

文章编号:1005-6947(2005)04-0253-04

· 乳腺肿瘤专题研究 ·

维生素 E 琥珀酸酯联合化疗药物对乳腺癌细胞增殖的抑制作用

张军初¹, 张伟¹, 朱大乔², 徐昕昀¹, 张玲珍³, 王强¹

(上海第二军医大学 1. 长征医院 普通外科, 上海 200003; 2. 护理系, 上海 200433; 3. 长征医院 实验科, 上海 200003)

摘要:目的 检测维生素 E 琥珀酸酯(VES)联合化疗药物对乳腺癌细胞增殖的抑制作用,并初步探讨其机制。方法 人乳腺癌细胞 Bcap-37 以 VES 联合化疗药物刺激 24h 和 36h, VES 浓度为 10 μg/mL 和 20 μg/mL, 化疗药 5-FU 和 MMC 及环磷酰胺的浓度分别为 16.9 μg/mL, 33.8 μg/mL; 1 μg/mL, 3.3 μg/mL 及 100 μg/mL, 300 μg/mL, 以 MTT 法测定对细胞增殖的抑制作用,以流式细胞仪分析细胞凋亡率和细胞表面 Fas 表达。结果 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞具有显著的抑制作用。流式细胞仪分析细胞周期, Bcap-37 细胞的自然凋亡率为 0.7%, 20 μg/mL VES 作用 24h 后凋亡率为 19.2%, 5-FU 和丝裂霉素及环磷酰胺 3 种化疗药物作用后的凋亡率分别为 16.2%, 16.7%, 12.3%。VES 与 3 种化疗药物合用后的凋亡率分别为 40.3%, 44.8%, 39.6%。VES 联合化疗药物作用后乳腺癌细胞表面 Fas 表达显著增强。结论 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞具有显著的抑制作用,其机制可能与细胞表面 Fas 表达上调有关。

关键词: 乳腺肿瘤/药物疗法; 维生素 E 琥珀酸酯/治疗应用; 抗肿瘤药, 多剂联用; 细胞凋亡率
中图分类号: R737.9; R979.19 **文献标识码:** A

Growth inhibition of human breast cancer by vitamin E succinate combined with chemotherapeutic drugs

ZHANG Jun-chu¹, ZHANG Wei¹, ZHU Da-qiao², XU Xin-yun¹, ZHANG Ling-zhen³, WANG Qiang¹

(1. Department of General Surgery, Changzheng Hospital, The Second Military University of PLA, Shanghai, 200003, China; 2. Department of Nursing, The Second Military University of PLA, Shanghai, 200433, China; 3. Department of Experimentation, Changzheng Hospital, The Second Military University of PLA, Shanghai, 200003, China.)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of vitamin E succinate (VES) combined with chemotherapeutic drugs on the proliferation of human breast cancer cells. **Methods** Bcap-37 human breast cancer cells were treated with VES combined with chemotherapeutic drugs for 24h and 36h. The concentrations of VES were 10 μg/mL and 20 μg/mL and those of 5-fluorouracil, mitomycin and cyclophosphamide were 16.9 μg/mL and 33.8 μg/mL, 1 μg/mL and 3.3 μg/mL and 100 μg/mL and 300 μg/mL respectively. The inhibitory effect was measured with MTT method and the cell cycle and cell surface Fas expression were analyzed with flow cytometry assay. **Results** The combination of VES with chemotherapeutic drugs had a significant inhibitory effect on the growth of Bcap-37 human breast cancer cells. Flow cytometry assay of cell cycle showed that the natural apoptotic rate of Bcap-37 cells was 0.7%; after treatment with VES 20 μg/mL, the apoptotic rate was 19.2%; after treatment with 5-Fu, mitomycin and cyclophosphamide the apoptotic rates were 16.2%, 16.7% and 12.3%, respectively; after the combined use of VES and the 3 chemotherapeutic drugs, the apoptotic rates were 40.3%, 44.8%, 39.6%, respectively. Fas expression in cancer cells increased after the co-administration of VES and chemotherapy drugs. **Conclusions** VES combined with chemotherapeutic drugs had significant inhibitory effect on the growth of Bcap-37 human breast cancer cells. The mechanism may be related to Fas upregulation on the surface of cancer cells.

基金项目:上海市科委科技发展基金资助(024119105)。

收稿日期: 2004-12-14; **修订日期:** 2005-03-25。

作者简介:张军初(1962-),男,浙江温岭人,上海长征医院副主任医师,主要从事甲状腺、乳腺疾病方面的研究。

通讯作者:张伟 电话:021-65480224(H), 021-63610109-73312(O), 13818770308(手机); E-mail: zhangwei412@yahoo.com.cn。

Key words: RREAST NEOPLASMS/drug ther; VITAMINE SUCCINATE/ther use; ANTINEOPLASMTIC AGENTS COMBINED;

APOPTOTIC RATE

CLC number: R737.9; R979.19

Document code: A

乳腺癌是妇女常见的恶性肿瘤,化疗是提高治疗效果、改善预后的重要的综合治疗手段之一。目前常采用两种或多种化疗药物的联合作用以增强其效果。维生素 E 琥珀酸酯 (Vitamin E succinate, VES) 是一种新的具有强效诱导肿瘤细胞凋亡的药物。本研究旨在检测 VES 联合治疗乳腺癌的常用化疗药物对乳腺癌细胞的凋亡诱导作用,以为临床联合用药提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 材料

人乳腺癌细胞株 Bcap-37 购自中科院上海细胞所, VES 购自 SIGMA 公司, 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 为上海旭东海普药业有限公司生产, 丝裂霉素 (MMC) 为浙江海正药业股份有限公司生产, 环磷酰胺 (CTX) 为上海华联制药有限公司生产。MTT 为 AMRESCO 产品, PE 标记的抗人 Fas 抗体购自晶美公司。

1.2 实验方法

Bcap-37 细胞以含 10% 小牛血清的 RPMI1640 培养基于 37℃, 5% CO₂ 的条件下培养。VES 以无水乙醇溶解, 实验浓度为 10 μg/mL 和 20 μg/mL, 无水乙醇的终浓度 < 2‰。5-FU, MMC, CTX 的浓度分别为 16.9 μg/mL, 33.8 μg/mL; 1 μg/mL, 3.3 μg/mL 和 100 μg/mL, 300 μg/mL。单用两种浓度的 VES 或单用不同浓度的化疗药物, 以及用两种浓度的 VES 分别与两种浓度化疗药物联合作用 24 h 和 36 h。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 MTT 法检测 VES 联合化疗药物抑制乳腺癌细胞的增殖 Bcap-37 细胞以 2×10^4 /mL 接种于 96 孔板, 每孔 200 μL, 每组设 6 个复孔。接种细胞 24 h 后加入药物。药物处理结束后每孔加入 5 g/L MTT 20 μL, 继续于 37℃ 孵箱培养 4 h 后, 吸去上清, 加入 DMSO 150 μL/孔, 震荡 5 min 后于自动酶标仪上进行比色, 测定波长为 492 nm 吸光值 (A)。计算联合用药对 Bcap-37 细胞的生长抑制率。抑制率 (%) = (对照组平均 A 值 - 实验组平均 A 值) / 对照组平均 A 值 × 100%。

1.3.2 流式细胞仪分析细胞周期 Bcap-37 细胞以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板, 以 VES 20 μg/mL 加 5-FU 8 μg/mL, 或加 MMC 3.3 μg/mL, 或加 CTX 300 μg/mL 作用于细胞 24 h。处理结束后收集细胞后离心弃去培养液制成单细胞悬液, 70% 冰乙醇固定后加入 (PI), 4℃ 黑暗处静置 30 min 后上机分析细胞周期和凋亡率, 每个标本分析 10 000 个细胞, 用随机所附软件对测量值进行分析。以未经药物作用的细胞作为对照。

1.3.3 流式细胞仪检测细胞表面 Fas 表达 Bcap-37 细胞以 5×10^4 /孔接种于 6 孔板, 培养 24 h 后按 1.3.2 中药物浓度及联合方式加入 VES 和化疗药物, 处理结束后收集细胞离心去除培养液, 加入 (PE) 标记的抗人 Fas 抗体于黑暗处静置 30 min, PBS 漂洗 3 次后, 流式细胞仪分析荧光强度。

1.4 统计学分析

实验数据均以均数 ± 标准差表示, 用 *t* 检验进行统计学分析。

2 结果

2.1 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞生长的抑制作用

单用不同浓度的 VES 或单用化疗药物对乳腺癌细胞的生长均可产生不同程度的抑制作用, 但二者联合应用时产生的抑制作用较单用药物时显著增强 ($P < 0.05$) 并且随药物浓度的增加而逐步增强 (附表)。

2.2 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞的凋亡率的影响

Bcap-37 细胞的自然凋亡率为 0.7%, 20 μg/mL VES 作用 24 h 后凋亡率为 19.2%, 33.8 μg/mL 5-FU, 3.3 μg/mL MMC 和 300 μg/mL CTX 3 种化疗药物作用 24 h 后的凋亡率分别为 16.2%, 16.7% 和 12.3%。按上述浓度的 VES 与 3 种化疗药物合用后的凋亡率分别升高为 40.3%, 44.8% 和 39.6% (附图)。

2.3 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞表面 Fas 表达的影响

未经药物作用的乳腺癌细胞表面 Fas 表达阳性

率和平均荧光强度分别为 92.5% 和 4.09; 20 μg/mL VES 分别与 33.8 μg/mL 5-FU, 3.3 μg/mL MMC 和 300 μg/mL CTX 联合作用后,阳性细胞率和平均荧光强度分别升高至 100%, 19.5; 100%, 22.0 和 100%, 18.7。

附表 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞的生长抑制作用

分组	A 值		抑制率(%)	
	24h	36h	24h	36h
对照组	0.811 ± 0.032	0.842 ± 0.023		
VES10 μg/mL	0.667 ± 0.021	0.591 ± 0.026	16.42% ¹⁾	29.81% ¹⁾
VES20 μg/mL	0.499 ± 0.021	0.398 ± 0.017	38.47% ¹⁾	52.73% ¹⁾
5-FU16.9 μg/mL	0.544 ± 0.034	0.491 ± 0.023	32.92% ¹⁾	41.68% ¹⁾
5-FU33.8 μg/mL	0.455 ± 0.013	0.424 ± 0.021	43.90% ¹⁾	49.64% ¹⁾
MMC 1 μg/mL	0.499 ± 0.017	0.381 ± 0.019	38.47% ¹⁾	54.75% ¹⁾
MMC 3.3 μg/mL	0.332 ± 0.023	0.301 ± 0.019	59.06% ¹⁾	64.25% ¹⁾
环磷酰胺 100 μg/mL	0.682 ± 0.031	0.629 ± 0.041	15.91% ¹⁾	25.30% ¹⁾
环磷酰胺 300 μg/mL	0.577 ± 0.013	0.447 ± 0.023	28.85% ¹⁾	46.91% ¹⁾
VES10 μg/mL + 5-FU16.9 μg/mL	0.482 ± 0.019	0.421 ± 0.021	40.57% ^{1,2)}	50.00% ^{1,2)}
VES10 μg/mL + 5-FU33.8 μg/mL	0.392 ± 0.009	0.318 ± 0.014	51.66% ^{1,2)}	62.23% ^{1,2)}
VES10 μg/mL + MMC 1 μg/mL	0.411 ± 0.021	0.297 ± 0.017	49.32% ^{1,2)}	64.73% ^{1,2)}
VES10 μg/mL + MMC 3.3 μg/mL	0.281 ± 0.010	0.199 ± 0.009	65.35% ^{1,2)}	76.36% ^{1,2)}
VES10 μg/mL + CTX 100 μg/mL	0.518 ± 0.022	0.512 ± 0.031	36.13% ^{1,2)}	39.19% ^{1,2)}
VES10 μg/mL + CTX 300 μg/mL	0.488 ± 0.017	0.348 ± 0.017	39.83% ^{1,2)}	58.67% ^{1,2)}
VES20 μg/mL + 5-FU16.9 μg/mL	0.312 ± 0.011	0.281 ± 0.023	61.53% ^{1,2)}	66.63% ^{1,2)}
VES20 μg/mL + 5-FU33.8 μg/mL	0.211 ± 0.014	0.112 ± 0.018	73.98% ^{1,2)}	86.70% ^{1,2)}
VES20 μg/mL + MMC 1 μg/mL	0.224 ± 0.009	0.200 ± 0.019	72.38% ^{1,2)}	76.25% ^{1,2)}
VES20 μg/mL + MMC 3.3 μg/mL	0.189 ± 0.007	0.083 ± 0.007	76.70% ^{1,2)}	90.14% ^{1,2)}
VES20 μg/mL + CTX 100 μg/mL	0.421 ± 0.031	0.293 ± 0.012	48.09% ^{1,2)}	65.20% ^{1,2)}
VES20 μg/mL + CTX 300 μg/mL	0.302 ± 0.021	0.161 ± 0.013	64.13% ^{1,2)}	80.88% ^{1,2)}

注: 1) 与对照组相比, $P < 0.05$; 2) 与相应浓度的单用药物相比, $P < 0.05$

1

2

3

4

5

6

7

8

1: Bcap-37 细胞; 2: VES; 3: 5-FU; 4: MMC; 5: CTX; 6: 5-FU + VES; 7: MMC + VES; 8: CTX + VES

附图 VES 联合化疗药物对乳腺癌细胞凋亡率的影响

3 讨论

乳腺癌是女性常见的恶性肿瘤,其发病率占妇女肿瘤的31%。辅助化疗是乳腺癌综合治疗的重要组成部分之一,对于改善乳腺癌的预后起着重要作用^[1,2]。目前的化疗多采用联合用药的方式,以提高治疗效果并减轻副作用。提高化疗效果的一种有效途径是引进新的化疗药物并尝试新的组合方案。

维生素E琥珀酸酯(VES)是一种维生素E衍生物,最早由Turley等^[3]报道,VES具有诱导人B淋巴瘤细胞凋亡的作用。进一步的研究表明,VES除对淋巴系统来源的肿瘤有抑制作用外,对上皮组织来源的恶性肿瘤如乳腺癌、前列腺癌和胃癌等都具有显著的凋亡诱导作用^[4,5]。VES对肿瘤细胞具有较强的凋亡诱导作用而其体内的毒性作用很低,故越来越引起人们的重视。

本实验分析了VES与乳腺癌化疗的常用药物5-FU,丝裂霉素和环磷酰胺的联合作用,结果表明,VES联合化疗药物后具有较单用药物更为显著的抑制乳腺癌细胞增殖的作用,并且这种作用随药物浓度的增加而增强,提示VES与化疗药物对抑制乳腺癌生长有协同作用。

Fas/FasL是已知的三大死亡分子之一。在细胞的凋亡过程中发挥重要的作用。设法调控凋亡诱导分子的表达从而促进肿瘤细胞凋亡是化疗的主要机制之一。从流式细胞仪分析细胞周期的结果看,VES联合化疗药物抑制乳腺癌细胞增殖的

作用主要通过诱导肿瘤细胞凋亡实现的。但其作用机制是否与调控乳腺癌细胞Fas表达有关呢?Turley^[6]等的实验结果表明,VES诱导肿瘤细胞的凋亡作用主要通过调控Fas/FasL这一主要凋亡诱导途径来实现,通过上调肿瘤细胞Fas表达诱导肿瘤细胞凋亡,而且,Fas的中和抗体能够阻断这种作用。本实验结果显示,联合应用VES和化疗药物后,乳腺癌细胞表面Fas的表达有显著的增高。据此推断,Fas的上调在VES联合化疗药物诱导乳腺癌细胞凋亡的过程中可能起重要的作用。

参考文献:

- [1] 张斌. 乳腺癌综合治疗的新概念[J]. 中国实用外科杂志, 2003, 23(10): 578-680.
- [2] 高砚春, 吴诚义. 乳腺癌新辅助化疗研究的新进展[J]. 中国普通外科杂志, 2004, 13(11): 846-849.
- [3] Turley JM, Funakoshi S, Ruscetti RW, *et al.* Growth inhibition and apoptosis of RL human B lymphoma cells by vitamin E succinate and retinoic acid: role for transforming growth factor beta [J]. *Cell Growth Differ*, 1995, 6(6): 655-663.
- [4] Yu W, Israel K, Liao QY, *et al.* Vitamin E succinate (VES) induces Fas sensitivity in human breast cancer cells: role for Mr 43000 Fas in VES-triggered apoptosis [J]. *Cancer Res*, 1999, 59(4): 953-961.
- [5] Israel K, Yu W, Sanders BG, *et al.* Vitamin E succinate induces apoptosis in human prostate cancer cells: roles of Fas in vitamin E succinate-triggered apoptosis [J]. *Nutr Cancer*, 2000, 36(1): 90-100.
- [6] Turley JM, Fu T, Ruscetti FW, *et al.* Vitamin E succinate induces Fas-mediated apoptosis in estrogen receptor negative human breast cancer cells [J]. *Cancer Res*, 1997, 57(5): 881-890.

中华医学会第15届全国外科学术会议征文通知

经中华医学会批准,由中华外科学会主办的第15届全国外科学术会议将于2005年10月12~15日在山东省济南市召开。本次会议将以外科肿瘤综合治疗和腹部大器官移植为主题全面检阅自2001年第14届全国外科学术会议以来国内普通外科领域临床及基础研究情况。会议将邀请大陆、港台及国外著名专家就外科领域基础与临床进展、外科医生的培养、外科医生与法律等话题做专题演讲。本次会议将致力于进一步规范外科疾病临床诊疗行为,推进外科医生的规范化培养,服务于国民卫生保健事业,促进外科医生队伍的法制建设。

征文内容:外科基础(休克、感染、创伤、营养、监护)、甲状腺和乳腺、胃肠、肝、胆、胰、脾、血管及腹壁等普外科领域常见病多发病的预防、诊断、综合治疗进展,普外科领域新技术、新方法应用经验及新理论、新概念等。

征文要求:(1)未公开发表的论文,(2)请寄3500字以内全文及800字以内的摘要打印稿一份,摘要应包括目的、方法、结果和结论,请附上软盘。不投摘要者将不能投入论文汇编,(3)请注明单位地址及邮编,并加盖公章。

论文截稿日期:2005年7月30日(以当地邮戳为准)。来稿请寄:北京市西城区阜内大街133号,中华普通外科杂志编辑部,邮编100034,请在信封左下角注明“第15届全国外科会议征文”字样。征文恕不退稿,请自留底稿。

本次会议是中华医学会一类学术会议,会议将向正式代表颁发中华医学会论文证书,并授予中华医学会继续教育学分。