

· 论 著 ·

三氧化二砷对 615 系小鼠皮下移植性胃癌的抗癌作用及机制研究

梁 军*, 战淑珺, 赵园园, 沈方臻, 姚如永, 丁爱萍, 尚庆军

(青岛大学医学院附属医院肿瘤治疗研究中心, 青岛 266003)

[摘要] **目的:** 观察不同剂量三氧化二砷(As_2O_3)对于实体型胃癌移植瘤 615 系小鼠模型的抑瘤及诱导凋亡作用。**方法:** 40 只 615 系小鼠皮下注射鼠前胃癌细胞株 MFC 建立移植瘤模型, 然后随机分为 5 组, 每组各 8 只。分别在腹腔内注射 5-Fu、生理盐水及不同剂量的 As_2O_3 ($1, 2, 4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$), 给药 8 d, 末次给药 24 h 后计算抑瘤率, 流式细胞术观察凋亡率, 透射电镜观察凋亡细胞超微结构, 免疫组化半定量分析凋亡调控基因 Bcl-2、Bax 的表达情况。**结果:** As_2O_3 对移植瘤生长有明显抑制作用, 表现为瘤细胞超微结构出现凋亡征象且凋亡率增加, 以 $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组作用最明显; 免疫组化显示 As_2O_3 作用下 Bcl-2 基因阳性细胞数降低, Bax 阳性细胞数则上升。**结论:** As_2O_3 主要是通过诱导细胞凋亡对荷胃癌鼠皮下移植瘤具有明显抑制作用。

[关键词] 三氧化二砷; 胃肿瘤; 细胞凋亡**[中图分类号]** R 735.2 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2004)08-0858-04

Anti-tumor effect and mechanisms of arsenic trioxide on subcutaneously implanted gastric cancer in 615 in-breeding mice

LIANG Jun*, ZHANG Shu-jun, ZHAO Yuan-Yuan, SHEN Fang-Zhen, YAO Ru-Yong, DING Ai-Ping, SHANG Qing-Jun (Department of Oncology, The Affiliated Hospital, Medical College, Qingdao University, Qingdao 266003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To study the anti-tumor and apoptosis-inducing effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on solid stomach carcinoma in transplanted tumor 615 mice models. **Methods:** Forty 615 mice were inoculated with mouse fore-stomach carcinoma cell line (MFC) to build transplanted tumor animal models. Mice were then randomly divided into 5-Fu, NS, and As_2O_3 groups of different concentrations ($1 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, $4 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) ($n=8$). The drugs were given for 8 d and 24 h after final-administration, the tumor inhibition rate (TIR) was calculated, the apoptosis rate was determined by flow cytometry (FCM), the ultramicrostructure of cells was observed with transmission electron microscope, and the expressions of apoptosis-regulated genes, Bcl-2 and Bax were determined by immunohistochemistry. **Results:** As_2O_3 significantly inhibited the growth of transplanted tumor, resulting in apoptotic ultramicrostructure and increased apoptosis rate, especially in $2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ group. Immunohistochemistry showed that As_2O_3 down-regulated Bcl-2 protein and up-regulated the expressions of Bax. **Conclusion:** As_2O_3 significantly inhibits the transplanted tumor growth in mice bearing stomach carcinoma, mainly through inducing cell apoptosis.

[KEY WORDS] arsenic trioxide; stomach neoplasms; cell apoptosis

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2004, 25(8): 858-861]

三氧化二砷(As_2O_3)抑制肿瘤细胞生长的作用, 已成功地在多种肿瘤细胞株的体外实验中得以验证(包括血液系统肿瘤及多种实体瘤)^[1,2]。目前临床上主要用于急性早幼粒细胞白血病(APL)的治疗, 疗效显著^[3]。已有资料证实, As_2O_3 对体外培养的胃癌细胞株亦有明显抑制增殖作用, 且抑制程度呈浓度与时间依赖性, 其机制为诱导胃癌细胞凋亡^[4]。但对体内动物模型实验及用于临床尚未见相关报道。本实验通过建立小鼠胃癌皮下移植瘤模型, 观察 As_2O_3 的抑瘤作用, 以进一步了解其体内抗癌活性, 并就其作用机制进行初步探讨, 以期寻找药物治疗胃癌的新途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂 近交系 615 小鼠 40 只, 雌、雄各半, 体质量 18~22 g, 5 周龄, 由中国协和医科大学肿瘤医院动物室提供; 小鼠前胃低分化癌细胞株 MFC 由中国协和医科大学基础所提供。 As_2O_3 试剂购自美国 Sigma 公司, 5-Fu 注射液购自天津金耀氨基酸有限公司, Bcl-2、Bax 检测试剂盒购自美国 Santa Cruz 公司。

[基金项目] 国家中医药管理局立项课题(00-01LL13)。**[作者简介]** 梁 军(1959-), 男(汉族), 博士, 副主任医师。

*Corresponding author. E-mail: zyyqd@yahoo.com.cn

1.2 胃癌动物模型的建立 MFC经615系小鼠皮下种植成瘤,肿瘤长至 1 cm^3 左右时,断颈处死小鼠,分离肿瘤。选取边缘部生长良好的瘤组织,在RMPI 1640培养液中剪成碎块,过滤成细胞悬液, Hank's液洗2次,血细胞计数板上锥虫蓝染色法证实活细胞率95%以上,将细胞密度调成 $1.5 \times 10^7/\text{ml}$ 细胞悬液备用。取MFC细胞悬液 0.2 ml ,种植于每只小鼠右腋下皮下。

1.3 动物分组及用药 将40只动物随机分为5组,每组8只。阴性对照组予等体积生理盐水(NS组);阳性对照组予5-Fu $10\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ [5](5-Fu组);另外3组分别予1、2、4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ As_2O_3 。均于接种肿瘤24 h后开始给药,每天腹腔灌注药物,共8 d。其中 As_2O_3 $4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组2只小鼠于用药第2天腹腔注射药物结束后数秒钟即抽搐而死。立即尸解,腹腔内有内出血,并对主要脏器做病理组织学切片检查,未见明显中毒迹象。考虑为注射时误伤腹主动脉导致出血。其余组小鼠至实验结束前均存活。

1.4 抑瘤率观察 末次给药24 h后断颈处死全部小鼠[6]。解剖小鼠取出肿瘤,去除脂肪纤维组织,称量,计算抑瘤率 $\text{TIR} = (1 - \text{实验组瘤重}/\text{对照组瘤重}) \times 100\%$ [7]。

1.5 流式细胞术检测细胞凋亡 将部分瘤组织制成单细胞悬液,离心去除碎片,PBS洗涤后,离心分离细胞。蛋白酶消化,PI染色,Cellquest3.1f收集细胞,Modfit2.0软件分析数据。

1.6 胃癌组织免疫组化分析 Bcl-2及Bax基因表达 取部分瘤组织制成病理切片,参照免疫组化试剂盒步骤操作,以PBS代替一抗作阴性对照。免疫组化阳性结果判断[5]:Bcl-1及Bax基因产物均为细胞质和细胞膜着色,呈棕黄色或褐色为阳性细胞。高倍镜下随机取5个视野,计数阳性细胞数,取平均值。阳性细胞数小于1%为(-),5%~15%为(+),15%~50%为(++),大于50%为(+++)。

1.7 透射电镜观察 取部分瘤组织用2.5%戊二醛固定,脱水,浸透,环氧树脂812包埋,电子染色,超薄切片,电镜下观察瘤组织超微结构变化。

1.8 统计学处理 计量资料数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,多样本均数比较采用方差分析,各组均数间两两比较用Student-Newman-Kewls法,半定量资料采用Ridit分析。

2 结果

2.1 对肿瘤生长的抑制作用 NS组、5-Fu组、1、2、4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ As_2O_3 组平均瘤重分别为(1.58 ± 0.15)、(0.91 ± 0.18)、(0.99 ± 0.16)、(0.64 ± 0.11)和(1.05 ± 0.13)g;抑瘤率分别为0、42.41%、37.34%、59.49%和33.54%。各组平均瘤重较NS组显著降低($P < 0.01$),可见 As_2O_3 及5-Fu均可明显抑制荷瘤鼠肿瘤生长。2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 As_2O_3 组抑瘤率最明显,其瘤重显著低于其他各组($P < 0.01$)。而小剂量($1\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)或大剂量($4\text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$) As_2O_3 组瘤重均与5-Fu组无显著性差异。提示 As_2O_3 在体内的抑瘤作用存在最适剂量,2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组作用最明显。

2.2 肿瘤细胞凋亡观察 FCM分析可见, As_2O_3 组及5-Fu组均有凋亡的特征表现——亚 G_1 峰出现,从而证实 As_2O_3 及5-Fu均可诱导胃癌细胞的凋亡。NS组、5-Fu组、1、2、4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ As_2O_3 组凋亡率分别为(8.33 ± 1.39)%、(15.51 ± 1.57)%、(12.65 ± 1.84)%、(21.06 ± 3.21)%和(14.74 ± 2.10)%。 As_2O_3 组及5-Fu组胃癌细胞凋亡率大于NS组($P < 0.01$)。不同剂量的 As_2O_3 对细胞凋亡的诱导作用不同,以中等剂量2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组诱导凋亡率最高,与其余各组比较差别均有显著统计学意义($P < 0.01$)。4 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 组凋亡率与5-Fu组比较无显著性差异,进一步提示中等剂量2 $\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ 的 As_2O_3 为诱导细胞凋亡作用的最适剂量。

2.3 凋亡相关蛋白变化 经免疫组化染色后,Bcl-2及Bax表达产物均为胞膜及胞质着色。光学显微镜下可见,小鼠皮下移植瘤的胃癌细胞呈浸润性生长,侵达附近骨骼肌细胞(可见骨骼肌细胞中有典型癌细胞浸润,细胞异型性明显,核分裂像多见),符合低分化癌的生物行为特点。按照前述方法判断各组Bcl-2及Bax基因表达的免疫组化染色结果(图1和图2)。免疫组化半定量结果见表1。NS组Bcl-2基因阳性细胞数明显高于5-Fu组及 As_2O_3 组($P < 0.05$)。证明5-Fu及 As_2O_3 均可下调凋亡抑制基因Bcl-2的表达。5-Fu组及 As_2O_3 组Bax基因阳性细胞数明显高于NS组($P < 0.05$)。证明5-Fu及 As_2O_3 均可上调凋亡活性基因Bax表达。

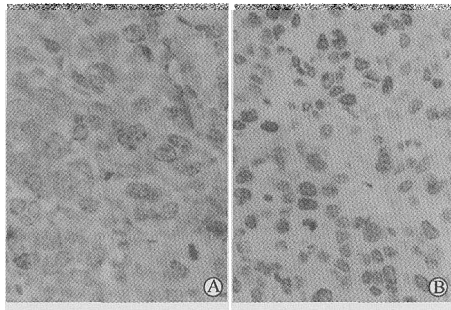


图 1 免疫组化 SP 法 Bcl-2 的表达

Fig 1 Expression of Bcl-2 by immunohistochemistry (×400)

A: NS group(+++); B: 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ As₂O₃ group(-)

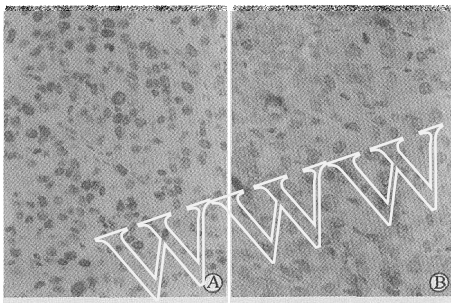


图 2 免疫组化 SP 法 Bax 的表达

Fig 2 Expression of Bax by immunohistochemistry (×400)

A: NS group(-); B: 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ As₂O₃ group(+++)

表 1 5 组动物 Bcl-2、Bax 蛋白半定量结果比较

Tab 1 Semiquantitative results of Bcl-2 and Bax protein in 5 groups

Group	Bcl-2 expression mice number				Bax expression mice number			
	-	+	++	+++	-	+	++	+++
NS	0	1	2	5	4	2	2	0
5-Fu	4	2	1	1	1	2	3	2
As ₂ O ₃								
1 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	3	2	2	1	1	2	2	3
2 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	5	2	1	0	0	1	3	4
4 mg · kg ⁻¹ · d ⁻¹	3	2	1	0	0	1	3	2

2.4 透射电镜观察 As₂O₃组及 5-Fu 组均见凋亡细胞超微结构特征:细胞体积缩小,细胞膜完整,胞质浓缩,电子密度高,线粒体扩张成空泡状。细胞内染色质呈新月状边聚或呈团块状聚集(图 3)。

3 讨论

本实验在体外实验的基础上,构建胃癌细胞株 MFC 的动物模型进行体内研究,用不同剂量的 As₂O₃ 加以干预,依然发现 As₂O₃ 对体内肿瘤组织有抑制生长的作用,并且剂量不同,其抑制作用也不

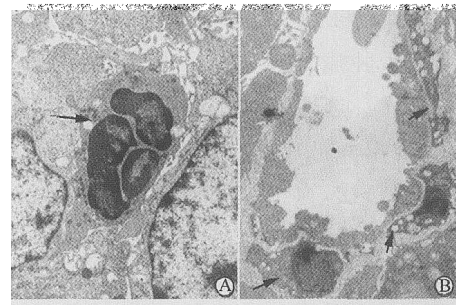


图 3 透射电镜下肿瘤细胞凋亡的超微结构

Fig 3 Tumor cells showing apoptotic ultrastructure under transmission

electron microscope (×15 000)

A: Chromatin pyknosis; B: Apoptosis image

同。与体外实验所不同的是,As₂O₃ 的体内作用并不是完全的量-效关系,而是存在着最适剂量。这一点通过免疫组化和 FCM 检测得以证实。FCM 检查发现凋亡率在 As₂O₃ 作用组随浓度不同而有差异,以 2 mg · kg⁻¹ · d⁻¹ 组凋亡率最高,为 (21.06 ± 3.21)%,与 5-Fu 组的 (15.51 ± 1.57)% 相对照,差别有显著性意义 (P < 0.01),从而证实中等剂量 As₂O₃ 诱导凋亡能力高于 5-Fu,并且成为最适剂量。而该浓度是根据临床取得成功经验的 APL 患者常用量 10 mg · d⁻¹,由小鼠与人体表面积换算推算而来。从而从侧面证实临床剂量适当,为今后用于实体瘤的治疗提供了实验依据。但为什么会存在最适剂量的问题,其机制是什么,还有待于今后的进一步研究。

另外,本实验中 5-Fu 组及 As₂O₃ 组均在 FCM 检测时有典型的亚 G₁ 峰,证实二者均有诱导凋亡的特性。并且在透射电镜下亦观测到 As₂O₃ 组细胞有特征性凋亡形态,说明其体内抗胃癌作用的机制是诱导肿瘤细胞的凋亡。顾琴龙等^[8]研究 As₂O₃ 与传统化疗药 5-Fu 对胃癌细胞株 MKN45 的作用,FCM 均显示二者有典型亚 G₁ 峰,并且 As₂O₃ 诱发的胃癌细胞凋亡率高于 5-Fu,与本实验结果一致。

细胞凋亡是一种主动的受基因调控的细胞自杀过程。许多人体基因,如 P53、C-myc、Bcl-2 家族等参与凋亡的调控,其中 Bcl-2 基因家族尤为重要,被看作是细胞凋亡调控的最后共同通路之一。Bcl-2 家族中,Bcl-2 高表达可通过广泛抑制各种刺激剂(如化疗药物、放射线、肿瘤坏死因子等)诱导的细胞凋亡,延长细胞活力而发挥生物学作用。Bax 是凋亡活化基

因,与 Bcl-2 有 21% 的同源性。既可形成 Bax/Bax 同二聚体,诱发凋亡;又可形成 Bax/Bcl-2 异二聚体,阻遏 Bcl-2 的抑制凋亡效应。本实验用免疫组化半定量观察发现,不同剂量 As_2O_3 均可下调凋亡抑制基因 Bcl-2 蛋白表达,上调凋亡活性基因 Bax 蛋白表达,这可能是诱导胃癌细胞凋亡的分子机制。涂水平等^[4]观察其对不同胃癌细胞系作用后基因 P53、C-myc、Bcl-2、Bcl-xl、Bcl-xs 等的表达变化,结果显示, As_2O_3 能明显下调 SGC-7901 细胞的 Bcl-2 蛋白和 mRNA 表达,以诱导凋亡,也支持本实验结果。

综上所述, As_2O_3 对体内胃癌实体瘤动物模型有良好抑瘤作用及诱导凋亡效应。但 As_2O_3 是否对体内人胃癌细胞也有较好的杀伤作用,其机制是否也为诱导细胞凋亡,值得进一步研究。

【参考文献】

- [1] 蔡洪培,邓志华,李石,等. As_2O_3 诱导人胃癌细胞凋亡的研究[J]. 第二军医大学学报,1999,20(9):636-639.
Cai HP, Deng ZH, Li S, et al. As_2O_3 induces apoptosis of human gastric cancer cells[J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 1999, 20(9): 636-639.
- [2] 高勇,贾绍昌,王杰军,等. 三氧化二砷诱导人胰腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 第二军医大学学报,2001,22(1):43-46.
Gao Y, Jia SC, Wang JJ, et al. Experimental study on arsenic trioxide-induced apoptosis of human pancreatic cancer cell line [J]. *Di-er Junyi Daxue Xuebao (Acad J Sec Mil Med Univ)*, 2001, 22(1): 43-46.
- [3] 张鹏,王树叶,胡龙虎,等. 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞性白血病七年总结—附 242 例分析[J]. 中华血液学杂志,2000,21(2):67-70.
Zhang P, Wang SY, Hu LH, et al. Seven years' summary report on the treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide—An analysis of 242 cases [J]. *Zhonghua Xueyexue Zazhi (Chin J Hematol)*, 2000, 21(2): 67-70.
- [4] 涂水平,江石湖,谭继宏,等. 三氧化二砷诱导胃癌细胞凋亡及相关基因表达的影响[J]. 肿瘤,2001,21(5):327-330.
Tu SP, Jiang SH, Tan JH, et al. Effect of arsenic trioxide on apoptosis and apoptosis related genes in gastric cancer cells [J]. *Zhongliu (Neoplasia)*, 2001, 21(5): 327-330.
- [5] 陈洪,秦叔達,潘麟声,等. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志,2002,8(1):27-29.
Chen H, Qin SK, Pan LS, et al. Antitumor effect of arsenic trioxide on mice experimental liver cancer [J]. *Zhonghua Ganzangbing Zazhi (Chin J Hepatol)*, 2002, 8(1): 27-29.
- [6] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991,512-515.
- [7] Mervis J. Ancient remedy perform trick[J]. *Science*, 1996, 273(5275):578.
- [8] 顾琴龙,沈佰华,李宁丽,等. 氧化砷诱发胃癌细胞株凋亡的初步研究[J]. 中华消化杂志,1998,18(2):69-71.
Gu QL, Shen BL, Li NL, et al. A preliminary study on arsenic trioxide induced apoptosis of gastric cancer lines [J]. *Zhonghua Xiaohua Zazhi (Chin J Digestion)*, 1998, 18(2): 69-71.

[收稿日期] 2004-02-03

[修回日期] 2004-07-23

[本文编辑] 曹静

• 个案报告 •

肺隔离症一例报告

Pulmonary sequestration: a case report

王宁,王雅杰(第二军医大学长海医院肿瘤科,上海 200433)

【关键词】肺隔离症;肺肿瘤;诊断;鉴别

【中图分类号】R 563

【文献标识码】B

【文章编号】0258-879X(2004)08-0861-01

1 临床资料 患者,女,48岁。因右乳腺癌术后入院。患者于2003年4月无明显诱因出现右乳疼痛,至当地医院检查发现右乳外上象限约2 cm×2 cm肿块,乳腺钼靶片检查提示为右乳癌。于2003年4月30日行右乳改良根治术,术中冰冻病理检查为:右乳浸润性导管癌。术后病理:右乳浸润性导管癌,腋窝淋巴结9/12转移,右锁骨上淋巴结2/2转移。临床分期为ⅢA期。患者于2003年5~9月接受6周期TA方案的辅助化疗,具体用药为多西紫杉醇120 mg 第1天+表阿霉素80 mg 第1天。2003年6月16日到2003年7月22日行右侧胸壁和右侧锁骨下区分别放疗50 Gy。患者多次入院检查胸部正侧位片均未发现明显异常,2003年7月27日常规行胸部CT发现左肺下叶软组织密度影,大小为3.5

cm×2.5 cm,考虑为左肺下叶内后基底段转移。1个月后再行胸部CT复查,发现左下肺后基底段圆形结节灶,大小无明显变化,且见病灶的供血动脉直接来自降主动脉(图1),患者无任何呼吸系统的不适感觉。经过临床医师的综合考虑认为患者肺部病灶并非为肺转移性肿块,而应是较为少见的肺隔离症。

2 讨论 肺隔离症(pulmonary sequestration)为一种先天性的疾病,表现为一部分肺组织与正常肺分离,单独发育
(下转第864页)

【作者简介】王宁(1978-),女(汉族),硕士生,住院医师。
E-mail: winne.sh@hotmail.com