

钙调素拮抗剂三氟拉嗪对犬肾上皮细胞增殖的影响

田勇 乔健 赵立红 金继昌 胡云峰 栾智华 王慧煜

(中国农业大学 动物医学院, 北京 100094)

摘要 为探讨钙调素拮抗剂三氟拉嗪(TFP)对犬肾上皮细胞(MDCK)增殖的抑制作用及对细胞各周期时相的影响,采用细胞计数法、流式细胞术、 $[-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ 掺入外源性底物的液体闪烁法和免疫组化技术,分别测定5、10和15 $\mu\text{mol/L}$ 浓度的TFP对MDCK细胞增殖的抑制作用、细胞各周期时相的百分率、胸苷激酶(TK)的活性以及增殖细胞核抗原(PCNA)表达的阳性率。结果表明:给药3 d后,各浓度TFP对MDCK细胞生长均具有明显抑制作用; G_0/G_1 期的细胞比率均显著增加($P < 0.05$),而S期、 G_2/M 期细胞的比率则有所下降,其中高浓度TFP组显著下降($P < 0.05$);细胞内TK的活性和PCNA的表达显著降低,呈明显的时间剂量效应关系。说明TFP可通过阻断钙调素信号通路,影响DNA合成和细胞周期而抑制MDCK细胞的增殖。

关键词 三氟拉嗪; 钙调素; 马-达二氏犬肾细胞; 细胞周期

中图分类号 Q 418

文章编号 1007-4333(2007)03-0005-04

文献标识码 A

Effects of trifluoperazine, a calmodulin antagonist, on proliferation of MDCK cells in vitro

Tian Yong, Qiao Jian, Zhao Lihong, Jin Jichang, Hu Yunfeng, Luan Zhihua, Wang Huiyu

(College of Veterinary Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract The objective of this study was to explore the effects of trifluoperazine on the proliferation of Madin-Darby canine kidney cells (MDCK). Cytometry was used to determine the suppressive effects of different concentrations of trifluoperazine on proliferation of MDCK cells. The percentage of different cell cycles was measured by Flow cytometry. The activity of thymidine kinase (TK) in MDCK cells induced at varying concentrations of trifluoperazine was detected by incorporation of $[-^{32}\text{P}]\text{ATP}$ into an exogenous substrate. The expression of PCNA was detected by immunohistochemistry after exposure to TFP for 72 h. The results showed that: 1) Trifluoperazine markedly inhibited the proliferation of MDCK cells after 72 hours culture at concentrations of 5, 10 and 15 $\mu\text{mol/L}$. 2) The percentage of cells in S and G_2/M phase decreased gradually and that in G_0/G_1 increased significantly. 3) The intracellular TK activity was suppressed with trifluoperazine. 4) The positive rate of PCNA decreased with the increase in TFP, especially in cells treated with higher concentrations of TFP. The results indicated that trifluoperazine could significantly suppress the proliferation of MDCK cells in vitro, probably by inactivating the CaM signal transduction pathway and changing the normal cell cycle.

Key words trifluoperazine; calmodulin; MDCK; cell cycle

犬肾上皮细胞(Madin-Darby canine kidney, MDCK)是体外研究流感病毒及其肾脏相关疾病的模式细胞^[1]。钙调素(calmodulin, CaM)是 Ca^{2+} 信号转导途径中的主要信号分子,通过影响胞内 Ca^{2+} 依赖酶和激酶的活性而在细胞增殖、分化以及凋亡

过程中起着重要调节作用^[2]。作为特异性的CaM抑制剂三氟拉嗪(trifluoperazine, TFP)在相关的研究领域得到了广泛的应用,研究显示TFP能够识别 $\text{Ca}^{2+}/\text{CaM}$ 的疏水区,通过改变CaM的构象,从而改变受体后CaM-CaMK(calmodulin protein kinases)

收稿日期: 2006-12-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30571398;30371063;30070567)

作者简介: 田勇,博士研究生,现工作单位河北北方学院, E-mail: tianyzn@163.com; 乔健,教授,博士生导师,通讯作者,主要从事细胞信号转导和细胞生物学研究, E-mail: qiaojian@cau.edu.cn

信号转导通路的功能状况,产生其生物学效应及相应的药理作用^[3]。已有的研究表明 TFP 对白血病细胞具有抗增殖活性而对正常淋巴细胞没有任何影响^[4],然而有关 TFP 对 MDCK 细胞增殖的影响未见报道。本研究以 MDCK 细胞为靶细胞,观测了 TFP 对其增殖和细胞周期各时相的影响,旨在从细胞生物学层面上探讨 TFP 对 MDCK 细胞生长的抑制作用及可能机制,为今后在 MDCK 细胞上开展病毒感染与钙信号转导的相关研究提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

DMEM(Delbecco's Modified Eagle's Medium),美国 GIBCO 公司产品;碘化丙啶(propidine iodide, PI)和胰蛋白酶(trypsin),美国 DIFCO 公司产品;胎牛血清(fetal bovine serum),杭州四季青生物材料有限公司产品;三氟拉嗪(TFP)和核糖核酸酶(RNase A),购自美国 Sigma 公司;大鼠抗小鼠 PCNA 单克隆抗体、SP-9000 通用试剂盒和浓缩型 DAB 显色试剂盒均为北京中杉金桥生物技术有限公司产品; [³²P]ATP 购自北京亚辉生物制品公司,其他试剂均为国产分析纯。荧光显微镜为日本 Nikon 公司产品;酶联免疫检测仪为奥地利 TALAN 公司产品;1801 型液闪仪为美国 Beckmon 公司产品;FAC-SCalibur 流式细胞仪为美国 Becton Dickinson 公司产品。

1.2 MDCK 细胞的培养及生长曲线测定

细胞培养:犬肾上皮细胞(MDCK)由本实验室保存,在含 10%(体积分数)胎牛血清、100 IU/L 青霉素和 100 μg/L 链霉素的 DMEM 培养基中贴壁生长,置 37 ± 5%(体积分数,下同)CO₂ 培养箱中培养传代,指数生长期细胞用于试验。

细胞生长曲线的测定:取对数生长期 MDCK 细胞,按 2×10^4 / mL 的浓度接种于 24 孔板,在 37 ± 5% CO₂ 条件下培养。实验组分别加入终浓度为 5、10 和 15 μmol/L 的 TFP 培养液,对照组加入正常培养液。从加药次日起,每天每个剂量组取 3 孔细胞,经胰酶消化后台盼蓝染色,用血细胞计数板平行计数活细胞数。连续 6 d,根据 3 次重复实验的均值,绘制细胞生长曲线。

1.3 流式细胞仪测定细胞周期

用 0.25%(质量分数)的胰酶消化收集经不同浓度 TFP 处理 72 h 后的细胞,70%(体积分数)酒精

4 固定 18 h 以上。离心去固定液,PBS 洗 2 次;重悬细胞,加入 RNase A 至质量浓度为 25 mg/L,37 反应 30 min。PBS 洗去 RNase A,碘化丙啶(终质量浓度为 50 μg/mL)4 避光染色 30 min,流式细胞仪测定细胞 DNA 含量,用 Multicycle Software 软件分析细胞周期时相。

1.4 胸苷激酶(TK)的提取与测定

依据参考文献[5]稍加改进。主要步骤为胰酶消化细胞后,用细胞抽提液(10 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1.6×10^{-5} mol/L thymidine; 0.003 mol/L -mercaptoethanol)悬浮细胞,反复冻融,使细胞及细胞核完全破裂。4 离心后取上清液 15 μL,加 30 μL 反应液(15 mmol/L MgCl₂; 30 mmol/L Tris-HCl, pH 7.5; 30 mmol/L ATP),10 μCi ³H-TdR 及适量细胞抽提液,37 反应 20 min。点样在纤维素膜上,洗膜、烘干后用液体闪烁计数器记录每 min 脉冲数(cpm),经 Bradford 法测定蛋白浓度并计算每 μg 蛋白酶活性(用 cpm 表示)。

1.5 免疫组化测定增殖细胞核抗原(PCNA)表达

细胞爬片,免疫组化 SP 法检测对照组和 5、10 和 15 μmol/L 浓度 TFP 组细胞 PCNA 的表达。操作按照试剂盒说明书进行。阳性结果判断:PCNA 染色,细胞核着色,染成棕黄色为阳性,浅蓝色视为阴性。在 400 倍高倍镜下每张细胞爬片观察 5 个视野,计数阳性细胞数和总细胞数,计算阳性表达率。阳性表达率 = (阳性细胞数/总细胞数) × 100%。

1.6 统计学分析

所有数据均以平均数 ± 标准差表示,使用 SPSS 11.5 统计软件分析,组间比较采用方差分析和组间 *q* 检验,以 *P* < 0.05 为差异显著。

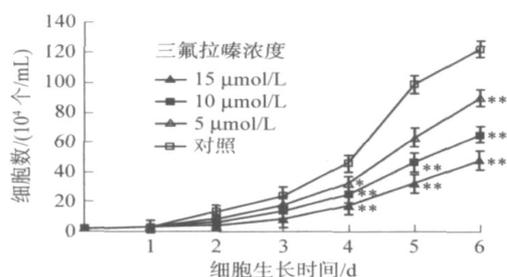
2 结果与结论

2.1 CaM 拮抗剂 TFP 对 MDCK 细胞生长的影响

对 MDCK 细胞生长曲线的测定结果表明,5、10 和 15 μmol/L 的 TFP 对 MDCK 细胞的生长均有抑制作用,随着 TFP 浓度的增加,抑制作用愈显著。1 ~ 3 d 内各用药物组细胞数均少于对照组,但差异不显著(*P* > 0.05),4 ~ 6 d 各用药物组细胞数均显著或极显著低于对照组(*P* < 0.01)。在本实验采用的剂量范围内,TFP 对 MDCK 细胞的抑制作用具明显的时间剂量效应(图 1)。

2.2 TFP 对 MDCK 细胞周期各时相的影响

FCM 分析了不同浓度 TFP 对细胞周期各时相



与对照组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;下同

图 1 不同浓度三氟拉嗪处理 MDCK 细胞的增殖 ($n = 3$)

Fig. 1 Effect of trifluoperazine (TFP) on the proliferation of MDCK cells

的影响。结果显示不同浓度 TFP 使细胞周期各时相的群体比例发生显著变化,与对照组相比 TFP 以浓度依赖性的方式使 G_1 期(DNA 合成前期)的细胞比率显著($5 \mu\text{mol/L}$ $P < 0.05$)或极显著(10 和 $15 \mu\text{mol/L}$; $P < 0.01$)增加;S 期(DNA 合成期)细胞($15 \mu\text{mol/L}$)和 G_2/M 期细胞的比率(10 和 $15 \mu\text{mol/L}$)显著下降($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 不同浓度三氟拉嗪作用 72 h 后 MDCK 的细胞周期

Table 1 Effect of trifluoperazine on cell cycle in MDCK cells after 72 h

三氟拉嗪浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	细胞周期		
	G_1/G_0 期	S 期	G_2/M 期
0	56.7 \pm 1.07	25.3 \pm 1.91	18 \pm 1.41
5	63.3 \pm 0.95 *	24.9 \pm 2.16	11.7 \pm 1.79
10	66.9 \pm 1.24 **	22.7 \pm 1.33	10.0 \pm 2.31 *
15	76.6 \pm 2.17 **	14.7 \pm 2.84 *	8.7 \pm 1.89 *

2.3 TFP 对 TK 激酶活性的影响

将处于对数生长期的 MDCK 细胞单层用不同浓度 TFP 处理 72 h 后,用 [^{32}P]ATP 渗入外源性底物的方法,液体闪烁测定细胞内 TK 活性。结果表明,5、10 和 $15 \mu\text{mol/L}$ 浓度的 TFP 作用 MDCK 细胞 72 h 后,胞内 TK 活性分别为对照组的 94.9% ($P > 0.05$)、79.2% ($P < 0.05$) 和 74.2% ($P < 0.01$),即 TFP 以浓度依赖性的方式抑制 MDCK 细胞内 TK 激酶的活性(图 2)。

2.4 TFP 对 MDCK 细胞 PCNA 表达的影响

通过免疫组化测定了不同浓度 TFP 作用 MDCK 细胞 72 h 后 PCNA 的表达,光镜下计数阳性细胞总数和总细胞数并求出阳性表达百分率。结果显示,5 $\mu\text{mol/L}$ TFP 浓度组 PCNA 的阳性表达百分率显著低于对照组 ($P < 0.05$),10 和 $15 \mu\text{mol/L}$ 组则极显著低于对照组 ($P < 0.01$),说明 TFP 以浓度依

赖性的方式抑制 MDCK 细胞 PCNA 的表达(表 2)。

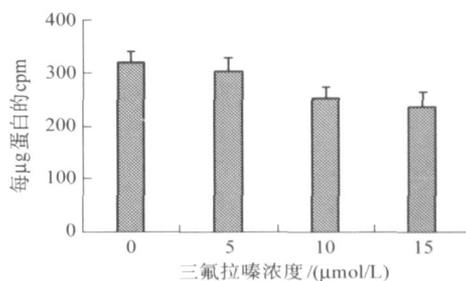


图 2 三氟拉嗪对 MDCK 细胞 TK 激酶活性的影响 ($n = 3$)

Fig. 2 Effect of TFP on TK activity in MDCK cells

表 2 不同浓度三氟拉嗪作用 72 h 后 MDCK 细胞的 PCNA 表达率

Table 2 Distribution of PCNA expression in MDCK cells after exposure to TFP for 72 h

三氟拉嗪浓度/ ($\mu\text{mol/L}$)	PCNA 阳性表达率/ %
0	74.6 \pm 6.8
5	69.5 \pm 9.5 *
10	62.8 \pm 12.1 **
15	57.9 \pm 9.6 **

3 讨论与小结

1) 钙调素(CaM)在细胞代谢及增殖中的调控作用一直为人们所重视,研究表明钙调素水平的升高和维持高水平,是细胞由 G_0 期进入细胞周期,由 G_1 期向 S 期、 G_2 期向 M 期和由 M 期的中期向后期过渡的必要条件^[6]。在细胞株中 CaM 的表达越高,细胞 G_0 期越短,增殖速度越快,即细胞通过 G_0 期的速度与 CaM 在细胞中的浓度成正比^[7]。CaM 拮抗剂 TFP 能有效地抑制 CaM 的活性而影响细胞周期,抑制成纤维细胞、淋巴细胞及肿瘤细胞等多种细胞的增殖^[4,8-9],但对 MDCK 细胞的抑制作用国内外尚未见报道。本实验通过细胞生长曲线观察到 5、10 和 $15 \mu\text{mol/L}$ 的 TFP 作用 MDCK 细胞 72 h 后开始抑制其生长,因此,细胞周期各时相群体的变化、TK 活性和 PCNA 阳性表达检测均在此时间点进行。

2) 流式细胞分析是单细胞定量的分析技术,对细胞内 DNA、蛋白质含量测定和细胞周期分析具有客观、准确、分析细胞数量大、参数多和变异系数小等优点。本实验结果显示 5 ~ $15 \mu\text{mol/L}$ 的 TFP 以剂量依赖性的方式抑制 MDCK 的增殖作用,即 $15 \mu\text{mol/L}$ 的 TFP 可使 G_0/G_1 期的细胞比率增加

19.9% (由56.7%增至76.6%)、S期和G₂/M期细胞分别减少10.6% (由25.3%减至14.7%)和9.3% (由18%减至8.7%)。说明TFP抑制MDCK细胞增殖的关键在于抑制细胞由G₀/G₁期进入S期,导致G₀/G₁期细胞增加而S期细胞减少,因而G₂/M期细胞也相应减少。

3) 胸苷激酶(thymidine kinase, TK)是嘧啶代谢循环中的关键酶之一,能够催化脱氧胸苷转变为脱氧胸苷酸,研究表明细胞内TK活性越高,存在增殖细胞数量也越多^[10]。增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)仅在增殖的细胞中合成与表达,与细胞增殖周期密切相关^[11],其功能是DNA聚合酶的辅助蛋白,为多种丝裂原信号最后传导通路^[12]。二者含量均可反映细胞增殖活性,已被广泛用于细胞增殖功能的检测^[13-14]。本实验发现不同浓度的TFP均可抑制MDCK细胞内TK激酶的活性和降低PCNA染色阳性率,对照组细胞PCNA阳性表达率和胞内每μg蛋白TK酶活反应的cpm值分别为(74.6 ± 6.8)%和318 ± 22,而15 μmol/L浓度的TFP使PCNA阳性表达率和胞内每μg蛋白TK酶活反应的cpm值分别下降为(57.9 ± 9.6)%和238 ± 28。提示TFP的主要作用在于能使G₀期细胞增多,减少细胞DNA的合成,这一点与流式细胞仪测定结果相一致。

总之,CaM拮抗剂TFP对MDCK细胞增殖的影响是一个多层次多途径的复杂调控过程,它既能抑制与DNA合成密切相关的TK的活性,也能抑制PCNA的表达,直接影响DNA的复制;同时还可作用于细胞周期调控因子而影响细胞周期进程。

参 考 文 献

- [1] Lars Opitz, Jatuporn Salaklang, Hermann B ütner, et al. Lectin-affinity chromatography for downstream processing of MDCK cell culture derived human influenza A viruses[J]. *Vaccine*, 2007, 25(5): 939-947
- [2] Maier L S, Bers D M, Brown J H. Calmodulin and Ca²⁺/calmodulin kinases in the heart-Physiology and pathophysiology[J]. *Cardiovascular Research*, 2007, 73(4): 629-630
- [3] Lei Tang, Shukla P K, ZJ Wang. Trifluoperazine, an orally available clinically used drug, disrupts opioid antinociceptive tolerance [J]. *Neuroscience Letters*, 2006, 397(1-2): 1-4
- [4] Zhelev Z, Ohba H, Bakalova R, et al. Phenothiazines suppress proliferation and induce apoptosis in cultured leukemic cells without any influence on the viability of normal lymphocytes. Phenothiazines Leukemia[J]. *Cancer Chemother pharmacol*, 2004, 53(3): 267-275
- [5] Liu H T, Gibson G W, Hirschhorn R R, et al. Expression of thymidine kinase and dihydrofolate reductase genes in mammalian mutants of the cell cycle [J]. *J Biol Chem*, 1985, 260(6): 3269-3274
- [6] Rasmussen C D, Means A R. Calmodulin is required for cell-cycle progression during G₁ and mitosis[J]. *EMBO J*, 1989, 8(1): 73-82
- [7] Means A R, VanBerkum M F A, Bagchi I, et al. Regulatory functions of calmodulin [J]. *Pharmacol Ther*, 1991, 50(2): 255-270
- [8] Karmakar P, Natarajan A T, Ramendra K, et al. Induction of apoptosis by phenothiazine derivatives in V79 cells [J]. *Toxicology Letters*, 2001, 125(3): 19-28
- [9] Masaharu T, Hiroyasu I, Miyako B, et al. Inhibition by the calmodulin antagonist trifluoperazine of experimental hepatocarcinogenesis induced by *N*-nitrosomorpholine in Sprague-Dawley rats[J]. *Cancer Letters*, 1996, 107(2): 179-185
- [10] Demeter A, Abonyi M, Look K Y, et al. Differences in thermostability of thymidine kinase isoenzymes in normal ovary and ovarian carcinoma [J]. *Anticancer Res*, 2001, 21(1A): 353-358
- [11] Paunesku T, Mittal S, Protic M. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): ringmaster of the genome [J]. *Int J Radiat Biol*, 2001, 77(10): 1007-1021
- [12] Levin D S, Bai W, Yao N, et al. An interaction between DNA ligase I and proliferating cell nuclear antigen: implications for okazaki fragment synthesis and joining[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(18): 12863-12868
- [13] Kurki P, Vanderlaan M, Dolbear F, et al. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA/cyclin) during the cell cycle [J]. *Exp Cell Res*, 1986, 166(1): 209-219
- [14] Kauffman M G, Kelly T J. Cell cycle regulation of thymidine kinase: residues near the carboxyl terminus are essential for the specific degradation of the enzyme at mitosis [J]. *Mol Cell Biol*, 1991, 11(5): 2538-2546