

· 论 著 ·

乌司他丁对乳腺癌细胞迁移、黏附、侵袭能力的影响及机制*

张 超, 孙治君[△]

(重庆医科大学附属第二医院甲状腺乳腺外科 400010)

摘要:目的 探讨乌司他丁(UTI)对乳腺癌 MDA-MB-231 雌激素受体阴性(ER-)和 MCF-7 ER 阳性(ER+)细胞迁移、黏附、侵袭的影响及机制。方法 体外培养 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞,并分别将其随机分为 5 组:空白组,UTI 高、中、低剂量组,UTI+多西紫杉醇(TXT)组。ELISA 检测两种细胞培养液中中性粒细胞弹性蛋白酶(NE)水平,Western blot 检测两种细胞蛋白激酶 B(Akt)、整合素 $\beta 1$ (Integrin $\beta 1$)的表达;改良 MTT 实验、Transwell 小室实验观察两种细胞的黏附、迁移和侵袭。结果 UTI 干预后,ER-/ER+乳腺癌细胞的迁移、黏附、侵袭均降低;两种乳腺癌细胞培养液中 NE 的水平和细胞 Akt 及 Integrin $\beta 1$ 的表达均明显下降。结论 UTI 抑制乳腺癌细胞的迁移、黏附、侵袭,可能与其降低乳腺癌细胞 NE、Akt 及 Integrin $\beta 1$ 的表达有关。

关键词:白细胞弹性蛋白酶;蛋白激酶类;整合素类;乳腺肿瘤;肿瘤转移

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.26.003

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2012)26-2685-04

Effect of ulinastatin on adhesion, invasion and migration of human breast cancer cell and its mechanism*

Zhang Chao, Sun Zhijun[△]

(Department of Thyroid and Breast Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400010, China)

Abstract: Objective To study the effect of ulinastatin(UTI) on adhesion, invasion and migration of estrin receptor-negative (ER-) breast cancer cell MDA-MB-231 and estrin receptor-positive(ER+) MCF-7 and its relevant mechanism. **Methods** The breast cancer cell line MDA-MB-231 and MCF-7 were randomly divided into 5 groups respectively: control, UTI at low, medium and high doses, TXT+UTI groups. The neutrophil elastase(NE) in both two kinds of cell culture supernates was detected by ELISA. Western blot was used to quantify the proteins of protein kinase B(Akt) and integrin $\beta 1$ of MDA-MB-231 and MCF-7. The adhesion ability of the two kinds of cells was tested by MTT assay with Matrigel. The invasion ability of cells was tested by Transwell chamber with Matrigel. The migration of cells was examined by Transwell chamber. **Results** The expression of Akt and integrin $\beta 1$ in MDA-MB-231 and MCF-7 was decreased compared with the control group, while also decreased the NE levels of cell culture supernates. The transfer of MDA-MB-231 and MCF-7 cells was inhibited compared with the control group, but TXT + UTI was superior to UTI. **Conclusion** UTI can inhibit the transfer of the MDA-MB-231 and MCF-7 cells by down regulation of the Akt, integrin $\beta 1$ and NE.

Key words: leukocyte elastase; protein kinases; integrins; breast neoplasms; neoplasm metastasis

乳腺癌已成为女性最常见的恶性肿瘤之一,尤其是在出现远处转移后,患者的平均生存时间仅为 18~30 个月。防止转移的发生成为治疗乳腺癌的重点。而在临床中,雌激素受体阴性/阳性(ER-/ER+)乳腺癌的治疗、预后有较大差异。乌司他丁(UTI)是一种酶抑制剂,有广泛的酶抑制作用,近年相关研究显示 UTI 具备抑制肿瘤细胞增殖、转移,促进凋亡的能力;而肿瘤转移、侵袭的三大基本步骤是迁移、黏附并对基质的降解,三个方面相互依存、相互促进缺一不可。在乳腺组织中,中性粒细胞弹性蛋白酶(neutrophil elastase, NE)是唯一能降解基底膜中弹性蛋白的酶,蛋白激酶 B(protein kinase B, Akt)的过表达对肿瘤的发生、发展方面存在重要影响,整合素 $\beta 1$ (Integrin $\beta 1$)的表达能促进肿瘤细胞与基质的黏附结合,因此上述三者可能在乳腺癌的转移、侵袭中发挥重要作用。为了研究证实 UTI 是否对乳腺癌的迁移、黏附、侵袭有抑制作用以及其机制是否与 Akt、NE 和 Integrin $\beta 1$ 有关,本实验将观察 UTI 对乳腺癌细胞迁移、黏附、侵袭能力的影响,以及对 Akt 和 Integrin $\beta 1$ 的表达及 NE 在细胞上清液中水平的影响。

1 材料与方

1.1 材料及试剂 乳腺癌 MDA-MB-231(ER-)及 MCF-7

(ER+)细胞系均由重庆医科大学附属第一医院惠赠。Akt 购自美国 Bioworld Technology 公司,Integrin beta1 兔抗人单克隆抗体购自美国 Santa(圣克鲁斯)公司,NE ELISA 试剂盒购自大连宝生物工程有限公司。辣根过氧化物酶(HRP)标记山羊抗兔 IgG 抗体购自武汉博士德生物工程有限公司。UTI 购自广东天普生化医药股份有限公司,多西紫杉醇(TXT)购自杭州赛诺菲安万特民生制药公司,药物分别配成 100 \times 血浆峰浓度(peak plasma concentration, PPC)备用。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 两种乳腺癌细胞均用 RPMI1640 培养液培养,加入 10% 胎牛血清、100 μ g/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素,置于细胞培养箱中培养。传代培养,取对数生长期的细胞,即细胞长满培养瓶底面积约 80% 以上时,弃培养液,加入 0.25% 的胰酶 1 mL 消化 2~3 min,再加入含 10% 胎牛血清和链霉素、青霉素双抗 RPMI1640 培养液,于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 培养箱中培养。

1.2.2 细胞分组及给药 将处于对数生长期的 MDA-MB-231 及 MCF-7 细胞各分为 5 组,UTI 低、中、高剂量组(分别加入最终浓度为 400、800、1 600 U/mL 的 UTI),UTI+TXT 组

(UTI 800 U/mL + TXT 3.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ^[1]) 及对照组(加入等体积的生理盐水),使用含双抗的 RPMI1640 培养液(含 10% 胎牛血清),培养 48 h。

1.2.3 ELISA 检测 MDA-MB-231 和 MCF-7 乳腺癌细胞各组培养液中 NE 水平 将细胞以 $5 \times 10^5/\text{mL}$ 的浓度均匀接种于细胞培养瓶,每瓶加入 3 mL 培养液,待细胞融合度达到 80% 左右时更换培养液,按照前述细胞分组及各组处理方式处理 24 h 后收集各组的细胞培养液,按照 NE ELISA 试剂盒操作说明,以标准品浓度作横坐标,对应光密度(OD)值作纵坐标,绘制出标准品线性回归曲线,并根据曲线方程测出各组培养液中 NE 的浓度值。

1.2.4 Western blot 检测细胞 Akt、Integrin β 1 表达 将两种乳腺癌细胞系的各处理组分别接种于培养瓶,以 β 肌动蛋白(β -action)作为内部参照,并按照前述处理方式培养细胞 48 h 后,提取各组蛋白,取含有 70 μg 蛋白的裂解液与 5 \times 蛋白质凝胶电泳上样缓冲液行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),用湿式转印法将 PAGE 胶上的蛋白转至聚偏二氯乙烯膜(PVDF)上,室温条件下封闭液封闭 1 h,加入一抗(Akt、Integrin β 1 兔抗人单克隆抗体,1:1 000 稀释),4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,加入二抗(HRP 标记山羊抗兔 IgG 抗体,1:1 000 稀释),室温下轻轻震荡 1 h,最后用 DAB 显色,扫描并记录保存结果。

1.2.5 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞迁移能力的检测 采用 Transwell 小室来检测乳腺癌细胞的迁移能力。取处于对数生长期的各处理组及对照组细胞,用不含胎牛血清的 RPMI1640 培养液悬浮制备细胞悬液,调整细胞数为 $3 \times 10^5/\text{mL}$;取细胞悬液 25 μL 加入上室的微孔,下室加入 500 μL 含 10% 胎牛血清的 RPMI1640 培养液,于 37 $^{\circ}\text{C}$,5% CO_2 条件下培养 10 h。将未迁移的细胞擦除,取出下室膜,用 4% 多聚甲醛固定 30 min,用 PBS 液轻轻漂洗 3 次,再用 Gimsa 染液染色 30 min,PBS 漂洗 3 次。在光学显微镜下观察并计数,计数 5 个高倍镜视野下细胞数总和及平均值。

1.2.6 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞侵袭能力的检测 用无血清的冷 RPMI1640 培养液把 Matrigel 胶配制浓度为 2 mg/mL 的应用液,在 24 孔板的 Transwell 上室中每孔加入 100 μL Matrigel 胶应用液;紫外线灯下过夜风干;用无血清培养液轻洗凝胶,置于孵箱;用 0.25% 胰酶消化已在无血清培养液中培养 12 h 的各组乳腺癌细胞,然后使用无血清培养液,配成细胞数约为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 的细胞悬液,并按每孔 200 μL 加入 Transwell 上室中;每个下室加入含有 10% 胎牛血清的培养液

400 μL ,放入孵箱 24 h,然后采用结晶紫法于 24 孔板置于酶标仪上,在 570 nm 波长下测各组 OD 值、间接反映细胞数;此实验重复 6 次;侵袭抑制率 = $(1 - \text{OD}_{\text{实验}}/\text{OD}_{\text{空白}}) \times 100\%$ 。

1.2.7 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞黏附能力的检测 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 纤粘连蛋白 100 μL 包被 96 孔板孔底,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,0.25% 胰酶消化处各组细胞,常温下静置 30 min;按每孔 5×10^4 个将经上述处理细胞接种于培养孔,置于培养箱中 1 h。用无血清培养液洗掉未黏附细胞;每孔加入 100 μL 的无血清培养液,采用 MTT 法在酶联免疫检测仪上测定各孔吸光度值,用吸光度值来反映并定量细胞数。

1.3 统计学处理 采用 SPSS18.0 的统计软件进行分析,全部数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较用方差分析,以 $\alpha = 0.05$ 为检验水准,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 乳腺癌细胞培养液 NE 水平的变化 各处理组培养液中 NE 水平均较对照组下降,差异有统计学意义($P < 0.05$);UTI 不同剂量组中,随着 UTI 剂量的增加,NE 水平逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);TXT+UTI 组 NE 水平最低,与其余各处理组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同细胞系相同处理因素间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 1。

表 1 各组上清液 NE 水平比较($\bar{x} \pm s$, ng/mL, A_{570} , $n = 6$)

组别	MCF-7	MDA-MB-231
对照组	30.870 \pm 1.044	32.238 \pm 1.046
UTI 低剂量组	24.693 \pm 1.045 Δ	25.617 \pm 2.469 Δ
UTI 中剂量组	15.619 \pm 1.607 Δ #	16.027 \pm 1.371 Δ #
UTI 高剂量组	7.037 \pm 0.560 Δ *#	8.493 \pm 1.812 Δ *#
TXT+UTI 组	3.240 \pm 1.050 Δ *# \blacktriangledown	3.012 \pm 0.686 Δ *# \blacktriangledown

Δ : $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与 UTI 低剂量组比较;*: $P < 0.05$,与 UTI 中剂量组比较; \blacktriangledown : $P < 0.05$,与 UTI 高剂量组比较。

2.2 乳腺癌细胞 Akt 和 Integrin β 1 的表达 同一细胞系内各处理组 Akt 和 Integrin β 1 的表达水平较对照组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),随着 UTI 浓度的升高,表达水平逐渐降低,差异有统计学意义($P < 0.05$),TXT+UTI 组靶蛋白表达水平最低,与其余各组比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$),见表 2、图 1。

表 2 各组 Akt 和 Integrin β 1 表达水平比较($\bar{x} \pm s$, 灰度值, $n = 6$)

组别	MCF-7		MDA-MB-231	
	Akt/ β -action	Integrin β 1/ β -action	Akt/ β -action	Integrin β 1/ β -action
对照组	0.636 \pm 0.008	0.713 \pm 0.011	0.779 \pm 0.014	0.683 \pm 0.012
UTI 低剂量组	0.514 \pm 0.012 Δ	0.618 \pm 0.006 Δ	0.647 \pm 0.018 Δ	0.613 \pm 0.076 Δ
UTI 中剂量组	0.439 \pm 0.008 Δ #	0.514 \pm 0.006 Δ #	0.526 \pm 0.012 Δ #	0.481 \pm 0.008 Δ #
UTI 高剂量组	0.377 \pm 0.003 Δ *#	0.477 \pm 0.003 Δ *#	0.439 \pm 0.016 Δ *#	0.443 \pm 0.008 Δ *#
TXT+UTI 组	0.322 \pm 0.005 Δ *# \blacktriangledown	0.411 \pm 0.007 Δ *# \blacktriangledown	0.381 \pm 0.006 Δ *# \blacktriangledown	0.362 \pm 0.005 Δ *# \blacktriangledown

Δ : $P < 0.05$,与对照组比较;#: $P < 0.05$,与 UTI 低剂量组比较;*: $P < 0.05$,与 UTI 中剂量组比较; \blacktriangledown : $P < 0.05$,与 UTI 高剂量组比较。

2.3 乳腺癌细胞的迁移能力 乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞系中 TXT+UTI 组迁移个数最少,不同剂量 UTI 中,随着 UTI 剂量的增高,细胞迁移个数逐渐减少,对照组迁移个数最多。UTI 中剂量组和 UTI 高剂量组间差异无统计学

意义($P > 0.05$),其余各组两两比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。不同细胞系相同处理因素间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。各组穿越细胞数见表 3。

2.4 乳腺癌细胞侵袭能力的变化 经过处理后乳腺癌 MDA-

MB-231 和 MCF-7 细胞各组穿膜细胞数 OD 值已发生明显变化,各处理组的侵袭能力较对照组显著降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);处理组间两两比较,除外 UTI 中剂量组和 UTI 高剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余均差异有统计学意义($P < 0.05$),且以 TXT+UTI 组效果最佳。不同细胞系相同处理因素间比较差异无统计学意义($P > 0.05$),见表 4。

2.5 乳腺癌细胞的黏附能力 在同一细胞系内,除 UTI 中剂量组和 UTI 高剂量组间差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其余各组两两比较均差异有统计学意义($P < 0.05$)。不同细胞系相同处理因素间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。经过处理后乳腺癌 MDA-MB-231 和 MCF-7 细胞各组黏附数目,见

表 5。

表 3 各组乳腺癌细胞迁移细胞数比较($\bar{x} \pm s$, 个/孔, $n=6$)

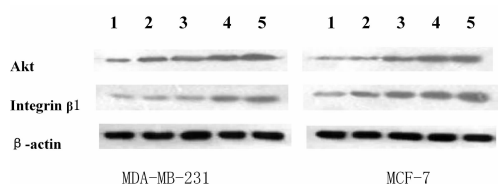
组别	MCF-7	MDA-MB-231
对照组	110.000±7.000	112.667±7.024
UTI 低剂量组	100.000±4.583 [△]	102.333±4.933 [△]
UTI 中剂量组	86.000±3.606 ^{△#}	88.000±2.646 ^{△#}
UTI 高剂量组	81.667±2.082 ^{△#}	84.333±3.512 ^{△#}
TXT+UTI 组	54.667±5.033 ^{△#*}	60.667±3.055 ^{△#*}

[△]: $P < 0.05$, 与对照组比较; [#]: $P < 0.05$, 与 UTI 低剂量组比较; ^{*}: $P < 0.05$, 与 UTI 中、高剂量组比较。

表 4 各组乳腺癌细胞侵袭能力比较($\bar{x} \pm s$, A_{570} , $n=6$)

组别	MDA-MB-231		MCF-7	
	OD 值($\bar{x} \pm s$)	侵袭抑制率(%)	OD 值($\bar{x} \pm s$)	侵袭抑制率(%)
对照组	1.115±0.039	0.0	1.088±0.074 [△]	0.0
UTI 低剂量组	0.999±0.021 [△]	10.4	0.961±0.036 [△]	11.6
UTI 中剂量组	0.874±0.042 ^{△#}	21.6	0.875±0.019 ^{△#}	19.58
UTI 高剂量组	0.827±0.021 ^{△#}	25.8	0.825±0.035 ^{△#}	24.18
TXT+UTI 组	0.569±0.017 ^{△#*}	48.9	0.521±0.013 ^{△#*}	52.11

[△]: $P < 0.05$, 与对照组比较; [#]: $P < 0.05$, 与 UTI 低剂量组比较; ^{*}: $P < 0.05$, 与 UTI 中、高剂量组比较。



1: TXT+UTI 组; 2: UTI 高剂量组; 3: UTI 中剂量组; 4: UTI 低剂量组; 5: 对照组。

图 1 各组处理 48 h 后 Akt、Integrin β1 的表达

表 5 各组乳腺癌细胞系黏附能力比较($\bar{x} \pm s$, A_{570} , $n=6$)

组别	MCF-7	MDA-MB-231
对照组	0.306±0.012	0.3136±0.012 [△]
UTI 低剂量组	0.287±0.006 [△]	0.2954±0.090 [△]
UTI 中剂量组	0.267±0.009 ^{△#}	0.2742±0.011 ^{△#}
UTI 高剂量组	0.262±0.010 ^{△#}	0.2674±0.042 ^{△#}
TXT+UTI 组	0.216±0.007 ^{△#*}	0.2134±0.083 ^{△#*}

[△]: $P < 0.05$, 与对照组比较; [#]: $P < 0.05$, 与 UTI 低剂量组比较; ^{*}: $P < 0.05$, 与 UTI 中、高剂量组比较。

3 讨论

乳腺癌细胞的迁移、黏附并对基质的降解是乳腺癌发生转移的三大步骤,同样也是形成远处转移病灶的前提。因此,抑制乳腺癌细胞的迁移、黏附以及对基质的降解并探究其中的作用机制,对于治疗乳腺癌显得极其重要。

Akt 即苏/丝氨酸蛋白激酶,作为 PI3K/Akt 信号通路中最重要的靶激酶,在乳腺癌中,过表达的 Akt 促进肿瘤细胞增殖^[2]、抑制细胞凋亡^[3-5]、促进细胞迁移、侵袭^[6-7]。跨膜蛋白细胞黏附分子家族成员之一的 Integrinβ1 调节细胞与细胞、细胞与基质间的信号转导和黏附;降低 Integrinβ1 的表达后,乳腺癌细胞相互之间以及乳腺癌细胞与基质之间的趋化、黏附能力

便显著降低,本实验结果同国外研究结果一致^[8-9],随着黏附能力的降低,原发病灶的乳腺癌细胞就更难于和基底膜充分接触,也就难于降解基底膜进而穿透基底膜,临近或远处转移并最终形成转移灶的能力也就降低。NE 属于丝氨酸蛋白酶中糜蛋白酶超家族的成员之一,正常情况下主要来源于中性粒细胞。NE 几乎能降解全部的细胞外基质蛋白,同时 NE 也是惟一能够降解不溶于水的弹性蛋白的蛋白酶,这种不溶于水的弹性蛋白是乳腺、肺组织和血管弹性组织的基本组成成分^[10],降解此种蛋白是破坏基底膜并游出的关键,本实验显示乳腺癌细胞能够分泌 NE,并且与 ER-/+ 无关,同国外研究结果一致^[11-12],NE 水平的降低导致乳腺癌细胞对乳腺组织中弹性蛋白的降解减少,基底膜的完整性得以保留,乳腺癌细胞难以穿越基底膜,难以形成临近或是远处转移。本实验结果显示,两种乳腺癌细胞均有 NE、Akt 和 Integrinβ1 的表达,当 NE、Akt 和 Integrinβ1 的表达降低时,细胞的转移能力均有显著降低,显示 NE、Akt 和 Integrinβ1 的变化与 ER-/+ 细胞的转移能力均有密切关系。

UTI 是一种酶抑制剂,具有广泛的酶抑制作用。近年相关研究显示 UTI 具备抑制肿瘤细胞增殖、转移,促进凋亡的能力,同时与其他抗肿瘤药物合用时可增强抗肿瘤药物的效果^[13-14]。经过 UTI 干预后,Akt、Integrinβ1 表达下降,细胞培养液中 NE 水平降低,且 UTI 对两种乳腺癌细胞上述因子均有影响。Akt 作为细胞内最重要的信号因子之一,接受多种细胞外或细胞内信号分子的作用后表达增加,而 UTI 通过抑制信号分子 IL-6、前列腺素 E2(PGE2)、胰岛素样生长因子-1 受体(IGF-1R)的表达阻断其与 Akt 之间的联系,降低 Akt 的表达。此外 Akt 作为细胞内信号通路中的关键节点,还能促进 Integrinβ1 的表达,提高肿瘤细胞的黏附能力^[15]。有研究发现 UTI 能够抑制在应激、炎症等情况下 NE 的释放和活性^[16-17],而在本实验中 UTI 降低了细胞培养液中 NE 水平,其可能机制为:(1)UTI 抑制了能提高、增强肿瘤细胞多种生物学能力

的 Akt 表达,进一步直接或间接抑制了 NE 的释放;(2)NE 的释放离不开炎症因子的刺激,UTI 能够抑制乳腺癌细胞分泌炎症因子,如 PGE2、IL-6、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。可见,UTI 对两种乳腺癌细胞上述因子均有作用,且发现作用效果差异无统计学意义($P>0.05$)。

综上所述,应用 UTI 干预乳腺癌细胞后,细胞培养液中 NE 水平、细胞 Akt 和 Integrin β 1 表达均下降,乳腺癌的转移能力降低,显示 UTI 抑制乳腺癌细胞的转移可能与 UTI 下调了与乳腺癌转移密切相关的 NE 水平和 Akt 及 Integrin β 1 表达有关。

参考文献:

- [1] 孙涛,姜大庆,宋志国,等.多西紫杉醇对 MCF-7 人乳腺癌细胞延迟外向钾电流的作用[J].中国医科大学学报,2007,36(2):199-200.
- [2] Lin HK,Wang G,Chen Z,et al. Phosphorylation-dependent regulation of cytosolic localization and oncogenic function of Skp2 by Akt/PKB[J]. Nat Cell Biol,2009,11(4):420-432.
- [3] Bucan V,Adili MY,Choi CY,et al. Transactivation of lifeguard(LFG) by Akt-/LEF-1 pathway in MCF-7 and MDA-MB 231 human breast cancer cells[J]. Apoptosis,2010,15(7):814-821.
- [4] Bratton MR,Duong BN,Elliott S,et al. Regulation of ER-alpha-mediated transcription of Bcl-2 by PI3K-AKT crosstalk;implications for breast cancer cell survival[J]. Int J Oncol,2010,37(3):541-550.
- [5] Kim D,Shu S,Coppola MD,et al. Regulation of proapoptotic mammalian ste20-like kinase MST2 by the IGF1-Akt pathway[J]. PLoS One,2010,5(3):e9616.
- [6] Kitamura T,Asai N,Enomoto A,et al. Regulation of VEGF-mediated angiogenesis by the Akt/PKB substrate Girdin[J]. Nat Cell Biol,2008,10(3):329-337.
- [7] Wolff C,Malinowsky K,Berg D,et al. Signalling networks associated with urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in breast cancer tissues: new insights from protein microarray analysis [J]. J Pathol,2011,223(1):54-63.
- [8] Nam JM,Onodera Y,Bissell MJ,et al. Breast cancer cells

in three-dimensional culture display an enhanced radioreponse after coordinate targeting of integrin alpha5beta1 and fibronectin[J]. Cancer Res,2010,70(13):5238-5248.

- [9] Kusuma N,Denoyer D,Eble JA,et al. Integrin-dependent response to laminin-511 regulates breast tumor cell invasion and metastasis[J]. Int J Cancer,2012,130(3):555-566.
- [10] Akizuki M,Fukutomi T,Takasugi M,et al. Prognostic significance of immunoreactive neutrophil elastase in human breast cancer;long-term follow-up results in 313 patients[J]. Neoplasia,2007,9(3):260-264.
- [11] Desmedt C,Ouriagli FE,Durbecq V,et al. Impact of cyclins E, neutrophil elastase and proteinase 3 expression levels on clinical outcome in primary breast cancer patients [J]. Int J Cancer,2006,119(11):2539-2545.
- [12] Sato T,Takahashi S,Mizumoto T,et al. Neutrophil elastase and cancer[J]. Surg Oncol,2006,15(4):217-222.
- [13] Yaguchi T,Muramoto M,Nakano T,et al. Urinary trypsin inhibitor suppresses migration of malignant mesothelioma[J]. Cancer Lett,2010,288(2):214-218.
- [14] Luo J,Sun X,Gao F,et al. Effects of ulinastatin and docetaxel on breast cancer invasion and expression of uPA, uPAR and ERK[J]. J Exp Clin Cancer Res,2011,30(1):71.
- [15] Arboleda MJ,Lyons JF,Kabbinavar FF,et al. Overexpression of AKT2/protein kinase B β leads to up-regulation of β 1 integrins,increased invasion, and metastasis of human breast and ovarian cancer cells[J]. Cancer Res,2003,63(1):196-206.
- [16] Zhou Q,Wang G,Gao C,et al. Effect of ulinastatin on perioperative inflammatory response to coronary artery bypass grafting with cardiopulmonary bypass[J]. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban,2010,35(2):107-110.
- [17] Park KH, Lee KH, Kim H, et al. The anti-inflammatory effects of ulinastatin in trauma patients with hemorrhagic shock[J]. J Korean Med Sci,2010,25(1):128-134.

(收稿日期:2012-01-09 修回日期:2012-04-22)

(上接第 2684 页)

- [12] 刘迎龙,阎军,李守军,等.右外侧小切口剖胸在先天性心脏病手术中的应用[J].中国微创外科杂志,2003,3(5):382-383.
- [13] 李保军,谢家声,李保田,等.右腋下垂直小切口内心直视手术 215 例[J].实用医药杂志,2007,24(11):1305-1306.
- [14] 徐振海,龚琪,王瑞,等.右腋下小切口内心直视手术 224 例[J].中国胸心血管外科临床杂志,2005,12(4):243-246.
- [15] 赵伟,黄克诚,吴凯,等.右腋下小切口心脏不停搏修补房室间隔缺损 24 例临床分析[J].蚌埠医学院学报,2009,34(4):311-313.

- [16] 王宏涛,宋先忠,郑谕章,等.右腋下小切口直视行先天性心脏病手术 152 例观察[J].医药论坛杂志,2010,31(13):136-137.
- [17] 孙浩峰,徐巨林.婴幼儿右胸小切口心脏手术 34 例[J].郑州大学学报,2004,39(2):333-334.
- [18] 宋鹏,郭光伟,王玉璇.右腋下直小切口治疗先天性心脏病 613 例[J].临床医药实践,2005,14(1):25-26.
- [19] 缪文瑞,王天策,王春光,等.法洛四联症血流动力学改变及一期矫治术[J].吉林大学学报:医学版,2003,29(2):351-353.

(收稿日期:2012-03-20 修回日期:2012-05-03)