

三氧化二砷对肝癌诱导血管内皮细胞相关基因蛋白表达的影响

崔永安, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 左小东

崔永安, 左小东, 扬州大学临床医学院肿瘤诊疗中心
江苏省扬州市 225001
秦叔逵, 陈惠英, 南京八一医院全军肿瘤中心 江苏省南京市 210002
王锦鸿, 南京中医药大学文献研究所 江苏省南京市 210029
全军“十·五”攻关课题 No. MB2001; 江苏省科技厅资助项目, No. BQ98048; 南京军区重点课题, No. NJ9804
通讯作者: 秦叔逵, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 南京八一医院全军肿瘤中心. qinsk@csco.org.cn
电话: 025-84453932
收稿日期: 2005-02-14 接受日期: 2005-03-22

摘要

目的: 研究三氧化二砷(As_2O_3)注射液对肝癌诱导血管内皮细胞相关基因蛋白表达的影响。

方法: 构建了人肝癌 SMMC-7721 细胞株诱导人脐静脉内皮细胞 ECV304 增殖的实验模型, 应用免疫组织化学方法, 严密观察了 As_2O_3 注射液对 SMMC-7721 细胞、ECV304 细胞及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞, 有关基因蛋白表达的影响。

结果: 2 mg/L 的 As_2O_3 注射液, 对 SMMC-7721 细胞、ECV304 细胞及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞表达肿瘤相关基因蛋白, 均有一定的调节作用; 可下调 VEGF、整合素 $\beta 1$ 和 EGFR 的表达; 上调 E-钙粘蛋白的表达。

结论: As_2O_3 注射液抗原发性肝癌及防治肝癌复发和转移的作用机制, 可能与其能调节肝癌细胞及血管内皮细胞 VEGF、整合素 $\beta 1$ 、E-钙粘蛋白和 EGFR 等基因蛋白的表达, 干预细胞的信号转导, 抑制肿瘤血管形成有关。

崔永安, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 左小东. 三氧化二砷对肝癌诱导血管内皮细胞相关基因蛋白表达的影响. 世界华人消化杂志 2005;13(9):1142-1144
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1142.asp>

0 引言

正常细胞转化成为恶性肿瘤细胞的过程复杂而漫长, 从分子生物学角度来看, 这是细胞分子生物学调控机制从量变到质变, 长期积累的后果. 原癌基因的激活, 癌基因的异常表达, 抗癌基因和肿瘤转移相关基因的激活与表达, 都与肿瘤的形成、转移及耐药性关系至为密切. 肿瘤相关基因的研究, 在肿瘤形成机制和探讨抗肿瘤新的治疗方法中均有十分重要的意义. 我们主要探讨了 As_2O_3 注射液对人肝癌 SMMC-7721 细胞、血管内皮细胞 ECV304 及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞血管内皮生长因子(VEGF)、整合素 $\beta 1$ (CD29)、E-钙粘蛋白(E-CD)、表皮生长因子受体(EGFR)等有关

基因蛋白表达的影响, 以期从细胞分子生物学角度进一步揭示 As_2O_3 抗肿瘤的作用机制。

1 材料和方法

1.1 材料 人类肝癌细胞株 SMMC-7721 和建株人脐静脉内皮细胞 (ECV304), 均引自中国科学院上海细胞生物研究所. 亚砷酸注射液 (As_2O_3 注射液), 哈尔滨伊达药业有限公司产品, 批号为 20010703, 规格 10 mL : 10 mg. 使用前用 RPMI-1640 培养液稀释至所需浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养^[1] SMMC-7721 细胞和 ECV304 细胞接种于无菌培养瓶中, 加入适量 RPMI-1640 培养液, 于 37°C、50 mL/L CO_2 及饱和湿度的培养箱中培养. 每 3-5 d 传代 1 次. 肝癌细胞条件培养液培养 ECV304 细胞, 则用预先制备的肝癌细胞条件培养液, 代替普通 RPMI-1640 培养液, 进行细胞培养. 肝癌细胞条件培养液的制备^[2]: 取 SMMC-7721 细胞, 按 2×10^8 /L/孔接种于 6 孔板, 48 h 后, 收集条件培养液, 滤膜过滤后备用。

1.2.2 免疫组化检测 按免疫组化超敏试剂盒 (SP) 说明书的步骤, 参照方福德 *et al*^[3] 介绍的方法操作. 分别收集与 As_2O_3 (终浓度为 2 mg/L) 共孵育 48 h 的 SMMC-7721 细胞、ECV304 细胞及 SMMC-7721 细胞条件培养液培养的 ECV304 细胞, 涂片, 风干, 4°C 丙酮固定, 晾干. 每张涂片加 50 μ L 过氧化酶溶液以阻断内源性过氧化酶的活性, 室温下孵育 10 min, PBS (pH7.4) 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 50 μ L 的非免疫性动物血清, 室温下孵育 10 min; 吸去多余的液体, 每张涂片加 50 μ L 的一抗 (VEGF、整合素 $\beta 1$ 、E-钙粘蛋白及 EGFR), 室温下孵育 1 h, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 50 μ L 生物素标记的二抗, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 50 μ L 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化酶溶液, 室温下孵育 10 min, PBS 冲洗 3 次, 每次 5 min; 每张涂片加 100 μ L 新鲜配制的 DAB 溶液, 显微镜下观察 3-10 min, 自来水冲洗, 苏木素复染, PBS 冲洗返蓝, 中性树胶封固, 镜检. 采用已知阳性切片作阳性对照, 用 PBS 代替一抗作阴性对照。

1.2.3 免疫组化染色阳性判断 以胞质和/或胞膜呈棕黄色为阳性细胞, 油镜下观察 200 个细胞, 计算阳性细胞百分率. 阳性率 < 5% 为 (-); 5-25% 为 (+); 26-50% 为 (2+); > 50% 为 (3+).

统计学处理 应用 SPSS 10.0 软件进行 *t* 检验和 Spearman 秩相关检验统计分析。

2 结果

2.1 As₂O₃对ECV304细胞相关基因蛋白表达的影响(表1) ECV304细胞未加药组, VEGF基因表达强(3+), CD29基因表达强(3+), E-CD基因表达弱(+), EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后, VEGF表达受到明显抑制(-), CD29表达明显被抑制(-), E-CD表达增强(3+), EGFR表达明显抑制(-).

表1 三氧化二砷对ECV304细胞肿瘤相关基因表达的影响(mean ± SD, n = 6)

	VEGF	EGFR	CD-29	E-CD
对照组	123.17 ± 23.67	126.67 ± 16.82	102.67 ± 25.90	13.33 ± 5.501
用药组	9.5 ± 5.4	9.5 ± 5.89	9 ± 6.19	103 ± 18.58
<i>t</i>	11.466	16.10	8.614	11.335
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 As₂O₃对SMMC-7721细胞相关基因蛋白表达的影响(表2) SMMC-7721细胞未加药组, VEGF基因表达较强(2+), CD29基因表达强(3+), E-CD基因表达弱(+), EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后, VEGF表达受到抑制(+), CD29表达明显被抑制(+), E-CD表达明显增强(3+), EGFR表达明显抑制(+).

表2 三氧化二砷对SMMC-7721细胞肿瘤相关基因表达的影响(mean ± SD, n = 6)

	VEGF	EGFR	CD-29	E-CD
对照组	75.83 ± 27.61	106 ± 27.80	108.67 ± 33.74	15 ± 8.56
用药组	10.83 ± 6.15	19.33 ± 14.83	14.5 ± 8.85	107.5 ± 21.51
<i>t</i>	5.629	6.738	6.613	9.788
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.3 As₂O₃对肝癌细胞条件液培养的ECV304细胞相关基因蛋白表达的影响(表3) SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组, VEGF基因表达强(3+), CD29基因表达强(2+), E-CD基因表达弱(+), EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后, VEGF表达受到抑制(+), CD29表达明显抑制(-), E-CD表达增强(2+), EGFR表达明显抑制(-).

表3 三氧化二砷对肝癌细胞条件液培养的ECV304细胞肿瘤相关基因表达的影响(mean ± SD, n = 6)

	VEGF	EGFR	CD-29	E-CD
对照组	131.67 ± 25.16	142.83 ± 15.13	99.83 ± 21.78	17.33 ± 9.87
用药组	21.83 ± 7.63	9.33 ± 4.18	9.67 ± 5.89	98.67 ± 18.86
<i>t</i>	10.233	20.831	9.787	9.357
<i>P</i>	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

3 讨论

从肿瘤相关基因着手来系统地研究肿瘤的形成、转移和

复发过程,是目前国内、外肿瘤学研究的热点课题.肿瘤相关基因的种类多种多样,按其功能可分为生长因子、生长因子受体、具有催化活性的信号转导蛋白、不具备催化活性的信号转导蛋白、核转录因子等.因此,肿瘤相关基因的生物学功能也是多种多样的.对肿瘤相关基因的研究,有助于了解肿瘤形成的过程.从肿瘤本身的细胞总数来看,肿瘤细胞总数在生长阶段是不断增加的.从细胞凋亡角度来看,肿瘤细胞的细胞凋亡倾向降低.无论是细胞生长过度,还是细胞凋亡倾向降低,其最终的结果是肿瘤本身的细胞总数增加,肿瘤体积不断增大.而无论是肿瘤的增殖还是凋亡,从分子生物学角度来看,都是由于基因的表达与调控,即肿瘤相关基因的表达与调控所决定的.因此,肿瘤相关基因的研究,对于了解肿瘤的增殖和凋亡过程,探索肿瘤转移的机制,研究新型的肿瘤标志物,促进肿瘤特异性诊断技术的开发和应用,以及开拓肿瘤的生物学治疗方法,都有十分重要的意义.

以往的研究表明,As₂O₃可诱导人肝癌细胞凋亡,对肿瘤相关基因具有调节作用.如As₂O₃可上调肝癌细胞凋亡促进基因bax和Fas的表达^[4-8],下调凋亡抑制基因bc1-2的表达^[9].对VEGF、MMP-2、CD44有下调作用,对nm23有上调作用^[10].我们的研究结果进一步表明,

3.1 As₂O₃具有抑制VEGF基因蛋白表达的作用 VEGF及其受体(VEGFR)在肝癌组织中较正常肝组织呈过表达,与肝癌的生长、转移、复发及治疗密切相关^[11-12].我们的实验表明,As₂O₃作用于SMMC-7721细胞、ECV304细胞及SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞后,ECV304细胞未加药组,VEGF基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,VEGF表达受到明显抑制(-);SMMC-7721细胞未加药组,VEGF基因表达较强(2+),经As₂O₃药物作用后,VEGF表达受到抑制(+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,VEGF基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,VEGF表达受到抑制(+).说明As₂O₃注射液可通过下调VEGF的表达,影响VEGF的信号通路,来抑制肿瘤血管形成、控制肿瘤细胞的生长.

3.2 As₂O₃可抑制肝癌细胞及血管内皮细胞整合素β1(CD29)的表达 肝癌组织内CD29的表达明显高于非肝癌组织,并且与肝癌的侵袭性和转移有关^[13-15].我们的研究表明,ECV304细胞未加药组,CD29基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,CD29表达明显被抑制(-);SMMC-7721细胞未加药组,CD29基因表达强(3+),经As₂O₃药物作用后,CD29表达明显被抑制(+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,CD29基因表达强(2+),经As₂O₃药物作用后,CD29表达被抑制(-).说明As₂O₃注射液抗肝癌作用机制之一,可能与下调整合素β1的表达有关,通过影响整合素β1的信号通路,影响整合

素介导的肝癌细胞与肝癌细胞、肝癌细胞与细胞外基质的黏附,影响整合素调控的细胞外基质的降解、肿瘤细胞的运动,及肿瘤血管形成中的某个环节,来控制肿瘤细胞的生长。

3.3 As₂O₃可上调肝癌细胞及血管内皮细胞 E-钙粘蛋白(E-CD)的表达 E-CD在肝癌发生、发展过程中发挥重要作用,肝癌组织中E-CD的表达与癌灶体积有显著的相关性,E-CD蛋白表达的降低是肝癌重要的恶性生物学指标,对了解和判断肝癌的恶性程度及患者的预后具有重要意义^[16-17]。本研究表明,ECV304细胞未加药组,E-CD基因表达弱(+),经As₂O₃药物作用后,E-CD表达明显增强(3+);SMMC-7721细胞未加药组,E-CD基因表达弱(+),经As₂O₃药物作用后,E-CD表达明显增强(3+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,E-CD基因表达弱(+),经As₂O₃药物作用后,E-CD表达有所增强(2+)。说明As₂O₃注射液抗肝癌作用机制之一,可能与提高E-CD蛋白表达有关,通过影响E-CD的信号通路,影响E-CD介导的肝癌细胞与肝癌细胞、肝癌细胞与细胞外基质的黏附,影响E-CD调控的细胞外基质的降解、肿瘤细胞的运动,及肿瘤血管形成中的某个环节有关。

3.4 As₂O₃对肝癌细胞EGFR表达具有抑制作用 EGFR在人肝癌的发生、发展中发挥一定的作用^[18]。As₂O₃作用SMMC-7721细胞、ECV304细胞及SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞后,ECV304细胞未加药组,EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后,EGFR表达明显抑制(-);SMMC-7721细胞未加药组,EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后,EGFR表达明显抑制(+);SMMC-7721细胞条件培养液培养的ECV304细胞未加药组,EGFR基因表达强(3+);经As₂O₃药物作用后,EGFR表达明显抑制(-)。说明As₂O₃注射液可通过下调肝癌细胞EGFR蛋白的表达,影响EGFR所介导的信号转导通路,从而抑制了肿瘤细胞的增殖和迁移,抑制了肿瘤新生血管形成,达到治疗肿瘤、防治肿瘤转移和复发的目的。

由于EGFR及其配体与E-CD、整合素等因子表达具有相关性,其中某一因子发生表达改变,或相互作用共同改变,均可对肿瘤的发生、发展及转移产生重要影响。

我们的研究表明,As₂O₃注射液对这些因子的表达均有一定调节作用,但其间的相互关系如何,尚有待进一步研究。

4 参考文献

- 1 鄂征. 组织培养技术及其在医学研究中的应用. 第1版. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2004:125
- 2 王兵, 王杰军, 徐钧, 许青, 高勇, 郭静. 人参皂苷R_{g3}对胃癌诱导血管内皮细胞增殖的抑制作用. 肿瘤防治杂志 2001;8:234-236
- 3 方福德, 周吕, 丁灏, 张德昌. 现代医学实验技巧全书(上、下册). 第1版. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1995:165
- 4 秦叔逵, 陈洪, 陈惠英, 马军, 潘其声, 刘文虎. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株凋亡的初步研究. 临床肿瘤学杂志 1998;3:40
- 5 刘琳, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷对人肝癌细胞增殖和超微结构的影响. 肿瘤防治研究 2001;28:426-428
- 6 陈洪, 秦叔逵, 潘麒声, 陈惠英, 马军. 三氧化二砷抗肝癌作用的实验研究. 中华肝病杂志 2000;8:27-29
- 7 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 陈洪, 刘文虎, 王锦鸿. 三氧化二砷对人肝癌细胞选择性抑制作用的实验研究. 临床肿瘤学杂志 1999;4:39-41
- 8 陈惠英, 刘文虎, 秦叔逵. 三氧化二砷对肝癌细胞株凋亡的诱导作用. 世界华人消化杂志 2000;8:532-535
- 9 刘琳, 秦叔逵, 陈惠英, 王锦鸿, 陈洪, 马军, 刘文虎. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究. 中华肝胆病杂志 2000;8:367-369
- 10 华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷抗肿瘤血管形成研究. 世界华人消化杂志 2004;12:27-31
- 11 Suzuki H, Seto K, Shinoda Y, Mori M, Ishimura Y, Suematsu M, Ishii H. Paracrine upregulation of VEGF receptor mRNA in endothelial cells by hypoxia-exposed hep G2 cells. *Am J Physiol* 1999;276:G92-97
- 12 邓靖宇, 何生. VEGF在肝癌中的作用. 世界华人消化杂志 2004;12:454-458
- 13 郭悦青, 易继林, 闫振宇, 熊荣斌, 叶关泉. 整合素Integrin β1在原发性肝癌组织内的表达及意义. 数理医药学杂志 2004;17:312-315
- 14 王桂兰, 陈莉. 整合素在肝癌研究中的意义. 临床肿瘤学杂志 2004;9:325-340
- 15 Yamamoto H, Itoh F, Adachi Y, Sakamoto H, Adachi M, Hinoda Y, Imai K. Relation of enhanced secretion of active matrix metalloproteinases with tumor spread in human hepatocellular carcinoma. *Gastroenterology* 1997;112:1290-1296
- 16 Matsumoto A, Ono M, Fujimoto Y, Gallo RL, Bernfield M, Kohgo Y. Reduced expression of syndecan-1 in human hepatocellular carcinoma with high metastatic potential. *metastatic potential. Int J Cancer* 1997;74:482-491
- 17 成峰, 王学浩, 钱建民, 张峰, 李相成. E钙粘蛋白、syndecan-1蛋白在肝细胞性肝癌中的表达与肝癌侵袭的关系. 中华普通外科杂志 2003;18:141-142
- 18 Fukusato T, Mori S, Kawamoto T, Taniguchi S, Machinami R. Immunohistochemical and ultrastructural localization of epidermal growth factor receptor in human liver and hepatocellular carcinoma tissues. *Acta Pathol Jpn* 1990;40:22-29

编辑 张海宁