

[文章编号] 1000-2200(2005)01-0011-03

·基础医学·

As₂O₃ 诱导人膀胱癌 BIU-87 细胞株凋亡及其对细胞周期的影响

夏俊¹, 陈俊霞², 盛甫秀², 崔秀云²

[摘要] 目的: 观察三氧化二砷(As₂O₃) 对人膀胱癌 BIU-87 细胞株生长抑制作用, 并探讨对细胞周期及凋亡的影响。方法: CellTiter 96 Aqueous One 试剂检测 BIU-87 细胞株增殖活力; 荧光染色观察凋亡细胞的形态学变化; 流式细胞术分析细胞周期及凋亡。结果: As₂O₃ 与 BIU-87 细胞株生长抑制率之间有明显的浓度依赖关系 ($P < 0.01$), IC₅₀ 为 28.92 μmol/L; 荧光显微镜下观察到经 As₂O₃ 作用的 BIU-87 细胞核膜消失, 核染色质呈大小不等的小圆形碎片; 流式细胞术结果表明 30 μmol/L 的 As₂O₃ 处理 BIU-87 细胞株 48 h 后, G₀/G₁ 期细胞比例下降, S 期细胞比例增加, 凋亡率为 47.37%。结论: As₂O₃ 能显著抑制 BIU-87 细胞株增殖; 使细胞阻滞在 S 期, 并进一步诱导细胞凋亡。

[关键词] 膀胱肿瘤; 三氧化二砷; BIU-87 细胞株; 凋亡; 细胞周期

[中国图书资料分类法分类号] R 731.14; O 612.5 [文献标识码] A

Arsenic trioxide induced apoptosis in human bladder cancer BIU-87 cell line and its influence on cell cycle

XIA Jun¹, CHEN Jun-xia², SHENG Fu-xiu², CUI Xiu-yun²

(1. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Anhui 233003; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Dalian Medical University, Liaoning 116027, China)

[Abstract] **Objective** To observe the effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on the cell growth, cell cycle and apoptosis of human bladder cancer BIU-87 cells line. **Methods:** CellTiter 96 Aqueous One was used to determine the cell proliferation. Morphological changes of BIU-87 cells were observed by fluorescence staining of Hoechst 33258. Cell cycle and apoptosis were analyzed by flow cytometry (FCM). **Results:** There was obviously a concentration-dependent relationship between As₂O₃ and the inhibition of BIU-87 cell proliferation ($P < 0.01$). IC₅₀ was 28.92 μmol/L. Morphological observation by fluorescence staining indicated that As₂O₃ induced apoptosis of BIU-87 cells. FCM demonstrated that the number of cells in G₀/G₁ phase was decreased, while that in S phase were increased after treated with As₂O₃, and apoptosis rate was 47.37%. **Conclusions:** The results suggest that As₂O₃ can inhibit human bladder cancer cells BIU-87 growth by means of cell proliferation inhibition, S phase arrest and induction of apoptosis.

[Key words] bladder neoplasms; arsenic trioxide; BIU-87 cell line; apoptosis; cell cycle

膀胱癌是泌尿系统最常见的恶性肿瘤, 具有晚期恶性度加重和易复发的特点, 术后化疗是膀胱癌最重要的辅助治疗措施。由于化疗药物毒副作用及肿瘤抗药性的增加, 其疗效显著降低。近年来寻找

安全、有效的防治膀胱癌复发的方法一直是令人关注的研究方向。本实验以人膀胱癌 BIU-87 细胞株为工作模型, 研究 As₂O₃ 对其生长抑制作用, 并初步探讨其作用机制, 为膀胱癌的临床治疗提供新的理论和实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂 人膀胱癌 BIU-87 细胞株(大连医科大学生物化学与分子生物学教研室保存); As₂O₃(Sigma 产品, 用 NaOH 滴定至溶解, 配制成 pH 7.2 的 1 mmol/L 的储存液); DMEM 培养基(HyClone 产品); 胎牛血清(中国医学科学院血液学

[收稿日期] 2004-06-20

[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2003kj256), 蚌埠医学院科研项目(by0206)

[作者单位] 1. 蚌埠医学院生物化学与分子生物学教研室, 安徽蚌埠 233003; 2. 大连医科大学生物化学与分子生物学教研室, 辽宁大连 116027

[作者简介] 夏俊(1965-), 女, 安徽庐江县人, 硕士, 副教授。

[3] Arenas E, Persson H. Neurotrophin-3 prevents the death of adult central noradrenergic neurons in vivo[J]. *Nature*, 1994, 367(6461): 368~371.[4] Altar CA, Boylan CB, Fritsche M, et al. Efficacy of brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 on neurochemical and behavioral deficits associated with partial nigrostriatal dopamine lesions[J]. *J Neurochem*, 1994, 63(3): 1021~1032.[5] Kaisho Y, Yoshimura K, Nakahama K, et al. Cloning and expression of a cDNA encoding a novel human neurotrophic factor[J]. *FEBS Lett*, 1990, 266(1-2): 187~191.[6] 穆援越, 范明, 甘思德. 人神经生长素-3 全长基因克隆[J]. *神经科学*, 1995, 2(2): 73~76.[7] 张伶俐, 胡火珍, 李小玉, 等. 神经生长素-3 的克隆与真核表达[J]. *四川大学学报(自然科学版)*, 2002, 39(Suppl): 195~199.

研究所); CellTiter 96 Aqueous One 试剂(Promega 产品); 荧光染料 Hoechst 33258(Sigma 产品); DNA Prep reagents kit(Coulter 产品)。

1.2 主要仪器 流式细胞仪(Becon Dickinson Facsclibur, 美国); Olympus 多功能显微镜(BX51 型, 日本); 二氧化碳培养箱(NuaireUS Auto Flow, 美国); 倒置显微镜(XD-101 型, 国产); 酶标仪(国产)等。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 BIU-87 细胞株贴壁培养于含 10%胎牛血清、 1.0×10^5 u/L 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液中, 置 37°C 、5% CO_2 的饱和湿度培养箱中培养。

1.3.2 细胞增殖活性测定 BIU-87 细胞株经胰蛋白酶消化, 接种于 96 孔板, 每孔 $100 \mu\text{l}$ 培养液含 2 000 个细胞, 培养 24 h 后, 对照组加 $50 \mu\text{l}$ 培养液, 实验组加入含 As_2O_3 的培养液 $50 \mu\text{l}$, 使其终浓度分别为 10、20、30、40、 $50 \mu\text{mol/L}$, 继续培养 48 h, 每孔加 CellTiter 96 Aqueous One 试剂 $20 \mu\text{l}$, 37°C 孵育 2 h, 酶标仪测 A_{490} 光吸收值(每组设 6 个平行孔, 独立重复 3 次)。

$$\text{肿瘤细胞生长抑制率(\%)} = \frac{1 - \text{实验组 } A_{490} \text{ 值}}{\text{对照组 } A_{490} \text{ 值}} \times 100\%$$

1.3.3 荧光染色 BIU-87 细胞株传至放有盖玻片的六孔板中, 待细胞达 70%~80% 汇片, 实验组用 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 作用细胞 48 h, 取出玻片, PBS 冲洗, 0.25%戊二醛固定, $5 \mu\text{g/ml}$ 荧光染料 33258 避光染色 5 min, PBS 洗涤, 甘油封片, 荧光显微镜下观察细胞核 DNA 荧光变化。

1.3.4 细胞周期及细胞凋亡测定 实验组用 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 作用 BIU-87 细胞株 48 h, 收集细胞制备单细胞悬液。70%冷乙醇固定, PBS 洗涤, RNase A 在 37°C 孵育 30 min。离心, 弃上清, 按 DNA Prep reagents kit 说明书操作, 加入 DNA-PrepLRP $210 \mu\text{l}$, DNA-Prep Stain 2.2 ml, 混匀, 避光染色, 室温 30 min。用流式细胞仪进行检测(Cellquest 软件获取), Modfit 软件分析结果。

1.4 统计学方法 采用直线回归与相关分析。

2 结果

2.1 细胞增殖活性的变化 以不同浓度 As_2O_3 和肿瘤细胞生长抑制率作直线回归和相关分析, 相关系数(r)=0.9 926, $P < 0.01$; 直线回归方程式为 $\hat{Y} = 3.443 + 1.610X$, 表明 As_2O_3 与 BIU-87 细胞株生长抑制率之间有显著的浓度依赖关系, IC_{50} 为 $28.92 \mu\text{mol/L}$ (见表 1)。

表 1 As_2O_3 对 BIU-87 细胞株增殖的抑制作用($n_i = 4$)

$\text{As}_2\text{O}_3(\mu\text{mol/L})$	抑制率(\%)($\bar{x} \pm s$)
10	19.38 \pm 1.63
20	32.74 \pm 7.30
30	54.83 \pm 6.91
40	71.05 \pm 3.86
50	80.73 \pm 3.81

2.2 荧光显微镜观察凋亡细胞 镜下可见对照组细胞核呈弥散均匀荧光, As_2O_3 作用后的 BIU-87 出现大量凋亡细胞, 其核膜消失, 核内可见染色浓度改变的颗粒状荧光, 核染色质呈大小不等的小圆形碎片(见图 1)。

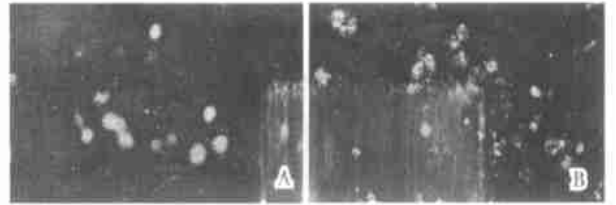


图 1 荧光显微镜观察 As_2O_3 诱导 BIU-87 细胞凋亡的形态学变化($200 \times$)(A. BIU-87; B. $30 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用 BIU-87 细胞 48h)

2.3 细胞凋亡及细胞周期变化 流式细胞术结果显示 $30 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 处理 BIU-87 细胞株 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比例下降, S 期细胞比例增加, 细胞凋亡率从 5.88% 上升到 47.37%(见表 2 及图 2)。

表 2 As_2O_3 对 BIU-87 细胞周期及凋亡的影响[百分率(\%)]

组别	G_0/G_1	S	G_2/M	细胞凋亡
对照组	81.40	13.23	5.37	5.88
As_2O_3 组	53.22	46.78	0.00	47.37

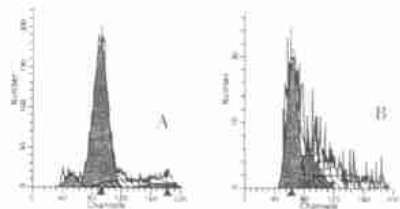


图 2 流式细胞术分析 As_2O_3 对 BIU-87 细胞周期凋亡的影响(A. BIU-87; B. $30 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用 BIU-87 细胞 48h)

3 讨论

砷在人体中属于微量元素, 主要以硫化物和氧化物形式存在, 与巯基有很强的亲和力, 能影响体内多种参与细胞能量代谢和 DNA 合成及修复酶的活性。长期以来, 砷化合物一直被认为是一种剧毒物质, 可导致哺乳类动物细胞染色体异常、姊妹染色体交换、DNA-蛋白交联和 DNA 链降解, 具有致癌、致

畸作用。然而在祖国传统医学中,人们用砷剂治疗梅毒、痔疮、牛皮癣、风湿病已历史悠久。但由于砷化合物毒性较大,故临床使用并不多。直至 20 世纪 90 年代初,我国学者应用 As_2O_3 治疗急性早幼粒细胞性白血病获得成功,砷化合物的应用才又重新被认识。人们发现 As_2O_3 不仅对各型白血病有效,对其他多种恶性肿瘤也有良好的治疗效果^[1~6]。有资料表明, As_2O_3 对人鼻咽低分化鳞癌移植瘤的生长有显著的抑制作用,除了能诱导鼻咽癌细胞凋亡外,还能够诱导鼻咽癌细胞的分化成熟^[2]; As_2O_3 对肝癌、食管癌、舌癌等实体瘤已从体外细胞、动物移植瘤实验到临床试验都观察到有明显的抑瘤作用^[3~6],因而在实体瘤治疗方面有很大的潜力。另有研究表明,砷对细胞 DNA 合成的影响呈双向性^[7],即在低浓度(0.05~0.5 $\mu\text{mol/L}$)时促进 DNA 合成,使某些始发致癌因素导致的突变或损伤的 DNA 复制增多,促进肿瘤发展;而在较高浓度(0.5~5 $\mu\text{mol/L}$)时抑制 DNA 合成,使突变或损伤的 DNA 复制减少,从而抑制肿瘤发展。血砷动力学研究显示^[8], As_2O_3 在血浆中无蓄积倾向,无明显的骨髓抑制及心、肺、肝、肾、神经功能损害,因而是一种有效且相对安全的药物。

近年来,细胞周期的改变和凋亡的关系愈来愈引起人们的重视。凋亡是由基因编码调控的细胞主动自杀过程,又称程序性细胞死亡(programmed cell death,PCD),既是生物体维持自身稳定和平衡的一个重要机制,也是消除异常增殖细胞的理想途径^[9,10]。有资料表明,许多化学结构不同、作用靶点迥异的抗肿瘤药物均可诱导细胞凋亡,因此通过诱导细胞凋亡的途径杀伤肿瘤细胞可能是不同作用机制的抗肿瘤药物发挥作用的共同通路。 As_2O_3 对肿瘤细胞周期的影响表现在以下几个方面:(1) 能使人肝癌细胞周期阻滞在 S 期^[11]; (2) 通过抑制在 G_1/S 期转换中起重要作用的 Rb 蛋白磷酸化,使其不能释放某些转录因子而抑制细胞 G_1/S 期的转换,从而使细胞周期延长^[12]; (3) 调节细胞 G_2/M 期转换的一些关键调控蛋白,如细胞周期蛋白 B 的表达,使细胞生长停滞在 G_2/M 期^[13]; (4) 调节 G_1 期及 G_2/M 期的细胞周期相关蛋白,如下调 CDK6、cdc2 和 cyclinA 的表达,上调 CDK1、p21 的表达,增强 p21 与 CDK6、cdc2、cyclinE、cyclinA 的结合,导致细胞周期在 G_1 及 G_2/M 期阻滞^[14]。本实验结果显示,30 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 作用 BIU-87 细胞株 48 h 后, G_0/G_1 期细胞比例从对照组的 81.40% 下降到 53.22%,而 S 期细胞比例从 13.23% 增加到

46.78%,细胞凋亡率从 5.88% 上升到 47.37%。 As_2O_3 能显著抑制 BIU-87 细胞株的生长,但其作用后非但没有减少 S 期细胞,反而使其增多,说明细胞群被阻滞在 S 期,推测 As_2O_3 抑制了细胞的 DNA 合成,将增殖态的细胞阻滞于 S 期,进而诱导细胞凋亡,从而发挥抗肿瘤作用。

目前关于细胞周期阻滞与细胞凋亡的研究已进入分子水平,我们将在上述实验基础上,对 As_2O_3 如何调节细胞周期相关蛋白的表达以及对细胞凋亡相关基因表达的影响进行更深入的研究。

[参 考 文 献]

- [1] 王丽,陈治文,夏俊,等.三氧化二砷对黑色素瘤 B₁₆ 细胞端粒酶活性影响[J].蚌埠医学院学报,2004,29(3):202~204.
- [2] 马佳,陈素莲,陈治文,等.三氧化二砷对恶性黑色素瘤 A₃₇₅ 细胞株凋亡的诱导作用[J].蚌埠医学院学报,2004,29(6):485~486.
- [3] 杜彩文,李德锐,林英城,等.三氧化二砷诱导人鼻咽低分化鳞癌裸鼠移植瘤细胞分化的研究[J].癌症,2003,22(1):21~25.
- [4] 钱军,秦叔逵,何泽明,等.三氧化二砷注射液治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J].中华肿瘤杂志,2001,23(6):487~489.
- [5] Shen ZY, Tan LJ, Cai WJ, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of oesophageal carcinoma in vitro[J]. *Int J Mole Med*, 1999, 4(1): 33~37.
- [6] 王跃平,竺涵光,张志愿,等.三氧化二砷对舌癌细胞鼠移植瘤的抑制作用[J].上海口腔医学,1999,8(3):132~133.
- [7] 章尧,赵燕,陈昌杰,等.三氧化二砷对 HL-60 细胞生长的影响[J].蚌埠医学院学报,2003,28(2):95~97.
- [8] 倪建华,陈国强,沈志祥,等.静脉滴注三氧化二砷治疗急性早幼粒细胞白血病的药代动力学分析[J].中华血液学杂志,1997,18(5):250~253.
- [9] Hengartner MO. Apoptosis: Corraling the corpses[J]. *Cell*, 2001, 104(3): 325~328.
- [10] Meier P, Finch A, Evan G, et al. Apoptosis in development[J]. *Nature*, 2000, 407(6805): 796~801.
- [11] 刘琳,秦叔逵,陈惠英,等.三氧化二砷选择性诱导人肝癌细胞凋亡及相关基因的实验研究[J].中华肝脏病杂志,2000,8(6):367~369.
- [12] 肖冬梅,孙关林,苏卉,等. As_2O_3 对 K562 细胞 BCR-ABL 蛋白酪氨酸磷酸化的影响[J].中华血液学杂志,1999,20(12):637~639.
- [13] Park JW, Choi YJ, Jang MA, et al. Arsenic trioxide induces G_2/M growth arrest and apoptosis after caspase-3 activation and bcl-2 phosphorylation in promonocytic U937 cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, 286(4): 726~734.
- [14] Park WH, Seol JG, Kim ES, et al. Arsenic trioxide-mediated growth inhibition in MC/CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor, p21, and apoptosis[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(11): 3065~3071.