

DOI:10.3971/j.issn.1000-8578.2011.02.005

盐酸普鲁卡因对人结肠癌 HT-29 细胞的作用及其机制

高曰文¹,朱晨宇¹,朱耀明¹,胡汉卿¹,王艳林²,秦 烨²

Effects and Its Mechanism of Procaine Hydrochloride on Human Colon Cancer HT-29 Cells

GAO Yue-wen¹, ZHU Chen-yu¹, ZHU Yao-ming¹, HU Han-qing¹, WANG Yan-lin², QIN Ye²

1. The First College of Clinical Medical Science, Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Institute of Molecular Biology of China Three Gorges University

Corresponding Author: ZHU Yao-ming, E-mail: zhuyaoming217@sina.com

Abstract; Objective To investigate the influence of Procaine hydrochloride (PCA) on human colon cancer HT-29 cells proliferation and explore its mechanism. **Methods** HT-29 cells were treated with 0 ~ 10 mmol/L of PCA, cell morphology changes were observed under contrast microscope. Cell proliferation was detected by MTT assay and cell cycle was detected by flow cytometry (FCM). **Results** With different concentrations of PCA being used to dispose cancer cells separately, growth inhibition taking the form of cell's decreased size, shrinkage, vacuoles, cells abscised from the inner surface of the bottle became increasing obvious under contrast microscope. With the rise of the PCA concentration, HT-29 cells has a presentation of negative acceleration in the proliferation by MTT. The analysis of the result indicated that PCA can inhibit the cell proliferation significantly whose effect was replying on the dosage and time. The result by FCM shows that PCA can lengthen the G₀/G₁ phase and shorten the S phase in HT-29 cells. **Conclusion** PCA can make the growth of the HT-29 cells blocked in G₀/G₁ phase, thus inhibiting the cell multiplication significantly, whose effect was relying on the dosage and time.

Key words: Procaine hydrochloride; HT-29 cells; Proliferation

摘要:目的 探讨盐酸普鲁卡因对人结肠癌 HT-29 细胞生长的抑制作用及其机制。**方法** 应用不同浓度(0~10 mmol/L)盐酸普鲁卡因处理 HT-29 细胞,通过倒置显微镜观察细胞形态学改变、四甲基偶氮唑盐比色法(MTT)检测细胞存活率、流式细胞术(FCM)观察细胞周期变化。**结果** 倒置显微镜观察盐酸普鲁卡因处理后的 HT-29 细胞呈现缩小、皱缩、空泡、脱壁等增殖变慢的形态学特征;MTT 结果分析表明盐酸普鲁卡因能显著抑制 HT-29 细胞增殖,其抑制率呈药物浓度及时间依赖性;FCM 结果显示盐酸普鲁卡因可以使 HT-29 细胞的 G₀/G₁ 期延长,S 期缩短。**结论** 盐酸普鲁卡因能够使 HT-29 细胞的生长阻滞在 G₀/G₁ 期,从而显著抑制 HT-29 细胞的增殖,并且具有剂量、时间依赖效应。

关键词: 盐酸普鲁卡因; HT-29 细胞; 细胞增殖

中图分类号: R735.3⁺5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-8578(2011)02-0137-04

0 引言

结肠癌是消化系统中常见的恶性肿瘤之一,其发病率也日趋增高。目前对结肠癌的治疗临床主要

采用手术联合化疗等治疗方法,但是大多数化疗药物毒性作用大,对人体伤害重,严重影响患者的生活质量。因此,寻求一种不良反应小的辅助化疗药物成为当前迫切需求。近年来,研究发现麻醉药物盐酸普鲁卡因(procaine, PCA)具有抗肿瘤的药理活性,可以抑制人鼻咽癌 CNE-2Z 细胞增殖,同时上调 CNE-2Z 细胞 RASSF1A 基因和 p16 蛋白的表达^[1];但 PCA 能否同时具有治疗结肠癌的药理功效,目前国内外相关报道还较少,本实验通过观察 PCA 作用结肠癌 HT-29 细胞后,观察细胞形态、增

收稿日期:2010-01-12;修回日期:2010-03-31

基金项目:三峡大学研究生科研创新基金资助项目(2009-35)

作者单位:1. 443002 湖北宜昌,三峡大学第一临床医学院;2. 三峡大学分子生物所

通信作者:朱耀明, E-mail: zhuyaoming217@sina.com

作者简介:高曰文(1982-),男,硕士,住院医师,主要从事结肠癌的防治研究工作

殖及生长周期等的变化,研究该药物对 HT-29 细胞增殖的影响及其作用机制,为 PCA 用于结肠癌的临床辅助治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 细胞株与试剂

结肠癌 HT-29 细胞系购于中国典型培养物保藏中心,细胞培养液 DMEM 为美国 Sigma 公司产品,PCA 购于江苏常州市兰陵制药有限公司,MTT 细胞增殖分析试剂为 Promega 公司产品,倒置荧光显微镜 NIKON TE2000 为上海衡桥仪器有限公司产品,全波长酶标仪为 Thermo 公司产品,EPLCS XL 流式细胞分析仪为 BectanCoulter 公司产品,其余试剂为 Sigma 公司产品。

1.2 细胞培养和药物处理

HT-29 细胞用含 20% 的小牛血清、100 u/ml 青霉素、100 mg/L 链霉素的 DMEM 培养液,于 37°C 含 5%CO₂ 和 95% 空气的恒定湿度细胞培养箱内进行传代培养。取对数生长期的 HT-29 细胞,分别加入终浓度(0~10)mmol/L PCA,继续置于培养箱中培养 24、48、72h,根据不同实验需求分别收集细胞。

1.3 PCA 处理后细胞形态学观察

将培养瓶中传代 24 h 生长良好的 HT-29 细胞分为正常细胞对照组、实验 A 组和 B 组,实验 A、B 组中分别加入终浓度为 1.0 和 2.5 mmol/L PCA,对照组不加入 PCA,继续培养至 48h,于倒置显微镜下观察细胞形态。

1.4 MTT 法检测细胞增殖

胰酶消化对数生长期的结肠癌 HT-29 细胞,充分吹打混匀成单细胞悬液,计数后调整细胞浓度到 4×10^4 /ml,按每孔 100 μ l 接种于 96 孔培养板。实验设调零组、空白对照组及药物处理组:调零组加 PBS,空白组不加任何处理,药物处理组再分成 5 个浓度梯度组。置培养箱内培养 24h 细胞贴壁良好后,分别加入终浓度为 0、0.5、1.0、2.5、5.0、10 mmol/L 的 PCA;37°C 继续培养 24、48、72 h 后吸去

细胞培养液,加入质量浓度为 2 g/L 的 MTT/DMEM 培养液(无血清和双抗),每孔 100 μ l,37°C 继续培养 4 h。吸去细胞培养液,每孔加入 200 μ l 二甲基亚砷(DMSO),室温振摇 20 min 溶解结晶。在全波长酶标仪上读取波长 570 nm 处的吸光度值(OD),求其平均值。空白对照组细胞生长率记为 100%,实验组按照下列公式计算细胞生存率(%) = $OD_{\text{药物}}/OD_{\text{对照}} \times 100\%$,并绘制细胞生长曲线。

1.5 流式细胞仪分析细胞周期

取生长良好的 HT-29 细胞分为正常细胞对照组、实验 A 组和 B 组,每组设 3 个复孔后,把实验 A、B 组中分别加入终浓度为 1.0、2.5 mmol/L PCA 处理,对照组不加入 PCA,继续培养 48 h 后收集细胞,用含 80% 乙醇的固定液(固定液含无水乙醇 0.8 ml、PBS 0.19 ml 和 0.5 mol/L EDTA 0.01 ml)固定 1 h;PBS 洗涤细胞 1 次,再加入 500 μ l 打孔液(打孔液含 PBS 8.55 ml、1% Triton X-100 1 ml 和 1 g/L RNase 500 μ l)和 0.5 g/L 碘化丙啶染色液 100 μ l,室温避光保温 30 min 后,流式细胞仪检测细胞周期,并用 Multicycle for windows 软件分析细胞周期分布的变化。

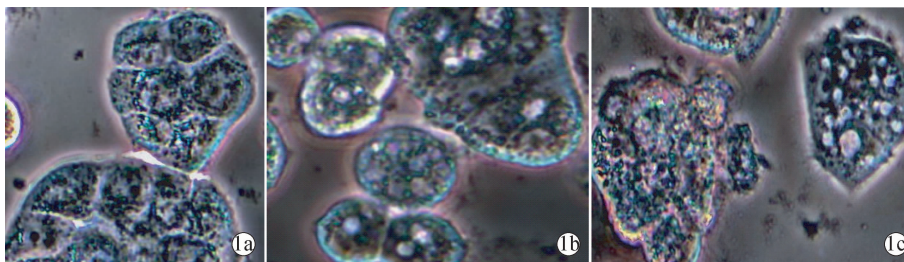
1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 13.0 软件进行统计分析,行单因素方差分析、重复测量方差分析、*t* 检验及其他统计处理, $P < 0.05$ 表示两组差异有统计学意义。

2 结果

2.1 PCA 作用后 HT-29 细胞形态学的变化

倒置显微镜观察发现:正常对照组 HT-29 细胞呈类圆形,部分伸展的癌细胞可呈现梭形,以贴壁方式生长;经 PCA 处理可以抑制实验组 HT-29 细胞的生长,且随药物浓度的增加,细胞生长密度逐渐下降;正常的细胞中异形细胞逐渐增多,细胞体积缩小,皱缩成团的圆形细胞增多,并出现空泡现象,此现象 B 组比 A 组更明显,见图 1。随着药物浓度增加和作用时间的延长,可见大量膨大、不规则形细胞



1a:Control group:HT-29 colon cancer cellin control group; 1b:A group:HT-29 colon cancer cell disposed with PCA (1.0 mmol/L) for 48h; 1c:B group:HT-29 colon cancer cell disposed with PCA (2.5 mmol/L) for 48h

图 1 倒置显微镜下观察结肠癌 HT-29 细胞形态学变化

Figure 1 The changes of HT-29 colon cancer cell observed under inverted microscope

即死细胞从瓶壁上脱落形成细胞碎片。而未加药的空白对照组细胞贴壁生长良好,细胞轮廓清楚,细胞间接触紧密,生长旺盛。

2.2 PCA 对 HT-29 细胞增殖的抑制作用

MTT 结果显示,不同浓度的 PCA 处理后,细胞增殖明显变缓,见图 2;而且随着 PCA 浓度的增加和作用时间的延长,这种抑制效应具有增强趋势,见表 1。HT-29 细胞经 2.5 mmol/L 的 PCA 处理 24 h 的抑制率为 19.79%,处理 48 h 的抑制率为 50.38%,处理 72h HT-29 细胞生长抑制率为 71.96%。

表 1 MTT 检测不同浓度的 PCA 对 HT-29 细胞生长的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Table 1 The effects of PCA on growth of cell HT-29 detected by MTT method ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

PCA (mmol/L)	Survival rate (%)		
	24h	48h	72h**
0	100.00 ± 4.50	100.00 ± 2.54	100.00 ± 7.02
0.5	86.37 ± 1.22	63.38 ± 4.57	50.82 ± 4.45
1.0	84.14 ± 1.98	53.99 ± 3.63	39.96 ± 3.85
2.5	80.21 ± 2.67	49.62 ± 5.72	28.04 ± 3.61
5.0	68.40 ± 4.57	15.72 ± 7.37	14.74 ± 1.21
10.0	59.55 ± 3.50	24.55 ± 3.31	13.66 ± 2.40
F*	51.42	41.61	112.46
P*	<0.01	<0.01	<0.01

Note: * different concentrations of Single-factor analysis of variance in different time; ** repeated measure analysis of variance; $F_{\text{time} \times \text{concentrations}} = 4.78, P < 0.05$

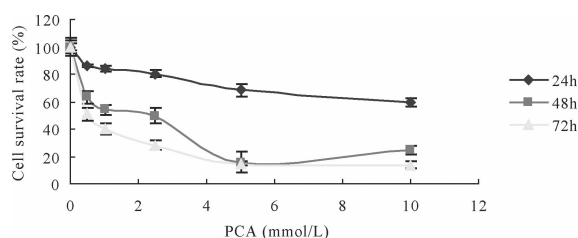


图 2 不同浓度的 PCA 处理 HT-29 细胞生长曲线
Figure 2 The growth curve of cell HT-29 disposed with different concentrations of PCA

2.3 PCA 对 HT-29 细胞生长周期的影响

HT-29 细胞在不同浓度 PCA 作用 48h 后,流式细胞仪检测细胞周期变化,可以看出随着药物浓度增加,G₀/G₁ 期细胞所占比例不断增多,S 期细胞比例明显不断减少,G₂/M 期无明显改变。提示 PCA 能够使 HT-29 细胞的生长阻滞在 G₀/G₁ 期,见表 2。

表 2 盐酸普鲁卡因对 HT-29 细胞周期的影响

($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 2 The effects of PCA on growth cycle of cell HT-29 detected by FCM method ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PCA (mmol/L)	Apoptosis rate (%)	Cell growth cycle (%)		
		G ₀ /G ₁	S	G ₂ /M
0	1.77 ± 1.96	62.60 ± 0.53	17.63 ± 1.24	19.77 ± 1.78
1.0	5.50 ± 5.50	65.70 ± 0.60**	12.43 ± 1.56*	19.13 ± 1.42
2.5	2.60 ± 0.67	68.70 ± 1.00**	8.37 ± 1.16**	22.97 ± 0.29

Note: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. the group of 0 mmol/L PCA

3 讨论

据统计,世界范围内 2007 年新增结肠癌病例数为 120 万,当年结肠癌致死人数为 60 万^[2]。目前,多数学者认为结肠癌和其他恶性肿瘤一样是一种以分化障碍为特征的遗传性细胞过度增殖性疾病。抑制或降低肿瘤细胞的增殖活性,是肿瘤治疗的基本策略之一^[3]。

有研究发现^[4],PCA 具有去甲基化的抗肿瘤作用,在乳腺癌细胞中可通过与 DNA 的 CpG 岛密集区紧密结合,直接干扰甲基化转移酶(DNMT)与 DNA 的结合位点,从而逆转 RARβ2 基因的高甲基化状态,使该基因的表达重新活化,并由此抑制肿瘤细胞的生长。而 Motohisa TD^[5]对肝癌研究显示在异种移植肿瘤中 PCA 也可以抑制肿瘤细胞的生长,同时发现作为一种抗肿瘤新药的 PCA 比普鲁卡因酰胺更安全;王立伟等^[6]研究发现,高浓度的 PCA 可阻断细胞膜的 Na⁺ 通道,降低细胞膜电位,从而具有直接杀伤鼻咽癌细胞的作用。

本研究发现 PCA 与脂氧合酶抑制剂 NDGA 相似^[7],可以使结肠癌 HT-29 细胞发生缩小、皱缩、空泡、脱壁等形态学变化,同时能够显著抑制 HT-29 细胞的增殖,且随着作用浓度的增加、作用时间的延长,这种效应有增强的趋势。当浓度为 2.5 mmol/L 的 PCA 持续作用 72h 时,其抑制率高达 71.96%。为进一步探讨 PCA 抑制 HT-29 细胞增殖的机制,本研究采用流式细胞仪检测 PCA 对 HT-29 细胞周期的影响,结果显示经 PCA 处理后的 HT-29 细胞 G₀/G₁ 期细胞百分比增加,而 S 期百分比却明显降低,表明 PCA 能够使 HT-29 细胞的生长阻滞在 G₀/G₁ 期。众所周知,细胞在 G₁ 期合成 rRNA、mRNA、tRNA、核蛋白体及糖元等,所以 G₁ 期是细胞周期运行的关键时刻和药物等因素作用的敏感点^[4]。结合流式细胞仪分析结果,PCA 能够将多数 HT-29 细胞阻滞于 G₀/G₁ 期,进一步说明 PCA 具有抑制 HT-29 细胞增殖的作用。

综上所述,PCA 除具有治疗乳腺癌、鼻咽癌、肝癌外,本研究证实 PCA 也可以抑制人结肠癌 HT-29 细胞的增殖,并且具有剂量、时间依赖效应。目前,PCA 已经进入了抗肿瘤的 II 期临床试验阶段^[8],但其抗肿瘤的具体机制还不明确,仍需进一步的研究。

参考文献:

- [1] Villar-Garea A, Fraga MF, Espada J, et al. Procaine is a DNA demethylating agent with growth-inhibitory effects in human cancer cells[J]. *Cancer Res*, 2003, 63(16): 4984-4989.
- [2] Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics 2007 [J]. *CA Cancer J Clin*, 2007, 57(1): 43-66.
- [3] 刘碧清,熊绍权,王柏丁. 肠复康对人大肠癌 HT-29 细胞增殖的影响及作用机制研究[J]. *肿瘤防治研究*, 2004, 31(12): 759-761.

- [4] 周慧,徐明锋,罗国庆,等. 普鲁卡因对人鼻咽癌细胞 CNE-2Z 增殖的影响[J]. *临床耳鼻咽喉头颈外科杂志*, 2007, 21(24): 1118-1121.
- [5] Tada M, Imazeki F, Fukai K, et al. Procaine inhibits the proliferation and DNA methylation in human hepatoma cells[J]. *Hepatol Int*, 2007, 1(3): 355-364.
- [6] 王立伟,陈丽新,钟平,等. 平阳霉素和普鲁卡因治疗鼻咽癌时细胞膜电位的变化[J]. *中国病理生理杂志*, 1996, 12(3): 249-252.
- [7] 夏光涛,张源潮,武森森,等. NDGA 对 HT-29 结肠癌细胞生长抑制及对端粒酶表达影响的研究[J]. *中国肿瘤生物治疗杂志*, 2005, 12(4): 262-265.
- [8] Brueckner B, Lyko F. DNA methyltransferase inhibitors. Old and new drugs from an epigenetic cancer therapy[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2004, 25(11): 551-554.

[编辑:黄园玲;校对:刘红武]

(上接第 136 页)

3 讨论

MTT 结果显示, 25、50、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ PUP 对 BGC-823 细胞增殖具有明显的抑制作用, 肿瘤细胞抑制率可高达 69.91%。电子透射显微镜观察结果表明, PUP 作用于 BGC-823 细胞后, 诱导典型的凋亡形态, 且凋亡率与其浓度成正比。

经 PUP 作用于 BGC-823 细胞 48 h, 发现 survivin mRNA 的表达水平显著降低。survivin 基因定位于染色体 17q25, 有 4 个外显子和 3 个内含子, 编码 142 个氨基酸, 属于凋亡抑制蛋白家族的成员。survivin 表达于胚胎和发育期的胎儿组织, 而在终未分化的成人组织中则表达减少乃至消失, 但在转化细胞系和许多人类肿瘤组织中再度表达。survivin 作为调节基因在 G₂/M 期表达, 可对抗 G₂/M

期凋亡的诱导^[4]。说明 PUP 抑制肿瘤细胞增殖并诱导其凋亡的机制与其下调 Survivin mRNA 有关^[5]。

参考文献:

- [1] 邓槐春,谈竟光,谢娇娥,等. 海带多糖的药理作用[J]. *中草药*, 1987, 18: 15-17.
- [2] 王学宏,李明春. 中药多糖的免疫及抗肿瘤作用研究进展[J]. *浙江中西医结合杂志*, 2003, 23(6): 56-59.
- [3] 傅体辉,谢之荣,邓碧芳,等. MTT 比色法检测肿瘤患者的淋转功能及其条件分析[J]. *中国实验临床免疫学杂志*, 1994, 6(2): 30-32.
- [4] Kawasaki H, Toyoda M, Shinohara H, et al. Expression of Survivin correlates with apoptosis, proliferation, and angiogenesis during human colorectal tumorigenesis [J]. *Cancer*, 2001, 91(11): 2026-2032.
- [5] Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma [J]. *Nat Med*, 1997, 3(8): 917-921.

[编辑:杨 卉;校对:黄园玲]