

文章编号:1005-6947(2005)12-0918-04

· 实验研究 ·

维生素 E 琥珀酸酯对乳腺癌荷瘤裸鼠的抑瘤作用

张伟¹, 张军初¹, 徐昕昀¹, 朱大乔², 何金³, 王强¹

(上海长征医院 1. 普外科 3. 病理科, 上海 200003; 2. 上海第二军医大学 护理系, 上海 200433)

摘要:目的 检测维生素 E 琥珀酸酯(VES)对裸鼠荷乳腺癌 MCF-7 细胞的抑制作用。方法 裸鼠皮下接种 MCF-7 乳腺癌细胞建立荷瘤裸鼠模型。以 150 mg/kg(体重)剂量的 VES 治疗模型鼠共 5 周。处死动物后测量肿瘤大小。以流式细胞仪检测细胞周期变化和细胞表面 Fas 和 FasL 的表达; 以免疫组化法检测肿瘤组织 Fas 和 FasL 的表达, 并以 TUNEL 法检测细胞凋亡指数。**结果** VES 对荷乳腺癌裸鼠具有显著的增殖抑制作用。细胞周期分析显示, VES 治疗后肿瘤细胞表现为 G₀/G₁ 期阻滞, 肿瘤组织和细胞表面的 Fas 和 FasL 均出现上调, 同时细胞的凋亡指数升高。**结论** VES 对于 MCF-7 乳腺癌荷瘤裸鼠具有强效的抑制作用, 其机制与上调肿瘤细胞 Fas/FasL 表达, 促进细胞凋亡有关。

关键词:琥珀酸酐类/病理学; 乳腺肿瘤/药物治疗; MCF-7

中图分类号: R737.7; R979.1

文献标识码: A

Inhibitory effect of vitamin E succinate on experimental breast cancer in nude mice

ZHANG Wei¹, ZHANG Jun-chu¹, XU Xin-yun¹, ZHU Da-qiao², HE Jin³, WANG Qiang¹
(1. Department of General Surgery, 3. Department of Pathology, Changzhang Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Nursing School, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To investigate the inhibitory effect of vitamin E succinate(VES) on experimental breast cancer in nude mice. **Methods** MCF-7 human breast cancer cells were inoculated subcutaneously in nude mice. VES was administrated at a dosage of 150 mg/kg body weight for 5 weeks. Then, the size of the tumor was measured and cell cycle and cell surface Fas/FasL were detected by flow cytometry. Fas/FasL expression in tumor tissue was detected with immunohistochemistry, and apoptosis index was detected by TUNEL method. **Results** VES showed obviously inhibitory effect on the growth of graft breast cancer tumor *in vivo*. VES treatment blocked tumor cells in G₀/G₁ phase. Fas/FasL expression was up-regulated accompanied with a rise of apoptotic index in tumor tissue. **Conclusions** VES had potent inhibitory effect on MCF-7 breast cancer graft in nude mice. The mechanism involved may be related to the up-regulation of Fas/FasL expression and promotion of apoptosis of tumor cells.

Key words: Succinic Anhydrides/pathol; Brease Neoplasms/drug ther; MCF-7

CLC number: R737.7; R979.1

Document code: A

维生素 E 琥珀酸酯(vitamin E succinate, VES) 是不具有氧化活性的维生素 E 衍生物, 体外实验中

能诱导 28% ~ 65% 的白血病细胞及肺癌、乳腺癌和结肠癌细胞等细胞的凋亡。而对正常细胞如造血细胞、成纤维细胞、内皮细胞、心肌细胞、肝细胞和平滑肌细胞无明显的凋亡诱导作用^[1]。对恶性细胞的选择性抑制作用使 VES 成为一种很有前途的抗肿瘤药物。本研究通过 MCF-7 乳腺癌荷瘤裸鼠模型的建立, 探讨 VES 在体内抑制肿瘤的作用。

基金项目:上海市科委科技发展基金资助(024119105)。

收稿日期:2005-03-04; **修订日期:**2005-08-31。

作者简介:张伟(1972-), 男, 天津人, 上海长征医院主治医师, 主要从事消化道和乳腺恶性肿瘤外科治疗方面的研究。

通讯作者:张军初; E-mail: zhangjc609@sohu.com。

1 材料与方法

1.1 材料

BALB/c-nu/nu 裸鼠 18 只,雌性,4 周龄,购于中科院上海实验动物中心。人乳腺癌 MCF-7 细胞受赠于上海肿瘤医院乳腺中心。人 Fas 和 FasL 免疫组织化学(免疫组化)试剂盒和原位凋亡检测试剂盒购自武汉博士德公司。VES 为 Sigma 公司产品。PE 标记的抗人 Fas 和 FasL 抗体购自晶美公司。

1.2 方法

1.2.1 动物实验方法 取对数期生长的乳腺癌 MCF-7 细胞,以 2×10^6 /只接种于裸鼠胸壁皮下,接种 3 d 后给药。参照文献^[2],VES 溶解于芝麻油(seasame oil),浓度为 60 mg/mL,按 150 mg/kg(体重)腹腔注射 1 次/d($50 \mu\text{L}/\text{d}$),连续 5 d 后休息 2 d。治疗时间为 5 周。将动物分为:(1)空白对照组;(2)芝麻油注射组;(3)VES 治疗组 3 组,每组 6 只。治疗 5 周后脱颈椎处死动物,切取肿瘤测量长径(a)和横径(b),按 $(a \times b^2)/2$ 计算肿瘤体积。

1.2.2 分析细胞周期 切取肿瘤组织剪碎,经 100 目/mm² 滤网过滤制成单细胞悬液,70% 冰乙醇固定 2 h 后以 PBS 漂洗 3 遍,加入碘化丙啶(PI),于 4°C 黑暗处静置 30 min 后流式细胞仪分析细胞周期。每个样本分析 10 000 个细胞。

1.2.3 肿瘤细胞表面 Fas 和 FasL 表达的检测 制成的单细胞悬液以 PBS 漂洗 2 遍后分别加入 PE 标记的抗人 Fas 和 FasL 抗体,再以 PBS 漂洗 3 遍,于黑暗处静置 30 min 后流式细胞仪分析荧光强度。

1.2.4 免疫组化法检测肿瘤组织 Fas 和 FasL 的表达 切取肿瘤组织以福尔马林固定 3 d 后制成石蜡切片。按免疫组化试剂盒的操作步骤检测 Fas 和 FasL 表达。细胞膜或细胞浆内出现棕黄色颗粒认定为 Fas 或 FasL 表达阳性。采用 AB 值法^[3]。A 表示显色深浅:0 为无显色,1 为浅黄色,2 为棕黄色,3 为棕褐色。B 为每个视野染色细胞比例:1 为阳性细胞 $< 1/3$,2 为 $1/3 \sim 2/3$,3 为 $> 2/3$ 。每例观察 5 个高倍视野计算平均值。

1.2.5 TUNEL 法测定肿瘤细胞的凋亡指数 取制成的肿瘤组织石蜡切片,按细胞凋亡检测试剂盒的操作步骤进行操作。细胞核出现棕黄色颗粒

为凋亡细胞,随机选取 5 个高倍视野计数每 100 个细胞中凋亡细胞数,计算乳腺癌细胞的凋亡指数。

1.3 统计学分析

实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,用方差分析进行统计学处理。

2 结果

2.1 肿瘤大小

全组裸鼠均接种成功,治疗期间无死亡。成瘤后瘤体大小在空白对照组和芝麻油注射组之间差异无显著性($P > 0.05$),而 VES 治疗组显著小于对照组及芝麻油注射组($P < 0.05$)(附表)。

附表 VES 治疗后各组肿瘤大小的比较

分组	动物数(只)	肿块大小(mm ³)
空白对照组	6	1008 \pm 132 [†]
芝麻油注射组	6	1121 \pm 105 [†]
VES 治疗组	6	405 \pm 38

注:† 与 VES 治疗组比较, $P < 0.05$

2.2 VES 对乳腺癌细胞周期的影响

芝麻油注射后对乳腺癌细胞周期无明显影响;VES 治疗后, G_0/G_1 期细胞增多,表现为 G_0/G_1 期阻滞。肿瘤细胞的凋亡率也较对照组升高(图 1)。

2.3 VES 对乳腺癌组织 Fas 和 FasL 表达的影响

细胞膜和/或胞浆出现棕黄色颗粒提示为 Fas/FasL 表达(图 2)。VES 治疗后,乳腺癌组织 Fas 表达值由对照组的 1.0 ± 0.71 升高至 2.4 ± 0.55 ,FasL 由 1.2 ± 0.45 升高至 2.8 ± 0.55 ;差异均具有显著性($P < 0.05$)。

2.4 VES 对乳腺癌细胞表面 Fas 和 FasL 表达的影响

与空白对照组相比,VES 治疗后肿瘤细胞表面 Fas 和 FasL 的表达均出现上调,Fas 平均荧光强度由 1.46 升高至 3.18,FasL 平均荧光强度由 2.68 升高至 4.66(图 3)。

2.5 VES 对乳腺癌细胞凋亡指数的影响

TUNEL 法显示细胞核为深棕黄色者为凋亡细胞(图 4)。经 VES 处理后,肿瘤细胞的凋亡指数由对照组的 10.8 ± 2.3 升高至治疗组的 27.2 ± 7.8 ,差异具有显著性($P < 0.05$)。

A: 对照组 B: VES 治疗组

图1 VES对乳腺癌细胞周期的影响

A: 对照组 B: VES 治疗组

图2 VES对乳腺癌瘤块Fas表达的影响(免疫组化×200)

A: 对照组 B: VES 治疗组

图3 VES对乳腺癌细胞表面Fas/FasL表达的影响

A: 对照组 B: VES 治疗组

图4 VES对乳腺癌细胞凋亡指数的影响(TUNEL×200)

3 讨论

VES是一种新的肿瘤抑制剂,由于对肿瘤细胞有选择性抑制作用,对正常细胞影响较小,对机体毒性也较小^[4],因而其在肿瘤治疗中的意义越来越引起人们的重视。最早Turley等^[5]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、前列腺癌和结肠癌等都具有显著的凋亡诱导作用^[6-8]。本实验结果表明,VES对MCF-7乳腺癌荷瘤裸鼠具有强效的增殖抑制作用,VES作用后乳腺癌细胞的G₀/G₁期比率明显升高,表现为G₀/G₁期阻滞,肿瘤细胞的凋亡率升高。提示其生长抑制作用与诱导细胞的凋亡有关。

由于在肿瘤发生过程中,肿瘤细胞常获得对凋亡的抵抗,因此恢复对凋亡诱导的敏感性是肿瘤治疗的策略之一^[9]。Fas/FasL系统是目前研究较

多的凋亡诱导分子。Turley等^[5]报道VES处理后,乳腺癌细胞通过分子质量为43kD的Fas蛋白在细胞表面的重新分布,使原来对Fas抵抗的乳腺癌细胞转变为对Fas敏感的表型。Fas/FasL系统是VES诱导肿瘤细胞凋亡的主要机制之一,VES能促进乳腺癌细胞Fas和FasL蛋白的合成并通过上调细胞表面Fas促进肿瘤细胞凋亡,而应用拮抗Fas的中和抗体能阻断凋亡诱导作用^[10]。本实验结果与此相一致。免疫组化结果亦显示治疗组组织内Fas/FasL的表达较对照组增加,提示VES具有促进肿瘤细胞Fas/FasL合成的作用。由于细胞凋亡主要由细胞表面Fas/FasL介导,本实验同时检测了细胞表面Fas/FasL的表达,发现VES同样具有上调作用。而TUNEL法检测到乳腺癌细胞的凋亡指数在VES作用后显著升高,与流式细胞仪的结果相一致。以上结果说明,VES体内诱导MCF-7乳腺癌细胞凋亡的作用机制可能与调控Fas/FasL的表达有关。

参考文献:

- [1] Neuzil J, Weber T, Gellert N, *et al.* Selective cancer cell killing by alpha-tocopheryl succinate [J]. *Br J Cancer*, 2001, 84(1):87-89.
- [2] Malata MP, Neitzel LT. Vitamin E succinate promotes breast cancer tumor dormancy [J]. *J Surg Res*, 2000, 93(1):163-170.
- [3] Shimizu M, Saitoh Y, Itoh H, *et al.* Immunohistochemical staining of H-ras oncogenic product in normal, benign and malignant human pancreatic tissues [J]. *Hum Pathol*, 1990, 21(6):607-613.
- [4] Bendich A, Machlin LJ. Safety of oral intake of vitamin E [J]. *Am J Clin Nutr* 1988, 48(3):612-619.
- [5] 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.
- [6] 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.
- [7] 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.
- [8] Wu K, Zhao Y, Liu BH, *et al.* RRR-alpha-tocopheryl succinate inhibits human gastric cancer SGC-7901 cell growth by inducing apoptosis and DNA synthesis arrest [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1):26-30.
- [9] Takeuchi T, Sasaki Y, Ueki T, *et al.* Modulation of growth and apoptosis response in PC-3 and LNCAP prostate-cancer cell lines by Fas [J]. *Int J Cancer*, 1996, 67(5):709-714.
- [10] 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.

文章编号:1005-6947(2005)12-0921-01

· 病例报告 ·

双上肢动脉栓塞合并脑栓塞及出血 1 例

吴良平¹, 张玉新¹, 王俊¹, 唐柚青²

(广州军区广州总医院 1. 普通外科 2. ICU 科, 广东 广州 510010)

关键词: 颅内栓塞和血栓形成; 病例报告

中图分类号: R651 文献标识码: D

患者 男, 64 岁。4d 前无明显诱因感右上肢麻痹、疼痛, 并逐渐出现右上肢发凉、发绀症状急诊入院。既往有“房颤”病史 1 年。体查: 体温 37.0℃, 脉搏 86 次/min, 呼吸 18 次/min, 血压 136/80 mmHg。神志清楚, 急性面容。右桡动脉搏动消失, 左桡动脉搏动不齐, 心电图示: 心房纤颤、T 波改变; 心脏彩超示: 主动脉粥样斑块形成; 右上肢血管彩色多普勒检查示: 右上肢肱动脉下端栓塞并血栓形成(狭窄 100%)。诊断“右上肢动脉

栓塞并血栓形成, 房颤”, 立即给予低右、溶栓、抗凝、祛聚等处理。入院第 2 日凌晨 3 时左右, 突发左上肢麻痹、疼痛、发凉、发绀, 左侧桡动脉搏动消失, 行左上肢血管彩色多普勒检查示: 左上肢腋动脉以下血管栓塞并血栓形成(100%)。遂急诊在全麻下行双侧腋动脉切开、Fogarty 导管取栓术, 术中完整取出右侧远心端条状血栓长约 10 cm, 直径约 0.3 cm; 左侧近心端条状血栓长约 5 cm, 直径约 0.5 cm。手术结束后 4h, 患者麻醉仍未苏醒, 处于昏迷状态, 行 MRI + MRA 检查示: 脑梗塞并出血。脑外科再次急诊行后颅窝去骨瓣减压术。术后依靠呼吸机维持, 一直昏迷不醒, 且并发梗阻性脑积水, 因中枢性呼吸循环衰竭导致死亡。

讨论 心源性血栓是动脉栓塞的

主要原因。对急性上肢动脉栓塞, 手术是其首选治疗方式, 手术时机无限制, 只要无明显坏死, 均应争取手术取栓, 其效果良好。本例患者虽然双侧上肢动脉栓塞, 但取栓后双侧桡动脉搏动恢复, 远端肢体皮温升高, 皮肤颜色转红, 有较好的治疗效果。

该患者因合并脑梗塞及出血, 最终中枢性呼吸循环衰竭死亡。追其根源, 房颤是其始发动因, 患者有房颤病史 1 年, 未经过正规的抗凝、抗心律失常等治疗造成心脏腹壁血栓形成, 在此病理状态下引起栓子脱落相继堵塞在右上肢、左上肢及颅内较大血管, 这类情况非常罕见, 病情来势凶猛提示脱落栓子较大, 造成脑梗塞面积大, 又合并蛛网膜下腔出血, 情况复杂, 虽经积极抢救仍难以挽救患者生命。说明对房颤的早期治疗显得尤为重要。

收稿日期: 2005-09-21。

作者简介: 吴良平(1970-), 男, 四川自贡人, 广州军区广州总医院主治医师, 主要从事血管性疾病的基础与临床方面的研究。

通讯作者: 吴良平 电话: 020-3665354 7(0), 13802779137(手机); E-mail: Wlpok@tom.com。