维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253－3626(2004)04－0444－04

三氧化二砷诱导人肝癌细胞凋亡及相关分子机制研究

张 霞，王丕龙，陶小红

(重庆医科大学临床学院消化内科,重庆 400016)

【摘 要】目的:研究三氧化二砷(As_2O_3)诱导人肝癌细胞凋亡时,细胞周期及细胞周期调节蛋白的变化,探讨 As_2O_3 抗肝癌作用的分子机制。方法:体外培养人肝癌细胞株 SMMC－7721，用 2μmol/L As_2O_3 处理 72h，流式细胞仪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;免疫细胞化学检测 cyclinD_1、cyclinA、p21 蛋白的表达。结果:As_2O_3 使 SMMC－7721 细胞周期阻滞在 G_0/G_1、S 期,与对照组比较,As_2O_3 在诱导 SMMC－7721 细胞发生凋亡的同时,p21 蛋白的表达水平显著增高(对照组 1.128;As_2O_3 组:3.794),cyclinD_1、cyclinA 蛋白的表达水平明显下降(对照组:3.647,2.833;As_2O_3 组:1.133,1.179)。结论:As_2O_3 能干扰细胞周期的进程,诱导 SMMC－7721 细胞凋亡。其作用机制与上调 p21 蛋白及下调 cyclinD_1、cyclinA 蛋白的表达有关。

【关键词】三氧化二砷;肝细胞癌;凋亡;细胞周期;调节蛋白

【中国图书分类法分类号】R329.2+8;R735.7 【文献标识码】A 【收稿日期】2003－11－12

Study on arsenic trioxide induced apoptosis in hepatoma cells and its molecular mechanism

ZHANG Xia, et al

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

【Abstract】*Objective*: To study the changes of cell cycle phase and cell cycle phase regulation protein during arsenic trioxide induced apoptosis in hepatoma cells, and to explore mechanisms of arsenic trioxide inhibited HCC. *Methods*: Cultured in vitre, HCC SMMC－7721 were treated 72h with 2μmol/L arsenic trioxide. The cell cycle and apoptosis index were detected by flow cytometry(FCM); the morphological changes were observed by transmission electron microscope. The immunohistochemistry was used to detect the protein expression of p21, cyclin D_1, cyclinA. *Results*: SMMC－7721 cell cycle was arrested in G_1 and S phase by arsenic trioxide. Compared with control in the course of apoptosis induced by arsenic trioxide p21 protein expressions rose significantly(control: 1.128; arsenic trioxide: 3.794), while cyclinD_1, cyclinA protein expressions decreased significantly(control 1: 3.647, 2.833; arsenic trioxide: 1.133, 1.179). *Conclusion*: Arsenic trioxide could disturb cell cycle progression of SMMC－7721 and induce apoptosis. The mechanism may relate to that arsenic trioxide up－regulate expression of p21 and down－regulate expression of cyclinD_1, cyclinA.

【Key words】Arsenic trioxide; Hepatoma; Apoptosis; Cell cycle; Regulation protein

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,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。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[1]。从 As_2O_3 干扰细胞周期的进程,调控细胞周期调节蛋白的水平上来研究其诱导凋亡的机制目前未见报道。本实验从以人肝癌细胞 SMMC－7721 作为研究对象,在探讨了 As_2O_3 对肝病细胞周期的影响后,用免疫细胞化学法进一步研究了 As_2O_3 对 cyclinA、cyclinD_1 和 p21 表达的影响,以期从分子水平探讨 As_2O_3 的作用机制。

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

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 细胞株 人肝癌细胞株 SMMC－7721 由重庆医科大学第二临床学院肝病研究所惠赠。

1.1.2 主要试剂和仪器 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)。鼠抗人 Cuclina、cyclinD_1 和 p21 单克隆抗体,S－P 免疫组化

维普资讯 http://www.cqvip.com

检测试剂盒(北京中山生物技术有限公司)。倒置显微镜(日本 NIOKO)。CO_2 孵箱(日本株式会社)。流式细胞仪(FACScan Becton Dickinson, USA)。透射电镜(Hitachi－600型, Japan)。As_2O_3(哈尔滨伊达药业有限公司),使用时用 RPMI－1640 配成所需要的浓度。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 SMMC－7721 细胞在含 10%小牛血清的 RPMI－1640 培养液(青霉素 100ku/L,链霉素 100ku/L)中,于 37℃、5%CO_2 孵箱中培养,细胞为上皮样贴壁生长,每 2～3 天传代 1 次。

1.2.2 流式细胞仪(FCM)检测细胞周期分布及凋亡率 收集对数生长期的 SMMC－7721 细胞,用含 10%小牛血清的 RPMI1640 培养液配成 1×10^6 细胞浓度 20ml 接种在 200ml 的培养瓶中。把不加药物的设为细胞对照组,处理组中加入 As_2O_3 2ml 使其终浓度为 2μmol/L。将两组细胞在 37℃、5%CO_2 孵箱中培养 72h 后取出,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),将细胞悬液转入 EP 管中,离心(2000r/min, 2min)弃去上清液,缓慢加入 70%的冰乙醇 1ml,固定 1h,送流式细胞仪检测,资料由 ModFit 软件收集、分析。

1.2.3 电镜观察超微结构 收集用 2μmol/LAs_2O_3 处理 72h 的细胞和对照组细胞(不加药物),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 4%戊二醛前固定,1%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。

1.2.4 免疫细胞化学(SP 法)检测细胞周期调节蛋白的表达 收集对数生长期的 SMMC－7721 细胞,用 0.1%胰酶消化成单细胞悬液后,以 1×10^5 细胞浓度接种在盖有玻片的 6 孔培养板中,2ml/孔,把不加药物的设为细胞对照组,处理组中加入 As_2O_3 200μl 使其终浓度为 2μmol/L。将两组细胞在 37℃、5%CO_2 孵箱中培养 72h 后,取出爬片,4%多聚甲醛室温固定 30min, PBS 洗 5min×3 次,接下来的步骤按免疫细胞化学染色试剂盒说明书操作。结果判断:排除爬片边缘的细胞,10×10 低倍镜下随机选取 10 个细胞分布均匀的视野,每个视野在 10×20 中倍镜下计数 50 个细胞。根据细胞着色的强弱分为 4 个等级:无着色 0 分,淡黄色 1 分,棕黄色 2 分,棕褐色 3 分。按公式 $HSCORE=\sum Pi(i+1)$(i=0,1,2,3;Pi 表示评分为 i 的比例)计算 HSCORE 得分[2]。该评分法考虑到了单个细胞是否阳性及其强弱,更具体更真实的反应细胞的蛋白表达情况。

1.2.5 统计学处理 计量资料用均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,两组间比较采用 t 检验。

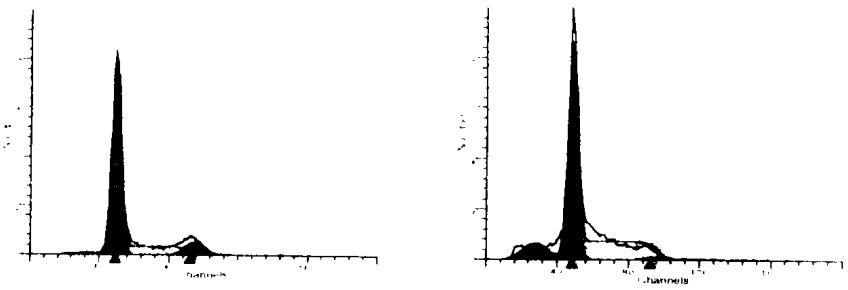
2 结 果

2.1 三氧化二砷对肝癌细胞凋亡的影响

2.1.1 流式细胞术分析 用 2μmol/L As_2O_3 处理 SMMC－7721 细胞 72h 后,在流式细胞仪 DNA 组方图上可见凋亡细胞呈特征性的亚二倍峰(凋亡峰),细胞周期的分布示 G_0/G_1、S 期细胞比例增加,G_2－M 期细胞比例减少,说明 As_2O_3 可使 SMMC－7721 细胞生长阻滞于 G_0/G_1、S 期,见表 1 及图 1。

表 1 As_2O_3 作用 72h 后 7721 细胞凋亡率及细胞周期的变化

分组	凋亡率	细胞周期		
		G_0/G_1	S	G_2－M
对照组	0	65.12	15.53	19.35
As_2O_3 组	11.47	70.61	21.57	7.81



A B

图 1 肝癌细胞经药物处理 72h 后的流式细胞图

A:对照 B:2μmol/L As_2O_3

2.1.2 透射电镜观察 用 2μ mol/L As_2O_3 处理 SMMC－7721 细胞 72h 后,形成典型的凋亡肝癌细胞,细胞胞质电子密度增高,细胞周边可见较多凋亡小体,见图 2。

2.2 三氧化二砷对肝癌细胞周期调节蛋白表达的影响

2.2.1 cyclinA、cyclinD_1 镜下观察,cyclinA 定位在胞核中,cyclinD_1 定位在胞核中(也可在胞浆中)。未用 As_2O_3 处理的细胞 cyclinA 表达增强,胞核被染成棕黄色;用 2μmol/L As_2O_3 处理后 cyclinA 表达明

维普资讯 http://www.cqvip.com

显减弱，胞核被染成浅黄色；未用 As_2O_3 处理的细胞 cyclin D_1 表达增强，胞核被染成棕黄色；用 2μmol/L As_2O_3 处理后 cyclin D_1 表达明显减弱，胞核被染成浅黄色；见表 2、图 3.1～3.4。

表 2 cyclin D_1、cyclinA、p21 的 HSCORE 得分（$\bar{x} \pm s$）

	cyclinA	cyclin D_1	p21
对照组	2.833±0.074	3.647±0.049	1.128±0.061
As_2O_3 处理组	1.179±0.058*	1.133±0.051*	3.794±0.069*

注：与对照组比较，* $P<0.01$

2.2.2 p21 镜下观察，p21 定位在胞核中，未用 As_2O_3 处理的细胞 p21 表达弱，胞核被染成浅黄色；用 2μmol/L As_2O_3 处理后 p21 表达明显增强，胞核被染成棕黄色，见表 2、图 4.1～4.2。

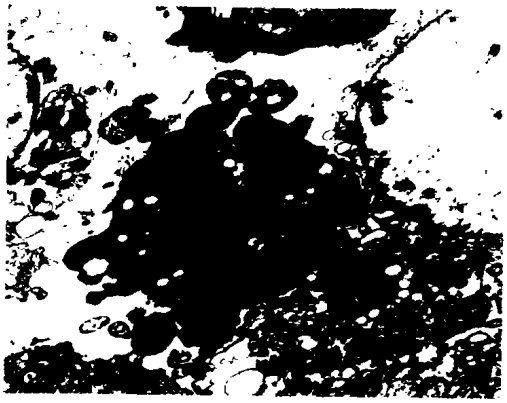


图 2 2μmol/LAs_2O_3 处理 SMMC－7721 细胞 72h 后形成的凋亡细胞和凋亡小体（TEM×5000）

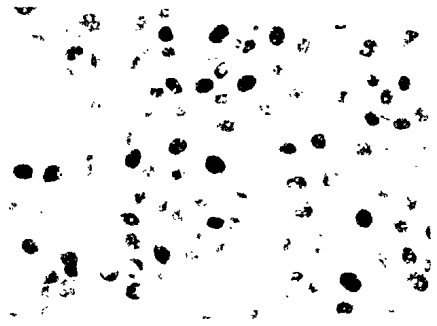


图 3.1 对照组 7721 细胞中 cyclinA 的表达（SP×400）

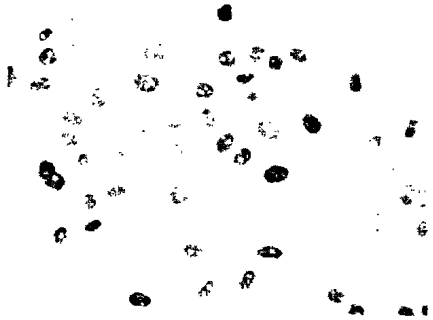


图 3.2 As_2O_3 处理后的 7721 细胞中 cyclinA 的表达（SP×400）

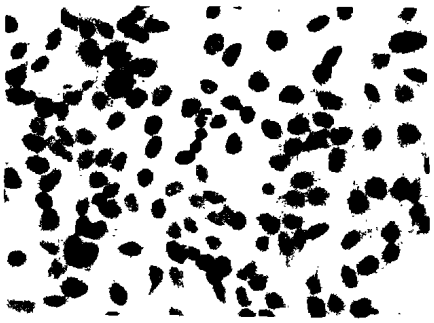


图 3.3 对照组 7721 细胞中 cyclin D_1 的表达（SP×400）

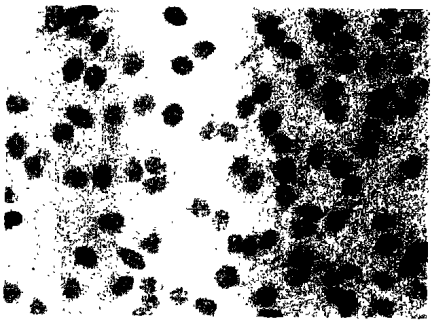


图 3.4 As_2O_3 处理后的 7721 细胞中 cyclin D_1 的表达（SP×400）

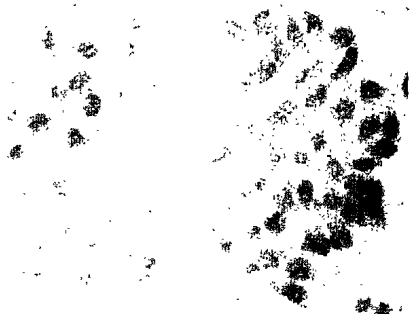


图 4.1 对照组 7721 细胞中 p21 的表达（SP×400）



图 4.2 As_2O_3 处理后的 7721 细胞中 p21 的表达（SP×400）

3 讨 论

细胞增殖必须经过，G_1→S→G_2→M 四个时期，细胞周期检测点对细胞周期按序正常进行起重要作用。细胞周期的中断可以引起细胞的程序化死亡即凋亡。大量的实验研究表明，许多抗癌药物对细胞

维普资讯 http://www.cqvip.com

周期有特异的阻断作用。这种作用受多种调控基因精细而又复杂的相互调控,这些基因最终是通过受表达的蛋白来实现对细胞增殖的直接调控[3]。本实验的目的是探讨 As_2O_3 是如何调控 SMMC-7721 细胞周期调节蛋白从而诱导细胞凋亡的。

分子生物学研究表明,cyclinD_1 蛋白是细胞 G_1/S期的监控点,是细胞增殖的重要正向调节因子。cyclinD_1 蛋白的作用主要与 CDK_4/CDK_6 结合,使 Rb 蛋白磷酸化而导致它与转录因子 E2F 解离,而发挥 E2F 转录因子的作用,使细胞进入 S 期[4]。当 cyclinD_1 蛋白的过表达或功能性 Rb 蛋白减少时,既不能与 E2F 形成复合体,也不能提供肋蛋白本身磷酸化抑制 cyclinD_1 蛋白的转录,可使细胞持续性生长。在实验中未处理的 SMMC-7721 细胞,cyclinD_1 蛋白的表达是强的(HSCORE 得分是 3.147),用 2μmol/L As_2O_3 处理 72h 后,cyclinD_1 蛋白的表达明显减弱(HSCORE 得分是 1.133,蛋白表达量减少了 3 倍)。提示 As_2O_3 可通过下调 cyclinD_1 的表达,抑制 CDK_4/CDK_6 酶的活性,使 E2F 不能发挥转录作用,细胞被阻滞于 G_1 期。而阻滞于 G_1 期的细胞不能有效地进行 DNA 的合成,细胞周期的进程受阻,同时启动凋亡过程,使细胞进入程序化死亡。

cyclinA 在 S 期合成,在 G_2 期达到高峰后迅速降解,具有 DNA 合成和促进细胞进入分裂期的双重作用。现已阐明在 cyclinA 基因(CCNA)上具有乙肝病毒插入的特定位点,病毒整合形成的嵌合蛋白累积使细胞增殖失控,从而导致恶性转化[5]。临床研究表明,肝癌与 cyclinA 表达异常有关。Chao et al[6]报道 37 例肝癌患者有 12 例 cyclinA 过表达。其中 6 例由基因扩增引起,另 6 例由转录后或翻译后修饰引起。在 SMMC-7721 细胞中,As_2O_3 对 cyclinA 的表达有明显的影响。与对照组比较,用 2μmol/L As_2O_3 处理后的 7721 细胞,cyclinA 的蛋白表达量明显下降(对照组 HSCORE 得分为 2.833,As_2O_3 组为 1.179,cyclinA 的蛋白表达量降低了 2 倍)。本研究提示 As_2O_3 通过下调 cyclinA 蛋白的表达来影响 DNA 的合成,将细胞阻滞在 S 期,使 HCC 的增殖受抑。

p21 是一种普遍的细胞周期素依赖性激酶抑制剂(CDKI),它可以直接与 cyclin-CDKs 复合物结合,抑制蛋白激酶的活性,达到抑制增殖,阻止细胞从 G_1 进入 S 期[7]。Hai et al[8]等研究发现,肝癌中 p21 的表达是 p53 依赖性的。p53 的突变导致了 p21 表达减弱,并提示 p21 表达减弱与肝癌的发生有关。本实验结果显示,p21 在 SMMC-7721 细胞中是弱表达,2μmol/L As_2O_3 作用 72h 后,p21 的表达增强(HSCORE 得分:对照组 1.128,As_2O_3 组 3.794,p21 的蛋白表达量扩大了 3 倍)。提示 As_2O_3 上调了 p21 的表达,增强了 p21 与 cyclin-CDKs 的结合能力,阻滞 SMMC-7721 细胞于 G_1 期,抑制了 HCC 的增殖。

实验从分子水平上研究了 As_2O_3 诱导人肝癌细胞凋亡的作用机制:As_2O_3 通过下调 SMMC-7721 细胞周期正调节因子 cyclinD_1、cyclinA 的表达;上调细胞周期负调节因子 p21 的表达,影响细胞周期的进程,阻断 SMMC-7721 细胞于 G_0/G_1,S 期,从而抑制 HCC 的增殖,诱导其凋亡。

参 考 文 献

[1] Pu YS, Hour TC, Chen J, et al. Arsenic trioxide as a novel anticancer agent human transitional carcinoma: characterizing its apoptotic pathway[J]. Anticancer Drugs, 2002; 13(3): 293-300.

[2] Deborah JH, Bruce AL, Vilram R, et al. Tenascin is differentially expressed in endometriun and endometrosis[J]. J Pathol, 1999; 187: 242-248.

[3] Johnson DG, Richie ER, Conti CJ, et al. The cell cycle and cancer[J]. Cncer Bull, 1995; 47: 480-485.

[4] Motokura T, Keyomarsi K, Kronenberg HM, et al. Cloning and characterization of human cycklin D3, a Cdna closely related in sequence to the PRAD1/cyclin D1 proto-oncogene [J]. Biol Chem, 1992; 267: 20412-20415.

[5] Wang J, Zindy F, Chenivesse X, et al. Modification of cyclin A expression by hepatitis B virus DNA integration in a hepatocellular carcinoma[J]. Oncogene, 1992; 7(8): 1653-1656.

[6] Chao Y, Shih YL, Chiu JH, et al. Overexpression of cyclin A but not skp2 correlates with the tumor relapse of human hepatocellular carcinoma[J]. Cancer Res, 1998; 58: 985-990.

[7] Lu X, Toki T, Konoshi I. Expression of p21WAF1/CIP1 in adenocarcinoma of the uterine cervix: a possible immunohistochemical marker of a favorable prognosis[J]. Cancer, 1998: 82 (12): 2409-2417.

[8] Hai am, Kanai Y, SakamotoM, et al. Reduced p21 (WAF1/CIP1) expression and p53 mutation in hepatocellular carcinomas[J]. Hepatology, 1997; 25(3): 575-579.