DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.08.017

文章编号:1000-5404(2001)08-0913-02

论著

三氧化二砷诱导肝癌细胞 $HepG_2$ 凋亡作用

闻勤生[1],罗俊卿[1],焦成松[2] (第四军医大学唐都医院:[1]消化内科;[2]传染科;西安 710038)

提 要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)诱导肝癌细胞 $HepG_2$ 凋亡作用。**方法** 应用普通光学显微镜、荧光显微镜和流式细胞仪观察 As_2O_3 对 $HepG_2$ 细胞株的形态学改变和诱发凋亡率。**结果** As_2O_3 作用于细胞后,可看到较典型的细胞凋亡形态学改变,细胞体积缩小、染色质固缩成斑块状、呈半月型紧贴于核膜周边、核碎裂、凋亡小体形成等。AO/EB 荧光染色法显示,细胞凋亡率为3.1%~9.1%。As_2O_3 诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡作用呈时间依赖性,最佳浓度为2 μmol/L。流式细胞仪 DNA 直方图上呈现典型的亚二倍体凋亡峰。As_2O_3 主要作用于细胞周期的 G_2/M 期。**结论** As_2O_3 具有诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡作用,具有治疗肝癌的潜在价值。

关键词: 三氧化二砷;肝癌;细胞凋亡
中图法分类号: R329.28;R735.7;R979.1 **文献标识码:** A

Arsenic trioxide induces apoptosis in liver cancer cell $HepG_2$

WEN Qin-sheng, LUO Jun-qing, JIAO Cheng-song (Department of Gastroenterology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710038, China)

Abstract: Objective To explore the effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on apoptosis of liver cancer cell lines $HepG_2$. **Methods** Morphological changes and apoptosis rate of $HepG_2$ cell induced by As_2O_3 were observed with fluorescent microscopy and flow cytometry assays. **Results** 24 h after exposure to the drug, $HepG_2$ exhibited some morphologic features of apoptosis including cell shrinkage, nucleus condensation, DNA fragmentation and formation of apoptotic bodies. The apoptotic rate of $HepG_2$ was 3.1% - 9.1% by fluorescent microscopy assay. The optimum concentration of As_2O_3 was 2 μmol/L. A typical subdiploid peak before G_1 phase was found with flow cytometry. **Conclusion** As_2O_3 can induce apoptosis of $HepG_2$ and mainly acts in G2/M phase, therefore, has a potential value in clinical therapy for liver cancer.

Key words: arsenic trioxide; liver neoplasm ; apoptosis

三氧化二砷(Arsenic trioxide, As_2O_3)治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)疗效满意[1],且证实其发挥作用的机制是诱导白血病细胞凋亡[2]。As_2O_3 对实体瘤是否有治疗作用,目前尚不肯定[3]。我们观察 As_2O_3 诱导肝癌细胞株 $HepG_2$ 凋亡作用,以寻找治疗肝癌的新途径。

1 材料和方法

1.1 材料

As_2O_3 注射液 5 mmol/L,哈尔滨医科大学附一院药剂科制备,应用时用 RPMI1640 培养液稀释至所需浓度。肝癌细胞株 $HepG_2$,由军事医学科学院分子病毒学研究所提供。RPMI1640 培养液、小牛血清、吖啶橙/溴乙锭(AO/EB)均购于华美公司。凋亡试剂盒为美国 Coulter 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 AO/EB 荧光染色及观察 按陈丽娟等[4]方法。取对数生长期 $HepG_2$ 细胞 1×10^5 接种于培养瓶,待细胞贴壁后,分别加入 10、5、2、1 μmol/L As_2O_3,对照组加等体积培养液,每浓度组设4个复孔,分别培养至24、48、72 h。取细胞悬液 100 μl,加入 AO/EB 染料 4 μl 混匀,置 1 滴于载玻片上,覆盖玻片,荧光显微镜下观察 200 个细胞,分别计数活细胞(VN)、早期凋亡细胞(VA)、晚期凋亡细胞(NVA)及非凋亡的死亡细胞(NVN)。计算细胞凋亡率,凋亡率(%) = (VA + NVA)/(VA + NVA + VN + NVN) × 100%。

1.2.2 流式细胞仪检测 细胞培养方法同前,收集经 2 μmol/L As_2O_3 处理的 $HepG_2$ 细胞,PBS 洗涤后,4 ℃乙醇固定 12 h 以上,离心除去乙醇,加 RNA 酶处理后,用碘化丙啶(PI)染色,上流式细胞仪检测 DNA 含量和细胞周期。资料均经 Multicycle 软件收集、贮存和分析。

1.2.3 普通光学显微镜观察 取对数生长期 $HepG_2$ 细胞 1×10^4 接种于置有盖玻片的 6 孔培养板内,待细胞贴壁后,实验组加入 2 μmol/L As_2O_3,对照组加等体积培养液,分别培养至 24、48、72 h,终止培养,吸出培养液,取出盖玻片,常规 HE 染色,光镜下观察细胞形态并照像。

1.2.4 统计学处理 数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用方差分析。

2 结果

2.1 As_2O_3 诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡率

以 2 μmol/L 组最高,呈时间依赖性,见表 1。

表 1 As_2O_3 诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡的凋亡率(%,$\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Apoptotic rate of $HepG_2$ treated with As_2O_3 (%, $\bar{x}\pm s$)

t/h	As_2O_3 (μmol/L)				
	10	5	2	1	0(Control)
24	3.1 ± 0.6^{ab}	5.6 ± 0.6^{a}	6.4 ± 0.5^{a}	4.3 ± 0.3^{ab}	0.6 ± 0.2
48	5.5 ± 0.7^{ab}	6.1 ± 0.5^{ab}	8.5 ± 0.9^{a}	5.9 ± 0.7^{ab}	1.1 ± 0.4
72	6.0 ± 0.9^{ab}	6.9 ± 0.8^{ab}	9.1 ± 1.2^{a}	7.7 ± 1.1^{a}	1.6 ± 0.5

a: $P<0.01$ *vs* control; b: $P<0.01$ *vs* 2 μmol/L As_2O_3

2.2 细胞形态学观察

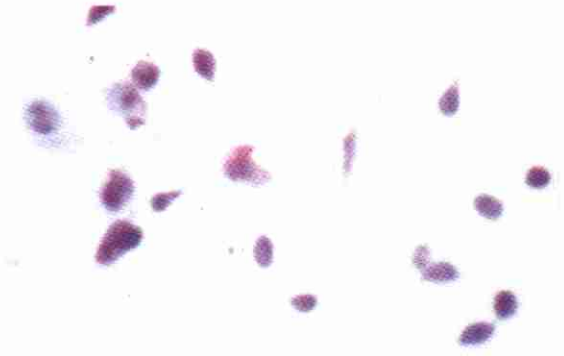
2 μmol/L As_2O_3 作用 24 h 后,细胞开始出现凋亡形态学改变,48~72 h 凋亡细胞明显增加。经 HE 染色后,见到较典型的

作者简介:闻勤生(1955-),男,江苏省泰州市人,硕士,副教授,主要从事肝脏疾病方面的研究,发表论文31篇。电话:(029)3577421

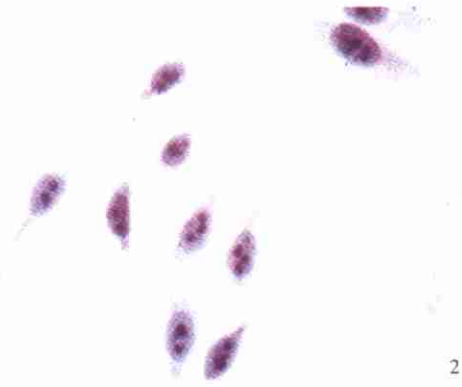
收稿日期:2001-04-30;修回日期:2001-06-03

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

细胞凋亡形态学变化：细胞体积缩小，染色质固缩成斑片状，呈半月型紧贴于核膜周边，核碎裂，凋亡小体形成等，见图1。对照组的肝癌细胞呈梭形、体积较大、胞核呈椭圆形、核膜清楚、核仁位于核中央、清晰可见，见图2。



1



2

图1 As_2O_3 作用48 h后 $HepG_2$ 细胞的形态学改变 （HE×400）

Fig 1 Morphological changes of $HepG_2$ induced with As_2O_3 for 48 h （HE×400）

图2 对照组 $HepG_2$ 细胞的形态 （HE×400）

Fig 2 Morphology of $HepG_2$ in control group （HE×400）

2.3 流式细胞仪检测

DNA直方图上出现典型的亚二倍体凋亡峰，2 μmol/L As_2O_3 作用24、48、72 h凋亡率分别为6.2%、8.3%和8.9%，与AO/EB荧光染色法测得的凋亡率结果相近。As_2O_3 主要作用于细胞周期的 G_2/M期，见表2。

表2 As_2O_3 对 $HepG_2$ 细胞周期的影响（%）

Tab 2 Effect of As_2O_3 on cell cycle of $HepG_2$（%）

t/h	G_0/G_1	S	G_2/M
0	58.4	26.5	15.1
24	59.2	24.5	16.3
48	38.6	24.6	36.8
72	34.0	22.8	43.2

3 讨论

以往对肿瘤的研究，多认为肿瘤细胞的无限增殖是肿瘤形成的关键。近年来，随着对细胞凋亡研究的深入，认识到肿瘤的发生、发展不仅与肿瘤细胞增殖过度和分化异常有关，而且与细胞凋亡受阻密切相关。Hino等[5]研究证实细胞凋亡存在于肝癌发展的各个阶段，不过随着肿瘤的发展，其增殖率高于凋亡率。因此，设法诱导肿瘤细胞凋亡可能是消除肿瘤的手段之一。临床上大多数化疗药物都具有不同程度的诱导肿瘤细胞凋亡作用[6]。As_2O_3 因具有较强的诱导白血病细胞凋亡作用，故用于治疗APL获得满意疗效[7]。

本研究表明，As_2O_3 能诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡，细胞凋亡率为3.1%～9.1%，各浓度组凋亡率与对照组比较差异显著（$P<0.01$）。诱导细胞凋亡作用在0～72 h内呈时间依赖性，2 μmol/L As_2O_3 诱导凋亡率与其它各浓度比较差异显著（$P<0.01$），说明 As_2O_3 诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡最佳浓度可能为2 μmol/L。我们以前已观察了 As_2O_3 对 $HepG_2$ 的细胞毒作用，结果显示，药物浓度愈高，细胞毒作用愈强；而 As_2O_3 诱导 $HepG_2$ 细胞凋亡作用，并非呈浓度依赖性。因此，认为高浓度的 As_2O_3 对 $HepG_2$ 细胞的影响主要表现为细胞毒作用增强，而并非诱导凋亡作用增强。As_2O_3 作用于细胞后，可见到较典型的细胞凋亡的形态学变化，流式细胞仪DNA直方图上呈现典型的亚二倍体的凋亡峰，检测24～72 h凋亡率为6.2%～8.9%，与AO/EB荧光染色法所测结果相近。本实验测定的凋亡率较小，可能与细胞凋亡发生的整个过程短暂，凋亡时间不同步，部分凋亡的细胞已碎裂而未能检测到有关。细胞周期分析，As_2O_3 作用48 h后，$HepG_2$ 细胞的细胞周期发生明显变化，G_0/G_1 期细胞从58.4%下降到34.0%，而 G_2/M期从15.1%上升至36.8%，说明 As_2O_3 使该细胞生长阻止于 G_2/M期。

参考文献：

[1] Lan W X, San Z F, He J D. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide injection[J]. Zhonghua Xiaohua Zazhi(Chin J Dig), 1999,20(2):109－109.

[2] Akao Y, Mizoguchi H, Kojima S, *et al*. Arsenic induces apoptosis in B-cell leukaemic cell lines *in vitro*: activation of caspases and down-regulation of Bcl-2 protein[J]. Br J Haematol,1998,102(4):1 055－1 060.

[3] Tan J H, Tu S P, Jiang S H, *et al*. Induction of apoptosis by arsenic trioxide on gastric cancer cell lines[J]. Zhonghua Xiaohua Zazhi(Chin J Dig),2000,20(1):37－39.

[4] Chen L J, Shen Y L, Wang C Y, *et al*. Apoptosis of HL-60 cell induced by cytosine arabinoside with AO/EB fluorimetric determination[J]. Zhonghua Xueyixue Zazhi (Chin J Hematol),1998,19(1):41－42.

[5] Hino N, Higashi T, Nouso K, *et al*. Apoptosis and proliferation of human hepatocellular carcinoma[J]. Liver,1996,16(1):123－129.

[6] Jiang S, Song M J, Shin E C, *et al*. Apoptosis in human hepatoma cell lines by chemotherapeutic drugs *via* Fas-dependent and Fas-independent pathways[J]. Hepatology,1999,29(1):101－110.

[7] Akao Y, Yamada H, Nakagawa Y. Arsenic-induced apoptosis in malignant cells *in vitro*[J]. Leuk Lymphoma,2000,37(1-2):53－63.

（编辑 张大春）

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