

[文章编号] 1000- 4718(2006)02- 0314- 04

三氧化二砷抑制体外培养小鼠气道成纤维细胞增殖及 c- myc 与 c- sis 表达*

郭红荣¹, 梁 标²

(¹南京医科大学附属常州第二人民医院呼吸科, 江苏 常州 213003; ²广东医学院呼吸疾病研究所, 广东 湛江 524021)

[摘要] 目的:探讨三氧化二砷(As₂O₃)对体外培养的小鼠气道成纤维细胞(FB)增殖及原癌基因 c- myc 与 c- sis 表达的影响。方法:按不同药物分7组,在体外培养的FB中分别加入浓度为0.25、0.5、1.0、2.0和4.0 μmol/L的As₂O₃,在1、3、5和7 d后用计数法观察FB生长情况,并用流式细胞仪(FCM)检测不同浓度药物对各组FB增殖的影响及各组 c- myc 与 c- sis 的阳性表达率。结果:各种实验浓度的As₂O₃对FB均有抑制作用,并有时间剂量效应。流式细胞仪分析显示,随着浓度的增高,G₁期细胞比例逐渐增高,G₂/M期细胞比例降低,浓度为2.0和4.0 μmol/L的As₂O₃能显著抑制 c- myc 与 c- sis 的表达。结论:As₂O₃能抑制FB的增生,其机理可能与其下调 c- myc 与 c- sis 的表达有关。

[关键词] 三氧化二砷; 成纤维细胞; 细胞增殖; 癌基因

[中图分类号] R363 [文献标识码] A

Inhibitory effect of arsenic trioxide on the proliferation of airway fibroblast and the expression of c- myc and c- sis *in vitro*

GUO Hong- rong¹, LIANG Biao²

(¹Department of Respiratory Medicine, Affiliated Changzhou Second People's Hospital, Nanjing Medical University, Changzhou 213003, China; ²Institute of Respiratory Disease, Guangdong Medical College, Zhanjiang 524023, China)

[ABSTRACT] AIM: To study the effects of arsenic trioxide (As₂O₃) on mouse airway fibroblast (FB) proliferation and expression of c- myc and c- sis in cultured FB. METHODS: The cultured FB was divided into seven groups. NS, dexamethasone (1.0 μmol/L) and As₂O₃ at concentrations of 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 μmol/L were instilled respectively into cultured FB. The effects of different concentration of As₂O₃ and dexamethasone on cell growth were observed at 1, 3, 5 and 7 day. The changes of cell cycle and the positive expression rate of c- myc and c- sis were examined by flow cytometry (FCM). RESULTS: Various concentrations of As₂O₃ significantly inhibited the proliferation of FB *in vitro* and showed a dose- dependent and time- dependent tendency. Data from FCM indicated that G₁- phase cell percentage increased and G₂/M- phase cell percentage decreased with the increase in As₂O₃ concentrations. The expression of c- myc and c- sis was significantly inhibited by As₂O₃(2.0, 4.0 μmol/L). CONCLUSION: As₂O₃ inhibits FB proliferation by downregulating the expression of c- myc and c- sis.

[KEY WORDS] Arsenic trioxide; Fibroblast; Cells proliferation; Oncogenes

三氧化二砷(arsenic trioxide, As₂O₃)被认为是剧毒物质,并且有致畸、致癌作用,但应用其小剂量来治疗白血病已早有报道^[1],其主要作用机理是抑制细胞增殖,促进细胞凋亡。近年来研究证实As₂O₃具有促进哮喘豚鼠气道嗜酸粒细胞凋亡、降低气道反应性的作用^[2]。慢性气道炎症、气道重构是哮喘的两个主要特点,而气道重构主要表现为气道平滑肌细胞(smooth muscle cell, SMC)、成纤维细胞(fibroblast, FB)的增生和大量细胞外基质(extracellular material, ECM)的沉积。FB是气道粘膜下主要结构细胞之一,

原癌基因 c- myc and c- sis 与FB增生密切相关。本研究通过体外培养FB,探讨As₂O₃对FB增殖及 c- myc与 c- sis 基因表达的影响,以期对哮喘的防治开辟新途径。

材 料 和 方 法

1 动物

昆明种雄性小鼠,体重(20±2)g(广东医学院实验动物中心提供)。

[收稿日期] 2004- 07- 08 [修回日期] 2004- 12- 07

* [基金项目] 广东省中医药局课题(No. 100023)

Tel: 0519- 8119299; E- mail: hyg68@tom.com

2 主要试剂及仪器

三氧化二砷(哈尔滨医科大学第一附属医院), DMEM(Sigma公司), 新生小牛血清(FBS, 北京生物制品有限公司), 胰蛋白酶(Sigma公司), 碘化丙啶(Sigma公司), EDTA(AKI公司), 胶原酶 IV(Sigma公司), 即用型 DAB 试剂盒(北京中山生物技术有限公司), 兔抗小鼠胶原酶 IV 单克隆抗体、抗平滑肌 α -肌动蛋白抗体(Sigma公司)、兔抗小鼠 c-myc 与 c-sis 蛋白多克隆抗体(美国 Santa Cruz 公司)。DMEM 培养液, 含 15% 小牛血清, 5% 谷氨酰胺, 青霉素 1×10^5 U/L, 链霉素 100 mg/L。日本 NAPCO5410 型培养箱, 倒置显微镜(日本 Olympus), EPICS-XL 流式细胞仪(美国库尔特公司)。

3 原代细胞的培养

引颈处死小鼠, 取支气管, 用生理盐水及 D-Hanks 液清洗干净, 刮去内外膜, 剪成小组织块($< 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$), 置于含胶原酶 IV(2×10^6 U/L) 的 DMEM 中于 37°C 5% CO_2 培养箱中消化 2 h 后, 加入 0.25% 胰蛋白酶消化 30 min, 离心弃上清。用含 20% FBS 的 DMEM 培养液于 37°C 5% CO_2 培养箱中继续培养。利用时差法将平滑肌细胞除去。当培养瓶 FB 细胞铺满后用 0.25% 胰蛋白酶-EDTA 消化传代, 每 3-5 d 更换培养液。实验用第 3-5 代处于对数生长期的细胞。

4 成纤维细胞的鉴定

根据细胞形态学及细胞免疫组化方法来鉴定。成纤维细胞呈放射状生长, 长梭形。将消化后的细胞制成细胞悬液, 接种于玻片继续培养。至生长状态良好后取出自然晾干, 冷丙酮甲酸(2:1) 固定 10 min, 晾干后 -20°C 冰箱保存备用。用免疫组化方法来鉴定成纤维细胞。

5 细胞生长曲线的绘制

取第 3 代细胞进行消化, 制成细胞悬液, 以 10^7 cells/L 的密度分别接种于 25 mL 培养瓶继续培养。每隔 1 d 取出 3 瓶进行计数, 计算均值。连续观察 2 周。

6 药物对细胞增殖的影响

6.1 细胞生长抑制实验 将第 3 代 FB 接种于 24 孔细胞培养板上(1×10^8 cells/L, 1 mL/well), 37°C 、5% CO_2 培养箱中培养 48 h 后, 细胞贴壁生长呈致密的单层。弃原生长液, 实验组每孔加入由培养液稀释的分别含 0.25、0.50、1.0、2.0 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 1 mL, 空白对照组仅加入培养液, 每 4 孔为一浓度组, 共 6 组。于 37°C 5% CO_2 培养箱中继续培养。分别于第 1、3、5 和 7 d 时收样, 用台盼蓝的稀释液在血球计数板上计数细胞。实验重复 3 次, 取均

值。计算抑制率 = (对照组细胞数 - 实验组细胞数) / 对照组细胞数 $\times 100\%$ 。

6.2 药物对细胞周期的影响 将第 3 代 FB 接种于 96 孔细胞培养板上用不同的药物处理, 分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松及浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0、4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 , 空白组只加生理盐水。每组重复 3 个样本。继续培养 48 h 后消化收集细胞制成细胞悬液(1×10^9 cells/L 左右), 加入 70% 预冷乙醇, 4°C 冰箱固定 48 h。RNase A 及碘化丙啶(PI) 处理(避光) 30 min, 用流式细胞仪进行细胞周期分析。

6.3 药物对细胞 c-myc、c-sis 基因表达的影响 将第 3 代 FB 按上述同样方法分组并处理, 分别加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松及浓度分别为 0.25、0.5、1.0、2.0 和 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 , 空白组只加生理盐水。每组重复 3 个样品。继续培养 48 h 后消化收集细胞制成细胞悬液(1×10^9 cells/L), 加入 70% 预冷乙醇, 4°C 冰箱固定 48 h。PBS 离心洗涤 2 次, 重悬于 100 μL PBS (含 0.1% 叠氮钠和 2% 小牛血清)。根据兔抗鼠 c-myc 与 c-sis 蛋白多克隆抗体试剂盒说明分别加入两种抗体, 并设阴性对照以 PBS 替代。 4°C 放置, 反应 45-60 min(避光)。洗涤后加入 50 μL 1:40 的 FITC 标记的山羊抗兔 IgG, 4°C 反应 30-45 min(避光), 洗涤后重悬于 0.5 mL PBS 中上流式细胞仪检测, 用 488 nm 激发波长测定 c-myc、c-sis 的阳性表达率。

7 统计学处理

各指标(计量资料)均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用 SPSS 10.0 统计软件进行单因素方差分析、方差齐性检验。

结 果

1 FB 细胞学特性

原代细胞 24 h 内可贴壁, 并有细胞长出成梭形。细胞生长最快在 8-14 d, 呈放射状排列生长, 胞体丰满, 胞浆均匀。传代细胞很快贴壁(< 8 h), 生长旺盛, 状态良好(见图 1、图 2)。

2 细胞免疫组化鉴定

FB 胞浆中抗 II 型胶原抗体阳性(染成褐黄色), 抗波形丝蛋白抗体阳性(染成棕黄色), 抗 α -肌动蛋白抗体阴性(未见橘黄色表达), 证实所培养细胞为成纤维细胞(见图 3-图 5)。

3 细胞生长曲线

细胞培养 2 周内细胞密度变化见表 1。细胞传代后第 1 d 生长缓慢, 从第 2 d 开始细胞分裂增殖活跃, 成对数生长, 一般在第 2-8 d 细胞分裂指数达高峰。当细胞达到饱和密度时, 细胞生长趋于停滞状态, 细胞生长曲线呈“滞缓-对数生长-平台模式”。



Fig 1 The primary cells by phase contrast microscope ($\times 40$).
图 1 相差显微镜下的原代 FB 形态



Fig 2 The generative cells by phase contrast microscope ($\times 40$).
图 2 相差显微镜下的传代 FB 形态



Fig 3 Collagen III positive expression of FB by IC (SP, $\times 400$).
图 3 免疫细胞化学染色显示 FB 细胞 III 型胶原表达阳性

4 细胞生长抑制率的变化

结果见表 2, 提示各剂量组之间、不同时间之间有显著差异 ($P < 0.01$), 而且随着 As_2O_3 浓度的增加, 作用时间的延长, As_2O_3 对 FB 的抑制作用愈明显。可见 As_2O_3 对细胞增生的抑制率既具有剂量效应关系, 又具有时间效应关系。见图 6。

5 药物对 FB 细胞周期的影响

FB 经 As_2O_3 及地塞米松处理后, 各治疗组中处于 G_1 期的比例显著大于正常对照组 ($P < 0.01$)。中小剂量组中处于 S 期的比例显著高于正常组 ($P < 0.01$), 至大剂量组才低于正常组。各组 G_2/M 期的比例少于正常对照组 ($P < 0.01$), 大剂量组较小剂量组降低更明显 ($P < 0.01$)。见表 3。

6 药物对 FB 细胞 c- myc .c- sis 基因表达的影响

随着 As_2O_3 剂量的增大, c- myc .c- sis 的表达

率逐渐降低, 呈剂量依赖性 ($P < 0.01$), 而且大剂量组降低作用强于小剂量组 ($P < 0.01$)。地塞米松可抑制两基因的表达率, 但与 As_2O_3 各处理组相比, 其降低作用弱于 As_2O_3 ($P < 0.01$)。见表 4。

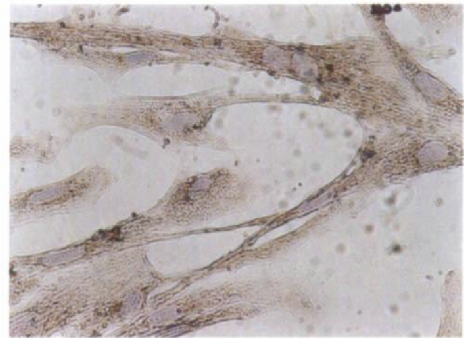


Fig 4 Vimentin positive expression of FB by IC (SP, $\times 400$).
图 4 免疫细胞化学染色显示 FB 细胞波形蛋白表达阳性

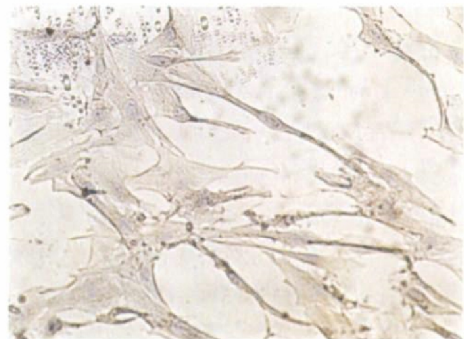


Fig 5 α -actin positive expression of FB by IC (SP, $\times 400$).
图 5 免疫细胞化学染色显示 FB 细胞 α - 肌动蛋白表达阴性 (未见橘黄色表达)

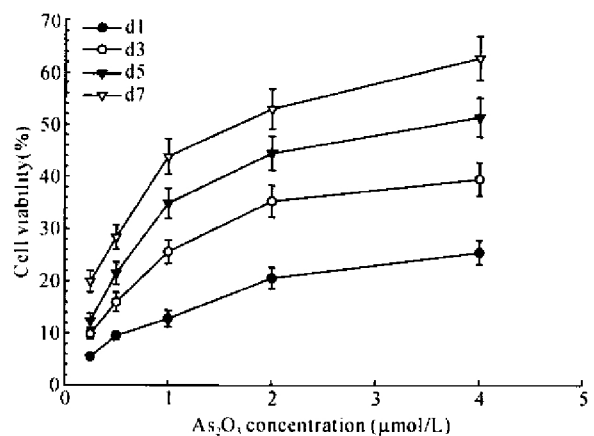


Fig 6 The dose- dependent and time- dependent effects on the cell viability of FB. $\bar{x} \pm s$. $n = 3$. $P < 0.01$ vs every group and every day each other.

图 6 As_2O_3 对 FB 生长抑制率的时效及量效作用

讨 论

早已证实, As_2O_3 在急性早幼粒细胞白血病 (APL) 及多种恶性肿瘤的治疗中发挥重要作用。体外研究表明, 其主要机理是一定剂量的 As_2O_3 能抑制

表 1 FB 细胞培养 2 周内细胞密度变化

Tab 1 Changes of the density of FB in 2 weeks ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Time(d)	0	2	4	6	8	10	12	14
Density($\times 10^4$)	2.00 \pm 0.53	2.52 \pm 0.77	5.98 \pm 0.89	7.66 \pm 1.02	9.85 \pm 0.42	10.77 \pm 0.64	11.01 \pm 0.39	11.32 \pm 0.56

表 2 As₂O₃ 对 FB 细胞培养不同天数生长抑制率的变化

Tab 2 Changes of the cell viability of FB(% . $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Concentration ($\mu\text{mol/L}$)	1 d	3 d	5 d	7 d
0.25	5.50 \pm 0.46	9.87 \pm 1.45	12.38 \pm 1.45	19.89 \pm 2.08
0.5	9.47 \pm 0.83	15.94 \pm 1.85	21.46 \pm 2.13	28.34 \pm 2.37
1.0	12.80 \pm 1.55	25.57 \pm 2.26	34.85 \pm 2.82	43.82 \pm 3.36
2.0	20.50 \pm 2.07	35.23 \pm 3.04	44.41 \pm 3.26	52.86 \pm 3.83
4.0	25.40 \pm 2.28	39.42 \pm 3.15	51.26 \pm 3.74	62.63 \pm 4.22

表 3 As₂O₃ 对 FB 细胞周期的影响

Tab 3 Effects of As₂O₃ on the cell cycle of FB(% . $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Group	G ₁	S	G ₂ /M
Control	80.55 \pm 2.38	5.71 \pm 0.53	13.74 \pm 1.56
Dexamethone	81.72 \pm 2.41*	3.36 \pm 0.47*	14.92 \pm 1.43*
As ₂ O ₃ 0.25	85.26 \pm 2.55*	7.58 \pm 0.87*	7.16 \pm 0.73* Δ
As ₂ O ₃ 0.5	85.47 \pm 2.81* Δ	7.35 \pm 1.04*	7.12 \pm 0.72*
As ₂ O ₃ 1.0	86.13 \pm 3.02*	7.55 \pm 0.98*	6.32 \pm 1.12*
As ₂ O ₃ 2.0	89.08 \pm 2.97* *	7.11 \pm 0.95* *	3.81 \pm 0.52* *
As ₂ O ₃ 4.0	90.25 \pm 3.17* *	5.54 \pm 0.61* *	4.21 \pm 0.66* *

* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.01$ vs As₂O₃ 2.0 group; * $P < 0.01$ vs As₂O₃ 0.25 group.

表 4 各组 c- myc ,c- sis 表达率的比较

Tab 4 Comparison of c- myc, c- sis expression rate among every group (% . $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Group	c- myc	c- sis
Control	21.25 \pm 0.48	14.69 \pm 0.32
Dexamethone	19.38 \pm 0.50*	12.58 \pm 0.18*
As ₂ O ₃ 0.25	14.65 \pm 0.41* *	10.71 \pm 0.30* *
As ₂ O ₃ 0.5	14.35 \pm 0.34* *	10.23 \pm 0.37* *
As ₂ O ₃ 1.0	5.64 \pm 0.27* Δ *	8.48 \pm 0.16* *
As ₂ O ₃ 2.0	4.57 \pm 0.16* Δ *	7.71 \pm 0.24* Δ *
As ₂ O ₃ 4.0	3.27 \pm 0.15* Δ *	4.75 \pm 0.12* Δ *

* $P < 0.01$ vs control group; $\Delta P < 0.01$ vs As₂O₃ 0.25 group; * $P < 0.01$ vs dexamethone group.

细胞增殖,诱导其凋亡^[3,4]。近年来研究^[2,5,6]发现 As₂O₃ 能抑制哮喘豚鼠骨髓中 EOS 的生成,抑制肺组织血管周围 EOS 浸润,促进 EOS 凋亡,从而减轻哮喘的气道炎症而发挥其治疗作用。Burns 等^[7]的实验提示,砷化物可抑制抗体形成及其它一些 T 细胞介导的免疫功能,并抑制抗原提呈细胞和淋巴细胞的活化和增殖。本研究发现,在 As₂O₃ 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 的剂量时,即出现 G₁ 的阻滞。随着剂量的增大,G₁ 期细胞逐渐增多,而处于 G₂/M 期细胞逐渐减少,呈剂

量依赖性。同时我们看到,在中小剂量时,S 期细胞的比例高于正常对照组,至 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 剂量组时,S 期细胞的比例才低于正常对照组。这可能与砷对于细胞的作用具有双重性有关。Meng 等^[8]研究发现,低浓度的砷剂可促进淋巴细胞 DNA 的合成,而高浓度的砷剂可抑制 DNA 的合成。这说明不同浓度的 As₂O₃ 具有不同的作用效应。但是,各剂量组 G₁ 期细胞明显多于正常组,G₂/M 期细胞明显减少。因此,As₂O₃ 总的作用效果仍然是抑制 FB 的增殖。地塞米松对细胞周期的影响不明显,考虑其治疗哮喘的机制与 As₂O₃ 有所不同。另外,实验结果显示随着 As₂O₃ 剂量的增大,c- myc ,c- sis 的表达率逐渐降低,低剂量组对基因的表达影响不明显,大剂量组能明显抑制两基因的表达,呈剂量依赖性。As₂O₃ 各处理组与对照组相比,差异显著($P < 0.01$),大剂量组明显优于小剂量组,且作用优于地塞米松($P < 0.01$)。因而我们认为,As₂O₃ 是通过下调 c- myc ,c- sis 的表达,从而调控细胞周期而抑制 FB 的增殖。这为 As₂O₃ 有效防治哮喘提供理论依据。

[参 考 文 献]

[1] 付春景,李金龙,黄幼田,等. STI571 及 As₂O₃ 诱导 K562 细胞凋亡机制的研究[J]. 中国病理生理杂志, 2004, 20 (10): 1919- 1920.

[2] 周林福,殷凯生. 小剂量三氧化二砷对哮喘豚鼠气道嗜酸细胞凋亡和核因子 κB 表达作用的相关性研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(7): 439.

[3] 陈国强,朱 军,石学耕,等. 氧化砷诱导早幼粒细胞白血病凋亡及其分子机制的初步研究[J]. 中华血液病杂志, 1997, 18(1): 25- 28.

[4] 唐印华,刘铁夫,庄丽维,等. 三氧化二砷抑制肝癌增殖的体内实验研究[J]. 哈尔滨医学, 2003, 23(1): 3- 4.

[5] 殷凯生,姚 欣,陈俊娣,等. 在实验动物中砷剂平喘机制的初步研究[J]. 南京医科大学学报, 1999, 19(5): 433.

[6] 丁礼仁,沈华浩,崔 巍. 砷剂对支气管哮喘大鼠气道炎症的作用[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(11): 686- 687.

[7] Burns LA, Munson AE. Gallium arsenide selectively inhibits T cell proliferation and alters expression of CD25(IL- 2R/ p55) [J]. J Pharmacol Exp Ther, 1993, 265(1): 178- 186.

[8] Meng ZQ, Meng NY. Effects of arsenolite on blast transformation and DNA synthesis of human blood lymphocytes [J]. Chemopere, 2000, 41(1- 2): 115- 119.