论著

文章编号:1000-5404(2007)01-0062-03

三氧化二砷诱导人卵巢癌细胞凋亡对端粒酶活性的影响

宁 燕,米 粲 (重庆医科大学基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨 As_2O_3 诱导细胞凋亡时对其端粒酶活性的影响及其作用机制。**方法** 采用光镜、电镜,PCR-ELISA,RT-PCR 等技术,检测细胞凋亡,端粒酶活性及其催化亚单位的表达。**结果** As_2O_3 可诱导卵巢癌细胞凋亡,但存在作用浓度,细胞株类型差异性;端粒酶活性随药物作用时间和浓度的增加而明显减弱,同时伴随 hTERT mRNA 表达水平的下降。**结论** 端粒酶活性和 hTERT mRNA 表达在 As_2O_3 诱导 $SKOV_3$、3AO 细胞凋亡过程中共同发挥作用,两者有密切关系,是诱导细胞凋亡的分子机制之一。

关键词: 三氧化二砷;人卵巢癌细胞;细胞凋亡;端粒酶活性

中图法分类号: R73-354;R737.31;R979.19 **文献标识码:** A

Effect of human ovarian cancer cell apoptosis induced by arsenic trioxide on telomerase activity

NING Yan, MI Can (Department of Pathology, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: **Objective** To investicate the effect of apoptosis of human ovarian cancer cell line $SKOV_3$ and 3AO exposed to arsenic trioxide on telomerase activity and its mechanisms. **Methods** The human ovarian cancer cell line SKOV3 and 3OA were treated with arsenic trioxide of different concentration for 12, 24, 72 h. Cell morphology, PCR-ELISA, RT-PCR were adopted to detect the cell apoptosis and telomerase activity and the expression of human telomerase catalytic subunit (hTERT). **Results** Arsenic trixide could induce apoptisis of ovarian cancer cell lines, but there exists difference in drug concentration, type of cell line. A dose and time-dependent decline of telomerase activity after $SKOV_3$ and 3AO cells exposed to arsenic trixide, meanwhile hTERT mRNA was down-regulated. **Conclusion** Telomerase activity and hTERT mRNA expression have close relationship and play an important role in arsenic trioxide inducing $SKOV_3$ and 3AO cells apoptosis.

Key words: arsenic trioxide; human ovarian cancer cell line; apoptosis; telomerase activity

近年的研究表明,端粒酶的激活与恶性肿瘤细胞的形成和发展密切相关[1]。1995 年,Sharma 等[2]首次报道白血病细胞的诱导分化与其端粒酶活性调节之间存在密切联系。细胞凋亡与端粒酶活性之间是否存在某种联系,迄今少见报道。近年,As_2O_3 对白血病的作用已引起广泛关注,而且其在实体瘤方面的作用也逐渐引起人们的广泛兴趣,该药通过诱导实体瘤细胞凋亡发挥其治疗作用。我们通过 As_2O_3 作用人卵巢癌细胞对端粒酶活性及其催化亚单位(human telomerase catalytic subunit, hTERT)的检测,探讨 As_2O_3 诱导细胞凋亡时对其端粒酶活性的影响及其作用机制。

作者简介:宁 燕(1972-),女,重庆市人,博士,主治医师,主要从事妇产科肿瘤方面的研究,现在复旦大学附属妇产科医院病理科。电话:(021)63455050

通讯作者:米 粲,电话:(023)68485789

收稿日期:2006-01-06;修回日期:2006-03-06

1 材料与方法

1.1 试剂

As_2O_3(Sigma 公司):10 mg 溶于生理盐水配成 1 mmol/L 母液,-20 ℃储存,临用前用完全培养基稀释成所需浓度。

1.2 细胞培养

人卵巢浆液性乳头状囊腺癌 $SKOV_3$ 细胞,人卵巢黏液性囊腺癌 3AO 细胞购自中科院上海细胞生物学研究所。$SKVO_3$、3AO 细胞常规培养在含 10% 新生小牛血清的 RPMI1640 培养基中,0.1% 胰酶消化传代。

1.3 凋亡细胞的形态学观察

1.3.1 光镜观察 每瓶接种 1×10^5/ml 细胞悬液,分为用药组和对照组,用药组细胞用 2、10 μmol/L As_2O_3 处理;于处理 12、24、72 h 后用倒置显微镜观察用药组和对照组细胞的形态变化;接种于盖玻片上的细胞进行相同的处理,经瑞氏染色后观察。

1.3.2 电镜观察 取对数生长期细胞,以 1×10^6/ml 细胞悬液接种于 100 ml 培养瓶中,孵育 24 h 后,弃培养液,加含 As_2O_3

的完全培养液，使 $SKOV_3$ 细胞培养液中 As_2O_3 的终浓度为 2 μmol/L，3AO 细胞为 10 μmol/L；处理 72 h 后收集细胞，按常规电镜样品制备程序切片，透射电镜观察。

1.4　端粒酶活性的检测

端粒酶 PCR-ELISA 试剂盒购自 Roche 公司，按说明书进行操作，制备细胞提取物，端粒重复序列扩增（TRAP 反应）及 ELISA 检测，酶免疫检测仪测定各孔 450 nm 波长的吸光度值 [D(450)]。

1.5　RT-PCR 检测 hTERT mRNA 表达

引物序列及来源：hTERT 引物序列如下，由上海博亚生物公司合成。hTERT（上游）5′-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3′（下游）5′-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3′（147 bp）；β-actin（上游）5′-ACACTGTGCCCATCTACGAGG-3′；（下游）5′-AGGGGCCGGACTCGTCATACT-3′（621 bp）。半定量 RT-PCR：按照 Promego 公司提供的 Trizol 试剂盒说明提取 RNA；行逆转录合成 cDNA。取 cDNA 产物按下列条件进行 PCR：①94 ℃，5 min；②94 ℃，45 s；55 ℃，1 min；72 ℃，1.5 min；③72 ℃，7 min。PCR 扩增产物在 1.5% 琼脂糖凝胶行电泳，紫外灯下观察结果。用 Bio-Rad 公司图像分析仪成像并进行定量分析。mRNA 相对含量 = 目的基因条带累加吸光度值/β-actin 条带累加吸光度值。

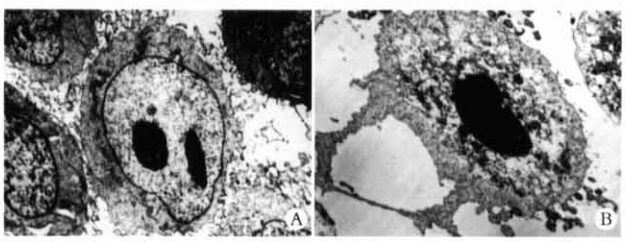
1.6　统计学分析

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用统计软件 SPSS 10.0 进行单因素方差分析。

2　结果

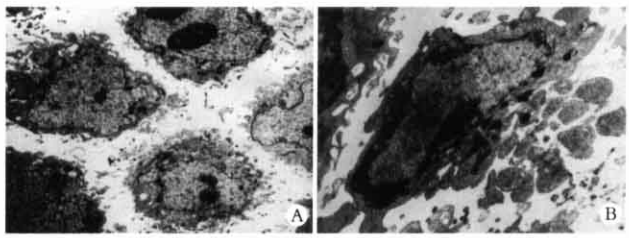
2.1　形态学观察

$SKOV_3$ 细胞经 2 μmol/L As_2O_3 作用 12 h 时可见大多数细胞变小变圆，细胞贴壁力明显下降，部分细胞脱落，悬浮生长，至 72 h 约 70% 细胞脱落，漂浮于培养基中，细胞集落明显下降，呈单个生长状态，排列稀疏，细胞变小变圆；对照组细胞排列紧密，呈多角形生长；3AO 细胞经 2 μmol/L As_2O_3 作用 72 h 后，少数细胞变小变圆，大多数仍呈多角形生长，细胞贴壁力和集落性未见明显变化；10 μmol/L As_2O_3 作用 24 h，细胞变化不明显，至 72 h 细胞变小变圆，部分细胞脱落悬浮生长，细胞集落性和贴壁力下降，但细胞仍呈集落性生长；对照组细胞呈多角形，簇状分布。超微结构变化：As_2O_3 处理 $SKOV_3$、3AO 细胞 72 h 后，均可见凋亡细胞，其形态学特征表现为细胞表面微绒毛明显减少，核浓缩或染色质凝集成块、边集，可见凋亡小体的形态，但细胞膜，核膜形态均完整。对照组 $SKOV_3$、3AO 细胞表面微绒毛丰富，核不规则，核质比例大（图 1，2）。



A：对照组 72 h $SKOV_3$ 细胞；B：As_2O_3 处理组 72 h $SKOV_3$ 细胞

图 1　$SKOV_3$ 细胞经 As_2O_3 处理前后超微结构变化　（TEM ×5 000）



A：对照组 72 h 3AO 细胞（TEM ×4 000）；B：As_2O_3 处理组 72 h 3AO 细胞（TEM ×8 000）

图 2　3AO 细胞经 As_2O_3 处理前后超微结构变化

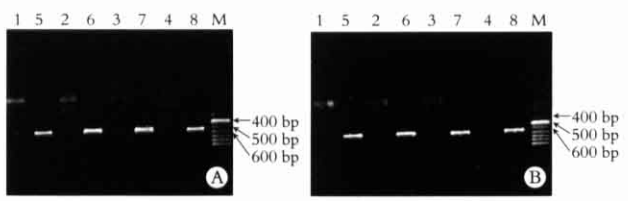
2.2　As_2O_3 作用 $SKOV_3$、3AO 细胞后对其端粒酶活性的影响

2 μmol/L As_2O_3 作用 $SKOV_3$ 细胞 12、24、72 h，端粒酶活性随作用时间延长呈逐渐下降趋势［分别为（1.550 ± 0.134）、（1.440 ± 0.031）、（0.930 ± 0.10）］，且均较对照组（1.943 ± 0.289）有显著性差异（$P < 0.05$）。分别用 2、5、10 μmol/L As_2O_3 作用 $SKOV_3$ 72 h，观察到端粒酶活性分别为 1.057、0、0，而对照组为 2.227，显示端粒酶活性明显下降。说明 As_2O_3 对 $SKOV_3$ 细胞端粒酶活性的影响存在浓度－时间依赖关系。

10 μmol/L As_2O_3 作用 3AO 细胞 12、24、72 h，端粒酶活性分别为（1.365 ± 0.287）、（1.266 ± 0.217）、（0.920 ± 0.222），与对照组（1.548 ± 0.117）比较，12、24 h 无显著性差异（$P > 0.05$），作用 72 h 有显著性差异（$P < 0.05$）。分别用 5、10、20 μmol/L As_2O_3 作用 3AO 细胞 72 h，其端粒酶活性分别为（1.401 ± 0.135）、（0.855 ± 0.057）、（0.351 ± 0.214）；与对照组（1.415 ± 0.275）比较，5 μmol/L As_2O_3 作用 3AO 细胞 72 h，端粒酶未见明显变化（$P > 0.05$），10、20 μmol/L As_2O_3 对 3AO 端粒酶活性均有明显抑制作用（$P < 0.05$）。

2.3　As_2O_3 对 $SKOV_3$、3AO 细胞 hTERT mRNA 表达的影响

2 μmol/L As_2O_3 处理 $SKOV_3$ 不同时间（12、24、72 h），其 hTERT mRNA 相对含量分别为 0.197、0.196、0.062；对照组为 0.236（图 3）。As_2O_3 逐渐降低了 $SKOV_3$ 细胞 hTERT mRNA 表达的水平。10 μmol/L As_2O_3 处理 3AO 细胞不同时间（12、24、72 h），其 hTERT mRNA 相对含量分别为 0.297、0.116、0；对照组为 0.365（图 3）。10 μmol/L As_2O_3 降低了 3AO 细胞 hTERT mRNA 表达的水平。



A：$SKOV_3$ 细胞；B：3AO 细胞

M：标准；1－4：hTERT mRNA 表达；1：0 h，2：12 h，3：24 h，4：72 h；5－8：β-actin mRNA 表达；5：0 h，6：12 h，7：24 h，8：72 h

图 3　hTERT mRNA 在 $SKOV_3$，3AO 细胞中的表达

3 讨论

诱导肿瘤细胞凋亡已成为近年来肿瘤治疗上的重要策略[3,4]。砷剂促进细胞凋亡可能在其抗实体瘤的作用中占重要地位。本课题对 As_2O_3 作用不同卵巢癌细胞株的研究结果显示，As_2O_3 可诱导卵巢癌细胞凋亡，但存在作用浓度，细胞株类型差异性。本组实验中 $SKOV_3$ 为卵巢浆液性乳头状囊腺癌细胞株，3AO 为卵巢黏液性囊腺癌细胞株，病理类型不同对 As_2O_3 的反应亦不同，研究表明前者为 As_2O_3 高敏感细胞株，后者为低敏感细胞株。表明 As_2O_3 对卵巢癌细胞株凋亡的诱导可能在浓度，细胞株类型及凋亡调控机制方面存在特异性。

As_2O_3 体外实验所使用的剂量，直接关系到今后临床应用价值。Chen 等[5]报道 As_2O_3 治疗 APL 患者临床剂量血药浓度多为 0.5～3.0 μmol/L，峰浓度为 4.2～6.7 μmol/L。我们实验中 As_2O_3 2 μmol/L 即可诱导 $SKOV_3$ 出现典型的凋亡特征——细胞增殖抑制，此剂量与上述临床剂量一致，故推测人体治疗 APL 的 As_2O_3 使用剂量可能对卵巢浆液性乳头状囊腺癌有效；对 3AO 细胞，只有 10 μmol/L As_2O_3 才能诱导凋亡的出现，其诱导 3AO 细胞凋亡剂量同 APL 的诱导剂量不同，故对于卵巢粘液性囊腺癌，可能需要寻找更合适的使用剂量。

端粒酶是一种 RNA 依赖性核酸蛋白复合体，参与合成端粒 DNA 重复序列(TTAGGG)，端粒酶的激活是细胞阻止端粒重复序列的缩短并获得永生化的主要途径[6]。在许多恶性肿瘤中显示有端粒酶活性，对卵巢上皮性恶性肿瘤，约 80% 可检测到端粒酶活性的表达，而良性卵巢肿瘤和正常卵巢上皮却检测不到其表达，提示端粒酶在肿瘤细胞恶性状态的发生和发展中，可能起关键性作用，而端粒酶活性可能是恶性肿瘤细胞的一种标志[7-9]。我们的研究结果显示，As_2O_3 在诱发 $SKOV_3$、3AO 细胞凋亡的过程中，端粒酶活性不断下降；不同浓度 As_2O_3 作用 $SKOV_3$、3AO 细胞，其端粒酶活性随作用浓度的升高呈不断下降趋势，5、10 μmol/L As_2O_3 作用 $SKOV_3$ 72 h 时，其端粒酶活性已基本变为阴性，提示 As_2O_3 诱导细胞凋亡与端粒酶活性的下降密切相关，抑制端粒酶活性表达可能是 As_2O_3 诱导细胞凋亡的分子机制之一。

1997 年，人类端粒酶催化亚单位 hTERT 被克隆出来，证实 hTERT 在端粒酶活性高的肿瘤细胞中有高表达，而无端粒酶活性的肿瘤细胞中表达很低，在无端粒酶活性表达的正常人细胞中导入外源性 hTERT 基因，即可重建端粒酶活性的表达及延长细胞的生存，提示 hTERT 的表达是端粒酶活性调节的一个限速步骤[10,11]。研究表明 hTERT mRNA 表达与端粒酶活性在许多上皮性恶性肿瘤中存在显著相关性，卵巢恶性肿瘤中，80% 的肿瘤示两者呈显著正相关[10,12,13]。我们的研究结果表明，在不同作用时间，As_2O_3 逐渐降低了 $SKOV_3$、3AO 细胞中 hTERT mRNA 表达的水平，这与端粒酶活性的下调变化相一致，提示端粒酶活性与 hTERT mRNA 表达在 As_2O_3 诱导 $SKOV_3$、3AO 细胞凋亡过程中共同发挥作用，两者有密切关系，至于是否由于 hTERT 基因的下降才导致端粒酶活性的下调，有待于进一步探讨。

参考文献：

[1] Dahse R, Fiedler W, Ernst G. Telomeres and telomerase: biological and clinical importance[J]. Clin Chem, 1997, 43(5): 708-714.

[2] Sharma H W, Sokoloski J A, Perez J R, *et al.* Differentiation of immortal cells inhibits telomerase activity[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 1995, 92(26): 12343-12346.

[3] 方福德，杨焕明，张德昌，等. 分子生物学前沿技术[M]. 北京：北京医科大学、中国协和医科大学联合出版社，1998：124-146.

[4] Cai X, Yu Y, Huang Y, *et al.* Arsenic trioxide-induced mitotic arrest and apoptosis in acute promyelocytic leukemia cells[J]. Leukemia, 2003, 17(7): 1333-1337.

[5] Chen G Q, Zhu J, Shi X G, *et al.* *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) 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 proteins[J]. Blood, 1996, 88(3): 1052-1061.

[6] Hahn W C, Stewart S A, Brooks M W, *et al.* Inhibition of telomerase limits the growth of human cancer cells[J]. Nat Med, 1999, 5(10): 1164-1170.

[7] Kyo S, Kanaya T, Takakura M, *et al.* Expression of human telomerase subunits in ovarian malignant, borderline and benign tumors[J]. Int J Cancer, 1999, 80(6): 804-809.

[8] Oishi T, Kigawa J, Minagawa Y, *et al.* Alteration of telomerase activity associated with development and extension of epithelial ovarian cancer[J]. Obstet Gynecol, 1998, 91(4): 568-571.

[9] Kyo S, Takakura M, Tanaka M, *et al.* Quantitative differences in telomerase activity among malignant, premalignant and benign ovarian lesions[J]. Clin Cancer Res, 1998, 4(2): 399-405.

[10] Meyerson M, Counter C M, Eaton E N, *et al.* $hEST_2$, the putative human telomerase catalytic subunit gene, is up-regulated in tumor cells and during immortalization[J]. Cell, 1997, 90(4): 785-795.

[11] Nakamura T M, Morin G B, Chapman K B, *et al.* Telomerase catalytic subunit homologs from fission yeast and human[J]. Science, 1997, 277(5328): 955-959.

[12] Lehner R, Enomoto T, Mcgregor J A, *et al.* Quantitative analysis of telomerase hTERT mRNA and telomerase activity in endometrioid adenocarcinoma and in normal endometrium[J]. Gynecol Oncol, 2002, 84(1): 120-125.

[13] Braunstein I, Cohen-Barak O, Shachaf C, *et al.* Human telomerase reverse transcriptase promoter regulation in normal and malignant human ovarian epithelial cells[J]. Cancer Res, 2001, 61(14): 5529-5536.

（编辑 张大春）