

文章编号:1005-6947(2007)01-0065-04

· 基础研究 ·

三氧化二砷抑制乳腺癌裸鼠移植瘤的生长及其作用机制的探讨

曲志博, 刘连新, 陈炜, 郭化鑫, 杨海彦, 潘尚哈, 姜洪池

(哈尔滨医科大学第一临床医学院 普通外科六病房, 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对人乳腺癌细胞系 MCF-7 细胞裸鼠背部皮下移植瘤生长的抑制作用及其作用机制。方法 建立 BALB/C-nu/nu 裸鼠 MCF-7 人乳腺癌皮下移植瘤模型, 以不同浓度的 As_2O_3 行腹腔内注射, 与 5-氟脲嘧啶(5-FU)治疗进行对比, 观察移植瘤的瘤重及瘤重抑制率。通过流式细胞仪检测移植瘤的凋亡情况, 免疫组织化学法检测 bcl-2, Fas 基因表达水平的变化, 并进行血常规及骨髓涂片检查。结果 5-FU (8 mg/kg) 组, As_2O_3 (4 mg/kg) 组, As_2O_3 (8 mg/kg) 组均能明显抑制裸鼠皮下肿瘤的生长, 抑瘤率分别为 38.33%, 51.42% 和 62.43%; As_2O_3 对移植瘤的生长抑制作用明显强于 5-FU, 差异有显著性 ($P < 0.01$)。两种浓度 As_2O_3 组 MCF-7 细胞凋亡率明显高于 5-FU 组。各实验组乳腺癌细胞存在 G_2/M 期阻滞, 在 G_1 峰前出现明显的凋亡峰。移植瘤组织中 bcl-2 蛋白阳性细胞数明显减少, Fas 蛋白阳性细胞数明显增加。血常规及骨髓涂片计数显示 As_2O_3 实验组未见造血系统功能受抑, 与 5-FU 组相比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。结论 As_2O_3 可明显抑制乳腺癌移植瘤的生长, 诱导移植瘤 MCF-7 细胞凋亡; 其作用的机制可能是下调 bcl-2 基因表达, 上调 Fas 基因表达。 [中国普通外科杂志, 2007, 16(1): 65-68]

关键词: 乳腺肿瘤; 三氧化二砷; 肿瘤移植, 裸鼠; 基因表达

中图分类号: R737.9

文献标识码: A

Arsenic trioxide inhibition of tumor growth of subcutaneously implanted human breast cancer cells and its mechanism

QU Zhi-bo, LIU Lian-xin, CHEN Wei, GUO Hua-xin, YANG Hai-yan, PAN Shang-ha

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

Abstract: Objective To study the inhibitory effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on the tumor growth of breast cancer cell line MCF-7 implanted subcutaneously in nude mice and its mechanism.

Methods BALB/C-nu/nu nude mice were subcutaneously injected with MCF-7 breast cancer cell line, and treated with intraperitoneal injection of As_2O_3 and 5-FU in different concentrations. The implanted tumor was weighed, and the tumor inhibition rates were calculated. The apoptosis of the implanted tumor was detected by flow cytometry. The expressions of bcl-2 and Fas induced by As_2O_3 were examined by immunohistochemical method. Routine blood test and bone marrow test were used to observe the function of hematopoietic system after As_2O_3 treatment. **Results** The growth of implanted tumor was markedly inhibited with 5-FU, low dose and high dose As_2O_3 , the inhibitory rates being 38.33%, 51.42% and 62.43%, respectively. The inhibitory effect of As_2O_3 was significantly stronger than that of 5-FU ($P < 0.01$). The apoptosis rate of MCF-7 cells treated with the 2 concentrations of As_2O_3 was significantly higher than that of 5-FU treated group. Breast cancer cells in all the study groups showed G_2/M stage arrest, while a marked apoptosis peak was observed before the G_1 peak. The immunohistochemical staining showed that the number of bcl-2 protein positive cells decreased, and the number of Fas protein positive cells increased. The function

收稿日期: 2006-06-17; 修订日期: 2006-10-26。

作者简介: 曲志博, 男, 黑龙江哈尔滨人, 哈尔滨医科大学第一临床医学院医师, 主要从事普外科肿瘤的临床与实验方面的研究。

通讯作者: 刘连新 E-mail: Liulianxin@medmail.com.cn

of hematopoietic system was not inhibited. **Conclusions** As₂O₃ inhibits the growth of human breast cancer cell implanted tumor and induces apoptosis of MCF-7. The molecular mechanism of As₂O₃ on induction of apoptosis of breast cancer cells may be through decreasing the expression of bcl-2 and increasing the expression of Fas.

[Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(1): 65 - 68]

Key words: Breast cancer; Arsenic trioxide; Neoplasm transplantation; Nude mice; Gene expression

CLC number: R737.9

Document code: A

体外实验证明三氧化二砷(As₂O₃)对人乳腺癌细胞株生长有明显的抑制作用,可诱导肿瘤细胞凋亡^[1,2]。本实验通过建立裸鼠乳腺癌皮下移植瘤模型,观察As₂O₃对人乳腺癌裸鼠移植瘤生长的抑制作用,并进一步探讨其作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料

乳腺癌细胞系 MCF-7 购自本校附属肿瘤医院肿瘤研究所。As₂O₃ (1g/L) 和 5-FU 注射液购自哈尔滨伊达药业有限公司。RPMI-1640 培养基、小牛血清、胰酶、免疫组织化学(免疫组化)试剂盒购自 Sigma 公司。BALB/C-nu/nu 无胸腺裸鼠(6~8 周龄,体重 16~20g,雌性)32 只,购自上海斯莱克实验动物有限公司,在 SPF (Specific Pathogen free) 条件下饲养。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养 MCF-7 细胞在 5% CO₂ 孵箱中培养,培养基为含 10% 灭活小牛血清的 RPMI1640 液,含 1% 双抗(青霉素和链霉素)。细胞为上皮样细胞,每 3~4 天传代 1 次,取对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 裸鼠移植瘤模型的建立 在超净工作台上建模。所有实验动物以碘伏常规消毒后,在其背部皮下注射 0.2ml MCF-7 细胞悬液(含 10⁶ 个细胞),制成移植性荷瘤裸鼠模型。

1.2.3 实验分组 32 只荷瘤裸鼠随机分为(1)阴性对照组(生理盐水);(2)阳性对照组(5-FU 8mg/kg);(3)低剂量 As₂O₃ 组(4 mg/kg);(4)高剂量 As₂O₃ 组(8mg/kg)。每组 8 只。各组荷瘤裸鼠于接种肿瘤细胞 2 周后开始腹腔内注射给药。药物剂量按每鼠 0.2mL 配成不同浓度,每

天 1 次,连续 10d。

1.2.4 观察指标

(1)瘤体生长 每日观察各组裸鼠的精神、饮食、活动等一般情况。于停药后第 2 天处死动物,完整切取皮下肿瘤,称重,计算瘤重抑制率。瘤重抑制率 = (1 - 给药组平均瘤重/阴性对照组平均瘤重) × 100%。

(2)流式细胞仪分析细胞周期及细胞凋亡情况 组织切片/胃蛋白酶消化法获取肿瘤组织细胞悬液,70% 酒精固定后过夜,用流式细胞仪进行分析。

(3)免疫组化法检测 bcl-2 和 Fas 蛋白表达 生理盐水组和两种浓度 As₂O₃ 组各随机抽取移植瘤标本 5 例,切片,常规脱蜡,入水,血清封闭,依次加入抗 bcl-2 和 Fas 抗体,生物素标记的二抗,过氧化物酶。DAB 显色,苏木素复染,脱水,封片,显微镜观察。每张切片在高倍镜下(×400)观察 1 000 个乳腺癌细胞,计数阳性细胞数(胞浆或胞膜着色为阳性),计算表达率。表达率 = (表达阳性细胞数/总细胞数) × 100%。

(4)对造血功能影响的判定 通过血常规和骨髓涂片计数以判定用药后对造血功能有无影响。

1.3 统计学处理

采用 PEMS 统计软件包进行数据处理。行方差分析及 *q* 检验。

2 结果

2.1 用药后荷瘤裸鼠瘤重及瘤重抑瘤率

5-FU (8mg/kg) 组、As₂O₃ (4mg/kg) 组和 As₂O₃ (8mg/kg) 组均能明显抑制裸鼠皮下肿瘤的生长,抑瘤率分别为 38.33%, 51.42% 和 62.43%; As₂O₃ 对移植瘤的生长抑制作用明显强于 5-FU, 差异有显著性 (*P* < 0.01) (表 1)。

2.2 各组细胞凋亡情况

低剂量 As_2O_3 , 高剂量 As_2O_3 和 5-FU 组的肿瘤标本均存在 G_2/M 期阻滞,且在 G_1 峰前出现明显的凋亡峰。两种浓度 As_2O_3 组 MCF-7 细胞凋亡率明显高于 5-FU 组,且随着用药浓度的增加,凋亡率随之增加,差异有显著性 ($P < 0.05$) (图 1~4)。

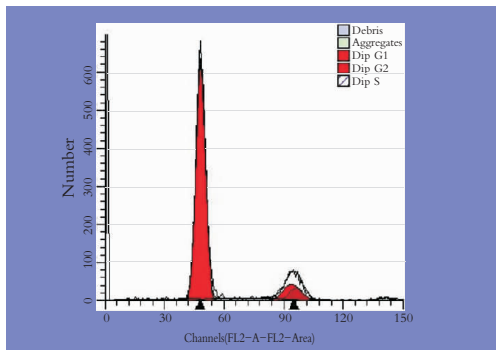


图1 生理盐水组, MCF-7 细胞凋亡率为 0%

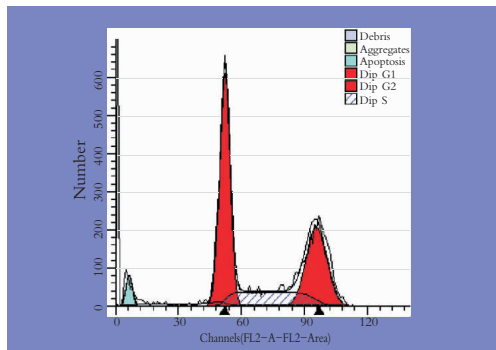


图2 5-FU 组, MCF-7 细胞凋亡率为 8.59%

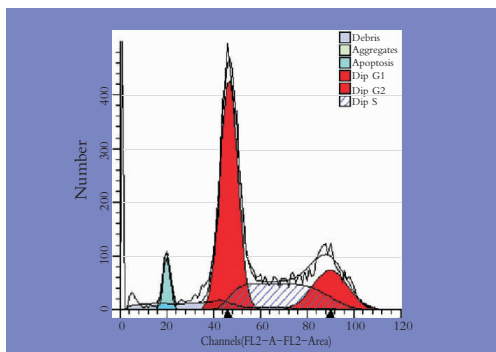


图3 高剂量 As_2O_3 组, 细胞凋亡率为 16.72%

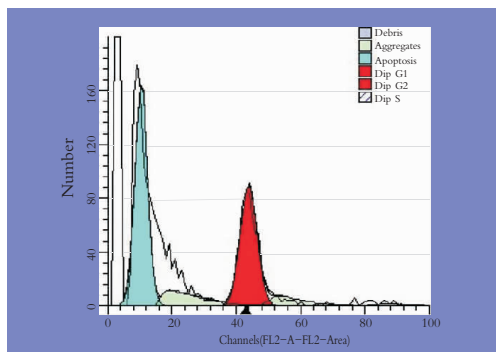


图4 高剂量 As_2O_3 组, 细胞凋亡率为 36.07%

2.3 移植瘤乳腺癌细胞 bcl-2 和 Fas 蛋白表达情况

经 As_2O_3 作用后,移植瘤组织中 bcl-2 蛋白阳性细胞数明显减少, Fas 蛋白阳性细胞数明显增加(表 2)。

表 2 移植瘤乳腺癌细胞 bcl-2 和 Fas 蛋白表达情况 ($n = 8, x \pm s$)

组别	bcl-2 阳性	Fas 阳性
生理盐水	77.56 ± 15.26	38.56 ± 5.21
低剂量 As_2O_3	42.38 ± 5.22 ¹⁾	47.25 ± 6.67 ²⁾
高剂量 As_2O_3	35.98 ± 4.75 ¹⁾³⁾	55.57 ± 5.18 ²⁾³⁾

注:与生理盐水组比较,1) $P < 0.01$, 2) $P < 0.05$;与低剂量 As_2O_3 组比较,3) $P > 0.05$ 。

2.4 血常规及骨髓涂片结果

各组红细胞计数及血红蛋白含量差异均无显著

表 1 药物作用后荷瘤裸鼠瘤重及瘤重抑瘤率 ($n = 8$)

组别	瘤重($g, x \pm s$)	瘤重抑瘤率(%)
生理盐水	5.27 ± 0.36	1.56
5-FU	3.25 ± 0.23 ¹⁾	38.33
低剂量 As_2O_3	2.56 ± 0.21 ¹⁾²⁾	51.42
高剂量 As_2O_3	1.98 ± 0.15 ¹⁾²⁾	62.43

注:1)与生理盐水组比较, $P < 0.01$; 2)与 5-FU 组比较, $P < 0.05$

性;低、高剂量 As_2O_3 组和生理盐水组之间的白细胞计数差异无显著性,但与 5-FU 组差异有显著性 ($P < 0.05$) (表 3);低、高剂量 As_2O_3 组和生理盐水组骨髓涂片显示增生活跃,细胞形态正常;而 5-FU 组骨髓涂片显示增生减低,细胞有空泡变形改变。提示 As_2O_3 对裸鼠的造血系统功能影响不大。

表 3 药物作用后白细胞计数

组别	白细胞计数($\times 10^9/L$)
生理盐水	13.15 ± 2.59
5-FU	8.26 ± 3.24 ¹⁾
低剂量 As_2O_3	12.59 ± 2.27 ²⁾
高剂量 As_2O_3	11.85 ± 1.08 ²⁾

注:1)与生理盐水组比较, $P < 0.05$; 2)与 5-FU 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

细胞凋亡是 As_2O_3 抗肿瘤的主要作用机制^[3,4]。体外实验已证实 As_2O_3 可诱导乳腺癌细胞凋亡,抑制乳腺癌细胞增殖^[1,2]。本实验以 As_2O_3 作用于裸鼠乳腺癌皮下移植瘤模型,观察 As_2O_3 在体内的抗肿瘤作用,结果表明, As_2O_3 对裸鼠移植瘤的生长有明显抑制作用,抑制率随药物剂量增大而升高,呈现一定的量效关系。两种浓度的 As_2O_3 对移植瘤的生长抑制作用均明显强于 5-FU,差异有显著性 ($P < 0.05$)。流式细胞术分析提示低剂量 As_2O_3 ,高剂量 As_2O_3 和 5-FU 组均能诱导肿瘤细胞凋亡,瘤体标本均存在 G_2/M 期阻滞,且在 G_1 峰前出现明显的凋亡峰。两种浓度 As_2O_3 组 MCF-7 细胞凋亡率明显高于 5-FU 组。且随着用药浓度的增加,凋亡率随之增加,差异有显著性 ($P < 0.05$)。

As_2O_3 诱导肿瘤细胞凋亡的分子机制比较复杂,可能与下调 bcl-2 的表达有关^[5]。bcl-2 是在 t(14,18) 染色体异位断点处发现的一种原癌基因,具有阻断程序化细胞死亡的作用。Fas 是细胞膜表面受体蛋白,属于肿瘤坏死因子受体超家族,Fas 与 Fas 配体 (FasL) 结合可介导细胞凋亡^[6]。Fas 基因表达下降或不表达,是癌细胞逃逸机体免疫细胞监视和杀伤的重要机制之一。利用 Fas 介导的凋亡信号传递途径,调节癌细胞中 Fas 基因表达,可诱导癌细胞凋亡。本实验表明, As_2O_3 作用后移植瘤乳腺癌细胞 bcl-2 的蛋白表达显著下降,而 Fas 的蛋白表达显著增强。本实验中选用两种浓度 As_2O_3 作用于裸鼠,剂量依赖性不明显。这可能是当作用剂量已达到饱和而未达到中毒剂量之内

时,并不因为药物剂量的变化而影响蛋白表达的缘故。

本实验结果显示,生理盐水组裸鼠一般情况差,呆滞少动,进食进水减少;5-FU 组裸鼠表现亦有不同程度的反应迟钝,活动减少;而 As_2O_3 组未见明显不良反应。血象及骨髓涂片结果提示 As_2O_3 对裸鼠的造血系统功能影响不大。

综上所述, As_2O_3 对裸鼠乳腺癌移植瘤的生长有明显抑制作用,可诱导移植瘤乳腺癌细胞凋亡;诱导凋亡的分子机制可能与下调 bcl-2 基因表达,上调 Fas 基因表达有关。

参考文献:

- [1] Baj G, Arnulfo A, Deaflio S, *et al.* Arsenic trioxide and breast cancer: Analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 73 (1): 61 - 73.
- [2] Karasulu HY, Karabulut B, Kantarci G, *et al.* Preparation of arsenic trioxide-loaded microemulsion and its enhanced cytotoxicity on MCF-7 breast carcinoma cell line [J]. *Drug Deliv*, 2004, 11 (6): 345 - 350.
- [3] 陈俊强. 三氧化二砷的抗肿瘤作用机制 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 11 (4): 236 - 238.
- [4] 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*, 2002, 10 (2): 134 - 138.
- [5] Tiezzi DG, De Andrade JM, Reis FJ, *et al.* Apoptosis induced by neoadjuvant chemotherapy in breast cancer [J]. *Pathology*, 2006, 38 (1): 21 - 27.
- [6] Mitchell C, Mallet V, Guidotti JE, *et al.* Experimental modulation of apoptosis: physiopathological and therapeutic targets [J]. *J Soc Biol*, 2005, 199 (3): 243 - 246.

本刊已加入中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC), 中文科技期刊数据库 (SWIC), CEPS 中文电子期刊, 书生数字期刊

为实现科技信息交流工作电子化, 网络化, 本刊已加入中文生物医学期刊文献数据库 (CMCC)、中文科技期刊数据库 (SWIC)、CEPS 中文电子期刊、书生数字期刊等数据库及电子、网络系统, 故向本刊投稿并录用的稿件文章, 将一律由编辑部统一纳入以上系统。凡有不同意见者, 请另投它刊。本刊所付稿酬包含以上刊物内容上网服务报酬, 不再另付。特此敬告读者。