

三氧化二砷对胰腺癌 BXPc-3 细胞移植瘤的体内抑制作用

蔡 宝, 魏为添, 刘 岸, 金洲祥, 林胜璋

(温州医学院附属第二医院 外科, 浙江 温州 325027)

摘 要:目的 探讨三氧化二砷在体内对胰腺癌 BXPc-3 细胞移植瘤的抑制作用, 并探讨其初步机制。方法 建立胰腺癌裸鼠移植瘤模型, 随机分为 4 组: 模型组、低剂量、高剂量 (2.5、5.0 mg/kg) 三氧化二砷组和吉西他滨组, 各组 ip 给药, 作用 2 周后, 检测实验前后裸鼠体质量变化, 观察药物对肿瘤生长的影响, 免疫组化检测肿瘤细胞增殖因子 ki-67 的表达, TUNEL 法检测移植瘤组织的细胞凋亡。结果 给药 2 周后, 各组裸鼠体质量变化差异不显著, 三氧化二砷和吉西他滨均可抑制裸鼠移植瘤的体积和质量, 且三氧化二砷 (5 mg/kg) 组作用较强; 免疫组化结果显示三氧化二砷可明显降低细胞增殖因子 ki-67 的阳性表达; TUNEL 检测表明三氧化二砷可明显诱导移植瘤肿瘤细胞凋亡。结论 三氧化二砷可抑制胰腺癌 BXPc-3 细胞在裸鼠体内的生长; 作用机制可能为抑制肿瘤细胞增殖及促进肿瘤细胞凋亡。

关键词:三氧化二砷; 胰腺癌; 细胞凋亡; 移植瘤

中图分类号:R286.1

文献标识码:A

文章编号:0253-2670(2010)01-0090-04

胰腺癌为临床上常见的消化系统肿瘤, 切除率低, 预后极差, 因此化疗成为当前临床上治疗胰腺癌的重要手段之一。吉西他滨 (健择) 被公认为是目前治疗晚期胰腺癌最好的药物, 然而其对许多患者的疗效仍较差, 而且价格昂贵, 难以长期使用。三氧化二砷 (As_2O_3) 是一种新型的抗肿瘤药物, 研究表明, 三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病 (APL) 效果良好^[1], 并对许多实体肿瘤如肝癌、胃癌也有较强的凋亡诱导作用^[2], 但对胰腺癌的治疗研究国内外报道较少, 且主要集中于体外实验, 本研究旨在以人类胰腺癌 BXPc-3 细胞株为靶细胞, 探讨其在体内的抗肿瘤作用及其初步机制, 希望能为临床治疗胰腺癌提供实验及理论依据。

1 材料

1.1 细胞株: 人胰腺癌 BXPc-3 细胞株 (中国科学院细胞库提供), 培养于含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养液中。

1.2 药品与试剂: 0.1% 亚砷酸注射液 (As_2O_3) (10 mL/10 mg/支, 哈尔滨伊达药业有限公司), 使用前以 RPMI 1640 培养液稀释至所需浓度; 吉西他滨, 法国 Lilly 公司, 批号: A447927A; ki-67 抗体、TUNEL 试剂盒购于北京中杉金桥生物技术公司。

1.3 动物: 4~6 周龄健康 BALB/c 雌性小鼠购于中国科学院上海实验动物中心。

2 方法

2.1 模型建立、分组及给药方法: 选择 4~6 周龄的雌性 BALB/c 裸鼠, 将 1×10^7 个 BXPc-3 细胞悬浮于 0.2 mL NS 中, 将细胞悬液注射至裸鼠右侧背部。待肿瘤细胞接种后的第 28 天将裸鼠随机分为 4 组, 每组 6 只, 三氧化二砷两个剂量 (2.5、5.0 mg/kg) 组, 吉西他滨组的药物剂量为 80 mg/kg, 模型组给予生理盐水, 各组均 ip 给药。

2.2 指标测定: 实验期间, 每周测量 1 次瘤块的长径 (a) 与短径 (b), 并记录动物体质量。计算瘤块体积 (V , $V = ab^2/2$), 绘制肿瘤生长曲线, 同时绘制动物体质量变化曲线。实验第 42 天时处死动物, 剥离瘤块, 称取瘤质量, 计算抑瘤率 [抑瘤率 = $(1 - \text{给药组平均瘤质量} / \text{模型组平均瘤质量}) \times 100\%$]。

2.3 肿瘤组织病理学检测: 取固定好的肿瘤组织, 经脱水、透明、浸蜡、包埋切片后, 行常规病理染色, 光镜下观察各组裸鼠肿瘤的组织病理学改变。

2.4 免疫组化分析肿瘤组织中细胞增殖因子 ki-67 的表达: 石蜡切片常规脱蜡水化, 按照二步法试剂盒所示的操作步骤进行染色, 切片经脱水、透明、封片、镜检后, 图片结果用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件进行分析。

2.5 TUNEL 法检测肿瘤细胞凋亡: 石蜡切片常规脱蜡水化, 按照 TUNEL 试剂盒所示的操作步骤进行操作, 切片经脱水、透明、封片、镜检后, 图片结果用 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件进行分析。

① 收稿日期: 2009-08-10

基金项目: 浙江省科技厅资助项目 (2006C33031)

作者简介: 蔡 宝 (1984—), 男, 安徽六安人, 硕士研究生, 住院医师。Tel: 15888409913 E-mail: cb5516@163.com

*通讯作者 林胜璋 E-mail: wzf21sz@163.com

2.6 统计学处理:应用 SPSS 14.0 软件包进行统计分析,组间差异采用多个样本均数两两比较的 q 检验。

3 结果

3.1 各组移植瘤裸鼠体质量的变化:在实验期间,各组动物的体质量变化不大。实验结束时,各组动物体质量与实验初期相比略有增加,各组间比较,差异不显著 ($P > 0.05$),见图 1。

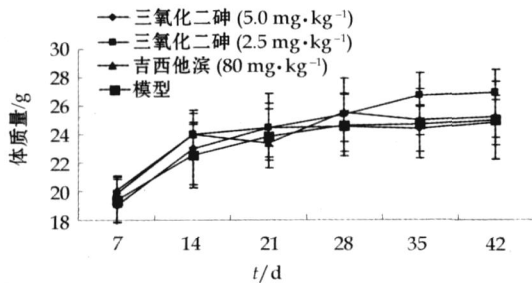


图 1 各组荷瘤小鼠体质量变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Changes of body weight in every group of tumor-bearing mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

3.2 三氧化二砷对胰腺癌裸鼠移植瘤的生长抑制作用:实验期间,各组裸鼠移植瘤体积变化结果见图 2。可见,模型组肿瘤体积增长较快,而三氧化二砷和吉西他滨组肿瘤生长较缓慢,说明三氧化二砷及吉西他滨均可抑制移植瘤的生长;各组瘤质量结果见表 1,三氧化二砷高剂量组抑瘤率达 57.20%;结果表明三氧化二砷高剂量组抑瘤效果较强。

3.3 肿瘤组织病理学观察:取固定后的肿瘤组织,石蜡切片,常规 HE 染色后,显微镜下观察肿瘤组织的病理学变化。可以看到模型组肿瘤组织血管丰富,肿瘤细胞增殖活跃,细胞核不规则缺乏极性,核仁明显;吉西他滨组肿瘤细胞出现部分坏死,血管减少,细胞轮廓稍显模糊,核仁不太明显;三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组中部分肿瘤细胞出现空泡样变化,且有向腺管分化的倾向,三氧化二砷 (5.0 mg/kg) 组上述变化更为明显,坏死细胞增多,细胞轮廓更为模糊,且部分细胞呈腺管状分面 (图 3)。

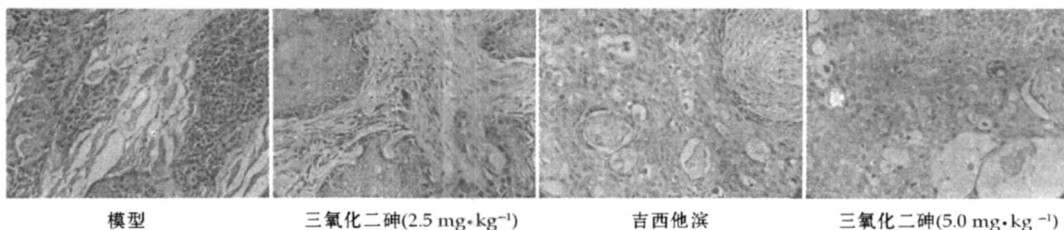
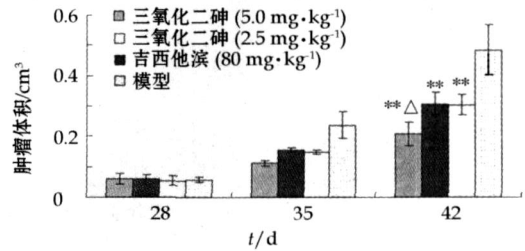


图 3 各组裸鼠移植瘤组织的病理学变化

Fig. 3 Pathologic changes of tumor tissues from BXP-3 xenografts in every group of nude mice



与模型组比较: ** $P < 0.01$

与三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组或吉西他滨组比较: $\Delta P < 0.05$

* $P < 0.01$ vs model group

$\Delta P < 0.05$ vs As_2O_3 (25 mg/kg) group or Gemcitabine group

图 2 三氧化二砷对胰腺癌 BXP-3 裸鼠移植瘤体积的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 2 Effects of As_2O_3 on volume of pancreatic carcinoma BXP-3 xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

表 1 三氧化二砷对胰腺癌 BXP-3 裸鼠移植瘤生长的抑制作用 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

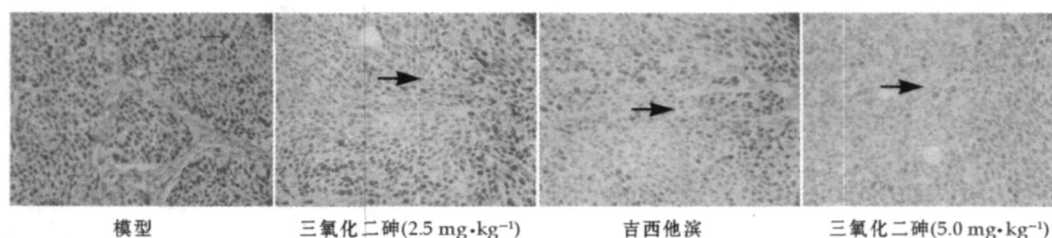
Table 1 Inhibition of As_2O_3 on growth of human pancreatic cancer BXP-3 xenografts in nude mice ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	肿瘤质量/g	抑瘤率/%
模型	0	0.480 ± 0.030 7	0
吉西他滨	80	0.297 ± 0.009 1 *	37.07
三氧化二砷	2.5	0.307 ± 0.021 4 *	36.38
	5	0.160 ± 0.018 7 *	57.20

与模型组比较: * $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs model group

3.4 三氧化二砷对肿瘤组织中细胞增殖因子 ki-67 表达的影响:ki-67 阳性细胞比例用累积吸光度 (A) 值来表示 (A 值越大,ki-67 阳性细胞比例越大)。结果表明,三氧化二砷能够抑制肿瘤细胞中 ki-67 的表达,并呈现剂量效应关系:三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组 A 值为 157.2 ± 7.26、吉西他滨组 A 值为 147.8 ± 13.42 和三氧化二砷 (5.0 mg/kg) 组 A 值为 66.8 ± 5.49,与模型组 A 值 (222.6 ± 23.96) 相比,明显减小 ($P < 0.01$);其中三氧化二砷 (5.0 mg/kg) 组又低于三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组和吉西他滨组 ($P < 0.05$),而三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组和吉西他滨组比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 4)。



箭头所指为 ki-67 阳性细胞

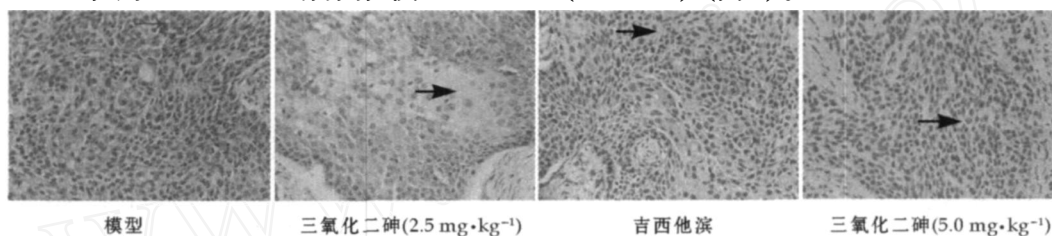
Arrows show positive cells of ki-67

图 4 免疫组化检测裸鼠移植瘤组织中 ki-67 表达的变化

Fig. 4 Immunohistochemical analysis of ki-67 expression in pancreatic cancer BXPC-3 xenografts in nude mice

3. 5 三氧化二砷诱导肿瘤细胞凋亡: TUNEL 染色阳性细胞表现为胞浆不着色, 胞核染成棕褐色, 核固缩, 染色质浓聚, 图片经过 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件分析后, TUNEL 阳性细胞比例用累积吸光度值 (IOD) 来表示 (IOD 值越大, TUNEL 阳性细胞比例越大), 实验结果显示, 三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组 IOD 值为 70.5 ± 5.82 、吉西他滨组 IOD

值为 68.5 ± 5.61 和三氧化二砷 (5.0 mg/kg) 组 IOD 值为 240.7 ± 7.00 , 与模型组 IOD 值为 25.7 ± 6.71 相比, 明显增加 ($P < 0.01$); 其中三氧化二砷 (5.0 mg/kg) 组大于三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组和吉西他滨组 ($P < 0.05$), 而三氧化二砷 (2.5 mg/kg) 组和吉西他滨组间比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$) (图 5)。



箭头所指为 TUNEL 阳性细胞

Arrows show positive cells of TUNEL

图 5 TUNEL 法检测各组裸鼠移植瘤细胞的凋亡情况

Fig. 5 Detection of apoptosis in BXPC-3 xenografts in every group of nude mice by TUNEL assay

4 讨论

几十年来, 胰腺癌的 5 年生存率几乎没有变化, 仍然低于 5%, 这主要是与其内在的生物学特性及缺乏特异的早期诊断指标有关。目前只有 10% 左右的患者在就诊时获得手术切除的机会, 且切除后的 5 年生存率仍然低于 20%, 因此迫切需要非手术治疗的药物, 而近年来的研究结果显示三氧化二砷为临床上治疗胰腺癌提供了新的希望。

三氧化二砷又称亚砷酸, 是中药砒霜的主要有效成分, 具有以毒攻毒的生物学功效, 是一种历史悠久的中医矿物药。近年来, 已有大量关于三氧化二砷应用于白血病治疗的研究, 该药主要是通过诱导白血病细胞分化和凋亡从而发挥抗肿瘤作用^[3]。但三氧化二砷对实体瘤的治疗^[4], 特别是对胰腺癌的治疗效果尚未见较多研究, Li 等^[5]的体外研究结果显示, 三氧化二砷可通过抑制肿瘤细胞增殖促进肿瘤细胞凋亡, 从而发挥其抗胰腺癌的作用, 此后 Li

等^[6]进一步的研究表明, 三氧化二砷促进胰腺癌细胞凋亡的作用是通过阻滞细胞周期、激活 caspase 以及改变 GADD 的表达而实现。

本研究以 BXPC-3 细胞株建立体内人胰腺癌裸鼠移植瘤动物模型, 干预 2 周后三氧化二砷组和吉西他滨组移植瘤体积和质量均显著低于模型组, 提示三氧化二砷具有抑制人胰腺肿瘤形成和生长的作用, 且具有剂量依赖性。Xiao 等^[7]的研究也显示, 三氧化二砷可以抑制人胃癌细胞在裸鼠体内的形成和生长, 与本实验结果一致。细胞过度增殖是肿瘤形成的生物学基础, ki-67 是一种核蛋白, 仅在增生细胞中合成和表达, 为 DNA 合成和复制所必需, 亦是反映细胞增殖活性的常用指标。本实验中三氧化二砷组 ki-67 阳性表达率显著低于模型组, 且三氧化二砷高剂量组 ki-67 阳性表达率均低于另两个给药组, 提示三氧化二砷可能是通过抑制肿瘤增殖而发挥抗癌作用。Mohamad 等^[8]的研究也发现 ki-67

在胰腺癌肿瘤细胞增殖过程中发挥极其重要的作用,而化疗药物通过对 ki-67 因子的调节发挥其抗癌作用。诱导肿瘤细胞凋亡是药物治疗肿瘤的重要途径之一。利用脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记 (TUNEL) 技术,对裸鼠肿瘤组织中的凋亡细胞进行观察和比较,在本实验中三氧化二砷处理组与模型组相比,凋亡细胞明显增多,提示三氧化二砷可诱导肿瘤细胞凋亡,从而抑制肿瘤的发生、发展。李利等^[9]研究发现三氧化二砷组中 TUNEL 细胞的阳性率较模型组明显增加,通过诱导 HL-60 肿瘤细胞凋亡发挥其抗肝癌效应。

本研究主要证实了三氧化二砷的体内抗肿瘤作用,对其作用机制的研究只处于初步探讨阶段,也缺乏同期进行的体外对照研究,这有待于下一步研究实现。

综上所述,作为一种新型的抗癌药物,三氧化二砷与吉西他滨作用相当,且高剂量的三氧化二砷显示出更强的抗癌效应,此种作用主要通过抑制肿瘤细胞增殖及促进肿瘤细胞凋亡而实现,至于其具体的作用机制尚需进一步研究明确。

参考文献:

[1] Grimwade D, Jovanovic J V, Hills R K, et al. Prospective

minimal residual disease monitoring to predict relapse of acute promyelocytic leukemia and to direct pre-emptive arsenic trioxide therapy [J]. *J Clin Oncol*, 2009, 27(22): 3650-3658.

[2] Cheng B, Yang X, An L, et al. Arsenic trioxide-induced apoptosis of Hep-2 cell line through modulating intracellular glutathione (GSH) level [J]. *Auris Nasus Larynx*, 2009, 10(24): 1011-1016.

[3] 钱晓萍,刘宝瑞,殷海涛,等. 氧化砷对 MR2 细胞耐药转运分子作用的研究 [J]. *中华肿瘤杂志*, 2004, 26(10): 601-605.

[4] Monzen H, Griffin R J, Williams B W, et al. Study of arsenic trioxide-induced vascular shutdown and enhancement with radiation in solid tumor [J]. *Radiat Med*, 2004, 22(4): 205-211.

[5] Li X, Ding X, Adrian T E. Arsenic trioxide inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells [J]. *Anticancer Res*, 2002, 22(4): 2205-2213.

[6] Li X, Ding X, Adrian T E. Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle, caspase activation, and GADD expression [J]. *Pancreas*, 2003, 27(2): 174-179.

[7] Xiao Y F, Liu S X, Wu D D, et al. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer [J]. *World J Gastroenterol*, 2006, 12(36): 5780-5786.

[8] Mohamad N A, Cricco G P, Sambuco L A. Aminoguanidine impedes human pancreatic tumor growth and metastasis development in nude mice [J]. *World J Gastroenterol*, 2009, 15(9): 1065-1071.

[9] 李利,孟凡义,扶云碧,等. 砷替佐米或联合三氧化二砷治疗 HL-60 白血病细胞移植瘤裸鼠的实验研究 [J]. *南方医科大学学报*, 2007, 27(10): 1504-1506.

制首乌总多糖对骨髓抑制贫血小鼠脾脏促红细胞生成素受体和转录因子 GATA-1 mRNA 表达的影响

冯雪梅¹, 祝彼得¹, 吕艳²

(1. 成都中医药大学基础医学院, 四川 成都 610075; 2. 四川大学华西基础与法医学院, 四川 成都 610041)

摘要:目的 观察制首乌总多糖 (PPS) 对放、化疗所致骨髓抑制贫血小鼠脾脏促红细胞生成素受体 (EpoR) 及转录因子 GATA-1 mRNA 表达的影响,探讨 PPS 补血作用的分子机制。方法 建立骨髓抑制贫血小鼠模型,提取 PPS,经 ip 给药,观察其对骨髓抑制贫血小鼠外周血及脾脏 EpoR 和 GATA-1 mRNA 表达的影响。结果 PPS 能促进骨髓抑制贫血小鼠外周血象恢复,并明显上调脾脏 EpoR 和 GATA-1 mRNA 的表达。结论 PPS 能通过促进 EpoR 和 GATA-1 mRNA 的表达,从而促进骨髓抑制贫血小鼠造血功能的恢复。

关键词:制首乌总多糖; 骨髓抑制; 贫血小鼠; 促红细胞生成素受体 (EpoR); GATA-1

中图分类号: R286.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2010)01-0093-04

造血生长因子通过与造血细胞表面的受体结合,从而通过多种信号转导途径,影响靶基因在细胞中的表达,调控造血细胞的存活、增殖、分化与凋亡。

制首乌具有补肝肾、益精血的作用,既往研究表明,制首乌总多糖 (PPS) 能促进骨髓抑制贫血小鼠造血祖细胞增殖、增加骨髓有核细胞数^[1]。本实验通

① 收稿日期:2009-03-19

基金项目:国家自然科学基金资助项目 (30271661)

作者简介:冯雪梅(1964—),女,四川省成都人,博士,副教授,主要从事中西医结合基础研究。

Tel: (028) 88046486 E-mail: fxmcd@yahoo.com.cn