亚砷酸钠对人胃癌细胞株 BGC-823 的作用机制

赵文韬[1]，王严庆[1]，汤为学[2]

Antitumor Mechanism of Sodium Arsenic on Human Gastric Carcinoma Cell Line BGC-823 in Vitro

ZHAO Wen-tao[1], WANG Yan-qing[1], TANG Wei-xue[2]

1. *Department of General Surgery, The First Affiliated Hospital of Chongqing University of Medical Science, Chongqing* 400016, *China*; 2. *Department of Pathophysiology, Chongqing University of Medical Science*

Abstract: Objective To investigate the antitumor mechanism of sodium arsenic on human gastric carcinoma cell line BGC-823 in vitro. **Methods** MTT assay, light microscopy, electron microscopy, flow cytometry, and immunocytochemical staining were used to detect the effect of sodium arsenic on biologic behavior of BGC-823 cells. **Results** Sodium arsenic inhibited the growth of BGC-823 cells in a time and concentration dependent fashion, its 50 % inhibitory concentration (IC_{50}) was 4.86μmol/L. BGC-823 cells were arrested significantly in G_2/M phase when treated with sodium arsenic. BGC-823 cells presented typical morphologic feature of apoptosis and necrosis after exposure to sodium arsenic. Sodium arsenic up-regulated Caspase-3 protein expression in BGC-823 cells. **Conclusion** Sodium arsenite could obviously inhibit the proliferation of BGC-823 cells: induce cell cycle arrest and apoptosis and necrosis of the cells. Its mechanism is possibly associated with inhibition of elimination of ROS, and the up-regulated expression of Caspase-3 protein.

Key words: Sodium arsenic; Stomach neoplasms; Apoptosis; Caspase-3

摘　要：**目的**　探讨亚砷酸钠对人胃癌细胞株 BGC-823 的作用机制。**方法**　采用 MTT 法、光镜、电镜、流式细胞仪检测和免疫细胞化学法研究亚砷酸钠对 BGC-823 细胞生物学行为的影响。**结果**　不同浓度的亚砷酸钠均可有效抑制 BGC-823 细胞生长，且具有浓度和时间依赖性，其中效浓度为 4.86μmol/L。流式细胞仪检测发现亚砷酸钠作用不同时间后，细胞均出现 G_2/M 期阻滞。形态学观察显示亚砷酸钠作用 72h 后，细胞出现典型的凋亡和坏死形态学改变。免疫细胞化学法发现亚砷酸钠能显著上调细胞 Caspase-3 蛋白的表达。**结论**　亚砷酸钠对 BGC-823 细胞的生长有明显的抑制作用，并可诱导细胞周期阻滞及细胞凋亡和坏死，其机制可能与其抑制 ROS 的清除，上调 Caspase-3 蛋白的表达有关。

关键词：亚砷酸钠；胃肿瘤；凋亡；Caspase-3

中图分类号：R329.25；R735.205.3；R979.1　**文献标识码**：A　**文章编号**：1000-8578(2006)05-0337-03

0　引言

近年来我国学者应用三氧化二砷(As_2O_3)作为抗肿瘤药物临床治疗急性早幼粒细胞白血病，得到了满意的疗效，表现出完全缓解率高，副作用小、无骨髓抑制等特点[1]。本实验以体外培养的人胃癌细胞株 BGC-823 为研究对象，观察亚砷酸钠对 BGC-823 细胞的生物学行为的影响，探讨其作用机制，以期为亚砷酸钠可能的临床应用提供实验依据。

收稿日期：2005-06-09；**修回日期**：2005-11-01

作者单位：1. 400016 重庆医科大学附属第一医院普外科；2. 重庆医科大学病理生理教研室

作者简介：赵文韬(1975-)，男，硕士，住院医师，主要从事临床外科研究

1　材料和方法

1.1　材料

人胃癌细胞株 BGC-823 为低分化腺癌细胞株，由重庆医科大学病理生理教研室提供。亚砷酸钠注射液(10ml:10mg(As_2O_3)及 90mg 氯化钠)购于哈尔滨伊达药业有限公司(生产批号:011230)；RPMI1640 购自 HyClone 公司；四甲基偶氮唑蓝(MTT)、RNA 酶(RNase)、碘化丙啶(PI)购自 Sigma 公司；鼠抗人 Caspase-3 单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品。流式细胞仪(型号:FACScan)为美国 BD 公司产品；透射电子显微镜为日本 Hitachi 公司产品。

1.2　细胞培养

人胃癌细胞株 BGC-823 用含 10 %小牛血清的 RPMI1640 培养液，于 37 ℃，5 %CO_2 培养箱中培

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

养。实验时选用对数生长期细胞。

1.3　MTT 法检测

将 BGC-823 细胞密度调整为 5.0 ×10^4/ml ,接种于 96 孔培养板中 ,每孔 200μl。实验设空白对照组、细胞对照组和实验组。实验组加亚砷酸钠 ,浓度分别为2.50、5.00、10.00、20.00、40.00μmol/L。空白对照加培养液 ,不加细胞。每组 5 个复孔。分别培养 24h、48h、72h 后 ,吸去培养液 ,每孔加入无血清的培养液 200μl 和 MTT(50mg/ml) 20μl ,继续培养 4h 后 ,吸去培养液 ,每孔加入二甲基亚砜 200μl ,用酶标仪测定 570mm 波长处吸光度(*A*)值。每组实验重复 3 次 ,取均值。参照文献[2] 计算细胞抑制率。细胞抑制率(%) = (1 - 实验组 *A* 值/细胞对照组 *A* 值) ×100 %,用直线回归法测定中效浓度 IC_{50} 值。

1.4　细胞周期分析

细胞以 5.0 ×10^4/ml 接种于 100ml 培养瓶中。加入 2.50μmol/L 的亚砷酸钠 ,分别培养 24h、48h、72h 后收集细胞 ,PBS 洗涤 3 次 ,70 %冰乙醇固定 ,PBS 洗涤 3 次 ,加入 20μg/ml 的 RNase 200μl 于 37 ℃水浴 30min ,加入 20μg/ml 碘化丙啶(PI) 1ml 于 4 ℃染色 30min。上机用 Modifit LT2.0 软件分析细胞周期分布。实验重复 3 次。

1.5　细胞形态观察

光镜观察:细胞以 5.0 ×10^4/ml 接种于预置盖玻片的 24 孔板中 ,每孔 2ml。加入 2.50μmol/L 的亚砷酸钠 ,培养 72h 后 , PBS 洗涤 3 次 ,95 %的乙醇室温固定 30min 后 ,再用 PBS 洗涤 3 次。取出盖玻片 ,加 1ml 瑞氏染液染色 10min 后 ,光镜下观察。

电镜观察:细胞以 5.0 ×10^4/ml 接种于 100ml 培养瓶中。加入 5.00μmol/L 的亚砷酸钠 ,培养 72h 后 ,胰酶消化 ,收集细胞 ,PBS 洗涤 3 次 ,4 %戊二醛固定细胞团块 2h 后 ,PBS 洗涤 3 次 ,1 %锇酸固定 1h ,丙酮梯度脱水 ,618 环氧树脂包埋 ,光镜定位 ,超薄切片 ,醋酸铀及枸橼酸铅染色后透射电镜观察。

1.6　免疫细胞化学染色

细胞以 5.0 ×10^4/ml 接种于预置盖玻片的 24 孔板中 ,每孔 2ml。加入 5.00μmol/L 的亚砷酸钠 ,培养 72h 后 , PBS 洗涤 3 次 ,95 %的乙醇室温固定 30min 后 ,再用 PBS 洗涤 3 次。取出盖玻片 ,常规 SP 法免疫化学染色 ,DAB 显色 ,苏木素复染 10 min 后光镜下观察。结果分析:排除爬片边缘细胞 ,10 ×10 低倍镜下随机选取 10 个细胞均匀分布的视野 ,10 ×20 中倍镜下每个视野随机选 50 个细胞。按着色强弱分为 4 个等级:无着色 0 分 ,淡黄色 1 分 ,棕黄色 2 分 ,棕褐色 3 分。按公式 HSCORE = ∑Pi (i + 1) (I = 0 ,1 ,2 ,3 ;Pi 表示评分为 i 的比例) 计算细胞 HSCORE 得分[3] 。

1.7　数据分析

采用 SPSS10.0 统计分析软件处理。采用单因素方差分析 ,直线回归分析。

2　结果

2.1　细胞形态观察

光镜下正常对照 BGC-823 细胞体积大 ,贴壁形态为不规则的多角形 ,核大深染 ,核仁明显。可见巨核细胞和多核细胞。亚砷酸钠作用后 ,细胞形态结构变得模糊 ,细胞膜通透性改变 ,细胞间有着色。部分细胞胞质浓缩 ,胞核聚集 ,部分细胞肿胀、碎裂 ,可见细胞碎片。

亚砷酸钠作用 BGC-823 细胞后 ,电镜下可见典型的细胞凋亡和坏死形态学改变。部分细胞坏死表现为细胞肿胀变大、变圆 ,微绒毛、内质网、线粒体等细胞器肿胀扩张;胞膜、核膜不完整;核溶解、碎裂。部分细胞凋亡表现为细胞皱缩 ,细胞密度增高 ,染色质聚集 ,成新月形 ,核固缩;细胞边缘胞质突起呈芽泡状 ,从细胞主体上脱离 ,有的含有染色质团块 ,形成典型的凋亡小体 ,见图 1。

2.2　免疫细胞化学检测

亚砷酸钠作用后的 BGC-823 细胞 Caspase-3 蛋白的表达较对照组细胞明显增加 ,对照组和亚砷酸钠组细胞 Caspase-3 蛋白表达的 HSCORE 得分分别为2.210 ±0.033、2.794 ±0.056 ,差异有显著性($P < 0.01$) ,见图 2。

2.3　MTT 分析

不同浓度的亚砷酸钠作用不同时间对 BGC-823 细胞的抑制效应 ,见图 3 ,由图可见亚砷酸钠对 BGC-823 细胞有明显的抑制作用 ,且呈浓度和时间依赖性。细胞抑制率随药物浓度的升高和作用时间的延长而提高 ,差异均有显著性($P < 0.01$)。亚砷酸钠作用 BGC-823 细胞 72h 的 IC_{50} 为4.86μmol/L。

表 1　亚砷酸钠对 BGC-823 细胞周期分布的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

时间	对照			亚砷酸钠		
	G_0/G_1	S	G_2/M	G_0/G_1	S	G_2/M
24h	54.39 ±2.14	34.53 ±1.58	11.08 ±1.17	58.80 ±2.24	28.40 ±1.48	12.79 ±0.87
48h	60.53 ±1.79	29.48 ±1.57	9.99 ±0.47 *	59.33 ±1.98	28.35 ±1.74	12.32 ±0.59 **
72h	65.84 ±2.41	26.79 ±1.48	7.37 ±0.32 *	55.09 ±1.79	32.76 ±1.57	12.14 ±0.72 **

注: *、** 之间差异有显著性($P < 0.05$)。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

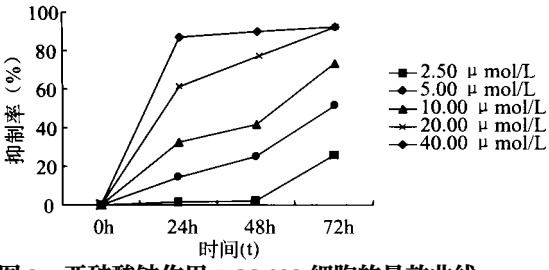

图 3 亚砷酸钠作用 BGC-823 细胞的量效曲线

2.4 细胞周期分析

亚砷酸钠作用不同时间后，BGC-823 细胞的细胞周期分布，见表 1，由表可见亚砷酸钠作用不同时间后细胞均出现 G_2/M 期阻滞，即表现为 G_2/M 期细胞比例逐渐增高，以 72h 时 G_2/M 期阻滞最明显（$P<0.05$）

3 讨论

本实验 MTT 法结果显示不同浓度的亚砷酸钠（2.50～40.00μmol/L）均可有效抑制 BGC-823 细胞的生长，且呈时间、浓度依赖性。Chen 等[4] 报道（As_2O_3）治疗急性早幼粒细胞白血病（APL）患者临床血药浓度为 0.5～3.0μmol/L，峰浓度为 4.2～6.7 μmol/L，亚砷酸钠作用 BGC-823 细胞 72h 的 IC_{50} 为 4.86μmol/L，与上述临床浓度相近。推测临床用于治疗 APL 所使用的浓度，可能对胃癌的治疗有效。

本实验流式细胞仪检测结果显示，亚砷酸钠作用 BGC-823 细胞后，细胞周期被阻滞于 G_2/M 期。提示亚砷酸钠可通过使细胞阻滞于 G_2/M 期改变细胞周期进程，减少细胞分裂，抑制细胞生长或诱导细胞凋亡。研究表明由于使用的细胞种类或药物浓度不同，As_2O_3 对细胞周期的影响也不完全相同。As_2O_3 可使不同种类细胞阻滞于 G_1、S 或 G_2/M 期。而 As_2O_3 是如何参与以细胞周期素（cyclin）-细胞周期依赖性蛋白激酶（CDK）为核心的细胞周期调控机制，阻滞细胞周期进程还有待进一步研究阐明。

近来研究显示砷剂抗肿瘤的机制与其抑制活性氧（reactive oxygen species，ROS）的清除有关。很多证据表明 ROS 的升高可能作为第二信使通过促进线粒体通透性转运孔的开放，上调促凋亡蛋白 bax 的表达，激活 Caspase 等作用诱导细胞凋亡。ROS 的清除主要依赖于谷胱甘肽还原系统。而砷剂作用的生化基础就在于与谷胱甘肽还原系统化合物的巯基结合，抑制巯基酶的活性，抑制 ROS 的清除[5]。同一种信号作用于细胞会因信号的强度、细胞的种类不同有不同的反应，或凋亡、或耐受、或坏死[6,7]。目前大多数研究证明，这种效应的强度和细胞型别依赖性与 ROS 有关。细胞固有 ROS 水平不同或产生的 ROS 的量可不同，不同水平的 ROS 通过影响 Caspase 激活、活性及 ATP 水平决定细胞命运，细胞可出现不同的死亡方式，低的发生凋亡，高的发生坏死[8]。本实验光镜、电镜下形态学观察显示亚砷酸钠不仅能诱导 BGC-823 细胞凋亡，也能促使 BGC-823 细胞坏死，提示亚砷酸钠可能通过抑制 BGC-823 细胞 ROS 的清除，使 ROS 含量增加，由于细胞个体异质性，ROS 水平不同，细胞出现不同的死亡方式。本实验免疫细胞化学检测显示亚砷酸钠可上调 BGC-823 细胞 Caspase-3 蛋白的表达。Caspase-3 蛋白是凋亡信号传导途径中外源性和内源性途径的共同的效应 Caspase 蛋白，是凋亡最重要的执行分子[9]。Caspase-3 蛋白表达的增加可能与细胞的凋亡、坏死过程有关，但 Caspase-3 蛋白表达的上调是否与 ROS 增加有关，还有待进一步的实验研究。

（本文图 1、2 见封 3）

参考文献：

[1] 张鹏，王树叶，胡龙虎，等. 三氧化二砷注射治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液杂志，1996，17(2)：58-60.

[2] 沈宜，汤为学，段红，等. 中效原理在顺铂、足叶乙甙对人肺癌细胞株（PAa）相互作用中的应用[J]. 重庆医科大学学报，2000，25(2)：118-120.

[3] Harrington DJ，lessey BA，Rai V，et al. Tenascin is differentially expressed in endometrium and endometriosis[J]. J pathol，1999，187(2)：242-48.

[4] Chen GQ，Zhe J，Shi XG，et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia：As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML protein[J]. Blood，1996，88(3)：1052-1061.

[5] Yang CH，Kuo ML，Chen JC，et al. Arsenic trioxide senisitivity is associated with low level of glutathione in cancer[J]. Br J Cancer，1999，81(5)：796-799.

[6] Samali A，Nordgren H，Orrenius S，et al. A comparative study of apoptosis and necrosis in HepG2 cell：oxidant-induced caspase inactivation leads to necrosis[J]. Biochem Biophys Res Commun，1999，255(1)：6-11.

[7] Lemasters JJ，Nieminen AL，Qian T，et al. The mitochondrial permeability transition in cell death：a common mechanism in necrosis，apoptosis and autophage[J]. Biochim Biophys Acta，1998，1366(1-2)：177-196.

[8] Susin SA，Zamzami N，Kroemer G. Mitochondria as a regulators of apoptosis：doubt no more[J]. Biochim Biophys Acta，1998，1366(1-2)：151-165.

[9] Cryns V，Yuan J. Proteases to die for[J]. Genes Dev，1998，12(11)：1551-1570.

[编辑：安 凤]

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

吡格列酮对胃癌细胞生长的影响及其机制

（正文见334页）

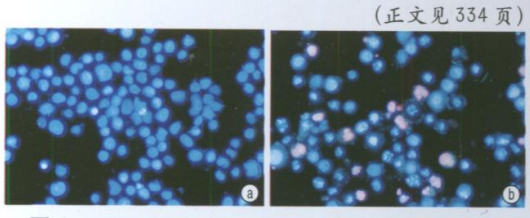

图4 Hoechst33342/PI双染色荧光显微镜观察吡格列酮处理组MGC803细胞72h前后的变化（×400）
a.MGC803对照组；b.吡格列酮20μmol/L实验组

人突变p27基因对大肠癌细胞凋亡的影响

（正文见343页）

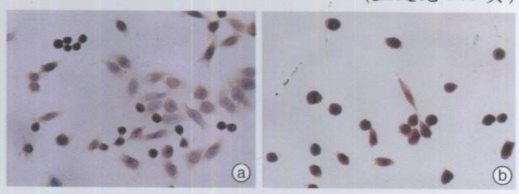

图4 TUNEL法检测细胞的凋亡
a.空白对照组；b.Ad-p27m组（×400）

HIF-1α反义寡核苷酸增强胃癌细胞对顺铂的敏感性

（正文见340页）

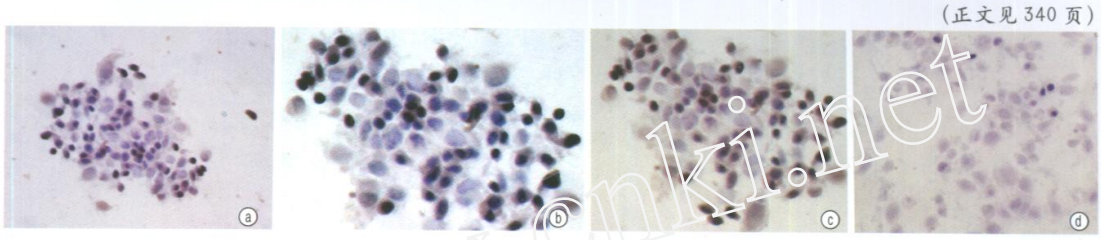

图2 HIF-1α ASODN转染对SGC-7901 HIF-1α蛋白表达的影响
a、b、c、d分别为空白对照组，脂质体对照，正义对照组和反义组HIF-1α在胞浆和胞核表达（SP × 200）

亚砷酸钠对人胃癌细胞株BGC-823的作用机制

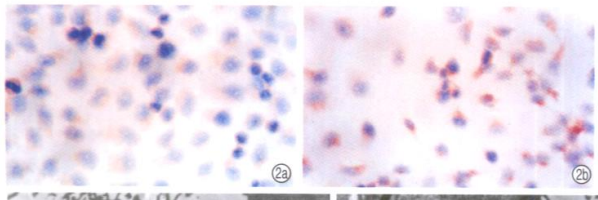

图2 亚砷酸钠作用72h后，BGC-823细胞中caspase-3蛋白的表达（SP×400）
a.对照组
b.亚砷酸钠作用72h组

（正文见337页）

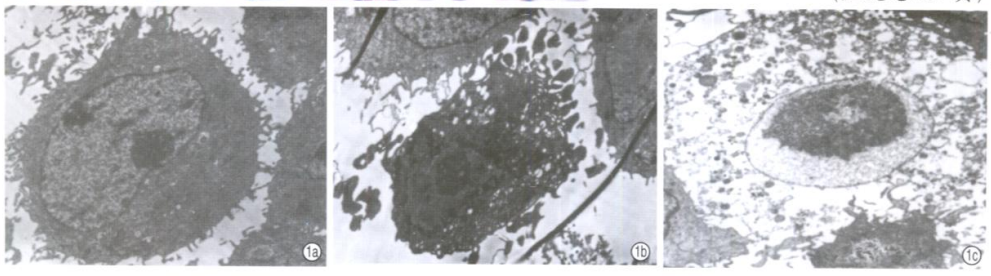

图1 亚砷酸钠作用72h后，电镜下BGC-823细胞形态学的变化
a.对照BGC-823细胞核浆比大，核仁明显，表面有较多的微绒毛，细胞分化程度低（× 6000）
b.亚砷酸钠作用后，BGC-823细胞发生凋亡，形成凋亡细胞和凋亡小体（× 6000）
c.亚砷酸钠作用后，BGC-823细胞重度肿胀，膜、核膜不完整，核浓缩、溶解（× 5000）

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net