

钙调蛋白拮抗剂对人胃癌细胞效应机理的研究

——钙调蛋白与磷酸二酯酶活性测定分析*

赵雅丽 孟松娘 刘树人 林仲翔

(北京市肿瘤防治研究所细胞生物室, 100034)

提 要

我们曾经证明钙调蛋白 (Calmodulin, CaM) 拮抗剂三氟拉嗪 (Trifluoperazine, TFP) 有抑制人胃癌细胞增殖和诱导细胞形态向正常分化的效应。本文用 CaM 活性测定箱方法测定了 TFP 处理的人胃癌 MGC-803 细胞胞质内的 CaM 活性。同时也测定了磷酸二酯酶 (Phosphodiesterase, PDE) 活性的变化。结果表明 TFP 选择性抑制胞质内依赖 Ca^{2+} /CaM 的 PDE 活性。氨茶碱有抑制 CaM 活化 PDE 的作用。本文对 TFP 作用机理及在调控癌细胞增殖及分化中的意义进行讨论。

关键词 CaM、PDE 活性测定, TFP, 氨茶碱, 人胃癌细胞, 小鼠肝癌腹水细胞

前 言

钙调蛋白 (CaM) 广泛存在于真核细胞内, 是细胞内信使 Ca^{2+} 的重要受体, 传递 Ca^{2+} 对各种细胞功能的调节信息。 Ca^{2+} /CaM 参与细胞增殖的调控^[1]。前人报道肿瘤细胞的增殖与 DNA 合成不像正常细胞那样必需外源性 Ca^{2+} 刺激^[2]。这种现象可能与癌细胞内 CaM 含量增多有关。高含量的 CaM 可能在不需外源性 Ca^{2+} 的条件下持续激发启动 DNA 合成^[3]。肝癌细胞内 CaM 含量与细胞增殖速度正相关^[4]。CaM 拮抗剂有抑制某些癌细胞增殖的作用^[5-7]。CaM 拮抗剂与抗癌药物联合对抑制癌细胞增殖有加成作用^[8]。研究 CaM 拮抗剂对癌细胞增殖调节的作用机理无疑对了解癌细胞增殖失控的原因及癌症治疗可提供有意义的资料。

我们曾证明 CaM 拮抗剂 TFP 有抑制人胃癌细胞增殖和 DNA 合成, 促进细胞连接通讯功能和诱导细胞形态分化的作用^[8,9]。本文

用生化测定方法观察了人胃癌细胞和小鼠肝癌细胞在 TFP 处理前后细胞内 CaM 与 PDE 活性的变化, 与氨茶碱的作用相比较, 探讨 TFP 对癌细胞效应的作用机理。

材 料 和 方 法

1. 细胞 (1) 人胃腺癌 MGC-803 细胞系, 山东师大王凯华建立和提供。细胞生长在 1640 培养基中, 内含 15% 小牛血清及抗生素, 放 37℃ 恒温箱内。(2) 生长旺盛的小鼠肝癌腹水细胞 (H₂₂)。昆明种小鼠腹腔接种肝癌细胞后第七天抽取腹水获得癌细胞。

2. 化学试剂 TFP, 上海黄河制药厂赠。氨茶碱, 北京医科大学附属医院药房购。CaM 测定箱, 中国医学科学院基础所药理室生产。

3. 药物处理 取生长良好的 MGC-803 细胞或小鼠肝癌细胞, 制成细胞悬液, 分别种植

* 本研究属于国家自然科学基金资助项目。

等数细胞在培养瓶内,一天后随机分组,对照组只加完全培养基,实验组加含药物的完全培养基。

4. CaM 活性测定法

(1) 待测样品 CaM 提取 分别收集各组细胞制成细胞悬液分装入样品管 (2.5×10^6 /管),离心去上清,加 1 ml 匀浆液 (10 mmol/L Tris, 1mmol/L EDTA,1:1 混合)混匀,超声粉碎细胞,置 100℃ 水浴内煮沸 5 min,冷却后 4℃ 离心 15 000 r/min 40 min. 上清液调成 2 mmol/L CaCl_2 溶液待测。

(2) CaM 活性测定^[10] 试管内含样品 50 μl , 按顺序加入 145 μl 测定缓冲液, 20 μl 4.5 mmol/L CaCl_2 或 EGTA, 20 μl PDE, 50 μl H-cAMP(~ 10 万 cpm)后立即置 37℃ 水浴中开始反应,15 min 后取出,转入 100℃ 水浴中

煮沸 3 min 终止反应,于冰浴中冷却后加入 10% 蛇毒 15 μl ,再于 37℃ 水浴中温育 15min,加 2.5 mmol/L 腺苷 700 μl , QAE-Sephadex A-25 柱 (0.4×2 cm) 层析分离,上样后加 4 ml 20 mmol/L 甲酸铵洗脱。收集洗脱液,取 1 ml 加甲苯-Triton 闪烁液,闪烁计数。根据测定箱 CaM 标准活性曲线换算出 CaM 含量^[10]。

5. PDE 活性测定法 样品制备基本同(4),但在冰浴中超声粉碎细胞,不经煮沸。试管含 50 μl 样品液,按(4)顺序加液,但不加 PDE。反应及测定过程同(4),闪烁计数 cpm 值代表 PDE 相对活性。

结 果

1. TFP 对人胃癌 MGC-803 细胞内CaM 活性的影响 本实验取 TFP 抑制胃癌细胞增

表1 TFP 对人胃癌 MGC-803 细胞胞质内 CaM 活性的影响
Table 1 Intracellular CaM activity of TFP-treated MGC-803 cells

样品序号 Sample sequen- tial No	胃癌 MGC-803 细胞内 CaM 活性含量 (ng / 10 ⁶ 细胞) Intracellular CaM activity content (ng/ 10 ⁶ cells)		显著性测定 Significance (P value)
	未处理的对照 MGC-803 细胞 ¹⁾ Untreated MGC-803 cells ¹⁾	TFP(10 $\mu\text{mol/L}$) 处理的 MGC-803 细胞 ¹⁾ TFP-treated MGC-803 cells ¹⁾	
1	5.00	5.50	P>0.05
2	3.89	5.00	
3	5.75	5.38	
4	5.13	4.25	
5	5.00	4.38	
6	3.63	5.63	
7	4.20	2.25	
8	4.50	4.00	
9	3.50	4.38	
10	4.00	2.75	
平均值 Mean value	4.72 $\pm$ 0.74	4.62 $\pm$ 1.13	

1) 每日更换新鲜的或含 TFP(10 $\mu\text{mol/L}$) 的培养液,连续三天。
1) Fresh- or TFP-containing culture medium was changed daily for 3-day treatment.

殖的有效剂量和时间^[8],以 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 处理胃癌细胞三天后进行 CaM 测定。表 1 说明 TFP 处理的胃癌细胞与未经处理的对照组比较,细胞内 CaM 活性无明显改变。

2. 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP + 2mmol/L 氨茶碱对胃癌细胞内 CaM 含量的影响 表 2 表明 TFP 与氨茶碱联合处理时,胃癌细胞内 CaM

含量与对照组比,有明显降低。
3. 2 mmol/L 氨茶碱对胃癌细胞内 CaM 含量的影响 表 3 表明,单独使用氨茶碱处理胃癌细胞,也有降低胃癌细胞内 CaM 含量的作用。
4. 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 和 2mmol/L 氨茶碱分别体外处理小鼠肝癌腹水细胞,在不同的短

表2 TFP+ 氨茶碱对胃癌 MGC-803 细胞内 CaM 活性含量的影响

Table 2 Intracellular CaM activity of MGC-803 cells exposed to TFP plus aminophylline

钙调蛋白含量 CaM activity content (ng/ 10 ⁶ cells) 样品号 Sample sequ- ential No.	实验分组 Groups	未处理的对照 MGC-803 细胞 Untreated control MGC-803 cells ¹⁾	10 μ mol/L TFP + 2mmol/L 氨茶 碱处理的 MGC-803 细胞 TFP plus aminophylline treated MGC-803 cells ¹⁾	显著性 测定 Significance (P value)
1		5.57	2.09	
2		5.53	2.58	
3		5.80	5.46	
4		5.70	2.07	
5		7.88	3.44	
6		6.13	1.64	
7		5.88	3.10	
CaM 活性含量均值 CaM activity content (ng/10 ⁶ cells) (Mean Value)		6.07 $\pm$ 0.82	2.91 $\pm$ 1.20	P<0.005

1) 每天换新鲜的或含有药物的培养基,连续三天。

1) Fresh- or drug-containing medium was changed daily for 3-day treatment.

表3 氨茶碱对 MGC-803 胃癌细胞内 CaM 活性含量的影响

Table 3 Intracellular CaM activity of MGC-803 cells exposed to aminophylline

分 组 Groups	样品数量 Samples examined	CaM 活性含量均值 Mean value of CaM activity content (ng/10 ⁶ cells)	显著性测定 Significance (P value)
未处理的 MGC-803 细胞 ¹⁾ Untreated MGC-803 cells	7	6.07 $\pm$ 0.82	P<0.05 差异显著
2mmol/L 氨茶碱 处理的 MGC-803 细 胞 ¹⁾ Aminophylline treated MGC- 803 cells	4	3.19 $\pm$ 0.88	Significant

1) 各组每天更换新鲜的或含 2 mmol/L 氨茶碱的培养液,连续 3 天。

1) Fresh-or aminophylline-containing culture medium was changed daily for 3-day treatment.

时间内对细胞内 CaM 含量的影响 表 4 同样可见 TFP 不能改变肝癌细胞内 CaM 的含量,然而氨茶碱有降低肝癌细胞内 CaM 含量的作用。

5. 10 μ mol/L TFP 对胃癌细胞内 PDE 活性的影响 表 5 显示 TFP 可以明显地降低胃癌细胞内 PDE 活性。

讨 论

已知钙调蛋白 (CaM) 与 Ca²⁺ 结合后发

生分子构型改变,暴露的疏水区可能是与靶酶结合的位点。TFP 与 CaM 的亲性和结合很可能在 CaM 分子的疏水区从而竞争性抑制 CaM 对靶酶的结合和活化^[1]。Levin 与 Weiss^[12] 的资料证明 TFP 对 CaM 亲性和结合无种属差异性。TFP 与 CaM 结合量的增多及其对 CaM 活化 PDE 的抑制作用表现平行相关性。本工作的 CaM 活性测定表明 TFP 不能抑制胃癌细胞内 CaM 活性(表 1),但有抑制 PDE 活性

表 4 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 或 2 mmol/L 氨茶碱短时间处理对小鼠肝癌腹水细胞 CaM 影响
Table 4 Intracellular CaM activity of mouse ascitic hepatoma cells exposed to either TFP or aminophylline

CaM 活性 CaM activity content (ng/10 ⁶ cells)	药物处理时间 Time of drug Treatment	1 min	5 min	15 min	30 min	1 h	3 h	5 h
		分组 cell groups						
未处理肝癌细胞对照 Untreated hepatoma cells		1.10	1.01	1.55	1.27	1.45	1.15	1.01
10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 处理组 TFP-treated hepatoma cells ¹⁾		1.11	1.22	1.09	1.10	1.68	1.19	1.02
2 mmol/L 氨茶碱处理组 Aminophylline-treated hepatoma cells ¹⁾		0.34	0.50	0.47	0.92	0.55	0.62	0.48

1) 每个样品细胞数为 7.56×10^6 , 每组样品检测复管的平均值。

1) 7.56×10^6 cells/sample, duplicated tubes were examined for each sample.

表 5 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 对胃癌 MGC-803 细胞内 PDE 活性的影响
Table 5 Intracellular PDE activities (cpm) of MGC-803 cells exposed to 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP for 3 days

样品号 Sample sequential No.	PDE 活性 (cpm) PDE activities (cpm)		P Value
	未处理对照 MGC-803 细胞 ¹⁾ Untreated MGC-803 cells	10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 处理的 MGC-803 细胞 ¹⁾ TFP-treated MGC-803 cells ¹⁾	
1	26272.86	17951.50	
2	18612.22	6484.00	
3	24607.14	20498.00	
4	28863.33	23924.00	
5	28533.33	18441.50	
6	22930.00	8108.00	
7	21800.00	20618.29	
平均值 Mean Value	24516.98	16575.04	$P < 0.02$

1) 两组每天换新鲜培养液或含 10 $\mu\text{mol/L}$ TFP 的培养液, 连续处理三天。

1) Fresh- or drug-containing culture medium was changed daily for 3-day treatment.

的作用(表 5)。同一测试法证明氨茶碱单独或与 TFP 联合, 都可以降低胃癌细胞内 CaM 活性(表 2、3), 这表明本测定方法对检测细胞内 CaM 活性是敏感的。此外, 我们用小鼠肝癌腹水细胞也得到相同的结果(表 4)。TFP 不改变肝癌细胞内的 CaM 活性。我们以前曾证明 TFP 处理使两种癌细胞内的 cAMP 水平有瞬时升高的现象。看来 TFP 对癌细胞内依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的 PDE 活性的抑制可能是作用的重要环节。究竟 CaM 拮抗剂 TFP 如何抑制

癌细胞内依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的 PDE 活性, 有可能是直接阻断 PDE 酶蛋白被 CaM 识别的位点, 或许经过更复杂的途径。

依赖 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的环腺苷磷酸二酯酶活性变化, 乃是调节细胞内 cAMP 和 Ca^{2+} 介导的两套信号系统之间相互作用的关键性反应之一^[13]。 Ca^{2+} 与 CaM 协同地调控 PDE 活性。高浓度的 CaM 能提高 PDE 对 Ca^{2+} 的敏感性而使 PDE 活性升高^[13]。前人已证明, 一些癌细胞或转化细胞内的 CaM 高于正常细

胞^[4,14,15],我们也测定出人胃癌 MGC-803 细胞内 CaM 活性比正常胎儿胃粘膜上皮细胞高约一倍以上(待发表资料),与他人的观察一致.癌细胞高于正常细胞的 CaM 含量可以使细胞内 PDE 持续保持高的活性,从而激发一系列刺激细胞增殖的反应.这可能是癌细胞增殖失控的原因之一.我们以前还曾观察到抑制胃癌细胞增殖的药物如丁酸钠^[16].同时明显抑制胃癌 MGC-803 细胞膜上的 PDE 活性.这一现象间接支持本工作的分析.

前人曾报道,TFP 有抑制细胞膜 Ca^{2+} -ATP 酶、 Mg^{2+} -和 Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的作用^[17,18],并有促进细胞膜的磷脂-丝氨酸碱基置换及抑制细胞膜对多胺的摄取的作用. Na^+ , K^+ -ATP 酶活性的抑制与人胃癌细胞增殖的抑制相关^[19]. 细胞膜磷脂-丝氨酸参与调节细胞形态和膜受体活性^[20].膜对多胺的摄取与细胞分裂活跃正相关^[21].这些资料提示 TFP 可能作用于细胞的多个方面. TFP 对人胃癌细胞增殖抑制和形态分化的调节可能是一个包括抑制 Ca^{2+} /CaM-PDE 活性和其它多种途径的复杂过程.

参 考 文 献

- 1 MacManus J P, Boynton A L *et al. Adv Cyclic Nucleotide Res*, 1978; 9: 485

- 2 Whitfield J F, Boynton A L *et al. Mol Cell Biochem*, 1979; 27: 155
- 3 Whitfield J F, Boynton A L *et al. Ann N Y Acad Sci*, 1980; 339: 216
- 4 Wei J W, Morris H P *et al. Cancer Res*, 1982; 42: 2571
- 5 Kikuchi Y, Iwano I *et al. Biochem Biophys Res Comm*, 1984; 123: 385
- 6 Gulino A, Barrera G, *et al. Cancer Res*, 1986; 46: 6274
- 7 Matsui T, Nakao Y *et al. Cancer Res*, 1985; 45: 311
- 8 赵雅丽等. 实验生物学报, 1988; 21: 481
- 9 林仲翔, 赵雅丽等. 实验生物学报, 1989; 22: 157
- 10 刘景生, 刘晔, 金荫昌. 中国医学科学院学报, 1985; 7: 453
- 11 Cheung W Y. *Sci*, 1980; 207: 19
- 12 Levin R, Weiss B. *Biochim Biophys Acta*, 1978; 540: 197
- 13 Sharma R K, Wang J H. *Biochem Cell Biol*, 1986; 64: 1072
- 14 Watlerson D M, VenEldick L J *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1976; 73: 2711
- 15 Chafouleas J C, Pardue R L *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1981; 78: 996
- 16 王端顺, 林仲翔, 严宇新等. 实验生物学报, 1985; 18: 189
- 17 Lichtman A M, Segel G B *et al. J Cell Physiol*, 1982; 111: 213
- 18 Levin R M, Weiss B. *Neuropharmacol*, 1980; 19: 169
- 19 吕桂芝等. 实验生物学报, 1989; 22: 169
- 20 Fujiwara M, Morikawa S *et al. J Biochem*, 1986; 99: 615
- 21 Warren D, Heston W *et al. Biochem Pharmacol*, 1988; 37: 2511

[本文于1990年2月20日收到, 4月20日修回]

STUDIES ON THE MECHANISMS OF THE ACTION OF CALMODULIN ANTAGONIST—TRIFLUOPERAZINE ON CULTURED HUMAN STOMACH CARCINOMA CELLS: QUANTITATIVE ANALYSIS OF CALMODULIN AND PHOSPHODIESTERASE ACTIVITIES*

Zhao Yali Meng Songniang Liu Shuren Lin Zhongxiang
(Department of Cell Biology, Beijing Institute for Cancer Research, 100034)

ABSTRACT

Motivated by our earlier demonstration that calmodulin (CaM) antagonist-trifluoperazine (TFP) effectively inhibits cell proliferation and DNA synthesis in human stomach car-

(Continued on page 128)

- 10 Gomperts BD 著, 梁康译. 质膜——作结构和功能研究的模型膜. 北京: 科学出版社, 1981. 62
- 11 孙润广, 姚松年, 曹连欣. 生物化学与生物物理学报, [本文于 1990 年 1 月 18 日收到, 10 月 5 日修回]

SAXS STUDY OF THE INFLUENCE OF WATER, METHANOL AND ETHANOL ON THE LIQUID-CRYSTAL STRUCTURE OF CEPHALIN

Sun Runguang Xu Fengxun Zhang Jing Tian Suikang
(Experimental Centre of Shanxi Normal University, Xi'an 710062, China)

ABSTRACT

This treatise introduces the results of the author's research in using the method of SAXS (the small angle X-ray scattering) on the structure of the liquid-crystal system made from micro-hydro cephalin with water, methanol and ethanol respectively. Experiments reveal to us the following phenomena: in the cephalin-water system when the content of water increases, the repeat distance of bilayers in the liquid-crystal system of cephalin and water widens and in the cephalin-methanol and cephalin-ethanol system, when the content of alcohol increases the repeat distance narrows; according to the multiplies of hydro-carbon chain in alcohol, the repeat distance varies from wider to narrower, then vanishes gradually and at last the liquid-crystal phase changes into liquid phase. Therefore it is quite clear that water and alcohol exert different influence on the repeat distance of liquid-crystal phase of cephalin.

Key words cephalin, liquid-crystal system, small angle X-ray scattering(SAXS)

(Continued from page 122)

cinoma MGC-803 cells with simultaneous induction of normalized cell morphology, this work was designed to investigate the mechanisms of TFP effect on MGC-803 cells. By using biochemical assays, CaM and phosphodiesterase(PDE) activities in TFP treated MGC-803 cells were quantitatively analyzed with comparison to untreated control cells. TFP treated mouse ascitic hepatoma cells were analyzed as parallel. Results indicate that TFP selectively inhibits Ca^{2+} /CaM-dependent PDE activity rather than the PDE-binding activity of CaM in drug-treated cells of both types. However, both MGC-803 and mouse hepatoma cells exposed to aminophylline (2mmol/L) for 3 days or shorter time showed decrease in PDE-binding activity of CaM. The possible mechanisms concerning TFP effects and their role in regulating cell proliferation of MGC-803 cells were discussed.

Key words CaM, PDE bioassay, TFP, Aminophylline, human stomach carcinoma cells, mouse ascitic hepatoma cells