5-FU 的 IC_{50} 值

MTT 实验结果显示不同浓度的 ADM、5-FU 作用于 MCF-7 细胞 72 h 后,细胞生长受到不同程度抑制,且抑制率随浓度增加而增加(表 1)。应用 SPSS 17.0 软件得出 ADM 及 5-FU 的 IC_{50} 分别为 5、12.7 μg/ml。在以下实验中选择的药物浓度均为 1/3 IC_{50}。

2.2 单纯照射、5-FU+照射及 ADM+照射对 Livin 蛋白表达的影响

图 1 为细胞爬片免疫组化检测的 200 倍照片。Livin 蛋白主要表达于 MCF-7 细胞的胞质,阳性显色呈棕黄色。用

表 1 ADM 及 5-FU 对 MCF-7 细胞的生长抑制率($\bar{x}\pm s$)

药物分组	剂量(μg/ml)	A 值	抑制率 (%)
阴性对照组		1.555 ± 0.096	
ADM	0.625	0.993 ± 0.056	36.14
	1.25	0.851 ± 0.067	45.26
	2.5	0.793 ± 0.043	49.03
	5.0	0.509 ± 0.045	67.24
	10	0.132 ± 0.018	91.50
5-FU	12.5	0.785 ± 0.064	49.54
	25	0.615 ± 0.021	60.47
	50	0.232 ± 0.020	85.07
	100	0.128 ± 0.009	91.74
	200	0.122 ± 0.008	92.17

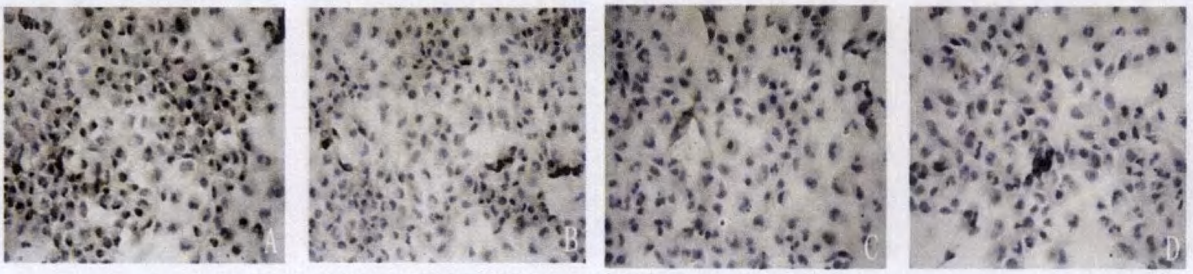
Image-Pro Plus 5.0 软件计算得出的平均光密度值表示各组的蛋白表达强弱。结果显示单纯照射组、ADM+ 照射组、5-FU+照射组细胞的 Livin 蛋白表达均较空白对照组减少（$P<0.05$），而 5-FU+照射组、ADM+照射组的下调水平较单纯照射组高，差异具有统计学意义（$P<0.05$）（见表 2）。

2.3　单纯照射、5-FU+照射及 ADM+照射对 Livin mRNA 表达的影响

图 2 为经 RT-PCR 扩增，1.5%琼脂糖凝胶电泳后，凝胶成像系统拍照所得的电泳照片。Quantity One 软件计算各组平均灰度值可见单纯照射组、ADM+ 照射组、5-FU+ 照射组细胞的 Livin mRNA 表达较空白对照组减少（$P<0.05$），而ADM+ 照射组、5-FU+ 照射组的 Livin mRNA 下调水平较单纯照射组显著（$P<0.05$），这与各组间蛋白质表达水平的差异相一致（见表 2）。

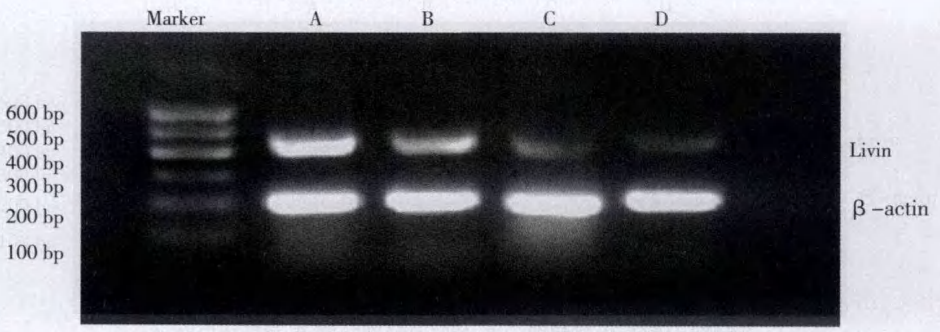
2.4　单纯照射、ADM+照射、及 5-FU+照射对细胞凋亡的影响

图 3 为 FCM 得到的细胞凋亡图片。结果显示单独予以 MCF-7 细胞 4Gy 的 6MV-X 线外照射后，其凋亡率为（5.326 ± 0.321）%，较空白对照组的凋亡率（2.322 ± 0.258）%高（$P<0.05$）；而外照射联合 ADM、5-FU 的凋亡率分别为（29.706 ± 0.474）%、（30.848 ± 0.606）%，高于单纯照射组，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。



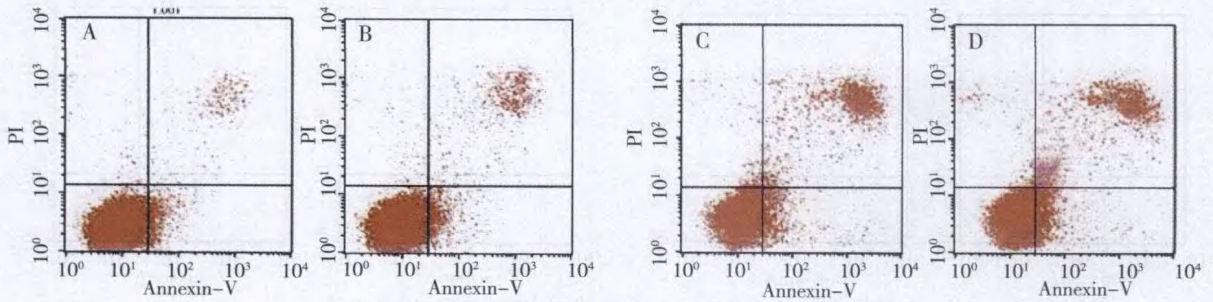
A. 空白对照组；B. 单纯照射组；C. 5-FU+ 照射组；D. ADM+ 照射组

图 1　细胞爬片免疫组化检测照片（HE × 200）



A. 空白对照组；B. 单纯照射组；C. 5-FU+ 照射组；D. ADM+ 照射组

图 2　RT-PCR 检测的各组细胞 Livin mRNA 表达



A. 空白对照组；B. 单纯照射组；C. 5-FU+ 照射组；D. ADM+ 照射组

图 3　FCM 得到的细胞凋亡图片

表 2　各组细胞平均光密度值和灰度值的差异（$\bar{x} \pm s$，$n=5$）

分组	平均光密度值	平均灰度值（Livin/β -actin）
空白对照组	0.242 ± 0.004	0.876 ± 0.012
单纯照射组	0.185 ± 0.002*	0.814 ± 0.012*
5-FU+ 照射组	0.056 ± 0.002*△	0.580 ± 0.020*△
ADM+ 照射组	0.043 ± 0.001*△	0.555 ± 0.020*△

* 与空白对照组比较，$P<0.05$；△与单纯照射组比较，$P<0.05$

3 讨 论

细胞凋亡是指细胞的程序性死亡，而细胞凋亡失调所导致的细胞凋亡抵抗是恶性肿瘤发生、发展和转移的主要原因之一。在恶性肿瘤的治疗中，目前大多数化疗药物都是通过诱导细胞凋亡以清除肿瘤细胞[3,4]。而肿瘤细胞经过放射线照射后会有部分细胞自动进行亚致死性损伤的修复，从而影响放疗的疗效。放疗和化疗的协同作用则会抑制细胞的这种修复，从而增加肿瘤细胞的凋亡率[5]，提高治疗效果。本研究将临床上最常用的乳腺癌化疗药物 5-FU、ADM 联合 6MV-X 线外照射与单纯 X 射线照射组进行比较，结果发现前两组 MCF-7 细胞经处理后凋亡率较单纯照射组增加（$P<0.05$），从而在细胞水平说明化疗药物 5-FU、ADM 联合 X 线外照射能起到一定的放射增敏作用。

Livin 是凋亡抑制蛋白家族（Inhibitor of apoptosis proteins，IAPs）成员之一，与该家族其他成员一样在抑制细胞凋亡中发挥着重要的作用。目前研究表明，Livin 基因在乳腺癌、肺癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、白血病及淋巴瘤等恶性肿瘤组织中高表达[6]。Wang 等[7]用 RT-PCR 及 Western blot 检测 40 例胃癌患者的肿瘤组织，结果发现 19/40 的肿瘤组织中有 Livin 的表达，且在低分化及有淋巴结转移的肿瘤组织中高表达（$P<0.05$）。Kitamura H 等[8]用酶联免疫及 Western blot 检测肾细胞肾癌患者血清中抗 Livin 抗体的表达，发现患者该抗体表达明显高于正常的志愿者（$P<0.05$）。由于 Livin 基因特异性高表达于各种恶性肿瘤中，故以 Livin 为靶点的抗肿瘤治疗是目前研究的热点之一。一些学者将 RNA 干扰技术与传统化疗药物结合后发现其增加了 Livin 阳性表达的肿瘤患者的化疗有效率，从而提高恶性肿瘤的治愈率[9,10]。本实验中我们将 ADM、5-FU 联合 6MV-X 线外照射乳腺癌 MCF-7 细胞，结果发现其 Livin 蛋白及 mRNA 表达均较单纯照射组下降。由于 Livin 基因具有抑制细胞凋亡的作用，故上述结果也与我们用流式细胞术测得的各组细胞凋亡率的比较结果相一致，这说明 ADM、5-FU 联合外照射后可能通过下调 Livin 基因的表达而增加细胞对射线照射的敏感性，从而促进了乳腺癌 MCF-7 细胞的凋亡。而在另一项研究中，国内孙建国等[11]通过基因转染获得稳定表达 Livin 基因的肺癌 A549 细胞，结果发现稳定表达该基因的细胞对放射线的敏感性及凋亡率较未转染组显著下降。从该项研究和本实验中我们可以推测 Livin 基因表达率的高低可能和肿瘤细胞的放射敏感性有一定关联，因此可以作为放射增敏的靶点来进一步研究。

放疗和化疗是目前乳腺癌两大主要治疗手段，如果延长化疗的时间不利于肿瘤的全身控制，而推迟放疗的时间则增加了肿瘤的局部复发率，因此将两者协同应用更有利于发挥二者的长处[12]。由于 ADM 及 5-FU 是乳腺癌常用的 CAF 方案中所用的 2 种化疗药物，故本实验为放化疗联合治疗乳腺癌提供了可靠的理论依据。但是由于在放疗的同时联合化疗在一定程度上会加重治疗的毒副反应，降低患者对治疗的耐受性，故还需进一步的临床研究以进行验证。

参 考 文 献

[1] Turnbull C, Mirugaesu N, Eeles R, et al. Radiotherapy and genetic predisposition to breast cancer[J]. Clinical Oncology, 2006, 18(3): 257-267.

[2] Lin J H, Deng G, Huang Q, et al. KIAP, a novel member of the inhibitor of apoptosis protein family[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 279(3): 820-831.

[3] Koceva-Chyła A, Jedrzejczak M, Skierski J, et al. Mechanisms of induction of apoptosis by anthraquinone anticancer drugs aclarubicin and mitoxantrone in comparison with doxorubicin: relation to drug cytotoxicity and caspase-3 activation[J]. Apoptosis, 2005, 10(6): 1497-1514.

[4] Havelka A, Berndtsson M, Olofsson M, et al. Mechanisms of action of DNA-damaging anticancer drugs in treatment of carcinomas: is acute apoptosis an "off-target" effect[J]? Mini Rev Med Chem, 2007, 7(10): 1035-1039.

[5] 殷蔚伯，余子豪，徐国镇，等. 肿瘤放射治疗学[M]. 第 4 版. 北京：中国协和医科大学出版社，2008. 1339.

[6] Ashhab Y, Alian A, Polliae A, et al. Two splicing [U10] variants of a new inhibitor of apoptosis gene with different biological properties and tissue distribution pattern[J]. FEBS Lett, 2001, 495(1-2): 56-60.

[7] Wang T S, Ding Q Q, Guo R H, et al. Expression of livin in gastric cancer and induction of apoptosis in SGC-7901 cells by shRNA-mediated silencing of livin gene[J]. Biomed Pharmacother, 2009, 63(5): 326-327.

[8] Kitamura H, Honma I, Torigoe T, et al. Expression of livin in renal cell carcinoma and detection of anti-livin autoantibody in patients[J]. Urology, 2007, 70(1): 38-42.

[9] 梁春艳，马 萍，刘新莉. 靶向 Livin 的小分子干扰素 RNA 联合表阿霉素对乳腺癌细胞 ZR-75-30 凋亡的影响 [J]. 中华医学杂志，2008, 88(24): 1703-1706.

[10] Yuan D, Liu L, Xu H, et al. The effects on cell growth and chemosensitivity by livin RNAi in non-small cell lung cancer[J]. Mol Cell Biochem, 2009, 320(1-2): 133-140.

[11] 孙建国，廖荣霞，陈正堂，等. Livin 异构体基因转染对肺腺癌 A549 细胞生长及放化疗敏感性的影响[J]. 中华结核和呼吸杂志，2005, 28(12): 836-840.

[12] Dubey A, Recht A, Come S, et al. Why and how to combine chemotherapy and radiation therapy in breast cancer patients[J]. Recent Results Cancer res, 1998, 152: 247-254.

（责任编辑：张学颖）