DOI: 10.16016/j.1000-5404.1996.06.005

钙调素阻滞剂三氟拉嗪对原代肺癌细胞作用的研究

熊 玮 沈寒放 (第三军医大学附属西南医院呼吸内科)重庆,630038

提 要 应用细胞培养技术对28例手术切除标本行原代肺癌细胞培养,并测定了钙调素(CaM)阻滞剂三氟拉嗪对原代肺癌细胞的作用。结果显示:三氟拉嗪能抑制肺癌细胞进入增殖周期,使细胞阻滞于G_0/G_1期。在长春新碱(VCR)、阿霉素(ADR)和足叶乙甙(VP16)各药物组加入三氟拉嗪后能使癌细胞活性(A值)明显降低($P<0.01$或$P<0.05$),单用三氟拉嗪组亦能使癌细胞活性降低,但无统计学意义($P>0.05$)。结果表明:三氟拉嗪对原代肺癌细胞增殖有一定抑制作用,能明显增强VCR ADR和VP16的体外抗癌活性。此增效作用可能与三氟拉嗪抑制钙调素和P糖蛋白(P-gp)功能有关。

关键词 肺肿瘤;细胞,培养的;三氟拉嗪;抗肿瘤药

中图法分类号 R734.2

钙调素(Calmodulin, CaM)作为细胞内Ca^{2+}的重要受体,在细胞分裂增殖中起重要作用。某些肿瘤的发生、发展与Ca^{2+}和CaM密切相关,有作者提出其可能为肿瘤治疗的新靶点。近年来发现无毒剂量的CaM阻滞剂能抑制部分肿瘤细胞生长,加强常用抗癌药物的效应,恢复耐药癌细胞的敏感性[1,2]。目前文献报道仅限于细胞株实验结果,尚未查见其对原代肺癌细胞作用的报道。本研究就CaM阻滞剂三氟拉嗪(Trifluoperazine, TFP)对肺癌原代培养细胞的作用作一初步探讨。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 组织细胞来源 用28例外科手术切除肺癌组织标本进行原代细胞培养,并进行TFP作用研究。其中男20例,女8例,年龄26~70岁。组织细胞类型:鳞癌20例,腺癌7例,小细胞癌1例。

1.1.2 主要试剂及药品 RPMI-1640培养基(美国GIBCO公司产品)、TFP(美国Sigma公司)、噻唑兰(MTT,瑞士Fluka公司),长春新碱(VCR,上海第十二制药厂)、足叶乙甙(VP16,北京制药工业研究所实验药厂)、盐酸阿霉素(ADR,意大利生产)、角蛋白单克隆抗体(丹麦DAKO公司)、ABC试剂盒(美国Vector Lab公司)。

1.2 方法

1.2.1 原代细胞培养及细胞初步鉴定 原代细胞培养参照Freshney[3]方法略加改进。培养细胞3 d后涂片行角蛋白ABC法组化分析及HE染色。

1.2.2 药物设置 取作用于细胞周期不同时相的3种抗癌药物,每种药物设1/10、1、10倍血峰值(PPC)浓度3个浓度点。设两对照组,对照I为细胞悬液加PBS,对照II为培养液加抗癌药物,每浓度3复孔。TFP参照文献[4,5]浓度分别作药敏试验及流式细胞分析与电镜观察。

1.2.3 TFP对肺癌细胞周期各时相影响的测试 将细胞浓度为5×(10^5~10^6)/ml的单细胞悬液各取1 ml加入24孔培养板各孔,分成两组。同时向其中一组各孔加入10 μmol/L浓度的TFP 40 μl,培养24 h后离心弃上清,PBS分别冲洗各组细胞2次,以70%酒精固定。过滤标记荧光,于流式细胞仪上测试细胞周期。

1.2.4 透射电镜观察 各取细胞浓度c(细胞)/10^4 ml^{-1}的癌细胞悬液3 ml加入两培养瓶中,其中一瓶加入终浓度为30 μmol/L的TFP,另一瓶作对照。均培养72 h后分别收集细胞,1 500×g离心后弃上清,戊二醛缓冲液前固定,常规包埋、切片、染色,日本产JEM 2000-EX型透射电镜观察。

1.2.5 用MTT法检测TFP对各种抗癌药物体外抗肺癌细胞作用的影响。

1.2.6 统计学处理 数据输入计算机(IBM, AST),并用SPLM统计程序包作如下统计分析:t检验、χ^2检验。

2 结果

2.1 原代细胞培养及初步鉴定

本组28例均培养成功,培养3 d后细胞离心涂片、角蛋白免疫组化反应均示强阳性,细胞涂片HE染色确定为各类型肺癌细胞。

2.2 TFP肺癌细胞周期各时相的影响见表1

表1 TFP对肺癌细胞周期时相的影响($\bar{x}\pm s$,%)

Tab 1 The effect of TFP on the lung cancer cell cycle ($\bar{x}\pm s$, %)

Groups	n	(S+G_2+M)%	P value
No-TFP	10	63.64±28.91	<0.01
TFP	10	44.75±28.02	

由表1可见,加用TFP组S、G_2及M期细胞百分比明显减少,相对地G_0、G_1期细胞百分比明显增加,与未加TFP组比较相差非常显著($P<0.01$)。

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

2.3 TFP处理后肺癌细胞透射电镜观察

本实验观察了4例肺癌细胞(其中鳞癌3例,腺癌1例),结果发现 TFP作用两种类型的肺癌细胞超微结构均有变化,鳞癌细胞为线粒体肿胀变性,微管、微丝减少,腺癌则为线粒体变性,嵴消失以及微绒毛减少,表明 TFP对肺癌细胞有一定抑制作用。见图1,2

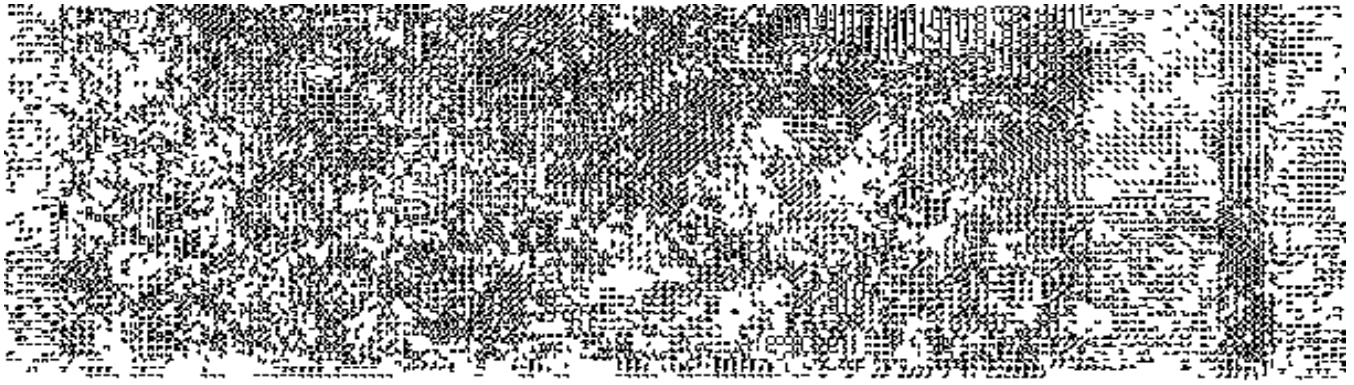


图1 培养3 d后肺鳞癌细胞电镜照片(加 TFP后) (TEM× 10000)

Fig 1 Ultrastructure of cells of lung squamous cell carcinoma after cultured for 3 days (add TEP) (TEM× 10000)

图2 培养3 d后肺腺癌细胞电镜照片(加 TFP后) (TEM× 6000)

Fig 2 Ultrastructure of cells lung adenocarcinoma after cultured for 3 days (add TFP) (TEM× 6000)

2.4 TFP对各抗癌药物体外抗肺癌细胞活性的影响见表2

表2 TFP对3药体外抗肺癌活性的影响($\bar{x}\pm s$, C_B/A)

Tab 2 The effect of TFP on the anti-cancer effects of the three drugs ($\bar{x}\pm s$, C_B/A)

Groups	Drugs	A value in differentidrug concentration		
		1/10 PPC	PPC	10 PPC
Cell control	No-TFP		0.453± 0.23	
	TFP		0.436± 0.24	
Test No-TFP	VCR	0.382± 0.19	0.305± 0.18	0.235± 0.17
	ADR	0.375± 0.20	0.306± 0.20	0.246± 0.18
	VP16	0.333± 0.21	0.245± 0.16	0.190± 0.10
TFP	VCR	0.325± 0.20**	0.234± 0.19*	0.170± 0.12**
	ADR	0.310± 0.20**	0.226± 0.18**	0.170± 0.12**
	VP16	0.296± 0.18*	0.185± 0.13*	0.130± 0.10*

*: $P<0.05$, **: $P<0.01$ *vs* Test No-TFP group

从表2可见反映各活细胞数量及活度的 A值的均值有较大的标准差,这是由于不同肺癌组织块所含活细胞数及各活细胞增殖活性差异性较大所致。单用 TFP时对肺癌细胞活性有一定抑制作用,但无统计学意义($P>0.05$)。经 TFP处理的肺癌细胞,在用抗癌药物后,其增殖活性(A值)较未用 TFP组均显著降低,$P<0.0$或0.05 说明 TFP能明显增强上述3种抗癌药物的抗癌活性。

3 讨论

近年来发现许多恶性肿瘤细胞中 CaM含量明显增高,而 CaM阻滞剂可以明显地抑制该类细胞的增殖。三氟拉嗪为一种典型的 CaM阻滞剂。作者用其处理原代肺癌细胞后,发现肺癌细胞的 G_0/G_1期细胞比例显著地增加,S+ G2+ M期明显下降,细胞周期进程明显受阻于 G_0/G_1期。透射电镜观察结果表明,TFP处理后原代肺癌细胞的部分细胞器变性坏死,细胞功能受到一定程度抑制。提示 TFP可能通过抑制 DNA的合成和改变细胞周期的进程而抑制肺癌细胞的增殖。

有研究已证实 CaM阻滞剂能逆转部分癌细胞株的耐药性,增加化疗的敏感性。Hait等[6]发现在 VCR和 ADR耐药的人白血病 P388细胞株中,TFP可使药物在细胞内蓄积,使化疗增敏。TFP对原代培养的肺癌细胞的作用如何?目前尚未见报道。本实验研究了

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

TFP对 28例原代培养肺癌细胞的化疗敏感性的影响。结果显示,TFP能明显增强 VCR ADR及 VP16 3药的体外抗肺癌活性,TFP处理前后抗癌效应比较 $P<0.01$或 $P<0.05$;该增强作用有剂量依赖性特点,随抗癌药物浓度增加而作用增强。本组结果与某些作者用部分细胞株研究结果一致[1,2]。

肺癌细胞易发生多药耐药。现已公认,典型的多药耐药与 P-糖蛋白(P-gp)有关,涉及的药物有蒽环类、长春碱类、鬼臼毒素类以及秋水仙碱和放线菌素 D等天然疏水性产物。本实验中选用的 VCR ADR及 VP16均为天然疏水性产物,这几种药物可能存在着一个相似的耐药机制,且很大程度上与 P-gp有关。当出现耐药且功能增强时,P-gp能加速上述药物排出细胞,使细胞内药物蓄积减少,进而使肿瘤细胞对药物产生耐药性。目前化疗增敏的具体机制尚不太清楚。Tsuruo等[7,8]提出 CaM阻滞剂逆转耐药,使化疗增敏的可能机制为:① 直接抑制 Ca^{2+}-CaM复合物形成,使 CaM失活,丧失加速抗癌药物从细胞内外排的能力;② 抑制细胞膜上能量依赖性外排系统(如 P-gp),使药物在细胞内蓄积增加;③ 增强某些抗癌药物与细胞内靶目标(如 DNA)的亲和力,有利于药物发挥作用;④ 抑制 DNA修复过程中的一个或多个环节。TFP可能通过抑制 CaM及 P-gp功能来增加 VCR ADR及 VP16在细胞内的蓄积,从而增强它们的抗癌活性。此外,TFP还能增强 VCR ADR与细胞核 DNA的亲和力,使细胞内药物的蓄积进一步提高,有利于发挥抗癌效应。这可能是本实验中所见到的 TFP对 3药作用不一致的原因。

本实验结果证明 TFP对原代肺癌细胞增殖有一定抑制作用,并能明显增强 VCR ADR和 VP16体外抗肺癌细胞作用,为今后进行动物及临床试验研究奠定了理论基础。

参考文献

1 Ganapathi R, Grabowski D. Differential effect of the calmodulin inhibitor TFP in modulating cellular accumulation, retention and cytotoxicity of doxorubicin in progressively doxorubcin-resistant L1210 mouse leukemia cells. Biochem Pharmacol, 1988; 37(1): 185

2 刘树人,张　雁,陆汉明等.钙调素拮抗剂对长春新碱抗癌作用的影响.中华医学杂志, 1994; 74(11): 680

3 Freshney R I. Culture of tumor tissue. In Freshney R I. Culture of animal cells. 2nd ed. New York: Alan R. Liss, 1987: 289-290

4 Perez R P, Handel L M, Hamilton T C. Potentiation of cisplation cytotoxicity in human ovarian carcinoma cell lines by TFP. A calmodulin inhibitor. Gynecologic Oncology, 1992; 46(1): 82

5 范　先,田鸿生,舒清波.钙调素拮抗剂对 A549肺癌细胞增殖及细胞骨架影响的研究.中华肿瘤杂志, 1992; 14(4): 270

6 Hait W N, Byrne T N, Piepmeier J *et al*. The effect of calmodulin inhibitor with bleomycin on the treatment of patients with high grade gliomas. Cancer Res, 1990; 50(12): 6636

7 Tsuruo T, Lida H, Tsukagoshi S *et al*. Increased accumulation of vincristine and driamycin in drug-resistant P388 tumour cells following incubation with calcium antagonist and calmodulin inhibitions. Cancer Res, 1982; 42(11): 4730

8 Charp P, Regan J. Inhibition of DNA repair by trifluoperazine. Biochem Biophys Acta, 1985; 824(1): 34

(收稿: 1996-06-05;修回: 1996-10-31)

(编辑　汪勤俭)

Effects of trifluperazine, a calmodulin antagonist, on the primany lung cancer cells

Xiong Wei, Shen Hanfang (Department of Respiratory Disease, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing, 630038)

Abstract　After 28 speimens of the primary human lung cancer cells obtained by operation were cultured, the effects of trifluperatine (TFP), a calmodulin (CaM) antagonist, on the primary lung cancer cells were investigated. It was found that TFP inhibited the proliferation of cancer cells and thus the percentage of cells at G_0/G_1 phase was increased significantly. The activity of cancer cells was significantly weakened when TFP was added into the VCR, ADR and VP16 treating groups ($P<0.01$ or $P<0.05$). These findings suggest that TFP can exert certain degree of inhibitory effects on the proliferation of primary lung cancer cells and enchance the anticancer effects of VCR, ADR and VP16 in vitro. The latter may be due to the inhibitory effects of TFP on CaM and P-gp.

Key words　lung neoplasms; trifluperazine; cell, cultured; antineoplastic agents

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