

多西紫杉醇对 MCF-7 人乳腺癌细胞延迟外向钾电流的作用

孙涛¹, 姜大庆², 宋志国³, 李金鸣^{3△}

(1. 辽宁省肿瘤医院内科, 辽宁 沈阳 110042; 2. 辽宁省肿瘤医院乳腺科; 3. 中国医科大学药学院药理学教研室)

[摘要] 目的:探讨多西紫杉醇对 MCF-7 人乳腺癌细胞延迟外向钾电流(I_K)的作用。方法:采用全细胞膜片钳记录方式,设保持电位-90 mV,刺激电位为-60~+60 mV,步阶脉冲 10 mV,波宽 200 ms,刺激间隔 3 s,刺激频率为 2 Hz。结果:随着多西紫杉醇的浓度增加,MCF-7 细胞 I_K 电流电压曲线斜率减少,多西紫杉醇对 I_K 通道具有关闭作用;在同一指令电压下, I_K 随着多西紫杉醇浓度的增加而减少,具有剂量依赖性,当指令电压为+60 mV 时,多西紫杉醇浓度从 1×10^{-7} mol·L⁻¹ 增加到 1×10^{-5} mol·L⁻¹ 时, I_K 从 (124.03 ± 8.43) pA/pF,减少到 (75.16 ± 9.10) pA/pF,每个浓度的 I_K 与给药前相比,差异显著($P < 0.01$)。结论:多西紫杉醇对 MCF-7 人乳腺癌细胞的延迟整流 K^+ 通道具有关闭作用,能够抑制乳腺癌细胞的增殖。

[关键词] 乳腺癌;多西紫杉醇;钾离子通道;延迟整流钾电流

[中图分类号] R979.1 [文献标识码] A [文章编号] 0258-4646(2007)02-0199-02

Effect of Docetaxel on delayed rectifier potassium current in human breast cancer cell line MCF-7

SUN Tao¹, JIANG Da-qing², SONG Zhi-guo³, LI Jin-ming^{3△}

(1. Department of Internal Medicine, Liaoning Tumor Hospital, Shenyang 110042, China; 2. Department of Breast, Liaoning Tumor Hospital; 3. Department of Pharmacology, College of Pharmacy, China Medical University)

[Abstract] Objective: To investigate the effect of Docetaxel on delayed rectifier potassium current (I_K) in breast cancer cell line MCF-7. Methods: Whole cell patch clamp technique (-90 mV holding potential, -60 mV to +60 mV stimulating potential, +10 mV step potential, 200 ms duration, 3 s stimulating interval, and 2 Hz stimulating frequency) was used. Results: The slopes of current-voltage curve of I_K decreased with the increase in the concentration of Docetaxel. At +60 mV, the current density of I_K decreased from 124.03 ± 8.43 to 75.16 ± 9.10 pA/pF when the concentration of Docetaxel increased from 1×10^{-7} to 1×10^{-5} mol/L, and in this process Docetaxel acted in a concentration-dependent manner. The differences in current density between cells untreated with Docetaxel and those treated with different concentrations of Docetaxel were significant ($P < 0.01$). Conclusion: Docetaxel has the closing effect on I_K , and as a result it inhibits the proliferation of breast cancer cells.

[Key words] breast cancer; docetaxel; K^+ channel; delayed rectifier potassium current

钾离子通道是广泛分布在包括癌症细胞在内的各种细胞质膜上的离子通道之一,延迟外向钾电流(delayed outward potassium current, I_K)作为钾离子通道电流的一种,在决定肿瘤细胞的生物物理特性以及在调控肿瘤细胞生长中起着非常重要的作用^[1]。多西紫杉醇(docetaxel)是一种抗肿瘤新药,它可以促进微管蛋白装配成微管,并抑制其解聚,导致微管束的排列异常,形成星状体,使纺锤体失去正常功能,细胞死亡。但多西紫杉醇对乳腺癌细胞的生长和增殖的抑制作用是否与 I_K 有关,尚无相关报道。本实验旨在探讨多西紫杉醇对 MCF-7 人乳腺癌细胞 I_K 的作用。

1 材料与方法

1.1 细胞

MCF-7 为人类乳腺癌细胞,细胞在含 10% 小

牛血清 RPMI1640 培养基中培养,贴壁生长。细胞株购自中国科学院上海细胞所。

1.2 药品与试剂

多西紫杉醇(罗纳普朗克·乐安公司, France): 用去离子水配成两个浓度,即: 1×10^{-4} 、 1×10^{-3} mol·L⁻¹, 现用现配,以累计方法给药,使浴槽中药物终浓度分别为 1×10^{-7} 、 1×10^{-6} 、 5×10^{-6} 、 1×10^{-5} mol·L⁻¹; 四乙胺(tetraethyl - Ammonium, TEA): 用去离子水配成储存液,浓度为 1×10^{-1} mol·L⁻¹, 加到浴槽中终浓度为 1×10^2 mol·L⁻¹; 4-氨基吡啶(4-aminopyridine, 4-AP): 用去离子水配成储存液,浓度为 1×10^{-1} mol·L⁻¹, 加到浴槽中终浓度为 1×10^{-2} mol·L⁻¹; 河豚毒素(tetrodotoxin, TTX)(以上均为 Sigma 公司产品); 维拉帕米(verapamil), 上海天丰制药有限公司。

1.3 溶液

电极外液 (mmol·L⁻¹): NaCl 143, KCl 5.4, CaCl₂ 1.8, MgCl₂ 1.8, MgCl₂ 0.5, NaH₂PO₄ 0.3, HEPES (羟乙

[基金项目] 辽宁省博士启动基金资助项目(20051025)

[作者简介] 孙涛(1969 -), 女, 副主任医师, 博士。

△ Corresponding Author's E-mail: jmlcn@tom.com

基哌嗪乙烷磺酸) 5, NaOH 2.3, 葡萄糖 5, 用 1 mol·L⁻¹ NaOH 将 pH 值调至 7.4; 电极内液 (mmol·L⁻¹): KCl 135, 乙二醇乙二胺四醋酸 10, Na₂ATP 5, glucose 5, HEPES 10, 用 1 mol·L⁻¹ KOH 将 pH 值调至 7.2。

1.4 膜片钳制技术全细胞模式记录 I_k

将玻璃电极轻压在细胞表面, 进行千兆封接, 全细胞状态形成后用 Pclamp5.5.1 程序记录细胞膜离子电流的变化。I_k 的电压钳制方案: 设保持电位 -90 mV, 刺激电位为 -60~+60 mV, 步阶脉冲 10 mV, 波宽 200 ms, 刺激间隔 3 s, 刺激频率为 2 Hz。

1.5 统计学分析

记录的电流用 Pclamp5.5.1 程序中的 Clampfit 软件进行电流大小测量和分析。结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS11.5 统计软件分析数据。组间比较采用独立样本 *t* 检验, 组内比较采用配对样本 *t* 检验。

2 结果

维拉帕米 (1 μmol·L⁻¹)、河豚毒素 (TTX, 0.1 μmol·L⁻¹) 的灌流液, 分别阻断钙电流 (I_{Ca})、钠电流 (I_{Na})。在设定的电压刺激方案条件下, MCF-7 乳腺癌细胞记录到一种电压敏感性电流, 1 × 10⁻² mol·L⁻¹ 的 TEA 和 1 × 10⁻² mol·L⁻¹ 4-AP 对该电流具有阻断作用, 用正常的细胞外液冲洗 5 min 后, 该电流大部分恢复到用药前水平, 表明这个记录到的外向电流主要是由 K⁺ 负载的电压门控 K⁺ 电流。

从图 1 可以看出, 在保持电压为 -90 mV, 指令电压从 -60 mV~+60 mV, 步阶脉冲为 10 mV 的条件下, 随着多西紫杉醇的浓度增加, I_k 减小, 电流电压

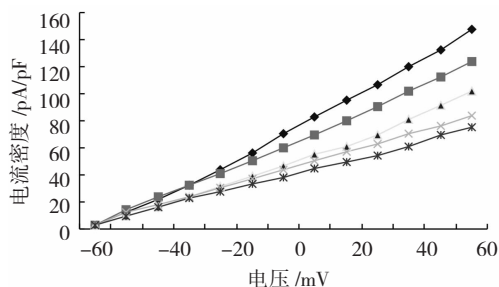


图 1 多西紫杉醇对乳腺癌细胞 MCF-7 I_k 作用的电流电压关系曲线
Fig.1 Effect of Docetaxel on current-voltage curve of I_k in breast cancer cell line MCF-7

曲线斜率减少, 多西紫杉醇对 I_k 具有抑制作用; 在同一指令电压下, I_k 随着多西紫杉醇浓度的增加而减少, 具有剂量依赖性。取指令电压为 +60 mV 时的 I_k 进行比较, 给药前为 (141.36 ± 7.23) pA/pF, 当多西紫杉醇浓度从 1 × 10⁻⁷ mol·L⁻¹ 增加到 1 × 10⁻⁵

mol·L⁻¹ 时, I_k 从 (124.03 ± 8.43) pA/pF, 减少到 (75.16 ± 9.10) pA/pF, 每个浓度的 I_k 与给药前比较, 差异显著 (P < 0.01)。

3 讨论

K⁺ 通道作为肿瘤细胞增殖关键调控物的观点, 近来已经被许多实验和临床证据所认同, 其中 I_k 电流在肿瘤细胞中的生物物理特性以及在调控肿瘤细胞生长中的作用非常重要, 以往的研究发现促进 I_k 传导的各种因子如缬氨霉素、泌乳素、胎牛血清、minoxidil 等可刺激肿瘤细胞生长^[2,4]。另外还发现 I_k 阻断剂如 TEA, 4-AP 和抗癌药他莫西芬、奎尼丁、Ba²⁺, 既抑制各种肿瘤细胞的 I_k, 又抑制这些细胞的增殖^[2-4]。

本实验发现多西紫杉醇对 MCF-7 乳腺癌细胞的 I_k 通道具有抑制作用, 使 I_k 电流密度减少, 并且抑制作用呈剂量依赖性, 说明多西紫杉醇的抗肿瘤的机制除了抑制微管蛋白解聚、影响凋亡、血管生成、基因表达外^[1], 还和钾离子通道抑制作用有关, 表明它是一个多效应靶点抗肿瘤新药。多西紫杉醇的作用机制可以帮助选择新的抗癌药与其联合应用, 提高疗效, 例如可以将之与钾离子通道抑制剂、抗血管内皮生长因子抗体等联合应用, 为肿瘤治疗开辟新的视野。另外, 如前所述抑制 I_k 可以抑制肿瘤细胞增殖, 进而抑制肿瘤形成, 因此 I_k 通道可以作为癌症治疗的靶点。目前认为 K⁺ 通道调控肿瘤细胞增殖可能的机制有 (1) Ca²⁺ 内流; (2) 细胞体积的调控; (3) DNA 合成的调控; 但 I_k 通道调控肿瘤细胞增殖的机制还需进一步研究。

参考文献:

[1] PANCRAZIO JJ, TABBARA IA, KIM YI. Voltage-activated K⁺ conductance and cell proliferation in small-cell lung cancer [J]. *Anticancer Res*, 1993, 13 (4): 1231-1234.

[2] ABDUL M, SANTO A, HOOSEIN N. Activity of potassium channel-blockers in breast cancer [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(4): 3347-3351.

[3] FRASER SP, GRIMES JA, DJAMGOZ MB. Effects of voltage gated ion channel modulators on rat prostatic cancer cell proliferation: comparison of strongly and weakly metastatic cell lines [J]. *Prostate*, 2000, 44 (1): 61-76.

[4] ZHOU Q, KWAN HY, CHAN HC, et al. Blockage of voltage-gated K⁺ channels inhibits adhesion and proliferation of hepatocarcinoma cells [J]. *Int J Mol Med*, 2003, 11(2): 261-266.

[收稿日期] 2006-10-30