

·优秀论文选登·

三氧化二砷对原发性肝癌的作用及其机理研究

刘连新 朱安龙 陈炜 郭化鑫 王秀琴 刘芝华 张亭栋 姜洪池 吴█

【摘要】目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对肝癌细胞系 BEL-7402 的影响及其作用机理,并观察不同应用途径对原发性肝癌患者的治疗效果。**方法** 观察 As_2O_3 作用后肝癌细胞的形态学改变、并通过流式细胞仪和 DNA 梯状电泳观察细胞凋亡的情况,应用逆转录聚合酶链式反应和荧光分光光度计检测半胱氨酸蛋白酶-3 的变化情况。观察其对裸鼠移植瘤生长抑制的效果。并分别通过静脉滴注和动脉持续灌注观察其对原发性肝癌患者的治疗效果。**结果** 不同浓度的 As_2O_3 作用于肝癌细胞有明显的时间和剂量依赖性,发生作用后细胞生长明显受抑制,有明显的凋亡特征性改变;流式细胞仪分析存在 G_2/M 期阻滞,在 G_1 峰前出现明显的凋亡峰;琼脂糖凝胶电泳出现明显的凋亡特征性梯状条带。随着 As_2O_3 作用时间的延长,半胱氨酸蛋白酶-3 的 mRNA 无明显变化,而半胱氨酸蛋白酶-3 蛋白质的活性逐渐增高。不同浓度的 As_2O_3 对裸鼠肝癌移植模型有明显的抑制生长作用。对 28 例患者的静脉输注治疗可明显改善患者的生存质量,并且具有毒副作用小的特点。43 例动脉灌注治疗患者中,30 例肿瘤体积缩小或不变,有效率为 69.8%,19 例甲胎蛋白下降或降至正常。**结论** As_2O_3 可明显抑制肝癌细胞的生长,其机理主要是诱导肝癌细胞凋亡;凋亡的可能机理是通过半胱氨酸蛋白酶-3 起作用,作用位点是在酶的前体水平;应用 As_2O_3 连续区域化疗对原发性肝癌有很好的治疗效果。

【关键词】 三氧化二砷; 癌, 肝细胞; 凋亡; 半胱氨酸蛋白酶-3; 持续灌注治疗

The effect and mechanism of arsenic trioxide on hepatocellular carcinoma LIU Lian-xin*, ZHU An-long, CHEN Wei, GUO Hua-xin, WANG Xiu-qin, LIU Zhi-hua, ZHANG Ting-dong, JIANG Hong-chi, WU Min.*
Department of Surgery, the First Clinical College, Harbin Medical University, Harbin 150001, China
Corresponding author: LIU Lian-xin, Email: liulianxin@medmail.com.cn

[Abstract] **Objective** To investigate the effect and mechanism of arsenic trioxide on hepatoma cell line BEL-7402 and observe the effect and best administration method of arsenic trioxide on hepatocellular carcinoma patients who were not suitable for operation. **Methods** The cell activity and morphologic changes were studied after being treated with arsenic trioxide in different concentrations. The apoptosis was detected by flow cytometry assay and DNA fragmentation assay. The caspase-3 level of mRNA and protein were detected by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and fluorescence spectrophotometer. The growth inhibition of implant tumor was observed in nude mice treated with arsenic trioxide in different concentrations. Arsenic trioxide was used in hepatocellular carcinoma patients by intravenous dropping and continuous regional infusion through hepatic artery. **Results** The effect of arsenic trioxide on hepatoma cell lines was dependent on the time and concentration obviously. The decrease in cell number was preceded by morphological changes in the treated BEL-7402 cells that were characteristic of apoptosis, including membrane blebbing, shrunken cytoplasm, nuclear condensation and loss of adhesion. Flow cytometry assay showed an arrestment at G_2/M phase and sub- G_1 cell peak. DNA fragmentation assay showed a marked DNA ladder. The mRNA level of caspase-3 was no change in RT-PCR whereas the protein of caspase-3 was increased after added As_2O_3 1—36 h. Caspase-3 activity began to increase after 2 h and reached a maximal level after 12 h in a linear fashion. Then, the level of caspase-3 was decreased, but still in a high

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30300339)

作者单位: 150001 哈尔滨医科大学附属第一医院普通外科(刘连新、朱安龙、陈炜、郭化鑫、姜洪池); 中医科(张亭栋); 中国医学科学院肿瘤研究所分子肿瘤学国家重点实验室(王秀琴、刘芝华、吴█)

通讯作者: 刘连新, Email: liulianxin@medmail.com.cn

level. The growth inhibition of implant tumors was obviously in nude mice. The intravenous usage of arsenic trioxide could improve the quality of life with low toxicity in hepatocellular carcinoma patients not suitable for operation. The tumor size decreased in 30 patients and AFP value decreased in 19 patients by continuous regional infusion through hepatic artery. **Conclusions** Arsenic trioxide can obviously inhibit the growth of hepatoma cell line BEL-7402 through inducing hepatoma cell apoptosis. The activation and increase of Caspase-3 is the possible mechanism of apoptosis, and the acting point is in pro-enzyme level. The best result of arsenic trioxide on non-operative patients should be gotten in continuous infusion through hepatic artery.

【Key words】 Arsenic trioxide; Carcinoma, hepatocellular; Apoptosis; Caspase-3; Regional perfusion

三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)可诱导急性早幼粒细胞性白血病细胞凋亡,并取得了满意的临床效果^[1,2]。那么,As₂O₃对实体肿瘤的治疗效果又如何呢^[3]?本实验旨在探讨As₂O₃对肝癌细胞株BEL-7402的作用及其机理,并观察其对荷瘤裸鼠的抑瘤作用,以及不同用药途径对不能切除原发性肝癌的作用。

资料与方法

一、实验材料

肝癌细胞株 BEL-7402 由中国医学科学院肿瘤研究所周传农教授惠赠。RPMI1640 培养基购自 Gibco BRL 公司,分子量标记 DNA/Hind III 和 DNA/Hae III 蛋白酶 K, RNase 购自上海生工生物工程有限公司,As₂O₃ 购自 Sigma 公司。

二、实验方法

1. 细胞培养: BEL-7402 细胞在 5% CO₂ 孵箱中培养,培养基为含 10% 灭活小牛血清及 1% 双抗(青霉素和链霉素)的 RPMI1640。

2. 形态观察: 观察 0.25~8 μmol/L 的 As₂O₃ 对肝癌细胞的作用。将 5×10⁴ 个细胞接种于 24 孔板上,每一浓度设 3 个复孔,在倒置显微镜下观察不同浓度的 As₂O₃ 作用不同时间肝癌细胞的形态学改变。

3. 流式细胞仪分析: 常规消化不同浓度作用不同时间的细胞 5×10⁵ 个,离心收集固定后的细胞,用 PBS 清洗。加入 500 μl 含有 3.4 mmol/L 柠檬酸钠,50 μg/ml 碘化丙啶,100 μg/ml 的核糖核酸酶(RNase A)的溶液中重悬细胞沉淀,避光室温染色 30 min,应用 Colter 流式细胞仪,以标准程序对其进行分析。

4. DNA 梯状电泳: 将细胞常规消化后,应用 PBS 洗涤两遍,离心后沉淀中加入 2 ml 氯化钠、TrisCl、EDTA 缓冲液(STE)重悬细胞,再加入 20% 十二烷基乙酸钠(SDS)100 μl 混匀,加入 20 mg/ml 蛋白酶 K10

μl,37 °C 过夜。反复抽提离心后上清中加入 3 mol/L 乙酸钠(NaAc)200 μl,4 ml 预冷的无水乙醇,-20 °C 沉淀过夜。应用 70% 的乙醇洗涤后,溶于 50~100 μl TrisCl、STE 中,于 1% 的琼脂糖凝胶中以 30~40 V 电压电泳,观察 Ladder 图像。

5. RT-PCR 分析: 根据 Trizol 试剂盒说明书提取组织的 RNA,并应用 DNA 酶处理 DNA。取 5 μg RNA 加入 Oligo(dT) 1 μl 和 Random Hexamers 1 μl,按照试剂盒说明书进行操作,合成 cDNA。半胱氨酸蛋白酶-3 引物应用 primer3 软件设计,由上海生工生物有限公司合成。应用 RNase 灭活 RNA,应用 25 μl 反应体系进行 PCR 反应。于 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 15 s, 60 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 25 个循环后,于 72 °C 延伸 5 min。应用 1.8% 的琼脂糖凝胶(含 0.1 μg/ml 溴化乙啶)电泳。

6. 半胱氨酸蛋白酶-3(Caspase-3)蛋白活性的检测: 计数约 10×10⁶ 个细胞,按照 CLONTECH 公司试剂盒说明书进行操作。应用装备有 400 nm 激发光和 505 nm 发射光的荧光分光光度计(日本岛津公司)进行检测。

7. As₂O₃ 对荷瘤裸鼠肿瘤生长的抑制作用: 观察不同浓度的 As₂O₃ 经尾静脉注射之后,对于裸鼠皮下移植瘤细胞的生长抑制作用及其副作用。

三、临床应用

采用经动脉灌注和静脉滴注的方式将 As₂O₃ 用于不能够手术的原发性肝癌患者的治疗。根据 2000 年中华外科学会肝脏外科学组第六届全国肝脏外科学术会议制定的条件^[4]选择患者。本组入选患者为 2000 年 9 月至 2003 年 9 月病例,共 71 例。患者一般状况均较好,无重要器官的器质性病变,无肝外器官转移,肝功能分级为 Child A 级或 Child B 级,肿瘤为多发或分散在肝脏的左右半肝;肿瘤巨大,无瘤侧肝脏未发生代偿性增大;肝内外胆管及健侧门静脉无癌栓;术后复发的患者不愿或不宜再次手术的。在进行治疗之前,患者及家属均签署了知

情同意书。

采用静脉滴注给药的患者 28 例, 其中男 19 例, 女 9 例, 年龄 37~71 岁, 平均 57.4 岁, 病灶数量 1~9 个, 平均 4.3 个。每例患者应用 20 mg As₂O₃, 每天 1 次静脉滴注, 连续 5 d 为一个疗程。

采用动脉灌注给药的患者 43 例, 其中男 28 例, 女 15 例, 年龄 34~70 岁, 平均 54.6 岁, 病灶数量 1~9 个, 平均 4.7 个。通过肝动脉置管造影明确诊断和定位, 将皮下埋藏式灌注装置(微泵)的导管置于肝左、肝右或肝固有动脉, 微泵的泵体埋藏于股三角(股动脉入路)或胸壁(腋动脉入路)。头皮针刺入泵体, 与微量注射泵连接。每天 1 次应用 20 mg As₂O₃, 连续 5 d 为一个疗程。每个月行 B 超或 CT 检查, 并检测血清甲胎蛋白(AFP)。

结 果

一、实验研究结果

1. 形态学变化: 不同浓度的 As₂O₃ 可以使肝癌细胞系 BEL-7402 生长受到抑制, 且有时间和剂量的依赖性, 药物剂量越大, 作用时间越长, 其生长受抑制越明显。正常情况下, BEL-7402 细胞成上皮形, 贴壁生长。在 As₂O₃ 的作用下, 癌细胞逐渐变圆, 折光性减弱, 细胞贴壁较差, 核染色质深染, 聚集于核膜下, 晚期可见凋亡小体(图 1)。

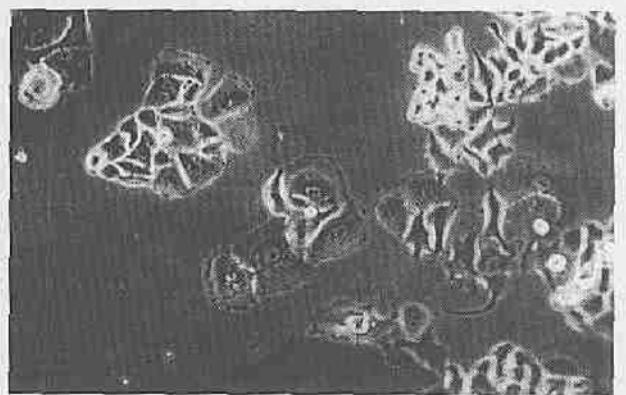


图 1 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As₂O₃ 作用 5 d 细胞变圆、折光性减弱, 出现凋亡小体(倒置显微镜 \times)

2. 流式细胞仪分析结果: 应用 As₂O₃ 后, 出现 G₂/M 期阻滞, 在 G₁ 峰前出现明显的凋亡峰。有明显的时间和剂量的依赖性, 较高浓度的 As₂O₃ 较早出现 G₂/M 期阻滞, 凋亡峰高尖。随作用时间的延长, 凋亡的现象越明显(图 2)。

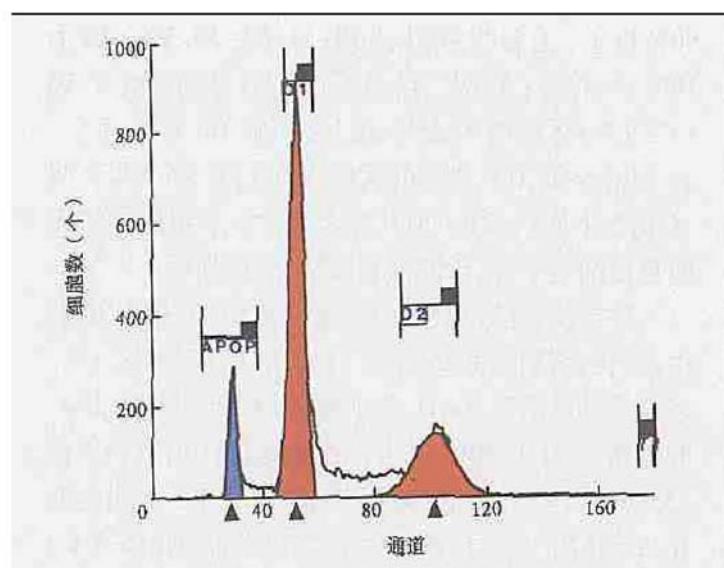


图 2 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As₂O₃ 作用 5 d 出现 G₂/M 期阻滞, 在 G₁ 峰前出现凋亡峰

3. DNA 梯状电泳结果: 不同浓度的 As₂O₃ 作用不同时间, 其出现梯状条带的时间亦不相同。随浓度的增加其出现梯状条带的时间越早, 随作用时间的延长其条带越明显, 且有明显的时间和剂量依赖性。

4. RT-PCR 结果: 不同浓度的 As₂O₃ 作用不同时间对在细胞凋亡过程中起关键作用的半胱氨酸蛋白酶-3 的 mRNA 影响不大, 没有明显的变化。

5. 蛋白质分析结果: 在应用 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 的 As₂O₃ 作用于肝癌细胞系 BEL-7402 后, 随作用时间的延长, Caspase-3 蛋白质的活性逐渐增高, 至 12 h 时达到高峰, 然后逐渐下降, 但仍保持较高水平(图 3)。

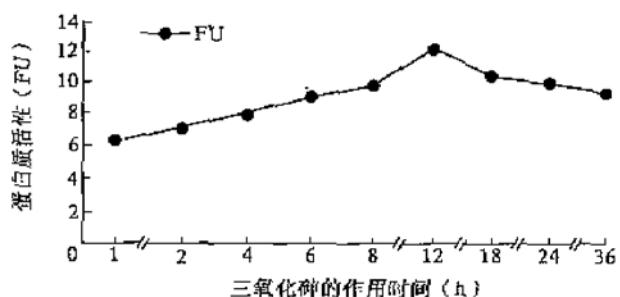


图 3 2 $\mu\text{mol}/\text{L}$ 三氧化二砷作用不同时间半胱氨酸蛋白酶-3 蛋白质的变化

6. As₂O₃ 对荷瘤裸鼠的作用: 在不同浓度的 As₂O₃ 作用下, 裸鼠皮下移植瘤的大小有明显的变化, 作用浓度越高, 移植瘤的生长抑制就越明显。

二、临床应用结果

1. 静脉滴注治疗效果: 25 例患者获得随访, 最长存活时间 17 个月, 1 年生存率为 28%。在静脉应用 As₂O₃ 6 个疗程后, 4 例(14.3%) 肿瘤体积均缩小

50% 以上, 无新发病灶出现; 11 例(39.3%) 缩小 10%~49%; 4 例(14.3%) 无明显变化; 5 例(17.9%) 体积增大 25% 以上; 4 例(14.3%) 死亡。24 例治疗前 AFP 增高的病例, 9 例(37.5%) AFP 明显下降, 1 例(4.2%) AFP 降至正常。本组患者均无明显白细胞下降、骨髓抑制、脱发等副作用。

2. 持续动脉灌注效果: 获得随访的 38 例患者中, 最长存活时间 26 个月, 1 年生存率为 58.1%。在持续动脉灌注 As₂O₃ 6 个疗程后, 16 例(37.2%) 肿瘤体积缩小 50% 以上, 无新发病灶出现; 14 例(32.6%) 缩小 10%~49%; 7 例(16.3%) 无明显变化; 9 例(20.9%) 体积增大 25% 以上; 7 例(16.3%) 死亡。37 例治疗前 AFP 增高的病例, 16 例 AFP 明显下降(43.2%), 3 例 AFP 降至正常(7.0%)。本组患者均无明显白细胞下降、骨髓抑制、脱发等副作用。只有 1 例因为持续高热于 4 个疗程后更换药物, 未计算在本组病例中。

讨 论

砷剂是一种广泛存在于自然界的毒性化合物, 早在 20 世纪 70 年代就已应用于白血病的治疗^[1]。到 20 世纪 90 年代, 逐渐发现其对急性早幼粒细胞白血病有显著效果^[2]。本研究显示, As₂O₃ 对肝癌细胞系亦有明显的效果, 它通过诱导肿瘤细胞凋亡而发挥作用^[3]。

细胞凋亡是一种相对于细胞坏死的、主动的、程序化的细胞死亡形式。本实验发现, As₂O₃ 对肝癌细胞的作用有明显的时间和剂量依赖性。较低浓度的 As₂O₃(1~2 μmol/L) 即对肝癌细胞系 BEL-7402 有明显的抑制作用, 且可使肝癌细胞发生凋亡。随着 As₂O₃ 浓度的提高, 其对肝癌细胞生长的抑制作用和促进凋亡作用变得更为明显, 而且发生作用的时间更短^[6]。

关于砷剂治疗肿瘤的机理一直是人们不断探索的问题。传统观念认为砷剂与蛋白质和氨基酸分子中的巯基具有较强的亲和性, 能影响巯基酶的活性^[7]; 也可直接与蛋白质的巯基结合, 使蛋白质失活, 引起细胞代谢异常, 发生凋亡^[3]。As₂O₃ 对白血病的作用机理主要是可下调白血病细胞 bcl-2 的表达, 使 bcl-2/bax 的比值失调; 也可选择性地与白血病细胞的白血病结合蛋白结合, 并促进其降解, 从而诱导细胞凋亡^[8]。本研究发现其对肝癌细胞系的作

用主要是使 Caspase-3 蛋白活性增加。在应用 2 μmol/L As₂O₃ 后逐渐升高, 至 12 h 时达高峰, 然后逐渐下降, 但仍维持高于用药前的水平。同时应用聚合酶链式反应发现 Caspase-3 的 mRNA 水平在用药前后并没有显著的变化。提示 As₂O₃ 使肝癌细胞发生凋亡的作用主要是通过使 Caspase-3 蛋白表达增高所致, 但其 mRNA 水平没有变化, 其作用位点是在转录水平后, 在翻译水平前。也就是说, As₂O₃ 能够使 Caspase-3 的酶原迅速转变为有活性的 Caspase-3, 且作用位点是在酶的前体水平。

在裸鼠荷瘤抑制实验取得了预想的效果之后, 我们借鉴血液系统肿瘤的治疗经验, 开展了静脉滴注 As₂O₃ 的临床治疗, 取得了显著的效果。由于原发性肝癌的血供主要来自于肝固有动脉, 我们进行持续动脉灌注治疗, 结果表明, 可以有效缓解肝区症状, 改善生活质量。由于局部持续用药, 可以使肿瘤细胞始终处于有效的药物浓度之下, 可以提高治疗效果, 减少全身副反应。应用 As₂O₃ 过程中无白细胞明显下降、骨髓抑制、脱发等副反应, 对肝、肾没有明显的毒性作用。低热比较常见, 一般于给药后 2~3 d 出现, 停药后 3~14 d 自行消失, 只有 1 例因为顽固性的高热退出了治疗。临床应用结果显示, As₂O₃ 是一种低毒、有效的治疗药物, 对于不能手术的原发性肝癌患者有很好的效果; 超选择性肝动脉置管, 连续区域化疗是最佳的给药方法。

参 考 文 献

- 孙洪德, 马玲, 胡晓晨, 等. 瘤灵一号结合中医辨证治疗急性早幼粒细胞性白血病. 中国中西医结合杂志, 1992, 12: 170-171.
- 张鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病. 中华血液学杂志, 1996, 17: 58-60.
- Ravandi F. Arsenic trioxide: expanding roles for an ancient drug? Leukemia, 2004, 18: 1457-1459.
- 中华医学会外科学分会肝脏外科学组. 原发性肝癌外科治疗方法的选择. 中华外科杂志, 2001, 39: 762-763.
- Tchounwou PB, Wilson BA, Ishaque AB, et al. Atrazine potentiation of arsenic trioxide-induced cytotoxicity and gene expression in human liver carcinoma cells (HepG2). Mol Cell Biochem, 2001, 222: 49-59.
- 刘连新, 朱安龙, 姜洪池, 等. 三氧化二砷对肝癌细胞系 BEL-7402 的影响. 中国普外基础与临床杂志, 2001, 8: 209-211.
- Mervis J. Ancient remedy performs new tricks. Science, 1996, 273: 578.
- Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As₂O₃ induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML proteins. Blood, 1996, 88: 1052-1061.

(收稿日期: 2004-10-25)

(本文编辑: 杨子明)