

· 临床研究 ·

血清脂联素对肥胖患者乳腺癌组织中 Bcl-2 表达的影响*

王永玲¹, 侯软玲², 孙银平¹, 高建芝^{3△}, 李绍山⁴(新乡医学院: 1. 病理生理学教研室; 2. 生理学教研室; 3. 法医综合实验室;
4. 三附院普外科, 河南新乡 453003)

摘要:目的 探讨肥胖乳腺癌患者血清脂联素对癌组织中 Bcl-2 表达的影响。方法 选择病理检验确诊的乳腺癌住院患者 82 例, 其中肥胖乳腺癌患者 45 例, 正常体质量乳腺癌患者 37 例, 术前抽取空腹静脉血并取血清, ELISA 法测定血清脂联素含量; 采用免疫组织化学观察 Bcl-2 蛋白在乳腺癌中的表达情况; RT-PCR 法检测乳腺癌组织中 Bcl-2 mRNA 表达。结果 与正常体质量乳腺癌组血清脂联素的含量(7.46±1.04)mg/L 比较, 肥胖乳腺癌组血清脂联素含量(2.77±0.76)mg/L 明显下降($P<0.05$); 肥胖乳腺癌组乳腺癌组织中 Bcl-2 mRNA 的相对表达量(0.56±0.12)与正常体质量组(0.36±0.08)比较, 差异有统计学意义($P<0.05$); 肥胖乳腺癌组乳腺癌组织中 Bcl-2 蛋白表达的平均光密度(0.25±0.08)较正常体质量乳腺癌组 Bcl-2 的平均光密度(0.18±0.05)显著升高($P<0.05$), 并且血清脂联素的含量与肥胖乳腺癌组织中 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达均呈负相关($r^1 = -0.894$; $r^2 = -0.947$; $P<0.05$)。结论 脂联素含量的降低可能通过上调 Bcl-2 相关的信号通路在乳腺癌发病中有一定作用。

关键词: 乳腺肿瘤; 脂联素; Bcl-2; 肥胖

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2012.28.007

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)28-2922-02

Serum adiponectin affected the expression of Bcl-2 in breast tissue in patients with breast cancer*

Wang Yongling¹, Hou Ruanling², Sun Yinping¹, Gao Jianzhi^{3△}, Li Shaoshan⁴(1. Department of Pathophysiology; 2. Department of Physiology; 3. Forensic Laboratory;
4. Surgical, Third Affiliated Hospital, Xinxiang Medical University, Xinxiang, Henan 453003, China)

Abstract: Objective To explore serum adiponectin affected the expression of antiapoptotic gene Bcl-2 in breast tissue in patients with breast cancer. **Methods** Breast tissue samples from 45 cases with breast cancer, 37 cases of normal weight with breast cancer, extraction hollow and take venous blood serum before the operative, the content of serum adiponectin was determined by ELISA; The expression of Bcl-2 mRNA and protein of breast tissue were detected by RT-PCR and immunohistochemistry in obese breast cancer group and normal weight breast cancer group. **Results** Compared with normal weight breast cancer group(7.46±1.04)mg/L, the content of serum adiponectin(2.77±0.76)mg/L was noticeably reduced($P<0.05$); the expression of Bcl-2 mRNA of breast tissue in obese breast cancer group increased obviously($P<0.05$), while the expression of Bcl-2 protein of breast tissue in obese breast cancer group increased obviously yet($P<0.05$); The content of serum adiponectin was negatively relevant with the expression of Bcl-2 mRNA and protein in breast tissue in obese breast cancer($r^1 = -0.894$; $r^2 = -0.947$; $P<0.05$). **Conclusion** The content of lower serum adiponectin maybe raise relevant signal pathway of Bcl-2 to promote the development of obesity-related breast cancer.

Key words: breast neoplasms; adiponectin; Bcl-2; obesity

乳腺癌是女性最常见的恶性肿瘤之一, 其发病率呈逐年上升的趋势。目前, 大量研究显示肥胖是乳腺癌发病的危险因素, 绝经后女性的体质量指数、体质量、腰臀比与乳腺癌的发生、发展呈正相关^[1]。脂联素作为脂肪组织分泌的一种激素蛋白, 不仅具有增加胰岛素敏感性、调节糖脂代谢、抗炎、抗动脉粥样硬化等作用, 而且与多种恶性肿瘤如子宫内膜癌、乳腺癌、结直肠癌等的发生、发展密切相关^[2-4]。Bcl-2 是一种凋亡抑制基因, 具有延长细胞生存期、提高癌细胞对机体免疫系统的耐受性, 一般情况下, 它的高表达预示着肿瘤的生物行为较差, 患者预后较差^[5]。目前, 关于 Bcl-2 在肥胖相关性乳腺癌的研究及脂联素对其的影响报道甚少。本研究旨在探讨肥胖乳腺癌患者血清脂联素对癌组织中 Bcl-2 表达的影响, 为临床乳腺癌的治疗提供实验依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料 依据病历和家属提供的性别、体质量、身高及

年龄情况, 选取 2005 年 7 月至 2007 年 7 月在新乡医学院第一和第三附属医院住院的接受手术治疗的乳腺癌病例 82 例(全部患者知情同意)。患者均为女性, 年龄 42~69 岁, 平均 51.2 岁, 其中 45 例为肥胖乳腺癌患者, 37 例为正常体质量乳腺癌患者。并根据国际抗癌协会建议: 以 T(原发癌)、N(局部淋巴结)、M(远处转移)对乳腺癌进行分期。肥胖症的诊断符合 WHO 为亚洲成年人制定的标准, 即体质量指数(body mass index, BMI)≥28 kg/m²。各组每例乳腺癌组织标本取材后一部分迅速投入液氮中速冻, 然后转存于-78℃冰箱, 另一部分以 4% 多聚甲醛固定。

1.2 试剂 鼠抗人 Bcl-2 单克隆抗体, 生物素标记的二抗, S-P 免疫组织化学染色试剂盒, DAB 显色试剂盒(北京中杉生物公司)。

1.3 方法

1.3.1 血液采集 所有患者禁食 12 h 后于清晨抽取静脉血,

立即分离血清,置-70℃保存,待测脂联素。脂联素采用竞争性酶联免疫吸附试验测定。

1.3.2 免疫组化检测方法 免疫组化操作按产品使用说明书进行,Bcl-2 鼠抗人单克隆抗体稀释度 1:200,用 PBS 代替一抗作阴性对照。阳性结果呈棕黄色或棕褐色,Bcl-2 阳性细胞为胞浆显色。每张切片于高倍镜(×100)下显微照相,阳性细胞胞质为棕黄色,随机选 6 个视野,采用 Motic Images Advanced 3.0 图像分析软件检测其阳性信号平均光密度值。

1.3.3 RT-PCR 法检测乳腺癌组织中 Bcl-2 mRNA 表达 在 GenBank 中检索出基因 cDNA 序列,自行设计 PCR 引物。cDNA 合成中引物用 Random primers,总体积为 20 μL,反应条件:30℃ 10 min,55℃ 30 min,99℃ 5 min,5℃ 5 min。Bcl-2:上游引物:5'-TTG GAT CAG GGA GTT GGA AG-3';下游引物:5'-TGT CCC TAC CAA CCA GAA GG-3',295 bp; GAPDH:上游引物:5'-CCA CAG TCC ATG CCA TCA CT-3';下游引物:5'-TCC ACC ACC CTG TTG CTG TAG-3',451 bp。反应结束后取 5 μL 产物用 1.5% 琼脂糖凝胶(内含 EB)电泳,成像系统照相,然后用 ImageJ 图像分析软件分析各条带的灰度值,以目的基因对 GAPDH 的相对值记录结果,各标本重复 3 次,取平均值。

1.4 统计学处理 使用 SPSS13.0 统计软件对所得数据进行分析。所得数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

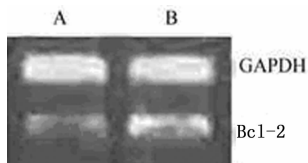
2.1 血清脂联素含量的测定 两组之间年龄差异无统计学意义($P > 0.05$),体质量指数差异有统计学意义($P < 0.05$);与正常体质量组比较,肥胖组血清脂联素的含量逐渐下降($P < 0.05$),见表 1。

表 1 两组血清脂联素含量的比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	年龄(岁)	BMI(kg/m ²)	脂联素(mg/L)
正常体质量组	37	49.45±6.07	19.35±4.65	7.46±1.04
肥胖组	45	51.32±7.65	28.11±5.53*	2.77±0.76*

*: $P < 0.05$,与正常体质量组比较。

2.2 各组乳腺组织中 Bcl-2 基因和蛋白表达情况 肥胖组乳腺组织 Bcl-2 mRNA 的相对表达量(0.56±0.12)与正常体质量组(0.36±0.08)比较,差异有统计学意义($P < 0.05$);肥胖组乳腺组织 Bcl-2 蛋白表达的平均光密度值(0.25±0.08)与正常体质量组(0.18±0.05)比较明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见图 1 和封 2 图 2、3。



A. 正常体质量组;B. 肥胖组。

图 1 两组 Bcl-2 mRNA 的表达

2.3 血清脂联素与肥胖乳腺癌组织中 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达的相关性分析 Spearman 相关分析表明,血清脂联素的含量与肥胖乳腺癌组织中 Bcl-2 mRNA 和蛋白的表达呈负相关($r^1 = -0.894$; $r^2 = -0.947$; $P < 0.05$)。

3 讨 论

脂联素是一种由脂肪细胞分泌的激素蛋白,其相对分子质

量为 28×10^3 ,在血浆中浓度为 $5 \sim 30 \mu\text{g/mL}$,脂联素作用于相应的靶组织,与其受体结合后具有增加胰岛素敏感性、调节糖脂代谢、抗炎、抗动脉粥样硬化的作用。因此,脂联素是目前研究发现的一种保护性细胞因子。大量的研究表明,脂联素对多种肿瘤如结肠直肠癌、前列腺癌、甲状腺癌、子宫内膜癌以及乳腺癌具有保护作用。Kumor 等^[6]研究表明,结肠直肠癌患者体内脂联素水平明显低于对照组,差异有统计学意义。体外细胞培养结果显示,MCF-7 乳腺癌细胞中存在脂联素受体,脂联素与受体结合后可以抑制 MCF-7 细胞系的增殖^[7-9]。也有研究证实,乳腺癌血清脂联素含量低于正常对照组^[10]。本研究结果显示,肥胖乳腺癌患者血浆脂联素含量明显低于正常体质量乳腺癌患者,差异有统计学意义,提示肥胖乳腺癌患者脂联素水平的降低可能与其肥胖性乳腺癌的发生、发展密切相关。

Bcl-2 是一种抑制凋亡的基因,具有抑制多种因素引起的细胞凋亡。Bcl-2 通过影响细胞的生存,在肿瘤细胞发生、发展方面有促进作用^[11]。许多研究证实,在人的多种肿瘤如乳腺癌、卵巢癌、肺癌、前列腺癌中均能检测到抗凋亡基因 Bcl-2 的表达,但具体机制尚未明确^[12-14]。有研究表明,Bcl-2 表达通常与好的生物学特性相关,在正常乳腺组织中 Bcl-2 基因呈强阳性表达,并且与恶性转化程度呈负相关,提示 Bcl-2 不仅抑制了细胞凋亡,而且还延长了细胞周期导致延迟肿瘤细胞的增殖^[15]。也有研究结果发现,Bcl-2 在正常组和乳腺单纯性增生组 100% 表达,乳腺非典型增生组表达率为 85.0%,乳腺癌组为 58.3%。本研究结果显示,肥胖相关性乳腺癌患者 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达明显高于正常体质量乳腺癌组,并且 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达呈正相关,提示抗凋亡基因 Bcl-2 在肥胖相关性乳腺癌患者癌组织中高表达促进了乳腺癌的发生、发展。

本研究亦发现,肥胖相关性乳腺癌患者血清脂联素含量与癌组织中 Bcl-2 mRNA 和蛋白表达呈负相关,说明乳腺癌的发生与脂联素含量降低引起的机体保护作用减弱有关,进一步提示脂联素含量的降低可能通过上调 Bcl-2 相关的信号通路促进乳腺癌的发生、发展,但确切机制有待于进一步深入研究。

参考文献:

[1] Carmichael AR. Obesity and breast cancer[J]. Obes Rev, 2006,7(4):333-340.
 [2] Yildirim A, Bilici M, Cayir K, et al. Serum adiponectin levels in patients with esophageal cancer[J]. Jpn J Clin Oncol, 2009,39(2):92-96.
 [3] Cust AE, Kaaks R, Friedenreich C, et al. Plasma adiponectin levels and endometrial cancer risk in pre and post menopausal women[J]. J Clin Endocrinol Metab, 2007,92(1):255-263.
 [4] Na SY, Myung SJ. Obesity and colorectal cancer[J]. Korean J Gastroenterol, 2012,59(1):16-26.
 [5] Rubenstein M, Hollowell CM, Guinan P. Effects of Bcl-2 suppression by antisense oligonucleotides on additional regulators of apoptosis compensatory change in non-targeted protein expression[J]. In Vivo, 2011,25(5):725-732.
 [6] Kumor A, Daniel P, Pietruczuk M, et al. Serum leptin, adiponectin, and resistin concentration in colorectal adenoma and carcinoma (CC) patients[J]. Int J Colorectal Dis, 2009,24(3):275-281.

的情况,为避免窦内血栓形成,术中有必要将骨折片取出^[13-14]。此时极易遇到大出血,发生危急情况。使用 CT 三维融合技术后,术前即可从不同角度观察静脉窦形态,辨识有无骨折碎片刺入静脉窦,使术者心中有数,并在术前做好相应器械和耗材的准备,设计适宜切口,预定手术步骤,必要时可提前作静脉窦的临时阻断或结扎^[15]。本组病例中 2 例均在取出骨片前对横窦破口两端作暂时性阻断,术中可以迅速行窦壁重建,最大限度减少出血,取得满意效果。

静脉窦跨性硬膜外血肿的临床症状与手术指征不同于普通的硬膜外血肿,即使血肿量小,也可因静脉窦受压而导致颅内压增高。通过 CT 三维融合技术,可以准确了解硬膜外血肿及静脉窦的具体情况,为下一步的处理提供参考。

参考文献:

- [1] Hayashi T, Kameyama M, Imaizumi S, et al. Acute epidural hematoma of the posterior fossa—cases of acute clinical deterioration[J]. *Amer J Emerg Med*, 2007, 25(9): 989-991.
- [2] Prat R, Galeano I. Posterior fossa venous epidural hematoma: based on 2 cases[J]. *Neurología (Barcelona, Spain)*, 2003, 18(1): 38-40.
- [3] 王德全, 蒲景礼. 横窦沟微型硬膜外血肿合并对冲性脑挫裂伤 14 例分析[J]. *中华神经医学杂志*, 2005, 4(1): 81-83.
- [4] Malik NK, Makhdoomi R, Indira B, et al. Posterior fossa extradural hematoma; our experience and review of the literature[J]. *Surg Neurol*, 2007, 68(2): 155-157.
- [5] Dirim BV, Orük C, Erdogan N, et al. Traumatic posterior fossa hematomas[J]. *Diagno interven radio (Ankara, Turkey)*, 2005, 11(1): 14-16.
- [6] Jang JW, Lee JK, Seo BR, et al. Traumatic epidural hematoma of the posterior cranial fossa[J]. *Bri J Neurosurg*, 2011, 25(1): 55-57.
- [7] Khwaja HA, Hormbrey PJ. Posterior cranial fossa venous extradural haematoma: an uncommon form of intracranial injury[J]. *Emerg Med*, 2001, 18(6): 496-499.
- [8] Yilmazlar S, Kocaeli H, Dogan S, et al. Traumatic epidural haematomas of nonarterial origin: analysis of 30 consecutive cases[J]. *Acta Neurochirurgica*, 2005, 147(12): 1241-1243.
- [9] Nakahara K, Shimizu S, Kitahara T, et al. Linear fractures invisible on routine axial computed tomography: a pit fall at radiological screening for minor head injury[J]. *Neurologia Medicochirurgica*, 2011, 51(4): 272-274.
- [10] Delgado Almandoz JE, Kelly HR, Schaefer PW, et al. Prevalence of traumatic dural venous sinus thrombosis in high risk acute blunt head trauma patients evaluated with multidetector CT venography[J]. *Radiology*, 2010, 255(2): 570-572.
- [11] Radulovic D, Janosevic V, Djurovic B, et al. Traumatic delayed epidural hematoma[J]. *Acta Neurochirurgica*, 2006, 67(1): 76-78.
- [12] 杜浩, 秦尚振, 郭再玉, 等. 幕上骨瓣开颅清除跨跨横窦硬膜外血肿[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2011, 12(7): 409-411.
- [13] Caplan JM, Khalpey Z, Gates J. Closed traumatic head injury: dural sinus and internal jugular vein thrombosis[J]. *Emerg Med*, 2008, 25(11): 777-779.
- [14] Matsushige T, Nakaoka M, Kiya K, et al. Cerebral sinovenous thrombosis after closed head injury[J]. *J Trauma*, 2009, 66(13): 1599-1602.
- [15] 何建青, 徐勤义, 蔡学见, 等. 骨瓣成形自体筋膜修补治疗窦汇区硬膜外血肿[J]. *中国临床神经外科杂志*, 2011, 16(8): 493-495.

(收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-03-22)

(上接第 2923 页)

- [7] Dieudonne MN, Bussiere M, Dos Santos E, et al. Adiponectin mediates antiproliferative and apoptotic responses in human MCF-7 breast cancer cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 345(1): 271-279.
- [8] Jardé T, Caldefie-Chézet F, Goncalves-Mendes N, et al. Involvement of adiponectin and leptin in breast cancer: clinical and in vitro studies[J]. *Endocr Relat Cancer*, 2009, 16(4): 1197-1210.
- [9] Nkhata KJ, Ray A, Schuster TF, et al. Effects of adiponectin and leptin co-treatment on human breast cancer cell growth[J]. *Oncol Rep*, 2009, 21(6): 1611-1619.
- [10] Yan WJ, Wu J, Mo J, et al. Plasma levels of adiponectin and tumor necrosis factor-alpha in children with obesity[J]. *Chin J Contemp Pediatr*, 2009, 11(1): 47-50.
- [11] Masir N, Campbell LJ, Goff LK. Bcl-2 protein expression in follicular lymphomas with t(14; 18) chromosomal translocations[J]. *Br J Haematol*, 2009, 144(5): 716-725.
- [12] Yao Q, Chen J, Lv Y, et al. The significance of expression of autophagy-related gene Beclin, Bcl-2, and Bax in breast cancer tissues[J]. *Tumour Biol*, 2011, 32(6): 1163-1171.
- [13] Gao Q, Yang S, Kang MQ. Influence of survivin and Bcl-2 expression on the biological behavior of non-small cell lung cancer[J]. *Mol Med Report*, 2012, 5(6): 1409-1414.
- [14] Anvari K, Seilanian Toussi M, Kalantari M, et al. Expression of Bcl-2 and Bax in advanced or metastatic prostate carcinoma[J]. *Urol J*, 2012, 9(1): 381-388.
- [15] Zhang D, Ma Q, Wang Z, et al. Beta2-adrenoceptor blockade induces G₁/S phase arrest and apoptosis in pancreatic cancer cells via Ras/Akt/NFkappaB pathway[J]. *Mol Cancer*, 2011, 10(1): 146-148.

(收稿日期: 2012-02-09 修回日期: 2012-03-22)