·基础研究·

不同转移潜能鼻咽癌细胞钙电流特征与细胞迁徙能力的相关性

刘书静[1]，田道法[1]，何迎春[1]，曾　亮[2]，黄　辰[3]，刘宇勤[1]

Correlation of Ca^{2+} Current Features of Nasopharyngeal Carcinoma Cells with Different Metastatic Potentiality to Their Moving Abilities

LIU Shu-Jing[1], TIAN Dao-Fa[1], HE Ying-Chun[1], ZENG Liang[2], HUANG Chen[3], LIU Yu-Qin[1]

1. 湖南中医药大学中西医结合学院，湖南 长沙 410007
2. 湖南省肿瘤医院病理科，湖南 长沙 410018
3. 西安交通大学医学院中心实验室，陕西 西安 710061

1. College of Integrative Medicine, Traditional Chinese Medicine University of Hunan Province, Changsha, Hunan, 410007, P. R. China
2. Department of Pathology, Hunan Provincial Tumor Hospital, Changsha, Hunan, 410018, P. R. China
3. Central Research Laboratory, Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi, 710061, P. R. China

通讯作者：田道法
Correspondence to：TIAN Dao-Fa
Tel：86-731-5381113
Fax：86-731-5516519
E-mail：tiandaofa@163.com

基金项目：国家自然科学基金项目（No. 30271678，No. 30572408）；国家研究生教育与学位中心基金项目（No. 2003-46-08）；国家中医药管理局中医药科研基金项目（No. 02-03JP29）；湖南省"十五、十一五"重点学科建设项目（No. 2001-2010）

Grants：National Natural Science Foundation of China（No. 30271678，No. 30572408）；Foundation from National Postgraduate Education and Degree Center（No. 2003-46-08）；Scientific Research Foundation from State Bureau of Traditional Chinese Medicine（No. 02-03JP29）；Key Subject Supporting Foundation for the Tenth and Eleventh Five-Year Planning Projects of Hunan Province（No. 2001-2010）

收稿日期：2006-09-12
修回日期：2006-12-18

[ABSTRACT] BACKGROUND & OBJECTIVE: The metastatic potentiality of malignancies is closely associated with their biological dynamic properties, which are affected by intracellular Ca^{2+} current activity. This study was to investigate the correlation of Ca^{2+} current features of sub-clonal nasopharyngeal carcinoma (NPC) cell lines 5-8F and 6-10B with different metastatic potentiality to their moving abilities. METHODS: 5-8F cells, with higher metastatic potentiality, and 6-10B cells, with lower metastatic potentiality, were cultured with herbal medicine-containing serum, which holds significant metastasis-inhibiting effect on tumor cells. Cell proliferation was assessed by MTT assay. The expression of nm23-H1 was detected by Western blot. Intracellular Ca^{2+} current features were detected with patch clamp technique in a whole cell recording way, while cell moving ability was determined by streak culturing assay. RESULTS: The expression of nm23-H1 was significantly lower in 5-8F cells than in 6-10B cells (2.3±0.2 vs. 2.9±0.4). The Ca^{2+} release-activated Ca^{2+} influx current (I_{CRAC}) was significantly lower in 5-8F cells than in 6-10B cells [(−1.39±0.36) nA vs. (−0.66±0.40) nA, $P < 0.05$]. The number of cells moved across the streak was significantly higher in 5-8F cells than in 6-10B cells (350±3 vs. 246±1, $P< 0.05$). When cultured with herbal medicine-containing serum, no significant difference in proliferation was found between 5-8F cells and 6-10B cells; the expression of nm23-H1 was significantly higher in 5-8F cells than in 6-10B cells (3.9±0.1 vs.1.0±0.1, $P<0.05$); the I_{CRAC} was decreased to (−1.27±0.35) nA in 5-8F cells and decreased to (−0.37±0.23) nA in 6-10B cell, and the inhibition rate was significantly higher in 5-8F cells than in 6-10B cells [(1.90±0.47)% vs. (0.46±0.12)%, $P < 0.05$]; the number of cells moved across the streak was significantly lower in 5-8F cells than in 6-10B cells (94±6 vs. 229±6, $P < 0.05$). CONCLUSIONS: There are significant differences in nm23-H1 protein expression, I_{CRAC} level and cell moving ability between 5-8F and 6-10B cells. Medicine intervention could inhibit Ca^{2+} current and moving ability of 5-8F cells, and meanwhile increase the nm23-H1 activity.

KEYWORDS: Nasopharyngeal neoplasm; Sub-clonal cell lines; Ca^{2+} current features; Metastatic potentiality

【摘　要】 背景与目的：肿瘤转移活性与瘤细胞以迁徙运动潜能为代表的生物力学特性有关，而其迁移运动的生物力学机制又受制于细胞内的钙离子活动和钙电流特征。本文探讨不同转移潜能鼻咽癌单克隆亚系细胞钙电流特征，及与细胞迁徙运动潜能的相关性。方法：人鼻咽癌高转移潜能细胞株 5-8F 及低转移潜能细胞株 6-10B 分别与 10%含药血清（由黄芪、党参、白花蛇舌草等组成）共同培

养，MTT 法检测含药血清对细胞增殖的影响，Western blot 检测 nm23-H1 蛋白表达水平。利用全细胞膜片钳制方法观察细胞钙电流特征（药物作用 20 min），划痕实验观察细胞迁移能力（药物作用 24 h），比较分析其相关性。结果：6-10B 细胞的 nm23-H1 表达水平（2.9±0.4）较 5-8F 细胞（2.3±0.21）高（$P<0.05$）。5-8F 细胞内钙释放激活的钙电流 I_{CRAC} 为（−1.39±0.36）nA，与 6-10B 细胞 I_{CRAC}［（−0.66±0.40）nA］相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。通过划痕区的 5-8F 细胞数（350±3）也显著高于 6-10B 细胞（246±1）（$P<0.05$）。应用含药血清干预后，5-8F 和 6-10B 细胞增殖活性差异无统计学意义（$P>0.05$），5-8F 细胞的 nm23-H1 表达水平（3.9±0.1）明显高于 6-10B 细胞（1.0±0.1）（$P<0.05$）。干预后，5-8F 细胞 I_{CRAC} 降至（−1.27±0.35）nA，平均抑制幅度为（1.90±0.47）%；6-10B 细胞则降至（−0.37±0.23）nA，平均抑制幅度为（0.46±0.12）%，两者差异有统计学意义（$P<0.05$），并出现与钙电流变化特点平行的细胞迁移能力变化，通过划痕线的 5-8F 细胞数明显减少（94±6），而 6-10B 细胞则受影响甚小（229±6，$P<0.05$）。干预前后 5-8F 细胞迁移能力变化具有显著性（$P<0.05$），6-10B 细胞则无显著性差异（$P>0.05$）。结论：不同转移潜能鼻咽癌细胞钙电流特征及细胞迁移能力以及 nm23-H1 表达存在明显差异。应用含药血清干预后，高转移潜能细胞 5-8F 出现了与细胞钙电流 I_{CRAC} 降低幅度相平行的细胞迁移能力抑制，药物血清可增加 5-8F 细胞的 nm23-H1 活性。

关键词：鼻咽肿瘤；单克隆亚系细胞；钙电流特征；转移潜能

中图分类号：R739.63　　文献标识码：A

文章编号：1000−467X(2007)05−0473−07

肿瘤转移是一个相当复杂的过程，涉及众多环节和因素。迄今为止，多角度的探讨取得了显著成绩，发现了不少可能的干预靶点。然而，对肿瘤转移本质问题的研究仍未获得突破性进展，以致许多肿瘤患者最终死于广泛的远处转移。肿瘤转移过程始于瘤细胞自原发病灶向周围组织，特别是基底膜外间质的浸润和迁徙，而该过程必然涉及细胞运动及激发其运动的基本环节——生物电活动，亦即细胞生物力学过程。从生物力学角度探讨肿瘤转移机制及潜在的干预靶点，有可能开启肿瘤转移研究之蹊径，提高抗肿瘤转移的临床疗效。

细胞迁移运动的激发始于生物电活动，而研究细胞生物电活动的有效工具是膜片钳制技术，通过离子通道的离子电流来反映细胞膜上离子通道分子活动，以了解生物膜离子通道的门控动力学特征及其通透性、选择性等膜信息，推断离子通道的生理学、病理学和药理学特性，以及离子通道变化对细胞功能的影响。本研究中我们以该技术为主，结合 Western blot 和划痕实验及药物干预实验，研究了不同转移潜能鼻咽癌单克隆亚系细胞 5-8F 和 6-10B 的转移相关生物力学特性，及抑瘤药物的干预效应。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验细胞　人鼻咽癌高转移潜能细胞株 5-8F 及低转移潜能细胞株 6-10B 由湘雅医学院提供。

1.1.2　实验动物　10~12 个月龄 SD 大白鼠 12 只，雌雄各半，体重 275~365 g。由湖南中医药大学实验动物中心提供，合格证号：24-002。

1.1.3　抑瘤中药组方及其制备　抑瘤中药复方由黄芪、党参、白花蛇舌草等组成。一次性购回，经鉴定后，煮沸过滤，50℃水浴中浓缩成含 1 g/ml 生药的药液，抽滤除菌，4℃保存备用。

1.1.4　主要试剂　胰蛋白酶、RPMI-1640 培养基（Gibco 公司）、胎牛血清（北京鼎国公司）、DMSO（Sigma 公司）等均为分析纯。鼠抗人 nm23（福州 Maxim），ECL（sc-2048）、山羊抗兔 Actin 抗体（sc-1616）为 Santa Cruz 产品，二抗兔抗山羊 IgG/HRP（02B-2306）、羊抗鼠 IgG/HRP（02B-2305）购自北京中山公司。细胞外液Ⅱ：NaCl 140 mmol/L，KCl 2.8 mmol/L，$CaCl_2$ 10 mmol/L，$MgCl_2$ 0.5 mmol/L，葡萄糖 11 mmol/L，HEPES 10 mmol/L；细胞内液Ⅱ：谷氨酸 145 mmol/L，NaCl 8 mmol/L，$MgCl_2$ 1 mmol/L，Mg-ATP 0.5 mmol/L，EDTA 10 mmol/L，HEPES 10 mmol/L；细胞外液Ⅰ：NaCl 135 mmol/L，$BaCl_2$ 10 mmol/L，KCl 5 mmol/L，$MgCl_2$ 1 mmol/L，Na-HEPES 10 mmol/L；细胞内液Ⅰ：$CaCl_2$ 30 mmol/L，Na_2EDTA 2 mmol/L，Na_2ATP 2 mmol/L，Na-HEPES 10 mmol/L。上述溶液 pH 值均调至 7.3，实验在室温下进行。

1.2　实验方法

1.2.1　细胞培养　用含 10%胎牛血清的 RPMI-1640 培养基分别制备 5-8F、6-10B 细胞悬液，在 37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养、传代，至细胞处于对数生长期时，再按实验要求调成所需细胞密度。

1.2.2　抑瘤中药复方含药血清制备　11 个月龄健康 SD 大鼠预适应 1 周后开始给药。中药组灌胃抑瘤中药复方制备的药物煎夜，按文献[1]提出的公

式计算等效剂量：给药剂量=临床常用量×动物等效面积系数×培养基内血清稀释度。给药量为10.4 $g \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，每天2次，连续给药3天。空白组动物正常饲养。

末次给药1 h后从颈总动脉取血采血[2]，37℃促凝。2 000 r/min离心取血清。56℃水浴30 min灭活，0.22 μm滤膜抽滤除菌，-20℃保存，2个月内使用。

1.2.3 MTT法检测含药血清的细胞毒作用 含10%胎牛血清的RPMI-1640培养基（内含青霉素、链霉素各100 u/ml及HEPES 25 mmol/L）培养细胞、传代。取对数生长期5-8F、6-10B细胞，含10%胎牛血清培养液配成1×10^4/ml密度，分别接种于96孔培养板（每孔200 μl）。24 h后大部分细胞贴壁时，换无血清RPMI-1640培养基促使细胞生长同步化。培养24 h后吸弃无血清培养液，随机分为空白组、正常大鼠血清对照组和含药血清组。含药血清组各孔中分别加入不同浓度的含药血清（2.5%、5%、10%、20%、40%），空白组加入不同浓度的胎牛血清，正常大鼠血清对照组各孔加入正常大鼠血清（2.5%、5%、10%、20%、40%）。每孔100 μl，每个浓度分别设3个复孔，37℃、5% CO_2、饱和湿度条件下培养24 h。每孔加5 mg/ml MTT 10 μl，继续培养4 h。再于每孔加盐酸-异丙醇100 μl，室温30 min显色，在酶标仪上测570 nm波长处吸光度（A）值。按下式计算细胞毒活性：细胞毒活性=（1-实验组A均值/空白对照组A均值）×100%。以活性值大于20%作为有统计学意义的判断标准。

1.2.4 Western blot检测细胞中nm23-H1蛋白表达 分别在无血清和无生长因子条件下培养传代5-8F、6-10B细胞，对照组用无血清培养基，实验组加10%含药血清，分别培养24 h，收集细胞，抽提总蛋白。细胞于液氮和37℃水浴中反复冻融3次，15 000 r/min离心15 min（4℃），收集上清液，-20℃保存备用。蛋白提取和检测参照文献[3]方法，分析比较含药血清干预前后nm23-H1蛋白的表达。

1.2.5 全细胞膜片钳制方法检测细胞钙电流特征 （1）细胞分组：分别以含10%胎牛血清的培养液培养5-8F、6-10B细胞至对数生长期，然后收集细胞，分别接种于35 mm培养皿中，37℃、5% CO_2培养箱内培养至贴壁，继而随机分组。实验组细胞培养皿中加10%含药血清培养液，对照组加等体积含10%胎牛血清的培养液，孵育20 min[2]，进行膜片钳制实验。

（2）细胞膜离子电流的全细胞式记录 将灌注细胞内液的玻璃微电极压在细胞表面，形成30~200 MΩ的高电阻封接，负压吸引，使膜片与微电极紧密接触，形成1 GΩ的高阻封闭。再稍加负压吸引，使电极尖端的膜片破裂，电极内液和细胞内液相通，成为和细胞内电极记录的相同状态，即可记录到一个整体细胞的电活动，并可进行膜电位固定，以记录细胞膜离子电流的变化。记录的电流在分析软件（P clamp 8.1）中进行测量及分析，将细胞给药前后数据进行配对t检验。

（3）钙电流记录 全细胞膜片钳制方法记录电压依赖性钙电流（voltage-depending calcium electrical current，I_{Ca}）和细胞内钙释放激活的钙电流（electrical current activated with release of intracellular calcium，I_{CRAC}）。细胞外液灌流流速2.0 ml/min。分离细胞置35 mm平放于倒置显微镜上的细胞池中，静置15 min贴壁后，膜片电极封接，使充灌细胞内液的电极电阻达1.0~2.0 MΩ。全细胞状态形成后，P clamp膜片钳发放刺激，记录细胞反应所产生的离子电流活动信号。I_{CA}的电压钳制方案是方波钳制，保持电位-30 mV和-90 mV，波宽200 ms，刺激间隔10 s，指令电位-90~+30 mV，步阶脉冲20 mV。I_{CRAC}电压钳制方案也是方波钳制，保持电位0 mV，波宽200 ms，刺激间隔20 s，指令电位-120~+60 mV，步阶脉冲20 mV。

1.2.6 划痕实验观察细胞迁移能力 无血清和生长因子条件下培养细胞24 h，待生长至单层融合状态时，无菌保险片刀在单层细胞面上划线，形成一条状无细胞间隔区域。洗去细胞碎片，加丝裂霉素预处理2 h，以消除血清和生长因子等诱导有丝分裂效应对细胞增殖活力的影响。随机分组，每组3个样本。对照组细胞继续以无血清培养基培养，实验组培养皿中加10%含药血清培养基继续培养24 h后弃培养液，细胞固定、染色，显微镜下观察由划痕边缘处移行进入无细胞区内的细胞数，以此评判细胞迁移运动能力。每个标本选择10个高倍视野进行细胞计数，取3次计数结果求均值，分别计算各组均数。

1.3 统计学方法

应用SPSS 12.0统计软件对实验数据进行统计分析。多组计量资料满足方差分析条件时进行方差分析，不能满足方差分析条件时作非参数检验；两组比较的计量资料满足t检验条件时进行t检验分析，否则作非参数检验。计数资料作χ^2检验。

2　结　果

2.1　不同浓度含药血清对细胞增殖活力的影响

实验结果显示，随着细胞培养体系中大鼠正常血清浓度和含药血清浓度由低而高逐渐增大，检测到的细胞悬液 A 值也呈相应递增趋势，但在40%血清浓度时，则 A 值出现陡然下降现象（图1）。由于含药血清在浓度为40%时的细胞毒活性大于20%，故取最接近细胞毒活性最大耐受量（20%）的10%含药血清浓度作为实验药物浓度。

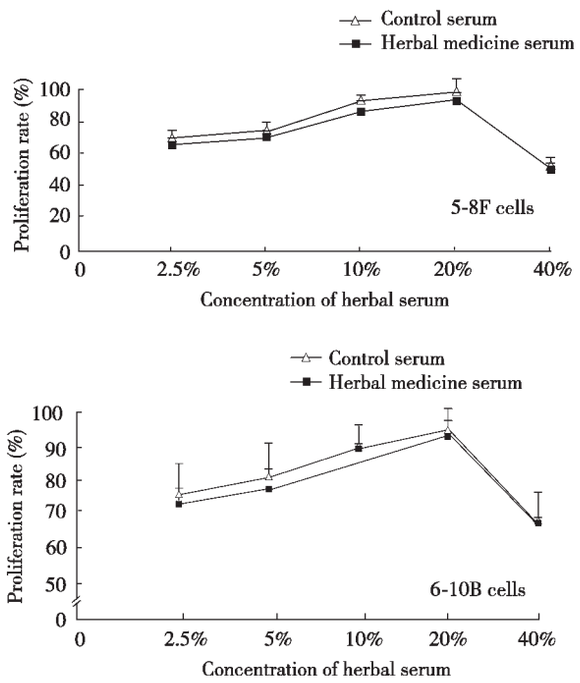

图1　不同浓度含药血清对不同鼻咽癌细胞增殖活性的影响

Figure 1　Effect of herbal medicine-containing serum at different concentrations on the proliferation of different nasopharyngeal carcinoma cells

对比观察不同浓度正常血清和含药血清对5-8F、6-10B细胞增殖活性的影响，目的在于排除因实验药物和动物血清本身对细胞活性的抑制干扰实验结果分析和理论推导。10%、20%含药血清分别作用24 h后，对细胞的增殖抑制作用差异无统计学意义（$P>0.05$）。对照组相应浓度正常血清培养后的鼻咽癌细胞，其增殖刺激作用则分别显著高于对应浓度的含药血清（$P<0.05$）。结果提示，在此实验条件下，实验细胞的基本生命活动没有因为实验药物和动物血清的给予而受到明显抑制，后续实验所观察到的细胞电学特征变化和迁移能力改变，应该可以认为是观察药物对细胞电学活动和迁移相关信号转导环节的直接干预所造成的。

2.2　含药血清干预前后5-8F细胞和6-10B细胞中nm23-H1的水平

分别提取对数生长期5-8F和6-10B细胞总蛋白，Western blot法检测nm23-H1蛋白的表达（图2）。结果显示，在正常培养条件下，6-10B细胞的nm23-H1表达（2.9±0.4）较5-8F细胞（2.3±0.2）高。应用10%含药血清干预24 h后，5-8F细胞的nm23-H1表达（3.9±0.1）显著升高，与6-10B细胞（1.0±0.1）相比差异有统计学意义（$P<0.05$）。同时，应用含药血清处理前后5-8F细胞本身的nm23-H1的表达差异也存在统计学意义（$P<0.05$），而6-10B细胞的nm23-H1表达在应用含药血清处理前后的变化无统计学意义（$P>0.05$）。

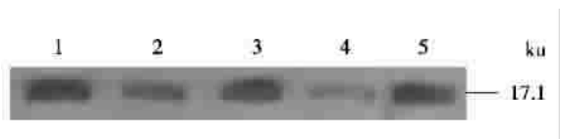

图2　10%含药血清干预前后5-8F、6-10B细胞nm23-H1表达水平

Figure 2　The expression of nm23-H1 in NPC cell lines 5-8F and 6-10B before and after treatment of 10% herbal medicine-containing serum detected by Western blot

Lane 1: control 6-10B cells; lane 2: control 5-8F cells; lane 3: 5-8F cells cultured with herbal medicine-containing serum; lane 4: 6-10B cells cultured with herbal medicine-containing serum; lane 5: GAPDH.

2.3　细胞电压依赖性钙电流（I_{Ca}）测定

在应用细胞内液Ⅰ和细胞外液Ⅰ条件下，采用两种电压钳制方案，各组细胞均未记录到电压依赖性钙电流 I_{Ca}。

2.4　细胞内钙释放激活的钙电流（I_{CRAC}）测定

在应用细胞内液Ⅱ和细胞外液Ⅱ条件下，采用 I_{CRAC} 的电压钳制方案，可以记录到明显的 I_{CRAC}。以连续示波刺激钳制方案记录观察时间延长对 I_{CRAC} 的影响，可见 I_{CRAC} 在5 min内无明显变化。添加10%含药血清共同培养后，两种细胞的胞内 I_{CRAC} 均被抑制。在峰电位下，含药血清处理后的5-8F细胞 I_{CRAC} 由给药前的（−1.39±0.36）nA降低至给药后的（−1.27±0.35）nA，平均抑制幅度（1.901±0.472）%（幅度变化差值比较 $P<0.05$，见图3A）；而在6-10B细胞，电流幅值由给药前的（−0.66±0.40）nA降至给药后的（−0.37±0.23）nA（图3B），平均抑制幅度（0.463±0.115）%，幅度变化差值比较差异有统计学意义（$P<0.05$）。

从图 3 电流-电压关系曲线可见，在各个指令电位下，10%含药血清使 I_{CRAC} 降低，但不影响翻转电位（图 3C）。含药血清处理前 5-8F 细胞的电流幅值均值明显大于 6-10B 细胞，差异具有显著性（$P<0.05$）。经含药血清处理后，5-8F 细胞电流幅值的平均抑制率也明显大于 6-10B 细胞。

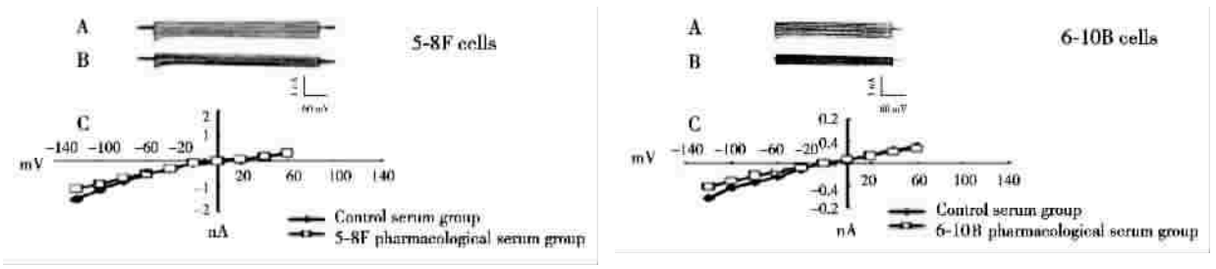

图 3　含药血清干预效应对 5-8F 和 6-10B 细胞钙电流 I_{CRAC} 特征的影响

Figure 3　Intervening effects of herbal medicine-containing serum on Ca^{2+} current features of 5-8F and 6-10B cells

A: I_{CRAC} of control cells; B: I_{CRAC} of the cells cultured with herbal medicine-containing serum; C: I-V correlation curves of the recorded data.

2.5　含药血清对 5-8F 和 6-10B 细胞迁移能力的抑制效应

结果显示，未用含药血清干预时，通过划痕区的 5-8F 细胞数为 350±3，显著高于通过划痕区的 6-10B 细胞数（246±1）（$P<0.05$）；应用含药血清干预 24 h 后，通过划痕区的 5-8F 细胞数为 94±6，显著低于通过划痕区的 6-10B 细胞数（229±6）（$P<0.05$）。比较含药血清处理前后两种细胞通过划痕区的细胞数，可见 5-8F 细胞于含药血清处理前后的细胞通过率差异有统计学意义（$P<0.05$），而后者则差异无统计学意义（$P>0.05$）（图 4）。结果提示，干预药物不仅可抑制瘤细胞的迁移运动能力，而且还具有一定程度的相对特异性，即对高转移潜能鼻咽癌细胞 5-8F 的药理学效应远大于低转移潜能的 6-10B 细胞。

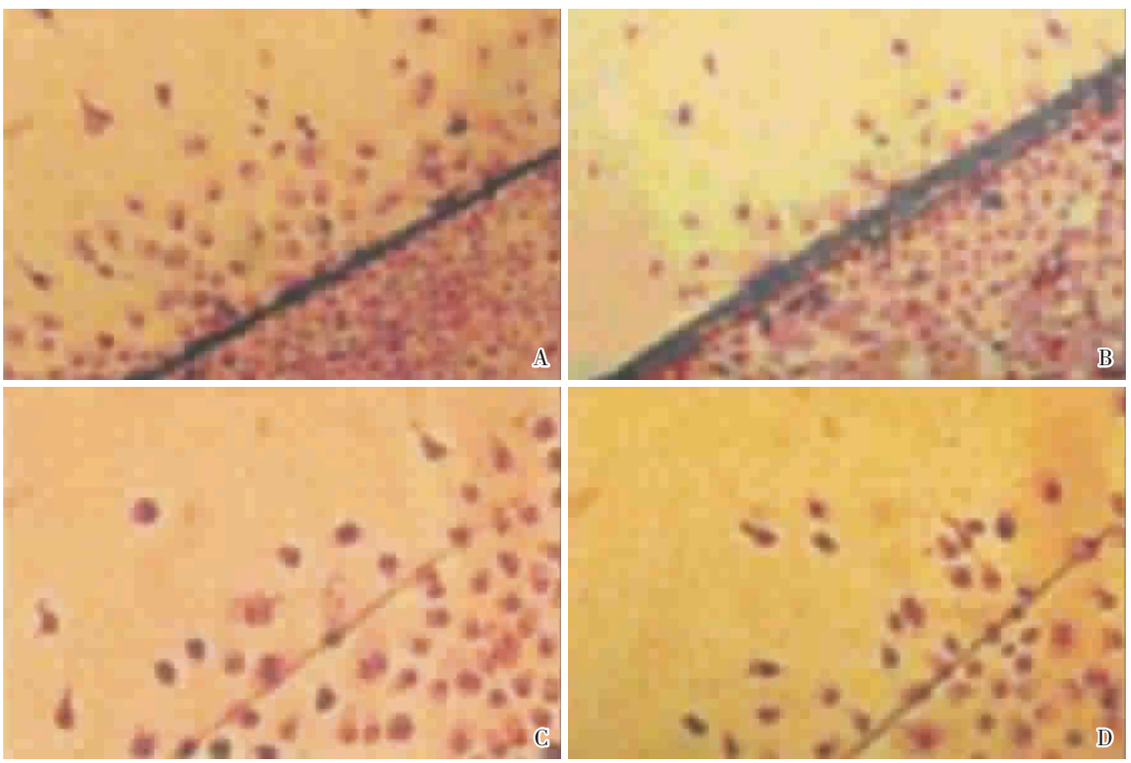

图 4　含药血清对 5-8F 和 6-10B 细胞迁移能力的影响（HE ×10）

Figure 4　Effect of herbal medicine-containing serum on moving activity of 5-8F and 6-10B cells (HE ×10)

A: control 5-8F cells; B: control 6-10B cells; C: 5-8F cells cultured with herbal medicine-containing serum; D: 6-10B cells cultured with herbal medicine-containing serum.

3 讨 论

3.1 5-8F 细胞和 6-10B 细胞的钙电流类型及其对肿瘤抑制药物的反应特征

鼻咽癌高转移潜能细胞株 5-8F 和低转移潜能细胞株 6-10B 为鼻咽癌细胞株 SUNE1 的两个亚株,由中山大学肿瘤防治中心实验室建株[4-6]。由于两株细胞之间存在肿瘤转移抑制基因表达水平的差异,深入研究其生物电学特征及其相关生物力学因素差异,应当有助于研发肿瘤转移高效干预药物。本研究结果显示,应用含 10 mmol/L EDTA 的细胞内液及记录钙释放激活钙电流(I_{CRAC})的钳制方案,明确地观察到了钙释放激活的钙电流,而且 5-8F 细胞电流幅值(−1.39±0.36)nA 明显高于 6-10B 细胞的电流幅值(−0.66±0.40)nA。实验细胞分别经含药血清处理后,都出现了 I_{CRAC} 的抑制效应,5-8F 细胞电流幅值降至(−1.27±0.35) nA,平均抑制幅度(1.901±0.472)%;而 6-10B 细胞降为(−0.37±0.23)nA,平均抑制幅度(0.463±0.115)%。结果表明,5-8F 和 6-10B 细胞的钙电流都是以钙释放激活的钙内流为主,但 5-8F 细胞的电流幅值明显大于 6-10B 细胞。这种电流可以被某些肿瘤转移抑制药物所抑制,而且以转移潜能高的 5-8F 细胞电流幅值受抑更为明显。由此提示,肿瘤细胞的不同转移特性可能与其不同的电学特征以及由此决定的生物力学机制有关,应用针对性药物可以影响其电学特征,而干预该类生物力学特性。特别是高转移潜能细胞 5-8F I_{CRAC} 对肿瘤转移抑制药物的敏感性,可能提示了更为有价值的临床意义。

关于肿瘤细胞的生物电学特征研究,早在 1992 年就已有作者在大鼠胰腺癌细胞 AR4-2J 观察了表面受体激动剂与膜去极化激活时,钙内流特点的相关性,发现该细胞存在电压敏感、可被二氢吡啶抑制的钙通道[7]。随后,又在人类胰腺 β 细胞观察到 3 种电压依赖性内向电流,其中一种高电压激活的钙电流可被二氢吡啶阻断[8]。然而,这些工作并未涉及瘤细胞生物电学特征、相关离子通道与其迁移运动等转移过程具有直接联系的主动生物力学机制。本研究结果有利于直接探讨肿瘤细胞转移相关的主动浸润和迁移机制,及其干预靶点。

3.2 5-8F 细胞和 6-10B 细胞 nm23-H1 表达差异及与细胞钙电流的关系

本研究发现,6-10B 细胞具有较高的 nm23-H1 表达,而其钙电流幅值则比较低。反之,5-8F 细胞的 nm23-H1 表达水平很低,但其钙电流幅值却远高于 6-10B。由此我们认为,nm23-H1 表达与钙电流幅值之间存在一种负相关关系,即具有 nm23-H1 高表达的低转移潜能细胞表现低幅值的钙电流,而低表达的高转移潜能细胞则表现高幅值的钙电流。该现象再次提示,钙电流幅值与 nm23-H1 蛋白水平的失衡关系,可能参与了由钙电流决定的瘤细胞主动迁移过程等生物力学机制。

nm23-H1 基因持续表达于整个细胞周期,在 S 期达最大表达丰度,通过影响细胞增殖周期而发挥效应[9]。Parker 等[10]利用不同的方法分别诱发了鼠黑色素瘤 B16 细胞的胞内钙升高或降低,观察胞内钙浓度对细胞 nm23 表达活性的影响,结果 nm23 表达水平一致下调,未发现胞内钙浓度变化对 nm23 表达活性的影响。但崔宏等[11]的报道却表明,瘤细胞 nm23 表达水平与其钙电流高低存在正相关关系。也许是不同的实验条件和记录方法对实验结果产生了不同的影响。无论如何,结合对细胞迁移运动实验结果的分析,我们认为 nm23 可能参与细胞侵袭转移信号转导通路,而介导生物电学改变,继而影响瘤细胞的迁移运动和转移潜能的推导能够成立。

3.3 5-8F 细胞和 6-10B 细胞中 nm23-H1 表达水平与细胞迁移运动能力的关系

Western blot 分析表明,含药血清干预前,低转移潜能细胞 6-10B 比高转移潜能细胞 5-8F 具有更高的 nm23-H1 蛋白表达。10%含药血清干预后,5-8F 细胞 nm23-H1 表达反较 6-10B 细胞更强 ($P<0.05$)。同时,处理前后 5-8F 细胞本身的 nm23-H1 表达也存在统计学意义,6-10B 细胞则否,显示了高转移潜能的瘤细胞对于转移干预因素的敏感性明显高于低转移潜能瘤细胞的特点。结果提示,不仅不同转移潜能的鼻咽癌细胞存在肿瘤转移抑制基因表达水平的不同,而且该类基因的表达可以被相关药物所干预,并且处于不同表达状态的同一肿瘤转移抑制基因对于相关干预因素的反应性也存在显著性差异。该特点似乎与不同分化程度的鼻咽癌细胞对于放射敏感性的反应性差异相似。

为深入分析不同转移潜能鼻咽癌细胞同类肿瘤转移抑制基因活性表达差异与各自细胞钙电流特征的关系,及其在细胞迁移运动中的意义,本研究应用划痕实验同时观察了 5-8F 细胞和 6-10B 细

胞的迁移运动能力，并分析其运动能力与 nm23-H1 蛋白表达水平的相关性。结果表明,药物干预前,5-8F 细胞通过划痕区的细胞数(350±3)显著高于 6-10B 细胞(246±1),提示高转移潜能鼻咽癌细胞比低转移潜能细胞具有更强的迁移运动能力。药物干预后,通过划痕区的 5-8F 细胞数目(94±6)反而显著低于 6-10B 细胞(229±6)。药物处理前后通过划痕区的 5-8 细胞数具有显著性,6-10B 细胞在用药前后的变化差异则无统计学意义。这一实验结果所显示的生物学行为特点，与不同细胞的 nm23-H1 表达特点及其对干预因素的反应性相同。结果再次提示,与 nm23-H1 表达对干预因素的反应性特点一样,5-8F 细胞的迁移运动能力对干预因素也更为敏感。在此,瘤细胞迁移能力对干预药物的反应与其 nm23-H1 表达对干预药物的反应之间的负相关关系，均反映了肿瘤转移潜能抑制这一相同事实。

钙电流和迁移运动能力的变化,就与肿瘤转移相关的细胞运动本质而言,涉及细胞的生物力学过程,nm23 表达变化对瘤细胞的生物力学过程产生负性影响。肿瘤转移抑制药物的药理效应，或许只是促进或调节了 nm23 蛋白对瘤细胞的该类转移相关生物力学过程的负性影响,特别是通过影响瘤细胞的电学特性而干预瘤细胞迁移运动能力,以达到降低瘤细胞浸润、转移活力的目的。然而,包括肿瘤转移机制是复杂的,既涉及到宿主自身的免疫机能抑制[12],也与瘤细胞生物学特性密切相关,抑瘤中药成分的复杂性也决定了其药理作用的广泛性[13]。因此,为研发有效的抗鼻咽癌转移制剂,还得从多途径进行深入的研究。

[参 考 文 献]

[1] 王力倩，李仪奎，符胜光，等. 血清药理学方法研究探索[J]. 中药药理与临床，1997,13(3):29-31.

[2] 李仪奎. 中药血清药理学实验方法的若干问题[J]. 中药新药与临床药理，1999,10(2):95-98.

[3] 梁国栋. 最新分子生物学技术[M]. 北京:科学出版社，2001:315.

[4] 吴荫棠,汪慧民,杨小平,等. 鼻咽癌裸鼠移植瘤及其相应体外细胞株的建立与特性研究[J]. 癌症，1995,14(2):83-86.

[5] 宋立兵,汪慧民,曾木圣,等. 鼻咽癌细胞株 SUNE-1 异质性研究[J]. 癌症，1998,17(5):324-327.

[6] 宋立兵,鄢 践,简少文,等. 鼻咽癌细胞亚株不同成瘤与转移潜能的分子机制[J]. 癌症，2002,21(2):158-162.

[7] Bird G S, Takemura H, Thastrup O, et al. Mechanism of activated Ca^{2+} entry in the rat pancreatoma cell line AR4-2J[J]. Cell Calcium, 1992,13(1):49-58.

[8] Barnett D W, Pressel D M, Misler S. Voltage-dependent Na^{+} and Ca^{2+} currents in human pancreatic islet β-cells: evidence for roles in the generation of action potential and insulin secretion[J]. Pflugers Arch, 1995,431(2):272-282.

[9] Caligo M A, Cipollini G, Berti A, et al. NM23 gene expression in human breast carcinomas: loss of correlation with cell proliferation in the advanced phase of tumor progression[J]. Int J Cancer, 1997,74(1):102-111.

[10] Parker C, Sherbet G V. Modulators of intracellular Ca^{2+} and calmodulin inhibitor after the expression of metastatic-associated gene MTS1 and NM23 in metastatic variants of the B16 murine melanoma[J]. Melanoma Res, 1992,2(5-6):337-343.

[11] 崔 宏，何三光，刘永锋，等. nm23 基因参与肿瘤转移抑制机制的研究[J]. 中国医科大学学报，1999,28(6):428-430.

[12] 田道法，陶正德. 鼻咽癌患者白细胞粘附抑制实验[J]. 癌症，1990,9(5):413-414.

[13] 唐发清，田道法. 黄连及其复方对鼻咽癌裸鼠复种移植瘤的抑制作用[J]. 癌症，1995,14(6):459-460.

[编辑及校对:张菊]