

## 砷剂对人胃癌细胞凋亡及 LRP 耐药基因表达影响的研究

耿礼文<sup>1</sup>,薄挽澜<sup>2</sup>,梁桃<sup>2</sup>(1.浙江省玉环县第二人民医院,浙江 玉环 317605;2.哈尔滨医科大学第一临床医学院,黑龙江 哈尔滨 150001)

**摘要** 目的:研究三氧化二砷( $As_2O_3$ )对人胃癌细胞的诱导凋亡作用及对 LRP、C-myc 基因表达的影响。方法:选用人胃癌 BGC-823 细胞株,运用体外细胞培养法,MTT 法,流式细胞术检测  $As_2O_3$  对人胃癌的诱导凋亡作用;用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)方法检测 LRP、C-myc mRNA 的表达。结果: $As_2O_3$  对人胃癌 BGC-823 细胞具有抑制作用,其抑制率呈时间-剂量依赖关系。不同浓度的  $As_2O_3$  均可诱导凋亡。1.0、2.0  $\mu\text{mol/L}$  的  $As_2O_3$  可下调 LRP、C-myc 的表达。结论: $As_2O_3$  具有抗肿瘤作用,主要是通过诱导细胞凋亡实现的,其机制与下调 LRP、C-myc 表达有密切关系。

**关键词** 三氧化二砷;胃癌细胞;LRP;C-myc;凋亡

中图分类号:R978.7;R965 文献标识码:A 文章编号:1006-0111(2009)02-0129-03

### Effect and mechanism of arsenic trioxide on LRP expression on human gastric carcinoma cells

Geng Li-wen<sup>1</sup>, Bo Wan-lan<sup>2</sup>, Liang Tao<sup>2</sup> (1. Second people's hospital of Yuhuan, Yuhuan 317605, China; 2. First Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150001, China)

**ABSTRACT Objective:** To study the apoptosis and mechanism of arsenicals on human gastric carcinoma cells. **Methods:** MTT, FCM and RT-PCR tests were used to investigate of apoptosis levels induced by arsenic trioxide and the effect on LRP, C-myc expression. **Results:** 1.0  $\mu\text{mol/L}$  and 2.0  $\mu\text{mol/L}$  arsenic trioxide can decrease LRP, C-myc expression. **Conclusions:** Low concentrations may improve apoptosis of gastric cancer by decreasing LRP, C-myc expression.  $As_2O_3$  may be used to treat gastric cancer but the results are no better than cisplatin.

**KEY WORDS** arsenic trioxide, gastric cancer, apoptosis, LRP, C-myc

三氧化二砷( $As_2O_3$ )治疗急性早幼粒细胞白血病的报道引起人们对  $As_2O_3$  治疗其它实体肿瘤的兴趣<sup>[1]</sup>。已有研究表明, $As_2O_3$  可诱导小细胞肺癌的凋亡,也可诱导肺癌,淋巴瘤,胃癌等细胞凋亡<sup>[2]</sup>,有学者通过动物实验和体外实验表明  $As_2O_3$  对胃癌有明显的抑制作用<sup>[3,4]</sup>,但其机制尚不完全明了。耐药基因(LRP、C-myc)等是近年发现的肿瘤耐药相关基因,在肿瘤耐药过程中起一定作用。我们选择胃癌 BGC-823 细胞株,观察  $As_2O_3$  对其生长,凋亡及 LRP、C-myc 基因水平的影响,探讨  $As_2O_3$  诱导肿瘤细胞凋亡的机理及临床应用前景。

#### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 胃癌细胞株 BGC-823 由哈尔滨医科大学遗传教研室提供,传代培养于含 10% 小牛血清的

1640 培养液中,培养条件为 37℃,5%  $CO_2$ ,于细胞处于对数生长期时使用。

$As_2O_3$  注射液(哈尔滨伊达药业有限公司,国药准字 X19990191,批号 20000705)溶解配成 50 mg/mL 原液,应用时用 1640 培养液稀释成工作浓度;注射用顺铂(锦州九泰药业有限责任公司,辽卫药准字(1996)第 001796 号,批号 020406);四甲基偶氮唑蓝(MTT)(Sigma 公司);RT-PCR 试剂盒(Invitrogen 公司)按试剂盒说明书流程操作。

#### 1.2 方法

**1.2.1 细胞生长抑制作用检测** 采用 MTT 法,将生长活力良好的 BGC-823 细胞以每孔  $1 \times 10^5$  的数目加入 96 孔板,待细胞贴壁后,实验组每孔加入 1.0  $\mu\text{mol/L}$  (A 组),2.0  $\mu\text{mol/L}$  (B 组),4.0  $\mu\text{mol/L}$  (C 组),6.0  $\mu\text{mol/L}$  (D 组)的  $As_2O_3$ ,每组设 4 个复孔,同时设空白组(仅加培养液)及 0.2  $\mu\text{g/mL}$  顺铂对照组(E 组),分别培养 24、48、72 h 后,每孔分别加入 MTT 20  $\mu\text{L}$  (5 mg/mL),在上述条件下孵育 4 h,每孔

再加入二甲基亚砜 (DMSO) 200  $\mu$ L,打匀后在酶标仪 492 nm处读取吸光度 A值,然后计算抑制率。

$$\text{抑制率}(\%) = [(\text{对照孔 A值} - \text{实验孔 A值}) / \text{对照孔 A值}] \times 100\%$$

**1.2.2 细胞凋亡的检测** 采用流式细胞仪 (FCM)分析,经  $\text{A}_2\text{O}_3$  处理后的细胞用 0.25%的胰蛋白酶消化成单个细胞,用 75%乙醇固定 24 h后,加入 RNA酶及碘化丙啶,用流式细胞仪 (BECTON DICKINSON公司)进行 DNA含量分析,所用软件为 MODFIT。

**1.2.3 BGC-823细胞 LRP的表达情况的检测** 采用 RT-PCR方法,用异硫氰酸胍 酚 氯仿 (Trizol)法提取 RNA,用紫外分光光度计检测 RNA纯度及含量,按说明书进行 RT-PCR。LRP的 PCR条件为 94 预变性 5 min; 94 30 s, 64 30 s, 72 1 min, 共 29个循环, 72 延伸 10 min,扩增产物大小为 221 bp;比较用 2.5%的琼脂糖凝胶电泳,扩增产物辉度扫描,靶基因 A值 /  $\beta$ -actin A值即为靶基因 mRNA相对量。

**1.2.4 Cmyc基因表达测定** 利用酶链亲和素生物素 (SABC)法,取对数生长期细胞加  $\text{A}_2\text{O}_3$  使细胞培养液终浓度分别为 0  $\mu$ mol/L (未加药组), 0.5  $\mu$ mol/L, 1.0  $\mu$ mol/L, 2.0  $\mu$ mol/L, 培养 72 h,收集细胞,4%多聚甲醛固定 48 h,酒精逐级脱水,石蜡包埋,切片,光镜下观察。基因表达阳性为细胞浆与细胞膜褐黄染色。取 10个高倍视野 ( $\times 400$ )作为观察区,求标记指数 (Labelling index LI)的平均值,  $\text{LI} = (\text{阳性细胞数} / \text{计数细胞总数}) \times 100\%$ 。

**1.2.5 统计学分析** 实验数据以  $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS软件包处理数据,多组间比较方差齐时应用 F检验,方差不齐时用秩和检验。

**2 结果**

**2.1 MTT法检测  $\text{A}_2\text{O}_3$ 对胃癌细胞株的抑制率的影响** MTT法显示各浓度  $\text{A}_2\text{O}_3$ 对 BGC-823细胞均有一定的抑制作用,抑制作用具有时间-浓度依赖性。结果见表 1。

表 1  $\text{A}_2\text{O}_3$ 及顺铂对 BGC-823细胞的生长抑制率 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

	顺铂组	A组	B组	C组	D组
24h	6.16 $\pm$ 1.9	24.88 $\pm$ 3.9	9.33 $\pm$ 3.1	15.73 $\pm$ 4.7	18.32 $\pm$ 1.6
48h	8.71 $\pm$ 1.8	27.78 $\pm$ 2.4	10.67 $\pm$ 2.5	19.26 $\pm$ 1.31	25.59 $\pm$ 2.6
72h	9.96 $\pm$ 0.79 <sup>1)</sup>	45.23 $\pm$ 2.8	20.67 $\pm$ 3.6 <sup>1)</sup>	31.55 $\pm$ 3.7 <sup>1)</sup>	38.17 $\pm$ 4.3 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,与顺铂组比较。

**2.2  $\text{A}_2\text{O}_3$ 对 BGC-823细胞凋亡的影响**  $\text{A}_2\text{O}_3$ 对胃癌细胞株 BGC-823的凋亡诱导率随浓度及时间的增加而增加,作用 72 h,各实验组与空白组比较均有显著差别,各浓度组  $\text{A}_2\text{O}_3$ 的凋亡诱导率均明显低于顺铂组,差别显著。结果见表 2。

**2.3  $\text{A}_2\text{O}_3$ 对 LRP基因表达的影响** BGC-823细胞经  $\text{A}_2\text{O}_3$ 作用 72 h,琼脂糖凝胶电泳图显示 1.0  $\mu$ mol/L的  $\text{A}_2\text{O}_3$ 使 LRP mRNA表达明显减弱,6.0  $\mu$ mol/L的  $\text{A}_2\text{O}_3$ 使 LRP mRNA表达明显增强。结果见表 3。

表 2  $\text{A}_2\text{O}_3$ 及顺铂对 BGC-823细胞凋亡诱导率的影响 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

	空白组	顺铂组	A组	B组	C组	D组
24h	2.67 $\pm$ 0.11	10.56 $\pm$ 0.14	3.15 $\pm$ 0.13	4.24 $\pm$ 0.13	5.14 $\pm$ 0.17	9.11 $\pm$ 0.17
48h	3.25 $\pm$ 0.33	12.38 $\pm$ 0.43	4.43 $\pm$ 0.23	6.25 $\pm$ 0.21	6.23 $\pm$ 0.11	10.41 $\pm$ 0.31
72h	3.83 $\pm$ 0.27	16.44 $\pm$ 0.34 <sup>1)</sup>	6.53 $\pm$ 0.20 <sup>1)2)</sup>	12.85 $\pm$ 0.5 <sup>1)2)</sup>	13.48 $\pm$ 0.29 <sup>1)2)</sup>	14.57 $\pm$ 0.18 <sup>1)2)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,与顺铂组比较

表 3  $\text{A}_2\text{O}_3$ 及顺铂对细胞 LRP的影响 (% ,  $\bar{x} \pm s$ )

	空白组	顺铂组	A组	B组	C组	D组
24h	0.96 $\pm$ 0.03	1.16 $\pm$ 0.05	0.46 $\pm$ 0.008	0.95 $\pm$ 0.06	1.16 $\pm$ 0.04	1.36 $\pm$ 0.04
48h	0.97 $\pm$ 0.05	0.77 $\pm$ 0.03	0.55 $\pm$ 0.03	1.04 $\pm$ 0.05	0.91 $\pm$ 0.05	1.15 $\pm$ 0.07
72h	0.96 $\pm$ 0.04	1.18 $\pm$ 0.12 <sup>1)</sup>	0.36 $\pm$ 0.02 <sup>1)2)</sup>	0.86 $\pm$ 0.03 <sup>1)2)</sup>	1.06 $\pm$ 0.05 <sup>1)2)</sup>	1.15 $\pm$ 0.05 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup>  $P < 0.05$ ,与空白对照组比较; <sup>2)</sup>  $P < 0.05$ ,与顺铂组比较

**2.4  $\text{A}_2\text{O}_3$ 对 Cmyc基因表达情况** BGC-823细胞经  $\text{A}_2\text{O}_3$ 作用 72 h,琼脂糖凝胶电泳图显示 1.0

$\mu$ mol/L的  $\text{A}_2\text{O}_3$ 使 Cmyc表达明显减弱,6.0  $\mu$ mol/L的  $\text{A}_2\text{O}_3$ 使 Cmyc表达明显减弱,6.0

μmol/L的 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>使 C<sub>myc</sub>表达明显增强。结果见表 4。

表 4 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>及顺铂对细胞 C<sub>myc</sub>基因蛋白表达情况

	空白组	顺铂组	A组	B组	C组	D组
24 h	0.37 ±0.01	0.23 ±0.01	0.12 ±0.01	0.12 ±0.03	0.34 ±0.03	0.35 ±0.04
48 h	0.36 ±0.01	0.17 ±0.02	0.23 ±0.03	0.43 ±0.03	0.36 ±0.03	0.49 ±0.02
72 h	0.36 ±0.01	0.41 ±0.03 <sup>1)</sup>	0.26 ±0.02 <sup>1) 2)</sup>	0.28 ±0.02 <sup>1) 2)</sup>	0.37 ±0.01 <sup>1)</sup>	1.04 ±0.07 <sup>1)</sup>

<sup>1)</sup> P < 0.05, 与空白对照组比较; <sup>2)</sup> P < 0.05, 与顺铂组比较

### 3 讨论

细胞凋亡是新陈代谢过程中调节细胞数和生命活动的重要环节,凋亡受阻将导致细胞代谢的紊乱及肿瘤的发生发展。多数学者认为,治疗肿瘤最有效的途径是直接诱导肿瘤细胞凋亡。近年来,化疗方案不断改进,化疗的疗效得以稳定地提高,但是肿瘤细胞的耐药性,特别是多药耐药(MDR)导致的化疗失败仍然是大多数癌症患者治疗上的一个主要问题<sup>[5]</sup>。LRP基因位于16号染色体短臂上,其相对分子量为110 × 10<sup>3</sup>,由896个氨基酸组成,不属于ATP结合盒式转运蛋白超家族成员,主要分布于具有分泌功能的上皮,它能阻止药物进入细胞核,并能以胞吐的方式将胞浆内的药物排出细胞外。

我们的实验结果表明,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对细胞BGC-823具有抑制作用,其抑制作用随浓度和作用时间增强;浓度从1.0~6.0 μmol/L的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>抗肿瘤作用明显增强,但与顺铂相比,6.0 μmol/L的砷剂效果,仍不如顺铂。经干预后,细胞中的LRP、C<sub>myc</sub>的基因表达水平有双相调节功能,在浓度为1.0、2.0 μmol/L时可以抑制LRP、C<sub>myc</sub>水平的表达;而4.0 μmol/L时,LRP、C<sub>myc</sub>表达有增高趋势,6.0 μmol/L时显示LRP、C<sub>myc</sub>表达明显增强。因此,从抑制LRP、C<sub>myc</sub>表达角度来看,低浓度的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>较高浓度有

一定优势。顺铂虽抑癌作用较As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>强,但诱导LRP、C<sub>myc</sub>表达也明显较As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>高。这表明顺铂抗癌治疗中有诱导耐药的可能性。从而提示,顺铂联用低浓度As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>,在增强抗肿瘤效果,预防抗癌药物耐药方面,将可能有独特的作用。而且,副作用小,安全性好,在治疗胃腺癌等实体瘤中,将会有较好的应用前景。

### 参考文献:

- [1] 周承志. 肺癌耐药相关基因及逆转耐药策略的研究进展[J]. 国外医学·呼吸系统分册, 2002, 22(12): 30.
- [2] 顾琴龙, 沈佰华, 李宁丽等. 氧化砷诱发胃癌细胞凋亡的初步研究[J]. 中华消化杂志, 1998, 18(6): 69.
- [3] Zhang W, Ohnishi K, Shigeno K, et al. The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms[J]. Leukemia, 1998, 12(18): 1383.
- [4] Chen GO, Zhu J, Shi XG, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> induces NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML protein[J]. Blood, 1996, 88(16): 1052.
- [5] 石玉枝, 柳英兰, 霍建民, 等. 三氧化二砷诱导小细胞肺癌细胞凋亡及 p53, bcl-2 基因表达的研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2002, 25(13): 665.

收稿日期: 2008-10-06

## 《药学实践杂志》2009年第 2期继续教育试题答题卡

姓名	科别	职称
邮编	电话	
工作单位		
▶试题 1 A B C D E	▶试题 2 A B C D E	
▶试题 3 A B C D E	▶试题 4 A B C D E	
▶试题 5 A B C D E	▶试题 6 A B C D E	
▶试题 7 A B C D E	▶试题 8 A B C D E	
▶试题 9 A B C D E	▶试题 10 A B C D E	
▶试题 11 A B C D E	▶试题 12 A B C D E	
▶试题 13 A B C D E	▶试题 14 A B C D E	
▶试题 15 A B C D E	▶试题 16 A B C D E	
▶试题 17 A B C D E	▶试题 18 A B C D E	

注: 请将正确的答案用 2B 铅笔涂黑 答题卡复印有效

回函地址: 上海市国和路 325 号药学实践杂志编辑部收 (200433)