DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.06.035
第25卷第6期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 6
546 2003年3月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Mar. 2003

论著

文章编号:1000-5404(2003)06-0546-03

三氧化二砷体外诱导口腔鳞癌细胞凋亡的研究

陈黎明 (贵阳市口腔医院口腔内科,贵阳 550002)

提 要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对口腔鳞癌细胞的体外生物学作用及机制。方法 采用形态学、MTT、克隆形成试验、DNA梯度降解试验、原位末端标记及流式细胞仪等方法,对As_2O_3在Tca8113细胞系中的作用进行体外研究。结果 As_2O_3对Tca8113细胞产生明显的生长抑制作用,MTT显示生长抑制率为76.3%。DNA梯度降解试验、原位末端标记、流式细胞仪显示As_2O_3诱导了Tca8113细胞凋亡。流式细胞仪显示As_2O_3的Tca8113细胞凋亡与细胞周期阻滞有关。结论 As_2O_3对口腔鳞癌细胞具有显著的体外生长抑制及凋亡诱导作用。

关键词:三氧化二砷;口腔鳞癌;细胞凋亡
中图法分类号:R730.21;R739.85;R995 文献标识码:A

A study on the human oral squamous carcinoma cell apoptosis induced by arsenic trioxide *in vitro*

CHEN Li-ming (Department of Oral Medicine, Guiyang Stomatological Hospital, Guiyang 550002, China)

Abstract: Objective To investigate the biological effects of As_2O_3 and its mechanism on human oral squamous carcinoma cell line *in vitro*. Methods The effects of As_2O_3 on Tca8113 cell line were investigated *in vitro* with morphological method, MTT, clone forming, DNA ladder, TUNEL assay and flow cytometry (FCM). Results As_2O_3 had marked suppressive effect on the growth of Tca8113 cell line. The growth suppression rate of the Tca8113 cells was 76.3% shown by MTT. DNA ladder, TUNEL and FCM showed As_2O_3 could induce the apoptosis of Tca8113 which might be related to cell cycle arrest shown by FCM. Conclusion As_2O_3 can inhibit the growth and induce the apoptosis of oral squamous carcinoma cell *in vitro*.

Key words: arsenic trioxide (As_2O_3); oral squamous carcinoma; apoptosis

三氧化二砷(As_2O_3)是传统中药砒霜的主要成分。目前的研究已经表明As_2O_3能有效治疗急性早幼粒白血病(APL),诱导白血病细胞凋亡[1~3]。在其它类型白血病及实体瘤的体内外研究也显示As_2O_3具有诱导肿瘤细胞凋亡及其治疗作用[4~7]。口腔鳞癌为常见恶性肿瘤,本研究As_2O_3对口腔鳞癌细胞的体外生物学作用及机制,探索As_2O_3治疗口腔鳞癌的可行性,为As_2O_3在临床口腔鳞癌中的应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 试剂

As_2O_3购自Sigma公司,生理盐水配成1 mmol/L储存液,使用前用细胞培养液稀释成所需浓度。

作者简介:陈黎明(1965-),女,贵州省贵阳市人,副主任医师,主要从事口腔粘膜病病因、发病机制及治疗方面的研究,发表论文10余篇。电话:(0851)5830355

收稿日期:2002-09-23;修回日期:2003-01-07

1.2 细胞系

Tca8113细胞:为人舌鳞状细胞癌细胞系,购自中科院上海细胞所。培养条件为M199培养基,含10%胎牛血清,37℃,5% CO_2。

1.3 细胞生长曲线-MTT法

采用96孔板,每孔接种细胞5 000~8 000个,37℃,CO_2孵箱中培养12~24 h后用不同浓度As_2O_3处理细胞。取不同时间点,弃去培养基,每孔加入MTT溶液。37℃孵育3~4 h,弃去MTT溶液。每孔加入DMSD,将96孔板置水平摇床上摇动后以酶标仪在525 nm波长下测定每孔A值。

1.4 平板克隆形成实验

每组取1个35 mm培养皿,接种细胞500×10^3/皿。采用不同浓度As_2O_3,培养24 h后收获细胞。按500个/皿接种至新的60 mm平皿中,每种接种3个平皿。置CO_2孵箱中培养2~3周。结晶紫染色,显微镜下计数大于50个细胞的克隆数。

1.5 细胞DNA梯度降解(DNA ladder)的检测

分别收集As_2O_3处理组及对照组细胞。加裂解液400 μl混匀。离心收集上清。加入SDS至终浓度1%,加RNA酶56℃

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

作用 2 h。加入蛋白酶 K 37℃ 2 h。乙醇沉淀 DNA 。干燥后加 TE 20 μl 溶解 DNA 沉淀。配制琼脂糖凝胶电泳, 长波紫外灯下观察并照相。

1.6　细胞凋亡原位检测(TUNEL 试验)

将细胞悬液滴于用多聚赖氨酸处理过的玻片上, 涂匀, 干燥后用多聚甲醇固定 30 min, 取出自然干燥后按以下步骤进行: PBS 洗 3 次, 每次 5 min。穿透液冰上 2 min。PBS 洗 3 次, 每次5 min。加 10 μl TUNEL 反应混合液, 置湿盒中, 37℃, 1 h。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。荧光显微镜下观察, 摄片。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。AP 覆盖液 10 μl, 37℃ 1 h。PBS 洗 3 次, 每次 5 min。底物缓冲液 50 μl, 室温下 10~15 min, 苏木精复染, 树脂封固。

1.7　流式细胞仪检测细胞周期及细胞凋亡

PI 染色法: As_2O_3 处理细胞后分别于不同的时间点收集细胞, PBS 清洗一遍。注入 70% 乙醇, 固定 18 h。离心弃乙醇后用 PBS 洗一次。加入 RNA 酶 37℃ 作用 1~2 h。加入 PI(100 μg/ml)100 μl 混匀置冰上 30 min 后在流式细胞仪上检测。

1.8　统计学分析

实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 Excel 软件分析, 组间差异用 t 检验。

2　结果

2.1　As_2O_3 对 Tca8113 细胞的形态学影响

以 As_2O_3 处理细胞, 第 2~3 天细胞聚集, 变圆, 胞浆内空泡增多, 3~5 d 后逐渐浮起悬浮于培养基中。对照组细胞形态无明显变化。

2.2　As_2O_3 对鳞癌细胞生长的抑制作用

2.2.1　MTT 试验　　用 MTT 法对 As_2O_3 处理的 Tca8113 细胞生长情况进行检测, 结果见表 1。As_2O_3 对 Tca8113 细胞生长具有明显的抑制作用。当 As_2O_3 为 5.0 μmol/L 时 Tca8113 细胞的存活率仅为 19.3%。

表 1　**As_2O_3 对 Tca8113 细胞的生长抑制作用($\bar{x} \pm s$)**

Tab 1　The growth suppression effect of As_2O_3 on Tca8113 cells(8 d)($\bar{x} \pm s$)

As_2O_3($\mu mol \cdot L^{-1}$)	As_2O_3[Survival(%)]	Control[Survival(%)]
0.5	1.25±0.04(99.5±3.5)	1.32±0.07(99.0±8.0)
1.0	1.13±0.07(93.2±4.3)	1.29±0.09(98.1±6.9)
2.0	1.06±0.08(79.6±4.8) *	1.21±0.05(97.9±2.5)
5.0	0.74±0.06(19.3±5.1) *	1.31±0.07(98.6±6.4)

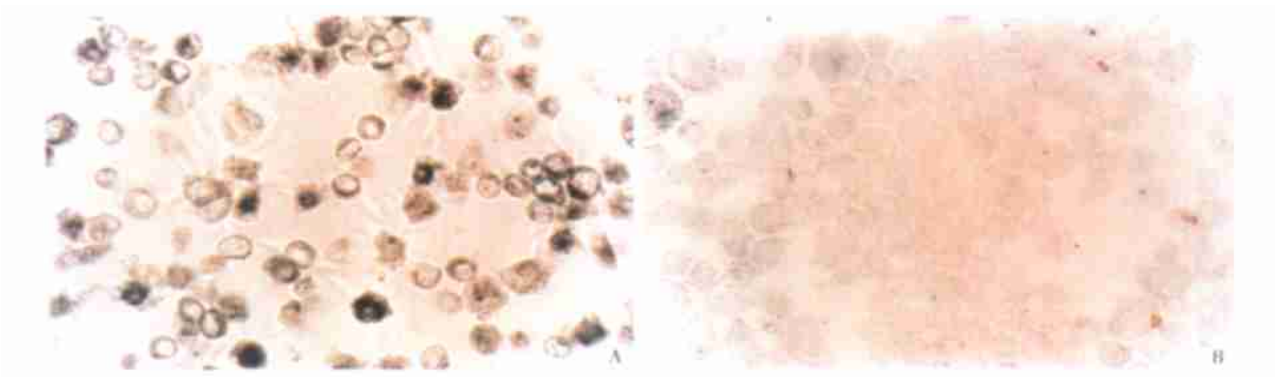
*: $P < 0.01$ *vs* Control

2.2.2　克隆形成试验　　按不同浓度 0、0.5、1.0、2.0、5.0 (mol/L) 的 As_2O_3 处理 Tca8113 细胞, 其克隆形成率分别为 100%, 96.6%, 92.3%, 58.6%, 40.5%。说明 As_2O_3 可以明显抑制 Tca8113 细胞的克隆形成能力。

2.3　As_2O_3 对 Tca8113 细胞的诱导凋亡作用

2.3.1　DNA 梯度降解试验(DNA Ladder)　　提取细胞染色体 DNA 进行琼脂糖凝胶电泳结果显示, Tca8113 细胞经 As_2O_3 处理 2 d 后染色体 DNA 发生断裂, 2、4、6 d 电泳可见 180~200 bp 不同倍体梯状 DNA(DNA Ladder), DNA Ladder 的出现有一定的时间效应, 以 6 d 时明显, 对照处理组染色体 DNA? 未见明显的 DNA Ladder。

2.3.2　细胞凋亡原位末端标记(TUNEL)　　细胞发生凋亡时, 染色体 DNA 在核小体之间发生断裂, ? 形成以核小体为单位的不同长度的 DNA 片断, 同时产生多个 3-OH 末端, 使用末端转移酶可将标记的 dUTP 连接在 DNA 片段的 3-OH 末端上, 进行显色, 从而显示凋亡细胞。TUNEL 技术检测法显示 As_2O_3 可以使 Tca8113 细胞出现明显凋亡。对照组细胞未见凋亡, 见图 1。



A: As_2O_3;　B: Control

图 1　**As_2O_3 处理 Tca8113 细胞的 TUNEL 凋亡分析**

Fig 1　TUNEL assay of Tca8113 cell treated with As_2O_3

2.3.3　流式细胞仪分析　　Tca8113 细胞分为 As_2O_3 及细胞对照组, 以不同浓度 As_2O_3处理, 经 70% 乙醇固定, PI 染色等处理后, 经 FCM 检测显示: As_2O_3 组 12 h G_1 期前出现明显的凋亡峰, 随着 As_2O_3 浓度的增加, 凋亡细胞数量增多。G_2/M 期 Tca8113 细胞数较对照组明显增多, 并随着 As_2O_3 浓度的增加而增加。表明 As_2O_3 可以引起 Tca8113 细胞 G_2/M 期阻滞, 见表 2。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

表 2 As_2O_3 处理后 Tca8113 细胞流式细胞仪分析($\bar{x}\pm s$)

Tab 2 Flow cytometry analysis of Tca8113 cell treated with As_2O_3($\bar{x}\pm s$)

As_2O_3 ($\mu mol\cdot L^{-1}$)	G_1(%)	S(%)	G_2M(%)	Apoptotic(%)
Control	66.1±2.4	19.3±0.8	14.6±0.7	1.7±0.6
0.5	64.5±3.2	20.5±3.5	14.8±0.9	1.8±0.9
1.0	45.5±2.5	29.6±0.8	20.0±3.6*	5.5±0.6*
2.0	38.4±4.5	27.3±2.2	25.1±2.9*	10.2±0.5*
5.0	40.5±1.7	8.8±1.6	30.5±2.3*	22.7±1.4*

*: $P<0.01$ *vs* Control

3 讨论

本研究结果显示，As_2O_3 对鳞癌 Tca8113 细胞生长有显著的生长抑制及凋亡诱导作用。MTT 法显示 As_2O_3 为 5.0 μmol/L 时 Tca8113 细胞的存活率仅为 19.3%。克隆形成试验 5.0 μmol/L 的 As_2O_3 处理 Tca8113 细胞其克隆形成率为 40.5%。Tca8113 细胞经 As_2O_3 处理 2、4、6 d 电泳可见 180~200 bp 不同倍体梯状 DNA（DNA Ladder）。TUNEL 检测法显示 As_2O_3 可以使 Tca8113 细胞出现明显凋亡。FCM 检测显示 As_2O_3 处理 Tca8113 细胞 12 h G_1 期前出现明显的凋亡峰，并引起 G_2/M 期阻滞。上述作用与在 APL 细胞中观察到的 As_2O_3 的诱导凋亡作用是一样的。

细胞凋亡是一个复杂的生命过程。通过 DNA 梯度降解试验检测染色体 DNA 的断裂，通过使用末端转移酶标记的 dUTP 连接在 DNA 断裂片段的 3-OH 末端上，进行显色，从而显示凋亡细胞。通过 FCM 显示细胞凋亡峰的变化。As_2O_3 能有效治疗急性早幼粒白血病(APL)，诱导白血病细胞凋亡，在其它类型白血病及实体瘤的体内外研究中也显示 As_2O_3 具有诱导肿瘤细胞凋亡及其治疗作用[1~7]。本实验证实 As_2O_3 能启动鳞癌细胞凋亡。鳞癌为口腔临床中常见的恶性肿瘤，鳞癌细胞凋亡与化疗药物的治疗作用密切相关[8,9]。实验结果表明，As_2O_3 作为一种细胞凋亡诱导药物，用于临床鳞癌等实体瘤的治疗具有诱人的应用前景。

有关细胞凋亡与细胞周期的关系，已往的研究表明各种药物均有其不同的倾向性。本实验显示，Tca8113 细胞经 As_2O_3 后发生明显的 G2/M 期阻滞和细胞凋亡。其 G_2/M 期阻滞百分比显著高于对照组，表明这种作用可能是不可逆的。这与金属抗癌药顺铂的作用特点相似[10]。本实验显示 Tca8113 细胞 G_2/M 期阻滞在 24 h 内开始，而此时尚不能检测出低于二倍体的凋亡峰。随着时间的延长，逐步出现了凋亡峰，表明细胞凋亡滞后于细胞周期阻滞。这说明是细胞周期阻滞抑制细胞生长，从而引发了细胞凋亡。这与一些药物作用先导致细胞周期阻滞，而后引起细胞凋亡的过程是一致的[10,11]。

总之，As_2O_3 可以抑制鳞癌细胞生长，诱导其凋亡，其作用是通过对鳞癌细胞的 G_2/M 期阻滞实现的。As_2O_3 引起鳞癌细胞的 G_2/M 期阻滞预示着，As_2O_3 可能对处于增殖期的肿瘤细胞的杀伤作用大于处于静止期的正常细胞，这为肿瘤治疗中与其它细胞周期阻滞药物联合应用以及深入研究其作用机制提供了理论依据，也为 As_2O_3 进一步的临床应用积累了资料。

参考文献：

[1] Au W Y, Chim C S, Lie A K, *et al*. Combined arsenic trioxide and all-trans retinoic acid treatment for acute promyelocytic leukaemia recurring from previous relapses successfully treated using arsenic trioxide[J]. Br J Haematol, 2002, 117(1): 130-132.

[2] 张 鹏，王树叶，胡龙虎，等. 三氧化二砷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.

[3] Zhao W L, Chen S J, Shen Y, *et al*. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide: clinical and basic studies[J]. Leuk Lymphoma, 2001, 42(6): 1265-1273.

[4] Baj G, Arnulfo A, Deaglio S, *et al*. Arsenic trioxide and breast cancer: analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects[J]. Breast Cancer Res Treat, 2002, 73(1): 61-73.

[5] Rojewski M T, Baldus C, Knauf W, *et al*. Dual effects of arsenic trioxide (As_2O_3) on non-acute promyelocytic leukaemia myeloid cell lines: induction of apoptosis and inhibition of proliferation[J]. Br J Haematol, 2002, 116(3): 555-563.

[6] Deng Y, Lin C, Zheng J, *et al*. Overexpression of Bcl-2 partly inhibits apoptosis of human cervical cancer SiHa cells induced by arsenic trioxide [J]. Chin Med J (Engl), 2000, 113(1): 84-88.

[7] Wang Z Y. Arsenic compounds as anticancer agents[J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 48(Suppl 1): S72-76.

[8] Williams H K. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma[J]. Mol Pathol, 2000, 53(4): 165-172

[9] Loro L L, Vintermyr O K, Ibrahim S O, *et al*. Apoptosis and expression of Bax and Bcl-2 in snuff- and non-snuff associated oral squamous cell carcinomas[J]. Anticancer Res, 2000, 20(5A): 2855-2860.

[10] Ormerod M G, Orr R M, Peacock J H. The role of apoptosis in cell killing by cisplatin: a flow cytometic study[J]. Br J Cancer, 1994, 69(1): 93-100

[11] Dubrez L, Goldwasser F, Genne P, *et al*. The role of cell cycle regulation and apoptosis triggering in determing the sensitivity of leukemic cells to topoisomerase Ⅰ and Ⅱ inhibitors[J]. Leukemia(Baltimore), 1995, 9(6): 1013-1024

（编辑 刘洪娥）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net