

A Study on the Expression of Estrogen Receptor and the Effect of Tamoxifen Treatment in Bladder Cancer

膀胱癌雌激素受体表达与他莫昔芬拮抗治疗的研究

朱 斌/杨罗艳/赵晓昆

(中南大学湘雅二医院泌尿外科,长沙 410011)

ZHU Bin ,YANG Luo-yan ,ZHAO Xiao-kun
(Department of Urology, Xiangya 2nd Hospital of Central South University, Changsha 410011, China)

【摘要】背景与目的：探讨他莫昔芬(TAM)联合阿霉素(ADM)对膀胱癌 BIU-87 细胞株生长的抑制作用。材料与方法：采用免疫组化化学法检测雌激素受体的表达；应用 MTT 法测定不同浓度的 TAM(1、5、10 $\mu\text{mol/L}$)及 ADM(0.1、1、10 $\mu\text{mol/L}$)，单独和联合作用对 BIU-87 细胞的生长抑制率，观察 TAM 的增敏作用；采用原位杂交法检测各实验组 bcl-2 mRNA 的水平。结果：膀胱癌 BIU-87 细胞表达雌激素受体；TAM 单独作用在低浓度时(1 $\mu\text{mol/L}$)对 BIU-87 生长无抑制作用；TAM 联合 ADM 作用时，对 BIU-87 细胞生长的抑制率增加，其中 TAM 10 $\mu\text{mol/L}$ 组增加显著($P < 0.05$)，显示 TAM 能提高 ADM 的敏感性，起到化疗的增敏作用；随着 TAM 浓度的增加和时间的延长，BIU-87 细胞 bcl-2 mRNA 的表达下调。结论：他莫昔芬能增加膀胱癌细胞株 BIU-87 对化疗药物 ADM 的敏感性，并抑制细胞增殖，其增敏的作用机制可能与 bcl-2 的表达下调有关。

【关键词】他莫昔芬；膀胱肿瘤；bcl-2；雌激素受体

中图分类号：R737.14 文献标识码：A 文章编号：1004 - 616X(2009)01 - 0059 - 04

【ABSTRACT】 BACKGROUND AND AIM: In this study we tried to evaluate the possible effects on chemosensitization of bladder cancer cell line BIU-87. MATERIALS AND METHODS: The expression of estrogen receptor(ER) was evaluated by immunohistochemical S-P method. *In vitro* chemosensitivity tests were done with bladder cancer cell line BIU-87 and Doxorubicin(0.1, 1, 10 $\mu\text{mol/L}$) in the presence or absence of graded concentrations of Tamoxifen(1, 5, 10 $\mu\text{mol/L}$). The growth and the sensitivity to Tamoxifen of cells were investigated by MTT assay. The level of bcl-2 gene mRNA expression was determined by *in situ* hybridization. RESULTS: Immunohistochemistry showed positive ER in BIU-87 cells. Tamoxifen stimulated a concentration- dependent and time-dependent decrease in bcl-2 mRNA. Tamoxifen at concentrations of 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ significantly enhanced the cytotoxicity of the chemotherapeutic agent to the cell lines. Tamoxifen alone caused significant toxic effects to BIU-87 at 10 $\mu\text{mol/L}$. Tamoxifen at 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ down-regulated the secretion of bcl-2 in a concentration-dependent manner. The effect of chemosensitization was evident in cells treated with 1, 5 and 10 $\mu\text{mol/L}$ Tamoxifen plus Doxorubicin in which 1.77 to 6.96-fold IC_{50} reduction was observed. CONCLUSION: Tamoxifen increased the chemosensitivity of Tamoxifen in human bladder cancer BIU-87 cell line *in vitro*, inhibited cell proliferation and promoted apoptosis.

【KEY WORDS】 Tamoxifen, bladder neoplasms, bcl-2, estrogen receptor

他莫昔芬是一种选择性雌激素受体调节剂(selective estrogen receptor modulators, SERMs)，具有雌激素拮抗的作用，是治疗雌激素受体(ER)阳性乳腺癌的一线治疗药物^[1]。近年一些研究发现它是一种化疗增

收稿日期：2008 - 08 - 27；修订日期：2008 - 10 - 19

作者简介：朱 斌(1976 -)，男，湖南省株洲人，博士，主治医师，研究方向：泌尿系肿瘤发病机制及治疗。E-mail：Ronaldzhubin@163.com

敏剂,能逆转某些 ER 阳性的非性激素靶器官肿瘤的耐药,提高化疗效果^[2]。阿霉素(adriamycin,ADM)是非典型细胞周期特异性抗代谢类药物,它对细胞 S 及 M 期最敏感,对其它期癌细胞亦有迟缓作用,同时也是膀胱癌化疗方案中的主要药物之一。本研究采用体外实验探讨 TAM 单独或联合 ADM 对表达 ER 的人膀胱癌细胞株 BIU-87 的生长抑制作用及凋亡的影响,以了解在他莫昔芬作用机制中 B 细胞淋巴瘤/白血病-2 基因(B-cell leukemia/lymphoma 2,bcl-2)所起的作用,从而为临床治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

人膀胱癌 BIU-87 细胞系由北京大学医学部泌尿外科研究所提供;他莫昔芬(以 DMSO 溶解后 -20℃ 保存备用)和阿霉素均购自本院药房。

1.2 免疫组织化学法检测 BIU-87 细胞雌激素受体的表达

取对数生长期的 BIU-87 细胞,将细胞爬片用纯丙酮室温固定 10 min;用 3% H₂O₂ 室温浸泡;滴加 50 μl 正常山羊血清封闭液,滴加 50 μl 一抗(鼠抗人雌激素受体单克隆抗体),滴加 50 μl 生物素化的二抗(山羊抗小鼠 IgG);滴加 50 μl 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液,加 100 μl 新鲜配制的二氨基联苯胺(diaminobenzidine, DAB)溶液,苏木素复染,酒精脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。实验以乳腺癌阳性片作阳性对照,以 PBS 代替一抗作阴性对照。判断标准:雌激素受体阳性定位于细胞核上,以胞核内出现棕黄色颗粒的细胞定为阳性细胞,每张切片随机选取 5 个高倍镜视野(×400 倍)。“-”代表阴性,未见着色;“+”代表 <20% 的细胞阳性;“++”代表 ≥20%~50% 的细胞阳性;“+++”代表 ≥50% 的细胞阳性。

1.3 四甲基偶氮唑蓝(MTT)比色分析法

将细胞以每孔 1×10^5 个的浓度接种于 96 孔板中,每孔终体积 200 μl;将培养板移入 CO₂ 孵箱中,在 37℃、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养 24 h。小心吸尽每孔培养液。实验分为分别加入 3 种不同浓度的阿霉素组(0.1、1、10 μmol/L);及分别加入 3 种不同浓度他莫昔芬组(1、5、10 μmol/L),分别加入不同浓度的阿霉素和他莫昔芬组和对照组。对照组为不加细胞仅含培养液的空白液。上述各组于培养箱孵育 48 h 后,各孔加入 5 mg/ml MTT 20 μl,继续孵育 4 h,弃去培养液,加入二甲基亚砷(DMSO)150 μl 溶解甲臜(MTT 还原产物),振荡 10 min 使结晶物充分溶解。再置于酶联免疫检测仪

中,由空白孔调零后,以酶标仪检测 492 nm 处的光吸收值(A),以上实验重复 3 次。按下式计算不同浓度药物单用或合用对膀胱癌 BIU-87 细胞株的生长抑制率。药物细胞毒性以 IC₅₀ 表示。

$$\text{抑制率} = (\text{对照组 } A \text{ 值} - \text{实验组 } A \text{ 值}) / \text{对照组 } A \text{ 值} \times 100\%$$

1.4 原位杂交检测 bcl-2 mRNA 的表达

实验组和对照组分别制成细胞涂片,按照 bcl-2 mRNA 原位杂交说明书操作。判断标准参照文献[3]:随机选择 5 个高倍镜视野(×400 倍)进行判断,细胞浆着色呈棕黄色为阳性表达。bcl-2 mRNA 的表达以染色强度和阳性细胞率的得分之和进行判断:无染色记 0 分,弱染色(浅黄色)记 1 分,中等染色(棕黄色)记 2 分,强染色(黄褐色)记 3 分;阳性细胞率 <5% 记 0 分,≥5%~25% 记 1 分,≥25%~50% 记 2 分,≥50% 记 3 分。上述两项积分相加,0 分为阴性(-),1~2 分为弱阳性(+),3~4 分为中等阳性(++),5~6 分为强阳性(+++)。

1.5 统计学方法

数据处理应用 SPSS10.0 统计软件包进行统计分析,实验数据 $\bar{x} \pm s$ 表示,显著性检验采用 *t* 检验,两组间阳性率的比较采用 χ^2 检验,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准。

2 结果

2.1 雌激素受体在膀胱癌 BIU-87 细胞的表达

膀胱癌 BIU-87 细胞株表达雌激素受体,且为强染色;主要以核膜周围明显,胞核内出现棕黄色颗粒。见图 1。

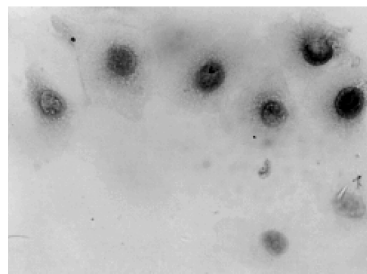


图 1 膀胱癌 BIU-87 细胞雌激素受体阳性表达
Figure 1 Expression of ER in bladder cancer cells

2.2 他莫昔芬对膀胱癌 BIU-87 细胞的生长抑制效应

他莫昔芬不同浓度(1、5、10 μmol/L)的单独作用组,在高浓度组对 BIU-87 细胞生长的最大抑制率达 27%,而在低浓度有一定促进细胞增殖的作用,但是 3 组之间的差异无统计学意义($P > 0.05$) (表 1)。阿霉素与他莫昔芬联合使用时,随着他莫昔芬浓度的增加,BIU-87 细胞的 A 值呈降低趋势,(表 2),他莫昔芬的增敏倍数分

别为 1.77、2.99 和 6.96 倍。

表 1 TAM 单独应用 BIU-87 细胞的吸光度 A 值
Table 1 Effects of TAM on BIU-87 cells(A, $\bar{x} \pm s$)

Groups	A value	Inhibition rate	P
TAM 0 $\mu\text{mol/L}$	0.624 \pm 0.026	-	-
1 $\mu\text{mol/L}$	0.671 \pm 0.132	- 7%	> 0.05
5 $\mu\text{mol/L}$	0.589 \pm 0.057	5.6%	> 0.05
10 $\mu\text{mol/L}$	0.455 \pm 0.035	27%	< 0.05

P value: compared with ADM 0 $\mu\text{mol/L}$ group

表 2 ADM 单独及与 TAM 联用后吸光度 A 值及其增敏效应

Table 2 Effects of ADM and/or TAM on BIU-87 cells

Groups	Concentration of ADM ($\mu\text{mol/L}$)			IC ₅₀ ($\mu\text{mol/L}$)	Sensitivity
	0.1	1	10		
ADM	0.595 \pm 0.101	0.691 \pm 0.021	0.590 \pm 0.042	68.25	-
TAM(1 $\mu\text{mol/L}$)	0.506 \pm 0.126	0.365 \pm 0.010*	0.414 \pm 0.083	38.57	1.77
TAM(5 $\mu\text{mol/L}$)	0.424 \pm 0.092	0.391 \pm 0.028*	0.369 \pm 0.059*	22.82	2.99
TAM(10 $\mu\text{mol/L}$)	0.537 \pm 0.116	0.508 \pm 0.089	0.217 \pm 0.058*	9.81	6.96

ADM: adriamycin; TAM: Tamoxifen; Compared with ADM group, *P < 0.05

表 3 ADM 单独及与 TAM 联用后 bcl-2 mRNA 表达强度

Table 3 Expression of bcl-2 mRNA

Groups	Concentration of ADM ($\mu\text{mol/L}$)			
	0	1	5	10
Blank	+++	/	/	/
ADM and TAM (1 $\mu\text{mol/L}$)	/	++	++/++	-

3 讨论

近年研究发现在某些非生殖系统肿瘤也有雌激素受体^[4],而且部分肿瘤如结肠癌^[5]经抗雌激素治疗后肿块缩小,生存期延长,所以对非生殖系统肿瘤的雌激素受体研究也逐渐引起重视。膀胱癌是我国最常见的泌尿系统肿瘤,文献报道,膀胱癌组织中存在雌激素受体,其阳性率为 22%~40.9%^[6],在研究中发现膀胱癌 BIU-87 细胞株亦有雌激素受体表达,且呈强阳性。提示他莫昔芬有可能通过阻断雌激素受体,从而影响雌激素介导的作用机制,改善膀胱癌细胞化疗效果。

有学者研究^[7-8]发现他莫昔芬可以增加 T24、NTUB1、TSGH-8301、HTB9 和 BFTCC905 膀胱癌细胞株的化疗敏感性,而且在相同的浓度下,比维拉帕米更有效。本研究结果亦证实他莫昔芬能提高膀胱癌 BIU-87 细胞株的化疗敏感性,且呈剂量依赖性,与阿霉素联用后 IC₅₀ 下降,增敏倍数可达 1.77~6.96 倍。进一步研究发现他莫昔芬可以抑制异体种植在裸鼠的膀胱移行细胞癌 5637 细胞株增殖^[9]。Hsu 等^[10]在晚期膀胱癌治疗临床实验中证实,大剂量的他莫昔芬联合顺铂、氨甲蝶呤和长春花碱的治疗效果与传统的 CMV 方案疗效相当,而且该方案化疗副作用可以接受。

Zhang 等^[11]研究证实, TAM 诱导 MCF-7 乳腺癌细胞凋亡与 bcl-2 下调有关,而与 bax, bcl X(L) 和 p53 无

2.3 作用 BIU-87 细胞前后 bcl-2 mRNA 的表达结果

经原位杂交法检测 BIU-87 细胞内均有 bcl-2 mRNA 阳性杂交信号,呈现为棕黄色颗粒状着色,主要见于胞浆,以核周胞浆区更明显,呈强阳性(+++)。在不同 TAM 浓度作用 24 h, BIU-87 细胞呈中等阳性至阴性(++~ -),随着浓度的增加, bcl-2 mRNA 的表达水平呈减弱趋势(表 3)。

关。本研究发现在膀胱癌 BIU-87 细胞有中等强度的 bcl-2 mRNA 表达,经他莫昔芬作用后,发现癌细胞中 bcl-2 mRNA 表达强度减弱,并且随着浓度的增加而减弱。现已发现 bcl-2 基因增强子上含有某些与雌激素受体蛋白结合序列一致的 SP1 结合位点^[12],由此推测雌激素可能在转录水平直接调节 bcl-2 mRNA 的表达。在线粒体凋亡途径中, bcl-2 蛋白的变化便足以改变 bax/bcl-2 比率,影响线粒体膜的通透性,其比值增大使线粒体膜通透性加大,引起细胞色素 C 的释放,激活 Caspase 9,最后激活 Caspase 3,使细胞发生凋亡^[13]。目前雌激素受体有 ER α 和 ER β 两种亚型,在膀胱癌, ER β 占据主导地位^[14]。因此他莫昔芬与不同受体结合,激活或抑制不同基因,激活不同通路,而对细胞增殖的影响还有待于进一步研究。

目前认为选用他莫昔芬作为逆转剂具有较大的临床应用价值。然而,对选用多大浓度才能起到有效的逆转作用仍有争议。本研究结果显示,他莫昔芬在 1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度时,对膀胱癌 BIU-87 细胞的生长表现为刺激作用,即“拟雌激素作用”,提示在用他莫昔芬治疗肿瘤时剂量应足够,否则可能引起相反的治疗效果。Lien 等^[15]报道在稳定的给药后,他莫昔芬在各种固体组织中的浓度高于血清浓度的 10~60 倍。假定治疗膀胱移行细胞癌的组织细胞周围间隙浓度需要达到 10 $\mu\text{mol/L}$,那么血清浓度只要 1 $\mu\text{mol/L}$ 就足够了。根据大剂量他莫昔芬临床 I 期试验,按每天 80 mg/m²,持续 9~13 d,该浓度是容易达到的,暗示大剂量他莫昔芬在此浓度下可安全使用^[16]。

(下转第 64 页)



3 讨论

传统的首蓿产品以家畜饲料为主,作为保健食品应用较少^[4]。目前,苜蓿叶蛋白、苜蓿总皂苷、苜蓿多糖等提取物的研究已成为苜蓿研究的热点^[5],研究显示苜蓿具有广阔的开发前景。有关苜蓿总皂苷毒性和致突变性的研究未见报道。

本研究对小鼠的经口 LD₅₀ 进行实验,结果表明,小鼠 LD₅₀ 为 13.01 g/kg。按照《保健食品检验与评价技术规范》的规定,属实际无毒级,苜蓿总皂苷的各实验剂量组对小鼠骨髓细胞微核试验结果为阴性,对雄性小鼠睾丸精子未造成影响,表明苜蓿总皂苷无明显的遗传毒性作用。本研究结果表明苜蓿总皂苷作为保健品开发是安全的。

参考文献:

- [1] Malinow MR, McLaughlin C, Stafford C, et al. Alfalfa seeds: effects on cholesterol metabolism[J]. *Experientia*, 1980, 36: 562-564.
- [2] Malinow MR, McLaughlin C, Stafford C, et al. Alfalfa saponins and alfalfa seeds. dietary effects in cholesterol-fed rabbits[J]. *Atherosclerosis*, 1980, 37(3): 433-438.
- [3] 中华人民共和国卫生部. 保健食品检验与评价技术规范[S]. 卫生部卫生法制与监督司编印, 2003.
- [4] 卢成, 曾昭海, 张涛, 等. 紫花苜蓿生物活性成分研究进展[J]. *草业科学*, 2005, 22(9): 28-31.
- [5] 何云, 刘圈炜, 王成章, 等. 紫花苜蓿活性成分研究进展[J]. *饲料工业*, 2005, 26(17): 52-54.

(上接第 61 页)

参考文献:

- [1] Zheng A, Källiö A, Harkonen P. Tamoxifen-induced rapid death of MCF-7 breast cancer cells is mediated via extracellularly signal-regulated kinase signaling and can be abrogated by estrogen[J]. *Endocrinology*, 2007, 148(6): 2764-2777.
- [2] 郁宝铭, 王灏, 郑民华, 等. 三苯氧胺对肿瘤细胞的体外逆转耐药作用[J]. *中华外科杂志*, 2002, 40(6): 462-464.
- [3] Gohji K, Hirano H, Okamoto M, et al. Expression of three extracellular matrix degradative enzymes in bladder cancer[J]. *Int J Cancer*, 2001, 95(5): 295-301.
- [4] 傅红. 雌孕激素受体检测及其在临床肿瘤研究中的应用[J]. *实用癌症杂志*, 1991, 6(2): 147.
- [5] Motylewska E, Lawnicka H, Me eń-Mucha G. Oestradiol and tamoxifen inhibit murine Colon 38 cancer growth and increase the cytotoxic effect of fluorouracil[J]. *Endokrynol Pol*, 2007, 58(5): 426-434.
- [6] Croft PR, Lathrop SL, Feddersen RM, et al. Estrogen receptor expression in papillary urothelial carcinoma of the bladder and ovarian transitional cell carcinoma[J]. *Arch Pathol Lab Med*, 2005, 129(2): 194-199.
- [7] Pu YS, Hsieh DC. Tamoxifen enhances the chemosensitivity of bladder carcinoma cells[J]. *J Urol*, 1995, 154(2Pt1): 601-605.
- [8] Pu YS, Hsieh TS, Cheng AL, et al. Combined cytotoxic effects of tamoxifen and chemotherapeutic agents on bladder cancer cells: a potential use in intravesical chemotherapy[J]. *Br J Urol*, 1996, 77(1): 76-85.
- [9] Sonpavde G, Okuno N, Weiss H, et al. Efficacy of selective

estrogen receptor modulators in nude mice bearing human transitional cell carcinoma[J]. *Urology*, 2007, 69(6): 1221-1226.

- [10] Hsu CH, Chen J, Wu CY. Combination chemotherapy of cisplatin, methotrexate, vinblastine, and high-dose tamoxifen for transitional cell carcinoma[J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(1B): 711-715.
- [11] Zhang G J, Kimijima I, Onda M, et al. Tamoxifen-induced apoptosis in breast cancer cells relates to down-regulation of bcl-2, but not bax and bcl-XL, without alteration of p53 protein levels[J]. *Clin Cancer Res*, 1999, 5(10): 2971-2977.
- [12] Krishnan V, Wang X, Safe S. Estrogen receptor SP1 complexes mediate estrogen induced cathepsin d gene expression in MCF7 human breast cancer cells[J]. *J Biol Chem*, 1994, 269(22): 15912-15917.
- [13] Green DR, Reed JC. Mitochondria and apoptosis[J]. *Science*, 1998, 281(5381): 1309-1312.
- [14] Shen SS, Smith CL, Hsieh JT, et al. Expression of estrogen receptors-alpha and -beta in bladder cancer cell lines and human bladder tumor tissue[J]. *Cancer*, 2006, 15, 106(12): 2610-2616.
- [15] Lien EA, Solheim E, Ueland PM. Distribution of tamoxifen and its metabolites in rat and human tissues during steady-state treatment[J]. *Cancer Res*, 1991, 51(18): 4837-4844.
- [16] Trump DL, Smith DC, Ellis PG, et al. High-dose oral tamoxifen, a potential multidrug-resistance-reversal agent: Phase I trial in combination with vinblastine[J]. *J Natl. Cancer Inst*, 1992, 84(23): 1811-1814.