

[文章编号] 1000- 4718(2005)08- 1572- 03

As₂O₃ 对胰腺癌细胞株的抑制作用 及其机制的初步探讨*

史立军¹, 闫彬彬², 李双星¹, 孟艳玲¹, 马珊珊³, 刘铁夫¹, 李呼伦^{3△}
(哈尔滨医科大学 ¹附属第一医院消化内科, ²生理学教研室, ³神经生物学教研室, 黑龙江 哈尔滨 150086)

[摘要] 目的: 探讨三氧化二砷(arsenous oxide, As₂O₃)对胰腺癌 PC₂ 细胞的抑制作用及其作用机制。方法: 用胰腺癌 PC₂ 细胞株进行培养传代, 观察 As₂O₃ 作用于细胞的不同时间, 对细胞生长抑制情况; 利用 TUNEL 染色检测胰腺癌细胞凋亡率; RT-PCR 方法检测 survivin 基因的表达。结果: ①随着药物对胰腺癌细胞作用时间的延长, 细胞生存率明显降低, 药物作用存在时间依赖性($P < 0.05, P < 0.01$)。②TUNEL 染色证实, As₂O₃ 对胰腺癌细胞的抑制作用是以促进细胞凋亡为主。③凋亡抑制因子 survivin 基因在胰腺癌细胞中表达; 胰腺癌细胞经 As₂O₃ 作用后, 抑制 survivin 基因的表达($P < 0.05$)。结论: As₂O₃ 可能通过抑制凋亡抑制因子 survivin 基因的表达, 促进细胞凋亡, 从而发挥抗肿瘤的作用。

[关键词] 三氧化二砷; 细胞凋亡; 癌基因; 胰腺肿瘤

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Inhibitory effect of arsenous oxide on pancreatic cancer cell line

SHI Li- jun¹, YAN Bin- bin², LI Shuang- xing¹, MENG Yan- ling¹, MA Shan- shan³, LIU Tie- fu¹, LI Hu- lun³

(¹Department of Digestive Internal Medicine, The First Affiliated Hospital of Harbin Medical University, ²Department of Physiology, ³Department of Neurobiology, Harbin Medical University, Harbin 150086, China)

[ABSTRACT] **AIM:** To study the effect and mechanism of arsenous oxide (As₂O₃) on pancreatic cancer PC₂ strain. **METHODS:** The pancreatic cancer PC₂ strain was chosen in this experiment. Apoptosis was detected by TUNEL test. Expression of survivin gene was detected by reverse transcriptase PCR. **RESULTS:** ① After administration of As₂O₃, the survival number of pancreatic cancer cells decreased significantly in a time- dependent manner ($P < 0.05, P < 0.01$). ② The fact that apoptosis was a major way of pancreatic cancer cells death after drug treatment was confirmed by TUNEL test. ③ The survivin gene was a kind of apoptosis inhibitory factor. The inhibitory rate of survivin gene expression induced by As₂O₃ was higher than that in control group ($P < 0.05$). **CONCLUSION:** As₂O₃ may inhibit cancer by accelerating apoptosis through inhibition of the expression of survivin.

[KEY WORDS] Arsenic trioxide; Apoptosis; Oncogenes; Pancreatic neoplasms

胰腺癌恶性程度高、易转移且预后较差, 占消化道肿瘤的 8% - 10%。胰腺癌一经诊断多属晚期, 无法用手术方法进行治疗, 因此, 探讨化学疗法治疗胰腺癌有着十分重要的意义。张鹏等^[1]将 As₂O₃ 用于治疗急性早幼粒细胞白血病取得了很好疗效, 引起人们对 As₂O₃ 抗肿瘤治疗的极大关注。有些学者认为 As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡^[2], 但其促进肿瘤细胞凋亡的机制并不十分清楚。Survivin 基因是 1997 年发现的一种凋亡抑制因子^[3], 其 mRNA 和蛋白几乎在所有常见的肿瘤组织中过量表达^[4], 但在成人分化

成熟的组织中则无表达。As₂O₃ 是否通过抑制 survivin 基因表达而诱导细胞凋亡达到抗癌作用? 本研究以 PC₂ 胰腺癌细胞为靶细胞, 观察 As₂O₃ 对 PC₂ 细胞的生长抑制作用, 并初步探讨 As₂O₃ 诱导 PC₂ 细胞凋亡的作用机制。

材 料 和 方 法

1 细胞培养

胰腺癌 PC₂ 细胞株(引自上海华山医院)用含有 10% 胎牛血清的 RPMI- 1640 培养基常规培养, 取细

[收稿日期] 2005- 05- 11 [修回日期] 2005- 06- 13

* [基金项目] 黑龙江省十五攻关课题基金资助项目(No. GB02C141- 02)

△通讯作者 E- mail: lhlybb@ 163. com

胞浓度为 2×10^8 cells/L 用于各项实验。

2 As₂O₃ 对细胞增殖功能的影响及形态学观察

用 MTT 法选择药物浓度为 12.5 μg/L, 用于各组实验。将细胞接种于 24 孔培养板中 (0.5 mL/well), 48 h 后弃上清, 加入 As₂O₃ 和顺铂 (0.5 mL/well), 取不同培养时间 1-6 d 进行观察, 绘制生长抑制曲线。

3 3'-原位末端标记 (TUNEL) 检测细胞凋亡数

将细胞接种于含有玻片的 24 孔培养板中 (0.5 mL/well), 弃上清, 加入 As₂O₃ (0.5 mL/well), 当细胞 50% 病变时, 弃上清, PBS 洗后冷丙酮固定。按试剂盒说明操作, 封片后, 随机选择 5 个视野计凋亡细胞和正常的细胞数, 计算均数和凋亡细胞百分数。

4 RT-PCR 检测 survivin 基因的表达

在 PC₂ 细胞培养形成单层的细胞瓶内加入 As₂O₃ (1.5 mL/well), 细胞 100% 病变后消化收集各组细胞, Trizol 提取总 RNA, 用 DNA/RNA 测定仪测定 RNA 的浓度和纯度。常规方法^[3]进行逆转录。Survivin 基因引物序列^[4]为 5' - CACCGCATCTCA-CATTCAA - 3' (上游) 和 3' - CACTTCTTCGCGCAG-TTTCCT - 5' (下游), 扩增产物为 344 bp。PCR 反应体系包括 10 μL RT 产物, MgCl₂ 3 μL; Latag 30.75 μL; 10 × LA PCR Pruffer 4 μL; survivin 基因上下游引物各 1 μL; ddH₂O 0.25 μL。反应条件: 94 °C 30 s, 54 °C 30 s, 72 °C 1.5 min; 30 个循环。用 β-actin 做内对照, 扩增产物为 465 bp。1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的基因片段。Bio-Rad 凝胶自动成像分析仪 (USA) 处理。

5 统计学处理

数据分析应用 SPSS 10.0 软件处理, 以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 两组之间比较使用 *t* 检验。

结 果

1 不同培养时间 As₂O₃ 对胰腺癌细胞增殖能力的影响 (图 1)

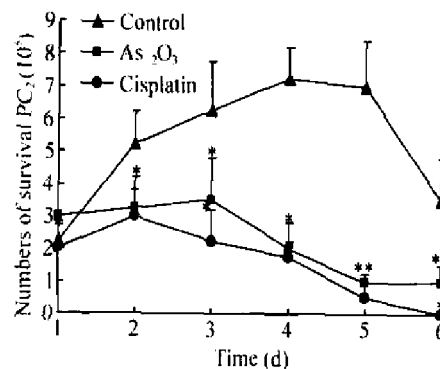


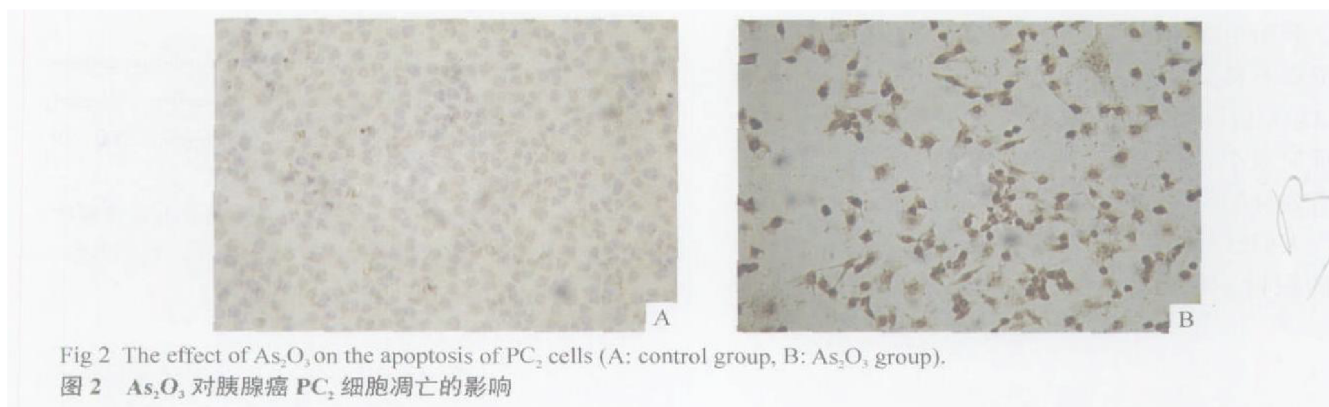
Fig 1 The effect of As₂O₃ on the survival numbers of the pancreatic cancer cells at the varied time. $\bar{x} \pm s$. *n* = 4. * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01 vs control.

图 1 As₂O₃ 作用不同时间对胰腺癌细胞生存数的影响

从图 1 可知, 随着 As₂O₃ 对细胞作用时间的延长, 细胞生存数量明显降低。第 2-6 d, As₂O₃ 组与细胞对照组比较差异显著 (第 2-3 d *P* < 0.05, 第 4-6 d *P* < 0.01)。常规化疗药物顺铂作为阳性对照物, 其作用也是随着作用时间的延长, 细胞生存数量降低, 与细胞对照组比较差异显著 (第 2 d *P* < 0.05, 第 3-6 d *P* < 0.01)。而 As₂O₃ 和顺铂两种药物之间相比较无显著差异 (*P* > 0.05), 说明 As₂O₃ 抗肿瘤效果与顺铂相似。

2 As₂O₃ 对胰腺癌细胞凋亡的影响

图 2 显示, TUNEL 染色后, 对照组细胞呈淡蓝色多角形, 极少见到凋亡细胞; As₂O₃ 组有部分细胞凋亡, 凋亡细胞呈褐色、圆形或梭形。



3 As₂O₃ 诱导胰腺癌细胞凋亡时 survivin 基因表达的变化

从图 3 可知, survivin 基因在胰腺癌细胞中存在

高表达。RT-PCR 结果显示, As₂O₃ 诱导胰腺癌细胞凋亡时, survivin 基因的 mRNA 受到抑制。Survivin gene/β-actin: 对照组为 0.502 ± 0.174 , As₂O₃ 组为

0.392 ± 0.105, 药物组与细胞对照组相比有显著差异 ($P < 0.05$)。

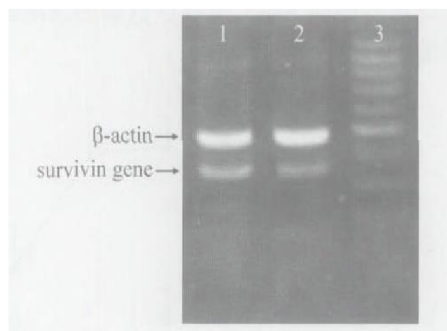


Fig 3 The effect of As_2O_3 on the expression of survivin of pancreatic cancer cells. 1: control; 2: As_2O_3 group; 3: Marke.

图3 As_2O_3 对胰腺细胞 survivin 基因表达的影响

讨 论

胰腺癌是一种极难治疗的恶性肿瘤,国内外发病率有逐年增高的趋势。在美国,每年有28 000位胰腺癌患者死亡,居于西方国家恶性肿瘤死亡的第4位。由于胰腺癌发病隐匿,临床症状不明显,手术切除率为10% - 24%,远期疗效不令人满意,化学药物治疗的不良反应大,患者应用一段时间无法承受,且易产生耐药^[5],寻找和筛选有效并不不良反应小的化疗药物具有现实意义。

As_2O_3 在抗肿瘤方面的作用逐渐被人们所认识,已开始进入临床应用阶段。我们用人的胰腺癌 PC₂ 细胞株作为靶细胞,探索 As_2O_3 对 PC₂ 肿瘤细胞的作用,旨在揭示其抗胰腺癌机制。本研究发现不同剂量的 As_2O_3 对胰腺癌细胞均有抑制作用。用 12.5 $\mu\text{g/L}$ As_2O_3 作用于胰腺癌细胞,动态观察 As_2O_3 的抗肿瘤效果,发现 As_2O_3 抑制胰腺癌细胞具有时间依赖性。顺铂是临床上常见的一种化疗药物,化疗效果好但毒不良反应大。我们用顺铂作为阳性对照,发现 As_2O_3 抗肿瘤效果与顺铂相似,但 As_2O_3 的临床不良反应较小,本实验结果提示 As_2O_3 可能替代顺铂,具有较好的临床应用价值。

人们已对 As_2O_3 抗肿瘤的发生机理进行了多方面的探讨。有学者认为, As_2O_3 抗肿瘤机制是抑制

bcl-2 基因表达,诱导细胞凋亡,也有学者认为它能增加 Fas/Fas-L 表达,诱导肿瘤细胞凋亡^[2]。 As_2O_3 可以诱导多种肿瘤细胞凋亡,但对不同的肿瘤细胞其诱导凋亡的机制和途径并不完全相同。颌东旭等^[5]认为多数促癌基因经 As_2O_3 诱导后表达下调,而多数肿瘤抑制基因则表达上调。

Survivin 基因是近年来发现的一种细胞凋亡抑制基因,它在成熟的终末分化组织中不表达,而大多数癌组织如肺癌、结直肠癌、胰腺癌、前列腺癌、乳腺癌和胃癌^[3]中水平升高,有学者认为肿瘤的发生是 survivin 基因高表达所致。我们用 As_2O_3 作用于胰腺癌 PC₂ 细胞,检测 survivin 基因表达,同时结合 TUNEL 检测法观察 As_2O_3 促进胰腺癌细胞凋亡的作用,结果表明, As_2O_3 作用于胰腺癌细胞后, TUNEL 显示有大量的肿瘤细胞出现了凋亡,同时 survivin 基因的表达明显受到抑制,说明它在 As_2O_3 诱导的肿瘤细胞凋亡过程中发挥重要的作用。本结果证实, As_2O_3 对胰腺癌细胞的杀伤作用,与 survivin 基因表达受抑制有关。

[参 考 文 献]

[1] 张 鹏, 王树叶, 胡龙虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒细胞白血病[J]. 中华血液学杂志, 1996, 17(2): 58- 61.

[2] Yang J, Li H, Chen YY, et al. Anthraquinones sensitize tumor cells to arsenic cytotoxicity *in vitro* and *in vivo* via reactive oxygen species- mediated dual regulation of apoptosis[J]. Free Radic Biol Med, 2004, 37(12): 2027- 2041.

[3] Conway EM, Pouefeyt S, Cornelissen J, et al. Three differentially expressed survivin cDNA variants encoded proteins with distinct antiapoptotic function[J]. Blood, 2000, 95(4): 1435 - 1442.

[4] Suzuki A, Ito T, Kawano, et al. Survivin initiate procaspase - 3/21 complex formation as a result of interaction with cdk4 to resist Fas- mediated cell death[J]. Oncogene, 2000, 19(10): 1346- 1353.

[5] 颌东旭, 丁 芬, 王秀琴, 等. As_2O_3 诱导人食管鳞状上皮癌 EC8712 细胞基因表达概况分析[J]. 科学通报, 1999, 44(12): 1287- 1292.