

三氧化二砷对小鼠恶性黑素瘤抑制机制的探讨

黄桦¹, 陈治文¹, 陈正徐², 胡博², 王东萍²

[摘要] 目的:探讨三氧化二砷(As_2O_3)对小鼠 B_{16} 细胞实体瘤的生长抑制作用及对端粒酶活性表达的影响,旨在为临床治疗黑素瘤提供理论和实验依据。方法:以不同浓度 As_2O_3 作用的鼠黑素瘤 B_{16} 细胞荷瘤小鼠,用 TRAP-PAGE-银染法检测药物作用后瘤体组织端粒酶活性的表达;通过测定荷瘤小鼠瘤体大小和肿瘤组织内微血管密度来反映不同剂量 As_2O_3 的抑瘤作用。结果: As_2O_3 能抑制鼠 B_{16} 细胞实体瘤的生长,破坏肿瘤组织微血管的形成($P < 0.01$); As_2O_3 能明显抑制鼠 B_{16} 细胞实体瘤端粒酶的活性。结论: As_2O_3 对于 B_{16} 细胞实体瘤的生长有显著的抑制作用,这可能与抑制肿瘤组织内微血管的形成和端粒酶表达活性有关。

[关键词] 黑素瘤;三氧化二砷;端粒酶;细胞凋亡;小鼠,近交 C57BL

[中国图书资料分类法分类号] R 739.5;O 613.63 **[文献标识码]** A

Inhibitory mechanism on the mice melanoma by arsenic trioxide

HUANG Hua¹, CHEN Zhi-wen¹, CHEN Zheng-xu², HU Bo², WANG Dong-ping²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology,

2. Research Center of Clinical Laboratory Science, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate inhibitory effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on the growth of B_{16} cell solid tumours in C57BL/6J mice and telomerase activity; and to provide experiment basis for treatment of malignant melanoma. **Methods:** Mouse melanoma B_{16} cells were transplanted into C57BL/6J mice that were treated with different concentrations of As_2O_3 . The weight of tumor and percent of tumor development were examined. The telomerase activity in mice tumours was detected by TRAP-PAGE-silver staining. **Results:** The tumor growth was significantly inhibited by As_2O_3 . The microvessel density in tumor tissues was obviously reduced by As_2O_3 ($P < 0.01$). Treated with As_2O_3 , the telomerase activity was obviously reduced. **Conclusions:** As_2O_3 can inhibit the growth and the telomerase activity of B_{16} cell solid tumours in C57BL/6J mice.

[Key words] melanoma; arsenic trioxide; telomerase; apoptosis; mice, inbred C57BL

文献报道,90.0%的原发性黑素瘤和100%转移性黑素瘤端粒酶检测呈阳性,良性痣细胞表达率为14.3%,而正常皮肤组织端粒酶活性均为阴性^[1]。 B_{16} 黑素瘤是1954年Jackson研究所饲养的C57BL/6J小鼠耳部皮肤自发的黑素瘤,具有生成黑色素和转移的能力。Fu在1964年建立了体外培养细胞株,将 B_{16} 细胞皮下接种于C57BL/6J小鼠,成瘤率100%^[2]。应用砷剂治疗黑素瘤的实验研究国内外文献报道较少。本研究选用黑素瘤鼠 B_{16} 细胞荷瘤小鼠模型为研究对象,探讨不同剂量三氧化二砷(As_2O_3)的抑制作用及对端粒酶活性的影响,旨在为临床治疗黑素瘤提供理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料和试剂 黑素瘤细胞株鼠 B_{16} 细胞(购自中科院细胞所);C57BL/6J小鼠[鼠龄4~6周,体重18~22g,雄性,中国医学科学院实验动物研究所提供,合格证号:CZXX(京)2004-0001]; As_2O_3 (Sigma公司);端粒酶活性检测试剂盒(Roche公司);丙烯酰胺、N,N'-亚甲基丙烯酰胺(华美公司);硝酸银、TEMED(上海生工)。

1.2 实验仪器 PCR扩增仪(日本PE公司,701型);垂直电泳槽(美国BIO-RAD公司);FR-200紫外与可见分析装置(上海复日);AHB-LB-2型生物显微镜(日本Olympus)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 鼠 B_{16} 细胞贴壁培养于RPMI 1640培养液(含10%新生小牛血清),置37℃、5% CO_2 、饱和湿度培养箱中培养。

1.3.2 小鼠成瘤实验 选用C57BL/6J小鼠建立 B_{16} 细胞肿瘤模型,每组8只。试验组小鼠右腋皮下注射 $1 \times 10^9/L$ B_{16} 细胞悬液0.1 ml(取培养4~5天

[收稿日期] 2007-04-25

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006kj351B)

[作者单位] 蚌埠医学院 1. 生物化学与分子生物学教研室, 2. 临床检验诊断学实验中心, 蚌埠 安徽 233030

[作者简介] 黄桦(1980-),男,硕士研究生。研究方向:肿瘤分子生物学。

[通讯作者] 陈治文,研究生导师,教授。

的对数生长期细胞,用含 2.0 g/L 胰酶和 0.5 mmol/L EDTA 的 V-T 消化),每组于接种细胞次日起注射药物。(1) As_2O_3 组:腹腔注射 1 mmol/L 的 As_2O_3 溶液(As_2O_3 用 NaOH 滴定至溶解,配制成 pH 7.2 的 1 mmol/L 储存液备用),连续给药 10 天后改为隔天 1 次,给药浓度分别为 $3 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (L 组)、 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (H 组)。3 周后处死,完整剥离瘤组织,称重,计算抑瘤率[抑瘤率 = $(1 - \text{实验组瘤重}/\text{对照组瘤重}) \times 100\%$]。(2) 阴性对照组(NS 组):腹腔注射生理盐水,每只每次注射 0.1 ml。(3) 阳性对照组(D 组):腹腔注射氮烯胍胺($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)^[3]。(4) 正常组:不注射 B_{16} 细胞及药物,正常喂养。

1.3.3 瘤组织内微血管密度计数 瘤组织经福尔马林溶液固定,石蜡包埋,切片,HE 染色,光镜下观察微血管密度,计数 10 个视野($400 \times$)的平均微血管数。

1.3.4 PCR 取坏死区与生长交界处的瘤组织约 30 mg 裂解, $4 \text{ }^\circ\text{C}$,12 000 r/min,离心后取上清液,按试剂盒说明书操作。

1.3.5 TRAP-PAGE-银染法 用 PCR 产物做 PAGE 电泳:180 V 60 min。硝酸银染色:10% 乙醇浸泡 5 min,1.1% 硝酸浸泡 5 min,0.012 mol/L 硝酸银染色 20 min,0.28 mol/L 碳酸钠、体积比为 0.02% 的甲醛显色。阳性对照物同 TRAP-ELISA。染色结果显示端粒酶活性的梯形条带。结果用 FR-200 紫外光与可见光分析装置拍摄并存储图像。

1.4 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 小鼠成瘤实验 实验结果显示,NS 组 8 只小鼠全部成瘤;D 组,5 只成瘤;L 组,6 只成瘤;H 组,3 只成瘤;各组间差异无统计学意义($H_0 = 7.33, P > 0.05$),H 组的瘤重较对照组明显减小($P < 0.01$)。D 组抑瘤率为 37.22%,L 组为 59.74%,H 组为 99.00%,高剂量 As_2O_3 抑制了肿瘤生长($P < 0.05$) (见表 1)。

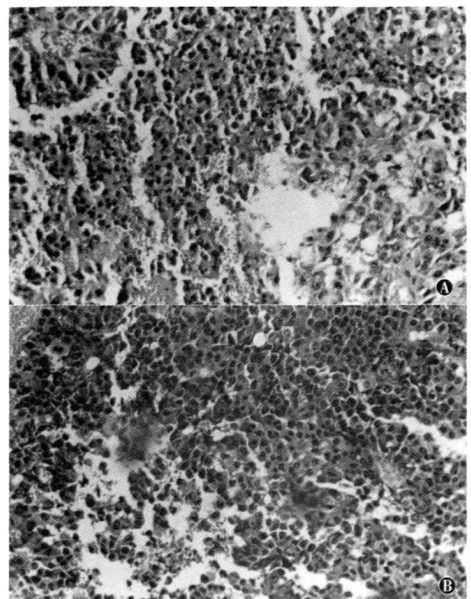
2.2 肿瘤组织内微血管密度计数 HE 染色显示 As_2O_3 能显著抑制小鼠恶性黑素实体瘤组织中的血管生长,使微血管密度降低(见图 1)。NS 组、D 组、L 组、H 组平均每个视野的微血管数分别是 8.51 ± 0.21 、 6.22 ± 0.34 、 4.1 ± 0.23 、 3.82 ± 0.52 ,差异有统计学意义($F = 314.82, P < 0.01, MS_{\text{组内}} = 0.121$)。除 L 组和 H 组差异无统计学意义($P > 0.05$)外,其

余各组间差异均有统计学意义($P < 0.01$)。

表 1 As_2O_3 对肿瘤生长的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	瘤重(g)	抑瘤率(%)
NS 组	8	4.987 ± 2.35	—
D 组	8	3.114 ± 3.51	37.22
L 组	8	2.758 ± 2.53	59.74
H 组	8	0.050 ± 0.13 $_{\Delta}^*$	99.00
F	—	5.45	—
P	—	<0.01	—
$MS_{\text{组内}}$	—	6.065	—

q 检验:与 NS 组比较 ** $P < 0.01$;与 L 组比较 $\Delta P < 0.05$



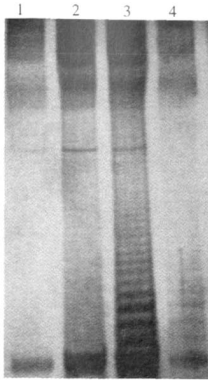
A:阴性对照组;B: As_2O_3 高剂量组

图 1 小鼠恶性黑素实体瘤组织(HE 染色 $\times 200$)

2.3 端粒酶活性的测定 TRAP-PAGE-银染法的结果显示,随着 As_2O_3 浓度的增高,端粒酶活性的梯形条带逐渐减弱直至消失,说明 H 组和 L 组均可抑制端粒酶的活性,且抑制作用强于 D 组(见图 2)。

3 讨论

砷属于微量元素,主要以硫化物和氧化物的形式存在。砷与巯基有很强的亲和力,可影响体内 200 多种酶的活性,特别是那些参与细胞能量途径和 DNA 合成及修复的酶^[4]。长久以来,砷作为一种毒物为人们所熟知;但近年来,我国学者应用砷剂作为抗肿瘤药物临床治疗白血病,特别是治疗急性早幼粒细胞白血病,取得了较好疗效。研究报道, As_2O_3 对人卵巢癌细胞株、膀胱癌 BIU-87 细胞的增殖和转移及黑素瘤鼠 B_{16} 细胞、人 A_{375} 细胞的端粒酶



1:H组;2:L组;3:NS组;4:D组
图2 As_2O_3 作用鼠恶性黑色素实体瘤后 TRAP-PAGE 图谱

活性均有抑制作用,且抑制作用呈时间和剂量依赖关系,并能诱导细胞凋亡^[5-9]。最近,有研究报道,将 As_2O_3 用于二期临床研究,以评价其对转移性黑色素瘤的毒性^[10]。

细胞凋亡和端粒酶活性与肿瘤发生之间的关系,是近年来肿瘤研究领域的热点。因此抑制肿瘤细胞端粒酶活性,促进细胞凋亡已经成为肿瘤治疗领域的新策略。启动凋亡的基因位于端粒结构附近,完整的端粒结构可以抑制这些基因的表达。自1978年 Blackburn 等报道四膜虫线粒体 DNA 末端含有重复序列(TTGGGG)以来,人们相继测出各种不同生物的端粒序列,并发现各种真核生物端粒 DNA 序列均为一条 5'→3'伸向染色体末端、富含 G 的核苷酸链。正常人体细胞端粒随细胞分裂而进行性缩短,与正常细胞相反,永生细胞随着细胞分裂,其端粒长度稳定不变,这是由于端粒酶被激活所致。

端粒酶是维持端粒长度的逆转录酶,是一种自带 RNA 模板的 DNA 聚合酶,能利用自身的 hTR 作模板,由 hTERT 催化合成端粒 DNA 到染色体末端,以补偿细胞分裂时染色体末端的缩短,从而维持端粒长度,使细胞获得无限增殖的能力。端粒酶的活化和端粒长度的维持对细胞永生及无限增殖至关重要。在人类胚胎早期发育阶段,很多组织都可以检测到端粒酶活性,但随着组织和细胞的分化,端粒酶活性迅速降低,到成人阶段仅有少数细胞(如生殖细胞等)仍具有端粒酶活性,而在大多数体细胞中已检测不到。

本实验结果表明, As_2O_3 可明显抑制鼠恶性黑色素实体瘤的端粒酶活性,至于端粒酶活性受到抑制的原因,推测一方面可能是受凋亡基因的直接调

控;另一方面可能是端粒酶活性的维持依赖于细胞核结构的完整性,在凋亡过程中由于内源性核酸内切酶的活化致使细胞 DNA 断裂,细胞完整性受到破坏,这可能影响到端粒酶的活性和表达。

血管生成在肿瘤的增殖中起着重要的作用,它可为肿瘤的生长提供丰富的营养和血液供应,以满足肿瘤细胞迅速生长的需要。一旦肿瘤组织血管生成发生障碍,肿瘤细胞就会由于缺少营养和氧气供应而生长变缓,甚至发生凋亡和坏死。本研究结果提示, As_2O_3 能够显著抑制小鼠 B_{16} 黑色素瘤的生长,其作用环节之一在于阻断肿瘤组织中新生血管的形成^[11]。

抑制剂抗肿瘤作用的分子机制比较复杂,还有待更深入的研究。本研究虽已建立动物实验模型,但还很不完善。同时,还需利用手术切除的肿瘤标本进一步研究抑制剂抑制肿瘤生长的机制以及人体内抗肿瘤作用的有效药物浓度,为临床治疗黑色素瘤和开发抑制剂药物奠定理论和实验基础。

[参 考 文 献]

- [1] 应作霖,孙建方,张行,等. 黑色素瘤的端粒酶活性研究[J]. 中国皮肤性病杂志, 2003, 17(1): 7-8.
- [2] 章静波主编. 组织和细胞培养技术[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 235-236.
- [3] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, 9(9): 1069-1072.
- [4] Ratnaik RN. Acute and chronic arsenic toxicity[J]. *Postgrad Med J*, 2003, 79(933): 391-396.
- [5] 王丽, 陈治文, 夏俊, 等. 三氧化二砷对黑色素瘤 B_{16} 细胞端粒酶活性影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(3): 202-204.
- [6] 陈治文, 王丽, 夏俊, 等. 三氧化二砷对黑色素瘤 A_{375} 细胞端粒酶活性的抑制作用[J]. 癌变·畸变·突变, 2004, 16(5): 276-278.
- [7] 黄守国, 孔北华, 马玉燕, 等. 三氧化二砷对人卵巢癌耐药细胞株细胞增殖和转移能力的影响[J]. 癌症, 2002, 21(8): 863-867.
- [8] 王岩, 宋云飞, 顾冰, 等. 三氧化二砷诱导膀胱癌 BIU-87 细胞凋亡作用的研究[J]. 哈尔滨医科大学学报, 2002, 36(4): 287-289.
- [9] 夏俊, 陈俊霞, 于丽华, 等. 三氧化二砷抑制人膀胱癌 EJ 细胞增殖及其作用机制探讨[J]. 癌变·畸变·突变, 2005, 17(3): 160-162.
- [10] Kim KB, Bedikian AY, Camacho LH, et al. A Phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic melanoma[J]. *Cancer*, 2005, 104(8): 1687-1692.
- [11] 夏俊, 陈俊霞, 于丽华, 等. 三氧化二砷抑制小鼠 B_{16} 黑色素瘤生长作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9): 1054-1058.