中华实验外科杂志 2007 年 5 月第 24 卷第 5 期 Chin J Exp Surg, May 2007, Vol 24, No. 5

· 胃外科 ·

六氧化四砷对小鼠胃癌生长和转移的抑制作用

陶厚权 施敦

【摘要】 目的 观察六氧化四砷(As_4O_6)对小鼠胃癌生长和转移的抑制作用。方法 完整组织块 SCID 鼠胃壁原位种植,建立胃癌转移模型。将裸鼠 40 只随机分为 4 组,每组 10 只。移植后第 7 天开始,分别给予生理盐水(对照组)、5-氟尿嘧啶(5-Fu 组)、As_4O_6 组、5-Fu 和 As_4O_6 联合应用(5-Fu + As_4O_6 组),每日 1 次,共 6 周。种植后第 8 周末处死动物,原位肿瘤切除称重,计算抑瘤率、测定肿瘤微血管密度(MVD)和细胞凋亡指数(AI),并检查转移情况,计算转移抑制率。结果 与对照组比较,5-Fu 组、As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组的抑瘤率分别为46.3%、52.2%和67.9%(均 $P<0.05$),MVD 分别为(12.2±5.2)、(7.1±3.5)($P<0.05$)和(5.6±3.3)($P<0.05$),AI 分别为(6.82±4.27)、(10.51±6.19)($P<0.05$)和(14.66±7.54)($P<0.05$),肝转移抑制率分别为25%、55%($P<0.05$)和 70%($P<0.05$),腹膜转移抑制率分别为22.9%、61.4%($P<0.05$)和87.1%($P<0.05$)。As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组胃癌生长和转移受到明显抑制,以 5-Fu 和 As_4O_6 联用组效果最明显。结论 As_4O_6 通过抑制血管生成对胃癌生长和转移有明显抑制作用,与 5-Fu 联用可起协同抑制作用。

【关键词】 胃肿瘤; 六氧化四砷; 脱噬作用; 转移

Inhibitory effects of tetraarsenic oxide on the growth and metastasis of gastric cancer in SCID mice

TAO Hou-quan, SHI Dun. Department of Surgery, Zhejiang Provincial Peoples' Hospital, Hangzhou 310014, China

【Abstract】 **Objective** To study the effect of tetraarsenic oxide (As_4O_6) on the growth and metastasis of gastric cancer in SCID mice. **Methods** Metastatic model of human gastric cancer was established by orthotopic implantation of histologically intact human tumor tissue into gastric wall of SCID mice. Mice were randomly divided into control, 5-Fu, As_4O_6, and combined treatment (5-Fu + As_4O_6) groups. Each agent was administered every day for 6 weeks one week after tumor implantation. One week after last administration, the mice were killed and tumor weight, inhibitory rate, intratumoral microvessel density (MVD), apoptotic index (AI) and metastasis were evaluated. **Results** Compared with control, tumor growth was significantly inhibited in mice treated respectively with 5-Fu, As_4O_6 and 5-Fu plus As_4O_6 with an inhibition rate of 46.3%, 52.2% and 67.9% respectively ($P<0.05$). Decreased MVD and increased AI were found in the mice treated with As_4O_6 ($P<0.05$) and 5-Fu plus As_4O_6 ($P<0.05$). The incidence of liver and peritoneal metastases was significantly inhibited in As_4O_6 group (55%, 61.4%) ($P<0.05$) and 5-Fu plus As_4O_6 group (70%, 87.1%) ($P<0.05$). The growth and metastasis of human gastric cancer implanted in SCID mice were significantly inhibited in As_4O_6 group and combined treatment group. The effect in 5-Fu plus As_4O_6 group was most significant. **Conclusion** As_4O_6 has strong inhibitory effect on tumor growth and metastasis of human gastric cancer in SCID mice by its antiangiogenesis efficacy, and has a synergic effect with cytotoxic agents.

【Key words】 Stomach neoplasms; Tetraarsenic; Apoptosis; Metastasis

我们利用原位种植人胃癌的动物模型观察六氧化四砷(As_4O_6)对胃肿瘤生长和转移的影响,初步探讨其抗肿瘤作用机制。

材料与方法

1. 实验动物:C. B-17 SCID/SCID 小鼠(上海肿瘤研究所实验动物部提供),SPF 级,雌性,4~6 周龄,体重 20 g 左右,共 40 只。

2. 胃癌原位种植模型制备:参照文献[1],人胃腺癌细胞株 SGC-7901,2×10^6 裸鼠皮下注射,成瘤后反复传代至成实体瘤,本实验瘤源为第 21 代。移植时处死荷瘤鼠,无菌条件下取出肿瘤并浸入生理盐水中,剪碎成 3 mm 大小碎块。实验动物以戊巴比妥钠 40 mg/kg 体重腹腔注射麻醉,术野皮肤消毒后腹中线切口进

作者单位:310014 杭州,浙江省人民医院外科

腹，于胃大弯侧切开浆膜，植入 3 mm 大小约 150 mg 肿瘤组织并缝合固定。

3. 药物与实验分组：As_4O_6 由韩国 Chonjisan 研究所提供，5-氟尿嘧啶(5-Fu)由天津氨基酸厂出品。荷瘤裸鼠共 40 只随机分为 4 组，每组 10 只。种植 1 周后开始给药，每日 1 次，共 6 周，方案如下：对照组：等容积生理盐水灌胃；5-Fu 组：5-Fu 30 mg/kg 体重腹腔注射；As_4O_6 组：As_4O_6 50 mg/kg 体重灌胃；5-Fu + As_4O_6 组：5-Fu 30 mg/kg 体重腹腔注射，As_4O_6 50 mg/kg 体重灌胃。至种植后第 7 周末，对照组 1 只裸鼠因荷瘤衰竭死亡。

4. 观察指标与方法：种植后第 8 周末处死动物，原位肿瘤切除称重，检查转移情况，分别计算抑瘤率和转移抑制率。标本以 10% 甲醛固定作病理检查及相关指标检测：(1)肿瘤内微血管密度(MVD)测定：方法参照文献[2]采用抗 CD31 抗体的标记链霉素亲和素-生物素(LSAB)免疫组织化学方法，20×10 倍视野下，计数 5 个最高血管密度区的微血管数并求其均数。(2)细胞凋亡检测：采用末端核苷酸转移酶(TdT)介导的脱氧核苷酸原位末端标记法检测凋亡细胞。细胞核染色呈蓝褐色为阳性细胞，20×20 倍视野下，随机选择 5 个肿瘤区域，计算凋亡细胞在全部癌细胞中所占的比例，凋亡指数(AI) = (凋亡细胞数/癌细胞总数) × 100%。

5. 统计学方法：荷瘤鼠瘤重、抑瘤率、MVD 和 AI 以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示，组间比较采用方差分析；各组荷瘤鼠腹膜、肝、其他脏器转移及腹水出现情况采用 Fisher 精确检验法。

结　果

1. As_4O_6 对肿瘤生长抑制作用：所有对照组和实验组种植于裸鼠胃壁的肿瘤均有生长，肿块表面有结节状突起，原位肿瘤生长率 100%。与对照组比较，5-Fu 组、As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组的裸鼠原位肿瘤生长受到明显抑制，As_4O_6 的抑瘤作用与 5-Fu 差异无统计学意义，两者联合应用时的抑瘤效果明显增加(表 1)。

2. As_4O_6 对转移的抑制作用：完整组织块 SCID 鼠胃壁原位种植，对照组区域性淋巴结转移率达 100.0%，肝转移率 66.7%，腹膜转移率达 77.8%，此外还有肾、脾、纵膈淋巴结和肺转移及腹水形成。与对照组比较，各治疗组的肝转移和腹膜转移均受到不同程度的抑制，其中 As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组的抑制转移作用差异有统计学意义(表 2)。

表 1　As_4O_6 和 5-Fu 对原位种植胃癌生长的抑制作用

组别	只数	原位肿瘤重量(g)	抑瘤率(%)	MVD	AI
对照组	9	2.03 ± 0.84		14.4 ± 5.6	4.52 ± 3.17
5-Fu 组	10	1.09 ± 0.53[a]	46.3[a]	12.2 ± 5.2	6.82 ± 4.27
As_4O_6 组	10	0.97 ± 0.49[a]	52.2[a]	7.1 ± 3.5[ab]	10.51 ± 6.19[a]
5-Fu + As_4O_6 组	10	0.65 ± 0.33[ab]	67.9[ab]	5.6 ± 3.3[ab]	14.66 ± 7.54[ab]

注：与对照组比较，[a]$P < 0.05$；与 5-Fu 组比较，[b]$P < 0.05$

表 2　As_4O_6 和 5-Fu 对原位种植胃癌转移抑制作用

组别	例数(只)	肝转移 只数	肝转移 (%)	腹膜转移 只数	腹膜转移 (%)	腹水转移(只)	其他脏器转移(只)
对照组	9	6	66.7	7	77.8	6	4
5-Fu 组	10	5	50.0	6	60.0	3	2
As_4O_6 组	10	3	30.0[ab]	3	30.0[ab]	0[a]	0[a]
5-Fu + As_4O_6 组	10	2	20.0[ab]	1	10.0[ab]	0[a]	0[a]

注：与对照组比较，[a]$P < 0.05$；与 5-Fu 组比较，[b]$P < 0.05$

3. As_4O_6 对肿瘤血管生成的影响：与对照组比较，MVD 于 5-Fu 组无明显减少，但 As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组 MVD 减少差异有统计学意义(表 1)。

4. As_4O_6 对肿瘤细胞凋亡的影响：各实验组原位生长的肿瘤细胞均可见凋亡小体形成，但 As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组的 AI 与对照组比较差异有统计学意义，其中以 5-Fu + As_4O_6 组的细胞凋亡最明显(表 1)。

讨　论

阻断血管生成抑制肿瘤生长是恶性实体瘤的治疗策略之一[3]。As_4O_6 是新近被研究的一种新型血管生成抑制剂，体内外实验时具有明显抑制新生血管生成的作用，并能使实验性 B16F10 恶性黑色素瘤肺转移的数目减少 50%[4]。作为砷制剂，其毒性最受关注，Park 等[4]使用 50 mg/kg 体重 As_4O_6 进行动物实验时，未见明显毒性作用。本研究我们应用 As_4O_6 对小鼠原位种植胃癌进行实验并与 5-Fu 比较，同时还观察了 As_4O_6 与 5-Fu 联用的疗效。结果显示，As_4O_6 和 5-Fu 均能有效地抑制肿瘤的生长，以 5-Fu 和 As_4O_6 联用时最显著。在 5-Fu 组，肿瘤的血管生成不受影响，而 As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组的肿瘤微血管数明显减少，说明血管生成受到抑制，肿瘤生长减慢。此外，As_4O_6 组裸鼠也未见明显的毒副反应。

抑制血管生成对肿瘤转移的防治也具有重要意义。Park 等[4]在恶性黑色素瘤肺转移模型上发现，As_4O_6 对肺转移有显著抑制作用。本研究中 As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组的肝转移和腹膜转移与对照组比较有显著减少，说明 As_4O_6 对小鼠胃癌转移有较好的抑制作用，与 5-Fu 联用还具有协同作用。为了解 As_4O_6

中华实验外科杂志 2007 年 5 月第 24 卷第 5 期 Chin J Exp Surg, May 2007, Vol 24, No. 5

是否也有诱导细胞凋亡的作用，我们同时检测了肿瘤的细胞凋亡情况，结果 As_4O_6 组和 5-Fu + As_4O_6 组 AI 明显增高，说明 As_4O_6 能诱导癌细胞凋亡，其机制与 As_4O_6 增加活性氧和诱导 Caspase-3 活性有关[5]，值得进一步探讨。

具有治疗肿瘤作用的血管生成抑制剂首先应能提高传统化疗、放疗的疗效；其次应能使手术后的微小转移灶处于休眠状态，从而抑制残留病灶的生长、甚至有可能治愈由微小灶引起的复发或远处转移。这正是血管生成抑制剂在肿瘤治疗应用中的发展方向。本文结果提示，As_4O_6 能有效地抑制活体内胃癌的生长和转移，同传统化疗药物 5-Fu 联用时，其疗效大于单一用药，其机制与抗血管形成、促进细胞凋亡有关。

参 考 文 献

[1] 陶厚权，林言箴，尹浩然，等. Linomide 对人胃癌裸鼠原位种植模型生长及转移的影响. 中华实验外科杂志，1998，15：1202-204.

[2] Weidner N, Folkman J, Pozza F, et al. Tumor angiogenesis. A new significant and independent prognostic factor in early-stage breast carcinoma. J Natl Cancer Inst, 1992, 84:1875-1887.

[3] 李喆，方国恩，华积德，等. 内皮细胞抑制素血管内皮细胞生长抑制因子 151 融合基因治疗胃癌的作用及其机制. 中华实验外科杂志，2005，22：1186-1189.

[4] Park MJ, Park IC, Bae IJ, et al. Tetraarsenic oxide, a novel orally administrable angiogenesis inhibitor. Int J Oncol, 2003, 22: 1271-1276.

[5] Park IC, Park MJ, Woo SH, et al. Tetraarsenic oxide induces apoptosis in U937 leukemic cells through a reactive oxygen species-dependent pathway. Int J Oncol, 2003, 23:943-948.

（收稿日期：2006-11-09）