DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.09.013
第23卷第9期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 9
1030 2001年9月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Sep. 2001

论著

文章编号:1000-5404(2001)09-1030-04

As_2O_3对胃癌细胞周期及端粒酶活性的影响

杨仕明,房殿春,罗元辉,鲁 荣,刘为纹 (第三军医大学附属西南医院全军消化专科中心,重庆 400038)

提 要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对SGC-7901胃癌细胞端粒酶活性及细胞周期的影响及其机制。方法 细胞凋亡、细胞周期分布及相关蛋白的表达采用流式细胞术;端粒酶活性的检测采用端粒末端重复序列扩增-ELISA法(TRAP-ELISA),端粒酶亚单位mRNA及c-myc mRNA的表达采用RT-PCR技术。结果 As_2O_3可明显抑制SGC-7901细胞的生长,细胞凋亡率明显增加,G_0/G_1期细胞减少,S和G_2/M期细胞增加,Bcl-2、c-myc、PCNA蛋白表达减少,Bax蛋白表达增加,端粒酶活性明显下降;端粒酶亚单位hTR和TP1 mRNA无明显变化,hTRT mRNA表达减少,同时,c-myc mRNA的表达亦减少。结论 As_2O_3对SGC-7901细胞的抑制作用可能是通过二条途径实现:一个是诱导细胞凋亡,另一个是通过下调hTRT mRNA的表达来下调端粒酶活性,其机制有可能与c-myc和Bcl-2基因的减少以及Bax基因的增加有关。

关键词:三氧化二砷;胃癌;细胞凋亡;端粒酶活性
中图法分类号:R329.28;R394.2;R735.2 文献标识码:A

Effects of arsenic trioxide on telomerase activity and cell cycle of gastric cancer cell line SGC-7901

YANG Shi-ming, FANG Dian-chun, LUO Yuan-hui, LU Rong, LIU Wei-wen (Department of Gastroenterology, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To explore the effects of arsenic trioxide(As_2O_3) on telomerase activity and cell cycle of SGC-7901 cell line. Methods Human gastric cancer cell line SGC-7901 was treated with different concentration of arsenic trioxide. Changes of apoptosis, cell cycle distribution and associated genes were analysed with flow cytometry. Telomerase activity was determined by telomeric repeat amplification protocol ELISA (TRAP-ELISA). Expression of mRNA in telomerase subunits and c-myc were tested by RT-PCR. Results Arsenic trioxide could significantly inhibit the proliferation of SGC-7901. After treating with arsenic trioxide, the percentage of apoptosis, S and G_2/M phase cells were significantly increased, while the percentage of G_0/G_1 phase cells were significantly decreased. Expression of Bcl-2, c-myc and PCNA was down-regulated and expression of Bax was up-regulated. Telomerase activity was descended with treatment time and concentration of arsenic trioxide. Further study indicated that telomerase subunits hTRT and c-myc were down-regulated, and telomerase subunits hTR and TP1 remained unchanged. Conclusion Two pathways may be involved in the process of proliferation inhibition by arsenic trioxide: one is inducing apoptosis and the other is down-regulation of telomerase through decreasing expression of hTRT. The mechanism of the above two pathways may be related with decreasing expression of Bcl-2 and c-myc and increasing expression of Bax.

Key words: arsenic trioxide; gastric cancer; apoptosis; telomerase activity

我国学者最早应用三氧化二砷(As_2O_3)进行早幼粒细胞白血病(Acute promyelocytic leukemia, APL)的治疗并取得了成功[1]。初步的研究表明,As_2O_3治疗APL的机制在于它能诱导APL细胞凋亡,并还可诱导APL细胞分化[2,3]。随后众多的研究表明As_2O_3同样可以诱导实体瘤细胞凋亡[4~6]。但As_2O_3对肿瘤细胞端粒酶活性及其亚单位的作用尚未见文献报道。本研究以As_2O_3诱导的SGC-7901胃癌细胞株为模型,研究诱导后SGC-7901细胞凋亡、周期分布及端粒酶活性变化,并拟从相关基因的变化来探讨其作用机制。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39670347)
作者简介:杨仕明(1969-),男,湖南省双峰县人,博士,主治医师,讲师,主要从事胃癌端粒酶的研究,发表论文20余篇。电话:(023)68752898
收稿日期:2001-06-18;修回日期:2001-08-31

1 材料和方法

1.1 胃癌细胞株

人胃癌细胞株SGC-7901为本室保存,用含10%小牛血清的1640培养基(GIBICO公司)传代培养,当细胞生长良好时使用。

1.2 生长曲线

96孔板中的SGC-7901细胞经不同浓度的As_2O_3(0.5 mmol/L,哈尔滨医科大学第一附属医院配制,用前以RPMI 1640培养基稀释)溶液(1,5,10,15 μmol/L)作用不同时间后,采用MTT(Sigma公司)法进行比色测定。

1.3 细胞周期的检测

采用流式细胞仪法。细胞经As_2O_3处理后,以70%预冷的乙醇固定24 h后,弃去固定剂,生理盐水洗2次,加入EB染液(EB 10 mg、NaCl 564 mg、枸橼酸钠1.0 g、RNase 10 mg、NP-40 0.3 ml加水至1 000 ml,pH 7.2~7.6)1 ml,4 ℃放置30 min后上机

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

检测。

1.4　相关蛋白免疫荧光检测

采用流式细胞仪间接免疫荧光标记技术, 细胞经 As_2O_3 处理后, 以 70% 预冷的乙醇固定 24 h 后, 弃去固定剂, PBS 缓冲液洗 2 次, 将细胞数调整为 1×10^6/ml, 每份样品加入一抗工作液 100 μl, 37 ℃水浴中温浴 30 min。然后用 PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 每份样品加入二抗工作液 100 μl, 37 ℃水浴中温浴 30 min, PBS 离心洗涤 2 次, 弃上清, 以去除未结合的多余的荧光抗体。上机检测前加入 PBS 1 ml, 并以 400 目筛网过滤。

1.5　克隆形成试验

按文献[7] 进行, 接种 1 000 个细胞后, 加不同浓度的 As_2O_3, 24 h 后换不含 As_2O_3 的培养液, 继续培养 3 周, 计算克隆形成数, 并计算克隆形成率。

1.6　端粒酶活性的检测

采用 TRAP-ELISA 法(试剂盒购自 Roche 公司), 按说明书进行。

1.7　端粒酶亚单位检测

RT-PCR 一步法(试剂盒购自 Promega 公司), 引物设计见表 1, 由上海申工生物工程公司合成。

表 1　端粒酶亚单位、c-myc 及 GADPH 引物序列表

Tab 1　Primer sequences of telomerase subunits, c-myc and GADPH

Genes	Up primer	Down primer	Length(bp)
TP1	5′-TCAAGCCAAACCTGAATCTGAG-3′	5′-CCCGACGTGAACGGTGGAAG-3′	264
hTR	5′-TCTAACCCTAACTGAGAAGGGCGTAG-3′	5′-GTTTGCTCTAGAATGAACGGTGGAAG-3′	126
hTRT	5′-CGGAAGAGTGTCTGGAGCAA-3′	5′-GGATGAAGCGGAGTCTGGA-3′	145
c-myc	5′-CCAGGAGTCTATGTGGAGGG-3′	5′-CTTGAGGACCAGTGGCTCT-3′	505
GADPH	5′-CCACCCATGGCAAATTCCATGGCA-3′	5′-TCTAGACGGCAGGTCAGGTCCAC-3′	598

1.8　统计学分析

采用 t 检验。

2　结果

2.1　As_2O_3 对SGC-7901 细胞生长的抑制作用

1 μmol/L As_2O_3 对 SGC-7901 细胞具有明显的抑制作用, 当浓度增加至 5 μmol/L 以上时, 抑制作用更为明显, 细胞生长至第 4 天便会出现生长停滞现象, 见图 1。

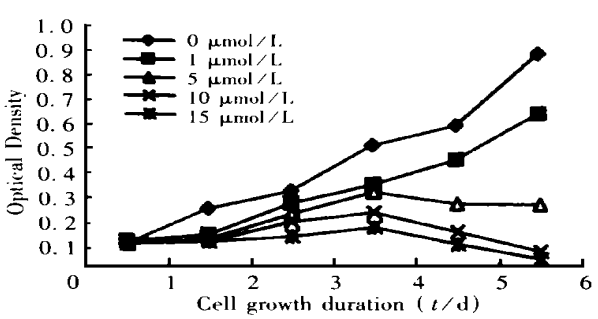


图 1　不同浓度三氧化二砷对 SGC-7901 细胞生长的影响

Fig 1　Effects of different concentration of arsenic trioxide on the growth of SGC-7901 cell line

2.2　细胞凋亡及周期的分布检测

经 5 μmol/L 及 10 μmol/L 的 As_2O_3 作用 24 h 后, 细胞凋亡率明显增加, 且 10 μmol/L 的 As_2O_3 组细胞凋亡率明显高于 5 μmol/L 组($P<0.05$)。进一步研究发现, G_0/G_1 期细胞比例明显下降, 而 S 期和 G_2/M 期细胞明显增加, 见表 2。

2.3　相关基因表达的改变

c-myc、Bcl-2 和 PCNA 基因的表达随 As_2O_3 作用浓度的增加而降低, 而 Bax 基因的表达随 As_2O_3 浓度的增加而增加, 见表 3。

表 2　不同浓度 As_2O_3 对 SGC-7901 细胞凋亡及细胞周期的影响(%, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of different concentration of arsenic trioxide on apoptosis and cell cycle of SGC-7901 cell line(%, $\bar{x}\pm s$)

Group	apoptosis	G_0/G_1	S	G_2/M
Control	4.6±0.53	80.2±2.50	8.6±1.52	11.2±11.11
5 μmol/L	10.5±0.59**	71.5±1.04**	12.7±0.78*	15.8±0.74**
10 μmol/L	15.2±2.55**&	70.3±2.37**	14.5±0.40*&	15.2±1.91*

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$ *vs* control group; &: $P<0.05$ *vs* 5 μmol/L group

表 3　不同浓度 As_2O_3 对 SGC-7901 相关基因表达的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Effect of different concentration of arsenic trioxide on the expression of associated-gene of SGC-7901 cell line($\bar{x}\pm s$)

Group	c-myc	Bcl-2	Bax	PCNA
Control	102±4	89±3	49±1	94±1
5 μmol/L	89±2**	70±5**	61±5*	75±2**
10 μmol/L	74±4**&	62±2**&	69±2**	64±5**

*: $P<0.01$, **: $P<0.05$ *vs* control;
&: $P<0.05$ *vs* 5 μmol/L group

2.4　As_2O_3 对克隆形成能力的影响

随 As_2O_3 浓度的增加, SGC-7901 细胞克隆形成能力逐渐下降, 5 μmol/L 浓度组克隆形成率为(13±3)‰, 10 μmol/L 浓度组无克隆形成, 均明显低于对照组(526±77)‰($P<0.01$)。

2.5　端粒酶活性的改变

SGC-7901 细胞端粒酶活性随着作用时间及作用浓度的增加而降低, 具有时间剂量效应关系, 见表 4。

表 4　As_2O_3 诱导 SGC-7901 细胞端粒酶活性的改变($\bar{x}\pm s$)

Tab 4　Changes of telomerase activity in SGC-7901 treated with arsenic trioxide($\bar{x}\pm s$)

Group	Telomerase activity
Control	0.503±0.018
5 μmol/L	
24 h	0.303±0.007**
48 h	0.292±0.013**
10 μmol/L	
24 h	0.235±0.008**
48 h	0.148±0.032**&&

**: $P<0.01$ *vs* control; &&: $P<0.01$ *vs* the group treated for 24 h

2.6　端粒酶亚单位的检测

经不同浓度的 As_2O_3 作用 24 及 48 h 后, SGC-7901 细胞 TP1 mRNA 和 hTR mRNA 无明显变化, 而 hTRT 的表达明显下降, 其中以 48 h 后最为明显, 进一步研究发现, c-myc 的表达亦随 As_2O_3 的作用浓度增加而下降, 见图 2。

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

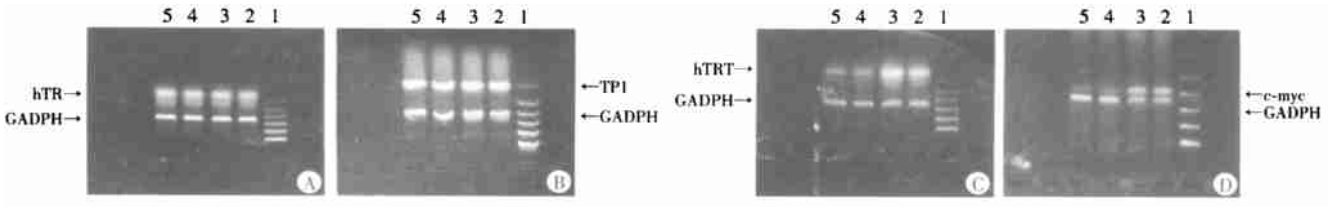


图 2 As_2O_3 诱导后 SGC-7901 细胞端粒酶亚单位及 c-myc 基因的表达

Fig 2 Expression of telomerase subunits and c-myc in SGC-7901 induced by arsenic trioxide

A: hTR; B: TP1; C: hTRT; D: c-myc; Lane 1: PCR marker; Lane 2, 3: control; Lane 4, 5: induced group

3 讨论

本研究结果显示，As_2O_3 可明显抑制 SGC-7901 细胞的增殖，其途径可能是通过二条通路实现的：一是诱导细胞凋亡，另一个可能是下调细胞的端粒酶活性。

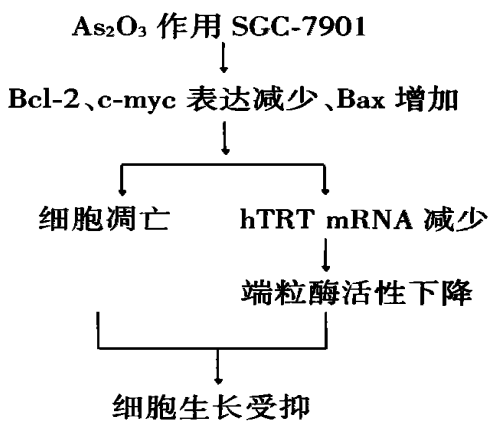
有文献报道，As_2O_3 诱导细胞凋亡之前，先出现 G_2/M 期阻滞，正是这种周期阻滞抑制了细胞的生长，从而最终引起细胞凋亡[6,8]。本研究表明，SGC-7901 细胞经 As_2O_3 诱导后，G_0/G_1 期细胞减少，而 S 和 G_2/M 期细胞增多，提示 As_2O_3 可诱导 SGC-901 细胞 G_2/M 阻滞，与文献报道基本一致。

本研究还表明，As_2O_3 不仅可以诱导细胞凋亡，而且还可下调 SGC-7901 细胞的端粒酶活性，SGC-7901 细胞端粒酶活性的下调与 As_2O_3 作用时间和浓度有关，呈现明显的时间－剂量效应关系。端粒酶活性的下调与 hTR 和 TP1 无关，而与 hTRT mRNA 表达减少有关，提示 As_2O_3 下调 SGC-7901 细胞端粒酶活性是通过下调 hTRT 的表达来实现的。

进一步研究发现凋亡相关基因在 As_2O_3 诱导后呈现有规律的变化。有研究表明，凋亡相关基因不仅对细胞凋亡有调控作用，而且对细胞端粒酶活性具有调控作用。Wang[9] 和 Greeberg 等[10] 将 c-myc 基因导入正常体细胞中，发现 c-myc 基因可以通过上调 hTRT 基因的表达来上调端粒酶活性；晚近有学者克隆了 hTRT 基因的启动子序列，发现在启动子的核心区域内有两个 c-myc 基因的结合位点，c-myc 基因的表达，可以增加 hTRT 基因的转录，从而上调端粒酶活性，这就为 c-myc 基因在端粒酶活性调控中的作用提供了最直接有力的证据[11,12]。Mandal 等[13] 将 Bcl-2 基因导入 HeLa 细胞、DiFi 人结肠癌细胞及鼠 IL-2 依赖的 T 淋巴细胞（CTLL-2），发现转染细胞在 Bcl-2 表达上升的同时，端粒酶活性上调 5～10 倍，进一步研究发现，在转染的 CTLL-2 细胞培养基中不加 IL-2，8 h 后 Bcl-2 表达减少，端粒酶活性下降，但未发现有凋亡形成及 G_0/G_1 期细胞增加，提示 Bcl-2 下调端粒酶活性不是通过诱导凋亡实现的。本研究采用流式细胞间接免疫荧光术检测了 Bcl-2 及 c-myc 蛋白的表达，同时采用 RT-PCR 法检测了 c-myc mRNA 的表达，结果发现 As_2O_3 诱导后，SGC-7901 细胞 Bcl-2 和 c-myc 基因的表达均明显下调。由于 Bcl-2 和 c-myc 的下调，一方面促进细胞凋亡的发生，另一方面可以通过下调 hTRT 的表达来下调端粒酶活性。

Bax 基因对端粒酶活性的直接调控作用尚未见报道，但作为促进凋亡的基因，Bax 可以与 Bcl-2 结合形成异源性二聚体[14]，从而取消 Bcl-2 基因的抗凋亡作用，这样一方面可以促进细胞凋亡，另一方面亦有可能减弱 Bcl-2 上调端粒酶活性的作用。本研究采用流式细胞术，发现 As_2O_3 诱导后，Bax 蛋白的表达是明显增加的，这与 Bcl-2 基因的下调正好一致，从而达到促进凋亡及下调端粒酶活性的作用。

据此，我们提出 As_2O_3 对 SGC-7901 细胞生长的抑制作用可能通过以下途径：



参考文献：

[1] 孙洪德，李元善，马 玲，等. 癌灵 1 号结合中医辩证治疗急性早幼粒细胞白血病 32 例[J]. 中国中西医结合杂志，1992，12(3)：170－173.

[2] Chen G Q, Zhu J, Shi X G, *et al*. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induce NB4 cell apoptosis with downregulation of Bcl-2 expression and modulation of PML-RALalpha/PMI protein[J].

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

Blood, 1996, 88(3): 1 052—1 061.
[3] Chen G Q, Shi X G, Tang W, *et al*. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia(APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells[J]. Blood, 1996, 89(9): 3 345—3 353.
[4] 聂 林, 张 洹. 三氧化二砷对恶性淋巴瘤细胞株凋亡的研究[J]. 肿瘤, 2001, 21(2): 79—81.
[5] 许 勤, 汤静燕, 伍 钢, 等. 三氧化二砷和高三尖杉诱导神经母细胞瘤细胞凋亡与 N-myc 表达的关系[J]. 癌症, 2001, 20(3): 239—244.
[6] 林 晨, 邓友平, 郑 杰, 等. 三氧化二砷诱导人肿瘤细胞凋亡和 G_2+M 期阻滞但引起人永生化宫颈上皮细胞 G_1 期阻滞[J]. 中国医学科学院学报, 2000, 22(2): 124—129.
[7] 司徒镇强, 吴军正 主编. 细胞培养[J]. 西安: 世界图书出版社, 1996. 183—184.
[8] 邓友平, 林 晨, 陈洁平, 等. 三氧化二砷诱导人宫颈癌细胞凋亡及 bcl-2 高表达对其影响[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 1999, 13(4): 288—293.
[9] Wang J, Xie L Y, Allan S, *et al*. Myc activates telomerase[J]. Genes Dev, 1998, 12(12): 1 769—1 774.
[10] Greenberg R A, O'Hagan R C, Deng H, *et al*. Telomerase reverse transcriptase gene is a direct target of c-myc but is not functionally equivalent in cellular transformation[J]. Oncogene, 1999, 18(5): 1 219—1 226.
[11] Takakura M, Kyo S, Kanaya T, *et al*. Cloning of human telomerase catalytic subunit (hTERT) gene promoter and identification of proximal core promoter sequences essential for transcriptional activation in immortalized and cancer cells[J]. Cancer Res, 1999, 59(3): 551—557.
[12] Wu K J, Grandori C, Amacker M, *et al*. Direct activation of TERT transcription by c-myc[J]. Nat Genet, 1999, 21(2): 220—224.
[13] Mandal M, Kumar R. Bcl-2 modulates telomerase activity[J]. J Biol Chem, 1997, 272(22): 14 183—14 187.
[14] Beerheide W, Tan Y J, Teng E, *et al*. Downregulation of proapoptotic proteins Bax and Bcl-Xs in P53 overexpressing hepatocellular carcinomas [J]. Biochem Biophy Res Commun, 2000, 273(1): 54—61.

(编辑 王 红)

文章编号: 1000-5404(2001)09-1033-01

个案与短篇

食管颗粒细胞瘤 1 例

Report of one case of granular cell tumor of the esophagus

袁 亮[1], 周子成[1], 于冬梅[2] (第三军医大学附属西南医院: [1] 全军消化专科中心; [2] 病理学研究所; 重庆 400038)

食管颗粒细胞瘤临床病例较少见, 易误诊为其它疾病。现将我科经内镜及病理确诊 1 例报告如下。

1 临床资料

患者, 女, 37 岁。因反复上腹饱胀不适 8 年, 加重月余入院。伴返酸、嗳气、纳差。院外胃镜诊断: 慢性胃炎。体检: 一般状况好, 心肺腹未见异常。胃镜所见: 距门齿 34 cm 处食管粘膜前壁有一直径 0.5 cm 大的白色圆形隆起性病变, 表面光滑。经胃镜下行高频电切。病理检查: 光镜下见瘤组织由圆形或多角形的瘤细胞构成, 胞浆丰富, 含有分布较均匀的嗜伊红颗粒, 胞核居中或偏侧, 瘤细胞排列成巢状或条索状, 其间有少量纤维组织分隔, 胞浆经淀粉酶处理后, PAS 染色阳性。病理诊断: 食管颗粒细胞瘤。

2 讨论

颗粒细胞瘤多发于舌及皮下组织, 发生于消化道者则以食管多见。对于本病来源尚有争议。其肿瘤细胞浆含较丰富的伊红色, PAS 阳性(抗淀粉性)是其特征。近年来多认为本病是雪旺氏细胞或外周神经来源的新生物性病变, 故有作者主张采用颗粒细胞瘤的命名来替代沿用已久的颗粒细胞肌母细胞瘤[1]。

本病好发于中年以上, 73% 为女性。临床表现缺乏特异性, 不易和食管平滑肌瘤或食管癌区别。胃镜发现粘膜下呈灰白色或黄色肿块, 提示本病。超声内镜检查可显示肿瘤起源的层次及扩散, 具有如下特点: ① 95% 的病例, 肿瘤< 2 cm; ② 100% 的病例呈低回声实体型; ③95% 的肿瘤发生于内层[2]。食管颗粒细胞瘤大多为良性, 其少数病变的浸润性不能视为恶性特征, 其恶性诊断依赖于转移病变的发现[3]。本病最终依靠病理确诊。内镜下施行肿块局部电凝切除是较好的治疗方法, 少数恶性者的治疗则类同食管癌。

关键词: 食管颗粒细胞瘤; 诊断
中图法分类号: R735.1 文献标识码: B

参考文献:

[1] 冯昌宁, 黄玉耀, 钱允庆, 等. 食管颗粒细胞瘤 1 例[J]. 中华外科杂志, 1983, 8: 482.
[2] Palazzo L, Landi B, Cellier C. Endosonographic features of esophageal granular cell tumors Endoscopy[J]. 1997, 29(9): 850—853.
[3] Chatelain D, Terris B, Molas G, *et al*. Infiltrating granular cell tumor of the esophagus: a description of two cases[J]. Ann Pathol, 2000, 20(2): 158—162.

(编辑 陈聪连)

作者简介: 袁 亮(1964—), 男, 重庆市人, 主治医师, 主要从事消化系疾病的研究。电话: (023)42721262
收稿日期: 2001-05-10; 修回日期: 2001-07-20

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