

## 潘生丁抑制平衡型核苷转运蛋白对 5 氟尿嘧啶 在胰腺癌细胞内浓聚的影响

刘胜利<sup>1</sup>, 王晶敏<sup>1</sup>, 鞠煌先<sup>2</sup>, 朱广华<sup>3</sup>, 杜丹<sup>2</sup>, 朱春富<sup>1</sup>, 徐皓<sup>1</sup>, 黄海<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>东南大学医学院附属中大医院, 南京 210009; <sup>2</sup>南京大学化学化工学院, 南京 210009;

<sup>3</sup>东南大学公共卫生学院, 南京 210009)

**【摘要】**目的:研究阻断平衡型核苷转运蛋白(ENTs)后对胰腺癌细胞膜转运 5 氟尿嘧啶(5-FU)能力的影响。方法:培养的 PANC-1 细胞分为 ENTs 阻断组 and ENTs 非阻断组,阻断组用潘生丁将 ENTs 阻断,非阻断组则未用潘生丁。两组培养基中均加入 5-FU 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 。温育 15, 30 min, 1, 2, 4 h 后细胞用橡皮刮取收集。取等量细胞刮取液 2 份各 100  $\mu\text{l}$ , 一份用毛细管区带电泳测定细胞内 5-FU 总量, 另一份用作平行样本测定总蛋白含量。根据平行样本细胞总蛋白来确定细胞数, 再依细胞体积计算单细胞内药物浓度。结果: ENTs 非阻断组细胞内 5-FU 浓度在 15 min 内上升较快, 达 66.99  $\pm$  10.16  $\text{pg}/\text{nl}$ , 为培养基中 5-FU 浓度的 67%, 30 min 为 83.75  $\pm$  5.333  $\text{pg}/\text{nl}$ , 1 h 达高峰(92.86  $\pm$  1.604  $\text{pg}/\text{nl}$ ), 为培养基中 5-FU 浓度的 93%, 以后处于平台。ENTs 阻断组细胞内 5-FU 浓度上升较慢, 15 min 仅为 ENTs 非阻断组浓度的 68.65%; 30 min 为 ENTs 非阻断组浓度的 70.66%; 1 h 达 ENTs 非阻断组的最高浓度; 但此后 ENTs 阻断组细胞内 5-FU 浓度仍继续升高, 2 h 达 138.3  $\pm$  9.769  $\text{pg}/\text{nl}$ , 为 ENTs 非阻断组的 1.64 倍( $P < 0.01$ )。结果提示, 完全阻断 ENTs 后早期细胞内 5-FU 浓度上升较慢, 但随着细胞在 5-FU 内暴露时间延长, 5-FU 在细胞内浓聚作用明显。结论: 阻断胰腺癌细胞膜上 ENTs 核苷转运蛋白可增加 5-FU 在细胞内的浓聚。

**【关键词】** 胰腺癌; 核苷转运蛋白; 5-氟尿嘧啶; 潘生丁; 毛细管区带电泳

**【中图分类号】** R965 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-5048(2003)06-0544-05

核苷是细胞合成核酸的重要物质。除重新合成途径外, 细胞可通过核酸的补救合成途径即重新利用核酸代谢产物或利用细胞外核苷来合成核酸<sup>[1]</sup>。核苷具有亲水性, 细胞外核苷需借助细胞膜上核苷转运蛋白才能进入细胞。迄今发现的核苷转运蛋白分为两大类, 即平衡型核苷转运蛋白(Equilibrative Nucleoside Transporters, ENTs)和钠浓度依赖型核苷转运蛋白( $\text{Na}^+$  Concentrative Dependent Nucleoside Transporters, CNTs)<sup>[2]</sup>。临床常用治疗胰腺癌的核苷类化疗药物亦需借助核苷转运蛋白才能进入细胞<sup>[3]</sup>。有报道显示, 核苷转运蛋白抑制剂如潘生丁(dipyridamole)、地拉唑(dilazep)及其衍生物, 可通过调节药物进出细胞过程或干扰核酸合成的补救途径来增强核苷类化疗药物的抗癌效果<sup>[4]</sup>。因此, 抑制有关引起药物向细胞外返流的核苷转运蛋白如 ENTs, 可能有提高细胞内药物有效浓度的潜在作用。胰腺癌预后很差, 5 年总生存率不到

4%<sup>[5]</sup>。虽然化疗是辅助治疗胰腺癌的重要手段, 但是胰腺癌细胞对化疗药物多存在固有或获得性阻抗<sup>[6]</sup>。本文研究 5-FU 在胰腺癌细胞株 PANC-1 内的浓聚过程, 并研究用潘生丁将 ENTs 核苷转运蛋白阻断后对 5-FU 在胰腺癌细胞内的浓聚过程的影响。

### 1 材料与方法

由于胰腺癌 PANC-1 细胞具有贴壁生长的特性, 收集细胞时若采用常用的消化方法将难以保证细胞内 5-FU 浓度的稳定。为确保检测样本中的 5-FU 均在细胞内, 本研究先将培养液除出并清洗干净后, 再将细胞刮下收集。在收集细胞的过程中有部分细胞被破坏, 不能用普通方法对细胞进行计数。本研究将根据平行样本中总蛋白含量来确定样本中的细胞数量, 再根据检测样本中 5-FU 含量与平行样本中细胞数量计算出单细胞中 5-FU 含

量,根据单细胞体积计算出单细胞内 5-FU 浓度。

### 1.1 仪器与试剂

所使用的化学试剂均为分析纯。HEPES(批号 H3375)、5-氟尿嘧啶(5-FU,批号 AMRESCO 0597)、潘生丁(批号 H4159)、茶碱(批号 AMRESCO 6523)等标准品均由美国 Sigma 公司生产,BCA 试剂盒(批号 23221)由美国 Pierce 公司生产,乙腈(批号 020328)为上海凌峰化学试剂公司生产,胎牛血清由杭州四季青公司提供,胰蛋白酶(批号 143913)由武汉中健科技发展公司提供。5-FU 储备液浓度为 1 mg/ml,茶碱溶于乙腈作为内标(25  $\mu$ g/ml)。

HP<sup>3D</sup>CE 型毛细管区带电泳仪为德国 Agilent 公司产品,毛细管柱由 Agilent 公司生产,酶标仪为日本 Bio-RAD 公司产品(Model 550)。

### 1.2 培养基和细胞的准备

胰腺癌细胞株 PANC-1 由德国乌尔姆大学赠送。细胞在直径 15 cm 的培养皿中用高糖 DMEM 培养基、含 10% 灭活胎牛血清、100 U/ml 青霉素、100 U/ml 链霉素和 12.5  $\mu$ mol/L HEPES 液培养(5% CO<sub>2</sub>,37<sup>o</sup>C)。待培养皿中细胞总数达 2  $\times 10^7$  个后进行以下实验:将所培养细胞分为 3 组,即 ENTs 阻断组、ENTs 非阻断组及空白组。ENTs 阻断组在应用 5-FU 的同时用潘生丁(100  $\mu$ mol/L)将 ENTs 阻断,ENTs 非阻断组仅用 5-FU 治疗。5-FU 的治疗浓度均为 100  $\mu$ g/ml,细胞温浴时间分别为 0,15,30 min,1,2,4 h。温浴结束后,细胞用冷 PBS(4<sup>o</sup>C,pH 7.2)冲洗 3 遍,洗净培养液,再用橡皮将细胞刮下收集。取等量刮下的细胞悬液两份各 100  $\mu$ l,一份用于测定细胞内 5-FU 浓度,另一份作为平行样本作蛋白定量以确定 100  $\mu$ l 细胞悬液中细胞数量,药物空白细胞备检测时消除背景用。

### 1.3 5-FU 含量测定

用毛细管区带电泳(CEZ)方法测定样本中 5-FU 的含量<sup>[7,10]</sup>。测定条件:毛细管柱内硅胶填充;柱长:61.8 cm,内径 50  $\mu$ m,检测电压:25.0 kV、电流:48.7  $\mu$ A;温度 30<sup>o</sup>C、检测波长:200 nm。检测前先将毛细管柱用 1 mol/L NaOH、0.1 mol/L NaOH、双蒸水分别洗 20 min。用茶碱作内标(25  $\mu$ g/ml),确定 5-FU 出峰位置。

测定已知 5-FU 浓度为 100,80,60,40,20  $\mu$ g/ml 和茶碱浓度为 25  $\mu$ g/ml 的峰面积,计算 5-FU 与茶碱的峰面积比值,求得 5-FU 浓度与峰面积比值的

标准曲线为  $y = 1.7285x + 0.257$  ( $r^2 = 0.998$ ,  $F = 961.5$ ,  $P < 0.01$ )。

为裂解细胞并去除样本中蛋白,细胞悬液与乙腈的比值为 1:2,震动混合后离心(9 000 g,3 min),取上清液与硼酸钠缓冲液(0.03 mol/L Na<sub>2</sub>BO<sub>4</sub>,pH 9.2)以 1:1 混匀,然后用 CZE 测定 5-FU 含量。每一样本取 3 次重复检测数据的平均值,根据所测得峰面积比值计算各样本中 5-FU 的含量。

### 1.4 测定细胞数量和细胞平均体积

确定样本中 5-FU 总含量后,根据受检平行样本总细胞蛋白确定 100  $\mu$ l 细胞悬液中细胞数,计算单细胞 5-FU 含量,再依细胞体积计算出单细胞内药物浓度。

为确定细胞数量与蛋白含量的关系,先确定吸光度与蛋白含量关系。将 BCA 试剂盒蛋白标准品配置成为 25,125,250,500,750,1 000,1 500,2 000  $\mu$ g/ml 系列浓度溶液,用 BCA 法测定各溶液的吸光度,求得吸光度与蛋白含量的标准曲线为  $y = 0.0004x + 0.011$  ( $r = 0.996$ ,  $F = 305.6$ ,  $P < 0.01$ )。

将 PANC-1 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化后收集细胞悬液,用 PBS 液定容至 10 ml。取 1 ml 细胞悬液用血细胞计数器(Leitz Wetzlar,德国)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。细胞裂解液由 1% 十二烷基硫酸钠、20  $\mu$ mol/L 盐酸三羟甲基氨基甲烷、2.5  $\mu$ mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)组成,每 10 毫升内放入 1 片蛋白酶抑制剂(Boehringer Mannheim,德国)。混合液体放置在冰上 30 min,然后离心 30 min(14 000 r/min,4<sup>o</sup>C)。上清液用 BCA 法于 540 nm 测定<sup>[10]</sup>。计算蛋白量,并求得蛋白含量与细胞数量的标准曲线为  $y = 426.1x + 11.15$  ( $r = 0.998$ ,  $F = 7448$ ,  $P < 0.01$ )。

平行样本细胞悬液 100  $\mu$ l 与细胞裂解液以 1:6 混合,用上述方法测定并根据标准曲线计算出单细胞内 5-FU 含量,即单细胞 5-FU 含量 = 检测样本中 5-FU 总量/检测样本中细胞数。

将 PANC-1 细胞用 0.25% 的胰蛋白酶消化分离后用 0.4% 台盼蓝(Sigma Aldrich, Irvine,英国)染色,然后借助显微镜连机图像程序,随机选取 46 个细胞测定直径,用公式  $V = (4/3) r^3$  计算细胞平均体积。单细胞内 5-FU 浓度 = 单细胞 5-FU 含量/细胞平均体积。

上述实验均重复 3 次,数据用 Excel (Version 2000)和 SPSS (Version 10.0)处理,均数用  $\bar{x} \pm s$  表示。

## 2 结果

所检测到的 5-FU 峰宽较小,峰高处于测定范围,5-FU 出峰处无明显干扰,分离良好(图 1),结果重现性良好,变异系数  $CV < 1\%$  ( $n=6$ )。5-FU 浓度与峰面积比值的标准曲线为  $y = 1.7285x + 0.257$ ,在标准曲线浓度范围内线性相关良好( $r = 0.998$ ,  $F = 961.5$ ,  $P < 0.01$ ),5-FU 最低检出浓度为  $1.64 \mu\text{g/ml}$ 。

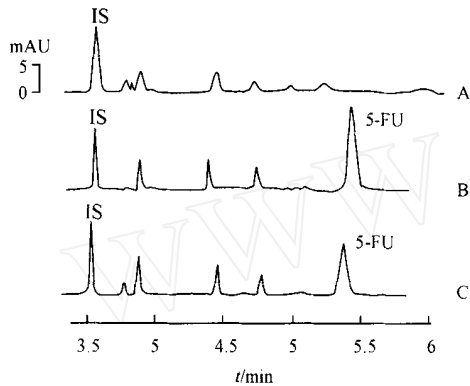


Fig 1. Electropherograms of (A) blank PANC-1 cell with theophylline (IS 0.14 mmol/L), (B) blank cell fortified with 5-FU (200  $\mu\text{g/ml}$ ) and theophylline, (C) PANC-1 cells incubated for 15 min in a culture medium containing 5-FU (100  $\mu\text{g/ml}$ )

测得 PANC-1 细胞平均直径为  $20.79 \pm 12.70 \mu\text{m}$ ,平均体积为  $4704.2 \pm 1092.4 \mu\text{m}^3$ (图 2,表 1)。

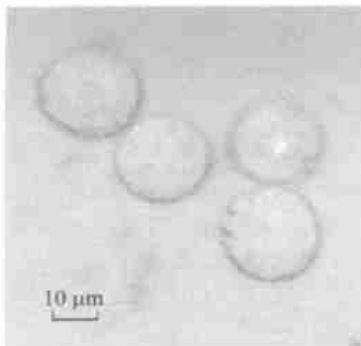


Fig 2. The cell diameters were randomly measured under the microscope by the use of a video imaging program. A standard micro-ruler side (Leitz Wetziar, 2 mm, 1 interval 0.001 mm) was used as a distance reference.

ENTs 非阻断组细胞内 5-FU 浓度在 15 min 内上升较快,达  $66.99 \pm 10.16 \mu\text{g/ml}$ ,为培养基中 5-FU 浓度的 67%,30 min 为  $83.75 \pm 5.333 \mu\text{g/ml}$ 。细胞内 5-FU 浓度于 60 min 达高峰( $92.86 \pm 1.604 \mu\text{g/ml}$ ),为培养基中 5-FU 浓度的 93%,以后处于平台(图 3)。

Tab 1. Intracellular 5-FU concentration in ENTs inhibited group and controls ( $n=3$ )

Exposure time (min)	ENTs inhibited group ( $\mu\text{g/ml}$ )	ENTs non-inhibited group ( $\mu\text{g/ml}$ )
15	$45.99 \pm 0.845^{**}$	$67.0 \pm 10.16$
30	$59.18 \pm 8.661^{***}$	$83.75 \pm 5.33$
60	$92.36 \pm 4.993^*$	$92.86 \pm 1.604$
120	$138.3 \pm 9.770^{***}$	$84.33 \pm 2.331$
240	$124.7 \pm 9.505^{***}$	$84.98 \pm 2.367$

\*  $P > 0.05$ ; \*\*  $P < 0.05$ ; \*\*\*  $P < 0.01$  vs control

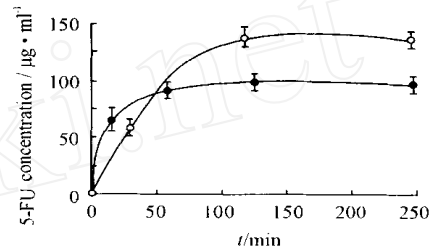


Fig 3. Intracellular concentration of 5-FU in PANC-1 cells vs exposure time to a medium containing (A) dipyrindamol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and 5-FU (100  $\mu\text{g/ml}$ ), (B) 5-FU (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Each data point represents the  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ) and the solid lines were determined using non-linear regression

ENTs 阻断组细胞内 5-FU 浓度上升较慢,15 min 仅为  $45.99 \pm 0.845 \mu\text{g/ml}$ ,为培养基中 5-FU 浓度的 46%;30 min 为  $59.18 \pm 8.661 \mu\text{g/ml}$ ,为培养基中 5-FU 浓度的 59%。1 h 达  $92.36 \pm 4.993 \mu\text{g/ml}$ ,2 h 达  $138.3 \pm 9.769 \mu\text{g/ml}$ ,为培养基中 5-FU 浓度的 1.38 倍,以后处于平台。如图 3 所示,若将上述 4 个时间点的细胞内 5-FU 浓度作相关分析,则发现 2 h 内细胞内 5-FU 浓度与时间呈直线相关( $y = 0.8832x + 34.28$ ,  $r = 0.996$ ,  $F = 291.52$ ,  $P < 0.01$ ) (图 4)。

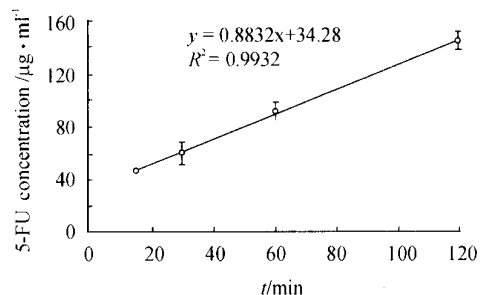


Fig 4. Intracellular concentration of 5-FU in PANC-1 cells vs exposure time to a medium containing dipyrindamol (100  $\mu\text{mol/L}$ ) and 5-FU (100  $\mu\text{g/ml}$ ). Each data point represents  $\bar{x} \pm s$  ( $n=3$ ) and the solid lines were determined using linear regression

随着细胞暴露时间延长,ENTs 阻断后 5-FU 在细胞内浓聚作用明显(图 3)。虽然 ENTs 阻断组 15 min 时细胞内 5-FU 浓度仅为 ENTs 非阻断组浓度

的 68.65%、30 min 时仅为 ENTs 非阻断组浓度的 70.66%、1 h 才达到 ENTs 非阻断组的最高浓度,但此后 ENTs 阻断组细胞内 5-FU 浓度仍继续升高,2 h 时细胞内 5-FU 浓度为 ENTs 非阻断组的 1.64 倍 ( $P < 0.01$ ),并高于 ENTs 非阻断组细胞内 5-FU 的最高浓度的 1.489 倍 ( $P < 0.01$ ) (表 1)。

### 3 讨论

5-FU 是常用的化疗药物,胰腺癌细胞对 5-FU 存在固有阻抗<sup>[6]</sup>,目前尚不清楚胰腺癌对 5-FU 的这种阻抗是否发生在药物进入细胞的环节。测定单细胞内 5-FU 浓度将便于与培养基中药物浓度进行比较,有利于了解 5-FU 在细胞内的浓聚过程,因此本文采用 Procházková 方法对单细胞内 5-FU 浓度测定<sup>[7]</sup>。在测定 5-FU 时,我们选择了多个检测波长,检测波长为 200 nm 时 5-FU 出峰较理想和稳定,5-FU 浓度与峰面积相关性好 ( $R = 0.998$ ,  $CV < 1\%$ ),因此选用检测波长为 200 nm。

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  $83.75 \pm 5.333 \mu\text{g/ml}$ ,1 h 时达高峰浓度 ( $92.86 \pm 1.604 \mu\text{g/ml}$ )。若扣除细胞核体积,此时胞浆中 5-FU 浓度可认为近似于培养基中浓度,结果与 Procházková 报道一致<sup>[7]</sup>。此后细胞内 5-FU 浓度不再上升,药物曲线形态处于平台,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,细胞膜对 5-FU 存在双向转运和转运有饱和现象。因此有理由认为,胰腺癌对 5-FU 阻抗并不是发生在细胞膜的转运过程,5-FU 主要以细胞内外浓度差为动力向细胞内移动。

ENT<sub>1</sub>和 ENT<sub>2</sub>在人类细胞膜上广泛存在<sup>[2]</sup>,但在 PANC-1 细胞上仅发现 ENT<sub>1</sub><sup>[8]</sup>。基于将 PANC-1 细胞膜 ENTs 完全阻断考虑,本文所使用潘生丁浓度远大于临床应用浓度<sup>[4]</sup>。研究结果显示,阻断 ENTs 后细胞内 5-FU 浓度上升速度明显下降,药物高峰时间明显延迟。从 15 min 至 2 h,细胞内药物浓度与时间呈线性相关 ( $y = 0.8832x + 34.28$ ,  $r = 0.996$ ,  $F = 291.52$ ,  $P < 0.01$ )。因此认为,此时潘生丁已阻断 ENTs 核苷转运蛋白,5-FU 进入细胞主要靠 CNTs 转运,且单位时间内 CNTs 转运 5-FU 的速率相等 ( $K_m = 0.883$ )。由于 CNTs 转运 5-FU 为向细胞内单向耗能转运过程,当细胞内 5-FU 浓度达

到一定水平后这种转运作用可能逐渐下降,2 h 以后细胞内药物浓度处于平台。一般认为 ENTs 是 5-FU 进入细胞的主要通道,ENTs 具有对底物转运速度快、流量高,而 CNTs 对底物转运效率相对较低<sup>[9]</sup>。在正常情况下,驱动 ENTs 转运的原动力为药物浓度梯度<sup>[10]</sup>。完全阻断 ENTs 后 5-FU 主要靠细胞膜上 CNTs 转运,因此早期细胞内 5-FU 的浓聚作用会明显降低。

阻断 ENTs 向细胞外返流过程一定时间后,5-FU 可在细胞内继续浓聚。本研究显示,在药物暴露 2 h 后细胞内 5-FU 浓度达  $138.3 \pm 9.768 \mu\text{g/ml}$ ,明显高于培养基中浓度 (1.4 倍) 和非阻断组细胞内浓度 (1.64 倍,  $P < 0.01$ )。这提示,阻断化疗药物的返流有可能成为提高细胞内药物有效浓度的手段之一,核苷类药物与 ENTs 阻断剂联合应用可能增加对胰腺癌细胞的毒性。临床上用 5-FU 除需要考虑血药浓度外,还需要考虑药物如何进入细胞并达到有效浓度等。为使药物有足够时间进入细胞,应用 5-FU 时临床多采用持续静滴。因此有理由认为,与 ENTs 阻断剂联合应用,5-FU 有足够时间在胰腺癌细胞内浓聚。

### 4 结论

ENTs 是细胞膜转运 5-FU 的主要通道,CNTs 也参与了 5-FU 的转运,胰腺癌细胞对 5-FU 阻抗并不是发生在细胞膜的转运过程。阻断胰腺癌细胞膜上 ENTs 核苷转运蛋白可增加 5-FU 在细胞内的浓聚,核苷类药物与 ENTs 阻断剂联合应用可能增加对胰腺癌细胞的毒性。

### 参考文献

- [1] Baldwin SA, Mackey JR, Cass CE, et al. Nucleoside transporters: molecular biology and implications for therapeutic development [J]. *Mol Med Today*, 1999, 5: 216-224.
- [2] Cass C, Young J, Baldwin S, et al. Nucleoside transporters of mammalian cells [J]. *Pharm Biotechnol*, 1999, 12: 313-352.
- [3] Mata J, Garcia M, Lostao M, et al. Role of the human concentrative nucleoside transporter (hCNT1) in the cytotoxic action of 5[Prime]-deoxy-5-fluorouridine, an active intermediate metabolite of capecitabine, a novel oral anticancer drug [J]. *Mol Pharmacol*, 2001, 59: 1542-1548.
- [4] Boyer C, Karjian P, Wahl G, et al. Nucleoside transport inhibitors, dipyridamole and p-nitrobenzylthioinosine selectively potentiate the antitumor activity of NB11 [J]. *Anticancer Drugs*, 2002, 13: 29-36.

- [5] Blaszkowsky L. Treatment of advanced and metastatic pancreatic cancer [J]. *Surgery*, 1998, **124**: 143-150.
- [6] 刘胜利, Friess H, Kleeff J, 等. 胰腺癌细胞株对 5-FU 存在固有 不敏感性[J]. 中国药科大学学报(*J China Pharm Univ*), 2002, **33**: 492-495.
- [7] Procházka A, Liu SL, Friess H, *et al.* Determination of 5-fluorouracil and 5-fluoro-2-deoxyuridine-5'-monophosphate in pancreatic cancer cell line and other biological material using capillary electrophoresis [J]. *J Chromatogr A*, 2001, **916**(1-2): 215-224.
- [8] Sundaram M, Yao S, Ingram J, *et al.* Topology of a human equilibrative, nitrobenzylthioinosine (NBMPR)-sensitive nucleoside transporter (hENT1) implicated in the cellular uptake of adenosine and anti-cancer drugs [J]. *J Biol Chem*, 2001, **276**: 45270-45275.
- [9] Pennycooke M, Chaudary N, Shuralyova I, *et al.* Differential expression of human nucleoside transporters in normal and tumor tissue [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2001, **280**: 951-959.
- [10] Ritzel M, Ng A, Yao S, *et al.* Recent molecular advances in studies of the concentrative Na<sup>+</sup>-dependent nucleoside transporter (CNT) family: identification and characterization of novel human and mouse proteins (hCNT3 and mCNT3) broadly selective for purine and pyrimidine nucleosides (system cib) [J]. *Mol Membr Biol*, 2001, **18**: 65-72.

## Effect of Inhibiting Equilibrative Nucleoside Transport Proteins with Dipyridamole on 5-FU Intracellular Accumulation in Pancreatic Cancer Cell

LIU Sheng-Li<sup>1</sup>, WANG Jing-Min<sup>1</sup>, JU Huang-Xian<sup>2</sup>, ZHU Guang-Hua<sup>3</sup>, DU Dan<sup>2</sup>, ZHU Chur-Fu<sup>1</sup>, XU Hao<sup>1</sup>, HUANG Hai<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Department of Surgery, Affiliated Zhong-Da Hospital, Southeast University, Nanjing 210009;

<sup>2</sup>Department of Analytical Chemistry, Chemistry and Chemical Engineering School, Nanjing University, Nanjing 210018

<sup>3</sup>Department of Sanitary Chemistry, Public Health School, Southeast University, Nanjing 210009, China

**【ABSTRACT】** AIM: To investigate the effect of blocking ENTs on the membrane of pancreatic cancer cell on 5-FU intracellular accumulation. METHOD: Cultured PANC-1 cells were divided into two groups, the ENTs inhibited group and the ENTs non-inhibited group. In ENTs inhibited group the ENTs on cells were inhibited by dipyridamole, while in ENTs non-inhibited group they were not inhibited by any drug. Cells in the two groups were cultured in the medium with 5-Fu (100 μg/ml). Cells were harvested with rubber policeman after 15, 30 min, 1, 2, 4 h incubation, respectively. Afterwards, two 100 μl cell suspensions were spliced, one was for 5-FU detection with capillary zone electrophoresis and the another parallel one for protein assay. Cell number in its parallel suspensions was defined according to the standard curve of total protein vs cell number. Then content of 5-FU in a single cell was determined and intracellular 5-FU concentration in a single cell was finally counted. RESULT: In ENTs non-inhibited group, 5-FU concentration in cells was increased quickly to 66.99 ± 10.16 μg/ml within the first 15 min and 83.75 ± 5.33 μg/ml in 30 min. The maximal intracellular 5-FU concentration was 92.86 ± 1.604 μg/ml at 60 min. Afterwards, the concentration curve produced a platform. In ENTs inhibited group, however, the intracellular 5-FU concentration was increased slowly in early stage. It was only 68.65% and 70.66% of that in ENTs non-inhabited group at 15 min and 30 min, respectively. The concentration of 5-FU equals to the maximal concentration of that in ENTs non-inhabited group. Afterwards, the intracellular 5-FU concentration was continuously accumulated in cells with the maximal concentration of 138.3 ± 9.769 μg/ml at 2 h, as 1.64 times as that in ENTs non-inhibited group (*P* < 0.01). These results implicated that after ENTs totally inhibited by dipyridamole the 5-FU intracellular concentration rises slowly in early stage and furthermore significantly accumulates in cell as the time prolonged. CONCLUSION: It is suggested that the intracellular 5-FU concentration in pancreatic cancer cells could be increased by the blockage of equilibrative nucleoside transporters

**【KEY WORDS】** Pancreatic cancer; Nucleoside transporter; 5-Fluorouracil; Dipyridamole; Capillary zone electrophoresis