·论著·

DOI: 10.3779/j.issn.1009-3419.2000.06.10

三氧化二砷对人肺癌细胞株增殖和凋亡的影响

董继华　吴裕丹　董晓荣　许林锋　刘莉

【摘要】 目的　探讨三氧化二砷(As_2O_3)对人肺癌的潜在性治疗作用及可能的机制。方法　选用人肺癌细胞株 GLC-82,运用细胞培养法、MTT 法、流式细胞术(FCM)检测细胞生长曲线、细胞增殖、细胞周期和细胞凋亡。结果　三氧化二砷可明显抑制 GLC-82 细胞的增殖,其抑制作用具有时—效和量—效关系。当 4.0 μmol/L 三氧化二砷处理 GLC-82 细胞 96 小时,增殖抑制率达 81.05%。FCM 检测肿瘤细胞 DNA 含量,观察到三氧化二砷使 GLC-82 细胞周期阻滞于 G_2/M 期,细胞周期进程变慢,同时出现剂量依赖性亚 G_1 峰。结论　三氧化二砷能有效地抑制人肺癌细胞株 GLC-82 的增殖,其可能的机制与三氧化二砷使细胞阻滞于 G_2/M 期并诱导其凋亡有关。

【关键词】 三氧化二砷　肺癌　GLC-82 细胞　凋亡

【中图分类号】 R734.2

Cell cycle arrest and apoptosis induced by arsenic trioxide in human lung cancer cell line

DONG Jihua, WU Yudan, DONG Xiaorong, XU Lingfeng, LIU Li. Department of Center Laboratory, Union Hospital, Tongji Medical University, Wuhan, Hubei 430022, *P. R. China*

【**Abstract**】 **Objective**　To explore the potential therapeutic effect of arsenic trioxide(As_2O_3) on human lung cancer. **Methods**　Cell growth curves, cell proliferation, cell cycle and apoptosis of human lung cancer cell line GLC-82 were detected by the MTT method and flowcytometry (FCM). **Results**　The data showed that As_2O_3 significantly inhibited proliferation of GLC-82 cells and the inhibiting effects had a dose-and time-dependence. The cell proliferation inhibition rate was 81.05% when treated with 4.0 μmol/L As_2O_3 for 96 hours. The change of DNA content of GLC-82 cells indicated that As_2O_3 was able to block cell cycle progress in G2/M phase, with appearance of sub-G1 peak in a dose-dependent manner. **Conclusion**　As_2O_3 can effectively inhibit the proliferation of human lung cancer cell line GLC-82 and the possible mechanisms may be related to G2/M phase arrest and apoptosis induced by As_2O_3.

【**Key words**】 Lung neoplasms　GLC-82 cell　Apoptosis　Arsenic trioxide

肺癌是我国发病率和死亡率最高的恶性肿瘤,人们都在努力寻找新的抗癌制剂或化疗方案以期提高肺癌的治愈率。近年来,有关三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)能有效治疗急性早幼粒白血病(APL)且无严重毒副作用及骨髓抑制的报道引起人们对 As_2O_3 治疗其它恶性肿瘤的浓厚兴趣[1]。目前,As_2O_3 对实体癌尤其是肺癌有作用国内外研究很少[2]。本研究观察了 As_2O_3 对人肺癌细胞株 GLC-82 在体外增殖状况的影响,以探讨药物治疗肺癌的新途径。

1　材料和方法

1.1　材料　人肺癌细胞株 GLC-82 由昆明医学院肿瘤所建立[3]。纯 As_2O_3 试剂购自 Sigma 公司(Lot A1010)。用 PBS 配成 1 mmol/L 的 As_2O_3 贮藏液,使用时用 PBS 稀释成所需浓度。四甲基偶氮唑兰(MTT)为 Fluke 产品,用 PBS 稀释成 12 mmol/L,过滤除菌,4℃避光保存,其它试剂均为国内生化厂家产品。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞生长曲线测定　采用培养细胞计数法。取对数生长期的 GLC-82 细胞,以 1×10^5/ml 接种于小培养瓶,37℃培养 24 小时后分别加入终浓度为 0、0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L 的 As_2O_3,培养 24、48、72、96 小时,用台酚兰染色鉴定细胞成活率并计数,所有实验重复三次。

1.2.2　细胞增殖抑制实验　采用 MTT 法。取对数生长期的 GLC-82 细胞,以 1×10^5/ml 接种于 96 孔培养板,每孔 100 μl,待细胞贴壁后分别加入终浓度 0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L 的 As_2O_3 液,每组设 5 个复孔,并设空白对照组。置 37℃、5% CO_2 条件下培养至 24、48、

作者单位:430022　武汉,同济医科大学附属协和医院中心实验室

72、96 小时，每孔加入 MTT 20 μl，继续培养 4 小时，弃去上清，每孔加 DMSO 100 μl，振荡至结晶溶解，酶标仪 570 nm 波长处测定吸光度值。抑制率(%) = (1 - 实验组平均吸光度值/对照组平均吸光度值) × 100%。

1.2.3 细胞周期和细胞凋亡的检测 采用流式细胞仪(FCM)分析。经 As_2O_3 处理后的细胞用 0.25% 胰蛋白酶消化成单个细胞，用 70% 乙醇固定 24 小时后，加入 RNase 及碘化丙啶，用流式细胞仪(Becton Dickson 公司)进行 DNA 含量和细胞周期分析，所用软件为 CELLQEST。

2 结果

2.1 As_2O_3 对 GLC-82 增殖的影响 图 1 显示 As_2O_3 对 GLC-82 细胞具有生长抑制作用，且其作用随药物浓度的提高、作用时间的延长而增强，当 4.0 μmol/L As_2O_3 处理 GLC-82 细胞 96 小时，增殖抑制率达 81.05%。

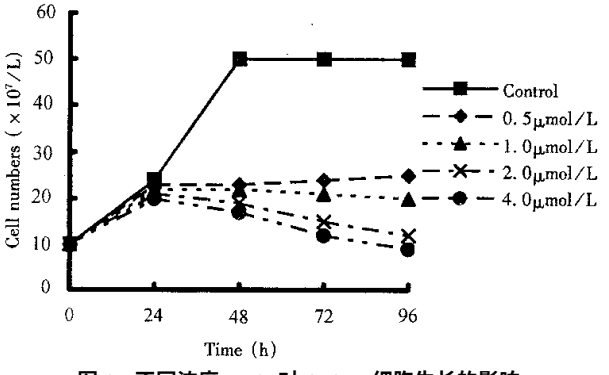

图 1 不同浓度 As_2O_3 对 GLC-82 细胞生长的影响

Fig 1 Effect of different concentrations of As_2O_3 on growth of GLC-82 cell

2.2 MTT 检测 表 1 显示 As_2O_3 对 GLC-82 细胞具有极强的生长抑制作用，且随药物浓度的提高、作用时间的延长而增强。

表 1 As_2O_3 对 GLC-82 细胞的生长抑制率(%)

Tab 1 The growth inhibiting rate of As_2O_3 on GLC-82 cell(%)

Concentration	Treatment Time(h)			
	24	48	72	96
0.5 μmol/L	1.65	2.25	3.59	3.98
1.0 μmol/L	6.16	6.64	8.56	12.23
2.0 μmol/L	11.26	17.75	24.69	50.87
4.0 μmol/L	14.87	26.35	50.00	57.26

2.2.1 As_2O_3 对 GLC-82 细胞周期分布及凋亡指数(AI)的影响 As_2O_3 使细胞出现 G_2/M 期阻滞。表 2 显示，经 0.5、1.0、2.0、4.0 μmol/L 的 As_2O_3 处理细胞 96 小时，G_2/M 期细胞百分比由 11.88% 增至 47.32%，增加了 3.98 倍，且两者有显著性差异($P < 0.05$)。与之对应，G_0/G_1 期细胞随浓度增加而减少，而 S 期细胞百分比各组间无显著性差异。GLC-82 细胞凋亡率与 As_2O_3 的浓度呈正比，在 DNA 组方图上(图 2)，各 As_2O_3 作用组均可见凋亡标志的亚 G_1 峰。

表 2 As_2O_3 对 GLC-82 细胞周期和凋亡指数的影响

Tab 2 The effect of As_2O_3 on the cell cycle and apoptosis index of GLC-82 cell

As_2O_3	Percentage of cells in different cell cycles			AI value(%)
	G0/G1	S	G2/M	
Control	71.73	16.49	11.88	1.96
0.5 μmol/L	69.31	16.07	14.62	4.43
1.0 μmol/L	66.59	17.36	16.05	8.06
2.0 μmol/L	50.46	20.01	29.52	9.60
4.0 μmol/L	44.50	8.18	47.32	12.31

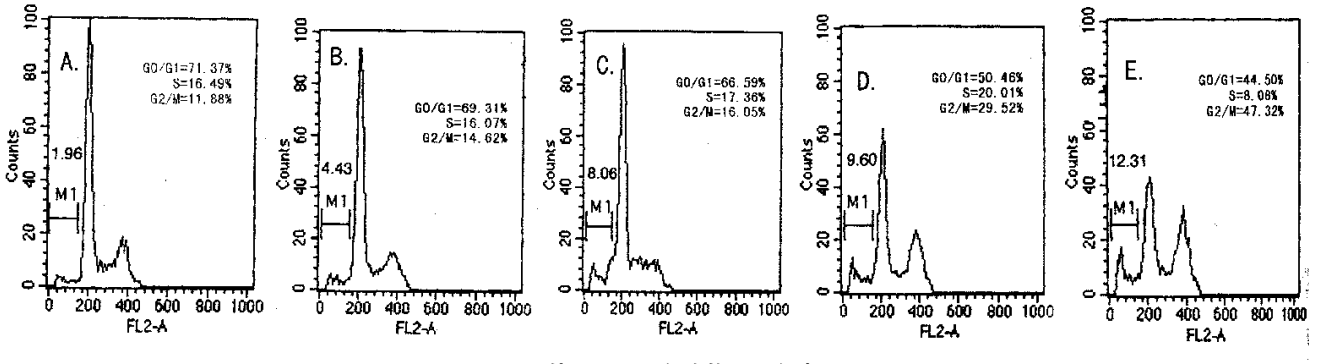

图 2 As_2O_3 处理 GLC-82 细胞的 DNA 组方图

M_1 值随 As_2O_3 剂量增大而增高。M_1 代表凋亡峰。A.对照组；B.0.5 μmol/L 组；C.1.0 μmol/L 组；D.2.0 μmol/L 组；E.4.0 μmol/L 组

Fig 2 DNA histograms of GLC-82 cells treated with As_2O_3

M1 value increased with As_2O_3 in a dose-dependent manner. M1 represented apoptosis (sub-G1) peak. A: control group; B: 0.5 μmol/L group; C: 1.0 μmol/L group; D: 2.0 μmol/L group; E: 4.0 μmol/L group.

3 讨论

祖国医学中,砷类的药用历史久远。几个世纪前,砷剂被人们广泛用于治疗多种疾病,包括肿块性疾病[1]。同时砷化合物也是一种致癌剂,它能诱导哺乳类动物细胞染色体异常,DNA－蛋白质相关的 DNA 降解,以及姐妹染色体交换[4]。哈尔滨医科大学应用中药'癌灵 1 号'及单药 As_2O_3 治疗急性早幼粒白血病的临床完全缓解率达 60%以上,最长缓解期超过 10 年,而且该药可静脉用药,毒付作用小,未见第二肿瘤发生。说明只要控制剂量、疗程,该药用于治疗肿瘤是切实可行的[1]。

我们在体外观察了 As_2O_3 对人肺癌细胞株 GLC-82 细胞增殖状况的影响。结果发现 As_2O_3 可明显抑制细胞的增殖,且增殖抑制作用随药物浓度增加、作用时间延长而增强,呈时间—浓度依赖性。由于 As_2O_3 为非脂溶性,分子量小,不同于目前临床上常规使用的抗癌药物,因而与其它药物产生交叉性耐药的可能性小。本实验所采用的浓度与文献中报道的治疗急性早幼粒白血病对应的有效体外浓度一致[1],提示临床上用于治疗 APL 的 As_2O_3 有效剂量也有可能适用于肺癌的临床运用。

肿瘤的特性之一是细胞周期异常,使肿瘤无限制地增殖,肿瘤治疗的中心环节是干扰肿瘤细胞的细胞周期,从而使肿瘤细胞增殖速率减慢或诱导细胞走向程序性死亡[5]。为了进一步探讨 As_2O_3 抑制 GLC-82 细胞增殖的可能机制,我们运用流式细胞术分析了经 As_2O_3 作用后的 GLC-82 细胞的细胞周期变化,发现 As_2O_3 能使 GLC-82 细胞周期进程停滞于 G_2/M 期,G_0/G_1 期细胞相应性减少。同时分析亚 G1 峰值变化趋势发现阻滞后的细胞被诱导走向凋亡,且这一变化趋势亦呈浓度依赖性。此作用机理也见于 As_2O_3 诱导急性白血病细胞系 HL-60、NB4 细胞凋亡中[6]。

综上所述,本研究结果显示 As_2O_3 可显著地抑制人肺癌细胞 GLC-82 的体外增殖,其机理可能与干扰细胞周期,诱导细胞凋亡有关。

参 考 文 献

1 张鹏,王树叶,胡龙虎.三氧化二砷注射液治疗急性早幼粒细胞白血病 72 例.中华血液学杂志,1996,17(2):58-60.

2 顾琴龙,沈佰华,李宁丽,等.氧化砷诱发胃癌细胞株凋亡的初步研究.中华消化杂志,1998,18(2):69-71.

3 梁达明,贾伟,胡美英,等.肺腺癌细胞系(GLC-82)的建立及其生物学特性.中华肿瘤杂志,1985,7(2):81-82.

4 Lerda D. Sister-chromatid exchange (SCE) among individuals chronically exposed to arsenic in drinking water. Mutat Res,1994,312(2):111-120.

5 吴裕丹. G_1/S 检测点调控与癌变. 国外医学血液及输血分册,1999,22(1):11-14.

6 陈国强,朱军,石学耕,等.氧化砷诱导早幼粒白血病细胞凋亡及其分子机制的初步研究.中华血液学杂志,1997,18(1):25-28.

(收稿:2000-06-01　　修回:2000-07-11)

(本文编辑　张世雯)