维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)02－0162－04

三氧化二砷与奥曲肽联用抑制人肝癌细胞株的增殖和诱导凋亡的作用

张 霞[1], 陶小红[1], 汤为学[2], 谯 敏[1]

(1.重庆医科大学临床学院消化内科,重庆 400016;2.重庆医科大学基础医学院病生教研室,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究三氧化二砷(As_2O_3)与奥曲肽(octreotide)联用对肝癌细胞生长增殖及细胞凋亡的作用,探讨其对肝癌的作用机制。方法:应用 As_2O_3 和 octreotide 共同处理肝癌细胞株 SMMC－7721,通过 MTT 法检测细胞存活率;用流式细胞术检测细胞周期变化及细胞凋亡率;透射电镜观察细胞形态变化及细胞凋亡情况。结果:As_2O_3 与 octreotide 联用可明显抑制 SMMC－7721 的生长,两药合用的中效浓度分别为 2.0221μmol/L 和 8.088μmol/L,较两药单用时的中效浓度低(As_2O_3 单用为 3.707μmol/L,octreotide 单用为 22.637μmol/L)。且两药合用可将肝癌细胞阻滞于 S 期并可诱导细胞凋亡。结论:As_2O_3 可与 Octreotide 协同抑制人肝癌细胞株的增殖,又能诱导其凋亡。

【关键词】三氧化二砷;奥曲肽;联合应用;增殖;凋亡;肝细胞癌

【中国图书分类法分类号】R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－06－18

Effects of combination of arsenic trioxide and octreotide on proliferation and cellular apoptosis in human hepatocellular carcinoma

ZHANG Xia, et al

(*Department of Gastroenterology, College of Clinical Medicine, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the effects of combination of arsenic trioxide and octreotide on the proliferation and apoptosis of hepatocellular carcinoma cells(HCC), and to explore the mechanism of their action on liver cancer. *Methods*: Heptocellular carcinoma cell SMMC－7721 was treated with arsenic trioxide and octreotide. Cell survival rate was determined by MTT assay; cell cycle and the apoptosis index were determined by flow cytometry (FCM); the morphological changes were observed by transmission electron microscope. *Results*: The combination of arsenic trioxide and octreotide significantly inhibited the growth of SMMC－7721 and the concentration of each drug in combination is 2.022μmol/L and 8.088μmol/L that was less than single use of arsenic trioxide (3.707μmol/L)and octreotide (22.637μmol/L). The combination of two drugs can arrest HCC in S phases and induce apoptosis. *Conclusion*: Arsenic trioxide can enhance the antiproliferative effect of octreotide to human HCC and induce apoptosis.

【Key words】Arsenic trioxide; Octreotide; Anticancer drug combination; Proliferation; Apoptosis; Hepatocellular carcinoma

三氧化二砷(As_2O_3)是中药复方青黛、砒霜等的主要有效成分,20 世纪 70 年代将其用于维甲酸治疗失败的急性早幼粒细胞性白血病,取得了满意的临床效果,完全缓解率达到 90%以上。近来的研究发现 As_2O_3 在体外对人的肝癌细胞株有抑制增殖、诱导凋亡的作用[1]。有研究证实 As_2O_3 较某些化疗药物具有更强的诱导肝癌细胞凋亡的效应[2]。As_2O_3 与其他抗肿瘤药物杀伤肿瘤细胞的协同作用及其机制国内外尚未见文献报道。本文采用 MTT 法观察 As_2O_3 与 octreotide 联用对人肝癌细胞株 SMMC－7721 的抗肿瘤活性,检测两药是否具有协同作用。用流式细胞术检测细胞周期变化,透射电镜观察细胞形态变化及细胞凋亡的情况,以探讨 As_2O_3 作为抗癌药物与 octreotide 联合用药的特性和临床应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 材料

作者介绍:张 霞(1962－),女,主治医师,硕士,主要研究方向:消化道肿瘤的治疗。

维普资讯 http://www.cqvip.com

人肝癌细胞株 SMMC－7721，由重庆医科大学肝研所惠赠。RPMI－1640 培养液（美国 Hycalon 公司），小牛血清（杭州四季青生物制品有限公司）。噻唑蓝（MTT）、二甲基亚砜（DMSO）、碘化丙啶（PI）（美国 Sigma 公司），自动酶标读数仪 550（日本 BIO－RAD 公司）。倒置显微镜（日本 NIOKO 公司），CO_2 孵箱（日本株式会社）。As_2O_3（哈尔滨伊达药业有限公司），奥曲肽（Octreotide）（瑞士诺华制药有限公司），使用时用 RPMI－1640 配成所需要的浓度。流式细胞仪（FACScan Becton Dickinson，USA）。透射电镜（Hitachi－600 型，Japan）

1.2 方法

1.2.1 细胞培养及四唑蓝快速比色法（MTT）[3] 检测抑制率 将人肝癌细胞株 7721 用含 10% 小牛血清 RPMI－1640 培养液，在 37℃ CO_2 孵箱中培养。实验设试剂对照组、肿瘤细胞对照组和各种不同浓度药物的实验组。采用 MTT 法，用 0.1% 胰蛋白酶处理对数生长期的 7721 细胞，调整细胞密度为 5×10^4 个/ml，以每孔 200μl 接种于 96 孔培养板中，24h 细胞贴壁后弃去培养液，实验组加入含不同浓度 As_2O_3 和 octreotide 的培养液 200μl，使 As_2O_3 的终浓度分别为 0.5、1、2、4、8μmol/L，octreotide 的终浓度分别为 2、4、8、16、32μmol/L，两药合用比例为 1∶1（每种单药剂量浓缩 1 倍，各加 100μl）。对照组则加等量相同不含药物的培养液。每个剂量 3 个平行孔。在 CO_2 孵箱中培养 72h 后，每孔中加入 0.5% MTT20μl 继续培养 4h，弃上清，加入 200μl DMSO，微量振荡至 MTT 完全溶解，于自动酶标读数仪 570nm 处测定各孔 OD 值。重复 3 次，求平均值。并用下列公式计算药物对细胞抑制率。

细胞抑制率 = 1 － 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值

1.2.2 药物联合作用的效应计算 对每一种药物，所用的浓度不同，则有不同的作用效应即抑制率（f_a）= 1 － 实验组平均 OD 值/对照组平均 OD 值[3]。根据中效方程式 $f_a/f_u=(D/D_m)^m$[4]，两边取对数后呈直线关系式 $Y=\log f_a/f_u$，$X=\log D$，$Y=bx+a$（f_a 为效应，$f_u=1-f_a$，D 为药物浓度，m 为斜率，D_m 为中效浓度。计算出两种药物单用及合用时各自的中效浓度 D_m（$\log D_m=-a/b$），然后可计算出两药合用时在各种效应时的合用指数 CI。CI＜1 协同，CI＝1 相加，CI＞1 拮抗。

1.2.3 流式细胞仪（FCM）检测 收集经 10μmol/L octreotide、2μmol/L As_2O_3 以及 4μmol/L octreotide + 1μ mol/L As_2O_3 作用的细胞和对照组细胞，用 0.1% 胰蛋白酶消化，离心（1000r/min，10min），弃上清，PBS 洗涤 2 次（1000r/min，5min），以去除细胞碎片，将等体积的细胞悬液和 PI 染液混匀，4℃ 放置 30min，上机测定，并用 ModFit 软件分析细胞周期分布及凋亡情况。

1.2.4 透射电镜观察 收集经上述浓度药物作用的细胞和对照组细胞，用 0.1% 胰蛋白酶消化，离心（1000r/min，10min），弃上清，PBS 洗涤 2 次（1000r/min，5min），再用 3% 戊二醛前固定，10g/L 锇酸后固定，梯度脱水，环氧树脂 618 包埋，聚合，超薄切片，透射电镜观察摄片。

2 结 果

2.1 As_2O_3 与 octreotide 联用对 7721 细胞增殖的影响

由表 1 可见 octreotide 与 As_2O_3 联用时，随着两药各自浓度的升高，抑制增殖的作用逐渐增强，效应逐渐增高。

2.2 两药合用时，计算在不同效应时的合用指数 CT，判断两药在不同效应时所需药物浓度之间的相互作用是协同、相加还是拮抗。结果表明，三氧化二砷联合奥曲肽在＜0.3 效应水平 CI＞1，在＞0.3 效应（尤其是较高药物浓度）时 CI＜1，相互之间表现为协同作用，结果见图 1。

2.3 octreotide 与 As_2O_3 联用对细胞形态的影响

透射电镜观察，1μmol/L As_2O_3 与 4μmol/L octreotide 联合处理 7721 细胞后，形成典型的凋亡肝癌细胞，细胞周边可见较多凋亡小体。细胞异染色质边聚，呈团块状，见图 2。未用药物处理（对照组）的细胞核较大，核仁明显，常染色质丰富，核内有两个假性包涵物，细胞器较少，表面有短小的微绒毛，见图 3。

表 1 As_2O_3 与 octreotide 单用及合用时对 7721 细胞增殖的抑制（$\bar{x}\pm s$，$n=9$）

octreotide μmol/L	As_2O_3					
		0.5	1	2	4	8
0	—	0.071±0.006	0.171±0.003	0.312±0.005	0.470±0.003	0.820±0.003
2	0.151±0.004	0.193±0.004	—	—	—	—
4	0.186±0.002	—	0.341±0.003	—	—	—
8	0.300±0.002	—	—	0.417±0.002	—	—
16	0.386±0.003	—	—		0.612±0.005	—
32	0.614±0.005	—	—	—	—	0.871±0.005

维普资讯 http://www.cqvip.com

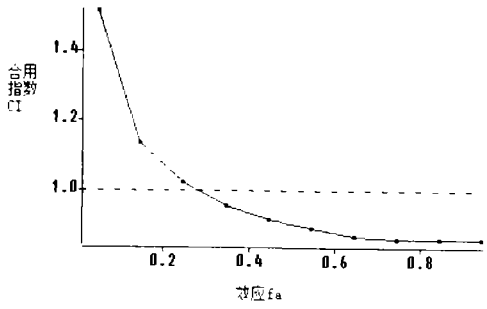


图 1 三氧化二砷与奥曲肽合用时效应与合用指数的关系

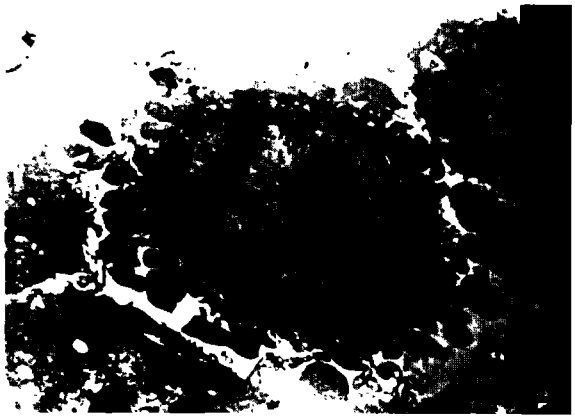


图 2 1μmol/L As_2O_3 与 4μmol/L octreotide 联合处理后的 7721 细胞(TEM×4000)



图 3 未用药物处理(对照组)的 7721 细胞(TEM×4000)

2.4 As_2O_3 与 octreotide 联用对细胞周期的影响及诱导细胞凋亡情况

octreotide 与 As_2O_3 均可改变细胞周期的分布，单用 octreotide 时 G_0/G_1、G_2-M 期细胞比例减少，S 期细胞比例增加；单用 As_2O_3 时 G_0/G_1、S 期细胞比例增加，G_2-M 期细胞比例减少；两药合用时 S 期细胞比例明显增高，G_0/G_1、G_2-M 期细胞比例减少，主要表现为 S 期阻滞作用，见表 2。

表 2 As_2O_3 与 octreotide 对 7721 细胞周期的影响及细胞凋亡率(%)

分组	凋亡率	细胞周期		
		G_0/G_1	S	G_2-M
对照组	—	70.12	20.53	9.35
As_2O_3 组	31.94	73.61	23.57	2.81
octreotide 组	—	65.71	26.66	7.63
联用组	11.47	60.81	37.23	1.96

3 讨 论

As_2O_3 是我国传统中药的一种，俗称砒霜，是近年新发现的细胞凋亡诱导物。有研究证实 As_2O_3 在体外对人的肝癌细胞株有抑制增殖、诱导凋亡的作用[1]。砷剂引起细胞凋亡的可能机理是：砷可直接与蛋白质的巯基结合，影响巯基酶的活性，使蛋白质灭活，引起细胞代谢异常，发生细胞凋亡[5]；还能下调抑凋亡基因 bcl-2，增加促凋亡基因 bax 的表达以及改变两者之间的比例，促使 Fas 基因的表达增强，促进其凋亡[6]。

奥曲肽(商品名：善宁)是生长抑素八肽类似物，它不仅能抑制大多数神经内分泌肿瘤的增殖，对实体瘤诸如：胃癌、肝癌、结肠癌、胰腺癌等也有抑制作用。奥曲肽的抑瘤机制主要是通过与特异性的生长抑素受体(SSTR)结合，激活多条信号转导通路[7]而对肿瘤细胞的增殖产生抑制作用。其次通过抑制促肿瘤生长的激素、细胞因子的分泌[8]，抑制肿瘤血管的生成减少其血供及对肿瘤生长的免疫调节[9]，从而抑制肿瘤细胞的增殖。

本实验研究结果亦表明 octreotide 能抑制体外培养的人 HCC 株的增殖，而 As_2O_3 不仅能抑制体外培养的人 HCC 的增殖，而且具有诱导凋亡的作用。当 octreoride 与 As_2O_3 联合应用时后者能显著增强对人 HCC 株的抑制，两药合用具有明显的协同杀伤作用，尤其是在>0.3 效应(较高的药物浓度)时协同作用更为显著。如表 1 中 8μmol/L As_2O_3 与 32μmol/Loctreotide 联合应用时，可使 octreotide 的抑制率由单用药时的 0.614 提高到合用时的 0.871 而且能减少 As_2O_3 的浓度(单用 As_2O_3 时，$D_m=3.707\mu mol/L$，两药合用时 As_2O_3 的 $D_m=2.022\mu mol/L$，减少了 1.83 倍)，降低其毒副作用。CaiX 等报道用 As_2O_3 50μmol/d 治疗肝功能正常的急性早幼粒细胞白

维普资讯 http://www.cqvip.com

血病复发患者 47 例,2 周后 1/3 的患者出现肝损害,7 例表现为肝中毒[10]。说明以 As_2O_3 治疗肝功能已受损的肝癌患者可能需要选择更小剂量。

目前 As_2O_3 与 octreotide 协同抗癌作用的机制未见报道。本研究结果提示,两药合用时 As_2O_3、既增强了 octreotide 抑制人 HCC 的增殖能力,又能诱导其凋亡,这可能是两药联合产生明显协同效应的重要原因之一。从表 2 对细胞周期分布的影响中见到,尽管 As_2O_3 组的凋亡率高于联用组,这是因为联用组中 As_2O_3 的浓度为 1μmol/L,低于单用时 2μmol/LAs_2O_3 的浓度。从表 2 中可知 As_2O_3 与 octreotide 联合应用时 S 期阻滞作用明显高于两药单独应用时,说明 As_2O_3 增强了 octreotide 抑制人肝癌细胞的增殖。

根据药物受体动力学规律,若两药在任何剂量条件下合用均不超过其中强药的最大反应,则两药可能作用于同一受体。本实验中 As_2O_3 与 octreotide 同时合用对人 HCC 的抑制率均明显高于单独使用时。提示此两药可能通过作用于不同的受体对瘤细胞产生杀伤作用。这对进一步研究其作用机制提供了一定线索。

参 考 文 献

[1] Katy P. Y. Siu, Judy Y. W. Chan, K. P. Fang. Effect of arsenic trioxide on humanhepatocellular carcinoma HepG2 cells: Inhibition of proliferation and induction of apoptosis[J]. Life Sciences, 2002;71:275 - 285

[2] Pu Y S, Hour T C, Chen J, et al. Arsenic trioxide as a novel anticancer agent human transitional carcinoma: characterizing its apoptotic pathway[J]. Anticancer Drugs, 2002;13(3):293 - 298

[3] 韩 锐. 肿瘤化学预防及药物治疗[M]. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1991;315 - 320.

[4] Hayley M, McDaid, Patrick G. Johnston Synergistic interaction between paclitaxel and 8 - chloro - adenosine 3, 5 - monophosphate in human ovarian carcinoma cells lines[J]. Clinical Cancer Research, 1999;5:215 - 220.

[5] Thounwon PB, Wilson BA, Ishaque AB, et al. Atrazine potentiation of arsenic trioxide - induced cytotoxicity and expression in human liver carcinoma cells (HepG2) 4[J]. Mol Cell Biochem, 2001;222(1 - 2):49 - 59.

[6] 刘 琳,秦叔逵,陈惠英,等. 三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究[J]. 中华肝脏病杂志, 2000;8(6):367 - 369.

[7] Patel YC. Somatosatatin and its receptor family. Front Neuroendocrino[J]. 1999;20:157 - 159.

[8] Berruti A, Dogliotti L, Mosca A, et al. Effects of the somatostatin analog Lanreotide on the circulating level of chromogranin - A, prostate - specific Antigen, and insulin - 1 ike growth factor - 1 in advanced prostate cancer patients[J]. Prostate, 2001;47:205 - 211.

[9] Gulec SA, DrouantGL, Fuselier J, et al. Antitumor and antiangiogenic effects of somatostatin receptor - targeted in situ radiation with (111) IN - DTPA - JIC 2DL[J]. J Surg Res, 2001;97:131 - 137.

[10] Cai X, Shen Y, Zhu Q, et al. Arsenic trioxide - induce apoptosis and differentiriation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia[J]. Caner Lett, 2002;183(2):147 - 151.

(上接第 155 页)

[3] Fong Y - F, Singh K. Effect of the levonorgestrel - releasing intrauterine system on uterine myomas in a renal transplant patient[J]. Contraception, 1999;60:51 - 53.

[4] 乐 杰. 妇产科学[M]. 北京:人民卫生出版社, 2000;4 - 10.

[5] Lesley N, Otto MD. The rhesus macaque as an animal model for pelvic organ prolapse[J]. Am J Obstet Gynecol, 2002;186(3):416 - 421.

[6] Rowland IJ, Rivens I, Chen L, et al. MRI study of hepatic tumors following high - intensity focused ultrasound surgery [J]. Br J Radiol, 1997;70:144 - 153.

[7] Cline HE, Hynynen K, Hardy CJ, et al. MR temperature mapping of focused ultrasound surgery[J]. Magn Reson Med, 1994;60:628 - 636.

[8] 胡和平,陈士岭. 盆腔 MRI 诊断学[M]. 北京:军事医学科学出版社, 1997;33 - 56.