

[文章编号 1000-1182(2005)05-0442-03

三氧化二砷对舌鳞癌细胞凋亡及 端粒酶逆转录酶基因的作用

姚 华¹, 吴求亮¹, 王慧明¹, 范 骏²

(1. 浙江大学医学院附属第一医院 口腔中心; 2. 传染病研究所, 浙江 杭州 310003)

[摘要] 目的 研究三氧化二砷(As_2O_3)对舌鳞癌细胞株(Tca8113)增殖的影响及对端粒酶逆转录酶基因(hTERT mRNA)的作用,并初步探讨三氧化二砷的作用机制。方法 以舌鳞癌细胞株(Tca8113)为研究对象,采用噻唑蓝(MTT)、Annexin V/碘化丙锭(PD)染色法检测细胞生长抑制率和细胞凋亡率;采用 Western blot 检测细胞 hTERT 蛋白的表达;采用 RT-PCR 法检测细胞 hTERT mRNA 的表达情况。结果 As_2O_3 能够明显抑制 Tca8113 细胞增殖,诱导细胞凋亡,并有浓度、时间依赖性。5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组 72 h 细胞生长抑制率为 $83.40\% \pm 7.31\%$, 细胞凋亡率为 $26.40\% \pm 3.42\%$ 。 As_2O_3 能抑制 hTERT mRNA 的表达和翻译,随 As_2O_3 作用时间、浓度增加,细胞 hTERT mRNA 和蛋白表达减弱,各实验组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论 As_2O_3 可以明显抑制 Tca8113 细胞增殖,诱导舌癌细胞凋亡,并抑制端粒酶催化亚基基因的表达,诱导细胞凋亡和抑制 hTERT 转录和翻译可能是其作用机制之一。

[关键词] 三氧化二砷; 舌鳞癌细胞; 细胞凋亡; 端粒酶逆转录酶

[中图分类号] R 739.8 **[文献标识码]** A

Effects of Arsenic Trioxide on the Cell Apoptosis and hTERT mRNA of Human Tongue Cancer Cells YAO Hua¹, WU Qiu-liang¹, WANG Hui-ming¹, FAN Jun². (1. Dept. of Stomatology, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China; 2. Research Institute of Infectious Disease, The First Affiliated Hospital, College of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310003, China)

[Abstract] **Objective** To study the effects and its mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) on cell growth and human telomerase reverse transcriptase (hTERT) of human tongue cancer cells (Tca8113 cell line). **Methods** The growth inhibition rates of Tca8113 by various concentrations of As_2O_3 were detected by MTT method. Cell apoptosis was detected by FCM labeled with Annexin V-FITC. hTERT gene expression was detected by RT-PCR method. hTERT protein of Tca8113 cells was determined by Western blot assay. **Results** The results showed that As_2O_3 could inhibit the growth of Tca8113 effectively and apoptotic rate of Tca8113 cells was obviously increased in a dose and time-dependent manner. (83.40 ± 7.31) % cells treated with 5 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 were inhibited on 72 hour point, the early apoptosis rate reached on 26.40 % \pm 3.42 % at that time. Moreover hTERT mRNA and protein were decreased depended on the dose and time of As_2O_3 , mRNA expressions of hTERT in test groups were greatly lower than that of control group on 72 hour point. **Conclusion** It was suggested that As_2O_3 could significantly inhibit the growth of Tca8113 cells by inducing causing cell apoptosis and down-regulating the expression of hTERT mRNA gene and protein which might be one of its action mechanisms.

[Key words] arsenic trioxide; human tongue cancer cell lines; cell apoptosis; human telomerase reverse transcriptase

三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)是一种有毒制剂,近年来,人们有报道用其注射液治疗急性幼性白血病,有效率为 90.9%,复发和难治者有效率达 64.2%,且副作用较小,与全反式维甲酸无交叉耐药,但其作用机制尚在深入探讨之中。本研究通过观察 As_2O_3 对舌癌细胞株 Tca8113 的作用,并检测 As_2O_3

对 Tca8113 细胞端粒酶逆转录酶(human telomerase reverse transcriptase, hTERT)蛋白和 mRNA 的影响,初步探讨其影响舌鳞癌细胞增殖的作用机制。

1 材料和方法

1.1 主要试剂

三氧化二砷(As_2O_3)注射液(哈尔滨医达公司产品),RPMI1640 培养基、Trizol 试剂(Gibco 公司,美国),10%小牛血清(杭州四季青生物工程公司),Annexin V-FITC (Beckman Coulter Immunotech 公司,美

[收稿日期 2005-02-05; 修回日期 2005-06-21

[基金项目]浙江省卫生厅资助项目(2003B058)

[作者简介]姚 华(1973-),女,浙江人,主治医师,博士

[通讯作者]姚 华, Tel: 13588722681

国), MTT(噻唑蓝染色)(Sigma公司,美国), 蛋白预染 Marker、兔一抗和羊抗兔二抗(HRP-linked antibody)(Cell Signaling公司,美国), hTERT抗体(Santa Cruz公司,美国)。

1.2 细胞培养和实验分组

Tca8113细胞购自上海第二医科大学口腔医学院, 采用含10%小牛血清的RPMI1640培养基在37℃, 95%CO₂ 保湿孵箱中培养。3d换液传代一次。取对数生长期的细胞接种于培养瓶或培养板内, 随机分成对照组(培养基代替As₂O₃)和实验组(As₂O₃浓度为1、3、5 μmol/L)用于实验。

1.3 Tca8113细胞生长抑制检测

采用MTT法检测Tca8113生长抑制率。将Tca8113细胞以每毫升5 × 10⁴个浓度接种于96孔板, 每孔200 μl。第2天, 分别按As₂O₃浓度0、1、3、5 μmol/L加入每孔, 每组3孔。于加药后第24、48、72 h分别加入5 g/L MTT溶液20 μl培养4 h, 加入200 μl DMSO, 置酶联检测仪检测波长570 nm的吸光度OD值, 每孔测3次, 计算各组均值。并按下列公式计算生长抑制率, 生长抑制率 = (未处理组OD值 - 处理组OD值) / 未处理组OD值 × 100%。

1.4 Tca8113细胞凋亡检测

采用流式细胞仪Annexin V-FITC和碘化丙锭染色法检测细胞凋亡率。收集细胞, 加入5 μl Annexin V及5 μl 碘化丙锭(250 mg/L), 混匀, 置冰浴暗处10 min, PBS洗2次, 上流式细胞仪检测。所有资料经Cellquest 1.2软件分析。

1.5 Tca8113细胞hTERT蛋白检测

采用Western blot检测Tca8113细胞hTERT蛋白表达。同时检测-actin含量, 以确保各蛋白加入量相同。离心收集细胞, 加入100 μl 预冷的蛋白裂解液, 冰上放置30 min, 于4℃条件下使细胞充分裂解, 12 000 g 4℃离心2 min, 提取细胞总蛋白。Bradford比色法测蛋白浓度。12% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳: 积层胶电压90 V, 分离胶电压160 V。电泳结束后转膜2 h, 电流200 mA。转膜结束后, 硝酸纤维素膜置入TBST缓冲液中短暂漂洗后, 放入封闭液中温和振荡2 h(4℃)。把膜放入1:1 000稀释的一抗中, 温和振荡1 h(4℃)后置4℃冰箱中过夜。温和振荡(4℃)2 h, 回收一抗后在TBST液中洗膜30 min, 中间更换TBST液2~3次, 分别把膜置于1:2 000稀释的二抗(HRP标记的抗兔IgG)中温和振荡1.5 h。在TBST中洗膜30 min, 中间换液2~3次。曝光、显影及定影, 洗片, 扫描。

1.6 Tca8113细胞hTERT mRNA检测

采用逆转录-聚合酶链反应(reverse transfection-

PCR, RT-PCR)法检测Tca8113细胞hTERT mRNA。细胞总RNA提取按Trizol试剂盒说明操作步骤进行。所得RNA用紫外分光光度仪测定纯度(OD_{260 nm}/OD_{280 nm} > 1.8), 同时进行RNA定量。取RNA 2 μg, 加随机引物3 μl, 用双蒸水加至11 μl, 70℃孵育5 min后, 冰上振荡, 在冰上依次加入下列试剂: 5 × reaction buffer 5 μl, 10 mmol/L dNTP混合物2 μl, 双蒸水加至19 μl, 加入200 U(1 μl)逆转录酶, 42℃处理60 min, 70℃处理10 min, 停止反应, 放置冰上。取上述逆转录后的cDNA 2 μl在冰上按下列顺序依次加入: 双蒸水13.2 μl, MgCl₂ 2 μl, 10 × buffer 2.5 μl, dNTP混合物1 μl, 上游引物1 μl, 下游引物1 μl, cDNA 2 μl, Taq聚合酶0.3 μl。PCR反应, 94℃ 60 s, 57℃ 45 s, 45℃ 45 s, 72℃ 10 min, 4℃终止, hTERT共36个循环, 内参-actin 24个循环。hTERT(207 bp): 上游引物5'-GCTGATCCAAATGCTTTTC-3', 下游引物5'-GGACCCAGGGGTTGGCTGF-3'。-actin(531 bp): 上游引物5'-TGAAGTGTGACGTGGACATC-3', 下游引物5'-TCATAGTCCGCCTAGAAGCA-3'。取4 μl扩增产物在1.5%琼脂糖凝胶电泳, 置凝胶成像仪中进行条带吸光度定量分析, 计算hTERT半定量值, 每组重复实验6次。引物由上海生物工程公司合成。

1.7 统计学处理

收集数据, 所有资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用SPSS 11.0统计软件, 各时间点比较采用单因素方差分析ANOVA检验, 以P < 0.05为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 As₂O₃对Tca8113细胞生长的影响

As₂O₃对Tca8113细胞生长的影响见图1, 由图1可见, As₂O₃对Tca8113细胞有良好的生长抑制作用, 并且呈现出随剂量、时间增加, Tca8113细胞生长抑制率明显升高。As₂O₃在3 μmol/L浓度作用48 h后细胞生长抑制率达43.70% ± 5.62%, 达到临床化疗药物敏感标准即30%以上。5 μmol/L作用72 h后有83.40% ± 7.31%细胞生长受抑制。

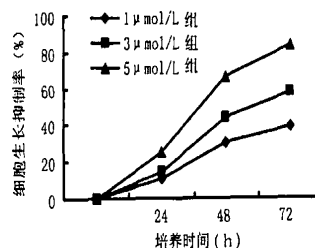


图1 As₂O₃对Tca8113细胞增殖的抑制作用

Fig 1 The inhibiting effect of As₂O₃ on proliferation of Tca8113 cell lines

2.2 As₂O₃ 对 Tca8113 细胞凋亡的影响

随着 As₂O₃ 作用浓度增加和时间延长,细胞出现一系列形态学改变。倒置显微镜下对照组细胞伸展性好,界限清楚,胞质均匀,核大而清楚,核仁清晰,贴壁致密。1 μmol/L 细胞胞浆颗粒增多。5 μmol/L 组细胞大量浮起,出现明显的发泡现象,细胞间连接变为松散,多孤立。Annexin V-FITC 流式细胞术检测到细胞早期凋亡率逐渐升高(表 1)。但单用碘化丙啶法在低浓度组 48 h 内未见亚 G₁ 峰,在高浓度组 48 h 后可见到较明显的特征性凋亡峰。

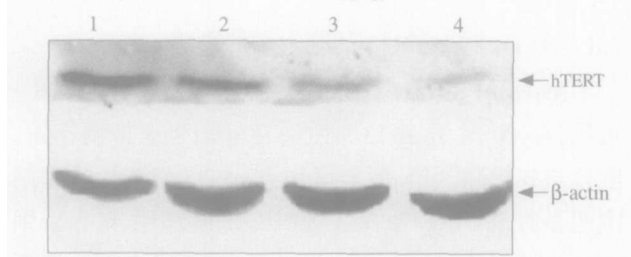
表 1 各组细胞在不同时间下细胞凋亡率比较(%, $\bar{x} \pm s$)

作用时间(h)	药物浓度(μmol/L)			
	0	1	3	5
24	1.00 ± 0.31	3.86 ± 0.25	4.95 ± 0.91 *	8.54 ± 0.05 *
48	1.21 ± 0.08	5.56 ± 0.65 *	7.68 ± 0.89 *	17.53 ± 0.26 *
72	2.36 ± 0.21	7.89 ± 0.94 *	15.91 ± 0.17 *	26.40 ± 3.42 *

注:与相应对照组(0 μmol/L)相比, * P < 0.05

2.3 As₂O₃ 对 Tca8113 细胞 hTERT 蛋白表达的影响

Western blot 检测各组 As₂O₃ 作用 72 h 细胞 hTERT 蛋白表达见图 2,由图 2 可见,细胞经 As₂O₃ 处理 72 h 后,1 μmol/L、3 μmol/L 及 5 μmol/L 组 hTERT 蛋白表达呈逐渐下降趋势,明显弱于对照组 0 μmol/L 蛋白表达量。



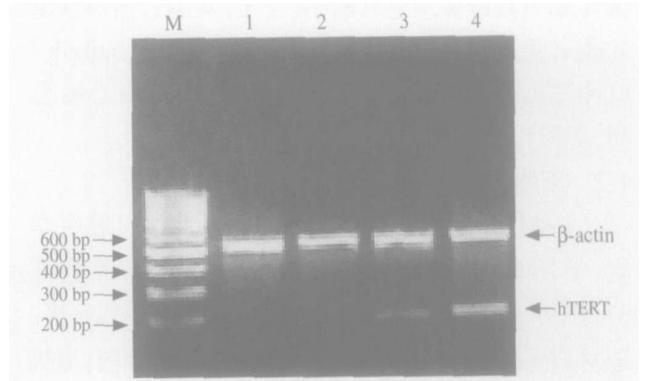
1:0 μmol/L 组; 2:1 μmol/L 组; 3:3 μmol/L 组; 4:5 μmol/L 组

图 2 Western blot 检测各组 As₂O₃ 作用 72 h 细胞 hTERT 蛋白表达

Fig 2 Detection of hTERT protein treated with As₂O₃ for 72 hours

2.4 As₂O₃ 对 Tca8113 细胞 hTERT mRNA 的影响

RT-PCR 结果显示,As₂O₃ 处理 48 h 开始,Tca8113 细胞 hTERT mRNA 出现表达减弱;As₂O₃ 处理 72 h 后,0 μmol/L、1 μmol/L、3 μmol/L 及 5 μmol/L 组 hTERT mRNA 与内参照比值分别为 0.75 ± 0.08,0.55 ± 0.05,0.38 ± 0.04,0.26 ± 0.10(图 3)。经方差分析,5 μmol/L、3 μmol/L、1 μmol/L 组与对照组(0 μmol/L)差异均有统计学意义(P < 0.05)。



M:DNA Marker; 1: 5 μmol/L 组; 2:3 μmol/L 组; 3:1 μmol/L 组; 4:0 μmol/L 组

图 3 各组 As₂O₃ 作用 72 h 细胞 hTERT mRNA 表达情况

Fig 3 The expression of hTERT mRNA treated with As₂O₃ for 72 hours

3 讨论

三氧化二砷是人类最早用于治疗恶性肿瘤的化学药物之一。砷剂治疗血液及其他实体肿瘤取得了实效,它是通过下调 bcl-2 基因、降解 PML/RAB 蛋白和 reactive oxygen species 诱导凋亡等途径实现的¹⁻³。端粒酶是细胞内一种特殊的核糖核蛋白复合体,与细胞周期调控密切相关,端粒酶活性也受 bcl-2、c-myc 等转录子的作用。端粒酶催化亚基是端粒酶的三大组分之一,并且是其活化的限速步骤,是细胞逃避凋亡得以永生的动力⁴。端粒酶催化亚基无论作为肿瘤的特异性标记,还是抗癌基因治疗的靶点,均是一个具有应用前景的后选因子。本研究用 1、3、5 μmol/L 浓度 As₂O₃ 作用于 Tca8113 细胞,结果表明,抑制细胞增殖和诱导凋亡具有时间、浓度依赖性。这同三氧化二砷对实体癌研究结果相同⁵。本研究还发现,单用 PI 法只在 As₂O₃ 作用 48 h 以后才检测到细胞凋亡现象,但 Annexin/PI 法 24 h 开始就发现有 5% 以上细胞出现凋亡,较对照组升高。可能是因为凋亡发生早期,细胞膜上磷脂酰丝氨酸从膜内转到膜外,Annexin V 与暴露的磷脂酰丝氨酸结合,这时候,DNA 断裂还没有发生。因此,PI 法在药物作用第 3 天时才检测到凋亡标志峰亚 G₁ 峰,Annexin/PI 法更敏感。

端粒酶参与了细胞凋亡已成为共识,由于端粒酶催化亚基对端粒酶活化的重要性,能够抑制 hTERT 基因启动子的因子都可导致端粒酶的失活。研究证实⁶,hTERT 下调先于端粒酶活性下降,一旦 hTERT 转录抑制,细胞端粒酶将得不到有效活化,细胞由 caspase 途径或 P21/P53 引发进入凋亡。As₂O₃ 有效抑制了白血病细胞端粒酶活性,可能是临床治疗急性早幼粒细胞白血病的机制之一⁴。本研究发现,As₂O₃

度的靶向性;AUC值是代表组织在某一段时间内吸收药物程度的量化指标,本实验组中癌组织的AUC值是对照组的10.36倍,这进一步证实了该隐形顺铂纳米系统对口腔癌具有高度的靶向性。

[参考文献]

- 1] Kawashima Y. Nanoparticulate systems for improved drug delivery J. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 47(1): 1-2.
- 2] Kumaresh S, Tejjraj M, Anand Rao R, et al. Biodegradable polymeric nanoparticles as drug delivery devices J. *J Control Release*, 2001, 70(1): 1-4.
- 3] 杨凯,温玉明,李龙江,等. 颈淋巴结靶向葫芦素BE聚乳酸纳米微粒冻干针剂的研制 J. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19(6): 347-350.
(Yang K, Wen YM, Li LJ, et al. Preparation of cucurbitacinBE poly(lactic acid) nano-particles for targeting cervical lymph nodes J. *West China J Stomatology*, 2001, 19(6): 347-350.)
- 4] 杨凯,温玉明,李龙江,等. 颈淋巴结靶向葫芦素BE聚乳酸纳米微粒的急性毒性和局部刺激实验研究 J. *华西口腔医学杂志*, 2001, 19(6): 380-382.
(Yang K, Wen YM, Li LJ, et al. Acute toxicity and local stimulate test of cucurbitacinBE poly(lactic acid) nano-particles of targeting cervical lymph nodes J. *West China J Stomatology*, 2001, 19(6): 380-382.)
- 5] 杨凯,温玉明,王昌美,等. 葫芦素BE聚乳酸纳米微粒对口腔癌颈淋巴结转移灶靶向治疗的应用研究 J. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(6): 447-450.
(Yang K, Wen YM, Wan CM, et al. Clinical application of anticancer

nanoparticles targeting metastasis foci of cervical lymph nodes in patients with oral carcinoma J. *West China J Stomatology*, 2003, 21(6): 447-450.)

- 6] 杨凯,温玉明,王昌美,等. 葫芦素BE聚乳酸纳米微粒对口腔癌颈淋巴结转移灶的靶向性评价 J. *华西口腔医学杂志*, 2003, 21(6): 477-480.
(Yang K, Wen YM, Wan CM, et al. The study of cucurbitacinBE poly(lactic acid) nanoparticles delivering cucurbitacinBE to metastasized cervical lymph nodes in mice with oral cancer J. *West China J Stomatology*, 2003, 21(6): 477-480.)
- 7] Peracchia MT, Fattal E, Desmaele D, et al. Stealth PEGylated polycyanoacrylate nanoparticles for intravenous administration and splenic targeting J. *J Control Release*, 1999, 60(1): 121-128.
- 8] Gref R, Quellec P, Sanchez A, et al. Development and characterization of CyA-loaded poly(lactic acid)-poly(ethylene glycol) PEG micro- and nanoparticles, comparison with conventional PLA particulate carriers J. *Eur J Pharm and Biopharm*, 2000, 51(2): 111-118.
- 9] 李龙江,温玉明,王昌美. 颊癌微血管分支类型的动物实验研究 J. *华西口腔医学杂志*, 1996, 14(2): 79-82.
(Li LJ, Wen YM, Wan CM. The animal experimental study of microvascular branching in buccal carcinoma J. *West China J Stomatology*, 1996, 14(2): 79-82.)
- 10] Yuan F, Dellian M, Fukumura D, et al. Vascular permeability in a human tumor xenograft: Molecular size dependence and cutoff size J. *Cancer Res*, 1995, 55(17): 3752-3756.
- 11] Anna M, Edgardo M, Alexei B, et al. Tumoral distribution of long-circulating dextran-coated iron oxide nanoparticles in a rodent model J. *Radiology*, 2000, 214(2): 568-576.

(本文编辑 汤亚玲)

(上接第444页)

能下调 Tca8113 细胞中端粒酶催化亚基 mRNA 基因的表达和翻译。端粒酶催化亚基 mRNA 和端粒酶在 Tca8113 细胞、口腔鳞癌中均高表达,正常口腔黏膜无表达⁷。由此,可以设想,诱导细胞凋亡、抑制口腔鳞癌端粒酶催化亚基表达是 As₂O₃ 作用于 Tca8113 细胞的机制之一。有几种可能: As₂O₃ 直接抑制 hTERT 基因, hTERT 下降参与细胞凋亡。As₂O₃ 通过抑制细胞凋亡相关基因如 c-myc, 间接下调 hTERT, 因为 c-myc 能与 hTERT 启动子结合, 促进 hTERT 转录。在一些因素作用下, hTERT 下调与凋亡同时发生, 加速细胞衰竭, 死亡, 这还需进一步研究。

综上所述, 本研究表明, As₂O₃ 能抑制 Tca8113 细胞增殖, 诱导其凋亡, 还能抑制端粒酶催化亚基基因的转录和翻译。这也为针对端粒酶的肿瘤治疗提供了实验资料。As₂O₃ 不但能通过诱导细胞凋亡治疗口腔肿瘤, 还可作为针对 hTERT 治疗肿瘤的药物。

[参考文献]

- 1] Fei G, Jing YI, Jing QY, et al. The cell cycle related apoptotic sus-

ceptibility to arsenic trioxide is associated with the level of reactive oxygen species J. *Cell Res*, 2004, 14(1): 81-85.

- 2] Liu P, Han ZC. Treatment of acute promyelocytic leukemia and other hematologic malignancies with arsenic trioxide: Review of clinical and basic studies J. *Int J Hematol*, 2003, 78(1): 32-39.
- 3] Tong Q, Zeng F, Zhu Z, et al. Preliminary study of the *in vitro* growth inhibition of human bladder cancer cell line BIU-87 by arsenic trioxide J. *J Tongji Med Univ*, 2000, 20(2): 112-115.
- 4] 王韞芳,孙红炎,李昕全,等. 三氧化二砷对 NB4 及 Jurkat 细胞系端粒酶活性的抑制效应 J. *中国实验血液学杂志*, 2003, 1(4): 359-362.
(Wang YF, Sun HY, Wang QL, et al. Inhibiting effect of arsenic trioxide on telomerase activity of NB4 and Jurkat cell lines J. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*, 2003, 11(4): 359-362.)
- 5] Miller WH Jr. Molecular targets of arsenic trioxide in malignant cells J. *Oncologist*, 2002, 7(Suppl 1): 14-19.
- 6] Janknecht R. On the road to immortality: hTERT upregulation in cancer cells J. *FEBS Lett*, 2004, 564(1-2): 9-13.
- 7] 姚华,吴葆萱,吴求亮. 口腔鳞癌和癌前病变中端粒酶活性检测和意义 J. *中华口腔医学杂志*, 1999, 34(6): 328-330.
(Yao H, Wu BX, Wu QL. Study and detection of telomerase activity in oral squamous cell carcinomas and precancerous lesions J. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 1999, 34(6): 328-330.)

(本文编辑 汤亚玲)