

三氧化二砷(As_2O_3)诱导人胃腺癌 SGC7901 细胞程序化死亡并降低 c-myc 基因的表达

邓友平¹, 林 晨*, 张雪艳, 陈德权, 肖培根¹, 吴 旻

(中国医学科学院、中国协和医科大学肿瘤医院分子肿瘤学国家重点实验室, 北京 100021;

¹ 药用植物研究所, 北京 100094)

摘要 目的:探讨 As_2O_3 对胃腺癌 SGC7901 细胞系的生物学效应及机制。方法:通过 MTT 还原法检测 As_2O_3 对该细胞系存活率的影响,从光学显微镜形态观察,流式细胞仪分析,DNA 凝胶电泳,细胞凋亡原位检测(TUNEL)进行细胞凋亡的检测。半定量 RT-PCR 检测基因表达。结果: As_2O_3 处理 SGC7901 细胞后,细胞的存活率明显降低,光学显微镜下可见到明显的凋亡细胞,流式细胞仪测定细胞周期的 G1 期前有亚 2 倍体的凋亡峰,DNA 凝胶电泳显示出典型的凋亡特征:DNA 有规律断裂形成的梯状图谱,细胞凋亡原位检测发现 DNA 的断裂,并降低细胞 c-myc 基因的表达。结论: As_2O_3 能诱导人胃腺癌 SGC7901 细胞程序化死亡并可能通过降低 c-myc 基因的表达。

关键词 三氧化二砷;胃腺癌 SGC7901 细胞;细胞程序化死亡;c-myc 基因表达

受 As_2O_3 对急性早幼粒白血病(APL)临床及其细胞系良好作用的启示^[1~3],我们开展了 As_2O_3 对动物体内肿瘤疗效的研究,取得了肯定效果(中国中药杂志,待发表资料),进一步启发我们从体外研究 As_2O_3 的生物学活性。胃癌在我国是常见病,也是高发性肿瘤^[4]。胃癌对放化疗敏感性均低,行胃癌根治手术的病例有 30%左右复发。因此,为了预防术后复发和晚期病例的治疗,急待寻找新的有效治疗胃癌的药物。本文以胃腺癌 SGC7901 细胞为模型,研究 As_2O_3 的生物学效应及作用机制。

材 料 和 方 法

材料 As_2O_3 购自 Sigma 公司,用生理盐水配成 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的贮存液,使用前用完全培养基稀释到所需浓度。

细胞和细胞培养 人胃腺癌 SGC7901 细胞,引自北京市肿瘤研究所。用 M199 培养基培养。

细胞形态观察 每瓶接种 1.0×10^6 细胞,24 h 后用不同浓度的 As_2O_3 处理,每天用相差显微镜观察并照相记录用药组和对照组细胞的形态变化。

MTT 还原测试 细胞在 96 孔板中接种,每孔

3 000 个细胞,培养 1, 3, 5, 7 d 后,参考文献^[5]方法进行 MTT 实验。用自动酶标检测仪(Biokinetics Reader, Microplate EL312e, 美国)在 540 nm 处检测 96 孔的吸光度,以(用药组/对照组)×100% 计算细胞的存活率。

流式细胞仪检测 参考文献^[6]方法进行。收集 As_2O_3 处理前后的细胞,70% 冷乙醇固定 24 h, $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$ RNaseA 37°C 温育 30 min 后,加碘化丙啶(PI)使其终浓度达 $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 暗处作用 0.5 h 以上。用流式细胞仪(Coulter, Epicus ELITE, ESP, 美国)数据用 multicycle 分析软件分析。

DNA 提取和凝胶电泳 按照文献^[7]的方法略加改进进行。收集 1×10^6 细胞,加细胞裂解液($1\% \text{ NP-40}$, $20 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ EDTA}$, $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ Tris-HCl}$, pH 7.5) $400 \mu\text{l}$ 裂解,离心,取上清液加 RNaseA 至终浓度 $10 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 37°C 温育 1 h,加蛋白酶 K 至终浓度 $20 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$, 37°C 温育 1 h,再加 2.5 体积的无水乙醇沉淀 DNA,用 $1\% \text{ 琼脂糖凝胶电泳}$ (含 $0.5 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1} \text{ EB}$)。紫外灯下检测 DNA 并照相。

细胞凋亡的 TUNEL(TdT-mediated dUTP nick end labeling) 检测 按细胞凋亡检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司产)说明书方法进行。

半定量逆转录-PCR(RT-PCR)分析 按照 GIBCO BRL 公司提供的 TRIZOL 试剂盒的说明提取 RNA;按照 Life Technologies, Inc. 逆转录试剂盒

的说明, 略加改进, 进行逆转录合成 cDNA。取 cDNA 产物在 PE-2400 热循环仪上, 用下列引物。

1 β-actin引物:

上游 5'-CGTCTGGACCTGGCTGGCCGGGACC-3'; 下游 5'-CTAGAAGCATTTGCGGTGGACGATG-3' 扩增 600 bp 片段。

2 c-myc 引物:

上游为 5'-CTCTCAACGACAGCAGCCCG-3'; 下游为 5'-AGGTGATCCAGACTCTGACC-3', 扩增 250 bp 片段。按下列条件进行 PCR: (1) 95℃, 5 min; (2) 95℃, 1 min; 56℃, 1 min; 72℃, 1 min; 25 cycles; (3) 72℃, 7 min。PCR 产物用 1.8% 琼脂糖凝胶电泳(含 0.5 μg·ml⁻¹ EB)。

结 果

1 三氧化二砷(As₂O₃)对胃腺癌 SGC7901 细胞存活率的影响

图 1 可见, As₂O₃ 明显抑制 SGC7901 细胞的生长和存活, As₂O₃ 浓度在 2 μmol·L⁻¹ 时, 效果已十分明显, 随着浓度和时间的增加, 细胞的存活率逐渐降低。

2 As₂O₃ 处理胃腺癌 SGC7901 细胞的形态学变化
As₂O₃ 处理 SGC7901 细胞后, 在相差显微镜下

观察到细胞的形态变化明显, 图 2 显示, 5 μmol·L⁻¹ As₂O₃ 处理 1 d 的 SGC7901 细胞(图 2B), 开始有少数细胞变圆, 细胞的数目开始减少, 2 d 时, SGC7901 细胞的间隔增大, 细胞变圆的数目增多, 染色质和细胞质浓缩, 细胞膜弯曲形成凋亡小体(图 2C); 到 d 3(图 2D) 凋亡的细胞数进一步增加, 多数细胞脱落而悬浮于细胞培养基中, 且有少数细胞破裂, 呈细胞坏死状。

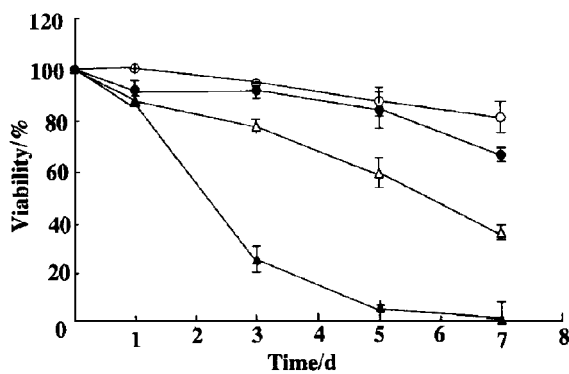


Fig 1 Effect of As₂O₃ at various concentrations on the viability of human gastric adenocarcinoma SGC7901 cells. Cell viability was determined by MTT reduction assay described in materials and methods. These results are the mean of three independent experiments. The bars represent the standard deviation. ○—○ 0.5 μmol·L⁻¹, ●—● 1.0 μmol·L⁻¹, △—△ 2.0 μmol·L⁻¹, ▲—▲ 5.0 μmol·L⁻¹.

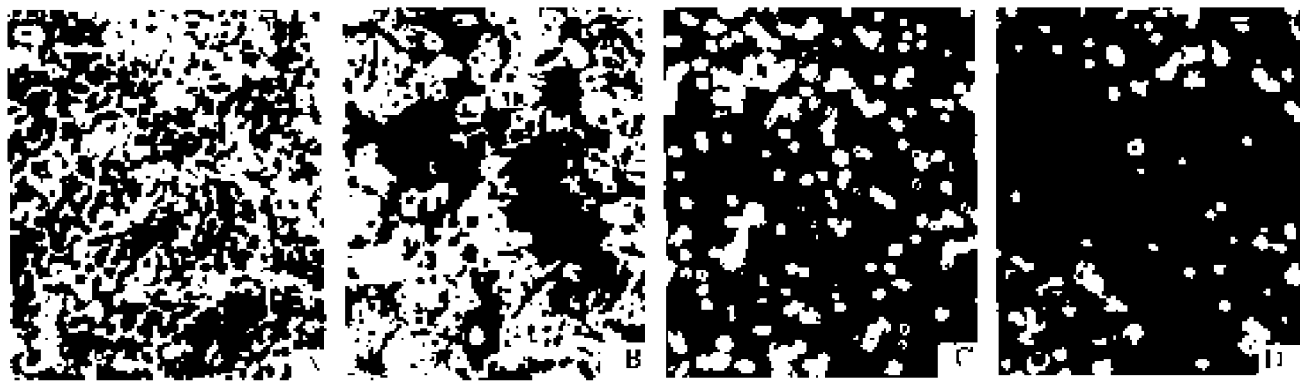


Fig 2 Morphological changes in SGC7901 cells after exposure to As₂O₃ under phase contrast microscope. (100×). A. Untreated SGC7901 cells (control); B~D. SGC7901 cells treated with As₂O₃ (5 μmol·L⁻¹) for 24, 48, 72 h.

3 流式细胞仪检测结果

不同 As₂O₃ 处理 SGC7901 细胞(图 3) 3 d 后, 在细胞周期 G1 期前面, 出现明显的凋亡峰, 2 μmol·L⁻¹ As₂O₃ 处理 3d 时, 凋亡细胞就达 37.1%, 而且随着用药浓度和时间的延长, 凋亡峰值逐渐加大。5 μmol·L⁻¹ 3 d 时, 53.2% 的 SGC7901 细胞已经凋亡。

4 As₂O₃ 处理 SGC7901 细胞提取基因组 DNA 电泳结果

图 4 所示, 不同浓度的 As₂O₃ 处理 SGC7901 细胞 48 h 后, 基因组 DNA 凝胶电泳显现明显的梯状图谱, 这是 DNA 在核小体间成 180~200 bp 整倍断裂的结果。1 μmol·L⁻¹ 时即可呈现微弱的梯状电泳带, 随着浓度的增加, 条带变得更为清晰。

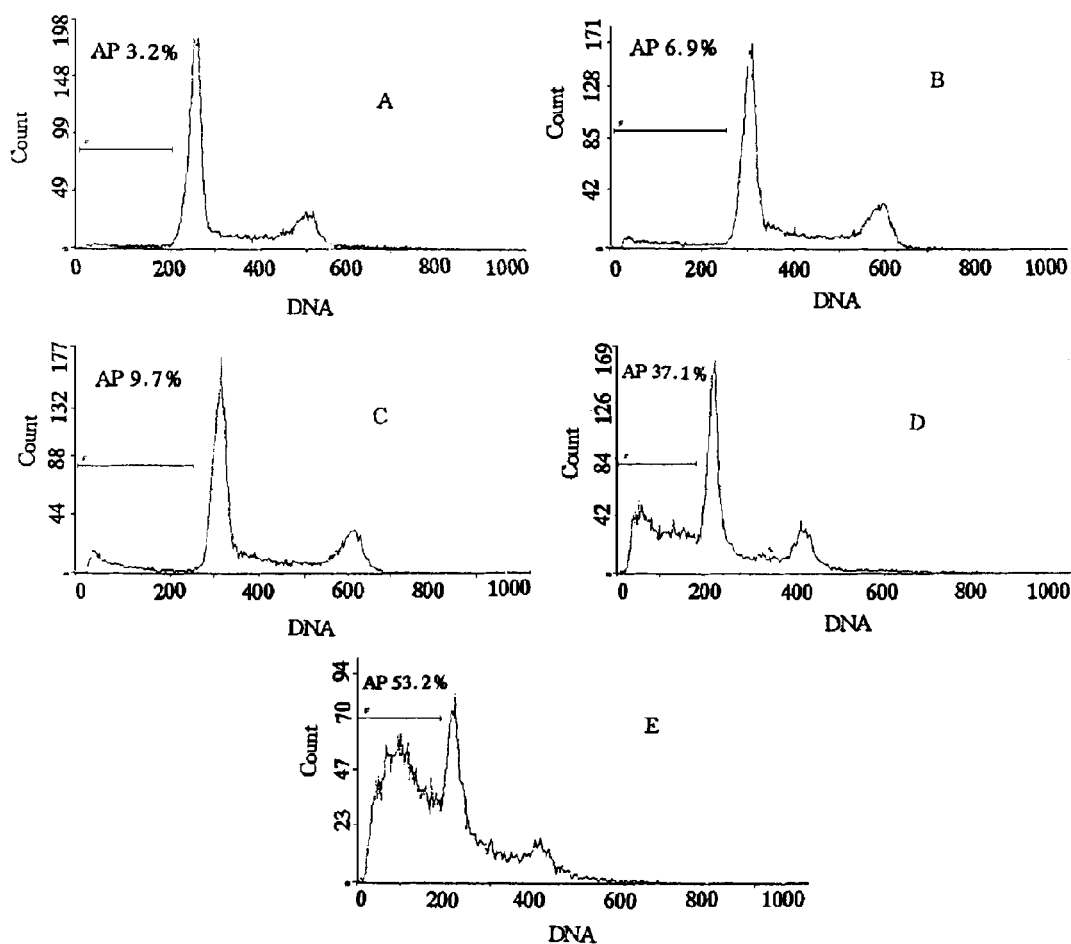


Fig 3 DNA histograms from flowcytometry analysis of As_2O_3 treated SGC7901 cells. AP represents apoptotic cells. Cells were incubated in the absence (A) or with As_2O_3 0.5 (B), 1.0 (C), 2.0 (D), 5.0 (E) $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 72 h. Cells were harvested and fixed with ice-cold 70% ethanol, then treated with RNaseA 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ at 37°C for 30 min and stained with propidium iodide 20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ for 30 min. The DNA content of cells was analyzed with a EPICS Elite flowcytometer (Coulter, Hialeah, FL).

5 细胞凋亡 TUNEL 检测结果

细胞凋亡 DNA 的断裂也可通过 TUNEL 检测。它是将标记物质标记在凋亡细胞 DNA 断裂处的 3-OH 末端, 凋亡的细胞核染上深褐色, 而正常细胞无色。5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As_2O_3 处理 2 d 的 SGC7901 细胞, 出现有较多的凋亡细胞(图 5B)。

6 As_2O_3 对 SGC7901 细胞 c-myc 基因表达的影响

RT-PCR 时, 我们以结构基因 β -actin 作为内对照来衡量目的基因的表达。RT-PCR 分析显示, 通过与内对照比较, 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As_2O_3 处理 24 h 后, c-myc 基因的表达就明显下降, 48 h 后下降最为明显, 到 72 h 后表达又略有回升(图 6), 呈现有时间阶段性的降调节作用。

讨 论

本研究从体外观察了 As_2O_3 对胃腺癌

SGC7901 的生物学作用, 结果与文献^[3]报道的 As_2O_3 引起 APL NB4 细胞凋亡的结果一致, 即 As_2O_3 也可诱导 SGC7901 细胞的凋亡。

细胞凋亡是一种相对于细胞坏死的、主动的、程序化的细胞死亡形式。它在胚胎发生、器官发育、变态作用和保存机体自身稳定过程中发挥重要作用^[8]。有人认为当细胞生长和细胞死亡的平衡被破坏时, 肿瘤就会发生^[9]。现已发现许多因素包括不少化疗药物^[10]均可引起肿瘤细胞凋亡。细胞凋亡为肿瘤治疗提供了新思路 and 靶点。本研究证实 As_2O_3 能明显诱导 SGC7901 细胞凋亡, 一方面提示 As_2O_3 有可能成为新的治疗胃腺癌的细胞凋亡诱导剂, 另一方面也为深入研究 As_2O_3 治疗胃腺癌的机制提供了途径。

在 1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ As_2O_3 作用 2 d 后, 即可诱导 SGC7901 细胞凋亡, 这十分接近 As_2O_3 作用 NB4

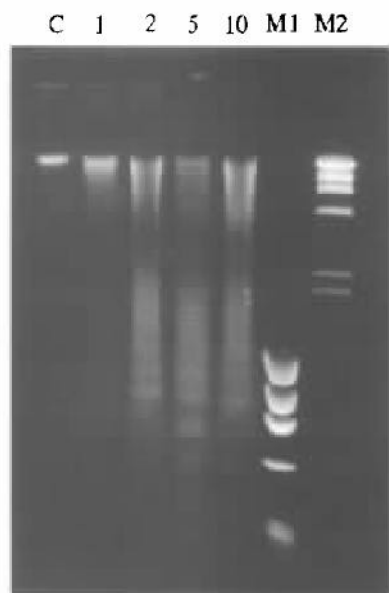


Fig 4 Detection of DNA ladder in As_2O_3 treated SGC7901 cells. Cells were exposed to indicated concentrations of As_2O_3 or vehicle for 48 h. DNA was extracted and analyzed with 1% agarose gel and photographed under ultraviolet lamp. C. Control; 1. As_2O_3 $1 \mu mol \cdot L^{-1}$; 2. As_2O_3 $2 \mu mol \cdot L^{-1}$; 5. As_2O_3 $5 \mu mol \cdot L^{-1}$; 10. As_2O_3 $10 \mu mol \cdot L^{-1}$. DNA marker, M_1 . Φx DNA/Hae III; M_2 . λ -DNA/Hind III.

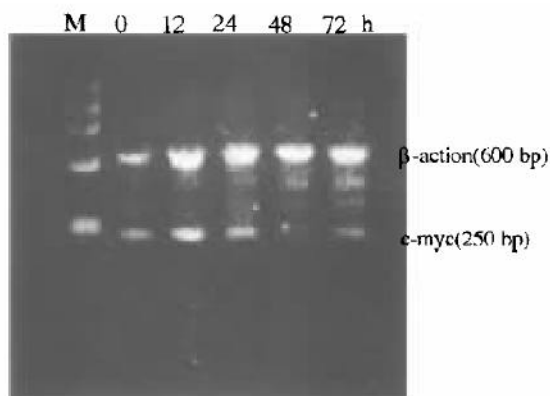


Fig 6 Semiquantitative RT-PCR analysis of c-myc gene expression with oligonucleotide primer specific for c-myc in $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ As_2O_3 treated SGC 7901 cells for 0 ~ 72 hours. β -Actin was simultaneously amplified as an internal control for RNA loading. After 25 cycles, the PCR products were put onto a 1.8% agarose gel electrophoresis. Molecular marker (M), Φx 174 DNA/Hae III.

细胞的剂量($0.25 \sim 2 \mu mol \cdot L^{-1}$)^[3], 当 As_2O_3 浓度增加到 $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ 时, 诱导凋亡更明显, 这个浓度在治疗 APL 病人 As_2O_3 的血浆峰值浓度($4.2 \sim 6.7 \mu mol \cdot L^{-1}$) 以内^[3]。由此可以推测, 临床使用治疗

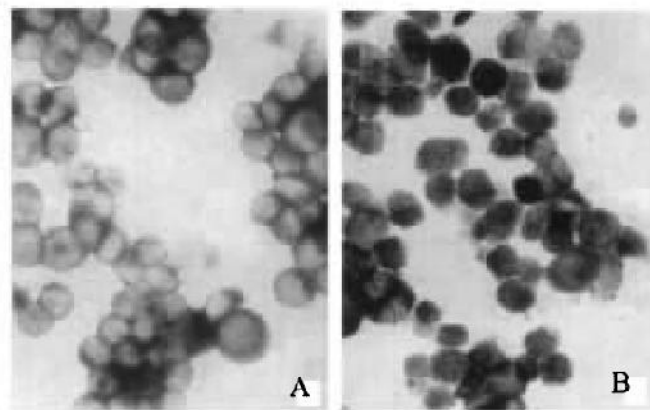


Fig 5 Detection of DNA strand breaks by As_2O_3 in SGC7901 cells by TUNEL assay performed according to the instruction of In Situ Cell Death Detection Kit (Boehringer Mannheim) ($200 \times$). A. Untreated SGC 7901 cells (control); B. SGC7901 cells treated with As_2O_3 ($5 \mu mol \cdot L^{-1}$) for 2 days.

APL 的 As_2O_3 剂量, 也有可能对胃腺癌有效。

c-myc 原癌基因编码的蛋白是 DNA 结合的转录因子, 它是促进细胞增殖的重要基因之一^[11], 是一个与细胞增殖、分化、转化和凋亡相关的调节子^[12]。尽管有许多证据表明, c-myc 基因还具有与其促进细胞增殖相反的功能, 即诱导细胞凋亡^[13]。而我们的实验结果表明 As_2O_3 能降低 SGC7901 细胞中 c-myc 基因的表达, 这与抑制 c-myc 基因的表达引起细胞凋亡的国际上的报道相符合^[14]。我室赵晓航^[15]发现, 当 c-myc 表达急剧下降时, 可引起食管癌细胞凋亡, 这也与我们的观察相一致。因此我们认为 As_2O_3 对 c-myc 基因的降调节, 可能是其导致 SGC7901 细胞凋亡的机制之一。另外, 本文还发现 $5 \mu mol \cdot L^{-1}$ As_2O_3 处理 24 h 后, c-myc 基因的表达就开始下降, 而此时凋亡细胞并不多, 48 h 后下降最为明显, 到 72 h 后表达又略有回升, 表明 c-myc 基因可能在本凋亡过程前期发挥的作用更为重要。

参 考 文 献

- 1 孙洪德, 马玲, 胡晓晨, 等. 癌灵 1 号结合中医辨证治疗急性早幼粒白血病 32 例. 中国中西医结合杂志, 1992, 12: 170
- 2 张鹏, 王树叶, 胡必虎, 等. 三氧化二砷注射液治疗 72 例急性早幼粒白血病. 中华血液学杂志, 1996, 17: 58
- 3 Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. *In vitro* studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) induced NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR2/PML

- proteins. *Blood*, 1996, **88**:1052
- 4 李振. 恶性肿瘤的化学化疗与免疫治疗. 北京: 人民卫生出版社, 1994. 298
 - 5 Carmichael J. Chemosensitivity testing of human lung cancer cell lines using the MTT assay. *Br J Cancer*, 1985, **57**:540
 - 6 Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, *et al.* A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991, **139**:271
 - 7 Hermann M, Lorenz HM, Voll R, *et al.* A rapid and simple method for the isolation of apoptotic DNA fragments. *Nucleic Acids Res*, 1994, **22**:5506
 - 8 Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*, 1995, **267**:1445
 - 9 Wyllie AH. Apoptosis and carcinogenesis. *Eur J Cell Biol*, 1997, **73**:189
 - 10 Cotter TG, Glynn JM, Echeverri F, *et al.* The induction of apoptosis by chemotherapeutic agents occurs in all phase of the cell cycle. *Anticancer Res*, 1992, **12**:773
 - 11 Foley KP, McArthur GA, Queva C, *et al.* Targeted disruption of the MYC antagonist MAD1 inhibits cell cycle exit during granulocyte differentiation. *EMBO J*, 1998, **17**:774
 - 12 Evan G. Cancer-a matter of life and cell death. *Int J Cancer*, 1997, **71**:709
 - 13 Shim H, Chun YS, Lewis BC, *et al.* A unique glucose dependent apoptotic pathway induced by c-myc. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**:1511
 - 14 Van Waardenburg RCAM, Meijer C, Burger H, *et al.* Effects of an inducible anti-sense c-myc gene transfer in a drug-resistant human small-cell-lung carcinoma cell line. *Int J Cancer*, 1997, **73**:544
 - 15 赵晓航, 王秀琴, 彭仁玲, 等. C-myc 反义 RNA 特异性诱发食管癌细胞程序性死亡. 中国科学(B辑), 1993, **23**:1185

ARSENIC TRIOXIDE INDUCES PROGRAMMED CELL DEATH OF HUMAN GASTRIC ADENOCARCINOMA SGC7901 CELLS AND DECREASES C-MYC GENE EXPRESSION

Deng Youping(Deng YP)¹, Lin Chen(Lin C)^{*}, Zhang Xueyan(Zhang XY),
Chen Dequan(Chen DQ), Xiao Peigen(Xiao PG)¹ and Wu Min(Wu M)

(National Laboratory of Molecular Oncology, Cancer Institute, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100021; ¹Institute of Medicinal Plants, Chinese Academy of Medical Sciences and Peking Union Medical College, Beijing 100094)

ABSTRACT AIM: To study the biological effect of As₂O₃ on human gastric adenocarcinoma SGC7901 cells and its mechanisms. **METHODS:** MTT reduction assay, morphology investigation, flow cytometry analysis, DNA gel electrophoresis and *In situ* cell death detection (TUNEL), semiquantitative RT-PCR were adopted. **RESULTS:** As₂O₃ inhibited the survival of SGC7901 cell line. The cells treated with As₂O₃ showed a typical apoptotic morphology and hypodiploid peak before G1 phase. DNA of the treated SGC7901 cells appeared a ladder pattern characteristic of apoptosis. TUNEL detection analysis also revealed DNA fragmentation. Moreover, As₂O₃ decreased the c-myc gene expression. **CONCLUSION:** As₂O₃ can induce programmed death of SGC7901 cells mainly via down regulation of c-myc gene expression.

KEY WORDS arsenic trioxide; human gastric adenocarcinoma; SGC7901 cells; programmed cell death; c-myc gene expression