doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.18.002

As2O3 干预口腔鳞癌 A431 细胞 EGFR 表达的研究*

摘要 目的:研究三氧化二砷(As₂O₃)对人口腔鳞癌 A431 细胞生长的抑制作用,探讨其抗肿瘤的机制。方法:合成特异性靶向到肿瘤细胞表面表皮生长因子受体 (EGFR) 的近红外荧光分子对比剂 EGF-Cy5.5, 验证试剂合成的靶向特异性。口腔鳞状细胞癌 A431 细胞系暴露于浓度分别为 0 μM,0.5 μM,2.5 μM 和 5.0 μM 的三氧化二砷溶液中 0,24 h,48 h 和 72 h。共聚焦显微镜、流式 细胞仪及免疫组化证实 EGFR 的表达水平,上述实验均测量三次,结果取平均值。结果:EGF-Cy5.5 靶向荧光对比剂的标记率为 68%~70%。对比对照组,越高浓度的三氧化二砷处理的肿瘤细胞其获得的细胞荧光信号强度越小,这与药物浓度越高细胞表面表 达 EGFR 的量越少相一致。流式细胞仪显示,在 72 小时,作用于细胞的三氧化二砷药物浓度分别为 0.5 μM,2.5 μM, 和 5.0 μM, 其相对应获得的细胞 EGFR 表达量分别为 57.28± 3.2 % (P<0.05), 29.91± 2.2 % (P<0.01) 和 10.73± 2.4 % (P<0.01),明显低于对照 组的细胞 EGFR 表达量分别为 57.28± 3.2 % (P<0.05), 29.91± 2.2 % (P<0.01) 和 10.73± 2.4 % (P<0.01),明显低于对照 组的细胞 EGFR 表达量 74.42± 1.8 %,(P<0.05)。结论:本研究应用近红外荧光分子成像的方法体外检测口腔鳞状细胞癌 A431 的 EGFR 表达水平,实验证明三氧化二砷对其 EGFR 具有明显的抑制作用,且抑制作用具有时间 - 剂量依赖性。 关键词: 三氧化二砷(As₂O₃);口腔鳞状细胞癌(OSCC);表皮生长因子受体(EGFR);近红外光学成像(NIR) 中图分类号:Q-93-33 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2014)18-3405-05

Effects of Arsenic Trioxide on EGFR Expression of Oral Squamous Cell Carcinoma A431 Cell*

ZHANG Ling-bo¹, ZHANG Bin^{1,23,4Δ}, HU Wei-ping¹, GUO Shuan-long¹, HU Narisu¹, FU Zhao-chen¹, GAO Li¹, LV Zhi-yong¹ (1 Stomatology Department, 2nd Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China; 2 Institute of Hard Tissue Development and Regeneration, 2nd Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150086, China; 3 Heilongjiang Academy of Medical Sciences, Haebin, Heilongjiang, 150086;

4 Sino-Russian Institute of Hard Tissue Development and Regeneration)

ABSTRACT Objective: This study was to investigate the inhibitory effect and mechanism of Arsenic Trioxide (As_2O_3) on oral squamous cell carcinoma A431 cell. **Methods:** EGF-Cy5.5 was synthesized according to our previous report and was used as a tumor cellular EGFR specific imaging agent. A431 *in vitro* were exposed to 0 μ M, 0.5 μ M, 2.5 μ M, or 5 μ M of As₂O₃ for 0 h, 24 h, 48 h and 72 h. Confocal microscopy and flow cytometry and cell immunohistochemical staining confirmed EGFR expression. All the studies were measured 3 times and the results were presented as mean. **Results:** The labeling rate of targeted fluorescent contrast agent EGF-Cy5.5 was 68 % to 70 %. *In vitro*, less intense cellular fluorescence signal was observed in cells treated with higher concentration of As₂O₃ compared with control cells, consistent with the lower levels of EGFR expression in treatment cells. Flow cytometry showed the cellular EGFR expression was 57.28± 3.2 % (P<0.05), 29.91± 2.2 % (P<0.01), and 10.73± 2.4 % (P<0.01) in cells treated with 0.5 μ M, 2.5 μ M, and 5.0 μ M As₂O₃, respectively, which were significant lower than the control group (74.42± 1.8 %, P<0.05) at 72 hours. **Conclusion:** This study assessed *in vitro* by NIR molecular imaging that the EGFR expression of OSCC A431 cell and demonstrates the inhibition effect of OSCC response to As₂O₃ treatment in dose-dependent characteristics.

Key words: Arsenic Trioxide (As₂O₃); Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC); Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR); Near Infrared Imaging (NIR)

Chinese Library Classification: Q-93-33 Document code: A Article ID: 1673-6273(2014)18-3405-05

前言

口腔鳞状细胞癌(OSCC)是十大常见癌症之一¹¹,目前是 口腔中最常见的恶性肿瘤¹²。尽管在过去三十年中其诊断和治 疗得到发展,但口腔鳞状细胞癌的预后仍不尽人意,主要表现 在其复发率高,常见淋巴结转移。其五年的平均存活率不到 60%³。 目前,外科手术治疗是口腔鳞状细胞癌的主要治疗方式。然而, 仅有一小部分患者手术治疗后获得痊愈,因为大部分术后患者 易罹患局部晚期或转移性疾病,还有一些术后患者导致明显的 颜面毁容。有效的减积手术治疗或治疗口腔鳞状细胞的药物疗 目(81101086):型龙江省科技匠攻关项目(GC12C303-2):

*基金项目:国家自然基金面上项目(81170960);国家自然基金青年项目(81101086);黑龙江省科技厅攻关项目(GC12C303-2); 哈尔滨医科大学附属第二医院青年启动基金(QN2010-04)

作者简介:张令波(1980-),女,博士,主治医师,主要研究方向:三氧化二砷治疗口腔颌面部恶性肿瘤机制研究,

△通讯作者:张斌,E-mail:zhangbinhmu@gmail.com

E-mail:zhanglingbo7552057@yahoo.com

⁽收稿日期:2014-01-22 接受日期:2014-02-20)

法是首选,特别适合应用在那些不适合外科手术切除的患者。 不幸的是,口腔鳞状细胞癌对大多数传统的化疗药物有耐药 性。

三氧化二砷(As₂O₃, TRISENOX)是被最广泛应用和研究的 砷剂抗癌药^[4], 是一种可以有效治疗复发性或疑难性急性早幼 粒细胞白血病(APL)的化疗药^[57]。大量的临床前实验已经证明 三氧化二砷也可以有效地治疗实体肿瘤,如:肝癌^[8]、肺癌^[9]、卵 巢癌^[10]、消化系统^[11]、前列腺癌^[12]、鼻咽癌^[13]及口腔癌^[14]等。然而, 三氧化二砷抑制肿瘤细胞生长及诱导其凋亡的抗癌机制未完 全清楚^[15]。本实验进一步从体外实验方面研究三氧化二砷对口 腔鳞状细胞癌细胞 A431 的表皮生长因子受体的表达,并探讨 其作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料

人类表皮样癌 A431 细胞系由中国上海科学院生物化学 与细胞生物学研究所提供。三氧化二砷溶液(Sigma 公司,美 国)。Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)(Invitrogen 公 司,美国),胎牛血清(Gibco 公司,美国),N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)酯(GE Healthcare,美国),人类表皮生长因子重组体 hEGF及 EGF(ImClone 系统,美国)。单克隆兔抗人表皮生长 因子受体抗体(Santa Cruz Biotechnology,美国),生物素化的山 羊抗兔 IgG(Southern Biotechnology Associates,美国),链霉素 过氧化物酶试剂(Histofine 试剂盒; Nichirei 公司,日本)。

1.2 方法

1.2.1 荧光探针合成 表皮生长因子受体的特异性靶向近红外 荧光剂,EGF-Cy5.5,通过单官能团的 N-羟基琥珀酰亚胺 (NHS)酯(CY5.5),将人类表皮生长因子重组体 hEGF 同 Cy5.5 荧光染料(Amersham Biosciences)进行标记,技术操作根据我 们以往报道的实验设计^[16]。实验主要步骤,在4℃的暗室内,将 EGF (35 mg, 233.45 nmol)与 Cy5.5-NHS (4.2 mg, 1242.5 nmol) 混合在 3 ml 的水中 2 小时,然后加入 5 %的乙酸(HOAc)3 ml 终止反应。制备成的 EGF-Cy5.5 装在 PD-10 一次性管内冻干、重新悬浮在 1 毫克 / 毫升浓度的盐水溶液内,然后贮存在 -20 ℃ 的暗室内备用。

1.2.2 体外细胞学实验 人类表皮样癌 A431 细胞高表达 EGFR¹⁷⁷,在 Dulbecco 改良的 Eagle 培养基(DMEM)中获得和 培养,并加入 10%(V/V)胎牛血清。在这一系列实验中,所有 细胞都是在 37℃,空气/二氧化碳(19:1)的湿度条件下进行 的。A431 细胞接种于平底 24 孔微量滴定板的盖玻片上,密度

为 1 × 10⁵ 细胞 / 孔。接种后 24 小时,用磷酸盐缓冲盐水(PBS, pH 值 7.2)冲洗细胞 3 次, 然后用生理盐水稀释的三氧化二 神溶液处理细胞 0 h, 24 h, 48 h, 或 72 h, 其三氧化二砷溶液浓 度分别为 0 μ M, 0.5 μ M, 2.5 μ M, 5.0 μ M。药物处理后, 所有的 细胞用磷酸盐缓冲盐水冲洗 3 次。

1.2.3 细胞免疫组化观察 细胞 EGFR 的表达是通过免疫组织 化学法评价。简而言之,固定在4%的多聚甲醛中的细胞放入 4℃的磷酸盐缓冲溶液中25分钟,然后再用磷酸盐缓冲溶液 冲洗三次。阻断30分钟,以减少非特异性抗体结合后,单克隆 兔抗人表皮生长因子受体抗体(1:200,羧基末端)与细胞共同 培养在37℃下2h,然后用磷酸盐缓冲溶液冲洗3次除去未结 合的配体。接下来,用生物素化的山羊抗兔 IgG 处理细胞,然后 加入链霉素过氧化物酶试剂。最后,加入作为色原体的二氨基 联苯胺(DAB)和1%的过氧化氢酶,并用苏木精复染细胞。用 配有尼康 DXM 1200 数码相机的尼康 E800 显微镜进行成像。

1.2.4 荧光显微镜检测 经处理后的细胞培养在暗室、37℃, 500 μL的EGF-Cy5.5 溶液中(最终浓度为 20 nM)30 分钟。培 养后,所有细胞用磷酸盐缓冲液冲洗 3 次。肿瘤细胞的荧光显 微镜(近红外二极管光源和过滤器配备了奥林巴斯显微镜)检 测,通过视觉确认EGF-Cy5.5 的吸收。使用二脒基 - 苯基 - 吲 哚(DAPI)染色细胞核。在微观图像,EGF-Cy5.5 是伪红色 (680-710 nm 发射光谱),而DAPI是伪蓝色(461 nm 发射光 谱)。

1.2.5 流式细胞分析 与 A431 细胞与 EGF- Cy5.5 共同孵育 4 小时后,A431 细胞加入胰蛋白酶溶液,用磷酸盐缓冲液离心淘洗 2 次使用流式细胞仪定量评估结合到 EGFR 的 EGF - Cy5.5 的荧光强度。所有实验均重复 3 次。

1.3 统计学分析

使用 SPSS18.0 统计软件包对数据进行分析,时间和 As₂O₃ 剂量对细胞 EGFR 的表达效果采用析因设计的方差分析,数据 显示以均数±标准差,P <0.05 被认为有统计学意义。

2 结果

2.1 荧光探针的合成

人表皮生长因子是一种小分子多肽,其末端含有氨基 (NH2)基团,是一种碱性基团,可以同近红外靛青荧光素 Cy5. 5-NHS 分子末端的酸性基团 n-羟基琥珀酰亚胺(NHS)基团发 生酰化反应,在催化剂的作用下合成本研究所需要的荧光探 针,合成后的化学结构式如图 1 所示。



图 1 EGF-Cy5.5 化学结构示意图 Fig. 1 Schematic diagram of EGF-Cy5.5 chemical constitution

2.2 荧光探针的生物学活性判定的体外细胞学实验

2.2.1 细胞形态 在 100 倍及 200 倍倒置荧光显微镜下观察口 腔鳞状细胞癌 A431 细胞的形态呈上皮型贴壁扁平生长,细胞 膜及细胞核显示清晰,细胞生长紧密旺盛。

2.2.2 流式细胞学检查测定 A431 口腔鳞状细胞癌表皮生长因 子表达 图 2显示通过流式细胞学方法检测 A431 口腔鳞状 细胞癌 EGFR 表达含量,其平均 EGFR 阳性细胞表达百分比约 为 74.4± 1.8%,即证实 A431 细胞高表达 EGFR。



图 2 A431 口腔鳞状细胞癌细胞 EGFR 表达流式细胞学检测 Fig. 2 The flow cytometry assay of EGFR expression of A431 OSCC cell line

2.2.3 荧光探针结合 A431 细胞 EGFR 受体的特异性检测 图
3 显示流式细胞学检测结果:按结合荧光探针的细胞所占受检细胞的门控百分比技术,荧光标记的 A431 百分比为(73.74 ±
2.45)%,(P < 0.05),证实 A431 细胞可以结合 EGF-Cy5.5 荧光

探针; 而受体阻断竞争性抑制实验中,A431 细胞与过量的 C225 充分孵育后, 特异性封闭 EGFR 受体,A431 细胞内仅有 极微量的 EGF-Cy5.5 荧光信号,表明 A431 细胞对 EGF-Cy5.5 的摄取是依赖于细胞膜表面的 EGFR 介导的。





图 4 显示激光共聚焦显微镜直观成像 A431 细胞对荧光 探针的摄取,其中,由 DAPI标记的细胞核呈蓝色,近红外荧光 激发 / 发射滤片选择 660/710 nm,发射荧光为红色(比例尺:A= 200 微米;B=100 微米)。与荧光探针共同孵育的 A431 细胞内 见强烈的红色荧光信号,未孵育荧光探针的细胞内仅见蓝染的 细胞核,未见红色荧光信号。图像结果证实,EGF-Cy5.5 荧光探 针是通过细胞膜表面表达的 EGFR 特异性聚集在细胞浆内。

2.3 体外细胞学实验

2.3.1 细胞免疫组化和荧光显微镜检测结果 细胞用不同浓度 的三氧化二砷处理后 48 小时,通过荧光显微镜肉眼观测 EGF-Cy5.5 的摄入量和细胞免疫组化法评估细胞 EGFR 表达。图 5 中 A-D,代表不同组的荧光图像(比例尺 = 100 微米),Cy5.5 被 标记为红色,DAPI 被标记为蓝色;E-H,代表细胞 EGFR 细胞 免疫组化的图像(比例尺 = 100 微米),二氨基联苯胺(DAB)表 现为棕褐色,代表 EGFR 的表达,其中苏木显示为蓝色表示细 胞核。靶向到 A-431 肿瘤细胞(图 5, A-D)的荧光显微镜显示探 针被摄入到细胞膜上和胞浆内。对比对照组细胞,三氧化二砷



图 4 口腔鳞状细胞癌细胞 A431 同 EGF-Cy5.5 特异性结合的激光共聚 焦成像



治疗组的细胞均显示较低的荧光信号。并且,对比较低三氧化 二砷治疗浓度组的细胞(0.5 μM),较高三氧化二砷治疗浓度组 的细胞(2.5 μM 或 5.0 μM)其荧光信号强度降低。荧光信号强 度的变化反映了不同治疗组 EGFR 的表达水平,同时,所得结 果被免疫组化显微镜所证实(图 5, E-H)。有趣的是,随着三氧 化二砷 0 μM 到 5.0 μM 浓度的增加,在荧光和免疫染色图像 中细胞数目均减少,表明三氧化二砷抑制肿瘤细胞增殖的作用

呈剂量依赖性,如先前报道一致[18]。



图 5 细胞荧光成像及 EGFR 免疫成像显示三氧化二砷对 A431 细胞 EGFR 表达的影响 (比例尺 =100 μm) Fig. 5 Effects of As₂O₃ on A431 cell EGFR expression by cellular

fluorescent and immunostaining (Scale bar =100 μ m)

2.3.2 流式细胞分析结果 不同浓度的三氧化二砷 (0 μM 、0.5 μM、2.5 μM、5.0 μM)对 A431 细胞作用 48 小时后,其流式细 胞检测结果平均分别为:75.07±1.02%、61.48±2.5%(P<0. 05)、41.81± 3.82%(P<0.01)、19.27± 4.12%(P<0.01), 三氧化 二砷的治疗浓度越高,其可检测到的 A431 细胞表面的 EGFR 表达越少(图 6)。不同浓度三氧化砷治疗前与治疗后 48 小时, 肿瘤细胞表面 EGFR 表达量对比 (图 7)(* P < 0.05, ** P < 0. 01)。随时间变化,不同浓度的三氧化二砷(0 µM、0.5 µM、2.5 μM、5.0 μM)治疗后,流式细胞仪动态检测 EGFR 细胞表达百 分比(*P <0.05,**P <0.01),所有的实验都重复进行三次,每 个数据代表平均值±标准误。治疗前,三氧化二砷浓度为0 μM、0.5 μM、2.5 μM、5.0 μM 的细胞 EGFR 的表达分别为 70.4± 1.3%、73.4± 1.0%、71.8± 1.5%、70.9± 1.7%,各组之间 没有明显差别(n=3, P>0.05)。随治疗时间(0h、24h、48h、72h) 的推移,治疗组 EGFR 的表达逐渐减少,而对照组 EGFR 的表 达却逐渐增加。进一步表明三氧化二砷抑制肿瘤细胞增殖的作 用呈剂量-时间依赖性。

3 讨论

据我们所知,这是首次证明了用近红外光学成像的方法体 外监测三氧化二砷治疗口腔鳞状细胞癌,评价其对口腔鳞癌细 胞 EGFR 表达的抑制作用。结果显示,在体外实验中,三氧化二 砷是抗口腔鳞癌 EGFR 的有效药物,其药效呈剂量-时间依赖 性,这与之前的研究结果相一致^[19]。



图 6 不同浓度三氧化二砷对 A431 细胞作用 48h 的 EGFR 流式细胞检测 Fig. 6 The representative quantification of EGFR expression was assessed using flow cytometry at 48 hours





虽然三氧化二砷最早是被批准作为治疗急性早幼粒细胞 白血病(APL)的有效化疗药,但促进三氧化二砷临床应用的热 情已经激发了将其应用在实体肿瘤的治疗中^[20]。目前广泛接受 的三氧化二砷活性的抗癌机理是它可以诱导细胞凋亡,影响远 处信号传导通路,包括丝裂原活化蛋白激酶(MAPK),p53 基 因,激活蛋白 -1 和核因子 kappa B^[21]。近期一些学者指出三氧 化二砷也可以抑制肿瘤细胞的 EGFR 表达。用体外或离体的方 法,通过 EGFR -RAS- RAF -ERK1/2 信号通路,激活 p21 基 因,导致细胞死亡^[19,22]。然而,通过近红外荧光成像的方法,检测 三氧化二砷治疗对口腔鳞状细胞癌 A431 细胞的作用及与 EGFR 表达之间的关系,至今未见报道。

正如之前我们论证的: 口腔鳞状细胞癌细胞摄取 EGF-Cy5.5 是受 EGFR 的调控,而荧光信号强度正与肿瘤细胞 EGFR 的表达成比例^[16]。相比对照组,三氧化二砷治疗组的细胞 荧光信号强度较低,荧光信号强度与三氧化二砷治疗的浓度呈 反比关系,这与免疫组织化学法所检测的治疗组肿瘤细胞的 EGFR 表达情况相—致(图1)。值得注意的是,随着三氧化二砷 浓度的增加(0μM 到 5μM)肿瘤细胞数量减少,这在细胞荧光 和免疫染色图像中均有体现,表明三氧化二砷对肿瘤细胞增殖 的抑制作用具有剂量依赖性,这与以前的报告相一致^[2]。另外, 通过流式细胞学检测,三氧化二砷治疗组的细胞 EGFR 表达呈 动态减少,表明三氧化二砷对 EGFR 的抑制作用呈剂量 - 时间 依赖模式(图 2)。

本实验结果具有一些临床意义。首先,近红外光学分子成 像 EGFR 的表达,正如本实验阐述的,能够无创、敏感地检测口 腔咽部鳞状细胞癌,能被用于长时间地活体监测并指导三氧化 二砷的治疗。虽然近红外荧光探针的背景吸收率较低,但其诊 断价值常常受到组织穿透深度的挑战,而表浅肿瘤,如口腔鳞 状细胞癌正适合于原位病灶的诊断,这比活检和免疫组织化学 检测等传统方法早期诊断肿瘤并指导治疗的效果要好得多。其 次,直接光学分子成像根据活体 EGFR 的时空表达,至少可以 提供半定量的信息。标准化 EGFR 表达水平测量的机会,将会 适应改善的、循证的指导原则来评价和治疗口腔鳞状细胞癌。 特别是,当用传统细胞外对比剂成像检测时,肿瘤体积缩小通 常是对治疗有效的滞后性的反映,而此时应用针对 EGFR 对治 疗的反应进行无创的靶向成像可以早期预测治疗的有效性与 否^[24]。

本实验提出了一种论证 - 理念,即,非创光学成像通过量 化 EGFR 的表达,应用在评价三氧化二砷的治疗效果。三氧化 二砷抑制 EGFR 表达的机理可能是通过 EGFR -RAS- RAF -ERK1/2信号通路,激活 p21 基因,导致细胞死亡^[19,23]。然而, 肿瘤细胞 EGFR 表达与三氧化二砷疗效之间的线性关系至今 不清,需要进一步实验证实。尽管初步临床前实验研究证实近 红外成像的有效性,但要想将这一技术真正转化到临床,可能 需要将原形 EGF-Cy5.5 试剂进行修饰。选择 EGF 受体拮抗剂 作为成像探针的靶向结合物会更好一些,这是因为 EGFR 受体 拮抗剂可以避免激活 EGFR 下游信号通路^[25]。选择比荧光染料 Cy5.5 波长更长的红外荧光染料有望增强荧光的组织穿透性, 如果能获得有关药品管理机构的批准将有助于加快临床实验网。 此外,今后的实验应考虑采用更加适当的数学分析模型来分析 成像数据,兼顾组织的非特异性结合和对比剂递送效率(如血 流、血管渗透率、血管密度和静脉压等)来改善活体受体成像数 据分析的准确率[27]。

近年来大量研究认为, 三氧化二砷抗肿瘤的机制是通过多 靶点、多通路的联合作用。本实验研究应用 EGF-Cy5.5 结合近 红外分子成像技术, 在体外方面证实了三氧化二砷对口腔鳞状 细胞癌 A431 细胞的抑制作用, 并发现其作用机制可能与降低 EGFR 的表达有关, 但其具体机制及体内实验的验证还有待进 一步研究。

参考文献(References)

- Konkimalla VB, Suhas VL, Chandra NR, et al. Diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma [J]. Expert Rev Anticancer Ther, 2007, 7(3):317-329
- [2] Sarkis SA, Abdullah BH, Abdul Majeed BA, et al. Immunohis tochemical expression of epidermal growth factor receptor (EGFR) in oral squamous cell carcinoma in relation to proliferation, apoptosis, angiogenesis and lymphangiogenesis [J]. Head Neck Oncol, 2010, 2: 13-20

- [3] Rethman MP, Carpenter W, Cohen EE, et al. Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas [J]. J Am Dent Assoc, 2010, 141(5):509-520
- [4] Zhang XW, Yan XJ, Zhou ZR, et al. Arsenic trioxide controls the fate of the PML-RARalpha oncoprotein by directly binding PML [J]. Science, 2010, 328(5975):240-243
- [5] Cantor KP, Lubin JH. Arsenic, internal cancers, and issues in inference from studies of low-level exposures in human populations [J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2007, 222(3):252-257
- [6] Soignet SL, Maslak P, Wang ZG, et al. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide [J]. N Engl J Med, 1998, 339(19):1341-1348
- [7] Davison K, Mann KK, Waxman S, et al. JNK activation is a mediator of arsenic trioxide-induced apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells [J]. Blood, 2004, 103(9):3496-3502
- [8] Liu ZM, Tseng JT, Hong DY, et al. Suppression of TG-interacting factor sensitizes arsenic trioxide-induced apoptosis in human hepatocellular carcinoma cells [J]. Biochem J, 2011, 438(2):349-358
- [9] Vernhet L, Allain N, Payen L, et al. Resistance of human multidrug resistance-associated protein 1-overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide [J]. Biochem Pharmacol, 2001, 61 (11):1387-1391
- [10] Jhala DD, Chinoy NJ, Rao MV. Mitigating effects of some antidotes on fluoride and arsenic induced free radical toxicity in mice ovary [J]. Food Chem Toxicol, 2008, 46(3):1138-1142
- [11] Chen X, Zhang M, Liu LX. The overexpression of multidrug resistance-associated proteins and gankyrin contribute to arsenic trioxide resistance in liver and gastric cancer cells [J]. Oncol Rep, 2009, 22(1):73-80
- [12] Maeda H, Hori S, Nishitoh H, et al. Tumor growth inhibition by arsenic trioxide (As₂O₃) in the orthotopic metastasis model of androgen-independent prostate cancer [J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5432-5440
- [13] Yeh KY, Chang JW, Li YY, et al. Tumor growth inhibition of metastatic nasopharyngeal carcinoma cell lines by low dose of arsenic trioxide via alteration of cell cycle progression and induction of apoptosis [J]. Head Neck, 2011, 33(5):734-742
- [14] Tsai CW, Chang NW, Tsai RY, et al. Synergistic cytotoxic effects of arsenic trioxide plus dithiothreitol on mice oral cancer cells [J]. Anticancer Res, 2010, 30(9):3655-3660
- [15] Zhu J, Chen Z, Lallemand-Breitenbach V, et al. How acute promyelocytic leukaemia revived arsenic [J]. Nat Rev Cancer, 2002, 2 (9):705-713
- [16] Wang K, Wang K, Li W, et al. Characterizing breast cancer xenograft epidermal growth factor receptor expression by using near-infrared optical imaging [J]. Acta Radiol, 2009, 50(10):1095-1103
- [17] Chou YH, Woon PY, Huang WC, et al. Divalent lead cations induce cyclooxygenase-2 gene expression by epidermal growth factor receptor/nuclear factor-kappa B signaling in A431carcinoma cells [J]. Toxicol Lett, 2011, 203(2):147-153

- [12] Ciervide R, Dhage S, Guth A, et al. Five year outcome of 145 patients with ductal carcinoma in situ (DCIS) after accelerated breast radiotherapy[J]. Int J Radiat Oncol Biol Phys, 2012, 83(2): e159-e164
- [13] Scott HR, McMillan DC, Forrest LM, et al. The systemic inflammatory response, weight loss, performance status and survival in patients with inoperable non-small cell lung cancer[J]. Br J Cancel, 2002, 87(3):264-267
- [14] Keohavong P, Kahkonen B, Kinchington E, et al.K-ras mutations in lung tumors from NNK-treated mice with lipopolysaccharide-elicited lung inflammation[J].Anticancer Res.2011, 31(9):2877-2882
- [15] Le Tonquè ze O, Gschloessl B, Namanda-Vanderbeken A, et al. Chromosome wide analysis of CUGBP1 binding sites identifies the tetraspanin CD9 mRNA as a target for CUGBP1-mediated downregulation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2010, 394(4): 884-889
- [16] Wang JC, Bégin LR, Bérubé NG, et al. Down-regulation of CD9 expression during prostate carcinoma progression is associated with
- (上接第3409页)
- [18] Kumar P, Gao Q, Ning Y, et al. Arsenic trioxide enhances the therapeutic efficacy of radiation treatment of oral squamous carcinoma while protecting bone [J]. Molecular Cancer Therapeutics, 2008, 7(7):2060-2069
- [19] Huang HS, Liu ZM, Ding L, et al. Opposite effect of ERK1/2 and JNK on p53-independent p21WAF1/CIP1 activation involved in the arsenic trioxide-induced human epidermoid carcinoma A431 cellular cytotoxicity [J]. J Biomed Sci, 2006, 13(1):113-125
- [20] Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable [J]. Blood, 2008, 111(5):2505-2515
- [21] Bode AM, Dong Z. The paradox of arsenic: molecular mechanisms of cell transformation and chemotherapeutic effects [J]. Crit Rev Oncol Hematol, 2002, 42(1):5-24
- [22] Liu ZM, Huang HS. As2O3-induced c-Src/EGFR/ERK signaling is via Sp1 binding sites to stimulate p21WAF1/CIP1 expression in human epidermoid carcinoma A431 cells [J]. Cell Signal, 2006, 18 (2):244-255

CD9 mRNA modifications[J]. Clin Cancer Re, 2007, 13(8): 2354-2361

- [17] Kusukawa J, Ryu F, Kameyama T, et al. Reduced expression of CD9 in oral squamous cell carcinoma: CD9 expression inversely related to high prevalence of lymph node metastasis [J]. J Oral Pathol Med, 2001, 30(2): 73-79
- [18] Gandemer V, Rio AG, de Tayrac M, et al. Five distinct biological processes and 14 differentially expressed genes characterize TEL/ AML1-positive leukemia[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 385
- [19] Beisang D, Rattenbacher B, Vlasova-St Louis I, et al. Regulation of CUG-binding protein 1 (CUGBP1)binding to target transcripts upon T cell activation[J]. J Biol Chem, 2012, 287(2):950-960
- [20] Banerjee S, Manna S, Mukherjee S, et al. Black tea polyphenols restrict benzopyrene-induced mouse lung cancer progression through inhibition of Cox-2 and induction of caspase-3 expression [J]. Asian Pac J Cancer Prey, 2006, 7(4):661-666
- [23] Kumar P, Gao Q, Ning Y, et al. Tunel Arsenic trioxide enhances the therapeutic efficacy of radiation treatment of oral squamous carcinoma while protecting bone [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(7): 2060-2069
- [24] Oyen WJG, van der Graaf WTA. Molecular imaging of solid tumors: exploiting the potential [J]. Nat Rev Clin Oncol, 2009, 6(10):609-611
- [25] Adams KE, Ke S, Kwon S, et al. Comparison of visible and near-infrared wavelength-excitable fluorescent dyes for molecular imaging of cancer [J]. Journal of biomedical optics, 2007, 12 (2): 024017
- [26] Gleysteen JP, Newman JR, Chhieng D, et al. Fluorescent labeled anti-EGFR antibody for identification of regional and distant metastasis in a preclinical xenograft model [J]. Head Neck, 2008, 30 (6):782-789
- [27] Tichauer KM, Samkoe KS, Sexton KJ, et al. In vivo quantification of tumor receptor binding potential with dual-reporter molecular imaging [J]. Mol Imaging Biol, 2012, 14(5):584-592