

三氧化二砷体外抑制 A375 黑色素瘤细胞的生长及谷胱甘肽过氧化物酶的活力

应方微, 唐松, 刘桂琴

作者单位:(518040)中国广东省深圳市眼科医院
作者简介:应方微,女,毕业于中山大学眼科中心,硕士,主治医师,研究方向:眼科学基础。
通讯作者:应方微. yingfangwei@yahoo.com.cn
收稿日期:2009-10-16 修回日期:2009-12-22

Inhibition effect of arsenic trioxide on the A375 melanoma cell growth and glutathione peroxidase activity *in vitro*

Fang-Wei Ying, Song Tang, Gui-Qin Liu

Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China
Correspondence to: Fang-Wei Ying. Shenzhen Eye Hospital, Shenzhen 518040, Guangdong Province, China. yingfangwei@yahoo.com.cn
Received: 2009-10-16 Accepted: 2009-12-22

Abstract

• AIM: To understand the effect of arsenic trioxide (As_2O_3) on cultured A375 melanoma cell growth and glutathione peroxidase activity.
• METHODS: Using methyl thiazolyl tetrazolium (MTT) reduction to assay the inhibition effect of 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 on A375 melanoma cells for 24, 48, 72 hours, respectively. To determine the glutathione peroxidase activity of the A375 melanoma cells co-cultivated with As_2O_3 for 24 hours.
• RESULTS: The growth of A375 tumor cells were inhibited by dose-depending As_2O_3 significantly. The higher As_2O_3 concentration was, the lower A375 cells proliferation was. 24 hours later, the glutathione peroxidase activity of the A375 cells was 2.23 ± 0.81 , 2.87 ± 0.70 , 4.08 ± 0.81 , 2.63 ± 0.84 , 1.40 ± 0.41 mU/mL respectively, and the 6.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 had the highest activity. Below or above this concentration, the enzyme activity showed decreasing trend. After statistically independent samples *t*-tests analysis, the difference was statistically significant.
• CONCLUSION: As_2O_3 can inhibit the growth of A375 tumor cells in a dose-dependent manner and can reduce the A375 tumor cell glutathione peroxidase activity significantly.
• KEYWORDS: arsenic trioxide; A375 melanoma cells; methyl thiazolyl tetrazolium; glutathione peroxidase

Ying FW, Tang S, Liu GQ. Inhibition effect of arsenic trioxide on the A375 melanoma cell growth and glutathione peroxidase activity *in vitro*. *Int J Ophthalmol (Guji Yanke Zazhi)* 2010;10(1):46-47

摘要

目的:了解三氧化二砷(As_2O_3)对体外培养的 A375 黑色

素瘤细胞的生长及谷胱甘肽过氧化物酶活力的影响。
方法:采用四甲基偶氮唑蓝(MTT)还原法检测 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 $\mu\text{mol/L}$ As_2O_3 与 A375 黑色素瘤细胞作用 24, 48, 72h 后对瘤细胞的抑制作用;测定共培养 24h 的 A375 黑色素瘤细胞所含的谷胱甘肽过氧化物酶活性。
结果:各浓度 As_2O_3 对 A375 瘤细胞的生长均有明显的抑制作用, As_2O_3 的浓度越高, 增殖抑制作用越强;各浓度 As_2O_3 与 A375 黑色素瘤细胞作用 24h 后, 瘤细胞的谷胱甘肽过氧化物酶活力均有明显的降低, 分别为 2.23 ± 0.81 , 2.87 ± 0.70 , 4.08 ± 0.81 , 2.63 ± 0.84 , 1.40 ± 0.41 mU/mL, 在 As_2O_3 浓度为 6.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, 酶活性最高, 低于此浓度或高于此浓度时, 酶活力呈递减的趋势。经过统计学独立样本的 *t* 检验分析, 差别有统计学意义。
结论: As_2O_3 对 A375 瘤细胞的生长有浓度依赖性抑制作用, As_2O_3 显著降低 A375 瘤细胞谷胱甘肽过氧化物酶活力。
关键词:三氧化二砷; A375 黑色素瘤细胞; 四甲基偶氮唑蓝; 谷胱甘肽过氧化物酶
DOI:10.3969/j.issn.1672-5123.2010.01.013

应方微, 唐松, 刘桂琴. 三氧化二砷体外抑制 A375 黑色素瘤细胞的生长及谷胱甘肽过氧化物酶的活力. 国际眼科杂志 2010; 10(1):46-47

0 引言

眼睑皮肤恶性黑色素瘤是眼科比较常见的恶性肿瘤, 三氧化二砷(As_2O_3)对实体肿瘤有一定的治疗作用, 在体外诱导肿瘤细胞凋亡, 抑制小鼠黑素瘤生长, 但其作用机制不十分明确^[1], 我们用不同浓度 As_2O_3 对体外培养的 A375 黑色素瘤细胞生长, 肿瘤细胞谷胱甘肽过氧化物酶活力的影响, 探讨 As_2O_3 杀伤 A375 黑色素瘤细胞的机制, 现报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料 As_2O_3 (sigma), A375 黑色素瘤细胞株(中国科学院上海细胞生物研究所), RPMI1640 培养基(GIBCO), 胎牛血清(杭州四季青), 酶标仪(THAM), 谷胱甘肽过氧化物酶检测试剂盒(碧云天)。

1.2 方法 以 RPMI1640 完全培养液培养 A375 瘤细胞株, 置于 37°C, 50mL/L CO_2 培养, 定期换液, 传代, 充分扩增细胞。设立 As_2O_3 终浓度分别为 0, 1.5, 3.0, 6.0, 12.0, 24.0 $\mu\text{mol/L}$, 在 96 孔细胞培养板上, 每组 7 孔, 各加入 2×10^5 /mL 的瘤细胞悬液 200 μL , 将培养板置于 37°C, 50mL/L CO_2 培养箱分别培养 24, 48, 72h。

1.2.1 瘤细胞杀伤的测定 与 As_2O_3 共培养 24, 48, 72h 的 A375 瘤细胞, 每孔加入 5g/L MTT 液 20 μL , 继续培养 4h 后吸除培养液, 各加入二甲基亚砷 200 μL , 充分混匀。在酶标仪上测定各组在波长 492nm 的吸光度 *A* 值, 根据公式: 细胞相对生长抑制率 = $1 - (\text{实验组 } A \text{ 值} / \text{对照组 } A \text{ 值}) \times 100\%$, 计算各组 A375 瘤细胞的生长抑制率。

表 1 As₂O₃ 对 A375 瘤细胞的生长的抑制的 A340 值和生长抑制率

	t/h	As ₂ O ₃ 浓度 (μmol/L)						$\bar{x} \pm s$
		24.0	12.0	6.0	3.0	1.5	0	
A340	24	0.162 ± 0.019 ^b	0.262 ± 0.059 ^b	0.416 ± 0.114 ^a	0.660 ± 0.163 ^b	0.846 ± 0.127 ^a	1.026 ± 0.127	
	48	0.169 ± 0.013 ^b	0.198 ± 0.044 ^b	0.346 ± 0.031 ^a	0.506 ± 0.256 ^a	0.515 ± 0.059 ^a	1.380 ± 0.373	
	72	0.215 ± 0.012 ^b	0.359 ± 0.117 ^b	0.393 ± 0.041 ^b	0.415 ± 0.091 ^b	-	1.302 ± 0.102	
抑制率	24	0.744076	0.629871	0.594807	0.356658	0.175977	-	
	48	0.859458	0.83607	0.713123	0.655995	0.573617	-	
	72	0.818449	0.697204	0.668316	0.64955	-	-	

^aP < 0.05, ^bP < 0.01 vs 0 μmol/L。

1.2.2 谷胱甘肽过氧化物酶活性的测定 与 As₂O₃ 共培养 24h 的 A375 瘤细胞,用细胞刮取下,加入 PBS 混悬后计数细胞,1000g 离心 5min,去上清,重复一次后,加入细胞裂解液成 1 × 10¹⁴/L 充分混匀,冰浴匀浆后 4℃,12000g 离心 10min,取上清用于酶活性测定。设定空白对照(无样品)和样品本底对照(无过氧化物试剂溶液),取上述的样品上清 4μL,GPx 检测液 10μL 分别加入到 182μL 的谷胱甘肽过氧化物酶检测缓冲液中混匀,加入 15mmol/L 过氧化物试剂溶液 4μL 后及开始用酶标仪在 25℃ 检测波长 340nm 的吸光度 A340 值,每隔 30s 检测 1 次,连续检测 6 个数据。根据公式:谷胱甘肽过氧化物酶活力 (mU/mL) = [A340(样品)/min - A340(空白)/min] / 0.00622。

统计学分析:利用 SPSS 13.0 统计软件的独立样本 t 检验分析 As₂O₃ 对 A375 瘤细胞的谷胱甘肽过氧化物酶活性的影响,以 P < 0.05 为有统计学意义。

2 结果

2.1 As₂O₃ 对 A375 瘤细胞生长的抑制作用 A375 黑色素瘤细胞贴壁生长,核圆形或长椭圆形,不同浓度的 As₂O₃ 与 A375 瘤细胞共培养 24,48,72h 后,与对照组相比,各浓度的 As₂O₃ 对 A375 瘤细胞的增殖均有明显的抑制作用,As₂O₃ 的浓度越高,对培养的 A375 瘤细胞的增殖抑制作用越强,其中 1.5 μmol/L As₂O₃ 作用 72h 对 A375 瘤细胞的生长无抑制(表 1)。

2.2 谷胱甘肽过氧化物酶活性 各浓度 As₂O₃ 与 A375 黑色素瘤细胞作用 24h 后,A375 黑色素瘤细胞的谷胱甘肽过氧化物酶活力与对照组相比,均有明显的降低,在 As₂O₃ 浓度为 6.0 μmol/L 时, A375 瘤细胞的酶活性相对最高,低于此浓度或高于此浓度时,酶活力呈递减的趋势(图 1)。

3 讨论

细胞内活性氧自由基(ROS)是细胞线粒体内氧化还原代谢的产物,参与细胞内的信号转导,与细胞生长凋亡有密切关系。大量研究表明,ROS 可介导细胞信号转导,激活转录因子,促使基因表达,调控细胞生长、增殖和凋亡,发挥重要生物学效应。当细胞内 ROS 的生成和清除失衡及定位出现异常时,则会损伤组织细胞,甚至导致细胞的死亡。谷胱甘肽过氧化物酶(GSH-Px)是机体内广泛存在的一种重要的过氧化物分解酶。它能使有毒的过氧化物还原成无毒的羟基化合物,同时促进 H₂O₂ 的分解,从而保护细胞膜的结构及功能不受过氧化物的干扰及损害。As₂O₃ 是一种具有抗肿瘤作用的药物,目前已用于临床治疗急性早幼粒细胞白血病。As₂O₃ 诱导实体肿瘤细胞凋亡与细胞内 ROS 的水平改变有关^[2,3]。As₂O₃ 作为细胞毒性

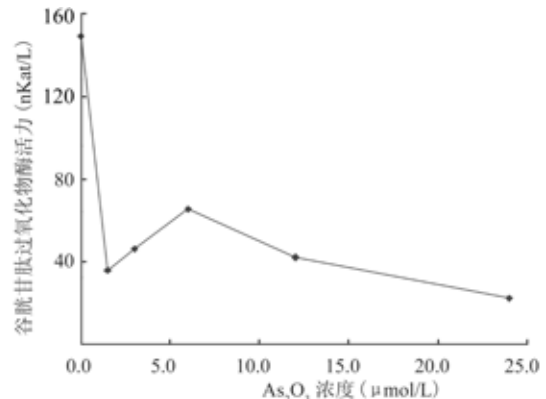


图 1 As₂O₃ 对 A375 瘤细胞的影响

药物,它通过蛋白质的巯基结合,干扰细胞代谢,诱导肿瘤凋亡^[4]。As₂O₃ 可直接与巯基形成复合物 As(GS),从而阻断由 GPx 作用下的 H₂O₂ 还原为 H₂O 的过程,降低其清除 ROS 的能力,间接地使 ROS 水平升高。结果提示,不同浓度的 As₂O₃ 均明显降低了体外培养 A375 黑色素瘤细胞谷胱甘肽过氧化物酶的活力,从而影响肿瘤细胞内 ROS 的清除,使得细胞内 ROS 含量上升,引起细胞损害及死亡。但是根据不同的 As₂O₃ 浓度,谷胱甘肽过氧化物酶活力的水平又有所波动,在 6.0 μmol/L As₂O₃ 浓度下形成了谷胱甘肽过氧化物酶活力的小高峰,高于及低于此浓度,酶活力均呈现递减的趋势,这与实验中 MTT 法检测的肿瘤细胞体外杀伤 A375 黑色素瘤的结果并不完全吻合。体外杀伤实验显示,As₂O₃ 体外杀伤 A375 黑色素瘤细胞呈现浓度依赖性,24h 的作用下,As₂O₃ 浓度越高,肿瘤细胞生长的抑制率越高,24 μmol/L As₂O₃ 时肿瘤细胞生长抑制率达到 74.4%,随着浓度递减,生长抑制率逐渐递减,1.5 μmol/L As₂O₃ 时生长抑制率至 17.6%,由此可见 As₂O₃ 体外抑制 A375 黑色素瘤生长的作用机制很复杂,对谷胱甘肽过氧化物酶活力的抑制只是其中一个方面。

参考文献

- 夏俊,陈俊霞,于丽华,等.三氧化二砷抑制小鼠 B16 黑色素瘤生长作用及其机制.中国药理学通报 2004;20(9):1054-1058
- Jing Y, Dai J, Chimeris Rechmn RM, et al. Arsenic trioxide selectively induces acute promyelocytic leukemia cell apoptosis via a hydroperoxide-dependent pathway. Blood 1999;94(6):2102-2111
- 曹娟,郑杰. As₂O₃ 诱导肿瘤细胞凋亡依赖 H2O2 途径.中国病理生理杂志 2006;22(6):1185-1190
- Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, et al. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. J Immunol Methods 1991;139(2):271-279