DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.05.039
第24卷第5期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 5
588 2002年5月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE May. 2002

论著

文章编号:1000-5404(2002)05-0588-03

生长抑素类似物诱导人胆管癌细胞株凋亡及对胞内游离钙的影响

陈 华,何振平,马宽生,王曙光 (第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038)

提 要:目的 探讨生长抑素类似物SMS201-995(SMS)是否通过诱导人胆管癌细胞凋亡而抑制肿瘤生长,以及与细胞内游离钙的关系。方法 采用人胆管癌细胞系SK-ChA-1,应用MMT比色法,Annexin V-FITC技术及激光共聚焦显微镜技术等方法进行检测和观察。结果 在SMS作用下SK-ChA-1细胞生长受抑制。SMS处理SK-ChA-1细胞后,Annexin V标记的凋亡细胞增多。细胞凋亡的同时细胞内游离钙浓度升高。结论 SMS可能通过诱导SK-ChA-1细胞[Ca^{2+}]i依赖性细胞凋亡,抑制胆管癌生长。

关键词:生长抑素;人胆管癌SK-ChA-1细胞;细胞凋亡;细胞内游离钙
中图法分类号:R329.2;R735.8;R977.1 文献标识码:A

Apoptosis of human cholangiocarcinoma cell line induced by somatostatin analogue and its effect on intracellular free calcium *in vitro*

CHEN Hua, HE Zhen-ping, MA Kuan-sheng, WANG Shu-guang (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Miltary Medical University, Chongqing 430038, China)

Abstract: Objective To investigate whether apoptosis induced by somatostatin analogue (SMS201-995, SMS) will inhibit the growth of human cholangiocarcinoma and the relationship between apoptosis and intracellular free calcium *in vitro*. Methods MMT assay, Annexin V-FITC and laser scanning confocal microscopy were performed to identify the inhibitory effect of SMS on cell proliferation and the induction of apoptosis in human cholangiocarcinoma SK-ChA-1 cells. Results SMS significantly reduced the growth of SK-ChA-1 cells and increased the number of cells with annexin V-labeling. Meanwhile the intracellular free calcium concentration was increased. Conclusion SMS can inhibit the proliferation activity by inducing the apoptosis mediated by increase of intracellular free calcium in SK-ChA-1 cell line.

Key words: somatostatin; human cholangiocarcinoma cell line; apoptosis; intracellular free calcium

目前认为肿瘤的发生和发展是细胞增殖和凋亡异常的结果[1],胆管癌的发生、发展和浸润转移也与凋亡密切相关[2]。Ca^{2+}参与真核细胞跨膜信息传导,胞内游离Ca^{2+}作为第二信使,在肿瘤细胞凋亡过程中起着关键作用。我们应用探针Fluo-3/Am并采用激光共聚焦显微镜技术检测生长抑素类似物诱导人胆管癌细胞系SK-ChA-1凋亡过程中胞内Ca^{2+}浓度([Ca^{2+}]i)的动态变化,以探讨生长抑素抑制胆管癌生长的机制。

1 材料与方法

1.1 实验材料及细胞培养

胆管癌细胞株SK-ChA-1来源于低分化肝外胆管腺癌转移性恶性腹水,由Knuth A教授惠赠。SMS201-995(SMS)由Suter教授惠赠。MMT购自Sigma公司。Fluo-3/Am,AnnexinV-FITC试剂盒购自晶美公司。细胞接种于25 ml培养瓶中,用含10%小牛血清DMEM/F12(V∶V,1∶1)培养基,于37 ℃,5% CO_2,湿度为95%的CO_2培养箱培养,2~3 d更换1次培养液。90%细胞融合时用0.15%胰酶/0.05% EDTA(V∶V,1∶3)消化传代。

1.2 观测项目

1.2.1 MTT比色分析法 取对数生长期SK-ChA-1,调整细胞浓度至5×10^4 cell/ml.用加样枪点样至96孔板.第1孔为空白对照,即100 μl无血清培养液;第2孔为实验对照,90 μl细胞悬液加0.1 mol/L PBS 10 μl;第3孔为实验组,90 μl细胞悬液,加入SMS 10 μl(SMS用0.1 mol/L PBS配制),使SMS终浓度为100 ng/ml;每孔均重复5次。于37 ℃、5% CO_2及饱和湿度条件下培养24、48、72、92 h后,每孔加MTT 10 μl,继续孵育4 h,弃上清,每孔加入100 μl DMSO,振荡10 min,在酶联免疫检测仪上490 nm波长处,以空白对照调零后测定各孔吸光度(OD值)。

1.2.2 Annexin V流式细胞仪检测 取对数生长期细胞接种于12孔培养板过夜后,弃原培养液,加入SMS使培养液终浓度为100 ng/ml,培养0、6、12、24 h,重复3次。消化收集细胞,PBS洗1遍,用结合缓冲液195 μl重悬细胞液,加5 μl Annexin V-FITC,混匀,室温孵育10 min。PBS洗后加190 μl结合缓冲液重悬细胞,加10 μl PI(20 μg/ml),流式细胞仪检测。

1.2.3 激光共聚焦测定胞浆内游离[Ca^{2+}i] Fluo-3/Am的激发波长为488 nm,发射波长为525 nm,本实验采用波长为488 nm的激光束发光,采用I、D、Q(Ion Domain Quantify)软件对新选定的区域进行荧光强度的数据采集并处理。数据输入到Microsoft Excel 5.0作进一步分析处理。细胞的处理:取对数生长期细胞,经消化、吹散、重悬于10%小牛血清DMEM培养液,调

作者简介:陈 华(1962-),男,四川省达州市人,博士,主治医师,讲师,主要从事胆管癌方面的研究,发表论文6篇,现在普通外科工作。电话:(023)68754000-73075

收稿日期:2002-01-11;修回日期:2002-04-01

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

整细胞浓度为5× 10^4cell/ml。取2 ml 加入内置盖玻片的 6 孔培养板内, 培养 24 h 后加入含 SMS (100 ng/ml)的培养液, 于 0、6、12、24 h 等时相点终止培养进行检测。钙敏染料 Fluo-3/Am 的负载及观察:①培养终止时, 弃上清, 用无血清 DMEM/F12 培养液洗 3 遍。②加含 5 mol/L Fluo-3/AM 的无血清 DME/F12 培养液, 37 ℃避光孵育 60 min。③取出盖玻片, 激光共聚焦显微系统下观察荧光物质的分布及强度, 并记录结果。

1.3　统计学处理

两组间均数比较用 t 检验。

2　结果

2.1　SMS 对胆管癌细胞体外生长的影响

如表 1 所示。与对照组相比较, SMS 处理后, SK-ChA-1 细胞生长在不同时间均明显受到抑制。

表 1　SMS 对胆管癌细胞体外生长的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Effects of SMS (100 ng/ml) on growth of SK-Ch-A1 cells($\bar{x}\pm s$)

Group	24 h	48 h	72 h	96 h
Control	0.367±0.021	0.593±0.015	0.754±0.013	0.857±0.011
SMS(100 ng/ml)	0.295±0.037 *	0.482±0.016 **	0.617±0.024 **	0.716±0.016 **

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* control

2.2　SMS 诱导胆管癌细胞凋亡

Annexin V-FITC 和 PI 双标法显示, 见图 1, 未加 SMS 时细胞凋亡数为(2.5±0.7)%, SMS 作用 6 h 即见凋亡细胞明显上升为(22±5.2)%, 随时间延长而逐步升高; 12 h 凋亡细胞占(39±7.1)%, 24 h 达到最高值(58±9.6)%。结果表明, SMS 可诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡。

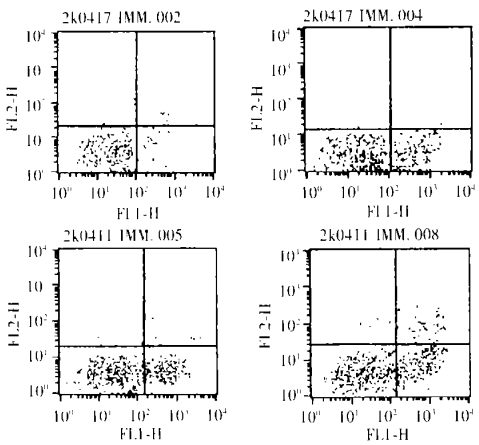


图 1　SMS 作用于 SK-ChA-1 细胞的 Annexin V-FITC 检测结果

Fig 1　Annexin V-FITC assay on SK-ChA-1 cells with SMS treatment

2.3　SMS 诱导 SK-ChA-1 细胞凋亡过程中胞内游离 [Ca^{2+}] i 的变化

应用激光共聚焦检测胞内游离[Ca^{2+}] i, 图 2 显示, SK-ChA-1 细胞静息时胞浆内[Ca^{2+}] i 为 136±16 nmol/L, 在 SMS 诱导细胞凋亡后 6 h, [Ca^{2+}] i 明显升高(241±19 nmol/L), 12 h 胞内[Ca^{2+}] i 达峰值(386±23 nmol/L), 24 h 胞内[Ca^{2+}] i 浓度(332±19 nmol/L)略有下降, 但仍维持在较高水平。

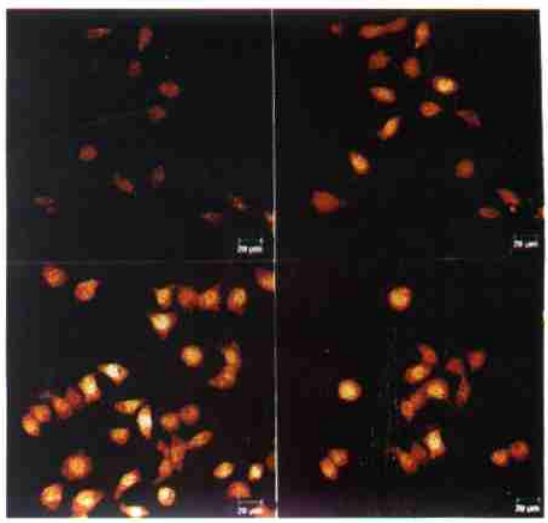


图 2　SMS 诱导胆管癌细胞凋亡过程中对胞浆内游离[Ca^{2+}] i 的影响

Fig 2　Change of intracellular free calcium in SK-ChA-1cells after SMS induced apoptosis with laser scanning confocal microscopy

3　讨论

近年来, 生长抑素对肿瘤生长的抑制作用正日益受到关注[3]。实验研究发现, 生长抑素作为抑制因子不仅可以抑制内分泌产生激素, 还可以抑制细胞的增殖[4]。生长抑素必须与受体结合而发生作用, 应用新的标记受体配基, 先后在胃癌、大肠癌、胰腺外分泌细胞癌测得生长抑素受体(Somatostatin Recptor, SSR)。Dancygier 等[5]证实胆管上皮细胞有 SSR 存在, 表明胆道组织也是生长抑素的靶组织之一。本实验应用 SMS 作用于一株 SSR(+)的人胆管癌细胞系 SK-ChA-1, 结果表明, SMS 可抑制胆管癌 SK-ChA-1 细胞的生长。

细胞凋亡是一种受基因调控的细胞主动死亡方式, 与肿瘤的形成和进展密切相关。本实验应用 Annexin V-FITC 染色流式细胞仪检测发现, SMS 作用于 SK-ChA-1 细胞 6 h 即可见凋亡细胞数明显增加, 随着 SMS 作用时间的延长, 凋亡细胞明显增多。表明 SMS 诱导细胞凋亡有一定的时效关系。

细胞外信号分子一般不进入细胞, 而是通过与胞膜上特异受体结合, 引起胞膜变化, 产生胞内信号分子, 将信号传至胞核, 引起基因及蛋白质变化, 最终调节细胞功能, 此过程称为信号传导通路。胞浆内信号传导主要包括 3 条信号通路, 即腺苷酸环化酶系统, 肌醇脂质系统和钙-钙调蛋白系统。Ca^{2+}、cAMP、1P3 和蛋白酶 C 等信号分子是 3 条通路的主要信号分子。其中 Ca^{2+} 在信号传导中起着重要作用, 是各条信号途径的枢纽。胞内 Ca^{2+} 升高会改变转录因子, 从而导致基因表达发生变化, 而启动凋亡[6]。胞内[Ca^{2+}] i 增加后, 可与 ATP 一起作用于染色质, 使原来折叠的很紧的染色质变得松散, 暴露出水解部位, 以便 DNase 水

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

解。现已明确，大多数细胞胞内[Ca^{2+}]i升高可以诱导细胞凋亡[4,7]。因此，本研究重点选择细胞内Ca^{2+}在胆管癌细胞凋亡信号传导机制中的作用。本实验研究显示：SMS作用于SK-ChA-1细胞6 h后胞内[Ca^{2+}]i明显上升，12 h时胞内[Ca^{2+}]i浓度最大，24 h时略有下降，但仍维持在较高水平。结合Annexin V-FITC染色流式细胞仪检测结果分析，随着细胞[Ca^{2+}]i内流的明显增加，可明显见到凋亡细胞数明显增加，表明[Ca^{2+}]i与SMS诱导SK-ChA-1细胞凋亡有关。Annexin V-FITC染色流式细胞仪检测结果显示，随着SMS作用到24 h时凋亡细胞仍在增加，而此时胞内[Ca^{2+}]i已在降低，推测SMS可能尚通过其他信号途径调节SK-ChA-1细胞凋亡，这有待今后进一步研究。

参考文献：

[1] Marx J. Cell death studies yield cancer dues[J]. Science, 1993, 256(3): 760-761.
[2] 扬竹林，钟德柞，李永国，等. 胆系恶性肿瘤组织中Bax蛋白和Fas抗原的表达及意义[J]. 中华实验外科杂志，1999, 16(2): 130-131.
[3] 陈 华，何振平. 生长抑素与肿瘤凋亡[J]. 中华临床新医学，2002, 2(2): 152-154.
[4] Castell T, Gomez-de-Segura I A, Vazquez I, *et al*. Somatostatin blockade improves the proliferative response but not intestinal morphological growth after small bowel resection in rats[J]. Eur J Surg, 2001, 167(1): 54-59.
[5] Dancygier H, Klein U, Ieuschner U, *et al*. Somatostatin-containing cells in the extrahepatic biliary tract of humans[J]. Gastroenterology, 1984; 86(2): 892-895.
[6] Szende B, Srkalovic G, Schally A V, *et al*. Inhibitory effects of analogs of luteinizing hormone-releasing hormone and somatostatin on pancreatic cancers in hamsters. Events that accompany tumor regression[J]. Cancer, 1990, 65(10): 2 279-2 290.
[7] Mattana A, Tozzi M G, Costa M, *et al*. By releasing ADP, Acanthamoeba castellanii causes an increase in the cytosolic free calcium concentration and apoptosis in wish cells[J]. Infect Immun, 2001, 69(6): 4 134-4 140.

（编辑 薛国文）

个案与短篇

文章编号：1000-5404(2002)05-0590-01

对某军队院校1999-2001年地方入伍新生体检结果分析

Analyses on physical examination of civilian students just enrolled in a military university during 1999-2001

田晓川，曹长源，田 妮，王文邦 （第三军医大学卫生处，重庆 400038）

新学员体检资料是掌握院校新学员健康状况的第一手资料，通过分析3年来地方入伍新学员的体检资料，可进一步掌握报考军校应届高考毕业生身体素质方面的某些基本情况及变化趋势，为今后军队院校体检工作提供参考，为新生入伍后的卫生保健工作提供有价值的资料。

1 对象与方法

1.1 对象

某军队院校1999-2001年682名地方入伍新学员。

1.2 方法

按照《中国人民解放军院校招收学员体检标准》对体检结果进行分析，数据处理采用SPSS软件χ^2检验。

2 结果

2.1 3年体检结果的变化趋势

1999-2001年体检人数682名，完全合格者663名，合格率97.21%；2000年最低(96.63%)；2001年最高(98.06%)，变化幅度不大，无显著性差异($\chi^2=1.034$ $P>0.05$)，见表1。

2.2 不合格原因

3年来地方入伍新学员(高考生)入校复检不合格的前3位原因依次是病毒性肝炎(47.37%)、胸部疾患(肺结核和慢性呼吸道疾病)(26.32%)、视力不良(21.05%)，见表2。

2.3 视力低下状况

通过对这3年体检资料分析，发现视力低下率有显著变化，将单眼裸眼视力低于5.0视为视力低下。其1999-2001年新学员视力低下率有逐年上升趋势，各年份变化幅度较大，有显著性差异(χ^2总=24.19 $P<0.01$)，见表3。

表1 某军校1999-2001年地方入伍新学员体检合格情况

年份	受检人数	合格人数(%)	不合格人数(%)
1999	226	219(96.90)	7(3.10)
2000	208	201(96.63)	7(3.37)
2001	258	253(98.06)	5(1.94)
合计	682	663(97.21)	19(2.79)

表2 某军校1999-2001年地方入伍新学员入学体检不合格原因比较

不合格原因	例数				百分比(%)			
	1999	2000	2001	合计	1999	2000	2001	合计
肝炎	5	4	0	9	71.43	57.14	0	47.37
胸部疾患	0	2	3	5	0	28.57	60.00	26.32
视力不良	1	1	2	4	14.29	14.29	40.00	21.05
其它	1	0	0	1	14.29	0	0	5.26
合计	7	7	5	19	100.00	100.00	100.00	100.00

作者简介：田晓川(1972-)，男，重庆市人，医师，主要从事预防保健方面的研究。电话：(023)68752151

收稿日期：2002-01-20 修回日期：2002-03-25

（下转593页）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net