

編號：CCMP94-RD-020

低劑量中藥材砒霜（三氧化二砷） 在實體腫瘤治療上的應用-強調在抑制 腫瘤轉移之輔助性療法及其機轉研究

魏凌鴻

台大醫院

摘 要

研究低劑量三氧化二砷在治療腫瘤轉移的可能性，並釐清其作用機轉。

使用細胞株包括 HeLa、Siha、DU-145、MCF-7、MDA-MB-231、PC-3，我們所使用的三氧化二砷濃度低於 2.5 μ M，比目前臨床治療所使用的濃度略低，是可以達到的合格劑量，在這個條件下，我們利用 cDNA 微陣列晶片及文獻蒐尋的方式，驗證三氧化二砷是否可以影響這些與密切相關之蛋白層次。基因表現利用反轉錄聚合鏈反應的方式確認訊息核糖核苷酸的變化，蛋白層次的變化使用西方墨點法、流式細胞儀、免疫螢光染色等方法檢驗，*in vitro* 的功能分析包括黏著試驗、細胞移行實驗、細胞侵襲實驗，在 *in vivo* 動物實驗包括鼠尾靜脈注射轉移模式及 orthotopic implantation metastatic model。在作用機轉的研究我們所使用的方法包括核蛋白活性分析、染色體免疫沈澱分析及報導分析。

- 一、第一個重要發現是三氧化二砷可以顯著的抑制趨化因子 CXCR4 的表現，不論在 mRNA 或 protein 的層次。
- 二、此種抑制作用在不同腫瘤的細胞皆可產生作用，包括 MDA-MB-231、MCF-7（乳癌）、PC-3、DU-145（前列腺癌）、HeLa、Siha（子宮頸癌）。
- 三、在作用機轉上，三氧化二砷抑制不同細胞株內生性 CXCR4 的表現，可能是透過調控 IKK 進而抑制 NF- κ B 活性所致。

- 四、更重要的發現是我們在 Siha 細胞證實了三氧化砷可以抑制缺氧所導致的 CXCR4 活化，而其作用機轉可能是透過影響 HIF-1 α 的安定性所致，這項發現目前的文獻中尚未被報導，至於三氧化二砷如何影響 HIF-1 α 蛋白的作用，我們目前正在做深入的探討。
- 五、在 in vitro 的功能分析實驗，我們已經確認三氧化二砷可以有效的抑制 CXCR4 所媒介的腫瘤細胞黏附作用及轉移作用。
- 六、兩項動物實驗目前正在進行中，預計 2006 年 2 月可以有結果。
- 七、從我們系列對三氧化二砷的研究裡，我們發現低劑量三氧化二砷在抑制腫瘤轉移的作用上極具成效，由於低劑量三氧化二砷無顯著細胞毒性，在臨床應用上，我們可將其定位在輔助性藥物較為適當。

關鍵詞：三氧化二砷、腫瘤轉移、趨化因子 CXCR4、缺氧誘發因子 HIF-1 α

Number: CCMP94-RD-020

Application of Low Dose Arsenic Trioxide on the Treatment of Solid Tumors-Focusing on the Adjuvant Use as an Antimetastatic Drug and Investigating the Mechanism of Action

Lin-Hung Wei

National Taiwan University Hospital

ABSTRACT

Aim: To investigate the feasibility of low dose arsenic trioxide in the management of tumor metastasis and elucidate the underlying mechanism for these effects.

Method: The cell lines used in this study include HeLa, SiHa (cervical carcinoma); DU145, PC-3 (prostate cancer); and MCF-7, MDA-MB-231 (breast cancer). Arsenic trioxide was kindly provided by TTY Inc. We introduced $< 2.5 \mu\text{M}$ arsenic trioxide for our study, and this dosage was slightly lowered than the concentration used in current clinical regimens. Under these circumstances, we investigated whether arsenic trioxide could influence the expression of metastasis-related molecules using CDNA microarray and literature searching. The change of mRNA was confirmed by RT-PCR, whereas the change at protein level was confirmed by Western blot, flowcytometry, and immunofluorescence. The in vitro functional assays include adhesion assay, migration assay, and invasion assay. The in vivo animal studies include murine tail vein injection metastatic model and orthotopic implantation metastatic model. To clarify the underlying mechanism for

action, we introduced EMSA, ChIP assay, and reporter assay.

Results & Discussion:

1. The first significant finding is that arsenic trioxide can remarkably inhibit the expression of CXCR4, at both mRNA and protein level.
2. The inhibitory effect of CXCR4 by arsenic could be observed in different tumor cell lines, including MDA-MB-231, MCF-7(breast cancer); PC-3, DU-145 (prostate cancer); and HeLa, SiHa (cervical cancer).
3. Arsenic trioxide could suppress endogenous CXCR4 expression in different cancer cell lines that could be attributed, in part, to the inhibition of NF- κ B activity through modulating IKK activity by arsenic trioxide.
4. The utmost finding for this study is the confirmation of hypoxia-mediated CXCR4 expression could be suppressed by Arsenic in SiHa cells. The mechanism for this action could be the modification of HIF-1 α protein stability by arsenic trioxide. To the best of our knowledge, this finding has not been reported yet. Currently, we are going further to elucidate how arsenic can modify the stability of HIF-1 α protein.

Keywords: arsenic trioxide, tumor metastasis, CXCR4, HIF-1 α

壹、前言

近年來臨床資料證實三氧化二砷治療急性前髓球性白血病的效果比化學治療高出很多，倍受國際上的重視，掀起一股「舊藥新用」的熱潮。隨著美國食品藥物管理局（FDA）的正式批准，目前國內外已經有許多將三氧化二砷運用於治療其他種類的癌症研究如胃癌、前列腺癌、肝癌等之研究。然而在高劑量、高毒性的限制下，三氧化二砷在實體腫瘤的治療應用上仍有待突破。

腫瘤細胞轉移是造成癌症病人死亡的主要原因。對於無法完全手術治療之腫瘤，各種治療方式，包括化學治療及放射治療均經常無法提供令人滿意之療效。我們的初步研究成果顯示在非毒殺性劑量下三氧化二砷仍然具有抑制由血清誘發之細胞附著及侵襲作用及降低細胞株產生之血管新生作用。運用放射線誘發轉移的動物試驗中也發現到三氧化二砷具有抑制肺部轉移的作用。我們初步的研究顯示許多與細胞附著、移動、侵襲作用及血管新生作用相關的基因會受到抑制。這些結果開啟了三氧化二砷在實體腫瘤的應用的契機。

中藥砒霜（三氧化二砷）使用於治療急性前髓球性白血病已被現代西方醫學所肯定，但其在實體腫瘤上的治療應用仍有待研究。過去的實驗結果顯示，高劑量的三氧化二砷雖然可以導致許多實體腫瘤細胞株的細胞凋亡，但也帶來嚴重的生物毒性效應，只有在低劑量的情況下，三氧化二砷的治療作用才有臨床應用的價值。由於三氧化二砷並不會造成顯著的骨髓抑制作用，因此我們認為三氧化二砷作為現代抗癌技術的輔助性藥物是較為正確的研究方向。本研究主旨為評估低劑量三氧化二砷運用於抑制實體腫瘤轉移之可行性，進一步進行機轉研究，並找出最佳合併治療模式。在此計畫中我們將建立三氧化二砷運用於侵襲與轉移的治療研究模式，這項研究的結果將有助於更深入了解三氧化二砷的抗癌機轉與擴展其應用，以奠定臨床試驗之基礎。

貳、材料與方法

評估三氧化二砷運用於侵襲轉移的可行性：

我們利用 DNA 微陣列（生物晶片）分析受三氧化二砷處理之腫瘤細胞及移植於老鼠之腫瘤比較在有無三氧化二砷處理下整體基因表現的模式。發現三氧化二砷最主要會降低與：一、血管新生；二、轉移；三、發炎反應等三大類有關的基因。三氧化二砷如何對轉移有關的基因及蛋白質層次調控及細胞生理行為的影響必須加以釐清。

使用細胞株包括 HeLa、Siha、DU-145、MCF-7、MDA-MB-231、PC-3，我們所使用的三氧化二砷濃度低於 2.5 μ M，比目前臨床治療所使用的濃度略低，是可以達到的合格劑量，在這個條件下，我們利用 cDNA 微陣列晶片及文獻搜尋的方式，驗證三氧化二砷是否可以影響這些與密切相關之蛋白層次。基因表現利用反轉錄聚合鏈反應的方式確認訊息核糖核苷酸的變化，蛋白層次的變化使用西方墨點法、流式細胞儀、免疫螢光染色等方法檢驗，*in vitro* 的功能分析包括黏著試驗、細胞移行實驗、細胞侵襲實驗，在 *in vivo* 動物實驗包括鼠尾靜脈注射轉移模式及 orthotopic implantation metastatic model。在作用機轉的研究我們所使用的方法包括核蛋白活性分析、染色體免疫沈澱分析及報導分析。實驗詳細步驟如下列參考資料。

參、結果

一、趨化因子 SDF-1a 及其受體 CXCR4 與腫瘤細胞轉移的相關作用請見參考圖 1。

低劑量三氧化二砷可以有效抑制腫瘤細胞 CXCR4 mRNA 的表現。而且三氧化二砷是專一性的抑制 CXCR4，並不影響 CCR1 或 CCR5 (data not shown)。

二、圖 2A：三氧化二砷抑制 HeLa 細胞 CXCR4 的表現-劑量效應（利用 RT-PCR 反轉錄聚合鏈反應）。

三、圖 2B：三氧化二砷抑制 HeLa 細胞 CXCR4 的表現-時間效應（利用 RT-PCR 反轉錄聚合鏈反應）。

低劑量三氧化二砷可以有效抑制腫瘤細胞 CXCR4 蛋白量的表現。

四、利用流式細胞儀偵測三氧化二砷抑制 HeLa 細胞表面 CXCR4 的表現。

低劑量三氧化二砷抑制 CXCR4 的表現可以在不同的腫瘤細胞觀察到。

五、三氧化二砷抑制不同腫瘤細胞 CXCR4 的表現，包括 HeLa、MCF-7、PC-3、DU-145 及 MDA-MB-231 細胞...等，利用 RT-PCR 反轉錄聚合鏈反應。

在腫瘤微環境下，缺氧是誘發 CXCR4 表現的重要因素，低劑量三氧化二砷也可以抑制此一表現。

六、圖 5A 及 5B：三氧化二砷抑制缺氧條件下誘發 Siha 細胞表現 CXCR4-利用 RT-PCR。

三氧化二砷調控 CXCR4 之機轉研究：著重在 NF- κ B 及 HIF-1 α 。

七、圖 6A：三氧化二砷藉由改變 HIF-1 α 蛋白的穩定度抑制缺氧所誘發的 CXCR4 表現-利用西方點墨法。

八、圖 6B：NF- κ B 路徑對三氧化二砷調控 CXCR4 的貢獻。利用化學抑制劑 BAY117082 探討。

CXCR4 promoter 已完成，目前進行 Chip Assay 及 IP-Western。

九、圖 7：功能分析，*in vitro*

利用黏著試驗，細胞移動實驗及細胞侵襲實驗檢驗三氧化二砷處理後 HeLa、MDA-MB-231 細胞的轉移能力降低。

十、動物實驗仍在正進行中，我們利用 MDA-MB-231 細胞的肺轉移模式，比較有無三氧化二砷處理的影響，利用的評估方式有正子造影、組織切片檢查及存活分析。由於我們強調抑制腫瘤轉移可以在相對低劑量下達成，所以我們花了不少時間在確認老鼠的治療劑量問題，我們將儘快解決這個瓶頸。

肆、討論

我們的實驗結果顯示 CXCR4 是低劑量三氧化二砷之重要作用標的，不論是腫瘤細胞內生性的 CXCR4 或是缺氧環境下所誘發的 CXCR4 表現都可受到低劑量三氧化二砷所抑制，從機制的探討過程中我們進一步發現三氧化二砷可能影響 HIF-1 α 蛋白的安定性，以 HIF-1 α 為分子標的的治療研究是目前腫瘤治療的熱門議題，到目前為止，只有極少數的藥物（例如：topotecan）被發現可以影響 HIF-1 α ，三氧化二砷在這些藥物中將是極具潛力的一員。

公共衛生的研究發現烏腳病的發生與飲用水中砷的污染有關，從我們的研究推論是否砷化物的毒理作用與其影響 HIF-1 α 有關，使得肢端循環對缺氧狀態無法反應？藥理、毒理一線之隔，或許利用砷化物這種特別的作用謹慎正確的使用之，將對腫瘤的治療提供助益。

伍、結論與建議

對於砷化物的研究，我們的重心在低劑量下可能的臨床應用，這是因為高劑量的砷化物所導致的毒性作用，將使其臨床應用價值大打折扣，我們系列的研究顯示這項主張極具發展潛力。例如，我們發現低劑量三氧化二砷可以抑制放射線治療可能誘發的 MMP-9 表現，因此，合併三氧化二砷與放射線治療上具加乘作用，再者，我們證實了與腫瘤轉移密切相關之趨化因子 CXCR4 也可以被三氧化二砷所抑制，動物實驗目前正進行中，以評估這項作用在生物體內是否可以有效抑制腫瘤的轉移，從腫瘤治療的觀點來看，低劑量三氧化二砷不具顯著的細胞毒性，在實體腫瘤的治療上不應單獨使用，但是做為輔助性用藥，低劑量三氧化二砷所具有的特定藥理作用將是其應用的利基，目前臨床上所使用之砷化物劑型為針劑依本項研究之成果，我們建議應發展其他劑型以利長期低劑量使用。

誌謝

本研究計畫承蒙行政院衛生署中醫藥委員會，計畫編號 CCMP94-RD-020 提供經費贊助，使本計畫得以順利完成，特此誌謝。

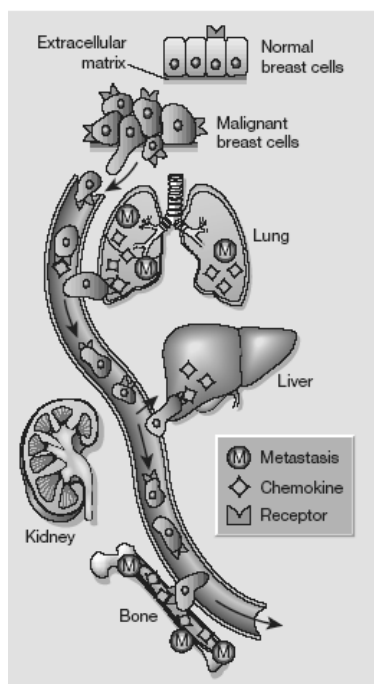
陸、參考文獻

1. Baggiolini M.: Chemokines and leukocyte traffic. *Nature* 1998; 392: 565-568.
2. Berger EA, Murphy PM, and Farber JM.: Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: roles in viral entry, tropism, and disease. *Annu Rev Immunol* 1999; 17: 657-700.
3. Bleul CC, Farzan M, Choe H, Parolin C, Clark-Lewis I, Sodroski J, and Springer TA.: The lymphocyte chemoattractant SDF-1 is a ligand for LESTR/fusin and blocks HIV-1 entry. *Nature* 1996; 382: 829-833.
4. Bleul CC, Fuhlbrigge RC, Casasnovas JM, Aiuti A, and Springer TA.: A highly efficacious lymphocyte chemoattractant, stromal cell-derived factor 1 (SDF-1). *J Exp Med* 1996; 184: 1101-1109.
5. Hughes MF.: Arsenic toxicity and potential mechanisms of action. *Toxicol Lett* 2002; 133: 1-16.
6. Kwong YL and Todd D.: Delicious poison: arsenic trioxide for the treatment of leukemia. *Blood* 1997; 89: 3487-3488.
7. Luster AD.: Chemokines--chemotactic cytokines that mediate inflammation. *N Engl J Med* 1998; 338: 436-445.
8. Miller WH, Jr, Schipper HM, Lee JS, Singer J, and Waxman S.: Mechanisms of action of arsenic trioxide. *Cancer Res* 2002; 62: 3893-3903.
9. Muller A, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, McClanahan T, Murphy E, Yuan W, Wagner SN, Barrera JL, Mohar A, Verastegui E, and Zlotnik A.: Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature* 2001; 410: 50-56.
10. Murgu AJ.: Clinical trials of arsenic trioxide in hematologic and solid tumors: overview of the National Cancer Institute Cooperative Research and Development Studies. *Oncologist* 2001; 6 Suppl 2: 22-28.
11. Nagasawa T, Hirota S, Tachibana K, Takakura N, Nishikawa S, Kitamura Y, Yoshida N, Kikutani H, and Kishimoto T.: Defects of B-cell lymphopoiesis and bone-marrow myelopoiesis in mice lacking the CXC chemokine PBSF/SDF-1. *Nature* 1996; 382: 635-638.
12. Oberlin E, Amara A, Bachelier F, Bessia C, Virelizier JL, Arenzana-Seisdedos

- F, Schwartz O, Heard JM, Clark-Lewis I, Legler DF, Loetscher M, Baggiolini M, and Moser B.: The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection by T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 1996; 382: 833-835.
13. Oonakahara K, Matsuyama W, Higashimoto I, Kawabata M, Arimura K, and Osame M.: Stromal-derived factor-1alpha/CXCL12-CXCR 4 axis is involved in the dissemination of NSCLC cells into pleural space. *Am J Respir Cell Mol Biol* 2004; 30: 671-677.
14. Phillips RJ, Burdick MD, Lutz M, Belperio JA, Keane MP, and Strieter RM.: The stromal derived factor-1/CXCL12-CXC chemokine receptor 4 biological axis in non-small cell lung cancer metastases. *Am J Respir Crit Care Med* 2003; 167: 1676-1686.
15. Rollins BJ.: Chemokines. *Blood* 2003; 90: 909-928.
16. Schioppa T, Uranchimeg B, Saccani A, Biswas SK, Doni A., Rapisarda A, Bernasconi S, Saccani S, Nebuloni M, Vago L, Mantovani A., Melillo G, and Sica A.: Regulation of the chemokine receptor CXCR4 by hypoxia. *J Exp Med* 2003; 198: 1391-1402.
17. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, Li XS, Xiong SM, Qiu QY, Zhu J, Tang W, Sun GL, Yang KQ, Chen Y, Zhou L, Fang ZW, Wang YT, Ma J, Zhang P, Zhang TD, Chen SJ, Chen Z, and Wang Z Y.: Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997; 89: 3354-3360.
18. Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, Jhanwar S, Calleja E, Dardashti LJ, Corso D, DeBlasio A, Gabrilove J, Scheinberg DA, Pandolfi PP, and Warrell RP, Jr.: Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. *N Engl J Med* 1998; 339: 1341-1348.
19. Tachibana K, Hirota S, Iizasa H, Yoshida H, Kawabata K, Kataoka Y, Kitamura Y, Matsushima K, Yoshida N, Nishikawa S, Kishimoto T, and Nagasawa T.: The chemokine receptor CXCR4 is essential for vascularization of the gastrointestinal tract. *Nature* 1998; 393: 591-594.
20. Taichman RS, Cooper C, Keller ET, Pienta KJ, Taichman NS, and McCauley LK.: Use of the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 pathway in prostate cancer metastasis to bone. *Cancer Res* 2002; 62: 1832-1837.

21. Tashiro K, Tada H, Heilker R, Shirozu M, Nakano T, and Honjo T.: Signal sequence trap: a cloning strategy for secreted proteins and type I membrane proteins. *Science* 1993; 261: 600-603.
22. Zou YR, Kottmann AH, Kuroda M, Taniuchi I, and Littman DR.: Function of the chemokine receptor CXCR4 in haematopoiesis and in cerebellar development. *Nature* 1998; 393: 595-599.

柒、圖



Chemokine stromal cell-derived factor-1 α (SDF-1 α) and its receptor, CXCR4, are involved in breast cancer metastasis.

Nature 410, 24–25, 2001

參考圖 1

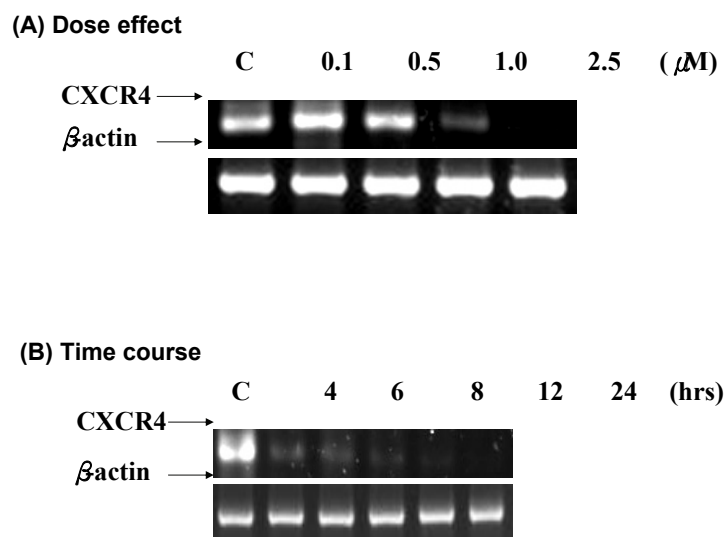


圖 2

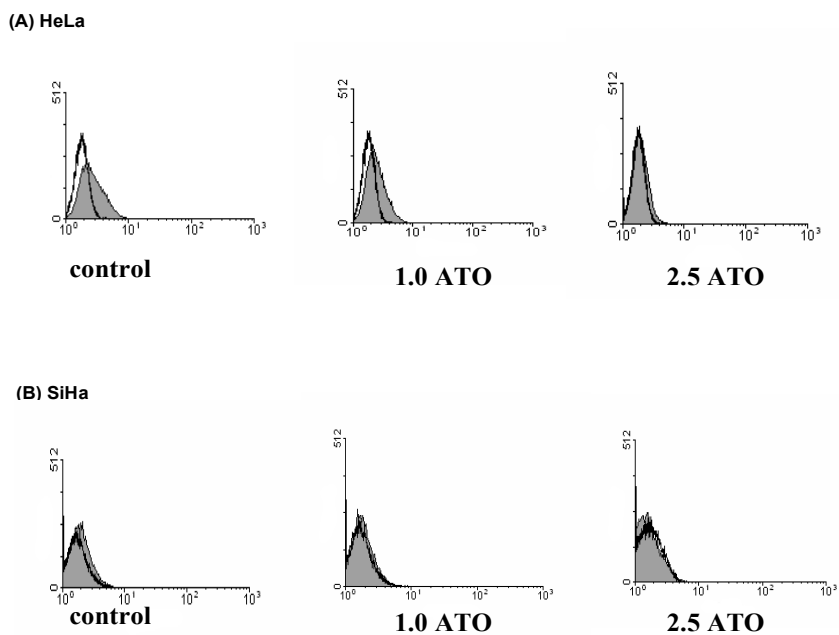


圖 3

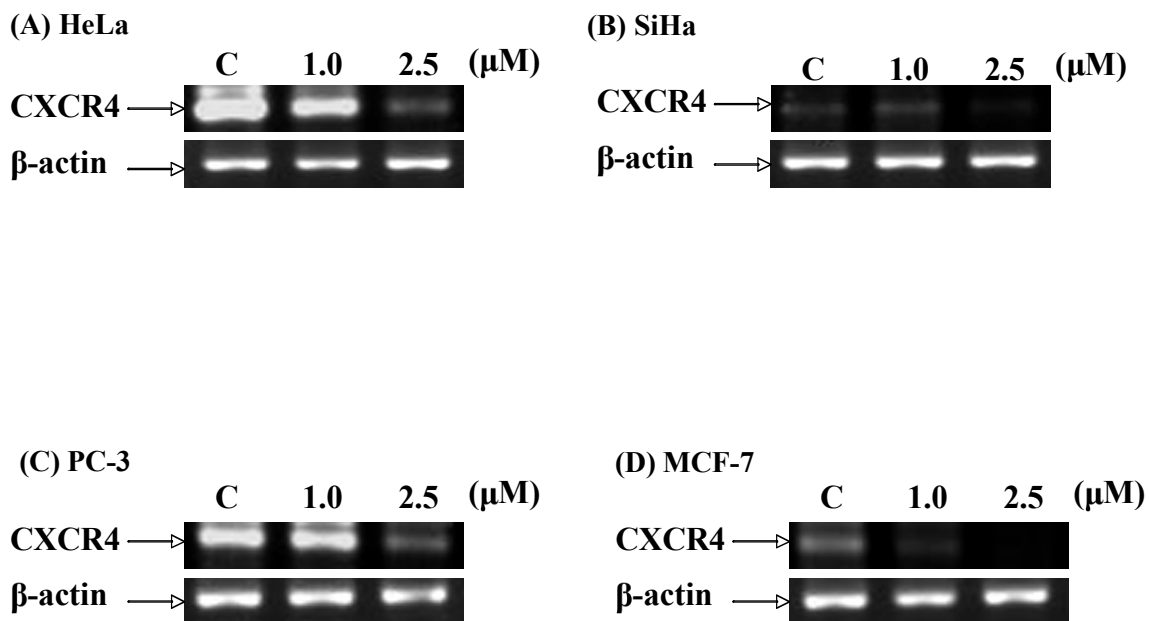


圖 4

SiHa

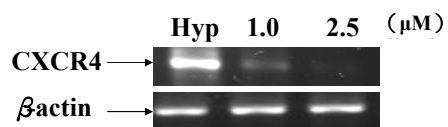


圖 5A

SiHa

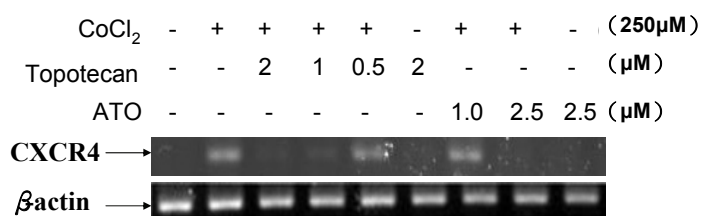


圖 5B

Whole cell extract of SiHa

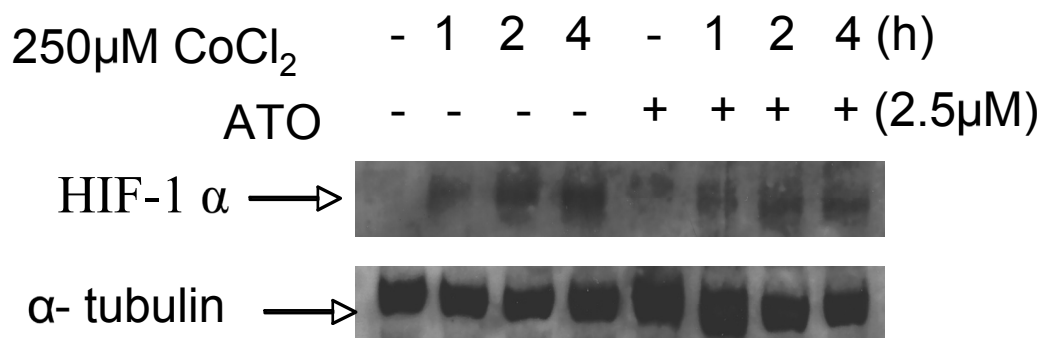


圖 6A

HeLa

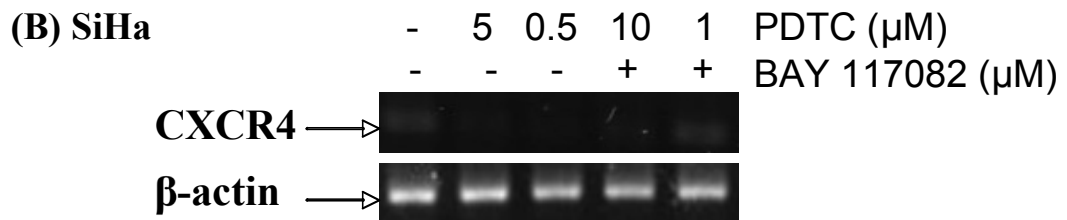
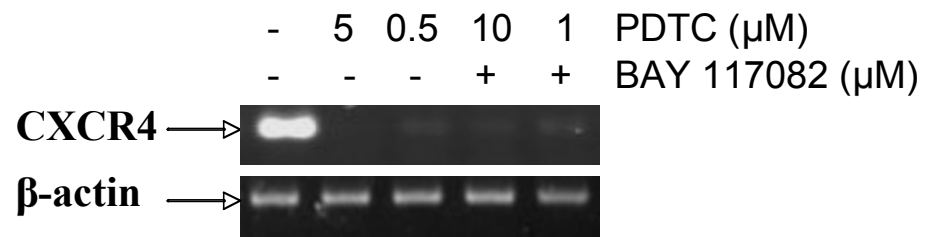


圖 6B

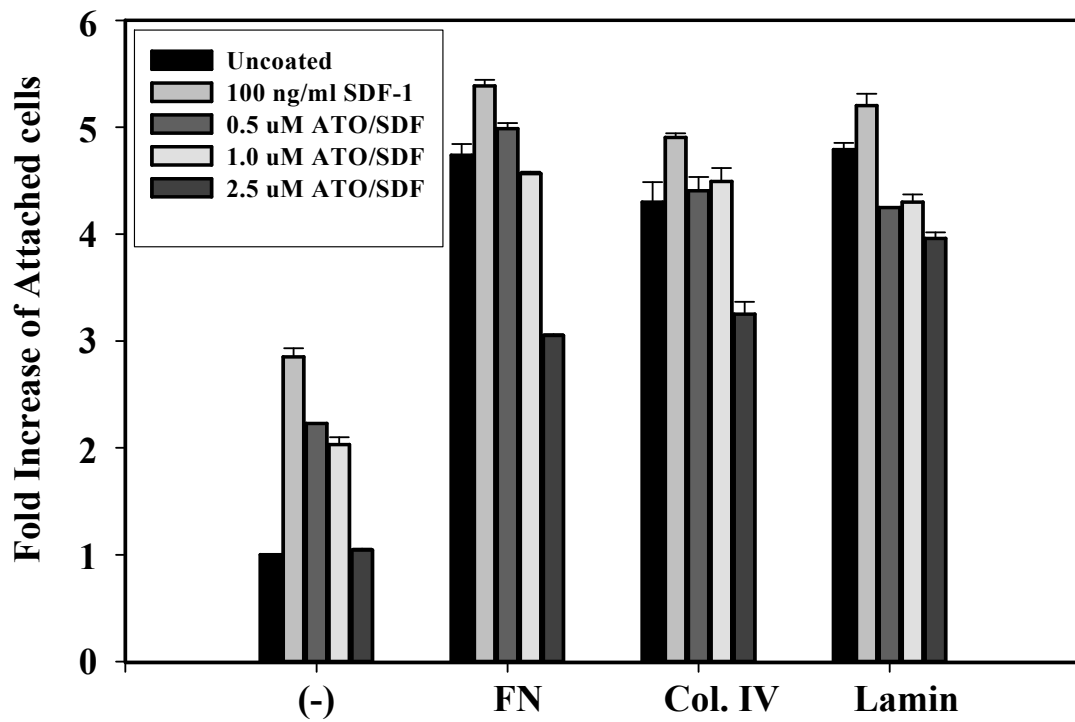


圖 7

