

[文章编号] 1000-2200(2004)06-0485-02

·基础医学·

三氧化二砷对恶性黑色素瘤 A₃₇₅ 细胞株凋亡的诱导作用

马 佳, 陈素莲, 陈治文

[摘要] 目的: 研究三氧化二砷(As₂O₃)对人恶性黑色素瘤 A₃₇₅ 细胞株凋亡的诱导作用。方法: 采用流式细胞术(FCM)检测不同浓度的三氧化二砷诱导 A₃₇₅ 细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率。结果: As₂O₃ 浓度分别为 5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 时, A₃₇₅ 细胞的早期凋亡率分别为 9.75%、50.9% 和 43.7%, 晚期凋亡率分别为 2.10%、4.61% 和 11.2%, 总凋亡率分别为 11.85%、55.51% 和 54.9%。结论: As₂O₃ 可诱导 A₃₇₅ 细胞早期凋亡和晚期凋亡, 10 μmol/L 和 20 μmol/L 的 As₂O₃ 可明显增加 A₃₇₅ 细胞总凋亡率。

[关键词] 黑色素瘤; 三氧化二砷; A₃₇₅ 细胞株; 凋亡

[中国图书资料分类法分类号] R 739.5; O 612.5 [文献标识码] A

Effect of arsenic trioxide on induction of apoptosis of melanoma A₃₇₅ cells

MA Jia, CHEN Su-lian, CHEN Zhi-wen

(Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Anhui 233003, China)

[Abstract] **Objective:** To study the effect of arsenic trioxide on induction of apoptosis of melanoma A₃₇₅ cell line. **Methods:** Early apoptosis rate and late apoptosis rate in A₃₇₅ cells were analysed by flow cytometry. **Results:** After pretreated with arsenic trioxide of 5 μmol/L, 10 μmol/L, and 20 μmol/L, the early apoptosis rate in A₃₇₅ cells were 9.75%, 50.9%, and 43.7%, respectively. The late apoptosis rate in A₃₇₅ cells were 2.10%, 4.61%, and 11.2%, respectively. The total apoptosis rate were 11.85%, 55.51%, and 54.9%, respectively. **Conclusions:** The early and the late apoptosis rate in A₃₇₅ cells were induced by arsenic trioxide.

[Key words] melanoma; arsenic trioxide; A₃₇₅ cell line; apoptosis

[收稿日期] 2004-05-17

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2004kj279)

[作者单位] 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233003

[作者简介] 马 佳(1977-), 女, 安徽怀远县人, 助教。

作的重点。本实验通过设定阳性、阴性及空白对照减少了系统误差, 提高了实验的特异性。目前, 免疫组化的方法测定的 ER 蛋白状态只是测定了 ER α , 随着 ER β 单克隆抗体的开发及应用, 常规测定 ER β 的蛋白表达将成为可能, 这对完善乳腺癌内分泌治疗的纳入标准和开发应用 ER 亚型的调节剂具有重要意义。

[参 考 文 献]

- [1] Enmark E, Gustafsson JA. Oestrogen receptors - an overview [J]. *J Intern Med*, 1999, 246(2): 133~138.
- [2] Leygue E, Dotzlaw H, Watson PH, et al. Altered estrogen receptor alpha and beta messenger RNA expression during human breast tumorigenesis[J]. *Cancer Res*, 1998, 58(15): 3197~3201.
- [3] Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, et al. Expression of estrogen receptor-beta in human breast tumors[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1997, 82(7): 2371~2374.
- [4] Hawkins MB, Thornton JW, Crews D, et al. Identification of a third distinct estrogen receptor and reclassification of estrogen receptors in teleosts[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97

三氧化二砷(As₂O₃)是我国传统中药的主要成分, 长期以来, 砷及其化合物一直被认为是剧毒物质, 随着医学的发展, 砷的毒理、药理研究也有了进展。近年来国内外学者应用其治疗以急性早幼粒细胞白血病为主的恶性血液病和某些实体瘤, 疗效显

(20): 10751~10756.

- [5] Paech K, Webb P, Kuiper GG, et al. Differential ligand activation of estrogen receptors ER α and ER β at AP1 sites[J]. *Science*, 1997, 277(5331): 1508~1510.
- [6] Sasano H, Suzuki T, Matsuzaki Y, et al. Messenger ribonucleic acid in situ hybridization analysis of estrogen receptors alpha and beta in human breast carcinoma[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 1999, 84(2): 781~785.
- [7] Speirs V, Parkes AT, Kerin MJ, et al. Coexpression of estrogen receptor alpha and beta: Poor prognostic factors in human breast cancer[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 525~528.
- [8] 温险峰, 沈镇宙, 吴 昊, 等. 雌激素受体 β 在乳腺癌中的表达[J]. *中华实验外科杂志*, 2002, 19(1): 27~28.
- [9] 吴 穷, 汪子书, 秦凤展, 等. 乳腺癌雌激素受体 ER α 和 ER β 的表达[J]. *蚌埠医学院学报*, 2003, 28(5): 383~385.
- [10] Speirs V, Mabne C, Walton DS, et al. Increased expression of estrogen receptor beta mRNA in tamoxifen-resistant breast cancer patients[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(21): 5421~5424.
- [11] Dotzlaw H, Leygue E, Watson PH, et al. Estrogen receptor-beta messenger RNA expression in human breast tumor biopsies: Relationship to steroid receptor status and regulation by progestins[J]. *Cancer Res*, 1999, 59(3): 529~532.

著。砷与含巯基的酶结合,可抑制酶的活性;与DNA聚合酶结合,影响DNA的合成与修复;砷还可诱导哺乳动物细胞的染色体畸变。本研究采用人恶性黑色素瘤A₃₇₅细胞株作为实验模型,观察砷及其化合物对A₃₇₅细胞凋亡的诱导作用,以期恶性黑色素瘤治疗提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 人恶性黑色素瘤细胞株A₃₇₅(中科院细胞所);RPMI 1640培养基和胰蛋白酶(GIBCO公司);As₂O₃和二甲亚砜(DMSO)(SIGMA公司);四氮唑蓝(珠海丽宝公司);Annexin V-FITC试剂盒(美国COULTER);新生小牛血清(杭州四季青生物材料有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 人恶性黑色素瘤细胞株A₃₇₅细胞贴壁培养于含10%新生小牛血清的RPMI 1640培养液中,置于37℃、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养,3~4天传代一次。

1.2.2 流式细胞术(FCM)检测细胞凋亡 将5×10⁸/L的A₃₇₅在培养瓶中培养3天,弃去培养液,分别加入含As₂O₃的新鲜培养液(As₂O₃用NaOH滴定至溶解,配制成pH 7.2的1 mmol/L储存备用,终浓度为5 mmol/L、10 mmol/L、20 mmol/L)。同时设不加药物的对照组。24 h后收集细胞,用冷PBS洗涤细胞,去除上清液后按Annexin V-FITC试剂盒操作;用冷的连接缓冲液调整细胞数目为10⁵~10⁶/ml,加入5 μl Annexin V-FITC和2.5 μl PI(碘化丙啶),1 h内用流式细胞仪(COULTER型,美国产)检测细胞的凋亡。

2 结果

FCM检测结果显示:As₂O₃浓度分别为0 μmol/L、5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L时,A₃₇₅细胞的早期凋亡率分别为1.72%、9.75%、50.9%、43.7%,晚期凋亡率分别为0.60%、2.10%、4.61%、11.2%,总凋亡率分别为2.32%、11.85%、55.51%、54.9%,10 μmol/L和20 μmol/L的As₂O₃可明显增加A₃₇₅细胞总凋亡率(见图1)。

3 讨论

恶性黑色素瘤可发生于机体全身的皮肤组织,是一种恶性程度很高的皮肤癌,易发生转移,5年生存率极低。恶性黑色素瘤的化疗效果很差,有效率低于25%^[1],国外主要是免疫治疗和基因治疗^[2,3]。

众所周知,砷是人体所必需的一种微量元素,但所用剂量到一定浓度则为毒性物质,正常人体内砷的含量约14~21 mg,砷进入人体后95%以上与红细胞的血红蛋白结合。适量的砷能刺激机体造血功能,

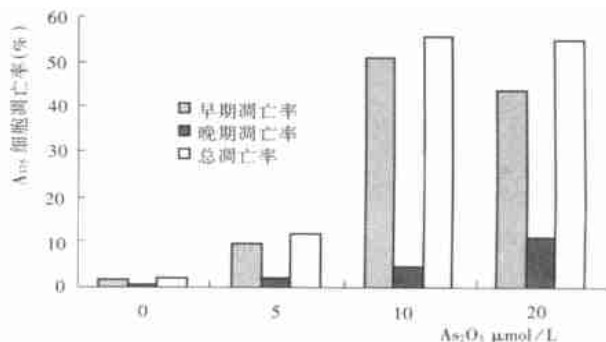


图1 流式细胞术分析As₂O₃诱导的A₃₇₅细胞凋亡

促进细胞的生长繁殖。近年来,砷剂用于恶性肿瘤治疗的研究,已得到越来越多的报道。体内外研究发现,As₂O₃抗肿瘤的主要细胞学和分子学机理涉及到:(1)诱导细胞凋亡和促进部分分化;(2)降解PML-RARα蛋白异性融合蛋白^[4];(3)下调Bcl-2蛋白的表达;(4)下调线粒体跨膜电位ΔΨ_m;(5)活化半胱氨酸蛋白酶Caspases等^[4]。砷剂用于血液系统恶性肿瘤的临床治疗,已取得较好的疗效^[5]。还有研究结果显示,As₂O₃对恶性黑色素瘤A₃₇₅细胞的增殖有浓度依赖性抑制作用,并可诱导体内产生nm23蛋白,对抑制肿瘤的转移和复发及判断预后具有重要意义^[6]。As₂O₃可明显抑制MG-63骨肉瘤细胞的增殖,1 μmol/L以上浓度的As₂O₃对MG-63骨肉瘤细胞的抑制率可达70%,As₂O₃抑制MG-63骨肉瘤细胞的增殖主要通过诱导细胞凋亡实现^[7]。砷剂应用于恶性黑色素瘤的治疗,国内外尚无报道。本研究显示了As₂O₃对恶性黑色素瘤凋亡的诱导作用,为砷及其化合物为恶性黑色素瘤治疗提供新的理论和实验依据。

[参 考 文 献]

- 王勇. 肿瘤基因疫苗——肿瘤免疫治疗的新途径[J]. 国外医学·肿瘤学分册, 2000, 27(3): 129~132.
- 陈治文, 夏俊, 刘爱国等. TIL与脐血LAK细胞对肿瘤细胞的杀伤作用[J]. 中国肿瘤临床与康复, 1998, 5(2): 12~13.
- 柳湘. 联合基因治疗肿瘤研究新进展[J]. 国外医学·肿瘤学分册, 2000, 27(5): 257~259.
- 陈思宁. 氧化砷治疗恶性血液病和肿瘤研究进展[J]. 西安医科大学学报, 2001, 22(20): 191~193.
- 李方. 砷剂的生物学作用及应用前景[J]. 国外医学·中医中药分册, 2001, 23(3): 134~138.
- 陈治文, 夏俊, 胡守芬等. 三氧化二砷诱导恶性黑色素瘤A₃₇₅和B₁₆细胞凋亡的研究[J]. 癌变·畸变·突变, 2002, 14(4): 218~221.
- 方成, 陈振光, 喻爱喜等. 三氧化二砷诱导骨肉瘤细胞凋亡的实验研究[J]. 中华骨科杂志, 2003, 23(6): 345~348.