

线粒体凋亡相关因子在大鼠自发性乳腺肿瘤中的表达

张睿¹, 崔雨婷¹, 陈正礼^{1*}, 罗启慧¹, 祝春梅², 孙凤娇³, 陈梦鹿¹

(1. 四川农业大学动物医学院 实验动物疾病模型研究室, 四川雅安 625014;
2. 成都大学 新药评价研究所, 成都 610051; 3. 四川普莱美生物科技集团有限公司, 四川 雅安 625014)

【摘要】 目的 探讨SD大鼠自发性乳腺肿瘤中线粒体凋亡通路相关因子的表达情况及作用机制。方法 将130只(♀:♂=1:1)Sprague-Dawley(SD)大鼠于SPF屏障环境中饲养,收集大鼠自发性乳腺肿瘤组织,通过病理学检查对肿瘤进行定性并分类,分为3组:正常乳腺组织(I组),良性乳腺肿瘤组织(II组)和恶性乳腺肿瘤组织(III组)。分别使用RT-PCR法和免疫组织化学法检测各样品中AIF、Cyt C、APAF-1、caspase-3、XIAP的mRNA和蛋白的表达。结果 130只大鼠中有14只检出自发性乳腺肿瘤,肿瘤发生率为10.77%;其中7只发生乳腺纤维腺瘤,7只发生乳腺癌,良、恶性肿瘤发生率均为5.38%。免疫组化结果如下,与I组相比,II组中AIF、APAF-1、caspase-3蛋白表达显著降低($P < 0.01$),Cyt C、XIAP蛋白表达显著增强($P < 0.01$),III组中AIF、Cyt C、APAF-1、caspase-3蛋白表达均显著减弱($P < 0.01$),仅XIAP蛋白表达显著增强($P < 0.01$);与II组相比,III组中AIF、Cyt C、caspase-3蛋白表达显著减弱($P < 0.01$),APAF-1、XIAP蛋白表达显著增强($P < 0.01$)。RT-PCR结果中,除APAF-1的mRNA与蛋白表达显著相关($P < 0.05$),其余因子与免疫组化的结果极显著相关($P < 0.01$)。结论 乳腺肿瘤是SD大鼠常见的肿瘤,线粒体凋亡通路相关因子AIF、Cyt C、APAF-1、caspase-3、XIAP在乳腺肿瘤中的异常表达与肿瘤的发生发展密切相关。

【关键词】 自发乳腺肿瘤;SD大鼠;RT-PCR;免疫组化;肿瘤发生

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015)04-0375-07

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2015.04.009

Expression of mitochondrial apoptotic pathway-related factors in Sprague-Dawley rats with spontaneous mammary neoplasms

ZHANG Rui¹, CUI Yu-ting¹, CHEN Zheng-li^{1*}, LUO Qi-hui¹, ZHU Chun-mei², SUN Feng-jiao³, CHEN Meng-lu¹

(1. College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China;
2. Institute of New Drug Evaluation, Chengdu University, Chengdu 610051;
3. Sichuan Primed Biological Technology Co Ltd., Chengdu 625014)

【Abstract】 Objective To investigate the expression of AIF, CYT C, PAF-1, caspase-3, and XIAP in Sprague-Dawley rats with spontaneous mammary neoplasms. **Methods** One-hundred and thirty 3-4-week old SPF Sprague-Dawley rats (♀:♂=1:1) were fed in a specific pathogen free (SPF) breeding barrier for 60 weeks. The occurrence of spontaneous breast tumors was recorded and histopathology was performed to identify the types of tumors. The rats were divided into 3 groups: rats with normal breast tissue (group I), with benign tumors (group II) and with malignant tumors (group III). The expression of AIF, CYT C, APAF-1, caspase-3 and XIAP proteins and mRNAs were detected by immunohistochemistry (IHC) and RT-PCR assay. **Results** Among these 130 SD rats, 14 rats were observed having spontaneous mammary neoplasms with the incidence rate of 10.77% (14/130). In these neoplasm cases, 7 cases were mammary fibroadenomas, 7

【基金项目】 国家科技支撑计划课题(2014BAI03B01); 国家重大科学仪器设备开发专项(2013YQ49085906); 四川省青年科技创新研究团队项目(2013TD0015)。

【作者简介】 张睿(1990-),女,硕士研究生。454713547@qq.com。

【通讯作者】 陈正礼(1975-),男,教授,博士生导师, Tel: 13308168367, E-mail: chzhli75@163.com。

cases of breast carcinoma, both with an incidence rate of 5.38%. Immunohistochemistry showed that, compared with the group I, the positive expressions of AIF, APAF-1, caspase-3 were decreased significantly ($P < 0.01$), and the CYT C and XIAP expressions were significantly increased in the group II. The positive expression of all genes except XIAP was decreased in the group III ($P < 0.01$). Compared with the group II, APAF-1 and XIAP were significantly higher in the group III ($P < 0.01$), and the positive expression of AIF, Cyt C, and caspases-3 were significantly decreased ($P < 0.01$). In the results of RT-PCR assay, except APAF-1 which showed significant correlation with the results of immunohistochemistry ($P < 0.05$), all the others showed an extremely significant correlation with immunohistochemical results ($P < 0.01$).

Conclusions Mammary tumors are most common spontaneous neoplasms in SD rats. Abnormal expression of mitochondrial apoptotic pathway-related factors AIF, CytC, APAF-1, caspase-3, and XIAP are correlated with the carcinogenesis and development of breast tumors.

【Key words】 Spontaneous mammary neoplasms; Sprague-Dawley rat; RT-PCR; Mitochondrial apoptotic pathway-related factors; Immunohistochemistry; Tumorigenesis

乳腺肿瘤是全球女性最常见的恶性肿瘤之一,其发病率在世界范围内呈明显上升趋势^[1]。其防治越来越受到重视,乳腺肿瘤动物模型的制作对进一步研究乳腺肿瘤的病因、发病机理,从而对其进行有效预防、提高治疗效果将起到非常关键的作用^[2]。目前乳腺癌动物模型主要有自发性、诱发性、移植性这三类,相比较而言自发性乳腺肿瘤发生的条件比较自然,与人类患病过程更为相似,有利于观察肿瘤发生发展的影响因素。近年来的许多研究显示肿瘤的发生与细胞的凋亡密切相关,凋亡是肿瘤的一种普遍自发现象^[3]。线粒体凋亡通路为最经典的一条凋亡通路^[4],目前多数研究仅涉及 2~3 个线粒体凋亡通路相关因子在乳腺肿瘤中的表达,凋亡通路的作用机制仍需进一步探索。本实验通过免疫组织化学和实时荧光定量法,检测线粒体凋亡通路五个关键因子 AIF、Cyt C、APAF-1、caspase-3、XIAP 在正常乳腺组织和良性肿瘤、恶性肿瘤中蛋白和 mRNA 的表达情况,以多个因子综合表达情况来评价乳腺肿瘤的发生发展及预后将会更有意义,同时可以为靶向治疗、新药研发等方面提供指导和依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 3~4 周龄 SD 大鼠(♀:♂=1:1)共 140 只,来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司【SCXK(沪)2007-0005】。实验操作在雅安普莱美生物科技有限公司【SYXK(川)2014-186】。环境参数:温度:20~25℃,相对湿度:40%~70%,换气次数:10~15 次/小时,照明时间:每日 12 h/12 h 交替照明。经检疫剔除可能影响实验的大鼠,实

际 130 只,实验期间按实验动物使用原则给予人道的关怀。

1.1.2 主要试剂和仪器

石蜡组织切片机;电子天平;日本奥林巴斯光学生物显微镜;数显恒温搅拌循环水箱;电热恒温鼓风干燥箱;超净工作台;高速冷冻离心机;Mini-SUB 凝胶电泳装置;实时荧光定量 PCR 仪;GelDoc 2000 凝胶成像分析系统,多聚甲醛固定液,二甲苯、乙醇;苏木素;中性树胶;光学显微镜,恒温箱,磷酸盐缓冲液(PBS)、柠檬酸钠缓冲液、多聚赖氨酸、链霉亲和素-生物素复合物(SABC)试剂盒,Total RNA extractor (Trizol)试剂盒,反转录试剂盒(RT reagent kit with gDNA eraser),荧光定量 PCR 试剂盒(SYBR Premix Ex Taq)等。

1.2 方法

1.2.1 大鼠自发性乳腺肿瘤筛查

实验周期为 60 周。大鼠饲养在 SPF 屏障环境。13 周开始,每周全身触诊,记录肉眼可见或能触摸搭配的肿瘤出现时间、部位、大小、硬度、发展情况。观察期间死亡的大鼠均及时登记,60 周后麻醉后处死,剖检前禁食过夜,自由饮水,其后腹腔注射 2% 戊巴比妥进行麻醉(麻醉剂量为 40~60 mg/kg)。解剖,摘除瘤体,观察肿块质地外观,拍照记录,取少量保存于液氮用于 RT-PCR 检测,其余用 4% 甲醛固定。

1.2.2 组织病理学

常规石蜡包埋,切片 5 μm,苏木精伊红(HE)染色后于光镜下检查。所有乳腺肿瘤均经 3 位病理学专家进行病理学诊断,按照 2012 年由多个国家毒性病理学会联合发布的大鼠乳腺肿瘤分类标准进行分类^[5]。

1.2.3 免疫组织化学

多聚赖氨酸处理载玻片防止脱片,切片厚度 5

μm , 经二甲苯脱蜡, 梯度酒精脱水后用体积分数为 3% 的 H_2O_2 封闭 20 min, 微波法修复抗原, 体积分数为 5% 的 BSA 封闭液 37℃ 封闭 40 min, 滴加一抗, 4℃ 过夜, 滴加二抗, 37℃ 孵育 40 min, 滴加链亲和素-过氧化物酶 SABC 溶液, 37℃ 孵育 20 min。以上每次孵育完成后 (5% BSA 后除外) 均以 0.01 mol/L PBS (pH 7.4) 漂洗 3 次, 每次 5 min。孵育后入 DAB 蓝色显色液显色, 时间不超过 30 min, 期间在镜下观察, 掌握显色时间, 蒸馏水终止显色, 梯度酒精脱水, 二甲苯透明, 中性树胶封片。用 PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.4 RNA 提取

乳腺肿瘤组织经液氮研磨后, 参照说明书使用 RNA 提取试剂盒 (total RNA extractor, Sangon) 提取

表 1 实时荧光定量 PCR 的引物序列

Tab.1 Sequences of the real-time fluorescence quantitative PCR primers

基因 Genes	引物序列 (5' - 3') Primer sequences	产物长度/bp Product length	退火温度/℃ Annealing temperature
β -action	F 5' TGACGTTGACATCCGTAAAGACC 3'	116	57.6
	R 5' TGCTAGGAGCCAGGGCAGTAA 3'		
AIF	F 5' TTGGTCTGGTGGATAGTAGTTTGC 3'	162	59
	R 5' CAGGGTCACTGGGAGGGATT 3'		
APAF-1	F 5' GTGAAATGTTGCTCCTGGTCTGC 3'	172	62
	R 5' CAATCACTGCCAAATGGTCGTAG 3'		
Caspase-3	F 5' ATGCTTACTCTACCGCACCCG 3'	167	60
	R 5' GAAGGACTCAAATTCCTGGC 3'		
CYT C	F 5' ACCAAGAAGGAGATTGACCAGGAA 3'	114	59
	R 5' ACAGACACCGATCAGAATAACCCA 3'		
XIAP	F 5' GTGCAAGAAGCTATACGAATGGGA 3'	159	57.6
	R 5' CTGACTTGACTCATCCTGCCGAAT 3'		

1.2.6 统计分析

免疫组化每个组织每个因子选取 3 张切片, 每张切片随机选取 5 个视野, 在光镜 200 倍视野下测量阳性细胞积分光密度值, 取其平均值作为每个组织因子的最终数据。RT-PCR 结果用法计算相对含量, 并用来表示。

实验数据以平均值 \pm 标准差 ($X \pm SD$) 表示, 采用 SPSS 20.0 软件进行方差分析 (ANOVA) 和相关性双变量统计分析免疫组化和 RT-PCR 的值, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 自发性乳腺肿瘤发生情况

130 只 SD 大鼠中有 14 只检出自发性乳腺肿瘤, 雄性未发生, 肿瘤发生率为 10.77%, 其中乳腺纤维瘤 7 只, 7 只发生乳腺癌 (3 例乳腺腺癌, 2 例乳腺乳头状癌, 2 例浸润性导管癌)。乳腺肿瘤多发生

于胸部, 腹股沟及尿道口的乳腺处。肿块形态多呈分页状, 也有球形, 直径 1~7 cm 不等。HE 染色显示乳腺纤维瘤有明显的增生的间质结缔组织成分, 富含粘多糖, 围绕着小管, 少量透明样变 (图 1A)。

1.2.5 实时荧光定量 PCR

提取的 RNA 使用反转录试剂盒 (Prime script RT kit, TaKaRa) 反转录成 cDNA 并储存于 -20°C 。根据定量 PCR 采用实时荧光定量 PCR 仪 (Bio-Rad CFX96) 序列检测系统来进行。在含有荧光染料 (SYBR green II)、Mix、cDNA 以及上下游引物的 25 μL 总反应体系中, 进行如下扩增: 95℃ 预变性 3 min; 95℃ 变性 10 s; 退火温度见表 1 均为 30 s; 72℃ 延伸 10 s, 变性, 退火, 延伸共 40 个循环, 最后 72℃ 下延伸 10 min。引物序列及相关参数见表 1。PCR 产物特异性通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 基因表达量通过测定荧光信号来确定。

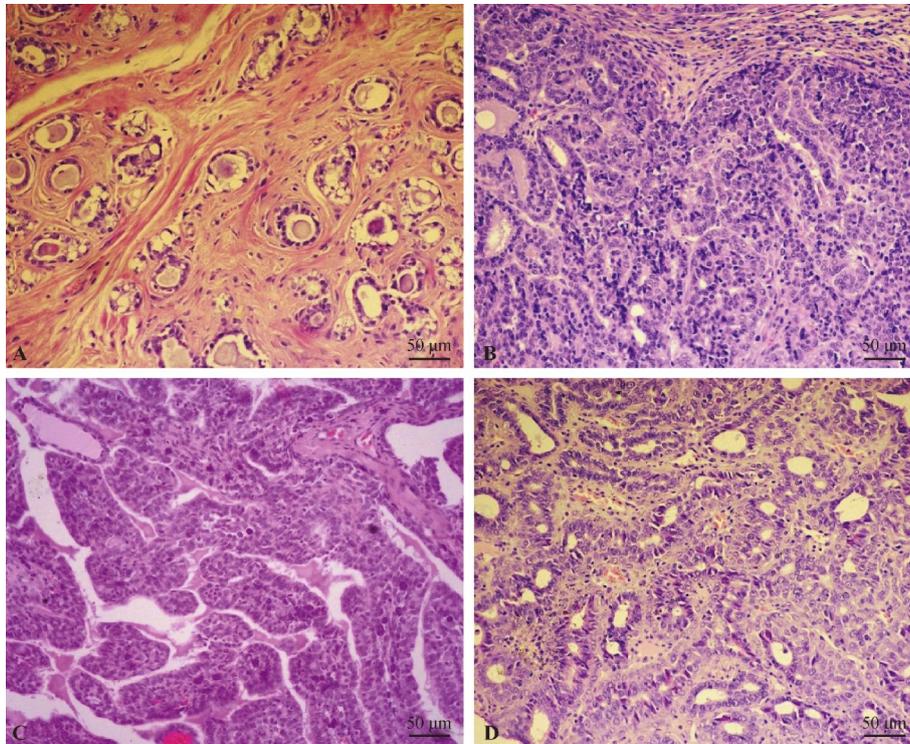
于胸部, 腹股沟及尿道口的乳腺处。肿块形态多呈分页状, 也有球形, 直径 1~7 cm 不等。HE 染色显示乳腺纤维瘤有明显的增生的间质结缔组织成分, 富含粘多糖, 围绕着小管, 少量透明样变 (图 1A)。乳腺腺癌肿瘤细胞主要以管状模式排列, 小管内壁增厚 1 到 2 倍, 细胞核染色深浅不一, 细胞核明显大小不均 (图 1B)。乳腺乳头状癌以多层的恶性上皮细胞群为特点, 高核质比, 有丝分裂数量增加, 纤维结缔组织和肌上皮细胞支持乳头状突起 (图 1C)。浸润性导管癌肿瘤细胞在管腔内壁生长并其向管周围的基质侵袭, 细胞多形性增加, 核质比增高, 细胞核大小不均明显 (图 1D)。

2.2 免疫组化结果

乳腺组织经 SABC 蓝色显色法显示各因子阳性物质呈蓝紫色 (图 2) 所示。各组形态学图像分析软件分析后结果如表 2 所示, 正常乳腺组织 (I 组) 与良性乳腺肿瘤组织 (II 组) 相比, AIF、APAF-1、

caspase-3 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.01$), Cyt c、XIAP 蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$); II 组与恶性乳腺癌肿瘤组织 (III 组) 相比, AIF、Cyt c、caspase-3 蛋白表达明显减弱 ($P < 0.01$), APAF-1、XIAP 蛋白表达显

著增强 ($P < 0.01$); I 组与 III 组比较, AIF、Cyt c、APAF-1、caspase-3 蛋白表达均明显减弱 ($P < 0.01$), 只有 XIAP 蛋白表达显著增强 ($P < 0.01$)。



注: A. 乳腺纤维腺瘤; B. 乳腺腺癌; C. 乳腺乳头状癌; D. 乳腺浸润性导管癌。

图 1 SD 大鼠自发性乳腺肿瘤 HE 染色

Note. A. Fibroadenoma; B. Adenocarcinoma; C. Papillary carcinoma; D. Infiltrating ductal carcinoma.

Fig. 1 Histological appearance of spontaneous mammary neoplasms in the SD rats. HE staining.

表 2 AIF、Cyt c、APAF-1、Caspase-3、XIAP 在 SD 大鼠乳腺各组中的表达 ($\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Expression of AIF, CYT C, APAF-1, caspase-3, and XIAP in the normal, benign and malignant tumor groups

组别 Grous	AIF	Cyt C	Apaf-1	Caspase-3	XIAP
正常组 ($n=5$) Normal group	12.74 ± 0.83	2.34 ± 0.33	9.87 ± 1.91	6.60 ± 0.04	3.75 ± 0.68
良性肿瘤 ($n=7$) Benign tumor group	4.18 ± 0.65 *	6.63 ± 0.79 *	2.71 ± 0.98 *	4.43 ± 0.10 *	8.52 ± 1.47 *
恶性肿瘤 ($n=7$) Malignancy group	3.06 ± 0.72 *	1.64 ± 0.19 *	5.16 ± 0.91 *	3.03 ± 0.11 *	15.21 ± 1.4 *

注: * 表示与正常组相比差异有显著性 ($P < 0.05$)。

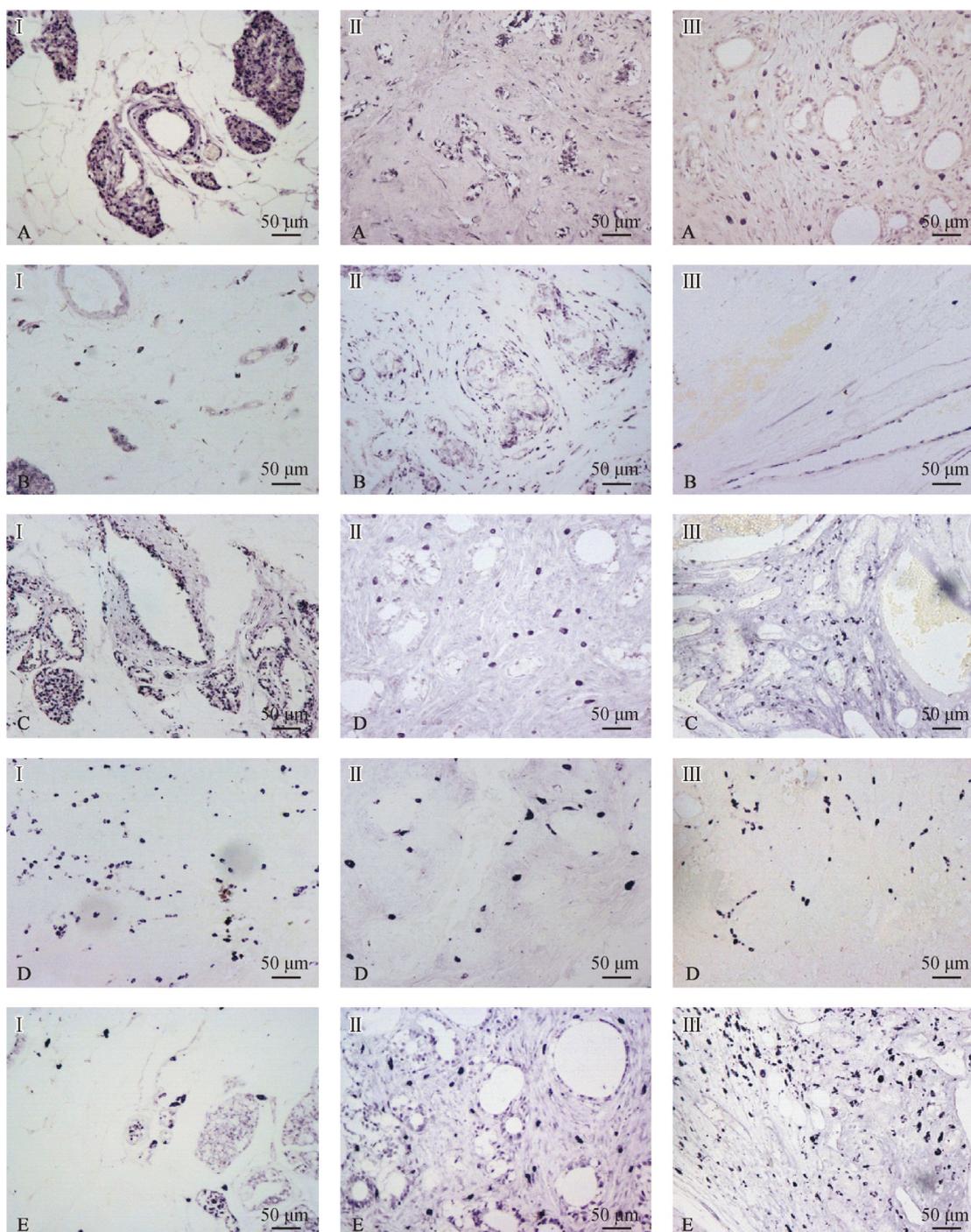
Note: * Difference is significant ($P < 0.05$) in comparison with the normal group.

2.3 mRNA 相对表达结果

荧光定量 PCR 检测各因子在 I、II、III 组中相对表达量如图 3 所示, 与 I 组相比, AIF、APAF-1、CASPASE-3 在 II、III 组中的表达均呈逐渐降低趋势, 差异有显著性 ($P < 0.01$); XIAP 在 II 组中相对表达量为 (1.28 ± 0.14), 表达明显升高 ($P < 0.05$), 在 III 组中相对量为 (2.21 ± 0.39), 表达极显著升高 ($P < 0.01$)。相对于 I 组, CYT C 在 II 组表达增

加 29%, 但在 III 组中减少了 54%, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。

免疫组化结果通过 RT-PCR 得到证实 (表 3), 对目的基因的 mRNA 的表达量与蛋白的表达量进行相关性分析, 发现 APAF-1 的 mRNA 表达与蛋白表达显著相关 ($P < 0.05$), 其余因子 mRNA 相对表达与蛋白表达呈相关一致性, 极显著相关 ($P < 0.01$)。



注：I：正常组织；II：良性肿瘤；III：恶性肿瘤。

图 2 目的基因在不同组中 SABC 免疫组化染色

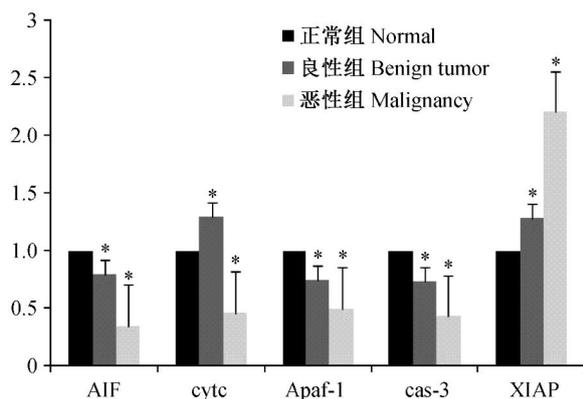
Note: I: Normal group; II: Benign tumor group; III: Malignant tumor group. A: AIF; B: Cyt C; C: APAF-1; D: Caspase-3; E: XIAP

Fig. 2 Target genes in different groups. Immunohistochemical SABC staining

表 3 目的基因 mRNA 表达量与蛋白表达量相关性

Tab. 3 Relationship between the target genes mRNA and protein levels

因子 Factors	AIF	Cyt C	Apaf-1	Caspase-3	XIAP
相关系数 Correlation coefficient	0. 793	0. 737	0. 532	0. 862	0. 932
P 值 P value	<0.01	<0.01	<0.05	<0.01	<0.01



注: *表示与正常组相比差异表达有显著性($P < 0.05$)。

图3 I、II、III组中AIF、Cyt c、APAF-1、CASPASE-3、XIAP的相对定量

Note. * Difference is significant ($P < 0.05$) in comparison with the normal group.

Fig. 3 The relative quantity of AIF, Cyt c, APAF-1, caspase-3 and XIAP in the 3 groups

3 讨论

实验动物自发性肿瘤在国外研究相对成熟,国内对SPF级的SD大鼠自发性乳腺肿瘤的报道也比较少。赵磊等^[6]的研究中显示10~16月龄的200只SD大鼠(♀:♂=3:1)的自发性乳腺肿瘤的发病率为10.5%,马超亚等^[7]的研究中则显示24月龄的400只雌性SD大鼠自发性肿瘤的发生率可达到46.5%。本实验选取的为130只SD大鼠(♀:♂=1:1),解剖时为63周龄,肿瘤发病率为10.77%,另有文献中的报道,随着大鼠周龄的增加,雌性大鼠内分泌功能逐渐紊乱,雌激素水平增高,导致乳腺肿瘤的发生^[5]。本研究看出乳腺肿瘤普遍雌性发病率较高,雄性发病率极少,与人类乳腺肿瘤发病特点相似,随着年龄的增长,乳腺肿瘤发病率不断升高,提示年龄及雌激素确实对乳腺肿瘤的发生起到促进作用。

凋亡诱导因子(apoptosis-inducing factor, AIF)是近来被发现的一种位于线粒体内的黄素蛋白,它定位于线粒体双层膜间区^[8]。AIF可通过线粒体外膜转移进入细胞核,引起染色质凝缩和DNA的大规模断片化^[8-10]从而引起细胞凋亡。相关研究显示,AIF在不同的肿瘤组织中表达不尽相同,丁静丽等^[11]发现AIF在肝癌组织中的表达相对于正常肝组织显著降低,而Urbano等^[12]在实验中发现AIF在结肠癌组织中表达远高于正常组织。而本文中AIF在乳腺肿瘤中的表达明显弱于正常乳腺组织($P < 0.01$),并且随着肿瘤分化程度降低而降低,提示

乳腺肿瘤发生后,凋亡受到抑制,AIF作为促凋亡因子,其表达逐步受到抑制,提示肿瘤逐渐恶化。AIF不仅一种DNA内切酶,还是一种氧化还原酶,从前人及本文中可以看出,它在不同组织及不同肿瘤中表达变化存在差异,仍需进一步研究其具体机制。

细胞色素C的释放是线粒体凋亡途径中的主要步骤^[13-15]。当细胞受到凋亡信号刺激时,细胞色素C可以从线粒体释放进入细胞质,启动胱蛋白酶活化^[16]。陈振栋等^[17]研究显示Cyt c在乳腺癌组织中表达显著高于正常组织。而在本实验中,在良性肿瘤组织中,与正常组相比细胞色素C的表达显著增加了($P < 0.01$),而在恶性肿瘤组织中,其比正常组的表达显著降低($P < 0.01$)。这可能是由于在乳腺肿瘤刚发生时,细胞异常增殖分化的同时,机体的抗肿瘤免疫系统也在增强,抑癌基因的表达产物可增加细胞色素C的含量,促进其释放入胞浆激活caspase级联反应,以增加细胞凋亡;而到恶性肿瘤时可能由于细胞异型性大,细胞器发育不良,线粒体储存和释放细胞色素C功能障碍,凋亡受到抑制,肿瘤恶化。

细胞色素C释放后第一步即与凋亡蛋白酶激活因子(APAF-1)结合。APAF-1与细胞色素C结合的复合物与ATP/dATP的结合激发其多聚化进而形成凋亡体(apoptosome)^[18],活化caspase家族,诱导凋亡发生。王海燕等^[19]研究显示APAF-1在鼻内翻乳头状瘤中表达显著低于正常组织。但目前,乳腺肿瘤中未见APAF-1的相关研究报道。本实验发现通过RT-PCR检测APAF-1基因的mRNA在乳腺肿瘤中的表达明显低于正常乳腺组织,恶性肿瘤中表达进一步下调,但在免疫组化中蛋白表达在肿瘤组织明显低于正常乳腺组织,但在恶性肿瘤组织中表达要明显高于良性肿瘤组织;即在良性肿瘤组织中mRNA的表达升高了,但蛋白的表达降低,这可能是由于蛋白的表达滞后于mRNA,也可能是肿瘤细胞中APAF-1作为促凋亡蛋白受到抑制,而mRNA对抑制产生了反馈所以有所上调。

半胱天冬酶-3(caspase-3)属于半胱氨酸基天冬氨酸基-特异性蛋白酶,是介导细胞凋亡的一类蛋白水解酶。而凋亡蛋白抑制剂(IAP)可以抑制线粒体活化,它能直接结合、抑制效应caspase-3的作用,IAP是唯一内源性caspase抑制物,而XIAP(X chromosome-linked inhibitor of apoptosis)是IAP家族蛋白中对胱氨酸天冬蛋白酶最有效的抑制剂^[21, 22]。刘

聪等^[23]研究发现 caspase-3 在乳腺纤维瘤中的表达显著高于乳腺癌。Yang 等^[24]研究表明, XIAP 在乳腺癌细胞系呈高表达, 而在正常乳腺上皮细胞系低表达。本实验免疫组化和荧光定量的检测结果一致显示在正常乳腺组织, 良性肿瘤, 恶性肿瘤中, Caspase-3 的表达逐步降低, 而 XIAP 的表达逐步升高, 与前人研究一致, 提示二者有拮抗关系, XIAP 高表达和 caspase-3 低表达可能为乳腺癌预后不良的指标。

乳腺肿瘤严重影响患者的身心健康及正常生活, 乳房切除术和化疗成为乳腺治疗的主要方法。虽然在乳腺治疗方面已经取得了很大的进步, 仍旧有约 70% 的病人由于肿瘤细胞的迅速增殖和骨转移而无法手术^[25]。因此迫切需要寻找对抗乳腺肿瘤的新方法。肿瘤以细胞快速无限增殖为特点, 即打破了细胞死亡和细胞增值的平衡, 细胞凋亡受到一定抑制。从本文结果可看出 AIF、Cyt C、APAF-1、caspase-3、XIAP 作为线粒体凋亡通路相关因子在正常组、良性肿瘤、恶性肿瘤组间表达有明显差异 ($P < 0.01$), 提示线粒体凋亡通路参与乳腺肿瘤的发生与发展, 因此可综合多因子的表达情况来预测乳腺肿瘤的发生及判断乳腺肿瘤的发展。同时根据各因子的表达趋势, 可以考虑使用运用分子生物学技术上调 AIF、CYT C、APAF-1、caspase-3, 下调 XIAP, 促进肿瘤细胞凋亡, 达到辅助治疗的效果, 以此为契机, 为肿瘤新药研发、靶向治疗提供依据与指导。

参 考 文 献

- [1] DeSantis C, Ma J, Bryan L, et al. Breast cancer statistics, 2013 [J]. CA Cancer J Clin, 2014, 64(1): 52–62.
- [2] 杨桂仙, 张大方. 乳腺癌动物模型的研究现状与评价 [J]. 长春中医药大学学报, 2007, 23(02): 82–83.
- [3] 李娜, 高俊岩, 刘敏. 细胞凋亡和肿瘤的关系研究进展 [J]. 当代医学, 2009, 15(16): 13–14.
- [4] 赵彦超, 顾耘. 细胞凋亡通路研究进展 [J]. 现代医学, 2013(04): 285–288.
- [5] Rudmann D, Cardiff R, Chouinard L, et al. Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse mammary, Zymbal's, preputial, and clitoral glands [J]. Toxicol Pathol, 2012, 40(6 Suppl): 7S–39S.
- [6] 赵磊, 谷长勤, 张万坡, 等. SPF 级大鼠自发性乳腺肿瘤的流行病学与病理学特点 [J]. 中国实验动物学报, 2007(02): 116–119.
- [7] 马超亚, 宋向荣, 高洪彬, 等. 雌性 SD 大鼠自发性乳腺肿瘤发生情况及其生存分析 [J]. 中国职业医学, 2013(06): 505–510.
- [8] Miseviciene L, Anusevicius Z, Sarlauskas J, et al. Redox reactions of the FAD-containing apoptosis-inducing factor (AIF) with quinoidal xenobiotics: a mechanistic study [J]. Arch Biochem Biophys, 2011, 512(2): 183–189.
- [9] Scovassi A I, Soldani C, Veneroni P, et al. Changes of mitochondria and relocation of the apoptosis-inducing factor during apoptosis [J]. Ann N Y Acad Sci, 2009, 1171: 12–17.
- [10] Hangen E, Blomgren K, Benit P, et al. Life with or without AIF [J]. Trends Biochem Sci, 2010, 35(5): 278–287.
- [11] 丁静丽. Smac 和 AIF 基因在肝癌细胞中的表达及与细胞凋亡关系的试验研究 [D]. 华中科技大学, 2007.
- [12] Urbano A, Lakshmanan U, Choo P H, et al. AIF suppresses chemical stress-induced apoptosis and maintains the transformed state of tumor cells [J]. EMBO J, 2005, 24(15): 2815–2826.
- [13] Stevens JM. Cytochrome c as an experimental model protein [J]. Metallomics, 2011, 3(4): 319–322.
- [14] Gustavsson T, Trane M, Moparthi VK, et al. A cytochrome c fusion protein domain for convenient detection, quantification, and enhanced production of membrane proteins in Escherichia coli—expression and characterization of cytochrome-tagged Complex I subunits [J]. Protein Sci, 2010, 19(8): 1445–1460.
- [15] Huttemann M, Helling S, Sanderson TH, et al. Regulation of mitochondrial respiration and apoptosis through cell signaling: cytochrome c oxidase and cytochrome c in ischemia/reperfusion injury and inflammation [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1817(4): 598–609.
- [16] Liu X, Kim CN, Yang J, et al. Induction of apoptotic program in cell-free extracts: requirement for dATP and cytochrome c [J]. Cell, 1996, 86(1): 147–157.
- [17] 陈振栋. 乳腺癌中线粒体钙、细胞色素 C 与乳腺细胞凋亡的研究 [D]. 佳木斯大学, 2004.
- [18] Zou H, Li Y, Liu X, et al. An APAF-1-APAF-1-cytochrome c multimeric complex is a functional apoptosome that activates procaspase-9 [J]. J Biol Chem, 1999, 274(17): 11549–11556.
- [19] 王海燕. XIAP 与 Apaf-1 在鼻内翻性乳头状瘤中的表达及意义的研究 [D]. 佳木斯大学, 2011.
- [20] Holcik M, Korneluk RG. XIAP, the guardian angel [J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2001, 2(7): 550–556.
- [21] Eckelman BP, Salvesen GS, Scott FL. Human inhibitor of apoptosis proteins: why XIAP is the black sheep of the family [J]. EMBO Rep, 2006, 7(10): 988–994.
- [22] 刘聪, 周晟, 阮秋蓉. 线粒体促凋亡因子 Omi/HtrA2 在乳腺癌中的表达及意义 [J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 2005, 14(4): 434–438.
- [23] Yang L, Cao Z, Yan H, et al. Coexistence of high levels of apoptotic signaling and inhibitor of apoptosis proteins in human tumor cells: implication for cancer specific therapy [J]. Cancer Res, 2003, 63(20): 6815–6824.
- [24] Tao M, Ma D, Li Y, et al. Clinical significance of circulating tumor cells in breast cancer patients [J]. Breast Cancer Res Treat, 2011, 129(1): 247–254.