

恩度联合紫杉醇对 *Her-2* 过表达乳腺癌细胞的诱导凋亡研究

Endostar and Paclitaxel Combination Induced Apoptosis in Breast Cancer Cells with *Her-2* Overexpression
SHEN Wei-xi, ZHAO Yan, YAN Yu, et al.

申维喜¹, 赵妍¹, 闫玉², 姜秋颖¹

(1. 哈尔滨医科大学附属二院, 黑龙江 哈尔滨 150081;

2. 齐齐哈尔市第一医院, 黑龙江 哈尔滨 161000)

摘要: [目的] 观察恩度、紫杉醇对 *Her-2* 过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的诱导凋亡作用。[方法] 免疫组化法检测乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的 *Her-2* 表达水平, 用流式细胞仪检测细胞凋亡率, 比较恩度、紫杉醇单独及联合作用于 MDA-MB-453 细胞 24, 48h 的细胞凋亡率。[结果] MDA-MB-453 细胞 *Her-2* 表达率 95% 可信区间为 63.32%~69.60%; 恩度与紫杉醇对 MDA-MB-453 细胞均有诱导凋亡作用, 并成剂量依赖关系, 其中以恩度 50 μ g/ml 联合紫杉醇 50 nmol/L 作用 48h 组凋亡率最高。[结论] 体外环境下恩度、紫杉醇均可诱导 *Her-2* 过表达乳腺癌细胞凋亡, 且呈剂量依赖关系, 两药联合时凋亡作用增强。

关键词: 恩度; 紫杉醇; 乳腺癌; *Her-2*; 凋亡

中图分类号: R737.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1671-170X(2012)11-0844-04

乳腺癌是危害女性健康的常见恶性肿瘤, 其发病率占妇女肿瘤的 31%, 其中有 10%~34% 属于 *Her-2* 基因过表达型乳腺癌。目前, 紫杉醇已成为治疗乳腺癌的有效药物之一。研究证明, 乳腺癌细胞中 *Her-2* 基因的过度表达降低了其对紫杉醇的敏感性^[1,2]。YH-16(恩度)为血管生成抑制剂类生物制品, 其作用机制是抑制肿瘤新生血管的生成, 阻断肿瘤的营养供给, 从而抑制肿瘤增殖或转移。目前已证实恩度在体外也可抑制肿瘤细胞如白血病细胞 HL-60、肝癌细胞 HepG2 的增殖^[3,4]。本研究以恩度和紫杉醇单独及联合作用于 *Her-2* 过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-453, 通过检测其诱导凋亡率, 判断恩度对紫杉醇诱导 *Her-2* 过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的影响, 初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂

恩度为烟台麦得津生物工程股份有限公司产

通讯作者: 姜秋颖, 主任医师, 硕士生导师, 硕士; 哈尔滨医科大学附属二院肿瘤内科, 黑龙江省哈尔滨市学府路 246 号 (150081); E-mail: jiangqiuying@medmail.com。

收稿日期: 2012-04-11; **修回日期:** 2012-09-30

品; 紫杉醇为百时贵施贵宝公司产品; 鼠抗人 *Her-2* 单抗、SP 检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒均购自北京中杉金桥生物技术有限公司; Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒购自北京宝赛生物技术有限公司。

1.2 仪器

光学显微镜及流式细胞仪由哈尔滨医科大学附属第二医院实验室提供。

1.3 细胞与细胞培养

人乳腺癌 MDA-MB-453 细胞株购自中国科学院上海生命科学研究院; 优级胎牛血清为杭州四季青公司产品; RPMI 1640 培养基为北京赛默飞世尔生化制品有限公司产品。MDA-MB-453 细胞以含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的条件下培养。

1.4 免疫细胞化学法检测 MDA-MB-453 细胞株 *Her-2* 蛋白的表达

取对数生长期 MDA-MB-453 乳腺癌细胞株于离心管中, 1 000r/min 离心 5min, 弃上清液, 加中性甲醛固定 (甲醛与细胞量之比为 7:1) 后制备成石蜡切片, 共制备 5 张切片, 按照 *Her-2* 染色试剂盒操作步骤检测表达率。

1.5 细胞生长情况观察

取对数生长期 MDA-MB-453 乳腺癌细胞 1 瓶, 用 RPMI 1640 和 10%FS 培养液充分吹打使细胞混匀, 细胞计数为 6×10^6 个/ml, 于 1 000r/min 离心 5min 后去上清液, 加培养液 2ml, 吸管充分吹打使细胞混匀, 平均分配到 5 个培养瓶中培养, 分别标记空白组、25 μ g/ml 恩度组、50 μ g/ml 恩度组、50nmol/L 及 100nmol/L 紫杉醇组。每瓶加 RPMI 1640+10%FS 培养液共 3ml。除空白组外, 其他 4 瓶分别加恩度、紫杉醇, 使其终浓度分别为 25 μ g/ml、50 μ g/ml、50nmol/L 及 100nmol/L。于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的条件下培养 24h, 光学显微镜下观察空白组、恩度组及紫杉醇组细胞的生长情况。

1.6 单药作用细胞凋亡率检测

取对数生长期 MDA-MB-453 细胞, 用 RPMI 1640 和 10%FS 培养液充分吹打使细胞混匀, 细胞计数为 6×10^6 个/ml, 于 1 000r/min 离心 5min 后去上清液, 各加 1ml PBS 充分吹打使细胞混匀后, 吸出移至 2 个 EP 管中并分别标记为 0 和 1, PBS 再次冲洗离心 2 次。恩度组除所用培养液为不同浓度的恩度 (25 μ g/ml 和 50 μ g/ml)+RPMI 1640+10%FS 外, 紫杉醇组所用培养液为不同浓度的紫杉醇 (50nmol/L 和 100nmol/L)+RPMI 1640+10%FS, 其他操作同上。以上步骤每组均重复 3 次。

1.7 恩度联合紫杉醇作用于 MDA-MB-453 细胞株的凋亡率检测

恩度联合紫杉醇作用于 MDA-MB-453 细胞, 共 8 组, 第 1 组: 恩度 25 μ g/ml, 紫杉醇 50nmol/L, 作用时间 24h; 第 2 组: 恩度 25 μ g/ml, 紫杉醇 50nmol/L, 作用时间 48h; 第 3 组: 恩度 25 μ g/ml, 紫杉醇 100nmol/L, 作用时间 24h; 第 4 组: 恩度 25 μ g/ml, 紫杉醇 100nmol/L, 作用时间 48h; 第 5 组: 恩度 50 μ g/ml, 紫杉醇 50nmol/L, 作用时间 24h; 第 6 组: 恩度 50 μ g/ml, 紫杉醇 50nmol/L, 作用时间 48h; 第 7 组: 恩度 50 μ g/ml, 紫杉醇 100nmol/L, 作用时间 24h; 第 8 组: 恩度 50 μ g/ml, 紫杉醇 100nmol/L, 作用时间 48h; 各组药物分别作用于 MDA-MB-453 细胞, 参照 Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡, 计算凋亡指数。

1.8 统计学分析

采用 SPSS 10.0 软件进行统计学分析, 重复测量分析影响因素。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫组化检测乳腺癌细胞 MDA-MB-453 的 Her-2 表达水平

5 张切片 Her-2 表达率分别为 65.30%、68.67%、63.64%、65.12%、69.57%, 其 95% 可信区间为 (63.32%~69.60%), 进一步验证了 MDA-MB-453 细胞为 Her-2 过表达乳腺癌细胞, 见图 1。

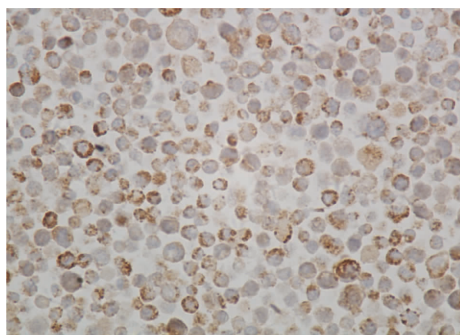


图 1 MDA-MB-453 细胞 Her-2 蛋白表达水平 (×400)

2.2 细胞生长情况观察

2.2.1 MDA-MB-453 细胞的生长情况

MDA-MB-453 细胞以含 10%胎牛血清的 RPMI 1640 培养基于 37℃、CO₂ 体积分数为 5% 的条件下培养 24h 后, 细胞生长旺盛, 多形成细胞团 (图 2)。

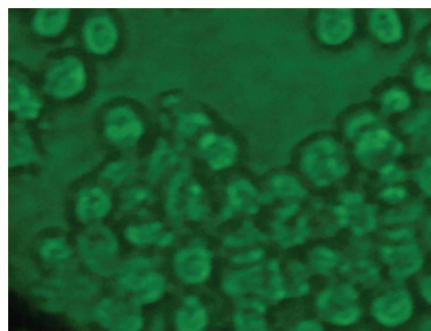


图 2 空白组 MDA-MB-453 细胞培养 24h 后的生长情况

2.2.2 恩度作用于 MDA-MB-453 细胞后的细胞生长情况

25 μ g/ml 的恩度作用于 MDA-MB-453 细胞 24h 后, 肿瘤细胞数目减少, 随着恩度浓度的增加, 乳腺

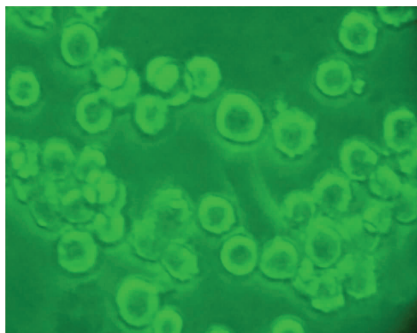


图 3 25μg/ml 恩度作用于 MDA-MB-453 细胞 24h 后的生长情况

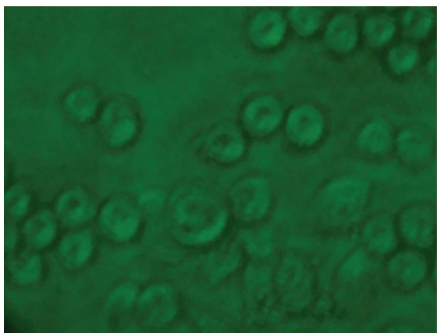


图 4 50μg/ml 恩度作用于 MDA-MB-453 细胞 24h 后的生长情况

癌细胞生长减慢,细胞数目明显减少(图 3、4)。

2.3 恩度、紫杉醇单独及联合作用于 MDA-MB-453 细胞的凋亡率

恩度和紫杉醇单独及联合作用于 MDA-MB-453 细胞的凋亡率均呈时间剂量关系($P<0.05$)。其中,以恩度 50μg/ml 联合紫杉醇 50nmol/L 作用 48h 组的凋亡率最高,见表 1。

表 1 两种药物单独及联合对乳腺癌细胞的凋亡率(%)

恩度 (μg/ml)	紫杉醇 (nmol/L)	作用时间	
		24(h)	48(h)
0	0	1.02	4.30
0	50	15.30	17.90
0	100	23.50	29.30
25	0	17.98	43.57
25	50	20.71	77.54
25	100	29.33	42.03
50	0	59.83	47.69
50	50	15.84	81.44
50	100	15.17	39.69

3 讨 论

紫杉醇是治疗乳腺癌的有效药物之一,其机制主要是促进微管聚合和稳定已聚合微管,将细胞阻滞于 G₂/M 期,抑制肿瘤细胞的迁移,激活免疫细胞等对乳腺癌细胞进行杀伤^[5,6]。紫杉醇稳定微管,破坏纺锤体形成,染色体稳定性下降导致细胞凋亡^[7-9]。约有 30% 的乳腺癌患者 Her-2 基因过表达,研究表明其对化疗药物存在明显耐药,常导致化疗失败^[10]。许多临床研究对 Her-2 和乳腺癌预后之间的研究表

明,Her-2 阳性乳腺癌病情进展迅速,局部复发危险性高,化疗缓解期短,无病生存期和总生存期缩短。为了提高紫杉醇的疗效,可以寻找一些紫杉醇化疗增敏的途径。

恩度为血管抑制素类新生物制品,其抗肿瘤作用的机制主要是抑制肿瘤新生血管及淋巴管,阻断肿瘤的营养供给而抑制肿瘤生长^[11,12]。目前有报道,恩度可增强放疗对肺癌、鼻咽癌的杀伤作用^[13-17]。研究也已证实,其对肿瘤细胞本身如白血病细胞、肝癌细胞的生长也有抑制作用。

本实验用免疫组化法验证了 MDA-MB-453 乳腺癌细胞为 Her-2 基因过表达乳腺癌细胞,以 50nmol/L 和 100nmol/L 的紫杉醇作用于 MDA-MB-453 细胞 24、48h 后的诱导凋亡率分别为 15.3% 和 17.9%,23.5% 和 29.3%。以 25μg/ml 和 50μg/ml 的恩度作用于 MDA-MB-453 细胞 24、48h 后的凋亡率分别为 17.98% 和 43.57%,59.83% 和 47.69%。说明紫杉醇、恩度对 Her-2 过表达乳腺癌细胞 MDA-MB-453 均有诱导凋亡作用,且这种作用成浓度依赖关系。本实验再以两药联合作用于 MDA-MB-453 细胞,结果表明两药联合的诱导凋亡率高于单药。随着对抗血管生成药恩度的深入研究,其有望成为紫杉醇化疗药物发挥疗效的增敏剂,进一步提高 Her-2 阳性乳腺癌的疗效。

凋亡为细胞内基因调控的程序性死亡,多种因素造成的凋亡基因的启动可以造成细胞凋亡。紫杉醇可激活核蛋白激酶 C-δ(PKC-δ),引发高尔基体-Cdk1 的活化,并上调高尔基体相关的 DR5,激活 caspase-8 和 caspase-3,从而激活高尔基体介导的、

线粒体参与的细胞凋亡途径^[18]。哌立福新(perifosine)与紫杉醇联合治疗的机制探讨中发现,两者联合应用能抑制 mTORC1,并能增加神经鞘氨醇和活性氧的含量,激活凋亡前信号转导途径,在多通路作用下导致细胞凋亡^[19]。紫杉醇还可通过 Raf-1 激酶依赖的信号途径诱发自体吞噬泡的形成,诱导细胞凋亡^[20]。有研究表明血管内皮抑素介导细胞凋亡与多个信号通路有关,包括调节 p53 和 Bcl-2 的表达。减弱 PI3K/蛋白激酶 B 信号通路的抗凋亡作用^[21],上调电压依赖阴离子通道蛋白 1(VDAC1)的表达水平,使线粒体通透性增高,细胞色素 C 的释放及 caspase-9 活化,从而激活凋亡程序^[22],启动内皮细胞的自我吞噬死亡程序^[23]。细胞内凋亡基因的启动,凋亡过程的进行,会受到细胞内外多种信号分子的干预,存在十分复杂的网状的信息通路,线粒体途径在两者的凋亡机制中均存在。启动不同的凋亡路径,影响不同的信号通路可能增强凋亡的因素,给予临床用药以理论参考。但阐明具体机制还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] Lu J, Tan M, Huang WC, et al. Mitotic deregulation by survivin in ErbB2-overexpressing breast cancer cells contributes to taxol resistance [J]. Clin Cancer Res, 2009, 15(4):1326-1334.
- [2] Wang S, Huang X, Lee CK, et al. Elevated expression of erbB3 confers paclitaxel resistance in erbB2- overexpressing breast cancer cells via upregulation of survivin [J]. Oncogene, 2010, 29(29):4225-4236.
- [3] 冯茹, 黄晓军. 重组人血管内皮抑素抗白血病使用的初步研究[J]. 中华血液学杂志, 2010, 31(7):461-465.
- [4] Wu G, Zhang R, Ren J, et al. Autophagic cell death of human hepatoma cells induced by endostar, a recombinant human endostatin [J]. Cancer Biother Radiopharm, 2008, 23(6):735-740.
- [5] Jordan MA, Wilson L. Microtubules as a target for anti-cancer drugs [J]. Nat Rev Cancer, 2004, 4(4):253-265.
- [6] Gligorov J, Lotz JP. Preclinical pharmacology of the taxanes: implications of the differences [J]. Oncologist, 2004, 9(Suppl 2):3-8.
- [7] Park JE, Woo SR, Kang CM, et al. Paclitaxel stimulates chromosomal fusion and instability in cells with dysfunctional telomeres: implication in multinucleation and chemosensitization [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2011, 404(2):615-621.
- [8] Demidenko ZN, Kalurupalle S, Hanko C, et al. Mechanism of G₁-like arrest by low concentrations of paclitaxel: next cell cycle p53-dependent arrest with sub G₁ DNA content mediated by prolonged mitosis [J]. Oncogene, 2008, 27(32):4402-4410.
- [9] Russell P, Hennessy BT, Li J, et al. Cyclin G₁ regulates the outcome of taxane-induced mitotic checkpoint arrest [J]. Oncogene, 2012, 31(19):2450-2460.
- [10] Menard S, Pupa SM, Campiglio M, et al. Biologic and therapeutic role of HER2 in cancer [J]. Oncogene, 2003, 22(42):6570-6578.
- [11] Li XQ, Shang BY, Wang DC, et al. Endostar, a modified recombinant human endostatin, exhibits synergistic effects with dexamethasone on angiogenesis and hepatoma growth [J]. Cancer Lett, 2011, 301(2):212-220.
- [12] Dong X, Zhao X, Xiao T, et al. Endostar, a recombinant humanized endostatin, inhibits lymphangiogenesis and lymphatic metastasis of Lewis lung carcinoma xenograft in mice [J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2011, 59(3):133-136.
- [13] Zhou N, Hu G, Mei Q, et al. Inhibitory effect of endostar in combination with radiotherapy in a mouse model of human CNE2 nasopharyngeal carcinoma [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2011, 31(1):62-66.
- [14] Wen QL, Meng MB, Yang B, et al. Endostar, a recombinant humanized endostatin, enhances the radioresponse for human nasopharyngeal carcinoma and human lung adenocarcinoma xenografts in mice [J]. Cancer Sci, 2009, 100(8):1510-1519.
- [15] Wu H, Deng J, Yu S, et al. The inhibitory effects of rh-endostatin (YH-16) in combination with radiotherapy on lung adenocarcinoma A549 in mice and the underlying mechanisms [J]. J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci, 2010, 30(1):108-112.
- [16] Zhang L, Ge W, Hu K, et al. Endostar down-regulates HIF-1 and VEGF expression and enhances the radioresponse to human lung adenocarcinoma cancer cells [J]. Mol Biol Rep, 2012, 39(1):89-95.
- [17] You ZY, Zhao Y, Liu F, et al. The radiosensitization effects of Endostar on human lung squamous cancer cells H-520 [J]. Cancer Cell Int, 2010, 10:17.
- [18] Lu PH, Yu CC, Chiang PC, et al. Paclitaxel induces apoptosis through activation of nuclear protein kinase C- δ and subsequent activation of golgi associated cdk1 in human hormone refractory prostate cancer [J]. J Urol, 2011, 186(6):2434-2441.
- [19] Sun H, Yu T, Li J. Co-administration of perifosine with paclitaxel synergistically induces apoptosis in ovarian cancer cells: more than just AKT inhibition [J]. Cancer Lett, 2011, 310(1):118-128.
- [20] Eum KH, Lee M. Crosstalk between autophagy and apoptosis in the regulation of paclitaxel-induced cell death in v-Ha-ras-transformed fibroblasts [J]. Mol Cell Biochem, 2011, 348(1-2):61-68.
- [21] Kang HY, Shim D, Kang SS, et al. Protein kinase B inhibits endostatin-induced apoptosis in HUVECs [J]. J Biochem Mol Biol, 2006, 39(1):97-104.
- [22] Yuan S, Fu Y, Wang X, et al. Voltage-dependent anion channel 1 is involved in endostatin-induced endothelial cell apoptosis [J]. FASEB J, 2008, 22(8):2809-2820.
- [23] Ramakrishnan S, Nguyen TM, Subramanian IV, et al. Autophagy and angiogenesis inhibition [J]. Autophagy, 2007, 3(5):512-515.