

[文章编号] 1000-2200(2008)03-0260-04

· 基础医学 ·

三氧化二砷对黑素瘤 B₁₆ 细胞内活性氧自由基的影响王东萍¹, 陈治文², 汤复根¹, 高绪峰¹

[摘要] 目的:探讨三氧化二砷(As₂O₃)对黑素瘤 B₁₆ 细胞增殖及细胞内活性氧自由基(ROS)水平的影响。方法:30 μmol/L As₂O₃ 与 500 μmol/L N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)分别单独或联合作用于 B₁₆ 细胞,应用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法测定细胞生长抑制情况;流式细胞术检测 ROS 水平。结果:As₂O₃ 能明显抑制 B₁₆ 细胞的增殖,NAC 可部分拮抗 As₂O₃ 对黑素瘤细胞的杀伤效应及诱导凋亡效应。As₂O₃ 作用 1 h 后的 B₁₆ 细胞内 ROS 水平比对照组升高(P<0.01),4 h 达到高峰,24 h 有所下降,与对照组差异均有统计学意义(P<0.01)。ROS 升高的趋势可被抗氧化剂 NAC 部分阻断(P<0.05~P<0.01)。结论:As₂O₃ 诱导 B₁₆ 细胞凋亡与 ROS 水平改变有关,As₂O₃ 可通过提高细胞内 ROS 水平诱导细胞凋亡而发挥抗肿瘤作用,这也可能是 As₂O₃ 抗黑素瘤的途径之一。

[关键词] 黑素瘤,实验性;三氧化二砷;B₁₆ 细胞株;凋亡;活性氧自由基

[中国图书资料分类法分类号] R 739.5;O 613.63 **[文献标识码]** A

Influence of As₂O₃ on the reactive oxygen species in melanoma B₁₆ cellsWANG Dong-ping¹, CHEN Zhi-wen², TANG Fu-gen¹, GAO Xu-feng¹

(1. Research Center of Clinical Laboratory Science; 2. Department of Biochemistry and Molecular Biology, Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To study the influence of As₂O₃ on the proliferation and the reactive oxygen species (ROS) levels in melanoma B₁₆ cells. **Methods:** B₁₆ cells were treated with 30 μmol/L As₂O₃ alone or together with 500 μmol/L N-acetylcysteine (NAC). The effect of As₂O₃ on B₁₆ cells was determined by MTT assay, and the intracellular ROS level was measured by flow cytometry (FCM). **Results:** As₂O₃ could obviously inhibit the proliferation of B₁₆ cells and NAC might partially antagonise the apoptosis effect induced by As₂O₃. ROS level in B₁₆ cells started to rise after being incubated with 30 μmol/L As₂O₃ for 1 h (P<0.01), and reached the peak point of at 4 h (P<0.01), and the ROS expression levels decreased slightly at 24 h. The difference was all significant compared with the control group (P<0.01). The increasing of ROS might be partially blocked by NAC (P<0.05 to P<0.01). **Conclusions:** B₁₆ cells apoptosis induced by As₂O₃ is related to the increase of ROS level. As₂O₃ induces B₁₆ cells apoptosis by accumulation of intracellular ROS level, which may be one of the antitumor processes of As₂O₃.

[Key words] melanoma, experimental; As₂O₃; B₁₆ cells; apoptosis; reactive oxygen species

三氧化二砷(As₂O₃)是一种具有抗肿瘤作用的药物,目前已用于临床治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)。研究表明,As₂O₃对实体肿瘤也有一定的治疗作用,在体外诱导 B₁₆ 细胞凋亡,抑制小鼠黑素瘤生长,但其作用机制不十分明确^[1]。细胞内活性氧自由基(ROS)是细胞线粒体内氧化还原代谢的产物,参与细胞内的信号转导,与细胞生长和凋亡有密切关系。本研究在前期研究基础上^[2],探讨 As₂O₃ 诱导细胞 B₁₆ 凋亡是否与 ROS 有关,为进一步阐明 As₂O₃ 的抗肿瘤作用机制提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料 (1)细胞株:鼠黑素瘤 B₁₆ 细胞为本实验室冻存。(2)试剂:As₂O₃、二甲亚砜(DMSO)、2', 7'-二氯氢化荧光素二酯(2', 7'-chlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH-DA)、N-乙酰半胱氨酸(N-acetylcysteine, NAC)(用 PBS 配制成 0.5 mol/L 浓缩液)购自美国 Sigma 公司;四甲基偶氮唑蓝(MTT)为上海生工生物工程公司产品(用 PBS 配制成 0.5 mol/L 浓缩液);RPMI-1640 培养基和胰蛋白酶为 GIBCO 公司产品;小牛血清为杭州四季青公司产品。其它试剂均为国产分析纯。(3)仪器:CO₂ 培养箱(日本科学株式会社);CX-201 超净工作台(蚌埠净化设备厂);FACSCalibur 流式细胞仪(FCM)(BECTON DICKINSON 公司,美国);Multiskan Ascent 酶标仪(芬兰);TS-1 脱色摇床(海门其林医用仪器厂)。

1.2 细胞培养及分组 B₁₆ 细胞用含 10% 小牛血清

[收稿日期] 2007-07-24

[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] 蚌埠医学院 1. 临床检验诊断学实验中心, 2. 生物化学与分子生物学教研室, 安徽 蚌埠 233030

[作者简介] 王东萍(1978-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 肿瘤分子生物学。

[通讯作者] 陈治文, 研究生导师, 教授。

的 RPMI-1640 培养液,在 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中培养,每隔 2~3 天传代 1 次。所有实验操作均采用对数生长期细胞。实验分组为对照组、30 μmol/L As₂O₃ 组、30 μmol/L As₂O₃ + 500 μmol/L NAC 组、500 μmol/L NAC 组。

1.3 细胞生长的抑制效应检测 MTT 可透过细胞膜进入细胞内,活细胞线粒体中的琥珀脱氢酶能使外源性 MTT 还原为难溶于水的蓝紫色的针状结晶并沉积在细胞中,结晶物能被 DMSO 溶解,用酶联免疫检测仪在 492 nm 波长处测定其吸光度值(A 值),可间接反映活细胞数量。B₁₆ 细胞经 V-T(含 2.0 g/L 胰酶和 0.5 mmol/L EDTA)消化接种于 96 孔板,每孔 100 μl 培养液含 2 000 个细胞,培养 24 h 后弃培养液,加入预先配制好的 100 μl 含不同浓度药物的培养基。培养 24 h 后,再加入 10 μl MTT (5 g/L)继续培养 4 h,然后吸掉上清,每孔加入 150 μl DMSO,置摇床上常温下避光低速振荡 10 min,使结晶物充分溶解。在酶联免疫检测仪 492 nm 处测量各孔的吸光值。每组均设 5 个复孔,重复多次,取 3 次独立试验的平均值计算抑制率。

$$\text{抑制率} = \frac{(\text{对照 A 值} - \text{实验 A 值})}{\text{对照 A 值}} \times 100\%$$

1.4 流式细胞仪检测 ROS 水平 细胞经 V-T 消化,将细胞悬液调整为 2 × 10⁵/ml,接种于 6 孔培养板,每孔 2 ml,培养 24 h 后弃培养液,分别加入含不同浓度药物的培养基,对照组不加药,分别培养 1、4、24 h 后,2 μl DCFH-DA (10 μmol/L)加入培养液中,37 ℃孵育 15 min,吸弃培养液消化细胞,冰 PBS 重复洗 2 遍,弃去未反应的 DCFH-DA。每管沉淀内加入 300 μl PBS 重悬,避光置于冰上待检。流式细胞仪检测 10 000 个细胞内的平均荧光强度,激发波长 488 nm,发射波长 530 nm。由于 DCFH-DA 是一种化学物质,通过细胞膜进入细胞内,在细胞内酯酶的作用下,脱乙酰基变成 DCFH,储存在细胞内 DCFH 被细胞内产生的 ROS 氧化,变成发出绿色荧光的荧光物质 DCF。因此根据细胞内 DCF 的荧光强度,可以测定出细胞 ROS 产生量^[3]。

1.5 统计学方法 采用方差分析和 q 检验。

2 结果

2.1 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞抑制率的影响 MTT 检测结果显示,当 30 μmol/L As₂O₃ 单独作用 B₁₆ 细胞 24 h 凋亡率为 (51.60 ± 4.45)%, As₂O₃ 能有效地抑制 B₁₆ 细胞的恶性增殖,而 NAC 本身对癌细胞的生长并没有显著的影响,但与 As₂O₃ 一起作用细胞凋亡

率为 (30.99 ± 4.34)%, NAC 能部分拮抗 As₂O₃ 对癌细胞的杀伤效应,提示 NAC 提供的化学基团很可能与 As₂O₃ 对癌细胞的杀伤效应有密切的关系(见图 1)。

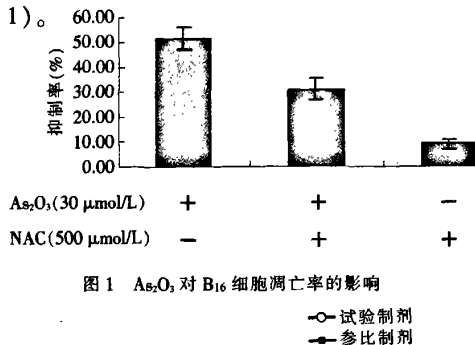


图 1 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞凋亡率的影响

2.2 As₂O₃ 对细胞内 ROS 水平的影响 用 DCFH-DA 作为荧光探针测定细胞内 ROS 水平时,发现 As₂O₃ 能上调细胞内 ROS 水平(见图 2)。30 μmol/L As₂O₃ 作用 B₁₆ 细胞 1 h、4 h 和 24 h 细胞内 ROS 荧光强度均较对照组明显升高 (P < 0.01)。NAC 能部分拮抗 As₂O₃ 引起的 ROS 升高 (P < 0.05 ~ P < 0.01)(见表 1)。从流式图中可清楚地看到存在两个峰值,表明活性氧的减少只发生在部分细胞中。

表 1 As₂O₃ 对 B₁₆ 细胞内 ROS 水平的影响 (n_i = 3; $\bar{x} \pm s$)

分组	1 h	4 h	24 h
0 μmol/L As ₂ O ₃ 组	995.59 ± 76.52	1133.51 ± 86.70	12.87 ± 68.49
30 μmol/L As ₂ O ₃ 组	1 402.43 ± 118.46 **	1 921.85 ± 215.05 **	179.39 ± 82.42 **
30 μmol/L As ₂ O ₃ + 500 μmol/L NAC 组	1 204.18 ± 103.15 Δ	1 504.57 ± 111.08 Δ	876.92 ± 108.48 Δ
500 μmol/L NAC 组	1 067.13 ± 101.19 ΔΔ	92.08 ± 98.27 ΔΔ	424.28 ± 107.99 ΔΔ
F	9.43	24.54	33.73
P	< 0.01	< 0.01	< 0.01
MS _{组内}	10 191.855	18 939.788	8 728.422

q 检验:与同一时间对照组比较 * P < 0.05, ** P < 0.01;与同一时间 30 μmol/L As₂O₃ 组比较 Δ P < 0.05, ΔΔ P < 0.01

3 讨论

关于 As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡的作用机制的报道不尽相同。研究表明,As₂O₃ 主要通过诱导白血病细胞凋亡过程中自由基的参与。As₂O₃ 诱导实体肿瘤细胞凋亡与细胞内 ROS 的水平改变有关^[3,4]。ROS 是真核细胞有氧呼吸时的产物,在线粒体电子链传递过程中,一小部分氧不能被完全还原,生成了单电子还原物超氧阴离子(O₂⁻·),并可进一步演化成过氧化氢(H₂O₂)、羟自由基(·OH),这些产物由于含有不成对的电子,因此具有较强的氧化能力,统称为 ROS。大量研究表明,ROS 可介导细胞

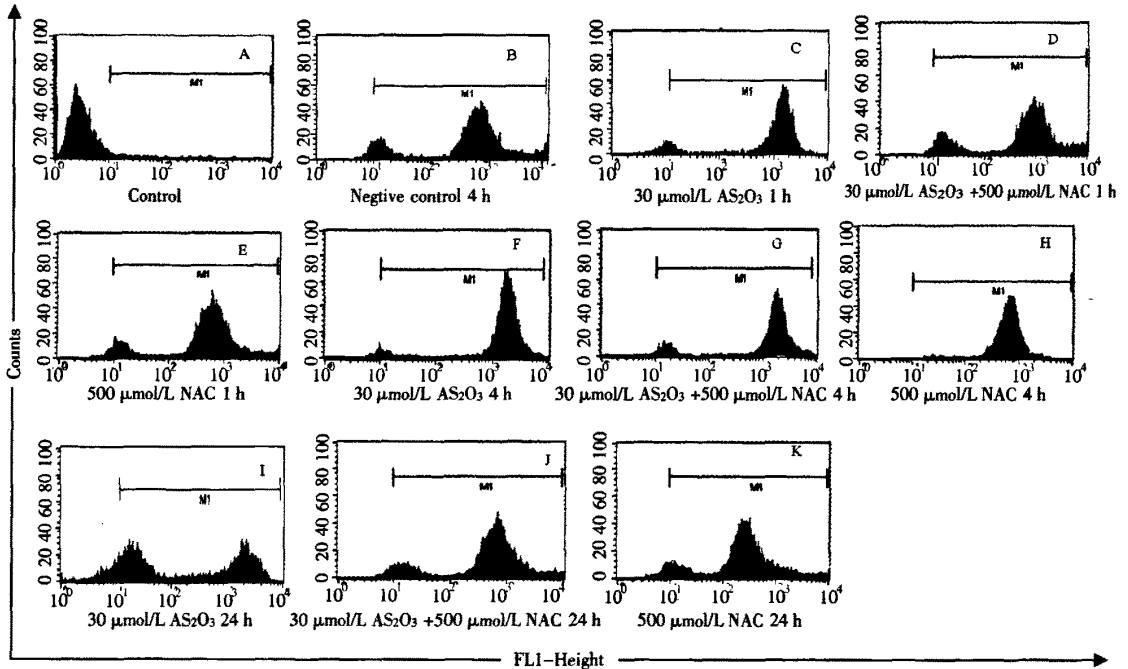


图2 As_2O_3 对 B_{16} 细胞内 ROS 水平的影响

信号转导, 激活转录因子, 促使基因表达, 调控细胞生长、增殖和凋亡, 发挥重要生物学效应。当细胞内 ROS 的生成和清除失衡及定位出现异常时, 则会损伤组织细胞, 甚至导致细胞的死亡。线粒体氧化应激状态下能产生过多的 ROS, 过高的 ROS 对细胞生存是不利的, 它可以导致包括脂质过氧化、蛋白质氧化和损伤 DNA 等有害变化, 其结果是引起细胞的损伤^[5]。 As_2O_3 使细胞内 ROS 生成增多是因为: (1) 开放线粒体通透性转运通道 (MPT)。MPT 是位于线粒体内外膜之间的多蛋白复合体, 通过调节线粒体基质中 Ca^{2+} 、pH 值和电荷, 维持线粒体内环境稳定, 保证氧化磷酸化通路顺畅, 对凋亡调控具有重要作用。一旦 MPT 开放, 可导致膜质子转运异常, 伴有线粒体跨膜电位 ($\Delta\psi_M$) 下降, 引起线粒体内高渗状态, 线粒体内氧化呼吸链受抑, ROS 外漏。在 As_2O_3 作用于 K562、HL-60 细胞时, 可见 $\Delta\psi_M$ 下降, ROS 增加^[6,7]。(2) 可通过活化黄素蛋白依赖的超氧化物酶 (如 NADPH 氧化酶) 使 H_2O_2 增加。 H_2O_2 可使线粒体释放 CytC, 活化 Caspase-3 及裂解多聚磷酸腺苷聚合酶 (PARP) 而介导细胞凋亡。(3) As_2O_3 可降低还原性谷胱甘肽 (GSH) 的活性^[8], As_2O_3 可直接与巯基形成复合物 $As(GS)_3$, 从而阻断由 GPx 作用下的 H_2O_2 还原为 H_2O 的过程, 降低其清除 ROS 的能力, 间接地使 ROS 水平升高。Park 等^[9]证实含巯基的抗氧化剂 NAC 可抑制 As_2O_3 诱

导的细胞凋亡, 可能通过自身相邻巯基竞争性 with As_2O_3 形成复合物 $As(GS)_3$, 并提高 GSH 水平, 通过抗氧化作用使 ROS 失活。

本实验观察 $30 \mu\text{mol/L } As_2O_3$ 作用于 B_{16} 细胞不同时间段 ROS 变化情况, As_2O_3 可引起细胞内 ROS 浓度的增加, ROS 水平 1 h 即开始升高, 4 h 达到高峰, 且呈明显的时间依赖性, 24 h 有所下降, 与对照组差异均有统计学意义 ($P < 0.01$), 24 h 用药组 ROS 水平有所下降, 可能与一些细胞在药物作用下已进入凋亡状态有关。ROS 是细胞凋亡中的第二信使, 细胞接受促凋亡信号后引起 ROS 的升高, 并可能由此激活相应的效应分子而引发细胞凋亡, 相应的 MTT 结果提示药物处理细胞 24 h 后出现明显凋亡现象, 提示 ROS 参与细胞凋亡的调控, 可能是凋亡途径中的早期事件。此外, 实验中我们发现用抗氧化剂 $500 \mu\text{mol/L NAC}$ 处理细胞后能明显降低细胞内 ROS 水平, 用 $500 \mu\text{mol/L NAC}$ 联合 $30 \mu\text{mol/L } As_2O_3$ 处理细胞后, 细胞内 ROS 水平也明显低于单独 As_2O_3 处理组, MTT 结果也显示 NAC 能抵抗 As_2O_3 诱导肿瘤细胞凋亡, 更进一步说明 ROS 在 As_2O_3 诱导细胞凋亡途径中的作用。

【参考文献】

- [1] 夏俊, 陈俊霞, 于丽华, 等. 三氧化二砷抑制小鼠 B_{16} 黑色素瘤生长作用及其机制[J]. 中国药理学通报, 2004, 20(9): 1054-1058.

结核分枝杆菌 19 kDa 脂蛋白诱导 THP-1 细胞凋亡的研究

韦莉, 金齐力, 刘勇, 夏佩莹

[摘要] 目的: 观察结核分枝杆菌 19 kDa 脂蛋白(Mtb P19)对 THP-1 细胞凋亡的影响。方法: 从培养的结核杆菌 H37Ra 制备 Mtb P19, 以 5、10、20 μg/ml Mtb P19 作用于佛波醇酯(PMA)分化的 THP-1 细胞, 37 ℃、5% CO₂ 孵箱孵育 4 h。Wright-Giemsa 染色观察细胞形态变化; AnnexinV-FITC 染色, 用流式细胞仪检测细胞凋亡。结果: 终浓度为 5 μg/ml 的 Mtb P19 即可诱导 THP-1 细胞凋亡, 且凋亡率随 Mtb P19 作用浓度的升高而增加(P < 0.01); Wright-Giemsa 染色镜下可见部分细胞体积变小、圆缩, 核固缩, 核断裂。结论: 结核分枝杆菌 P19 以剂量依赖方式诱导 THP-1 细胞凋亡。

[关键词] 细胞凋亡; 结核分枝杆菌 19 kDa 脂蛋白; THP-1 细胞

[中国图书资料分类法分类号] R 329.25 **[文献标识码]** A

Study on apoptosis of THP-1 cells induced by *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa lipoprotein

WEI Li, JIN Qi-li, LIU Yong, XIA Pei-ying

(Department of Microbiology, Bengbu Medical College;

Anhui Key Laboratory of Infection and Immunity at Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233030, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the influence of *Mycobacterium tuberculosis* 19 kDa(Mtb P19) on the apoptosis of THP-1 cells. **Methods:** Mtb P19 was prepared from cultured Mtb H37Ra. Phorbol myristate acetate-differentiated THP-1 cells were incubated with P19 at the concentrations from 5 μg/ml to 20 μg/ml at 37 ℃, 5% CO₂ for up to 4 hours. The change of cells was observed by Wright-Giemsa stain, and the apoptosis rate was detected by flowcytometry. **Results:** Mtb P19 could induce THP-1 cells apoptosis at final concentration of 5 μg/ml, and the apoptosis rate increased with the concentration of P19(P < 0.01). Round shrinkage, pyknosis or nuclear fragmentation were observed in some cells by Wright-Giemsa stain. **Conclusions:** Mtb P19 induces apoptosis in THP-1 cells in a dose-dependent manner.

[Key words] apoptosis; *Mycobacterium tuberculosis* 19-Kilodalton; THP-1 cell

结核病(tuberculosis)是由结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*, Mtb)引起的慢性传染病^[1],至今仍严重威胁人们的生命健康。Mtb 是兼性胞内寄生菌,感染人体后主要被巨噬细胞吞噬,未

被机体免疫系统清除而潜伏下来的 Mtb 也主要寄生于巨噬细胞内。巨噬细胞的凋亡可以杀死寄生于其内的 Mtb,阻止体内播散,并激活临近未感染细胞,增强机体对 Mtb 的杀伤能力。因此,巨噬细胞的凋亡情况对于寄生于其内的 Mtb 的命运至关重要。由于 Mtb 不产生内、外毒素,其致病与其菌体成分及机体对菌体成分产生的免疫损伤密切相关, Mtb 细胞壁富含的脂质是公认的主要致病物质。Mtb 的细胞壁成分与巨噬细胞凋亡密切相关^[2]。确定 Mtb 诱导细胞凋亡的具体成分可以帮助我们更加深入地理解其致病机制,并且为疾病的预防和治疗提供新的思路。Mtb 细胞壁上 19 kDa 脂蛋白(P19)是一种糖

[收稿日期] 2008-01-04

[基金项目] 安徽省高校省级自然科学研究计划项目(KJ2008B320);安徽省省级重点实验室重点科研项目(2004sys008)

[作者单位] 蚌埠医学院病原生物学教研室,安徽省感染与免疫重点实验室,安徽蚌埠 233030

[作者简介] 韦莉(1981-),女,硕士研究生,助教。

[通讯作者] 夏佩莹,研究生导师,教授。

[2] 马佳,沈继龙,黄桦,等. 三氧化二砷对恶性黑色素瘤 B₁₆ 细胞凋亡的影响[J]. 蚌埠医学院学报, 2006, 31(3): 233-234.

[3] Jing Y, Dai J, Chalmers-Redman RM, et al. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydrogen peroxide-dependent pathway[J]. *Blood*, 1999, 94(6): 2102-2111.

[4] 曹娟, 郑杰. As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡依赖 H₂O₂ 途径[J]. 中国病理生理杂志, 2006, 22(6): 1185-1190.

[5] Allen RG, Tresini M. Oxidative stress and gene regulation[J]. *Free Radic Biol Med*, 2000, 28(3): 463-499.

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

53-63.

[7] Perkins C, Kim CN, Fang G, et al. Arsenic induces apoptosis of Multidrug-resistant human myeloid leukemia cells that express Bcr-Abl or overexpress MDR, MRP, Bcl-2, or Bcl-x(L) [J]. *Blood*, 2000, 95(3): 1014-1022.

[8] Miller WH Jr. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells [J]. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 1): 14-19.

[9] Park MJ, Lee JY, Kwak HJ, et al. Arsenic trioxide (As₂O₃) inhibits invasion of HT1080 human fibrosarcoma cells: role of nuclear factor-kappaB and reactive oxygen species [J]. *J Cell Biochem*, 2005, 95(5): 955-969.