基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1651-03

Bcl-2、Bad 表达与乳腺癌细胞对化疗药物敏感性的关系

罗 杰,于 冰,孙治君
(重庆医科大学附属第二医院普外科,重庆 400010)

【摘 要】目的:研究 bcl-2、bad 表达与乳腺癌细胞对化疗药物敏感性的关系。方法:选取术中冰冻病理诊断为乳腺癌(术前未行放疗、化疗)的手术切除标本 20 例,体外分离细胞作培养,应用四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide,MTT)法分析表柔比星(Epirubicin adriamycin, EADM)、5- 氟脲嘧啶(Fluorouracil,5-Fu)、盖诺(Navelbine,NVB)、顺铂(Diaminedichloroplatinum,DDP)4 种化疗药物对乳腺癌肿瘤细胞的相对抑制率,通过免疫组织化学染色法分析乳腺癌组织 bcl-2、bad 的表达。结果:0.1 倍血浆峰值浓度(Plasma peak concentration,PPC)浓度时乳腺癌细胞对 4 种化疗药物的敏感率分别为 EADM 30%、5-Fu 20%、NVB 45%、DDP 25%;bcl-2(-)的乳腺癌细胞对 4 种化疗药物敏感性均高于 bcl-2(+)的乳腺癌细胞($P<0.05$),bcl-2 阳性表达程度与乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性存在负相关关系($P<0.05$)。bad (+) 的乳腺癌细胞对 EADM 敏感性高于 bad(-)的乳腺癌细胞($P<0.05$),bad 阳性表达程度与乳腺癌细胞对 EADM、NVB 的敏感性存在正相关关系($P<0.05$)。结论:联合检测 bcl-2、bad 的表达可对乳腺癌化疗药物的选择起到指导作用,调节 bcl-2、bad 表达水平能成为治疗乳腺癌的新途径。

【关键词】乳腺癌;Bcl-2;Bad;化疗敏感性
【中国图书分类法分类号】R730.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-03-17

Relationship of the expression of bcl-2 and bad in breast cancer cell with chemosensitivity

LUO Jie, et al
(*Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the relationship of the expression of bcl-2 and bad in breast cancer cells with chemosensitivity. *Methods*: Surgical samples of breast cancer, diagnosed by pathology, were obtained from The First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University. The cancer sample cells were cultured separately in the incubator at 37℃, 5% CO_2 in vitro. The rate of inhibition of cancer cells by 4 kindsof anticancer drugs, which were EADM (Epirubicin adriamycin), 5-Fu (Fluorouracil), NVB(Navelbine) and DDP (Diaminedichloroplatinum), were assayed by MTT(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide)method. Immuno histochemistry was used to detect the expression of IL-2 and IL-4 in the breast cancer tissues. *Results*: Sensitivity rates of 20 breast cancer cells in 0.1 × PPC(plasma peak concentration) within 48h in vitro were 30%(EADM), 20%(5-Fu), 45%(NVB)and 25%(DDP). Respectively the rate of inhibition of EADM, 5-Fu, NVB and DDP were significantly higher in the bcl-2 negative cancer cells than in the bcl-2 positive cancer cells. A negative correlation was found between expression of bcl-2 and chemosensitivity for all the 4 anticancer drugs. The rates of inhibition of EADM and NVB were significantly lower in the bad negative cancer cells than in the bad positive cancer cells. A positive correlation was found between expression of bad and chemosensitivity for EADM. *Conclusion*: The combined detection of bcl-2 and bad may be taken as an index of the selection of anticancer drugs. Regulated the expression level of bcl-2 and bad may be a new way to the therapy of breast cancer.

【Key words】Breast cancer; Bcl-2; Bad; Chemosensitivity

乳腺癌是危害女性健康的“头号杀手”、其治疗手段多以手术、化疗、放疗和内分泌治疗相结合,其中化疗是治疗乳腺癌的重要手段。尽管不断有新的化疗药物、化疗方案推出,但乳腺癌的化疗效果仍不十分理想,其重要原因就是乳腺癌细胞对化疗药物不敏感或产生耐药性。目前对乳腺癌化疗药物的选择仍缺乏明确的指标,因此寻找对乳腺癌化疗疗效起预测作用的指标十分必要。本研究通过四甲基偶氮唑盐(3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphe

作者介绍:罗 杰(1981-),男,硕士,研究方向:乳腺肿瘤。
通讯作者:孙治君,男,教授,E-mail:ch.sunzj@yahoo.com.cn。

nyltetrazolium bromide,MTT)法分析表柔比星(Epirubicin adriamycin,EADM)、5-氟脲嘧啶(Fluorouracil,5-Fu)、盖诺(Navelbine,NVB)、顺铂(Diaminedichloroplatinum,DDP),4 种化疗药物对乳腺癌肿瘤细胞的相对抑制率,通过免疫组织化学染色法检测乳腺癌组织 bcl-2、bad 的表达,分析 bcl-2、bad 的表达与乳腺癌细胞化疗敏感性的关系。

1 材料和方法

1.1 实验标本

选取我院经病理诊断为乳腺癌,术前未经放疗、化疗的手术切除的新鲜癌组织 20 例。取材中严格无菌操作,避开坏死区域,取下组织分为 2 块,一块置入不含小牛血清的 RPMI1640 培养液中迅速送往实验室, 另一块经福尔马林液中固定、脱水、石蜡包埋。

1.2 试剂

Bcl-2、bad 兔抗人多克隆抗体购自武汉博士得生物工程有限公司,表柔比星(EADM,浙江海正药业股份有限公司)、5-氟脲嘧啶(5-Fu,天津人民制药厂)、盖诺(NVB,江苏豪森药业股份有限公司)、顺铂(DDP,德州德药制药有限公司)分别用生理盐水配置成母液,再用培养液配制成浓度为 100 倍 PPC(Plasma peak concentration,血浆峰值浓度)的工作液,正压过滤除菌,-20℃保存备用。

1.3 细胞分离培养与 MTT 检测[1]

采用机械法获取癌细胞单细胞悬液,先将标本用生理盐水(含青霉素 300 U/ml、链霉素 300 μg/ml)反复冲洗,去除坏死组织和血凝块,置于无菌平皿中,加入少许培养液,用眼科剪反复剪切成糊状,200 目不锈钢网过筛; 经台盼蓝染色计数活细胞数≥95%;以 1 000 r/min 离心,10 min;用 RPMI1640 完全培养液(含小牛血清、含青霉素 100 U/ml、链霉素 100 μg/ml)调整细胞浓度为 5×10^4 个 /L,接种于 96 孔板,每孔 180 μl;接种细胞分别加入化疗药物 20 μl(药物终浓度为 10 倍 PPC、1 倍 PPC、0.1 倍 PPC),每个浓度 3 个复孔;并设细胞对照组(加细胞不加药)和空白对照组(只加培养液),细胞对照组、空白对照组均加入 20 μl 培养液;置入 37℃、体积分数为 5% 的 CO_2 培养箱培养。加药培养 48 h 后,离心去上清,每孔加入 RPMI 1640 完全培养液 180 μl、MTT 溶液 20 μl 再培养 4 h,离心去上清,加入 DMSO (Dimethyl sulfoxide,二甲基亚砜) 200 μl, 震荡 15 min 使沉淀充分溶解, 用酶标仪(570 nm)测每孔 OD(Optical density,光密度)值,按下列公式计算相对抑制率: 相对抑制率=(对照组平均 OD 值 - 加药组平均 OD 值)/ 对照组平均 OD 值 × 100%。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片脱蜡至水;加过氧化酶阻断溶液(试剂 A);加非免疫性动物血清(试剂 B);加入一抗;加生物素标记第二抗体(试剂 C):加链霉素抗生物素蛋白 - 过氧化物酶溶液(试剂 D):加二氨基联苯胺(Diaminobenzidine,DAB)溶液,苏木素复染, 中性树胶封固。每步骤间磷酸盐缓冲液(Phosphate buffered saline,PBS)冲洗 3 次。结果判定:依据染色阳性细胞所占细胞总数的百分数评分(A):阳性细胞数为零者为 0 分,<30% 为 1 分,30% ~ 60% 为 2 分,>60% 为 3 分;按染色强度评分(B):无色为 0 分,弱染色为 1 分,中染色为 2 分,强染色为 3 分;总分(A+B)≥3 分为阳性表达,<3 分为阴性表达。

1.5 统计学方法

实验结果以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,采用 SPSS11.5 统计软件分析系统进行 t 检验、Spearman 等级相关分析进行统计学处理。$P<0.05$ 视为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 乳腺癌细胞体外药物敏感性检测结果

10 倍 PPC 浓度时乳腺癌细胞平均相对抑制率为 EADM 69.74% ± 7.67%、5-Fu 61.81% ± 9.94%、NVB 69.10% ± 8.27%、DDP 63.27% ± 6.79%;1 倍 PPC 浓度时为 EADM 45.39% ±

表 1 0.1×PPC 浓度时 20 例乳腺癌细胞 MTT 法药物敏感结果(n 为例数)

药物	不敏感(%)	敏感(%)	中度敏感(%)	敏感率(%)
EADM	70(n=14)	30(n=6)	0	30(n=6)
5-Fu	80(n=16)	20(n=4)	0	20(n=4)
NVB	55(n=11)	35(n=7)	10(n=2)	45 (n=9)
DDP	75(n=15)	25(n=5)	0	25 (n=5)

表 2 乳腺癌细胞 bcl-2 表达与对 4 种化疗药物的相对抑制率(%)的关系

药物	Bcl-2		t	P
	+	-		
EADM	30.45 ± 2.52	34.87 ± 2.25	3.99	0.001
5-Fu	30.44 ± 1.49	34.40 ± 2.34	t'=4.25	0.001*
NVB	34.72 ± 3.44	41.19 ± 2.60	4.51	<0.05
DDP	24.32 ± 3.29	29.87 ± 1.90	4.30	<0.05

注:*两样本方差不齐,行 t' 检验

表 3 乳腺癌细胞 bad 表达与对 4 种化疗药物的相对抑制率(%)的关系

药物	Bad		t	P
	+	-		
EADM	39.95 ± 2.29	28.34 ± 6.67	t' = 5.78	<0.05*
5-Fu	30.33 ± 3.90	25.76 ± 4.94	1.998	0.061
NVB	38.60 ± 2.67	26.79 ± 6.42	t' = 5.67	<0.05*
DDP	28.70 ± 2.56	26.40 ± 2.44	2.044	0.056

注:*两样本方差不齐,行 t' 检验

表 4 乳腺癌组织中 bcl-2、bad 的联合表达与 4 种化疗药物相对抑制率(%)的关系 n 为例数

药物	bcl-2(+)bad(-) (n = 8)	bcl-2(+)bad(+) (n= 5)	bcl-2(-)bad(+) (n= 6)	bcl-2(-)bad(-) (n= 1)
EADM	25.93 ± 3.05	33.47 ± 4.65	40.16 ± 5.20	37.72
5-Fu	24.18 ± 4.18	30.38 ± 4.81	37.86 ± 2.80	35.11
NVB	26.06 ± 7.43	36.62 ± 2.78	42.50 ± 2.63	38.88
DDP	23.01 ± 4.14	26.01 ± 4.73	31.90 ± 6.81	28.52

11.74%、5-Fu 44.56% ± 12.28%、NVB 48.50% ± 9.96%、DDP 41.42% ± 4.81%;0.1 倍PPC 浓度时为 EADM 27.57% ± 8.94%、5-Fu 25.48% ± 8.62%、NVB 30.35% ± 9.02%、DDP 25.33% ± 5.65%;随着药物浓度的降低,乳腺癌细胞的相对抑制率逐渐降低。在 0.1 倍 PPC 浓度时乳腺癌细胞对 4 种化疗药物敏感率分别为 EADM 30%、5-Fu 20%、NVB 45%、DDP 25%(表 1)。

2.2 乳腺癌组织 bcl-2、bad 的表达与癌细胞在 0.1 倍 PPC 浓度时体外药物敏感性的关系

在体外药物敏感试验中乳腺癌细胞对 4 种化疗药物在 0.1 倍 PPC 浓度时的敏感性均与 bcl-2 的表达相关,bcl-2 阴性表达的肿瘤细胞对 4 种化疗药物敏感性高于 bcl-2 阳性表达的肿瘤细胞(表2);bcl-2 的阳性表达程度与对 4 种化疗药物敏感性存在负相关关系(P<0.05)。在体外药物敏感试验中乳腺癌细胞对 EADM、NVB 的敏感性与 bad 的表达相关,bad 阳性表达的肿瘤细胞对 EADM、NVB 的敏感性高于 bad 阴性表达的肿瘤细胞(P<0.05)(表 3);bad 的阳性表达程度与对 EADM、NVB 的敏感性存在正相关关系(P<0.05)。bcl-2(-)bad(+)时对 4 种化疗药物敏感性高于 bcl-2(+)bad(+)、bcl-2(+)bad(-);bcl-2(+)bad(+)时对 NVB 的敏感性高于 bcl-2(+)bad(-)(P<0.05);bcl-2(-)bad(+)、bcl-2(+)bad(-)时对 NVB 的敏感性高于其它 3 种化疗药物,但差异无统计学意义(P>0.05)(表 4)。

3 讨 论

化疗是治疗乳腺癌的重要手段,在临床选择化疗药物时仍存在一定的盲目性,同一化疗方案对不同个体的疗效相差较大,不知化疗药物的敏感性而盲目使用将会造成很大的毒副作用。这就需要在化疗前了解所用化疗方案的药物敏感性,以避免治疗和无效药物的不良反应,实现真正意义上的治疗个体化,故化疗前的药物敏感性预测就显得尤其必要。多数化疗药物是通过诱导肿瘤细胞凋亡来发挥作用的,对细胞凋亡过程中调控因子的研究将对我们了解肿瘤细胞耐药性的产生提供很大的帮助。

bcl-2 及其家族成员在细胞的凋亡过程中发挥着重要的调控作用,bcl-2 是抗凋亡基因,其作用机制尚不十分明确,可能与影响 Ca^{2+} 进入细胞,从而调节细胞内信号转导;干扰自由基对细胞的损害作用,对抗过氧化作用等有关[2]。Bad 是 bcl-2 家族中的凋亡促进基因,其促凋亡作用的发挥是通过与 bcl-2 家族中的凋亡抑制基因 bcl-2 等的表达产物形成异源二聚体进而逆转其抑制凋亡的作用。有临床研究表明 bcl-2 的表达水平与一些公认的正性因子如孕激素受体、雌激素受体呈正相关与其他一些负性因子呈负相关如表皮生长因子受体、S 期(DNA 合成期)分数、增殖细胞核抗原、腋窝淋巴结转移情况等[3]。在对乳腺疾病的研究中也发现从正常—单纯性增生—非典型增生(轻 - 中 - 重)—原位癌—浸润性乳腺癌这一过程中 bad 蛋白的表达是呈递减趋势[4]。

本组实验中 bcl-2(-)的乳腺癌细胞对 4 种化疗药物的敏感性均高于 bcl-2(+)的乳腺癌细胞,且经等级相关分析 bcl-2 阳性表达程度与乳腺癌对化疗药物敏感性存在负相关关系,提示 bcl-2 可能通过调节细胞内信号转导,干扰自由基对细胞的损害等作用抑制肿瘤细胞凋亡的发生,进而对肿瘤细胞的化疗敏感性产生正性影响,bcl-2 可能成为乳腺癌临床化疗疗效预测的指标之一。本组实验中 bad(-)的乳腺癌细胞对 EADM、NVB 的敏感性低于 bad(+)的乳腺癌细胞;bcl-2(-)bad(+)时对 4 种化疗药物敏感性高于 bcl-2(+)bad(+)、bcl-2(+)bad(-);bcl-2(+)bad(+)时对 NVB 的敏感性高于 bcl-2(-)bad(+)(P<0.05),表明对 bcl-2、bad 表达的联合检测可对乳腺癌化疗药物的选择起到指导作用。有实验研究证实[5],bcl-2 反义寡核苷酸能够有效下调乳腺癌细胞的 bcl-2 表达水平,降低 bcl-2 基因对化疗药物诱导的细胞凋亡的抑制,从而提高肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,改善治疗效果。Bcl-2 反义寡核苷酸作为传统化疗药物的辅助药物,为乳腺癌治疗提供了一条新的途径。

基础研究 文章编号:0253-3626(2009)12-1654-04

喉鳞癌中 NFκB p65 和 PTEN 的表达及临床意义

黄 闯[1],姜振东[2],冯亚瑾[2],王洪鹏[1],陈鸿雁[1]
(1.重庆医科大学附属第一医院耳鼻咽喉科,重庆 400016;2.第三军医大学附属西南医院耳鼻咽喉科,重庆 400038)

【摘 要】目的:探讨核因子 κBp65(Nuclear factor-κB p65,NFκB p65)和第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosometen,PTEN)在喉鳞癌组织中的表达及意义。方法:采用免疫组化法检测 52 例喉鳞癌组织及 30 例癌旁正常组织中 NFκB p65 和 PTEN 的表达。结果:喉鳞癌中 NFκB p65 表达明显高于癌旁正常组织($P<0.01$),NFκB p65 的表达水平与喉鳞癌的 T 分期、淋巴结转移及临床分期密切相关($P<0.05$)。喉鳞癌中 PTEN 表达明显低于癌旁正常组织($P<0.01$),PTEN 的表达水平与喉鳞癌的 T 分期、淋巴结转移及临床分期密切相关($P<0.05$)。NFκB p65 和 PTEN 蛋白在不同年龄、不同性别、不同临床分型及不同病理分级的喉鳞癌组织中表达差异无统计学意义($P>0.05$)。NFκB p65 和 PTEN 在喉鳞癌中的表达呈负相关($r_s=-0.580$,$P<0.01$)。结论:NFκB p65 的高表达及 PTEN 的缺失表达与喉鳞癌的发生、发展有关,二者有可能成为判断喉鳞癌侵袭能力及预后评估的参考指标。

【关键词】喉肿瘤;免疫组织化学;NFκB p65;PTEN
【中国图书分类法分类号】R246.81 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-02-18

Expression and clinicopathological significance of NF κ B p65 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma

HUANG Chuang, et al
(*Department of Otolaryngology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the expression of NFκB p65 and PTEN in laryngeal squamous cell carcinoma (LSCC) and their clinical significance. *Methods*: Immunohistochemical staining was used to examine the expression of NFκB p65 and PTEN in 52 cases of LSCC and 30 cases of adjacent normal tissues. *Results*: The expression positive rates of NF κ B p65 in LSCC were obviously higher than those in adjacent normal tissues($P<0.01$), the positive intensities of NFκB p65 was associated with T Stage, lymph node metastasis and clinical stage($P<0.05$).The expression positive rates of PTEN in LSCC were obviously lower than those in adjacent normal tissues($P<0.01$); the positive intensities of PTEN was associated with T Stage, lymph node metastasis and clinical stage($P<0.05$). The positive expression of NFκB p65 and PTEN were not related with the age, gender, primary site, and differentiation of LSCC patients($P>0.05$). The Spearman analysis indicated that the expression level of NFκB p65 was negatively correlated with that of PTEN significantly($r_s=-0.580$, $P<0.01$). *Conclusion*: The higher expression of NFκB p65 and PTEN loss are associated with pathogenesis and development of LSCC. The two markers may be useful for predicting invasion and metastasis ability and prognosis of LSCC.

【Key words】Laryngeal neoplasms; Immunohistochemistry; NFκB p65; PTEN

核因子 κBp65(Nuclear factor-κB p65,NFκB p65)是一类广泛存在于细胞中的多显性核转录因子,可调控细胞增殖、分化、凋亡及恶性转化[1]。第 10 号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源的基因(Phosphatase and tensin homolog deleted on chromosome ten,

作者介绍:黄 闯(1980-),男,硕士,
研究方向:头颈肿瘤。
通讯作者:陈鸿雁,女,教授,E-mail:cqchenhongyan@126.com。

参 考 文 献

[1] 廖子君.现代肿瘤药物治疗学[M].第 1 版.西安:世界图书出版公司,2002,103-112.
[2] Chami M, Prandini A, Campanella M, et al. Bcl-2 and Bax exert opposing effect on Ca^{2+} signaling, which do not depend on their putative pore-forming region [J]. J Biol Chem,2004,279(52):54581.
[3] Linjawi A,Kontogiannea M,Halwani F,et al.Prognostic significance of p53, Bcl-2, and Bax expression in early breast cancer[J].J Am Coll Surg,2004,198(1):83.
[4] 王晓薇,郭炳麟,商中华.bcl-2 和 bad 蛋白表达与乳腺癌相关性研究[J].中华普通外科杂志,2004,19(9):56.
[5] Tanabe K, Kim R, Inoue H, et al. Isense Bcl-2 and HER-2 oligonucleotide treatment of breast cancer cells enhances their sensitivity to anticancer drugs[J].Int J Oncol, 2003,22(8):875-881.

(责任编辑:冉明会)