文章编号:1000-5404(2007)17-1677-05

论著

As_2O_3诱导人肾癌786-0细胞凋亡及其分子机制的研究

王德林[1],米 粲[2],陈在贤[1],吴小候[1],苟 欣[1],彭 波[1],姜萃萍[1] (重庆医科大学:[1]附属第一医院泌尿外科,[2]基础医学院病理学教研室,重庆 400016)

提 要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)诱导786-0细胞凋亡的作用及其分子机制。**方法** 用FCM和TUNEL等方法观察As_2O_3诱导786-0细胞凋亡,以ICC、RT-PCR、ISH、Western blot和EMSA技术等检测凋亡相关基因p53、bcl-2、c-myc、c-fos、NF-κB p65的mRNA和蛋白表达及NF-κB DNA结合活性的改变。**结果** 2 μmol/L以上浓度As_2O_3作用786-0细胞24 h后开始发生细胞凋亡,出现凋亡的形态学改变和特征性亚二倍体峰(凋亡峰),使786-0细胞内p53活性升高($P<0.05$),而bcl-2、c-myc、c-fos和NF-κB p65基因表达降低($P<0.05$),NF-κB DNA结合活性也被显著抑制($P<0.01$)。**结论** As_2O_3可能通过降低NF-κB p65基因表达和NF-κB DNA结合活性,下调bcl-2、c-myc和c-fos基因表达,而增加p53基因的表达,诱导人肾癌786-0细胞凋亡。

关键词:As_2O_3;肾癌;786-0细胞;凋亡
中图法分类号:R73-361;R737.11;R914.3 **文献标识码**:A

Arsenic trioxide induces apoptosis of human renal cell carcinoma 786-0 cells

WANG De-lin[1], MI Can[2], CHEN Zai-xian[1], WU Xiao-hou[1], GOU Xin[1], PENG Bo[1], JIANG Cui-ping[1] ([1]Department of Urinary Surgery, the First Affiliated Hospital, [2]Department of Pathology, College of Basic Medical Sciences, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China)

Abstract: Objective To explore the onset and mechanisms of apoptosis in 786-0 cells treated with As_2O_3. **Methods** The onset of apoptosis in 786-0 cells was investigated by FCM and TUNEL, and the changes of apoptosis related genes, such as p53, bcl-2, c-myc, c-fos, NF-κB p65, and NF-κB DNA binding activity were analyzed by ICC, RT-PCR, ISH, Western blot and EMSA. **Results** The characteristic apoptotic morphological changes were evaluated after treated with ≥2 μmol/L As_2O_3, and FCM revealed that 2 μmol/L As_2O_3 could induce a sub-G_1 peak in 786-0 cells after 24-hour treatment. The expression of p53 gene was up-regulated ($P<0.05$), while bcl-2, c-myc, c-fos, and NF-κB p65 were down-regulated ($P<0.05$). NF-κB DNA binding activity was significantly inhibited ($P<0.01$). **Conclusion** As_2O_3 can obviously induce the apoptosis of 786-0. Its mechanisms are supposed to down-regulate the expression of bcl-2, c-myc and c-fos genes, and up-regulate the expression of p53 gene through inhibiting NF-κB signaling.

Key words: arsenic trioxide; renal cell carcinoma; 786-0 cells; apoptosis

细胞有增殖、分化和凋亡3方面的特征,三者相互协调,共同调节,其中细胞凋亡对细胞衰老与更新、保持细胞数目的相对恒定方面起重要作用。肿瘤不仅存在增殖与分化的异常,同时也有凋亡的异常。肿瘤的发生、发展与肿瘤细胞增殖失控和细胞凋亡减少有关,抑制肿瘤细胞增殖和诱导肿瘤细胞凋亡是化学药物治疗肿瘤最重要的机制之一[1]。As_2O_3具有诱导人肾癌786-0细胞凋亡的作用[2],其机制需要进一步阐明。本实验采用流式细胞术(flow cytometric assay, FCM)、TUNEL和DNA片段琼脂糖凝胶电泳,观察As_2O_3处理后786-0细胞发生凋亡的情况,以免疫细胞化学(immunocytochemistry, ICC)和蛋白质印迹杂交(Western blot)检测As_2O_3处理后786-0细胞中bcl-2、

基金项目:国家人事部科技活动项目择优经费项目(2005-12);重庆市自然科学基金(2005BB5033)
Supported by the Project for Sci & Tech Activity of Personnel Department of China (2005-12) and the Natural Science Foundation of Chongqing (2005BB5033)

作者简介:王德林(1968-),男,四川省广安市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事泌尿男生殖系统肿瘤的基础与临床和老年男子部分雄激素缺乏方面的研究,发表论文30篇。电话:(023)89011117,E-mail:dlwangws@sina.com

收稿日期:2006-10-08;修回日期:2007-01-28

c-myc、c-fos、p53 和 NF-κB p65 基因蛋白表达的变化，以逆转录多聚酶链反应（reverse transcription polymerase Chain reaction，RT-PCR）、原位杂交技术（*in situ* hybridization，ISH）、和凝胶电泳迁移率实验（electrophoretic mobility shify assay，EMSA）分析 As_2O_3 处理后 786-0 细胞中 bcl-2、c-myc、c-fos 、NF-κB p65 mRNA 表达的改变以及 NF-κB DNA 结合活性的变化，进一步阐明 As_2O_3 诱导 786-0 细胞凋亡的作用及其可能的分子机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养

参照文献[2]的方法。786-0 细胞生长于含 10% FCS 的 RPMI1640 培养基（Gibco/BRL 公司）中，在 37 ℃、5% CO_2、饱和湿度条件下常规培养。每周传代 1～2 次，收集对数生长期细胞进行实验。以灭菌 PBS 将 As_2O_3（Sigma 公司）配成 1 mmol/L 的储备液，使用时以 RPMI1640 培养基稀释至 1、2、5 μmol/L。

1.2 细胞凋亡的检查

1.2.1 流式细胞术 2.5×10^4/ml 786-0 细胞密度悬液接种培养，2、5 μmol/L As_2O_3 作用 24、48、72 h，收集细胞总数约 1×10^6，加入 -20 ℃预冷的 70% 乙醇 1.5 ml 固定细胞，4 ℃保存。检测时，加入等体积的 PI 染液，4 ℃放置 30 min，再放入 FCM 仪（美国 FACScan Becton Dickinson）的样品室，选取 488 nm 激发波长测定，在分析细胞凋亡率时用 LYSIS/Modfit LT2.0 软件分析亚二倍峰（亚 G_1 峰）的分布面积即为凋亡率。

1.2.2 TUNEL 技术 按照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒（美国 Roche 公司）说明进行操作：常规细胞爬片并用 2 μmol/L As_2O_3 处理培养 24、48、72 h 后终止，用 4% 多聚甲醛室温固定 30 min，以 3% H_2O_2 甲醇溶液封闭内源性过氧化物酶。再用细胞通透液（0.3% TritonX-100）室温孵育 30 min。滴加 TUNEL 混合反应液 50 μl（酶溶液与标记溶液按照 1∶9 体积混合），37 ℃孵育 60 min，同时以标记溶液代替反应溶液作为阴性对照。滴加 POD 液 50 μl，37 ℃孵育 30 min。最后滴加新鲜配制的 DAB 显色液 50 μl 显色。

1.3 ICC 检测

按照文献[2]将经过 2 μmol/L As_2O_3 处理 72 h 并丙酮固定的 786-0 细胞分别与鼠抗人 bcl-2、c-myc、c-fos 和 p53 单克隆抗体（福建迈新生物技术开发公司），以及 p65 PcAB（兔抗人，Santa Cruz 公司），4 ℃结合 24 h，再与生物素标记二抗 25 ℃孵育 30 min，最后滴加链霉菌抗生物素蛋白—过氧化物酶溶液 25 ℃孵育 30 min，用 DAB 底物反应显色。以 PBS 代替一抗作为阴性对照，同时设立阳性对照。根据阳性细胞数和染色强度进行半定量分析，光镜下恒定倍数，摄取标本，图片输入计算机，应用北航 CM-2000 B 型生物医学图像分析系统处理，取平均光密度值（AOD）。

1.4 RT-PCR 检测

按照文献[2]设立对照组和 2 μmol/L As_2O_3 处理组，分别处理 24、48、72 h 后终止，收集细胞总数约 1×10^7，立即加入 1 ml Trizol（上海生物工程有限公司），提取总 RNA，-20℃保存。cDNA（RT）合成按照试剂盒（上海生物工程有限公司）操作步骤：先加入总 RNA（1 g/μl）2 μl，Random hexamer 引物 1 μl，无核酸去离子水 9 μl，70 ℃孵育 5 min。再加入 5×反应缓冲液4 μl，核酸酶抑制剂（20 U/μl）1 μl，10 mmol/L dNTPs 2 μl，25℃孵育 5 min。最后加入 M-MuLV 逆转录酶（20 U/μl）1 μl，25 ℃孵育 10 min 后 37 ℃孵育 60 min，最后 70 ℃孵育 10 min 终止反应。PCR 反应体系（大连宝生物公司）为 25 μl，包括 10×PCR buffer 2.5 μl，10 mmol/L $MgCl_2$ 2.5 μl，10 mmol/L dNTPs 1 μl，20 mmol/L 引物 1 和 引物 2 各 1 μl（bcl-2：5′-GGCGCACGCTGGGAGAAc-3′，5′-TAGCGGCGGGAGAAGTCGTc-3′388 bp；c-myc：5′-CTGGCAAAAGGTCAGAGTCTGGATCACCTT-3′，5′-TGTCTCAGGACTCTGACACTGTCCAACTTG-3′ 187 bp；c-fos：5′-GAATAAGATGGCTGCAGCCAAATGCCGCAA-3′，5′-CAGTCAGATCAAGGGAAGCAGATCACAGACATCT-3′ 236 bp；β-actin：5′-GACTACCTCATGACCT-3′，5′-GCGGATGTCCACGTCACACT-3′，313 bp）[3-5]，5 U/μl *Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl，cDNA 4 μl，双蒸水 12.5 μl。于 GeneAMP PCR System 9600 PCR 仪（PE 公司），先 94 ℃孵育 5 min，然后 94 ℃变性 1 min，55 ℃退火 1 min，72 ℃扩增 2 min，40 个周期，最后 72 ℃扩增 10 min。取 PCR 扩增产物 5 μl 在 1.5% 琼脂凝胶（含 0.5 μg/ml 溴化乙锭）电泳，用瑞典 Pharmacia Master Imagine 紫外凝胶成像分析系统进行目的基因表达水平的半定量分析。

1.5 ISH 检测

按照原位杂交试剂盒（武汉市博士德生物工程有限公司）的操作流程并稍作修改如下：细胞爬片培养后，4% 多聚甲醛/0.1 mol/L PBS（pH 7.2～7.4）室温固定 30～60 min，-20 ℃保存。0.3% TritonX-100，37℃孵育 20 min 后，按每片 40 μl 预杂交液，37℃预杂交 3 h。稀释杂交液（含人 NF-κB p65 寡核苷酸探针序列如下：① 5′-CACCATCAAGATCAATGGCTACACAGGACc-3′，② 5′-TCTGGCAGCTGCCTCGGTGGGGATGAGATc-3′，③ 5′-AAGACTTCTCCTCCATTGCGGACATGGACT-3′）浓度为 5.0 ng/μl，每片用 30～40 μl，于 5×SSC 湿盒内，43 ℃杂交 43 h。按照 2×SSC、0.5×SSC、0.2×SSC 顺序于37 ℃各洗 2 次，每次 20 min。滴加封闭液（5% BSA），37℃孵育 30～40 min。再滴加生物素化鼠抗地高辛，37 ℃孵育 3.5～5 h。0.5 mol/L TBS 室温漂洗 4 次。滴加 SABc-AP，37℃孵育 1 h。0.5 mol/L TBS 室温漂洗 4 次。BCIP/NBT 显色按 1∶20 的比例用 0.01 mol/L TBS（pH 9.5）稀释，显微镜下控制显色。在杂交反应时用预杂交液作为阴性对照。以细胞质/细胞核呈明显的紫蓝色颗粒为阳性染色。测定 AOD 同 ICC 方法。

1.6 Western blot 检测

收集 1×10^7 培养细胞，加入 4 ℃ 预冷的总蛋白提取液[200 mmol/L HEPES（pH7.9），0.2% NP-40，10% 甘油，400 mmol/L NaCl，0.1 mmol/L EDTA，1 mmol/L DTT，1 mmol/L 钒酸钠，0.5 mmol/L PMSF，10 μg/ml 亮肽素（Roche 公司）][6] 200 μl，冰浴 20 min。4 ℃，10 000 r/min 离心 10 min，共 2 次，取上清液，调整蛋白浓度为 5 μg/ml，-80 ℃保存。取 20 μl 样品在 7.5 % 丙烯酰胺分离胶和 3.9% 丙烯酰胺积层胶的凝胶上点样电泳。分离胶正面覆盖硝酸纤维滤膜（美国 Roche 公司），

再在每面覆盖滤纸，将滤纸-凝胶-滤膜-滤纸"三明治"放入转移仪中，4 ℃过夜。滤膜放入 TTBS 液中室温孵育 30 min，移入小塑料袋中，一抗 P-65 PcAB[兔抗人(Santa Cruz 公司)]用 TTBS 液按照 1∶200 稀释并按 0.1 ml/cm² 加入，4 ℃过夜。TTBS 漂洗滤膜 3 次，加入用封闭液按照 1∶500 稀释的二抗[山羊抗兔 Ig (Jackson 公司)]，37 ℃孵育 2 h。TTBS 漂洗 3 次，再 PBS 漂洗 2 次。将 Western blot 发光试剂 A 液和 B 液(Satus Cruz 公司)等量混合后均匀地覆盖于滤膜上，1～2 min 倾去发光试剂，压 X 光片(柯达公司)曝光 1～2 min，将胶片照相或用凝胶成像分析系统(Pharmacia biotech 公司)扫描输入电脑，用 Image Master VDS Software 软件分析蛋白区带，蛋白含量用区带积分光密度值(IOD)表示。

1.7　EMSA 检测

收集 1×10^7 培养细胞，加入 4 ℃预冷的核蛋白提取液 A [10 mmol/L HEPES，0.1 mol/L EDTA，10% 甘油，1.5 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF，10 μg/ml 亮肽素(Roche 公司)][8]400 μl，冰浴 30 min。4 ℃，3 000 r/min，离心 5 min。弃去上清液，加入核蛋白提取液 B [10 mmol/L HEPES，0.1 mol/L EDTA，10% 甘油，400 mmol/L $MgCl_2$，1 mmol/L DTT，1 mmol/L PMSF，10 μg/ml 亮肽素][7] 100 μl，冰浴 30 min。4℃，12 000 r/min 离心 10 min，上清液为核蛋白，调整蛋白浓度为 1 μg/ml，－70 ℃保存。进行 NF-κB 探针标记，顺次加入2 μl NF-κB 探针(Promega 公司，序列为 5′-AGTTGAGGGGACTTC-CCAGGc-3′，3′-TCAACTCCCCTGAAAGGGTCCG-5′，1.75 pmol/μl)，1 μl T_4 多核苷酸激酶 10×buffer，1 μl[γ-^{32}P]ATP(北京亚辉公司，370 MBq/ml)，1 μl T_4 多核苷酸激酶(5～10 U/μl)，5 μl 无核酸酶纯水，37 ℃孵育 1 h。加入 0.5 mol/L EDTA 1 μl 终止反应，最后加入 89 μl TE 缓冲液稀释。洗涤离心后，将沉淀溶解于 100 μl TE 溶液中，50 000～200 000 cpm 的探针可以使用，－20℃保存。NF-κB 寡核苷酸探针与核蛋白的结合反应体系包括 4 μl 5×结合 buffer，5 μl 核蛋白，1 μl NF-κB 探针，10 μl 无核酸酶纯水，37 ℃孵育 30 min。于 7% 非解离聚丙烯酰胺凝胶点样，在低于 20 ℃进行电泳。30% 冰醋酸固定 5 min，80 ℃干燥 90 min，－70 ℃自显影。测定 IOD 同 Western blot 方法。

1.8　统计学处理

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件 SAS 6.12 进行 t 检验。

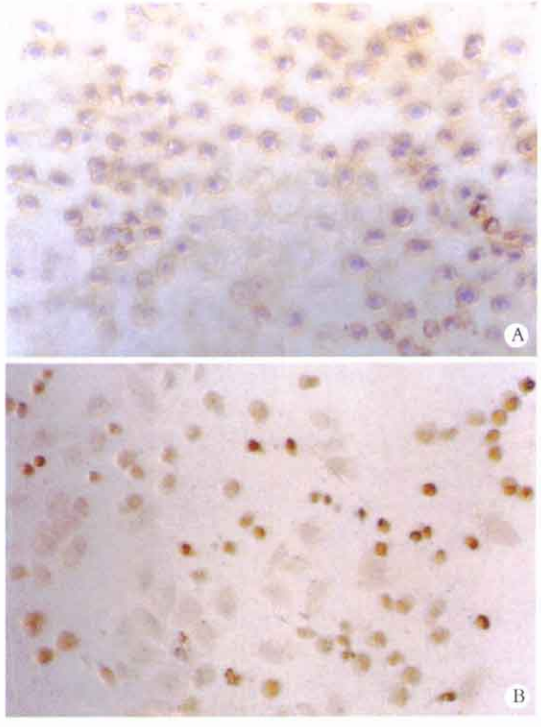
2　结果

2.1　FCM 检测细胞凋亡率

FCM 分析细胞 DNA 含量，结果显示典型的凋亡细胞群，呈特征性的亚二倍体峰(凋亡峰，亚 G_1 峰)，这是细胞凋亡时 DNA 断裂成小片段 DNA 从细胞中释放的结果，检测凋亡峰的面积可以测算凋亡细胞的比例。2 μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞 24、48、72 h 后，细胞凋亡率分别为 0.9%、3.4% 和 11.4%，5 μmol/L As_2O_3 处理后分别为 1.2%、10.5% 和 14%。随着 As_2O_3 浓度的升高和作用时间的延长，细胞凋亡发生率逐渐增加，在 5.0 μmol/L As_2O_3 作用 786-0 细胞 72 h 后细胞凋亡率最高。

2.2　TUNEL 技术检测细胞凋亡的结果

TUNEL 技术检测结果显示，2 μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞后出现大量细胞凋亡。786-0 细胞经 2 μmol/L As_2O_3 作用 24、48、72 h 后的细胞凋亡率分别为 3.8%、6.5% 和 14.6%。而对照组仅 1.3%。统计学分析显示，实验组各时段细胞凋亡率与对照组之间有极显著性差异($P<0.01$)，As_2O_3 作用不同时间的细胞凋亡率之间亦有极显著性差异($P<0.01$)，提示 As_2O_3 可以明显诱导 786-0 细胞凋亡(图 1)。



A：对照组；B：2 μmol/L As_2O_3 处理 72 h 后

图 1　786-0 细胞 As_2O_3 处理前后 TUNEL 染色结果　(×100)

2.3　ICC 检测结果

NF-κB p65 和 bcl-2 蛋白表达位于 786-0 细胞的细胞质，c-myc蛋白表达位于细胞质/细胞核，c-fos 和 p53 蛋白表达仅位于细胞核。对照组细胞中，NF-κB p65、bcl-2、c-myc 和 c-fos 均为中-强阳性，呈棕黄色，p53 基因呈弱阳性。经 2 μmol/L As_2O_3 处理 72 h 后，细胞质 p65 和 bcl-2、细胞质/细胞核 c-myc 和细胞核 c-fos 蛋白表达明显减弱，呈弱阳性表达，但 p53 基因的蛋白表达增强，前后平均光密度值(AOD)变化有显著性差异($P<0.05$，$P<0.01$)(表 1)。

表 1　As_2O_3 对 786-0 细胞 NF-κB p65、bcl-2、c-myc、c-fos 和 p53 蛋白表达的影响(AOD，$\bar{x}\pm s$)

组别	p65	bcl-2	c-myc	c-fos	p53
对照组	0.14±0.02	0.28±0.04	0.17±0.03	0.16±0.02	0.06±0.01
处理组	0.07±0.01[b]	0.07±0.01[b]	0.07±0.02[b]	0.08±0.03[a]	0.12±0.03[a]

a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与对照组比较

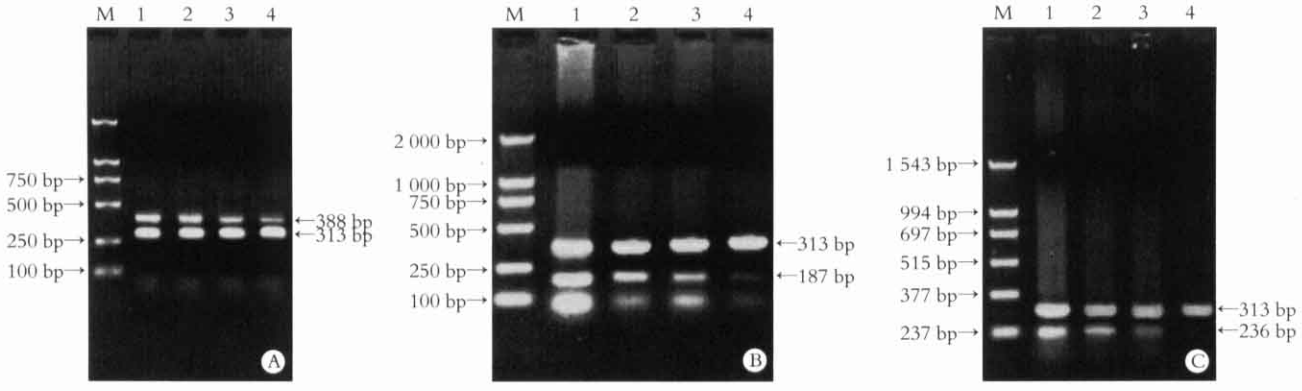
2.4　Western blot 检测结果

As_2O_3 处理前 786-0 细胞 NF-κB p65 的 IOD 为(327.48±12.34)，2 μmol/L As_2O_3 处理 72 h 后 NF-κB p65 的 IOD 为

(106.99 ± 7.40),前后 IOD 变化有极显著差异($P < 0.01$)。

2.5 RT-PCR 检测结果

As_2O_3 处理前 786-0 细胞 bcl-2、c-myc 和 c-fos mRNA 的相对表达量分别为 0.80、0.91 和 0.98,2 μmol/L As_2O_3 处理 24 h 后分别为 0.67、0.73 和 0.71,48 h 后分别为 0.55、0.58 和 0.51,72 h 后分别为 0.36、0.36 和 0.23,As_2O_3 处理前后 786-0 细胞 bcl-2、c-myc 和 c-fos mRNA 表达量均呈明显下降($P < 0.01$),且随时间延长而更加显著(图 2)。



M: DNA 分子量标准; 1: 对照组; 2: 处理 24 h; 3: 处理 48 h; 4: 处理 72 h

A:bcl-2 mRNA;B:c-myc mRNA;C:c-fos mRNA

图 2 2 μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞后 bcl-2、c-myc、c-fos mRNA 表达的改变(RT-PCR)

2.6 As_2O_3 处理 786-0 细胞前后 NF-κB p65 mRNA 表达的改变

786-0 细胞 p65 mRNA 表达的阳性产物定位于细胞质/细胞核内,呈蓝紫色颗粒,AOD 为(0.30 ± 0.05),2 μmol/L As_2O_3 处理 72 h 后细胞中 NF-κB p65 mRNA 表达明显减弱,AOD 为(0.09 ± 0.02),提示 As_2O_3 可以明显下调 786-0 细胞中 NF-κB p65 mRNA 的表达($P < 0.01$)。

2.7 As_2O_3 处理前后 786-0 细胞 NF-κB DNA 结合活性变化的 EMSA 检测

2 μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞 72 h 后 NF-κB DNA 结合活性较处理前明显降低,As_2O_3 处理前 NF-κB DNA 结合活性 IOD 为(1 643.68 ± 123.51),处理后为(566.05 ± 26.95),差异极显著($P < 0.01$)。

3 讨论

化学药物抗肿瘤作用最重要的机制之一是诱导肿瘤细胞的凋亡,从而抑制肿瘤的进一步进展,乃至全部消灭残留的肿瘤细胞[1]。通过光学显微镜和电镜观察研究证实,经 2 μmol/L As_2O_3 处理后出现细胞凋亡的特征性改变,可见大量的凋亡细胞和凋亡小体,这些改变随时间的延长和浓度提高而更明显;DNA 琼脂糖凝胶电泳分析亦证实,经 2 μmol/L 以上浓度 As_2O_3 处理 786-0 细胞后,可见到典型的 DNA 阶梯状条带[2]。TUNEL 技术亦显示 2 μmol/L 以上浓度 As_2O_3 处理 786-0 细胞后出现大量的细胞凋亡,FCM 检测见典型的细胞凋亡峰。提示 As_2O_3 可以显著地诱导人肾癌 786-0 细胞的凋亡,并通过诱导细胞凋亡实现对 786-0 细胞的增殖抑制作用。

细胞凋亡是一种主动程序化有别于坏死的细胞自杀现象,其过程受到多种基因的调控,涉及一系列相关基因的改变。对 bcl-2 研究最多,被认为是哺乳动物细胞凋亡发生的关键基因之一。bcl-2 主要通过与 Bax 形成二聚体而发挥作用,当 bcl-2 表达量较高则形成异源二聚体而发挥抗凋亡作用[8]。研究证实 bcl-2、bcl-xl 高表达的肾癌组织罕见凋亡现象,而 Bax 高表达组织却常见凋亡现象,并与肾癌的进展和远处转移有关,抑制 bcl-2 可增加 fas 和 p53 诱导人肾癌细胞凋亡的作用[9-13]。本实验 ICC 检测提示经 As_2O_3 处理后 786-0 细胞质 bcl-2 蛋白表达量显著减少($P < 0.01$),RT-PCR 结果进一步显示经 As_2O_3 处理后 786-0 细胞 bcl-2 mRNA 表达较对照组明显降低,说明 bcl-2 蛋白降低是由于 bcl-2 mRNA 低转录所致,因此推测 As_2O_3 可能通过下调 786-0 细胞中 bcl-2 抗凋亡基因的表达,使 bcl-2 和 Bax 二聚体中 Bax 基因表达占优势则形成同源二聚体而发挥促凋亡作用,促进 786-0 细胞凋亡。

c-myc 在多数肾癌中存在过高表达,在肾癌形成中起抗凋亡和促进增殖的作用,并与肿瘤的恶性程度密切相关[14]。本实验 RT-PCR 结果显示,经 As_2O_3 处理后 786-0 细胞 c-myc mRNA 表达较对照组明显降低,ICC 检测提示经 As_2O_3 处理后786-0细胞质 c-myc 蛋白表达量显著减少($P < 0.01$),表明 As_2O_3 处理786-0细胞后下调了 c-myc 基因的表达,提示抑制 c-myc 基因的功能在 As_2O_3 诱导 786-0 细胞凋亡中具有一定的作用。

p53 基因是多种肿瘤中突变率最高的基因,野生

型 p53 是最重要的促细胞凋亡基因，可以诱导肿瘤细胞凋亡。用 ICC 检测 112 例肾癌标本，15 例 p53 阳性（13.4 %），52 例 bcl-2 阳性（42.0 %），认为在肾癌组织中 bcl-2 抑制了 p53 诱导的凋亡[10]。研究表明 As_2O_3 通过上调 p53 基因的表达和活化 caspase-3 诱导胃癌细胞凋亡[15]。本实验 ICC 检测提示经 As_2O_3 处理后 786-0 细胞核 P53 蛋白表达量显著增加（$P < 0.05$），表明 As_2O_3 可能通过下调 786-0 细胞 bcl-2 基因的表达，降低对 p53 的抑制作用，同时直接上调 p53 基因的表达，从而促进 786-0 细胞发生凋亡。

c-fos 基因编码蛋白质 fos 和 Jun 蛋白系列（c-Jun、JunB、JunD）形成二聚体，构成转录因子复合物 AP-1（activator protein-1，AP-1）。c-fos 作为 AP-1 的主要成分，被认为是参与细胞分化、分裂和转化的一种重要分子。c-fos 基因与肾癌的恶性程度密切相关[16]。在本实验中，经 As_2O_3 处理后 786-0 细胞 c-fos mRNA、蛋白表达明显降低（$P < 0.05$），提示 c-fos 基因的表达下调可能在 As_2O_3 诱导 786-0 细胞凋亡中亦具有一定的作用。

NF-κB 是一种功能多样的重要核转录因子，常与 IκB 结合在一起，以无活性状态存在于细胞质中。NF-κB 活化因子激活 IKKα/β 后，导致 IκB 磷酸化-泛素化-降解，使 NF-κB 亚单位 p65 迅速从细胞质易位到细胞核，与靶基因启动子的特定序列结合并开始相关基因的转录。NF-κB 可以调节细胞凋亡、血管生成、增殖及炎症相关的基因，NF-κB 活化与多种肿瘤的发生、发展、转移，以及抵抗化学药物诱导肿瘤细胞凋亡有关[17-19]。本实验利用 ICC 和 Western blot 法检测 2 μmol/L As_2O_3 处理肾癌 786-0 细胞后，786-0 细胞中 p65 蛋白表达较处理前明显降低，ISH 检测显示 As_2O_3 处理后 786-0 细胞中 p65 mRNA 表达下降，EMSA 检测显示 As_2O_3 处理后 786-0 细胞中 NF-κB DNA 结合活性明显受到抑制。表明 As_2O_3 有效抑制了 NF-κB 的功能和信号转导。提示 As_2O_3 可能通过抑制 786-0 细胞 NF-κB 的信号转导，从而改变 NF-κB 相关靶基因的转录，达到抑制 786-0 细胞的增殖和诱导其凋亡的作用[2]。

总之，据以上结果，表明 As_2O_3 具有显著的诱导 786-0 细胞凋亡的作用，具体机制可能是首先抑制 NF-κB 的活化和核易位，并通过下调 p65 mRNA 的转录功能降低 p65 蛋白含量，降低 NF-κB DNA 结合活性，进而调节 786-0 细胞中靶基因诸如 bcl-2、c-myc、c-fos 及 P53 等凋亡相关基因的转录能力，诱导 786-0 细胞凋亡。

参考文献：

[1] Aghdassi A, Phillips P, Dudeja V, *et al*. Heat shock protein 70 increases tumorigenicity and inhibits apoptosis in pancreatic adenocarcinoma[J]. Cancer Res, 2007, 67(2): 616 - 625.

[2] 王德林，米　粲，陈在贤. 三氧化二砷抑制肾癌细胞系 786-0 增殖及诱导凋亡的研究[J]. 中华实验外科杂志，2005，22(5)：558 - 561.

[3] Ramachandran C, You W. Differential sensitivity of human mammary epithelial and breast carcinoma cell lines to curcumin[J]. Breast Cancer Res Treat, 1999, 54(3): 269 - 278.

[4] Irving J, Feng J, Wistrom C, *et al*. An altered repertoire of fos/jun (AP-1) at the onset of replicative senescence[J]. Exp Cell Res, 1992, 202(1): 161 - 166.

[5] Ohnami S, Matsumoto N, Nakano M, *et al*. Identification of genes showing differential expression in antisense K-ras-transduced pancreatic cancer cells with suppressed tumorigenicity[J]. Cancer Res, 1999, 59(21): 5565 - 5571.

[6] Oya M, Ohtsubo M, Takayanagi A, *et al*. Constitutive activation of nuclear factor-kappaB prevents TRAIL-induced apoptosis in renal cancer cells[J]. Oncogene, 2001, 20(29): 3888 - 3896.

[7] Tu Z, Kelley V R, Collins T, *et al*. I kappa B kinase is critical for TNF-alpha-induced VCAM1 gene expression in renal tubular epithelial cells[J]. J Immunol, 2001, 166(11): 6839 - 6846.

[8] Adams J M, Cory S. The bcl-2 protein family: arbiters of cell survival [J]. Science, 1998, 281(5381): 1322 - 1326.

[9] Uchida T, Gao J P, Wang C, *et al*. Clinical significance of p53, mdm2, and bcl-2 proteins in renal cell carcinoma[J]. Urology, 2002, 59(4): 615 - 620.

[10] Kallio J P, Hirvikoski P, Helin H, *et al*. Renal cell carcinoma MIB-1, Bax and bcl-2 expression and prognosis[J]. J Urol, 2004, 172(6 Pt 1): 2158 - 2161.

[11] Gobe G, Rubin M, Williams G, *et al*. Apoptosis and expression of bcl-2, bcl-XL, and Bax in renal cell carcinomas[J]. Cancer Invest, 2002, 20(3): 324 - 332.

[12] Kausch I, Jiang H, Thode B, *et al*. Inhibition of bcl-2 enhances the efficacy of chemotherapy in renal cell carcinoma[J]. Eur Urol, 2005, 47(5): 703 - 709.

[13] Kelly J D, Dai J, Eschwege P, *et al*. Downregulation of bcl-2 sensitises interferon-resistant renal cancer cells to Fas[J]. Br J Cancer, 2004, 91(1): 164 - 170.

[14] Li J J, Hou X, Banerjee S K, *et al*. Overexpression and amplification of c-myc in the Syrian hamster kidney during estrogen carcinogenesis: a probable critical role in neoplastic transformation[J]. Cancer Res, 1999, 59(10): 2340 - 2346.

[15] Jiang X H, Wong B C, Yuen S T, *et al*. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cells through up-regulation of p53 and activation of caspase-3[J]. Int J Cancer, 2001, 91(2): 173 - 179.

[16] Avnet S, Cenni E, Perut F, *et al*. Interferon-alpha inhibits *in vitro* osteoclast differentiation and renal cell carcinoma-induced angiogenesis [J]. Int J Oncol, 2007, 30(2): 469 - 476.

[17] Oya M, Takayanagi A, Horiguchi A, *et al*. Increased nuclear factor-kappa B activation is related to the tumor development of renal cell carcinoma[J]. Carcinogenesis, 2003, 24(3): 377 - 384.

[18] Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death[J]. Nat Immunol, 2002, 3(3): 221 - 227.

[19] Takada Y, Gillenwater A, Ichikawa H, *et al*. Suberoylanilide hydroxamic acid potentiates apoptosis, inhibits invasion, and abolishes osteoclastogenesis by suppressing nuclear factor-kappaB activation [J]. J Biol Chem, 2006, 281(9): 5612 - 5622.

（编辑　王小寒）