

DOI:10.3724/SP.J.1008.2010.01255

· 短篇论著 ·

厌氧加强三氧化二砷对 A549 细胞 G₁ 期的阻滞作用

Anaerobic condition reinforces G₁ phase arrest of A549 cells caused by arsenic trioxide

刘永安¹, 修清玉¹, 臧远胜¹, 曲歌平¹, 张玲珍², 李兵^{1*}

1. 第二军医大学长征医院呼吸内科, 上海 200003

2. 第二军医大学长征医院实验诊断科, 上海 200003

[摘要] **目的** 观察低浓度三氧化二砷(As₂O₃)在不同氧环境下对肺癌 A549 细胞增殖抑制、细胞周期阻滞、细胞凋亡的诱导作用。**方法** 分别在常氧(21% O₂)、低氧(5% O₂)、厌氧(0% O₂)环境利用 0 μmol/L As₂O₃ (空白对照组)、1 μmol/L As₂O₃、1 μmol/L VP-16 体外诱导培养肺癌 A549 细胞 24 h, 通过甲基噻唑基四唑(methyl thiazolyl tetrazolium, MTT)法测细胞增殖抑制率, 通过碘化丙啶(propidium iodide, PI)染色、流式细胞仪检测细胞周期, 通过 Annexin V/PI 双染色法检测细胞凋亡。**结果** 1 μmol/L As₂O₃ 组 A549 细胞增殖抑制率及 G₀/G₁ 期细胞比例随缺氧加重而增加; 厌氧环境下该组细胞增殖抑制率及 G₀/G₁ 期细胞比例均高于空白对照组(P<0.05), 但其细胞凋亡率较空白对照组降低(P<0.05); 与 3 种相应氧环境下 VP-16 组相比较, As₂O₃ 组 A549 细胞增殖抑制率、G₀/G₁ 期细胞比例、G₂/M 期细胞比例、细胞凋亡率均减少(P<0.05)。**结论** 1 μmol/L As₂O₃ 对 A549 细胞无明显诱导凋亡作用, 厌氧环境下该剂量 As₂O₃ 可以通过 G₁ 期阻滞抑制 A549 细胞增殖。

[关键词] 厌氧; 三氧化二砷; 肺肿瘤; 细胞周期; 细胞增殖; 细胞凋亡

[中图分类号] R 734.2 **[文献标志码]** B **[文章编号]** 0258-879X(2010)11-1255-04

三氧化二砷(As₂O₃)药用历史已久, 1997 年 Shen 等^[1]报道 As₂O₃ 可以诱导 APL 细胞分化成为成熟粒细胞, 使部分全反式维甲酸治疗失败的 APL 患者达到完全缓解, 其抗实体肿瘤细胞的作用也得到了进一步证实^[2]。李怀臣等^[3]报道低浓度 As₂O₃ 在体外常氧环境对肺癌细胞增殖的抑制作用虽然较高浓度 As₂O₃ 减弱, 但能够通过阻滞细胞周期于 G₁ 期增加肺癌细胞对化疗的敏感性; 而低氧本身也可以促进细胞 G₁ 期阻滞。肺癌实体瘤内部多为低氧环境, 因此我们推测低浓度 As₂O₃ 对瘤体内肺癌细胞 G₁ 期阻滞作用更强; 而目前国内外尚未见这方面的报道。为验证这一假设, 我们通过厌氧袋发生法模拟了肺癌内部低氧环境, 观察了 1 μmol/L As₂O₃ 在 3 种氧环境下对肺癌 A549 细胞增殖抑制、细胞周期及细胞凋亡作用的特点, 初步探索低浓度 As₂O₃ 在体内通过细胞周期阻滞治疗肺癌的可能性。

1 材料和方法

1.1 实验材料 人肺腺癌 A549 细胞株购自中国科学院上海细胞生物研究所; 小牛血清(杭州四季青生物制品公司生产)和 RPMI 1640 培养液(Gibco 公司生产); 三氧化二砷(As₂O₃, 亚砷酸)注射液为哈尔滨伊达药业有限公司生产; 甲基噻唑基四唑(MTT)和二甲基亚砷(DMSO)购自华美生物工程公司。低氧发生装置(Genbag Microaer)法国 BioMerieux

公司生产。流式细胞仪(型号为 BeckMan Coulter Cytomics Fc500)为美国 BECKMEN 公司生产。

1.2 实验方法

1.2.1 肺腺癌 A549 细胞的体外培养及药物配制 A549 细胞接种在 RPMI 1640 细胞培养液中, 培养液的配制方法为: 每 89 ml RPMI 1640 培养液中加入 10 ml 灭活小牛血清、1 ml 双抗(青霉素 100 万 U, 链霉素 100 万 U 加入三蒸水 100 ml 中混匀制成), 于 37℃、5% CO₂ 无菌培养箱中孵育培养传代, 0.25% 胰蛋白酶消化, 待细胞生长活力良好, 处于对数生长期时应用。采用 BioMerieux 公司的 Genbag Microaer 低氧培养袋和厌氧培养袋发生法构建低氧环境(5% O₂)及厌氧环境(0% O₂)。取 10 mg/10 ml As₂O₃ 10 μl 溶于 12.5 ml 细胞培养液中, 制成 4 μmol/L As₂O₃, 然后进行倍比稀释, 配制 1 μmol/L As₂O₃; 取 20 g/L 的依托泊苷 1 μl 溶于 34 ml 培养液中制成 1 μmol/L VP-16。

1.2.2 MTT 比色法检测 A549 细胞增殖及增殖抑制率 取对数生长期 A549 细胞, 按 1×10⁵/孔接种于 96 孔培养板, 每孔加液量 200 μl。24 h 后换液, 设空白调零组, 不加细胞; 实验组细胞分为: 空白对照(0 μmol/L As₂O₃)组, 不加药物; 1 μmol/L As₂O₃ 组, 加入 As₂O₃ 使其终浓度达到 1 μmol/L; 1 μmol/L VP-16 组, 加入 VP-16, 使其终浓度达到 1 μmol/L; 每组设 12 个复孔。培养 24 h 后加入 MTT(5 mg/ml)20

[收稿日期] 2010-07-07 **[接受日期]** 2010-10-26

[基金项目] 上海市科委中药现代化项目(09dZ1976000). Supported by Fund for Modernization of Traditional Chinese Herbs of Shanghai Municipal Government(09dZ1976000).

[作者简介] 刘永安, 博士生, 主治医师. E-mail: 52yan25heng@sohu.com

* 通讯作者(Corresponding author). Tel: 021-81885322. E-mail: lbxwzhao@yahoo.com.cn

μl,继续培养4 h后吸出培养液,每孔加DMSO 150 μl,振荡溶解10 min,待结晶完全溶解后,在ELX800酶标仪(美国Bio-Tek公司)上选择波长490 nm,空白组调零,测定各孔光密度(D)值,计算细胞生长抑制率。抑制率(%)=[1-(实验组D平均值-空白调零组D平均值)/(空白对照组D平均值-空白调零组D平均值)]×100%。

1.2.3 PI染色流式细胞仪(FCM)检测细胞周期 将对数生长期的细胞消化后接种于24孔板,细胞密度约为 3×10^5 个/孔,待细胞贴壁后吸尽上清,编号后将实验细胞随机分为3组:空白对照组,不加药物;1 μmol/L的As₂O₃组,加入As₂O₃使其终浓度达到1 μmol/L;1 μmol/L VP-16组,加入VP-16,使其终浓度达到1 μmol/L;每组设8个复孔;再将24孔板分别放于低氧培养袋或厌氧培养袋中,然后放于37℃、5%CO₂无菌培养箱中孵育;或直接将加药后的24孔板放于37℃、5%CO₂无菌培养箱中孵育。3种氧环境下诱导培养24 h后,用含0.25%胰蛋白酶的消化液消化各组细胞,收集、离心、弃上清后PBS洗涤,然后再离心、弃上清2次,加入70%冰乙醇固定,4℃过夜。固定过夜后的细胞,加入PBS振荡洗涤后离心弃上清,加入100 μg/ml RNase 37℃消化、碘化丙啶(PI)50 μg/ml染色,室温避光孵育30 min后进行流式细胞仪检测;每个流式细胞管检测细胞数不低于8 000个。以上各部分实验共重复3次。采用CellQuest软件进行细胞周

期分析,并计算出各期细胞比例。

1.2.4 Annexin V/PI双染色法流式细胞仪检测细胞凋亡 细胞分组及处理同上;培养相应时间后用含0.25%胰蛋白酶消化液消化各组细胞,收集、离心、弃上清后PBS洗涤,离心弃上清后控干,加入200 μl Annexin V标记缓冲液及5 μl Annexin V,室温避光孵育15 min,离心弃上清后加入250 μl Annexin V标记缓冲液,然后加入5 μl PI,混匀后上机检测细胞凋亡。实验重复2次。

1.3 统计学处理 本实验设计为两因素析因设计,实验数据为计量资料,均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示;利用SPSS 11.0统计软件对数据进行统计学分析;对不同药物在不同氧环境下对各期细胞比例的影响采用两因素方差分析,方差齐性采用LSD检验,方差不齐采用Tamhane检验。采用二元回归分析法析药物与缺氧对细胞周期及细胞凋亡率影响的相关性大小。检验水平(α)为0.05。

2 结果

2.1 不同氧环境下As₂O₃对肺癌A549细胞增殖活性的影响 结果见表1。As₂O₃组A549细胞的增殖抑制作用较弱,但随着缺氧程度加重,增殖抑制率增加,以厌氧环境最大,较同一环境空白对照组明显增加(P<0.05);但在3种氧环境下均较同一浓度VP-16组降低(P<0.05)。

表1 不同氧环境下As₂O₃对肺癌A549细胞的增殖抑制情况

(n=3)

氧环境	空白对照组 D值	1 μmol/L As ₂ O ₃ 组		1 μmol/L VP-16组	
		D值	抑制率(%)	D值	抑制率(%)
常氧(21% O ₂)	1.037±0.045	1.004±0.039	3.9	0.954 ±0.031*△	9.09
低氧(5% O ₂)	1.010±0.035	0.956±0.038	5.3	0.909 ±0.029*△	9.01
厌氧(0% O ₂)	0.955±0.041	0.883±0.041*▲□	7.5	0.808 1±0.035 *▲□	15.17

* P<0.05与空白对照组比较; △P<0.05与1 μmol/L As₂O₃组比较; ▲P<0.05与常氧组比较; □P<0.05与低氧组比较

2.2 不同氧环境下As₂O₃对肺癌A549细胞周期的作用 As₂O₃组G₁期细胞比例随缺氧加重而升高,厌氧环境下G₀/G₁期细胞比例最高(48.03%),高于常氧和低氧环境(P<0.05);厌氧环境下As₂O₃组较空白对照组G₀/G₁期细胞比例明显升高(P<0.05);低氧环境及常氧环境下As₂O₃组与空白对照组G₀/G₁期细胞无明显差异;S期细胞比例均随缺氧加重而相应降低,且3种氧环境下均较空白对照组降低

(P<0.05);As₂O₃组G₂/M期细胞比例随缺氧加重而升高,但厌氧环境、常氧环境G₂/M期细胞比例与空白对照组无明显差异,低氧环境明显低于空白对照组(P<0.05)。VP-16组在3种氧环境下G₀/G₁期细胞比例、G₂/M期细胞比例均高于同种氧环境空白对照组、As₂O₃组相应细胞比例,S期细胞比例则相应降低,有统计学意义(P<0.05)。二元回归分析发现,1 μmol/L As₂O₃不及缺氧对于G₁期的阻滞作用强。详见表2。

表2 不同氧环境下各组细胞的细胞周期分布

(%, n=3, $\bar{x} \pm s$)

氧环境	空白对照组			1 μmol/L As ₂ O ₃ 组			1 μmol/L VP-16组		
	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M	G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
常氧(21% O ₂)	27.9±1.88	70.04±2.04	2.13±0.24	29.67±2.73	71.05±2.78	1.12±0.35	37.7±0.95*△	43.78±5.63*△	8.44±0.21*△
低氧(5% O ₂)	34.78±4.36▲	61.63±4.29▲	3.60±0.49▲	38.19±2.60▲	60.22±2.83▲	1.56±0.27*▲	58.77±2.24*▲	28.03±1.71*△▲	13.54±2.69*△▲
厌氧(0% O ₂)	37.95±4.41▲	51.53±3.78▲□	10.52±2.27▲□	48.03±2.03*▲□	40.47±1.52*▲□	11.47±0.63▲□	59.33±1.06*△▲	20.73±0.86*△▲□	19.93±0.25*△▲□

* P<0.05与空白对照组比较; △P<0.05与1 μmol/L As₂O₃组比较; ▲P<0.05与常氧组比较; □P<0.05与低氧组比较

2.3 不同氧环境下 As₂O₃ 对细胞凋亡的作用 各组细胞以晚期凋亡为主, 未见明显早期凋亡细胞; 常氧和低氧环境下 As₂O₃ 组细胞凋亡率与空白对照组之间无统计学差异; 厌氧

环境下 As₂O₃ 组细胞凋亡率较空白对照组降低 ($P < 0.05$); 与 VP-16 组相比, As₂O₃ 组 3 种氧环境下细胞凋亡率均明显降低 ($P < 0.05$), 见表 3。

表 3 不同氧环境下各组细胞的凋亡率

(%, $n=3, \bar{x} \pm s$)

氧环境	空白对照组	1 $\mu\text{mol/L}$ As ₂ O ₃ 组	1 $\mu\text{mol/L}$ VP-16 组
常氧(21% O ₂)	4.39 ± 0.21	4.48 ± 0.37	5.70 ± 0.35* Δ
低氧(5% O ₂)	2.55 ± 0.23 \blacktriangle	2.36 ± 0.15 \blacktriangle	5.09 ± 0.91* Δ
厌氧(0% O ₂)	5.51 ± 0.63 $\blacktriangle\Box$	4.36 ± 0.28* $\blacktriangle\Box$	7.72 ± 0.87* $\Delta\blacktriangle\Box$

* $P < 0.05$ 与空白对照组比较; $\Delta P < 0.05$ 与 1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 组比较; $\blacktriangle P < 0.05$ 与常氧组比较; $\Box P < 0.05$ 与低氧组比较

3 讨论

正常组织的氧耗与氧供平衡, 而肿瘤组织的氧耗大于氧供。通常正常组织氧分压平均值介于 40 ~ 60 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa) 之间, 而肿瘤组织氧分压明显降低, 半数肿瘤的氧分压平均值低于 10 mmHg。肿瘤低氧可以引起多种基因表达异常, 从而抑制肿瘤细胞凋亡、上调耐药基因, 使肿瘤细胞对多种化疗药物和放疗的敏感性下降, 降低患者的生存期^[4-5]。相关研究显示 As₂O₃ 在低氧状态下对胃癌、乳腺癌等多种肿瘤细胞仍具有较强的生长抑制作用, 显示了较为独特的细胞毒作用^[6-7]。

本实验采用体外低氧及厌氧培养细胞技术, 模拟了实体肿瘤组织的低氧环境, 为探讨 As₂O₃ 在肺癌组织中的生长抑制作用提供了一定的借鉴。实验结果表明: As₂O₃ 诱导培养 A549 细胞 24 h, 随着缺氧程度的加重, 其对细胞 G₀/G₁ 期的阻滞作用逐渐增强, 对肿瘤细胞增殖抑制作用也逐渐增强; 由此可见, 低氧尤其是厌氧加强 As₂O₃ 对细胞 G₀/G₁ 期的阻滞作用; 而 G₀/G₁ 期阻滞有可能使细胞走向分化。

本实验也表明, 缺氧本身可以使 A549 细胞 G₁ 期阻滞, 阻止细胞由 G₁ 期向 S 期转化, 使细胞停留在 G₁ 期, 从而增加细胞分化的可能性。据报道, 间歇性低氧能够显著延长移植的白血病小鼠生存时间, 并且抑制白血病细胞浸润并诱导其分化, 其分子机制可能为低氧刺激细胞产生低氧诱导因子 (HIF1 α), 而 HIF1 α 能够选择性刺激诱导 As₂O₃ 对 APL 细胞生长抑制及细胞分化^[8]; 这与我们的实验结果相一致。但是经二元回归分析发现: 1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 不及缺氧对于 G₁ 期的阻滞作用强。

我们也发现其细胞周期特异性阻滞作用不及 VP-16 强, 1 $\mu\text{mol/L}$ VP-16 在低氧环境下对细胞 G₀/G₁ 期也有明显的阻滞作用, 且强于相应环境下 As₂O₃; 但 VP-16 对 A549 细胞 G₂/M 期阻滞作用更加明显, 而且在低氧环境对细胞 G₂/M 期阻滞作用较常氧环境有所增加。经二元回归分析发现, VP-16 对 G₂/M 期阻滞作用要强于缺氧对于 G₂/M 期细胞比例的影响; 这也正说明其为 G₂/M 期阻滞作用特异性药物, 与 Gorzyca 等^[9] 的报道相一致。

本实验结果也表明: 低浓度 As₂O₃ 对细胞的凋亡作用不

及相应浓度 VP-16 对细胞凋亡的诱导作用。只有较高浓度的 As₂O₃ 才能诱导细胞凋亡; Kim 等^[10] 报道 2.5 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 对肺癌 NCI-H157 细胞的生长抑制非常有限, 他们认为至少需要 25 $\mu\text{mol/L}$ 的 As₂O₃ 才能对非 APL 的肿瘤细胞起到治疗作用; Ling 等^[11] 报道 10 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 作用 72 h 后才能使非小细胞肺癌 (NSCLC) 中的 H520、H322、H460 发生 50% 以上凋亡, 其凋亡的半数抑制浓度 (IC₅₀) > 10 $\mu\text{mol/L}$; Miao 等^[12] 也报道 As₂O₃ 对 A549 细胞凋亡的 IC₅₀ 约为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。而 10 $\mu\text{mol/L}$ 的 As₂O₃ 会诱导骨髓间充质干细胞凋亡从而导致心脏毒性^[13], 因此, 通过诱导肺癌细胞凋亡来治疗肺癌的可行性不大。

值得欣喜的是, 李怀臣等^[3] 报道 1 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 能够在体外通过阻滞细胞周期于 G₁ 期抑制肺癌细胞增殖并增加肺癌细胞对化疗的敏感性, Baj 等^[14] 也报道低浓度 As₂O₃ 对乳腺癌细胞仍然具有明显的生长抑制作用, 他们通过实验证明 0.5 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ 能使人乳腺癌细胞中标志乳腺上皮分化的 CD54 分子上调, 从而诱导细胞分化。本实验结果表明: 低浓度 As₂O₃ 在缺氧状态下是通过 G₁ 期阻滞作用而不是通过诱导凋亡对其增殖产生抑制作用; 缺氧尤其是厌氧加强 As₂O₃ 的 G₁ 期阻滞作用, 从而有利于促进肺癌细胞分化; 因此有必要更加深入地研究低浓度的 As₂O₃ 对体内低氧状态肺癌实体瘤的诱导分化作用及其分子机制, 从而为其应用于临床治疗肺癌提供理论依据。

[参考文献]

- [1] Shen Z X, Chen G Q, Ni J H, Li X S, Xiong S M, Qiu Q Y, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients[J]. Blood, 1997, 89: 3354-3360.
- [2] Evens A M, Tallman M S, Gartenhaus R B. The potential of arsenic trioxide in the treatment of malignant disease: past, present and future[J]. Leuk Res, 2004, 28: 891-900.
- [3] 李怀臣, 王春霞, 黄琛, 王兰芳, 牟晓燕, 姜淑娟, 等. 三氧化二砷对肺腺癌化疗敏感性的影响及其机制[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2003, 11: 689-692.
- [4] Airley R E, Monaghan J E. Hypoxia and disease: opportunities for novel diagnostic and therapeutic prodrug strategies[J]. Pharmaceut J, 2000, 264: 666-673.

- [5] Lelong-Rebel I, Brisson C, Fabre M, Bergerat J P, Rebel G. Effect of pO_2 on antitumor drug cytotoxicity on MDR and non-MDR variants selected from the LoVo metastatic colon carcinoma cell line[J]. *Anticancer Res*, 2008, 28(1A): 55-68.
- [6] Dilda P J, Hogg P J. Arsenical-based cancer drugs[J]. *Cancer Treatment Reviews*, 2007, 33: 542-564.
- [7] Hayden P J, Mitsiades C S, Anderson K C, Richardson P G. Novel therapies in myeloma[J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14: 609-615.
- [8] Yan H, Peng Z G, Wu Y L, Jiang Y, Yu Y, Huang Y, et al. Hypoxia-simulating agents and selective stimulation of arsenic trioxide-induced growth arrest and cell differentiation in acute promyelocytic leukemic cells[J]. *Haematologica*, 2005, 12: 1607-1616.
- [9] Gorzyca W, Gong J, Ardel B. The cell cycle related differences in susceptibility of HL-60 cells to apoptosis induced by various anticancer agents[J]. *Cancer Res*, 1993, 13: 3186-3192.
- [10] Kim H R, Kim E J, Yang S H, Jeong E T, Park C, Kim S J, et al. Combination treatment with arsenic trioxide and sulindac augments their apoptotic potential in lung cancer cells through activation of caspase cascade and mitochondrial dysfunction[J]. *Int J Oncol*, 2006, 28: 1401-1408.
- [11] Ling Y H, Jiang J D, Holland J F, Perez-Soler R. Arsenic trioxide produces polymerization of microtubules and mitotic arrest before apoptosis in human tumor cell lines[J]. *Mol Pharmacol*, 2002, 62: 529-538.
- [12] Miao Z F, Chang E E, Tsai F Y, Yeh S C, Wu C F, Wu K Y, et al. Increased aquaglyceroporin 9 expression disrupts arsenic resistance in human lung cancer cells[J]. *Toxicol In Vitro*, 2009, 23: 209-216.
- [13] Cai B Z, Meng F Y, Zhu S L, Zhao J, Liu J Q, Liu C J, et al. Arsenic trioxide induces the apoptosis in bone marrow mesenchymal stem cells by intracellular calcium signal and caspase-3 pathways[J]. *Toxicol Lett*, 2010, 193: 173-178.
- [14] Baj G, Arnulfo A, Deaglio S, Mallone R, Vigone A, De Cesaris M G, et al. Arsenic trioxide and breast cancer: analysis of the apoptotic, differentiative and immunomodulatory effects [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2002, 73: 61-73.

[本文编辑] 孙岩