

三氧化二砷对人宫颈癌细胞 Fas 表达和钙含量的影响

魏玲¹, 王兴武¹, 宋现让¹, 左文述²

Change of Fas Expression and Intracellular Calcium Content in Human Cervical Carcinoma Cells Treated with Arsenic Trioxide

WEI Ling¹, WANG Xing-wu¹, SONG Xian-rang¹, ZUO Weng-shu²

1. Cancer Research Center, Shandong Tumor Hospital, Ji nan 250117, China; 2. The First Department of Surgery

Abstract: **Objective** The study was to research Fas expression and intracellular calcium content change in human cervical carcinoma HeLa cells treated with arsenic trioxide. **Methods** MTT method was used to observe the growth inhibition. Apoptosis was detected with Annexin V-FITC + PI dual parameter. Fas positive rate and intracellular calcium ions ($IECa^{2+}$) levels were measured by flow cytometry in HeLa cells treated with As_2O_3 . **Results** As_2O_3 could inhibit the growth of HeLa cells dramatically. There was obvious dosage-effect and time-effect correlations, its half inhibitory concentration (IC_{50}) at 24h, 48h and 72h were $8.62\mu mol/L$, $6.77\mu mol/L$ and $4.89\mu mol/L$ respectively. Apoptosis rate increased in HeLa cells treated with As_2O_3 . As_2O_3 could increase Fas expression and $IECa^{2+}$ levels in HeLa cells ($P < 0.01$). **Conclusion** As_2O_3 could inhibit the growth of HeLa cells dramatically and induce apoptosis, we proposed that its mechanisms were probably associated with the improved Fas expression and $IECa^{2+}$ levels.

Key words: Arsenic trioxide (As_2O_3); Cervical carcinoma; Calcium content; Fas protein

摘要: **目的** 研究人宫颈癌 HeLa 细胞经三氧化二砷 (As_2O_3) 处理后的 Fas 表达和钙含量变化。方法利用 MTT 法观察 As_2O_3 对 HeLa 细胞的生长抑制作用, Annexin V-FITC + PI 双参数检测细胞凋亡。流式细胞仪测定 As_2O_3 处理后 HeLa 细胞 Fas 阳性百分率及胞内钙离子 ($IECa^{2+}$) 含量变化。 **结果** (1) As_2O_3 可显著抑制 HeLa 细胞生长, 且剂量-效应和时间-效应关系显著 ($P < 0.05$), 其 24h、48h 和 72h 的 IC_{50} 值分别为 $8.62\mu mol/L$ 、 $6.77\mu mol/L$ 和 $4.89\mu mol/L$ 。(2) As_2O_3 处理后 HeLa 细胞凋亡率明显增加。(3) As_2O_3 能显著增加 Fas 蛋白表达和 $IECa^{2+}$ 含量 ($P < 0.01$)。 **结论** As_2O_3 在体外可显著抑制 HeLa 细胞生长并引起凋亡, 其机制可能与上调 Fas 表达和 $IECa^{2+}$ 含量有关。

关键词: 三氧化二砷; 宫颈癌; 钙离子; Fas 蛋白

中图分类号: R730.53; R737.33; R73-36⁺1 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)07-0417-03

0 引言

三氧化二砷 (As_2O_3) 应用于急性早幼粒白血病 (APL) 的临床治疗已获满意疗效。研究发现, As_2O_3 不仅对白血病细胞, 而且对实体瘤如食管癌、鼻咽癌等也有显著抑制效应^[1-2]。本实验在观察 As_2O_3 抑制宫颈癌细胞生长的基础上, 研究其诱导凋亡效应及对 Fas 表达及细胞内钙离子 ($IECa^{2+}$) 含量的影响, 为 As_2O_3 可能的临床应用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 细胞株、药品和试剂

人宫颈癌细胞株 HeLa, 购自中科院上海细胞生

物学研究所。细胞培养按常规方法进行, 实验时选用对数生长期细胞。 As_2O_3 为 Sigma 公司产品, 用生理盐水配成 $0.5 mmol/L$ 的储存液, $-20^\circ C$ 保存。流式细胞术 (flow cytometry, FCM) 用单抗 (FITC-conjugated mouse anti-human Fas monoclonal antibody and IgG1 isotype control) 和 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit 均为美国 B-D Pharmingen 公司产品。钙离子荧光指示剂 fluo-3/AM ($1 mM$), 购自 Molecular Probes 公司。

1.2 生长抑制实验

采用 MTT 法。HeLa 细胞以 1×10^4 / 孔接种于 96 孔板, 培养 24h 后离心 ($1000 r/min$, $5 min$) 去除原培养液, 加入含 As_2O_3 浓度分别为 $2.5\mu mol/L$ 、 $5.0\mu mol/L$ 、 $7.5\mu mol/L$ 、 $10.0\mu mol/L$ 的 DMEM 培养液 $100\mu L$, 对照组加生理盐水, 空白组只有培养液

收稿日期: 2004-07-19; 修回日期: 2004-12-06

作者单位: 1. 250117 济南, 山东省肿瘤医院基础研究中心, 2. 外一科

不加细胞,每组 5 个复孔。分别于 24h、48h 和 72h 后加入 MTT 磷酸盐缓冲液(5mg/mL) 20 μ L/孔,继续培养 4h,离心弃上清液,加入二甲基亚砜 150 μ L/孔溶解甲臆,于波长 570nm 处,用酶联免疫检测仪测其吸光度(A)值,计算细胞生长抑制率(IR)。IR(%) = [1 - (实验组 A 值 - 空白组 A 值) / (对照组 A 值 - 空白组 A 值)] \times 100%。

1.3 FCM 检测凋亡及 Fas 蛋白表达和 IECa²⁺ 含量

将 1 \times 10⁵/mL 的单细胞悬液接种 6 孔板内,每孔 2mL。24h 后更换培养液,加入终浓度为 2.5 μ mol/L、5.0 μ mol/L 和 10 μ mol/L 的 As₂O₃,对照组加生理盐水。每一浓度设 2 个复孔,分别于 24h、48h 和 72h 收获细胞。

1.3.1 细胞凋亡检测

细胞 4 离心(1 000r/min, 5min)弃上清,冷 PBS 洗涤 2 次,将细胞悬浮于 100 μ L 1 \times Binding Buffer 中,加 5 μ L Annexin V-FITC 和 20 μ L PI,轻轻混匀,避光室温反应 15min,再加 150 μ L 1 \times Binding Buffer 到样品中,混匀后 1h 内上机检测。

1.3.2 Fas 表达的样品制备

1 \times 10⁶/mL 细胞悬液用 PBS 洗涤 2 次后均分为 2 管,分别加入 Fas 单抗和同型对照各 20 μ L,室温避光反应 30min, PBS 漂洗后以 400 μ L PBS 液悬浮,经 300 目尼龙网过滤上机检测。

1.3.3 IECa²⁺ 含量测定^[3]

细胞用无血清的 DMEM 培养液漂洗 2 次后等分为两份。一份(阳性管)加入含 1 μ mol/L fluo-3/AM 无血清的 DMEM 培养液,另一份(阴性管)仅有细胞悬液,不加 fluo-3/AM 液,两者均 37 \circ C 孵育 40min, PBS 洗涤后待检。

1.3.4 流式细胞仪条件

应用美国 B-D 公司 FACS Calibur 型流式细胞仪, Fas 表达以阳性细胞百分率表示, IECa²⁺ 含量以荧光强度(平均道数值)表示。阳性细胞率(%) = 标记阳性细胞数 / 受检细胞总数 \times 100% - 非特异标记细胞%; IECa²⁺ 含量(指数) = 受 fluo-3/AM 作用后细胞荧光强度平均道数 / 无 fluo-3/AM 作用细胞荧光强度平均道数 \times 1 000^[3]。

1.4 统计学分析

用 SPSS(10.0) 统计软件处理。采用 *t* 检验及相关分析。

2 结果

2.1 As₂O₃ 对 HeLa 细胞的生长抑制作用

As₂O₃ 可显著抑制 HeLa 细胞生长(见图 1), 且

抑制作用呈现量效依赖性和时间依赖性(*P* < 0.05), 其 24h、48h 和 72h 的 IC₅₀ 值分别为 8.62 μ mol/L、6.77 μ mol/L 和 4.89 μ mol/L。

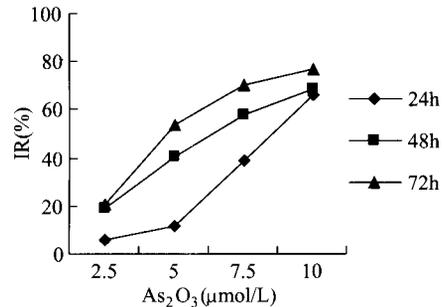


图 1 As₂O₃ 对 HeLa 细胞的生长抑制作用

2.2 As₂O₃ 对 HeLa 细胞凋亡的影响

As₂O₃ 作用 72h 后的 HeLa 细胞凋亡率明显增加, 与对照组比较有显著性差异(*P* < 0.05, 见图 2)。

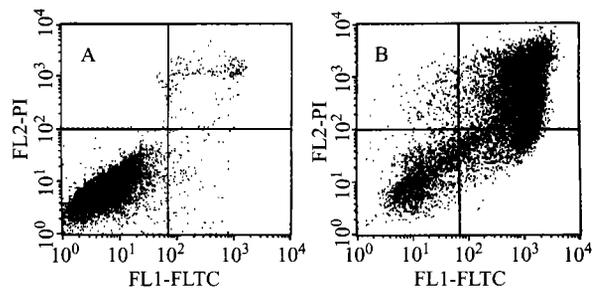


图 2 As₂O₃ 介导 HeLa 细胞凋亡

A 对照组; B 10.0 μ mol/L As₂O₃ 组

2.3 As₂O₃ 对 HeLa 细胞 Fas 蛋白表达的影响

HeLa 细胞经 As₂O₃ 处理后, Fas 蛋白表达明显增加, 与对照组比较具显著差异(*P* < 0.01)。Fas 蛋白上调以 5 μ mol/L As₂O₃ 作用 48h 最明显, 较对照组相比增加了 67% (见图 3)。

表 1 As₂O₃ 对 Fas 表达的影响(%, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μ mol/L)	24h	48h	72h
control	0	53.81 \pm 0.94	55.21 \pm 0.82	55.51 \pm 0.88
As ₂ O ₃	2.5	89.32 \pm 1.27	86.12 \pm 1.06 *	88.51 \pm 0.93 *
	5.0	88.34 \pm 1.19	92.09 \pm 1.03 *	81.71 \pm 1.07 *
	10.0	89.03 \pm 1.07	89.05 \pm 0.98 *	83.56 \pm 1.21 *

与对照组比较, * *P* < 0.01

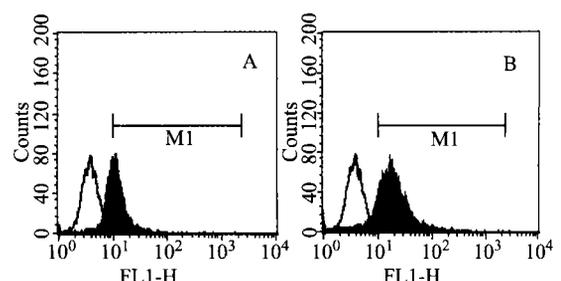


图 3 HeLa 细胞 Fas 表达

白色峰区为 Isotype control, 黑色峰区为 Fas 表达,

M1 区为阳性表达细胞 A 对照组; B 5.0 μ mol/L As₂O₃ 组

2.4 As₂O₃对 HeLa 细胞 IECa²⁺ 含量的影响

由表 2 可见, As₂O₃ 可明显增加 HeLa 细胞 IECa²⁺ 含量,与对照组比较差异显著 (P < 0.01)。IECa²⁺ 含量增加以 10μmol/L As₂O₃ 作用 48h 时最显著,为对照组的 2.77 倍 (见图 4)。

表 2 As₂O₃对 HeLa 细胞 IECa²⁺ 含量的影响(指数, $\bar{x} \pm s$)

组别	剂量 (μmol/L)	24h	48h	72h
对照组	0	26812.65 ± 896.42	24358.72 ± 846.37	25748.96 ± 1108.92
As ₂ O ₃ 组	2.5	42095.86 ± 1002.14 *	66255.27 ± 956.73 *	52527.88 ± 938.64 *
	5.0	34052.07 ± 802.61 *	62358.32 ± 923.18 *	65917.34 ± 894.76 *
	10.0	40312.92 ± 923.46 *	67423.29 ± 891.46 *	63754.28 ± 1031.82 *

与对照组比较, * P < 0.01

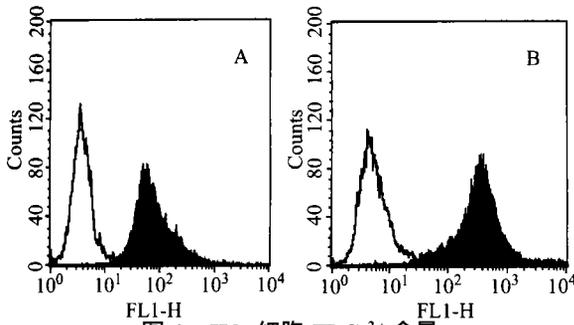


图 4 HeLa 细胞 IECa²⁺ 含量

白色峰区为阴性管 IECa²⁺ 含量,黑色峰区为阳性管 IECa²⁺ 含量
A 对照组;B 5.0μmol/L As₂O₃组

3 讨论

本实验利用 MTT 法观察到 As₂O₃ 可显著抑制 HeLa 细胞生长,与 Uslu 等^[4] 观察 As₂O₃ 对卵巢癌细胞和前列腺癌细胞的作用结果相似。应用 Annexin V 试剂检测发现 As₂O₃ 作用 HeLa 细胞 72h 后凋亡率增高,显示 As₂O₃ 对 HeLa 细胞具诱导凋亡效应。

Fas 基因是重要的凋亡相关基因。当 Fas 与其配体结合后可向细胞内传递凋亡信号,使细胞 DNA 裂解而发生凋亡。本研究发现 As₂O₃ 可显著上调 HeLa 细胞 Fas 表达,黄守国和 Zhu 等应用 As₂O₃ 分别处理卵巢癌耐药细胞株 3A0/cDDP 和白血病/淋巴瘤细胞 HL-60 和 RL 时也发现 Fas 被上调^[5,6]。但 Zhu 等也发现,应用抗 CD95 抗体仅可部分阻断 As₂O₃ 引起的 HL-60 和 RL 凋亡,推测还有其他机

制参与凋亡。Fluo-3/AM 是继 Quin-2、Fura-2 等之后出现的新一代 Ca²⁺ 敏感结合荧光染料,其与 Ca²⁺ 结合后的荧光强度是自由染料的 40 倍,声噪比大^[7]。本研究应用 Fluo-3/AM 发现 As₂O₃ 可上调 IECa²⁺ 含量,Shen 等在用 As₂O₃ 处理食管癌细胞时也发现其可增加胞内 Ca²⁺ 含量和一氧化氮水平^[8]。目前认为 As₂O₃ 升高胞质 Ca²⁺ 浓度的机制可能有: 通过抑制 bcl-2 途径使 Ca²⁺ 通道开放; 降低线粒体跨膜电位使 Ca²⁺ 吸收逆转,导致 Ca²⁺ 由线粒体转移至胞质; 升高细胞内活性氧类 (ROS) 并直接作用于细胞内 Ca²⁺ 转位酶的巯基造成胞内外 Ca²⁺ 平衡失控^[9]。As₂O₃ 通过何种途径上调 HeLa 细胞 IECa²⁺ 含量还需进行相关研究后再下结论。

本研究表明,As₂O₃ 对 HeLa 细胞具有抑制增殖和促凋亡的双重效应,可上调 Fas 蛋白表达和 IECa²⁺ 含量。作为一种传统中药,As₂O₃ 有可能用于宫颈癌的化疗。但其抗肿瘤的确切机制、是否引起宫颈癌细胞耐药及临床应用剂量和疗效方面还需深入研究。

参考文献:

- [1] Shen ZY, Zhang Y, Chen J Y, et al. Intratumoral injection of arsenic to enhance antitumor efficacy in human esophageal carcinoma cell xenografts[J]. *Oncol Rep*, 2004, 11(1): 155-159.
- [2] Du C, Li D, Lin Y, et al. Differentiation of human nasopharyngeal carcinoma xenografts and repression of telomerase activity induced by arsenic trioxide[J]. *Natl Med J India*, 2004, 17(2): 67-70.
- [3] 尹格平, 李云飞, 朱彤宇, 等. 正常孕妇和妊娠高血压综合征患者外周血红细胞内钙含量测定及其临床价值[J]. *中华围产医学杂志*, 2002, 5(1): 18-20.
- [4] Uslu R, Sanli UA, Sezgin C, et al. Arsenic trioxide-mediated cytotoxicity and apoptosis in prostate and ovarian carcinoma cell lines[J]. *Clin Cancer Res*, 2000, 6(12): 4957-4964.
- [5] 黄守国, 孔北华, 马玉燕, 等. 三氧化二砷对人卵巢癌耐药细胞增殖和转移能力的影响[J]. *癌症*, 2002, 21(8): 863-867.
- [6] Zhu J, Okumura H, Ohtake S, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis in leukemia/lymphomas cell lines via the CD95/CD95L system[J]. *Oncol Rep*, 2003, 10(3): 705-709.
- [7] 刘成玉, 尹协瑛. 高血压患者红细胞变形能力与红细胞内钙浓度的关系[J]. *中华老年医学杂志*, 1995, 14(1): 18-20.
- [8] Shen ZY, Shen WY, Chen MH, et al. Nitric oxide and calcium ions in apoptotic esophageal carcinoma cells induced by arsenite[J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1): 40-43.
- [9] Zhang TC, Cao HE, Li JF, et al. Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC 803 cell growth by arsenic trioxide[J]. *Eur J cancer*, 1999, 35(8): 1258-1263.

[编辑: 周永红; 校对: 安 凤]