

三氧化二砷联合抗坏血酸对高转移性卵巢癌细胞系 HO-8910PM 的抗肿瘤实验研究

高克非¹, 冯艳玲^{2,3}, 黄永文^{2,3}, 邓高丕¹

(1.广州中医药大学第一附属医院, 广东 广州 510405; 2.中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060;

3.华南肿瘤学国家重点实验室, 广东 广州 510060)

摘要: [目的] 在高转移性上皮性卵巢癌细胞株 HO-8910PM 中观察 As_2O_3 联合抗坏血酸 (Vitamin C) 的抗肿瘤效应。[方法] 本研究以高转移性上皮性卵巢癌细胞株 HO-8910PM 为研究对象, 以 MTT 药敏实验、流式细胞仪以及 Western-blot 方法检测 As_2O_3 和 Vitamin C 单药及联合的抗肿瘤效应及其机制。[结果] As_2O_3 和 Vitamin C 单药对 HO-8910PM 细胞株均具有剂量依赖性的生长抑制作用。 As_2O_3 联合 Vitamin C 后具有明显的协同抗肿瘤效应, 并且出现 S 期阻滞效应。Western-blot 结果显示, As_2O_3 和 Vitamin C 联合作用后, 凋亡抑制蛋白 bcl-2 和凋亡促进蛋白 bax 分别进一步表达下调和上调。[结论] 对高转移性的上皮性卵巢癌细胞株, Vitamin C 和 As_2O_3 单药均具较好的抗肿瘤效应, Vitamin C 对 As_2O_3 有较好的化疗增敏效应, 两者的联合应用值得在卵巢癌方面进一步研究探讨。

关键词: 三氧化二砷; 抗坏血酸; 化疗; 卵巢癌

中图分类号: R737.31 文献标识码: A 文章编号: 1004-0242(2014)06-0518-05

doi: 10.11735/j.issn.1004-0242.2014.06.A016

The Research on Anti-cancer Effect of Arsenic Trioxide Combined with Ascorbic Acid on Highly Metastatic Ovarian Carcinoma Cell line HO-8910PM

GAO Ke-fei¹, FENG Yan-ling^{2,3}, HUANG Yong-wen^{2,3}, et al.

(1.The First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; 2.Sun Yat-sen University Cancer Center, Guangzhou 510060, China; 3.State Key Laboratory of Oncology in South China, Guangzhou 510060, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the anti-cancer effect of arsenic trioxide (As_2O_3) combined with Vitamin C on highly metastatic ovarian carcinoma cell line HO-8910PM. [Methods] In HO-8910PM cells, the anti-cancer effects of Vitamin C or As_2O_3 applied as a single agent were observed, and the sensitizing effects of Vitamin C when it was used in the combination with As_2O_3 were observed. The anti-cancer effect of As_2O_3 or Vitamin C and their mechanisms were analyzed by MTT chemosensitivity test, flow cytometry and Western-blot method. [Results] Dose-dependent antiproliferative effect on HO-8910PM cells were observed when Vitamin C or As_2O_3 was applied as single agent. Vitamin C had sensitizing effect on As_2O_3 . Vitamin C combined with As_2O_3 leads to significant S-phase block. The expression of inhibitor-of-apoptosis protein bcl-2 was down-regulated, and the promoter of apoptosis protein bax was up-regulated. [Conclusions] Both As_2O_3 and Vitamin C have anti-cancer effects on HO-8910PM cells. Vitamin C has sensitizing effect on Vitamin C when they were used in highly metastatic ovarian carcinoma cells. The combination of the two agents is a promising regimen which is worth on-going study in epithelial ovarian cancer.

Key words: arsenic trioxide; ascorbic acid; chemotherapy; ovarian carcinoma

卵巢癌是妇科恶性肿瘤中死亡率最高的一类疾病, 化疗在卵巢癌治疗中占有非常重要的地位。三氧化二砷 (As_2O_3) 已成功应用于多种血液系统疾病的

治疗, 其在包括卵巢癌在内的多种实体瘤治疗的相关研究也不断取得进展。具有双向氧化还原性质的抗坏血酸 (ascorbic acid, AA), 即维生素 C (Vitamin C), 可降低细胞内 GSH 水平, 已证实对 As_2O_3 具有较好的化疗增敏效应, 而该效应在卵巢癌, 特别是高

收稿日期: 2013-11-02; 修回日期: 2013-12-21

通讯作者: 高克非, E-mail: schsums@163.com

转移性的卵巢癌未见研究报道。本研究以高转移性上皮性卵巢癌细胞系为研究对象,在体外实验探讨 As_2O_3 联合Vitamin C的抗肿瘤效应。

1 材料与方法

1.1 细胞系及主要试剂

高转移性卵巢癌细胞株HO-8910PM购自中科院上海生命科学研究院生物化学与细胞生物学研究所。RPMI-1640培养液为美国GIBCO公司产品,优质胎牛血清(FBS)为杭州四季青公司产品。亚砷酸注射液为伊达药业有限公司惠赠。维生素C注射液为南京金陵药液有限公司产品。胰蛋白酶、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砷(DMSO)均为美国Sigma公司产品。酶标仪型号BIO-TEK ELX800,流式细胞仪型号Beckman-Coulter ELITE。Bcl-2、Bax抗体及辣根过氧化物酶标记的二抗均购自美国SantaCruz公司。

1.2 实验步骤

1.2.1 细胞培养

HO-8910PM细胞于含10%胎牛血清的RPMI-1640培养液中,在37℃,饱和湿度,5%CO₂培养箱中培养,细胞呈贴壁生长。

1.2.2 MTT实验

取处于对数生长期的HO-8910PM,以 6.0×10^3 /孔接种于96孔板,常规培养24h,更换含不同浓度的Vitamin C和 As_2O_3 的培养液。实验分为Vitamin C单药、 As_2O_3 单药、 As_2O_3 联合Vitamin C 3组。细胞培养68h后加入MTT溶液(10mg/ml) 10 μ l,再放入培养箱反应4h,加入DMSO振荡,上酶标仪测定OD值(A570nm)。实验重复3次,取3次实验结果的平均值作为实验结果。肿瘤细胞增殖抑制率=[1-(物处理组A值-空白对照组A值)/(细胞对照组A值-空白对照组A值)] $\times 100\%$ 。 As_2O_3 单药抑制实验中设置6个梯度的药物浓度:空白对照、9.92 μ mol/L、19.84 μ mol/L、39.68 μ mol/L、79.36 μ mol/L、158.73 μ mol/L。Vitamin C单药抑制实验中设置8个梯度的药物浓度:空白对照、22.18 μ mol/L、44.36 μ mol/L、88.71 μ mol/L、177.43 μ mol/L、354.85 μ mol/L、709.7 μ mol/L、1419.41 μ mol/L。 As_2O_3 与Vitamin C的联合用药实验中, As_2O_3 设3个药物浓度即9.92 μ mol/L、19.84 μ mol/L、39.68 μ mol/L,Vitamin C设一个药物

浓度即11.09 μ mol/L,每个处理组均分为 As_2O_3 单药和联合Vitamin C 2个处理,并将两者的抑制率进行比较,观察Vitamin C是否对3个浓度的 As_2O_3 均具有增敏效应。

1.2.3 流式细胞仪检测

HO-8910PM细胞培养24h后,以19.84 μ mol/L的 As_2O_3 单药以及分别联合2.77 μ mol/L、5.54 μ mol/L、11.09 μ mol/L浓度的Vitamin C的培养液处理细胞48h。收集全部细胞,PBS洗涤,冰预冷70%乙醇固定,离心,1%RNAase和PI染液处理,行流式细胞仪检测凋亡比率及细胞周期。CELLQuest软件采集样本,ModFit LT软件分析结果,观察凋亡和细胞周期的变化。

1.2.4 Western-blot

检测检测凋亡相关蛋白的表达:HO-8910PM细胞以19.84 μ mol/L的 As_2O_3 单药以及分别联合5.54 μ mol/L、11.09 μ mol/L的Vitamin C作用12h后,按常规方法提取总蛋白,经蛋白定量后以SDS-PAGE电泳分离蛋白,电转至硝酸纤维素膜,室温下用3%小牛血清封闭1h,随后加入1.5%BSA稀释的一抗,轻摇过夜,TBST缓冲液洗4次,于1.5%BSA稀释的二抗中孵育1h,TBST洗4次,ECL化学发光试剂反应2min,照相、分析、保存,观察凋亡抑制蛋白bcl-2和凋亡促进蛋白bax的变化趋势。

1.3 统计学处理

采用SPSS 17.0统计软件,IC₅₀值的计算采用概率单位法。样本间均数的比较采用配对资料T检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 MTT实验结果

MTT单药抑制实验中, As_2O_3 和Vitamin C对HO-8910PM细胞株均呈现药物浓度依赖性的生长抑制作用,其抑制细胞增殖的IC₅₀值分别为65.48 μ mol/L和132.98 μ mol/L(Figure 1 A、B)。

MTT联合抑制试验中,HO-8910PM细胞接受3个浓度的 As_2O_3 单药以及分别联合11.09 μ mol/L的Vitamin C的处理,结果显示联合组的增殖抑制率均大于同浓度 As_2O_3 单药组的抑制率($P < 0.05$)(Figure 1 C, Table 1)。

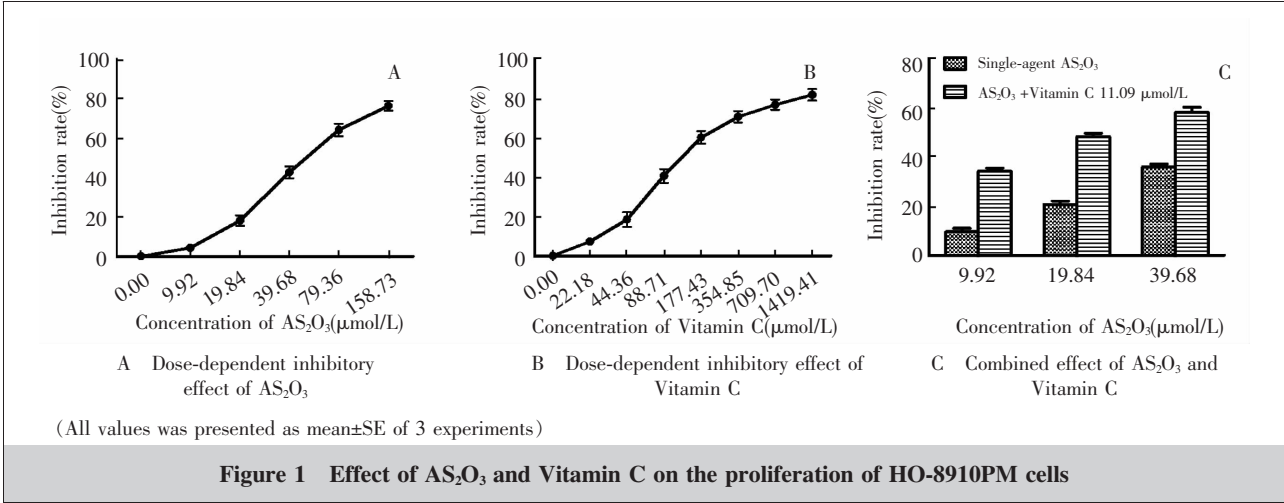


Figure 1 Effect of AS₂O₃ and Vitamin C on the proliferation of HO-8910PM cells

Table 1 Effects of Vitamin C on HO-8910PM cell growth inhibition by AS₂O₃

AS ₂ O ₃ (μmol/L)	Vitamin C (μmol/L)	Inhibition rate (%)	P
9.92	0	9.60±1.40	0.0075
	11.09	34.33±1.80	
19.84	0	20.60±1.51	0.0029
	11.09	48.33±1.45	
39.68	0	36.00±1.56	0.0068
	11.09	58.38±2.03	

2.2 流式细胞仪检测结果

结果显示,19.84μmol/L AS₂O₃ 单药以及与2.77μmol/L、5.54μmol/L、11.09μmol/L 的 Vitamin C 联合后,其诱导凋亡率逐渐升高,各联合组与 AS₂O₃ 单药组比较,均有显著性差异 ($P<0.05$)。细胞周期结果显示,AS₂O₃ 联合 Vitamin C 之后,呈现 S 期阻滞效应,G₂/M 期的比例降低,各联合组与 AS₂O₃ 单药组 S 期比例比较, 均有显著性差异 ($P<0.05$) (Table 2, Figure 2)。

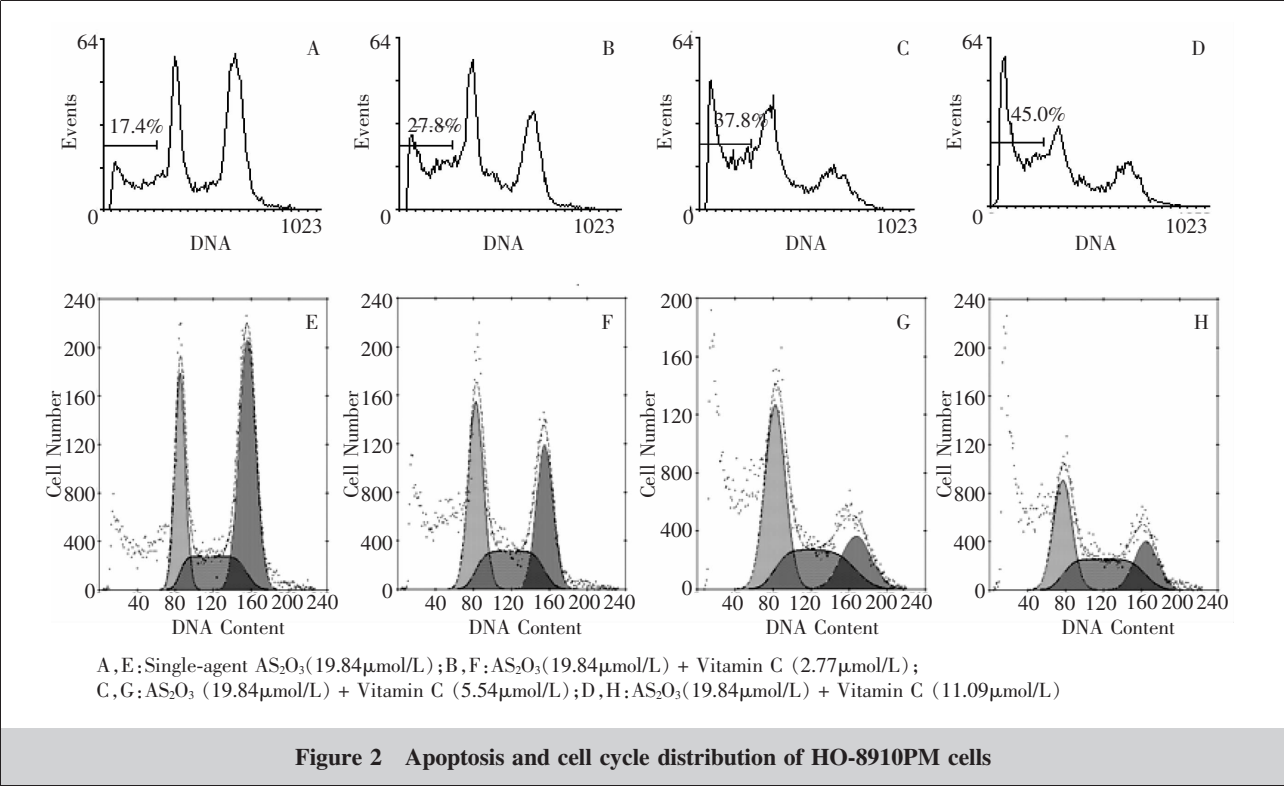


Figure 2 Apoptosis and cell cycle distribution of HO-8910PM cells

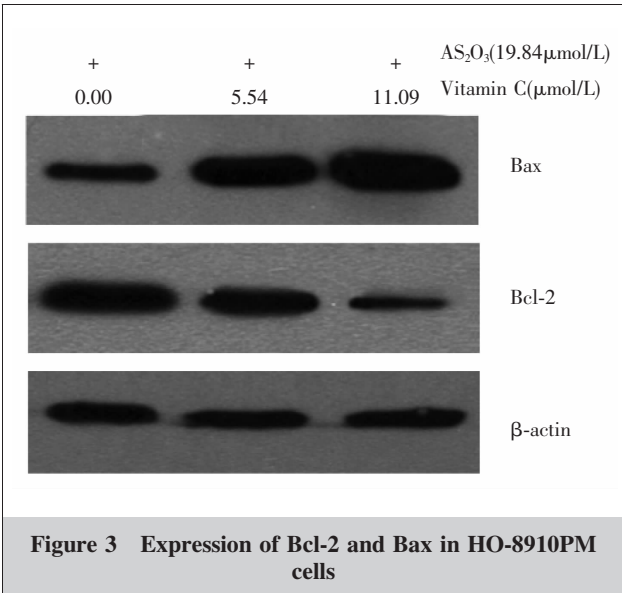
Table 2 Apoptosis and cell cycle distribution of HO-8910PM cells

AS ₂ O ₃ (μmol/L)	Vitamin C (μmol/L)	Apoptosis rate (%)	Cell cycle proportion(%)		
			G ₁	S	G ₂ /M
19.84	0	17.4±2.6	28.1±2.0	21.5±2.2	50.4±3.8
	2.77	27.8±3.0*	37.8±2.4	28.2±3.0*	34.0±1.8
	5.54	37.8±2.2*	48.2±2.8	31.8±3.0*	20.0±3.2
	11.09	45.0±4.2*	39.5±1.9	38.6±2.4*	21.9±3.1

*, P<0.05 compared with single-agent AS₂O₃ group

2.3 bax、bcl-2 蛋白表达

HO-8910PM 细胞经 19.84μmol/L AS₂O₃ 单药以及 5.54μmol/L、11.09μmol/L 的 Vitamin C 联合作用,结果显示随着 Vitamin C 浓度的增加,凋亡促进蛋白 bax 的表达逐渐升高,凋亡抑制蛋白 bcl-2 的表达逐渐降低 (Figure 3)。



3 讨论

已知 AS₂O₃ 对血液系统疾病的疗效非常确切,尤其对早幼粒细胞白血病 (APL) 的疗效已为全世界所公认,而抗坏血酸 (维生素 C) 对 AS₂O₃ 具有显著增敏效应已经得到证实,因此,AS₂O₃ 单药及联合抗坏血酸的研究被引入实体瘤研究领域,目前在肺癌、肝癌、喉癌、宫颈癌等研究中已经确认了 AS₂O₃ 单药的抗肿瘤效应及抗坏血酸对 AS₂O₃ 的化疗增敏效应^[1-4],而在卵巢癌方面尚少见相关报道。既往本课题组对一般转移能力的卵巢癌细胞系 OVCAR-3 的研究中已经证实 AS₂O₃ 和抗坏血酸单药及联合的抗

肿瘤效应,在此基础上,本研究针对具有高转移特点的 HO-8910PM 卵巢癌细胞株进行相关研究,以期证实其对不同异质性的卵巢癌细胞的有效性。

本研究显示,AS₂O₃ 和 Vitamin C 对 HO-8910PM 细胞均具有显著的生长抑制作用,两者的 IC₅₀ 值分别为 65.48μmol/L 和 132.98μmol/L。AS₂O₃ 联合 Vitamin C 的 MTT 实验中,各组联合后的 HO-8910PM 细胞株增殖抑制率均大于同浓度 AS₂O₃ 单药的抑制率 (P<0.05)。

流式细胞仪的检测结果显示,19.84μmol/L AS₂O₃ 单药以及 2.77μmol/L、5.54μmol/L、11.09μmol/L 的 Vitamin C 联合后,其诱导凋亡率逐步升高,并且呈现出了明显的 S 期阻滞效应。在蛋白水平,Western-blot 的实验结果显示,经抗坏血酸对 AS₂O₃ 的化疗增敏处理,凋亡抑制蛋白 bcl-2 的表达较 AS₂O₃ 单药组明显降低,而凋亡促进蛋白 bax 表达升高。以上研究结果中,肿瘤抑制和凋亡相关实验结果与其他实体瘤的相关研究结果相一致^[1-4],细胞周期和凋亡相关蛋白方面,因实体瘤领域在这两个方面的报道数据较少,所以本实验结果暂无法做充分的比较分析。

关于 AS₂O₃ 和抗坏血酸的单药和联合作用机制,目前已有一定的研究报道。研究显示,细胞线粒体内存在着活性氧簇 (ROS) 和谷胱甘肽 (GSH) 组成的氧化和抗氧化平衡系统。AS₂O₃ 的抗肿瘤作用机制是直接作用于线粒体,增加线粒体内 ROS 的生成,并使其氧化还原系统丧失^[5]。抗坏血酸单药的抗肿瘤机制是在高浓度下,其可作为促氧化剂 (prooxidant) 产生大量包括 H₂O₂ 在内的活性氧簇成分,而这些产物可以氧化破坏生物膜结构,干扰、阻断其生物学功能,断裂 DNA 双链,进而导致细胞生长抑制、凋亡和死亡^[6],且此效应主要出现在肿瘤细胞,正常细胞则不明显^[7]。Vitamin C 提高 AS₂O₃ 疗效的主要机制是降低细胞内 GSH 水平,进一步提高 AS₂O₃ 诱导的 ROS 水平,从而加剧线粒体的氧化损伤,促进凋亡进程^[8]。具体分子机制上,涉及死亡受体表达上调、端粒酶活性抑制增加、NF-KB 和 COX-2 表达下调等方面^[9-11]。

Grad 等^[12]收集活体肿瘤细胞进行体外实验,验证了 AS₂O₃ 与 Vitamin C 具有明显的协同效应,并显示 Vitamin C 可下调细胞内 GSH 水平,促进 AS₂O₃

诱导的细胞死亡。Bahlis 等^[13]对 6 例复发难治性多发性骨髓瘤患者给予 As_2O_3 联合 Vitamin C 治疗的临床试验, 结果显示每天 0.25 mg/kg 的 As_2O_3 联合 1g/d 的 Vitamin C 连用 25d 没有出现剂量限制性毒性反应, 两者的联合不改变 As_2O_3 的药代动力学, 并且检测到外周血单核细胞(PBMCs)内 GSH 水平的下降, 而 As_2O_3 单药及联合 Vitamin C 对正常骨髓细胞作用均不明显。

我们的研究显示 As_2O_3 和抗坏血酸单药对高转移性的 HO-8910PM 上皮性卵巢癌细胞均具有明显的抗肿瘤效应, 抗坏血酸对 As_2O_3 有显著的化疗增敏作用, 与 OVCAR-3 实验比较, 达到同样抑制效果所需的单药及联合用药的药物浓度略高, 这提示我们针对不同异质性的肿瘤个体的药物治疗需要制定不同的用药方案。

参考文献:

- [1] Cao J, Zheng J, Lv XN. Study on ascorbic acid enhancing arsenic trioxide to induce apoptosis in cervical cancer HeLa cells [J]. Journal of Southeast University (Medical Sciences), 2005, 24 (5): 294-299. [曹娟, 郑杰, 吕秀宁. 维生素 C 增强 As_2O_3 诱导宫颈癌 HeLa 细胞凋亡的研究 [J]. 东南大学学报(医学版), 2005, 24 (5): 294-299.]
- [2] Wang CC, Hu CL, Ma BL. Research progress in arsenic trioxide combined with Vitamin C on proliferation and phosphorylation on gene expression in lung adenocarcinoma cell [J]. China Cancer, 2013, 22 (4): 279-283. [王翠翠, 呼彩莲, 马伯林. 三氧化二砷联合维生素 C 抑制肺癌细胞增殖及多西酚氧化酶表达的研究进展 [J]. 中国肿瘤, 2013, 22 (4): 279-283.]
- [3] Xu WM, Shu CH, Hu J, et al. Effects of vitamin C combined with arsenic trioxide on the apoptosis of Hep-2 cell [J]. Journal of Clinical Otorhinolaryngology, 2008, 22 (4): 171-173. [许伟民, 舒诚华, 胡劲, 等. 三氧化二砷和维生素 C 联合诱导喉癌细胞 Hep-2 凋亡的作用 [J]. 临床耳鼻咽喉头颈外科杂志, 2008, 22 (4): 171-173.]
- [4] Li JJ, Tang Q, Li Y, et al. Role of oxidative stress in the apoptosis of hepatocellular carcinoma induced by combination of arsenic trioxide and ascorbic acid [J]. Acta Pharmacol Sin, 2006, 27 (8): 1078-1084.
- [5] Zhou J. Arsenic trioxide: an ancient drug revived [J]. Chin Med J (Engl), 2012, 125 (19): 3556-3560.
- [6] Du J, Cullen JJ, Buettner GR. Ascorbic acid: chemistry, biology and the treatment of cancer [J]. Biochim Biophys Acta, 2012, 1826 (2): 443-457.
- [7] Leung PY, Miyashita K, Young M, et al. Cytotoxic effect of ascorbate and its derivatives on cultured malignant and non-malignant cell lines [J]. Anticancer Res, 1993, 13 (2): 475-480.
- [8] Pelicano H, Feng L, Zhou Y, et al. Inhibition of mitochondrial respiration: a novel strategy to enhance drug-induced apoptosis in human leukemia cells by a reactive oxygen species-mediated mechanism [J]. J Biol Chem, 2003, 278 (39): 37832-37839.
- [9] Han SS, Kim K, Hahm ER, et al. Arsenic trioxide represses constitutive activation of NF-kappaB and COX-2 expression in human acute myeloid leukemia, HL-60 [J]. J Cell Biochem, 2005, 94 (4): 695-707.
- [10] Ge FM, Bai QX, Liu YX, et al. Ascorbic acid enhances apoptosis of multiple myeloma RPMI 8226 cells induced by arsenic trioxide [J]. Tumor, 2006, 26 (04): 331-334. [葛繁梅, 白庆成, 刘延香, 等. 抗坏血酸增强三氧化二砷诱导多发性骨髓瘤细胞凋亡 [J]. 肿瘤, 2006, 26 (04): 331-334.]
- [11] Galimberti S, Guerrini F, Salvi F, et al. Arsenic trioxide and ascorbic acid interfere with the BCL2 family genes in patients with myelodysplastic syndromes: an ex-vivo study [J]. J Hematol Oncol, 2012, 5 (1): 1-8.
- [12] Grad JM, Bahlis NJ, Reis I, et al. Ascorbic acid enhances arsenic trioxide-induced cytotoxicity in multiple myeloma cells [J]. Blood, 2001, 98 (3): 805-813.
- [13] Bahlis NJ, McCafferty-Grad J, Jordan-McMurry I, et al. Feasibility and correlates of arsenic trioxide combined with ascorbic acid-mediated depletion of intracellular glutathione for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma [J]. Clin Cancer Res, 2002, 8 (12): 3658-3668.