

文章编号:1005-6947(2008)09-0861-04

· 基础研究 ·

草氨酸盐对人胰腺癌细胞内钙含量影响的研究

张树华, 王春友, 熊炯炘

(华中科技大学同济医学院附属协和医院 胰腺外科中心, 湖北 武汉 430022)

摘要:目的 探讨草氨酸盐(oxamate)对人胰腺癌细胞内钙含量的影响。方法 体外培养人胰腺癌细胞 panc-1, 用 oxamate 干预癌细胞后 48h, 行钙离子荧光指示剂 Fluo-3/AM 染色, 激光共聚焦下观察不同浓度 oxamate 作用下细胞内钙含量的变化。结果 oxamate 干预 48h 后, 细胞内钙含量随着 oxamate 浓度的升高而致荧光强度逐渐增强, 呈剂量-效应关系。结论 oxamate 能增加 panc-1 细胞内钙离子含量, 影响细胞内钙离子平衡, 进而干涉细胞病理生理过程。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(9): 861-864]

关键词: 胰腺肿瘤; 草氨酸盐; 细胞内钙离子

中图分类号: R 735.9

文献标识码: A

The study of effect of oxamate on the concentration of intracellular calcium in pancreatic cancer cell panc-1

ZHANG Shuhua, WANG Chunyou, XIONG Jiongxin

(Department of Pancreatic Surgery, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China)

Abstract: **Objective** To investigate the effects of oxamate on concentrations of calcium in pancreatic cancer cells. **Methods** Pancreatic cancer cell panc-1 was cultured in vitro with oxamate for 48 h, then stained with Fluo-3/AM, and the light density of cells for different concentration of oxamate under confocal laser microscopy was observed. **Results** Oxamate influenced the concentration of calcium in panc-1, and this effect corresponded to the concentration of oxamate. **Conclusions** Oxamate can induce the increase of the concentration of calcium of panc-1, and then influence the cellular pathophysiologic process.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(9): 861-864]

Key words: Pancreatic Neoplasms; Oxamate; Intracellular Calcium

CLC number: R 735.9

Document code: A

钙离子是细胞内普遍存在的第二信使, 参与调节细胞众多的生理和病理过程^[1]。真核细胞通过释放细胞内钙库或钙离子内流而调节细胞内钙离子含量。细胞膜上的钙池操纵的钙通道(store-operated calcium, SOC)是非兴奋细胞的主要钙内流通道, 而钙释放激活钙通道(calcium release activated

calcium, CRAC)通道则是SOC中比较特殊的一种, 具有对钙的高选择性, 可能成为调节细胞功能紊乱的关键靶点^[2]。肿瘤细胞内ATP产生不足时, 可以导致细胞内钙池钙含量下降, 最终激活CRAC通道而导致细胞内钙含量升高^[3]。本实验采用通过特异性抑制乳酸脱氢酶(Lactate dehydrogenase, LDH)活性干扰细胞ATP产生, 检测不同浓度草氨酸盐(oxamate)对人胰腺癌细胞 panc-1 的钙含量的影响。

收稿日期: 2008-08-10; 修订日期: 2008-08-30。

作者简介: 张树华, 男, 华中科技大学同济医学院附属协和医院博士研究生, 主要从事胰腺肿瘤方面的研究。

通讯作者: 张树华 E-mail: takezhang@tom.com

1 材料与方 法

1.1 材 料

人胰腺癌细胞株 panc-1 由华中科技大学同济医学院附属协和医院普外研究室提供。oxamate 购自广州伟伯化工有限公司;钙离子染剂 Fluo-3/AM 购自碧云天生物技术公司,激光共聚焦显微镜采用华中科技大学同济医学院 OLMPUS FV500 型。

1.2 实验方 法

1.2.1 药物配制 称取 1.1103g 的 oxamate 溶于 80 mL 无血清的 DMEM 高糖培养基中,充分溶解后,调节总体积为 90 mL;过滤除菌后加入 10 mL 胎牛血清,制成 0.1 mol/L 的 oxamate 液备用。

1.2.2 细胞培养 含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养 panc-1 细胞,至其对数生长期,消化后制备单细胞悬液。在 6 孔板的每孔内加上圆形盖玻片后,加入单细胞悬浮液;准确加入细胞保证每孔细胞数目均等。培养 24 h 细胞贴壁后,小心吸去培养液,加入 oxamate 及细胞培养液,调整 oxamate 的终浓度为 0, 0.02, 0.04, 0.06, 0.08 mol/L 和 0.1 mol/L,培养 48 h。

1.2.3 钙含量的测定 细胞 oxamate 干预 48 h 后,小心吸去培养液,加入 Hank's 液洗涤 2 次,每孔加入 Hank's 液 1 mL,再加入 Fluo-3/AM 染料 0.5 μ L,混匀;20~30 $^{\circ}$ C 染色 50 min 后,吸去染色液。加入 Hank's 液继续孵育 30 min 后,取出圆形盖玻片上激光共聚焦显微镜观察圈;在显微镜下

观察,随机选择细胞荧光最强的视野里适宜的 3~4 个细胞观察不同浓度 oxamate 对细胞内钙含量的影响。激光波长为 488 nm,连续记录 4 min,故每一视野中的每个细胞各有 200 个荧光度值(图 1)。荧光强度以($\bar{x} \pm s$)表示。

1.3 统计学方 法

应用统计软件 SPSS 13.0 进行统计分析, $P < 0.05$ 表示有统计学意义。描述性统计采用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 Sperman 相关分析,单因素方差分析(One-Way ANOVA),组间两两比较采用 SNK 法,其它组与对照组比较采用 Dunnett-t 检验。

2 结 果

oxamate 作用 panc-1 细胞 48 h 后,在激光共聚焦显微镜下检测各组浓度 oxamate 视野里细胞荧光强度。各组细胞内钙荧光强度随 oxamate 浓度的增加,可见细胞荧光强度逐渐增强(图 1-2),同时细胞数逐渐变少,细胞形态不规则。随着 oxamate 浓度的升高,细胞内钙离子荧光强度由 0 mol/L 的($1\ 592.10 \pm 173.41$)逐渐升高,直至 0.1 mol/L 的($3\ 707.26 \pm 179.06$) (表 1),各组浓度下钙荧光强度的差异整体分析显示差异显著($P < 0.05$);不同浓度 oxamate 的钙荧光强度与 0 mol/L 比较差异均有统计学意义($P < 0.05$)。各组钙荧光强度行 Sperman 相关分析显示 oxamate 浓度(0~0.1 mol/L)与钙荧光强度存在一定的剂量-效应关系(图 3)。

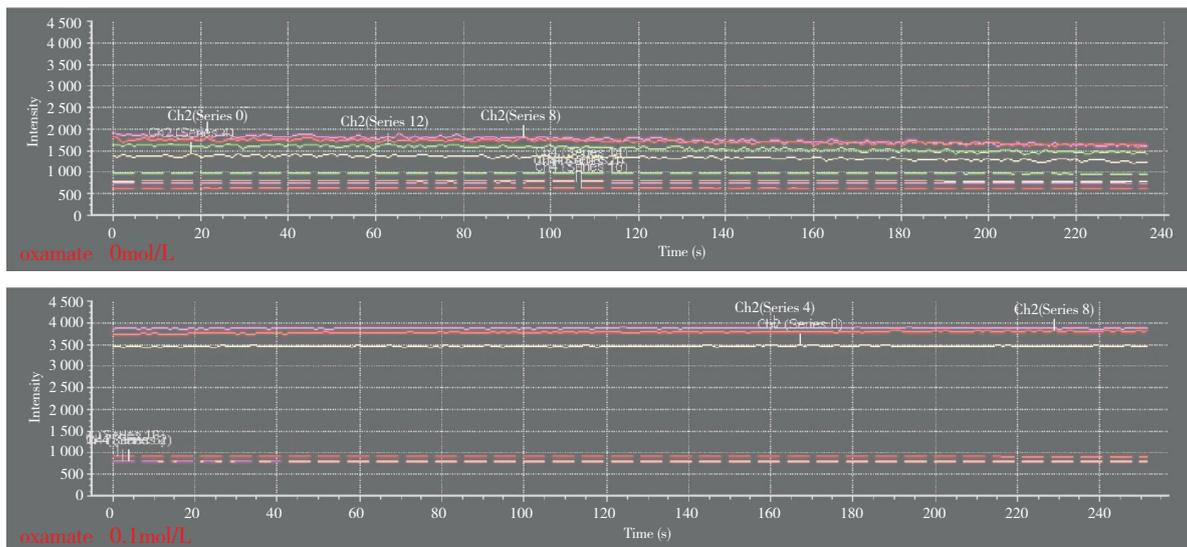


图 1 人胰腺癌细胞株 panc-1 的细胞内钙的检测

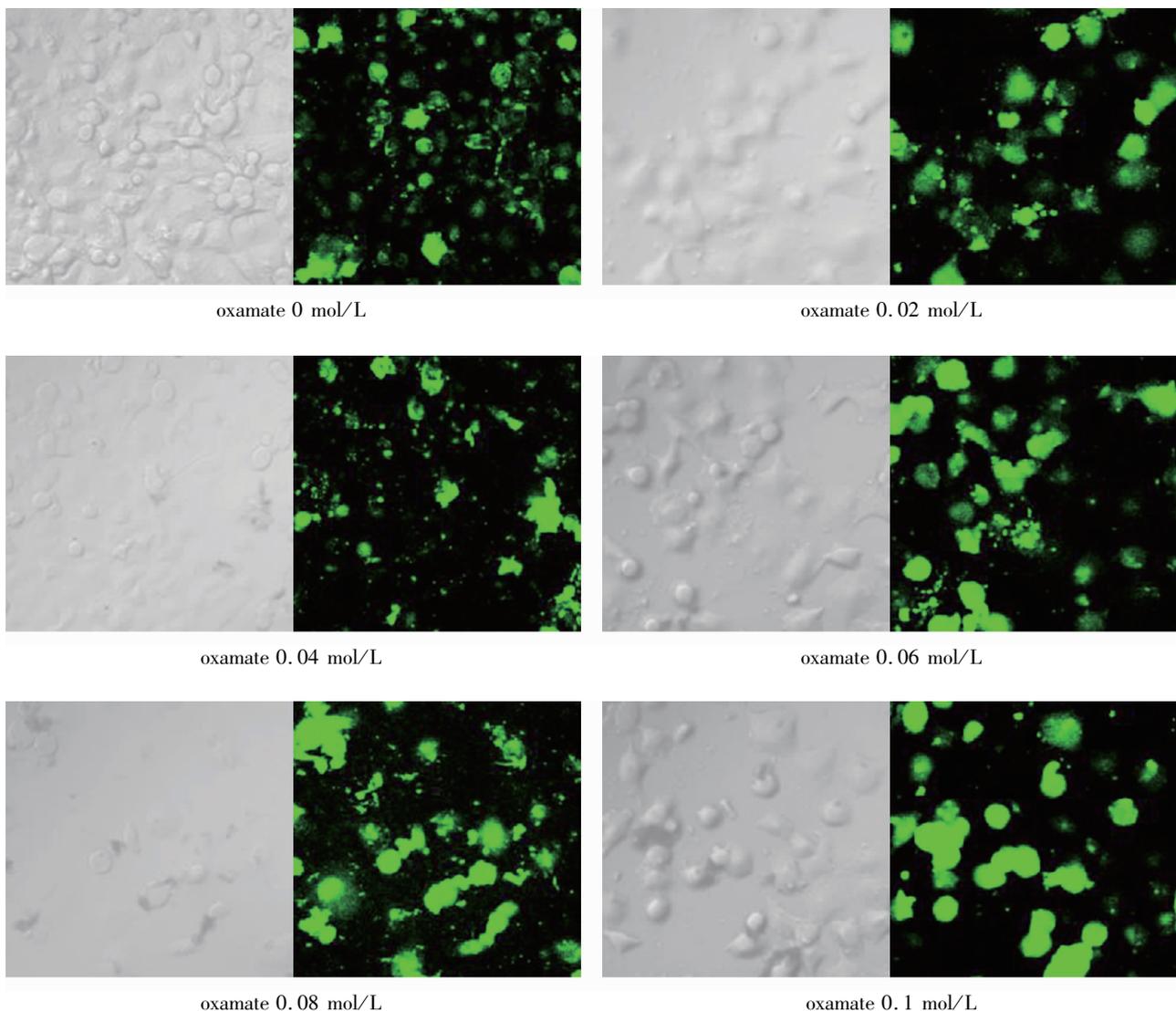


图2 不同浓度 oxamate 对人胰腺癌细胞株 panc-1 细胞内钙的影响

表1 不同浓度 oxamate 的钙荧光强度($\bar{x} \pm s$)

浓度	0 mol/L	0.02 mol/L	0.04 mol/L	0.06 mol/L	0.08 mol/L	0.1 mol/L
钙荧光强度	1592.10 ± 173.41	1785.72 ± 153.78	2394.31 ± 384.95	3123.26 ± 409.09	3211.15 ± 409.33	3707.26 ± 179.06

注:整体比较, $F = 5160.863, P < 0.05$; 组间比较, $P < 0.05$

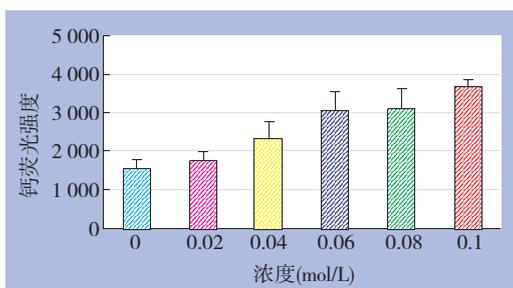


图3 不同浓度 oxamate 的钙荧光强度 Spermman 相关分析: $r = 0.914, P < 0.05$, 两者相关具有统计学意义

3 讨论

多种机制导致大多数肿瘤细胞缺血缺氧,其有氧化障碍,而无氧糖酵解增强,这一现象称为瓦博格效应(Warburg effect)^[4]。由于肿瘤细胞不同与正常细胞的能量代谢方式,越来越多的研究采用特异性抑制无氧糖酵解中的关键酶治疗肿瘤,取得了一定的效果^[5]。Ko等^[6]通过特异性抑制体外培养的肝癌细胞系的己糖激酶,细胞死亡率高达100%。Pelicano H等^[7]认为抑制肿瘤

细胞糖酵解会导致其 ATP 的严重缺乏,且能更为有效地杀伤糖酵解水平高的肿瘤,改善肿瘤化疗耐药,具有极好的临床前景。

细胞内钙离子对维持机体生命活动极为重要,参与调控细胞的许多生理活动,包括肌肉收缩、能量代谢、分泌以及细胞分裂。当细胞受到应激时,会通过多种机制调节钙离子浓度,其浓度的变化势必引起细胞功能的变化。细胞内钙升高,一方面可导致钙依赖性酶激活而诱导凋亡;另一方面可以导致线粒体摄入钙而使线粒体钙超载^[8]。线粒体的膜间腔内存在多种凋亡启动因子,线粒体钙超载,导致内膜的跨膜压降低和通透性转换孔开放,引起线粒体外膜肿胀破裂,释放上述因子,诱导细胞凋亡。

LDH 是糖酵解的关键酶,其催化细胞内丙酮酸氧化生成乳酸。特异性抑制细胞内 LDH,势必引起丙酮酸堆积,而丙酮酸是有氧氧化和无氧氧化的分叉点。Bakowski 和 Parekh 最近报道了细胞能量代谢的中间产物和细胞内钙稳态的相关性,指出能量代谢的中间产物丙酮酸可以减少 CRAC 通道的失活而调节其活性,导致细胞内钙离子含量升高^[9-10]。本实验结果也显示,oxamate 干预后细胞内钙含量随其浓度升高而升高,且成剂量-效应关系。

综上所述,由于肿瘤细胞无氧糖酵解系其唯一的能量代谢方式,特异性抑制无氧糖酵解,可以抑制其生长甚至杀伤肿瘤细胞。oxamate 通过特异性抑制 LDH 活性,使细胞内钙含量增高,进而可能导致细胞凋亡增加。由于其除了干扰肿

瘤细胞能量代谢外,还可通过影响细胞内钙含量,而有可能启动凋亡或坏死途径,能更大程度地杀伤肿瘤细胞。目前,糖酵解抑制剂的实验研究和临床研究正在不断地深入,而其也极有可能成为新的治疗胰腺癌的策略。

参考文献:

- [1] Bootman MD, Lipp P, Berridge MJ. The organisation and functions of local Ca^{2+} signals [J]. *J Cell Sci*, 2001, 114 (Pt 12): 2213 - 2222.
- [2] Vig M, Kinet JP. The long and arduous road to CRAC [J]. *Cell Calcium*, 2007, 42 (2): 157 - 162.
- [3] Parekh AB, Putney JW Jr. Store operated calcium channels [J]. *Physiol Rev*, 2005, 85 (2): 757 - 810.
- [4] Kondoh H. Cellular life span and the Warburg effect [J]. *Exp Cell Res*, 2008, 314 (9): 1923 - 1928.
- [5] Pelicano H, Martin DS, Xu RH. *et al.* Glycolysis inhibition for anticancer treatment [J]. *Oncogene*, 2006, 25 (34): 4633 - 4646.
- [6] Ko YH, Pedersen PL, Geschwind JF. Glucose catabolism in the rabbit VX2 tumor model for liver cancer: characterization and targeting hexokinase [J]. *Cancer Lett*, 2001, 173 (1): 83 - 91.
- [7] Xu RH, Pelicano H, Zhou Y, *et al.* Inhibition of glycolysis in cancer cells: a novel strategy to overcome drug resistance associated with mitochondrial respiratory defect and hypoxia [J]. *Cancer Res*, 2005, 65 (2): 613 - 621.
- [8] Saris NE, Carafoli E. A historical review of cellular calcium handling with emphasis on mitochondria [J]. *Biochemistry (Mose)*, 2005, 70 (2): 187 - 194.
- [9] Muallem S. Calcium signaling: pyruvate and CRAC meet at the crossroad [J]. *Curr Biol*, 2007, 17 (14): 549 - 551.
- [10] Bakowski D, Parekh AB. Regulation of store-operated calcium channels by the intermediary metabolite pyruvic acid [J]. *Curr Biol*, 2007, 17 (12): 1076 - 1081.

本刊 2008 年下半年各期重点内容安排

本刊 2008 年下半年各期重点内容安排如下,欢迎赐稿。

第 7 期	肝脏外科及肝移植	第 10 期	胃肠道外科及大肠肿瘤
第 8 期	胆道外科及胆道肿瘤	第 11 期	甲状腺、乳腺外科
第 9 期	胰腺外科及胰腺肿瘤	第 12 期	微创外科及其他