

尼莫地平对人结肠癌细胞系增殖的影响

杨 智, 牛海艳, 蓝永洪, 符碧薇(海南医学院形态学实验室, 海口 571199)

【摘要】 目的 探讨分析尼莫地平对人结肠癌细胞系(HCT)增殖的影响。**方法** 采用不同剂量的尼莫地平作用于 HCT 细胞,通过细胞的生长动力学检测、细胞凋亡的流式细胞仪测定、瑞士-吉姆萨染色观察细胞形态。**结果** 0.1~20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的尼莫地平加入 HCT 细胞培养基和对照组比较,12、24 h 后吸光度值均有明显差异,说明不同浓度尼莫地平对 HCT 细胞的增殖均有一定抑制作用,而在 48 h 后,20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的尼莫地平作用于 HCT 细胞,抑制率可达 35.67%。尼莫地平的浓度增高, $G_0 \sim G_1$ 期的 HCT 细胞百分率逐渐升高,当尼莫地平浓度为 10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$, $G_0 \sim G_1$ 期的百分率明显高于对照组的百分率,而 S 期的百分率则明显低于对照组的百分率,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 在一定剂量范围内,随着尼莫地平浓度的升高可以有效抑制 HCT 的增殖,为肿瘤的治疗提供新的方法。

【关键词】 尼莫地平; 人结肠癌细胞; HCT 细胞

DOI:10.3969/j.issn.1672-9455.2014.09.024 文献标志码:A 文章编号:1672-9455(2014)09-1206-02

Influence of nimodipine on the proliferation of human colon cancer cell line YANG Zhi, NIU Hai-yan, LAN Yong-hong, FU Bi-wei (Laboratory of Morphology, Hainan Medical College, Haikou, Hainan 571199, China)

【Abstract】 Objective To investigate the influence of nimodipine on the proliferation of human colon cancer cell line(HCT cells). **Methods** HCT cells were treated with different dosage of nimodipine. Then, cell growth kinetics, apoptotic cells and cell morphology characteristics were analyzed. **Results** Compared with control group, absorbance values of HCT cells, treated by nimodipine with concentration of 0.1—20.0 $\mu\text{mol/L}$ for 12 and 24 h, were different. 48 h after treatment of nimodipine with concentration of 20.0 $\mu\text{mol/L}$, the inhibitory rate could reached 35.67%. Proportion of cells at $G_0 - G_1$ stage increased with the elevation of the concentration of nimodipine. When the dosages of nimodipine were 10.0 and 20.0 $\mu\text{mol/L}$, the proportion of cells at $G_0 - G_1$ stage were significantly higher than control group, and that of cells at S stage was significantly lower($P < 0.05$). **Conclusion** In a certain range of dosage, elevated concentration of nimodipine could effectively inhibit the proliferation of HCT cells, which might be a new approach for the treatment of cancer.

【Key words】 nimodipine; human colon cancer cell; HCT cells

生物体内的第二信使有环磷酸腺苷(cAMP)、环磷酸鸟苷(cGMP)、1,2-二酰甘油(DAG)、1,4,5-三磷酸肌醇(IP₃)、Ca²⁺,游离的钙离子在细胞凋亡的过程中同样扮演着重要的角色^[1]。据文献[2]报道,处于凋亡早期的细胞常伴随着胞质内游离钙离子浓度的升高。尼莫地平作为临床上常用的钙离子通道阻滞剂(CCB),可以通过调节细胞膜对钙离子的通透性从而调节细胞内游离钙的浓度,目前较多用于心血管疾病的治疗^[3],本研究旨在观察不同浓度的尼莫地平对人结肠癌细胞系(HCT)内钙离子浓度的影响,为肿瘤的治疗提供新的方法。

1 材料与方法

1.1 细胞培养的材料 HCT 细胞购于上海中科院细胞所,将 HCT 细胞在含 10% 胎牛血清及青霉素、链霉素各 1×10^5 U/L 的 RPMI-1640 培养基中贴壁生产,并在 37℃ 的温度下,5% CO₂、95% O₂ 培养箱中传代培养,取 3~6 代细胞用于实验。

1.2 实验药试剂及分组 尼莫地平注射液、四氮唑(MTT)、胰蛋白酶、磷酸盐缓冲液(PBS)、甲基亚砷(DMSO)等试剂。根据培养基中的试剂不同,将培养的细胞随机分为 5 组,即采用培养基培养的为对照组,以及加入不同浓度(0.1、1.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$)的尼莫地平组。

1.3 实验方法

1.3.1 细胞的生长动力学检测 取对数生长长期的人结肠癌 HCT 细胞,用 2.5 g/L 胰酶消化,使用含 5% 胎牛血清的 RP-

MI-1640 培养液调整细胞数量至 1×10^5 /mL 接种于 96 孔培养板,每孔 5×10^5 个细胞,每组取 18 个孔,在 37℃、5% CO₂、95% O₂ 以及饱和适度的条件下培养。当细胞达到亚融合状态时,每孔加入 200 μL 无血清培养基,12 h 后弃培养基,随后加入 0.1、1.0、10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 尼莫地平及培养基,各孔体积均为 200 μL 。2 d 后再次弃培养基,每孔中加 MTT 溶液(5 mg/mL)20 μL 。培养 3 h 后,再往每孔中加入 150 μL DMSO,振荡 10 min,用酶联免疫检测仪测定每孔吸光度值(测量波长 570 nm,参考波长 490 nm)。根据公式抑制率 $\text{IR}(\%) = (1 - B/A) \times 100\%$,计算细胞的生长抑制率(A、B 分别为对照组和不同剂量组的光密度者)。

1.3.2 细胞凋亡的流式细胞仪测定 将对照组以及不同浓度尼莫地平培养的 HCT 细胞用 PBS 液洗细胞两次,将细胞浓度调整为 1×10^6 /mL。从中取 1 mL HCT 细胞并加入 10 g/L 核糖核酸酶 A(RNase A) 10 μL ,于 37℃ 环境下孵育 30 min,随后在冰浴环境中加入 70% 冷乙醇(-20℃)固定,置于 4℃ 冰箱 12 h,冰浴过后加入荧光探针碘化丙啶(PI)至终浓度为 50 mg/L,用流式细胞仪对细胞凋亡和细胞周期进行分析。

1.3.3 瑞士-吉姆萨染色观察细胞形态 采用瑞士-吉姆萨染色,在显微镜下观察各组细胞形态变化情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS16.0 软件进行统计学处理,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用 t 检验,计量资料以率表示,比

较采用 χ^2 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 尼莫地平对 HCT 细胞增殖的影响 不同浓度的尼莫地平加入 HCT 细胞培养基和对照组比较,12、24 h 后吸光度值差异有统计学意义($P<0.05$),说明不同浓度尼莫地平对 HCT 细胞的增殖均有一定抑制作用,而在 48 h 后,20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的尼莫地平作用于 HCT 细胞,抑制率可达 35.67%。见表 1。

表 1 尼莫地平对人结肠癌细胞系 HCT 增殖的影响($\bar{x}\pm s$)				
组别	n	吸光度值(OD)		
		12 h	24 h	48 h
对照组	18	0.745 $\pm$ 0.011	0.826 $\pm$ 0.036	1.102 $\pm$ 0.108
尼莫地平组				
0.1 $\mu\text{mol/L}$	18	0.687 $\pm$ 0.008*	0.704 $\pm$ 0.037*	1.015 $\pm$ 0.144
1.0 $\mu\text{mol/L}$	18	0.673 $\pm$ 0.013*	0.697 $\pm$ 0.034*	1.118 $\pm$ 0.178
10.0 $\mu\text{mol/L}$	18	0.677 $\pm$ 0.016*	0.679 $\pm$ 0.049*	1.072 $\pm$ 0.057
20.0 $\mu\text{mol/L}$	18	0.687 $\pm$ 0.043*	0.673 $\pm$ 0.045*	0.892 $\pm$ 0.020*

注:与对照组比较,* $P<0.05$ 。

2.2 尼莫地平对 HCT 细胞周期的影响 随着尼莫地平浓度的增高, G_0 ~ G_1 期的 HCT 细胞百分率逐渐升高,同时 S 期的 HCT 细胞百分率则逐渐降低,当尼莫地平浓度为 10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$, G_0 ~ G_1 期的百分率明显高于对照组的百分率,而 S 期的百分率则明显低于对照组的百分率,差异具有统计学意义($P<0.05$),说明尼莫地平可以使 HCT 细胞停滞于 G_0 ~ G_1 期,且随着浓度增加停滞的效果越明显。见表 2。

表 2 尼莫地平对人结肠癌系 HCT 细胞周期的影响(%)			
组别	各细胞周期的细胞百分率		
	$G_0\sim G_1$	S	$G_2\sim M$
对照组	52.13	38.64	9.23
尼莫地平组			
0.1 $\mu\text{mol/L}$	56.27	33.12	10.61
1.0 $\mu\text{mol/L}$	57.87	32.81	9.32
10.0 $\mu\text{mol/L}$	72.96	20.96	6.08
20.0 $\mu\text{mol/L}$	71.18	20.28	8.54

2.3 显微镜下细胞凋亡形态 通过瑞士-吉姆萨染色细胞,在显微镜下观察到 HCT 细胞随着时间的推移,细胞膜刨化,染色质凝集、折光性增高,并且 20.0 $\mu\text{mol/L}$ 尼莫地平作用下的 HCT 细胞凋亡形态比对照组的细胞凋亡形态更明显。

3 讨 论

CCB 是临床中较常见的应用于心血管疾病治疗的药物^[4],该种药物在调节细胞内游离钙离子浓度时,是否会对肿瘤细胞的增殖产生促进或抑制作用,为肿瘤疾病的预防及治疗提供新思路,本院采用常见的 CCB 药物——尼莫地平对 HCT 进行作用,分析其细胞增殖情况。

从本研究可以看出不同浓度的尼莫地平对 HCT 细胞的增殖均有一定抑制作用,而在 48 h 后,20.0 $\mu\text{mol/L}$ 的尼莫地平作用于 HCT 细胞,抑制率可达 35.67%,这与文献[5-6]报道结果相符合,并且从吸光度的变化上可以看出,随着尼莫地平浓度的升高,其吸光度越低即细胞增殖的抑制情况越显著,而从流式细胞仪检测中可以看出,随着尼莫地平浓度的浓度增

高, G_0 ~ G_1 期的 HCT 细胞百分率逐渐升高,同时 S 期的 HCT 细胞百分率则逐渐降低,当尼莫地平浓度为 10.0、20.0 $\mu\text{mol/L}$ 时, G_0 ~ G_1 期的百分率明显高于对照组的百分率,而 S 期的百分率则明显低于对照组的百分率,差异有统计学意义($P<0.05$),说明尼莫地平可以使 HCT 细胞停滞于 G_0 ~ G_1 期,且随着浓度增加停滞的效果越明显,与文献[7]报道相符合。从本研究结果可以看出尼莫地平主要是抑制 HCT 细胞的增殖从而加速了其凋亡的过程,并非在细胞凋亡早期加速细胞凋亡的过程。据文献[8-9]报道,在一定浓度的尼莫地平作用下,HCT 细胞内游离钙离子浓度升高,说明尼莫地平也可以在 HCT 细胞凋亡期产生作用,同时也符合胞质内钙离子浓度升高可以激活细胞凋亡途径这一研究结果^[10]。通过本次实验,作者认为在后期的研究过程中可以加大尼莫地平的剂量,并分析不同浓度尼莫地平下 HCT 细胞胞质内游离钙的浓度,从而帮助了解尼莫地平调节 HCT 细胞凋亡的具体过程。

综上所述,在一定剂量范围内,随着尼莫地平浓度的升高可以有效抑制人结肠癌细胞系 HCT 的增殖,为肿瘤的治疗提供新的方法。

参考文献

[1] 刘秀玲,李伟娟,俞芳,等.尼莫地平对氧化低密度脂蛋白诱导人血管内皮细胞凋亡的影响[J].中国实验诊断学,2011,15(6):22-24.

[2] 孙莉莉.尼莫地平与阿糖胞苷联合对 HL-60 细胞线粒体膜电位变化及对细胞内活性氧生成影响的研究[D].青岛:青岛大学,2007:76-78.

[3] 孙颖,滕峰,耿燕,等.尼莫地平眼膏对兔慢性高眼压致视网膜内核层及神经节细胞凋亡干预作用[J].青岛大学医学院学报,2011,47(1):25-27.

[4] 李明娥,王梅林,王芸,等.尼莫地平对 H₂O₂ 诱导血管内皮细胞凋亡的影响[J].滨州医学院学报,2012,35(2):124-125.

[5] 潘妍婷,崔万森.神经节苷脂 GM1 联合尼莫地平对脑缺血再灌注后细胞凋亡及凋亡相关蛋白表达的影响[J].陕西医学杂志,2010,39(8):947-949.

[6] Žižić JB, Vuković NL, Jadranin MB, et al. Chemical composition, cytotoxic and antioxidative activities of ethanolic extracts of propolis on HCT-116 cell line[J]. J Sci Food Agric, 2013, 12(7):12-19.

[7] 程景丽,和姬苓,耿红,等.大鼠脑缺血再灌注损伤后尼莫地平对神经细胞凋亡影响的研究[J].中国现代医生,2010,48(6):1-2.

[8] 邢莲梅,赵玉林,余文发,等.尼莫地平对 rhTGF- α 诱导的人喉鳞癌 Hep-2 细胞增殖及 RNA 编辑酶 1mRNA 表达的影响[J].郑州大学学报:医学版,2009,44(3):537-539.

[9] 何志聪,李文娟,李战辉,等.尼莫地平对脑出血患者血中白细胞介素-6 和肿瘤坏死因子- α 含量的影响[J].右江医学,2010,38(4):386-388.

[10] Wang TP, Pan YR, Fu CY, et al. Down-regulation of UDP-glucose dehydrogenase affects glycosaminoglycans synthesis and motility in HCT-8 colorectal carcinoma cells[J]. Experimental Cell Research, 2010, 3(16):17-32.