[文章编号] 1000-2200(2006)03-0233-02 · 基础医学 ·

三氧化二砷对鼠恶性黑素瘤 B_{16} 细胞凋亡的影响

马 佳[1,2],沈继龙[3],黄 桦[2],陈素莲[2],陈治文[2]

[摘要]**目的:** 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对鼠恶性黑素瘤 B_{16} 细胞诱导凋亡的影响。**方法:** 采用流式细胞术(FCM)检测不同浓度的 As_2O_3 诱导 B_{16} 细胞的早期凋亡率、晚期凋亡率和总凋亡率。**结果:** As_2O_3 浓度分别为 5 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/L 时, B_{16} 细胞的早期凋亡率分别为 7.18%、21.1%、3.59%,晚期凋亡率分别为 2.63%、5.35%、6.34%,总凋亡率分别为 9.81%、26.45%、9.93%。**结论:** B_{16} 细胞的早期凋亡率和晚期凋亡率对 As_2O_3 有浓度依赖关系,高浓度的 As_2O_3 使 B_{16} 细胞出现坏死。

[关键词] 黑素瘤;三氧化二砷;细胞凋亡;细胞株
[中国图书资料分类法分类号] R 739.5;O 613.63 [文献标识码] A

The effect of arsenic trioxide on apoptosis of melanoma B_{16} cells

MA Jia[1,2], SHEN Ji-long[3], HUANG Hua[2], CHEN Su-lian[2], CHEN Zhi-wen[2]
(1. *Department of Microbiology and Parasitology, Anhui Medical University, Hefei 230032;*
2. *Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu 233030;*
3. *The Key Laboratory of Ministry of Education, Anhui Medical University, Hefei 230032, China*)

[**Abstract**] **Objective:** To study the effect of arsenic trioxide on apoptosis of melanoma B_{16} cells. **Methods:** Early apoptosis rate, late apoptosis rate and total apoptosis rate in melanoma B_{16} cells were analysed by flow cytometry. **Results:** At the doses of arsenic trioxide were 5 μmol/L, 10 μmol/L, or 20 μmol/L, the early apoptosis rates in melanoma B_{16} cells were 7.18%, 21.1%, and 3.59%, respectively; the late apoptosis rates were 2.63%, 5.35%, and 6.34%, respectively; the total apoptosis rates were 9.81%, 26.45%, and 9.93%, respectively. **Conclusions:** The early apoptosis rate and the late apoptosis rate in melanoma B_{16} cells have dose-dependent relationship with arsenic trioxide.

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

三氧化二砷(As_2O_3)是传统中药砒霜的主要成分之一,低剂量的 As_2O_3 早已载入我国中药史册,我国医学家用 As_2O_3 治疗早幼粒细胞白血病和慢性粒细胞白血病已取得良好疗效,它可使异常粒细胞减少或退化,诱导细胞凋亡,此外,有研究表明 As_2O_3 对其他恶性肿瘤,如胃癌、肺癌等也有良好疗效。笔者已证实,As_2O_3 具有促人恶性黑素瘤 A_{375} 细胞凋亡的作用[1];本研究以鼠恶性黑素瘤 B_{16} 细胞作为工作模型,观察 As_2O_3 对鼠恶性黑素瘤 B_{16} 细胞凋亡的诱导作用。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂 鼠恶性黑素瘤细胞株 B_{16} 购自中科院细胞所;RPMI 1640 培养液和胰蛋白酶(Gibco 公司);As_2O_3 和二甲亚砜(Sigma 公司);四氮唑蓝(珠海丽宝公司);Annexin-V-FITC 试剂盒(美国 Coulter 公司);新生小牛血清(杭州四季青生物材料有限公司);FACS Calibur 型流式细胞仪(Becton Dickinson 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 鼠恶性黑素瘤 B_{16} 细胞贴壁培养于 RPMI 1640 培养液(含 10% 新生小牛血清)中,置 37 ℃,5% CO_2 饱和湿度培养箱中培养,3~4 天传代一次。

1.2.2 流式细胞术检测(FCM) 将 5×10^8 /L 的 B_{16} 细胞在培养瓶中培养 3 天,弃去培养液,分别加入含 As_2O_3 的新鲜培养液(As_2O_3 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 μmol/L、10 μmol/L、20 μmol/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 10^5 ~ 10^6 /ml,加入 Annexin-V 和碘化吡锭(PI),1 h 内用流式细胞仪检测细胞的凋亡。

2 结果

As_2O_3 浓度分别为 5 μmol/L、10 μmol/L、20

[收稿日期] 2005-12-26
[基金项目] 安徽省教育厅自然科学研究资助项目(2006kj351b)
[作者单位] 1. 安徽医科大学 病原生物学教研室,安徽 合肥 230032;2. 蚌埠医学院 生物化学与分子生物学教研室,安徽 蚌埠 233030;3. 安徽医科大学教育部省部共建重点实验室,安徽 合肥 230032
[作者简介] 马 佳(1977-),女,讲师.

μmol/L时，作用鼠恶性黑素瘤 B_{16}细胞，其早期凋亡率分别为 7.18%、21.1%、3.59%，晚期凋亡率分别为 2.63%、5.35%、6.34%，总凋亡率分别为 9.81%、26.45%、9.93%。B_{16}细胞的凋亡率随着 As_2O_3 浓度增加而增加，As_2O_3 浓度≤10 μmol/L时，以早期凋亡为主，但高浓度的砷（20 μmol/L）可使 B_{16}细胞出现坏死（见图 1）。

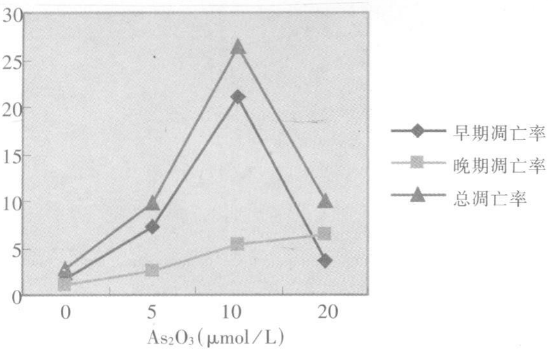

图 1 As_2O_3 对 B_{16} 细胞的促凋亡作用

3 讨论

细胞凋亡是一种有别于细胞坏死，主动、程序化的细胞死亡形式，它在胚胎发生、器官发育、变态反应和保存机体自身稳定过程中发挥着重要的作用[2]。正常情况下细胞的增殖和凋亡始终处于动态平衡，是机体维持细胞动力学稳态的一种保护机制。这种平衡一旦被打破，肿瘤就会发生。许多化学结构不同、作用靶点迥异的化疗药物均是通过诱导细胞凋亡来杀伤肿瘤细胞。

体外研究发现药物诱导恶性黑素瘤细胞凋亡机制涉及到以下几种途径：（1）肿瘤坏死因子相关的凋亡诱导配体（TRAIL）诱导凋亡，一是通过直接激活 caspase-8 导致靶细胞走向凋亡。另外还可通过线粒体途径激活 caspase-8 表现出线粒体膜电位改变及线粒体在核周的聚集[3]。（2）凋亡与细胞内氧化还原状态相关，而且凋亡程度与线粒体膜电位呈反相关[4]。（3）p53是一种抑癌基因，它可以下调抗凋亡蛋白 bcl-2和 P-糖蛋白表达而诱导凋亡[5]。（4）黑素瘤分化相关基因 mda7/IL-24诱导凋亡，mda7促进黑素瘤细胞 DNA 损伤和生长停止诱导因子（GADD）家族的表达，具有时间剂量依赖性。GADD 家族包括 GADD34、GADD45-α、GADD45-β、GADDγ、GADD153，其中 GADD34 被认为与细胞凋亡有关，而其他几种则与转录过程有关。无论哪一种 GADD基因的过度表达，都可抑制细胞生长或诱导细胞凋亡。另外，资料显示 mda7诱导 GADD家族表达是通过 p38丝裂原活性蛋白激酶途径（p38 MAPK pathway）产生，这一过程在 mda7诱导细胞凋亡中起核心作用[6~8]。（5）CD95/Fas诱导凋亡途径：其中 Bax/Bcl比率决定了人恶性黑素瘤细胞对 CD95/Fas途径诱导凋亡的敏感程度[9]。

本课题已有研究发现：As_2O_3 可显著抑制恶性黑素瘤 B_{16}细胞的核酸合成，10 μmol/L的 As_2O_3 诱导黑素瘤 B_{16}细胞凋亡的作用具有时间依赖性[10]。本实验还发现 As_2O_3 对黑素瘤 B_{16}细胞的诱导凋亡作用具有浓度依赖性，而且 As_2O_3≤10 μmol/L时，以诱导早期凋亡为主，但高浓度的砷（20 μmol/L）对 B_{16}细胞的细胞毒作用显著增加。这一结果为 As_2O_3 应用于临床治疗恶性黑素瘤提供了新的理论和实验依据。

[参考文献]

[1] 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.

[2] Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide[J]. *Science*，1995，267(5203)：1445-1449.

[3] Thomas WD，Zhang XD，Franco AV，*et al*. TNF-related apoptosis inducing ligand-induced apoptosis of melanoma is associated with changes in mitochondrial membrane potential and perinuclear clustering of mitochondria[J]. *J Immunol*，2000，165(10)：5612-5620.

[4] Cen D，Gonzalez RI，Buckmeier JA，*et al*. Disulfiram induces apoptosis in human melanoma cells：A redox-related process[J]. *Mol Cancer Ther*，2002，1(3)：197-204.

[5] Li G，Bush JA，Ho VC. p53-dependent apoptosis in melanoma cells after treatment with camptothecin[J]. *J Invest Dermatol*，2000，114(3)：514-519.

[6] Sarkar D，Su ZZ，Lebedeva IV，*et al*. Mda-7(IL-24) mediates selective apoptosis in human melanoma cells by inducing the coordinated overexpression of the GADD family of genes by means of p38 MAPK[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*，2002，99(15)：10054-10059.

[7] Takekawa M，Saito H. A family of stress inducible GADD45-like proteins mediate activation of the stress responsive MTK1/MEKK4 MAPKKK[J]. *Cell*，1998，95(4)：521-530.

[8] Zhan Q，Lord KA，Alamo J，*et al*. The gadd and MyD genes define a novel set of mammalian genes encoding acidic proteins that synergistically suppress cell growth[J]. *Mol Cell Biol*，1994，14(4)：2361-2371.

[9] Raisova M. The Bax/Bcl-2 ratio determines the susceptibility of human melanoma cells to CD95/Fas mediated apoptosis[J]. *J Invest Dermatol*，2001，117(2)：333-340.

[10] 王 丽，陈治文，夏 俊. 三氧化二砷抑制恶性黑色素瘤 B_{16}细胞核酸合成的研究[J]. 蚌埠医学院学报，2005，30(4)：288-290.