

- 9 Sanders KM, Ward SM. Nitric oxide as a mediator of nonadrenergic noncholinergic neurotransmission. *Am J Physiol* 1992;262:G379-392
- 10 Levin ER. Endothelins. *N Engl J Med* 1995;333:356-363
- 11 Lazaratos S, Kashimura H, Nakahara A, Fukutomi H, Osuga T, Urushidani T, Miyauchi T, Goto K. Gastric ulcer induced by submucosal injection of ET-1: role of potent vasoconstriction and intraluminal acid. *Am J Physiol* 1993;265(3Pt 1):G491-G498
- 12 Lopez-Talavera JC, Cadelina G, Olchowski J, Merrill W, Groszmann RJ. Thalidomide inhibits tumor necrosis factor alpha, decreases nitric oxide synthesis, and ameliorates the hyperdynamic circulatory syndrome in portal-hypertensive rats. *Hepatology* 1996;23:1616-1621
- 13 Ohta M, Tarnawski AS, Itani R, Pai R, Tomikawa M, Sugimachi K, Sarfeh IJ. Tumor necrosis factor alpha regulates nitric oxide synthase expression in portal hypertensive gastric mucosa of rats. *Hepatology* 1998;27:906-913
- 14 Marsden PA, Brenner BM. Transcriptional regulation of the endothelin-1 gene by TNF-alpha. *Am J Physiol* 1992;262(4 Pt 1):C854-C861
- 15 Stephens KE, Ishizaka A, Larrick JW, Raffin TA. Tumor necrosis factor causes increased pulmonary permeability and edema. Comparison to septic acute lung injury. *Am Rev Respir Dis* 1988;137:1364-1370

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2003年版权归世界胃肠病学杂志社

• 研究快报 •

黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca^{2+} 的抑制作用

台卫平, 罗和生

台卫平, 罗和生, 武汉大学人民医院消化内科 湖北省武汉市 430060
项目负责人: 罗和生, 430060, 湖北省武汉市武昌区解放路 238 号, 武汉大学人民医院消化内科. luotang@public.wh.hb.cn
电话: 027-88041919-2134
收稿日期: 2003-01-10 接受日期: 2003-02-19

摘要

目的: 探讨黄连素对人结肠癌细胞系 HT-29 的作用及与 Ca^{2+} 有关的机制, 为黄连素作为一种新的结肠癌化学治疗药物进行理论上的准备和提供相关实验结果.

方法: 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的黄连素加入到 HT-29 结肠癌细胞系培养液中. 分别在第 1 d, 第 2 d, 第 3 d 测量各有关值. 以 bapta-AM (33 $\mu\text{mol/L}$) 为细胞内 Ca^{2+} 螯合剂, verapamil (50 mmol/L) 为细胞膜 Ca^{2+} 通道拮抗剂, 分别抑制细胞内 Ca^{2+} 和细胞膜 Ca^{2+} 通道, 对比观察黄连素对细胞内 Ca^{2+} 的影响及结肠癌细胞在不同 Ca^{2+} 浓度条件下各有关值. 细胞记数检测细胞的生长和增生, 用免疫荧光分光光度法检测细胞内 Ca^{2+} 浓度.

结果: 黄连素在浓度大于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时则有明显的量效关系抑制结肠癌细胞的生长. 黄连素在浓度大于 0.3 $\mu\text{mol/L}$ 时对细胞内 Ca^{2+} 的释放有抑制作用.

结论: 黄连素能够抑制 Ca^{2+} 的释放可能为黄连素抑制 HT-29 细胞生长和增生的一个机制.

台卫平, 罗和生. 黄连素对 HT-29 人结肠癌细胞系 Ca^{2+} 的抑制作用. 世界华人消化杂志 2003;11(10):1642-1644

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/11/1642.asp>

0 引言

结肠癌是常见的恶性肿瘤之一, 他严重地危害着人们的身体健康. 目前临床上结肠癌常用的化疗药物毒副作用

用大, 寻找新的化疗效果好、毒副作用小的药物, 可以提高结肠癌患者的治疗效果, 提高患者的生存期及生存质量. 已有研究证实黄连素(berberine, ber)对平滑肌细胞内 Ca^{2+} 有作用^[1]. Ca^{2+} 作为第二信使可能以某种形式参与肿瘤生长和繁殖的调节^[2]. 本题采用细胞培养的方法, 将黄连素加入到结肠癌细胞培养环境中, 观察培养上清中细胞内 Ca^{2+} 的改变, 同时观察 ber 对结肠癌细胞生长、增生的影响, 为 ber 作为一种新的结肠癌化疗药物进行理论上的研究.

1 材料和方法

1.1 材料 细胞系: HT-29 细胞系购自中南大学湘雅医学院肿瘤研究所, 该细胞系由该所引自 ATCC. 主要试剂和仪器: berberine (Sigma), Fura-2/AM (Sigma), bapta-AM (Sigma), verapamil (Sigma), 日本产岛津 RF-5000 荧光分光光度计.

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 HT-29 以 RPMI-1640 为培养液, 加入 100 mL/L 热灭活的 FBS 及青霉素和链霉素, HT-29 细胞置于 37 $^{\circ}\text{C}$, 50 mL/L CO_2 培养箱中培养, 以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 细胞接种 24 h 后, 分组加药: 终浓度为 0.1 $\mu\text{mol/L}$, 0.3 $\mu\text{mol/L}$, 3.0 $\mu\text{mol/L}$, 30.0 $\mu\text{mol/L}$ 的 ber 加入到 HT-29 结肠癌细胞系培养液中. 以 bapta-AM (33 $\mu\text{mol/L}$) 为细胞内 Ca^{2+} 螯合剂, verapamil (30 mmol/L) 为细胞膜 Ca^{2+} 通道拮抗剂, 分别抑制胞内 Ca^{2+} 及胞膜钙通道, 对比观察黄连素对细胞内 Ca^{2+} 的影响. 24 h 后测量钙离子浓度.

1.2.2 生长曲线的绘制 采用氮兰四唑盐实验(MTT)法, 取对数生长期的 HT-29 细胞按传代方式制成单细胞悬液, 以每孔 4×10^3 个细胞接种于 96 孔培养板中, 培养 24 h 后, 弃去原细胞培养液, 实验组每孔加入 ber

母液,使其浓度为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 、0.3 $\mu\text{mol/L}$ 、3.0 $\mu\text{mol/L}$ 、30.0 $\mu\text{mol/L}$,对照组不加药,换成与实验组相同体积的培养液.每组每个时间点设6个平行孔,继续培养箱内培养,培养6 d,每组各取6孔加入MTT溶液(5 mg/mL) 20 μL ,37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育4 h后弃去孔内培养液,每孔加入15 μL DMSO 震荡10 min.以空白孔调零,在酶联免疫检测仪上测490nm波长处的每孔吸光度值(aborbance, A值),求其平均值.

1.2.3 免疫荧光分光光度法检测钙离子浓度 经典的Fura-2/AM负载测钙^[2]方法:用无血清的培养液洗涤细胞,将 10^6 细胞悬浮于1 mL含2.5 mmol/L Fura-2/AM和2 g/L BSA的BSS液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴80 min,并不断振荡.用冷BSS洗涤细胞2次,去除胞外游离的Fura-2/AM.将细胞悬浮在冷BSS中.连续测定340 nm、380 nm波长激发光交替激发时,490 nm发射新的荧光强度F,同时记录荧光强度比值R($R = F_{340}/F_{380}$).扫描结果由Super Ion Probe Software软件自动分析,依据公式 $[\text{Ca}^{2+}]_i = K_d (R_{\text{min}} - R) / (R - R_{\text{max}}) \times (F_{f2}/F_{b2})$,其中 K_d 为Fura-2/AM与钙离子结合反应的解离平衡常数. F_{f2}/F_{b2} 分别为钙离子游离与饱和时380 nm的荧光强度.自发荧光以未负载Fura-2/AM的细胞同样方法测得,计算时减去.

统计学处理 采用统计软件SPSS10.0分析.根据资料性质,实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,用t检验处理, $P < 0.05$ 为有统计学差异.

2 结果

2.1 ber对HT-29细胞生长、增生的影响 不同浓度的ber对HT-29细胞干预后的生长曲线如图1.细胞接种后,对照组细胞几乎呈线性生长,72 h后细胞数量大约增加8倍.ber干预后呈剂量依赖性抑制细胞增生,生长曲线向右移,3.0 $\mu\text{mol/L}$ 及30.0 $\mu\text{mol/L}$ 浓度抑制细胞增生较明显.

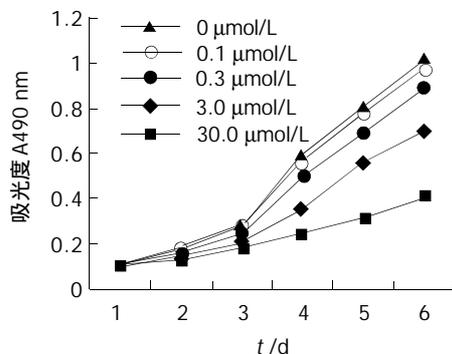


图1 不同浓度ber对HT-29细胞干预后的生长曲线.

2.2 ber对HT-29 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响 不同浓度的ber及verapamil、Bapta-AM对HT-29 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响见表1.结果显示当ber浓度在0.3-30 $\mu\text{mol/L}$ 之间时,对 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 有抑制作用,但作用强度比胞膜 Ca^{2+} 拮抗剂verapamil弱,比胞内 Ca^{2+} 螯合剂Bapta-AM更弱.

表1 Ber和verapamil、Bapta-AM对HT-29 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 的影响($n = 6$)

组别	浓度($\mu\text{mol/L}$)	$[\text{Ca}^{2+}]_i(\text{nmol/L})$
对照		145.5 \pm 10.7
Ber	0.1	141.3 \pm 9.5
	0.3	123.7 \pm 7.5 ^a
	3.0	120.7 \pm 10.3 ^a
	30.0	118.8 \pm 8.5 ^a
Verapamil	50	110.3 \pm 8.7 ^a
Bapta-AM	33	20.1 \pm 5.4 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

3 讨论

黄连素是从毛茛科黄连素(Coptis chinensis)根状茎中提取的一种季胺类化合物,属于异喹啉生物碱,主要用于肠道炎症伴发热,其毒副作用很小.近年来有研究证实ber对肿瘤细胞系也有作用^[3].关于ber对肿瘤细胞的作用机制,以前侧重于ber与细胞凋亡的关系^[4]. Ca^{2+} 作为一种第二信使,在细胞信号传导中起着重要作用^[5].

细胞钙以结合钙(如与带负电的脂质及蛋白质结合)和游离钙两种形式存在.在通常情况下,细胞外液约50-60%是结合钙,游离钙浓度约0.1-10 mmol/L,细胞内钙则99.9%以上为结合钙,主要分布于细胞核、线粒体、内质网/肌浆网和质膜,而胞内游离钙极少.细胞在非激活状态时,胞内游离钙浓度仅为0.1 $\mu\text{mol/L}$ 左右,但胞内游离钙浓度的改变却是细胞生理功能的关键环节.钙库如内质网、线粒体中的 Ca^{2+} 缓冲能力很大,在调节细胞质内 Ca^{2+} 浓度中起着重要作用.当一种刺激使胞外即使少量的 Ca^{2+} 进入胞内溶质或钙库释放稍有增加时,均可以导致胞质内 Ca^{2+} 浓度大幅度增加,继而引起一系列生理生化反应,而起到传递细胞外信号的作用^[6].由此可见,胞内游离钙浓度的变化是细胞生理功能的重要物质基础,胞内游离钙浓度的调节也就成为信息传递过程中的关键环节^[7,8].

细胞游离钙浓度的变化是 Ca^{2+} 跨膜转运的结果.胞外 Ca^{2+} 内流:钙在细胞内外的电化学梯度大于其他许多离子,胞外 Ca^{2+} 可通过被动扩散进入细胞内,但控制胞外 Ca^{2+} 内流最主要的途径还是通过细胞膜上的钙通道.钙通道的种类很多,但对其确切的分子结构大多还不清楚,目前认为有五大钙通道:(1)电压操纵的钙通道(voltage-operated calcium channels, VOCs):常见于应激细胞,其活动受膜电压变化的影响,存在于心肌、骨骼肌、神经元及内分泌等不同细胞中^[9].(2)受体操纵的钙通道(receptor-operated calcium channels, RCCs):见于神经元与其靶细胞之间的突触传递^[10].(3)第二信使操纵的钙通道(second messenger operated calcium channels, SMOCs):受控于细胞的第二信使,其电导很小^[11].(4)机械操纵的钙通道(mechanically operated calcium channels, MOCs):内皮细胞上有牵张刺激的钙通道,这一通道也

存在于平滑肌与骨骼肌中^[12]。(5)漏流钙通道(leak calcium channels, LCCs):也称为静息钙通道或背景钙通道,存在于平滑肌与心肌细胞膜中,在无电学或机械刺激时,参与静息钙电流,协助调节静息细胞内Ca²⁺浓度^[13]。

细胞内钙主要储存于内质网(endoplasmic reticulum, ER)/肌浆网(sarcoplasmic reticulum, SR)内。目前已知ER/SR有两类钙库,即IP₃敏感(IP₃-sensitive calcium pools, IsCaP)和IP₃不敏感钙库(IisCaP),分别通过上面的IP₃受体通道和ryanodine受体通道释放Ca²⁺^[14]。

本研究发现浓度大于0.3 μmol/L时黄连素可以降低胞内Ca²⁺浓度,结果如表所示。在正常培养环境中,胞内Ca²⁺浓度为145.5 ± 10.7 nmol/L, verapamil 50 μmol/L可以使胞内Ca²⁺浓度降至110.3 ± 8.7 nmol/L。而verapamil的作用位点为VOCs,这说明在HT-29细胞膜上存在VOCs,这一点与Jamie et al^[14]的研究结果相一致;由于RCCs仅见于神经元与其靶细胞之间的突触传递;SMOCs由于受控于细胞的第二信使;MOCs仅见于血管内皮细胞、平滑肌和骨骼肌;LCCs仅存于心肌和平滑肌细胞膜,参与静息钙电流。故在HT-29细胞中黄连素降低[Ca²⁺]_i胞外钙离子内流环节可能涉及到的通道为VOCs和SMOCs。而在细胞内钙离子动员方面, Bischof et al^[15]已经证实HT-29细胞胞内钙可以通过ER/SR钙库动员。故本实验推测黄连素降低细胞内钙离子浓度其机制可能是通过VOCs或SMOCs或抑制ER、SR胞内钙离子的释放进而降低胞内钙离子浓度;在观察的0.1-10.0 μmol/L浓度范围内,其抑制用的强度弱于50 μmol/L的细胞膜L-通道拮抗剂verapamil(30 μmol/L黄连素组 vs 50 μmol/L verapamil组, P>0.05, 无显著性差异),更不如33 μmol/L的胞内钙离子螯合剂bapta-AM(30 μmol/L黄连素组 vs 33 μmol/L bapta-AM组, P<0.05, 差异有显著性)。

4 参考文献

- 1 Cao JW, Luo HS, Yu BP, Huang XD, Sheng ZX, Yu JP. Effects of berberine on intracellular free calcium in smooth muscle cells of Guinea pig colon. *Digestion* 2001;64:179-183
- 2 Scott DA, de Souza W, Benchimol M, Zhong L, Lu HG, Moreno SN, Docampo R. Presence of a plant-like proton-pumping pyrophosphatase in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem* 1998;273:22151-22158
- 3 Li XK, Motwani M, Tong W, Bornmann W, Schwartz GK. Huanglian, A Chinese herbal extract inhibits cell growth by suppressing the expressing of cyclinB1 and inhibiting CDC2 kinase activity in human cancer cells. *Mol Pharmacol* 2000;58:1287-1293
- 4 Lin HL, Liu TY, Wu CW, Chi CW. Berberine modulates expression of mdr1 gene product and the responses of digestive track cancer cells to Paclitaxel. *Br J Cancer* 1999;81:416-422
- 5 Shen MR, Chou CY, Browning JA, Wilkins RJ, Ellory JC. Human cervical cancer cells use Ca²⁺ signalling, protein tyrosine phosphorylation and MAP kinase in regulatory volume decrease. *J Physiol* 2001;537(Pt 2):347-362
- 6 刘景生. 细胞信息与调控. 第1版. 北京:北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998:169-170
- 7 Gomez-Lagunas F, Melishchuk A, Armstrong CM. Block of Shaker potassium channels by external calcium ions. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:347-351
- 8 Kindzelskii AL, Petty HR. Intracellular calcium waves accompany neutrophil polarization, formylmethionylleucylphenylalanine stimulation, and phagocytosis: a high speed microscopy study. *J Immunol* 2003;170:64-72
- 9 Yoshida M, Ishikawa M, Izumi H, De Santis R, Morisawa M. Store-operated calcium channel regulates the chemotactic behavior of ascidian sperm. *Proc Natl Acad Sci USA* 2003;100:149-154
- 10 Mao L, Wang JQ. Group I metabotropic glutamate receptor-mediated calcium signalling and immediate early gene expression in cultured rat striatal neurons. *Eur J Neurosci* 2003;17:741-750
- 11 Mitra P, Slaughter MM. Calcium-induced transitions between the spontaneous miniature outward and the transient outward currents in retinal amacrine cells. *J Gen Physiol* 2002;119:373-388
- 12 Jorgensen NR, Teilmann SC, Henriksen Z, Civitelli R, Sorensen OH, Steinberg TH. Activation of L-type calcium channels is required for gap junction-mediated intercellular calcium signaling in osteoblastic cells. *J Biol Chem* 2003;278:4082-4086
- 13 Subramani S, Vijayanand C, Tharion E. Differential effects of organic calcium-channel blockers on diastolic SR calcium-handling in the frog heart. *Br J Pharmacol* 2002;137:756-760
- 14 Jamie H, Dyason K, Milne PJ, Grant G, Graz CJ. The influence of acetoacetate and butyrate on calcium influx and ATP concentrations in HT-29 cells. *Pharmazie* 2001;56:332-336
- 15 Bischof G, Brenman J, Bredt DS, Machen TE. Possible regulation of capacitative Ca²⁺ entry into colonic epithelial cells by NO and cGMP. *Cell Calcium* 1995;17:250-262