基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0156-03

三氧化二砷对人肺癌细胞株 A2 放射增敏的实验研究

任庆兰[1],陈晓品[1],吴永忠[2],刘 丽[1],高 枫[1],李少林[3]

(1. 重庆医科大学附属第一医院肿瘤科,重庆 400016;2. 重庆市肿瘤医院放疗科,重庆 400030;3. 重庆医科大学基础医学院放射医学教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:本文探讨三氧化二砷(Arsenic trioxide,As_2O_3)对人肺癌细胞株 A2 放射敏感性的影响。方法:设立空白对照组、单纯照射组(直线加速器 X 射线照射,2 Gy)、As_2O_3 组(1.0 μmol/L As_2O_3)、As_2O_3+ 照射组(1.0 μmol/L As_2O_3+X 射线照射,2 Gy)。用流式细胞仪检测 As_2O_3 作用后肿瘤细胞周期的变化,MTT 法及平板克隆形成试验测定各实验组人肺癌细胞株 A2 细胞存活分数和集落形成率,用流式细胞仪观察 Bcl-2 蛋白的表达。结果:As_2O_3 作用后使 A2 细胞出现明显 G_2/M 期阻滞。As_2O_3+ 照射组细胞存活分数和集落形成率较 As_2O_3 组及单纯照射组明显下降,与 As_2O_3 组或单纯照射组比较差异具有显著性(P<0.01)。As_2O_3+ 照射组细胞 Bcl-2 蛋白的表达明显下调,与 As_2O_3 组或单纯照射组比较差异具有显著性(P<0.01)。结论:As_2O_3 对人肺癌细胞 A2 具有放射增敏作用,其增敏机制可能与 As_2O_3 增加照射前 G_2/M 期细胞比例及照射后肿瘤细胞的凋亡率有关。

【关键词】三氧化二砷;人肺癌细胞株 A2;放射敏感性

【中国图书分类法分类号】R737.31 【文献标志码】A 【收稿日期】2009-03-09

Radiosensitization effect of arsenic trioxide on human lung cancer cell line A2

REN Qing-lan, et al

(*Department of Oncology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To explore the effect of arsenic trioxide on radiosensitivity in human lung cancer cell line A2. *Methods*: There were four groups in the study: control group (untreated group), As_2O_3 group (1.0 μmol/L As_2O_3), irradiation group, As_2O_3+ irradiation group. Cellular response to irradiation was evaluated by the colony forming test and MTT assay; Flow cytometry was used to determined the Bcl-2 protein expression and cell cycle. *Results*: As_2O_3 could induced a G_2/M cell cycle arrest. As_2O_3 + irradiation could significantly decreased the proliferation rate (vs As_2O_3 group or irradiation group, P<0.01). As_2O_3 significantly decreased the expression of Bcl-2 in irradiated human lung cancer cell line A2 (vs As_2O_3 group or irradiation group, P<0.01). *Conclusion*: Arsenic trioxide could sensitize the human lung cancer cell A2 to ionizing irradiation. This effect is probably caused by increasing the rate of G_2/M cells before irradiation and the apoptosis rate of A2 cells after irradiation.

【Key words】arsenic trioxide; human lung cancer cell line A2; radiosensitivity

放射治疗是肺癌的重要治疗手段之一。三氧化二砷(Arsenic trioxide, As_2O_3)俗称砒霜是中国的传统中药,我们用 MTT 法及平板集落形成试验观察它对人肺癌细胞株 A2 放射敏感性的影响,明确其具有放射增敏的作用后用流式细胞仪检测实验各组细胞周期及 Bcl-2 表达的变化,初步探讨其放射增敏的机制。本文试验结果可能对肺癌的治疗带来益处。现将实验结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 细胞株和主要试剂

人肺癌细胞株 A2(人肺癌鳞状细胞系)购自北京中日友好医院。纯 As_2O_3 购自美国 Sigma 公司,配成 1.0 mmol/L,溶于磷酸盐缓冲液(PBS),4℃ 冷藏。使用时用 RPMI1640 培养液稀释至 1.0 μmol/L。

1.2 实验分组

实验分为 4 组:①空白对照组(不做任何处理)。②单纯照射组:用培养液轻轻洗涤细胞,用 0.2%胰酶消化,收集活细胞,将 8×10^3 个细胞悬浮于新鲜培养液中,在室温下行直线加速器 6 MV X 射线照射 2 Gy;③As_2O_3 组:在培养液中加入 1.0 μmol/L As_2O_3 100 μl 培养 48 h;④As_2O_3+ 照射组:加入 1.0 μmol/L As_2O_3 100 μl 后培养 48 h 后进行 6MV X 射线照射 2 Gy。

1.3 细胞培养

将 A2 细胞单层培养于含 10%灭活小牛血清、青-链霉素各 100 U/ml 的 RPMI1640 培养液中,置于 37℃、饱和湿度、

作者介绍:任庆兰(1972-),女,副主任医师,博士,研究方向:肿瘤放射增敏。

基金项目:重庆市卫生局科研基金项目(编号:2008-2-31)。

体积分数为 0.05 的 CO_2 孵箱中无菌培养（细胞倍增时间为 20～24 h）。

1.4 流式细胞仪检测细胞周期

将 A2 细胞在上述条件下培养，收集对数生长期细胞进行试验，设空白对照组和 As_2O_3 组。将 1.0 μmol/L $As_2O_3$100 μl 加入培养液中，分别培养 12、24、48、72 h 后弃去原培养液，PBS 洗涤后，重悬细胞，70%乙醇固定，加入等体积 PI 染液，4℃放置 30 min。再放入 FCM 仪的样品室，选取 488 nm 激发波长测定，并用 LYSIS/ModfitLT2.0 软件分析细胞周期的分布。

1.5 MTT 试验

将实验各组细胞用 0.2%胰酶消化，制成单细胞悬液，用 0.4%台盼蓝染色，计数活细胞数，调整细胞浓度为 4×10^4 个/ml。取 96 孔板，每孔接种单细胞悬液 200 μl，即每孔细胞数为 8×10^3 个。每组设 4 个复孔。置于 37℃、体积分数为 0.05 的 CO_2、无菌条件下培养 3～5 d。培养 72 h 时换新鲜培养液 1 次。到相应终止时间，弃原培养液，每孔加入转染液 90 μl，再加入 MTT(5 mg/ml)10 μl，放入 CO_2 孵箱中继续孵育 4 h 后终止培养，小心吸弃孔内上清液，每孔加入 DMSO 150 μl，震荡 10 min，使结晶物充分溶解。用酶联免疫检测仪 570 nm 波长比色，用所测得的吸光值计算存活分数。同样步骤重复实验 3 次。计算存活分数 = 实验组平均吸光值/对照组平均吸光值 × 100%。

1.6 平板集落形成试验

将处理后的活细胞用 0.2%胰酶消化，制成单细胞悬液，用 0.4%台盼蓝染色，计数活细胞数，调整细胞浓度为 1×10^3 个/ml。取 6 孔板，每孔接种单细胞悬液 200 μl，即每孔细胞数为 200 个。每组设 2 个复孔。将培养板移入 CO_2 孵箱中，37℃、体积分数为 0.05 的 CO_2 及饱和湿度，无菌条件下培养 10 d，在显微镜下计数≥50 个细胞的集落数。重复实验 3 次。计算集落形成率(%)=计数细胞集落数/200 × 100%。

1.7 免疫荧光测定 Bcl-2 蛋白的表达

各实验组处理 72 h 后收集约 106 个细胞，PBS 清洗 2 次，加入甲醛和丙酮(1:1)固定 10～15 min；用 0.1%Saponin PBS 漂洗 2 次，再加入 1%人 AB 型血清 10 μl，4 ℃，10 min；加入 Bcl-2 Ⅰ抗(1:10 稀释)10 μl，4℃，30 min；0.1%Saponin PBS 漂洗 2 次，加入 IgG-FITC Ⅱ(1:100 稀释)50 μl，4℃，30 min；0.1%Saponin PBS 漂洗 2 次，将细胞重悬入 1%多聚甲醛中，流式细胞仪检测 Bcl-2 蛋白的表达。

1.8 统计学分析

用 SPSS 10.0 for windows 统计软件处理。检测数据以均数 ± 标准差($\bar{x}\pm s$)表示，计数资料采用 χ^2 检验，计量资料采用 t 检验，$P<0.05$ 则表示差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 流式细胞仪检测细胞周期结果

随着 As_2O_3 作用时间的增加，G_0/G_1 及 G_2/M 期细胞的比例增加，尤其以 G_2/M 期细胞比例增加明显，由空白对照组的 11.79 %增至作用 72 h 后的 17.34%，增加了近 1.5 倍，而 S 期细胞由明显减少，经 As_2O_3 作用 72 h 后 S 期细胞所占比例较空白对照组减少 20 %。见表 1。

2.2 MTT 试验结果

As_2O_3 组和单纯照射组的存活分数都较空白对照组有所下降，As_2O_3+ 照射组其存活分数明显下降，与单纯照射组或 As_2O_3 组比较差异有显著性($P<0.01$)，而且和空白对照组比较，As_2O_3+ 照射组的细胞存活分数下降值大于 As_2O_3 组和单独照射组下降的存活分数之和，因此 As_2O_3 对人肺癌细胞株 A2 具有放射增敏作用。见表 2。

2.3 平板集落形成试验结果

As_2O_3 组和单纯照射组的集落形成率都较空白对照组有所下降，As_2O_3+ 照射组其集落形成率明显下降，与单纯照射组或 As_2O_3 组比较差异有显著性($P<0.01$)，而且和空白对照组比较，As_2O_3+ 照射组的集落形成率下降值大于 As_2O_3 组和单独照射组下降的集落形成率之和，因此 As_2O_3 对人肺癌细胞株 A2 具有放射增敏作用。见表 3。

表 1 As_2O_3 处理后不同时间对 A2 细胞周期的影响($\bar{x}\pm s$,%)

组别	G_0/G_1 期	S 期	G_2/M 期
空白对照组	59.82 ± 1.69	29.49 ± 1.17	11.79 ± 1.34
12 h	57.43 ± 2.67	30.27 ± 2.36	12.88 ± 2.42
24 h	55.58 ± 2.79	28.82 ± 2.45	16.18 ± 2.28
48 h	57.96 ± 2.93	26.13 ± 2.43	16.59 ± 2.21
72 h	58.49 ± 2.28	24.38 ± 2.68	17.34 ± 2.93

表 2 实验各组培养 4 d 后 A2 细胞存活分数比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	24 h	48 h	72 h	96 h
空白对照组	100.00 ± 1.69	100.00 ± 1.51	100.00 ± 1.67	100.00 ± 2.08
As_2O_3 组	91.43 ± 3.21	90.23 ± 3.12	89.98 ± 2.35	88.44 ± 2.56
单纯照射组	88.32 ± 2.95	83.27 ± 2.18	80.34 ± 2.28	78.28 ± 2.34
As_2O_3+ 照射组	70.86 ± 2.89$^{\Delta*}$	62.95 ± 2.68$^{\Delta*}$	60.19. ± 2.21$^{\Delta*}$	56.62 ± 2.36$^{\Delta*}$

与 As_2O_3 组比较，$^{\Delta}P<0.01$；与单纯照射组比较，$^{*}P<0.01$

表 3 实验各组 A2 细胞集落形成率比较($\bar{x} \pm s$,%)

组别	集落形成率
空白对照组	81.25 ± 3.35
As_2O_3 组	76.63 ± 2.39
单纯照射组	72.61 ± 2.98
As_2O_3+ 照射组	55.56 ± 2.79$^{\Delta *}$

与 As_2O_3 组比较,$^{\Delta}P<0.01$;与单纯照射组比较,$^{*}P<0.01$

2.4 免疫荧光测定 Bcl-2 蛋白的表达

As_2O_3 组和单纯照射组 Bcl-2 表达都较空白对照组有所下降,As_2O_3+ 照射组 Bcl-2 表达明显下调,与单纯照射组或 As_2O_3 组比较差异有显著性($P<0.01$)。见表 4。

表 4 实验各组 Bcl-2 蛋白阳性率比较($\bar{x} \pm s$,%)

组别	Bcl-2 表达阳性率
空白对照组	80.23 ± 2.79
As_2O_3 组	60.26 ± 2.95
单纯照射组	54.69 ± 3.25
As_2O_3+ 照射组	27.62 ± 2.47$^{\Delta *}$

与 As_2O_3 组比较,$^{\Delta}P<0.01$;与单纯照射组比较,$^{*}P<0.01$

3 讨 论

目前肺癌已经成为严重危害人类生命和健康的主要疾病,其发病率和死亡率居我国大中城市肿瘤首位,也是全世界最主要的死亡原因之一[1]。放射治疗在肺癌的治疗中具有重要作用,可根据病期、患者的一般状况、病理类型等,单独或与其他抗肿瘤方法联合用于肺癌的治疗。但放疗过程中患者可能出现一系列放疗副反应,且随着放射剂量的增加,其副反应发生率及严重程度亦会随之增加。急性放疗反应如放射性食管炎、放射性肺炎等,晚期并发症包括肺纤维化、食管狭窄、放射性脊髓病及神经病变等,严重影响患者的生活质量。因此,寻找肺癌的放疗增敏剂,努力提高治疗增益比,具有重要的临床意义。研究发现中医中药在肺癌的治疗中具有独到作用[2,3]。在祖国医学中,As_2O_3 是砒霜升华而成的精制品,最早记载于宋代《日华子本草》,作为药物"以毒攻毒"治疗很多疾病。长期以来 As_2O_3 虽归属中药,但它的药用价值被剧毒性掩盖。随着质控技术的发展和对该药物作用机理的深入研究,其临床运用价值越来越凸显出来。20 世纪 90 年代砒霜精制品 As_2O_3 开始治疗急性早幼粒细胞性白血病取得显著疗效,并在该领域取得了重要发现[4,5]。我国学者用 As_2O_3 治疗复发性急性早幼粒细胞白血病也取得良好效果[6]。人们开始研究 As_2O_3 对其他恶性肿瘤的治疗效果及其机制。很多实验表明 As_2O_3 可明显抑制肿瘤细胞的生长,并阐明了其部分抗肿瘤机制[7,8]。Shen L 等研究者发现 As_2O_3 可导致人 B 细胞来源的恶性淋巴瘤细胞株 MBC-1 中 Bcl-2 和 c-myc 基因的表达明显下调[9]。Bcl-2 和 c-myc 下调,可促进细胞凋亡的发生。许多研究结果都证实 As_2O_3 能增加肿瘤细胞的凋亡[10,11]。

As_2O_3 与肿瘤的放射治疗也有一定关系。国外有学者在放疗前用 As_2O_3 处理乳腺癌患者的皮肤转移病变,达到增加放疗疗效的作用[12]。进一步研究发现,As_2O_3 放射增敏可能的作用机制为:砷是一种细胞原浆毒,与巯基有很强的亲和力,与含巯基酶结合后,使酶活性受到抑制,干扰酶的生理功能、结构与代谢[13]。因此,As_2O_3 可通过抑制肿瘤细胞的修复能力、促进放射损伤效应而起放射增敏作用。王德林等证实 As_2O_3 能明显影响细胞周期的再分布,能使细胞周期阻滞在放射敏感的 G_2/M 期,而对射线抗拒的 S 期细胞比例减少[14]。Ho SY 等认为 As_2O_3 通过改变细胞周期检查点来增加放射诱导的凋亡,从而增加放射敏感性[15]。这些研究均提示我们 As_2O_3 可作为放射增敏剂。在本实验中,我们也观察到 As_2O_3 能诱导人肺鳞癌细胞 A2 的 G_2/M 期阻滞,使对射线敏感的 G_2/M 期细胞比例增加,并且使放射抵抗的 S 期细胞比例下降。以上结果提示诱导细胞周期再分布可能是 As_2O_3 放射增敏作用的机理之一。在本研究中 MTT 实验结果表明,As_2O_3+ 照射组细胞存活分数较 As_2O_3 组及单纯照射组明显下降,观察照射后 24、48、72、96 h 4 个时间点,随时间延长细胞存活分数下降更明显($P<0.01$)。集落形成实验结果也表明 As_2O_3+ 照射组细胞集落形成率较 As_2O_3 组及单纯照射组明显下降,差异具有显著性统计学意义($P<0.01$)。MTT 实验和集落形成实验皆证实 As_2O_3 对人肺鳞癌 A2 细胞具有辐射增敏作用。免疫荧光测定 Bcl-2 蛋白的表达结果显示,As_2O_3+ 照射组 Bcl-2 基因表达阳性率明显下降,由单纯 As_2O_3 组和单纯照射组的 60.26%、54.69%,下降到联合组的 27.62%($P<0.01$)。本实验结果提示 As_2O_3 的放射增敏作用可能与 As_2O_3 能使肺癌细胞阻滞在放射敏感的 G_2/M 期,并且抑制照射后肺癌细胞 Bcl-2 的表达,从而增加肿瘤细胞的凋亡率有关。

目前国内外对 As_2O_3 的临床使用方法及安全性研究认为,As_2O_3 用于肿瘤治疗安全有效[16]。深入研究 As_2O_3 对肺癌放射增敏机制,可能对肺癌的治疗带来益处。

参 考 文 献

[1] Parkin D M. Global cancer statistics in the year of 2001[J]. Lancet Oncol,2001,2(9):542-552.

[2] 程剑华,刘伟胜,李志明,等.中医药全程治疗老年晚期非小细胞肺癌的临床研究[J].中国中西医结合杂志,2008,28(1):16.

[3] Pettersson H M,Pietras A,Munksgaard P M,et al. Arsenic trioxide is highly cytotoxic to small cell lung carcinoma cells[J].Mol Cancer Ther,2009,8(1):160-170.

[4] Bonati A,Rizzoli V,Lunghi P. Arsenic trioxide in hematological malignancies:the new discovery of an ancient drug[J].Curr Pharm Biotechnol,2006,7(6):397-405.

[5] Tallman M S. What is the role of arsenic in newly diagnosed APL[J]. Best Pract Res Clin Haematol,2008,21(4):659-666.

[6] 潘琳莉,郝 强,张学勇.三氧化二砷治疗复发性急性早幼粒细胞白血病 12 例临床观察[J].中国中西医结合杂志,2006,26(8):731.

基础研究 文章编号:0253-3626(2011)02-0159-04

Hedgehog 信号通路对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭迁移作用及机制探讨

欧阳小波,郝亚琴,王 立
(重庆医科大学附属第一医院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 Hedgehog(Hh)信号通路对人胃癌 SGC-7901 细胞侵袭迁移的作用及其机制。方法:环靶明特异性阻断 Hh 信号通路后,Transwell 小室和划痕实验检测 SGC-7901 细胞侵袭和迁移的能力;RT-PCR 检测 SGC-7901 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 mRNA 表达;细胞免疫化学检测 SGC-7901 细胞中 MMP-2 和 MMP-9 蛋白表达。结果:阻断 Hh 信号通路能显著抑制 SGC-7901 细胞的侵袭和迁移能力($P<0.05$)。MMP-2 和 MMP-9 的 mRNA 以及蛋白表达亦显著降低($P<0.05$)。结论:Hh 信号通路可能是通过调节 MMP-2 和 MMP-9 的表达促进 SGC-7901 细胞侵袭、迁移。

【关键词】Hedgehog;胃癌;侵袭;迁移;MMP-2;MMP-9
【中国图书分类法分类号】R735-2 【文献标志码】A 【收稿日期】2010-11-02

Investigation into the effect and mechanism of Hedgehog signaling pathway on invasion and migration of human gastric cancer cell line SGC-7901

OUYANG Xiao-bo, et al
(*Department of Gastroemerology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To investigate the effect and mechanism of Hedgehog signaling pathway on invasion and migration of human gastric cancer cell line SGC-7901. *Methods*: After cyclopamine blocked Hh signaling pathway specifically, transwell chamber assay and wound healing assay were used to examine the capacities of invasion and migration of SGC-7901 cells respectively. Reverse transcriptase-polymerase chain reaction (RT-PCR) was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA in SGC-7901 cells. Immunochemistry was used to detect the expression of MMP-2 and MMP-9 protein in SGC-7901 cells. *Results*: The capacities of invasion and migration of SGC-7901 cells could be significantly inhibited after blocking Hh signaling pathway ($P<0.05$). There was lower expression of MMP-2 and MMP-9 mRNA than the

作者介绍:欧阳小波(1983-),女,硕士,
研究方向:消化道肿瘤防治。
通信作者:王 立,女,教授,Email:wangli380@yahoo.com.cn。

[7] Ai Z, Lu W, Ton S, et al. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in gallbladder carcinoma cells via down-regulation of Cyclin D1 transcription mediated by Sp1 transcription factor[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2007, 360(3): 684-689.

[8] Bae-Jump V L, Zhou C, Boggess J F, et al. Arsenic trioxide (As_2O_3) inhibits expression of estrogen receptor-alpha through regulation of the mitogen-activated protein kinase (MAPK) pathway in endometrial cancer cells[J]. Reprod Sci, 2008, 15(10): 1011-1017.

[9] Shen L, Chen T X, Wang Y P, et al. As_2O_3 induced apoptosis of the human B lymphoma cell line MBC-1[J]. J Biol Regul Homeost Agents, 2000, 14(2): 116-119.

[10] Mann K K, Colombo M, Miller W H J. Arsenic trioxide decreases AKT protein in a caspase-dependent manner [J]. Mol Cancer Ther, 2008, 7(6): 1680-1687.

[11] Wang Y, An R, Dong X, et al. Protein kinase C is involved in arsenic trioxide-induced apoptosis and inhibition of proliferation in human bladder cancer cells [J]. Urol Int, 2009, 82(2): 214-221.

[12] Lai Y L, Chang H H, Huang M J, et al. Combined effect of topical arsenic trioxide and radiation therapy on skin-infiltrating lesions of breast cancer-a pilot study[J]. Anticancer Drugs, 2003, 14(10): 825-828.

[13] Carney D A. Arsenic trioxide mechanisms of action-looking beyond acute promyelocytic leukemia[J]. Leuk Lymphoma, 2008, 49(10): 1846-1851.

[14] 王德林,米 粲,陈在贤,等. As_2O_3 对肾癌细胞 786-0 细胞周期的影响及其机制的研究[J].重庆医科大学学报,2007,32(4):362-365.

[15] Ho S Y, Huang P C, Guo H R, et al. Mechanisms of apoptosis induction and cell cycle regulation in irradiated leukemia U937 cells and enhancement by arsenic trioxide[J]. Radiat Res, 2006, 165(4): 390-399.

[16] Au W Y, Kwong Y L. Arsenic trioxide: safety issues and their management[J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(3): 296-304.

(责任编辑:关蕴良)