

三氧化二砷对人 SO-Rb50 瘤细胞在大鼠眼内生长及表达 NGF/VEGF 的影响

应方微¹, 唐松²

基金项目:中国深圳市科技计划资助项目(No. 200603160)
作者单位:(518040)中国广东省深圳市,暨南大学第二临床医学院 深圳市眼科医院病理科¹;眼科²
作者简介:应方微,女,毕业于中山大学眼科中心,硕士,眼科肿瘤与病理专业,主治医师,研究方向:眼科学基础。
通讯作者:应方微. yingfangwei@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-07-30 **修回日期:**2009-08-25

Effect of arsenic trioxide on the growth of human SO-Rb50 tumor cells in rat eye and expression of NGF/VEGF

Fang-Wei Ying¹, Song Tang²

Foundation item: Shenzhen Municipal Science and Technology Plan Project, China(No. 200603160)

¹Pathology Department; ²Ophthalmologic Department, Shenzhen Eye Hospital, the Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China

Correspondence to: Fang-Wei Ying. Pathology Department, Shenzhen Eye Hospital, the Second Clinical Medical College of Jinan University, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. yingfangwei@yahoo.com.cn

Received:2009-07-30 Accepted:2009-08-25

Abstract

• **AIM:** To explore the effect of arsenic trioxide(ATO) on the growth of human SO-Rb50 tumor cells in rat anterior chamber and expression of NGF/VEGF.

• **METHODS:** The anterior chambers of one eye of ten 14-day-old SD rats were injected with 0.03mL of 5×10^8 /L SO-Rb50 cells with 24 μ mol/L ATO, and the other eye were injected with the same quantity cells simply which was taken as the contrast. Then the tumor cell developing in the anterior chamber of those rats was observed by the slit lamp. 20 days after injection, the tumor tissue was taken from the 20 rats' eyes and examined the NGF and VEGF content. The effect of the ATO was analyzed statistically.

• **RESULTS:** After injection of oncocyte suspension with 24 μ mol/L ATO into the rats' anterior chambers, mean nepheloid time of anterior chambers was 6 days. Compared with the control group 2 days, there was significant difference($T=9.487, P<0.01$). The mean time of anterior chamber neovascularization was 13.8 days. Compared with the control group 9.7 days, there was significant difference($T=5.212, P<0.01$); the average NGF content of the tumor tissues was 3.1 μ g/L in ATO intervention group, which was more than the contrast of

2.1 μ g/L ($T=3.544, P<0.05$), and the average VEGF content was 0.9ng/L in ATO intervention group, which was less than the contrast of 2.6 μ g/L ($T=27.8, P<0.01$).

• **CONCLUSION:** ATO can prolong neovascularization and turbidity time of anterior chamber after injection of SO-Rb50 oncocyte suspension, promote the expression of NGF and restrain the expression of VEGF.

• **KEYWORDS:** retinoblastoma; arsenic trioxide; rat; VEGF; NGF

Ying FW, Tang S. Effect of arsenic trioxide on the growth of human SO-Rb50 tumor cells in rat eye and expression of NGF/VEGF. *Int J Ophthalmol (Guoji Yanke Zazhi)* 2009;9(10):1868-1870

摘要

目的:了解三氧化二砷(ATO)对人 SO-Rb50 瘤细胞株在 SD 幼鼠前房内表达神经生长因子及血管内皮生长因子的影响。

方法:出生 14d 的 SD 幼鼠 10 只,将含 24 μ mol/L ATO 的 5×10^8 /L SO-Rb50 瘤细胞悬液 0.03mL 注射到任 1 眼前房,另 1 眼前房注射同量不含 ATO 的瘤细胞悬液作为对照,每日裂隙灯观察前房肿瘤形成的情况;接种后 20d,分别取出鼠前房内生长的组织测定其神经生长因子(NGF)、血管内皮生长因子(VEGF)含量,并通过统计学分析 ATO 的影响。

结果:将含 24 μ mol/L ATO 的瘤细胞悬液注射前房后,前房内出现混浊的时间平均为 6d(对照组为 2d),明显延长($T=9.487, P<0.01$),前房内新生血管形成时间平均为 13.8d(对照组为 9.7d),也明显延长($T=5.212, P<0.01$);无 ATO 干预组肿瘤组织 NGF 平均含量为 2.1 μ g/L, ATO 干预组为 3.1 μ g/L, ATO 干预组肿瘤组织 NGF 含量增加($T=3.544, P<0.05$);无 ATO 干预组肿瘤组织 VEGF 平均含量为 2.6 μ g/L, ATO 干预组为 0.9ng/L, ATO 干预组肿瘤组织 VEGF 含量显著降低($T=27.8, P<0.01$)。
结论:ATO 能够显著延长 SO-Rb50 瘤细胞悬液注射后前房内出现混浊的时间及新生血管形成时间,促进肿瘤组织的 NGF 表达,同时抑制肿瘤组织的 VEGF 表达。

关键词:视网膜母细胞瘤;三氧化二砷;大鼠;VEGF;NGF
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2009.10.009

应方微,唐松.三氧化二砷对人 SO-Rb50 瘤细胞在大鼠眼内生长及表达 NGF/VEGF 的影响. *国际眼科杂志* 2009;9(10):1868-1870

0 引言

三氧化二砷(ATO)在祖国医学中它曾被用于治疗恶性肿瘤等多种疾病。国内外用 ATO 成功治愈急性早幼粒细胞白血病(APL)的成果报道以来,我国采用治疗儿童

APL 已经获得成功,同时 ATO 对消化、呼吸、生殖系统的实体肿瘤的抑瘤作用的研究也已经广泛开展。视网膜母细胞瘤(retinoblastoma, RB)是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤,是造成儿童死亡的重要原因,即使摘除眼球可能也无法延长患儿生命。我们观察 ATO 对植入动物前房内 SO-Rb50 瘤细胞表达神经生长因子(NGF)和血管生长因子(VEGF)的影响如下。

1 材料和方法

1.1 材料 出生 14d SD 幼鼠 10 只(广东省动物中心),SO-Rb50 瘤细胞株(中山大学眼科中心病理科提供),三氧化二砷(Sigma),RPMI 1 640 培养基(Gibco),胎牛血清(杭州四季青),NGF ELISA 试剂盒(USA RapidBio),VEGF ELISA 试剂盒(USCN Life),酶标仪(Thalm MK3)。

1.2 方法 参照文献[1]以 RPMI 1 640 完全培养液培养 SO-Rb50 瘤细胞株,置于 37℃,50mL/L CO₂ 培养箱,充分扩增细胞至对数生长期,取培养细胞置于离心管中,1 000r/min 离心 5min,弃上清,加入完全培养液,调整细胞浓度至 5×10^8 /L,加入 ATO,使终浓度为 24 μ mol/L。出生 14d 的 SD 幼鼠 10 只,体质量 200 ± 22 g,用 20g/L 戊巴比妥钠,按照 2.3mL/kg 肌注麻醉,任选 1 眼前房内注射含 ATO 的细胞悬液 0.03mL,另 1 眼前房内注射无 ATO 的细胞悬液 0.03mL 作为对照。每日裂隙灯下观察幼鼠眼前房中灰白色混浊组织形成,以及新生血管形成情况。分析 ATO 影响 SO-Rb50 瘤细胞在 SD 幼鼠前房内引起的反应的时间的差异性。前房接种 RB 瘤细胞后 20d,核瘤幼鼠麻醉后,2 组各完整取出 4 眼球,中性福尔马林固定 24h 后,常规脱水,石蜡包埋,切片行 HE 染色。眼前房接种 SO-Rb50 瘤细胞后 20d,按照接种 SO-Rb50 细胞是否含 ATO 分为 2 组,将 SD 幼鼠麻醉后,每组各取 6 眼,切开角膜,取出前房内的絮状混浊组织。将两组前房取出的组织分别置于玻璃匀浆器中,按照每 20mg 组织加入 200 μ L 组织匀浆液,在冰浴中匀浆后,在 4℃,12 000r/min 离心 10min,取上清用于酶活性及细胞因子含量的测定。

1.2.1 NGF 含量的测定 含 4 000 ~ 31.25ng/L NGF 的倍比稀释共 8 个标准样品各 100 μ L 分别加入酶标板反应孔,前房组织匀浆上清各 100 μ L 加入反应孔,37℃ 反应 90min 后,弃去液体并每孔加入配制好的清洗缓冲液 350 μ L,清洗 5 次后,每孔加入 100 μ L Biotin 抗 NGF 抗体溶液,37℃ 反应 60min 后再洗板 5 次,甩干后每孔加入 100 μ L HRP 溶液 37℃ 反应 30min,再次洗板 5 次,甩干后依序每孔加入 100 μ L TMP 染色溶液,37℃ 避光反应 15min 后加入终止溶液 100 μ L 终止反应,酶标仪检测各样品 A492nm 值。按照倍比稀释的 8 个标准品的 NGF 浓度为横坐标,A 值为纵坐标绘出标准曲线,计算出直线回归方程式,根据细胞培养液样品的 A 值计算出样品中的 NGF 浓度。

1.2.2 VEGF 含量的测定 在酶标板上分别设定空白孔,含 1 000 ~ 15.6ng/L VEGF 的倍比稀释共 7 个标准样品孔,样品空白对照孔,以及两组前房组织匀浆上清样品孔,各孔分别加入相应的样品溶液 100 μ L,37℃ 反应 120min 后,弃去液体并在每孔加入 100 μ L 检测溶液 A,37℃ 反应 60min,之后洗板 3 次,每次 2min,甩干后每孔加入 100 μ L 检测溶液 B,37℃ 反应 60min,再次洗板 5 次,每次 2min,甩干后依序每孔加入 90 μ L 底物溶液,37℃ 避光反应 20min 后加入终止溶液 50 μ L 终止反应,酶标仪测量各样品 A450nm 值。按照倍比稀释的 7 个标准品的 VEGF 浓度为横坐标,A 值为纵坐标绘出标准曲线,计算出直线回归

方程式,根据前房组织样品的 A 值计算出样品的 VEGF 浓度。

统计学分析:利用 SPSS 11.0 统计软件分析 ATO 对 SO-Rb50 瘤细胞在 SD 幼鼠前房内生长情况及组织中 NGF,VEGF 的影响。

2 结果

2.1 肿瘤细胞在幼鼠前房内生长,无 ATO 的 RB 瘤细胞接种眼 接种 1d 后 3 眼前房内可见混浊,3d 后全部的眼前房内可见混浊,平均出现混浊时间为 2 ± 0.82 d;接种 8d 后 4 眼前房混浊组织前方和/或角膜内表面出现新生血管,12d 全部的眼前房混浊组织和/或角膜内表面出现新生血管,平均出现新生血管的时间为 9.7 ± 1.8 d。含 24 μ mol/L ATO 的 RB 瘤细胞接种眼在 4d 后开始有肿瘤生长的迹象,1 眼前房内可见混浊,7d 后全部的眼前房内可见混浊,平均出现混浊时间为 6 ± 1.1 d;12d 起 3 眼前房混浊,前房及角膜内表面出现新生血管,16d 全部的眼前房及角膜内表面出现新生血管,平均出现新生血管的时间为 13.8 ± 1.7 d。统计学 *t* 检验分析,在 14d SD 幼鼠的前房接种含有 24 μ mol/L ATO 的 SO-Rb50 瘤细胞,比接种不含有 ATO 的 SO-Rb50 瘤细胞成瘤时间明显延长($T = 9.487, P < 0.01$),新生血管形成时间明显延长($T = 5.212, P < 0.01$),适当浓度的 ATO 对 SO-Rb50 瘤细胞在 SD 幼鼠前房内生长具有显著的抑制作用。

2.2 NGF 含量变化 8 个倍比浓度的 NGF 标准品在 492nm 的 A 值分别为 0.006,0.012,0.020,0.028,0.030,0.040,0.046 和 0.063。经过统计学分析,标准品的浓度与相应的 A492 呈线性正相关($r = 0.914, F = 30.35, P = 0.002$),有统计学意义。经过线性回归,拟合回归方程为: $A_{492} = 0.01833 + 1.235 \times 10^{-5}$ 浓度;残差标准差为 0.004,经 *t* 检验 $T = 5.007, P = 0.02$;回归系数标准差为 0.000,经过 *t* 检验 $T = 5.509, P = 0.02$,均有统计学意义。反应样品测量的 A492nm 值均数通过回归方程计算出对应反应样品的 NGF 浓度,根据稀释比例计算出各样品实际的 NGF 含量,无 ATO 干预组肿瘤组织 NGF 平均含量为 2.1 μ g/L,ATO 干预组为 3.1 μ g/L,统计学 *t* 检验分析, $T = 3.544, P < 0.05$,ATO 干预组肿瘤组织 NGF 含量增加,ATO 促进肿瘤组织的 NGF 表达。

2.3 VEGF 含量变化 7 个倍比浓度的 VEGF 标准品与不含 VEGF 的样品在 450nm 的 A 值分别为 0.75,0.095,0.127,0.126,0.156,0.236,0.333 和 0.744。经过统计学分析,标准品的浓度与相应的 A450nm 呈线性正相关, $r = 0.991, P < 0.01$,有统计学意义。经过线性回归,拟合回归方程为: $A_{450nm} = 0.08018 + 6.325 \times 10^{-4}$ 浓度;残差标准差为 0.014,经 *T* 检验 $t = 5.779, P = 0.01$;回归系数标准差为 0.000,经过 *t* 检验 $T = 18.610, P < 0.01$,均有统计学意义。反应样品测量的 A450nm 值均数通过回归方程计算出对应反应样品的 VEGF 浓度,根据稀释比例计算出各样品实际的 NGF 含量,无 ATO 干预组肿瘤组织 VEGF 平均含量为 539ng/L,ATO 干预组为 76ng/L,统计学 *t* 检验分析, $T = 27.8, P < 0.01$,ATO 干预组肿瘤组织 VEGF 含量显著降低,ATO 明显抑制 VEGF 表达。

2.4 肿瘤组织变化 摘出的眼球中可见肿瘤组织位于前房,肿瘤细胞体积较小,核大、深染,胞质少,可见肿瘤组织在晶状体内生长,并破坏晶状体组织,细胞可见坏死(图 1);前房中的混浊絮状的肿瘤组织,位于晶状体与角膜之间,



图1 幼鼠眼内肿瘤组织病理(HE×100)



图2 幼鼠眼内混浊絮状组织病理(HE×40)

瘤细胞体积较小,核大、深染,胞质少,可见纤细的纤维组织及新生血管分布在肿瘤组织中(图2)。

3 讨论

ATO 是中药砒霜的主要成分,20 世纪 70 年代我国学者首先使用治疗复发性和难治性 APL, 并取得了 52% ~ 92% 的完全缓解,目前砒剂已成功应用于 APL 的治疗^[2]。近年来研究表明 ATO 除了能治疗血液系统疾病,对多种恶性实体瘤如消化系统的胃癌、食管癌、肝癌、结肠癌、胰腺癌,呼吸系统的肺癌、鼻咽癌、口腔鳞癌,生殖系统的卵巢癌、宫颈癌、乳腺癌、前列腺癌以及恶性淋巴瘤等均有不同程度的抗肿瘤作用。它的抗肿瘤机制主要在于诱导肿瘤细胞凋亡^[3,4]、同时诱导肿瘤细胞的分化^[5,6],抑制肿瘤细胞增殖^[7,8]、转移,以及抑制肿瘤血管的生成等。在眼科学研究中发现,一定剂量的 ATO 直接作用于裸鼠腋下皮下的脉络膜黑色素瘤移植瘤,可以通过诱导细胞凋亡及直接导致细胞坏死来抑制肿瘤的生长^[9]。大多数的恶性黑色素瘤细胞中端粒酶的活性高表达^[10],而良性肿瘤和正常组织中端粒酶的检出率仅为 4%^[11]左右,ATO 可以抑制 A375 黑色素瘤细胞的端粒酶活性,这对抑制恶性黑色素瘤细胞的生长繁殖有重要临床意义。视网膜母细胞瘤是婴幼儿最常见的眼内恶性肿瘤,发病早,可侵及单眼和双眼,对视力的损害极大,并可危及生命。由于 RB 多发于 3 岁以下的婴幼儿,致使其难以被早期诊断发现,因此,就诊的患儿多处于中晚期,使 RB 治疗相当棘手。目前,RB 的治疗措施主要包括手术摘除眼球、放疗、化疗等,但这些治疗措施都有其一定的局限性,因此寻找新的药物治疗手段成为临床工作的当务之急。在相关的体外杀伤实验中我们发现,ATO 浓度 > 24mmol/L 时,对体外培养的 SO-Rb50 瘤细胞的增殖有明显的抑制作用,且抑制作用与

ATO 的浓度成正比,在小于该浓度时则对瘤细胞的增殖无明显作用。根据这一结果,我们观察了 24mmol/L 对人 SO-Rb50 瘤细胞在出生 2wk 的 SD 幼鼠前房内的生长性的影响。根据文献提示^[12]:SO-Rb50 瘤细胞与晶状体上皮细胞、皮质纤维及囊膜体外共同培养,RB 瘤细胞改变悬浮生长方式,不仅附着在晶状体上皮细胞上贴壁生长,也可在囊膜上生长繁殖。在本实验中,我们可以看到 SO-Rb50 瘤细胞主要在 SD 幼鼠的前房及晶状体内生长,肿瘤细胞的生长形成前房内絮状的混浊物,肿瘤在晶状体囊膜下生长,浸润上皮,引起晶状体的混浊,并且造成前房及角膜内面大量的新生血管形成,但 ATO 显然延缓了这些改变的发生。

肿瘤血管生成是肿瘤恶性生长、浸润和转移的形态学基础且与预后密切相关。激活内皮细胞释放细胞因子能刺激肿瘤细胞生长,而肿瘤细胞释放内皮生长因子(如 VEGF)促进血管内皮增殖生长,形成肿瘤血管。研究表明 ATO 对人乳腺癌裸鼠移植瘤组织中的 VEGF 表达有抑制作用^[13],用 ATO 处理白血病细胞株 HLE 能使其 VEGF 表达下降^[14]。本研究的结果显示,ATO 明显降低 SD 幼鼠眼内肿瘤组织中的 VEGF 的含量,这与肿瘤细胞生长引起的前房及角膜内表面出现新生血管时间延迟相吻合,新生血管是促使 RB 肿瘤快速生长扩增的重要因素,抑制新生血管能够有效的抑制肿瘤生长。研究同时显示 ATO 促进肿瘤组织中 NGF 含量明显上升,视网膜母细胞是一种较原始神经细胞,它本身能够分化为视网膜的神经细胞,并产生神经生长因子及神经营养因子等一系列的神经细胞因子,NGF 含量的上升有可能预示着肿瘤细胞的分化性提高,对肿瘤预后是否有一定的积极作用尚有待进一步的研究。

参考文献

- 1 金捷,易玉珍,郑健梁,等.人视网膜母细胞瘤细胞系 SO-Rb50 的建立及其生物学特征.中华眼科杂志 1990;26(6):355-359
- 2 Wang Z, Zhou T, Lu X, et al. Arsenic speciation in urine from acute promyelocytic leukemia patients undergoing arsenic trioxide treatment. *Chem Res Toxicol* 2004;17(1):95-103
- 3 马晓冬,乔东访,田雪梅,等.三氧化二砷诱导线粒体通透性转变孔道开放的机制研究.癌症 2006;5(1):17-21
- 4 曹琦,韦国桢,郭红荣.三氧化二砷诱导恶性肿瘤细胞凋亡机制的研究进展.现代肿瘤医学 2007;15(5):731
- 5 杜彩文,李德锐,林英城,等.三氧化二砷诱导人鼻咽低分化鳞癌裸鼠移植瘤细胞分化的研究.癌症 2003;22(1):21-25
- 6 Baj G, Arnulfo A, Deaglio S, et al. Arsenic trioxide and breast cancer: analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects. *Breast Cancer Res Treat* 2002;73(1):61-73
- 7 Ling YH, Jiang JD, Holland JF, et al. Arsenic trioxide preAuces polymerization of microtubules and mitotic rest before apoptosis in human tumor cell lines. *Mol Pharmacol* 2002;62(3):529
- 8 蒋明东,李少林.三氧化二砷与肝癌治疗的研究进展.重庆医学 2006;35(6):558-559,563
- 9 王春芳,李彬,李辽青,等.三氧化二砷抑制人眼脉络膜黑色素瘤裸鼠移植瘤生长的研究.眼科研究 2006;24(4):402-406
- 10 Heine B, Coupland SE, Kneiff S, et al. Teomerase expression in uveal melomerase. *Ophthalmol* 2000;84(2):217-223
- 11 Wu A, Ichihashi M, Ueda M. Correlation of the expression of human telomerase subunits with telomerase activity in normal skin and skin tumors. *Cancer* 1999;86(10):2038-2044
- 12 李永平,易玉珍,冯官光,等.视网膜母细胞瘤 SO-Rb50 瘤细胞体外粘附晶体实验的初步报告.中华眼底病杂志 1996;12(3):163-165
- 13 陈鑫,吴诚义.三氧化二砷对人乳腺癌裸鼠抑制瘤血管生成的作用.重庆医学 2003;32(6):708-709
- 14 华海清,秦叔逵,王锦鸿,等.三氧化二砷抗肿瘤血管生成研究.世界华人消化杂志 2004;12(1):27-31