



doi:10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.009
http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract4097.shtml

· 基础研究 ·

肾上腺素受体在乳腺癌细胞中的表达及其对细胞增殖的影响

高德宗¹, 刘兴莉², 马忠兵¹

(1. 山东大学第二医院 乳腺外科, 山东 济南 250033; 2. 山东大学齐鲁儿童医院, 检验科, 山东 济南 250022)

摘要

目的: 探讨肾上腺素受体在乳腺癌细胞中的表达以及将其阻断后对乳腺癌细胞增殖的变化。

方法: 用免疫细胞化学方法分别检测乳腺癌 MCF-7 (ER 阳性) 和 MDA-MB-231 (ER 阴性) 细胞中 α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 肾上腺素受体的表达; MTT 法分别检测去甲肾上腺素、卡维地洛 (非特异性肾上腺素受体阻断剂) 或两种联合作用后两种乳腺癌细胞的增殖情况。

结果: MCF-7 和 MDA-MB-231 细胞均有 α 与 β 肾上腺素受体表达, 但受体亚型表达水平不同, MCF-7 细胞 α_1 、 β_1 受体表达相对较强, α_2 、 β_2 受体表达相对较弱, MDA-MB-231 细胞则与 MCF-7 相反; 卡维地洛能明显抑制两株乳腺癌细胞增殖, 并呈一定的时间与浓度依赖趋势, 部分差异有统计学意义 (均 $P < 0.05$); 去甲肾上腺素能明显促进两种乳腺癌细胞的增殖, 但与卡维地洛共同作用后, 其促细胞增殖作用被明显拮抗, 并呈浓度依赖性, 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$)。

结论: 乳腺癌细胞同时不同程度地表达 α 、 β 肾上腺素受体亚型, 非特异性阻断肾上腺素受体可有效抑制乳腺癌细胞的增殖。
[中国普通外科杂志, 2014, 23(11):1501-1505]

关键词

乳腺肿瘤; 受体, 肾上腺素能; 细胞增殖
中图分类号: R737.9

Expression of adrenergic receptors in breast cancer cells and their influence on cell proliferation

GAO Dezong¹, LIU Xingli², MA Zhongbing¹

(1. Department of Breast Surgery, the Second Hospital, Shandong University, Ji'nan 250033, China; 2. Department of Clinical Laboratory, Qilu Children Hospital, Shandong University, Ji'nan 250022, China)

Corresponding author: GAO Dezong, Email: gaohill100@yeah.net

ABSTRACT

Objective: To investigate the expression of adrenergic receptors in breast cancer cells and changes in breast cancer cell proliferation after their blockage.

Methods: The expressions of adrenergic α_1 -, α_2 -, β_1 - and β_2 -receptor in breast cancer MCF-7 (ER-positive) and MDA-MB-231 (ER-negative) cells were examined by immunocytochemical staining. The proliferation of the two types of breast cancer cells was analyzed by MTT assay after they were exposed to norepinephrine and carvedilol (non-selective blocker of adrenergic receptors) alone, or in combination, respectively.

基金项目: 山东大学自主创新基金资助项目 (2012TS185)。

收稿日期: 2014-05-22; 修订日期: 2014-09-05。

作者简介: 高德宗, 山东大学第二医院主治医师, 主要从事乳腺癌基础与临床方面的研究。

通信作者: 高德宗, Email: gaohill100@yeah.net

Results: The MCF-7 and MDA-MB-231 cells both expressed the adrenergic α - and β -receptor, but the expression levels of the adrenergic-receptor subgroups were different between them. The α_1 - and β_1 -receptor showed a relatively strong expression while α_2 - and β_2 -receptor showed a relatively weak expression in MCF-7 cells, but there was an opposite pattern of expression in MDA-MB-231 cells. The proliferation of both types of breast cancer cells was significantly inhibited by carvedilol treatment, with a certain time- and concentration dependent trend toward higher inhibition, and some of the differences had statistical significance (all $P < 0.05$); the proliferation of both types of breast cancer cells were significantly increased after norepinephrine treatment, which was concentration-dependently antagonized by carvedilol co-treatment, and all the differences reached statistical significance (all $P < 0.05$).

Conclusion: Both adrenergic α - and β -receptor are present in breast cancer cells with varying levels of expression, and non-selective blockage of adrenergic receptors can effectively suppress the proliferation of breast cancer cells.

[Chinese Journal of General Surgery, 2014, 23(11):1501-1505]

KEYWORDS Breast Neoplasms; Receptors, Adrenergic; Cell Proliferation

CLC number: R737.9

神经内分泌递质对于乳腺癌的发生、发展具有重要作用。长期压抑、沮丧等不良情绪会导致交感神经系统功能紊乱，神经内分泌递质分泌失调，特别是去甲肾上腺素异常分泌，过多的 NE 会促进乳腺癌细胞增殖和转移^[1-3]。本研究旨在检测乳腺癌细胞 α 、 β 肾上腺素受体表达状况，探讨非选择性肾上腺素受体阻断剂卡维地洛对乳腺癌细胞增殖的影响。

1 材料与方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 由山东大学医学院肿瘤中心实验室提供；高糖 DMEM 培养基及小牛血清购自美国 Gibco 公司；去甲肾上腺素及卡维地洛购自美国 Sigma 公司；免疫组织化学 SP 试剂盒及 DAB 试剂盒购自北京中杉金桥生物技术公司； α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 肾上腺素受体兔多克隆免疫球蛋白购自英国 Gibco 公司。

1.2 细胞培养和实验分组

人乳腺癌细胞株 MCF-7 和 MDA-MB-231 用含 10% 小牛血清的高糖 DMEM 培养基在 37 °C，5% CO₂ 的培养箱中培养。取对数生长期细胞经胰酶消化后制成细胞密度为 5×10^5 个/mL 细胞悬液，将其接种于细胞培养板，待细胞贴壁后，弃去培养基，分别加入浓度为 10 $\mu\text{mol/L}$ 去甲肾上腺素和 / 或 0.1、0.5、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ 卡维地洛的高糖

DMEM 培养基，分别干预 24、48、72 h 后用于后序实验。每孔设 3 个复孔，实验重复 3 次。

1.3 肾上腺素受体的表达及定位检测

采用 SABC 染色法进行检测，病理切片先预处理，具体操作按说明书进行，PBS 代替一抗作阴性对照。取 $1 \times 10^5/\text{mL}$ 的细胞悬液接种于预置盖玻片（经多聚赖氨酸处理）的 6 孔细胞培养板上，2 mL/孔，培养 4~36 h 后，将 6 孔板中长满细胞的盖玻片取出，经 100% 4 °C 丙酮固定 10 min，然后用 SABC 染色法检测 α_1 、 α_2 、 β_1 、 β_2 肾上腺素受体的表达情况。当细胞膜及基底膜上呈棕黄色染色时为阳性染色，采用二级计分法计数阳性细胞。在装有目镜网格测微尺的光学显微镜 200 倍视野下随机选择 5 个视野，每个视野计数 100 个细胞，总共计数 500 个细胞，根据阳性细胞比例及阳性着色强度，按 Shimizu 等^[4]采用的评分标准进行：阳性细胞数 $< 5\%$ ，5%~24%，25%~50%，51%~74% 及 $\geq 75\%$ ，分别判定为 0、1、2、3、4 分。每张切片阳性细胞的着色强度按无着色、淡黄色、棕黄色和棕褐色分别判定为 0、1、2、3 分。根据两项积分之和判定结果，0~1 分为阴性（-），2 分为弱阳性（±），3 分为阳性（+），4~5 分为中等阳性（++），6~7 分为强阳性（+++）。

1.4 采用 MTT 比色分析法测定细胞生长抑制率

两株乳腺癌细胞中分别加 10 $\mu\text{mol/L}$ 去甲肾上腺素和 / 或卡维地洛（0.1、0.5、1.0、5.0 $\mu\text{mol/L}$ ），

不加药物的乳腺癌细胞作为对照组, 检测作用 24、48、72 h 后各组细胞平均吸光度 A 值。细胞生长抑制率 (%) = (1 - 药物组平均吸光度 A 值 / 对照组平均吸光度 A 值) × 100%。

1.5 统计学处理

应用 SPSS 13.0 统计软件进行分析, 数据以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 均数比较采用方差分析与 *q* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 两种乳腺癌细胞肾上腺素受体表达情况

MCF-7 细胞和 MDA-MB-231 细胞都表达 α 、 β 受体, 受体表达于乳腺癌细胞浆及细胞膜, 阳性细胞呈棕黄色, 背底不着色, 阴性对照不着色。但受体表达强度不同, 其中 MCF-7 细胞 α_1 、 β_1 受体表达较强 (图 1A、C), α_2 、 β_2 受体表达相对较弱。MDA-MB-231 细胞与 MCF-7 相反, α_2 、 β_2 受体表达较强 (图 1B、D), α_1 、 β_1 受体表达较弱。

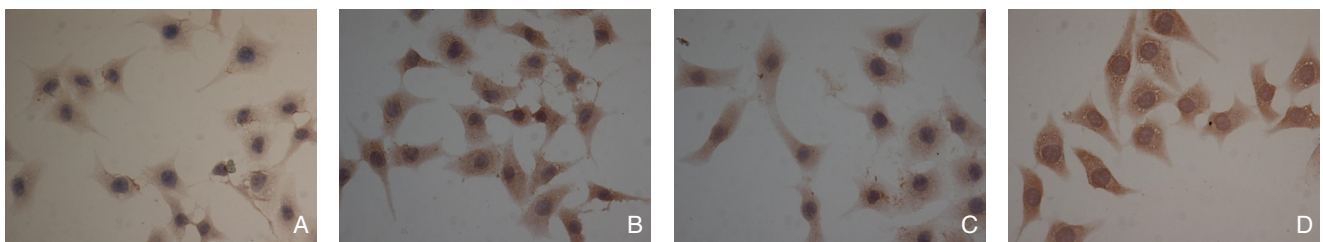


图 1 免疫细胞化学法检测两种乳腺癌细胞肾上腺素受体表达 ($\times 100$) A: MCF-7 细胞 α_1 受体表达; B: MDA-MB-231 细胞 α_2 受体表达; C: MCF-7 细胞 β_1 受体表达; D: MDA-MB-231 细胞 β_2 受体表达

Figure 1 Immunocytochemical staining for measurement of the expression of adrenergic receptors in the two types of breast cancer cells ($\times 100$) A: Adrenergic α_1 -receptor in MCF-7 cells; B Adrenergic α_2 -receptor in MDA-MB-231 cells; C: Adrenergic β_1 -receptor in MCF-7 cells; D: Adrenergic β_2 -receptor in MDA-MB-231 cells

2.2 卡维地洛对 MCF-7 乳腺癌细胞增殖的抑制作用

对 MCF-7 细胞, 不同浓度的卡维地洛作用 24 h 对细胞生长抑制率无差异 ($P > 0.05$), 但作用 48 h 有明显细胞增殖抑制作用, 而且有浓度依赖性 ($P < 0.05$), 浓度为 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 时, 卡维地洛对 MCF-7 细胞的抑制率为 13.60%, $5.0 \mu\text{mol/L}$ 时抑制率达 37.25%。尽管作用 72 h 后卡维地洛对 MCF-7 细胞生长仍有抑制, 且有浓度依赖性 ($P < 0.05$), 但较卡维地洛作用 48 h 的抑制率未见进一步加强 (表 1)。

2.3 卡维地洛对 MDA-MB-231 乳腺癌细胞增殖的抑制作用

与 MCF-7 乳腺癌细胞相比, 卡维地洛作用 24 h 就能明显抑制 MDA-MB-231 细胞生长 ($P < 0.05$), $0.1 \mu\text{mol/L}$ 卡维地洛作用 24 h 对 MDA-MB-231 细胞生长抑制率为 10.90%, $5.0 \mu\text{mol/L}$ 抑制率

为 30.37%, 有浓度依赖性。卡维地洛对 MDA-MB-231 细胞生长抑制作用也具有时间依赖性 ($P < 0.05$), 各不同浓度药物对 MDA-MB-231 细胞抑制作用在 72 h 时最强 (表 2)。

表 1 不同作用时间、不同浓度卡维地洛对 MCF-7 细胞生长抑制率 (%)

Table 1 Rates of growth inhibition of MCF-7 cells after exposure to different concentration carvedilol for different times (%)

卡维地洛 ($\mu\text{mol/L}$)	作用时间 (h)		
	24	48	72
0.1	2.42 ± 0.23	$13.60 \pm 2.27^{1)}$	$12.24 \pm 2.32^{1)}$
0.5	2.15 ± 0.45	$22.47 \pm 2.84^{1), 2)}$	$17.71 \pm 2.80^{1), 2)}$
1.0	2.83 ± 0.51	$28.82 \pm 3.01^{1), 2)}$	$27.82 \pm 2.91^{1), 2)}$
5.0	3.24 ± 0.37	$37.25 \pm 3.84^{1), 2)}$	$40.76 \pm 3.72^{1), 2)}$

注: 1) 与 24 h 同一浓度组比较, $P < 0.05$; 2) 与同一时间点 $0.1 \mu\text{mol/L}$ 组对比, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. the same concentration group at 24 h; 2) $P < 0.05$ vs. $0.1 \mu\text{mol/L}$ group at the same time point

表 2 不同作用时间、不同浓度卡维地洛对 MDA-MB-231 细胞生长抑制率 (%)

Table 2 Rates of growth inhibition of MDA-MB-231 cells after exposure to different concentration carvedilol for different times (%)

卡维地洛 ($\mu\text{mol/L}$)	作用时间 (h)		
	24	48	72
0.1	10.90 ± 2.03	$18.93 \pm 2.44^{1)}$	$27.62 \pm 3.79^{1)}$
0.5	14.52 ± 2.38	$22.41 \pm 3.64^{1)}$	$33.81 \pm 4.33^{1)}$
1.0	$21.84 \pm 3.37^{2)}$	$34.45 \pm 4.40^{1),2)}$	$41.63 \pm 3.91^{1),2)}$
5.0	$30.37 \pm 3.76^{2)}$	$46.28 \pm 5.18^{1),2)}$	$57.56 \pm 6.09^{1),2)}$

注: 1) 与 24 h 同一浓度组比较, $P < 0.05$; 2) 与同一时间点 0.1 $\mu\text{mol/L}$ 组对比, $P < 0.05$

Note: 1) $P < 0.05$ vs. the same concentration group at 24 h;

2) $P < 0.05$ vs. 0.1 $\mu\text{mol/L}$ group at the same time point

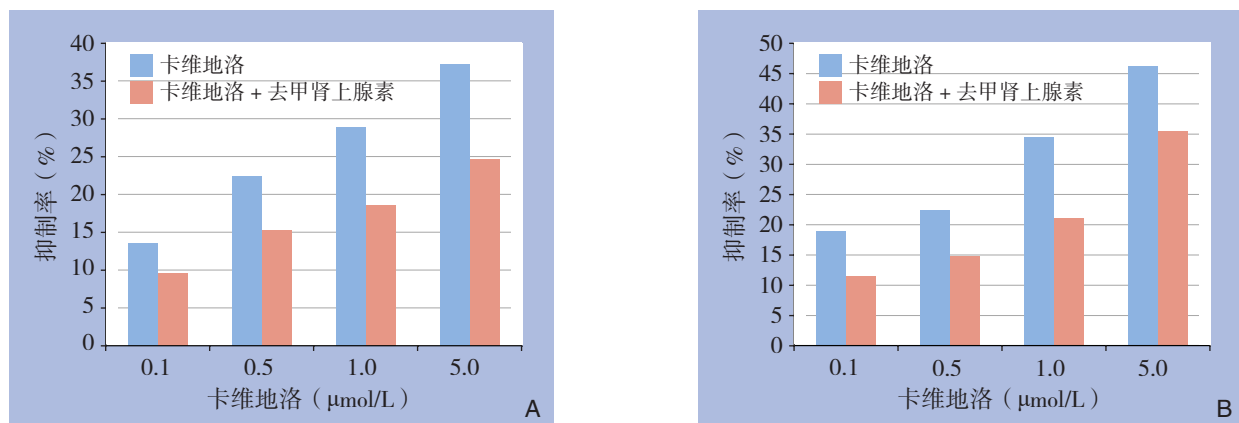


图 2 去甲肾上腺素、卡维地洛单用与联用对乳腺癌细胞增殖的影响 A: MCF-7 细胞; B: MDA-MB-231 细胞

Figure 2 Influence of norepinephrine and carvedilol alone or combination on proliferation of breast cancer cells A: MCF-7 cells; B: MDA-MB-231 cells

3 讨论

近年的研究^[5-7]表明,包括乳腺癌在内的许多肿瘤细胞存在神经递质受体的分布,相应神经递质的异常分泌可影响肿瘤细胞的生长、侵袭和转移,但其作用可被相应的受体拮抗剂所阻断。肿瘤细胞表达肾上腺素受体是应用相应拮抗剂进行治疗的前提^[8-10]。研究表明,乳腺癌细胞表达肾上腺素受体,但各型乳腺癌细胞表达 α 和 β 受体的程度不同。有研究^[11-12]发现ER(+)的MCF-7细胞以 α_2 受体表达为主,而ER(-)的MD-MB-231细胞以 β_2 受体表达为主。但Shi等^[13-14]研究与此相反,他们认为MCF-7细胞以 β_2 受体表达为主,MDA-MB-231细胞以 α_2 受体表达为主。本研究证明,MCF-7和MDA-MB-231乳腺癌细胞都表达 α 、 β 受体,但表达强度各不同。其中MCF-7细胞 α_1 、 β_1 受体表达最强, α_2 、 β_2 受体表达相

2.4 卡维地洛和去甲肾上腺素联合应用对乳腺癌细胞增殖的影响

单独应用去甲肾上腺素(10 $\mu\text{mol/L}$)培养MCF-7和MDA-MB-231细胞48 h,平均吸光度值分别为0.683和0.705,对照组细胞值分别为0.517和0.576,差异有统计学意义(均 $P < 0.05$)。卡维地洛和去甲肾上腺素联合应用时,两株细胞增殖活性较单独应用去甲肾上腺素时降低,但较单独应用卡维地洛时增殖活性升高(均 $P < 0.05$) (图2A-B)。

对较弱。MDA-MB-231细胞与MCF-7相反, α_2 、 β_2 受体表达最强, α_1 、 β_1 表达较弱。本研究结果提示,以往研究结果的不一致恰恰表明各型乳腺癌细胞株都不同程度的表达 α 、 β 受体亚型,可能由于培养条件或检测技术的原因导致各受体亚型在不同的乳腺癌细胞株中表达不一致。

Vázquez等^[11]研究表明,去甲肾上腺素可激活MCF-7乳腺癌细胞肾上腺素受体而促进其增殖, α 受体拮抗剂能阻断去甲肾上腺素对MCF-7细胞的增殖刺激作用,但 β 受体阻滞剂无效。对MDA-MB-231乳腺癌细胞研究表明, β 受体阻滞剂普萘洛尔对其抑制作用较强,而 α 受体阻滞剂无抑制作用^[12]。对鼠乳腺癌细胞系MC4-L5(表达 α_2 受体)的研究也证实, α_2 受体激动剂能够促进MC4-L5细胞生长,其拮抗剂育亨宾和罗芙素抑制肿瘤生长^[15]。甚至肿瘤间质细胞也表达 α_2 受体, α_2 受体激动剂也能够促进肿瘤间质细胞生长^[16]。

以上研究结果表明, 不同类型的乳腺癌细胞 α 、 β 受体亚型表达程度不同, 因此, 特异性受体阻断剂才能发挥阻断效应。对人体而言, 乳腺癌组织是各型乳腺癌细胞的混合体, 即表达 α 受体各亚型也表达 β 受体各亚型。由于各型乳腺癌细胞 α 和 β 受体亚型表达水平不同, 正如以上对不同细胞株研究结果的差异, 特异性肾上腺素受体阻滞剂 (单纯抑制 α 或 β 受体各亚型) 可能难以对所有乳腺癌细胞都发挥作用。

新型非选择性肾上腺素受体阻滞剂卡维地洛, 对 α 和 β 受体都有阻滞作用, 体外实验表明, 卡维地洛能够抑制胶质瘤等细胞增殖, 诱导细胞凋亡^[17-18]。本研究将对 α 和 β 受体都有阻滞作用的卡维地洛用于 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, MTT 法显示卡维地洛对两株细胞增殖都有抑制作用, 但作用模式不同。对于 MCF-7 细胞, 卡维地洛作用 48 h 时抑制作用最强, 进一步延长作用时间, 抑制效果未进一步增强。而对于 MDA-MB-231 细胞则不同, 卡维地洛对其生长抑制作用有时间和浓度依赖性。去甲肾上腺素对两株细胞生长都有促进作用, 而卡维地洛能拮抗去甲肾上腺素的促乳腺癌细胞增殖作用。

卡维地洛目前广泛应用于高血压、心绞痛、心力衰竭等心血管疾病, 具有独特疗效, 本研究将其用于肾上腺素受体亚型表达不同的 MCF-7 和 MDA-MB-231 乳腺癌细胞, 发现其能明显抑制两株细胞的增殖活性, 提示卡维地洛的非选择性可能是其发挥“广谱”抗乳腺癌作用的基础。卡维地洛对乳腺癌细胞抑制作用的机制需进一步研究, 其对细胞侵袭及转移有无效果也有待阐明, 以期为临床应用提供理论依据。

参考文献

- [1] Drell TL 4th, Joseph J, Lang K, et al. Effects of neurotransmitters on the chemokinesis and chemotaxis of MDA-MB-468 human breast carcinoma cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2003, 80(1):63-70.
- [2] Thaker PH, Han LY, Kamat AA, et al. Chronic stress promotes tumor growth and angiogenesis in a mouse model of ovarian carcinoma[J]. *Nat Med*, 2006, 12(8): 939-944.
- [3] Sood AK, Bhatti R, Kamat AA, et al. Stress hormone-mediated invasion of ovarian cancer cells[J]. *Clin Cancer Res*, 2006, 12(2):369-375.
- [4] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H. Immunohistochemical staining of Ha-ras oncogene product in normal, benign, and malignant human pancreatic tissue[J]. *Hum Pathol*, 1990, 21(6): 607-612.
- [5] Schuller HM. Neurotransmission and cancer: implications for prevention and therapy[J]. *Anticancer Drugs*, 2008, 19(7):655-671.
- [6] Zhang D, Ma QY, Hu HT, et al. Beta2-adrenergic antagonists suppress pancreatic cancer cell invasion by inhibiting CREB, NF-kappaB and AP-1[J]. *Cancer Biol Ther*, 2010, 10(1):19-29.
- [7] Zhang D, Ma Q, Shen S, et al. Inhibition of pancreatic cancer cell proliferation by propranolol occurs through apoptosis induction: the study of beta-adrenoceptor antagonist's anticancer effect in pancreatic cancer cell[J]. *Pancreas*, 2009, 38(1): 94-100.
- [8] Schuller HM, Al-Wadei HA. Neurotransmitter receptors as central regulators of pancreatic cancer[J]. *Future Oncol*, 2010, 6(2):221-228.
- [9] McGraw DW, Liggett SB. Molecular mechanisms of β_2 -adrenergic receptor function and regulation[J]. *Proc Am Thorac Soc*, 2005, 2(4):292-296.
- [10] 廖新华, 仇广林, 陈锐, 等. 胃癌细胞中 β 肾上腺素受体与 NF- κ B 通路及其下游侵袭相关因子的关系 [J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(10):1284-1290.
- [11] Vázquez SM, Pignataro O, Luthy IA. Alpha2-adrenergic effect on human breast cancer MCF-7 cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 1999, 55 (1):41-49.
- [12] Madden KS, Szpunar MJ, Brown EB. β -Adrenergic receptors (β -AR) regulate VEGF and IL-6 production by divergent pathways in high β -AR-expressing breast cancer cell lines[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 130(3):747-758.
- [13] Shi M, Liu D, Duan H, et al. The β_2 -adrenergic receptor and Her2 comprise a positive feedback loop in human breast cancer cells[J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2011, 125(2): 351-362.
- [14] Vázquez SM, Mladovan AG, Pérez C, et al. Human breast cell lines exhibit functional alpha2-adrenoceptors[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2006, 58(1):50-61.
- [15] Bruzzone A, Piñero CP, Castillo LF, et al. Alpha2-adrenoceptor action on cell proliferation and mammary tumour growth in mice[J]. *Br J Pharmacol*, 2008, 155(4):494-504.
- [16] Bruzzone A, Piñero CP, Rojas P, et al. α (2)-Adrenoceptors enhance cell proliferation and mammary tumor growth acting through both the stroma and the tumor cells[J]. *Curr Cancer Drug Targets*, 2011, 11(6):763-774.
- [17] Erguven M, Yazihan N, Aktas E, et al. Carvedilol in glioma treatment alone and with imatinib in vitro[J]. *Int J Oncol*, 2010, 36(4):857-866.
- [18] Stanojkovic TP, Zizak Z, Mihailovic-Stanojevic N, et al. Inhibition of proliferation on some neoplastic cell lines-act of carvedilol and captopril[J]. *J Exp Clin Cancer Res*, 2005, 24(3):387-395.

(本文编辑 宋涛)

本文引用格式: 高德宗, 刘兴莉, 马忠兵. 肾上腺素受体在乳腺癌细胞中的表达及其对细胞增殖的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(11):1501-1505. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.009
Cite this article as: GAO DZ, LIU XL, MA ZB. Expression of adrenergic receptors in breast cancer cells and their influence on cell proliferation[J]. *Chin J Gen Surg*, 2014, 23(11):1501-1505. doi: 10.7659/j.issn.1005-6947.2014.11.009