文章编号:1000-5404(2009)07-0615-04

论著

青蒿琥酯对人表皮鳞癌A431细胞增殖和凋亡的影响

江忠勇,梅 峰,于 彬,韩 鹃,田衍平,李世峰,周德山 (第三军医大学基础医学部组织胚胎学教研室,重庆市神经科学研究所,重庆 400038)

摘 要:目的 初步探讨青蒿琥酯(artesunate, ART)对人表皮鳞癌细胞增殖和凋亡的影响及其相关机制。**方法** 以人表皮鳞癌细胞系A431为研究对象,人永生化角质形成细胞系HaCaT为正常对照,顺铂(diamminedichloroplatinum, DDP)为药物阳性对照,通过MTT法和流式细胞术观察ART对A431细胞增殖和凋亡的影响,以及铁离子抑制剂去铁敏(desferrioxamine, DFOM)部分阻断ART对A431细胞的生长抑制作用。**结果** ART对A431细胞有较明显的增殖抑制作用,对HaCaT细胞的损害显著低于DDP;药物组ART 60 μmol/L(IC_{50})作用A431细胞48 h,A431细胞阻滞于S期[(67.60±4.12)%,$P<0.05$],同时凋亡率上调[(19.87±0.03)%,$P<0.01$];药物阻断组DFOM 60 μmol/L预处理A431细胞4 h、加入ART 60 μmol/L作用48 h,凋亡率显著下调[(7.37±0.02)%,$P<0.01$],而周期检测未发生变化。**结论** ART通过阻滞A431细胞停滞于S期和诱导A431细胞凋亡发挥增殖抑制作用,此作用在一定范围内与药物剂量呈正相关;ART对A431细胞的诱导凋亡作用与Fe^{2+}介导有关;ART毒副作用明显低于DDP。

关键词: 青蒿琥酯;鳞状细胞癌;角质形成细胞;细胞凋亡
中图法分类号: R730.23; R739.5; R978.51 **文献标识码:** A

Artesunate inhibits proliferation and apoptosis of epidermal squamous cell line A431

JIANG Zhong-yong, MEI Feng, YU Bin, HAN Juan, TIAN Yan-ping, LI Shi-feng, ZHOU De-shan (Department of Histology and Embryology, College of Basic Medical Sciences, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To investigate the effects and the underlying mechanisms of artesunate (ART) on the growth and apoptosis of epidermal carcinoma cells. **Methods** The proliferation, cell cycle and apoptosis of A431 cells (a cell line of malignant epidermal carcinoma) were detected with MTT assay and flow cytometer (FCM). HaCaT cells (an immortalized keratinocyte cell line) served as normal control, and diamminedichloroplatinum (DDP) as drug positive control. Deferoxamine mesylate (DFOM) was employed to block the effect of ART. **Results** ART showed obviously inhibitory effect on the proliferation of A431 cells, and had lesser toxicant to HaCaT cells compared with DDP. When 60 μmol/L ART (IC_{50}) was used to treat A431 cells for 48 h, the cells was arrested in S phase [(67.60±4.12)%, $P<0.05$]; and their apoptotic rate was increased to (19.87±0.03)% ($P<0.01$). However, when the A431 cells was pretreated with 60 μmol/L DFOM for 4 h followed with the treatment as above mentioned, there was no change in cell cycle distribution, and the apoptotic rate was (7.37±0.02)% ($P<0.01$). **Conclusion** ART significantly suppresses the proliferation of A431 cells by arresting the cells in S phase and inducing cell apoptosis in a dose-dependent manner. Fe^{2+} might mediate the apoptosis of A431 cells induced by ART. ART has lower toxicant to A431 cells than DDP.

Key words: artesunate; squamous cell carcinoma; keratinocyte cells; apoptosis

近年研究表明,青蒿素类药物,尤其是青蒿琥酯(artesunate, ART)对多种肿瘤细胞具有特异的杀伤作用,且毒副作用小[1]。目前国内外尚少见有关ART对人皮肤肿瘤作用的研究报道。本实验采用人皮肤鳞癌A431细胞为研究对象,人皮肤永生化角质形成细胞HaCaT细胞[2]为正常对照,探讨ART对A431细胞生长的抑制作用及机制,为皮肤癌的临床治疗提供基础研究依据。

1 材料与方法

1.1 药品及主要试剂

DMEM培养基购自美国Gibco公司;胎牛血清购自天津

作者简介:江忠勇,男,重庆市人,硕士研究生,主要从事肿瘤发生机制方面的研究。电话:(023)68752229
通信作者:周德山, E-mail:dszhou2000@yahoo.com
收稿日期:2008-09-16;修回日期:2008-10-24

TBD 公司；ART 用 5% 碳酸氢钠配成 60 mg/ml 的储备液，-20 ℃ 保存，用时以培养液稀释成所需浓度，碳酸氢钠的终浓度 <0.1%（广西桂林南药制药厂）；顺铂（diamminedichloroplatinum，DDP）、台盼蓝、MTT、DMSO、PI、RNase A、去铁敏（deferoxamine，DFOM）均为 Sigma 公司产品；AnnexinV-FITC 细胞凋亡试剂盒（晶美生物）。

1.2 设备和仪器

酶标仪（BIO-RAD model 680），流式细胞仪（美国 BD-FACSCalibur）。

1.3 细胞培养

人表皮鳞癌 A431 细胞和人永生化角质形成细胞 HaCaT 由第四军医大学西京医院全军皮肤病研究所高天文教授惠赠，在 37 ℃、5% CO_2 条件下培养，每 2～3 天换液传代 1 次或收获细胞用于后续实验。

1.4 MTT 法检测

1.4.1 检测 ART 对 A431 细胞和 HaCaT 细胞的生长抑制作用

取对数生长期 A431 细胞和 HaCaT 细胞，分别以 5.0×10^4/ml、100 μl/孔接种于 96 孔板，细胞贴壁后无血清 DMEM 同步化培养 24 h，每孔加入含有不同浓度 ART 的 DMEM 培养基 100 μl，使 ART 的终浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200 μmol/L，同时设置细胞对照，各个浓度组设置 8 个复孔。培养 48 h 后加入 5 mg/ml MTT（20 μl/孔），继续培养 4 h，弃上清，加入 DMSO 150 μl/孔，微量振荡器摇振 10 min，待甲瓒结晶完全溶解后酶标仪测定 570 nm 处波长的吸光度值[$D(570)$]。实验重复 3 次。

$$\text{细胞生长抑制率}(\%)=\frac{1-\text{平均}\,D(570)_{\text{处理组}}}{\text{平均}\,D(570)_{\text{细胞对照组}}}\times100\%$$

1.4.2 检测 DDP 对 A431 细胞和 HaCaT 细胞的生长抑制作用

取对数生长期 A431 细胞和 HaCaT 细胞接种于 96 孔板中，设置 DDP 的终浓度分别为 2、4、6、8、10、20、30 μmol/L，设置 A431 细胞和 HaCaT 细胞对照组，培养 48 h 进行检测。按 1.4.1 步骤操作，实验重复 3 次。

1.4.3 检测 DFOM 部分阻断 ART 对 A431 细胞和 HaCaT 细胞的作用

取对数生长期 A431 细胞和 HaCaT 细胞接种于 96 孔板中，每孔加入含有终浓度为 60 μmol/L DFOM 的 DMEM 培养基 100 μl，预处理 4 h 去除 DFOM，加入终浓度分别为 10、20、30、40、50、60、70、80、90、100 μmol/L 的 ART，培养 48 h 进行检测，设置 A431 细胞和 HaCaT 细胞对照组。按 1.4.1 步骤操作，实验重复 3 次。

1.5 光镜观察 ART 和 DFOM 作用后 A431 细胞和 HaCaT 细胞形态变化

根据 MTT 结果，ART 作用 A431 细胞 48 h 的中效浓度（IC_{50}）为 60 μmol/L，DFOM 作用 A431 细胞 4 h 的安全浓度为 60 μmol/L；药物组均为 ART 60 μmol/L 作用 48 h，药物阻断组均为 DFOM 60 μmol/L 预处理 4 h 后，ART 60 μmol/L 作用 48 h。

取对数生长期 A431 细胞和 HaCaT 细胞接种于 6 孔板，设置药物组、药物阻断组、细胞对照组。光学显微镜观察各组细胞形态变化，台盼蓝活细胞染色计数。实验重复 3 次。

1.6 流式细胞仪检测细胞周期

取对数生长期 A431 细胞和 HaCaT 细胞接种于 100 ml 培养瓶，设置药物组、药物阻断组和细胞对照组，培养 48 h 后收集细胞到 1.5 ml 的 EP 管内，PBS 洗 2 次，4 ℃ 预冷的 70% 乙醇 1 ml 固定 24 h，PI（终浓度 50 μg/ml）染色后，避光孵育 30 min，流式细胞仪检测细胞周期。实验重复 3 次。

1.7 流式细胞术检测细胞凋亡

取对数生长期 A431 细胞和 HaCaT 细胞接种于100 ml 培养瓶。设置药物组、药物阻断组和细胞对照组，培养 48 h 收集各组细胞，PBS 清洗后，加入反应结合液 200 μl、PI 10 μl、AnnexinV-FITC 5 μl，室温避光孵育 10 min，流式细胞仪检测细胞凋亡。实验重复 3 次。

1.8 统计学处理

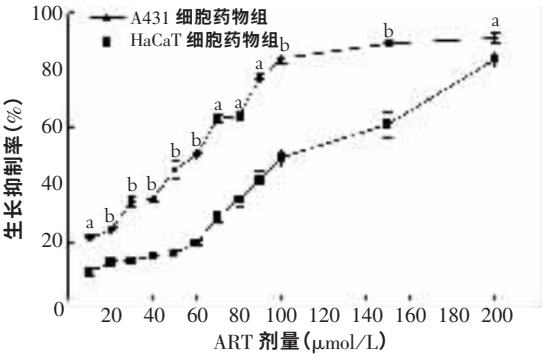
采用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析。

2 结果

2.1 MTT 检测 ART 对 A431 细胞的生长抑制作用

ART（10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、150、200 μmol/L）作用 A431 细胞和 HaCaT 细胞 48 h 后，MTT 结果显示：ART 作用 A431 细胞的中效浓度（IC_{50}）为 60 μmol/L，HaCaT 细胞的中效浓度（IC_{50}）为 100 μmol/L；在低剂量 20～60 μmol/L 范围内，相同剂量的 ART 对 A431 细胞生长抑制作用显著高于正常对照 HaCaT 细胞（$P<0.01$）；同时结果显示 ART 对 A431 细胞的生长抑制作用呈剂量依赖性（图 1）。

DDP 作用 A431 细胞 48 h 的 IC_{50} 剂量为 20 μmol/L，此剂量作用 HaCaT 细胞的生长抑制率为（46.26 ± 1.35）%，与 ART 作用 A431 细胞 48 h 的 IC_{50} 剂量（60 μmol/L）对 HaCaT 细胞的生长抑制率[（19.80 ± 1.17）%]相比，ART 对正常对照 HaCaT 细胞的生长抑制作用明显低于 DDP（$P<0.01$）。

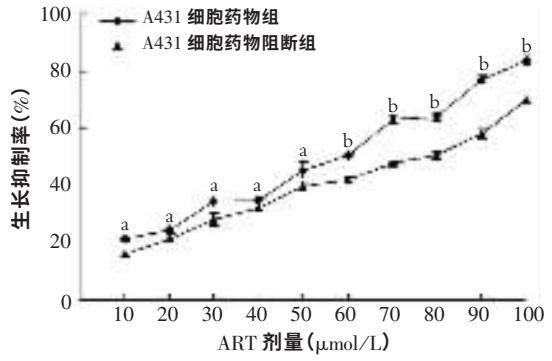


a：$P<0.05$，b：$P<0.01$，与 HaCaT 细胞药物组比较

图 1 不同浓度 ART 对 A431 细胞和 HaCaT 细胞的生长抑制率

2.2 DFOM 部分阻断 ART 对 A431 细胞的生长抑制作用

DFOM（60 μmol/L）预处理 4 h 后培养 48 h，其吸光度值为（1.569 ± 0.360），与不加任何药物的细胞对照组吸光度值（1.611 ± 0.239）相比，无明显差异（$P>0.05$），即说明 60 μmol/L DFOM 为安全剂量；60 μmol/L DFOM 显著减弱 ART 对 A431 细胞的生长抑制作用（$P<0.01$，图 2）；而 DFOM 不阻断 ART 抑制 HaCaT 细胞的生长作用（$P>0.05$）。



a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与 A431 细胞药物阻断组比较

图 2　DFOM 抑制 ART 对 A431 细胞的生长抑制率

2.3　光镜观察 ART 作用后 A431 细胞和 HaCaT 细胞形态变化

对照组 A431 细胞圆润饱满,折光性好,轮廓清晰,细胞间连接紧密,台盼蓝 3 次活细胞计数为$(2.26\pm0.06)\times10^6\,ml^{-1}$;药物组 A431 细胞变小,伪足消失,活细胞计数为$(1.20\pm0.02)\times10^6\,ml^{-1}$,细胞形态不规则,细胞间连接疏松,分泌物增多,死亡数量增多。对照组 HaCaT 细胞圆润饱满,折光性好,轮廓清晰,细胞间连接紧密,台盼蓝 3 次活细胞计数为$(2.02\pm0.1)\times10^6\,ml^{-1}$;药物组 HaCaT 细胞形态未见变化,但细胞密度明显降低,活细胞计数为$(1.62\pm0.36)\times10^6\,ml^{-1}$,与对照组相比,死亡细胞未见明显变化。

DFOM 能够部分阻断 ART 对 A431 细胞的生长抑制作用,而对 HaCaT 细胞的影响较小。药物阻断组 A431 细胞间连接不明显,但细胞形态不规则,台盼蓝活细胞数目为$(1.36\pm0.15)\times10^6\,ml^{-1}$,与 A431 细胞药物组比较,差异显著($P<0.01$);而 HaCaT 细胞药物阻断组的细胞形态与药物组相比无变化,活细胞数目为$(1.64\pm0.31)\times10^6\,ml^{-1}$,与药物组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图 3)。

2.4　流式细胞术检测 ART 阻滞 A431 细胞和 HaCaT 细胞周期变化

ART 阻滞 A431 细胞于 S 期,导致 A431 细胞周期不能正常运行而生长停滞,与 MTT 检测结果和形态学变化一致;ART 阻滞 HaCaT 细胞于 G_0/G_1 期堆积而停止生长,与 MTT 结果和形态学变化相同;实验结果还显示,DFOM 对于 ART 的周期变化没有影响。见表 1。

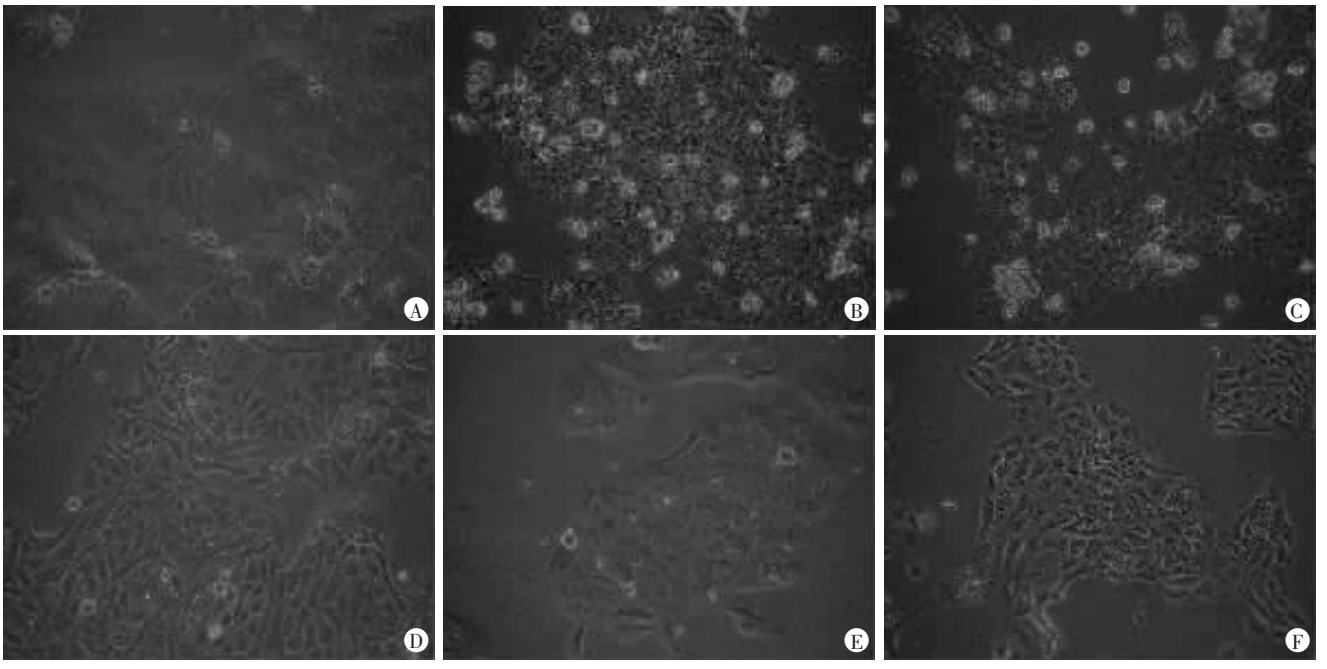
表 1　流式细胞仪检测 ART 对 HaCaT 细胞和 A431 细胞周期的作用
(%,$\bar{x}\pm s$)

组别	G_0/G_1	S	G_2/M
A431 细胞 对照组	54.18 ± 2.75	32.18 ± 1.93	13.64 ± 1.11
药物组	28.81 ± 3.02[a]	67.60 ± 4.12[a]	12.92 ± 0.63
HaCaT 细胞 对照组	44.43 ± 1.50	30.02 ± 0.41	25.55 ± 0.09
药物组	58.47 ± 1.00[b]	26.71 ± 1.56	12.82 ± 1.41[a]

a:$P<0.05$, b:$P<0.01$,与 A431 细胞对照组比较

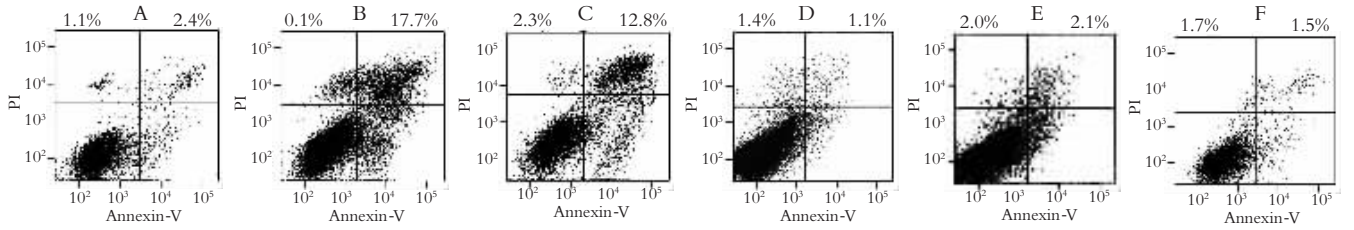
2.5　流式细胞术检测 ART 诱导 A431 细胞凋亡

药物组 A431 细胞凋亡率[(19.87 ± 3.2)%]显著高于对照组[(2.57 ± 1.93)%,$P<0.01$];药物组 HaCaT 细胞的凋亡率仅为(2.76 ± 0.41)%,与对照组自发凋亡率[(2.56 ± 0.21)%]相比,差异无统计学意义($P>0.05$)。凋亡结果显示,药物阻断组 A431 细胞凋亡率为(7.37 ± 1.8)%,明显低于药物组($P<0.01$),而药物阻断组 HaCaT 细胞凋亡率为(2.43 ± 0.06)%,与对照组相比差异无统计学意义($P>0.05$,图 4)。



A: A431 细胞对照组; B: A431 细胞药物组; C: A431 细胞药物阻断组; D: HaCaT 细胞对照组; E: HaCaT 细胞药物组; F: HaCaT 细胞药物阻断组

图 3　ART 作用 48 h 后 A431 细胞和 HaCaT 细胞的形态变化　(倒置显微镜 ×200)



A：A431 细胞对照组；B：A431 细胞药物组；C：A431 细胞药物阻断组；D：HaCaT 细胞对照组；E：HaCaT 细胞药物组；F：HaCaT 细胞药物阻断组

图 4 流式细胞仪检测 A431 细胞和 HaCaT 细胞药物作用后凋亡指数

3 讨论

青蒿素类药物是一种高效低毒的抗疟疾药物。近年研究表明该类药物对 55 种肿瘤细胞系均有杀伤作用[3]。目前尚少有关于 ART 对皮肤鳞癌作用的报道。本研究结果表明：ART 对人表皮癌细胞系 A431 的增殖抑制作用主要是通过阻滞细胞停滞于 S 期和诱导凋亡而发挥特异性杀伤作用，而对 HaCaT 细胞的作用是通过阻滞细胞于 G_0/G_1 期发挥生长抑制作用，但并无凋亡诱导作用。常用 ART 对 HaCaT 细胞的生长抑制作用，明显低于抗癌药顺铂。提示与顺铂比较，ART 作为一种高效特异杀伤肿瘤细胞且低毒副作用的抗癌药，可能更有利于临床相关疾病的治疗。

本研究发现 ART 不仅能够较明显地抑制 A431 细胞增殖，同时亦能促进其细胞凋亡。为探讨 ART 的这一作用机制，本研究应用 DFOM 预处理，降低 A431 细胞内的高 Fe^{2+} 浓度，发现 ART 导致的 A431 细胞凋亡率下降，提示 ART 导致细胞凋亡可能与细胞内 Fe^{2+} 介导有关，这与文献[4]报道的 Fe^{2+} 下调减少凋亡一致。Singh 等[5]认为癌细胞核酸代谢旺盛，需大量 Fe^{2+}，多数肿瘤细胞表面存在较高密度的转铁蛋白受体，而正常细胞转铁蛋白受体相对较少，所以，A431 细胞可通过表面转铁蛋白受体吸收大量 Fe^{2+}。当 ART 进入 A431 细胞内与 Fe^{2+} 发生反应时，可产生自由基，同时降低细胞内 Fe^{2+}，降低 DNA 的合成，发挥杀伤和抑制肿瘤细胞增殖的作用；而正常对照 HaCaT 细胞的转铁蛋白含量较少[6]，且对 Fe^{2+} 的吸收有其他的途径，所以 DFOM 对其影响较小。同时实验数据显示，DFOM 不能完全阻断 ART 对 A431 细胞的凋亡作用，提示 ART 还可能通过其他的机制诱导 A431 细胞的凋亡。有研究表明 ART 可通过调节 bcl-2[7]、survivin[8]，或改变细胞内线粒体膜电位[9]以及提高细胞内 Ca^{2+} 浓度等方式发挥杀伤肿瘤细胞的目的，但这些信号分子是否参与 ART 对 A431 细胞的杀伤作用，亦有待进一步研究。

本研究发现 ART 作用后，A431 细胞停滞于 S 期，即 S 期细胞大量堆积，同时发现正常对照 HaCaT 细胞在 ART 的作用下停滞于 G_0/G_1 期，与 Efferth 等[10]发现的 ART 对其他肿瘤细胞周期的结果不一致，可能与 ATM/ATR-Chk1/2-Cdc25C 信号通路相关[11]。S 期细胞增多是否与 ART 抑制细胞增殖有关仍需实验验证。

本实验结果表明，ART 对皮肤鳞癌细胞具有较特异的杀伤作用，而对正常角质细胞的杀伤作用远较 DDP 等弱，提示 ART 的毒性明显低于 DDP，可能更具潜在的皮肤肿瘤临床治疗的应用价值。

参考文献：

[1] Singh N P, Lai H C. Artemisinin induces apoptosis in human cancer cells[J]. Anticancer Res, 2004, 24(4): 2277 - 2280.

[2] Stein M, Bernd A, Ramirez-Bosca A, *et al*. Measurement of anti-inflammatory effects of glucocorticoids on human keratinocytes *in vitro*. Comparison of normal human keratinocytes with the keratinocyte cell line HaCaT [J]. Arzneimittelforschung, 1997, 47(11): 1266 - 1270.

[3] Efferth T, Dunstan H, Sauerbrey A, *et al*. The anti-malarial artesunate is also active against cancer [J]. Int J Oncol, 2001, 18(4): 767 - 773.

[4] Warren G, Davoust J, Cockcroft A. Recycling of transferrin receptors in A431 cells is inhibited during mitosis[J]. EMBO J, 1984, 3(10): 2217 - 2225.

[5] Singh N P, Lai H. Selective toxicity of dihydroartemisinin and holotransferrin toward human breast cancer cells[J]. Life Sci, 2001, 70(1): 49 - 56.

[6] 李燕华，毕志刚. 紫外线诱导 HaCat 转铁蛋白受体表达机制的初步探讨[J]. 中国皮肤性病学杂志，2006，20(9)：516 - 518.

[7] 王 勤，吴理茂，赵 一，等. 青蒿琥酯抗肿瘤作用的机制研究[J]. 药学学报，2002，37(6)：477 - 478.

[8] 李 哲，袁守军，聂丽平，等. 青蒿琥酯诱导肿瘤细胞凋亡与抑制存活蛋白表达有关[J]. 中国临床药理学与治疗学，2004，9(6)：607 - 611.

[9] 聂 蕾，殷祎隆，尹少甫，等. 青蒿琥酯诱导人早幼粒白血病细胞 HL60 凋亡的线粒体机制[J]. 中国临床药理学与治疗学，2005，10(2)：176 - 179.

[10] Efferth T, Sauerbrey A, Olbrich A, *et al*. Molecular modes of action of artesunate in tumor cell lines[J]. Mol Pharmacol, 2003, 64(2): 382 - 394.

[11] Tyagi A, Singh R P, Agarwal C, *et al*. Resveratrol causes Cdc2-tyr15 phosphorylation via ATM/ATR-Chk1/2-Cdc25C pathway as a central mechanism for S phase arrest in human ovarian carcinoma Ovcar-3 cells [J]. Carcinogenesis, 2005, 26(11): 1978 - 1987.

（编辑 吴培红）