维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)07-0835-04

乳腺癌中 IL-2、IL-4 表达与化疗药物敏感性关系的研究

于 冰,孙治君,沈洪彦

(重庆医科大学附属第一医院内分泌外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究乳腺癌细胞中 IL-2、IL-4 表达与化疗药物敏感性的关系。方法:选取病理诊断为乳腺癌(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(MTT)法分析表柔比星(EADM)、5- 氟脲嘧啶(5-Fu)、盖诺(NVB)、顺铂(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 IL-2、IL-4 的表达。结果:0.1×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%;IL-2(+)的乳腺癌细胞对 4 种化疗药物敏感性均高于 IL-2(-)的乳腺癌细胞($P<0.05$),IL-2 阳性表达程度与乳腺癌细胞对化疗药物的敏感性存在正相关关系($P<0.05$)。IL-4(+)的乳腺癌细胞对 EADM、NVB 敏感性均低于 IL-4(-)的乳腺癌细胞($P<0.05$),IL-4 阳性表达程度与乳腺癌细胞对化 EADM、NVB 的敏感性存在负相关关系($P<0.05$)。结论:IL-2、IL-4 的表达与乳腺癌细胞对化疗药物敏感性有关,IL-2、IL-4 可作为乳腺癌临床化疗疗效预测的 2 个指标。对 IL-2、IL-4 表达的联合检测可以对乳腺癌化疗药物的选择起到指导作用。

【关键词】乳腺癌;IL-2;IL-4;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】2007-09-30

Relationship of the expression of IL-2 and IL-4 in breast cancer with chemosensitivity

YU Bing, et al

(*Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】 *Objective*: To investigate the relationship of the expression of IL-2 and IL-4 in breast cancer cells with chemosensitivity. *Methods*: Surgical samples of breast cancer, diagnosed by pathology, were obtained from The First Affiliated Hospital ofChongqing 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, 5-Fu, NVB and DDP, were assayed by MTT method. Immunohistochemistry 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 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 IL-2 positive cancer cells than in the IL-2 negative cancer cells. A positive correlation was found between expression of IL-2 and chemosensitivity for all the 4 anticancer drugs. The rates of inhibition of EADM and NVB were significantly lower in the IL-4 positive cancer cells than in the IL-4 negative cancer cells. A negative correlation was found between expression of IL-4 and chemosensitivity for the 2 anticancer drugs. *Conclusions*: The expression of IL-2 and IL-4 are related with the chemosensitivity of the breast cancer cells, and they may become one of the markers for judging the effect of chemotherapy in clinic. The combined detection of IL-2 and IL-4 may be taken as an index of the selection of anticancer drugs.

【Key words】 Breast cancer; IL-2; IL-4; Chemosensitivity

乳腺癌是一种需要手术、放疗、化疗以及内分泌等综合治疗的疾病,临床化疗有效者能显著延长患者的生存期,对化疗药物的抵抗被认为是乳腺癌化疗失败的原因之一。目前对乳腺癌的化疗多是根据临床经验选择相应化疗方案,使治疗存在盲目性,因此有必要寻找一些能对乳腺癌化疗疗效起预测作用的指标,以期知道临床化疗药物的选择及化疗方案的运用,进而提高化疗疗效。

作者介绍:于 冰(1982-),男,硕士,研究方向:内分泌肿瘤。

通讯作者:孙治君,男,教授,E-mail:ch.sunzj@yahoo.com.cn。

1 材料和方法

维普资讯 http://www.cqvip.com

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

IL-2、IL-4 兔抗人多克隆抗体购自武汉博士德生物工程有限公司，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，再用培养液配制成工作液(100×PPC)，正压过滤除菌，-20℃保存备用。

1.3 细胞分离培养与 MTT 检测[1,2]

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 300μ/ml、链霉素 300μ/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 000r/min 离心，10min；用 RPMI1640 完全培养液(含小牛血清、含青霉素 100μ/ml、链霉素 100μ/ml)调整细胞浓度为 5×10^4 个/L，接种于 96 孔板，每孔 180μl；接种细胞分别加入化疗药物 20μl(药物终浓度为 10×PPC、1×PPC、0.1×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 20μl 培养液；置入 37℃、体积分数为 5%的 CO_2 培养箱培养。加药培养 48h 后，离心去上清，每孔加入 RPMI1640 完全培养液 180μl、MTT 溶液 20μl 再培养 4h，离心去上清，加入 DMSO200μl，震荡 15min 使沉淀充分溶解，用酶标仪(570nm)测每孔 OD 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 DAB 溶液，苏木素复染，中性树胶封固。每步骤间 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×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×PPC 浓度时为 EADM(45.39±11.74)%、5-Fu(44.56±12.28)%、NVB(48.50±9.96)%、DDP(41.42±4.81)%；0.1×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×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 IL-2、IL-4 的表达与癌细胞在 0.1×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×PPC 浓度时的敏感性均与 IL-2 的表达相关，IL-2 阳性表达的肿瘤细胞对 4 种化疗药物敏感性高于 IL-2 阴性表达的肿瘤细胞(表 2)；IL-2 的阳性表达程度与对 4 种化疗药物敏感性存在正相关关系($P<0.05$)。在体外药物敏感试验中乳腺癌细胞对 EADM、NVB 的敏感性与 IL-4 的表达相关，IL-4 阳性表达的肿瘤细胞对 EADM、NVB 的敏感性低于 IL-4 阴性表达的肿瘤细胞(表 3)；IL-4 的阳性表达程度与对 EADM、NVB 的敏感性存在负相关关系($P<0.05$)。IL-2(+)IL-4(-)时对 4 种化疗药物敏感性高于 IL-2(+)IL-4(+)、IL-2(-)IL-4(+)，对 NVB 的敏感性高于 DDP($P<0.05$)；IL-2(+)IL-4(+)

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

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

维普资讯 http://www.cqvip.com

时对 NVB 的敏感性高于 IL-2(-)IL-4(+)($P<0.05$)；IL-2(+)IL-4(+)、IL-2(-)IL-4(+)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

乳腺癌被认为是一种全身性疾病，对化疗中度敏感；化疗是乳腺癌综合治疗的重要组成部分，具有举足轻重的作用，但化疗有效仅为 50%~70%，能达到完全缓解效果的较少。各类化疗药物多具有不同程度的毒副作用，盲目使用则可能对部分病人不仅无效，还会造成骨髓功能和免疫功能抑制等不良反应，并增加病人的经济负担。近年来我国乳腺癌的发病率逐步上升，但乳腺癌的死亡率呈下降趋势。乳腺癌患者死亡率下降与现代肿瘤治疗理念不断更新有关。从过去的单纯手术到以手术为主的综合治疗，特别是可手术乳腺癌术后辅助化疗和内分泌治疗的应用，明显提高了乳腺癌患者的长期生存率。乳腺癌综合治疗的重要组成部分 - 化疗仍存在一部分疗效欠佳的问题，而化疗失败的主要原因就是肿瘤细胞耐药性的产生。因此，提高乳腺癌细胞对化疗的敏感性是提高患者生存率的重要策略。肿瘤细胞耐药的机制相当复杂，包括 mdr1 等多药耐药基因及其表达产物异常导致细胞内药物积聚下降、药物转运或摄取过程障碍、机体解毒作用增强、DNA 修复能力增强等，其中凋亡通路受阻是重要机制之一[3]。

Fas/FasL 介导的细胞凋亡是 T 细胞凋亡的重要机制之一，当可溶性或表达于细胞表面的 FasL 与靶细胞表面的 Fas 受体结合，激活并聚集 Fas 相关蛋白，继而激活 caspases 的级联反应，最终启动细胞的

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

药物	IL-2			
	+	-	t	P
EADM	33.24 ± 8.81	24.51 ± 7.67	2.309	0.033
5-Fu	34.45 ± 9.64	21.30 ± 3.47	t' = 3.488 2	<0.05*
NVB	38.79 ± 9.69	25.80 ± 4.23	t' = 3.377 5	<0.05*
DDP	29.86 ± 5.25	22.90 ± 4.29	3.208 1	0.004 9

注：*两样本方差不齐，行 t' 检验

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

药物	IL-4			
	+	-	t	P
EADM	24.57 ± 6.49	40.82 ± 3.05	4.800 1	0.000 1
5-Fu	22.73 ± 4.14	35.53 ± 14.76	t'=-1.716 6	>0.05*
NVB	27.10 ± 5.30	43.35 ± 9.65	4.659 4	0.000 2
DDP	24.30 ± 4.62	29.48 ± 8.18	1.723 4	0.101 9

注：*两样本方差不齐，行 t' 检验

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

	IL-2(+)IL-4(-) (n=3)	IL-2(+)IL-4(+) (n= 4)	IL-2(-)IL-4(+) (n=12)	IL-2(-)IL-4(-) (n=1)
EADM	48.82 ± 3.43	27.57 ± 6.75	23.15 ± 6.17	40.81
5-Fu	38.54 ± 16.51	25.50 ± 3.60	22.12 ± 4.05	26.49
NVB	47.46 ± 6.21	32.29 ± 5.55	25.36 ± 4.10	31.03
DDP	33.19 ± 4.24	27.37 ± 4.87	23.27 ± 4.25	18.36

维普资讯 http://www.cqvip.com

凋亡过程[4-7]。IL-2 可增强 T 细胞对 FasL 的敏感性，在活化诱导的细胞死亡(Activated induced cell death, AICD)过程中起重要作用。IL-4 是介导 Th2 型细胞发育的主要细胞因子，并且抑制 Th1 型细胞因子(如 IL-2、IL-12)的增殖及其生物学作用，从而抑制细胞凋亡的发生。我们在实验中发现 IL-2 在乳腺癌中的表达较乳腺纤维瘤、正常乳腺组织低，IL-4 在乳腺癌中的表达较乳腺纤维瘤、正常乳腺组织高，说明乳腺癌患者一方面机体处于免疫抑制状态，另一方面 IL-2 低表达、IL-4 高表达也可能使肿瘤细胞凋亡的发生在一定程度上受到抑制。

本组实验中 IL-2(+)的乳腺癌细胞对 4 种化疗药物的敏感性均高于 IL-2(-)的乳腺癌细胞，且经等级相关分析 IL-2 阳性表达程度与乳腺癌对化疗药物敏感性存在正相关关系；提示 IL-2 可能通过增强 T 细胞对 FasL 的敏感性从而诱导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，IL-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 IL-4(+)的乳腺癌细胞对 EADM、NVB 的敏感性低于 IL-4(-)的乳腺癌细胞；IL-2(+)IL-4(-)时对 4 种化疗药物敏感性高于IL-2(+)IL-4(+)、IL-2(-)IL-4(+)；对 NVB 的敏感性高于 DDP($P<0.05$)；IL-2(+)IL-4(+)时对 NVB 的敏感性高于 IL-2(-)IL-4(+)($P<0.05$)，表明对 IL-2、IL-4 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。有关 IL-2、IL-4 对肿瘤细胞的化疗敏感性影响的具体信号传导途径，以及通过免疫治疗提高机体 IL-2 强势是否能增强化疗药物的敏感性有待进一步的研究。

参 考 文 献

[1] 韩 悦.肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 第1版.北京：北京医科大学中国协和医科大学联合出版社，1995.418-419.

[2] 廖子君，南克俊，韩 军.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.

[3] Ueda K, Yoshide A, Amachi T. Recent progress in P-glycoprotein research[J]. Anticancer Drug Des, 1999; 14(2): 115-121.

[4] Pano E, Kovanen UJ, Kati T, et al. Regulaton of Jak2 tyrosine by protein kinase C during macmphage differentiation of IL-3-dependent myeloid progenitor cells[J]. Blood, 2000; 95(8): 1626-1632.

[5] Villinger A, Ghaffari-Tabrizi N, Tinhofer I, et al. Synergistic action of protein kinase C theta and calcineurin is sufficient for Fas ligand expression and induction of a crmA-sensitive apoptosis pathway in Jurkat T cells[J]. Eur J Immunol, 1999; 29(11): 3549-3561.

[6] Bertolotto C, Maulon L, Filippa N, et al. Protein kinase C theta and epsilon promote T-cell survival by a rsk-dependent phosphorylation and inactivation of BAD[J]. J Biol Chem, 2000; 275(47): 37246-37250.

[7] Woo M, Hakem A, Elia AJ, et al. In vivo evidence that caspase-3 is required for Fas-mediatedapoptosis of hepatocytes[J]. Immunol, 1999; 163(4): 4909-4916.

(责任编辑：谭乐勤)

(上接第 834 页)

减轻甚至消除肿瘤引起的不良后果，达到明显改善生活质量、延长生存期的目的。是一种安全、有效、具有很高临床应用价值的微创治疗方法。

参 考 文 献

[1] 程树群，吴梦超，陈 汉，等.癌栓分型对肝细胞性肝癌合并门静脉癌栓治疗及预防的指导意义[J]. 中华医学杂志，2004; 84(1): 3-5.

[2] Lee HS, Kim JS, Choi IJ, et al. The safety and efficacy of transcatheter arterial chemoembolization in the treatment of patients with hepatocellular carcinoma and main portal vein obstruction. A Prospective controlled study[J]. Cancer, 1997; 79(11): 2087-2094.

[3] Fukuda S, Okuda K, Imamura M, et al. Surgical resection combined with chemotherapy for advanced hepatocellular carcinoma with portal vein thrombus: report of 19 cases[J]. Surgery, 2002; 131(3): 300-310.

[4] 吴孟超.原发性肝癌伴门静脉癌栓的外科治疗[J]. 中华医学杂志，2004; 84(1): 1-2.

[5] Kokudo N, Makuuchi M. Current role of portal vein embolization/hepatic artery chemoembolization[J]. The Surgical clinics of North America, 2004; 84(2): 643-657.

[6] 叶超平，刘德鑫.门静脉癌栓分型在肝癌经皮肝动脉栓塞化疗术治疗中的意义[J]. 中国综合临床，2006; 22(9): 814-815.

[7] 肖恩华，胡国栋，李锦清.无水乙醇碘油乳剂栓塞治疗肝细胞癌[J]. 中华放射学杂志，2005; 39(10): 1073-1076.

[8] 周 剑，汤钊猷，樊 嘉，等.3 种血管生长因子与肝癌微血管密度及门静脉癌栓形成的关系[J]. 中华医学杂志，2001; 81(8): 462-464.

[9] Zhou WP, Zhou JP, Cong WP, et al. Pathological study of excised specimens from resectable large hepatocellular carcinoma after transcatheter arteria[J]. The Chinese-German Journal of Clinical Oncology, 2004; 3(1): 11-14.

[10] Saccheri S, Lovaria A, Sangiovanni, et al. Segmental transcatheter arterial chemoembolization treatment in patients with cirrhosis and inoperable hepatocellular[J]. Journal of Vascular and Interventional Radiology, 2002; 13(10): 995-999.

(责任编辑：关蕴良)