

微缺氧对三氧化二砷抑制胃癌细胞 SGC-7901 生长的影响

张俊文,王丕龙

Inhibitory Effect of Arsenic Trioxide on Gastric Cancer Cell SGC-7901 During Hypoxia

ZHANG Jun-wen, WANG Pi-long

Department of Gastroenterology, The First Affiliated Hospital, Chongqing University Medical Sciences, Chongqing 400016, China

Abstract: **Objective** To investigate the effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on gastric cancer cell SGC-7901 during the normal and hypoxia. **Methods** The environment of hypoxia was established by GasPak method. The effect of As_2O_3 was determined by MTT, and FCM was used for studying the apoptosis of SGC-7901 and cell cycle. **Results** As_2O_3 can inhibit significantly the growth of SGC-7901, and arrest the cell in G₂/M and S phases. But this inhibitory effect was decreased significantly during hypoxia ($P < 0.01$), which was found by the lower percentage of apoptosis. **Conclusion** As_2O_3 can inhibit the growth of gastric cancer cell, but during hypoxia this inhibitory effect was decreased, so it may be limited to cure hypostatic neoplasm for only using As_2O_3 .

Key words: Hypoxia; Arsenic trioxide; Gastric cancer cell line SGC-7901; Apoptosis

摘要:目的 常氧和微缺氧条件下三氧化二砷(As_2O_3)注射液对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长抑制作用的对比研究。方法 运用产气袋法(GasPaK)制造微缺氧条件,实验分为微缺氧组和对照组,用 MTT 法检测药物效应。流式细胞仪分析细胞周期和细胞凋亡。结果 不同浓度 As_2O_3 对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长有抑制作用,并呈剂量-效应关系。细胞滞留于 G₂/M 及 S 期。微缺氧条件下 As_2O_3 对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长抑制作用下降($P < 0.01$)。凋亡细胞百分比下降。结论 As_2O_3 对人胃癌细胞生长有抑制作用,但对缺氧胃癌细胞的抑制作用下降,单用 As_2O_3 治疗胃癌存在一定的局限性。

关键词:微缺氧;三氧化二砷;人胃癌细胞 SGC-7901;凋亡

中图分类号:R364.4;R735.202 文献标识码:A 文章编号:1000-8578(2005)11-0692-03

0 引言

三氧化二砷(As_2O_3),经过多年的实验室研究和临床应用,在抗肿瘤治疗方面取得了肯定的疗效,其主要机制为诱导肿瘤细胞凋亡^[1]。近年来许多研究证实其对多种消化系肿瘤细胞株的生长有抑制作用^[2],并发现其对实体肿瘤有一定的治疗效果^[3]。但 As_2O_3 在微缺氧状态下对肿瘤细胞生长的抑制情况尚未见报道。本实验研究通过比较常氧和微缺氧条件下 As_2O_3 对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长抑制率的变化,对 As_2O_3 在微缺氧状态下对肿瘤细胞生长的抑制情况作初步的探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

人胃癌细胞株 SGC-7901(重庆医科大学病理生理教研室提供)。三氧化二砷(亚砷酸注射液,购于

伊达药业有限公司),使用时配成(32、16、8、4、2) $\mu\text{mol/L}$;四甲基偶氮唑蓝(MTT)(购于上海华舜生物工程有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 微缺氧条件的制造

运用产气袋法(GasPaK)制造微缺氧条件。通过血气分析仪监测含小牛血清的 RPMI1640 培养液中 PO_2 、 PCO_2 和 pH 的变化,本装置在 48h 内 PO_2 、 PCO_2 和 pH 稳定,并能达到微缺氧细胞培养的条件(1%~5%氧、5%二氧化碳及 90%氮)^[4]。

1.2.2 MTT 法检测 As_2O_3 对不同氧状态下 SGC-7901 细胞的抑制作用

将对数生长期的胃癌细胞 SGC-7901 制成 5×10^4 个/mL 的细胞悬液,每孔 200 μL 加入两块 96 孔培养板内。实验设药物试验组及肿瘤细胞阴性对照组,将三氧化二砷的 5 个不同浓度分别加在 96 孔板内,每孔加药量 20 μL ,每个剂量 3 个平行孔,重复 7 次。两块 96 孔培养板分为微缺氧组及常氧组。常氧组在 CO_2 箱内培养(20%氧、5%二氧化碳及

收稿日期:2004-11-25;修回日期:2005-03-07

作者单位:400016 重庆医科大学附属第一医院消化内科

科

75 %氮) 48h, 微缺氧组先入缺氧密封盒并放入 37 隔水式电热恒温烤箱孵育 16h, 取出后在 CO₂ 箱内继续培养 32h。两者同时取出离心后吸弃上清, 每孔加无血清 1640 200μL, MTT20μL, CO₂ 箱孵育 4h 弃上清。每孔加二甲亚砷 (DMSO) 200μL, 用自动酶标读数仪 (Bio-Rad-550 型, 美国, 波长 570nm) 测定每孔 A 值。药物作用效应即抑制率 (fa) = (1-实验组 A 值/对照组 A 值) ×100 %。根据中效方程式 $fa/fu = (D/Dm)^m$ (fu 为 1-fa, D 为药物浓度, m 为斜率, Dm 为中效浓度, 即 0.5 效应时的药物浓度), 计算 Dm 值。

1.2.3 流式细胞仪分析

用 As₂O₃ 常氧下中效浓度的 1/3 浓度 (5.6 μmol/L) 为处理浓度, 取对数生长期的人胃癌细胞 SGC-7901 制成 5 ×10⁴ 个/mL 的细胞悬液, 分为对照组、As₂O₃ 组、缺氧对照组、缺氧 As₂O₃ 组各 20mL 细胞悬液入 100mL 培养瓶, As₂O₃ 组和缺氧 As₂O₃ 组分别加入 5.6 μmol/L 的 As₂O₃ 2mL 处理 SGC-7901 细胞, 缺氧对照组、缺氧 As₂O₃ 组先入缺氧密封盒并放入恒温水浴箱孵育 16h, 取出在 CO₂ 箱内培养 56h。对照组、As₂O₃ 组在 CO₂ 箱内培养。72h 后 0.1 %胰蛋白酶消化收集细胞, PBS 洗涤, 70 %乙醇固定 1h, PBS 洗涤 2 次, 将等体积的细胞悬液和 PI 染液混合, 4 放置 30min, 将样品放入 FCM 的样品室, 以激发波长 488nm 测定细胞周期, 并用 Modfit L T2.0 软件分析。并重复 5 次。

1.3 统计学处理

数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 分析采用配对 t 检验或方差分析; 数据均用统计软件包 SAS8.0 分析。

2 结果

2.1 常氧和微缺氧状态下 As₂O₃ 对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长抑制作用的变化

不同浓度的 As₂O₃ 在常氧状态下对 SGC-7901 生长均有抑制作用, 呈剂量-效应关系 [$r = 0.973$, $Dm = (19.32 \pm 0.52) \mu\text{mol/L}$]。在微缺氧状态下, 低浓度的 As₂O₃ (2μmol/L) 对 SGC-7901 生长没有抑制作用, 增高浓度后具有抑制作用, 并呈剂量-效应关系 [$r = 0.959$, $Dm = (34.56 \pm 0.31) \mu\text{mol/L}$]。但同常氧状态下 As₂O₃ 对人胃癌细胞株 SGC-7901 的抑制率比较, 微缺氧状态下, 各浓度的 As₂O₃ 对人胃癌细胞株 SGC-7901 生长的抑制作用均有减弱, 抑制率明显下降 (P < 0.01), 见表 1。

2.2 流式细胞仪检测结果

在不同氧状态下相同浓度的 As₂O₃ 作用 SGC-7901 细胞 72h 后, SGC-7901 细胞产生明显的亚

表 1 不同氧状态下 As₂O₃ 对人胃癌细胞株 SGC-7901 的抑制率 ($\bar{x} \pm s$)

组别 (μmol/L)	常氧组		微缺氧组	
	A 值	抑制率 (%)	A 值	抑制率 (%)
细胞对照	0.402 ±0.042	- -	0.394 ±0.012	- -
2	0.356 ±0.036	11.44 ±1.03	0.412 ±0.025	- -
4	0.346 ±0.028	13.93 ±0.87	0.387 ±0.014	1.69 ±0.31
8	0.223 ±0.029	37.81 ±1.15	0.354 ±0.020	10.17 ±0.83
16	0.250 ±0.016	44.53 ±2.14	0.271 ±0.031	29.66 ±1.06
32	0.159 ±0.008	60.45 ±0.98	0.249 ±0.018	36.72 ±2.11

注: P < 0.01 两组间相同各浓度抑制率比较; · P < 0.01 同各自细胞对照比较; P > 0.05 两组间细胞对照比较

G₁ 期峰, 同未经处理的细胞对照组比较 G₂/M 及 S 期细胞百分比上升, G₀/G₁ 细胞百分比下降, 说明细胞滞留于 G₂/M 及 S 期。常氧下调亡细胞占 9.62 %, 而微缺氧组调亡细胞占 3.73 %, 即微缺氧组 As₂O₃ 作用所诱导的调亡率明显下降。未经 As₂O₃ 处理的常氧及微缺氧细胞对照组间流式细胞仪分析结果无差异, 见表 2。

表 2 不同氧状态下 As₂O₃ 对 SGC-7901 细胞周期分布及细胞调亡率的影响 (%) (n = 5)

	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	调亡率
常氧对照组	69.98 ±1.23	25.06 ±1.93	4.96 ±0.44	- -
微缺氧对照组	66.95 ±0.91	27.67 ±1.30	5.37 ±0.32	- -
As ₂ O ₃ 组	50.88 ±0.78	31.93 ±0.77	17.19 ±0.92	9.62 ±0.35
As ₂ O ₃ 微缺氧组	43.71 ±1.33	30.51 ±1.53	25.78 ±1.27	3.73 ±0.12 [#]

注: [#] P < 0.05 同常氧下 As₂O₃ 组比较有显著下降

3 讨论

近年来, 多项研究发现低浓度 As₂O₃ 能够通过诱导肿瘤细胞调亡, 达到抑制肿瘤细胞生长的作用。有学者认为 As₂O₃ 可能通过干扰巯基酶类的活性^[5], 调控癌相关基因表达^[6] 以及通过阻抑癌细胞周期进程^[7] 等途径来抑制癌细胞增殖, 诱导癌细胞分化及调亡。本实验资料显示, As₂O₃ 在不同氧状态下均能够抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖, 呈剂量-效应关系; 其在常氧下对人胃癌细胞 SGC-7901 生长的抑制率同文献报道相近^[2]。本实验资料还显示, As₂O₃ 在不同氧状态下均能使 G₀/G₁ 期 SGC-7901 细胞减少, 细胞滞留于 G₂/M 及 S 期。调亡细胞百分比分别为 9.62 % 和 3.73 %。其中常氧下调亡的百分比同报道相近^[2]。表明 As₂O₃ 对胃癌细胞的抑制作用主要是通过阻抑细胞周期进程和诱导调亡而实现的。显示 As₂O₃ 对胃癌有治疗作用, 在抗胃癌治疗中有应用的前景。

近年的研究表明, 实质性肿瘤发生过程中, 由于血管生长的相对滞后和肿瘤细胞的快速增殖导致肿

瘤细胞缺氧^[8]。肿瘤的缺氧是肿瘤发生恶性转化甚至转移的始动因素,以缺氧为显著特征的实质性肿瘤微环境是肿瘤细胞遗传不稳定的基本始动因素,缺氧介导肿瘤细胞的恶性筛选,对凋亡不敏感的以及表达突变型 p53 的肿瘤细胞在缺氧环境下具有明显的生存优势。缺氧作为一种生理性的选择,使得这些细胞筛选并存活下来,从而使肿瘤细胞对化疗药物诱导的凋亡不敏感,导致缺氧肿瘤细胞对放、化疗耐受性的增加。缺氧还可以使肿瘤细胞内参与解毒和药物代谢的酶类表达增加,从而使进入细胞内的化疗药迅速被代谢而丧失效应^[9,10]。本实验资料显示,As₂O₃对微缺氧处理的人胃癌细胞 SGC-7901 生长有抑制作用,但同常氧下其对 SGC-7901 的抑制作用比较抑制率明显下降($P < 0.01$)。流式细胞仪结果显示常氧下 As₂O₃作用于 SGC-7901 细胞,诱导细胞凋亡,凋亡细胞占 9.62%。而微缺氧环境下同浓度等量的 As₂O₃作用后凋亡细胞占 3.73%。提示在微缺氧环境下 As₂O₃的药物效应下降,诱导细胞凋亡的能力下降。其原因可能同缺氧微环境导致肿瘤细胞遗传不稳定,缺氧介导肿瘤细胞的恶性筛选以及缺氧时肿瘤细胞内参与解毒和药物代谢的酶类表达增加有关。

胃癌为实质性恶性肿瘤,存在有缺氧的肿瘤细胞。乏氧肿瘤细胞的存在导致其对放、化疗抗拒性增加,并可能导致 As₂O₃在体内外对胃癌细胞抑制作用的变化。本实验资料显示 As₂O₃能够明显抑制胃癌细胞 SGC-7901 增殖、诱导细胞凋亡,但在微缺氧环境下 As₂O₃的效应下降,诱导细胞凋亡的能力下降。因此可以推测 As₂O₃虽对胃癌实体肿瘤有一定治疗效果,但对胃癌中乏氧肿瘤细胞作用较弱,单用 As₂O₃治疗胃癌实体肿瘤可能存在一定的局限性。如何增强 As₂O₃对乏氧肿瘤细胞抑制作用,从而更好地发挥 As₂O₃抗肿瘤作用,将是我们进一步

研究的方向。

参考文献:

- [1] Nolte F, Friedrich O, Rojewski M, et al. Depolarisation of the plasma membrane in the arsenic trioxide (As₂O₃)-and anti-CD95-induced apoptosis in myeloid cells[J]. FEBS Lett, 2004, 578(1-2): 85-89.
- [2] 涂水平,江石湖,谭继宏,等. 氧化砷抑制胃癌 SGC-7901 细胞增生和诱导凋亡作用[J]. 世界华人消化杂志, 1999, 7(1): 18-21.
- [3] 刘秀峰,陈映霞,钱军,等. 三氧化二砷注射液治疗中晚期原发性肝癌的临床研究[J]. 中华肿瘤杂志, 2001, 23(6): 487-489.
- [4] Gregg L. Expression of Hypoxia-inducible Factor 1: Mechanisms and Consequences[J]. Biochem Pharmacol, 2000, 59(1): 47-53.
- [5] Hossain K, Akhand AA, Kato M, et al. Arsenite induces apoptosis of murine T lymphocytes through membrane raft-linked signaling for activation of C-Jun amino-terminal kinase[J]. J Immunol, 2000, 165(8): 4290-4297.
- [6] Jian XH, Chun YU, Wong B, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in human gastric cancer cell through up-regulation of p53 and activation of caspase-3[J]. Int J Cancer, 2001, 91(2): 173-179.
- [7] Park WH, Seol JG, Kim ES, et al. Arsenic trioxide mediated growth inhibition in MC/ CAR myeloma cells via cell cycle arrest in association with induction of cyclin-dependent kinase inhibitor p21 and apoptosis[J]. Cancer Res, 2000, 60(11): 3065-3071.
- [8] Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis and therapeutic exploitation[J]. Eur J Cancer, 2000, 36(13 Spec No): 1649-1660.
- [9] Frederiksen LJ, Siemens DR, Heaton JP, et al. Hypoxia induced resistance to doxorubicin in prostate cancer cells is inhibited by low concentrations of glyceryl trinitrate[J]. J Urol, 2003, 170(3): 1003-1007.
- [10] Shannon AM, Bouchier-Hayes DJ, Condron CM, et al. Tumour hypoxia, chemotherapeutic resistance and hypoxia-related therap[J]. Cancer Treat Rev, 2003, 29(4): 297-307.

[编辑:周永红]