

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2010.08.010

As₂S₂ 对人卵巢癌耐药株 C13K/DDP 细胞增殖和凋亡的作用

于晓兰,田媛,卢运萍,马丁,汪辉

Role of As₂S₂ on C13K/DDP Cells Proliferation and Apoptosis *in vitro*

YU Xiao-lan, TIAN Yuan, LU Yun-ping, MA Ding, WANG Hui

Department of Obstetrics Gynecology, Tongji Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430030, China

Corresponding Author: WANG Hui, E-mail: wang71hui@yahoo.com.cn; MA Ding, E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the role of As₂S₂ on C13K/DDP cells proliferation and apoptosis *in vitro*. **Methods** C13K/DDP cells were incubated with different concentration of As₂S₂ (4, 6, 8, 10 μmol/L) at various periods (24, 48, 72h). The cell growth was measured by MTT. Apoptosis was detected by double staining flow cytometry (FCM). The expression of BCL-2, BAX and AKT was examined by Western blot analysis. **Results** Compared with DDP group, the proliferation of C13K/DDP cells treated with As₂S₂ was significantly inhibited in dose- and time-dependent manner ($P < 0.01$). FCM analysis showed that As₂S₂ could markedly induce C13K/DDP cells apoptosis. The apoptotic rates of C13K/DDP cells treated with As₂S₂ (6, 8 μmol/L) after 24h and 48h were (16.05 ± 2)% , (22.30 ± 3)% and (28.94 ± 1.8)% , (37.85 ± 3)% respectively, there was significant difference compared to control group [(7.82 ± 1.2)% , (9.80 ± 2.6)%] and DDP group [(9.45 ± 2)% , (14.74 ± 3.2)%] ($P < 0.05$). BCL-2 and AKT expression was down-regulated by As₂S₂ and BAX expression was up-regulated by As₂S₂. **Conclusion** As₂S₂ could inhibit the proliferation of C13K/DDP cell and induce cell apoptosis, which may be related to the BCL-2 or AKT down-regulation and BAX up-regulation.

Key words: As₂S₂; Inhibition; Apoptosis; BCL-2; BAX; AKT

摘要:目的 研究 As₂S₂ 对卵巢癌耐药株 C13K/DDP 细胞增殖抑制和诱导凋亡的作用。**方法** 以不同浓度(4、6、8、10 μmol/L)的 As₂S₂, 分三个时间点(24、48、72h)干预 C13K/DDP 细胞, 采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测 As₂S₂ 对 C13K/DDP 细胞的增殖抑制率; 流式细胞仪(FCM)检测细胞凋亡率; Western blot 检测 BCL-2、BAX、AKT 的表达。**结果** MTT 结果显示不同浓度(4、6、8、10 μmol/L)的 As₂S₂ 作用 C13K/DDP 细胞后, 与 DDP 组相比其增殖受到抑制, 作用呈明显的时效和量效关系, 差异有统计学意义($P < 0.01$); 流式细胞仪的结果显示 6、8 μmol/L As₂S₂ 诱导细胞的 24h 凋亡率分别为(16.05 ± 2)%、(22.30 ± 3)% , DDP 组为(9.45 ± 2)% , 对照组为(7.82 ± 1.2)% ; 6、8 μmol/L As₂S₂ 诱导细胞 48h 凋亡率分别为(28.94 ± 1.8)%、(37.85 ± 3)% , DDP 组为(14.74 ± 3.2)% , 对照组为(9.80 ± 2.6)% , 各组比较, 差异有统计学意义($P < 0.05$); Western blot 结果显示 BCL-2、AKT 表达下调, BAX 表达明显上调。**结论** As₂S₂ 对人卵巢癌耐药株 C13K/DDP 细胞具有增殖抑制和诱导凋亡的作用, 可能与 BCL-2 下调、BAX 上调或 AKT 下调有关。

关键词: As₂S₂; 增殖抑制; 凋亡; BCL-2; BAX; AKT**中图分类号:** R73-36⁺1; R737.31 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2010)08-0894-03**收稿日期:** 2009-04-16; **修回日期** 2009-10-23**基金项目:** 国家自然科学基金资助项目(30600668)**作者单位:** 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院妇产科**通信作者:** 汪辉, E-mail: wang71hui@yahoo.com.cn; 马丁, E-mail: dma@tjh.tjmu.edu.cn**作者简介:** 于晓兰(1979-), 女, 硕士, 主要从事妇科肿瘤的研究

0 引言

卵巢癌发病隐匿, 早期诊断困难, 确诊时 70% 已属临床晚期, 手术以后联合以铂类药物为基础的化疗已成为治疗卵巢癌的主要手段。目前国内外所用的铂类药物主要包括顺铂等, 尽管这些药物对治疗有一定疗效, 但随之产生的耐药问题已成为卵巢

癌治疗的主要障碍。因此寻找效果好,不良反应小的化疗药物变得非常重要。

中药砷剂在我国传统医学中具有悠久的历史,近年来砷剂(雄黄,砒霜)在治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)方面疗效显著^[1-3],发现其具有抗肿瘤作用,其主要机制是诱导肿瘤细胞凋亡。目前对氧化砷(砒霜)的研究较为广泛,但其是剧毒性药物,不良反应大,而同属砷剂的雄黄(主要成分 As₂S₂)的毒性要比砒霜低的多,其价值倍受关注,而且目前对雄黄作用实体瘤的研究很少,对卵巢癌的作用国内外更未见报道。本文研究 As₂S₂ 对人卵巢癌细胞的体外作用,为寻找有效治疗卵巢癌药物提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 药物与试剂 As₂S₂(98%购于 Sigma 公司。其配制方法:取适量 As₂S₂ 溶解于 1mol/L NaOH 中,然后调 pH 值至 7.34~7.45,微孔滤膜过滤除菌后,经原子吸收光谱测定砷原子的浓度,以 295μmol/L 为 As₂S₂ 储液浓度,并通过三次预实验确定实验药物浓度。MTT 购于 Sigma 公司;兔抗人 BCL-2 抗体和 AKT 购自 Cell Signaling Technology 公司,BAX 购自 Newmarkers 公司,β-actin 购自 Sigma 公司;BCIP/NBT 显色试剂盒购自武汉凌飞科技有限公司。

1.2 细胞培养 人卵巢癌耐药株 C13K 细胞由加拿大 Benjamink. Tsang 博士惠赠(Department of Obstetrics and Gynecology and Cellular and Molecular University Ottawa)。细胞用含 10%小牛血清的 RPMI 1640 完全培养液在 37℃、5%CO₂ 培养箱中培养。实验时细胞处于对数生长期,活细胞数达 95%~100%。以 2.5g/L 胰蛋白酶消化传代。

1.3 MTT 检测 以 6 × 10³ 个细胞/孔接种于 96 孔板,分为空白组,As₂S₂ 实验组(4、6、8、10μmol/L),DDP 实验组(4μg/ml)和对照组,分别培养 24、48、72h 后加入 MTT 溶液(终浓度 5mg/ml),37℃ 孵育 4h,吸弃孔中培养上清液,每孔加入 150μl DMSO,混匀 10min,在酶联免疫检测分析仪检测波长 570nm,参考波长 630nm 下检测各孔吸光度值(D 值)。计算各组细胞的抑制率,抑制率 = (1 - 实验组 D 值/对照组 D 值) × 100%,重复三次取平均值。

1.4 流式细胞仪检测细胞凋亡 用 Annexin-V-FITC 及 PI 双标流式细胞仪检测细胞凋亡,分为 As₂S₂ 组、DDP 组和对照组。As₂S₂ 组分别加入终浓度为 6、8μmol/L 的 As₂S₂,DDP 组加入终浓度为 4μg/ml 的 DDP 分别作用细胞 24、48h 后,用 Annexin V/PI 检测细胞凋亡率。

1.5 Weston blot 检测 BCL-2、BAX 和 AKT 的表达 8μmol/L As₂S₂ 处理细胞后不同时间,收集细胞,裂解细胞提取蛋白,测定蛋白质浓度(考马斯亮蓝 G250 染料法)。10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离蛋白质,转至 PCDF 膜,脱脂奶封闭 1h,一抗 4℃ 孵育过夜,0.1% TBST 洗膜,二抗室温孵育 1h,0.1% TBST 洗膜,用 BCIP/NBT 试剂盒显色 15~60min。β-actin 作为等量上样的标准。

1.6 统计学方法 采用 SPSS11.5 统计软件包进行方差分析。

2 结果

2.1 As₂S₂ 对 C13K/DDP 细胞增殖的影响

As₂S₂ 以时间、剂量依赖方式抑制 C13K 细胞增殖,24、48、72h 后,As₂S₂ 不同浓度对细胞抑制率分别如下:4μmol/L 为(2.27 ± 3)%、(21.6 ± 3)%、(37.1 ± 5)%;6μmol/L 为(25.3 ± 7)%、(32.37 ± 7)%、(50.81 ± 4)%;8μmol/L 为(38.64 ± 7)%、(50.67 ± 3)%、(77.6 ± 1)%;10μmol/L 为(45.49 ± 6)%、(58.25 ± 6)%、(81.8 ± 3)%。4μg/ml DDP 作用 C13K 细胞 24、48、72h 后,细胞抑制率如下:(7.17 ± 3)%、(8.4 ± 4)%、(10.19 ± 2)%。As₂S₂ 组不同浓度、时间点之间细胞抑制率差异有统计学意义(P < 0.01),As₂S₂ 不同浓度组与 DDP 组之间比较,差异有统计学意义(P < 0.01),结果见图 1。

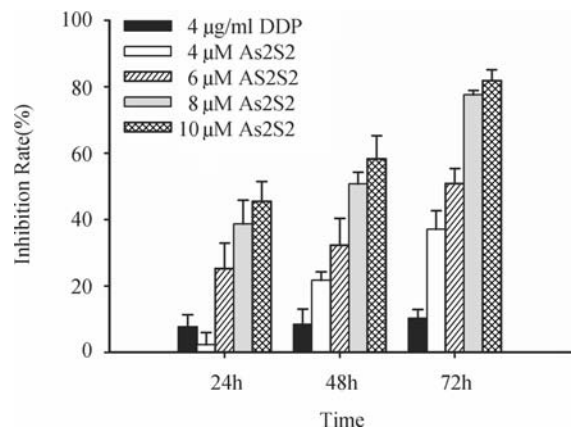


图 1 As₂S₂ 对 C13K/DDP 细胞的增殖抑制作用

Figure 1 Role of As₂S₂ on proliferation of C13K/DDP cell

2.2 As₂S₂ 对 C13K/DDP 细胞凋亡的影响

C13K/DDP 细胞经 4μg/ml DDP 及 6μmol/L、8μmol/L 的 As₂S₂ 分别干预 24h 和 48h 后,凋亡率如下:DDP 组为(9.45 ± 2)%、(14.74 ± 3.2)%;6μmol/L As₂S₂ 为(16.05 ± 2)%、(28.94 ± 1.8)%;8μmol/L As₂S₂ 为(22.3 ± 3)%、(37.85 ± 3)%。对照组凋亡率为(7.82 ± 1.2)%。As₂S₂ 组与 DDP 组及对照组相比差异有统计学意义(P < 0.05)。结果见图 2。

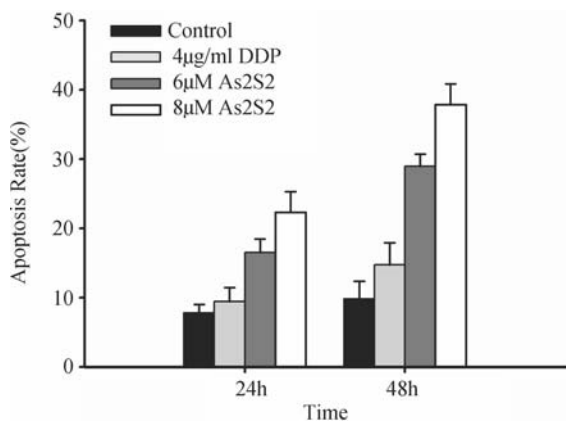


图 2 As₂S₂ 对 C13K/DDP 凋亡的影响

Figure 2 Effect of As₂S₂ on apoptosis of C13K/DDP cell

2.3 As₂S₂ 对 C13K 细胞 BCL-2、BAX、AKT 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示, 8µmol/L As₂S₂ 作用 C13K/DDP 后 24h BCL-2 无明显变化, 36h 后表达逐渐减弱, BAX 从 24h 开始表达逐渐增强。而 AKT 在 24h 有微弱增强, 36h 以后表达迅速减弱。结果见图 3。

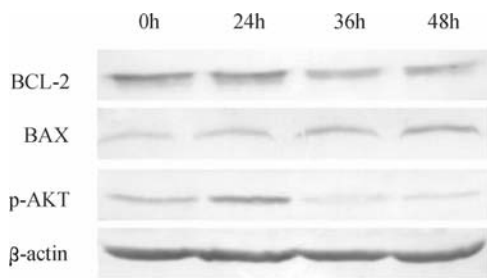


图 3 As₂S₂ 作用 C13K/DDP 后 BCL-2、BAX 及 AKT 的表达情况
Figure 3 Expression of BCL-2, BAX and AKT after As₂S₂ treatment

3 讨论

卵巢癌是威胁妇女生命的三大恶性肿瘤之一, 其发生发展与肿瘤细胞的恶性增殖、肿瘤细胞的凋亡减少有关。近年来随着对细胞凋亡研究的深入和发展, 人们逐渐认识到诱导细胞凋亡是治疗肿瘤性疾病的一种有效的方法和手段, 许多抗肿瘤药物都是通过诱导肿瘤细胞凋亡来达到杀死肿瘤细胞的目的^[4]。含砷中药逐渐得到大家的关注, 有关雄黄诱导 APL 细胞凋亡及机制的研究有所报道^[5-6]。现研究较多的是雄黄能抑制不同类型的恶性血液病细胞增殖和诱导凋亡, 对实体瘤细胞有类似作用。因此抑制肿瘤细胞增殖和诱导凋亡是雄黄抗肿瘤作用的一种比较明确的机制。陈思宇、张晨、宁凝等^[7-9]研究发现雄黄能抑制血液病细胞 K562 和 HL-60 细胞的增殖和诱导凋亡, 其作用机制与雄黄上调 BAX,

下调 BCL-2 和 P-gp, 增加细胞膜 HSP-70 蛋白表达有关。邹春芳、张晨等^[10-11]用雄黄分别对实体瘤肺腺癌 SPC-A-1、肝癌细胞系 BEL-7402 进行干预, 发现雄黄能抑制上述癌细胞增殖, 并阻滞细胞周期。Liu 等^[12]研究发现雄黄能抑制宫颈癌细胞 Siha 的增殖及诱导其凋亡。

本实验通过细胞增殖抑制试验研究 As₂S₂ 抗肿瘤作用, 结果表明其能有效抑制 C13K/DDP 细胞增殖, 并能诱导其发生凋亡, 且呈明显的量效关系和时间依赖性。FCM 显示, As₂S₂ 处理 C13K 细胞后, 凋亡的细胞所占比例增高, 且明显高于 DDP 组, 这与文献报道硫化砷诱导肺腺癌细胞、肝癌细胞系及宫颈癌细胞凋亡一致^[10-12]。Western blot 结果显示 8µmol/L As₂S₂ 作用于 C13K/DDP 后 BCL-2 和 AKT 减弱, 而 BAX 表达增强, 与文献报道雄黄上调 BAX, 下调 BCL-2 和 AKT 相一致^[7,13], 说明 As₂S₂ 诱导 C13K/DDP 凋亡可能是通过 BCL-2 和 AKT 下调, BAX 上调起作用的。其具体作用机制有待今后进一步探讨。本实验可为雄黄抗肿瘤研究, 进一步开发雄黄的药用价值提供一定实验依据。

参考文献:

- [1] 陈思宇, 李信民, 刘陕西. 含砷类中药在恶性血液病治疗中的研究概况[J]. 中国中药杂志, 2000, 25(8): 454-457.
- [2] Wang ZY. Arsenic compound sasantic cancer agents [J]. Cancer Chemother Pharmacol, 2001, 48(Supp11): S72-S76.
- [3] Chen Z, Chen GQ, Shen ZX, et al. Treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic compounds: In vitro and in vivo studies [J]. Semin Hematol, 2001, 38(1): 26-36.
- [4] 粟俭, 张礼和. 药物诱导的肿瘤细胞凋亡研究进展[J]. 国外医学, 肿瘤学分册, 1995, 22(1): 7-10.
- [5] 刘延方, 江滨, 陆道培. 硫化砷诱导 NB4 细胞凋亡及细胞周期阻滞的研究[J]. 中华血液学杂志, 2000, 21(12): 647-648.
- [6] 钟璐, 陈芳源, 韩洁英, 等. 雄黄对 NB4 和 HL-60 细胞形态、PMLmRNA 及蛋白的表达影响[J]. 中国实验血液学杂志, 2001, 9(3): 223-227.
- [7] 陈思宇, 刘陕西, 李信民. 雄黄诱导 K562 细胞凋亡中 BCL-2 和 Bax 表达[J]. 第四军医大学学报, 2002, 23(9): 790.
- [8] 张晨, 黄世林. 雄黄抗白血病细胞多药耐药及其凋亡诱导关系的研究 [J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(12): 40.
- [9] 宁凝, 彭致富, 袁兰, 等. 雄黄纳米微粒对于白血病细胞的诱导凋亡及坏死作用[J]. 中国中药杂志, 2005, 30(2): 136-140.
- [10] 邹春芳, 张祖盼. As₂S₂ 诱导肺腺癌细胞凋亡的实验研究[J]. 实用肿瘤杂志, 2004, 19(6): 507-510.
- [11] 张晨. 雄黄对肝癌细胞系 BEL-7402 增生的影响[J]. 肝脏, 2004, 9(2): 112-113.
- [12] Rong LIU, Demin PU, Yan LIU, et al. Induce of Siha cells apoptosis by nanometer realgar suspension and its mechanism [J]. J Huazhong Univ Sci Technology (Med Sci), 2008, 28(3): 317-321.
- [13] Xi RG, Huang J, Li D, et al. Role of P13-K/Akt pathways in nanoparticle realgar powder-induced apoptosis in U937 cells [J]. Acta Pharmacol Sin, 2008, 29(3): 355-363.

[编辑:周永红;校对:贺文]