

细胞分化剂增强三氧化二砷诱导肝癌细胞的凋亡效应

刘建伟¹, 唐毅¹, 沈雁¹, 钟雪云², 区庆嘉³

(1. 暨南大学附属广州红十字会医院普外科, 广东 广州 510220; 2. 暨南大学医学院病理科, 广东 广州 510632;
3. 中山大学附属第二医院普外科, 广东 广州 510120)

摘要:【目的】探讨细胞分化剂(CDA-II)在三氧化二砷(As_2O_3)诱导肝癌细胞凋亡效应中的作用。【方法】应用CDA-II和 As_2O_3 共同处理肝癌细胞株BEL-7402、HepG2,通过四唑蓝比色法检测细胞存活率;用活细胞荧光染色观测细胞凋亡及形态学变化、流式细胞术分析细胞周期变化及凋亡率。【结果】CDA-II毒性作用很低,但可以显著增强 As_2O_3 对肝癌细胞生长的抑制作用,1.0 g/L CDA-II便可使 As_2O_3 对两株细胞的半数抑制浓度由 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 降低至 $1.0 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$)。形态学可观察到CDA-II明显加强了 As_2O_3 诱导的细胞凋亡,且与剂量有关;流式细胞术分析,低质量浓度的CDA-II ($< 2.0 \text{ g/L}$)细胞生长阻滞于 G_2 期较对照组多,而随着剂量的增加则凋亡细胞和滞留于 G_1 期的细胞增多,低剂量CDA-II与 As_2O_3 共同处理肝癌细胞后,凋亡率明显高于单独用 As_2O_3 。【结论】CDA-II可增强 As_2O_3 诱导肝癌细胞的凋亡效应,两药具有协同作用。

关键词: 癌, 肝细胞; 凋亡; 细胞分裂期; 生长抑制物; 三氧化二砷

中图分类号: R735.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-257X(2002)06-0423-04

Cell Differential Agent-II Potentiate Arsenic Trioxide-induced Apoptosis in Hepatoma cells LIU Jian-wei¹, TANG Yi¹, Shen Yan¹, ZHONG Xue-yun², OU Qing-jia³. (1. Department of General Surgery, Guangzhou Red Cross Hospital, Ji-nan University, Guangzhou 510220, China; 2. Department of Pathology, Medical College of Jinan University, Guangzhou 510632, China; 3. Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510120, China)

Abstract: 【Objective】 To illustrate the possible role of cell differential agent II (CDA-II) on the apoptosis of hepatoma cells induced by arsenic trioxide (As_2O_3). 【Methods】 Hepatoma cell lines BEL-7402 and HepG2 were treated with As_2O_3 together with CDA-II. Cell surviving fraction was determined by MTT assay; morphological changes were observed by immunofluorescence staining of Hoechst 33 258; cell cycle and the apoptosis index were determined by flow cytometry (FCM). 【Results】 Cytotoxicity of CDA-II is low. Nevertheless, CDA-II could strongly potentiate arsenic trioxide-induced apoptosis. At 1.0 g/L of CDA-II, IC_{50} of As_2O_3 on hepatoma cell lines was reduced from $5.0 \mu\text{mol/L}$ to $1.0 \mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$). The potentiation of apoptosis was dependent on the dosage of CDA-II. FCM study indicated that in hepatoma cell growth was inhibited by CDA-II at lower concentration ($< 2.0 \text{ g/L}$) primarily by arresting at S and G_2 phase, and at higher concentrations ($> 2.0 \text{ g/L}$) apoptotic cell and cell cycle arresting at G_1 phase increased proportionally. The combination of two drugs led to much higher apoptotic rates, compared to separate usage of either drug alone. 【Conclusion】 CDA-II can strongly potentiate As_2O_3 -induced apoptosis in hepatoma cells, and two drugs can produce a significant synergic effect.

Key words: carcinoma, hepatocellular; apoptosis; cell division phase; growth inhibitors; arsenic trioxide

三氧化二砷(As_2O_3)是近年新发现的凋亡诱导物,有研究证实其较某些化疗药物具有更强的诱导肝癌细胞凋亡效应,也有较强的细胞毒性和肿瘤细胞耐药性问题^[1]。人尿提取物细胞分化剂(CDA-II)具有较强的诱导肿瘤细胞分化和逆转化疗药耐药性的作用^[2],临床治疗晚期肝癌发现肝功能好转,症状明显改善有利于化疗^[3]。我们应用CDA-II和 As_2O_3 共同处理肝癌细胞,旨在探索细胞分化剂与三氧化二砷在诱导肝癌细胞凋亡效应中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

肝癌细胞株 HepG2、BEL-7402 来源于中山大学医学院细胞库;细胞分化剂(CDA-II,商品名:喜滴克)由合肥永生制药有限公司提供;三氧化二砷(As_2O_3 , $M_r=197.84$)、四甲基偶氮唑蓝(MTT)和Hoechst 33 258 购自 Sigma 公司;其他:PRMI 1640 (美国 GIBCO)、琼脂糖、蛋白酶K、(华美公司)、小牛血清(杭州四季青)、DMSO(二甲基亚砷,进口分装)。

收稿日期: 2002-08-10

基金项目: 广东省科委广东省重点科技攻关科研基金资助项目(1998110)

作者简介: 刘建伟(1955-),男,湖北黄石人,硕士,副教授。

1.2 分组

根据预实验的结果 1.0~5.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 诱导肝癌细胞的凋亡率有差异性, 1.0~5.0 g/L 的 CDA-II 具有抑制肝癌细胞增殖及诱导分化的作用。本实验分为 A 组: 对照, 只有细胞, 不加药物; B 组: 单纯加 As_2O_3 , 以 PRMI 1640 液稀释, 终浓度 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 5 个浓度; C 组: 单纯加 CDA-II, 以 PRMI 1640 液稀释, 终浓度 1.0, 2.0, 3.0, 4.0, 5.0 g/L 5 个浓度; D 组: A 组各浓度 + 1.0 g/L CDA-II。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养及四唑蓝快速比色法(MTT)检测存活率 细胞常规培养(37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数 5% CO_2 饱和湿度), 实验时用 PRMI 1640 液将细胞株浓度调整至 $1 \times 10^6/\text{mL}$, 接种于 96 孔培养板上培养 24 h, 按实验分组加入不同浓度药物, B、C 组每孔加 100 $\mu\text{L/L}$ 培养液, 100 $\mu\text{L/L}$ 药物, 总体积 200 $\mu\text{L/L}$; D 组两种药物各加 100 $\mu\text{L/L}$, 总体积 200 $\mu\text{L/L}$; 对照组每孔加培养液 200 $\mu\text{L/L}$ 。每组浓度均为 4 个复孔, 培养 72 h 后, 每孔加入 MTT 20 $\mu\text{L/L}$, 继续培养 4 h, 去上清, 加 DMSO 200 $\mu\text{L/L}$, 并于微型振荡器摇匀 15 min, 溶解形成的结晶, 立即比色, 在主波长 570 nm, 参比波长 690 nm 处, 用酶标仪检测吸光度 A 值。取实验组 4 孔 A 值平均值/对照组 4 孔 A 值平均值 $\times 100\%$ 。即为细胞存活率。每项实验至少重复 3 次。

1.1.2 活细胞荧光染色 检测凋亡率 上述细胞加

药物培养后, 加 Hochst 33 258 入细胞悬液, 终质量浓度为 1 mg/L, 避光染色 15 min, 滴片后在荧光显微镜观察细胞核 DNA 荧光。

1.3.3 流式细胞术分析细胞凋亡 收集经药物处理 4 d 的细胞, 用磷酸缓冲盐溶液(PBS)洗涤, 1×10^6 细胞乙醇固定, 送中山医科大学附属第一医院肾病实验室流式细胞仪(美国 BECKMAN - COULPER)进行细胞周期分析, 亚 G1 期 DNA 含量的细胞为凋亡细胞。

1.4 统计学处理

以 SPSS 8.0 软件, 资料均行方差齐性检验, 多因素实验设计资料方差分析的析因分析。

2 结果

2.1 CDA-II, As_2O_3 对肝癌细胞生长的影响

As_2O_3 作用肝癌细胞后呈现明显的细胞毒性, 对细胞存活率的影响呈浓度依赖关系, 两株细胞的半数抑制浓度是 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 。而 CDA-II 的细胞毒性很低, 在质量浓度 1.0 g/L 时, HepG2、Bel-7402 两株细胞存活率分别是 92% 和 89%, 质量浓度 3.0 g/L 时分别是 70% 和 65%, 质量浓度 < 3.0 g/L 时与对照组比较无统计学意义 ($P > 0.05$); 但当将 CDA-II 与 As_2O_3 共同处理后却明显提高了 As_2O_3 对这两株肝癌细胞的毒性, 统计学分析显示两药有交互效应 ($P < 0.05$, 表 1), 联合用药对两株细胞的半数抑制浓度是 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 1.0 g/L CDA-II。

表 1 各组药物作用肝癌细胞 HepG2 后的存活率

Table 1 Survival rate of hepatoma cell lines HepG2 treated with drugs

($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	$c_{B,B}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ ¹⁾ or $\rho_{B,C}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ ²⁾				
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0 ⁴⁾
A(Controls)	100	100	100	100	100
B($\text{As}_2\text{O}_3, c_B$) ⁵⁾	80.06 \pm 3.27	70.58 \pm 5.42	67.82 \pm 3.43	59.33 \pm 7.33	49.12 \pm 4.25
C(CDA-II, ρ_B) ⁶⁾	92.41 \pm 4.25	81.22 \pm 7.34	70.23 \pm 2.32	68.22 \pm 4.56	67.12 \pm 9.23
D(B + $C_{1.0}$) ^{3), 7)}	50.67 \pm 3.56	47.88 \pm 6.42	47.34 \pm 4.25	45.54 \pm 8.22	41.55 \pm 3.75

1) $c_{B,B}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$ is for group B ($\text{As}_2\text{O}_3, c_B$); 2) $\rho_{B,C}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$ is for group C (CDA-II, ρ_B); 3) Group D (B + $C_{1.0}$) refers to every each group B ($\text{As}_2\text{O}_3, c_B$) plus $\rho_{B,C} = 1.0 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$; 4) Concentration grades effect; $F = 32.270$, sig. = 0.000, $P < 0.05$; 5) Main effect for group B ($\text{As}_2\text{O}_3, c_B$); $F = 22.856$, sig. = 0.000, $P < 0.05$; 6) Main effect for group C (CDA-II, ρ_B); $F = 0.831$, sig. = 0.059, $P > 0.05$; 7) Interaction effect for group D (B + $C_{1.0}$); $F = 27.178$, sig. = 0.000, $P < 0.05$

2.2 药物对细胞形态学的影响

在荧光显微镜下, 对照组细胞核呈弥散均匀荧光, 两药共同处理的细胞出现大量凋亡细胞, 其核

内见染色浓度改变的颗粒状荧光(图 1)。计算 500 个细胞的细胞凋亡率。结果显示: 单独使用 As_2O_3 随浓度的增加, 肝癌细胞核 DNA 呈颗粒状染色的

比例缓慢增加, 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 时与对照组差异无统计学意义 ($P = 0.063$, 表 2)。单独使用 CDA-II 组 3.0 g/L 以上凋亡细胞与对照组差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 而在 C 组, 当药物浓度很低时凋亡

细胞的比例就已经很高, 1.0 g/L CDA-II + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 时的凋亡率已接近单用 As_2O_3 5.0 $\mu\text{mol/L}$ 时的水平。

2.3 流式细胞仪分析细胞周期及细胞凋亡

表 2 各组药物作用肝癌细胞 BEL-7402 后的凋亡率

Table 2 Apoptotic rate of hepatoma cell lines BEL-7402 treated with drugs ($\bar{x} \pm s, \%$)

Groups	$c_{B,B}/(\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1})$		or $\rho_{B,C}/(\text{g} \cdot \text{L}^{-1})$		
	1.0	2.0	3.0	4.0	5.0
A(Controls)	9.4 ± 4.1	11.1 ± 3.2	9.3 ± 3.6	7.9 ± 1.8	8.8 ± 2.8
B($\text{As}_2\text{O}_3, c_B$) ¹⁾	13.1 ± 2.3	33.6 ± 1.8	39.2 ± 2.0	44.0 ± 3.1	50.4 ± 1.7
C(CDA-II, ρ_B) ²⁾	8.7 ± 3.1	15.6 ± 2.8	25.7 ± 2.2	27.2 ± 2.9	29.4 ± 2.1
D(B + $C_{1.0}$) ³⁾	42.1 ± 2.2	51.0 ± 2.8	59.3 ± 3.5	61.4 ± 4.3	66.8 ± 6.1

1) Main effect for group B($\text{As}_2\text{O}_3, c_B$); $F = 0.387, \text{sig.} = 0.063, P > 0.05$; 2) Main effect for group C(CDA-II, ρ_B); $F = 0.670, \text{sig.} = 0.785, P > 0.05$; 3) Interaction effect for group D(B + $C_{1.0}$); $F = 22.450, \text{sig.} = 0.000, P < 0.05$

不同药物处理后, 细胞周期及凋亡率呈现明显不同。 As_2O_3 作用 4 d 后 HepG2 和 BEL-7402 细胞 G_1 期前出现亚二倍体细胞 (sub- G_1), 凋亡细胞数与药物浓度成正比, 药物浓度越高, 凋亡发生率越高, 两株细胞单独应用 5.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 的凋亡率分别是 46.7% 和 53.1%。单独应用 CDA-II 组, 细胞的凋亡率与对照组并没有显著性的差异, 但低质量浓度 ($< 2.0 \text{ g/L}$) 时细胞生长阻滞于 G_2 期较对照组多, 而随浓度的增加则细胞滞留于 G_1 期的细胞相对增多 (图 2)。1.0 g/L CDA-II 和 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 共同处理 HepG2 细胞后, 凋亡率较单独应用 As_2O_3 或者 CDA-II 的 11.3% 或 8.7% 显著上升为 40.2% (图 3)。统计学分析表明联合用药 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 1.0 g/L CDA-II 的细胞凋

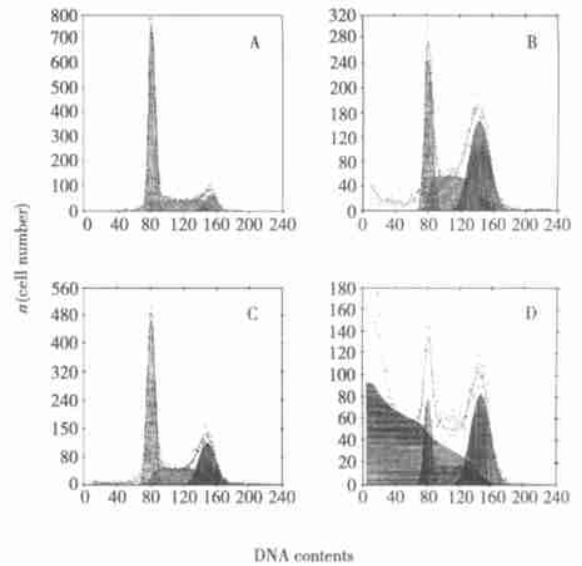


图 3 肝癌细胞经药物处理 4 d 后的流式细胞图

Fig 3 Flow cytometry on day 4 after treatment with drugs

A: Control; B: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 ; C: 1.0 g/L CDA-II; D: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 1.0 g/L CDA-II

亡率相当于单独应用 5.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 。

3 讨论

细胞凋亡剂的细胞毒性和肿瘤的耐药性往往是导致化疗失败的主要原因。Cai X 等报道用 As_2O_3 10 mg/d 治疗肝功能正常的急性早幼粒细胞白血病复发患者 47 例 2 周后, 1/3 的患者出现肝损害, 7 例表现为肝中毒^[4]。说明以 As_2O_3 治疗肝功能已受损的肝癌患者可能需要选择更小剂量。然而, 体外实验表明低浓度的 As_2O_3 (0.25 ~ 2.0

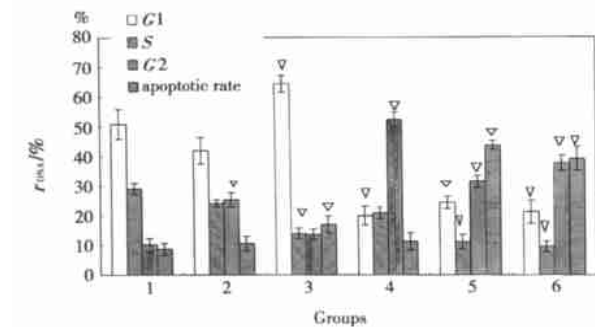


图 2 药物处理 4 d 后各组细胞 DNA 分布

Fig 2 The comparison of different groups for DNA on 4 d after treatment with drugs

1: Controls; 2: 1.0 g/L CDA-II; 3: 5.0 g/L CDA-II; 4: 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 ; 5: 5.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 ; 6: 1.0 g/L CDA-II + 1.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 . ∇ , compared with the controls. $P < 0.05$

$\mu\text{mol/L}$)仅抑制肝癌细胞的增殖,而未进入实质凋亡,高浓度才诱导肝癌细胞凋亡^[5]。根据抗癌药物的敏感标准,药物的敏感性仅与凋亡发生率有关,肿瘤细胞的凋亡阈值与化疗效果有着某种内在联系^[6],本实验中肝癌细胞对 As_2O_3 的敏感剂量(凋亡阈值)是 $5.0 \mu\text{mol/L}$,按公式:药物质量浓度($\mu\text{g/mL}$) = [(药物 $\text{mg} \times$ 体表面积)/体质量] \times (100/60),临床用药的敏感剂量应是 20mg/m^2 ,显然剂量偏大。细胞分化剂是从健康人尿中分离提纯的一组天然活性成分的非细胞毒抗肿瘤生物制剂,其药靶是癌细胞的异常甲基转移复合酶,作为甲基转移酶抑制剂能有效改善 DNA 甲基化低水平的状态^[7]。Shen 等^[8]在研究人肝癌时 DNA 甲基化水平与临床病理指标的关系指出, *N-ras* 在肝癌的表达阳性率高达 61%,而其甲基化降低,癌基因的甲基化水平乃至整个 DNA 甲基化水平的低下在肝癌中发挥了重要作用,甲基化水平越低,其肿瘤渗透及转移的能力越强。经美国 CMB 基金(95-583)、国家自然科学基金(93670701)和国家“九五”攻关基金(96-906-01-15)资助项目的研究提示 CDA-II 有明显抑制裸鼠人肝癌切除后的切缘复发和肝内外转移,对原癌基因 *c-myc*、*N-ras*、*c-jun*、*c-fos* 及 *mmp-9* 基因的表达有明显的下调作用^[9,10]。提示 CDA-II 的作用机理可能是下调 *N-ras* 等原癌基因的表达,改善 DNA 甲基化水平。徐建业等^[2]发现低浓度 CDA-II 能够明显逆转 KBV200(耐药株)癌细胞的耐药性,与 VCR(长春新碱)合用可增加 VCR 诱导 KBV200 细胞凋亡。本实验结果可以观测到 CDA-II 对肝癌细胞的直接凋亡效应并不明显,但能增强 As_2O_3 诱发的细胞凋亡,细胞周期分析发现低浓度的 CDA-II 使肝癌细胞滞留于 G_2 或 S 期的数目增多。此时只需增加小剂量的诱导凋亡剂三氧化二砷便能极大地促进细胞凋亡的发生,

说明 CDA-II 可能降低了肝癌细胞的凋亡阈值,增加肝癌细胞对 As_2O_3 敏感性。本实验 As_2O_3 合用 CDA-II 后凋亡阈值较单用时的 $5.0 \mu\text{mol/L}$ 降低至 $1.0 \mu\text{mol/L}$ 。临床用药 As_2O_3 只需 4mg/m^2 ,结果有助于临床选择低剂量的 As_2O_3 并协同用 CDA-II,以减少 As_2O_3 对肝脏的毒副作用,提高疗效。

(本文图 1 见插页 2. Fig. 1 shown in back coloured page 2)

(本课题实验数据的统计学处理得到中山大学公共卫生学院统计学教研室凌莉副教授的热心指导,谨此致谢)

参考文献:

- [1] Pu Y S, Hour T C, Chen J, *et al.* Arsenic trioxide as a novel anticancer agent against human transitional carcinoma: characterizing its apoptotic pathway[J]. *Anticancer Drugs*, 2002, 13(3): 293.
- [2] 徐建业,周琦,卢萍,等. 细胞分化剂对肿瘤细胞凋亡的诱导与耐药性的逆转[J]. *中华内科杂志*, 2000, 39(1): 37.
- [3] 高也陶,时善全,吴孟超,等. 尿多酸肽注射液治疗晚期肝癌 15 例[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(2): 110.
- [4] Cai X, Shen Y L, Zhu Q, *et al.* Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia[J]. *Leukemia*, 2000, 14(2): 262.
- [5] Oketani M, Kohara K, Tuvdendorj D, *et al.* Inhibition by arsenic trioxide of human hepatoma cell growth[J]. *Cancer Lett*, 2002, 183(2): 147.
- [6] Fish D E. Apoptosis in cancer therapy: crossing the threshold[J]. *Cell*, 1994, 78(4): 539.
- [7] 廖明微. “聪明的抗癌药 CDA-II”[M]. 台北:世茂出版社, 1999. 149~161.
- [8] Shen L, Fan J, Qiu D, *et al.* Correlation between DNA methylation and pathological change in human hepatocellular carcinoma[J]. *Hepatogastroenterology*, 1998, 45(11): 1753.
- [9] 孙婧婧,周信达,刘银坤,等. 细胞分化诱导剂防治裸鼠肝癌转移复发的疗效[J]. *中华肝胆外科杂志*, 1999, 5(1): 14.
- [10] 刘银坤,李岩,马晓明,等. 喜滴克对肝癌相关基因及 AFP 表达的调节[J]. *中国肿瘤*, 2002, 11(3): 169.

(编辑 张敏瑞)

(上接第 422 页 from page 422)

- [4] O' Driscoll S W. Articular cartilage regeneration using periosteum[J]. *Clin Orthop*, 1999, 367 Suppl: 186.
- [5] Kandel R A, Boyle J, Gibson G, *et al.* *In vitro* formation of mineralized cartilaginous tissue by articular chondrocytes[J]. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 1997, 33(3): 174.
- [6] 郑卫平,张志光,郑有华,等. 兔关节软骨细胞在几丁糖中培养的生物学特性[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(4): 277.
- [7] Koedam J A, Hoogenbrugge C M. Differential regulation of IGF-binding proteins in rabbit costal chondrocytes by IGF-I and dexamethasone[J]. *J Endocrinol*, 2000, 165(3): 557.
- [8] Mi Z, Ghivizzani S C, Lechman E R, *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of insulin-like growth factor I stimulates proteoglycan synthesis in rabbit joints[J]. *Arthritis Rheum*, 2000, 43(11): 2563.
- [9] Turley E A, Bowman P, Kytryk M A. Effect of hyaluronate and hyaluronate binding proteins on cell motile contact and behaviour[J]. *J Cell Sci*, 1985, 78(10): 133.
- [10] Hu M, Sabelman E E, Tsai C, *et al.* Improvement of Schwann cell attachment and proliferation on modified hyaluronate acid strands by polylysine[J]. *Tissue Engineering*, 2000, 6(6): 585.

(编辑 张敏瑞)