

三氧化二砷对腺样囊性癌 ACC-2 细胞 MDM2 基因表达的影响

王双双, 姜涛, 李德卫, 仝晓燕, 王晓川, 张玉

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(No. ZR2012HM062)
作者单位:(266003)中国山东省青岛市,青岛大学附属医院眼科
作者简介:王双双,女,在读硕士研究生,研究方向:眼底病、眼外伤。
通讯作者:姜涛,博士,教授,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:眼底病、眼外伤。lanlandetian20000@163.com
收稿日期:2015-06-04 **修回日期:**2015-08-11

Effect of arsenic trioxide on expression of MDM2 in adenoid cystic carcinoma-2 cells

Shuang-Shuang Wang, Tao Jiang, De-Wei Li, Xiao-Yan Tong, Xiao-Chuan Wang, Yu Zhang

Foundation item: Natrual Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2012HM062)

Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China

Correspondence to: Tao Jiang. Department of Ophthalmology, the Affiliated Hospital of Qingdao University, Qingdao 266003, Shandong Province, China. lanlandetian20000@163.com
Received:2015-06-04 Accepted:2015-08-11

Abstract

• **AIM:** To investigate effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on the proliferation and apoptosis of on adenoid cystic carcinoma-2 (ACC-2) cells and detect the expression of MDM2 gene from gene and protein level and to explore detailed mechanism of As_2O_3 inducing ACC-2 cells apoptosis.

• **METHODS:** ACC-2 cells were cultured *in vitro* and divided into the experiment group and control group. Different concentrations of As_2O_3 (2, 4, 6, 8 μ mol/L) were applied to cells in logarithmic growth phase at different time as experiment group, the control group was given the same amount of cell culture fluid, after added As_2O_3 , the cells were cultured at different times, respectively. The effect of different As_2O_3 concentrations at each point time on inhibition and metamorphoses of ACC-2 cells was observed under inverted phase contrast microscope. Expression changes of MDM2 mRNA (24, 48h) and protein (24, 48, 72h) were determined by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and immunohistochemistry test (IHCT) respectively.

• **RESULTS:** Cells shrinkage, nuclear chromatin condensation, apoptotic cells increased and the number of viable cells significantly reduced after being cultured with different concentrations of As_2O_3 . The results of RT-

PCR and IHCT were showed consistent the expression of MDM2 in experiment group decreased gradually with the increase of As_2O_3 concentrations and extension of action time, which was significantly different to that in the control group ($P < 0.05$). Campared with each other, it was statistically significant between the different concentration and time of two groups ($P < 0.05$). MDM2 expression was negatively correlated with concentration and time ($r < -0.7$, $P < 0.05$), that was, it presented in dose- and time-dependent manner.

• **CONCLUSION:** As_2O_3 has the inhibitory and apoptosis-inducing effect on ACC-2 cells, and it can downregulate the expression of MDM2 mRNA and protein in ACC-2 cell line. This may be the mechanism of As_2O_3 induced ACC-2 cells apoptosis.

• **KEYWORDS:** arsenic trioxide; adenoid cystic carcinoma; MDM2; apoptosis

Citation: Wang SS, Jiang T, Li DW, *et al.* Effect of arsenic trioxide on expression of MDM2 in adenoid cystic carcinoma-2 cells. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2015;15(9):1516-1520

摘要

目的:研究三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)对腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)中 ACC-2 细胞增殖、凋亡的影响,并从基因和蛋白水平分析其对 ACC-2 细胞中 MDM2 基因表达的影响,从而探讨 As_2O_3 诱导 ACC-2 细胞凋亡的具体机制。

方法:体外培养 ACC-2 细胞,分为实验组和对照组,向培养至指数生长期的 ACC-2 细胞加入不同浓度(2、4、6、8 μ mol/L)的含 As_2O_3 的细胞培养液作为实验组,对照组给予等量的细胞培养液,加入 As_2O_3 后分别培养不同时间。倒置显微镜下密切观察各时间点不同浓度 As_2O_3 对 ACC-2 细胞的生长抑制作用和细胞凋亡的形态变化,应用荧光定量 RT-PCR 和免疫细胞化学技术检测 MDM2 基因(24、48h)和蛋白(24、48、72h)的表达变化。

结果:经 As_2O_3 处理后 ACC-2 细胞体积缩小变圆,核质固缩,悬浮凋亡细胞增多,存活细胞数量明显减少。RT-PCR 及免疫细胞化学结果一致显示,ACC-2 细胞随着药物浓度的增加及作用时间的延长,MDM2 表达明显减少,与对照组比较,差异有统计学意义($P < 0.05$),不同浓度不同时间各组两两比较差异有统计学意义($P < 0.05$),MDM2 蛋白表达量与浓度及时间呈显著负相关性($r < -0.7$, $P < 0.05$),即呈浓度和时间依赖性。

结论: As_2O_3 对 ACC-2 细胞具有生长抑制和诱导凋亡的作用,且 As_2O_3 能够下调腺样囊性癌 ACC-2 细胞中癌基

因MDM2 mRNA及蛋白的表达,可能是其诱导腺样囊性癌ACC-2细胞凋亡的机制。

关键词:三氧化二砷;腺样囊性癌;MDM2;凋亡

DOI:10.3980/j.issn.1672-5123.2015.9.06

引用:王双双,姜涛,李德卫,等.三氧化二砷对腺样囊性癌ACC-2细胞MDM2基因表达的影响.国际眼科杂志2015;15(9):1516-1520

0 引言

腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma, ACC)是泪腺上皮性肿瘤中最为常见并且恶性程度最高的肿瘤,其发生率居于第2位,仅次于多形性腺瘤^[1]。其进展快,预后差,且发病机制不明,除手术外尚无有效治疗方法。三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)是砷化合物之一,作为传统中药砒霜的有效成分,最早用于治疗急性早幼粒细胞白血病^[2-3],而后逐渐运用于实体瘤(如肝癌^[4-5]、胰腺癌^[6]、乳腺癌^[7]、肾癌^[8]),取得了良好的效果,而运用于ACC的报道甚少。其具体作用机制仍不明确,研究最多的机制是诱导肿瘤细胞凋亡^[9]。鼠双微染色体2(Murine Double Minute, MDM2)是一种癌基因,定位于12q13-14,编码蛋白质的分子量为90kDa。MDM2在许多恶性肿瘤中存在表达,通过抑制p53来抑制细胞凋亡^[10-11]。有研究证明腮腺ACC中MDM2的表达水平明显高于癌旁正常组织,这提示MDM2蛋白的表达与腮腺ACC的危险性存在密切的关系^[12]。本实验意在探讨As₂O₃能否抑制ACC细胞的生长,影响MDM2的表达,进而探讨As₂O₃抑制ACC细胞生长的具体机制,为其临床应用提供药理依据。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞 腺样囊性癌ACC-2细胞(来源于人涎腺ACC)由上海交通大学医学院附属第九人民医院惠赠。自行复苏后常规细胞培养,实验选用传代3次后处于对数生长期的细胞。

1.1.2 实验试剂 注射用三氧化二砷:北京双鹭药业股份有限公司;RPMI-1640培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司;鼠抗人MDM2单克隆抗体:美国Santa Cruz公司;小鼠PV-9000试剂盒、浓缩型DAB试剂盒均购自北京中杉金桥公司;逆转录试剂盒及SYBR荧光染料选用宝生物工程产品;其余试剂均为国产分析纯。

1.1.3 实验仪器 超净工作台:苏州亿达净化设备有限公司;恒温水浴箱:上海新苗医疗器械有限公司;CO₂恒温培养箱:美国VWR公司;光学倒置显微镜:日本Olympus公司;细胞计数板:美国Yhermo Forma公司;微量离心机、低温超速离心机:德国Sigma公司;可微量程移液器:德国Eppendorf公司;核酸蛋白分析仪:美国Beckman公司;病理图文分析系统:日本Nikon公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及观察 选用人腺样囊性癌ACC-2细胞于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基中培养,在恒温培养箱中以5% CO₂, 37℃及90%湿度条件下培养,每2~3d换液1次。实验分为实验组和对照组。实验组分别加2.0、4.0、6.0、8.0 μmol/L的As₂O₃ 2mL,分别处理24、48、72h,空白对照组加2mL培养液代替As₂O₃,不同浓度各时间点在倒置显微镜下动态观察各组细胞形态变化,并照相

记录,同一时间、浓度设立3个平行对照。各组均行苏木素染色,以观察细胞核形态变化。

1.2.2 荧光定量RT-PCR检测ACC-2细胞中MDM2基因表达 取实验组和对照组12孔板细胞,处理24、48h后,以Trizol提取细胞中的总RNA,根据试剂盒说明进行逆转录合成cDNA。MDM2及内参引物序列(由大连takara公司合成)如下:MDM2引物序列:上游5'-AGCCTCCAATGAGAGCAACTTGA-3',下游5'-CAGGCTGCCATGTGACCTAAGA-3',产物长度100bp;内参GAPDH引物序列:上游5'-TCATGGGTGTGAACCATGAGAA-3',下游5'-GGCATGGACTGTGGTCATGAG-3',产物长度146bp。将反转录所得的cDNA进行扩增:上下游引物各0.5 μL, cDNA模板2 μL, SYBR 10 μL, RNase Free dH₂O 7 μL, 总共20 μL。PCR反应过程如下:(1)95℃ 30s;(2)95℃ 5s, 60℃ 30s, 共40个循环;(3)95℃ 15s, 60℃ 30s, 95℃ 15s检测溶解曲线。荧光定量PCR仪(eppendorf Mastercycler ep realplex)绘制荧光扩增曲线和溶解曲线,得出Ct值,应用2^{-ΔΔCt}法(ΔΔCt=ΔCt待测样本-ΔCt对照样本, ΔCt=目的基因Ct值-内参Ct值)分析结果。

1.2.3 免疫细胞化学检测ACC-2细胞中MDM2蛋白表达 取实验组和对照组6孔板细胞,处理24、48、72h后,行免疫细胞化学操作:(1)吸除6孔板中的旧培养液,取出细胞爬片,0.01 mol/L PBS漂洗3min×3次;(2)4%多聚甲醛固定20min,0.01 mol/L PBS漂洗3min×3次;(3)0.1% Triton X-100作用20min,0.01 mol/L PBS漂洗3min×3次;(4)3% H₂O₂去离子水孵育10min,0.01 mol/L PBS漂洗3min×3次;(5)滴加1:200稀释的鼠抗人MDM2单克隆抗体工作液,37℃湿盒孵育2h;(6)滴加PV-9000工作液;(7)滴加DAB工作液,显微镜下观察控制显色时间,待标本细胞核染至棕色时蒸馏水充分冲洗终止反应;(8)取需复染的玻片,滴加1滴苏木素于玻片上复染10~30s,盐酸酒精分化3s,氨水返蓝5s,自来水轻轻冲洗1min;(9)75%、80%、95%、100%酒精梯度各脱水2min,中性树胶封片。阴性对照用PBS替代一抗,其余步骤相同。MDM2阳性表达为细胞内的棕黄色颗粒。光学显微镜下随机选取5个高倍(×400)视野观察并拍照,应用Image-pro plus 6.0图像分析软件进行分析,以平均光密度值代表MDM2蛋白的表达强度。

统计学分析:采用SPSS 17.0统计软件,各组数据使用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,应用单因素方差分析对同一时间不同浓度MDM2 mRNA的表达水平进行分析,运用配对样本t检验分析同一浓度不同时间MDM2 mRNA的表达水平,重复测量数据的方差分析对MDM2的蛋白表达进行分析,不同浓度和时间内部两两比较应用LSD-t检验,并应用Pearson相关性分析其时间依赖性和浓度依赖性,以P<0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞形态学观察 正常ACC-2细胞形态规则,大小均匀,呈梭形或多边形,细胞之间紧密连接,边界清晰,折光性强,细胞核大,可见多个核仁及核分裂相,贴壁生长速度快,1:4传代3d即可长满整个培养皿。细胞经不同浓度As₂O₃处理后,均显示不同程度的变化,细胞形态缩小变圆,细胞核固缩,分裂相减少,细胞接触率降低,随着药物浓度增加及作用时间的延长,贴壁细胞不断减少,悬浮

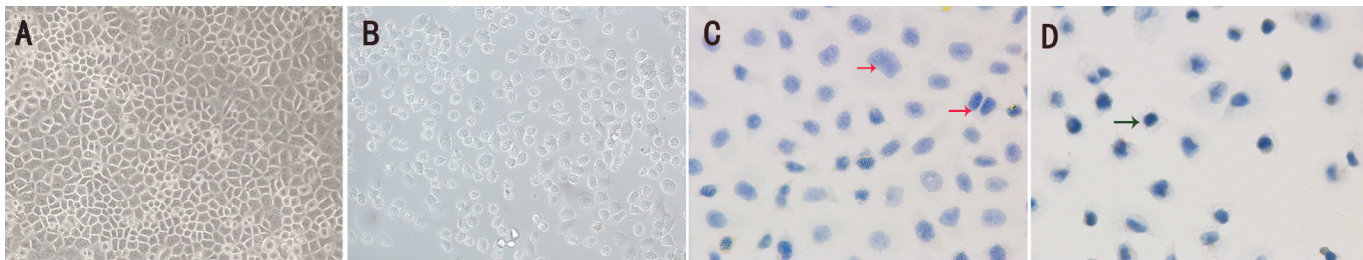


图1 ACC-2细胞形态学观察 A:正常ACC-2细胞传代72h,可见细胞排列紧密,形态规则,成多边形,贴壁良好,悬浮凋亡的细胞较少($\times 200$);B: $6\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 刺激48h后ACC-2细胞光镜下形态,可见细胞排列松散,接触减少,边缘不整齐,胞体缩小变圆,贴壁减少,悬浮凋亡的细胞较正常状态下明显增多($\times 200$);C:正常ACC-2细胞苏木素染色,可见细胞核呈椭圆形,核大深染,多个核仁,有核分裂相,可见双核及巨核细胞(红色箭头, $\times 400$);D: $6\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 刺激48h后的ACC-2细胞苏木素染色,可见细胞皱缩,核固缩(黑色箭头),染色加深,胞浆中颗粒样物质增多,呈现明显的凋亡状态($\times 400$)。

浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	24h	48h	<i>t</i>	<i>P</i>
0	1.010 \pm 0.0100	1.050 \pm 0.0558	-1.309	0.321
2	0.876 \pm 0.0252	0.766 \pm 0.0208	19.053	0.003
4	0.733 \pm 0.0153	0.613 \pm 0.0321	12.000	0.007
6	0.453 \pm 0.0115	0.346 \pm 0.0252	12.095	0.007
8	0.233 \pm 0.0152	0.130 \pm 0.0264	11.717	0.007
<i>F</i>	1123.787	326.562		
<i>P</i>	0.000	0.000		

注:浓度 $0\mu\text{mol/L}$ 为对照组。

死亡的细胞不断增多, $2\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 刺激24h细胞凋亡变化不明显,48h可见凋亡细胞增多,72h凋亡细胞明显增多, $4\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 刺激24h即观察到细胞凋亡,48h时细胞凋亡增多,72h可见大量细胞凋亡, $6\sim 8\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 刺激24h以内即有明显凋亡,72h存活细胞极少(图1)。

2.2 As_2O_3 对 ACC-2 细胞 MDM2 mRNA 表达的影响

PCR能检测到ACC-2细胞中存在MDM2 mRNA的表达,且随处理时间及药物浓度的增加,MDM2表达逐渐减少。用SPSS 17.0对不同浓度的 As_2O_3 作用于ACC-2细胞24h及48h后MDM2 mRNA相对含量进行单因素方差分析,总体差异具有统计学意义($F_{24h} = 1123.787, P = 0.000; F_{48h} = 326.562, P = 0.000$);不同浓度两两比较,差异均有统计学意义($P < 0.05$)。随后对同一浓度作用不同时间后MDM2 mRNA相对表达量进行配对样本*t*检验,结果可见同一药物浓度作用48h比作用24h后MDM2 mRNA的表达量下降,除对照组($P > 0.05$)外,差异具有统计学意义($P < 0.05$;表1,图2)。

2.3 As_2O_3 对 ACC-2 细胞 MDM2 蛋白表达的影响

2.3.1 MDM2 蛋白表达情况 显微镜下可见PBS代替一抗的阴性对照染色中ACC-2细胞胞核及胞浆均无明显着色,胞核呈现蓝色,对照组($0\mu\text{mol/L}$ As_2O_3)MDM2蛋白高表达,可见细胞胞浆少量棕色颗粒,胞核着色深,呈棕黄色或褐色; As_2O_3 浓度越高,处理时间越长,细胞胞核着色越浅, $8\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用72h后细胞着色最浅(图3、4)。

2.3.2 MDM2 蛋白染色强度 用图像分析软件Image pro-plus 6.0检测MDM2蛋白染色强度,用平均光密度值表示(表2),其值越大表示染色越深,说明MDM2蛋白的表达量高,反之表示染色越浅,说明MDM2蛋白的表达量小。应用重复测量数据的方差分析,结果示对照组表达量最高,随着 As_2O_3 作用浓度的增加和处理时间的延长,细胞

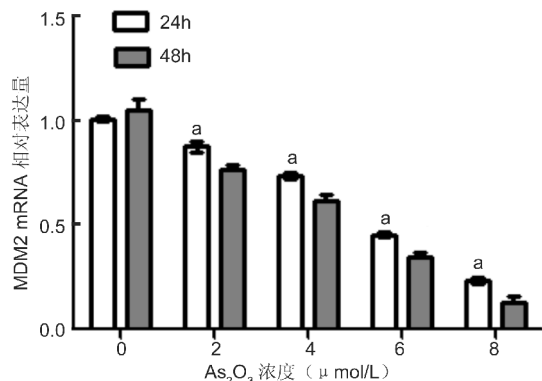


图2 不同浓度 As_2O_3 处理 ACC-2 细胞后的 MDM2 mRNA 相对表达量 ^a $P < 0.05$ vs 48h。

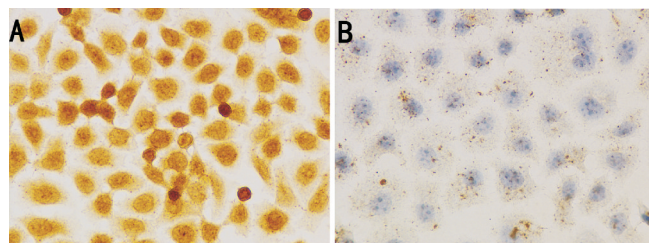


图3 对照组和阴性对照组MDM2蛋白染色结果(ICC, $\times 400$) A:对照组阳性染色可见MDM2蛋白表达阳性的细胞,胞核呈棕褐色,胞浆少量棕色颗粒;B:阴性对照组中PBS代替一抗的阴性对照染色,ACC-2细胞胞浆见极少量棕色颗粒,胞核呈蓝色。

核染色越来越浅,细胞数量也逐渐减少,凋亡皱缩的细胞数量增加,MDM2蛋白的染色强度和染色范围逐渐下降,说明MDM2蛋白表达量逐渐下降(图4、5),不同浓度组间比较差异具有统计学意义($F_{浓度} = 599.099, P < 0.01$),不同

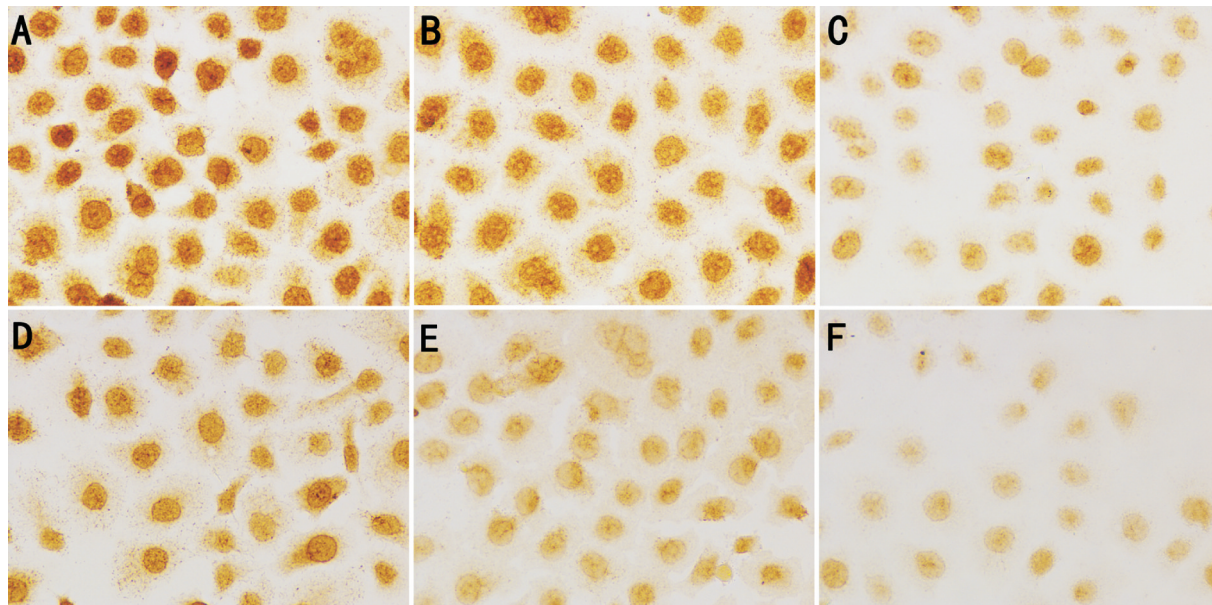


图4 不同浓度 As₂O₃ 处理不同时间 MDM2 蛋白染色结果(ICC,×400) A:2μmol/L As₂O₃ 处理 24h;B:2μmol/L As₂O₃ 处理 48h; C:2μmol/L As₂O₃ 处理 72h;D:6μmol/L As₂O₃ 处理 24h;E:6μmol/L As₂O₃ 处理 48h;F:6μmol/L As₂O₃ 处理 72h。

表2 不同浓度 As₂O₃ 作用于 ACC-2 细胞不同时间后 MDM2 平均光密度值 $\bar{x} \pm s$

浓度(μmol/L)	24h	48h	72h	r	P
0	0.758±0.063	0.793±0.028	0.771±0.057	0.117	0.765
2	0.631±0.029	0.560±0.013	0.485±0.021	-0.958	0.000
4	0.527±0.020	0.387±0.025	0.298±0.015	-0.977	0.000
6	0.423±0.034	0.296±0.018	0.239±0.023	-0.942	0.000
8	0.295±0.037	0.239±0.036	0.221±0.011	0.754	0.019
r	-0.980	-0.961	-0.915		
P	0.000	0.000	0.000		

注:0μmol/L 组为对照组。

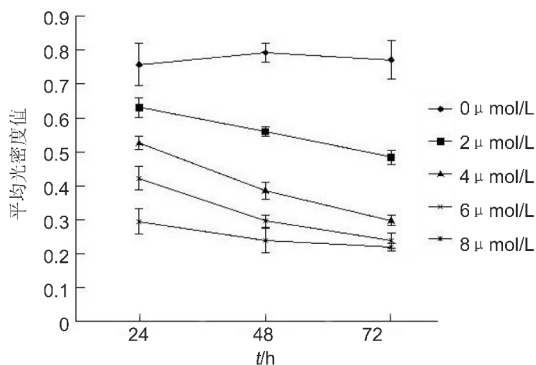


图5 不同浓度 As₂O₃ 作用于 ACC-2 细胞不同时间后 MDM2 平均光密度值。

时间组内比较差异具有统计学意义 ($F_{\text{时间}} = 48.437, P < 0.01$);各时间点的组间差异和各组的时间差异进行两两比较均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。应用 Pearson 相关性分析,得出 MDM2 蛋白表达量与浓度及时间呈现显著负相关性 ($r < -0.7, P < 0.05$),说明 MDM2 蛋白表达具有时间依赖性和浓度依赖性。

3 讨论

泪腺腺样囊性癌(lacrimal gland adenoid cystic carcinoma, LGACC)是一种浸润性极强、预后差的疾病,其

发病机制及治疗是临床上亟待解决的重要问题。由于其极易复发和转移,手术很难完全切除癌组织,化疗仍然是重要的辅助治疗手段,但目前临床上应用的常规化疗药物效果并不理想,所以寻求一种新的有效的化疗药物一直是 ACC 的研究方向。本实验采用的腺样囊性癌 ACC-2 细胞虽来源于人类涎腺 ACC,其与泪腺 ACC 组织同源性极高,其生理生化特性与泪腺 ACC 极为相似。

As₂O₃ 应用于临床治疗各种肿瘤已有多年,尤其对急性早幼粒细胞白血病的治疗取得了良好的效果,本研究发现 ACC-2 细胞经不同浓度的 As₂O₃ 处理后,均有不同程度的生长抑制。且随着作用时间的延长和药物浓度的增加,凋亡细胞逐渐增多。其中 8μmol/L As₂O₃ 作用 72h 细胞凋亡最明显,这为临床应用 As₂O₃ 治疗泪腺 ACC 提供可靠的依据。研究表明,As₂O₃ 可通过多种机制启动线粒体介导的凋亡途径,使活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)增加,激活细胞色素 C 途径诱导凋亡,ROS 还可使线粒体 mtDNA 突变老化死亡^[13]。也有研究表明,As₂O₃ 作用于 ACC-2 细胞,可通过降低线粒体膜电位从而激活 Caspase-3 引起细胞凋亡^[14]。细胞凋亡过程中存在多种基因的调控作用,与凋亡密切相关的基因有 Survivin、E2F、p53、Rb 和 bcl-2 等。野生型 p53 基因是一个重要的抑癌基因,位于 17 号染色体短臂 1 区 3.1 带(17p13.1)上,由 11 个外显子、10 个内含子组成。国内外有关野生

型 p53 的研究已经非常成熟。突变型 p53 与野生型 p53 蛋白结合形成异四聚体,结构正常,却失去 p53 原有的功能,不能调控细胞周期、引起细胞增殖,最终导致细胞癌变^[15]。我们前期的研究发现,ACC-2 细胞存在 p53 基因突变,且 As₂O₃ 可下调突变型 p53 基因的表达水平,导致腺样囊性癌 ACC-2 细胞的凋亡。

MDM2 基因是一种癌症基因,过度表达的 MDM2 基因与多种恶性肿瘤有密切关系,如胃癌^[16]、乳腺癌^[17]、肺癌^[18]、胰腺癌^[19]。学者们研究证明在不同类型的肿瘤中,MDM2 的过表达与患者的预后不良有很大关系或者增加肿瘤发生的风险。有研究表明,MDM2 基因在 ACC 中也存在过度表达^[12]。本实验用 As₂O₃ 刺激腺样囊性癌 ACC-2 细胞,发现 MDM2 基因表达明显下降,且具有随时间和药物浓度变化呈现依赖性,而药物浓度的依赖性更明显。因此,As₂O₃ 抑制腺样囊性癌 ACC-2 细胞生长,使 MDM2 基因表达下降,诱导其凋亡,可能的分子机制为:(1)MDM2 基因能够抑制野生型 p53 蛋白形成复合物,影响其抑癌功能的发挥,同时能加速其降解。过度表达时可以封闭 p53 的反式激活作用,使 p53 的功能消失,细胞周期紊乱,使肿瘤发生、发展,还与肿瘤对放化疗的耐受有关^[20]。而 As₂O₃ 作用于肿瘤细胞明显抑制 MDM2 的表达,使突变型 p53 蛋白表达减少,wtp53 表达增加,进而促进 ACC 细胞的凋亡。(2)PTEN 是一种抑癌基因,PTEN 的传导通路为 TEN-P13K-AKT/PKB-MDM2-p53/PRb/E2F^[21],E2F 转录因子家族在控制细胞周期及抑癌基因功能上起到重要作用,E2F 家族中的成员表达的蛋白可以和视网膜母细胞瘤蛋白 PRb 结合,同时介导细胞增殖及 p53 依赖与非依赖性的细胞凋亡。已有研究证明了 PTEN 基因在 ACC 中表达,且与 MDM2 基因的表达呈负相关^[12],MDM2 减少可以反向激活 PTEN,使其表达增加,进而激活 p53、PRb、E2F 等一系列的凋亡相关基因,加速了 ACC-2 细胞的凋亡。(3)早幼粒细胞白血病(promyelocytic leukemia,PML)基因具有生长抑制、诱导凋亡、转录调节等生物学功能,PML 蛋白是一种肿瘤生长抑制因子,它可以通过聚集 p53 形成亚核蛋白复合物,促进 p53 的活性,能够抑制肿瘤的生长。PML 可以被 MDM2 从核内向核外的易位所抑制。MDM2 通过抑制 PML 的功能来促进 GAL4-CBP 融合蛋白的转录活性,这种相互作用是 p53 非依赖性的。MDM2 表达的降低促进了 PML 的作用,抑制了腺样囊性癌 ACC-2 细胞的生长。(4)此外,MDM2 可能结合启动整个细胞周期的基因启动子,使细胞从 G₀期向 S 期转化,还能够直接与磷酸化 Rb 蛋白结合,抑制抑癌 Rb 基因的生长抑制活性,这些功能由于 MDM2 表达下降,都不能得到充分的发挥,间接起到了抑制肿瘤细胞生长的作用^[22]。

综上所述,As₂O₃ 诱导细胞凋亡已经成为当前一种新的肿瘤治疗策略。本实验发现 ACC 与 MDM2 基因存在密切关系,一定浓度的 As₂O₃ 能够下调 MDM2 基因的表达,进而解除了 MDM2 基因对 p53、Rb 等一系列凋亡相关基因的抑制作用,加速了肿瘤细胞的凋亡,在抑制肿瘤生长中发挥了重要的作用。同时本次实验对 As₂O₃ 作用于 ACC 的分子机制进行了更深一步的研究,进一步证实了 ACC 的体外抑瘤作用,为其应用于临床提供了一定的理论依据。目前 MDM2 基因靶向治疗药物的研究也日趋成熟,也为研发治疗泪腺 ACC 新的药物提供了新的方向,随着细胞凋亡与肿瘤发生发展关系的进一步阐明以及细胞凋亡分子调控机制研究的不断深入,相信 As₂O₃ 在 ACC

实验与临床治疗中将发挥不可估量的作用。

参考文献

- 1 Ducrey N, Villemure JG, Jaques B, et al. Cystic adenocarcinomas of the lacrimal gland. *Klin Monatsbl Augenheilkd* 2002;219(4):231-234
- 2 Lengfelder E, Hofmann WK, Nowak D. Impact of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26(3):433-442
- 3 Keyhani M. Use of arsenic trioxide as a first-line single agent in the treatment of acute promyelocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2012;30(2):217-222
- 4 Lin CC, Hsu C, Hsu CH, et al. Arsenic trioxide in patients with hepatocellular carcinoma: a phase II trial. *Invest New Drugs* 2007;25(1):77-84
- 5 Meng YL, Hu HT, Li HL, et al. The clinical therapeutic effects of arsenic trioxide combined with transcatheter arterial chemoembolization in treating primary liver cancer with pulmonary metastases. *Zhonghua Nei Ke Za Zhi* 2012;51(12):971-974
- 6 Han JB, Sang F, Chang JJ, et al. Arsenic trioxide inhibits viability of pancreatic cancer stem cells in culture and in a xenograft model via binding to SHH-Gli. *Oncol Targets Ther* 2013;6:1129-1138
- 7 Kim MJ, Jung JH, Lee WS, et al. Arsenic hexoxide enhances TNF-alpha-induced anticancer effects by inhibiting NF-kappaB activity at a safe dose in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncol Rep* 2014;31(5):2305-2311
- 8 Vuky J, Yu R, Schwartz L, et al. Phase II trial of arsenic trioxide in patients with metastatic renal cell carcinoma. *Invest New Drugs* 2002;20(3):327-330
- 9 Gupta S, Yel L, Kim D, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in peripheral blood T lymphocyte subsets by inducing oxidative stress: a role of Bcl-2. *Mol Cancer Ther* 2003;2(8):711-719
- 10 Bose I, Ghosh B. The P53-MDM2 network: from oscillations to apoptosis. *J Biosci* 2007;32(5):991-997
- 11 Chene P. Inhibiting the p53-MDM2 interaction: an important target for cancer therapy. *Nat Rev Cancer* 2003;3(2):102-109
- 12 张兴伟, 王建伟, 李丽, 等. 腮腺腺样囊性癌中 PTEN、MDM2 的表达. *现代生物医学进展* 2014;14(7):1300-1302
- 13 Yang CH, Kuo ML, Chen JC, et al. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. *Br J Cancer* 1999;81(5):796-799
- 14 欧阳艳艳, 姜涛, 高萌, 等. Δψm 和 Caspase 3 在 As₂O₃ 诱导腺样囊性癌 ACC-2 细胞凋亡过程中的作用. *国际眼科杂志* 2014;14(2):232-235
- 15 Chen D, Shan J, Zhu WG, et al. Transcription-independent ARF regulation in oneogenic stress-mediated P53 responses. *Nature* 2010;464(7288):624-627
- 16 孙迎娟, 时飞, 孙坚萍, 等. 胃癌组织中 p53 基因突变及 p53 和 MDM2 蛋白表达的研究. *肿瘤防治杂志* 2005;12(13):974-978
- 17 Turbin DA, Cheang MC, Bajdik CD, et al. MDM2 protein expression is a negative prognostic marker in breast carcinoma. *Mod Pathol* 2006;19(1):69-74
- 18 戴文鑫, 雷怀定, 吴智勇, 等. MDM2-p53 通路在肺腺癌中的表达及其调控机制. *中国老年学杂志* 2011;31(17):3256-3257
- 19 于观贞, 朱明华, 倪灿荣, 等. 胰腺癌 p53 上下游基因 MDM2、p21^{WAF1/CIP1} 以及 p14^{ARF} 蛋白的表达及相互关系. *中国病理学杂志* 2004;33(2):130-133
- 20 阚和平, 刘正军, 谭永法. 胰腺癌 P53 蛋白表达与 AgNORs 量及组织学分级的关系. *中国病理生理杂志* 2008;24(8):1521-1523
- 21 Feng J, Tamskovic R, Yang Z, et al. Stabilization of Mdm2 via decreased ubiquitination is mediated by protein kinase B/Akt-dependent phosphorylation. *J Biol Chem* 2004;279(34):35510-35517
- 22 Bianco R, Caputo R, Caputo R, et al. Combined targeting of epidermal growth factor receptor and MDM2 by gefitinib and antisense MDM2 cooperatively inhibit hormone-independent prostate cancer. *Clin Cancer Res* 2004;10(14):4858-4864