

[文章编号] 1007-385X(2002)03-0168-04

氧化砷对小鼠移植性肝癌的作用

沈 健, 吴敏华, 陈铭华, 李乔山, 沈忠英(汕头大学医学院病理教研室, 广东 汕头 515031)

[摘要] 目的: 研究三氧化二砷(As_2O_3)对体内抗上皮性实体瘤作用,用不同剂量 As_2O_3 治疗小鼠移植性肝癌。方法: 在 50 只小鼠腹腔分别注射 0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{mol/g}$ As_2O_3 , 观察急性毒性作用之后, 选择 1, 2, 3 $\mu\text{mol/g}$ 剂量进行抑瘤实验; 80 只小鼠双侧腋下移植肝癌细胞(1.5×10^6 细胞), 0, 1, 2, 3 $\mu\text{mol/g}$ As_2O_3 分别右腋下注射, 每日 1 次, 共 10 次。在接种肝癌细胞后第 30 天处死小鼠检查实体瘤大小和慢性毒性反应。结果: 右侧肿瘤直接注射 As_2O_3 组明显小于左侧($P < 0.05$); 不同剂量相比, 右侧给 2 和 3 $\mu\text{mol/g}$ As_2O_3 肿瘤重量小于对照组($P < 0.001$), 左侧肿瘤 1 和 2 $\mu\text{mol/g}$ 组肿瘤大于对照组($P < 0.05$), 3 $\mu\text{mol/g}$ 组却相反($P < 0.05$)。抑瘤机制是引起瘤细胞凋亡。慢性毒性作用引起肝、肾、脾损伤和血中白细胞降低。结论: As_2O_3 在合适剂量和直接接触瘤细胞, 对上皮性实体瘤将是一种有用的新疗法。应强调的是抗癌治疗中注意合适剂量和给药途径。

[关键词] 小鼠; 肝癌细胞; 三氧化砷; 凋亡

[中图分类号] R735.1 [文献标识码] A

The Effects of Arsenite Trioxide on the Transplanted Hepatic Carcinoma in Mice

SHEN Jian, WU Min-hua, CHEN Ming-hua, LI Qiao-shan, SHEN Zhong-ying (Department of Pathology, Shantou University Medical College, Shantou 515031, China)

[Abstract] Objective: To investigate the antitumor effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on solid tumor *in vivo*, the transplanted hepatic carcinoma of mice were treated with various dosages of As_2O_3 . **Methods:** After 50 mice were injected intraperitoneally with 0, 2, 4, 6, 8 $\mu\text{mol/g}$ As_2O_3 respectively for observation of acute toxicity, 1, 2, 3 $\mu\text{mol/g}$ were selected for this experiment. Eighty mice were transplanted with hepatic carcinoma cells (1.5×10^6 cells/each side) into both subaxillae. As_2O_3 in 0, 1, 2 and 3 $\mu\text{mol/g}$ were injected into right subaxilla respectively once every day for 10 days. At the 30th day after transplanted hepatic carcinoma cell, mice were killed and the size of solid tumors was measured. The chronic cytotoxicity of As_2O_3 was observed in these mice. **Results:** In right subaxillae tumors, which were injected directly with As_2O_3 , were apparent smaller than that in the left ($P < 0.05$). Comparing different dosage, the right solid tumors in 2 and 3 $\mu\text{mol/g}$ groups were smaller than that in control group ($P < 0.001$). In the left the tumor masses of 1 and 2 $\mu\text{mol/g}$ groups were larger than that in control group ($P < 0.05$) and 3 $\mu\text{mol/g}$ group vice versa ($P < 0.05$). The mechanism of action of As_2O_3 was inducement of cellular apoptosis. The damages of liver, kidney, spleen and decrease of WBC were found by chronic toxicity of As_2O_3 . **Conclusion:** Our results suggested that As_2O_3 in a convenient dosage and in direct contact with tumor cells might be a useful, novel therapy for epithelial solid tumor and the permissible dosage and the route of administration were emphasized in the anticancer therapy.

[Key words] mice; hepatic carcinoma; arsenic trioxide; apoptosis

* 三氧化二砷(As_2O_3)用于治疗白血病有显著疗效^[1], 在上皮性肿瘤细胞也见有诱导凋亡作用^[2]。我们过去的研究不同剂量对食管癌细胞的作用, 小剂量有促癌作用, 大剂量可诱发细胞凋亡和坏死^[3-4]。以上这些研究对象多是细胞株和白血细胞, As_2O_3 对实体瘤的治疗报导较少^[5]。本实验以小鼠两腋下移植肝

癌细胞, 形成实体瘤, 用 As_2O_3 治疗, 观察不同剂量 As_2O_3 对体内实体瘤的疗效, 并比较药物直接作用及间

* [基金项目] 广东省中医药局资助科研课题(100083)

[作者简介] 沈 健(1960-), 男, 实验师, 主要从事肿瘤诱发和肿瘤实验治疗研究。

接作用疗效的差异。

1 材料与方法

1.1 动物饲养

昆明种小鼠 130 只由我院动物房供应,鼠龄 6 周,体重 20~25 g,雌雄各半,在动物室饲养,每个标准小鼠笼内饲养 5 只,给块状混合饲料(我院动物中心提供)及自来水。经 1 周检疫后进行实验。

1.2 As₂O₃ 配制

As₂O₃(10 mg/10 ml 安瓿,哈尔滨医科大学附属医院产品),用生理盐水(NS)稀释至 200 μmol/ml。

1.3 As₂O₃ 急性毒性实验

50 只小鼠,10 只 1 组,腹腔注射(i. p.)配制 As₂O₃, 0.2, 0.4, 0.6 和 0.8 ml(每只小鼠药物浓度约 2,4,6,8 μmol/g)和生理盐水(NS)0.8 ml 为对照组观察 7 d。统计各剂量组小鼠死亡率。

1.4 肿瘤接种

小鼠肝癌细胞株腹水型 H22,引自中山医科大学实验动物中心。80 只小鼠移植肝癌细胞,每只左、右腋下各接 1.5 × 10⁶ 细胞/0.2 ml,肿瘤细胞接种后 24 h 开始治疗,观察 30 d。

1.5 抑癌实验

每组 10 只小鼠,分别以 0.1, 0.2, 0.3 ml 配制 As₂O₃(每只动物约 1,2,3 μmol/g),每日右腋下接种肿瘤处注射 1 次,共 10 d,对照组注射 0.3 ml NS。本实验重复 1 次。As₂O₃ 治疗后 20 d(接种肿瘤后 30 d),小鼠深麻醉至死。检查内容:① 肿瘤重量,观察不同 As₂O₃ 剂量差别,左右侧肿瘤的差别;② 肿瘤细胞超微结构。本实验重复 1 次。

1.6 As₂O₃ 的慢性毒性作用

检查小鼠心、肺、肝、脾、肾和淋巴结组织切片;血常规检查(血细胞自动分析仪),检查白血球(WBC),红血球(RBC),血色素(Hb)和血小板(PLT)数值。以了解 As₂O₃ 慢性毒性作用。

1.7 统计学处理

采用 *t* 检验方法(SPSS 10.0 软件);多个样本均数间的比较,用 post hoc 比较法(SPSS 10.0 软件)。

2 结果

2.1 急性毒性作用

小鼠腹腔 1 次注射不同剂量 As₂O₃,7 d 后统计小鼠死亡数(见表 1)。腹腔内 1 次注射 As₂O₃ 随着剂量增加,小鼠急性死亡数增加。2 μmol/g 组未见小鼠死亡,4 μmol/g 组 20% 小鼠死亡。本实验选择 1,2,3 μmol/g 给药,0 μmol/g 为对照组。

表 1 小鼠腹腔注射不同剂量 As₂O₃ 的死亡率(%)

Tab. 1 The mortality(%) of mice i. p. injection with various dosage of As₂O₃

Dosage	Animal no.	Lethal no.	Mortality
0 mol/g	10	0	0%
2 μmol/g	10	0	0%
4 μmol/g	10	2	20%
6 μmol/g	10	5	50%
8 μmol/g	10	8	80%

2.2 As₂O₃ 抑癌作用

同一小鼠左右腋接种同数量瘤细胞,As₂O₃ 注射右腋下,右腋肿瘤为药物直接作用组,左侧为间接作用组(见表 2),左右侧用药的 3 组肿瘤重量比较,右侧肿瘤明显小于左侧($P < 0.05$)。不同剂量 As₂O₃ 各组比较,右侧 2,3 μmol/g 组肿瘤平均重量小于对照组。经统计学处理差异有显著性($P < 0.001$)。1 μmol/g 组和对照组比较则无差别。在同一小鼠左侧肿瘤,1 μmol/g 和 2 μmol/g 组肿瘤重量比对照组大($P < 0.05$); 3 μmol/g 组肿瘤重量比对照组小($P < 0.05$),说明治疗实体瘤不同 As₂O₃ 剂量和用药途径其结果不同。大剂量有抑癌作用,小剂量有促癌作用;As₂O₃ 直接作用于瘤细胞疗效较好。

表 2 不同剂量 As₂O₃ 对小鼠移植性肝癌重量(mg)的影响

Tab. 2 The effect of As₂O₃ in various dosages on the weight(mg) of transplanted hepatic carcinoma in mice

Dosage	Left	Right
1 μmol/g	1691.0 ± 439.7 [△]	1303.0 ± 232.4 [▲]
2 μmol/g	1639.0 ± 303.9 [□]	434.0 ± 369.7 [■]
3 μmol/g	1027.0 ± 130.0 [○]	288.9 ± 159.6 [●]
Control (NS)	1273.5 ± 313.9	1288.0 ± 260.0

Multiple sample comparison of right tumors with left (Post Hoc, SPSS 10.0) $P < 0.05$; Single factor *t* test, compared with control group

$\Delta t = 2.44, P < 0.05$; $\blacktriangle t = 0.136 P > 0.05$

$\square t = 2.65, P < 0.05$; $\blacksquare t = -5.98 P < 0.001$

$\circ t = -2.516, P < 0.05$; $\bullet t = -9.95 P < 0.001$

2.3 肿瘤细胞超微结构改变

未经治疗的肝细胞呈圆形或立方形,细胞外观饱满有一圆形细胞核,核仁大,胞浆有丰富线粒体(图

1A);经 3 μmol/g 的 As₂O₃ 治疗,12 h 后肝癌细胞呈凋亡或坏死改变,线粒体肿胀,外膜破裂,呈气球样变;细胞核染色质凝集,核固缩或碎裂,核膜破裂,凋亡小体形成,呈典型凋亡形态(图 1B)。因此认为 As₂O₃ 对移植性肝癌的治疗作用是诱导细胞凋亡。

图 1 As₂O₃ 诱导肝癌细胞凋亡

Fig. 1 Apoptosis of hepatic carcinoma cells induced by As₂O₃
 A: Hepatic carcinoma cell without arsenic treatment(EM, ×10K);
 B: By treated with As₂O₃ in 3 μmol/g, hepatic carcinoma cells displayed apoptotic changes.(EM, ×10K)

2.4 As₂O₃ 慢性毒性作用

经 3 μmol/g As₂O₃ 作用 10 次,30 d 后检查小鼠心、肺、肝、肾、脾、淋巴结和血常规,发现心、肺未见明显改变。肝组织呈毒性改变,中央静脉周围肝细胞脂肪变,部份肝细胞核固缩,细胞凋亡。部份细胞核增

大,无明显炎症反应,但窦内皮细胞增多(图 2A)。肾小管有散在凝固性坏死(图 2B)。脾脏细胞稀疏有灶性淋巴细胞坏死,脾小体淋巴细胞减少。从形态改变说明 As₂O₃ 对肝、肾、脾细胞有一定毒性作用。

图 2 小鼠肝和肾组织病理改变

Fig. 2 Pathological change of murine liver and kidney
 At the 30 th day after treatment with As₂O₃ in 3 μmol/g
 A: Partial cells of liver cells displayed fatty degeneration and apoptosis (HE, ×200); B, The tubular epithelium of kidney displayed locally coagulated necrosis (arrow). (HE, ×200)

血常规检查(见表 3),10 只小鼠平均值计算,1 μmol/g 组 WBC 比对照组增加($P < 0.01$)。3 μmol/g 组 WBC 数降低($P < 0.01$),其它各成份和对照组无明显差异。

表 3 As₂O₃(3 μmol/g) 对小鼠血细胞的影响
 Tab. 3 The effects of As₂O₃(3 μmol/g) on blood cells in mice

Blood cells	NS	1 μmol/g	2 μmol/g	3 μmol/g
WBC(×1000)	6.00 ± 1.35	9.50 ± 2.11 **	5.73 ± 1.55	3.37 ± 1.05 *
RBC(×100 万)	9.17 ± 0.62	8.34 ± 0.76	7.77 ± 1.10	8.27 ± 0.97
Hb (g/L)	127.00 ± 8.67	115.00 ± 7.94	115.00 ± 12.12	101.30 ± 26.65
PLT (×1000)	538.67 ± 119.56	551.33 ± 269.34	586.00 ± 224.35	383.00 ± 337.99 ***

t test, compared with control; * $t = 4.86, P < 0.01$; ** $t = 4.42, P < 0.01$; *** $t = 1.37, P > 0.05$

3 讨论

我们过去的研究认为 As₂O₃ 对体外培养的细胞有双相作用,小剂量 As₂O₃ 可促进癌细胞增殖,大剂量有抑癌作用^[3],本实验也见类似结果。本研究设计同一小鼠左右侧腋下移植同样数量肝癌细胞,右侧腋下肿瘤部位注射 As₂O₃,作为 As₂O₃ 直接作用组;As₂O₃ 通过血液或淋巴液到达对侧,则为间接作用于癌细胞,以

此观察其作用差异。我们发现 As₂O₃ 对小鼠移植性肝癌细胞实体瘤的作用,以药物直接作用瘤细胞疗效最显著,对侧间接作用肿瘤疗效较差,小剂量甚至有促进肿瘤生长。此现象值得临床重视,即应用 As₂O₃ 治疗实体瘤应以适当剂量进行直接注射,以提高其疗效。有人认为 As₂O₃ 对实体瘤的疗效除了对瘤细胞直接毒性作用以外,尚可能 As₂O₃ 有选择性血管闭塞作用,引起瘤体供血不足,致使瘤组织坏死^[6],As₂O₃ 对肿瘤的

治疗机制有新的发展。

我们过去研究 As_2O_3 对食管癌细胞抑瘤作用主要是诱导瘤细胞的凋亡, 凋亡细胞早期改变在线粒体^[7-8]。本实验 As_2O_3 对小鼠移植性肝癌细胞实体的有效作用也见肝细胞凋亡。电镜检查, 线粒体肿胀, 线粒体外膜破裂。线粒体的损伤可释放细胞色素 C 和凋亡诱导因子(AIF)产生半胱氨酸酶(caspases)系活化引起细胞凋亡, 因此认为 As_2O_3 有线粒体毒性作用(Mitochondriotoxicity)^[2]。肝癌细胞线粒体很丰富, 因此可选择 As_2O_3 作为肝癌治疗的药物。线粒体是细胞氧化代谢主要细胞器, As_2O_3 可通过线粒体产生超氧阴离子和脂质过氧产物(MDA)^[9], 损伤线粒体膜和其它细胞成份。 As_2O_3 还可通过抑制谷氨酸酶系和过氧化歧化酶系抑制瘤细胞生长和诱导凋亡^[10]。线粒体功能改变主要是由于线粒体跨膜电位($\Delta\psi_m$)下降^[11]及 As_2O_3 作用于巯基氧化有关。

As_2O_3 是一剧毒药物, 其急性毒性作用, 4 $\mu\text{mol/g}$ 有 20%, 8 $\mu\text{mol/g}$ 有 80% 小鼠死亡, 故采用 < 4 $\mu\text{mol/g}$ 。说明治疗有效量和中毒量极为接近, 值得注意。在氧化砷有效地抑瘤作用的同时应注意其慢性毒性作用, 本实验小鼠在局部用药(3 $\mu\text{mol/g}$)10 次, 1 个月后发现明显病变有肝、脾、肾和血中白血球降低。胃肠道、心、肺、脑形态改变不明显。由于 As_2O_3 在肝蓄积和解毒, 肝细胞首当其毒性作用; 肾脏是 As_2O_3 主要排泄器官, 故肾小管上皮也受其损伤。

总之, 适当浓度的三氧化二砷对小鼠移植性肝癌有抑瘤作用。药物直接作用于实体瘤, 肿瘤明显缩小, 有统计学显著意义。本实验提示小剂量 As_2O_3 ($\leq 1 \mu\text{mol/g}$) 有一定促增殖作用; 大剂量 ($> 4 \mu\text{mol/g}$) 有毒性作用, 因此治疗量和中毒量相近。慢性中毒以肝、肾、脾和血白细胞受损。从动物实验的结果证明 As_2O_3

对肝癌实体瘤有一定疗效, 选择适当剂量直接作用于瘤细胞有明显抑瘤作用, 可考虑试用于肿瘤直接注射疗法。

[参考文献]

- [1] Shen ZX, Chen G, Ni JH, *et al.* Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL). II clinical efficacy and pharmacokinetics[J]. *Blood*, 1997, 89: 3354-3360.
- [2] Shen ZY, Tan LJ, Shen J, *et al.* Arsenic trioxide induces apoptosis of esophageal carcinoma *in vitro*[J]. *Int J Mol Med*, 1999, 4: 33-37.
- [3] 沈健, 吴敏华, 沈忠英, 等. 不同剂量三氧化二砷对食管癌细胞的作用[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2001, 8(2): 106-109.
- [4] 沈忠英, 陈彩云, 沈健, 等. 氧化砷诱导食管癌细胞凋亡和坏死的超微结构研究[J]. *中国医学物理学杂志*, 1999, 16(5): 91-94.
- [5] 陈洪, 潘麒麟, 秦叔逵. 砒霜提取物三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究[J]. *江苏中医*, 2000, 21(4): 42-43.
- [6] Lew YS, Brown SL, Griffin RJ, *et al.* Arsenic trioxide causes selective necrosis in solid murine tumors by vascular shutdown[J]. *Cancer Res*, 1999, 59: 6033-6037.
- [7] 沈忠英, 沈健, 陈铭华, 等. 氧化砷诱导食管癌细胞凋亡线粒体形态改变[J]. *中华病理学杂志*, 2000, 29(3): 200-203.
- [8] Shen ZY, Shen J, Cai WJ, *et al.* The alteration of mitochondria is an early event of arsenic trioxide induced apoptosis in esophageal carcinoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2000, 5: 155-158.
- [9] Wang TS, Kuo CF, Jan KY, *et al.* Arsenite induces apoptosis in Chinese hamster ovary cells by generation of reactive oxygen species[J]. *J Cell Physiol*, 1996, 169: 256-268.
- [10] Dai J, Weinberg RS, Waxman S, *et al.* Malignant cells can be sensitized to undergo growth inhibition and apoptosis by arsenic trioxide through modulation of the glutathione redox system[J]. *Blood*, 1999, 93(1): 268-277.
- [11] 沈健, 吴敏华, 沈忠英, 等. 氧化砷诱导食管癌细胞凋亡线粒体超微结构和跨膜电位差的改变[J]. *汕头大学医学院学报*, 2002, 15(2): 68-70.

[收稿日期] 2002-02-28

[修回日期] 2002-07-22

《临床肿瘤学杂志》征订启事

《临床肿瘤学杂志》是面向全国学术类科技期刊。本刊已被国家科技部心选为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊和《万方数据-数字化期刊群》数据库来源期刊, 并被北京大学图书馆《中文科技期刊目录》、《中国医学文摘(肿瘤学)》及《中国肿瘤年鉴》等收录, 被 CNKI《中国期刊网》、《中国学术期刊(光盘版)》、CSCO 网站(www.cscoc.org.cn)选为全文收录来源期刊。本刊侧重肿瘤临床, 并结合基础研究, 以肿瘤专业者及其他医药卫生人员为主要读者对象。主要刊登肿瘤防治新成果、新进展和新经验, 深受广大肿瘤科研工作者的厚爱。

《临床肿瘤学杂志》为双月刊, 国际标准刊号: ISSN 1009-0460, 国内统一刊号: CN 32-1577/R。大十六开本, 每期 80 页, 采用进口铜板纸激光照排、胶印, 国内外公开发行。邮发代号: 28-267, 单价 9 元, 全年 54 元, 全国各地邮局均可订阅。如邮局订阅延误, 可汇款至南京市杨公井 34 标 34 号《临床肿瘤学杂志》编辑部补订, 邮编: 210002, 电话: (025) 6648090-615。