

三氧化二砷诱导宫颈癌细胞凋亡与 Fas/FasL 表达的研究*

★ 杜晓梅¹ 高国兰² 陈文学¹ 黄传生¹ 邹学森¹ (1. 南昌大学第四附属医院妇产科 南昌 330001; 2. 江西省肿瘤医院妇产科 南昌 330029)

摘要:目的:研究三氧化砷(Arsenic trioxide, As₂O₃)体外诱导宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞株凋亡作用及凋亡相关机制。方法:采用凝胶电泳、流式细胞术等方法进行凋亡检测,免疫组织化学方法检测 As₂O₃ 诱导对宫颈癌 HeLa 和 SiHa 细胞株细胞 Fas 和 FasL 表达的影响。结果:2.5 μmol/L 和 5 μmol/L 浓度的 As₂O₃ 作用 SiHa 和 HeLa 细胞株 48 h 可以观察到细胞出现典型的凋亡变化。琼脂糖凝胶电泳 DNA 片段观察到 DNA 梯形条带。流式细胞仪分析细胞凋亡率显示,As₂O₃ 诱导两种细胞株凋亡具有剂量和时间依赖性($P < 0.05$)。而且细胞免疫组化显示 As₂O₃ 诱导两种细胞株凋亡同时上调 Fas 蛋白表达($P < 0.05$)。5 μmol/L 浓度的 As₂O₃ 诱导 HeLa 细胞株凋亡过程同时伴 FasL 蛋白表达明显上调($P < 0.05$)。结论:As₂O₃ 能诱导 SiHa 和 HeLa 细胞株凋亡,其机制可能与 Fas 基因的表达上调有关。

关键词:三氧化二砷;宫颈肿瘤;凋亡;Fas;FasL

中图分类号:R 979.1 **文献标识码:**A

Study on the Apoptosis of Cervical Cancer Cell by Arsenic Trioxide and the Expression of Fas/FasL

DU Xiao-mei¹, GAO Guo-lan², CHEN Wen-xue¹, HUANG Chuan-sheng¹, ZOU Xue-seng¹

1. Department of Obstetrics and Gynecology, Fourth Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330001

2. Department of Obstetrics and Gynecology, Jiangxi Cancer Hospital, Nanchang 330029

Abstract: Objective: To study the mechanism of apoptosis on cervical cancer cell lines (HeLa and SiHa) by As₂O₃. Methods: The DNA fragmentation analysis was determined by the gel electrophoresis. The cell apoptosis ration was measured by flow cytometry (FCM). Cell immunohistochemical method was given to detect the expression of apoptosis-related protein Fas and Fas ligand. Results: We can observe the typical apoptotic cells in the concentrations of 2.5 μmol/L and 5 μmol/L As₂O₃ after 48 h treatment. DNA Ladder was seen. The result of FCM assay demonstrated: the apoptosis induced by As₂O₃ was time dose-dependent ($P < 0.05$). As₂O₃ (2.5 μmol/L, 5 μmol/L) could significantly upregulate the expression of Fas on the two cell lines ($P < 0.05$), 5 μmol/L As₂O₃ also up regulated the expression of FasL on HeLa cell lines ($P < 0.05$). Conclusions: Apoptosis does occur on cervical carcinoma cell lines induced by As₂O₃. The upregulation of Fas maybe one of the main mechanisms of apoptosis on cervical cancer cell lines by As₂O₃.

Key words: Arsenic trioxide; Cervical neoplasms; Apoptosis; Fas; FasL

目前 As₂O₃ 已经用于白血病和肝癌的临床治疗,研究发现 As₂O₃ 具有选择性强、骨髓抑制作用小以及与多种化疗药物无交叉耐药性等优点^[1~3]。但有关 As₂O₃ 在体外对宫颈癌细胞的作用机制报道较少。因此本实验以宫颈鳞癌 SiHa

和宫颈腺癌 HeLa 细胞株为研究对象。观察 As₂O₃ 诱导两种宫颈癌细胞株的凋亡效应,并初步探讨 As₂O₃ 对凋亡相关蛋白 Fas 和 FasL 表达的影响。

1 材料与方

* 基金项目:江西省卫生厅基金资助项目(2005a08)

1.1 主要实验材料 As_2O_3 为美国 Sigma 公司产品,用生理盐水配制成 1 mmol/L 的贮存液, $-20^{\circ}C$ 贮存,使用前用 RPMI-1640 培养基稀释至所需要浓度。DNA-MARKER(大连博宝生物有限公司)。Fas 抗体、FasL 抗体均为兔抗人多克隆抗体(浓缩型)试剂盒(均为 Santa Cruz 公司产品),一抗稀释度均为 1:150。

1.2 实验细胞株及培养 宫颈癌鳞癌细胞株(SiHa),购自中国科学院上海细胞生物研究所。宫颈腺癌细胞株(Hela),由江西省肿瘤研究所提供。两种宫颈癌细胞均采用含 10% 的小牛血清的 RPMI-1640 培养基,于 $37^{\circ}C$ 、5% CO_2 、95% 湿度条件下传代培养,实验时选用对数生长期细胞。

1.3 主要仪器 流式细胞仪为美国 Beckman Coulter 公司,电泳仪为北京六一器械厂。

1.4 细胞生化观察-DNA 凝胶电泳 将 1.25、2.5、5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 及对照细胞组培养 24、48、72 h 后消化为 $1 \times 10^6/ml$ 后收集到离心管内。高速离心洗涤后加入约 50 μl 细胞裂解液并混匀,于 $37^{\circ}C$ 水浴保温 24 h。用酚 $\rightarrow$ 氯仿 $\rightarrow$ 异戊醇依次抽提。用 1/10 体积 3 mmol/L 的醋酸钠和 2 倍体积的 95% 冷乙醇沉淀 DNA,将 DNA 融解于 TE 缓冲液中。2% 的琼脂糖凝胶,80V 电压,电泳 3 h,紫外线下观察。

1.6 流式细胞仪检测细胞凋亡率 将 1.25、2.5、5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 及对照细胞组培养 24、48、72 h 后消化为 $2 \times 10^4/ml$,加入 70% 冷乙醇 5 ml 固定,反复离心并弃上清,加入 RNA 酶及 PI 染液混匀。于室温避光 30 min 后上机分析,检测细胞 DNA 含量。

1.7 细胞免疫组化检测凋亡相关蛋白 Fas/FasL 的表达-SP 法 将 1.25、2.5、5 $\mu mol/L$ 浓度 As_2O_3 及对照细胞组细胞培养 48 h 的细胞爬片经 PBS 洗涤。加入 10% 冷甲醇固定按试剂实用说明 SP 法。染色结果按文献采用 HSCORE 积分计算^[4]。

1.8 统计学方法 所有数据使用 SPSS10.0 软件进行 t 检验及相关性分析。

2 结果

2.1 琼脂糖凝胶电泳检测细胞 DNA 片断 对照组 SiHa 和 Hela 细胞株培养 24、48、72 h,琼脂糖凝胶电泳仅观察到离加样孔很近的 DNA 条带。当 2.5 和 5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 作用 SiHa 和 Hela 细胞株 48 h,通过凝胶电泳观察到典型的凋亡梯状条带。1.25、2.5、5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 分别作用 SiHa 和 Hela 细胞株 72 h,可见血涂片样条带。

2.2 流式细胞仪检测细胞凋亡率 随着 As_2O_3 作用时间延长和药物浓度增大,细胞凋亡率增大。细胞凋亡率与 As_2O_3 作用浓度及时间呈正相关($P < 0.05$)。相同浓度相同时间 As_2O_3 诱导 Hela 细胞株凋亡作用强于 SiHa 细胞株($P < 0.05$)。

2.4 细胞免疫组化检测细胞凋亡相关蛋白 Fas/FasL 的表达 细胞免疫组化结果显示 Fas/FasL 蛋白表达主要位于细胞膜/细胞浆。Fas/FasL 蛋白在两种宫颈癌细胞株中均低表

达。但当 2.5 $\mu mol/L$ 和 5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 作用 SiHa 细胞株 48 h 后,观察到细胞 Fas 蛋白表达明显增加,HSCORE 积分与对照组相比有显著性差异($P < 0.05$),而 FasL 蛋白表达与对照组相比无明显差异($P > 0.05$)。2.5 和 5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 作用 Hela 细胞株 48 h 后,Fas 蛋白表达均明显上调($P > 0.05$);同时 5 $\mu mol/L$ 浓度 As_2O_3 作用 Hela 细胞株 48 h 后,FasL 蛋白表达明显增加($P < 0.05$)。

3 讨论

细胞凋亡是各种内外信号激活细胞死亡程序后发生的一种自杀现象,同细胞增殖和分化一样,细胞凋亡是生物体维持自我稳态的重要机制。当细胞凋亡受阻,将导致肿瘤的发生。凋亡细胞具有其独特的生化学特征,不同于细胞坏死。我们通过 DNA 凝胶电泳观察到 2.5 和 5 $\mu mol/L$ 浓度的 As_2O_3 作用两种宫颈癌细胞株 48 h 后细胞凋亡的发生。同时流式细胞仪从半定量的角度分析细胞凋亡率,发现对照组细胞也有凋亡峰出现,这表明在正常细胞也存在细胞凋亡,但对对照组细胞凋亡率均低于 9%。随着 As_2O_3 药物浓度的增大和作用时间的延长,细胞凋亡峰值明显增加。而且发现相同浓度相同时间 As_2O_3 诱导 Hela 细胞株凋亡强于 SiHa 细胞株。

Fas 和 FasL 是参与细胞凋亡的重要基因。表达 Fas 的细胞与 Fas 抗体或自然存在的 FasL 以三聚体形式结合后,可活化并传导细胞凋亡信号,触发 Fas 所在靶细胞数小时内凋亡。细胞表面 Fas 抗原表达达到临界水平是 Fas/FasL 系统诱导细胞凋亡易感性的首要条件,而细胞凋亡受阻将导致肿瘤的发生。本实验研究结果表明 As_2O_3 诱导两种宫颈癌细胞株凋亡同时明显上调 Fas 蛋白表达($P < 0.05$)。较高浓度的 As_2O_3 同时能够上调宫颈腺癌 Hela 细胞株 FasL 蛋白表达($P < 0.05$);而 As_2O_3 诱导 SiHa 细胞株凋亡前后,FasL 蛋白表达无明显改变($P > 0.05$)。因此推测 As_2O_3 能够诱导宫颈癌细胞凋亡,其分子机制可能与 As_2O_3 上调宫颈癌细胞 Fas 蛋白表达有关。对于较高浓度 As_2O_3 是否能够通过上调 FasL 蛋白表达导致肿瘤免疫逃逸发生,促进宫颈腺癌细胞的转移尚须进一步研究。

上述实验结果表明 As_2O_3 能够诱导两种宫颈癌细胞株凋亡,其机制可能在于上调细胞内 Fas 基因表达来实现,确切机制有待于进一步研究证实。 As_2O_3 对宫颈癌可能有潜在治疗价值。

参考文献

- [1] Mathews V, George B, Lakshmi KM, et al. Single agent arsenic trioxide in the treatment of newly diagnosed acute promyelocytic leukemia: durable remissions with minimal toxicity[J]. Blood, 2006, 107: 2627-2632.
- [2] Karlsson J, Ora I, Porn-Ares I, et al. Arsenic trioxide-induced death of neuroblastoma cells involves activation of Bax and does not require p53[J]. Clin Cancer Res, 2004, 10(9): 3179-3188.
- [3] 邓志华,蔡洪培,李石,等. 三氧化二砷对正常肝细胞及肝癌细胞株的影响[J]. 中华消化杂志, 1999, 19(4): 227-229.

(收稿日期:2007-11-21)