

文章编号:1005-6947(2005)04-0281-05

· 实验研究 ·

三氧化二砷诱导人类胆管癌 QBC939 细胞凋亡的初步研究

周军, 汤恢焕

(中南大学湘雅医院 普通外科, 湖南 长沙 410008)

摘要:目的 研究三氧化二砷(As_2O_3)诱导人类胆管癌 QBC939 细胞凋亡。方法 应用 MTT 法检测 As_2O_3 对胆管癌细胞的抑制作用;采用光镜、荧光显微镜观察细胞形态变化;流式细胞术检测 Rhodamine123 染色并分析 DNA 含量及细胞周期。结果 1~16 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 均能抑制人胆管癌细胞 QBC939 的生长,且抑制率具有浓度-时间依赖性。4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用细胞后出现典型的凋亡形态特征,可检测到亚二倍体凋亡峰, Rhodamine123 荧光强度降低。结论 As_2O_3 能诱导 QBC939 细胞发生凋亡,其机制可能与线粒体膜电位去极化有关。

关键词:胆管肿瘤/化学诱导;三氧化二砷/副作用;细胞凋亡

中图分类号:R735.8; R329.25

文献标识码:A

A preliminary study of arsenic trioxide induced apoptosis of human cholangiocarcinoma QBC939 cell line

ZHOU Jun, TANG Hui-huang

(Department of General Surgery, Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

Abstract: **Objective** To study arsenic trioxide induces apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line QBC939. **Methods** MTT was applied to detect the inhibitory effect of arsenic trioxide on cholangiocarcinoma cell line QBC939. Morphological changes were observed by light microscopy and fluorescence microscopy. Rhodamine123 dyeing and analysis of DNA content and cell cycle were examined by flow cytometry. **Results**

Cell growth was significantly inhibited by different concentration (1-16 $\mu\text{mol/L}$) of arsenic trioxide. The inhibition ratio was dependent on arsenic concentration and time. The typical morphological character of apoptosis was observed, apoptotic peak of hypodiploid was detected and fluorescence intensity of Rhodamine 123 decreased when the cells were cultured with 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 . **Conclusions** As_2O_3 can induce apoptosis of cell line QBC939. The mechanism may be related to the depolarization of mitochondrial membrane potential.

Key words: BILE DUCT NEOPLASMS/chem ind; ARSENIC TRIOXIDE/adv eff; APOPTOSIS

CLC number: R735.8; R329.25

Document code: A

原发性胆管癌是常见的肝胆系统恶性肿瘤,发病率为 1.2/100,000^[1],约占全部恶性肿瘤的 2%。胆管癌总的疗效目前仍难如人意。20 世纪 90 年代,发现三氧化二砷(arsenic trioxide, As_2O_3)

能通过诱导凋亡抑制急性早幼粒细胞白血病(AML)细胞的生长,并取得满意疗效^[2,3]。 As_2O_3 对肿瘤的作用成为近年来的研究热点,本实验的目的在于探讨 As_2O_3 是否能诱导胆管癌细胞凋亡。

1 材料与方法

1.1 材料

人胆管癌 QBC939 细胞株由第三军医大学王曙光建立^[4],北京大学人民医院外科肿瘤研究室转赠。 As_2O_3 (伊尔达, 10 mg/10 mL, 哈尔滨伊达

基金项目:国家自然科学基金(20335020)。

收稿日期:2005-01-31; **修订日期:**2005-03-28。

作者简介:周军(1970-),男,湖南桃源人,中南大学湘雅医院主治医师,主要从事肝胆胰外科方面的研究。

通讯作者:周军 电话:0731-4327468; E-mail:cs.zj@163.com。

药业有限公司产品),用RPMI1640培养基配制成 $20\mu\text{g}/\text{mL}$ ($100\mu\text{mol}/\text{L}$)的储存液,使用前用RPMI1640培养基稀释至所需浓度。0.25%胰蛋白酶加0.02%EDTA溶液,Hanks液,10%小牛血清的RPMI1640培养基,MTT,RNA酶,DMSO,Hoechst 33342,Rhodamine123,PI均购于北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 QBC939细胞在5%CO₂培养箱中培养,培养基为含10%小牛血清的RPMI1640培养液,37℃条件下培养,细胞为上皮样贴壁生长,每3~4日传代1次,取对数生长期的细胞用于实验。

1.2.2 四唑盐比色实验(MTT) QBC939细胞 $100\mu\text{L}$ (1×10^4)接种于4块96孔板,培养箱孵育过夜,次日加入含不同浓度As₂O₃的培养液 $100\mu\text{L}$,使As₂O₃终浓度分别为1,2,4,8和 $16\mu\text{mol}/\text{L}$,每组设6个复孔。实验组加入含不同浓度药物的培养液,阴性对照不加药,空白对照不加培养液,加药后分别于24,48,72,96h后加入 $20\mu\text{L}$ MTT,继续孵育4h后吸出培养液,加入 $150\mu\text{L}$ DMSO振荡溶解10min,空白对照调零,酶联免疫仪检测,波长570nm,测定各孔的吸光值,计算抑制率。细胞生长抑制率=(1-实验组MTT值/对照组MTT值) $\times 100\%$ 。通过药物抑制浓度计算软件(LOGIT法)1.0计算IC₅₀。

1.2.3 Hoechst染色 实验组为终浓度 $4\mu\text{mol}/\text{L}$ As₂O₃处理48h的QBC939细胞,对照组为未加药干预的生长48h细胞。收集 2×10^6 个细胞, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min;PBS洗涤1次, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min去上清;70%乙醇1ml重悬细胞;PBS洗涤, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min去上清;用 $15\mu\text{L}$ Hoechst33342重悬细胞,终浓度 $16\mu\text{g}/\text{ml}$,孵育

15min;取 $10\mu\text{L}$ 放在波片上,荧光显微镜下观察照片。

1.2.4 流式细胞仪检测凋亡率及细胞周期 实验组为终浓度 $4\mu\text{mol}/\text{L}$ As₂O₃处理24,48,72,96h的QBC939细胞,对照组为未加药干预的同时期生长细胞。收集 2×10^6 个细胞, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min祛除培养液;PBS洗涤1次, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min去上清;70%预冷乙醇重悬细胞固定,4℃过夜;离心弃去固定液,3mL PBS重悬5min;400目筛网过滤, $1000\text{r}/\text{min}$ 离心5min去上清;1mL PI($100\mu\text{g}/\text{mL}$)4℃避光染色30min;流式细胞仪检测,激发波长为488nm,发射波长为630nm。

1.2.5 线粒体膜通透性实验 实验组为终浓度 $4\mu\text{mol}/\text{L}$ As₂O₃处理48h的QBC939细胞,对照组为未加药干预的生长48h细胞。收集 2×10^6 个细胞,PBS洗涤,Rhodamine123^[5]($10\mu\text{g}/\text{mL}$)染色,在37℃,5%CO₂培养箱孵育30min,PBS洗3次,流式细胞仪检测,激发光波长505nm,发射光波长534nm。

1.3 统计学方法

计量资料描述以均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$)表示,各组间数据比较采用单因素方差分析(one way ANOV),数据以SPSS11.0统计软件处理分析。

2 结果

2.1 MTT检测结果

各浓度As₂O₃均对细胞生长有抑制作用。随着As₂O₃浓度的增加,细胞生长抑制率增高,各浓度间差异性存在显著性(均 $P<0.01$);随着As₂O₃干预时间的延长,细胞生长抑制率增加,各干预时相组间存在显著性差异,($P<0.01$)。药物干预第4天的IC₅₀值为 $4.014\mu\text{mol}/\text{L}$ (表1)。

表1 As₂O₃对QBC939细胞生长抑制率的影响(%)

干预时间(h)	例数(<i>n</i>)	各浓度As ₂ O ₃ 对QBC939细胞生长抑制率(%)				
		1 $\mu\text{mol}/\text{L}$	2 $\mu\text{mol}/\text{L}$	4 $\mu\text{mol}/\text{L}$	8 $\mu\text{mol}/\text{L}$	16 $\mu\text{mol}/\text{L}$
24	6	4.88 \pm 1.06	8.97 \pm 1.79	15.86 \pm 1.38	32.41 \pm 2.37	54.80 \pm 0.92
48	6	7.59 \pm 1.18	15.85 \pm 1.54	26.35 \pm 0.71	36.91 \pm 3.32	61.38 \pm 1.36
72	6	10.78 \pm 2.99	21.80 \pm 1.44	28.66 \pm 1.39	53.05 \pm 0.97	73.78 \pm 1.02
96	6	13.04 \pm 4.10	28.13 \pm 6.78	45.83 \pm 1.81	65.63 \pm 1.85	84.38 \pm 0.92
<i>P</i>		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

2.2 As₂O₃ 干预后细胞形态学改变

4 μmol/L As₂O₃ 干预 QBC 细胞后,24h 即出现细胞变小,高倍镜下可见颗粒,细胞增殖减缓。随着时间的延长,漂浮细胞出现逐渐增多,96h 大部分细胞处于漂浮状态,细胞数明显减少。Hoechst 33342 染色,荧光显微镜下见正常细胞的细胞核呈弥散均匀荧光,As₂O₃ 干预后凋亡细胞增多:细胞的体积缩小,核固缩,表现为浓染致密的颗粒块状荧光(图 1,2)。

2.3 流式细胞术检测凋亡率及细胞周期

4 μmol/L As₂O₃ 干预 QBC 细胞后,凋亡率随着

时间的延长,凋亡率逐渐增高,各时相间存在显著性差异 ($P < 0.01$), (表 2,图 3)。As₂O₃ 干预后,S 期细胞减少、G₁ 期细胞增多,细胞被阻滞于 G₁ 期(图 4)。

表 2 4 μmol/L As₂O₃ 干预 QBC939 细胞凋亡率变化

分组	例数 (n)	凋亡率(%)			
		24h	48h	72h	96h
对照组	4	0.98 ± 0.32	1.08 ± 0.46	1.75 ± 0.38	2.51 ± 0.71
实验组	4	2.12 ± 0.56	12.29 ± 2.52	15.12 ± 1.91	21.70 ± 0.78
P		<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

图 1 正常 QBC939 细胞 Hoechst 染色

图 2 4 μmol/L As₂O₃ 干预 QBC939 细胞 48h Hoechst 染色

图 3 4 μmol/L As₂O₃ 干预 QBC939 细胞凋亡率的变化

a

b

c

d

e

a:对照组;b: As₂O₃ 干预 QBC 细胞 24h;c: As₂O₃ 干预 QBC 细胞 48h; d: As₂O₃ 干预 QBC 细胞 72h; e: As₂O₃ 干预 QBC 细胞 96h.

图 4 4 μmol/L As₂O₃ 干预 QBC 细胞流式术检测到亚二倍体凋亡峰

2.4 线粒体膜通透性实验

流式细胞仪检测实验组干预细胞 Rhodamine 123 荧光强度较对照组弱(图5)。

a: 对照组细胞 rho123 荧光强度 b: 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 干预 QBC 细胞 48 h 后 Rhodamine 123 荧光强度

图5 对照组及 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 干预 QBC 细胞后 Rhodamine 123 染色图

3 讨论

20 世纪 90 年代,发现 As_2O_3 可以通过诱导凋亡和分化抑制急性早幼粒细胞白血病细胞的生长,并应用于临床取得了良好的疗效^[2,3]。进一步的研究发现, As_2O_3 通过诱导凋亡对胃癌^[6]、头颈部肿瘤^[7]、肝癌^[8]、结肠癌^[9] 等实体瘤也有抑制作用。本实验观察到不同浓度的 As_2O_3 对人胆管癌细胞 QBC939 均有抑制作用,随着药物浓度的提高,抑制率增高;随着药物作用时间的延长,抑制率也增高。说明 As_2O_3 对 QBC939 细胞的抑制作用,存在时间-剂量依赖性。本研究证实 As_2O_3 对 QBC939 细胞的抑制作用是通过诱导凋亡实现的。其表现在:(1) As_2O_3 作用于细胞后,在光镜和荧光显微镜下,可观察到典型的细胞凋亡的形态学变化,如细胞核固缩,染色质凝集,边聚,核碎裂,核固缩,凋亡小体形成等。(2) 流式细胞术检测发现 As_2O_3 干预后出现典型的亚二倍体凋亡峰,细胞凋亡率显著增高,实验组与对照组凋亡率以及实验组内不同时相组间均有显著性差异。(3) As_2O_3 能延长细胞周期,报道显示 As_2O_3 在有些细胞阻滞细胞周期于 G_1 期,在有些细胞阻滞于 $G_2 \sim M$ 期^[10]。因此, As_2O_3 可能作用在 G_1 和 $G_2 \sim M$ 期 2 个控制点,使整个细胞周期延长。其发

生的具体机制还不清楚。本实验发现 4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 干预 QBC939 细胞后,随着时间的延长, G_1 期细胞逐渐增多,细胞周期阻滞于 G_1 期。

线粒体膜电位的丧失是诱导细胞凋亡的重要途径。细胞外的某些信号或细胞内 DNA 的损伤首先引起促凋亡的 Bcl-2 家族成员发生蛋白水解、脱磷酸化等修饰而由无活性状态变为活性状态,从而由胞浆向线粒体膜移位,使线粒体膜的通透性转换孔(permeability transition pore, PTP) 开放或发生其它变化,使细胞色素 C、凋亡诱导因子(apoptosis inducing factor, AIF) 等凋亡信号分子进入胞浆,激活 Caspase-9,再激活下游的 Caspase-3,引起细胞凋亡^[11,12]。Rhodamine 123 是一种阳离子荧光染料,可以通过线粒体膜进入线粒体,并聚集于线粒体内膜和基质。当线粒体膜电位去极化时,线粒体通透性发生改变。正常细胞 Rhodamine 123 荧光强度高;凋亡细胞荧光强度减低;坏死细胞不能吸收 Rhodamine 123,不发荧光。本实验观察到,4 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 干预 QBC939 细胞 48 h 后,与对照组比较,实验组荧光强度明显减弱。提示 As_2O_3 可以使线粒体膜电位去极化。由此推测, As_2O_3 可能通过线粒体途径诱导 QBC939 细胞凋亡。

本实验发现 As_2O_3 可以呈时间-剂量依赖性地抑制人类胆管癌 QBC939 细胞的生长。 As_2O_3 抑制细胞生长是通过诱导细胞凋亡引起的。 As_2O_3 诱导 QBC939 细胞凋亡可能是通过线粒体途径来实现的,但有关诱导凋亡的具体途径还有待进一步实验来证实。

参考文献:

- [1] Chamberlain RS, Blumgart LH. Hilar cholangiocarcinoma: a review and commentary [J]. Ann Surg Oncol, 2000, 7(1): 55-66.
- [2] Shen ZX, Chen GO, Ni HJ. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL), II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients [J]. Blood, 1997, 89(9): 3354-3360.
- [3] Soignet SL, Maslak P, Wang ZG. Complete remission after treatment of acute promyelocytic leukemia with arsenic trioxide. [J]. N Engl J Med, 1998, 339(8): 1341-1348.
- [4] 王曙光, 韩本立, 段恒春. 肝外胆管癌细胞系的建立 [J]. 中华实验外科杂志, 1997, 14(1): 67.

- [5] Andreas S, Jugoh I, James W. *et al.* p53 negatively regulates intestinal immunity by delaying mucosal T cell cycling [J]. *J Clin Invest*, 2002, 109(11): 1481-1492.
- [6] Zhang TC, Cao EH, Li JF, *et al.* Induction of apoptosis and inhibition of human gastric cancer MGC 803 cell growth by arsenic trioxide [J]. *Eur J Cancer*, 1999, 35(8): 1258-1263.
- [7] Seol JG, Park WK, Kim ES, *et al.* Effect of arsenic trioxide on cell cycle arrest in head and neck cancer cell line PCI-1 [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 1999, 265(2): 400-404.
- [8] 刘连新,姜洪池,朱安龙,等. 三氧化二砷对肝癌细胞系 HLE 的影响 [J]. *中国普通外科杂志*, 2001, 10(2): 134-138.
- [9] Nakagawa Y, Akao Y, Morikawa H, *et al.* Arsenic trioxide induced apoptosis through oxidative stress in cells of colon cancer cell lines [J]. *Life Sci*, 2002, 70(19): 2253-2269.
- [10] Woo HP, Jae GS, Eun SK, *et al.* Arsenic Trioxide-mediated Growth Inhibition in MC/CAR Myeloma Cells via Cell Cycle Arrest in Association with Induction of Cyclin-dependent Kinase Inhibitor, p21, and Apoptosis [J]. *Cancer Res*, 2000, 60(6): 3065-3071.
- [11] Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis [J]. *Nature*, 2000, 407(12): 770-776.
- [12] Li P, Nijhawan D, Budihardjo I, *et al.* Cytochrome c and dATP-dependent formation of Apaf-1/caspase-9 complex initiates an apoptotic protease cascade [J]. *Cell*, 1997, 91(4): 479-489.

文章编号:1005-6947(2005)04-0285-01

· 病例报告 ·

Peutz-Jeghers 综合征合并结肠癌 1 例

刘薇, 廖国庆, 汤恢煊

(中南大学湘雅医学院 普外科, 湖南 长沙 410008)

关键词: 肠息肉病; 结肠肿瘤/继发性; 病例报告

中图分类号: R656.9

文献标识码: D

患者 女, 38 岁。患者 20 余年前因腹痛在当地医院行剖腹探查术, 术中发现小肠结肠多发肠息肉, 当时切除息肉较多的一段小肠, 术后症状缓解。5 年前在结肠镜下切除肠息肉, 病理切片证实为 Peutz-Jeghers 综合征。其后患者仍反复发作腹痛腹泻, 均经抗炎补液对症处理后好转, 本次因再度腹泻, 黄色水样便, 约 1 次/15 min, 经保守治疗无好转入我院, 既往有卵巢囊肿切除术史。体查: 贫血貌, 手足、口唇及颊黏膜可见散在黑斑, 心、肺无异常发现, 腹平软, 中下腹压痛, 未扪及明显包块, 肠鸣

音弱, 四肢凹陷性水肿。肛查 (KC 位): 肛门括约肌松弛, 距肛门约 7 cm 可扪及多个小息肉。实验室检查: 红细胞 $2.04 \times 10^{12}/L$; 血红蛋白 70 g/L; 白蛋白 17.2 g/L; 血钾 2.4 mmol/L。全消化道钡餐检查: 胃、小肠、结肠可见多处充盈缺损, 横结肠部分狭窄。乙状结肠镜取息肉活检为: 符合 Peutz-Jeghers 综合征息肉, 未见癌变。经输血、补充白蛋白等培补治疗病情改善后行剖腹探查, 术中见胃、小肠、结肠布满大小不等息肉, 尤以回盲部最多, 乙状结肠处形成约 6 cm × 7 cm 大小肿物, 切除回肠末端及乙状结肠并清扫淋巴结, 术后病检示: P-J 综合征, 乙状结肠肿块腺上皮重度非典型增生、癌变且侵及浅肌层, 肠旁淋巴结转移。患者术后经全肠外营养支持等对症治疗后逐渐恢复正常饮食, 腹泻症状缓

解出院。

讨论 Peutz-Jeghers 综合征, 又称为黑斑息肉病, 是常染色体显性遗传性疾病, 其与 STK11 基因突变有关。特点是黏膜皮肤的色素沉着和胃肠道的息肉病。息肉主要是错构瘤性息肉, 可混有腺瘤性成分, 累及全消化道, 最常见的部位是小肠。

虽然错构瘤极少癌变, 但不能排除息肉中腺癌成分癌变或是错构瘤转变成腺癌甚至恶变的可能。本病不是癌前病变, 但 Dong 等 (Chin J Dig Dis, 2004, 5(4): 160-164.) 提出本病发生结肠癌的机会增加。本病累及全消化道, 手术治疗的仅为缓解症状, 有鉴于本病最可能发生的恶性肿瘤是胃肠道癌及胰腺癌, 应定期复查内镜、B 超及肿瘤标志物。

收稿日期: 2005-01-07;

修订日期: 2005-03-07。

作者简介: 刘薇 (1981-), 女, 湖南娄底人, 中南大学湘雅医学院硕士研究生, 主要从事普通外科临床方面的研究。

通讯作者: 刘薇 电话: 13755101989 (手机)。