DOI: 10.16016/j.1000-5404.1998.06.003

双甲基氨氯吡咪抑制人肺癌细胞株 Na^+/H^+ 交换泵-1活性诱导肿瘤细胞酸化和凋亡*

吴国明** 历为良*** 黄桂君 钱桂生 (第三军医大学附属新桥医院呼吸内科研究所) 重庆, 400037

提 要 目的: 研究 Na^+/H^+ 交换泵-1(NHE-1)在肺癌细胞增殖/凋亡调控中的作用。方法: 采用荧光探针法检测 NHE-1抑制剂双甲基氨氯吡咪(DMA)对人肺巨细胞癌高转移株(PLA-801D)细胞的酸化作用;以活细胞计数法检测 DMA对 PLA-801D细胞增殖生长的抑制作用;采用原位细胞凋亡检测法观察 DMA诱导 PLA-801D细胞的凋亡。结果: 经 25μmol/L以上 DMA处理 24 h或 50μmol/L处理 8 h以上即能酸化 PLA-801D细胞,其细胞内 pH(pHi)显著降低,并诱导了 PLA-801D细胞的凋亡,肿瘤细胞的增殖生长也显著受抑。结论: NHE-1在肺癌细胞增殖/凋亡调控中起重要作用,抑制其增强的活性可能具有一定的应用前景。

关键词 肿瘤细胞; NHE-1; 细胞酸化; 细胞凋亡; 双甲基氨氯吡咪

中图法分类号 R730.21

研究表明,肿瘤细胞的糖代谢具有 Crabtree效应: 即使在有氧条件下糖酵解增强并占优势,以此提供细胞生命活动的主要能量,同时产生大量的氢离子。但细胞内酸负荷增大的肿瘤细胞能通过其表达增强的细胞膜 Na^+/H^+ 交换泵-1(Na^+/H^+ exchanger-1, NHE-1)将过多的氢离子泵出细胞外,维持细胞内 pH(pHi)的稳定,以利其恶性生长[1~3]。因此,肿瘤细胞 pHi调节机制可能是抗癌策略中新的良好靶点。双甲基氨氯吡咪(Dimethyl amiloride, DMA)为 NHE-1活性抑制剂,可抑制细胞内外的 H^+ 和 Na^+ 交换。本研究即试图利用 DMA这一特性诱导人肺癌细胞酸化和凋亡。探讨 NHE-1在肺癌细胞增殖/凋亡调控中的作用和以 pHi调节机制作为抗癌靶点的应用前景。

1 材料与方法

1.1 人肺癌细胞株的培养

采用人肺巨细胞癌高转移株 PLA-801D细胞。用 RPMI-1640培养基,在充分湿化、37℃、含 5% CO_2 的全自动孵箱中培养。指数生长期单层细胞用于实验。

1.2 肿瘤细胞 pHi的测定

参照 Maidorn等[3]的方法,并作适当改进。

1.2.1 标准曲线的建立

1.2.1.1 用 0.25%胰酶和 0.01% EDTA消化肿瘤细胞,用 Hanks液(pH7.4)漂洗二次,并使之成单细胞悬液,细胞密度为 3.0×10^5/ml 以每管 2 ml移入 24支试管中,每管加入双羧乙基碳氧荧光素四乙酰氧甲酯(BCECF-AM, Sigma产品)至其终浓度为 2μg/ml, 37℃孵育 30 min。

1.2.1.2 用 Hanks液漂洗 3次后重新悬浮于 pH值分别为 6.2、6.4、6.8、7.0、7.2、7.4和 7.6的 KCl溶液(KCl 135 mmol/L, $CaCl_2$ 1 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L, 葡萄糖 10 mmol/L,用 Tris-MOPS调节 37℃时的 pH至所需值),每管 3 ml(细胞密度为 2×10^6/ml),每一 pH值设 3管。每管中加入 Nigericin(NGR, Sigma产品),终浓度为 1.6μg/ml, 37℃孵育 10 min。

1.2.1.3 用 RF-540荧光光度计(Shimadzu,日本)测定各管在激发波长分别为 440 nm和 495 nm 发射波长为 525 nm时的荧光强度。

1.2.1.4 用直线回归法求得肿瘤细胞 pHi与荧光强度比值(FIR)(495 nm/440 nm)间的相关系数及回归方程。

1.2.2 pHi的测定 将待测肿瘤细胞按第 1.2.1.1步处理后用 Hanks液漂洗 3次,然后重新悬浮于氯化胆碱溶液(氯化胆碱 140 mmol/L, KCl 1 mmol/L, $CaCl_2$ 1 mmol/L, $MgCl_2$ 1 mmol/L,葡萄糖 10 mmol/L,无脂肪酸小牛血清白蛋白 0.1%, pH7.4)中,细胞密度为 2×10^6/ml,每管 3 ml, 37℃孵育 10 min后按第 1.2.1.3步测定 FIR,将该比值代入上述第 1.2.1.4步求得的回归方程中求得 pHi。

1.3 DMA对 PLA-801D细胞的酸化作用

用不同终浓度(0、25、50、100、150μmol/L)的 DMA(购自 Sigma公司)与常规培养的 PLA-801D细胞共孵育 24 h后收获细胞并测定其 pHi 选取最适浓度的 DMA(本研究选 50

* 第三军医大学科研基金资助项目

** 吴国明,男,37岁,副主任医师,副教授,博士研究生 *** 解放军 412医院呼吸内科 宁波, 315040

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

μmol/L)分别与肿瘤细胞共孵育 0、8、24、48 h后测定肿瘤细胞 pHi。

1.4　DMA对 PLA-801D细胞增殖生长的抑制

用 0.25%胰酶分离细胞,用培养基悬浮成单细胞液,细胞密度 1×10^5/ml,接种于 24孔培养板,每孔 2 ml,在 CO_2孵箱内常规培养。实验分 2组:处理组于接种后 12 h加入 DMA(终浓度为 50μmol/L),此后每隔 24 h取 3孔细胞进行活细胞计数,余下各孔细胞更换新的培养基和 DMA;对照组除以等量溶剂代替 DMA外,其余操作与处理组相同。

1.5　细胞凋亡检测

肿瘤细胞直接生长在置于培养皿内的盖玻片上,与 DMA(50μmol/L)共孵育 0、8、24和 48 h后观察细胞生长情况,同时用 pH试纸监测培养基的 pH值,使 pH保持在 7.1~7.2,并收集盖玻片作原位细胞凋亡检测,其检测采用宝灵曼提供的细胞原位凋亡检测试剂盒(AP Kit),按说明书介绍的步骤操作。

1.6　统计学处理

资料用 $\bar{x}\pm s$表示,用 t检验作组间差异显著性检验,部分资料进行直线回归分析。

2　结果

2.1　荧光强度比值与 pHi的关系

两者呈显著直线相关,r= 0.9895($P<0.001$),其回归方程为 $\hat{Y}$= 7.8356+ 1.6845X,见图 1。

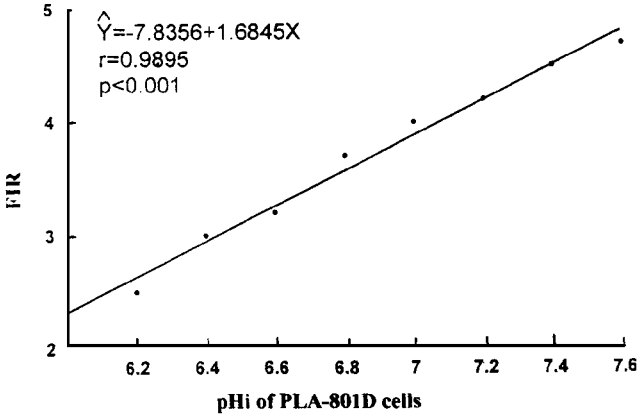


图 1　PLA-801D细胞 pHi与 FIR的关系

Fig 1　Correlation between pHi and FIR of PLA-801D cells

2.2　DMA对 PLA-801D细胞的酸化作用

DMA 25μmol/L以上处理 24 h或 50μmol/L处理 8 h以上即能明显酸化肿瘤细胞,pHi明显降低($P<0.05$~0.01);50μmol/L以上时增加浓度并不能使 pHi进一步降低($P>0.05$),呈现平台效应,见表 1、2。

表 1　不同浓度的 DMA处理 24 h对 PLA-801D细胞的酸化作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 1　Acidification effect of DMA on PLA-801D cells at 24 h after treatment($\bar{x}\pm s$)

	DMA concentration				
	0μmol/L	25μmol/L	50μmol/L	100μmol/L	150μmol/L
pHi of PLA-801D cells	7.14±0.03	6.82±0.04*	6.51±0.05**	6.46±0.01**	6.48±0.02**

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* base value

表 2　50μmol/L DMA不同处理时间对 PLA-801D细胞的酸化作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Acidification effect of 50μmol/L DMA on PLA-801D cells in different time after treatment($\bar{x}\pm s$)

	Treatment time			
	0 h	8 h	24 h	48 h
pHi of PLA-801D cells	7.19±0.08	6.80±0.06*	6.60±0.04**	6.52±0.05**

*: $P<0.05$,**: $P<0.01$ *vs* base value

2.3　DMA对 PLA-801D细胞增殖生长的抑制

与对照组比较,DMA处理组的活细胞数显著减少,生长受到显著抑制($P<0.05$~0.01),见表 3。

表 3　50μmol/L DMA对 PLA-801D细胞增殖生长的抑制作用($\bar{x}\pm s$)

Tab 3　Inhibitory effect of 50μmol/L DMA on proliferation of PLA-801D cells($\bar{x}\pm s$)

	Incubation time					
	0 h	1 h	2 h	3 h	4 h	5 h
Cell count of control group	2.0±0.2	5.13±0.5	11.15±0.8	16.93±1.0	21.83±0.8	26.85±1.3
Cell count of treatment group (×10^5/ml)	2.0±0.2	3.37±0.6△	3.95±0.4△△	3.60±0.4△△	3.50±0.5△△	2.90±0.6△△

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

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

2.4 原位细胞凋亡检测

细胞核染上紫蓝色者即为凋亡细胞。结果显示50μmol/L DMA处理8h即可检测到少量凋亡的肿瘤细胞,处理24h后可检测大量的凋亡细胞,见图2

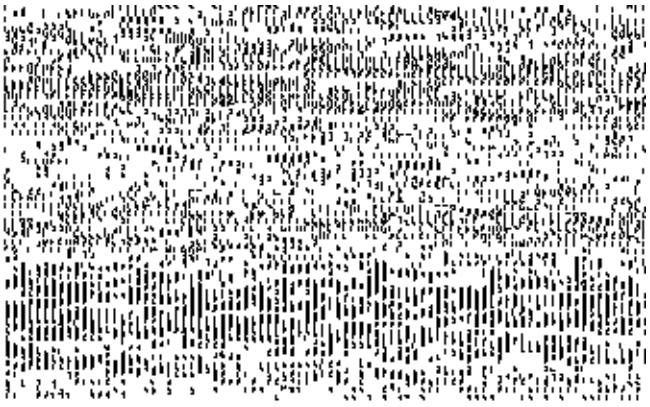


图 2 50μmol/L DMA处理 24 h后检测到大量的凋亡细胞 (AP×100)

Fig 2 A large number of apoptotic tumor cells were found at 24 h after administration of 50 μmol/L DMA (AP×100)

3 讨论

本研究所采用的荧光探针法是目前较好的离体肿瘤细胞 pHi的测定方法之一。其原理如下:荧光素BCECF在波长 495 nm的光波激发下发射出的波长525 nm的光波强度与 pH值呈正相关,而激发光波长为 440 nm时,发射波(525 nm)强度与 pH值无关。非离子形式的 BCECF-AM能迅速通过胞膜扩散到细胞内,随之被胞内非特异性脂酶水解成离子形式的BCECF。后者难以穿透细胞膜而被扣押在细胞内,并能被激发出高强度的荧光。氢离子通道剂 NGR通过催化 K^+/H^+和 Na^+/H^+的跨膜交换,可使 H^+顺利进出细胞,从而使细胞内外 pH值相等[3],因而作标准曲线时每组氯化钾溶液的 pH值即为该组肿瘤细胞的pHi。用 FIR代替荧光强度可以消除可能的极少量的荧光素外漏对 pHi测定值的影响,使该方法更趋完善可靠。本结果显示 pHi与 FIR呈显著正相关,$r=0.9895$($P<0.001$),足以作为测定 pHi的标准曲线。

本实验结果表明 50μmol/L的 DMA能明显酸化PLA-801D细胞,同时明显抑制了肿瘤细胞的增殖生长;在作用 8h后,pHi下降至 6.80,可检测到少量凋亡细胞;在作用 24 h后,pHi降至 6.60时,可检测到大量的凋亡细胞。而本实验检测的群体细胞的平均pHi,因而推测肿瘤细胞的 pHi需降至 6.60时才会诱导细胞凋亡。而在 DMA作用 8h后,有少量的细胞个体 pHi低于群体平均值 6.80,达到 6.60,故也发生了凋亡,文献[4]也有类似报道。DMA诱导 PLA-801D细胞酸化和凋亡的机制为 DMA通过与 NHE-1膜外段 Na^+结合位点竞争性结合,直接抑制了 NHE-1活性;同时也可能通过抑制 DNA蛋白质和 ATP的合成,对 NHE-1活性起到了间接抑制作用[5],NHE-1被抑制后细胞内过多的 H^+不能排出细胞外,导致 pHi下降。由于 Na^+结合位点是有限的,DMA占据所有 Na^+结合位点后,则再增加 DMA浓度,其酸化作用也不能明显增强,即表现为本研究所见的平台效应。此外,NHE-1还是重要的信号转导蛋白,并在细胞有丝分裂的启动中有重要作用,这与 DMA抑制 PLA-801D的增殖生长也有关系。DMA诱导的细胞内酸化可激活酸性核酸内切酶(DNaseⅡ),将基因组 DNA在核小体间降解,终致细胞凋亡[2467]。DNaseⅡ催化的DNA降解的片段带有 5′羟基(-OH)和 3′磷酸基(-P)末端;而细胞核内存在的染色质相关多聚核苷酸激酶/3′磷酸酶却能将它们转化为 5′-P和 3′-OH末端,这是凋亡过程中特征性的生化事件[4]。原位细胞凋亡检测法正是利用这一特征事件而设计的,因而是灵敏、早期和特异的细胞凋亡检测方法。

Maidorn等[3]的结果显示单用氨氯吡咪(AML,100μmol/L)及其衍生物(10μmol/L DMA等),或在细胞外 pH(pHe)7.0时与 NGR(0.25μg/ml)合用 6h对体外培养的肿瘤细胞均无毒性作用;只有在 pHe<6.4且与 NGR合用时,AML及其衍生物才能增强 NGR的非特性细胞毒性作用。其结果与本实验不一致,原因可能是前者药物处理时间过短、药物浓度较低和所用的检测方法(相对集落形成率)不够敏感。

本结果表明单用 DMA能酸化肺癌细胞并诱导其凋亡,提示 NHE-1在肺癌细胞增殖、凋亡调控中起重要作用。抑制肿瘤细胞增强的 NHE-1活性以诱导肿瘤细胞凋亡可能具有一定的应用前景。

参考文献

1 Rempel A, Mathupala S P, Griffin C A, *et al*. Glucose catabolism in cancer cells: amplification of the gene encoding type Ⅱ hexokinase. Cancer Res, 1996, 56(11): 2468

2 黄桂君,钱桂生. pH对细胞凋亡的调控及 pH调节的肿瘤治疗学. 科学, 1997, 228(8): 51

3 Maidorn R P, Cragoe E J Jr, Tannock I F. Therapeutic po-

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

tential of analogues of amiloride: inhibition of the regulation of intracellular pH as a possible mechanism of tumour selective therapy. Br J Cancer, 1993, 67(2): 297

4 Barry M A, Reynilds J E, Eastman A. Etoposide-induced apoptosis in human HL-60 cells is associated with intracellular acidification. Cancer Res, 1993, 53(10): 2349

5 Perez-Sala D, Collado-Escobar D, Mollinedo F. Intracellular alkalinization supresses lovastatin-induced apoptosis in HL-60 cells through the inactivation of a pH-dependent endonuclese. J Biol Chem, 1995, 270(11): 6235

6 Shemtov M M, Cheng D L W, Kong L, *et al*. LAK cell mediated apoptosis of human bladder cancer cells involves a pH-dependent endonuclease system in the cancer cell: possible mechanism of BCG therapy. J Urol, 1995, 154(1): 269

7 Rebollo A, Gomez J, Lastres P, *et al*. Apoptosis induced by IL-2 withdrawal is associated with an intracellular acidification. Exp Cell Res, 1995, 218(3): 581

(收稿: 1998-04-07;修回: 1998-10-07)

(编辑 王 红)

Induction of the acidification and apoptosis of human lung cancer cell line through inhibition of Na^+/H^+ exchanger-1 with dimethyl amiloride

Wu Guoming, Li Weiliang, Huang Guijun, Qian Guisheng (Department of Respiratory Diseases, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 400037)

Abstract **Objective**: To study the role of Na^+/H^+ exchanger-1 (NHE-1) in modulation of proliferation/apoptosis of lung cancer cells. **Methods**: The acidification, inhibition and apoptosis of human lung cancer cell line PLA-801D induced by dimethyl amiloride (DMA), one of the NHE-1 inhibitors, was determined with BCECF, a fluorescent probe, living cell count and *in situ* tailing respectively. **Results**: There was obvious acidification of PLA-801D cells incubated with DMA at a volume more than 25 μmol/L for 24 h or 50 μmol/L for 8h and the intracellular pH (pHi) of the tumor cells declined significantly ($P < 0.05$-0.01). Meanwhile, apoptosis of PLA-801D cells was induced and proliferation of them markedly inhibited. **Conclusion**: NHE-1 may play an important role in modulation of proliferation/apoptosis of lung cancer cells and inhibition of the enhanced NHE-1 activity of the tumor cells may be an anticancer strategy.

Key words tumor cell; NHE-1; acidification; apoptosis; dimethyl amiloride

28例老年肺癌临床误诊原因分析

个案与短篇

Analysis of the misdiagnosis of lung cancer in 28 senile patients

谭晓明* (第三军医大学附属西南医院肿瘤科) 重庆, 400038

李小兵 (第三军医大学基础医学部生物化学教研室) 重庆, 400038

肺癌是当前世界各国常见的恶性肿瘤之一,早发现、早诊断、早治疗对延长患者生存期甚为重要[1,2]。重庆市垫江县人民医院肿瘤科近几年共收治 60岁以上肺癌患者共 94例,其中误诊 28例,现将误诊原因分析如下。

1 临床资料

本组误诊病例共 28例,其中男 20例,女 8例;病变部位左肺 17例,右肺 11例;其中鳞癌 19例,腺癌 7例,小细胞肺瘤 2例。误诊疾病及例数如下: 肺炎 9例,慢性支气管炎 3例,肺结核 6例,结核性胸膜炎 2例,颈淋巴结核 1例,腰椎病 1例,颈椎病 1例,内耳眩晕症 1例,脑梗塞 1例,喉炎 2例,腹痛待诊 1例。

2 讨论

分析本组 28例误诊原因如下:① 病史询问不够: 临床医生对老年肺癌的早期症状,综合表现认识不足,缺乏老年肺癌的概念。对可疑患者询问病史不详细、不细致,未引起足够的临床重视。② 缺乏全面客观分析: 对临床上出现的某些症状,过早的

(下转 483页)

* 谭晓明,男,40岁,进修生,现在重庆市垫江县人民医院肿瘤科

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