

三氧化二砷通过诱导结肠癌 LoVo 细胞凋亡和坏死抑制其生长

吴永平, 柳红, 黄艳

(徐州医学院病理学教研室, 江苏 徐州 221002)

摘要:目的 探讨三氧化二砷(As_2O_3)对结肠癌细胞系 LoVo 细胞生长的影响及可能机制。方法 通过肿瘤细胞计数, 观察 As_2O_3 对 LoVo 细胞生长的影响。应用光镜、电镜、流式细胞仪以及生化分析仪, 观察细胞形态学、凋亡细胞峰并测定培养上清液中乳酸脱氢酶(LDH)含量。结果 As_2O_3 明显抑制 LoVo 细胞生长, 并呈时间和剂量依赖关系($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。光镜及电镜下可见典型的细胞凋亡和坏死形态表现。流式细胞仪分析显示: 在 G_1 期前出现亚二倍体的凋亡细胞峰。生化分析测定发现: As_2O_3 浓度为 $2.0 \mu\text{mol/L}$ 时, 培养上清液中 LDH 含量增加($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 As_2O_3 通过诱导 LoVo 细胞凋亡和坏死抑制其生长。

关键词:三氧化二砷; LoVo 细胞; 凋亡; 坏死

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2001)06-0434-04

As_2O_3 inhibits the growth of LoVo cells by inducing apoptosis and necrosis

WU Yong-ping, LIU Hong, HUANG Yan

(Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To study the effect of As_2O_3 on LoVo cell growth. **Methods** The effect of As_2O_3 on LoVo cell growth was studied by tumor cell count. The changes of cell morphology, peak of apoptotic cell count and LDH content in medium were studied by light microscopy and electron microscopy (EMS), flowcytometry analysis and biochemical analysis, respectively. **Results** As_2O_3 evidently inhibited LoVo cell growth in time and dose dependent manners ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Typical morphological manifestations of apoptosis and necrosis were observed in light microscopy and EMS. Hypodiploid cell peak of apoptosis was observed before G_1 phase in flowcytometry. Biochemical analysis showed LDH content increased in the supernatant of the medium containing $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** As_2O_3 inhibits LoVo cell growth by inducing apoptosis and necrosis.

Key words: As_2O_3 ; LoVo cell; apoptosis; necrosis

近年来,用三氧化二砷(As_2O_3)治疗急性早幼粒细胞白血病取得了满意效果,并通过实验研究探讨了其作用机制^[1,2]。而对于占恶性肿瘤绝大部分的实体瘤, As_2O_3 有无治疗作用及其可能的机制则报道较少。本研究观察 As_2O_3 对结肠癌细胞系 LoVo 细胞生长的影响并探讨可能机制,以期为临床应用 As_2O_3 治疗实体瘤提供实验和理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料 癌灵一号注射液(含 1% As_2O_3)购自哈尔滨医科大学附属第一医院,用 RPMI 1640 培养液配成 $100 \mu\text{mol/L}$ 的储备液, -20°C 储存备用。RNase A 及溴化丙锭为 Sigma 公司产品。LoVo 细胞系购自中国科学院上海细胞所。

1.2 方法 取对数生长期的 LoVo 细胞制成 $1 \times 10^8/\text{L}$ 的细胞悬液,加入 As_2O_3 储备液使其终浓度为 0、0.1、0.25、0.5、1.0 和 $2.0 \mu\text{mol/L}$, 将上述各组细胞悬液分装在 10 ml 培养瓶中,每组设 3 个平行样本;另将细胞悬液分装在置有小玻片的 10 ml 培养瓶中。各组细胞放入 37°C 5% CO_2 培养箱中培养,于培养的第 1~7 天逐日取出各组细胞进行细胞计数,每瓶细胞重复计数 4 次取平均值。逐日取出瓶中玻片,10%中性甲醛固定,苏木精-伊红染色及甲基绿-派诺宁染色观察细胞形态。将各组细胞悬液分装在 100 ml 培养瓶中,置 37°C 、5% CO_2 培养箱,于培养的第 4 天取出培养瓶,收集无细胞的培养上清液,用附壁细胞制备单细胞悬液,70%乙醇固定, RNase A 37°C 孵育 30 min, 溴化丙锭染色, 4°C 避光

基金项目: 江苏省教委自然科学基金资助课题(JW970043)

作者简介: 吴永平(1957-),男,江苏南京人,副教授,硕士生导师。

30 min, 置美国 BD 公司生产 FACSCalibur 型流式细胞仪检测亚二倍体的凋亡细胞峰, Olympus AU1000 全自动生化分析仪测培养上清液中乳酸脱氢酶含量。另于培养的第 4 天收集细胞, 500 r/min, 离心 5 min, 细胞团块常规制备电镜标本, 日本 H-600 电子显微镜, 透射电镜观察。

1.3 统计学处理 数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用 *F* 检验及 *q* 检验。检验水准: $\alpha=0.05$ 。

2 结果

2.1 As₂O₃ 对 LoVo 细胞生长的影响 见表 1。表 1 显示 As₂O₃ 对 LoVo 细胞生长的抑制作用呈时间和剂量依赖关系。

2.2 As₂O₃ 诱导 LoVo 细胞凋亡

2.2.1 光镜观察 经苏木精-伊红染色, 在 As₂O₃ 作用组可见单个散在分布的细胞体及细胞核固缩、

深染或者细胞核染色质凝集成块状边集的凋亡细胞; 甲基绿-派诺宁染色细胞质红染, 可区别于坏死细胞, 凋亡细胞在高浓度组较易见; 台盼蓝染色示各组活细胞均大于 95%(图 1, 2)。

2.2.2 电镜观察 电镜下见细胞核染色质凝集成块, 但细胞器结构基本正常(图 3)。

2.2.3 流式细胞仪检测 在 G₁ 峰左侧出现亚二倍体的凋亡细胞峰, 随着 As₂O₃ 的浓度增高, 峰增高(图 4)。

2.3 As₂O₃ 引起 LoVo 细胞坏死 苏木精-伊红染色在高浓度的 As₂O₃ 组见细胞核碎裂、细胞体积增大或细胞溶解的坏死细胞; 电镜下见同样改变; 甲基绿-派诺宁染色细胞质不着色(图 5, 6)。

2.4 生化检测 2.0 μmol/L As₂O₃ 作用后, LoVo 细胞培养上清液中乳酸脱氢酶含量增高, 与其他各组的差别有显著性意义(表 2)。

表 1 不同浓度 As₂O₃ 对 LoVo 细胞生长的影响(×10⁸/L, $\bar{x} \pm s$)

时 间	n	As ₂ O ₃ 浓度(μmol/L)					
		0	0.1	0.25	0.5	1.0	2.0
第 1 天	12	1.02±0.20	1.04±0.18	0.98±0.26	1.00±0.21	0.93±0.23	0.87±0.22
第 2 天	12	1.55±0.24 ^{##}	1.44±0.26 [#]	1.37±0.20	1.28±0.23	1.22±0.28	1.04±0.24
第 3 天	12	2.48±0.51 ^{##▲}	2.36±0.63 ^{##}	2.10±0.34	1.92±0.48	1.78±0.48	1.41±0.45
第 4 天	12	3.49±0.76 ^{##▲▲*}	3.16±0.75 ^{##}	2.79±0.60 ^{##}	2.47±0.58	2.40±0.53	1.73±0.48
第 5 天	12	4.72±1.60 ^{##▲▲}	4.25±1.05 ^{##▲▲}	4.13±1.19 ^{##▲}	3.32±0.82 [#]	2.60±0.47	1.83±0.40
第 6 天	12	5.32±1.68 ^{##▲▲**}	5.18±0.95 ^{##▲▲*}	4.45±0.68 ^{##▲}	3.80±0.56 ^{##}	2.83±0.29	1.64±0.25
第 7 天	12	5.86±1.63 ^{##▲▲***}	5.35±1.38 ^{##▲▲**}	3.98±0.75 ^{##▲}	3.31±0.37 ^{##}	2.59±0.38	1.54±0.33

与 2.0 μmol/L 组比: # *P* < 0.05, ## *P* < 0.01; 与 1.0 μmol/L 组比: ▲ *P* < 0.05, ▲▲ *P* < 0.01; 与 0.5 μmol/L 组比: * *P* < 0.05, ** *P* < 0.01; 与 0.25 μmol/L 组比: ※ *P* < 0.05, ※※ *P* < 0.01

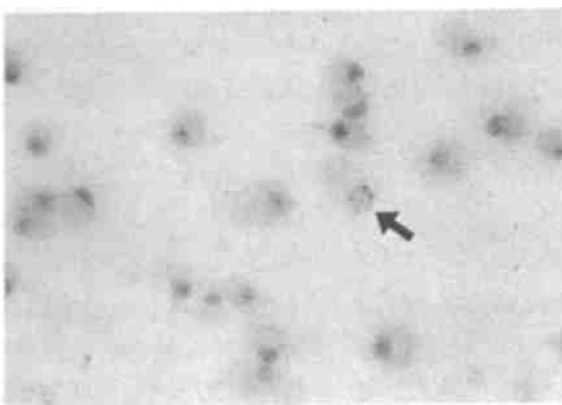


图 1 LoVo 细胞经 As₂O₃ 作用后出现细胞凋亡, 核染色质呈块状(苏木精-伊红染色, ×20)

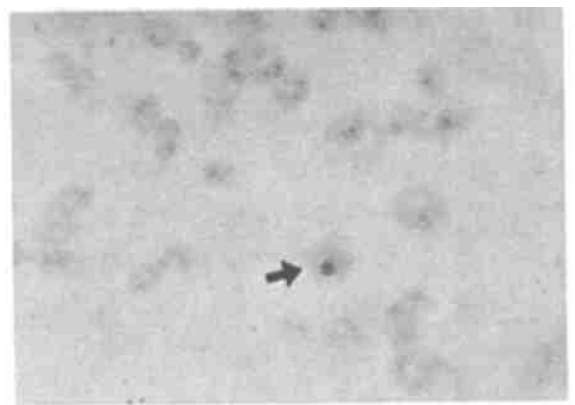


图 2 LoVo 细胞经 As₂O₃ 作用后出现细胞凋亡, 胞质着红色(甲基绿-派诺宁染色, ×20)



图3 LoVo 细胞经 As_2O_3 作用后出现凋亡细胞, 染色质凝集成块、边集, 细胞器基本正常(EM, $\times 4\ 000$)

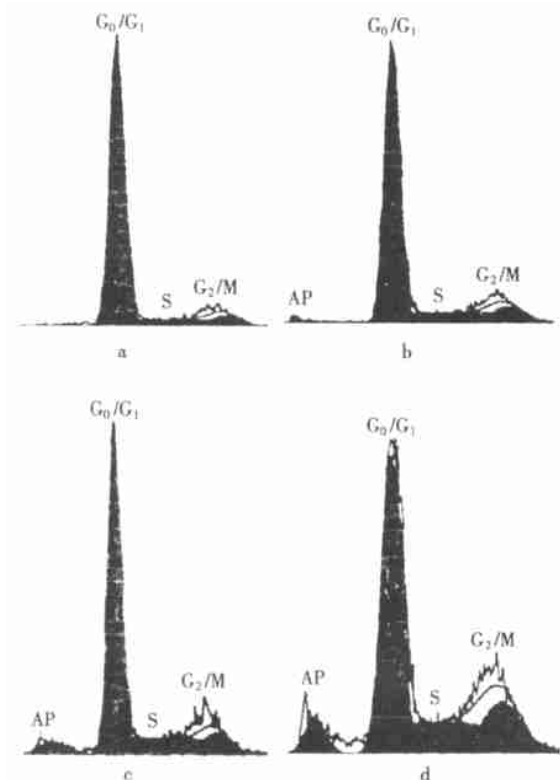


图4 LoVo 细胞与不同浓度 As_2O_3 作用后 4 d 的凋亡细胞峰

a 对照组 b 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组
c 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组 d 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组

表2 LoVo 细胞培养上清液中乳酸脱氢酶含量($\bar{x} \pm s$)

As_2O_3 浓度($\mu\text{mol/L}$)	n	乳酸脱氢酶含量(U/L)
0.00	14	37.36 \pm 3.65 [#]
0.10	14	36.93 \pm 3.85 [#]
0.25	14	37.21 \pm 3.66 [#]
0.50	14	36.93 \pm 3.99 [#]
1.00	14	38.71 \pm 5.76
2.00	14	47.43 \pm 12.04 [▲]

与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: [#] $P < 0.01$; 与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组比较: [▲] $P < 0.05$



图5 高浓度 As_2O_3 引起细胞坏死, 细胞核碎裂、固缩, 胞质不着色(甲基绿-派诺宁染色, $\times 20$)

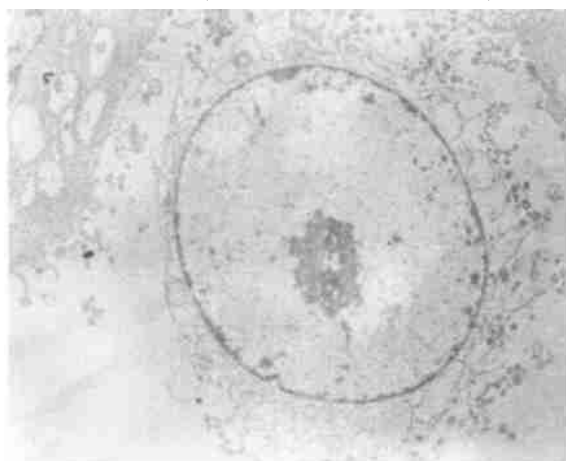


图6 高浓度 As_2O_3 引起细胞坏死, 核溶解, 细胞器破坏(EM, $\times 6\ 000$)

3 讨论

肿瘤的增长与肿瘤细胞的增殖和凋亡之间的平衡有关。某些抗肿瘤药物通过诱导肿瘤细胞的凋亡达到治疗目的。有资料表明, As_2O_3 显示出诱导肿瘤细胞凋亡^[1~3]及引起细胞 G_2-M 期阻滞的作用^[4]。我们在光镜和电镜下观察到, LoVo 细胞经 As_2O_3 作用后, 出现单个散在分布的凋亡细胞, 表现为染色质固缩、聚集在核膜下呈境界分明的颗粒状或形成新月形小体, 细胞质固缩, 但细胞器结构基本完好。流式细胞仪分析在 G_1 峰左侧出现亚二倍体细胞群的峰型, 随着 As_2O_3 浓度增加, 此峰值增高。同时我们还观察到, LoVo 细胞经 As_2O_3 作用后, 出现明显的生长受抑制现象, 这种抑制作用的强弱与 As_2O_3 的浓度和作用时间有关, 在 As_2O_3 浓度为 0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时, 细胞生长开始受到抑制, 至 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时受抑最明显。随着时间的增加抑制作用逐渐明显, 在培养的第 1 天, 各组之间的差异无显著性, 从

第2天起,2.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组细胞数低于对照组和0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组,至第7天时多个浓度组均显示细胞生长抑制。在0.1 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组与对照组之间以及在1.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组与2.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度组之间,细胞生长情况始终未显示出明显差异。此结果可能为临床使用 As_2O_3 治疗肿瘤时选用给药方法及药物剂量提供一定的实验依据。形态学观察,在 As_2O_3 浓度为0.25 $\mu\text{mol/L}$ 时已可见到细胞凋亡,在 As_2O_3 浓度为2.0 $\mu\text{mol/L}$ 时,出现细胞核和胞体溶解,细胞器破坏或消失等细胞坏死的表现。在细胞坏死时,因细胞膜通透性增高或细胞的崩解,细胞内的LDH释放到细胞外,生化分析显示培养上清液中LDH的含量增加,也证实细胞坏死崩解。实验提示低浓度 As_2O_3 通过引起细胞凋亡抑制细胞生长,而高浓度 As_2O_3 还可以引起细胞坏死,以致对细胞生

长的抑制作用最明显。

参考文献:

- [1] 陈国强,朱军,石学耕,等.氧化砷诱导早幼粒细胞白血病细胞凋亡及其分子机制的初步研究[J].中华血液学杂志,1997,18(1):25-28.
- [2] 张鹏,王树叶,胡龙虎,等.三氧化二砷注射液治疗72例急性早幼粒细胞白血病[J].中华血液学杂志,1996,17(2):58-60.
- [3] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) induces NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR2/PML proteins[J]. Blood, 1996,88(3):1052-1061.
- [4] 林晨,邓友平,郑杰,等.三氧化二砷诱导人肿瘤细胞凋亡和 G_2 +M 期阻滞但引起人永生性宫颈上皮细胞 G_1 期阻滞[J].中国医学科学院学报,2000,22(2):124-129.

收稿日期:2001-08-07 修回日期:2001-10-12

本文编辑:孙立杰

三氧化二砷引起人结肠癌 LoVo 细胞 S 期及 G_2 -M 期阻滞

吴永平,孔庆亮,刘莹

(徐州医学院病理学教研室,江苏 徐州 221002)

摘要:目的 研究三氧化二砷(As_2O_3)对人结肠癌 LoVo 细胞株细胞周期的影响,探讨其引起细胞周期改变的可能机制。方法 将结肠癌 LoVo 细胞与不同浓度(0,0.1,0.25,0.5,1.0及2.0 $\mu\text{mol/L}$)的 As_2O_3 共同培养96h,应用流式细胞仪、电子显微镜和光学显微镜观察 LoVo 细胞的细胞周期分布及形态学改变。结果 与低浓度组比较,高浓度(2.0 $\mu\text{mol/L}$)的 As_2O_3 引起 LoVo 细胞 S 期及 G_2 -M 期阻滞($P<0.05$ 或 $P<0.01$);形态学观察到细胞核分裂增多,体积增大,细胞内微管减少。结论 As_2O_3 引起 LoVo 细胞 S 期及 G_2 -M 期阻滞,可能与 As_2O_3 抑制了 DNA 合成和微管的聚合有关。

关键词:氧化砷;LoVo 细胞;细胞周期;微管

中图分类号:R735.35 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-2065(2001)06-0437-03

Arsenic trioxide induces LoVo cells S phase and G_2 -M phase arrest

WU Yong-ping, KONG Qing-yan, LIU Ying

(Department of Pathology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To study the effects of As_2O_3 on cell cycle of LoVo cells and to probe the possible mechanism. **Methods** Cultivated LoVo cells with different concentration (0, 0.1, 0.25, 0.5, 1.0 and 2.0 $\mu\text{mol/L}$) of As_2O_3 for 96 hours. To observe the changes of cell cycle phase distribution and morphology, using flow cytometer, electron microscope (EMS) and light microscope. **Results** High concentration of As_2O_3 can induce synthesis phase (S phase), gap 2 phase (G_2 phase) and mitosis phase (M phase) arrest of LoVo cells ($P<0.05$, $P<0.01$). Morphologically, we can see that the number of mitosis is increased, the volume of the cells is enlarged and the intracellular microtubules are decreased. **Conclusion** Arrest of S phase and G_2 -M phase of LoVo cells were induced by As_2O_3 . The reason is that As_2O_3 may have impact on composition of DNA and microtubules aggregation.

Key words: arsenic trioxide; LoVo cell; cell cycle; microtubules

基金项目:江苏省高校科研项目课题经费资助(JW970043)

作者简介:吴永平(1957-),男,江苏南京人,副教授,硕士生导师。