DOI:10.16016/j.1000-5404.2001.07.019
第23卷第7期 第三军医大学学报 Vol. 23, No. 7
2001年7月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Jul. 2001

文章编号:1000-5404(2001)07-0793-02

论著

一氧化氮对胆管癌细胞增殖的影响

王立明[1],何振平[2],梁 平[1],马宽生[2],王曙光[2],李 昆[2] (第三军医大学:[1]附属新桥医院普通外科,重庆 400037;[2]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 探讨一氧化氮在胆管癌发生与发展中的作用。方法 实验分为3组:①正常对照组(NQB):正常培养胆管癌QB细胞;②NO抑制剂组(LQB):体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按1 mmol/L的剂量加入L-NMMA,3 d后取样检测;③NO促进剂组(AQB):体外培养管癌QB细胞,传代当天按5 mmol/L的剂量加入L-Arg,3 d后取样检测。采用紫外分光光度仪等测定胆管癌细胞QB内NO含量,同时应用^{3}H-胸腺嘧啶脱氧核苷掺入法观察一氧化氮对QB增殖的影响。结果 一氧化氮抑制剂对胆管癌QB细胞增殖无影响,一氧化氮促进剂明显抑制QB细胞的增殖。结论 一氧化氮对胆管癌细胞的生长具有双向作用。

关键词:胆管癌;一氧化氮;细胞增殖
中图法分类号:R730.231.1R735.8 文献标识码:A

Effect of nitric oxide on proliferation of cholangiocarcinoma cell *in vitro*

WANG Li-ming, HE Zhen-ping, LIANG Ping, MA Kuan-sheng, WANG Shu-guang, LI Kun (Department of General Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract Objective To study the effect of nitric oxide (NO) on the genesis and development of cholangiocarcinoma. Methods Cholangiocarcinoma cells QB were established and cultured. The cultured QB cells were divided into 3 groups: ① Normal control group (NQB); ② NO inhibitor group (LQB): QB+L-NMMA (1 mmol/L); ③ NO promotor group (AQB): QB+L-Arg (5 mmol/L). The content of NO in cultured cholangiocarcinoma cell QB strain was detected with ultraviolet spectrometry, and the effects of NO on the proliferation of QB cells was detected with ^{3}H-TDR incorporation 3 d after culture. Results NO at high concentration had markedly inhibitory effect on the proliferation of cultured QB cells, but that at low concentration exerted no effect on this aspect. Conclusion The results indicate that NO takes two-way roles in the growth of cholangiocarcinoma.

Key words: cholangiocarcinoma; nitric oxide; proliferation

胆管癌的发病率近年来呈上升趋势,其临床切除率低,其它抗癌辅助治疗效果欠佳,预后较差。现代医学利用肿瘤细胞自身的生物学特性来对抗肿瘤取得惊人成就,为临床开发新的肿瘤综合治疗手段开辟了新天地。本实验检测胆管癌细胞内一氧化氮(Nitric oxide, NO)的含量,观察细胞内NO的水平对细胞增殖的影响,试图为临床利用胆管癌细胞自身生物学特性防治胆管癌提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要试剂与仪器

1.1.1 主要试剂 NO试剂盒购自南京生物工程研究所;氚胸腺嘧啶脱氧核苷(^{3}H-TdR)由北京原子能研究所提供;DMEM培养基及新生牛血清购自Serva公司;左旋精氨酸(L-Arg)和N^G-单甲基-左旋精氨酸(L-NMMA)等试剂均为Sigma公司产品。

1.1.2 主要仪器 液体闪烁计数仪及紫外分光光度仪(瑞典LKB公司);高速低温离心机(美国杜邦公司)等;超静工作台(苏州净化设备公司YT-875型);24孔细胞培养板(美国Costar公司产品)等。

1.2 方法

1.2.1 标本的采集和处理 体外培养胆管癌细胞QB由西南医院全军肝胆外科研究所建株。患者为男性,51岁。材料取之其低分化肝门部胆管腺癌肝内转移灶。QB组织学上与源癌组织相似,具有较多的微绒毛、微管、微丝及细胞连接,细胞质和细胞膜存在角蛋白和桥粒蛋白等上皮来源特征,生长速度快,群体活力高,独立生存能力强,具有较强的致瘤性[1]。本实验所用为第25~30代细胞。将细胞悬液接种于盛有含10%小牛血清的DMEM培养基的培养瓶中,于37 ℃、5%CO_2培养箱中培养,细胞贴壁生长良好。细胞每3 d传代1次,传代后接种于24孔细胞培养板,按实验要求时间加样0.1 ml/孔,待细胞生长汇合80%时,用0.25%胰蛋白酶消化后,立即检测或用DMEM培养液制成细胞悬液(10^6个/ml)置-4 ℃冰箱或液氮保存待用。

1.2.2 实验分组及治疗 ①NQB组:正常培养胆管癌QB细胞,未加其它治疗试剂,作为对照;②LQB组:体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按1 mmol/L的剂量加入L-NMMA,3 d后取样检测;③AQB组:体外培养胆管癌QB细胞,传代当天按5 mmol/L的剂量加入L-Arg,3 d后取样检测。

1.2.3 NO含量测定 采用硝酸还原酶化学比色法,按试剂盒说明书进行。其中A液:0.3%磺胺;B液:6 mmol/L萘乙烯二胺盐酸盐;C液:0.15%硫酸锌;D液:4%氢氧化钠;E剂:亚硝酸钠。

取样品0.1 ml,加C液0.6 ml、D液0.1 ml、三蒸水0.4 ml混匀,冰上孵育60 min,12 000 r/min高速低温离心2 min,取上清0.6 ml,加A液0.1 ml、三蒸水0.4 ml混匀,冰上孵育15 min后,加B液0.1 ml混匀,避光室温放置60 min,545 nm比色,读D值。

标准曲线:以亚硝酸钠为标准品,制作标准曲线。当日配制1.0 mmol/L亚硝酸钠($NaNO_2$)溶液(取E剂6.9 mg用三蒸水定容至100 ml),分别取该溶液0、10、20、30、40、50、100、200、300、400、500 μl,加三蒸水补足体积达1 000 μl,取每一浓度0.1 ml,

作者简介:王立明(1965-),男,湖北省武汉市人,博士,主治医师,主要从事胃肠肿瘤的发病机制方面的研究。电话:(023)68755114-74605
收稿日期:2000-07-28;修回日期:2000-09-15

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

按测定步骤测量 D_{545}值，制成标准曲线。

1.2.4 ^{3}H-TdR 掺入实验 传代 72 h 对数生长期细胞，0.25%胰蛋白酶消化后，用 10%含小牛血清的培养液制成细胞悬液，接种于 24 孔板(5×10^{4} 个细胞，0.9 ml/孔)，培养24 h。当细胞贴壁生长后换为等量无血清培养液，标记后各孔加入 0.1 ml不同浓度的 L-NMMA 及 L-Arg，对照组加入等量 DMEM。培养70 h，加^{3}H-TdR(7.4×10^{4}Bq/孔)再培养 2 h，弃上清，每孔加 0.25%胰蛋白酶 0.2 ml 消化，多头细胞抽滤器过滤于滤纸上，干燥，加入到放有闪烁液的计数管内过夜(12 h)激活。放入液体闪烁计数仪内计数。

1.3 统计学处理

实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示，采用第三军医大学数学教研室医用统计程序包对实验数据进行统计学处理。

2 结果

加入 NO 抑制剂 L-NMMA 后，体外培养胆管癌细胞 QB 中 NO 水平明显下降($P<0.001$)，对细胞的增殖无明显影响($P>0.05$)；加入 NO 促进剂 L-Arg 后，体外培养胆管癌细胞QB 中NO 水平明显上升($P<0.001$)，而胆管癌细胞的增殖受到明显抑制($P<0.01$)，见表1。

表 1 NO 对胆管癌细胞 QB 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Effects of NO on proliferation of cholangiocarcinoma QB cells($\bar{x}\pm s$)

Group	n	NO(μmol/ml)	^{3}H-TdR(Bq/well)
NQB	10	13.30±0.14	128.52±8.89
LQB	10	6.57±0.11 **	130.81±10.30
AQB	10	34.74±0.18 **	47.59±3.85 *

*: $P<0.01$, **: $P<0.001$ *vs* NQB

3 讨论

近年来的研究发现，一氧化氮作为传统介质和调节介质，与多种疾病，特别是与肿瘤的发生和发展密切相关[2,3]。目前有关肿瘤与 NO 关系的研究非常活跃，但临床上有关 NO 与胆管癌的相关研究尚属罕见。

现代医学已经证实 NO 在细胞内信息传递方面起着十分重要作用[4]，并很快在生理学、神经科学和免疫学等许多领域证明了 NO 既兼有第二信使和神经递质的性能，又是杀伤肿瘤细胞的效应分子[5,6]。目前普遍认为，细胞内 NO 的作用依赖于 NO 的生成量，小量 NO 主要参与机体的正常活动，对人体血压的正常调节、神经传导、学习和记忆及抗感染防御等生理功能有一定的调节作用[7]。本实验发现体外培养胆管癌细胞 QB 中低浓度 NO 对细胞增殖无明显影响，与上述报道相一致。大量资料表明，细胞内高水平的 NO 主要引起细胞毒作用，与组织的损伤有关。它不仅是入侵微生物的细胞毒，而且对产生 NO 的细胞和邻近细胞也有毒性[8]。有人报道，利用体内肿瘤免疫模型，将肿瘤细胞接种裸鼠和肿瘤免疫小鼠的腹膜下，免疫小鼠的腹膜 MΦ 代谢 L-Arg 生成 NO 的能力大于裸鼠，间接表明高水平的 NO 能抑制肿瘤生长[9]。本实验也发现胆管癌细胞内高水平的 NO 能明显抑制胆管癌细胞增殖，表明胆管癌细胞内高浓度的 NO 在抗肿瘤方面具有积极意义。

胆管癌细胞内高浓度的 NO 对肿瘤细胞增殖的抑制效应可能通过以下途径：①与肿瘤细胞内高浓度的氧自由基相互作用，快速反应生成过氧亚硝基($ONOO^{-}$)，迅速灭活 NO，而 $ONOO^{-}$ 进一步分解成毒性更大的羟自由基(·OH)和二氧化氮(NO_2)，引起明显的组织损伤，甚至组织坏死[10]；②引起细胞核酸亚硝酰化，破坏 DNA 双螺旋结构，抑制核糖核苷酸还原酶，进而抑制 DNA 合成，使细胞生长受到限制[11]；③抑制某些与细胞呼吸有关的关键酶的活性，使细胞无法正常生长。NO 可与某些含亚铁卟啉的铁原子结合，形成亚硝酰铁络合物，导致线粒体的 NADPH；泛醌氧化还原酶、琥珀酸；泛醌氧化还原酶以及三羧酸循环中乌头酸灭活，引起线粒体呼吸抑制和靶细胞铁离子丧失[12]。

值得一提的是，本研究发现 NO 对体外培养胆管癌细胞生长具有双相作用，高水平的 NO 对胆管癌细胞的增殖起抑制作用，这一作用受外源性 NO 促进剂 L-NMMA 的调节。此现象是否同时存在于临床胆管癌标本，有待于进一步研究证实。

参考文献：

[1] 王曙光. 肝外胆管癌细胞系的建立[J]. 中华实验外科杂志，1997，14(2)：67－68.

[2] Ayuse T，Brienza，Revelly J P，*et al*. Role of nitric oxide in porcine liver circulation under normal and endotoxemic conditions[J]. J Appl Physiol，1995，78(4)：1 319－1 329.

[3] Shi Q，Xiong Q，Wang B，*et al*. Influence of nitric oxide synthase Ⅱ gene disruption on tumor growth and metastasis[J]. Cancer Res，2000，60(10)：2 579－2 583.

[4] Uysal G，Yuksel G，Sinav B，*et al*. Cerebrospinal fluid nitric oxide levels in childhood bacterial meningitis[J]. Scand J Infect Dis，1999，31(5)：518－520.

[5] Tschugguel W，Schneeberger C，Unfried G，*et al*. Expression of inducible nitric oxide synthase in human breast cancer depends on tumor grade[J]. Breast Cancer Res Treat，1999，56(2)：145－151.

[6] Reveneau S，Arnould L，Jolimoy G，*et al*. Nitric oxide synthase in human breast cancer is associated with tumor grade，proliferation rate，and expression of progesterone receptors[J]. Lab Invest，1999，79(10)：1 215－1 225.

[7] Culotta E. Forcing the evolution of an RNA enzyme in the test tube[J]. Science，1992，257(5 070)：1 862－1 871.

[8] Cunningham J M，Green I C. Cytokines，nitric oxide and insulin secreting cells[J]. Growth Regul，1994，4(4)：173－180.

[9] 臧梦维. 一氧化氮的致突变性和致癌性[J]. 国外医学：生理、病理科学与临床分册，1998，18(1)：37－40.

[10] Yuen V H，Zeng L H，Wu T W，*et al*. Comparative antioxidant protection of cultured rabbit corneal epithelium[J]. Curr Eye Res，1994，13(11)：815－818.

[11] Nagashima M，Kasai H，Yokato J，*et al*. Formation of an oxidative DNA damage，8-hydroxydeoxyguanosine，in mouse lung DNA after intratracheal instillation of diesel exhaust particles and effects of high dietary fat and beta-carotene on this process[J]. Carcinogensis，1995，16(6)：1 441－1 445.

[12] Moncada S，Martin J F，Higgs A，*et al*. Peroxynitrite modification of low-density lipoprotein leads to recognition by the macrophage scavenger receptor[J]. New Engl J Med，1993，329(27)：2 002－2 007.

（编辑 冯崇英）

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