维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2007)04-0362-04

As_2O_3 对肾癌细胞 786-0 细胞周期的影响及其机制的研究

王德林[1],米 粲[2],陈在贤[1],吴小候[1],苟 欣[1]

(1.重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学院病理教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨三氧化二砷(As_2O_3)对人肾癌细胞系 786-0 的细胞周期、周期素(Cyclin)和周期素依赖性激酶抑制剂(DKI)的影响,探讨 As_2O_3 抗肾癌作用的机制。方法:采用细胞培养、流式细胞技术观察 As_2O_3 作用 786-0 细胞后细胞周期的改变,以免疫细胞化学和 RT-PCR 技术等检测 As_2O_3 致细胞 Cyclin 蛋白和 CDKI 基因的改变。结果:以 2μmol/L 或 5μmol/L As_2O_3 作用 786-0 细胞 24h、48h、72h,使其细胞周期停滞于 G_2/M 和 G_0/G_1 期,并出现细胞凋亡,周期素蛋白 CyclinA、B_1、D_1、E 表达均不同程度降低($P<0.05$),而其 CDKI 基因 p16、$p21^{WAF/CIP1}$、$p27^{kip1}$ 表达升高($P<0.05$)。结论:As_2O_3 通过降低 CyclinA、B_1、D_1、E 蛋白的表达和增强 p16、$P21^{WAF/CIP1}$、$p27^{kip1}$ 活性,将 786-0 细胞阻滞于 G_2/M 和 G_0/G_1 期,达到其抑制增殖和诱导细胞凋亡的作用。

【关键词】As_2O_3;肾癌;786-0 细胞; 细胞周期;凋亡

【中国图书分类法分类号】R69 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-09-30

Influences of arsenic trioxide on the cell cycle of human renal cell carcinoma 786-0 cells in vitro and its mechanisms

WANG Delin, et al

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

【Abstract】*Objective*: To explore the influence of arsenic trioxide on cell cycle, cyclin and cyclin-dependent kinase inhibitor (CDKI) of human renal cell carcinoma 786-0 cells. *Methods*: The change of cell cycle was measured by flow cytometric assay (FCM), and its mechanism was analyzed by immunocytochemistry and reverse transcription polymerase chain reaction. *Results*: Treatment with As_2O_3 of 2μmol/L or 5μmol/L for 24h, 48h and 72h, notably induced a G_2/M and G_0/G_1 cell cycle arrest in 786-0 cells, decreased expression of cyclin A, B_1, D_1, E ($P<0.05$) and increased expressions of CDKI genes p16, $P21^{WAF1/CIP1}$ and $p27^{kip1}$ ($P<0.01$). *Conclusions*: As_2O_3 can inhibit the growth in 786-0 cells effectively by down-regulating expression of cyclinA, B^1, D_1, E and up-regulating expressions of p16, $P21^{WAF1/CIP1}$ and $p27^{kip1}$ genes.

【Key words】Arsenic trioxide; Renal cell carcinoma; 786-0 cells; Cell cycle; Apoptosis

恶性肿瘤细胞不仅有多种基因功能和表达的异常,还存在广泛的细胞周期调节失控,导致细胞分化受阻,使肿瘤细胞呈过度增殖状态[1]。研究证实三氧化二砷(As_2O_3)对肾癌 786-0 细胞有显著的抑制作用[2],As_2O_3 对 786-0 细胞周期的影响及其机制尚不清楚。本实验采用流式细胞术(Flow cytometric assay, FCM)研究 As_2O_3 对人肾癌细胞系 786-0 细胞周期的影响,以免疫细胞化学检测 As_2O_3 处理前后 786-0 细胞中周期素(Cyclin)和周期素依赖性激酶抑制剂(Cyclin-dependent kinase inhibitor, CDKI)的改变,并以逆转录多聚酶链反应(Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)检测 Egr-1 (Early growth response-1, Egr-1) 的变化,探讨 As_2O_3 对 786-0 细胞周期的影响及其作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞培养[2]

786-0 细胞生长于含 10% FCS 的 RPMI 1640 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 1mmol/L 的储备液,使用时以 RPMI 1640 培养基稀释至 2μmol/L 和 5μmol/L, 根据要求分别培养 0.5h、1h、2h、4h、12h、24h、48h、72h 后中止。

作者介绍: 王德林(1968-),男,博士,副教授,主要研究方向:泌尿男生殖系统肿瘤的基础与临床,老年男子部分雄激素缺乏。

基金项目: 重庆市自然科学基金(CSTC. 2004 BB 5109)和重庆市卫生局资助项目(渝卫科教 032088)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 流式细胞术检测细胞周期

2.5×10^4/ml 786-0 细胞密度悬液接种培养，2μmol/L 和 5μmol/L As_2O_3 作用 24h、48h 和 72h，收集细胞总数约 1×10^6。以 0.01mol/L 冰 PBS(pH7.4)洗细胞后，缓慢加入 -20℃预冷的 70% 乙醇 1.5ml 固定细胞，充分震荡，使细胞分散，4℃保存待测。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 488nm 激发波长测定，并用 LYSIS/Modfit LT2.0 软件分析细胞周期的分布。

1.3 免疫细胞化学染色[11]

将经过 2μmol/L As_2O_3 处理 72h，爬片培养并丙酮固定的 786-0 细胞分别与鼠抗人周期素蛋白 Cyclin A、B、D、E 和 CDKI 基因 p16、$p21^{WAF1/CIP1}$、$p27^{kip1}$ 单克隆抗体(福建迈新生物技术开发公司)4℃结合 24h，再与生物素标记二抗 25℃孵育 30min，再滴加链霉抗生物素蛋白—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，随机摄取标本，图片输入计算机，应用北航 CM-2000B 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

分对照组和 2μmol/L As_2O_3 处理组，分别处理 0.5h、1h、2h、4h、12h、24h 后中止，收集细胞总数约 1×10^7 于 E-P 管中，立即加入 1ml Trizol(上海生物工程有限公司)，提取总 RNA，-20℃保存。取 2μl RNA 样品稀释后在 752 型紫外分光仪测定总 RNA 含量，根据 RNA 在 260nm 和 280nm 的吸光度的比值(≥1.8)和 1% 琼脂糖凝胶电泳 28s 和 18s RNA 条带比值≥1.5 鉴定 RNA 纯度。RNA 浓度(μg/ml)=OD260×40×稀释倍数。逆转录反应按第一链 cDNA 合成(RT)试剂盒(上海生物工程有限公司)操作步骤进行，于 200μl 反应管中加入总 RNA(1μg/μl)2μl，Random hexamer 引物 1μl，无核酸去离子水 9μl，70 ℃孵育 5 min，再加入 5×反应缓冲液 4μl，核酸酶抑制剂(20U/μl)1μl，10mmol/L dNTPs 2μl，25℃孵育 5min。最后加入 M-MuLV 逆转录酶(20U/μl)1μl，25℃孵育 10min，再 37℃孵育 60min，最后 70℃孵育 10min 终止反应。PCR 反应体系(大连宝生物公司)为 25μl，包括 10×PCR buffer 2.5μl、10mmol/L $MgCl_2$ 2.5μl、10mmol/L dNTPs 1μl、20mmol/L 引物 1 和引物 2 各 1μl(Egr-1：5'-CTGCACGCCTTCTCAGTGTTC-3，5'-AG-CA GCATCATCTCCTCCAG-3'200bp；β-actin：5'-GAC-TACCTCATGA AGATCCT-3'，5'-CGCGCATGTCCACGTCA-CACT-3'，313 bp)[12-14]，5U/μl Taq DNA polymerase 0.5μl，cDNA 4μl，ddH_2O 12.5μl。用 GeneAMP PCR System 9600 PCR 仪(美国 PE 公司)，94℃先孵育 5min，然后 94℃变性 1min，55℃退火 1min，72℃扩增 2min，40 周期，最后 72℃扩增 10min。取 PCR 扩增产物 5μl 在 1.5% 琼脂凝胶(含 0.5μg/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。mRNA 的相对含量＝目的基因条带积分光密度值/内参照 β-actin 基因条带积分光密度值。

1.5 统计学处理

所有数据均用 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用统计软件包 SAS 6.12 进行数据统计分析。两组均数比较采用 t 检验，以 $P<0.05$ 为差异具有显著统计学意义，以 $P<0.01$ 为差异具有非常显著性统计学意义。

2 结 果

2.1 As_2O_3 对 786-0 细胞周期的影响

不同浓度处理 786-0 细胞 24~72h 的细胞周期见图 1。与对照组比较，经不同浓度 As_2O_3 处理不同时间的 786-0 细胞，处于 G_2/M 期和 G_0/G_1 期者显著增多，S 期者则明显减少，表现为 G_2/M 期和 G_0/G_1 期阻滞。

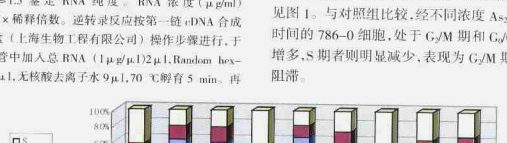


图 1 不同浓度(μmol/L)As_2O_3 处理 24h、48h 和 72h 对 786-0 细胞周期的影响(%)

2.2 免疫细胞化学结果

细胞 cyclinA、cyclinD1、cyclinE 蛋白的表达位于胞核，而 cyclinB1 蛋白表达位于胞质，细胞 CDKI 基因 p16、$P21^{WAF1/CIP1}$、$p27^{kip1}$ 的蛋白表达均位于胞核。对照组均呈中-强阳性反应，经 2μmol/L As_2O_3 处理 72h 后，胞核 cyclinA、cyclinD1、cyclinE 和胞质 cyclinB1 的蛋白表达呈弱阳性，前后平均光密度值(AOD)变化有显著意义($P<0.05$)；而对照组细胞 CDKI 蛋白均为弱阳性表达，经 2μmol/L As_2O_3 处理 72h 后，胞核 p16、$P21^{WAF1/CIP1}$ 和 $p27^{kip1}$ 的蛋白表达明显增强，为中-强阳性，呈棕黄色，前后平均光密度值(AOD)变化亦有显著差异(表 1、表 2、图 2)。

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 As_2O_3 对 786-0 细胞中细胞周期蛋白表达的影响 (平均光密度值)

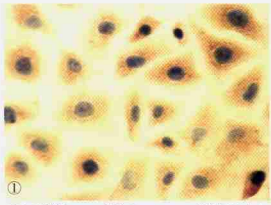
分组	cyclinA	cyclinB_1	cyclinD$_1$	cyclinE	P
对照组	0.18±0.03	0.12±0.02	0.15±0.02	0.11±0.01	P<0.01
处理组	0.10±0.02*	0.06±0.01	0.04±0.01	0.05±0.01	

*P<0.05 vs control group

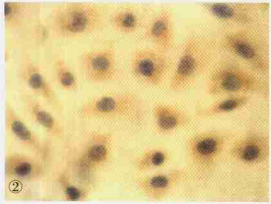
表 2 As_2O_3 对 786-0 细胞中 CDKI 基因表达的影响 (平均光密度值)

分组	p16	P21^{WAF1}	p27^{KIP1}	P
对照组	0.07±0.01	0.04±0.01	0.06±0.02	P<0.05
处理组	0.29±0.04*	0.09±0.02	0.15±0.03	

*P<0.01 vs control group



①为对照组 786-0 细胞质 Cyclin B1 呈强阳性表达

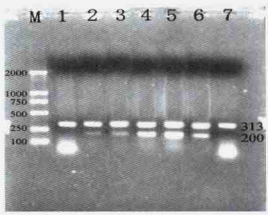


②为 2 μmol/L As_2O_3 处理 72h 后 786-0 细胞质 Cyclin B1 呈弱阳性表达(SP×200)

图 2 As_2O_3 处理前后 786-0 细胞质 Cyclin B1 蛋白的表达 (免疫细胞化学)

2.3 Egr-1 mRNA 表达的改变

以 RT-PCR 分析显示,与细胞生长和分化相关的基因 Egr-1。在 2μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞后,可以短时间诱导该基因的表达,0.5h 后开始表达,4h 达到高峰后降低(图 3)。



M Marker PRL2000;
1 0h;2 0.5h;3 1h;4 2h;5 4h;6 12h;7 24h

图 3 2μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞不同时间后 Egr-1 mRNA 表达的改变(RT-PCR)

3 讨 论

恶性肿瘤细胞常存在细胞周期的调节失控。细胞周期有 G0/G_1、G_1/S 和 G_2/M 3 个调控点,其调控因子包括细胞周期素(Cyclin)、周期素依赖性激酶(CDK)和周期素依赖性激酶抑制剂(CDKI),它们也是参与细胞癌变过程的调节位点,其中 Cyclin 是正性调控因子,而 CDKI 是负性调节因子。目前发现 Cyclin 至少有 11 种,从 CyclinA 至 CyclinH,CDKI 主要有 p15、p16、P21$^{WAF1/CIP1}$ 和 p27^{KIP1} 等蛋白[1]。研究报告 As_2O_3 可使恶性胶质细胞瘤 U87MG 和 T98G 阻滞于 G_2/M 和 G1 期,使胰腺癌细胞停滞于 G_0/G_1 和 G_2/M 期,使神经母细胞瘤、小细胞肺癌、卵巢癌、宫颈癌和乳腺癌等细胞系发生 G_2/M 期阻滞,认为 As_2O_3 可能为周期特异性药物[2-5]。本实验结果发现,经 2μmol/L 或 5μmol/L 浓度 As_2O_3 处理 24h、48h 和 72h 后,786-0 细胞处于 G_2/M 期和 G_0/G_1 期的细胞显著增多,而 S 期细胞则明显减少,提示 As_2O_3 可以导致 786-0 细胞 G_2/M 和 G_0/G_1 期阻滞。

As_2O_3 影响肿瘤细胞周期的机制可能通过降低 CyclinB1 蛋白的表达来抑制细胞经过 G_2/M 期,而通过抑制 CyclinD1 导致细胞阻滞于 G_1 期[6-8]。CyclinA 和 CyclinB$_1$ 在 S 期和 G_2 期活性最高,主要促使 G_2 期向 M 期转换,使细胞进入有丝分裂,而 CyclinD1 和 CyclinE 在 G_1 期活性最高[10]。本实验发现,经过 2μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞 72h 后,CyclinA、CyclinB$_1$、CyclinD$_1$ 和 CyclinE 的 AOD 分别为由 0.18 降低为 0.10(P<0.05)、0.12 降低为 0.06(P<0.01)、0.15

维普资讯 http://www.cqvip.com

降低为 0.04($P<0.01$)、及 0.11 降低为 0.05($P<0.01$)。结果提示 As_2O_3 可能通过降低 CyclinA 和 CyclinB1 蛋白的表达使肾癌细胞停滞于 G_2/M，并降低 CyclinD$_1$ 和 CyclinE 蛋白的表达，诱导 G_0/G_1 期阻滞。

p16 基因位于人 9p21，是 CDK4 抑制物，与 CyclinD1 竞争结合 CDK4，抑制了 CDK4 激酶活性，阻滞细胞周期 G_1 期进程。$P21^{WAF1/CIP1}$ 基因定位于人 6 p21.1，是 CDK 特异性抑制因子，与 CDK-CyclinB 复合物紧密结合，抑制蛋白激酶的活性，阻滞细胞从 G_1 期进入 S 期，主要负向调节 G_1 期[11,12]。研究发现 As_2O_3 作用恶性胶质细胞瘤后，通过上调 $p21^{WAF1/CIP1}$ 使恶性胶质细胞瘤细胞阻滞于 G1 期[5]。$p27_{kipl}$ 基因位于人 12p12~12 p13.1，与 $P21^{WAF1/CIP1}$ 基因具有一定的同源性，能与所有的 CDK-Cyclin 复合物结合，抑制蛋白激酶的活性，使细胞停滞于 G_1 期。在本实验中，经过 2μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞 72h 后，p16、$P21^{WAF1/CIP1}$ 和 $p27^{KIP1}$ 的 AOD 分别由 0.07 升高为 0.19($P<0.01$)，0.04 高为 0.09($P<0.05$)和 0.06 升高为 0.15($P<0.05$)。提示 As_2O_3 通过增强 p16、$P21^{WAF1/CIP1}$ 和 $p27^{kipl}$ 等的活性[13]，提高了它们与 CDK-Cyclin 复合物结合能力，抑制蛋白激酶的活化，阻滞了 786-0 细胞的细胞周期。

Egr-1 是早期生长反应基因家族的一种，常在细胞受刺激后数分钟内启动表达，与细胞的生长和分化有关[14]。研究证实肿瘤抑制剂 genistein 作用人膀胱癌细胞 TCCSUP 和 TSGH-8301，均可出现 Egr-1 基因短暂的活性表达，但其机制尚不清楚[3]。本实验还观察到，在 2μmol/L As_2O_3 处理 786-0 细胞 0.5h 后，开始检测到 Egr-1 mRNA 的表达，并随时间延长而增加，在 4 h 达到高峰后下降，24h 后消失。这一现象进一步证实 As_2O_3 能够迅速启动 786-0 细胞内的相关基因，产生抗肾癌的作用。我们推测，As_2O_3 作用 786-0 细胞后迅速启动 Egr-1 等早期反应基因的表达，与相关靶基因的启动子结合，进而激活相关基因，调节 CyclinA、CyclinB1、CyclinD1、CyclinE、p16、$P21^{WAF1/CIP1}$ 和 $p27^{KIP1}$ 等蛋白的表达，导致 786-0 细胞发生相应的细胞周期阻滞[15]。

参 考 文 献

[1] 曾昭淳.细胞周期[M].第 1 版，北京：中国协和医科大学出版社，2000.221-237.

[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(4)：50-54.

[3] Chen CC，Shieh B，Jin YT，et al.Microarry profiling of gene expression patterns in bladder tumor cells treated with genistein[J].J Biomed Sci，2001；8:214-222.

[4] Ohnamis 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.

[5] *Zhao S，Tsuchida T，Kawakami K，et al.Effect of As2O3 on cell* cycle progression and cyclinD1 & B1 expression in two glioblastoma cell lines differing in p53 status[J]. Int J Oncol，2002；21(1)：49-55.

[6] Li X，Ding X，Adrian TE.Arsenic trioxide inhibits proliferation and induces apoptosis in pancreatic cancer cells[J].Anticancer Res，2002；22(4)：2105-2213.

[7] Li X，Ding X，Adrian TE.Arsenic trioxide induces apoptosis in pancreatic cancer cells via changes in cell cycle，caspase activation，and GADD expression[J].Pancreas，2003；27(2)：174-179.

[8] Ling YH，Jiang JD，Holland JF，et al.Arsenic trioxide produces polymerization of microtubles and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines[J].Mol Pharmol，2002；62(3)：529-538.

[9] Woo SY，Lee MY，Jung YJ，et al.Arsenic trioxide inhibits cell growth in SH-SY5Y and SK-N-AS neuroblastoma cell lines by a different mechanism[J].Pediatr Hematol Oncol，2006；23(3)：231-243.

[10] Cordon-Cardo C.Mutations of cell cycle regulators：biological and clinical implications for human neoplasia[J].Am J Pathol，1995；147(3)：545-560.

[11] Taylor BF，Mcneely SC，Miller HL，et al.p53 suppression of arsenite-induced mitotic catastrophe is mediated by p21CIP1/WAF1 [J].J Pharmacol Exp Ther，2006；318(1)：142-151.

[12] Li W，Sanki A，Karim RZ，et al.The role of cell cycle regulatory proteins in the pathogenesis of melanoma[J].Pathology，2006；38(4)：287-301.

[13] Huang HS，Liu ZM，Ding L，et al.Opposite effect of ERK1/2 and JNK on p53-independent p21WAF1/CIP1 activation involved in the arsenic trioxide-induced human epidermoid carcinoma A431 cellular cytotoxicity[J].J Biomed Sci，2006；13(1)：113-125.

[14] Liu J，Lacy J，Sukhatme VP，et al.Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor induces transcriptional activation of Egr-1 in murine peritoneal macrophages[J].J Biol Chem，1991；266(9)：5929-5933.

[15] Xiao D，Chinnappan D，Pestell R，et al.Bombesin regulates cyclin D1 expression through the early growth response protein Egr-1 in prostate cancer cells[J].Cancer Res，2005；65(21)：9934-9942.