

As₂O₃ 引起 LoVo 细胞内钙离子浓度增高及意义*柳红¹, 黄建², 李志刚¹

(1. 徐州医学院病理学教研室, 江苏 徐州 221002; 2. 徐州医学院附属医院中心实验室)

摘要:目的 观察 LoVo 细胞株经 As₂O₃ 作用后细胞内钙离子浓度的改变并探讨其意义。方法 应用流式细胞仪观察亚二倍体细胞峰并检测 LoVo 细胞内的钙离子浓度。应用光镜、电镜观察 As₂O₃ 对 LoVo 细胞生长的抑制作用、凋亡细胞形态和线粒体形态。结果 ①As₂O₃ 引起细胞内 Ca²⁺ 浓度升高 ($P < 0.01$), 呈剂量依赖关系 ($P < 0.01$ 或 0.05), 在 2.0 μmol/L 组 Ca²⁺ 浓度最高; ②在各时间段, 对照组的 Ca²⁺ 浓度无变化 ($P > 0.05$), 而经 As₂O₃ 作用后 Ca²⁺ 浓度出现变化 ($P < 0.01$ 或 0.05), 在 20 min 时 Ca²⁺ 浓度均已增高, 10 h 时增高最明显, 至 24 h, 0.5 μmol/L Ca²⁺ 浓度回复到 20 min 时的水平, 1.0 和 2.0 μmol/L 组则低于 20 min 时的浓度; ③As₂O₃ 抑制 LoVo 细胞生长; ④LoVo 细胞经 As₂O₃ 作用后在光镜、电镜下出现细胞凋亡的形态学改变, 并见线粒体肿大、嵴破坏或消失。流式细胞仪检测发现高浓度组凋亡细胞数高于对照组和低浓度组 ($P < 0.01$ 或 0.05)。结论 As₂O₃ 作用于 LoVo 细胞引起细胞内钙离子浓度增高, 可能通过引起线粒体功能的改变而诱导细胞凋亡。

关键词: 氧化砷; LoVo 细胞株; 钙离子; 凋亡; 线粒体**中图分类号:** R735.35 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-2065(2003)04-0289-04

The increase of intracellular calcium induced by As₂O₃ in LoVo cells and its therapeutical significance

LIU Hong, HUANG Jian, LI Zhi-gang

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

Abstract: Objective To study the change of intracellular calcium level induced by As₂O₃ in LoVo cells and its significance. **Methods** The hypodiploid cell peak and the intracellular calcium level were determined by flowcytometry. The growth inhibition of LoVo cells and the morphology of apoptotic cells and mitochondria were studied under light microscope and electron microscope. **Results** (1)As₂O₃ induced an increase of intracellular calcium ($P < 0.01$) in dose-dependent manner ($P < 0.01$ or 0.05), with the calcium level highest in the 2.0 μmol/L test group. (2)The calcium level in control group was steady throughout the experiment. The As₂O₃-induced increase of calcium level was evident in 20 min, reached its peak at 10 h, and declined after 24 hours, approximating the calcium level at 20 min in the 0.5 μmol/L group and a little bit lower than that in the 1.0 and 2.0 μmol/L groups ($P < 0.01$ or 0.05). (3)The growth of LoVo cells was inhibited by As₂O₃. (4)Microscopic studies showed As₂O₃ induced apoptotic and mitochondrial changes. Flowcytometry showed the frequency of apoptotic cells was proportional to the concentration of As₂O₃ in the culture fluid ($P < 0.01$ or 0.05). **Conclusion** As₂O₃ may cause the intracellular calcium to increase in LoVo cells, affect the mitochondrial functions and induce apoptosis of the cells.

Key words: As₂O₃; calcium; apoptosis; mitochondria

已有实验和临床资料证实三氧化二砷(As₂O₃)能明显抑制肿瘤细胞生长, 有效地治疗肿瘤, 并从不同的侧面探讨了其抑制肿瘤细胞生长的机制。Ca²⁺在癌细胞凋亡中的作用已有报道^[1,2], 但经 As₂O₃ 作用后肿瘤细胞内 Ca²⁺ 的改变及意义则极少见报道。我们观察了人结肠癌 LoVo 细胞株与 As₂O₃ 共同培养后细胞内钙离子浓度的改变并探讨其意义。

1 材料和方法

1.1 材料 癌灵一号注射液(含 1%As₂O₃)购自哈尔滨医科大学附属第一医院, 用 1640 培养液配成 100 μmol/L 的储备液, -20 °C 储存备用。RNase A、溴化丙锭及 Fluo³-AM 为 Sigma 公司产品。LoVo 细胞购自中科院上海细胞所。

* 基金项目: 江苏省高校科研项目经费资助(JW970043)

作者简介: 柳红(1953—), 女, 山东平邑人, 教授, 硕士

1.2 LoVo 细胞培养及细胞悬液制备 LoVo 细胞培养于 37℃、5% CO₂ 培养箱, 取对数生长期的细胞制备成 1×10⁸ 个/L 的细胞悬液。

1.3 光镜观察方法 取细胞悬液加入 As₂O₃ 储存液, 使其终浓度分别为 0、0.1、0.25、0.5、1.0 及 2.0 μmol/L, 将上述各组细胞悬液分装在置有小玻片的 10 ml 培养瓶中, 每组 7 瓶; 置 37℃、5% CO₂ 培养箱培养, 于培养的第 1~7 天逐日取出各组 1 瓶细胞中的玻片, 10% 中性甲醛固定, 用苏木精-伊红及甲基绿-派诺宁染色观察细胞形态。

1.4 电镜观察 将上述各组细胞悬液分装在 100 ml 培养瓶中, 置 37℃、5% CO₂ 培养箱, 于培养的第 4 天取细胞, 制备单细胞悬液, 离心 500 r/min, 细胞团块常规制备电镜标本, 日本 H-600 电子显微镜观察。

1.5 流式细胞仪检测 待测细胞制备单细胞悬液, 70% 乙醇固定, RNase A 37℃ 孵育 30 min, 溴化丙锭

染色 4℃ 避光 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。分别于 20 min、2 h、10 h 及 24 h 收集各组细胞, Fluo3-AM, 37℃ 避光负载 30 min 置流式细胞仪测 Ca²⁺ 荧光强度, 反映 Ca²⁺ 浓度。

1.6 统计学处理 各组数据均数以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计方法选用 F 检验及 q 检验。

2 结果

2.1 As₂O₃ 引起细胞内 Ca²⁺ 浓度升高 见表 1。

2.1.1 As₂O₃ 浓度的影响 对照组细胞内的 Ca²⁺ 浓度与其他各组之间的差异均有显著性, 经 As₂O₃ 作用后细胞内 Ca²⁺ 浓度增加; 在 2.0 μmol/L 组细胞内 Ca²⁺ 浓度最高, 与其他各组的差异具有显著性; 各剂量组之间细胞内 Ca²⁺ 浓度的差异亦有显著性, 显示出剂量依赖关系。

表 1 As₂O₃ 引起细胞内 Ca²⁺ 浓度变化 ($\bar{x} \pm s$)

时 间	n	As ₂ O ₃ 浓度(μmol/L)			
		0	0.5	1.0	2.0
20 min	10	8.73±1.54 ^{1,2,3}	13.10±1.29 ^{1,2}	19.96±2.09 ¹	29.54±3.75
2 h	10	7.88±1.50 ^{1,2,3}	12.68±1.43 ^{1,2}	21.87±1.72 ¹	25.95±3.19
10 h	10	8.97±1.17 ^{1,2,3}	17.92±2.25 ^{1,2,①}	24.91±3.68 ^{1,④}	30.58±4.22 ^⑦
24 h	10	8.15±1.06 ^{1,2,3}	12.31±1.78 ^{1,2}	16.54±1.95 ^{1,②,③}	21.28±2.52 ^{⑤,⑥}

1. 与 2.0 μmol/L 组相比, P < 0.01; 2. 与 1.0 μmol/L 组相比, P < 0.01; 3. 与 0.5 μmol/L 组相比, P < 0.01;

①: 与 20 min、2 h 和 24 h 时相比, P < 0.01; ②: 与 20 min、2 h 和 10 h 时相比, P < 0.01; ③: 与 20 min 时相比, P < 0.05;

④: 与 20 min 时相比, P < 0.01; ⑤: 与 20 min 和 10 h 时相比, P < 0.01; ⑥⑦: 与 2 h 时相比, P < 0.05

2.1.2 As₂O₃ 作用时间的影响 在各时间段对照组细胞内 Ca²⁺ 浓度的差异无统计学意义; As₂O₃ 各浓度组在 20 min 时细胞内 Ca²⁺ 浓度均已增高, 10 h 增高最明显, 至 24 h, 0.5 μmol/L 组 Ca²⁺ 浓度回复到 20 min 时的水平, 1.0 和 2.0 μmol/L 组则低于 20 min 时的浓度, Ca²⁺ 浓度的差异有显著性。

2.2 As₂O₃ 诱导 LoVo 细胞凋亡

2.2.1 光镜观察 见图 1、2。经 H-E 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%。

2.2.2 电镜观察 见图 3。经 As₂O₃ 作用后, 于电镜下可见细胞核染色质凝集成块的凋亡细胞, 细胞

器结构基本完好。

2.2.3 流式细胞仪检测凋亡细胞 见表 2。高浓度组(2.0 及 1.0 μmol/L)与对照组及低浓度组之间凋亡细胞数的差异有显著意义。

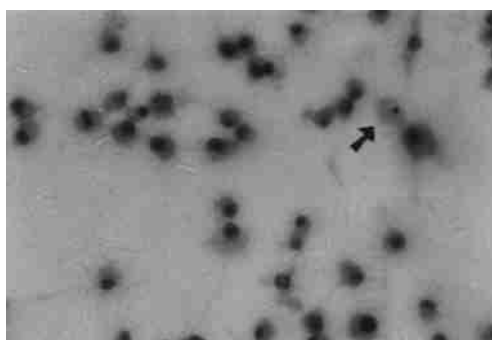


图 1 经 As₂O₃ 作用组的 LoVo 细胞出现凋亡 (H-E, ×20)

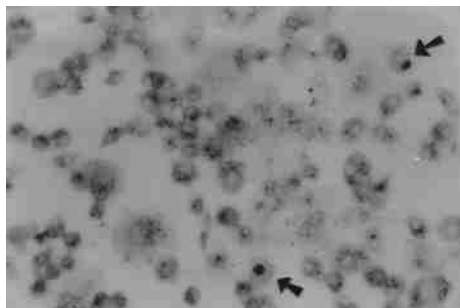


图2 As₂O₃ 诱导 LoVo 细胞凋亡,核固缩 (甲基绿-派诺宁染色, ×20)

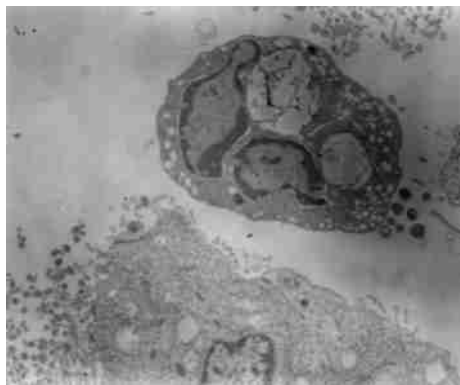


图3 As₂O₃ 引起 LoVo 细胞凋亡,核染色质凝集成块 (EM, ×6 000)

表2 LoVo 细胞经不同浓度的 As₂O₃ 作用后的凋亡细胞数($\bar{x} \pm s$)

As ₂ O ₃ ($\mu\text{mol/L}$)	<i>n</i>	凋亡细胞数(%)
0.00	8	0.31±0.29 ^{1,2}
0.10	8	0.50±0.35 ³
0.25	8	0.64±0.35 ⁴
0.50	8	0.90±0.55
1.00	8	1.79±1.29
2.00	8	4.64±2.34

与 2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 1,3; $P < 0.01$; 4; $P < 0.05$

与 1.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 2; $P < 0.01$

0.50 $\mu\text{mol/L}$ 组与对照组相比, $P = 0.057$; 0.5 $\mu\text{mol/L}$ 组与

2.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, $P = 0.053$

2.3 As₂O₃ 引起线粒体病变 见图 4、5。经 As₂O₃ 作用组线粒体肿胀、嵴破坏消失,对照组线粒体结构正常。

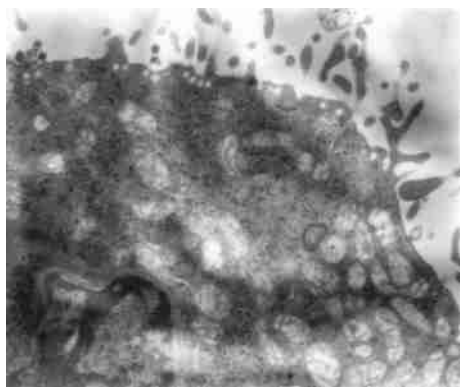


图4 对照组的线粒体 (EM, ×15 000)

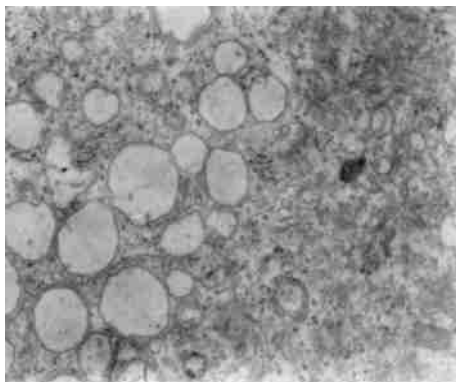


图5 As₂O₃ 引起线粒体肿胀,嵴消失 (EM, ×15 000)

3 讨论

As₂O₃ 是中药砒石的主要成分,我国应用它治疗恶性肿瘤的历史久远。近年来,国内对 As₂O₃ 的抗癌机制进行了研究,认为它可诱导肿瘤细胞凋亡^[3]。我们的实验也观察到类似结果,经不同浓度的 As₂O₃ 作用后的 LoVo 细胞生长受到不同程度的抑制,形态学观察和流式细胞仪分析证实有细胞凋亡^[4]。为了进一步探讨细胞生长受抑制的可能机制,本实验从信号转导分子 Ca²⁺ 的改变着手进行研究,发现 LoVo 细胞与 As₂O₃ 共同培养后细胞内 Ca²⁺ 浓度增高,且表现出剂量和时间依赖关系。随着 As₂O₃ 浓度的增加, Ca²⁺ 浓度逐渐增高,经 As₂O₃ 作用 20 min 时检测 Ca²⁺ 浓度已明显增高,至 10 h 达高峰,24 h 恢复到或低于其 20 min 时的水平,但仍然明显高于对照组的浓度。线粒体是细胞的能量供应站,同时也是细胞的钙库。线粒体在细胞凋亡中发挥重要作用,在线粒体膜上有通透性转运孔(permeability transition pore, PTP),线粒体过量地吸取 Ca²⁺ 可导致 PTP 病理性高通透性开放,进而导致线粒体跨膜电位($\Delta\Psi_m$)下降和促凋亡因子(如细胞色素 C 与凋亡诱导因子)自线粒体释放入胞质,并激活一些凋亡效应分子,如半胱氨酸蛋白酶家族成员(caspases),从而诱导细胞的凋亡^[5~7]。结果显示 LoVo 细胞在与 As₂O₃ 共同培养后早期即出现 Ca²⁺ 浓度明显升高。由于 Ca²⁺ 浓度的改变可能改变了线粒体的功能,为 As₂O₃ 诱导细胞凋亡的机制之一,线粒体膜通透性改变和跨膜电位改变使线粒体肿胀。有研究发现食管癌细胞经 As₂O₃ 作用后早期出现线粒体增生和肿胀,12 及 24 h 线粒体外形结构不清^[8]。我们也观察到经 As₂O₃ 作用后 LoVo 细胞的线粒体肿胀、嵴破坏的现象。LoVo 细胞在与 As₂O₃ 共同培养后出现的细胞内 Ca²⁺ 浓度升高,至 24 h 仍

维持在高水平。细胞内 Ca^{2+} 浓度持续增加能促发内切酶的活性,也可导致细胞凋亡。因此,细胞内 Ca^{2+} 浓度增高在细胞凋亡的发生中有重要意义。

参考文献:

[1] 邢承忠,陈峻青,徐惠绵.胃癌细胞凋亡过程中胞内 Ca^{2+} 和磷酸肌醇浓度的改变[J].中华肿瘤杂志,1999,21(4):256—258.

[2] Li M, Kondo T, Zhao QL, et al. Apoptosis induced by cadmium in human lymphoma U937 cells through Ca^{2+} -calpain and caspase-mitochondria-dependent pathways[J]. J Biol Chem, 2000, 275(50): 39702—39709.

[3] 陈国强,朱军,石学耕,等.氧化钾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].中华血液病杂志,1997,18(1):25—28.

[4] 吴永平,柳红,黄艳.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[J].徐州医学院学报,2001,21(6):434—437.

[5] Huang X, Zhai D, Huang Y. Study on the relationship between calcium-induced calcium release from mitochondria and PTP opening[J]. Mol Cell Biochem, 2000, 213(1—2):29—35.

[6] Hajnoczky G, Csordas G, Madesh M, et al. Control of apoptosis by IP(3) and ryanodine receptor driven calcium signals[J]. Cell Calcium, 2000, 28(5—6):349—363.

[7] Gennari A, Viviani B, Galli CL, et al. Organotins induce apoptosis by disturbance of $[Ca^{2+}]_i$ and mitochondrial activity, causing oxidative stress and activation of caspases in rat thymocytes[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2000, 169(2):185—190.

[8] 沈忠英,沈健,陈铭华,等.氧化钾诱导食管癌细胞凋亡线粒体形态改变[J].中华病理学杂志,2000,29(3):200—203.

收稿日期:2003—04—25 修回日期:2003—06—22

本文编辑:程春开

异种生物瓣膜组织宿主内皮细胞生长形态特征观察*

董红燕¹,张中明²,于红丽¹,王婷¹,徐夏红¹

(1.徐州医学院神经生物学研究中心,江苏徐州 221002;2.徐州医学院附属医院心胸外科)

摘要:目的 观察血流切应力对植入的异种生物瓣膜组织宿主内皮细胞的生长形态和排列的影响。方法 将戊二醛和 L-谷氨酸(L-G)处理的牛心包片进行体外内皮细胞种植培养,并同时将同样处理的牛心包片置于猪的右心房近三尖瓣处,扫描电子电镜观察心包片宿主内皮细胞生长的形态学特征。结果 牛心包片体外内皮细胞种植培养及猪右心房三尖瓣处移植后,心包片表面内皮细胞生长良好。体内移植牛心包片内皮细胞从缝合端向游离端生长 15 天的过程中,细胞形态和排列随着血流机械应力的影响,细胞从近似圆形铺路石状逐渐向长梭形变化。缝合端内皮细胞呈一致的长梭形,内皮细胞生长区中部细胞呈梭形、卵圆形、圆形混杂,内皮细胞生长端细胞呈铺路石状,与培养板孔中培养的心包片表面连续单层内皮细胞(来源于人脐静脉内皮细胞)形态一致。结论 在在体状态下,处于三尖瓣处的异种生物瓣膜上的内皮细胞经血流作用,变形为长梭形,排列方向趋向于血流切应力作用的方向,内皮细胞生长的形态学时相改变与体外培养不同。

关键词:异种生物瓣膜;内皮细胞;形态;切应力;约克夏猪

中图分类号:R364.4 **文献标识码:**A **文章编号:**1000—2065(2003)04—0292—04

The morphometric features of the host's endothelial cellson xenograft

DONG Hong-yan, ZHANG Zhong-ming, YU Hong-li, et al

(Centre of Neurobiological Research, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

Abstract: Objective To investigate the influence of the hemodynamic force on the morphometric feature and arrangement of host endothelial cells over the xenograft in vivo. **Methods** Bovine pericardium flap treated with 0.5% glutaraldehyde and 8% L-glutamic acid was implanted in the culture of human vascular endothelial cells harvested from umbilical vein in vitro. Meanwhile, the pericardium flap treated the same way was implanted into the pig right atrium in vivo. The morphometric features of the implanted bovine pericardium were studied under scanning electron microscopy 15 days later. **Results** Morphological analysis demonstrated that the growth of endothelial cells over the bovine pericardium was good enough both in vitro and in vivo.

* 基金项目:江苏省教委自然科学基金资助项目(98K8 320008)

作者简介:董红燕(1956—),女,辽宁盖县人,副教授,学士。