

文章编号:1005-6947(2005)06-0441-07

· 实验研究 ·

三氧化二砷与阿霉素对人肝癌细胞株 HepG2 中 survivin 表达的影响

李志红^{1,2}, 王志明¹, 穆拉德¹

(1. 中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008; 2. 湖南省郴州市第一人民医院 普通外科, 湖南 郴州 423000)

摘要:目的 探讨三氧化二砷与阿霉素诱导肝癌细胞凋亡的可能机制。方法 用不同浓度的 As₂O₃ 或/和 ADM 干预人肝癌细胞株 HepG2 不同时间,以免疫细胞化学和 RT-PCR 方法检测 HepG2 细胞中 survivin 表达的改变。结果 (1) 未加药物干预之前, HepG2 细胞中可见 survivin 强烈表达; (2) 不同浓度的 As₂O₃ 或 ADM 均可降低 HepG2 细胞 survivin 表达程度,并且随药物浓度的增加或作用时相的延长,降低程度更明显;浓度与时相之间存在交互作用; (3) ADM 降低 HepG2 细胞 survivin 表达的作用比 As₂O₃ 更明显,两者联用后,作用进一步增强。结论 (1) 单用 As₂O₃ 或 ADM 均可降低 HepG2 细胞中 survivin 表达,并呈浓度和时间依赖性; (2) 相同浓度下, ADM 对 HepG2 细胞中 survivin 表达的减弱作用较 As₂O₃ 更强,但两者的联用较单用者能更显著降低 survivin 表达; (3) As₂O₃ 和 ADM 可能通过下调 survivin 表达而参与诱导癌细胞凋亡,从而发挥其抗癌作用;两者联用有叠加抗癌作用,从而可降低各自的临床使用剂量。

关键词: 肝肿瘤/药物治疗; 三氧化二砷/治疗应用; 阿霉素/治疗应用; 细胞株 HepG2; survivin 蛋白; 细胞凋亡

中图分类号: R735.7; R329.21

文献标识码: A

Effects of arsenic trioxide and adriamycin on survivin expression in hepatocellular carcinoma cell line HepG2

LI Zhi-hong^{1,2}, Wang Zhi-ming¹, Morad¹

(1. Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha, 410008, China; 2. Department of General Surgery, The First People's Hospital, Chenzhou, Hunan 423000, China)

Abstract: **Objective** To investigate potential mechanism of arsenic trioxide (As₂O₃) and/or adriamycin (ADM) induces apoptosis in hepatocellular carcinoma (HCC) cells. **Methods** Human hepatocellular carcinoma cells, HepG2, were treated with As₂O₃ combined with/without ADM in various concentrations for various time, and then the expression of survivin was detected by immunocytochemistry and RT-PCR respectively. **Results** (1) Before the cells were interfered with drugs, survivin was highly expressed in HepG2 cells. (2) Expression of survivin was reduced in cells treated with various concentrations of As₂O₃ or ADM, and the reduction was dependent on drug concentration and time, these two factors were interrelated. (3) Expression of survivin was reduced more markedly in cells treated with ADM than in those treated with As₂O₃ and the reduction was additionally increased in cells treated with a combination of the two compounds. **Conclusions** (1) Either As₂O₃ or ADM can downregulate the expression of survivin in HepG2 cells in a concentration- or time-dependent manner; (2) At the same concentration, ADM is more effective than As₂O₃ on the downregulation of survivin expression in HepG2 cells, but the effect can be enhanced by combination of these two drugs. (3) As₂O₃ and ADM may induce apoptosis in HepG2 cells through the downregulation of survivin expression and thus exert their anti-cancer effect. Their combination may enhance their anti-tumor effect, so that in clinical use, the dosage of each drug may be reduced.

基金项目:湖南省自然科学基金资助项目(04jj6047)。

收稿日期:2005-02-18; **修订日期:**2005-04-14。

作者简介:李志红(1971-),男,湖南嘉禾人,湖南省郴州市第一人民医院主治医师,硕士,主要从事普通外科肿瘤方面的研究。

通讯作者:李志红 电话:13517351731(手机); E-mail:lance007@126.com。

Key words: Liver neoplasms/drug ther; Arsenic Trioxide/ther use; Adriamycin/ther use; Cell Line HepG2; Survivin; Apoptosis
CLC number: R735.7; R329.21 **Document code:** A

survivin 是最新鉴定的一种凋亡抑制蛋白,其在凋亡过程中发挥重要作用。本研究在人肝癌细胞株中检测三氧化二砷(As_2O_3)或/和阿霉素(ADM)干预后凋亡抑制蛋白 survivin 的表达,探讨其治疗肝癌的分子作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要材料和设备

(1)人肝癌细胞株 HepG2:中南大学湘雅医学院肿瘤研究所提供。(2)三氧化二砷(As_2O_3):伊尔达[®]亚砷酸注射液,10mg/10mL,哈尔滨伊达药业有限公司。(3)阿霉素(ADM):盐酸阿霉素,10mg,浙江海正药业股份有限公司。(4)兔多克隆 survivin 抗体:Abcam 公司。(5)羊抗兔抗体:LAB VISION 公司。(6)细胞裂解液:TRIZOL[®] Reagent, 100mL, Invitrogen life technologies。(7)逆转录试剂盒:RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit, Fermentas LIFE SCIENCES。(8)Taq 酶、dNTP: Fermentas LIFE SCIENCES)。(9) survivin 引物及 GAPDH (内参照)引物:华大基因上海鼎安生物科技有限公司。(10) CO₂ 培养箱: TABAI ESPEC 公司。(11) PCR 仪: Ependorf 公司。(12)凝胶成像分析系统: Gene 公司。

1.2 研究方法步骤

1.2.1 细胞培养 采用人肝癌细胞株系 HepG2, 以含体积分数 10% 新生小牛血清和青霉素、链霉素各 100U/ml 的 RPMI-1640 培养基,在 37℃、CO₂ 浓度 5%、饱和湿度条件下培养,细胞贴壁生长,每 3~4d 传代 1 次。

1.2.2 药物干预分组 (1) As_2O_3 组:按药物浓度再分为 5 组 [A1 组 (0.25 μg/mL)、A2 组 (0.5 μg/mL)、A3 组 (1.0 μg/mL)、A4 组 (2.0 μg/mL)、A5 组 (4.0 μg/mL)]; (2) ADM 组:按药物浓度再分为 4 组 [B1 组 (0.25 μg/mL)、B2 组 (0.5 μg/mL)、B3 组 (1.0 μg/mL)、B4 组 (2.0 μg/mL)]; (3) 联合组:按药物浓度再分为 2 组 [C1 组 (As_2O_3 0.5 μg/mL + ADM 0.25 μg/mL)、C2 组 (As_2O_3 1.0 μg/mL + ADM 0.5 μg/mL)]; (4) 空白对照组 (D 组)。按照预定时间点 (12h、24h、48h、72h) 分批

收取细胞作进一步检测。

1.3 检测项目及方法

1.3.1 免疫细胞化学方法检测 Survivin 蛋白表达 按 LAB VISION 公司 UltraVision Detection System 试剂盒说明书操作步骤,并根据摸索所得条件稍作修改后进行细胞免疫染色。结果判断:细胞染成棕黄色为 survivin 阳性,依染色深浅分为:-(未染色)、+(弱)、++(中)、+++ (强),计分值为:0 (-)、1 (+)、2 (++)、3 (+++)。每份样本计数 200 个细胞,算出各个染色细胞的累积积分;各组样本 5 份,所有积分数值直接输入软件进行统计分析。

1.3.2 RT-PCR 方法检测 Survivin mRNA 表达 按 Invitrogen 公司 TRIZOL 试剂说明书操作步骤提取总 RNA。按 Fermentas 公司 RevertAid[™] First Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒说明书操作步骤进行 cDNA 合成。PCR 扩增引物: survivin 上游引物: 5'-GGA-CTA-CCG-CAT-CTC-TAC-A-3'; 下游引物: 5'-CGC-ACT-TTC-TTT-GCA-GTT-T-3'; 目的基因: 350 bp。GAPDH 正义链: 5'-AAT-CTC-ATC-ACC-ATC-TTC-CA-3'; 反义链: 5'-CCT-GCT-TCA-CCA-CCT-TGT-TG-3'; 目的基因: 580 bp。50 μL 反应体系中含 cDNA 模板 5 μL, 10 × PCR 缓冲液 5 μL, survivin 上游和下游引物各 2.5 μL (20 pmol/mL) 或 GAPDH (内参照)引物正义链和反义链各 2.5 μL (20 pmol/mL), dNTPs 5 μL (2 mmol/L), MgCl₂ 3.5 μL (1.5 mmol/L), Taq 酶 1 μL (2 U/μL); 消毒双蒸水补至 50 μL。热循环条件: 95℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 30 s, 54℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 40 个循环; 72℃ 再延伸 10 min。取 PCR 产物 10 μL, 在 1.0g% 琼脂糖凝胶中于 90V 电泳 30~45 min。GeneSnap 4.00.00 扫描并照像,照片经 GeneTools Version 3.00.22 软件读取灰度值。计算 survivin mRNA/GAPDH mRNA 的比值,进行半定量分析,各标本 4 份,所有比值数值直接输入软件进行统计分析。

1.4 统计学处理

各组之间、各作用时相之间的数据比较均采用重复测量设计资料的方差分析,数据以 SPSS 11.0 统计软件处理分析。

2 结果

2.1 survivin 蛋白表达

2.1.1 HepG2 细胞中 survivin 蛋白表达 未加药物干预之前, HepG2 细胞中 survivin 蛋白强表达, 免疫染色以“+++ (强)”为主, 阳性率为 100%; 而且, 核内表达比胞浆中表达更强。

2.1.2 As₂O₃ 干预对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响 As₂O₃ 干预后, HepG2 细胞 survivin 免疫染色减弱, 染色积分减少, 阳性率降低, 且与浓度和时间呈反比相关性(图 1, 2)。统计学上, 不同干预时相之间 survivin 免疫化学染色积分存在差别 ($F = 130.687, P < 0.01$); 不同干预浓度之间也存在差别 ($F = 1104.261, P < 0.01$); 干预时相与干预浓度之间存在交互作用 ($F = 16.356, P < 0.01$) (表 1)。两两比较, 平行时相上, 各 As₂O₃ 浓度组干预后, HepG2 细胞 survivin 蛋白染色积分均低于对照组 ($P < 0.01$); 随 As₂O₃ 浓度递增, survivin

蛋白染色积分依次递减 ($P < 0.01$)。两两比较各时相, 随作用时相延长, survivin 蛋白染色积分依次递减 ($P < 0.01$)。

2.1.3 ADM 干预对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响 ADM 对 HepG2 细胞中 survivin 蛋白表达的影响与 As₂O₃ 相似: ADM 干预后, HepG2 细胞 survivin 免疫染色减弱, 染色积分减少, 阳性率降低, 亦与浓度和时间呈反比相关性(图 3, 4)。统计学上, 不同干预时相之间 survivin 免疫化学染色积分存在差别 ($F = 102.684, P < 0.01$); 不同干预浓度之间也存在差别 ($F = 2435.097, P < 0.01$); 干预时相与干预浓度之间存在交互作用 ($F = 10.010, P < 0.01$) (表 2)。两两比较, 平行时相上, 各 ADM 浓度组干预后, HepG2 细胞 survivin 蛋白染色积分均低于对照组 ($P < 0.01$); 随 ADM 浓度递增, survivin 蛋白染色积分依次递减 ($P < 0.01$)。两两比较各时相, 随作用时相延长, survivin 蛋白染色积分依次递减 ($P < 0.01$)。

表 1 不同浓度 As₂O₃ 作用不同时间对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响

组别	浓度(μg/mL)	样本数	survivin 蛋白免疫染色积分($\bar{x} \pm s$)			
			12h	24h	48h	72h
D	0	5	547.6 ± 10.7	545.4 ± 17.8	548.8 ± 19.4	540.0 ± 12.4
A1	0.25	5	443.8 ± 10.6	428.2 ± 18.3	391.8 ± 11.5	328.2 ± 30.2
A2	0.5	5	378.6 ± 17.3	330.6 ± 33.6	309.6 ± 20.3	290.4 ± 19.3
A3	1.0	5	337.6 ± 19.0	230.6 ± 12.1	248.4 ± 18.9	246.0 ± 20.4
A4	2.0	5	145.0 ± 5.3	121.8 ± 6.7	114.0 ± 7.3	89.8 ± 7.1
A5	4.0	5	89.4 ± 11.1	79.2 ± 6.8	65.8 ± 7.7	57.0 ± 8.6

注:各浓度组两两比较均为 $P < 0.01$

表 2 不同浓度 ADM 作用不同时间对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响

组别	浓度(μg/mL)	样本数	survivin 蛋白免疫染色积分($\bar{x} \pm s$)			
			12h	24h	48h	72h
D	0	5	547.6 ± 10.7	545.4 ± 17.8	548.8 ± 19.4	540.0 ± 12.4
B1	0.25	5	302.4 ± 5.9	285.0 ± 10.3	262.0 ± 15.1	215.8 ± 24.0
B2	0.5	5	237.4 ± 10.1	221.4 ± 12.2	193.6 ± 8.6	150.6 ± 19.4
B3	1.0	5	146.6 ± 9.2	139.8 ± 10.3	113.2 ± 11.0	105.2 ± 12.1
B4	2.0	5	82.4 ± 7.0	73.8 ± 7.7	62.4 ± 6.2	48.8 ± 6.5

注:各浓度组两两比较均为 $P < 0.01$

图 1 0.25 μg/mL As₂O₃ 干预 48h 细胞染色 (×400) (细胞被染成棕黄色, 部分 ++, 整体较对照组变浅)

图 2 0.5 μg/mL As₂O₃ 干预 48h 细胞染色 (×400) (细胞被染成棕黄色, ++ 为主)

图 3 0.5 μg/mL ADM 干预 48h 细胞染色 (×400) (细胞被染成棕黄色, ++ ~ +++)

图 4 2.0 μg/mL ADM 干预 48h 细胞染色 (×400) (细胞染色进一步变浅, - ~ +)

2.1.4 相同浓度梯度下 As_2O_3 或 ADM 干预对 Survivin 蛋白表达的影响 相同浓度梯度下, survivin 染色减弱的程度在 ADM 干预后比在 As_2O_3 干预后更明显, 即 A1 组与 B1 组、A2 组与 B2 组、A3 组与 B3 组、A4 组与 B4 组之间差异均具显著性 ($P < 0.01$)。

2.1.5 联合药物干预对 survivin 蛋白表达的影响 As_2O_3 与 ADM 联合干预及与单用药物相同浓度

相比, 不同时相之间 survivin 免疫化学染色积分存在差别 ($F = 116.809, P < 0.01$); 不同干预浓度之间也存在差别 ($F = 1388.242, P < 0.01$); 干预时相与干预用药及浓度之间存在交互作用 ($F = 14.836, P < 0.01$) (表 3)。联合干预后, survivin 蛋白表达几乎被完全抑制 (图 5, 6), 可达两者各自单用 8 倍剂量干预的效果 ($F = 3.766, P > 0.05$) (表 4)。

表 3 As_2O_3 与 ADM 联用对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响 (1)

组别	干预药物及浓度		样本数	survivin 蛋白免疫染色积分 ($\bar{x} \pm s$)			
	As_2O_3 ($\mu g/mL$)	ADM ($\mu g/mL$)		12h	24h	48h	72h
C1	0.5	0.25	5	68.0 \pm 9.7	64.0 \pm 6.8	61.0 \pm 12.4	52.8 \pm 5.7
C2	1.0	0.5	5	31.4 \pm 4.4	29.4 \pm 6.7	16.6 \pm 4.8	13.2 \pm 5.1
A2	0.5	-	5	378.6 \pm 17.3	330.6 \pm 33.6	309.6 \pm 20.3	290.4 \pm 19.3
A3	1.0	-	5	337.6 \pm 19.0	230.6 \pm 12.1	248.4 \pm 18.9	246.0 \pm 20.4
B1	-	0.25	5	302.4 \pm 5.9	285.0 \pm 10.3	262.0 \pm 15.1	215.8 \pm 24.0
B2	-	0.5	5	237.4 \pm 10.1	221.4 \pm 12.2	193.6 \pm 8.6	150.6 \pm 19.4

注: 各组与 C1、C2 组及 C2 与 C1 组比较均为 $P < 0.01$

表 4 As_2O_3 与 ADM 联用对 HepG2 细胞 survivin 蛋白表达的影响 (2)

组别	干预药物及浓度		样本数	survivin 蛋白免疫染色积分 ($\bar{x} \pm s$)			
	As_2O_3 ($\mu g/mL$)	ADM ($\mu g/mL$)		12h	24h	48h	72h
C1	0.5	0.25	5	68.0 \pm 9.7	64.0 \pm 6.8	61.0 \pm 12.4	52.8 \pm 5.7
A5	4.0	-	5	89.4 \pm 11.1	79.2 \pm 6.8	65.8 \pm 7.7	57.0 \pm 8.6
B4	-	2.05	82.4 \pm 7.0	73.8 \pm 7.7	62.4 \pm 6.2	48.8 \pm 6.5	

2.2 药物干预对 HepG2 细胞 survivin mRNA 表达的影响

2.2.1 As_2O_3 干预对 survivin mRNA 表达的影响 同一浓度 As_2O_3 的不同干预时相对 HepG2 细胞 survivin mRNA 表达影响的差异具显著性 ($F = 107.230, P < 0.01$), 随着作用时间的延长, HepG2 细胞 survivin mRNA 表达水平逐渐下降; 不同浓度的 As_2O_3 对 survivin mRNA 表达水平的影响差异也有统

计学意义 ($F = 270.430, P < 0.01$); 干预时相与药物浓度间存在交互作用 ($F = 4.650, P < 0.01$) (表 5)。两两比较, 平行时相上, 各 As_2O_3 浓度组干预后, HepG2 细胞 survivin mRNA 表达水平均低于对照组 ($P < 0.01$); 随 As_2O_3 浓度递增, survivin mRNA 表达水平依次递减 ($P < 0.01$) (图 7)。随作用时相延长, survivin mRNA 表达水平依次递减 ($P < 0.01$)。

表 5 不同浓度 As_2O_3 作用不同时间对 HepG2 细胞 survivin mRNA 表达的影响

组别	As_2O_3 浓度 ($\mu g/mL$)	样本数	survivin mRNA/GAPDH mRNA 灰度比值 ($\bar{x} \pm s$)			
			12h	24h	48h	72h
D	0	4	0.80 \pm 0.02	0.78 \pm 0.06	0.78 \pm 0.06	0.76 \pm 0.07
A1	0.25	4	0.76 \pm 0.02	0.70 \pm 0.02	0.64 \pm 0.02	0.60 \pm 0.02
A2	0.5	4	0.68 \pm 0.02	0.60 \pm 0.01	0.56 \pm 0.03	0.50 \pm 0.01
A3	1.0	4	0.59 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	0.47 \pm 0.02	0.42 \pm 0.03
A4	2.0	4	0.52 \pm 0.01	0.48 \pm 0.01	0.36 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01

注: 各浓度组两两比较均为 $P < 0.01$

2.2.2 ADM 干预对 survivin mRNA 表达的影响
 同一浓度 ADM 的不同干预时相对 HepG2 细胞 survivin mRNA 表达影响的差异具显著性 ($F = 47.998$, $P < 0.01$),随着作用时间的延长, HepG2 细胞 survivin mRNA 表达水平逐渐下降;不同浓度的 ADM 对 survivin mRNA 表达水平的影响差异也有统计学意义 ($F = 108.625$, $P < 0.01$);干预时相与药物浓度

间存在交互作用 ($F = 3.790$, $P < 0.01$) (表6)。两两比较,平行时相上,各 ADM 浓度组干预后, HepG2 细胞 survivin mRNA 表达水平均低于对照组 ($P < 0.01$);随 ADM 浓度递增, survivin mRNA 表达水平依次递减 ($P < 0.01$)。随作用时相延长, survivin mRNA 表达水平依次递减 ($P < 0.01$)。

表6 不同浓度 ADM 作用不同时间对 HepG2 细胞 survivin mRNA 表达的影响

组别	ADM 浓度($\mu\text{g}/\text{mL}$)	样本数	survivin mRNA/GAPDH mRNA 灰度比值($\bar{x} \pm s$)			
			12h	24h	48h	72h
D	0	4	0.80 \pm 0.02	0.78 \pm 0.06	0.78 \pm 0.06	0.76 \pm 0.07
B1	0.25	4	0.70 \pm 0.02	0.62 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01	0.52 \pm 0.03
B2	0.5	4	0.63 \pm 0.07	0.58 \pm 0.03	0.52 \pm 0.06	0.49 \pm 0.03
B3	1.0	4	0.53 \pm 0.05	0.50 \pm 0.01	0.39 \pm 0.02	0.32 \pm 0.01

注:各浓度组两两比较均为 $P < 0.01$

2.2.3 联合药物干预对 survivin mRNA 表达的影响
 As_2O_3 与 ADM 联合干预后, survivin mRNA 降低较单用者更明显,显示 survivin mRNA 表达进一步受到抑制。不同干预时相之间 survivin mRNA 表达存在差

别 ($F = 116.328$, $P < 0.01$) (图8);不同干预浓度之间也存在差别 ($F = 207.209$, $P < 0.01$);干预时相与干预用药及浓度之间存在交互作用 ($F = 1.917$, $P < 0.05$) (表7)。

图5 As_2O_3 (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 ADM (0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 联合干预 48h 后细胞染色 ($\times 400$) (细胞染色较单用药物干预组变浅, + 为主)

图6 As_2O_3 (1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 与 ADM (0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 联合干预 48h 后细胞染色 ($\times 400$) (细胞染色进一步变浅, - ~ +)

图7 各浓度 As_2O_3 干预 HepG2 细胞 24h 后 survivin mRNA/GAPDH mRNA 电泳图

图8 As_2O_3 0.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ + 0.25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 干预不同时相后 survivin mRNA/GAPDH mRNA 电泳图

表7 As_2O_3 与 ADM 联用对 HepG2 细胞 survivin mRNA 表达的影响

组别	干预药物及浓度		样本数	survivin mRNA/GAPDH mRNA 灰度比值($\bar{x} \pm s$)			
	As_2O_3 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	ADM ($\mu\text{g}/\text{mL}$)		12h	24h	48h	72h
C1	0.5	0.25	4	0.45 \pm 0.04	0.40 \pm 0.02	0.37 \pm 0.03	0.29 \pm 0.01
C2	1.0	0.5	4	0.36 \pm 0.05	0.31 \pm 0.02	0.26 \pm 0.01	0.21 \pm 0.01
A2	0.5	-	4	0.68 \pm 0.02	0.60 \pm 0.01	0.56 \pm 0.03	0.50 \pm 0.01
A3	1.0	-	4	0.59 \pm 0.01	0.51 \pm 0.02	0.47 \pm 0.02	0.42 \pm 0.03
B1	-	0.25	4	0.70 \pm 0.02	0.62 \pm 0.01	0.58 \pm 0.01	0.52 \pm 0.03
B2	-	0.5	4	0.63 \pm 0.07	0.58 \pm 0.03	0.52 \pm 0.06	0.49 \pm 0.03

注:各组与 C1, C2 组及 C2 与 C1 组比较均为 $P < 0.01$

3 讨论

凋亡的减弱或抑制为肿瘤细胞大量增殖提供了良好土壤环境,与肿瘤的发生、发展及浸润和转移能力密切相关。凋亡抑制蛋白(IAP)家族的新成员 survivin 在细胞增殖与凋亡的联系上起着关键作用^[1,2]。其通过直接或间接方式对 caspases 具强大抑制作用而抑制了细胞凋亡,控制着线粒体依赖性凋亡途径——即所谓“体内”途径。survivin 普遍表达于人类大部分的肿瘤细胞,但正常已分化的细胞不表达^[3]。本研究结果表明,HepG2 细胞中存在 survivin 强表达,包括 mRNA 和蛋白水平。而且,survivin 蛋白在 HepG2 核内表达比胞浆中更强。这与 Fortugno^[4]报道在细胞分裂中 survivin 蛋白核浆比率为 1:6 有差别。按照 Grabowski^[5]报道,核内 survivin 蛋白表达比胞浆中表达更具肿瘤学意义;其在食管鳞癌患者中发现,癌细胞核内表达 survivin 的患者平均生存期明显短于癌细胞核内无 survivin 表达者。

目前,化学治疗仍是抗肿瘤的一个基本而重要的手段。而大多数化疗药物都是通过诱导肿瘤细胞凋亡发挥其抗癌作用的^[6~8]。由此,降低作用强大的凋亡抑制蛋白 survivin 的表达可能促进化疗药物对肿瘤细胞凋亡的诱导而增强其抗癌作用。

近年来采用 As₂O₃ 治疗 APL 取得良好效果,其作用机制即为诱导早幼粒细胞凋亡和部分分化^[10]。文献^[11~14]报道 As₂O₃ 对肝癌的治疗作用在于诱导肝癌细胞凋亡,而且主要作用于细胞周期的 G₂/M 期,本研究结果显示,As₂O₃ 可以降低细胞中 survivin 的表达,并呈现时相与浓度依赖性。因为 survivin 是作用强大的 IAP,survivin 能降低肿瘤细胞对放、化疗的敏感性,其表达的增加与实体瘤、急性白血病、淋巴瘤等患者的预后相关。本研究发现,As₂O₃ 可下调 survivin 表达,因而可能会增加肿瘤细胞对化疗药物的敏感性,进而促进肿瘤细胞的凋亡。

ADM 是一种常用的抗肿瘤药物,也是肝癌治疗的推荐化疗药物,但其临床疗效并不令人满意,以 ADM 为主的方案的部分缓解率仅为 16%^[15]。研究

表明,ADM 亦可促进 HepG2 细胞凋亡,并将细胞周期阻滞于 G₀/G₁ 期^[16~18]。本研究结果显示,ADM 亦可下调 survivin 表达。同样,将减弱癌细胞凋亡的抑制而促进 HepG2 细胞凋亡。

本研究结果显示,As₂O₃ 对 HepG2 细胞中 survivin 表达的下调作用较 ADM 差。究其原因,ADM 为一细胞周期非特异性抗肿瘤药物,可将细胞周期进展阻滞于 G₀/G₁ 期,从而进展到 G₂/M 期的细胞数目减少;而 As₂O₃ 主要作用于细胞周期的 G₂/M 期;故特异表达于 G₂/M 期的 survivin 在 ADM 干预后较 As₂O₃ 干预后下降更显著。另外,ADM 直接嵌入 DNA 核碱对之间,干扰转录过程,阻止 mRNA 的形成而起到抗肿瘤作用,同时抑制 DNA 和 RNA 的合成,故可直接抑制 survivin mRNA 的合成。

本研究发现,As₂O₃ 和 ADM 联用后,可以强化各自对 HepG2 细胞中 survivin 表达的下调作用,可达到单用其中一种药物 8 倍剂量的效果。两者通过共同下调 survivin 的表达增加了 HepG2 细胞对化疗药物的敏感性,促进对 HepG2 细胞的凋亡诱导作用;临床上,两者联用可能会大大降低各自单独使用的剂量而不降低临床疗效,同时可减低毒性;或者在相应单用剂量下大大增加其效能,这将明显增加化疗药物的有效性与安全性。

参考文献:

- [1] Ferreira CG, Epping M, Krutz FA, *et al.* Apoptosis: target of cancer therapy [J]. *Clin Cancer Res*, 2002, 8(7): 2024 - 2034.
- [2] Krammer PH. CD95's deadly mission in the immune system [J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 789 - 795.
- [3] Wang X. The expanding role of mitochondria in apoptosis [J]. *Genes Dev*, 2001, 15(22): 2922 - 2933.
- [4] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 479 - 489.
- [5] Du C, Fang M, Li Y, *et al.* Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition [J]. *Cell*, 2000, 102(1): 33 - 42.
- [6] Barry MA, Behnke CA, Eastman A. Activation of programmed cell death (apoptosis) by cisplatin, other anticancer drugs, toxins and hyperthermia [J]. *Biochem Pharmacol*, 1990, 40(10): 2353 - 2362.
- [7] Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease [J]. *Science*, 1995, 267(5203): 1456 - 1462.
- [8] Hannun YA. Apoptosis and the dilemma of cancer chemotherapy

- [J]. Blood, 1997, 89(6): 1845-1853.
- [9] 魏亚明, 欧剑锋, 欧英贤, 等. 三氧化二砷对白血病细胞凋亡和分化的双向诱导作用[J]. 西北国防医学杂志, 2002, 23(5): 324-326.
- [10] 陈俊强, 李绍森. 三氧化二砷的抗肿瘤作用机制[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(2): 236-238.
- [11] 闻勤生, 罗俊卿, 焦成松. 三氧化二砷诱导肝癌细胞 HepG2 凋亡作用[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(8): 913-914.
- [12] 刘连新, 姜洪池, 朱安龙, 等. 三氧化二砷对肝癌细胞系 HLE 的影响[J]. 中国普通外科杂志, 2001, 10(4): 134-138.
- [13] 汤秀红, 秦叔逵, 陈惠英, 等. 三氧化二砷与顺铂合用抗人肝癌细胞株 QGY-7701 的实验研究[J]. 肿瘤防治研究, 2002, 29(5): 362-364.
- [14] 刘建伟, 唐毅, 沈雁, 等. 三氧化二砷和细胞分化剂诱导肝癌细胞凋亡的阈值[J]. 中华实验外科杂志, 2003, 20(2): 116-117.
- [15] Roland T, Skeel MD. 癌症化疗手册[M]. 于世英主译. 北京: 科学出版社, 2002. 281-283.
- [16] 李杰, 刘玉琴, 孙桂芝, 等. 阿霉素诱导人肝癌细胞 BEL-7402 凋亡的观察[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1999, 6(6): 14-17.
- [17] 薛妍, 刘宝瑞, 慕利梅. 姜黄素和阿霉素联合应用对人肝癌细胞 SMMC-7721 抑制作用的研究[J]. 肿瘤研究与临床, 2000, 12(6): 372-374.
- [18] 钟雪云, 陈运贤, 孙晓东. 顺铂和阿霉素诱导肝细胞肝癌细胞凋亡阈值研究[J]. 中国病理生理杂志, 2000, 1(6): 199-202.

文章编号:1005-6947(2005)06-0447-01

· 病例报告 ·

原发性小肠恶性黑色素瘤 1 例

蒋祖福, 梁建华

(浙江省台州市中心医院 普通外科, 浙江台州 318000)

关键词:空肠肿瘤; 黑色素瘤; 病例报告

中图分类号:R725.33

文献标识码:D

患者 男, 76 岁。因腹胀腹痛半月入院。体查: 腹饱满, 无触痛, 左侧腹部扪及可疑包块, 移动性浊音阴性, 肠鸣音亢进, 未闻及气过水音。CEA 0.9 ng/mL。腹部 B 超示左侧腹部低回声占位; 平片示: 高位小肠梗阻; 结肠灌钡造影未见异常; 小肠造影: 空肠占位性病变伴肠套叠, 空肠不完全性肠梗阻; CT 示: 左侧小肠占位合并小肠套叠, 伴高位小肠梗阻。行剖腹探查术, 术中见距屈氏韧带 100 cm 处小肠套叠, 复位后见小肠腔内 5 cm × 5 cm × 3 cm 肿瘤, 呈灰褐色, 质硬。肠旁可见肿大淋巴结, 肠系膜根部及腹主动脉旁未及肿大淋巴结, 其他肠段未见异常。行小肠部分切除

(包括区域系膜整块切除)。病理报告: 小肠恶性黑色素瘤伴系膜淋巴结转移(附图)。免疫组化: Vin(+ + ~ + + +), S100(+ + +), NSE(+ + +), HMB45(+ + +), EMA(-), CD34(-)。检查皮肤、肛管、直肠、眼、内耳未见黑色素瘤原发病灶。术后拒绝放化疗, 术后生存 16 个月。

讨论 黑色素瘤的组织学起源为黑色素细胞。人体许多组织含有黑色素细胞, 如皮肤、直肠、肛门、阴道、胃、小肠、呼吸道、内耳、眼脉络膜、泌尿道等。黑色素细胞以皮肤最为丰富, 90% 以上黑色素瘤起源于皮肤。原发性小肠恶性黑色素瘤极为罕见, 国内外仅有个案报道, 小肠黑色素瘤多为转移性, 半数以上皮肤黑色素瘤并发小肠转移。而在小肠转移癌中, 半数以上为黑色素瘤。若临床上遇见单发病变的小肠黑色素瘤而又找不到原发病灶, 可考虑为原发性。Sachs 等 (Sachs DL, et al. Do primary small intestinal melanomas exist? Report of a case. J Am Acad Dermatol, 1999, 41: 1042-1044) 提出 3 条诊断标准: (1) 病灶单发; (2) 其他器官无原发灶, 无引流区域以外淋巴结肿大; (3) 诊断以后存活 1 年以上。本例患者为单发病灶, 其他器官未找到原发灶, 无区域外淋巴结转移, 存活 16 个月, 符合上述诊断标准, 可诊断为原发性小肠恶性黑色素瘤。

收稿日期:2004-12-21;

修订日期:2005-03-31。

作者简介:蒋祖福(1965-), 男, 浙江玉环人, 浙江省台州市中心医院副主任医师, 主要从事普通外科、腹腔镜外科方面的研究。

通讯作者:蒋祖福 电话:0576-852619

2; E-mail:ljh54123@163.com。

附图 小肠恶性黑色素瘤伴肠系膜淋巴结转移