

# 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系PC-3凋亡及其抑制转移的作用

刘静冰, 秦叔逵, 李进

## ■背景资料

胰腺癌号称21世纪最顽固的癌症堡垒, 历来受到消化科及肿瘤科医生的广泛关注, 其早期诊断困难, 外科手术治疗虽经努力可以达到“根治性”切除, 但复发转移较快, 因此其他辅助治疗目前研究较多。

刘静冰, 秦叔逵, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心江苏省南京市 210002

李进, 上海复旦大学医学院附属肿瘤医院 上海市 200032

南京军区医学科研“十·五”计划课题, No. 02MA014

通讯作者: 秦叔逵, 210002, 江苏省南京市杨公井34标34号, 中国人民解放军第八一医院全军肿瘤中心肿瘤内科, qinsk@csc.org.cn

电话: 025-84453932 传真: 025-84453932

收稿日期: 2007-02-25 接受日期: 2007-03-23

## Effects of arsenic trioxide on the pancreatic carcinoma cell line PC-3 and inhibitory migration

Jing-Bing Liu, Shu-Kui Qin, Jin Li

Jing-Bing Liu, Shu-Kui Qin, Oncology Center of Chinese PLA 81<sup>st</sup> Hospital, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China

Jin Li, Cancer Hospital, Medical Center of Fudan University, Shanghai 200032, China

Supported by: the Medical Research Program of Nanjing Military Region during the 10<sup>th</sup> Five-Year Plan Period, No. 02MA014

Correspondence to: Shu-Kui Qin, Oncology Center of Chinese PLA 81<sup>st</sup> Hospital, No. 34, 34 Biao, Yanggongjing Street, Nanjing 210002, Jiangsu Province, China. qinsk@hotmail.com  
Received: 2007-02-25 Accepted: 2007-03-23

## Abstract

**AIM:** To explore the effects of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> on apoptosis and its inhibitory migration in a human pancreatic carcinoma cell line.

**METHODS:** The human pancreatic carcinoma PC-3 cell line was treated with As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>. The rate of apoptosis and the growth cycle of the cell line were investigated by flow cytometry. The expression of gene proteins related to apoptosis (Fas, Fas-L, Bcl-2, and Bax) and metastasis (CD44 and nm23) were observed by immunohistochemistry.

**RESULTS:** A visible apoptotic peak and blockage of the S phase of the cell cycle (14.86%-63.66%) were shown by flow cytometry. Immunohistochemical staining indicated that the expressions of Bcl-2 (+++~+) and CD44 (++++~+) were down regulated, while the expressions of Fas

(+~+++), Fas-L (-~+++), and nm23 (+~+++), were up-regulated.

**CONCLUSION:** Injections of As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> can induce human pancreatic carcinoma cell apoptosis and inhibit pancreatic carcinoma migration. The mechanism was thought to be that As<sub>2</sub>O<sub>3</sub> regulated the expression of Fas, Fas-L, Bcl-2, CD44 and nm23.

**Key Words:** Arsenic trioxide; Pancreatic carcinoma cell; Apoptosis; Migration

Liu JB, Qin SK, Li J. Effects of arsenic trioxide on the pancreatic carcinoma cell line PC-3 and inhibitory migration. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(17):1952-1955

## 摘要

**目的:** 探讨三氧化二砷(亚砷酸, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>)注射液诱导人类胰腺癌细胞凋亡及其抑制转移的作用机制。

**方法:** 用As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>处理人胰腺癌细胞株PC-3, 通过流式细胞仪观察细胞的凋亡率及生长周期的变化; 用免疫组织化学的方法, 检测凋亡相关基因蛋白Fas, Fas-L, Bcl-2和Bax及转移相关基因蛋白CD44和nm23表达的变化。

**结果:** 流式细胞仪检测显示明显的凋亡峰出现, 并使细胞周期主要被阻滞在S期(14.9%-63.7%); 免疫组化结果显示, Bcl-2(+++~+), CD44(++++~+)基因的表达下调, Fas(+~+++), Fas-L(-~+++), 及nm23(+~+++), 基因的表达上调。

**结论:** As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液可诱导人类胰腺癌细胞株PC-3凋亡并具有抑制转移作用, 这可能与调节Bcl-2, Fas, Fas-L及CD44, nm23蛋白的表达有关。

**关键词:** 三氧化二砷; 胰腺癌细胞; 凋亡; 转移

刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷诱导胰腺癌细胞系

PC-3凋亡及其抑制转移的作用. 世界华人消化杂志 2007;15(17):1952-1955

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/1952.asp>

## 0 引言

胰腺癌(pancreatic carcinoma)是胰腺的外分泌性腺癌,在引起人类死亡的十大恶性肿瘤中占第8位,全世界每年有22.7万人死于此病,其发生率在男性和女性分别为0.007%-0.009%和0.0045%-0.006%<sup>[1-5]</sup>;且胰腺癌预后极差,是所有常见恶性肿瘤中生存率最低的肿瘤,据美国癌症协会统计,2004年美国有31 860例患者被诊断为胰腺癌,其中31 270例死亡<sup>[6]</sup>;几十年来,胰腺癌的5 a生存率几乎没有变化,仍然低于5%,这主要与其内在的生物侵袭性及临床发现较晚有关<sup>[7]</sup>.手术切除是可能治愈此病的唯一方法,然而只有10%左右的患者在就诊时获得切除机会,且切除后的5 a生存率仍然只有5%-20%<sup>[8]</sup>.目前的姑息性治疗,包括放疗、化疗、姑息手术等,只能减轻症状,不能显著延长生存期.三氧化二砷(arsenic trioxide, As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, 亚砷酸)注射液在胰腺癌<sup>[9-14]</sup>的研究和临床应用上初步显示出良好的前景,但仍较肤浅,我们课题组在预实验<sup>[15]</sup>中已观察到As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对胰腺癌细胞有明显的诱导凋亡作用,本实验进一步观察其诱导凋亡及抗转移的作用机制,希望能为胰腺癌的临床治疗提供一种新的有效药物以及确凿的治疗依据.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 人类胰腺癌细胞株PC-3,引种自北京协和医科大学协和医院病理科.将细胞接种于无菌培养瓶中,加入适量RPMI 1640培养液(含150 mL/L的小牛血清、青霉素100 mg/L、链霉素100 mg/L),于37℃、50 mL/L CO<sub>2</sub>及饱和湿度的培养箱中培养.细胞呈单纯贴壁生长,每3-5 d传代1次. As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液:哈尔滨伊达药业有限公司上市药品.

**1.2 方法** 取1.0×10<sup>6</sup>的活细胞接种于培养瓶中,待细胞贴壁后分别加入终浓度为2 mg/L的As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>溶液,置培养箱中培养至预定时间.消化,离心,固定,加入5 g/L的碘化丙啶(propidium iodide) 1 mL进行染色,过滤后,存放在4℃冰箱内20 min后上流式细胞仪检测.使用软件CELL Quest进行分析.收集与As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>(终浓度为2 mg/L)孵育48 h的PC-3细胞,固定,晾干.按免疫组化试剂盒所示方法(SP法)进行操作.阳性判断:以胞质

表 1 As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对PC-3细胞凋亡及细胞周期的影响(%)

时间(h)	凋亡	G <sub>0</sub> /G <sub>1</sub>	S	G <sub>2</sub> /M
0	0.2	60.9	14.9	24.2
12	3.8	39.5	23.9	36.6
24	21.9	38.6	37.1	24.3
48	27.4	31.8	63.7	4.6

和/或胞膜呈棕黄色为阳性细胞,油镜下观察200个细胞,计算阳性细胞百分率.以阳性率<5%为(-);5%-25%为(+);26%-50%为(++);>50%则为(+++).

**统计学处理** 采用SPSS11软件进行相关资料处理.统计变量以mean±SD表示, P<0.05表示差异具有显著性.

## 2 结果

**2.1 流式细胞术(FCM)分析** 2 mg/L As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>注射液分别作用12 h、24 h及48 h后的胰腺癌PC-3细胞,经流式细胞仪检测,结果显示对照组细胞的凋亡率为0.21%;As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用组细胞的凋亡率随作用时间的延长而增加,且随用药时间的延长,S期细胞比例呈上升趋势,而G<sub>0</sub>/G<sub>1</sub>期呈下降趋势(表1).

**2.2 PC-3细胞凋亡相关基因蛋白的表达** 未加药的对照组PC-3细胞, Bax基因表达强(+++), Bcl-2基因表达强(+++), Fas基因表达弱(+), Fas-L基因表达阴性(-);经As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用48 h后, Bax基因仍表达较强(+++), Bcl-2基因表达弱(+), Fas基因表达增强(+++), Fas-L基因表达增强(+++).

**2.3 PC-3细胞转移相关基因蛋白的表达** 未加药对照组的PC-3细胞, CD44基因表达呈强阳性(++++) , nm23基因表达弱(+);经As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>作用48 h后, CD44基因表达减弱(+), nm23基因表达增强(+++).

## 3 讨论

自1971年哈尔滨医科大学第一临床医学院率先用As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>治疗急性早幼粒细胞白血病(AML-M<sub>3</sub>型,简称APL)取得成功以后,砷剂成为世界血液、肿瘤界研究的新热点;近年来的研究证实,As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对多种实体瘤均有效<sup>[16-19]</sup>.对As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>的作用机制,人们进行了较为广泛的研究,发现As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>除诱导细胞凋亡和部分分化外,还可调控细胞凋亡相关基因的表达,在诱导不同类型肿瘤细胞凋亡时,调控凋亡相关基因的表达也不完全相同,并可使线粒体内膜跨膜电位下降,延长细胞

## ■应用要点

因前期研究已得出:As<sub>2</sub>O<sub>3</sub>对胰腺癌细胞有明显的诱导凋亡作用,本文则进一步观察了其诱导凋亡及抗转移的作用机制,为临床治疗提供更为可靠的治疗依据.

# 同行评价

本文内容新颖, 实验方法成熟, 结果可信, 对胰腺癌机制的研究有参考价值 and 借鉴意义。

倍增时间或阻抑细胞周期进程。

本实验中, FCM分析显示 $As_2O_3$ 作用于胰腺癌细胞48 h后, 细胞凋亡率一直随时间的延长而持续上升; 细胞周期分析显示: S期细胞比例呈上升趋势(14.9%-63.7%), 而 $G_0/G_1$ 期呈下降趋势(60.9%-31.8%)。说明 $As_2O_3$ 诱导胰腺癌细胞凋亡的机制之一为将细胞周期阻滞于S期, 从而阻抑细胞的有丝分裂。

Bcl-2基因家族在细胞凋亡的调控中起着重要的作用, Bcl-2具有抑制细胞凋亡, 延长细胞生命的功能, 其定位于细胞线粒体膜、核膜和内质网, 在诸多凋亡相关基因中尤显重要, 被看做是调控细胞凋亡的最后共同通路之一<sup>[20-21]</sup>; Bax是Bcl-2家族的另一成员, 与Bcl-2作用相反, 具有促进细胞凋亡的作用<sup>[22-24]</sup>。这一基因家族的成员通常以二聚体的形式发挥作用, 如Bcl-2/Bax。 $As_2O_3$ 作用于胰腺癌细胞48 h后, Bax基因表达无变化, 而Bcl-2基因表达明显减弱(+++~+), 使Bcl-2/Bax的比值下调, 从而促进了细胞的凋亡。Fas基因也称APO-1或CD95, 是存在于人细胞表面介导凋亡的蛋白质分子, 属于TNF受体和NGF受体家族的成员, 通过与其配体(Fas-L)交联, 即可诱导典型的细胞凋亡<sup>[25-27]</sup>。本实验发现,  $As_2O_3$ 作用于胰腺癌细胞48 h后, Fas及Fas-L基因表达均明显增强(+~+++及~++++)。

CD44属于黏附分子家族透明质酸受体类, 是存在于细胞表面的跨膜糖蛋白, 主要配体为透明质酸(HA), 其大量表达于癌前期病变和恶性肿瘤<sup>[28-32]</sup>。大量研究表明, 他的表达与胰腺癌的浸润和转移有关。nm23定位于人17号染色体长臂远端, 他可以抑制参与细胞转移连锁反应中的蛋白质或直接作用于转移相关基因的RNA或DNA<sup>[33-38]</sup>。nm23基因的低表达已经在多种高转移性肿瘤中被证实, 通过分析乳腺癌、胰腺癌、甲状腺癌、胃癌、肝癌、结肠癌等均发现, nm23基因缺乏及其产物低表达与疾病进展及高转移潜力呈正相关, 且预后也差。经 $As_2O_3$ 作用48 h后的胰腺癌细胞, 转移相关基因蛋白CD44表达减弱(+++~+), nm23表达增强(+~+++), 表明 $As_2O_3$ 抗胰腺癌转移的机制与调节这两种基因蛋白的表达密切相关。

本实验证实了 $As_2O_3$ 长期以来被认为能抑制细胞DNA合成, 干扰细胞代谢, 致染色体畸变或损害细胞基因的作用; 尤其对生长活跃的肿瘤细胞,  $As_2O_3$ 可抑制在正常细胞表达少而在肿瘤

细胞表达活跃的基因<sup>[39-42]</sup>。研究发现,  $As_2O_3$ 通过阻滞细胞周期的发展及以上基因主动参与的激活过程而发挥抗胰腺癌的作用, 本实验为其治疗胰腺癌的作用机制研究提供了新的思路, 为胰腺癌的治疗提供了科学客观的实验依据。

# 参考文献

- Verma M. Pancreatic cancer epidemiology. *Technol Cancer Res Treat* 2005; 4: 295-301
- Saif MW, Saviglin H, Carpenter M. Impact of ethnicity on outcome in pancreatic carcinoma. *JOP* 2005; 6: 246-254
- Hahn SA, Bartsch DK. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Gastroenterol Clin North Am* 2004; 33: 919-994
- Hahn SA, Bartsch DK. Genetics of hereditary pancreatic carcinoma. *Clin Lab Med* 2005; 25: 117-133
- Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 74-108
- Brand R, Mahr C. Risk factors for pancreatic adenocarcinoma: are we ready for screening and surveillance? *Curr Gastroenterol Rep* 2005; 7: 122-127
- Wray CJ, Ahmad SA, Matthews JB, Lowy AM. Surgery for pancreatic cancer: recent controversies and current practice. *Gastroenterology* 2005; 128: 1626-1641
- Stojadinovic A, Brooks A, Hoos A, Jaques DP, Conlon KC, Brennan MF. An evidence-based approach to the surgical management of resectable pancreatic adenocarcinoma. *J Am Coll Surg* 2003; 196: 954-964
- 高勇, 贾绍昌, 王杰军, 许青, 郭静. 三氧化二砷诱导人胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 第二军医大学学报 2001; 22: 43-46
- 张兴荣, 蔡洪培, 陈岳祥, 谢渭芬, 沈建伟. 氧化砷诱导胰腺癌细胞凋亡的实验研究. 胰腺病学 2002; 2: 38-40
- 刘静冰, 秦叔逵, 钱军, 王琳, 何泽明. 三氧化二砷注射液治疗晚期胰腺癌的床观察. 临床肿瘤学杂志 2005; 10: 117-119
- 张兴荣, 蔡洪培, 邓志华, 沈建伟. 细胞内 $Ca^{2+}$ 变化在砷剂诱导胰腺癌细胞凋亡中的作用. 第二军医大学学报 2001; 22: 422-424
- Li X, Ding X, Adrian TE. Arsenic trioxide causes redistribution of cell cycle, caspase activation, and GADD expression in human colonic, breast, and pancreatic cancer cells. *Cancer Invest* 2004; 22: 389-400
- 史立军, 闫彬彬, 李双星, 孟艳玲, 马姗姗, 刘铁夫, 李呼伦.  $As_2O_3$ 对胰腺癌细胞株的抑制作用及其机制的初步探讨. 中国病理生理杂志 2005; 21: 1572-1574
- 刘静冰, 秦叔逵, 李进. 三氧化二砷注射液对胰腺癌细胞系PC-3的体外作用. 世界华人消化杂志 2005; 13: 1713-1716
- 秦叔逵. 三氧化二砷治疗原发性肝胆癌的研究进展. 肿瘤学杂志 2001; 7: 115-118
- Liu LX, Zhu AL, Chen W, Guo HX, Wang XQ, Liu ZH, Zhang TD, Jiang HC, Wu M. The effect and mechanism of arsenic trioxide on hepatocellular carcinoma. *Zhonghua Wai Ke Za Zhi* 2005; 43: 33-36
- 何景利, 王贵英, 单宝恩. 三氧化二砷联合顺铂对人结肠癌细胞株colon26抑制作用机理的研究. 中国肿瘤临床 2005; 32: 1125-1128
- 魏玲, 王兴武, 左文述, 宋现让. 三氧化二砷抑制人乳



- 腺癌细胞生长及其作用机制的初步研究, 中华医学杂志 2005; 85: 1209-1213
- 20 Sharma J, Srinivasan R, Majumdar S, Mir S, Radotra BD, Wig JD. Bcl-XL protein levels determine apoptotic index in pancreatic carcinoma. *Pancreas* 2005; 30: 337-342
- 21 Brazdil J, Lukas Z, Hermanova M, Pazourkova M, Ruzicka M, Habanec B, Kren L, Dite P. Apoptosis and expression of bcl-2 protein in invasive ductal adenocarcinoma of the pancreas. *Cesk Patol* 2003; 39: 168-173
- 22 吴晓康, 吴育连, 郑樟栋, 吴荣进, 楼善贤, 王丽霞. 胰腺癌细胞凋亡与bcl-2, bax基因的表达. 中国普通外科杂志 2002; 11: 171-173
- 23 Manoj K, Liu ZR, Tian R, Qin RY. Mechanisms of inhibition of growth of human pancreatic carcinoma implanted in nude mice by somatostatin receptor subtype 2. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi* 2004; 84: 760-765
- 24 张元, 夏曙霞, 钱家勤. Bax基因表达在胰腺癌组织细胞凋亡中的作用. 肝胆外科杂志 2002; 10: 344-346
- 25 Pernick NL, Sarkar FH, Tabaczka P, Kotcher G, Frank J, Adsay NV. Fas and Fas ligand expression in pancreatic adenocarcinoma. *Pancreas* 2002; 25: e36-41
- 26 Radfar S, Davrinche C, Hollande E. Serial in vivo loss and in vitro gain of Fas expression and function in human cancerous pancreatic duct cells. *Int J Cancer* 2005; 115: 214-223
- 27 Bernstorff WV, Glickman JN, Odze RD, Farraye FA, Joo HG, Goedegebuure PS, Eberlein TJ. Fas (CD95/APO-1) and Fas ligand expression in normal pancreas and pancreatic tumors. Implications for immune privilege and immune escape. *Cancer* 2002; 94: 2552-2560
- 28 Sugahara KN, Hirata T, Hayasaka H, Stern R, Murai T, Miyasaka M. Tumor cells enhance their own CD44 cleavage and motility by generating hyaluronan fragments. *J Biol Chem* 2006; 281: 5861-5868
- 29 Nakai K, Tanaka T, Murai T, Ohguro N, Tano Y, Miyasaka M. Invasive human pancreatic carcinoma cells adhere to endothelial tri-cellular corners and increase endothelial permeability. *Cancer Sci* 2005; 96: 766-773
- 30 Ladwein M, Pape UF, Schmidt DS, Schnolzer M, Fiedler S, Langbein L, Franke WW, Moldenhauer G, Zoller M. The cell-cell adhesion molecule EpCAM interacts directly with the tight junction protein claudin-7. *Exp Cell Res* 2005; 309: 345-357
- 31 Schmidt DS, Klingbeil P, Schnolzer M, Zoller M. CD44 variant isoforms associate with tetraspanins and EpCAM. *Exp Cell Res* 2004; 297: 329-347
- 32 刘铁夫, 成秉林, 关宇光, 梁桃. CD44基因编码蛋白表达与三氧化二砷抗肿瘤作用关系的研究. 哈尔滨医科大学学报 2001; 35: 111-112
- 33 Ni X, Gu S, Dai J, Cheng H, Guo L, Li L, Ji C, Xie Y, Ying K, Mao Y. Isolation and characterization of a novel human NM23-H1B gene, a different transcript of NM23-H1. *J Hum Genet* 2003; 48: 96-100
- 34 党诚学, 韩玥, 泰兆寅, 纪宗正, 黎一鸣. nm23/NDPK在胰腺癌中表达和临床意义. 中国肿瘤临床与康复 2000; 7: 20-21
- 35 Ohshio G, Imamura T, Okada N, Suwa H, Yamaki K, Imamura M, Ogasahara K, Tsukayama C, Yamabe H. Immunohistochemical expression of nm23 gene product, nucleotide diphosphate kinase, in pancreatic neoplasms. *Int J Pancreatol* 1997; 22: 59-66
- 36 Yu GZ, Wang JJ, Chen Y, Ni CR, Zhu MH. Expressions of nm23, P53 and S100A4 proteins and their relationships with metastasis potential in gastric carcinoma. *Zhonghua Wei Chang Wai Ke Za Zhi* 2006; 9: 165-169
- 37 Elagoz S, Egilmez R, Koyuncu A, Muslehiddinoglu A, Arici S. The intratumoral microvessel density and expression of bFGF and nm23-H1 in colorectal cancer. *Pathol Oncol Res* 2006; 12: 21-27
- 38 Liu YJ, Yan PS, Li J, Jia JF. Expression and significance of CD44s, CD44v6, and nm23 mRNA in human cancer. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 6601-6606
- 39 华海清, 秦叔逵, 王锦鸿, 陈惠英. 三氧化二砷对人肝癌细胞黏附和侵袭影响的实验研究. 中国中西医结合杂志 2004; 24: 922-925
- 40 戴亚红, 刘淑梅, 孟昕, 梁桃. 三氧化二砷对人胃癌细胞株nm23、P53基因表达的影响. 中国康复理论与实践 2005; 11: 626-627
- 41 刘琳, 赵伟, 秦叔逵, 李苏宜, 邱少敏, 王南瑶, 陈惠英. 三氧化二砷抗裸鼠人结肠癌移植瘤作用及其机制的研究. 中国肿瘤临床 2005; 132: 1067-1070, 1080
- 42 林英城, 吴名耀, 李德锐, 吴贤英, 杜彩文, 陈炯玉, 洪超群, 郑瑞明. 三氧化二砷诱导鼻咽癌CNE1细胞凋亡及其作用机制的实验研究. 肿瘤防治研究 2005; 32: 467-469, 528

电编 郭海丽 编辑 张焕兰