

[文章编号] 1007-385X(2008)03-0273-05

· 论 著 ·

低氧条件下三氧化二砷对人肺腺癌 A549 细胞增殖的影响

曲歌平¹, 李 兵^{1*}, 修清玉¹, 张玲珍²(第二军医大学 附属长征医院 1. 呼吸内科; 2. 实验诊断科, 上海 200003)

[摘 要] 目的: 对比研究常氧和低氧条件下三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)对人肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制作用。方法: 分别在常氧(21% O_2)和低氧(5% O_2)条件下以 1、2、4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 处理人肺腺癌 A549 细胞, 12、24、48 h 后收集细胞, 以 MTT 法检测细胞增殖抑制率, 以 Annexin V-PI 双染色流式细胞术检测细胞凋亡, 分析两种条件下 As_2O_3 对细胞增殖抑制率及凋亡率的影响。结果: 常氧及低氧条件下, 细胞增殖抑制率、细胞早期凋亡率及总凋亡率均随 As_2O_3 浓度的增加及作用时间的延长而增加(均 $P < 0.05$), 晚期凋亡率变化不显著。在 As_2O_3 相同浓度、相同处理时间, 低氧条件下细胞增殖抑制率及凋亡率较常氧条件下无明显降低。结论: As_2O_3 可促进细胞凋亡, 显著抑制 A549 细胞增殖, 且在低氧条件下的上述作用未见减弱。

[关键词] 低氧; 三氧化二砷; 人肺腺癌 A549 细胞; 凋亡; 增殖

[中图分类号] R734.2; R730.54 **[文献标志码]** A

Anti-proliferation effect of arsenic trioxide on human lung adenocarcinoma cell line A549 under hypoxia condition

QU Ge-ping¹, LI Bing^{1*}, XIU Qing-yu¹, ZHANG Ling-zhen²(1. Department of Respiratory Diseases, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China; 2. Department of Laboratory Diagnosis, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[Abstract] Objective: To compare the anti-proliferation effect of arsenic trioxide on human lung adenocarcinoma cell line A549 under normoxia and hypoxia conditions. **Methods:** Different concentrations (1, 2, and 4 $\mu\text{mol/L}$) of arsenic trioxide were used to treat the A549 cells at normoxia(21% O_2) and hypoxia(5% O_2) conditions. The cells were collected at 12, 24, and 48 h later. MTT assay was used to examine the cell growth inhibitory rate and Annexin V-PI double labeling FCM was used to determine cell apoptotic rate. To compare the influences of 2 conditions on the growth inhibitory rate and apoptotic rate of A549 cells. **Results:** Arsenic trioxide markedly increased the cell growth inhibitory rate, forepart and total apoptotic rates in a time- and dose-dependent manner under both conditions; the late apoptotic rates were not significantly change. The cell growth inhibitory rate and forepart apoptotic rate were not decreased under hypoxia condition compared with under normoxia when the concentration and treatment time were the same. **Conclusion:** Arsenic trioxide can markedly inhibit the growth and promote apoptosis of A549 cells; and this effect of arsenic trioxide is not attenuated by hypoxia.

[Key words] hypoxia; arsenic trioxide; human lung adenocarcinoma cell line A549; apoptosis; proliferation

[Chin J Cancer Biother, 2008, 15(3): 273-277]

正常组织的氧耗与氧供平衡, 而肿瘤组织的氧耗大于氧供。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, 降低患者生存期^[1]。研究显示, 三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)在低氧状态下对胃癌、乳腺癌等多种肿瘤细

胞仍具有较强的杀伤力, 显示了较为独特的细胞毒作用^[2-5]。但目前有关低氧条件下 As_2O_3 对肺癌细胞的增殖抑制情况尚未见报道。本研究采用 MTT 法及 Annexin V-PI 双染色法研究常氧及低氧条件下

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(No. 303703378)。Supported by the National Natural Science Foundation of China (No. 303703378)

[作者简介] 曲歌平(1980-), 男, 黑龙江省齐齐哈尔市人, 博士研究生, 主要从事肺癌诊治方面的研究

* Corresponding author. E-mail: Lbxwzhao@yahoo.com.cn

As₂O₃ 对人肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制作用,初步探讨 As₂O₃ 对肺癌的治疗作用。

1 材料与方法

1.1 材料

人肺腺癌 A549 细胞株购自中科院上海细胞生物研究所。As₂O₃(亚砷酸注射液)由哈尔滨伊达药业有限公司提供(质量浓度 1 mg/ml,根据实验需要用培养液稀释成相应浓度备用)。F12K 培养基购自上海普飞生物技术有限公司。Annexin V-PI 细胞凋亡检测试剂盒购自上海晶美生物技术有限公司。低氧发生装置(Genbag Microaer)购自法国 BioMerieux 公司。

1.2 细胞培养

人肺腺癌 A549 细胞接种于培养瓶中,加入 F12K 培养液(含 10% 小牛血清、青、链霉素各 100 U/ml),于 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中培养。细胞呈单层贴壁生长,每 2~3 d 换 1 次培养液,每 3~5 d 传代 1 次。

本实验采用低氧发生袋制造低氧条件。低氧发生装置由可密闭的发生袋及反应药囊组成。将细胞培养瓶及反应药囊同时放入发生袋中并密闭袋口,药囊与袋内空气发生化学反应,袋内环境即为 5% O₂、5% CO₂ 及 90% N₂。将此装置放入 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度的培养箱中即可在 5% 氧供的低氧条件下培养细胞。

1.3 MTT 法检测 As₂O₃ 对 A549 细胞增殖的抑制作用

将处于对数生长期的 A549 细胞制成 5×10^4 /ml 的细胞悬液,每孔 100 μ l 接种于 96 孔板中。实验组按 As₂O₃ 浓度分为 1、2、4 μ mol/L 3 个亚组,每组设 24 个复孔,空白对照组也设 24 个复孔。待细胞贴壁后吸尽上清,各孔加入相应浓度的 As₂O₃ 100 μ l,空白对照组以培养液代替。各组内再以每 8 个复孔为单位,分别在常氧和低氧条件下培养 12、24、48 h。培养至相应时间后,每孔加入 MTT(5 mg/ml) 20 μ l,继续孵育 4 h,吸弃孔内上清液,每孔加入 10 μ l 二甲亚砜(DMSO),振荡 15 min 以溶解结晶。选择 570 nm 的波长,在酶标仪上测定每孔的光密度值(D 值)。取每 8 个复孔 D 值的平均值计算不同 As₂O₃ 浓度作用不同时间的细胞增殖抑制率。公式如下:增殖抑制率(%)=(对照孔 D 值 - 实验孔 D 值)/对照孔 D 值 \times 100%。实验重复 3 次。

1.4 Annexin V-PI 双染色法检测细胞凋亡

将处于对数生长期的 A549 细胞制成 1×10^6 /ml

的细胞悬液,每孔 1 ml 接种于 24 孔板中。实验组按 As₂O₃ 浓度分为 1、2、4 μ mol/L 3 组,每组设 6 个复孔,空白对照组也为 6 个复孔。待细胞贴壁后吸尽上清,各孔加入相应浓度的 As₂O₃ 1 ml,空白对照组以培养液代替。各组内再以每 2 个复孔为单位,分别在常氧和低氧条件下培养 12、24、48 h,培养至相应时间后收集细胞待用。待测细胞用 PBS(pH 7.4)洗涤 2 次,分别加入 5 μ l FITC 标记的 Annexin V 及 10 μ l PI(按试剂盒说明书操作),避光反应 15 min。流式细胞仪(Cytomics FC 500 型)检测,每次检测 10 000 个细胞,Cell Quest 软件进行数据分析。以 Annexin V⁺/PI⁻ 判断为早期凋亡,以 Annexin V⁺/PI⁺ 判断为晚期凋亡,两种凋亡率之和为总凋亡率。实验重复 3 次。

1.5 统计分析

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计软件为 SAS6.12,各组数据两两比较采用 *F* 检验,组间比较采用独立样本 *t* 检验,*P* < 0.05 判定为有统计学意义。

2 结果

2.1 常氧和低氧条件下 As₂O₃ 对 A549 细胞增殖的抑制

2.1.1 常氧条件下 As₂O₃ 对 A549 细胞增殖的抑制率 1、2、4 μ mol/L As₂O₃ 作用于 A549 细胞 12、24、48 h,细胞增殖抑制率显著高于对照组(*P* < 0.05),细胞增殖抑制率随 As₂O₃ 浓度的增加及作用时间的延长而增加(*P* < 0.05),4 μ mol/L As₂O₃ 处理细胞 48 h 后细胞增殖抑制率超过 30%。对照组内各时间点细胞增殖抑制率无显著差异(表 1)。

2.1.2 低氧条件下 As₂O₃ 对 A549 细胞的增殖抑制率 在 5% 氧供时,As₂O₃ 仍能明显抑制 A549 细胞增殖,细胞增殖抑制率随浓度的增加和时间的延长而增加(*P* < 0.05,表 1)。就相同作用时间、相同处理浓度而言,常氧和低氧条件下细胞增殖抑制率差异无统计学意义。

2.2 常氧和低氧条件下 As₂O₃ 对 A549 细胞的致凋亡作用

2.2.1 常氧条件下 As₂O₃ 对 A549 细胞的致凋亡作用 1、2、4 μ mol/L As₂O₃ 作用于 A549 细胞 12、24、48 h,细胞早期凋亡率及总凋亡率显著高于对照组,且凋亡率随 As₂O₃ 浓度的增加及作用时间的延长而增加(*P* < 0.05),4 μ mol/L As₂O₃ 作用 48 h 早期凋亡率超过 35%。对照组各时间点凋亡率无显著差异(表 2)。各组细胞晚期凋亡率并未随 As₂O₃ 浓度增加及作用时间延长而增加,可能与晚期凋亡细胞

在形态上与死亡细胞接近有关。

2.2.2 低氧条件下 As_2O_3 对 A549 细胞的致凋亡作用 在 5% 氧供时, As_2O_3 仍能明显促进 A549 细胞凋亡, 且早期凋亡率及总凋亡率随 As_2O_3 浓度的增

加和作用时间的延长而增加 ($P < 0.05$, 表 3)。就相同的作用时间、相同的处理浓度而言, 两种氧供条件下细胞早期凋亡率及总凋亡率差异无统计学意义 (图 1)。

表 1 常氧和低氧条件下 As_2O_3 对人肺腺癌 A549 细胞增殖的抑制 (%)

Tab. 1 Cell growth inhibitory rate of lung adenocarcinoma cell line A549 treated by As_2O_3 under normoxia and hypoxia conditions

Group	12 h		24 h		48 h	
	21% O_2	5% O_2	21% O_2	5% O_2	21% O_2	5% O_2
Control	2.55 ± 1.14	2.62 ± 1.02	3.14 ± 1.23	2.74 ± 1.23	3.73 ± 1.77	3.23 ± 1.34
1 $\mu\text{mol/L}$	4.00 ± 1.13*	4.20 ± 1.40*	7.53 ± 2.53*	6.83 ± 1.83*	11.54 ± 2.90*	10.78 ± 3.20*
2 $\mu\text{mol/L}$	6.88 ± 1.27**	6.21 ± 1.56**	15.13 ± 2.71**	13.13 ± 2.66**	21.11 ± 3.47**	20.32 ± 4.11**
4 $\mu\text{mol/L}$	9.12 ± 1.22**	8.67 ± 1.88**	21.38 ± 3.31**	20.56 ± 3.01**	30.53 ± 5.44**	28.39 ± 4.80**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control under the same condition

表 2 常氧条件下 As_2O_3 致人肺腺癌 A549 细胞的凋亡率 (%)

Tab. 2 Apoptotic rate of lung adenocarcinoma cell line A549 treated by As_2O_3 under normoxia condition

Group	Apoptosis stage	12 h	24 h	48 h
Control	Forepart apoptosis	0.42 ± 0.18	0.46 ± 0.24	0.36 ± 0.25
	Terminal apoptosis	0.41 ± 0.20	0.36 ± 0.18	0.34 ± 0.12
	Total apoptosis	0.83 ± 0.38	0.82 ± 0.42	0.70 ± 0.37
1 $\mu\text{mol/L}$	Forepart apoptosis	2.91 ± 1.67*	3.92 ± 1.89*	6.88 ± 2.60*
	Terminal apoptosis	1.43 ± 0.83	1.86 ± 0.78	1.92 ± 1.29
	Total apoptosis	4.34 ± 2.50*	5.78 ± 2.67*	8.80 ± 3.89*
2 $\mu\text{mol/L}$	Forepart apoptosis	11.23 ± 2.88**	16.10 ± 5.23**	19.62 ± 5.34**
	Terminal apoptosis	1.53 ± 0.66	1.48 ± 0.81	1.97 ± 1.49
	Total apoptosis	12.26 ± 3.54**	17.58 ± 6.04**	21.59 ± 6.83**
4 $\mu\text{mol/L}$	Forepart apoptosis	24.70 ± 4.65**	35.45 ± 4.23**	39.05 ± 5.46**
	Terminal apoptosis	1.98 ± 1.01	2.09 ± 1.12	2.86 ± 2.12
	Total apoptosis	26.68 ± 5.66**	37.54 ± 5.35**	41.91 ± 7.58**

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs control in the same time point

3 讨论

近年来多项研究发现 As_2O_3 能通过诱导肿瘤细胞凋亡达到抑制肿瘤生长的作用。已有实验证实 As_2O_3 可能通过启动凋亡信号转导、增加细胞内氧化应激以及阻抑细胞周期进程等途径抑制癌细胞增殖, 诱导癌细胞分化及凋亡^[6-11]。本实验结果显示 As_2O_3 在常氧及低氧状态下均能显著抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖、促进细胞凋亡, 且作用呈剂量 - 时间依赖性, 说明 As_2O_3 对 A549 细胞有明显的增殖

抑制作用, 并可能主要是通过诱导凋亡实现的。

在实体肿瘤发生过程中, 血管生长的相对滞后和肿瘤细胞的快速增殖导致肿瘤细胞缺氧。肿瘤的缺氧是肿瘤细胞发生恶性转化甚至转移的始动因素^[12]。缺氧诱导的肿瘤或基质细胞蛋白质组的改变, 可能使细胞适应营养缺乏或脱离不利的环境, 从而利于肿瘤细胞增殖。同时肿瘤组织缺氧所致的低氧应激蛋白和凋亡潜能缺失均可导致肿瘤组织对放疗和化疗的敏感性降低^[13]。许多研究证实了缺氧特性能明显降低化疗药物的敏感性, 黄磊等^[14]在缺

氧影响卵巢癌化疗敏感性的研究发现,以紫杉醇 + 顺铂处理卵巢癌细胞,缺氧化疗组凋亡率显著低于常氧化疗组。Karlsson 等^[15]报道,VP-16 在 1% 氧供状态下对神经母细胞瘤细胞的杀伤作用显著低于正常氧供时,而 As₂O₃ 在正常氧及缺氧状态下对细胞均有明显的损伤作用,甚至在缺氧状态下对 VP-16 耐药细胞株仍有一定的增殖抑制作用。As₂O₃ 在低氧状态下仍保持对肿瘤细胞有明显抑制作用可能是其

不同于其他化疗药物的特点之一,也为其可能成为新型化疗药及化疗辅助用药奠定了理论基础。肺癌是实体肿瘤,也存在肿瘤缺氧所致的一系列肿瘤细胞生物学行为。本研究证实了在低氧环境中 As₂O₃ 同样能够显著抑制人肺腺癌 A549 细胞增殖并促进其凋亡,提示 As₂O₃ 对低氧区域肿瘤细胞的生长抑制作用可能优于某些传统的化疗药物。

表 3 低氧条件下 As₂O₃ 致人肺腺癌 A549 细胞的凋亡率(%)

Tab.3 Apoptotic rate of lung adenocarcinoma cell line A549 treated by As₂O₃ under hypoxia condition

Group	Apoptosis stage	12 h	24 h	48 h
Control	Forepart apoptosis	0.32 ± 0.14	0.42 ± 0.24	0.40 ± 0.26
	Terminal apoptosis	0.28 ± 0.21	0.40 ± 0.28	0.36 ± 0.12
	Total apoptosis	0.60 ± 0.35	0.82 ± 0.52	0.76 ± 0.38
1 μmol/L	Forepart apoptosis	2.69 ± 1.12*	3.66 ± 1.68*	6.43 ± 2.58*
	Terminal apoptosis	1.04 ± 0.53	1.69 ± 0.95	1.42 ± 0.55
	Total apoptosis	3.73 ± 1.65*	5.35 ± 2.63*	7.85 ± 3.13*
2 μmol/L	Forepart apoptosis	12.05 ± 2.31**	15.82 ± 4.63**	19.01 ± 3.54**
	Terminal apoptosis	1.69 ± 0.85	1.56 ± 0.32	1.35 ± 0.99
	Total apoptosis	12.74 ± 3.16**	17.38 ± 4.95**	20.36 ± 4.53**
4 μmol/L	Forepart apoptosis	22.38 ± 2.46**	33.54 ± 3.67**	38.89 ± 4.88**
	Terminal apoptosis	1.98 ± 1.15	2.46 ± 1.52	2.58 ± 1.44
	Total apoptosis	24.36 ± 3.61**	36.00 ± 5.19**	41.47 ± 6.32**

* P < 0.05, ** P < 0.01 vs control in the same time point

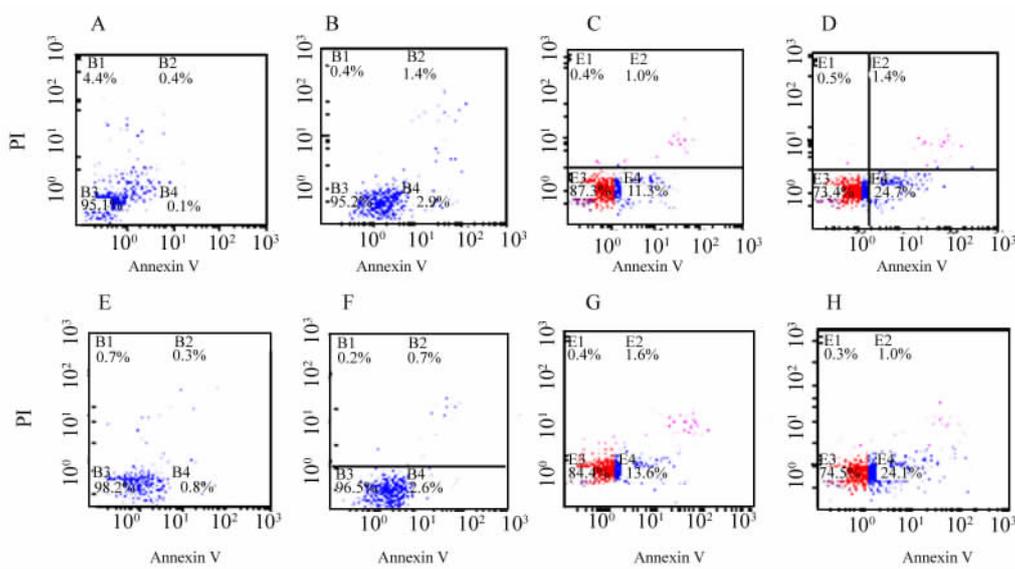


图 1 常氧和低氧条件下 As₂O₃ 作用 12 h 人肺腺癌 A549 细胞凋亡的 FCM 检测

Fig.1 Apoptosis of lung adenocarcinoma cell line A549 treated by As₂O₃ for 12 h under normoxia and hypoxia conditions by FCM

A-D:21% O₂; E-H:5% O₂; A, E: Control; B, F: 1 μmol/L As₂O₃; C, G: 2 μmol/L As₂O₃; D, H: 4 μmol/L As₂O₃

目前包括肺癌在内的许多恶性肿瘤的治疗仍无突破性进展,多年来总的治愈率和生存期未见明显的改善,因而积极寻找一种有效安全的肿瘤治疗手段意义非常重大。As₂O₃ 作为祖国医学的传统用药,是我国科学家首先推向全球的抗肿瘤药物。现已证明它在低氧状态下对人肺腺癌 A549 细胞的生长仍有明显的抑制作用,如何解释其具体的作用机制将是我们的进一步的研究方向。

[参 考 文 献]

- [1] Lelong-Rebel I, Brisson C, Fabre M, *et al.* Effect of pO₂ on anti-tumor 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.
- [2] 张俊文,王丕龙.微缺氧对三氧化二砷抑制胃癌细胞 SGC-7901 生长的影响[J]. *肿瘤防治研究*, 2005, 32(11): 692-694.
- [3] 宗建春,吴诚义,吴凯南.三氧化二砷对乳腺癌细胞血管内皮生长因子表达的影响[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(5): 532-534.
- [4] Dilda PJ, Hogg PJ. Arsenical-based cancer drugs[J]. *Cancer Treat Rev*, 2007, 33(6): 542-564.
- [5] Hayden PJ, Mitsiades CS, Anderson KC, *et al.* Novel therapies in myeloma[J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14(6): 609-615.
- [6] Mathieu J, Besançon F. Clinically tolerable concentrations of arsenic trioxide induce p53-independent cell death and repress NF-kappa B activation in Ewing sarcoma cells[J]. *Int J Cancer*, 2006, 119(7): 1723-1727.
- [7] Kim HR, Kim EJ, Yang SH, *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(6): 1401-1408.
- [8] Yih LH, Hsueh SW, Luu WS, *et al.* Arsenite induces prominent mitotic arrest via inhibition of G2 checkpoint activation in CGL-2 cells[J]. *Carcinogenesis*, 2005, 26(1): 53-63.
- [9] 周芳,汪运山,郝雁飞,等.三氧化二砷诱导胃癌细胞 AGS 的凋亡及对 STAT3、VEGF 表达的影响[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2007, 15(2): 179-183.
- [10] Effertth T, Li PC, Konkimalla VS, *et al.* From traditional Chinese medicine to rational cancer therapy[J]. *Trends Mol Med*, 2007, 13(8): 353-361.
- [11] Karlsson J, Pietras A, Beckman S, *et al.* Arsenic trioxide-induced neuroblastoma cell death is accompanied by proteolytic activation of nuclear Bax[J]. *Oncogene* 2007, 26(42): 6150-6159.
- [12] Dachs GU, Tozer GM. Hypoxia modulated gene expression: angiogenesis, metastasis, and therapeutic exploitation[J]. *Eur J Cancer*, 2000, 36(13): 1649-1660.
- [13] Höckel M, Vaupel P. Tumor hypoxia: definitions and current clinical, biologic, and molecular aspects[J]. *J Natl Cancer Inst*, 2001, 93(4): 266-276.
- [14] 黄磊,敖启林,李芳,等.低氧对紫杉醇诱导的人卵巢癌细胞 A2780 凋亡的影响及其机制[J]. *癌症*, 2005, 24(4): 408-413.
- [15] Karlsson J, Edsjö A, Pählman S, *et al.* Multidrug-resistant neuroblastoma cells are responsive to arsenic trioxide at both normoxia and hypoxia[J]. *Mol Cancer Ther*, 2005, 4(7): 1128-1135.
- [收稿日期] 2008 - 02 - 28 [修回日期] 2008 - 04 - 15
[本文编辑] 郁晓路

· 简 讯 ·

第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会

为满足全国专家、学者和临床一线医师对消化性病变介入/内镜新技术研究、探讨和交流的欲望,进一步提升国内消化系疾病尤其是消化道恶性病变介入/内镜诊治的技术水平,上海同仁医院联合福建省肿瘤医院,定于 2008 年 11 月 7 - 12 日在福建省福州市举办第八届全国消化道恶性病变介入诊疗暨消化介入新技术研讨会。会议有福建省抗癌协会、福建省消化内镜学会、福建省放射学会介入学组具体承办。中华消化内镜学杂志、中华放射学杂志、世界胃肠病杂志以及介入放射学治疗杂志共同参与协办。会议将着重介绍消化道病变内镜治疗、介入放射学治疗、肿瘤内外科治疗的新理论、新技术和新方法,为各相关交叉学科之间的相互交流和研讨搭建一个平台。本次会议拟安排相关学科的著名专家围绕食管、胆管、胃肠道等消化道管腔内支架治疗应用技术和发生的问题以及消化道病变的消化内镜、介入放射、内外科治疗的新进展等热点课题进行精彩的演讲及深入探讨。会议中还将安排疑难案例讨论及手术操作演示,内容精彩。参会者将授予国家级一类继续医学教育学分 10 分。

福建省肿瘤医院介入科,林海澜 13850171973 hanlan@pub2.fz.fj.cn

福建省肿瘤医院内镜室,施宏 13959105615 endoshihong@hotmail.com

福建省福马路凤坂马路顶 91 号 邮编 350014 电话:0591 - 83660063 - 8428;8017

传真:0591 - 83546120