

文章编号: 1005-6947(2013)09-1158-05

· 基础研究 ·

胰腺癌细胞膜平衡型核苷转运载体和集中型核苷转运载体的检测

胡丽华¹, 王晶敏²

(1. 山东省泰安市中医医院 外科, 山东 泰安 271000; 2. 江苏省苏州市立医院北区 普通外科, 江苏 苏州 215008)

摘要

目的: 检测胰腺癌细胞膜上 Na⁺ 非依赖的平衡型核苷转运载体 (ENT) 和 Na⁺ 依赖性的集中型核苷转运载体 (CNT), 并对 ENT 进行定量检测。

方法: 将胰腺癌细胞株 (Panc-1) 在含潘生丁 (100 μmol/L) 的培养基中分别温育 8, 15, 60, 120 min, 收集细胞用乙腈裂解, 荧光分光光度计测定细胞悬液中潘生丁的荧光强度, 依据平行悬液中的细胞数量计算出单个细胞表面 ENT 的数量; 再将 Panc-1 分别在含 5-氟尿嘧啶 (5-FU) 和 5-FU+潘生丁两种培养基中分别温育 15, 30, 60, 120, 240 min, 毛细管区带电泳法测定 5-FU 含量; 根据平行悬液中的细胞数量和单细胞体积计算单细胞中 5-FU 的浓度, 间接判定细胞膜上是否存在 CNT 载体。

结果: Panc-1 在含潘生丁的培养基温育 8 min 后即能检测到细胞的荧光强度, 15 min 达高峰 20.2×10^{-19} mol; 借助潘生丁测得单个细胞表面有 1.25×10^5 个 ENT。用潘生丁阻断 ENT 后, 5-FU 仍可被转运入胰腺癌细胞中, 且细胞内的 5-FU 最高浓度达到 (138.3 ± 9.77) mg/L, 明显高于培养基中 5-FU 的浓度 ($P=0.011$)。

结论: 与潘生丁结合后, 通过荧光法可以定量检测细胞表面的 ENT; 通过阻断 ENT 并测定细胞中 5-FU 浓度, 可以判断胰腺癌细胞膜上存在 CNT, 从而对合理应用化疗药物, 提高化疗效果提供依据。

关键词

胰腺肿瘤 / 药物疗法; 人胰腺癌细胞株; 核苷载体 / 药理学

中图分类号: R735.9 文献标志码: A



DOI:10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.011
<http://www.zpwz.net/CN/abstract/abstract3629.shtml>

Detection of equilibrative nucleoside transporter and concentrative nucleoside transporter on pancreatic cancer cell membrane

HU Lihua¹, WANG Jingmin²

(1. Department of Surgery, Taian Hospital of Traditional Chinese Medicine, Taian, Shandong 271000, China; 2. Department of General Surgery, the North Hospital of Suzhou Municipal Hospital, Suzhou, Jiangsu 215008, China)

Corresponding author: WANG Jingmin, Email: wjm730222@163.com

ABSTRACT

Objective: To detect the sodium-independent equilibrative nucleoside transporter (ENT) and sodium-dependent concentrative nucleoside transporter (CNT) on pancreatic cancer cell membrane and make a quantitative assessment of ENT.

收稿日期: 2012-09-22; 修订日期: 2013-03-31。

作者简介: 胡丽华, 山东省泰安市中医医院副主任医师, 主要从事中西医结合外科方面的研究。

通信作者: 王晶敏, Email: wjm730222@163.com

Methods: Pancreatic cancer cell line (Panc-1) was incubated in the medium containing dipyridamole (100 $\mu\text{mol/L}$) for 8, 15, 60 and 120 min, respectively. Afterwards, the cells were harvested and lysed with acetonitrile, the fluorescence intensity of dipyridamole in the cell suspension was detected by spectrofluorometer, and the sum of ENTs on a single cell was calculated according to the number of the cells in the parallel suspension. Next, Panc-1 cells were incubated in the medium containing 5-fluorouracil (5-FU) or 5-FU plus dipyridamole for 15, 30, 60, 120 and 240 min, respectively, and the content of 5-FU in the cell was measured by capillary zone electrophoresis; the 5-FU concentration in a single cell was counted according to the number of cells and the single cell volume in the parallel suspension to indirectly determine whether CNT was present on the cell membrane of Panc-1.

Results: The fluorescence was detected in Panc-1 after 8 min of incubation in the medium containing dipyridamole with a maximal level of 20.2×10^{-19} mol at 15 min. The sum of ENTs was determined at 1.25×10^5 in a single cell according to the dipyridamole content. 5-FU was still transported into the Panc-1 cells after the blockage of ENT with dipyridamole and the maximal level of intracellular 5-FU reached (138.3 ± 9.77) mg/L, which was significantly higher than that of the medium ($P=0.011$).

Conclusion: ENTs on the cell surface can be quantitatively determined through fluorescence intensity detection after their binding with dipyridamole. Whether CNT is present on the cell membrane can be determined by measuring the intracellular 5-FU concentration after the blockage of ENT, and therefore provides a reference for the rational use of chemotherapeutic drugs and improvement of their effect.

KEY WORDS

Pancreatic Neoplasms/drug ther; Human Pancreatic Carcinoma Cell; Nucleoside Transporter/pharm

CLC number: R735.9 **Document code:** A

DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.011

核苷是细胞合成核酸的重要物质,细胞外核苷需借助细胞膜上核苷载体进入细胞。迄今发现的核苷载体分为两大类,即 Na^+ 非依赖的平衡型核苷转运载体(ENT)和 Na^+ 依赖的集中型核苷转运载体(CNT)^[1]。临床治疗胰腺癌的核苷类化疗药物 5-氟尿嘧啶(5-FU)亦需通过核苷载体转运进入细胞。因此胰腺癌细胞膜上核苷载体的数量与肿瘤耐药性有关,对胰腺癌有一定预后判断价值^[2-4]。有报道核苷载体抑制剂潘生丁可与 ENT 1:1 结合阻断其功能,并能在一定光波激发下产生荧光,藉此有可能进行 ENT 定量研究^[5-6]。由于 ENT 介导核苷双向转运^[7-9],而 CNT 介导核苷向细胞内单向主动转运过程,从而使胞内达到较高的底物浓度^[10-11]。由此推测核苷载体抑制剂如潘生丁可通过阻断相应核苷载体,调节药物进出细胞过程等来增强 5-FU 等核苷类化疗药物的疗效。但完全抑制 ENT 后,5-FU 主要依靠 CNT 转运。本研究旨在检测胰腺癌细胞膜上是否存在 ENT 和 CNT,并对 ENT 进行定量,同时检测在 ENT 阻断后 CNT 对 5-FU 在胰腺癌细胞内的转运及浓聚作用,从而对合理应用化疗药物,提高化疗效果提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 细胞与试剂

胰腺癌细胞株 Panc-1 由德国乌尔姆大学赠送;胎牛血清购自杭州四季青公司;胰蛋白酶购自武汉中健科技发展公司;高糖 DMEM 培养基购自美国 GIBCO 公司;4-羟乙基哌嗪乙磺酸缓冲液(HEPES 液),台盼蓝,潘生丁,5-FU,茶碱购自美国 Sigma 公司;乙腈(ACN)购自上海凌峰化学试剂公司;BCA 试剂盒购自美国 Pierce 公司。

1.2 主要仪器

血细胞计数器(德国 Leitz Wetzlar 公司);650-60 型荧光分光光度计(日本 HITACHI 公司);毛细管电泳系统(德国 Agilent 公司)。

1.3 细胞培养

胰腺癌细胞株 Panc-1 用含 10% 胎牛血清,1 mol/L 青霉素,1 mol/L 链霉素和 HEPES 液(12.5 $\mu\text{mol/L}$)的高糖 DMEM 培养基(pH=7.4)培养。

1.4 测定细胞平均体积

用 0.25% 胰蛋白酶消化分离细胞后,用 0.4%

台盼蓝染色；借助显微镜联机图像程序，随机读取46个细胞直径，计算细胞平均体积。

1.5 测定细胞数量，建立蛋白含量与细胞数量的标准曲线

根据检测样本的吸光度计算Panc-1细胞的蛋白含量。标准牛血清与细胞裂解液分别配成终浓度为25~2 000 $\mu\text{g/mL}$ 标准溶液。100 μL 细胞悬液与600 μL CAN细胞裂解液混合裂解细胞。混合液体放置在冰上30 min，离心30 min（14 000 r/min ，4 $^{\circ}\text{C}$ ）。上清液用二喹啉甲酸法（BCA法）测定，测定波长为540 nm，建立吸光度与蛋白含量间的标准曲线。用0.25%胰蛋白酶消化Panc-1后收集细胞，细胞悬液定容至10 mL。取1 mL细胞悬液经血细胞计数器计数。分别取细胞悬液0.4，0.8，1.2，1.6，2.0 mL，以1:6比例加入细胞裂解液，用BCA法测定蛋白量，建立蛋白含量与细胞数量的标准曲线。

1.6 测定潘生丁荧光光谱

用荧光分光光度计检测潘生丁溶液的光谱范围，激发狭缝和发射狭缝均为5 nm，检测温度20 $^{\circ}\text{C}$ 。将潘生丁配成不同浓度标准溶液，测定各溶液的荧光强度，建立荧光强度与潘生丁浓度间的标准曲线。

1.7 测定潘生丁在Panc-1单细胞表面的结合量

将Panc-1细胞培养至 2×10^7 个后，加入潘生丁分别温育8，15，60，120 min后，用冷磷酸盐缓冲液（PBS，4 $^{\circ}\text{C}$ ，pH7.2）冲洗3遍，再用橡皮将细胞刮下并收集。取细胞悬液测定细胞膜结合潘生丁的量及细胞蛋白定量。荧光检测前，为除去待测样本中的细胞蛋白，将细胞悬液与ACN以1:2（体积比）混合后离心（9 000 r/min ，3 min）；取上清液测定荧光强度。依据标准曲线计算各样本中实际潘生丁的浓度。每次检测重复3次，取平均值。

1.8 5-FU含量的测定

细胞悬液与ACN以1:2混合震动后离心（9 000 r/min ，3 min），取上清液与硼酸钠缓冲液（pH=9.2）以1:1混匀，然后用毛细管区带电泳法测定上清液中5-FU的含量。检测样本并记录5-FU和茶碱的峰高与峰面积。每个样本检测3次后取平均值，计算5-FU和茶碱的峰面积比值。

测定已知浓度为100，80，60，40，20 mg/L 的5-FU和25 mg/L 茶碱的峰面积及其比值，作5-FU浓度与峰面积比值的标准曲线。

1.9 计算单细胞内5-FU浓度

将所培养的细胞分为ENT阻断组和ENT非阻断组。ENT阻断组在用5-FU的同时加用潘生丁，ENT非阻断组仅用5-FU。两组5-FU的治疗浓度为100 mg/L ，细胞温育时间分别为15，30，60，120，240 min。细胞用冷PBS（4 $^{\circ}\text{C}$ ，pH7.2）冲洗3遍，再用橡皮将细胞刮下并收集，分别测定细胞内5-FU浓度及用于蛋白定量。结合上述结果计算出单细胞内5-FU的药物浓度。

1.10 统计学处理

使用Excel 2000和SPSS 13.0统计软件进行统计学分析。计量资料数据以均数 \pm 标准差（ $\bar{x} \pm s$ ）表示，采用成组资料和配对资料 t 检验；计数资料采用 χ^2 检验；根据一元线性回归原理利用Excel 2000作回归分析，得到回归方程。 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Panc-1与潘生丁结合情况

测得Panc-1细胞平均直径为（20.79 \pm 12.70） μm ，平均体积为（4 704.2 \pm 1 092.4） μm^3 。荧光强度与潘生丁浓度的标准曲线为 $Y=14.8X+14.7$ （ $R^2=0.9997$ ， $F=132.765$ ， $P < 0.01$ ），浓度范围在 10^{-12} ~ 10^{-9} 时线性相关良好，吸光度与蛋白浓度间的标准曲线为 $Y=0.001X+0.1401$ （ $R^2=0.9944$ ， $F=1 237.608$ ， $P < 0.01$ ），在0~2 000 mg/L 范围时线性相关良好；细胞数目与蛋白含量间的标准曲线为 $Y=9.4889X+13.675$ （ $R^2=0.9939$ ， $F=49.875$ ， $P < 0.01$ ），在细胞数0~ 4×10^6 的范围内线性相关性良好。潘生丁与Panc-1细胞分别温育8，15，60，120 min时各组样本实际细胞数量见表1，各时间点潘生丁结合量见表2。潘生丁与Panc-1细胞膜结合速度较快，结合量恒定，符合共价键的特点。15 min时结合在单细胞上的潘生丁数量即达最大值，随后无明显变化（表3），此结果说明其时细胞膜上的ENT已被潘生丁完全结合。其在单细胞的最大结合量为（20.21 \pm 0.21） $\times 10^{-19}$ mol，相当于平均每个细胞结合了 1.25×10^5 个潘生丁

分子。根据潘生丁与 ENT 结合为 1:1 关系,可由测得的单细胞潘生丁结合量判定单细胞膜上 ENT 数量。

表 1 各时间点实际细胞数量

时间 (min)	细胞数目 ($\times 10^7$ /mL)
8	8.363 \pm 0.1143
15	7.004 \pm 0.0805
60	11.43 \pm 0.3986
120	7.773 \pm 0.2046

表 2 各时间点潘生丁结合量

时间 (min)	潘生丁结合量 ($\times 10^{-12}$ /mL)
8	0.1835 \pm 0.0151
15	1.457 \pm 0.0203
60	2.323 \pm 0.0981
120	3.134 \pm 0.0819

表 3 单个细胞结合潘生丁量

时间 (min)	潘生丁结合量 ($\times 10^{-19}$ mol)
8	1.590 \pm 0.4263
15	20.21 \pm 0.2067
60	19.72 \pm 0.7423
120	19.43 \pm 3.195

2.2 Panc-1 细胞与 5-FU 浓度变化

5-FU 浓度与峰面积比值的标准曲线为 $Y=1.7285X+0.257$ ($R^2=0.997$, $F=961.5$, $P<0.01$), 线性相关良好。在 ENT 非阻断组中胰腺癌 Panc-1 细胞经含 5-FU 的培养基培养后, 细胞内 5-FU 浓度在 15 min 内迅速升高, 30 min 达 (83.75 ± 5.33) mg/L, 60 min 时达高峰浓度 (92.86 ± 1.60) mg/L。扣除细胞核体积, 此时胞浆中 5-FU 浓度近似于培养基中浓度。此后细胞内 5-FU 浓度不再上升, 药物曲线处于平台, 这提示 5-FU 可进入细胞, 细胞内 5-FU 浓度可达到细胞外水平。因此有理由认为, 胰腺癌细胞膜上至少存在一种载体。

在 ENT 阻断组细胞中, 将前 4 个时间点的细胞内 5-FU 浓度作相关分析, 发现 2 h 内细胞内 5-FU 浓度与时间呈直线相关 $Y=0.8832X+34.28$ ($R^2=0.993$, $F=291.52$, $P<0.01$)。随着暴露时间的延长, 5-FU 在 Panc-1 内的浓聚作用逐渐明显。虽然 15 min 时细胞内 5-FU 仅为 ENT 非阻断组的 68.65%, 60 min 才达到 ENT 非阻断组的最高浓度, 但此后 5-FU 浓度继续升高, 2 h 达 (138.3 ± 9.769)

pg/nL, 为培养基中 5-FU 浓度的 1.38 倍, 为 ENT 非阻断组的 1.64 倍 ($P<0.01$), 并高于非阻断组 5-FU 最高浓度的 1.489 倍 ($P<0.01$), 以后药物曲线处于平台 (表 4)。

表 4 ENT 阻断组与 ENT 非阻断组细胞中 5-FU 浓度
Table 4 The intracellular 5-FU concentration of the cells with ENT block or without ENT block

时间 (min)	ENT 阻断组 (pg/nL)	ENT 非阻断组 (pg/nL)	P
15	45.99 \pm 0.845	67.0 \pm 10.16	0.074
30	59.18 \pm 8.661	83.75 \pm 5.33	0.025
60	92.36 \pm 4.993	92.86 \pm 1.604	0.903
120	138.3 \pm 9.770	84.33 \pm 2.331	0.011
240	124.7 \pm 9.505	84.98 \pm 2.367	0.013

3 讨论

至今发现人类有 2 类核苷载体, 即 ENT 和 CNT。ENT 对核苷分子跨膜转运的原动力是药物浓度梯度, 最终使细胞内外核苷浓度一致^[7-9]。CNT 系 Na^+ 依赖性地将核苷向细胞内单向主动转运的核苷载体, 从而使胞内达到较高的底物浓度^[10-11]。核苷类化疗药物也需通过核苷载体转运入胞起到细胞毒作用。细胞膜表面 ENT 转运速度快、流量高, 又是转运化疗药物的主要通道, ENT 数量与肿瘤耐药性密切相关, 因此确定胰腺癌细胞膜上 ENT 数量可能为临床化疗提供指导。本研究结果显示单个 Panc-1 细胞膜上有 1.25×10^5 个 ENT。虽然在本研究中对单细胞的 ENT 进行了定量, 但尚不能说明这是 Panc-1 细胞对化疗药物的耐药机制。但它所建立的研究方法可成为今后研究细胞耐药机制的手段之一。

另外, 在利用潘生丁阻断胰腺癌细胞膜表面的 ENT 的实验中, 观察其对 5-FU 在胰腺癌细胞内浓聚的影响。在 5-FU 跨膜转运的初期, ENT 和 CNT 都能将药物转运至细胞内; 随细胞内外药物浓度差的减少, ENT 对药物转运入细胞的作用将越来越少。当细胞内外浓度平衡后, 理论上, 此时 CNT 仍可转运 5-FU 入细胞内, 而 ENT 则将 5-FU 从细胞内转运到细胞外, 以达到细胞内外浓度的一致。由于 ENT 转运速度快、流量高, 而 CNT 转运速度慢、流量低, 故在没有加入阻断剂的细胞内 5-FU 的浓度基本表现 ENT 的特性。ENT 阻断组加用潘生丁后 2 h 内, 细胞内 5-FU 浓度缓慢上升并与时间呈直线相关, 说明在

Panc-1 细胞表面的 ENT 载体已被完全阻断, 其转运只依靠 CNT 进行, 并最终高于培养基中底物浓度。依照 ENT 和 CNT 的转运特点, 可以判断 Panc-1 细胞膜表面存在 CNT 载体。但遗憾的是, 目前尚无法对 CNT 定量测定。

目前, 胰腺癌的预后仍比较差, 5-FU 等化疗药物疗效一般^[12]。国际上, 胰腺癌最新的化疗方法的前瞻性研究包括药理学分析和新的分子靶向药物的选择, 这些依赖于患者的某些特定药物分子标记的确定, 药理学在此个性化的有针对性的治疗中可能发挥核心作用^[13]。田锐等^[14]报道, 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体与化疗药有协同效应。杜志勇等^[15]报道生长抑素二型受体重新表达后可增强胰腺癌细胞对化疗药物 5-FU 的敏感性。而本研究提示我们核苷类化疗药物与 ENT 阻断剂联合应用不但可减少核苷进入细胞而抑制核苷酸补救合成, 而且可能提高细胞内化疗药物浓度, 阻断化疗药物的反流, 并干扰和竞争掺入核酸合成的能力, 有望成为恶性肿瘤治疗的重要策略。

参考文献

- [1] Podgorska M, Kocbuch K, Pawelczyk T. Recent advances in studies on biochemical and structural properties of equilibrative and concentrative nucleoside transporters[J]. *Acta Biochim Pol*, 2005, 52(4):749-758.
- [2] Tsujie M, Nakamori S, Nakahira S, et al. Human equilibrative nucleoside transporter 1, as a predictor of 5-fluorouracil resistance in human pancreatic cancer[J]. *Anticancer Res*, 2007, 27(4B):2241-2249.
- [3] Galmarini CM, Thomas X, Calvo F, et al. Potential mechanisms of resistance to cytarabine in AML patients[J]. *Leuk Res*, 2002, 26(7):621-629.
- [4] Kim R, Tan A, Lai KK, et al. Prognostic Roles of human equilibrative transporter 1 (hENT-1) and ribonucleoside reductase subunit M1 (RRM1) in resected pancreatic cancer [J]. *Cancer*, 2011, 117(14):3126-3134.
- [5] Hammond JR. Kinetic analysis of ligand binding to the Ehrlich cell nucleoside transporter: pharmacological characterization of allosteric interactions with the [3H]nitrobenzylthioinosine binding site[J]. *Mol Pharmacol*, 1991, 39(6):771-779.
- [6] Magda H, Barary M, Abdel HE, et al. Utility of derivative spectrophotometry in the determination of carbochromen hydrochloride and dipyrindamole in the presence of their oxidative degradation products[J]. *Analytical Letters*, 1989, 22(7):1643-1644.
- [7] Visser F, Zhang J, Raborn RT, et al. Residue 33 of human equilibrative nucleoside transporter 2 is a functionally important component of both the dipyrindamole and nucleoside binding sites[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 67(4):1291-1298.
- [8] Huang Y, Anderle P, Bussey KJ, et al. Membrane transporters and channels: role of the transportome in cancer chemosensitivity and chemoresistance[J]. *Cancer Res*, 2004, 64(12):4294-4301.
- [9] Rauchwerger DR, Firby PS, Hedley DW, et al. Equilibrative-sensitive nucleoside transporter and its role in gemcitabine sensitivity[J]. *Cancer Res*, 2000, 60(21):6075-6079.
- [10] Smith KM, Ng AM, Yao SY, et al. Electrophysiological characterization of a recombinant human Na⁺-coupled nucleoside transporter (hCNT1) produced in *Xenopus* oocytes[J]. *J Physiol*, 2004, 558(Pt 3):807-823.
- [11] Zhang J, Smith KM, Tackaberry T, et al. Uridine binding and transportability determinants of human concentrative nucleoside transporters[J]. *Mol Pharmacol*, 2005, 68(3):830-839.
- [12] 杜卫东, 袁祖荣, 倪泉兴, 等. 5-氟尿嘧啶缓释剂瘤内注射治疗胰腺癌的实验研究和临床研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(5):355-360.
- [13] Giovannetti E, Mey V, Nannizzi S, et al. Pharmacogenetics of anticancer drug sensitivity in pancreatic cancer[J]. *Mol Cancer Ther*, 2006, 5(6):1387-1395.
- [14] 田锐, 秦仁义, 杜志勇, 等. 肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体的抗胰腺癌细胞的作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(11):821-825.
- [15] 杜志勇, 陈立模, 秦仁义. 氟尿嘧啶与生长抑素受体基因联合治疗鼠胰腺癌移植瘤的研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2006, 15(11):826-830.

(本文编辑 姜晖)

本文引用格式: 胡丽华, 王晶敏. 胰腺癌细胞膜平衡型核苷转运载体和集中型核苷转运载体的检测[J]. *中国普通外科杂志*, 2013, 22(9):1158-1162. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.011
 Cite this article as: HU LH, WANG JM. Detection of equilibrative nucleoside transporter and concentrative nucleoside transporter on pancreatic cancer cell membrane[J]. *Chin J Gen Surg*, 2013, 22(9):1158-1162. DOI: 10.7659/j.issn.1005-6947.2013.09.011