

## 氟代柠檬酸对体外培养的神神经胶质瘤细胞 G422 增殖的抑制效应

瞿家桂<sup>1,2</sup>, 王正波<sup>2</sup>, 董锦润<sup>2</sup>, 马原野<sup>2,3,4,\*</sup>

(1. 中国科学技术大学 生命科学学院, 安徽 合肥 230026; 2. 中国科学院昆明动物研究所 灵长类认知实验室, 云南 昆明 650223;  
3. 中国科学院昆明灵长类研究中心, 云南 昆明 650223; 4. 昆明 Biomed International, 云南 昆明 650223)

**摘要:** 为研究氟代柠檬酸 (Fluorocitrate) 对体外培养的神神经胶质瘤细胞生长的影响, 采用 MTT 法研究不同的氟代柠檬酸浓度 (0.0025 mmol/L, 0.005 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L 和 0.1 mmol/L) 和作用时间 (36h, 48h 和 60h) 对神经胶质瘤细胞 G422 增殖的影响。结果发现: (1) 氟代柠檬酸可抑制 G422 细胞的增殖, 并且其抑制作用随氟代柠檬酸浓度的增加而增强; (2) 高浓度 (0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L 和 0.1 mmol/L) 氟代柠檬酸对 G422 细胞的增殖抑制作用随作用时间的延长而增强; (3) 低浓度 (0.0025 mmol/L 和 0.005 mmol/L) 氟代柠檬酸对 G422 细胞的增殖抑制作用不随作用时间的延长而改变。实验表明, 氟代柠檬酸能够抑制神经胶质瘤细胞的增殖, 其抑制能力随氟代柠檬酸浓度的增加和作用时间的延长而加强。

**关键词:** 氟代柠檬酸; 神经胶质瘤细胞; MTT; 增殖; 抑制效应

中图分类号: Q42 文献标识码: A 文章编号: 0254-5853(2008)04-0427-04

## Inhibitory Effect of Fluorocitrate on the Proliferation of Cultured Glioblastomas G422 Cells

QU Jia-gui<sup>1,2</sup>, WANG Zheng-bo<sup>2</sup>, DONG Jin-run<sup>2</sup>, MA Yuan-ye<sup>2,3,4,\*</sup>

(1. School of Life Science, University of Science and Technology of China, Hefei Anhui 230026, PR China; 2. Laboratory of Primate Neuroscience Research and Key Laboratory of Animal Models and Human Disease Mechanisms, Kunming Institute of Zoology, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, PR China; 3. Kunming Primate Research Center, the Chinese Academy of Sciences, Kunming Yunnan 650223, PR China; 4. Kunming Biomed International, Kunming Yunnan 650223, PR China)

**Abstracts:** In the present study, the effects of fluorocitrate on the proliferation of cultured glioblastomas G422 cells were investigated. Proliferation of glioblastomas G422 cells was measured by MTT assay at 36h, 48h and 60h after fluorocitrate (0.0025 mmol/L, 0.005 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L and 0.1 mmol/L) treatment. Our results showed that: (1) Fluorocitrate inhibited the proliferation of glioblastomas G422 cells in a dose dependent manner; (2) The inhibition rate increased with treatment time at high concentrations of fluorocitrate (0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L and 0.1 mmol/L); (3) The inhibition rate did not increase with treatment time at low concentrations of fluorocitrate (0.0025 mmol/L and 0.005 mmol/L). This study indicated that fluorocitrate inhibited the proliferation of glioma cells as a function of fluorocitrate concentration and treatment time.

**Key words:** Fluorocitrate; Glioma cells; MTT; Proliferation; Inhibitory effect

氟代柠檬酸 (Fluorocitrate) 是氟醋酸盐 (Fluoroacetate) 在生物代谢中的产物 (Peters,

1952)。它可竞争性抑制细胞三羧酸循环中顺乌头酸酶的活性 (Morrison & Peters, 1954; Villafranca &

收稿日期: 2008-03-17; 接受日期: 2008-04-25

基金项目: National Science Foundation of China (30470553, 30530270, 30670669, 30770700); 973 program (2005CB522803, 2007CB947703); 863 program (07013810, 2006AA02A116); the Major State Basic Research of China (2003CB716600); Chinese-Finnish International Collaboration Project-neuro (30621130076); Program of CASC (KSCX1-YW-R-33, YZ200737); National Key Technologies R&D Program; Yunnan Science and Technique Program (2006PT08-2)

\*通讯作者 (Corresponding author), E-mail: yuanma0716@vip.sina.com

第一作者简介: 瞿家桂, E-mail: qujiagui@mail.ustc.edu.cn

Platus, 1973), 从而阻断细胞的三羧酸循环。早期的研究发现腹腔注射氟代柠檬酸可抑制移植在小鼠腋下的腺癌瘤 755 的生长(Dietrich & Shapiro, 1956)。在神经系统中氟代柠檬酸对细胞代谢的抑制是特异性的。体内和体外的实验都证明, 氟代柠檬酸在一定的浓度范围内只抑制神经胶质细胞的三羧酸循环而不影响神经元的代谢(Hassel et al, 1992; Hassel et al, 1995)。神经胶质细胞的三羧酸循环和神经元不同, 前者以醋酸盐为代谢底物, 与谷氨酰胺的合成有关; 后者以葡萄糖为代谢底物, 不能代谢醋酸盐, 与谷氨酰胺的合成无关(Berl & Clarke, 1969; Martinez-Hernandez et al, 1977)。Fonnum et al(1997)认为氟代柠檬酸这种特异性的抑制作用产生的原因是只有神经胶质细胞才能摄入氟代柠檬酸。目前, 氟代柠檬酸因其特异性的对神经胶质细胞的抑制作用, 已成为研究神经胶质细胞功能及其与神经元之间关系的一种常用工具药。

神经胶质瘤是颅内常见恶性肿瘤, 其呈浸润性生长, 外科手术无法将其全部切除。残留的神经胶质瘤细胞增殖能力非常强, 神经胶质瘤经常会在手术后的一至两年内复发, 很难根治。神经胶质瘤细胞来源于神经胶质细胞(Escourolle et al, 1978), 那么, 氟代柠檬酸对神经胶质瘤细胞的增殖是否具有抑制作用? 目前尚缺乏实验数据。由于动物体内环境相当复杂, 不利于研究氟代柠檬酸和肿瘤细胞间的直接关系, 而体外培养的环境简单可控, 且可直接研究氟代柠檬酸对神经胶质瘤细胞的作用。在本实验中, 我们将采用体外培养的方法研究氟代柠檬酸对神经胶质瘤细胞的影响。此研究将为探讨神经胶质瘤细胞的代谢特点打下基础, 同时也可能为神经胶质瘤的治疗找到一种新的化疗药物。

## 1 材料和方法

### 1.1 药物

Ba-fluorocitrate 为 SIGMA 公司产品, 参照(Paulsen et al, 1987)方法配制 1mmol/L 氟代柠檬酸母液, 并用生理盐水将氟代柠檬酸稀释为 0.25 mmol/L, 0.1 mmol/L, 0.05 mmol/L, 0.025 mmol/L 四个浓度梯度。

### 1.2 仪器

酶标仪 (BIO-RAD), CO<sub>2</sub> 恒温培养箱 (SHELLAB), SW-CJ-IB 超净工作台 (中国苏州净化设备厂)。

### 1.3 细胞株

实验所用小鼠神经胶质瘤细胞株 G422 购自北京天坛医院。细胞培养于 RPMI1640 培养基。培养基由 RPMI1640 (GIBCO)、10% 小牛血清 (杭州四季青公司) 和 0.1% 青霉素、链霉素配制而成。将细胞分两组: 对照组 (加 10% 生理盐水) 和药物组 (加 10% 氟代柠檬酸)。

### 1.4 MTT 法测定细胞活力

用噻唑蓝 (MTT, AMRESCO 分装) 还原测定法测定不同剂量药物作用后细胞的存活数(Sobottka & Berger, 1992)。将细胞和药物加入 96 孔板, 每孔细胞数为  $2.5 \times 10^4$ 。设定三个作用时间: 36h, 48h 和 60h, 分别在三块 96 孔板上进行实验。在每块 96 孔板上设定一个对照组和五个药物浓度梯度组, 每组 12 孔。在药物作用相应时间后于 96 孔板的小孔内加入 5mg/mL MTT 10 $\mu$ L, 置 CO<sub>2</sub> 培养箱孵育 4h。3000rpm 离心去上清后用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解 MTT 反应产物甲臜, 用酶联免疫检测仪在 570 nm 波段测定甲臜溶液的 OD 值。用公式

$$\frac{\text{对照组 OD 值} - \text{药物组 OD 值}}{\text{对照组 OD 值}} \times 100\% \quad \text{计算氟代柠檬酸对}$$

G422 细胞增殖的抑制率。

### 1.5 数据处理与分析

数据采用 SPSS13.0 统计软件分析。采用双因素方差分析“药物剂量”与“作用时间”对细胞增殖的影响; 采用单因素方差分析同一时间段不同药物剂量以及同一剂量不同作用时间对细胞增殖的影响。数据采用“平均值 $\pm$ 标准差”表示, 以  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果

双因素方差分析表明, 不同浓度的氟代柠檬酸对 G422 细胞增殖抑制率的影响具有显著差异 [ $F_{(5, 198)} = 1272.609$ ;  $P < 0.001$ ], 各浓度氟代柠檬酸作用时间的长短对 G422 细胞增殖抑制率的影响也具有显著差异 [ $F_{(2, 198)} = 45.885$ ;  $P < 0.001$ ], 并且“作用时间”和“药物剂量”存在交互作用 [ $F_{(10, 198)} = 10.997$ ;  $P < 0.001$ ]。

氟代柠檬酸的所有测试浓度, 0.0025 mmol/L, 0.005 mmol/L, 0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L 和 0.1 mmol/L, 在三个不同作用时间段, 36h, 48h 和 60h, 对 G422 细胞的增殖均具有明显的抑制作用 [36h, 48h 和 60h:  $F_{(5, 71)} = 640.814, 287.081$  和  $269.392$ ;

$P<0.001$  ]。此外, Post-hoc 分析表明三个作用时间段每个浓度的氟代柠檬酸对 G422 细胞增殖的抑制作用是不同的, 其剂量之间的差异具有统计学显著性 ( $P<0.05$ , 图 1)。

高浓度氟代柠檬酸对 G422 细胞增殖的抑制率与其作用时间的长短有关。Post-hoc 分析表明: 低浓度氟代柠檬酸, 0.0025 mmol/L 和 0.005 mmol/L, 分别处理 G422 细胞 36 h, 48 h 和 60 h 后, 其细胞增殖的抑制率不具有显著差异 ( $P>0.05$ ); 高浓度氟代柠檬酸, 0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L 和 0.1 mmol/L,

对细胞增殖的抑制随作用时间的增加而增强, 三个作用时间段对细胞增殖的抑制率具有显著性差异 [ $F_{(2, 35)}=7.738, 27.160$  和  $48.179; P<0.001$  ]。其中 0.01 mmol/L 和 0.025 mmol/L 的氟代柠檬酸, 在 48 h 和 60 h 作用时间段的抑制率均高于 36 h ( $P<0.05$ ), 但 60 h 和 48 h 作用时间段的抑制率之间没有显著差异 ( $P>0.05$ ), 在 0.1 mmol/L 时, 三个作用时间段对细胞增殖的抑制率具有显著性差异 ( $P<0.05$ , 图 2)。

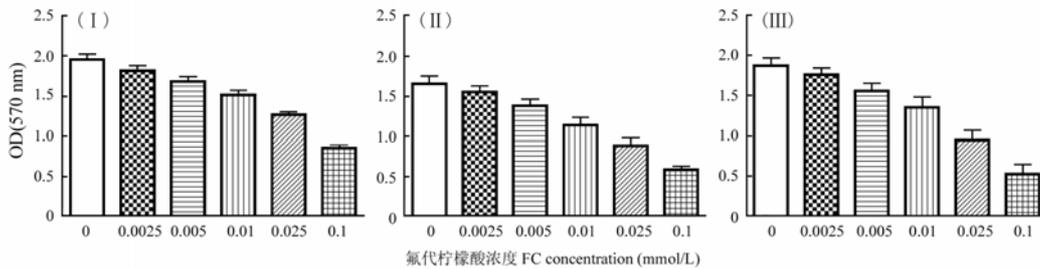


图 1 不同剂量氟代柠檬酸对 G422 细胞增殖的抑制效应

Fig. 1 Inhibitory effect of fluorocitrate (FC) on the proliferation of G422 cells

(I), (II) 和 (III) 分别表示氟代柠檬酸作用 36 h, 48 h 和 60 h 后不同剂量氟代柠檬酸对 G422 细胞增殖的抑制效果。图中数据为各组 OD 值的平均值  $\pm$  标准差 ( $n=12$ )。

(I), (II) and (III) show inhibitory effect of fluorocitrate with different concentrations on the proliferation of G422 cells after fluorocitrate treatment for 36h, 48h and 60h respectively. Data are expressed as mean of OD  $\pm$  SD ( $n=12$ ).

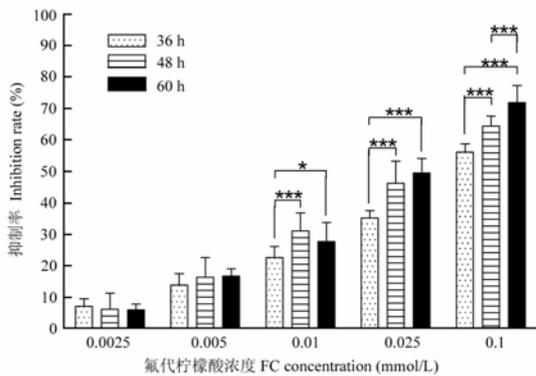


图 2 不同浓度氟代柠檬酸在不同长度作用时间下对 G422 细胞增殖的抑制效应

Fig. 2 Inhibitory effect of fluorocitrate (FC) on the proliferation of G422 cells with different concentrations and treatment times

图中数据为各组平均抑制率  $\pm$  标准差 (每个浓度各时间段  $n=12$ )。

Data are expressed as mean of inhibition rate  $\pm$  SD ( $n=12$  per concentration per time).

\*  $P<0.05$ ; \*\*\*  $P<0.001$ .

在本实验中, 我们研究了氟代柠檬酸对神经胶质瘤细胞 G422 增殖的影响, 结果发现随着剂量的加大和作用时间的延长, 氟代柠檬酸对 G422 细胞增殖的抑制也逐渐增强。该结果与氟代柠檬酸对小鼠腋下腺癌瘤 755 生长的抑制作用是一致的 (Dietrich & Shapiro, 1956)。氟代柠檬酸作为三羧酸循环的一种抑制剂 (Morrison & Peters, 1954; Villafranca & Platus, 1973), 可能是通过抑制 G422 细胞的三羧酸循环来抑制其增殖。在神经系统中小剂量氟代柠檬酸选择性地作用于神经胶质细胞 (Hassel et al, 1992; Hassel et al, 1995), 提示神经胶质瘤细胞和神经胶质细胞在代谢机理上有相似之处。

氟代柠檬酸作用的另一个特点是氟代柠檬酸剂量和作用时间的交互效应, 即低浓度氟代柠檬酸对 G422 细胞的抑制没有时间效应, 而高浓度氟代柠檬酸对 G422 细胞的抑制随作用时间延长而增强。以前的研究发现, 人工合成的氟代柠檬酸对纯化的顺乌头酸酶活性的抑制有两种形式: 在浓度为 0.006 mmol/L 时其对顺乌头酸酶活性的抑制是可逆的; 在浓度为 0.024 mmol/L 时其对顺乌头酸酶的抑

### 3 讨论

制则是不可逆的(Morrison & Peters, 1954)。这与本实验中低浓度氟代柠檬酸(0.0025 mmol/L 和 0.005 mmol/L)对 G422 细胞的抑制没有时间效应,高浓度氟代柠檬酸(0.01 mmol/L, 0.025 mmol/L 和 0.1 mmol/L)对 G422 细胞的抑制随时间延长而增强是相对应的。提示氟代柠檬酸对 G422 细胞作用在剂量和时间上的交互效应产生的原因可能是低浓度氟代柠檬酸对 G422 细胞三羧酸循环的抑制是可逆的,而高浓度氟代柠檬酸对 G422 细胞三羧酸循环的抑制是不可逆的。氟代柠檬酸这种特性在活体动物实验中也有发现。在大鼠纹状体内注射 1 nmol 氟代柠檬酸可导致谷氨酰胺、谷氨酸和天冬氨酸水平的可逆性改变,并且发现神经胶质细胞的超微结构受到损伤;在大鼠纹状体内注射 2 nmol 氟代柠檬酸则可导致谷氨酸等氨基酸水平不可逆的改变,不但神经胶质细胞的超微结构受到损伤,而且神经元的超微结构也受到损伤(Paulsen et al, 1987)。

以前的研究发现,0.02 mmol/L 氟代柠檬酸可对体外培养的正常星形胶质细胞产生抑制作用(Hassel et al, 1994)。而在本实验中,0.0025 mmol/L 氟代柠檬酸即对体外培养的神经胶质瘤细胞 G422

有显著的抑制作用。这提示氟代柠檬酸可能对神经胶质瘤细胞抑制作用更强。

本实验证明了氟代柠檬酸对小鼠神经胶质瘤细胞 G422 的增殖有抑制作用,但氟代柠檬酸对其他动物的神经胶质瘤细胞特别是人的神经胶质瘤细胞的增殖是否有抑制作用尚需进一步研究。此外,氟代柠檬酸全身给药时会影响到肝、肾等细胞的代谢和功能(Chung 1984; Guarriera-Bobyleva & Buffa, 1969)。这决定了氟代柠檬酸治疗神经胶质瘤时只能颅内局部给药,即将氟代柠檬酸直接送入颅内的神经胶质瘤组织或肿瘤切除后的瘤腔。氟代柠檬酸作为治疗神经胶质瘤的化疗药物的潜力和优势在于小剂量氟代柠檬酸不影响神经元代谢,其在抑制神经胶质瘤生长的同时可能不会对神经元的正常功能产生大的影响。

**致谢:** 感谢本实验室付玉同学在数据分析和论文写作上给予的帮助,以及王磊博士在细胞培养,药物配制和文献方面给予的帮助。

## 参考文献:

- Berl S, Clarke DD. 1969. Compartmentation of amino acid metabolism[A]. Handbook of Neurochemistry[M]. Plenum, New York: Lajtha, A, 2: 447-472.
- Chung HM. 1984. Acute renal failure caused by acute monofluoroacetate poisoning[J]. *Veterinary and Human Toxicology*, 26 (Suppl 2): 29-32.
- Dietrich LS, Shapiro DM. 1956. Fluoroacetate and fluorocitrate antagonism of tumor growth; effect of these compounds on citrate metabolism in normal and neoplastic tissue[J]. *Cancer Research*, 16(7): 585-588.
- Escourolle R, Poirier J, De Girolami U. 1978. Manual of Basic Neuropathology[M]. Eastbourne: Holt-Saunders, Butterworth-Heinemann.
- Fonnum F, Johnsen A, Hassel B. 1997. Use of fluorocitrate and fluoroacetate in the study of brain metabolism[J]. *Glia*, 21(1): 106-113.
- Guarriera-Bobyleva V, Buffa P. 1969. The inhibition by fluorocitrate of rat liver mitochondrial and extramitochondrial aconitase hydratase[J]. *The Biochemical Journal*, 113(5): 853-860.
- Hassel B, Paulsen RE, Johnsen A, Fonnum F. 1992. Selective inhibition of glial cell metabolism in vivo by fluorocitrate[J]. *Brain Research*, 576(1): 120-124.
- Hassel B, Sonnewald U, Unsgard G, Fonnum F. 1994. NMR spectroscopy of cultured astrocytes: effects of glutamine and the gliotoxin fluorocitrate[J]. *J Neurochem*, 62(6): 2187-2194.
- Hassel B, Westergaard N, Schousboe A, Fonnum F. 1995. Metabolic differences between primary cultures of astrocytes and neurons from cerebellum and cerebral cortex. Effects of fluorocitrate [J]. *Neurochemical research*, 20(4): 413-420.
- Martinez-Hernandez A, Bell KP, Norenberg MD. 1977. Glutamine synthetase: glial localization in brain[J]. *Science*, 195(4284): 1356-1358.
- Morrison JF, Peters RA. 1954. Biochemistry of fluoroacetate poisoning: the effect of fluorocitrate on purified aconitase[J]. *The Biochemical Journal*, 58(3): 473-479.
- Paulsen RE, Contestabile A, Villani L, Fonnum F. 1987. An in vivo model for studying function of brain tissue temporarily devoid of glial cell metabolism: the use of fluorocitrate[J]. *J Neurochem*, 48(5): 1377-1385.
- Peters RA. 1952. Lethal synthesis[J]. *Proceedings of the Royal Society of London Series B, Containing papers of a Biological character*, 139(895): 143-170.
- Sobottka SB, Berger MR. 1992. Assessment of antineoplastic agents by MTT assay: partial underestimation of antiproliferative properties[J]. *Cancer Chemotherapy and Pharmacology*, 30(5): 385-393.
- Villafranca JJ, Platus E. 1973. Fluorocitrate inhibition of aconitase: reversibility of the inactivation[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 55(4): 1197-1207.