

As₂O₃联合Aspirin对诱导肝癌细胞凋亡的影响

郝立晓, 刘铁夫

郝立晓, 刘铁夫, 哈尔滨医科大学第四附属医院消化内科 黑龙江省哈尔滨市 150001

作者贡献分布: 实验设计由刘铁夫完成; 肝癌细胞培养、药物干预及细胞周期、凋亡、抑制率的检测由郝立晓操作完成; 数据统计分析由郝立晓完成; 郝立晓与刘铁夫共同完成论文撰写。

通讯作者: 刘铁夫, 主任医师, 150001, 黑龙江省哈尔滨市, 哈尔滨市第四附属医院消化内科. liutiefuydsy@126.com

电话: 0451-82576696

收稿日期: 2012-03-03 修回日期: 2012-04-30

接受日期: 2012-06-01 在线出版日期: 2012-06-18

Aspirin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis of hepatocarcinoma cells

Li-Xiao Hao, Tie-Fu Liu

Li-Xiao Hao, Tie-Fu Liu, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China

Correspondence to: Tie-Fu Liu, Chief Physician, Department of Gastroenterology, the Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin 150001, Heilongjiang Province, China. liutiefuydsy@126.com

Received: 2012-03-03 Revised: 2012-04-30

Accepted: 2012-06-01 Published online: 2012-06-18

Abstract

AIM: To investigate the effect of aspirin combined with arsenic trioxide (As₂O₃) on human hepatocarcinoma cell line Bel-7402 and to explore the possible mechanisms involved.

METHODS: Cultured Bel-7402 cells were incubated with different concentrations of aspirin and As₂O₃, alone or in combination. After treatment, cell morphology was observed using an inverted microscope, cell proliferation was determined by MTT assay, cell apoptosis was measured by flow cytometry with annexin V/propidium iodide staining, and cell cycle progression was analyzed by fluorescence-activated cell sorting.

RESULTS: As₂O₃ and aspirin showed different degrees of inhibitory effect on the growth of Bel-7402 cells, and both were concentration-dependent. The two drugs had a synergistic effect, and the inhibitory effect in the combination group was more significant than those in the

two monotherapy groups (both $P < 0.05$). Compared to treatment with 2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ alone, treatment with 2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃ combined with 0.2 mmol/L aspirin significantly increased the apoptosis rate ($5.64\% \pm 0.56\%$ vs $7.35\% \pm 0.62\%$, $P < 0.05$), decreased the percentage of cells in G₁ phase ($0.52\% \pm 0.64\%$ vs $32.03\% \pm 0.97\%$), and increased the percentages of cells in G₂ phase or S phase ($9.57\% \pm 0.82\%$ vs $13.66\% \pm 0.82\%$, $50.41\% \pm 0.32\%$ vs $54.37\% \pm 0.69\%$).

CONCLUSION: Aspirin enhances As₂O₃-induced apoptosis of Bel-7402 cells possibly by altering cell cycle progression.

Key Words: Arsenic trioxide; Aspirin; Hepatocarcinoma; Apoptosis; Cell cycle

Hao LX, Liu TF. Aspirin enhances arsenic trioxide-induced apoptosis of hepatocarcinoma cells. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2012; 20(17): 1537-1541

摘要

目的: 观察As₂O₃与Aspirin联合应用对肝癌细胞Bel-7402的影响, 并探讨其作用机制。

方法: 体外培养肝癌Bel-7402细胞, Aspirin、As₂O₃不同浓度孵育细胞。倒置显微镜观察细胞形态学改变, 四甲基偶氮唑蓝(MTT)法检测As₂O₃和Aspirin单独及联合应用对Bel-7402细胞增殖情况的影响, 流式细胞术观察细胞凋亡情况, 并通过流式软件分析细胞周期变化。

结果: As₂O₃及Aspirin对肝癌Bel-7402细胞生长均呈不同程度的抑制, 且呈浓度依赖性。二者联合具有协同作用, 药物联用组抑制率均显著高于单独应用同等剂量As₂O₃组和Aspirin组($P < 0.05$)。2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃与0.2 mmol/L Aspirin联用组与2.0 $\mu\text{mol/L}$ As₂O₃单药组相比, 凋亡率从 $5.64\% \pm 0.56\%$ 提高到 $7.35\% \pm 0.62\%$, 差异具有统计学意义($P < 0.05$)。且通过对两组细胞周期检测发现, G₁期细胞从 $40.52\% \pm 0.64\%$ 下降到 $32.03\% \pm 0.97\%$, G₂期及S期细胞分别从 $9.57\% \pm 0.82\%$ 、 $50.41\% \pm 0.32\%$ 上升到 $13.66\% \pm 0.82\%$ 、 $54.37\% \pm 0.69\%$, Aspirin能显著增强As₂O₃诱导细胞集中

■背景资料

As₂O₃是中药砒霜的主要成分, 早在20世纪70年代, 哈尔滨医科大学就已用他治疗急性早幼粒性白血病(APL), 并取得可喜成就。随之关于其治疗实体瘤的研究接踵而至, 然而其有较强的毒性及致畸作用, 本实验旨在为实现As₂O₃低毒高效抗肝癌作用进行研究。

■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室

■ 研发前沿

As₂O₃治疗实体瘤疗效确切,但其抗癌效力呈剂量-时间效应关系,所以如何实现其低毒高效的抗癌效力一直备受关注。近年来联合用药引起关注,包括与常规化疗药、中药等联合,寻求与其具有协同抗癌作用且不良反应小的药物值得深入研究。

于S及G₂期的作用,从而增强其促凋亡作用。

结论: Aspirin能增强As₂O₃诱导细胞凋亡的作用,该作用可能与影响细胞周期有关。

关键词: 三氧化二砷; 阿司匹林; 肝癌; 细胞凋亡; 细胞周期

郝立晓, 刘铁夫. As₂O₃联合Aspirin对诱导肝癌细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2012; 20(17): 1537-1541

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/20/1537.asp>

0 引言

As₂O₃是中药砒霜的主要成分,早在20世纪70年代,哈尔滨医科大学就已用他治疗急性早幼粒性白血病(acute promyelocytic leukemia, APL),取得可喜成就^[1]。这一成就引起世人关注,随之关于其治疗实体瘤的研究接踵而至。秦叔逵等^[2]在国内外最早报道用于临床治疗原发性肝癌,开创了亚砷酸对肝癌治疗研究的先河。随着我们对As₂O₃治疗肝癌研究的深入,认识到As₂O₃的抗癌效力呈剂量-时间效应关系, Cai等^[3]报道As₂O₃ 10 mg/d治疗肝功能正常的APL复发患者47例, 2 wk后1/3的患者出现肝损害, 7例表现为肝中毒,说明以As₂O₃治疗肝功能已受损的肝癌患者可能需要选择更小剂量。所以,如何应用低剂量的As₂O₃达到高效率抗肿瘤的目的成为医学界的一大难题,于是研究者们想到了联合用药。本研究初步探讨As₂O₃与Aspirin联合应用在诱导肝癌细胞Bel-7402凋亡的协同作用。

1 材料和方法

1.1 材料 肝癌细胞株Bel-7402由东北师范大学遗传与细胞研究所朱筱娟教授馈赠。As₂O₃及Aspirin肠溶片购自本院。

1.2 方法

1.2.1 细胞系及培养: 细胞株置于37℃、50 mL/L CO₂培养箱中,用含100 mL/L小牛血清DMEM培养液培养,每24 h更换培养液1次,隔天传代1次,取传代后2 d处于对数生长期细胞用于实验。

1.2.2 细胞形态观察: 取对数生长期Bel-7402细胞, 0.25%胰酶消化,调整细胞浓度为4×10⁵/mL,接种于灭菌6孔板,每孔2 mL。实验分为空白对照组, 0.4 mmol/L Aspirin处理组、4 μmol As₂O₃处理组。作用24 h后,收集细胞,倒置显微镜观察细胞形态变化。

1.2.3 MTT法测细胞抑制率: 实验设阴性对照

组,不同浓度As₂O₃组(终浓度分别为4.0、2.0、1.0 μmol/L)、Aspirin组(终浓度为0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L)、药物联用组(As₂O₃浓度为4.0、2.0、1.0 μmol/L与Aspirin浓度为0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L分别组合)。取对数长期的Bel-7402细胞制成每毫升含5×10³个细胞的悬液,加入96孔培养板中,每孔200 μL,培养24 h后各组分别加入相应药物,每个剂量设3个平行孔。50 mL/L CO₂培养箱中培养至24 h,取出96孔板,吸出液体,在每孔中加入无血清培养基180 μL和0.5%MTT 20 μL后继续培养4 h,弃上清液,再加入二甲亚砷(DMSO)150 μL,微量震荡约10 min,于自动酶标仪490 nm处测定各孔吸光度(A)值,重复3次,求平均值。抑制率(%) = (阴性对照组A值-实验组A值)/阴性对照组A值×100%。

1.2.4 流式细胞术: 实验设阴性对照组、As₂O₃组(4.0 μmol/L、2.0 μmol/L)、Aspirin组(0.4 mmol/L)、联用组(2.0 μmol/L As₂O₃+0.2 mmol/L Aspirin)。给药培养至24 h,用0.25%胰酶将各组细胞消化下来,用磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗2次,调整细胞浓度,加碘化丙啶(PI),暗处作用30 min,用流式细胞仪检测并分析结果。

统计学处理 实验结果采用SPSS13.0统计软件进行分析。计量资料以mean±SD来表示。配对组间比较采用样本t检验,多组件比较采用方差分析。

2 结果

2.1 细胞形态观察 空白对照组细胞呈梭形,形态均一,贴壁良好,透光性强。As₂O₃及Aspirin处理组细胞贴壁能力明显减弱,细胞变圆变小,大小不一,数量减少。

2.2 MTT法检测对肝癌细胞的抑制作用 不同浓度的As₂O₃组(4.0 μmol/L、2.0 μmol/L、1.0 μmol/L)以及Aspirin组(0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L)、对细胞生长均呈不同程度的抑制,并且呈浓度依赖性,药物联用组(As₂O₃浓度为4.0 μmol/L、2.0 μmol/L、1.0 μmol/L与Aspirin浓度为0.4 mmol/L、0.2 mmol/L、0.1 mmol/L)抑制率均显著高于单独应用同等剂量As₂O₃组和Aspirin组(均P<0.05,表1)。

2.3 流式细胞仪检测Annex in-V/PI检测细胞凋亡 细胞膜不对称丧失导致磷脂酰丝氨酸(phosphatidyl serine, 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

表 1 不同浓度As₂O₃及Aspirin单独及联合应用对肝癌Bel-7402细胞增殖的抑制 (mean ± SD, %)

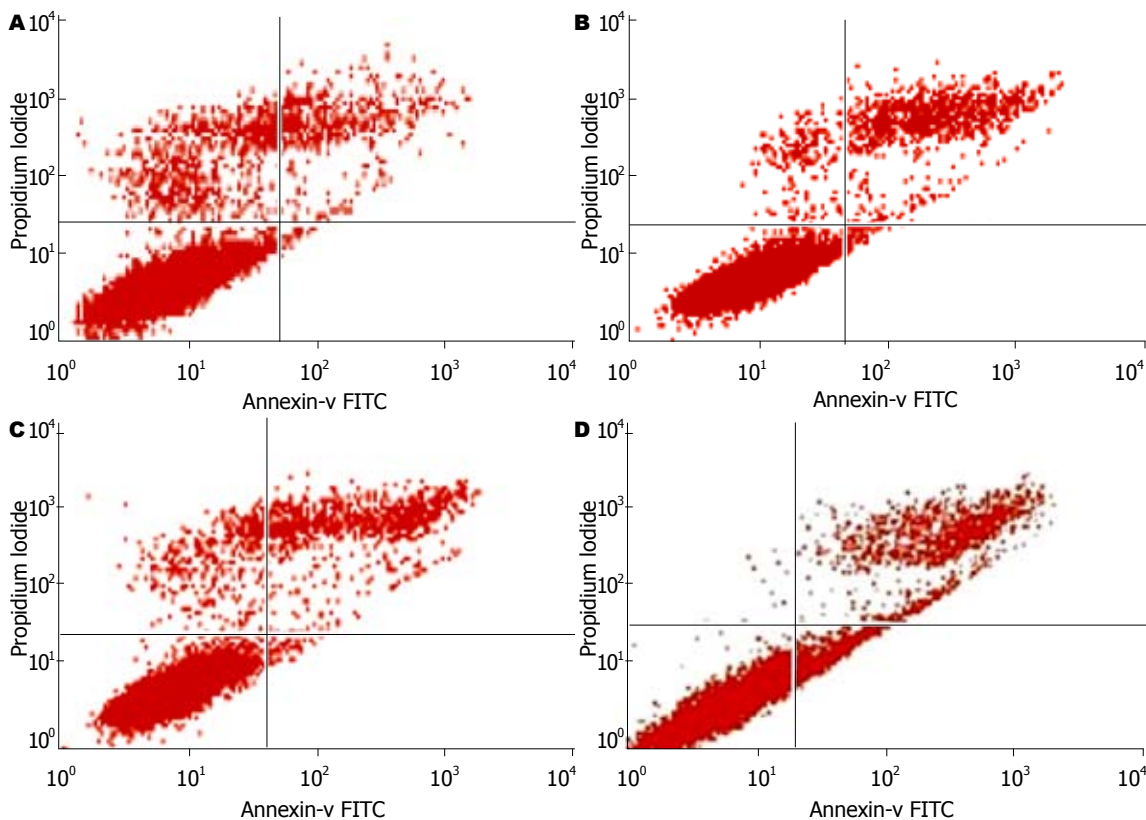
Aspirin(mmol/L)	As ₂ O ₃ (μmol/L)			
	0	1	2	4
0	4.51 ± 0.02	5.67 ± 0.12	7.68 ± 0.17	11.30 ± 0.31
0.1	4.83 ± 0.01	6.26 ± 0.13	8.37 ± 0.13	12.45 ± 0.31
0.2	5.54 ± 0.10	7.62 ± 0.26	9.48 ± 0.17	14.33 ± 0.90
0.4	6.68 ± 0.13	8.76 ± 0.17	10.30 ± 0.30	16.48 ± 0.36

表 2 不同浓度As₂O₃及Aspirin对Bel-7402细胞凋亡率及细胞周期的影响

分组	凋亡率(%)	细胞周期(%)		
		G ₁	G ₂	S
对照组	3.94 ± 0.40	46.11 ± 0.69	8.44 ± 0.56	45.45 ± 0.834
4 μmol/L As ₂ O ₃	8.32 ± 0.82	29.70 ± 0.86	14.62 ± 0.84	56.68 ± 0.74
0.4 mmol/L Aspirin	6.74 ± 0.786	33.93 ± 1.23	11.64 ± 0.64	53.44 ± 0.36
联合组	7.35 ± 0.62	32.03 ± 0.97	13.66 ± 0.82	54.37 ± 0.69
2 μmol/L As ₂ O ₃	5.64 ± 0.56	40.52 ± 0.64	9.57 ± 0.82	50.41 ± 0.32

■ 相关报道

As₂O₃与Aspirin能抑制多系统肿瘤生长,二者单独抗肝癌以及协同抗胃癌疗效已为研究者证实,但二者联合治疗肝癌至今尚未有人研究。

图 1 Bel-7402细胞凋亡情况. A: 对照组; B: 联合用药组; C: 0.4 mmol/L Aspirin组; D: 4 μmol/L As₂O₃.

暴露在细胞表面的PS. 用PI可以区分膜的完整性. 药物联用组(2.0 μmol/L As₂O₃+0.2 mmol/L Aspirin)处理Bel-7402细胞后凋亡细胞群与对照组及单用As₂O₃组(2.0 μmol/L)有显著性差异($P<0.05$, 图1, 表2). 细胞周期分析可知As₂O₃主要诱导细胞的S及G₂期细胞凋亡, Aspirin显著增强了As₂O₃诱导细

胞集中于S及G₂期的作用(图2, 表2).

3 讨论

As₂O₃中药名砒霜, 最早用于治疗APL, 新近研究发现, 他对其他多系统肿瘤均具有抑制作用, 主要机制集中在诱导肿瘤细胞凋亡^[4,5]. 其诱导

应用要点

本研究发现 As_2O_3 与Aspirin具有协同抗肝癌作用,可同时降低两药用量,实现了 As_2O_3 的低毒高效抗癌作用,为临床制定科学有效的化疗方案提供了实验及理论依据。

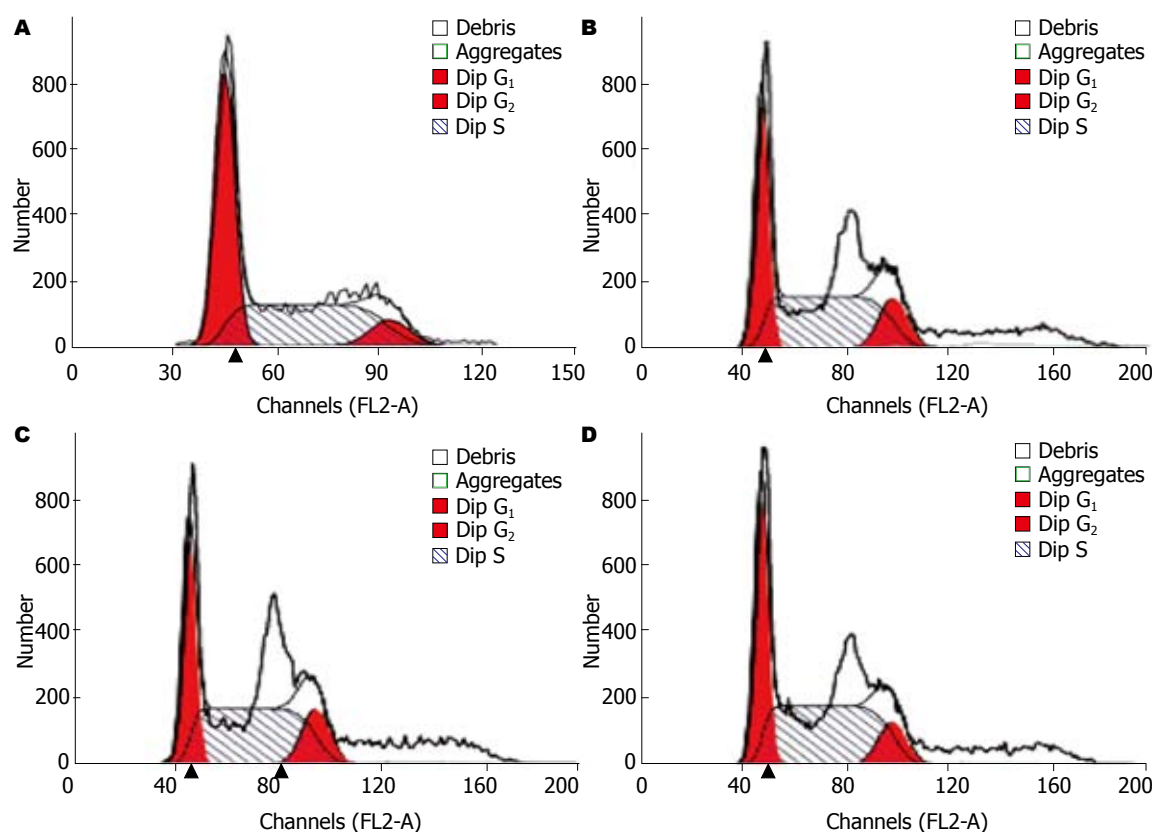


图2 Bel-7402细胞周期情况. A: 对照组; B: 0.4 mmol/L Aspirin组; C: 4.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 组; D: 联合用药组。

肿瘤细胞凋亡的主要机制有^[6]: (1)改变细胞内氧化还原状态; (2)开放MPT、活化caspase家族; (3)抑制*bcl-2*基因, 抑制NF- κ B活化, 使胞质 Ca^{2+} 浓度升高; (4)影响细胞周期. 刘湘国等^[4]发现经 As_2O_3 作用后的Bel-7402细胞, 在琼脂糖电泳中出现了典型的DNA凋亡条带, 用流式细胞仪检测出了典型的凋亡峰, 电镜下观察到了典型的凋亡细胞形态学改变: 如细胞核仁消失, 染色质浓缩、碎裂, 聚于核膜边缘并形成凋亡小体。

Aspirin属于非甾体类抗炎药(non-steroidal anti-inflammatory drugs, NSAIDs), 是临床传统的抗炎镇痛药. 近年来也用于某些肿瘤防治及研究, 发现其对多种体内移植瘤或诱发性肿瘤具有一定的抗肿瘤作用^[7,8]. 研究表明, 其抗癌机制包括抑制环氧酶COX-2减少, 抑制前列腺素PGE2生成和抑制NF- κ B活性或降低NF- κ B结合活性诱导凋亡等^[9-11], 诱导肿瘤细胞凋亡与Bax基因的上调有关^[12,13]等, 但机制尚未完全阐明. 本实验主要通过单独及联合应用 As_2O_3 与Aspirin于肝癌Bel-7402细胞, 通过倒置显微镜观察细胞形态变化, MTT观察药物作用后细胞的抑制率, 流式细胞仪检测细胞凋亡及周期情况明确二者在抗肝癌方面是否具有协同效应以及初步探讨两种药物的协同抗癌机制, 以期临床制定科

学有效的化疗方案提供理论和实验依据。

研究表明, 倒置显微镜下观察 As_2O_3 与Aspirin处理细胞, 发现细胞活力下降, 变小变圆, 且形态不均, 贴壁能力下降. 我们通过MTT实验得到证实, As_2O_3 与Aspirin在抗肝癌效力方面呈浓度依赖性, 随着药物浓度的增加, 抗癌效力越来越强, 与对照组相比, 差异具有统计学意义($P<0.05$), 且联合组与单用 As_2O_3 组比较, 具有显著性差异($P<0.05$). 通过流式细胞仪检测发现, 阴性对照组Bel-7402凋亡率仅为 $3.94\% \pm 0.40\%$, $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 、 $4 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 、 0.4 mmol/L Aspirin和 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0.2 mmol/L Aspirin联合作用后24 h, Bel-7402细胞凋亡率分别上升至 $5.64\% \pm 0.56\%$ 、 $8.32\% \pm 0.822\%$ 、 $6.74\% \pm 0.78\%$ 和 $7.35\% \pm 0.62\%$, 与阴性对照组相比, 凋亡率均显著升高($P<0.05$), 而 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 + 0.2 mmol/L Aspirin联合用药组与 $2 \mu\text{mol/L}$ As_2O_3 单用药组相比, 差异仍具统计学意义($P<0.05$), 说明两种药物联合应用, 在诱导Bel-7402细胞凋亡方面具有协同作用. 通过对细胞周期的检测我们发现, 在细胞周期方面, As_2O_3 与Aspirin作用于Bel-7402细胞后与阴性对照组相比, G_1 期细胞明显减少, 而 G_2 以及S期细胞明显增多, 差异具有统计学意义($P<0.05$). 细胞生长周期有 G_1 /S和 G_2 /M

两个转换限制点, 其中G₁/S决定周期时间^[14], 故二者协同诱导细胞凋亡作用可能通过影响这两个转换限制点来影响细胞周期从而达到抑制细胞增长的作用. 肿瘤细胞的G₀期细胞是肿瘤复发的根源, 处于DNA复制前期阶段的G₁期细胞的减少会导致细胞增殖的抑制. 本实验研究表明, As₂O₃和Aspirin在抗肝癌方面具有协同效应, 二者均可诱导肝癌细胞凋亡, 其作用机制可能与细胞周期有关. 至今为止, 不同的NSAIDs可以诱导肺腺癌细胞发生凋亡已有报道但其作用机制仍不明确^[15,16], 同一作者对不同的NSAIDs诱导食管癌细胞凋亡的研究, 也先后得出不同的结论^[17,18]. Aspirin作为临床常用的解热镇痛药, 价格低廉, 易于购买, 不良反应小, 为肝癌联合用药提供了新思路, 但其诱导肝癌细胞凋亡的作用机制有待进一步研究与探讨.

4 参考文献

- 1 张霞, 陶小红, 汤为学. 三氧化二砷联合奥曲肽协同抗肝癌作用的实验研究. 中国药房 2005; 16: 501-504
- 2 秦叔逵, 陈洪, 陈惠英, 马军, 潘其声, 刘文虎. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞株凋亡的初步研究. 临床肿瘤学杂志 1998; 3: 40
- 3 Cai X, Shen YL, Zhu Q, Jia PM, Yu Y, Zhou L, Huang Y, Zhang JW, Xiong SM, Chen SJ, Wang ZY, Chen Z, Chen GQ. Arsenic trioxide-induced apoptosis and differentiation are associated respectively with mitochondrial transmembrane potential collapse and retinoic acid signaling pathways in acute promyelocytic leukemia. *Leukemia* 2000; 14: 262-270
- 4 刘湘国, 方建珍, 苏先狮. 三氧化二砷诱导人肝癌细胞凋亡的实验研究. 医学临床研究 2003; 20: 252-255
- 5 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: 1952-1955
- 6 Xiao YF, Liu SX, Wu DD, Chen X, Ren LF. Inhibitory effect of arsenic trioxide on angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in gastric cancer. *World J Gastroenterol* 2006; 12: 5780-5786
- 7 Duan L, Wu AH, Sullivan-Halley J, Bernstein L. Nonsteroidal anti-inflammatory drugs and risk of esophageal and gastric adenocarcinomas in Los Angeles County. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2008; 17: 126-134
- 8 Fan XM, Wong BC, Lin MC, Cho CH, Wang WP, Kung HF, Lam SK. Interleukin-1beta induces cyclooxygenase-2 expression in gastric cancer cells by the p38 and p44/42 mitogen-activated protein kinase signaling pathways. *J Gastroenterol Hepatol* 2001; 16: 1098-1104
- 9 Qiao L, Hanif R, Sphicas E, Shiff SJ, Rigas B. Effect of aspirin on induction of apoptosis in HT-29 human colon adenocarcinoma cells. *Biochem Pharmacol* 1998; 55: 53-64
- 10 Gradilone A, Silvestri I, Scarpa S, Morrone S, Gandini O, Pulcinelli FM, Gianni W, Frati L, Aglianò AM, Gazzaniga P. Failure of apoptosis and activation on NFkappaB by celecoxib and aspirin in lung cancer cell lines. *Oncol Rep* 2007; 17: 823-828
- 11 Stark LA, Reid K, Sansom OJ, Din FV, Guichard S, Mayer I, Jodrell DI, Clarke AR, Dunlop MG. Aspirin activates the NF-kappaB signalling pathway and induces apoptosis in intestinal neoplasia in two in vivo models of human colorectal cancer. *Carcinogenesis* 2007; 28: 968-976
- 12 Zhou XM, Wong BC, Fan XM, Zhang HB, Lin MC, Kung HF, Fan DM, Lam SK. Non-steroidal anti-inflammatory drugs induce apoptosis in gastric cancer cells through up-regulation of bax and bak. *Carcinogenesis* 2001; 22: 1393-1397
- 13 Gu Q, Wang JD, Xia HH, Lin MC, He H, Zou B, Tu SP, Yang Y, Liu XG, Lam SK, Wong WM, Chan AO, Yuen MF, Kung HF, Wong BC. Activation of the caspase-8/Bid and Bax pathways in aspirin-induced apoptosis in gastric cancer. *Carcinogenesis* 2005; 26: 541-546
- 14 蒋明东, 李少林. 三氧化二砷抗肝癌作用研究进展. 国际消化病杂志 2006; 26: 26-28
- 15 Hanif R, Pittas A, Feng Y, Koutsos MI, Qiao L, Staiano-Coico L, Shiff SJ, Rigas B. Effects of nonsteroidal anti-inflammatory drugs on proliferation and on induction of apoptosis in colon cancer cells by a prostaglandin-independent pathway. *Biochem Pharmacol* 1996; 52: 237-245
- 16 Souza RF, Shewmake K, Beer DG, Cryer B, Spechler SJ. Selective inhibition of cyclooxygenase-2 suppresses growth and induces apoptosis in human esophageal adenocarcinoma cells. *Cancer Res* 2000; 60: 5767-5772
- 17 Li M, Wu X, Xu XC. Induction of apoptosis by cyclooxygenase-2 inhibitor NS398 through a cytochrome C-dependent pathway in esophageal cancer cells. *Int J Cancer* 2001; 93: 218-223
- 18 Li M, Lotan R, Levin B, Tahara E, Lippman SM, Xu XC. Aspirin induction of apoptosis in esophageal cancer: a potential for chemoprevention. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2000; 9: 545-549

■同行评价

本研究验证了As₂O₃与Aspirin协同抗肝癌作用, 其作用机制可能是通过影响细胞周期从而达到促细胞凋亡, 具有一定的临床应用价值.

编辑 曹丽鸥 电编 鲁亚静