

· 实验研究 ·

三氧化二砷对人神经母细胞瘤细胞凋亡作用的影响

高晓宁, 黄东生, 唐锁勤, 张晓飞, 杨婷婷

(中国人民解放军总医院小儿内科, 北京 100853)

[摘要] 目的 三氧化二砷(As_2O_3)通过诱导细胞凋亡和诱导细胞分化效应治疗急性早幼粒细胞白血病(APL)患者已取得很好疗效。与APL细胞相似,神经母细胞瘤(NB)细胞也是分化成熟受阻,该文对 As_2O_3 在体外对人神经母细胞瘤细胞凋亡作用的影响及可能的机制进行探讨。方法 比色法观察 As_2O_3 对神经母细胞瘤SK-N-SH细胞增殖的影响;Giemsa染色观察细胞形态学改变;Annexin V/PI双染色流式细胞术检测细胞凋亡;免疫细胞化学染色方法检测bcl-2蛋白表达变化。结果 As_2O_3 明显抑制SK-N-SH细胞增殖,抑制作用呈剂量时间依赖效应,并出现细胞凋亡的形态学改变;流式细胞仪检测4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用SK-N-SH细胞72 h后,早期凋亡细胞比例($9.9 \pm 0.8\%$),与对照组($3.7 \pm 0.2\%$)相比明显增多,差异有显著性($P < 0.05$);分别以1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 处理SK-N-SH细胞72 h后,bcl-2表达随 As_2O_3 浓度增加呈降低趋势,bcl-2表达阳性率分别为($26.3 \pm 8.0\%$), ($15.0 \pm 4.5\%$)和($4.8 \pm 3.2\%$),与对照组($73.6 \pm 6.1\%$)相比,差异有显著性($P < 0.01$)。结论 As_2O_3 可在体外抑制神经母细胞瘤细胞增殖,诱导凋亡,bcl-2参与了其调节作用。

[中国当代儿科杂志, 2005, 7(2): 163-166]

[关键词] 神经母细胞瘤;三氧化二砷;细胞凋亡

[中图分类号] R73 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008 - 8830(2005)02 - 0163 - 04

Effect of arsenic trioxide on apoptosis of neuroblastoma cells

Xiao-Ning GAO, Dong-Sheng HUANG, Suo-Qin TANG, Xiao-Fei ZHANG, Ting-Ting YANG. Department of Pediatrics, General Hospital of People's Liberation Army, Beijing 100853, China (Email: gaoxn@tom.com)

Abstract: Objective Recent clinical studies have shown that arsenic trioxide (As_2O_3) at low concentrations induces a complete remission with minimal toxicity in patients with refractory acute promyelocytic leukemia (APL). Studies suggest that As_2O_3 induces apoptosis and possible differentiation in APL cells. Like APL cells, neuroblastoma (NB) cells are thought to be arrested at an early stage of differentiation, and cells of highly malignant tumors fail to undergo spontaneous maturation. This study was designed to investigate the effect of (As_2O_3) on apoptosis of neuroblastoma cells in vitro and its mechanism. **Methods** The effect of a wide range of concentrations of As_2O_3 on the proliferation of neuroblastoma cells was measured by the colorimetric method. Morphological changes of the cells were observed under the optical microscope in Giemsa stain. Cell apoptosis was determined by the flow cytometry assay in Annexin V/PI stain. Bcl-2 was detected by the immunocytochemical method. **Results** 0.5-4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 significantly inhibited the proliferation of the neuroblastoma cell line SK-N-SH and the inhibitory effect was dose- and time-dependent, which was accompanied by the appearance of morphologic characteristics of apoptosis. After 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 treatment for 72 hrs, the percentage of apoptotic cells [$(9.9 \pm 0.8\%)$] increased significantly when compared with the untreated controls [$(3.7 \pm 0.2\%)$] ($P < 0.05$). The expression level of bcl-2 was down-regulated as the concentration of As_2O_3 increased. SK-N-SH cells treated with 1.0 $\mu\text{mol/L}$, 2.0 $\mu\text{mol/L}$, and 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 , the percentage of bcl-2 positive cells [$(26.3 \pm 8.0\%)$, ($15.0 \pm 4.5\%$) and ($4.8 \pm 3.2\%$) respectively] decreased significantly when compared with the untreated controls [$(73.6 \pm 6.1\%)$] ($P < 0.01$). **Conclusions** As_2O_3 may inhibit the proliferation and induce apoptosis of the neuroblastoma cells, in which bcl-2 is involved. [Chin J Contemp Pediatr, 2005, 7(2): 163-166]

Key words: Neuroblastoma; Arsenic trioxide; Apoptosis

神经母细胞瘤(neuroblastoma, NB)是儿童中最常见的实体瘤之一,恶性程度高,多数患儿诊断时

就已发生转移,即使采用强烈放疗、化疗、骨髓移植及维甲酸等综合治疗,完全缓解率和长期无病生存

[收稿日期]2004-07-22;[修回日期]2004-10-06

[作者简介]高晓宁(1978-),女,硕士,医师。主攻方向:小儿血液肿瘤疾病。

[通讯作者]黄东生,中国人民解放军总医院小儿内科,邮编:100853。

率仍低^[1]。近年来,临床使用三氧化二砷(As_2O_3)治疗急性早幼粒细胞白血病(acute promyelocytic leukemia, APL)患者取得了很好疗效,尤其对复发和难治的患者也有较高缓解率,优于其他疗法,体外试验证实 As_2O_3 通过与维甲酸不同的途径特异性降解 APL 致病基因 PML/RAR α 融合基因的蛋白产物,下调 bcl-2 基因诱导 APL 细胞凋亡^[2]。与 APL 细胞相似,NB 细胞也是分化成熟受阻,可被药物诱导分化,这使得人们寻找治疗 NB 新方法的目光投向了 As_2O_3 这一具有潜力的药物。已有研究证实, As_2O_3 通过活化凋亡相关蛋白 bax^[3]、激活 caspase-3^[4]等机制诱导神经母细胞瘤细胞凋亡。我们在体外观察了 As_2O_3 对人 NB 细胞株 SK-N-SH 凋亡作用的影响,并对其可能的作用机制进行探讨。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

人神经母细胞瘤细胞系 SK-N-SH 购于中国医学科学院细胞中心。 As_2O_3 干粉由哈尔滨医科大学附属第一医院提供,用 PBS 缓冲液配成 50 $\mu\text{mol/L}$ 的储存液,0.22 μm 的滤膜过滤除菌备用。CellTiter 96 Aqueous 单溶液细胞增殖分析试剂盒为 Promega 公司产品。钙依赖性磷脂结合蛋白 V 荧光染色试剂盒(annexin-V-fluores stain kit)为 Boehringer Mannheim 公司产品。bcl-2 为小鼠抗人单克隆抗体为 Santa Cruz 公司产品,SP 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒、Triton X-100(聚乙二醇辛基苯基醚)购于北京中山生物技术有限公司。

1.2 细胞培养

SK-N-SH 细胞用含 10% 胎牛血清(Hyclone)的 DMEM 高糖培养基(GIBCO-BRL),置 37 $^{\circ}\text{C}$ 、体积分数为 5% 的 CO_2 饱和湿度的培养箱中培养。实验用对数生长期细胞,台盼兰拒染率在 95% 以上。

1.3 As_2O_3 对 NB 细胞活力和增殖的影响

接种 SK-N-SH 细胞于 96 孔板,每孔 2×10^4 个细胞(100 μL),37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下培养 24 h 后实验组依次加 0.125,0.25,0.5,1.0,2.0,4.0,8.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 ,继续分别培养 24,48,72 h 时终止培养,设只加培养液的对照组。实验结束前 4 h 每孔加 20 μL CellTiter 96 Aqueous 单溶液试剂,37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 条件下继续孵育 4 h,然后在 96 孔板读板仪上测定 490 nm 吸光度 A 值。细胞增殖抑制率 = $(1 - \text{实验组 A 值} / \text{对照组 A 值}) \times 100\%$ 。本实验每次每组设 3 个复孔,结果为 3 次独立实验的均值。

1.4 Giemsa 染色观察细胞形态

SK-N-SH 细胞接种直径 3.5 cm 的培养皿(costar),与一定浓度 As_2O_3 共同孵育不同时间,用甲醇固定 5 min, Giemsa 染色后,显微镜下观察细胞凋亡的特征性变化。

1.5 流式细胞仪检测细胞凋亡

钙依赖性磷脂结合蛋白 V 和碘化丙啶(annexin V/PI)双染色流式细胞仪检测细胞凋亡: 1×10^6 个细胞经 PBS 洗涤后,按照 annexin-V-fluores stain kit 提供的方法操作,流式细胞仪(B-D 公司)检测:激发波长 488 nm,用波长 511 nm 的通带滤器检测 annexin-V-fluores 的绿色荧光,另一波长 560 nm 的滤器检测 PI 的红色荧光。

1.6 免疫细胞组织化学技术检测 bcl-2 蛋白表达

SK-N-SH 细胞接种 24 孔细胞培养板,加入 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 ,同时设不加 As_2O_3 的对照组,于 72 h 后用免疫细胞组织化学技术检测 bcl-2 蛋白表达。以 4% 多聚甲醛固定 20 min, PBS 洗涤, 1% Triton-x 100 作用 30 min, 0.3% H_2O_2 中和内源性过氧化氢酶,用 10% 羊血清封闭无关抗原,加 1:40 稀释的小鼠 bcl-2 单克隆抗体,室温过夜, PBS 洗涤,加生物素标记的羊抗小鼠 IgG 工作液, PBS 洗涤,滴加辣根酶标记的链酶卵白素工作液, DAB 显色,苏木素复染。阴性对照以 PBS 代替一抗。细胞浆内呈棕黄色为阳性,400 倍显微镜下随机选取 10 个视野,计数阳性细胞百分比。

1.7 统计学方法

应用 SPSS10.0 统计包处理数据,数据用均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两样本间均数比较用 t 检验,检验水准定为 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 As_2O_3 抑制 SK-N-SH 细胞增殖

CellTiter 96 Aqueous 单溶液试剂包含一种新型甲臍化合物(内盐, MTS)和一个电子偶联试剂(乙硫吩嗪, PES),在 490 nm 吸收值测量的甲臍产物的量直接与培养物中活细胞的数量成正比。我们的结果显示,在 0.5 ~ 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 的浓度范围内,随药物浓度的增加及作用时间的延长, SK-N-SH 细胞增殖明显受抑, 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 抑制作用与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比,增殖受抑程度增高不明显。0.125 ~ 0.25 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 对 SK-N-SH 细胞增殖抑制作用不明显(见表 1)。

表1 不同浓度 As_2O_3 对 SK-N-SH 细胞增殖的影响

药物浓度 ($\mu\text{mol/L}$)	抑制率 ($\bar{x} \pm s, \%$)		
	24 h	48 h	72 h
0.125	5.3 ± 9.7	8.1 ± 11.2	11.3 ± 14.0
0.25	2.8 ± 12.3	13.4 ± 13.4	10.2 ± 11.3
0.5	15.2 ± 2.7^a	23.6 ± 17.6	17.5 ± 7.5^a
1	20.4 ± 3.1^a	34.3 ± 11.9^b	37.3 ± 4.9^b
2	25.4 ± 8.4^b	42.5 ± 5.6^a	52.6 ± 5.7^a
4	36.0 ± 12.4^b	44.4 ± 9.9^a	56.1 ± 5.3^a
8	42.9 ± 15.2^b	51.3 ± 7.1^a	55.5 ± 5.3^a

与对照组相比, a $P < 0.01$; b $P < 0.05$

2.2 As_2O_3 诱导 SK-N-SH 细胞形态学改变

1.0 ~ 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用 72 h 以后, 倒置显微镜下可见细胞体积缩小, 胞体变圆, 细胞周围有数个小泡状突起, 细胞间隙增宽, 生长缓慢, 细胞贴壁能力稍下降。Giemsa 染色后显微镜观察, 见细胞胞膜完整, 染色质凝聚, 核固缩, 核碎裂, 形成凋亡小体, 随着时间的延长及药物浓度增加, 凋亡细胞数增多。

2.3 As_2O_3 诱导 SK-N-SH 细胞凋亡

细胞膜不对称丧失导致磷脂酰丝氨酸 (phosphatidylserine, PS) 外翻发生在细胞凋亡的早期。annexin V 可以特异性地与 PS 结合, 而被用来检测暴露在细胞表面的 PS, 这时细胞膜仍维持其完整性, 使变性染色质着色的 PI 不能进入细胞, 然而坏死和凋亡晚期的继发性坏死细胞可同时受 annexin V 和 PI 标记, 用 PI 可以区分膜的完整性。本研究结果显示 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用 72 h, 凋亡细胞百分比为 $(9.9 \pm 0.8)\%$, 与对照组 $(3.7 \pm 0.2)\%$ 相比, 差异有显著性 ($t = 11.42, P < 0.01$), 提示 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 能够诱导 SK-N-SH 细胞凋亡。

2.4 不同浓度 As_2O_3 对 SK-N-SH 细胞中 bcl-2 表达的影响

以 1.0, 2.0, 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 处理 SK-N-SH 细胞 72 h 后, bcl-2 表达阳性率分别为 $(26.3 \pm 8.0)\%$ 、 $(15.0 \pm 4.5)\%$ 和 $(4.8 \pm 3.2)\%$, 与对照组 $(73.6 \pm 6.1)\%$ 相比, 差异有显著性 ($t_1 = 13.85, t_2 = 26.92, t_3 = 35.36$, 均 $P < 0.01$), 表明随 As_2O_3 浓度增加, bcl-2 表达呈降低趋势。

3 讨论

神经母细胞瘤在儿童恶性实体瘤的发病率中占第 2 位, 转移早、恶性程度高, 目前临床治疗主要是

手术治疗加辅助化疗, 但完全缓解率和长期无病生存率很低, 因此, 寻找新的化疗药物对改善 NB 患儿预后具有重要临床意义。砷剂通过诱导细胞凋亡和部分分化的双重效应^[5] 被用于 APL 的治疗取得成功, 激起了人们将砷剂应用于其它肿瘤治疗的研究热情。伍刚等^[6,7] 的研究已经表明, As_2O_3 能明显抑制神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖, 诱导细胞凋亡。深入研究 As_2O_3 对神经母细胞瘤细胞作用及可能的机制将为 As_2O_3 应用于 NB 患者的临床治疗提供理论依据。

本研究表明, As_2O_3 可以抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞的增殖。Chen 等^[8] 报道用 As_2O_3 治疗 APL 的血药浓度为 0.5 ~ 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 在 16 例维甲酸治疗后复发的 APL 患者中, 15 例达完全缓解而没有出现明显的骨髓抑制。本研究显示, 0.125 ~ 0.25 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 因浓度过小, 对 SK-N-SH 细胞增殖抑制作用不明显, 在 0.5 ~ 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度范围内, As_2O_3 以浓度依赖方式抑制 SK-N-SH 细胞生长, 随作用时间延长, As_2O_3 抑制作用逐渐增强, 这提示治疗 APL 的剂量可能同样适用于 NB 的临床治疗。当作用时间一定, 8.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 As_2O_3 抑制作用与 4.0 $\mu\text{mol/L}$ 组相比, 增殖受抑程度增高不明显, 这提示我们, 运用砷剂于临床治疗时, 一味增加给药浓度并不能增加疗效。

细胞凋亡是区别于细胞坏死的、主动的、受多基因调控的程序化的死亡, 是细胞的自杀现象。肿瘤的发生即是肿瘤细胞的凋亡和增殖平衡失调的结果。许多化疗药物即是通过诱导肿瘤细胞凋亡而引起治疗作用的。Akao 等^[9] 的研究显示: 以低浓度 (2.0 $\mu\text{mol/L}$) 的 As_2O_3 作用于 10 种神经母细胞瘤细胞系中有 7 种发生细胞凋亡的表现。我们应用 Giemsa 染色可观察到典型的凋亡细胞及凋亡小体等形态学改变, 流式细胞术检测显示凋亡细胞明显增多, 表明 As_2O_3 在体外可以诱导人神经母细胞瘤 SK-N-SH 细胞凋亡。体外研究显示^[5] As_2O_3 对维甲酸敏感的 APL 细胞系 NB4 具有剂量依赖的双重效应, 高浓度 As_2O_3 诱导细胞凋亡, 低浓度 (0.1 ~ 0.5 $\mu\text{mol/L}$) As_2O_3 则诱导细胞部分分化的形态学改变。本实验中, 低浓度 As_2O_3 作用下, 没有见到细胞部分分化的形态学改变。

Bcl-2 是调节细胞凋亡的关键基因, 其蛋白产物能抑制细胞凋亡。 As_2O_3 诱导一些白血病细胞凋亡与其降低 bcl-2 的表达有关。已知人神经母细胞瘤细胞株 SK-N-SH 中 bcl-2 蛋白呈高表达^[10], 本实验显示, 1.0 ~ 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 作用于 SK-N-SH 细

胞72 h, bcl-2 表达明显减少, 表明 As_2O_3 可通过下调 bcl-2 蛋白表达而诱导凋亡。

综上所述, As_2O_3 在体外能够在一定程度上抑制人神经母细胞瘤 SK-N-SH 的生长, 诱导细胞凋亡, 其作用机制与调节 bcl-2 蛋白表达有关。

[参 考 文 献]

- [1] Bown N. Neuroblastoma tumor genetics: clinical and biological aspects [J]. J Clin Pathol, 2001, 54(12): 897-910.
- [2] Lallemand-Breitenbach V, Zhu J, Puvion F, Koken M, Honore N, Doubekovsky A, et al. Role of promyelocytic leukemia (PML) sumolation in nuclear body formation, 11S proteasome recruitment, and As_2O_3 -induced PML or PML/retinoic acid receptor alpha degradation [J]. J Exp Med, 2001, 193(12): 1361-1371.
- [3] Karlsson J, Ora I, Porn-Ares I, Pahlman S. 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.
- [4] Ora I, Bondesson L, Jonsson C, Ljungberg J, Porn-Ares I, Garwicz S, et al. Arsenic trioxide inhibits neuroblastoma growth in vivo and promotes apoptotic cell death in vitro [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2000, 277(1): 179-185.

- [5] Chen GQ, Shi XG, Tang W, Xiong SM, Zhu J, Cai X, et al. Use of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): I. As_2O_3 exerts dose-dependent dual effects on APL cells [J]. Blood, 1997, 89(9): 3345-3353.
- [6] 伍刚, 应大明, 王耀平, 林梓, 沈蕾, 朱亚忠. 三氧化二砷对神经母细胞瘤细胞增殖的影响[J]. 中华儿科杂志, 1998, 36(5): 265-267.
- [7] 伍刚, 周云峰, 陈同辛, 沈蕾, 周昕, 林梓, 等. 三氧化二砷诱导神经母细胞瘤细胞凋亡机理的研究[J]. 中华儿科杂志, 2000, 38(7): 452-453.
- [8] Chen GQ, Zhu J, Shi XG, Ni JH, Zhong HJ, Si GY, et al. In vitro studies on cellular and molecular mechanisms of arsenic trioxide (As_2O_3) in the treatment of acute promyelocytic leukemia: As_2O_3 induces NB4 cell apoptosis with downregulation of bcl-2 expression and modulation of PML-RAR alpha/PML protein [J]. Blood, 1996, 88(3): 1052-1061.
- [9] Akao Y, Nakagawa Y, Akiyama K. Arsenic trioxide induces apoptosis in neuroblastoma cell lines through the activation of caspase 3 in vitro [J]. FEBS Lett, 1999, 455(1-2): 59-62.
- [10] Hanada M, Krajewski S, Tanaka S, Cazals-Hatem D, Spengler BA, Ross RA, et al. Regulation of bcl-2 oncoprotein levels with differentiation of human neuroblastoma cells [J]. Cancer Res, 1993, 53(20): 4978-4986.

(本文编辑: 吉耕中)

· 消息 ·

第十一届全国小儿神经学术会议通知

中华医学会儿科学分会神经学组, 定于2005年11月3~6日在深圳市召开第十一届全国小儿神经学术会议, 现将征文事宜通知如下。

1、征文内容: 涉及小儿神经系统疾病诊断治疗的临床经验与应用基础研究, 主要包括: 癫痫、脑电图、神经遗传代谢病、神经系统自身免疫性疾病、神经系统感染、脑瘫、智力低下与言语发育障碍、心理行为异常、睡眠障碍、其他。

2、征文要求: (1) 具有科学性、创新性和实用性; 数据要准确。(2) 来稿必须是未公开发表过的论文。(3) 请用计算机打印稿件。(4) 来稿请寄800字以内的摘要(包括目的、方法、结果和结论, 结果部分应有主要数据)和3000字以内的全文各1份, 并请加盖公章或附单位介绍信。稿件务必注明工作单位、地址和邮政编码。稿件及软盘请寄深圳市益田路7019号深圳市儿童医院小儿癫痫脑瘫诊疗中心廖建湘收, 邮政编码: 518026。信封请注明“小儿神经会议征文”字样。

3、截稿日期: 2005年7月31日(以邮戳为准)。未录用稿件一律不退, 请自留底稿。

4、被录用文章将被编入“论文汇编”, 并颁发论文证书。

5、欢迎电子邮件(可替代软盘, 主题注明“小儿神经会议征文”)投稿。

电子邮件地址: epilepsycenter@sina.com; epilepsycenter@163.com;

epilepsycenter@medmail.com.cn。

中华医学会儿科学分会神经学组

2005年1月