维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2005)04－0570－04

砷剂对乳腺癌 MCF－7 和 MCF－7/ADR 细胞生长抑制作用的比较研究

印国兵,吴诚义

(重庆医科大学附属第一医院普外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨 As_2O_3 对人乳腺癌 MCF－7 细胞和多药耐药 MCF－7/ADR 细胞生长抑制作用的差异。方法:采用 MTT 还原法、光镜、电镜和流式细胞术等方法检测 As_2O_3 对 MCF－7 和 MCF－7/ADR 细胞的生长抑制作用和诱导凋亡的情况。结果:As_2O_3 对 MCF－7 和 MCF－7/ADR 细胞均有生长抑制作用,并呈时间剂量依赖关系,96h 的 IC_{50} 值分别为 3μmol/L 和 12.8μmol/L,形态学检测显示其抑制作用主要源于凋亡;在相同作用时间及浓度下,As_2O_3 对 MCF－7 细胞的抑制率显著高于 MCF－7/ADR 细胞,起效时间亦早于后者。结论:As_2O_3 能诱导乳腺癌 MCF－7 和 MCF－7/ADR 细胞凋亡;MCF－7/ADR 细胞虽对 As_2O_3 表现耐药,但耐药倍数较低(4.27)。

【关键词】砷剂;乳腺癌;凋亡;耐药

【中国图书分类法分类号】R737.9 【文献标识码】A 【收稿日期】2004－12－01

The comparative study of growth inhibition effect of arsenic trioxide on human breast cancer MCF－7 and MCF－7/ADR cell

YIN Guobing, et al

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

【Abstract】*Objective*: To explore the difference between the growth inhibition effect of arsenic trioxide(As_2O_3)on the human breast cancer MCF－7 and multidrug resistance MCF－7/ADR cell line. *Methods*: MCF－7 and MCF－7/ADR cell was cultured with 0.5μmol/L～16μmol/L arsenic trioxide in vitro. MTT test was adopted to detect the growth suppression effect of As_2O_3 in the two cell lines. Apoptosis morphology was studied with light microscope and electron microscope. Apoptosis ratio was analysed with flow cytometry. *Results*: As_2O_3 could inhibit the proliferation of the MCF－7 and MCF－7/ADR cell line, especially that of 2μmol/L～16μmol/L, and the effect was dose－and－time dependent. The IC_{50} at 96h was 3.0μmol/L for MCF－7 and 12.8μmol/L for MCF－7/ADR. Cell morphology and flow cytometry revealed the growth suppression was caused mainly by apoptosis rather than necrosis; however, to obtain the same inhibitory level, MCF－7/ADR cell required higher concentration of As2O3 and longer processing time. *Conclusion*: As_2O_3 can inhibit the proliferation in MCF－7/ADR cell as well as MCF－7 cell, though MCF－7/ADR cell is tolerant to As_2O_3, but the tolerance is at a low level.

【Key words】Arsenic trioxide; Breast cancer; Apoptosis; Drug resistance

三氧化二砷(As_2O_3)对多种实体瘤具有生长抑制和诱导凋亡的作用,但其对乳腺癌及多药耐药乳腺癌细胞的作用研究鲜见报道,本文着重探讨 As_2O_3 对人乳腺癌 MCF－7 和 MCF－7/ADR 细胞的诱导凋亡的作用及其差异。

1 材料与方法

1.1 材料

MCF－7 细胞由重庆医科大学附属第一医院外科实验室馈赠,MCF－7/ADR 细胞购自中山医科大学肿瘤研究所。RMPI1640 培养液加 10%胎牛血清(杭州四季青公司产品)。细胞培养于 37℃、5% CO_2 及饱和湿度条件下,MCF－7/ADR 细胞培养液中加入 5μmol/L 的阿霉素维持培养。亚砷酸注射液(含 As_2O_3 1mg/ml, 10mg/支)以生理盐水配成 200μmol/L 储备液,存放于－80℃,临用时以培养液稀释到相应浓度。临用前一天将 MTT 干粉以生理盐水配成 5mg/ml。

作者介绍:印国兵(1974－),男,硕士,主要研究方向:内分泌外科研究。

维普资讯 http://www.cqvip.com

1.2 MTT 实验

MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞均按 As_2O_3 0.5、1.0、2.0、4.0、6.0、8.0、16μmol/L 分为 7 个实验组，设阴性对照和空白对照。将对数生长期的上述两种细胞按 10^3/ml 分别接种于 5 块 96 孔培养板，每孔 200μl，每组设 4 个复孔，重复 3 遍。待细胞贴壁后，更换含有相应浓度 As_2O_3 的培养液，但阴性对照不加 As_2O_3，空白对照只加培养液。加药后每 24h 各取出一块培养板，分别加入 20μl MTT，继续培养 4h，加入 150μl DMSO 振荡溶解 10min，用酶联仪在 570nm 波长下检测各孔的吸光值。

生长抑制率=(阴性对照组 OD 值 - 药物组 OD 值)/阴性对照组 OD 值×100%。

1.3 细胞凋亡的观察

1.3.1 形态学观察 倒置显微镜下每日观察给药前后细胞的大小、形状及长势。

光镜观察：两种细胞均在六孔板内直接于载玻片上培养，于加药 48h 后取出载玻片行 HE 染色，观察细胞大小、形状、分裂像及细胞核的变化。

电镜：培养瓶内的细胞经低浓度和高浓度 As_2O_3 作用 48h 后，酶消化所有贴壁的细胞，与悬浮细胞一并离心，所得细胞团以 2%戊二醛固定，按常规制备标本，透射电镜观察。

1.3.2 流式细胞术测定

细胞经 As_2O_3 作用 48h 后，以酶消化法收集，重悬于 PBS 液，按 1:3 比例逐滴滴入到 -20℃ 预冷 70% 乙醇中，PBS 清洗 3 遍，去除乙醇；用不含 DNA 酶的 RNA 酶消化 30min，去掉 RNA，其间控制细胞浓度为 10^6/ml，然后 PI 染色 30min，上机检测。

1.4 统计学处理

结果用 SAS 8.1 统计软件进行分析。

2 结 果

2.1 MTT 实验结果

不同剂量 As_2O_3 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞的抑制率随时间的变化分别见图 1 和图 2。可见，0.5μmol/L～1.0μmol/L 的 As_2O_3 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞抑制作用都较弱，而 2μmol/L～16μmol/L 的 As_2O_3 对两种细胞则显示时间剂量依赖关系的抑制作用；其 96h 的 IC_{50} 分别为 3.0μmol/L 和 12.8μmol/L。单因素重复测定的方差分析显示作用时间和作用浓度对两种细胞都有正向的交互作用，在相同条件下，As_2O_3 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞抑制率的两两比较差异有显著性($P<0.05$)，前者的抑制率明显高于后者，起效时间也早于后者。

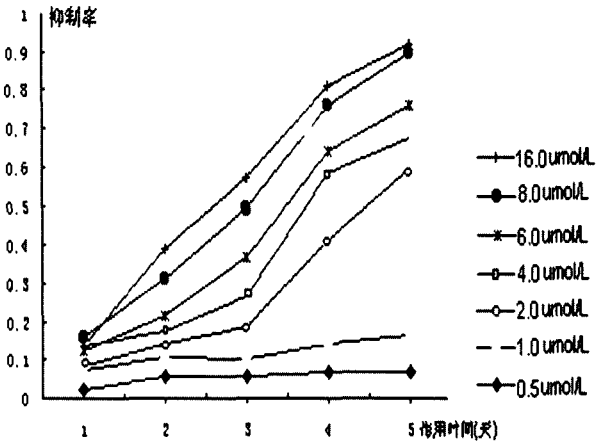


图 1 As_2O_3 对 MCF-7 细胞的生长抑制作用

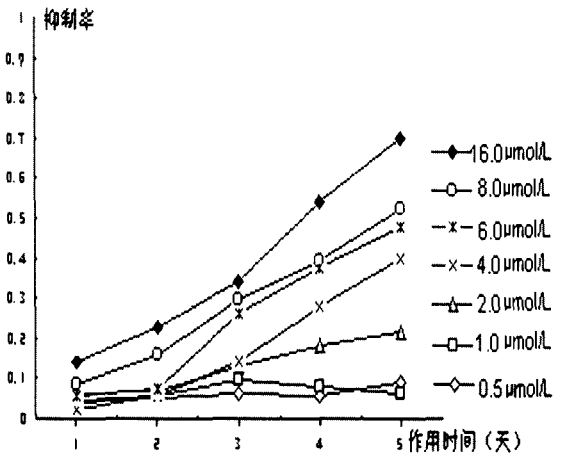


图 2 As_2O_3 对 MCF-7/ADR 细胞的生长抑制作用

表 1 As_2O_3 作用 48h 后

MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞的凋亡率(%)

	1.0umol/L	2.0umol/L	4.0umol/L	6.0umol/L	8.0umol/L	16umol/L
MCF-7	4.74	4.77	5.75	9.09	16.57	17.83
MCF-7/ADR	未测出	未测出	4.04	6.16	8.50	11.76

2.2 形态学观察结果

给药前，两种细胞生长旺盛，倒置显微镜下观察细胞呈多角形或梭形，均匀分布于瓶底，悬浮细胞少见。给药后，0.5μmol/L～1μmol/L 的 As_2O_3 对 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞形态无明显影响；2μmol/L～16μmol/L 的 As_2O_3 作用于 MCF-7 和 MCF-7/ADR 细胞后，可见细胞透光度降低，体积缩小，出现中毒颗粒，可见圆形、椭圆形和悬浮细胞，并随作用浓度和作用时间的增加而增加。

光镜下观察的结果与倒置显微镜下观察结果类似，另发现 2μmol/L～16μmol/L 的 As_2O_3 作用 48h 后的 MCF-7 细胞和 6μmol/L～16μmol/L 的

维普资讯 http://www.cqvip.com

As_2O_3 作用 48h 后的 MCF－7/ADR 细胞出现染色质边集、核溶解、核碎裂等现象，并可见凋亡细胞和凋亡小体。

电镜下观察：MCF－7 细胞 2μmol/L 组主要为胞浆空泡化（图 3），6μmol/L 组见到凋亡细胞（图 4）。MCF－7/ADR 细胞 2μmol/L 组仅有线粒体肿胀表现（图 5）；6μmol/L 组见到凋亡细胞（图 6）。

2.3 流式细胞术结果

不同浓度 As_2O_3 作用 48h 后，MCF－7 细胞在 1.0μmol/L～16μmol/L As_2O_3 作用下均见到随剂量的增加而加强的亚 G1 峰。MCF－7/ADR 细胞在 1.0μmol/L 和 2.0μmol/L As_2O_3 作用下未见到亚 G1 峰出现，4μmol/L～16μmol/L 才见到随剂量增加而加强的亚 G1 峰（表 1）。



图 3 MCF－7 细胞 2μmol/L As_2O_3 作用 48h，胞浆空泡化（电镜 15000 倍）

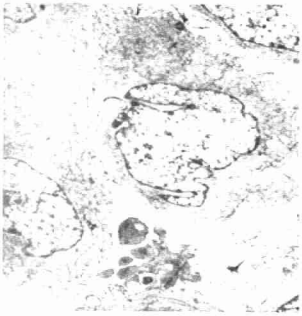


图 4 MCF－7 细胞 6μmol/L As_2O_3 作用 48h，出现凋亡小体（电镜 5000 倍）

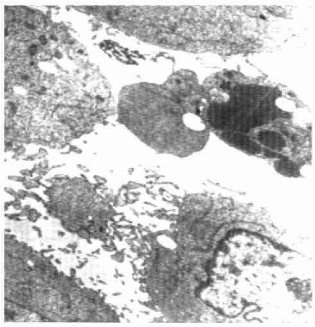


图 5 MCF－7/ADR 细胞 2μmol/L 组，仅见到线粒体肿胀（电镜 6000 倍）

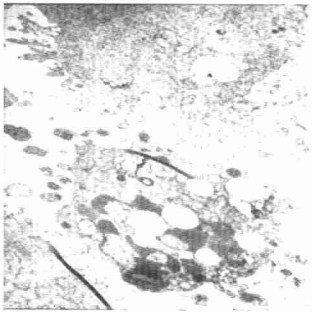


图 6 MCF－7/ADR 细胞 6μmol/L 组出现凋亡小体伴胞浆空泡化（电镜 8000 倍）

3 讨 论

本实验发现，0.5μmol/L～16μmol/L 的 As_2O_3 对 MCF－7 细胞均有生长抑制作用，其中，0.5μmol/L～1μmol/L 的 As_2O_3 抑制作用较弱，2μmol/L～16μmol/L 的 As_2O_3 则显示明显的生长抑制作用，并随作用时间和作用浓度的增加而增强，但随着 As_2O_3 作用浓度的增加，8μmol/L 和 16μmol/L As_2O_3 的抑制作用渐趋接近，120h 时分别为 89% 和 91%。光镜和电镜观察显示这种生长抑制作用来源于凋亡而非坏死。流式细胞术测定结果表明，凋亡率与 MTT 实验的抑制率呈正相关关系。可见，As_2O_3 对 MCF－7 细胞有良好的增殖抑制作用，并主要通过诱导 MCF－7 细胞的凋亡实现，与文献报

维普资讯 http://www.cqvip.com

道一致。

从 As_2O_3 应用于临床治疗恶性肿瘤的十余年历史来看，关于恶性肿瘤对其耐药的问题尚有争论。早期的临床观察认为其耐药率低，甚至无耐药情况，对传统化疗药物耐药的肿瘤改用 As_2O_3 治疗后，也能成功地诱导其完全缓解[1]。同时，Perkins 等[2]的体外实验证实其在治疗浓度下能有效抑制耐药相关基因 MDR、MRP 以及 BCL－2 高表达的肿瘤细胞的增殖。但是，随着近年来对 As_2O_3 耐药问题研究的深入，这种观点受到质疑，越来越多的研究结果表明高表达多药耐药相关蛋白 MRP1、Pgp 和 GST/GSH 解毒酶系统的癌细胞可对 As_2O_3 产生有效的耐受。Vernhet 等[3,4]以肺癌 GLC4 细胞和 MRP1 高表达的 GLC4/Sb30 细胞为研究对象，发现后者对亚砷酸盐、砷酸盐的耐药倍数分别是其母细胞 GLC4 细胞 12.7、16.3 倍，同时，该细胞 MRP1 的表达明显增加。Yang 等[5]研究发现对 As_2O_3 敏感的膀胱癌、APL、胃癌细胞内谷胱甘肽浓度明显低于其他癌细胞。而对砷交叉耐药的多药耐药癌细胞较其敏感的亲代细胞往往含有较高的 GSH 水平。Liu 等[6]则发现长期砷暴露的细胞通过过表达 Pgp，MRP1/MRP2 以及 GST－Pi 对砷产生获得性耐药。

通过研究 As_2O_3 诱导人乳腺癌 MCF－7 和多药耐药 MCF－7/ADR 细胞凋亡的差异，我们发现，As_2O_3 也能抑制 MCF－7/ADR 细胞的增殖，作用机制与 MCF－7 细胞类似，但细胞毒实验表明：① As_2O_3 对 MCF－7/ADR 细胞的抑制率明显低于其亲代 MCF－7 细胞，2μmol/L 的 As_2O_3 作用 120h 两者的抑制率分别为 21.3% 和 59.1%；②其 96h 的 IC50 值高达 12.8μmol/L，显著高于其亲代 MCF－7 细胞；③8μmol/L As_2O_3 达到 50% 的抑制率，MCF－7/ADR 细胞需要 115.2h，而 MCF－7 细胞仅需 72.6h，表明 As_2O_3 对 MCF－7/ADR 细胞的起效时间也晚于 MCF－7 细胞。可见，MCF－7/ADR 细胞较其亲代 MCF－7 细胞对 As_2O_3 有耐药表现。Wang 等[7]报道 MCF－7/ADR 细胞可对阿霉素产生 1000 倍的耐药，与此相比，其对 As_2O_3 的耐药程度较低，仅为 4.27 倍。可见，As_2O_3 在乳癌的治疗方面有良好的应用前景。

参 考 文 献

[1] 张 鹏，王树叶，胡龙虎，等. As_2O_3 治疗急性早幼粒细胞白血病七年总结－附 242 例分析[J]. 中华血液学杂志，2000；21(2)：67－70.

[2] Perkins C, Kim CN, Fang G, et al. Arsenic induces apoptosis of multidrug－resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr－Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl－2, or Bcl－x(L)[J]. Blood, 2000；95(3)：1014－1022.

[3] Laurent Vernhet, Nathalie Allain, Lea Payen, et al. Resistance of human multidrug resistance－associated protein 1 overexpressing lung tumor cells to the anticancer drug arsenic trioxide[J]. Biocheical Pharmacology, 2001；(61)：1387－1391.

[4] Vernhet L, Seite MP, Allain N, et al. Arsenic induces expression of the multidrug resistance－associated protein 2 (MRP2) gene in primary rat and human hepatocytes[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2001；298(1)：234－239.

[5] Yang CH, Kuo ML, Chen JC, et al. Arsenic trioxide sensitivity is associated with low level of glutathione in cancer cells. Br J Cancer, 1999；81(5)：796－799.

[6] Liu J, Chen H, Miller DS, et al. Overexpression of glutathione S－transferase II and multidrug resistance transport proteins is associated with acquired tolerance to inorganic arsenic [J]. Mol Pharmacol, 2001；60(2)：302－309.

[7] Wang F, Jiang X, Yang DC, et al. Doxorubicin－gallium－transferrin conjugate overcomes multidrug resistance: evidence for drug accumulation in the nucleus of drug resistant MCF－7/ADR cells[J]. Anticancer Res, 2000；20(2A)：799－808.