

钙通道阻滞剂对体外培养的脑膜瘤细胞信号转导及增殖的影响

王和平, 杨海, 陈坚, 雷霆

Effects of Calcium Channel Antagonist on Signal Transduction and Proliferation of in Vitro Meningioma Cell

WANG He-ping, YANG Hai, CHEN Jian, LEI Ting

Department of Neurosurgery, Tongji Hospital, Tongji Medical College of HuaZhong University of Science & Technology, Wuhan 430030, China

Abstract: **Objective** This study aimed to assess the effects of verapamil on signal transduction and proliferation of in vitro meningioma and inquired into the possible mechanisms. **Methods** Spectrofluorometer was used to measure the cytoplasmic free calcium; cell count was used to determine the proliferation of meningioma. **Results** Verapamil in concentration of $1\mu\text{mol/L}$ can block the proliferation of in vitro meningioma cell induced by FCS, the rate of cell number (vs. control group) is 80%, FCS induced a quick rise of intracellular free calcium ($P < 0.01$); $[\text{Ca}^{2+}]_i$ was increased to $435.3 \pm 34.9\mu\text{mol/L}$, preincubation with verapamil could inhibit the rise of $[\text{Ca}^{2+}]_i$, the $[\text{Ca}^{2+}]_i$ is 221.1 ± 26.1 ($P < 0.01$). **Conclusion** These data indicate that verapamil can stop the influx of Ca^{2+} and hence inhibit the FCS induced proliferation signal transduction.

Key words: Meningioma; Intracellular free calcium; Calcium channel antagonist; Cell proliferation

摘要: **目的** 观察维拉帕米对体外培养的脑膜瘤细胞信号转导及增殖的影响并探讨其作用机制。 **方法** 采用荧光光度计检测脑膜瘤细胞内游离钙离子浓度 ($[\text{Ca}^{2+}]_i$) 水平, 结合细胞计数方法测定细胞的增殖情况。 **结果** $1\mu\text{mol/L}$ 维拉帕米能明显抑制血清诱导的脑膜瘤细胞的增殖 ($P < 0.01$); 细胞数为对照组的 80%。10% 的血清作用于脑膜瘤细胞以后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 迅速升高到 $(435.3 \pm 34.9)\mu\text{mol/L}$ ($P < 0.01$)。用维拉帕米预处理后, $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 为 221.1 ± 26.1 , 升高幅度明显降低, ($P < 0.01$)。 **结论** 维拉帕米能抑制血清诱导的体外培养的脑膜瘤细胞增殖信号的转导, 其作用机制与降低了 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 增加有关。

关键词: 脑膜瘤; 细胞内游离钙离子; 钙通道阻滞剂; 细胞增殖

中图分类号: R739.45 文献标识码: A 文章编号: 1000-8578(2005)05-0263-02

0 引言

血清中丰富的生长因子作用于细胞膜上相应的受体, 引起 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 浓度水平的改变, 但这种早期 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 水平改变与细胞增殖的关系尚未完全肯定。本实验观察维拉帕米对细胞增殖的影响, 并初步探讨其作用机制。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 维拉帕米(美国 Sigma 公司)、Fura-2/AM(美国 Calbiochem 公司分装)、超净工作台(苏州净化设备厂)、 CO_2 培养箱(德国 Heraeus 公司)、倒置显微镜(日本 Olympus 公司)、荧光光度计(日本 Hitachi 公司)。

1.2 细胞培养 新鲜脑膜瘤组织块, 放入 PBS 缓

冲液中, 洗净后剪碎, 室温下用胰蛋白酶及胶原酶联合消化, 充分消化后过滤、离心, 收集细胞种植于 100mL 的培养瓶中, 第 3~5 代细胞用于本次实验。

1.3 培养细胞的特征及鉴定 定期观察培养细胞的生长特点。用多聚赖氨酸处理后盖玻片置入培养皿中, 接种细胞, 待细胞次全融合后用 4% 多聚甲醛固定, 然后用 SP 法行 EMA 及 Vimentin 抗原染色。

1.4 细胞生长试验 取 10^5 个细胞置于含培养基的 25mL 培养瓶中。对照组不加维拉帕米, 实验组按加入维拉帕米浓度不同分为 5 组, 组 $1\mu\text{mol/L}$, 组 $5\mu\text{mol/L}$, 组 $10\mu\text{mol/L}$, 组 $50\mu\text{mol/L}$, 组 $100\mu\text{mol/L}$ 。7 天后收集各组细胞, 苔盼蓝染色以后细胞计数, 每组重复 3 次。

1.5 细胞内游离钙离子浓度的检测 $[\text{Ca}^{2+}]_i$ 采用荧光标记法来测量。取 $2 \sim 3 \times 10^6$ 个对数生长期的细胞, 悬浮于测钙液中, 加入 Fura-2/AM 孵育、离心、悬浮后上机测量荧光值。对照组加入血清后测

收稿日期: 2004-04-12; 修回日期: 2004-09-16

作者单位: 430030 武汉, 华中科技大学同济医学院附属同济医院神经外科

量荧光值。实验组细胞用 100μmol/L 维拉帕米预处理 5min 以后加入血清。测得的荧光值代入公式来计算钙离子的浓度。

$$[Ca^{2+}]_i(nmol/L) = K_d [(R-R_{min}/R_{max}-R) ()]$$

1.6 统计学分析 数据以均数 ±标准差表示,生长实验结果行配对 *t* 检验,[Ca²⁺]_i结果行 *t* 检验,确定 *P*<0.05有显著性意义。

2 结果

2.1 培养细胞的特征及鉴定 早期的脑膜瘤细胞呈贴壁生长,双极,有丰富的胞浆,核相当大并呈圆形,核仁明显。细胞次全融合以后,细胞呈多边形,均匀肥大,连结成片(见图 1),且表现为延长的增生抑制。5 例标本中,检测均表达 EMA 及 Vimentin 抗原(见图 2)。

2.2 细胞生长试验结果 浓度为 1μmol/L 维拉帕米明显抑制脑膜瘤的增殖,细胞数约为对照组的 80 % (*P*<0.01)。抑制效应呈剂量依赖性,在 100μmol/L 浓度处达到最大抑制效应,约为对照组细胞数的 10 % (*P*<0.01)。结果见表 1。

2.3 血清及维拉帕米对细胞内游离钙离子浓度的影响 培养的脑膜瘤细胞在加入 10 % FCS 以后,[Ca²⁺]_i值由静息状态的(123.2 ±12.1)μmol/L 上升至(435.3 ±34.9)μmol/L,与静息水平相比有显著性差异 (*P*<0.01),用维拉帕米预处理后,[Ca²⁺]_i比静息状态升高,为(221.1 ±26.1)μmol/L (*P*<0.01),但升高幅度较实验组明显降低 (*P*<0.01)。

表 1 维拉帕米对脑膜瘤细胞数的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	<i>n</i>	细胞数目 (×10 ⁵)
对照组	3	10.40 ±0.90
	3	8.30 ±0.73
	3	6.50 ±0.61
	3	2.07 ±0.17
	3	2.08 ±0.15
	3	1.25 ±0.11

与对照组相比, *P*<0.01

3 讨论

脑膜瘤起源于神经囊组织,EMA 及 Vimentin 抗原阳性表达高度提示为脑膜瘤细胞,结合本次培养中观察到的细胞生长特点及免疫组化结果证实为脑膜瘤细胞。生长试验结果显示 1μmol/L 维拉帕米就能观察到生长抑制效应。各组细胞用苔盼蓝染色发现细胞存活率仍可达 90 %,显示其对培养细胞没有毒性作用。据此推测钙通道阻滞剂抑制增殖的效应,仅仅是减少细胞的增生,而不是通过毒性效应

来杀伤细胞。临床上血浆维拉帕米浓度范围约为 0.5 ~ 8μmol/L,脑脊液中的药物浓度比血浆中低 10 倍,一般 10 ~ 20μmol/L 被认为是有毒性作用^[1,2]。脑膜瘤一般有丰富的血供,因此认为在脑脊液中 1 ~ 5μmol/L 浓度的维拉帕米是可以达到的。

一般认为有两种相互关联的钙内流调控机制。一种是依赖于细胞内的钙的储存容量(钙库),另一种是直接依赖于胞膜表面受体的活动。大量的证据表明胞外的钙内流起决定性的作用,这种钙内流指的是在细胞内的钙储存耗尽以后细胞膜表面的钙通道的开放,提供了从细胞内钙储存释放后延长的胞浆内钙浓度的增加^[3,4]。血清中丰富的生长因子与受体结合以后可以激活 G 蛋白介导的磷脂酶 C 系统(PKC),PKC 系统产生的 IP₃ 激活内质网上 Ca 通道,引发短暂的胞内钙库释放 Ca²⁺,随后是释放的钙诱发长程的胞外钙内流,[Ca²⁺]_i升高^[5],介导细胞增殖。是否改变细胞内的钙稳态可能是一种有效的抑制细胞增殖的手段呢? [Ca²⁺]_i的测量证实这种推测。加入 FCS 以后,细胞内的[Ca²⁺]_i明显增加。若预先给予维拉帕米处理后,[Ca²⁺]_i虽然同样增加,但细胞内钙上升幅度水平明显下降。据此认为脑膜瘤细胞增殖信号转导过程中,细胞内钙起到第二信使的作用,因为钙通道阻滞剂是通过改变细胞内钙浓度,来抑制增殖信号转导。维拉帕米抑制增殖的机制可能与破坏了细胞内的钙稳态,改变了细胞对各种受体介导信号的反应的能力有关^[6]。其他可能的机制包括抑制了蛋白激酶 C 系统、RTK-ras-raf-1-ERK2 系统、阻断血浆诱导的鸟苷酸脱羧酶的激活等有关。

(本文图见 324 页)

参考文献:

[1] Goodman GE, Yen YP, Cox TC, et al. Effect of verapamil on the in vitro cytotoxicity of adriamycin and vinblastine in the human tumor cell [J]. Cancer Res, 1987, 47(9): 2295-2304.

[2] Hofer CA, Smith JK, Tenholder MF. Verapamil intoxication: a literature review of overdoses and discussion of therapeutic options [J]. Amer J Med, 1993, 95(4): 431-438.

[3] Putney JW. Inositol phosphates and calcium entry [J]. Adv second messenger Phosphoprotein Res, 1992, 26(): 143-160.

[4] Gill DL, Waldron RT, Rys-Sikora KE, et al. Calcium pool, calcium entry, and cell growth [J]. Biosci Rep, 1996, 16(2): 139-157.

[5] 郇金荣. 分子生物学 [M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1999. 285-294.

[6] Zernig G. Widening potential for Ca²⁺ antagonists: Non-L-type Ca²⁺ channel interaction [J]. Trends Pharmacol Sci, 1990, 11(1): 38-44.

[编辑: 安 凤; 校对: 刘红武]

钙通道阻滞剂对体外培养的脑膜瘤细胞信号转导及增殖的影响

(正文见 263 页)



图 1 培养早期的脑膜瘤细胞 ($\times 400$)

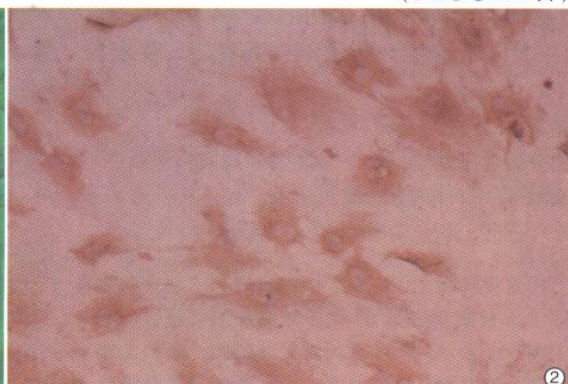


图 2 脑膜瘤细胞 Vimentin 抗原阳性表达 (SP $\times 400$)

三氧化二砷对人卵巢癌细胞株 SKOV3 细胞增殖抑制的影响

(正文见 287 页)

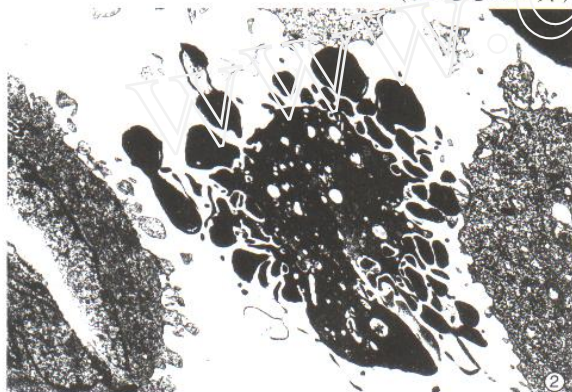


图 2 As_2O_3 对 SKOV3 细胞超微结构的影响 (SP $\times 400$)

肿瘤靶向性载体介导的 IL-12 基因增强裸鼠抗骨肉瘤免疫

(正文见 305 页)



图 3 免疫组化法检测 mL-12 基因修饰的 MG63 细胞中基因的表达, 在 $400 \times$ 普通光镜视野下可见 mL-12 阳性细胞

纯系 LEW 大鼠及裸小鼠膀胱灌注给药方式的探讨

(正文见 296 页)

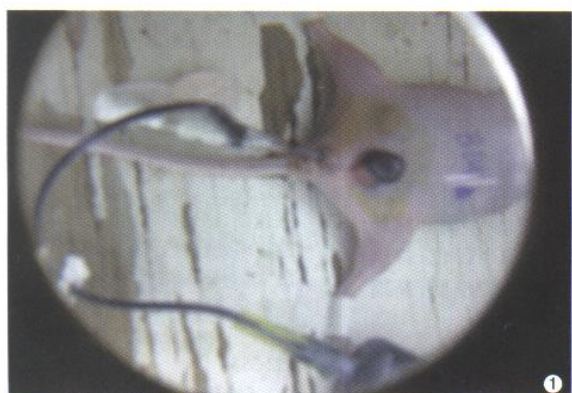


图 1 裸小鼠膀胱灌注示意图



图 2 套管针置入裸小鼠膀胱内图 ($\times 13$)