

[文章编号] 1000-2200(2005)04-0288-03

·基础医学·

三氧化二砷抑制恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞核酸合成的研究

王 丽, 陈治文, 夏 俊

[摘要] 目的: 研究不同浓度的三氧化二砷(As₂O₃)对恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞核酸合成抑制及诱导 B₁₆ 细胞凋亡的作用, 探讨砷及其化合物治疗恶性黑色素瘤的作用机制, 为其治疗恶性黑色素瘤提供新的理论和实验依据。方法: 采用³H-TdR 和³H-UdR 掺入肿瘤细胞 DNA 和 RNA 的方法, 观察不同浓度的 As₂O₃ 对恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞核酸生物合成的抑制作用; 用流式细胞术(FCM)检测 As₂O₃ 诱导 B₁₆ 细胞的凋亡及细胞毒作用。结果: As₂O₃ 对恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞核酸合成抑制和诱导凋亡及细胞毒作用有显著的浓度和时间依赖关系($P < 0.01$)。结论: As₂O₃ 对恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞核酸合成的抑制作用和诱导凋亡及细胞毒作用随药物浓度的增加和作用时间的延长而增强。

[关键词] 黑色素瘤; 三氧化二砷; 黑色素瘤细胞株 B₁₆; 核酸合成; 凋亡

[中国图书资料分类法分类号] R 739.5; O 162.5 [文献标识码] A

Effects of arsenic trioxide on nucleic acid biosynthesis and apoptosis of melanoma B₁₆ cells

WANG Li, CHEN Zhi-wen, XIA Jun

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

[Abstract] **Objective** To study the effect of arsenic trioxide(As₂O₃) on nucleic acid biosynthesis and apoptosis of melanoma B₁₆ cells.

Methods: The nucleic acid biosynthesis in melanoma B₁₆ cells were detected by incorporation of ³H-TdR and ³H-UdR into DNA and RNA, respectively. Apoptosis and necrosis in B₁₆ cells were analyzed by flow cytometry. **Results:** As treated with different doses of As₂O₃ in B₁₆ cells the rates of inhibition and apoptosis and necrosis have both dose-dependent and time-dependent manner ($P < 0.01$).

Conclusions: As₂O₃ can inhibit nucleic acid biosynthesis and induce apoptosis and necrosis in melanoma B₁₆ cells. The assay showed a dose-response and time-response relationship for inhibition of nucleic acid biosynthesis and apoptosis in B₁₆ cells by As₂O₃. The inhibition was enhanced with the increase of As₂O₃ concentration and prolong of culture time.

[Key words] melanoma; arsenic trioxide; melanoma cells line B₁₆; nucleic acid biosynthesis; apoptosis

砷属于微量元素, 主要以硫化物和氧化物的形式存在, 与某些蛋白质或酶的巯基有很强的亲和力, 砷可影响体内 200 多种酶的活性, 特别是那些参与细胞能量途径和 DNA 合成及修复的酶^[1]。砷剂在祖国医学中的应用由来已久, 三氧化二砷(As₂O₃)就是中药砒霜的主要成分, 近年来砷剂作为抗肿瘤药物的研究和应用有了更加深入的发展。恶性黑色素瘤是恶性程度很高的皮肤癌, 可发生于机体全身的皮肤组织, 并可循血液和淋巴转移至全身各器官和黏膜组织。由于肿瘤恶性程度高且多发性, 易转移, 传统化疗效果较差, 故患者的 5 年生存率极低; 国外主要以免疫治疗和基因治疗为主^[2,3]。恶性黑色素瘤在白种人中发病率较高, 我国的发病率也呈逐年上升趋势^[4,5], 而砷剂用于恶性黑色素瘤的治疗国内外鲜见报道。本研究采用鼠恶性黑色素瘤 B₁₆ 细

胞作为工作模型, 观察 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞核酸合成的抑制作用及诱导凋亡和细胞毒作用, 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 主要材料和试剂 鼠恶性黑色素瘤细胞株 B₁₆ (中科院细胞所); As₂O₃ (SIGMA 公司); ³H-TdR 和³H-UdR (中国原子能研究院同位素所); 1640 培养基和胰蛋白酶(Gibco 公司); 新生小牛血清(杭州四季青公司); 49 型玻璃纤维滤纸(上海红星造纸厂); Annexin V-FITC 试剂盒(奥地利 Vienna 公司); 闪烁液(取二甲苯 400 ml、乙酸乙酯 100 ml、对三联苯 1.0 g 等于干燥洁净烧杯中, 溶解后置棕色瓶中 4℃保存备用)。

1.2 主要仪器 液体闪烁计数器(FJ-2107, 西安 262 厂); 多头细胞收集器(ZT-2, 浙江绍兴东浦医疗仪器厂)。FACS Calibur 流式细胞仪(BECTON DICKINSON 公司)。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 恶性黑色素瘤细胞株 B₁₆ 细胞培养于 RPMI 1640 培养液(含 10% 新生小牛血清), 置

[收稿日期] 2004-07-06

[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] 王 丽(1965-), 女, 安徽宿州人, 硕士, 研究方向: 肿瘤分子生物学。

37 °C、5%CO₂、饱和湿度培养箱中培养。

1.3.2 ³H-TdR、³H-UdR 掺入试验 取培养 4~5 天的对数生长期恶性黑色素瘤细胞株 B₁₆ 细胞, 用 V-T (含 2.0 g/L 胰酶和 0.5 mmol/L EDTA) 消化后, 调整浓度为 2.5×10⁸/L 的细胞悬液, 接种 96 孔培养板, 每孔加细胞悬液 100 μl, 培养 24 h 后弃去培养液, 再加入 As₂O₃ 终浓度分别为 5、10、20 和 30 μmol/L 的培养液各 100 μl, 并设对照组。上述测定平行做 4 个复孔。在加入 As₂O₃ 作用 24 h 和 48 h 后各孔分别加入 25 mCi/ml 的 ³H-TdR 或 ³H-UdR 10 ml, 37 °C 慢速震荡 5 min 后放回细胞培养箱继续培养 5 h, 冰浴终止反应。用 V-T 消化液将上述各孔细胞悬起, 用多头细胞收集器将细胞收集到玻璃纤维滤膜上, 依次洗涤、固定、脱水、脱色、烘干, 液体闪烁计数器测定 1 min 脉冲数 (cpm)。

1.3.3 流式细胞术检测 将上述 2.5×10⁸/L 的细胞悬液接种于 24 孔培养板, 每孔加细胞悬液 1.0 ml, 培养 24 h 后弃去培养液, 每孔加入 As₂O₃ 终浓度 10 μmol/L 的新鲜培养液 1.0 ml, 同时设对照组, 分别于 24 h 和 48 h 后收获细胞, 用冷 PBS 洗涤

细胞(4 °C离心 5 min), 去除上清液后按 Annexin V-FITC 试剂盒说明书操作: 用冷连接缓冲液调整细胞数为 10⁵~10⁶/ml, 在此细胞悬液中加入 Annexin V (一种磷脂结合蛋白) 和碘化丙锭 (PI), 1 h 内用流式细胞仪检测细胞的凋亡和坏死。

1.3.4 计算公式 按以下公式计算 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞 DNA 及 RNA 的合成抑制率:

$$\text{合成抑制率}(\%) = \frac{1 - \text{实验组 cpm 值}}{\text{对照组 cpm 值}} \times 100\%$$

1.4 统计学方法 采用秩和检验、t 检验及直线相关与回归分析。

2 结果

2.1 ³H-TdR、³H-UdR 掺入试验 各药物浓度组对 B₁₆ 细胞的 DNA 与 RNA 合成抑制率随 As₂O₃ 浓度的升高和作用时间的延长而升高, 结果见表 1。以 As₂O₃ 浓度的对数值与掺入抑制率作直线回归和相关分析, 实验结果表明 As₂O₃ 与 B₁₆ 细胞 DNA 和 RNA 合成抑制之间有明显的浓度和时间依赖关系 (见表 2)。

表 1 不同浓度 As₂O₃ 作用于 B₁₆ 细胞的核酸合成抑制率 (%) 比较 (n_i=4; $\bar{x} \pm s$)

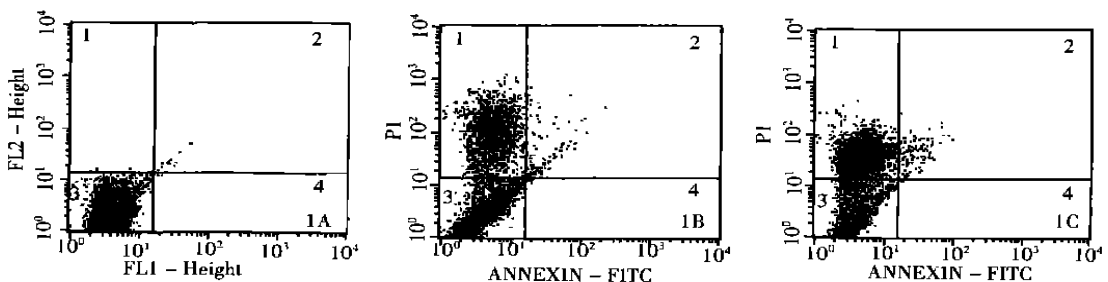
As ₂ O ₃ (μmol/L)	DNA				RNA			
	24 h	48 h	t	P	24 h	48 h	t	P
对照组	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00	>0.05	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00	>0.05
5	4.22±0.65 *	28.17±2.04 *	22.37	<0.01	6.49±1.46 *	24.91±3.02 *	10.98	<0.01
10	18.08±2.31 *	51.05±1.12 *	25.69	<0.01	17.61±3.37 *	67.97±1.94 *	25.90	<0.01
20	26.40±2.52 *	69.76±1.54 *	29.36	<0.01	25.06±5.43 *	91.99±0.45 *	24.57	<0.01
30	40.10±4.18 *	89.68±0.63 *	23.46	<0.01	51.89±5.44 *	92.34±1.05 *	14.60	<0.01
Hc	14.8	18.7	—	—	9.9	12.3	—	—
P	<0.01	<0.01	—	—	<0.01	<0.01	—	—

与对照组比较 *P<0.01

表 2 As₂O₃ 浓度与合成抑制率的直线回归和相关关系

观察指标	24 h		48 h	
	DNA	$\hat{Y}=0.444+0.13X$ $r=0.978$ $P<0.01$	$\hat{Y}=0.324+0.13X$ $r=0.959$ $P<0.01$	
RNA	$\hat{Y}=0.640+0.01X$ $r=0.995$ $P<0.01$	$\hat{Y}=0.558+0.01X$ $r=0.995$ $P<0.01$		

2.2 FCM 检测 结果显示 As₂O₃ 终浓度为 10 μmol/L 和 B₁₆ 细胞分别作用 24 h 和 48 h 的凋亡和死亡率分别是 1.93%、27.95% 和 3.66%、61.94% (见图 1)。由此可见, 同一浓度的 As₂O₃, 随着作用时间的延长, 诱导细胞凋亡和细胞毒作用显著增加, 即 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞的杀伤作用具有时间依赖性。



1A 为对照组, 1B、1C 分别为 10 μmol/L As₂O₃ 作用 B₁₆ 细胞 24 h 和 48 h

图 1 诱导不同时间 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞凋亡和死亡的影响

3 讨论

3.1 砷剂治疗实体瘤的研究 As_2O_3 已成功地应用于白血病的临床化疗, 并发现其对肿瘤细胞选择性高、毒副作用小、化疗效果好、与其他化疗药物无交叉耐药等优点。近年来研究发现 As_2O_3 对人卵巢癌细胞与膀胱癌 BIU-87 的增殖和转移能力有抑制作用, 且抑制作用呈时间和剂量依赖关系, 并能诱导细胞凋亡^[6, 7]。抗肿瘤药物的主要作用机制之一在于干扰或阻断细胞内核酸及蛋白质的合成, 抑制细胞增殖和诱导细胞凋亡^[8, 9]。

3.2 砷剂抗癌作用的机制 砷剂的应用历史悠久, 如用于治疗某些皮肤病、梅毒等。砷是一种毒物, 主要以氧化物与硫化物的形式存在。长期以来, 砷及其化合物一直被认为是剧毒物质和环境致癌因素, 随着医学研究的发展, 砷的毒理、药理研究也有了进展。

3.2.1 抑制细胞增殖 细胞周期存在 G_1/S 与 G_2/M 期 2 个转化限制点, As_2O_3 可导致 G_2/M 期阻滞, 从而抑制细胞增殖。本课题先期研究发现, As_2O_3 可抑制恶性黑色素瘤 A_{375} 细胞的增殖并可诱导细胞凋亡, 且抑制和诱导作用具有浓度依赖关系^[10, 11]。

3.2.2 诱导肿瘤细胞分化和凋亡 研究发现, 低浓度 ($0.1 \sim 0.5 \mu\text{mol/L}$) As_2O_3 可诱导 NB4 及 HL-60 细胞分化; As_2O_3 与蛋白质分子中氨基酸残基中的巯基 (-SH) 有较强的亲合力, 砷与巯基氧化成交联, 从而影响巯基酶或含巯基蛋白质的活性, 影响细胞正常代谢, 诱导细胞凋亡。

3.2.3 直接损伤 DNA As_2O_3 可与 DNA 聚合酶结合, 影响 DNA 合成、修复, 诱导染色体畸变和 DNA 损伤, 砷剂对 DNA 的损伤可能是砷抗肿瘤作用的又一途径, 而且与大多数抗肿瘤药物的作用一样, 对正常细胞和肿瘤细胞无选择性。

3.2.4 抑制血管生成 研究发现, 内皮细胞经低剂量的 As_2O_3 处理, 细胞生长受到显著抑制。血管生成在肿瘤的增殖中起重要的作用, 它可为肿瘤的生长提供丰富的营养和血液供应, 以满足肿瘤细胞迅速生长的需要。血管形成是肿瘤恶性生长、浸润和转移的形态学基础, 且与肿瘤的预后密切相关, 一旦肿瘤组织血管生成发生障碍, 肿瘤细胞就会因缺少营养和氧气供应而生长缓慢, 甚至发生凋亡和坏死。抗肿瘤新生血管的形成可成为治疗肿瘤的一个作用靶点。

As_2O_3 用于恶性黑色素瘤的研究国内外鲜见报道, 本研究结果表明 As_2O_3 可显著抑制 B_{16} 细胞核酸合成, 并可诱导细胞凋亡和细胞毒作用, 且具有时间和剂量依赖性, 这对抑制恶性黑色素瘤细胞的增殖有重要的临床意义。本研究还显示 $10 \mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 分别作用 B_{16} 细胞 24 h 和 48 h 后, 其诱导凋亡和细胞毒作用均随作用时间的延长而增强, 表明 As_2O_3 对 B_{16} 细胞的作用具有时间依赖性, 但细胞毒作用更为显著, 分析原因可为 As_2O_3 浓度较大, 导致细胞毒作用较为显著; 另则, 细胞凋亡是一相当短暂的过程, 该过程受诸多因素的影响, 本实验可能未及时捕捉到细胞凋亡的短暂过程。

As_2O_3 的作用机制比较复杂, 本课题研究还发现 As_2O_3 可下调 B_{16} 细胞的端粒酶活性^[12], 其抑制恶性黑色素瘤 B_{16} 细胞核酸合成、下调端粒酶活性、诱导细胞凋亡及细胞毒作用的关系, 还有待进一步深入研究。

[参 考 文 献]

- [1] Ratnaike RN. Acute and chronic arsenic toxicity[J]. *Postgrad Med J*, 2003, 79(933): 391 ~ 396.
- [2] 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.
- [3] 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.
- [4] Koh D, Wang H, Lee J, *et al.* Basal cell carcinoma, squamous cell carcinoma and melanoma of the skin: Analysis of the Singapore Cancer Registry data 1968-97 [J]. *Br J Dermatol*, 2003, 148(6): 1161 ~ 1166.
- [5] Geller AC, Annas GD. Epidemiology of melanoma and nonmelanoma skin cancer[J]. *Semin Oncol Nurs*, 2003, 19(1): 2 ~ 11.
- [6] 黄守国, 孔北华, 马玉燕, 等. 三氧化二砷对人卵巢癌耐药细胞株细胞增殖和转移能力的影响[J]. 癌症, 2002, 21(8): 863 ~ 867.
- [7] Tong Q, Zeng F, Zheng L, *et al.* Apoptosis inducing effects of arsenic trioxide on human bladder cancer cell line BIU-87[J]. *Chin Med J (Engl)*, 2001, 114(4): 402 ~ 406.
- [8] Ryungsa K, Kazuaki T, Yoko U, *et al.* Current status of the molecular mechanisms of anticancer drug-induced apoptosis[J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2002, 50(1): 343 ~ 352.
- [9] 夏 俊, 陈治文, 胡守芬, 等. 芦笋提取液抑制恶性黑色素瘤 A_{375} 细胞增殖的研究[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(2): 95 ~ 97.
- [10] 陈治文, 夏 俊, 胡守芬, 等. 三氧化二砷对恶性黑色素瘤 A_{375} 细胞的增殖抑制作用[J]. 中国药理学通报, 2002, 18(5): 567 ~ 569.
- [11] 马 佳, 陈素莲, 陈治文. 三氧化二砷对恶性黑色素瘤 A_{375} 细胞株凋亡的诱导作用[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(6): 485 ~ 486.
- [12] 王 丽, 陈治文, 夏 俊, 等. 三氧化二砷对恶性黑色素瘤 B_{16} 细胞端粒酶活性影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2004, 29(3): 202 ~ 204.