维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)03－0398－02

昆布多糖硫酸酯对乳癌细胞化疗药物的增敏作用

董浦江，姚榛祥

(重庆医科大学临床学院器官移植研究室,重庆 400016)

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】B 【收稿日期】2003－10－24

细胞程序死亡(Programmed cell death PCD)抑制蛋白对肿瘤细胞化疗效果有明显影响,Bcl－2 控制着 PCD 途径的下游位置,该基因蛋白过度表达可使肿瘤细胞对化疗药物耐受性增加[1]。昆布多糖硫酸酯(Laminarin suiphate,LAMS)为昆布多糖经硫酸化后的多糖酯,作者利用该物下调 Bcl－2 基因蛋白表达的功效,探讨 LAMS 对乳癌细胞化疗药的增敏作用。报道如下。

1 材料与方法

1.1 LAMS

由本室参照文献[2]从海带提取制备,多糖含最 30%。使用时用生理盐水稀释成 40μg/ml(使 435－S、MCF－7 细胞 IC_{50}的平均浓度),0.22μl 孔径滤器过滤。

1.2 化疗药物

氟脲嘧啶(5－Fu)、氨甲喋啶(MTX)、雏裂霉素(MMC)、阿霉素(ADM)、环磷酰胺(CTX)分别由上海旭东海普药业有限公司、上海华跃制药有限公司、Kyowa Hakko Kogyo Co. Ltd、浙江海正药业有限公司、上海华联制药有限公司出品。使用时用生理盐水稀释至 5 倍血液药峰浓度:5－Fu 250μg/ml、MTX 40μg/ml、MMC 10μg/ml、ADM 4μg/ml、CTX 100μg/ml。

1.3 实验细胞

MDA－MB－435S 细胞、MCF－7 细胞由本室常规培养。实验时用含 10%新生牛血清的 RPMI－1640 培养液将细胞浓度调成 1×10^5/ml。

1.4 LAMS 对乳癌细胞 Bcl－2 基因蛋白的影响

取对数生长期实验细胞以每孔 1000μl 置内放盖玻片的 24 孔培养板,一式三份。5% CO_2、37℃ 培养 24h,实验孔分别加 15μl、30μl、45μl LAMS 液。继续培养 24h,取出盖玻片,按 Bcl－2 免疫组化试剂盒操作说明书进行染色、固定。

结果判断 放大 400 倍视野下,按乳癌细胞胞浆中棕黄色颗粒或不规则块状物数量及颜色深度分为强阳性(＋＋＋)、阳性(＋＋)、弱阳性(＋)及阴性(－),分别计数为 3、2、1 及 0 分,求积分指数(积分指数＝阳性细胞百分率×强度计分)。

1.5 LAMS 对乳癌细胞增殖抑制试验

取对数生长期实验细胞以每孔 200μl 接种于 96 培养板,一式三份。37℃、培养 24h。实验孔每孔分别加 LAMS 液 3μl、6μl、9μl、12μl,对照孔加 6μl 生理盐水继续培养 24h,加 5mg/ml MTT 液 20μl,再培养 4h,吸弃上清液 20μl,加 DMSO200μl,震荡 5min,用酶标仪(波长 600nm)测定光密度。

1.6 LAMS 对化疗药物治疗乳癌 IC_{50}剂量的影响

分别取对数生长期实验细胞以每孔 200μl 接种于 96 培养板,一式三份。37℃、培养 24h。LAMS 对照孔每孔分别加 LAMS 液 3μl、6μl。化疗药物对照孔每孔分别加化疗药物 1.25μl、2.5μl、5μl、10μl、15μl、20μl。试验孔为上述化疗药剂量再加 LAMS 3μl,6μl 两组。继续培养 24h,加 5mg/ml MTT 液 20μl,再培养 4h,吸弃上清液 200μl,加 DMSO 200μl;震荡 5min,用酶标仪(波长 600nm)测定光密度。

1.7 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)或均数($\bar{x}$)表示,数据间比较用 t 检验。$P<0.05$ 为差异显著。

2 结 果

2.1 LAMS 对乳癌细胞 Bcl－2 基因蛋白的影响见表 1,由表可见随着 LAMS 浓度增加,Bcl－2 基因蛋白表达降低。

表 1 LAMS 对乳癌细胞 Bcl－2 基因蛋白的影响(积分指数,$\bar{x}\pm s$,$n=3$)

细胞株	对照孔	加 LAMS(μl)		
		15	30	45
MCF－7	95±16	70±11*	41±13**	20±8**
MDA－MB－435S	152±17	131±12	102±15**	38±12**

* 与对照孔比较 $P<0.05$;** 与对照孔比较 $P<0.01$

2.2 LAMS 对乳癌细胞增殖抑制效果见表 2,从表可见 9μl 以上以及 12μlL LAMS 分别对 MCF－7、MDA－MB－435S

作者介绍:董浦江(1953－),男,副主任技师,主要研究方向:肿瘤免疫。

维普资讯 http://www.cqvip.com

乳癌细胞有抑制作用。

2.3 LAMS 对化疗药物治疗乳癌细胞 IC_{50} 的影响见表 3，从表可知 LAMS 能降低化疗药物治疗乳癌细胞的 IC_{50}，降低的程度与 LAMS 浓度成正比。尤其对 5－Fu、MTX 作用显著。

表 2 LAMS 对乳癌细胞增殖抑制效果($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

	加 LAMS(μl)				对照
	3	6	9	12	
MCF－7	85±12	81±12	65±11*	52±14**	82±11
MDA－MB－435S	81±13	82±12	80±13	66±13*	87±15

* 与对照比较 $P<0.05$ ** 与对照比较 $P<0.01$

表 3 LAMS 对化疗药物治疗乳癌细胞 IC_{50} 剂量(μl)影响(x, $n=3$)

	MCF－7			MDA－MB－435S		
	化疗药对照	加 3μl LAMS	加 6μl LAMS	化疗药对照	加 3μl LAMS	加 6μl LAMS
5－FU	15	5**	1.25**	20	7.5**	2.5**
MTX	15	5**	2.5**	20	10*	5**
MMC	10	5*	2.5**	15	10*	5**
ADM	5	2.5	1.25*	10	7.5	5*
CTX	10	7.5	5*	15	10	5**

* 与对照比较 $P<0.05$, ** 与对照比较 $P<0.01$

3 讨 论

由 Bcl－2 基因蛋白介导的耐药性与药物积累有关的 MDR_1 基因表达无关，它是通过抑制 Caspase 激酶的联级活化和 PAR 降解及其它凋亡特性导致肿瘤细胞对 PCD 耐受，从而使其耐受化疗药物。应用某种药物使 PCD 抑制蛋白表达降低，同时以远低于常用剂量的化疗药杀伤肿瘤细胞，是提高肿瘤化疗效果的又一新途径[3]。

近年发观 LAMS 具有多种生物功能，是良好的免疫激活剂[4]，能抑制碱性性成纤维细胞生长因子附着及其依赖性细胞增殖和抗某些肿瘤的作用[5]。作者以不致使乳癌细胞增殖抑制剂量的 LAMS 进行实验，结果表明 LAMS 可下调乳癌细胞 Bcl－2 蛋白的表达，并可降低 5－Fu、MTX、MMC、ADM、CTX 的有效治疗剂量，尤其对 5－Fu、MTX 作用显著，这与文献[1]报道降低 Bcl－2 基因蛋白表达尤其可增强肿瘤细胞对细胞毒化疗药物敏感性相符。

参 考 文 献

[1] 邱莲女. Bcl－2 与肿瘤关系的研究进展[J]. 国外医学，临床生化与检验，2000;21(4):196－198.

[2] 范曼芳，陈琼华. 褐藻淀粉和褐藻淀粉硫酸酯的制取、分析及生物活性比较[J]. 中国药科大学学报，1988;19(1):30－34.

[3] 曹世龙. 肿瘤学新理论与新技术[M]. 1997;4－11.

[4] 董浦江，姚榛祥. LAMS 拮抗肝癌细胞分泌物对 T 细胞转化的影响[J]. 中华肝胆外科杂志，2002;8(5):309－310.

[5] Hoffman R, Paper DH, Donaldson J. Inhibition of angiogenesis and murine tumour growth by laminarin sulphate[J]. Br J Cancer, 1996;73:1183－1186.

(上接第 397 页)

参 考 文 献

[1] Cheng TO, Doctor Y K. Wu: Father of cardiothoracic surgery in China[J]. Ann Thorac Surg, 1999;68:1439－1440.

[1] Favaloro RG. Saphenous vein auto－grafts replacement of severe segmental coronary artery occlusion: operative technique [J]. Ann Thorac Surg, 1968;5(4):334－339.

[2] Sharma GVRK, Deupree RH, Khuri SF, et al. Coronary bypass surgery improves survival in high－risk unstable angina [J]. Circulation, 1991;84(Suppl Ⅲ): Ⅲ260－267.

[3] 吴清玉，胡盛寿，许建屏，等. 1110 例冠状动脉搭桥术早期结果[J]. 中华外科杂志，1999;37(11):666－668.

[4] Reardon MJ, Conklin LD, Rearden PR, et al. Coronary artery bypass conduits: review of current status[J]. J Cardiovasc Surg, 1997;38(3):201－209.

[5] Loop FD, Lytle BW, Losgrore DM, et al. Influence of the internal mammary artery graft on 10－year survival and other cardiac events[J]. N Eng J Med, 1986;314:1－6.

[6] Lichtenstein SV, Ashe KA, Dalati HE, et al. Warm heart surgery[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1991;10(2):269－274.

[7] 胡亚兰. 冠状动脉旁路移植术后低氧血症相关因素分析[J]. 郑州大学学报·医学版，2003;38(3):428－430.